



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA

**“Estudio de la actividad nucleasa de quelatos mixtos de Cu(II): Casiopeínas”**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M en C JUAN CARLOS GARCÍA RAMOS**

**DIRECTOR DE TESIS**

Dra. Lena Ruiz Azuara  
Facultad de Química, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

Dr. Antonio Campero Celis  
División de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAM Iztapalapa  
Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe  
Instituto de Química, UNAM-CCIQS

MÉXICO, D. F agosto de 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Química Inorgánica Medicinal (L-210) del departamento de Química Inorgánica y Nuclear de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los resultados incluidos en esta tesis han sido presentados de manera parcial o en su totalidad en los siguientes congresos:

**46° Congreso Mexicano de Química.** Querétaro, Querétaro, México. 10 al 14 de septiembre de 2011.

**11th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry.** Barcelona, España, 2 al 5 de diciembre de 2011.

**30 Congreso Latinoamericano de Química, CLAQ-2012,** Cancún, México, 27 al 31 de octubre del 2012.

**QUIMIUNAM 2012,** Auditorio Alfonso Caso, Ciudad Universitaria, México, 14 al 16 de noviembre de 2012.

**6° Encuentro de Química Inorgánica.** Puebla, Puebla, México. 25 al 28 de junio de 2013.

**Medicinal Redox Inorganic Chemistry 2013 conference. Redox Modulation of Health and Disease: From Inorganic Chemistry to Translational Medicine.** Erlangen-Nürnberg, Alemania. 20 al 22 de junio de 2013.

**International Conference on BioInorganic Chemistry ICBIC 16.** Grenoble, Francia. 22 al 26 de Julio de 2013.

**48° Congreso Mexicano de Química.** Guanajuato, Guanajuato, México. 31 de agosto al 4 de septiembre de 2013.

**Simposio Latinoamericano de Química de Coordinación y Organometálica**

**“SILQCOM” 2013.** Huatulco, Oaxaca, México, 13 al 17 de octubre de 2013.

**49° Congreso Mexicano de Química.** Mérida, Yucatán, México, 17 al 21 de septiembre de 2014.

Los resultados que aquí se presentan fueron publicados de manera parcial o en su totalidad en los siguientes trabajos:

Juan Carlos García-Ramos, Lena Ruiz-Azuara, Virtudes Moreno. **“Compuestos inorgánicos en el tratamiento del cáncer”** en **Aplicación de los compuestos metálicos en medicina. Una visión bioinorgánica.** Dinorah Gambino, Virtudes Moreno, Maribel Navarro (Editoras) **2012.** EDITORIAL ACADÉMICA ESPAÑOLA.

Juan Carlos García-Ramos, Araceli Tovar-Tovar, Joseelyne Hernández-Lima, Fernando Cortés-Guzmán, Rafael Moreno-Esparza, Lena 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.

Anllely Grizett Gutiérrez, Adriana Vázquez-Aguirre, Juan Carlos García-Ramos, Marcos Flores-Alamo, Enrique Hernández-Lemus, Lena Ruiz-Azuara, and Carmen Mejía. Copper (II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 126 (2013) 17-25.

Juan Carlos García-Ramos, Rodrigo Galindo-Murillo, Fernando Cortés-Guzmán, Lena Ruiz-Azuara. Metal-based drug-DNA interactions. (Review) **Journal of the Mexican Chemical Society**, 57 (2013) 245-259.

Juan Carlos García-Ramos, Rodrigo Galindo-Murillo, Virginia Gómez-Vidales, Araceli Tovar-Tovar, Ana Luisa Alonso-Saenz, Marcos Flores-Alamo, Luis Ortiz- Frade, Fernando Cortés-Guzmán, Rafael Moreno-Esparza, Antonio Campero, Lena Ruiz-Azuara. The  $\pi$ -back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu(II) antineoplastic compounds. Experimental and theoretical study. **Chemistry-A European Journal**, 20 (2014) 13730-13741.

Lorena Becco, Juan Carlos García-Ramos, Lena Ruiz-Azuara, Dinorah Gambino, Beatriz Garat. Analysis of the DNA interaction of copper compounds belonging to the Casiopeínas® antitumoral series. **Biological Trace Elements Research**, 161 (2014) 210-215.

Rodrigo Galindo-Murillo, Juan Carlos García-Ramos, Lena Ruiz-Azuara, Thomas E. Cheatham III, and Fernando Cortés-Guzmán. Intercalation processes of copper complexes in DNA. **Nucleic Acids Research**, 43 (2015) 5364-5376. Doi:10.1093/nar/gkv467.

“Recordarás algo de lo que leas, bastante de lo que oigas,  
mucho de lo que veas, y todo lo que hagas”

*Anónimo*

# Índice

<b>Índice general</b> .....	<b>6</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>8</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>12</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>13</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>14</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>17</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>20</b>
<b>1.1 Agentes que generan enlaces covalentes con el ADN</b> .....	<b>20</b>
<b>1.2 Antimetabolitos</b> .....	<b>22</b>
<b>1.3 Inhibidores de la topoisomerasa</b> .....	<b>23</b>
1.4 Antibióticos antitumorales .....	24
1.5 Agentes antimicrotubulares .....	25
1.6 Agentes hormonales.....	25
1.7 Agentes bioterapéuticos .....	26
1.8 Agentes misceláneos.....	28
<b>2.0 Antecedentes</b> .....	<b>45</b>
<b>3.0 Hipótesis</b> .....	<b>57</b>
<b>4.0 Objetivos</b> .....	<b>57</b>
<b>5.0 Resultados y discusión</b> .....	<b>58</b>
5.1 Síntesis y caracterización de Casiopeínas .....	58
5.2. Estudios de difracción de rayos X de monocristal .....	76
5.3. Comportamiento electroquímico .....	83
5.4 Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE).....	90
5.5 Correlación de propiedades encontradas .....	97
5.5.1 Evaluación de la ionicidad y la covalencia del enlace y efecto del sustituyente ...	97
5.6 Interacción de Casiopeínas con tioles.....	118
5.7 Interacción de Casiopeínas con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato. .....	130
5.8. Interacción de Casiopeínas con ADN de timo de bovino .....	155
5.9 Actividad nucleasa .....	170
5.10 Citotoxicidad en células tumorales .....	181

5.11 Citotoxicidad en células sanas .....	189
<b>6.0 Conclusiones .....</b>	<b>193</b>
<b>7.0 Sección experimental .....</b>	<b>198</b>
7.1 Síntesis de compuestos ternarios de Cu(II) .....	198
7.2 Caracterización de los compuestos de coordinación .....	198
7.2.1 Difracción de rayos X de monocristal .....	199
7.2.2 Estudio electroquímico .....	204
7.2.3 Espectroscopia RPE .....	204
7.2.4 Química computacional .....	205
7.3 Interacción de Casiopeínas con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato .....	205
7.4 Interacción de Casiopeínas con ADN-TB .....	206
7.5 Actividad nucleasa .....	206
7.5.1 Obtención de células competentes .....	206
7.5.2 Transformación de células competentes .....	207
7.6 Viabilidad de células tumorales .....	209
7.7 Cultivo de linfocitos y macrófagos de sangre periférica humana .....	211
<b>8.0 Referencias .....</b>	<b>213</b>
<b>9.0 Apéndice 1. Publicaciones .....</b>	<b>250</b>



## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Agentes que generan enlaces covalentes con el ADN empleados en terapia .....	21
<b>Figura 2.</b> Antimetabolitos empleados en terapia .....	22
<b>Figura 3.</b> Inhibidores de la topoisomerasa .....	23
<b>Figura 4.</b> Antibióticos antitumorales empleados en terapia .....	24
<b>Figura 5.</b> Agentes antimicrotubulares .....	25
<b>Figura 6.</b> Estructuras de algunos de los agentes hormonales empleados en terapia .....	26
<b>Figura 7.</b> Algunos agentes misceláneos empleados en terapia .....	29
<b>Figura 8.</b> Algunos compuestos de Rutenio que se encuentran en estudios de fase clínica .....	42
<b>Figura 9.</b> Estructura general de los compuestos de Rutenio denominados como taburete de piano.	43
<b>Figura 10.</b> Estructuras generales de Casiopeínas .....	49
<b>Figura 11.</b> Mecanismo de acción propuesto para la Casiopeína IIgly ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> (47dmfengly).....	54
<b>Figura 12.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>bpygly</b> .....	59
<b>Figura 13.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>bpysalal</b> .....	60
<b>Figura 14.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>44dmbpygly</b> .....	60
<b>Figura 15.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>44dmbpyacac</b> .....	61
<b>Figura 16.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>44dmbpysalal</b> .....	62
<b>Figura 17.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>55dmbpygly</b> .....	62
<b>Figura 18.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>55dmbpyacac</b> .....	63
<b>Figura 19.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>55dmbpysalal</b> .....	64
<b>Figura 20.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>fenacac</b> .....	65
<b>Figura 21.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>47dmfenacac</b> .....	66
<b>Figura 22.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>47dmfenser</b> .....	67
<b>Figura 23.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>47dmfenleu</b> .....	68
<b>Figura 24.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>5mfengly</b> .....	69
<b>Figura 25.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>56dmfengly</b> .....	71
<b>Figura 26.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>tmfengly</b> .....	72
<b>Figura 27.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>47døfenacac</b> .....	74
<b>Figura 28.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>47døfenser</b> .....	75
<b>Figura 29.</b> Estructuras molecular del compuesto <b>47døfenval</b> .....	76
<b>Figura 30.</b> Características estructurales de las Casiopeínas en estado sólido .....	82-83
<b>Figura 31.</b> Comportamiento electroquímico general.....	84-85

<b>Figura 32.</b> Comportamiento del potencial redox de los compuestos de coordinación.....	88
<b>Figura 33.</b> Espectros de RPE de los compuestos a) 55dmbpygly, b) 55dmbpyacac y c) 55dmbpysalal. ....	93
<b>Figura 34.</b> Gráfico de los valores $g_0$ frente $A_0$ para diferentes compuestos de coordinación cuya estructura fue confirmada por rayos X. ....	96
<b>Figura 35.</b> Efecto del cambio de la densidad de carga sobre la covalencia del enlace $\zeta$ .....	101
<b>Figura 36.</b> Cambio en la covalencia del enlace.....	104-105
<b>Figura 37.</b> Propiedades calculadas frente a experimentales.....	109-110
<b>Figura 38.</b> Momento dipolar y cuadrupolar del ion Cu(II) en los compuestos de coordinación....	113
<b>Figura 39.</b> Potenciales redox respecto a (ENH) de las Casiopeínas, agentes reductores y especies reactivas de oxígeno generadas.....	119
<b>Figura 40.</b> Espectro electrónico (a) y comportamiento de la absorbancia en función de la fracción mol de reductor .....	120
<b>Figura 41.</b> Voltamperogramas de 44dmbpycac en ausencia (rojo) y en presencia de diferentes equivalentes de cisteína.....	122
<b>Figura 42.</b> Espectros RPE del compuesto con diferentes equivalentes de tiol para asegurar la completa reducción del Cu(II) presente en la disolución .....	123
<b>Figura 43.</b> Espectro RPE de 44dmbpyacac con POBN en presencia y ausencia de GSH .....	124
<b>Figura 44.</b> Desdoblamiento del espectro de DMPO al formarse el aducto con radical hidroxilo y superóxido .....	125
<b>Figura 45.</b> Espectros RPE de 44dmbpyacac (1mM) en presencia de GSH (10 mM) y DMPO .....	126
<b>Figura 46.</b> Migración de hidrógeno que genera radicales en base carbono más estables que el radical tionilo formado al inicio. ....	127
<b>Figura 47.</b> a) Estado de transición encontrado para la reacción entre bpyacac, Cisteína y oxígeno molecular.....	128
<b>Figura 48.</b> Mecanismo de reacción propuesto en función de los resultados descritos en el texto de esta sección.....	130
<b>Figura 49.</b> Interacción de 44dmbpygly (a) y 44dmbpyacac (b) interactuando con diferentes equivalentes de adenina. ....	132
<b>Figura 50.</b> Espectros RPE de 44dmbpyacac (a) y 44dmbpygly (b) con diferentes equivalentes de adenina .....	133
<b>Figura 51.</b> Región central del espectro RPE donde se observan las siete señales asociadas al acoplamiento de un electrón con dos núcleos de cobre.....	134
<b>Figura 52.</b> Espectro RPE en donde se muestra el estado triplete debido a la gran cercanía de los núcleos de Cu(II). ....	136

<b>Figura 53.</b> Espectros RPE del compuesto 44dmbpyacac con 4 equivalentes de adenina donde se muestra el grado de transformación con el paso del tiempo hasta llegar al estado triplete. .....	137
<b>Figura 54.</b> Estructura molecular del compuesto $[\text{Cu}_2(56\text{dmfen})_2(\text{adenina})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$ mostrado a un 50% de ocupación.....	138
<b>Figura 55.</b> Diagrama ORTEP (50% de ocupación) que presenta la unidad asimétrica del aducto formado entre el compuesto $[\text{Cu}(44\text{dmbypy})(\text{acac})(\text{H}_2\text{O})]^+$ y la adenina.....	139
<b>Figura 56.</b> Fuerzas intermoleculares involucradas en la estabilización del aducto formado entre las adeninas y el compuesto 44dmbpyacac.....	140
<b>Figura 57.</b> Interacciones intermoleculares en el aducto 44dmbpyacac y adenina.....	141
<b>Figura 58.</b> Puentes de hidrógeno que pueden formarse entre dos unidades de adenina.....	142
<b>Figura 59.</b> Interacciones intermoleculares obtenidas del análisis QTAIM en donde se observan los puntos críticos de enlace y de las interacciones intermoleculares en el aducto, las adeninas y el compuesto de coordinación.....	144
<b>Figura 60.</b> Representación gráfica (flechas naranjas) de la transferencia de carga entre los ligantes del compuesto de coordinación y las adeninas que se presentan en el aducto. ....	146
<b>Figura 61.</b> Cambio en la población electrónica de todos los grupos involucrados en el aducto. Se tomo como referencia el compuesto de coordinación 44dmbpyacac para obtener los valores de la diferencia.....	146
<b>Figura 62.</b> Espectro electrónico de 44dmbpyacac con diferentes concentraciones de 2-desoxiadenosin-5monofosfato. ....	148
<b>Figura 63.</b> Estructura molecular del compuesto dinuclear obtenido de la interacción de 47dmfenacac con 2-desoxiadenosin-5-monofosfato.....	149
<b>Figura 64.</b> Interacciones $\pi$ - $\pi$ que se presentan entre los anillos de la fenantrolina y la adenina, así como entre fenantrolinas en el compuesto $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .....	151
<b>Figura 65.</b> Puentes de hidrógeno presentes entre distintas unidades del compuesto dinuclear $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .....	152
<b>Figura 66.</b> Puentes de hidrógeno formados entre las unidades de adenina presentes en los compuestos dinucleares $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . ....	153
<b>Figura 67.</b> Interacción de Casiopeínas con ADN-TB. ....	157
<b>Figura 68.</b> Espectro RPE experimental (azul) y simulado (negro) de una disolución que contiene 1mM de bpyacac con 0.001 mM de ADN-TB en una disolución amortiguada a pH= 7.2. .....	162
<b>Figura 69.</b> Gráfica donde se presentan los grupos de compuestos de Cu(II) con diferentes geometrías y el resultado de la interacción entre bpyacac y ADN-TB. ....	163

<b>Figura 70.</b> Resultado promedio de la dinámica molecular de la interacción entre bpyacac y ADN. .....	164
<b>Figura 71.</b> Cambio en la población electrónica de los participantes provenientes de la estructura promedio de las dinámicas moleculares.....	165
<b>Figura 72.</b> Representaciones del resultado de las interacciones encontradas en las simulaciones.	167
<b>Figura 73.</b> pRSET en presencia de diferentes amortiguadores. ....	171
<b>Figura 74.</b> Estudio de electroforesis con MOPS y HEPES en presencia y ausencia de Casiopeína 47dmfengly .....	172
<b>Figura 75.</b> Interacción entre ADN y las Casiopeínas 44dmbpyacac y 47dmfengly.....	173
<b>Figura 76.</b> Interacción de 500 ng de pRSET-B con las Casiopeínas estudiadas a una concentración 2.5 mM en presencia de BME 50 mM .....	174
<b>Figura 77.</b> Átomos de hidrógeno que pueden ser sustraídos más fácilmente de la cadena de ADN .....	176
<b>Figura 78.</b> Posibles mecanismos de ruptura una vez formado el radical sobre C1' .....	177
<b>Figura 79.</b> pRSET-B (500 ng) tratado con Casiopeína II-gly en presencia y ausencia de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	179
<b>Figura 80.</b> Ruptura de ADN plasmídico por la presencia de Casiopeínas e inhibición del proceso por adición del atrapador de radicales DMSO .....	180
<b>Figura 81.</b> Efecto de las Casiopeínas sobre la proliferación de células de neuroblastoma CHP-212. .....	182
<b>Figura 82.</b> Especies reactivas de oxígeno generadas por el tratamiento con Casiopeínas. ....	186
<b>Figura 83.</b> Las Casiopeínas inducen apoptosis.....	187
<b>Figura 84.</b> La apoptosis es principalmente por vía mitocondrial en células CHP-212 tratadas con Casiopeínas .....	188
<b>Figura 85.</b> Efecto de la administración de Casiopeínas sobre la viabilidad celular de macrófagos de sangre periférica humana. ....	190
<b>Figura 86.</b> Efecto de la administración de Casiopeínas sobre la viabilidad celular de macrófagos de sangre periférica humana. ....	192

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Agentes quimioterapéuticos empleados en clínica, mecanismos de acción y principales indicaciones terapéuticas.....	30
Tabla 2. Claves de las Casiopeínas .....	49
<b>Tabla 3.</b> Distancias (Å) y ángulos (°) de enlaces seleccionados .....	77
<b>Tabla 4.</b> Datos cristalográficos.....	79
Tabla 5. Potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) en mV de los compuestos estudiados .....	86
<b>Tabla 6.</b> Parámetros RPE para los compuestos de coordinación de Cu(II) con fórmula general [Cu (N-N) (X <sub>1</sub> -X <sub>2</sub> ) (H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> .....	91
<b>Tabla 7.</b> Propiedades seleccionadas de puntos críticos de enlace en unidades atómicas. .	109
<b>Tabla 8.</b> Parámetros electrónicos obtenidos de cálculo DFT .....	114
<b>Tabla 9.</b> Distancias y ángulos de enlace seleccionados para el compuesto [Cu <sub>2</sub> (47dmfen) <sub>2</sub> (2-desoxiadenosin-5-monofosfato) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)] 3H <sub>2</sub> O .....	1154
<b>Tabla 10.</b> Constantes de asociación de compuestos de coordinación de Cu(II) con ADN .....	159
<b>Tabla 11.</b> Viabilidad celular en cultivos de macrófagos de sangre periférica humana con diferentes dosis de las Casiopeínas <b>44dmfengly</b> , <b>47dmfenacac</b> , <b>44dmbpyacac</b> .....	190
<b>Tabla 12.</b> Viabilidad celular en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana con diferentes dosis de las Casiopeínas <b>44dmfengly</b> , <b>47dmfenacac</b> , <b>44dmbpyacac</b> .....	191
<b>Tabla 13.</b> Datos cristalográficos .....	200

## **Agradecimientos**

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A CONACyT (beca no. 239701) y a los proyectos CONACyT CB179119, REDES 194130, ICyTDF PIN VII-32, UNAM PAPIIT IN 218013 y CYTED 613RT0479 por el apoyo financiero.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara por la confianza, dedicación, estímulo y guía a lo largo de este satisfactorio camino en mi formación personal y profesional.

A mi comité tutor, Dr. Antonio Campero Celis y Dr. Bernardo Frontana Uribe, por la guía y todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

Al Dr. Fernando Cortés Guzmán, Dr. Rodrigo Galindo Murillo, Dra. Yanis Toledano Magaña, Dr. Marcos Flores Alamo, Dr. Luis Ortiz Frade, M. en C. Virginia Gómez Vidales, M. en C. Araceli Tovar Tovar y la Q. Lillian Ramírez por su maravillosa disposición y su apoyo incondicional, además de todos los consejos, enseñanzas y buenos ratos para lograr un increíble equipo de trabajo.

A la M. en C. Nayeli López Balbiaux, M. en I. Víctor Hugo Lemus Neri y a la Q. Marisela Gutiérrez Franco de la USAI por su apoyo en la caracterización de los compuestos.

## Resumen

En las últimas décadas la química inorgánica medicinal ha tenido un crecimiento muy importante generando una gran cantidad de compuestos de coordinación que se encuentran en las primeras etapas de estudios de fase clínica como posibles candidatos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, Alzheimer, diabetes, enfermedades parasitarias, entre muchas otras. Una de las etapas más importantes para que estos compuestos puedan llegar rápidamente a las fases clínicas es la obtención de evidencias acerca del mecanismo de acción a través del cual ejercen su actividad y su selectividad hacia células tumorales y sanas.

Los compuestos que presentan actividad antitumoral tienen dos blancos moleculares principales: el ADN y la mitocondria. Un ejemplo de éstos son los compuestos de coordinación de Cu(II) con fórmula general  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})]\text{NO}_3$ , donde N-N= diimina, N-O= aminoacido o péptido y O-O= acetilacetato o salicilaldehidato. Registrados bajo el nombre de Casiopeínas<sup>®</sup> han sido estudiados en modelos *in vitro* e *in vivo* en donde han mostrado actividad citotóxica y antitumoral y se plantea que son capaces de generar especies reactivas de oxígeno e interactuar directamente con ADN para provocar su actividad citotóxica.

En este trabajo se estudiaron 35 Casiopeínas con la finalidad de identificar la geometría adoptada por estos compuestos en estado sólido y en disolución, siendo ésta la de pirámide de base cuadrada en ambos casos. Se identificó la contribución de los ligantes diimina aromática (ligante primario), así como de la glicina, acetilacetato y el salicilaldehidato (ligantes secundarios) en la distribución de la densidad electrónica en toda la molécula y en particular sobre el centro metálico determinando el potencial redox y el ambiente

magnético del cobre en cada compuesto de coordinación a partir de los parámetros espectroscópicos obtenidos de la espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica. En todos los casos el principal modulador de la densidad electrónica son las diiminas aromáticas. Los valores experimentales de potencial redox y comportamiento magnético se explican a partir de nuevos descriptores electrónicos obtenidos con ayuda de la química computacional, entre los que se encuentran la densidad electrónica ( $\rho$ ), el laplaciano de la densidad electrónica ( $\nabla^2\rho$ ), el momento dipolar ( $\mu_{Cu}$ ) y el momento cuadrupolar ( $Q_{Cu}$ ) determinado sobre el centro metálico.

La interacción entre las Casiopeínas y algunos de los constituyentes como la adenina, la adenosina y el 2-desoxiadenosin-5-monofosfato permitió identificar una diferencia de estabilidad y de reactividad, en donde se identificó que los compuestos con acetilacetato son capaces de generar sistemas que presenten interacciones de apilamiento mientras que los compuestos con glicina presentan una sustitución del ligante secundario desde que se hace la mezcla de reacción. Aun cuando existe la diferencia de reactividad, se identificó que ambos compuestos (derivados con glicina y acetilacetato) generan compuestos dinucleares de Cu(II) con el paso del tiempo. De estos experimentos también se determinó la preferencia de coordinación del Cu(II) con los oxígenos del grupo fosfato respecto a los nitrógenos presentes en el ligante 2-desoxiadenosin-5-monofosfato.

Las Casiopeínas son capaces de generar radical superóxido y radical hidroxilo cuando reaccionan con glutatión o cisteína, siendo el primer paso de la reacción la coordinación del átomo de azufre al centro metálico. La reacción es acelerada cuando existe oxígeno molecular en la mezcla generando superóxido como especie intermediaria y finalmente radical hidroxilo.



La interacción de las Casiopeínas con el ADN es bastante fuerte presentando valores de constantes de asociación con valores de 1 a  $10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  obtenidas a partir de titulaciones espectrofotométricas. La interacción con el ADN se ve afectada por la posición que ocupan los sustituyentes, así como la naturaleza de los mismos. También se encontró que los compuestos con acetilacetato en su esfera de coordinación presentan en todos los casos valores de  $K_b$  mayores que los compuestos con glicinato.

Cuando se tiene en un mismo sistema Casiopeína, agente reductor (glutación o  $\beta$ -mercaptoetanol) y ADN, el material genético es degradado y el grado de ruptura depende de la concentración de Casiopeína empleada. La degradación del material genético se incrementa cuando se adiciona  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La ruptura del ADN se asocia a la capacidad de las Casiopeínas de generar radicales libres en las condiciones de reacción empleadas y esta propuesta se apoya al disminuir el grado de ruptura al adicionar al medio un atrapador de radicales (DMSO).

Finalmente, la citotoxicidad ejercida por estos compuestos lleva a las células a morir por vía apoptótica, en el caso de las células de neuroblastoma se activa la vía intrínseca. En estas células se observó un incremento de superóxido y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , una disminución importante de glutación intracelular así como daño en la mitocondria. Concentraciones similares de Casiopeína en linfocitos y macrófagos de sangre periférica humana generan una disminución de sólo el 20% de la población celular lo que permite establecer que las Casiopeínas presentan una mayor selectividad a inducir muerte celular en células tumorales con respecto a células sanas.

## Abstract

In recent decades medicinal inorganic chemistry has had a very significant growth generating a lot of coordination compounds that are in early stage clinical studies as potential candidates for treating diseases such as cancer, Alzheimer's, diabetes, parasitic diseases, among others. One of the most important stages for these compounds to quickly reach clinical phases is to obtain evidence about the mechanism of action through which they operate, and their selectivity for tumor cells and healthy cells. For compounds having antitumor activity two key molecular targets are DNA and mitochondria. Cu (II) coordination compounds with general formula  $[\text{Cu} (\text{N-N}) (\text{N-O})] \text{NO}_3$  and  $[\text{Cu} (\text{N-N}) (\text{O-O})] \text{NO}_3$ , where N-N = diimine, N-O = aminoacidato or peptide and O-O = acetylacetonato or salicilaldehydato have been registered under the name Casiopeínas<sup>®</sup>. These compounds have shown cytotoxic and antineoplastic activity on the *in vitro* and *in vivo* models and it has been stated that they are capable of generating reactive oxygen species and directly interact with DNA to cause their cytotoxic activity. In this work, 35 Casiopeínas have been studied in order to identify the geometry adopted by these compounds in solid state and in solution, this being the square pyramid in both cases. The contribution of aromatic diimine ligands (primary ligands) and glycine, acetylacetonate and salicilaldehydato (secondary ligands) in the electron density distribution throughout the molecule and in particular on the metal center was identified by determining the redox potential and the magnetic environment for copper ion in each coordination compound through the spectroscopic parameters obtained from cyclic voltammetry and electron paramagnetic resonance spectroscopy, respectively. In all cases the principal modulator of electron density is the aromatic diimine. The experimental values of redox potential and

magnetic behavior can be described from new electronic descriptors obtained using computational chemistry, among which are the electron density ( $\rho$ ), the Laplacian of the electron density ( $\nabla^2\rho$ ), dipolar ( $\mu_{Cu}$ ) and the quadrupole moment ( $Q_{Cu}$ ) determined on the metal center.

The interaction between Casiopeínas with DNA constituents such as adenine, adenosine and 2-desoxyadenosine-5-monophosphate allowed identify a difference of stability and reactivity. Compounds with acetylacetonate are capable to generate systems experiencing stacking interactions while compounds with glycine have a replacement of secondary ligand even since the reaction mixture just was made. Although at the end, both compounds generate dinuclear Cu compounds (II). From these experiments, coordination preference of Cu (II) with the oxygens of the phosphate group regarding nitrogens present in the ligand 2-desoxyadenosine-5'-monophosphate was determined.

The Casiopeínas are able to generate superoxide and hydroxyl radical when they react with glutathione or cysteine, the first reaction step is the coordination of the sulfur atom to the metal center. The reaction is accelerated when molecular oxygen is present in the reaction mixture, the superoxide anion is generated as intermediate specie and hydroxyl radical is produced as the final product.

The interaction with DNA is quite strong with association constants values  $K_b = 1$  to  $10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  obtained from spectrophotometric titrations. DNA interaction is affected by nature and position of the aromatic diimine's substituent. It was also found that compounds with acetylacetonate in its coordination sphere in all cases have greater  $K_b$  values than compounds with glycinate.

When in the same system coexist Casiopeína, reducing agent (glutathione or  $\beta$ -

mercaptoethanol) and DNA, the genetic material is degraded and the degree of rupture depends on the concentration of Casiopeína employed. Degradation of genetic material increases when  $H_2O_2$  was added. DNA breakage is associated with the ability of Casiopeínas of generating free radicals in the reaction conditions employed and this proposal is supported by decreasing the extent of cleavage upon addition to a radical trap, means DMSO.

Finally, cytotoxicity effect exerted by these compounds leads to the cells to die by apoptotic pathway, in the case of neuroblastoma cells activates the intrinsic pathway. In these cells increased levels of superoxide and  $H_2O_2$ , a significant decrease in intracellular glutathione as well as damage to the mitochondria was observed. Similar concentrations used in human peripheral blood macrophages and lymphocytes only produce a 20% decrease of the cell population allowing establishing that the Casiopeínas exhibit selectivity in the induction of cell death over tumor cells regarding to healthy cells.

## **1. Introducción**

De acuerdo a los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en el 2014 los tumores malignos ocupaban el tercero y cuarto lugar entre las principales causas de muerte, respectivamente.<sup>1,2</sup>

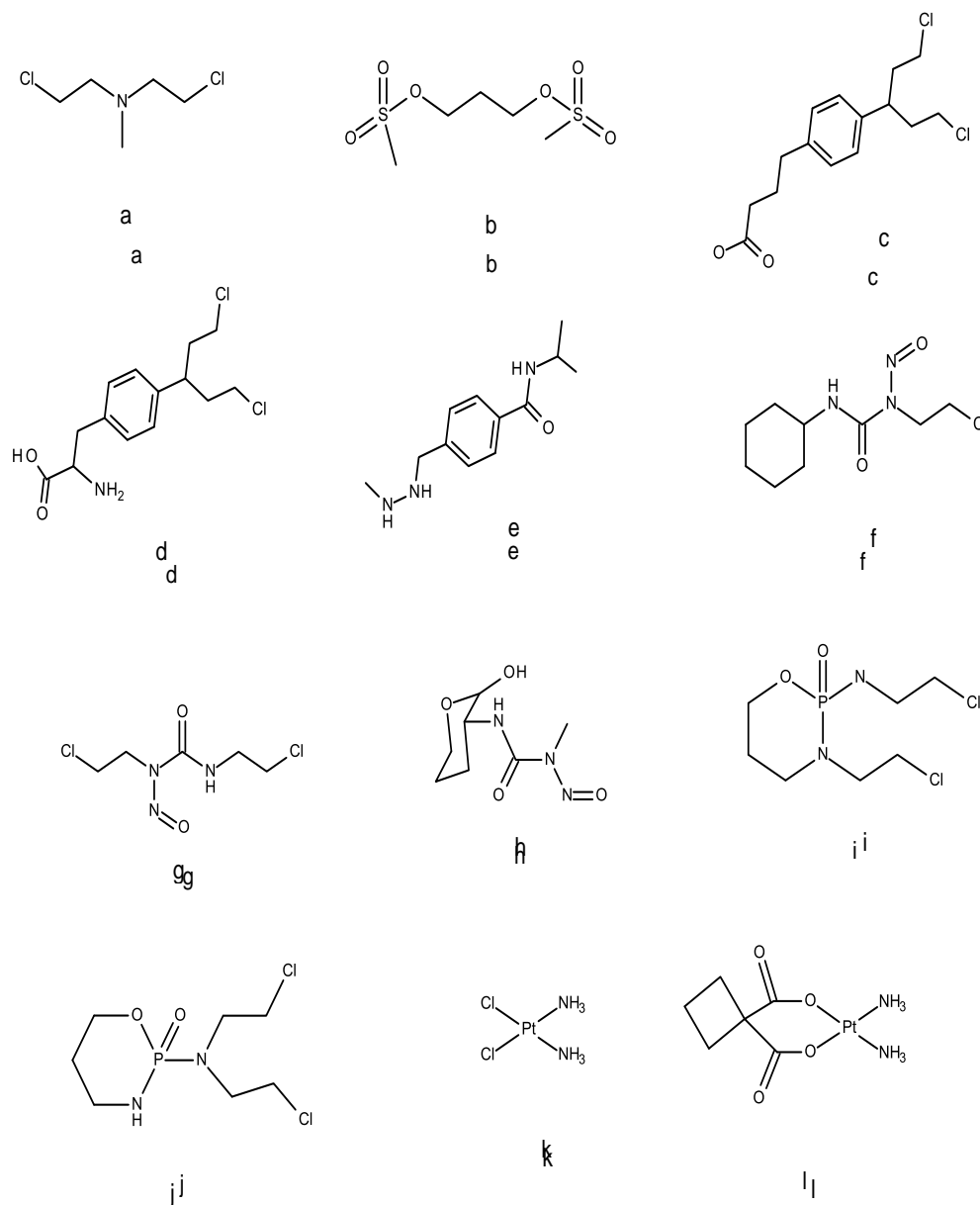
El tratamiento de este conjunto de enfermedades conocidas como cáncer sigue teniendo como base fundamental a tres procedimientos: i) cirugía, ii) quimioterapia y iii) radioterapia.<sup>3</sup> Aunque en las últimas décadas se han logrado avances importantes en nuevas alternativas como la inmunoterapia y terapias dirigidas, estas terapias no son del todo accesibles para el grueso de la comunidad con requerimientos de tratamiento,<sup>3</sup> lo que hace necesario el continuar desarrollando nuevas estrategias de tratamiento, entre ellas, nuevos agentes quimioterapéuticos.

Los agentes quimioterapéuticos para tratar el cáncer están clasificados de manera inicial en función de su origen, naturales o sintéticos (orgánicos o inorgánicos). Sin embargo, una clasificación mucho más útil para el desarrollo de nuevos compuestos antineoplásicos es en función de su mecanismo de acción. La literatura no presenta un listado único de clasificación pero si es posible encontrar coincidencia en varios grupos principales enlistados a continuación. A continuación se presenta una descripción general de cada grupo así como las estructuras de algunos ejemplos representativos.<sup>4-11</sup>

### **1.1 Agentes que generan enlaces covalentes con el ADN**

Son compuestos altamente reactivos que se unen fácilmente al ácido desoxirribonucleico (ADN) y en la gran mayoría de la literatura se encuentran clasificados como agentes

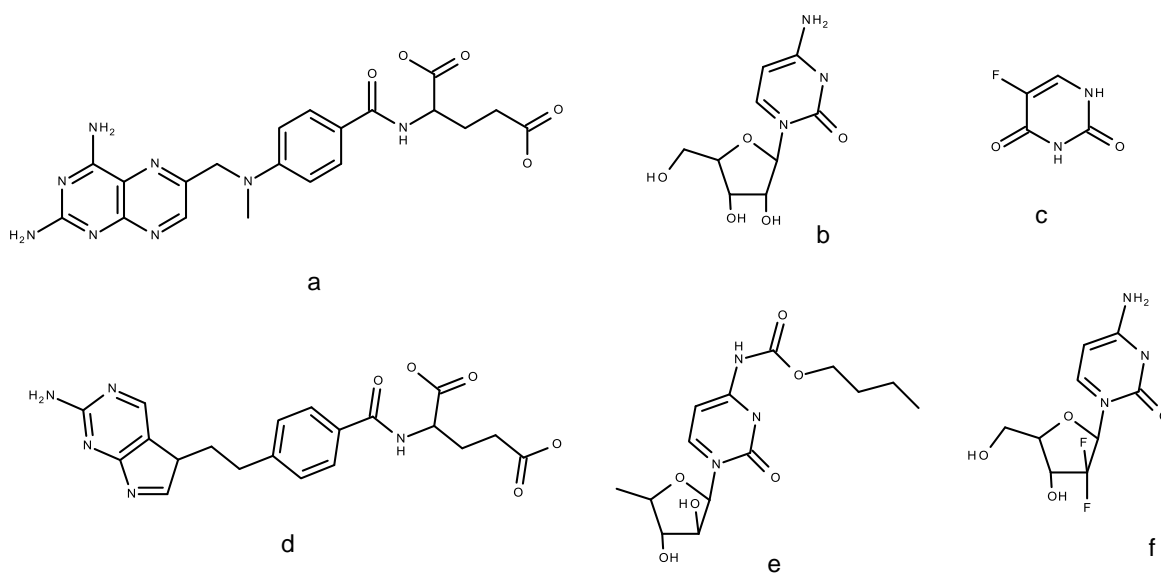
alquilantes. Su principal modo de acción es a través del entrecruzamiento de las hebras del ADN. El proceso mencionado puede ser mono- o bi-funcional involucrando una o dos hebras del ADN. Los agentes alquilantes son ampliamente empleados en el tratamiento de linfomas, enfermedad de Hodgkin, cáncer de mama y mieloma múltiple. En la figura 1 se presentan algunos de estos compuestos empleados en terapia.



**Figura 1.** Agentes que generan enlaces covalentes con el ADN empleados en terapia. a) mecloretamina, b) busulfan, c) clorambucilo, d) melfalán, e) procarbazina, f) lomustina, g) carmustina, h) estreptoizocina, i) ifosfamida, j) ciclofosfamida, k) cisplatino, l) carboplatino.

## 1.2 Antimetabolitos

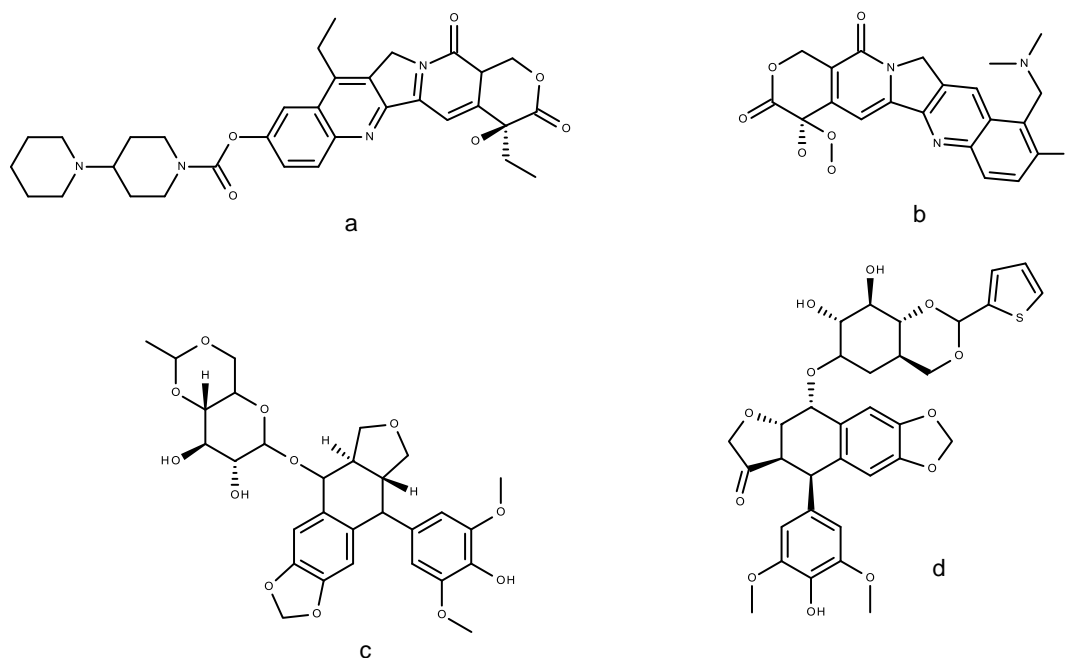
Los antimetabolitos interfieren la síntesis de ARN, ADN y proteínas. Estos compuestos ejercen su actividad principalmente en la fase S del ciclo celular. Algunos antimetabolitos son análogos estructurales de los metabolitos normales esenciales para el crecimiento y duplicación celular (antimetabolitos de pirimidina). Lo anterior permite que los antimetabolitos sean incorporados al ARN o al ADN generando un “mensaje falso”. Otros antimetabolitos inhiben enzimas que son necesarias para la síntesis de compuestos esenciales (antifolatos). Los productos naturales se dividen en cinco grupos principales: análogos de la camptotecina, epipodofilotoxinas, antibióticos antitumorales, agentes antimicrotubulares y enzimas. Las estructuras de algunos antimetabolitos empleados en terapia se presentan en la figura 2.



**Figura 2.** Antimetabolitos empleados en terapia. a) metotrexato, b) cytarabine, c) 5-fluorouracilo, d) pemetrexed, e) capecitabine, f) gemcitabina.

### 1.3 Inhibidores de la topoisomerasa

Las topoisomerasas modifican la estructura terciaria del ADN para facilitar el proceso de replicación o expresión de genes. La topoisomerasa I (topo I) es una enzima esencial para resolver los problemas de torsión asociados a la replicación del ADN, transcripción y condensación de cromatina. La enzima comienza el proceso rompiendo el ADN y forma un enlace covalente con la estructura fraccionada, esto provoca la relajación del ADN y posteriormente la enzima vuelve a unir el enlace fosfato roto para regenerar la estructura del ADN. La topoisomerasa II (topo II) también es una enzima esencial para la replicación del ADN, pues esta forma es un intermediario escindible con el ADN que permite la replicación del ADN y después lo vuelve a unir para regenerar la doble hebra. Ejemplos de inhibidores de topo I son el irinotecan y topotecan mientras que topo II es inhibida por el etopósido y el tenopósido.

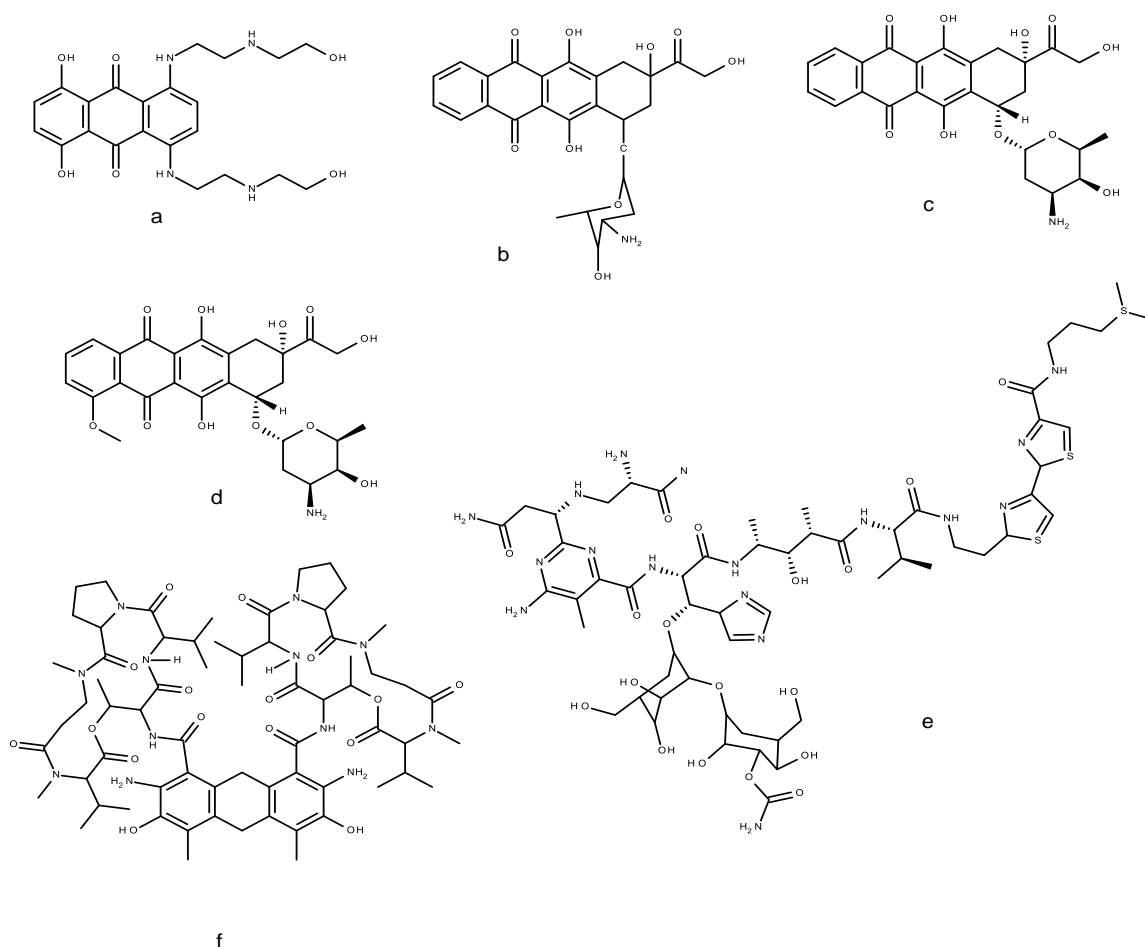


**Figura 3.** Inhibidores de la topoisomerasa. a) Irinotecan, b) Topotecan, c) Etopósido, d) Tenipósido.



## 1.4. Antibióticos antitumorales

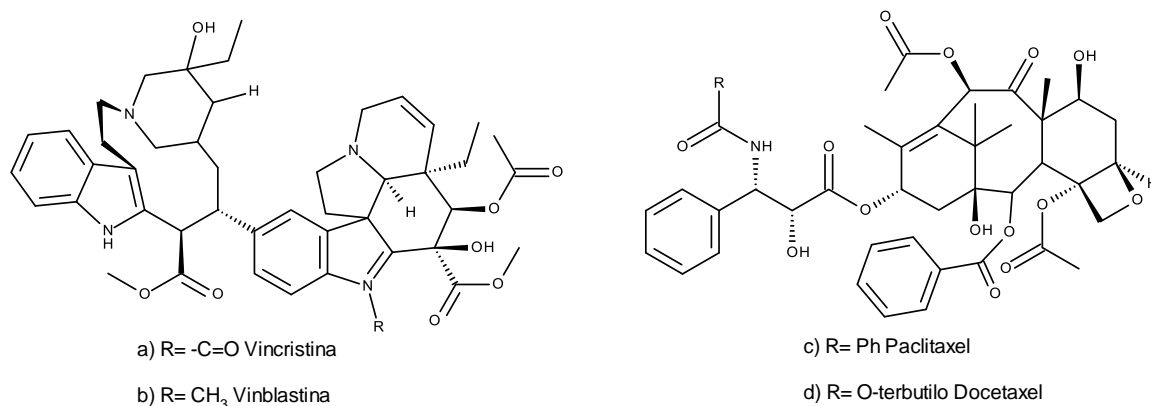
Esta clase de agentes quimioterapéuticos incluyen a las antraciclinas, la bleomicina y la dactinomicina, sus estructuras se presentan en la figura 4. Todos los miembros de este grupo son obtenidos de bacterias u hongos. Dentro de las antraciclinas la doxorubicina es un producto natural, mientras que la epirubicina, mitoxantrona e idarubicina son compuestos semisintéticos. El mecanismo de acción por el cual ejercen el efecto citotóxico es a través de la inhibición de la topo II (no se encuentra en el grupo de inhibidores de la topoisomerasa debido a su origen).



**Figura 4.** Antibióticos antitumorales empleados en terapia. a) mitoxantrona, b) epirubicina, c) idarubicina, d) doxorubicina, e) bleomicina, f) actinomicina.

## 1.5 Agentes antimicrotubulares

Este grupo incluye a los taxanos paclitaxel y docetaxel así como a los alcaloides vincristina, vinblastina y vindesina. En la célula los microtúbulos existen en un equilibrio dinámico con los heterodímeros de tubulina, constituidos por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$ . Tanto paclitaxel como docetaxel promueven el ensamble de los microtúbulos a través de la unión con las subunidades  $\beta$  de la tubulina. De esa manera, la depolimerización de los microtúbulos se evita, interrumpiendo así la división celular normal y causando la detención del ciclo celular. La posterior fosforilación de la proteína Bcl-2 genera el desencadenamiento de la muerte celular vía apoptosis.

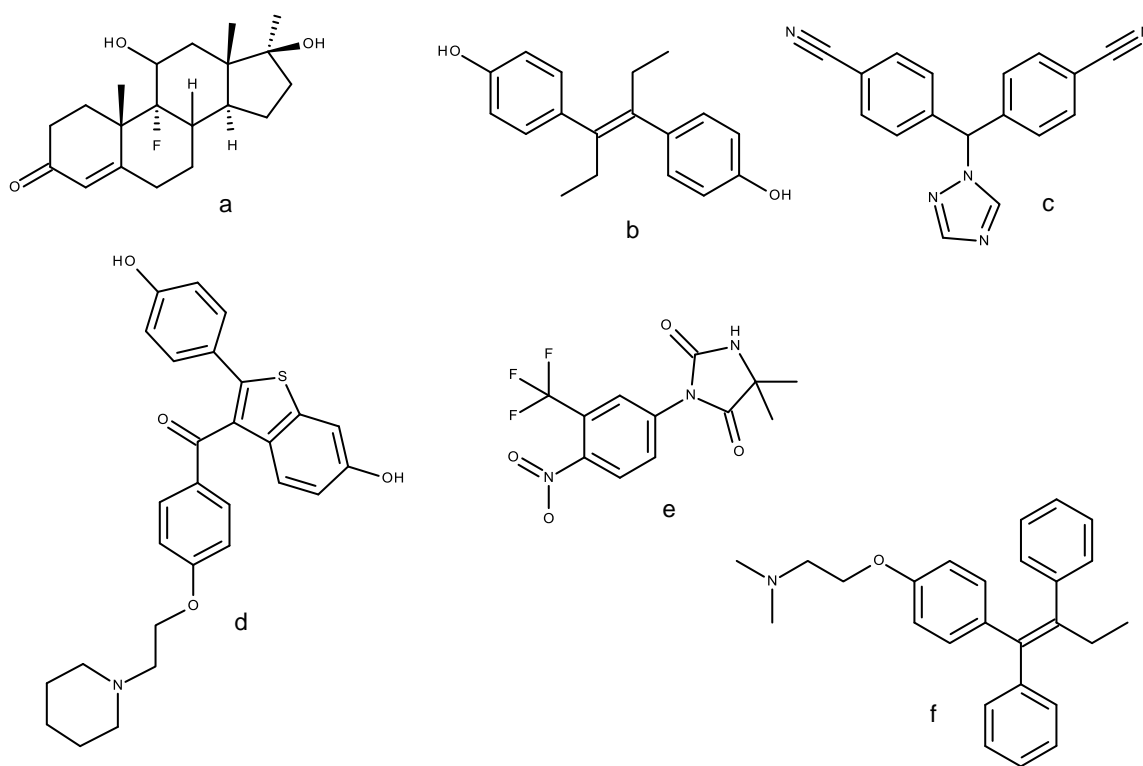


**Figura 5.** Agentes antimicrotubulares. a) Vincristina, b) Vinblastina, c) Paclitaxel, d) Docetaxel

## 1.6 Agentes hormonales

El manejo hormonal del cáncer dependía del uso de andrógenos, estrógenos y progestinas, sin embargo, en los últimos años han sido reemplazados por antagonistas de estrógenos, inhibidores de la aromatasas y análogos de la hormona liberadora de la hormona

leutinizante. Estos compuestos tienen los efectos adversos esperados como la escasez de estrógeno, fatiga, sofocos, disminución variable de la densidad mineral ósea, náuseas y en algunos casos una mayor incidencia de fenómenos tromboembólicos. Las estructuras de algunos de estos compuestos se presentan en la figura 6.



**Figura 6.** Estructuras de algunos de los agentes hormonales empleados en terapia. a) Fluoximesterona, b) Dietilestilbestrol, c) Letrozol, d) Raloxifeno, e) Nilutamida y f) Tamoxifeno.

### 1.7 Agentes bioterapéuticos

El sistema inmunológico es el responsable de la protección del cuerpo frente a agentes perjudiciales como las bacterias, virus y el cáncer. Las investigaciones recientes de la respuesta inmunológica relacionada con procesos tumorigénicos han permitido tener un mayor conocimiento respecto a la biología del cáncer y diseñar modificadores de la

respuesta biológica así como anticuerpos monoclonales dirigidos eficaces como alternativas de tratamiento.

Derivado de estas investigaciones se encuentran los interferones. Los interferones se aislaron originalmente de leucocitos humanos como agentes antivirales, pero el interferón alfa-2 que utilizamos hoy en día en la terapia del cáncer es un producto recombinante. Por otro lado las interleucinas (IL) son una familia de citocinas, sustancias secretadas por las células T (linfocitos), monocitos, macrófagos y otras células. Los anticuerpos monoclonales se nombran y clasifican de acuerdo a su origen, los anticuerpos monoclonales murinos llevan un sufijo “momab”, estos son eliminados rápidamente del cuerpo y tienen mayor posibilidad de inducir una reacción anticuerpo humano anti-ratón (HAMA, por sus siglas en inglés). Los anticuerpos quiméricos humano-ratón poseen la terminación “imab” y son más eficientes y eficaces en la destrucción de las células a través de citotoxicidad dependiente del complemento y respuesta de anticuerpo mediada por células dependiente de anticuerpos. Los anticuerpos monoclonales humanizados tienen la terminación 'umab' y es poco probable que desencadenen una respuesta HAMA.

La terapia con anticuerpos monoclonales se basa en la capacidad de dirigirse a los marcadores y se unen a antígenos de la membrana celular con gran especificidad. Muchas veces la especificidad mejorada mostrada hacia los antígenos tumorales permite que las células normales se protejan contra los efectos perjudiciales, a diferencia de la quimioterapia convencional. Hay varios mecanismos por los cuales los anticuerpos monoclonales destruyen o impiden la replicación de células malignas. Algunos anticuerpos monoclonales utilizan la respuesta inmunológica del tumor y componentes del mecanismo de defensa natural del tumor para ejercer su efecto. Por ejemplo, los anticuerpos

monoclonales pueden utilizar a las células efectoras tumorales para promover la lisis de células tumorales o tienen la capacidad de modular directamente su función en el tumor.

### **1.8 Agentes misceláneos**

En este grupo se encuentran muchos de los medicamentos que ejercen su efecto citotóxico a través de diferentes mecanismos de acción afectando varios blancos moleculares al mismo tiempo o aquellos cuyo mecanismo de acción no puede ser clasificado dentro de alguno de los grupos definidos anteriormente.

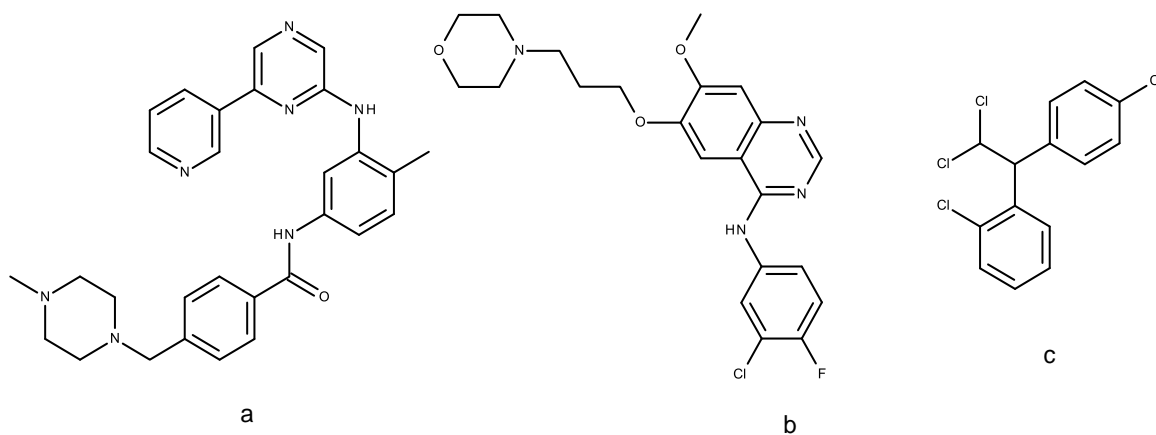
Denileukin diftitox es una proteína que combina a la interleucina-2 con la toxina de la difteria para destruir células con el receptor de interleucina-2 a través de la inhibición de síntesis de proteínas. Es empleado principalmente en linfomas cutáneos de células T en pacientes que expresan el componente CD 25 del receptor IL-2.

Mitotane es un agente citotóxico adrenal producido por Bristol Meyer Squibb comercializado como un fármaco para enfermedades huérfanas debido al pequeño número de pacientes que requieren emplearla. Mitotane altera el metabolismo periférico esteroide, suprime directamente la corteza suprarrenal y altera el metabolismo que conduce a la cortisona hipocortisolismo.

Por otro lado, los inhibidores de las tirosina cinasas están diseñados para interferir en pasos críticos del metabolismo de células tumorales que son más vulnerables que en células normales. Estos inhibidores son muy importantes en situaciones en donde se ha identificado algún gen particular que genera proteínas que llevan al proceso tumoral. Un ejemplo de estos procesos está asociado con la alteración genética Bcr-Abl también conocida como cromosoma Filadelfia. La fusión accidental de los genes Bcr y Abl da lugar a un nuevo gen

que produce una proteína anormal. Esta proteína anormal, un tipo de tirosina cinasa, produce el crecimiento anormal y fuera de control de linfocitos, dando lugar a la leucemia. Para tratar esta enfermedad se emplea Imatinib, que inhibe a la proteína tirosina cinasa Bcr-Abl e induce la apoptosis en las células.

Los inhibidores de la señalización transduccional ejercen su actividad antitumoral evitando la activación de las enzimas tirosina cinasas que son necesarias para el funcionamiento de los factores de crecimiento epidérmico. Gefitinib es el primer inhibidor selectivo del receptor del factor de crecimiento epidérmico dominio de tirosina quinasa (EGFR, por sus siglas en inglés). EGFR está localizado en una gran cantidad de células tumorales como colon, hígado y cabeza y cuello. La figura 7 presenta la estructura de algunos agentes misceláneos.



**Figura 7.** Algunos agentes misceláneos empleados en terapia. a) Imatinib, b) Getifinib y c) Mitotane.

En la tabla 1 se describe de manera general el mecanismo de acción, las principales indicaciones terapéuticas y la toxicidad general.<sup>4-11</sup>

**Tabla 1.** Agentes quimioterapéuticos empleados en clínica, mecanismos de acción, principales indicaciones terapéuticas y toxicidad general.<sup>4-11</sup>

Medicamento	Mecanismo de acción	Indicaciones	Toxicidad
<b>1.1 Agentes que generan enlaces covalentes con el ADN (agentes alquilantes)</b>			
Ciclofosfamida	Profármaco que se biotransforma en el hígado para generar metabolitos activos (vía la hidroxilación en la posición 4 llevada a cabo por el citocromo P450) que alquilan el ADN provocando mala codificación y entrecruzamiento de las hebras del ADN.	Linfoma, adenocarcinoma mamario, sarcomas y leucemia linfática.	Depresión de medula ósea (anemia, leucopenia, trombocitopenia). Cistitis hemorrágica. Cáncer de vejiga.
Ifosfamida	Análogo de la ciclofosfamida, también se biotransforma en el hígado para generar los metabolitos activos.	Linfoma recurrente y varios sarcomas	
Clorambucilo	Alquila ADN provocando mala decodificación y entrecruzamiento de las hebras del ADN; el agente alquilante más lento en actuar	Leucemia linfática crónica, linfoma de células pequeñas	
Mecloretamina	Alquila ADN provocando mala decodificación y entrecruzamiento de las hebras del ADN	Linfoma de Hodgkin, linfosarcoma, leucemia mieloide crónica, cáncer broncogénico.	Depresión de la médula ósea. Disfunción de las gónadas y en algunas ocasiones leucemia tardía
Melfalán	Alquila ADN provocando mala decodificación y entrecruzamiento de las hebras del ADN	Mieloma múltiple	
Procarbazina	Es metabolizada y activada en el hígado. El mecanismo de acción completo no está dilucidado, pero se genera peróxido de hidrógeno y azo-procarbazina que funciona como el agente alquilante.	Linfoma de Hodgkin y glioblastoma multiforme	
Busulfan	Alquila ADN provocando mala decodificación y entrecruzamiento de las hebras del ADN.	Leucemia mieloide crónica	
Carmustina	Después de su administración se unan a lípidos y tienen un gran volumen de distribución y también un alto grado de penetración en sistema nervioso central (SNC). Es un compuesto inestable que se	Tumores cerebrales y mieloma múltiple.	Depresión de la medula ósea. Fibrosis pulmonar.

	descompone espontáneamente generando las especies alquilantes.		
Lomustina (CCNU)	Después de su administración se unan a lípidos y tienen un gran volumen de distribución y también un alto grado de penetración en sistema nervioso central (SNC). Es un compuesto inestable que se descompone espontáneamente generando las especies alquilantes.	Linfoma, mastocitoma, sarcoma histiocítico, neoplasias de sistema nervioso central (SNC), mieloma múltiple.	Depresión de la medula ósea. Fibrosis pulmonar.
Estreptozocina	Inhibe la síntesis de ADN; alta afinidad por células $\beta$ pancreáticas.	Insulinoma	Depresión de medula ósea. Daño renal.
Temozolamida	Alquila ADN provocando mala codificación y entrecruzamiento de las hebras del ADN.	Melanomas malignos y tumores cerebrales que incluyen astrocitomas y gliomas.	
Cisplatino	Forma enlaces entrecruzados inter e intra-cadena con las hebras del ADN lo que inhibe la replicación del ADN y desencadena la señalización apoptótica.	Cáncer testicular, de ovario, vejiga, pulmón, de células escamosas de cabeza, cuello y ano.	Depresión de medula ósea. Ototoxicidad. Neuropatía periférica. Mielosupresión, náusea y vómito.
Carboplatino	El mismo mecanismo de acción que cisplatino pero con proporciones de aductos formados diferentes.	Cáncer testicular, de ovario, vejiga, pulmón, de células escamosas de cabeza, cuello y ano.	
Oxaliplatino	El mismo mecanismo de acción que cisplatino y carboplatino	Cáncer colorectal	

### 1.2 Antimetabolitos

Metotrexato (MTX)	Inhibición de la dihidrofolato reductasa que es requerida para la formación de tetrahidrofolato, un cofactor necesario para la síntesis de timidilato. El timidilato es esencial en la síntesis y reparación de ADN.	Leucemia linfática aguda, Linfoma no-Hodgkin y cáncer de mama.	El efecto principal es el daño a células normales que incorporan estos antimetabolitos, por ello las células más afectadas son aquellas de rápida proliferación como la médula ósea, el sistema
5-fluorouracilo (5-FU)	Análogo de la pirimidina, interfiere con la síntesis de ADN y puede ser incorporado en el ARN provocando efectos tóxicos	Carcinomas sistémicos y cutáneos.	
Cytarabine	Análogo de la pirimidina, se incorpora en el ADN	Linfomas (incluyendo SNC) y	



	provocando impedimento estérico que lleva a la inhibición de la síntesis de ADN. Presenta actividad sinérgica con agentes alquilantes, análogos de purina y MTX.	leucemias. No presenta actividad en tumores sólidos.	linfático y el epitelio gastrointestinal. Los principales efectos tóxicos son depresión de la médula ósea, náusea, vómito, diarrea y mucositis.
Gemcitabina	Análogo de la pirimidina, es activado enzimáticamente a través de una fosforilación para generar los metabolitos activos que se incorpora en el ADN provocando impedimento estérico que lleva a la inhibición de la síntesis de ADN.	Alta eficacia en el tratamiento de carcinoma de pulmón de células no pequeñas. Eficacia moderada en linfoma y en varios carcinomas.	Cytarabine puede provocar conjuntivitis.
Capecitabine (Xeloda, Roche)	Pro-fármaco que genera 5-FU. Es convertido en el hígado por la enzima carboxilesterasa a 5'-doxi-5-fluorocitidina. Ésta es convertida por una citidina deaminasa en 5'-deoxi-5-fluorouridina y posteriormente, ya en tejido tumoral, la timidina fosforilasa la convierte en 5-FU.	Cáncer colorectal metastásico y cáncer de mama	El uso prolongado de capecitabine o 5-FU pueden provocar ataxia cerebelosa y eritrodisestesia palmo-plantar (también conocido como el síndrome mano-pie).
Pemetrexed	Antifolato multi-blanco que inhibe varias enzimas involucradas en el metabolismo del folato y en la síntesis de purina y pirimidina que incluyen timidilato sintasa, dehidrofolato reductasa y glicinamida ribonucleotido formiltransferasa.	Varios tumores sólidos. En combinación con cisplatino se emplea para tratar mesotelioma maligno.	Altas dosis de MTX pueden causar toxicidad renal.
<b>1.3 Inhibidores de la topoisomerasa</b>			
Irinotecan	Es metabolizado por carboxilesterasas y por citocromo P450 para formar el inhibidor de topo I 7-etil-10-hidroxicaptotecina (SN-38).	Cáncer colorectal metastásico en combinación con oxaliplatino, capecitabina, bevacizumab y cetuximab.	Mielosupresión, diarrea mucositis, alopecia y fatiga. La gran mayoría del fármaco se une a albumina lo que afecta su farmacocinética y farmacodinamia.
Topotecan	El mismo mecanismo que irinotecan	Cáncer de ovario recurrente o resistente a compuestos de platino y cáncer de células de pulmón no pequeñas.	
Etopósido	Forma aductos con el ADN y con topo II que interfiere con el proceso de reestructuración de la doble hebra. Afecta en dos fases específicas del	Cáncer de células de pulmón pequeñas. En combinación con otros agentes para tratar cáncer testicular	Mielosupresión, mucositis,

	ciclo celular, fase S y fase G2. Presenta una preferencia importante a la inhibición de la isoforma alfa de la topo II	refractario. También se emplea en el tratamiento de linfoma, leucemia no-linfoide y glioblastoma multiforme.	alopecia y en casos de exposición prolongada puede generar un segundo proceso neoplásico.
Tenipósido	El compuesto no se une directamente al ADN, su interacción es principalmente con la topo II.	Leucemia linfática crónica refractaria.	
<b>1.4 Antibióticos antineoplásicos</b>			
Doxorubicina	Ahora se sabe que el mecanismo de acción es por inhibición de la topo II y la estabilización del aducto con la cadena de ADN rota. Aunque se generan radicales no se piensa que influyan en la citotoxicidad de las antraciclinas, sin embargo si contribuyen en la toxicidad cardiaca.	Linfomas, leucemias, mieloma múltiple, osteosarcoma, hemangiosarcoma, cáncer de mama, gástrico, tumor de Wilms, neuroblastoma y algunos otros sarcomas y carcinomas.	Los principales efectos tóxicos son mielosupresión, alopecia, mucositis y a largo plazo pueden generar toxicidad cardiaca.
Mitoxantrona	Mismo mecanismo que doxorubicina	Leucemia mieloide aguda y cáncer de próstata avanzado. Linfomas y varios carcinomas como mama y próstata.	
Epirubicina	Forma complejos con el ADN por intercalación entre pares de bases, inhibe la topoisomerasa II mediante la estabilización del aducto ADN-topo II evitando la unión posterior para regenerar la doble hebra. También interfiere con la replicación del ADN y la transcripción mediante la inhibición de la actividad de la ADN-helicasa.	Para su uso como un componente de la terapia adyuvante en pacientes con evidencia de afectación tumoral de los ganglios axilares después de la resección de cáncer de mama primario. Cáncer gástrico y de mama.	
Idarubicina	Forma complejos con el ADN por intercalación entre pares de bases, inhibe la topoisomerasa II mediante la estabilización del aducto ADN-topo II evitando la unión posterior para regenerar la doble hebra	Leucemia mieloide aguda en adultos	
Bleomicina	Mezcla de glicopéptidos, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan ruptura y fragmentación de la cadena de ADN. Requiere la	Carcinomas	
			Inflamación hepática que puede llevar a fibrosis hepática irreversible.

	presencia de cofactores específicos para generar el daño al ADN: cationes de metales de transición como Cu y Fe, oxígeno y un agente reductor que intercambie un electrón.		Bronquiolitis obliterante, hipersensibilidad eosinofílica y neumotitis intersticial. Fiebre, rigidez, estomatitis y fatiga.
Dactinomicina (Actinomicina D)	Se intercala y se une al ADN alterando la estructura del ácido nucleico. Inhibe la actividad de la ARN y ADN polimerasas. Causa ruptura de la cadena con ayuda de la ADN-topoisomerasa II. Genera radicales libres que provocan la ruptura del ADN y daño en la membrana celular.	Tumor de Wilms, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de Ewing y cáncer testicular metastásico.	Diarrea, estomatitis, mielosupresión con leucopenia, náuseas y vómitos. En algunas ocasiones puede generar alopecia, foliculitis superficial de la cara y tronco, reacciones anafilactoides tipo 1, anorexia, enrojecimiento de la cara y tronco y segundos tumores primarios.
<b>1.5 Agentes antimicrotubulares</b>			
Vincristina	Se une a la tubulina, generando alteraciones en el huso mitótico y provocando la detención del ciclo celular.	Enfermedad de Hodgkin, linfomas y leucemias	Agentes vesicantes. Mielosupresión, neuropatía periférica y constipación.
Vinblastina	Se une a la tubulina, generando alteraciones en el huso mitótico y provocando la detención del ciclo celular. Afecta principalmente en la fase S del ciclo celular.	Leucemia aguda, linfoma maligno, enfermedad de Hodgkin, eritema agudo.	
Paclitaxel	Se une a la subunidad b de la tubulina evitando la despolimerización de los microtúbulos provocando así la interrupción del ciclo celular normal.	Cáncer de mama, ovario, próstata, células germinales y cáncer pulmonar de células no pequeñas.	Mielosupresión, alopecia, neuropatía periférica y reacciones de hipersensibilidad.
Docetaxel	Se une a la subunidad b de la tubulina evitando la despolimerización de los microtúbulos provocando así la interrupción del ciclo celular normal.	Cáncer de mama, ovario, próstata, células germinales y cáncer pulmonar de células no pequeñas. Cáncer de mama metastásico.	
<b>1.6 Agentes hormonales</b>			

Fluoximesterona	La fluoximesterona se une al receptor de andrógenos. La actividad antitumoral de fluoximesterona parece estar relacionado con la reducción o la inhibición competitiva de los receptores de prolactina o los receptores de estrógeno.	Tratamiento paliativo de cáncer de mama recurrente andrógeno-sensible en las mujeres que tienen más de un año pero menos de cinco años después de la menopausia.	
Nilutamida	Compite con los andrógenos por los sitios de unión de los receptores de andrógenos, teniendo como consecuencia la acción de los andrógenos de origen suprarrenal y testicular que estimulan el crecimiento del tejido normal y maligno de la próstata.	Para el uso en combinación con castración quirúrgica para el tratamiento de cáncer de próstata metastásico que implica ganglios linfáticos distantes, huesos u órganos viscerales (etapa D2)	
Letrozol	El letrozol es un inhibidor competitivo no esteroideo del sistema enzimático aromatasa; inhibe la conversión de andrógenos a estrógenos. Inhibe selectivamente la esteroidogénesis gonadal pero no tiene ningún efecto significativo sobre la síntesis de mineralocorticoides o glucocorticoides adrenal.	Para el tratamiento adyuvante de continuación del cáncer de mama temprano en mujeres postmenopáusicas que han recibido 5 años de tratamiento con tamoxifeno. También para el tratamiento de primera línea de mujeres posmenopáusicas con receptores hormonales positivos o receptor hormonal desconocido con cáncer de mama localmente avanzado o metastásico. También está indicado para el tratamiento del cáncer de mama avanzado en mujeres posmenopáusicas con progresión de la enfermedad después de la terapia antiestrógeno	Escasez de estrógeno, fatiga, sofocos, disminución variable de la densidad mineral ósea, náuseas y en algunos casos una mayor incidencia de fenómenos tromboembólicos.  Los efectos secundarios producidos por la fluoximesterona incluyen virilización (características masculinas en mujeres), acné, retención de líquidos e hipercalcemia.
Dexametasona	La dexametasona libre cruza las membranas celulares y se une con alta afinidad a los receptores citoplasmáticos específicos de glucocorticoides. Este complejo se une a elementos de ADN	Mieloma múltiple, tumores cerebrales primarios o metastásicos.	La nilutamida y el dietilestilbestrol incluyen mareos, malestar general, dolor de cabeza, náuseas y vómitos.  La toxicidad que presentan los corticosteroides son producto

	(elementos de respuesta a glucocorticoides) que se traduce en una modificación de la transcripción y, por lo tanto, la síntesis de proteínas a fin de lograr la inhibición de la infiltración de leucocitos en el sitio de la inflamación, la interferencia en la función de mediadores de la respuesta inflamatoria, la supresión de respuestas inmunes humorales y la reducción de edema o tejido cicatricial.		de la forma en como actúan, pues tienen un efecto lítico sobre las células de linfoma y mieloma, reducen el edema asociado con metástasis cerebrales, reducen reacciones inmunológicas y alérgicas además de que ejercen un efecto antiemético solo y con bloqueadores de 5-HT3.
Dietilestilbestrol	Competición con receptores de estrógeno	Cáncer de próstata	
Raloxifeno	El raloxifeno se une a los receptores de estrógeno, lo que resulta en la expresión diferencial de múltiples genes regulados por estrógenos en diferentes tejidos.	Para la reducción de la incidencia de cáncer de mama invasivo en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis o tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer de mama.	Tamoxifeno y raloxifeno a altas dosis provocan dificultades respiratorias en el paciente y convulsiones.
Tamoxifeno	El tamoxifeno es un agente no esteroide que se une a los receptores de estrógeno (ER), induciendo un cambio conformacional en el receptor	El tamoxifeno está indicado para el tratamiento de cáncer de mama metastásico en mujeres y hombres y carcinoma ductal <i>in situ</i> .	
Abarelix	Abarelix se une al receptor de la hormona liberadora de gonadotropina y actúa como un potente inhibidor de la secreción de gonadotropina.	Para el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzado	
Goserelin	La goserelina actúa como un potente inhibidor de la secreción de gonadotropina pituitaria cuando se administra en la formulación biodegradable. El resultado es una supresión sostenida de los niveles de testosterona y de LH en suero.	Se utiliza para tratar los cánceres sensibles a las hormonas de la mama (en pre- y peri-menopáusicas) y de próstata, y algunos trastornos ginecológicos benignos (endometriosis, fibromas uterinos y adelgazamiento del endometrio).	
Leuprolide	Mismo mecanismo de acción que goserelina	Cáncer de próstata	
Acetato de Megestrol	Actividad antiestrogénica, efectos antigonadotrópicos y antiandrogénicos.	Utilizado para el tratamiento paliativo del cáncer de mama recurrente, inoperable o metastásico, cáncer de endometrio y	

		cáncer de próstata en Canadá y algunos otros países.	
<b>1.7 Agentes bioterapéuticos</b>			
Interferón- $\alpha$	El interferón $\alpha$ se une a los receptores de interferón de tipo I (IFNAR1 y IFNAR2c) que, tras la dimerización, activan dos tirosina cinasas Jak (cinasas de Janus JAK1 y Tyk2). Estos se transforilan a sí mismos y fosforan los receptores. Los receptores INFAR fosforilados a continuación, se unen a Stat1 y Stat2 (transductores de señal y activadores de transcripción) que dimerizan y activan proteínas inmunomoduladoras múltiples (~ 100) y proteínas antivirales.	Se utiliza principalmente en el tratamiento de la leucemia de células pilosas, el sarcoma de Kaposi del SIDA, melanoma y carcinoma de células renales.	Síndrome similar a la gripe con fiebre, escalofríos, entumecimiento y mialgias. A largo plazo puede provocar fatiga profunda, confusión, efectos neurológicos y depresión (a veces suficientemente grave como para llevar al suicidio).
Interleucinas	Estimulan las células del sistema inmunitario, un efecto que podría estimular la supresión inmunológica de las células tumorales.	Carcinoma de células renales y el melanoma	Altas dosis por vía Intravenosa causan fiebre, retención de líquidos, hipotensión, dificultad respiratoria, supresión de la hematopoyesis, nefrotoxicidad y hepatotoxicidad.
Bevacizumab	Bevacizumab contiene regiones marco humanas con regiones de unión a antígeno de un anticuerpo murino humanizado que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Bevacizumab se une al VEGF e impide la interacción de VEGF a sus receptores (Flt-1 y KDR) en la superficie de las células endoteliales. Esto evita la proliferación de vasos sanguíneos y en el retraso de respuesta del crecimiento del tumor metastásico se produce.	Como parte de la terapia de combinación para el cáncer color rectal metastásico y el cáncer de mama metastásico HER2-negativo.	La administración de anticuerpos monoclonales puede generar fiebre, escalofrío, disnea, broncoespasmo, dolor de cabeza, hipertensión, erupción cutánea, náuseas, opresión de la garganta, enrojecimiento y urticaria. Estos síntomas pueden variar desde síntomas
Rituximab	Las regiones Fab de Rituximab se une al antígeno CD20 en los linfocitos B, mientras que el dominio Fc	Es utilizado en contra de células B CD 20+ de linfoma no Hodgkin,	

	recluta a los anticuerpos y complementos para mediar la lisis celular.	ahora se utiliza en combinación con el régimen CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona)	muy leves hasta reacciones graves o mortales.
Trastuzumab	Trastuzumab se une al proto-oncogen HER2 (o c-erbB2), una proteína similar al receptor de EGF que se encuentra en el 20-30% de las células de cáncer de mama.	Terapia de mantenimiento semanal para pacientes con cáncer de mama metastásico HER2neu-positivos	
<b>1.8 Agentes misceláneos</b>			
Denileukin diftitox (Ontak)	Se une a receptores de IL-2 introduciendo la toxina de la difteria en estas células provocando la muerte de las mismas	Linfomas, leucemias y linfoma cutáneo de células T.	No hay información.
Mitotane	Se sugiere que daña las mitocondrias de células adrenales	Carcinoma de corteza suprarrenal. Su uso principal es en aquellos pacientes que tienen enfermedad persistente a pesar de la resección quirúrgica, los que no son candidatos para la cirugía, o los que tienen enfermedad metastásica.	Anorexia, náuseas, diarrea, vómitos, disminución de la memoria, salpullido, ginecomastia, artralgia y leucopenia.
Gefitinib	Gefitinib es el primer inhibidor selectivo del receptor del factor de crecimiento epidérmico dominio de tirosina quinasa.	Es usado en el tratamiento de leucemia mieloide crónica, tumores del estroma gastrointestinal y otros tipos de cáncer.	Diarrea y erupción cutánea.
Imatinib	Inhibe la tirosina cinasa Bcr-Abl	Carcinoma de colon, hígado, cabeza y cuello.	Náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal, neutropenia, retención de fluidos, fatiga, fiebre, mialgia, y dolor muscular.

Leucemia: es un grupo de enfermedades malignas de la médula ósea (cáncer hematológico) que provoca un aumento descontrolado de leucocitos en la misma. Sin embargo, en algunos tipos de leucemias también pueden afectarse cualquiera de los precursores de las diferentes líneas celulares de la médula ósea, como los precursores mieloides, monocíticos, eritroides o megacariocíticos

Linfoma: es un conjunto de neoplasias hematológicas que se desarrollan en el sistema linfático, que también forman parte del sistema inmunitario del cuerpo humano. A los linfomas también se les llama tumores sólidos hematológicos para diferenciarlos de las leucemias.

Sarcoma: neoplasia maligna que se origina en un tejido conjuntivo, como pueden ser hueso, cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos, u otros.

Carcinoma: cáncer con origen en células de tipo epitelial o glandular, de tipo maligno.



Todos los compuestos descritos con anterioridad presentan blancos terapéuticos específicos para cumplir con su función antitumoral, siendo el ADN uno de los predilectos. La obtención de compuestos que presenten un alto grado de selectividad implica una ardua tarea en diseño, el cual debe considerarse como partes clave en el desarrollo de nuevos medicamentos: el control de la toxicidad (efectos secundarios) y la selectividad hacia los tejidos, órganos o células donde la actividad tiene que ser realizada.

La selectividad de los medicamentos antitumorales es uno de los problemas más difíciles de resolver, sin embargo, el empleo de compuestos de coordinación puede proporcionar importantes ventajas respecto a los compuestos orgánicos. Entre estas ventajas se pueden mencionar una gran variedad de números de coordinación y por ende una gran diversidad de geometrías. Los metales empleados para generar estos compuestos de coordinación, en particular los metales de transición, pueden estabilizar diferentes estados de oxidación. Así mismo, las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, entre ellas el potencial redox, lipofilia, volumen, estabilidad o geometría pueden modularse modificando los ligantes de su esfera de coordinación o los sustituyentes presentes en estos ligantes, proporcionando un enorme abanico de posibilidades con respecto a reactividad y arreglo tridimensional.

El compuesto más famoso de Pt(II) además de seguir siendo uno de los más empleados en terapia es el *cis*-diaminodicloroplatino (II), también conocido como cisplatino. El estudio de este compuesto como agente antitumoral se deriva de los estudios que el profesor Rosenberg llevaba a cabo en la Universidad Estatal de Michigan sobre los efectos de aplicación de corriente eléctrica en el crecimiento de cultivos bacterianos. La capacidad de este grupo de trabajo para identificar que el efecto de inhibir la división celular en *Escherichia coli* no era debido a la corriente eléctrica aplicada sino a un compuesto de platino disuelto (sintetizado *in situ* en el medio de cultivo) después identificado como

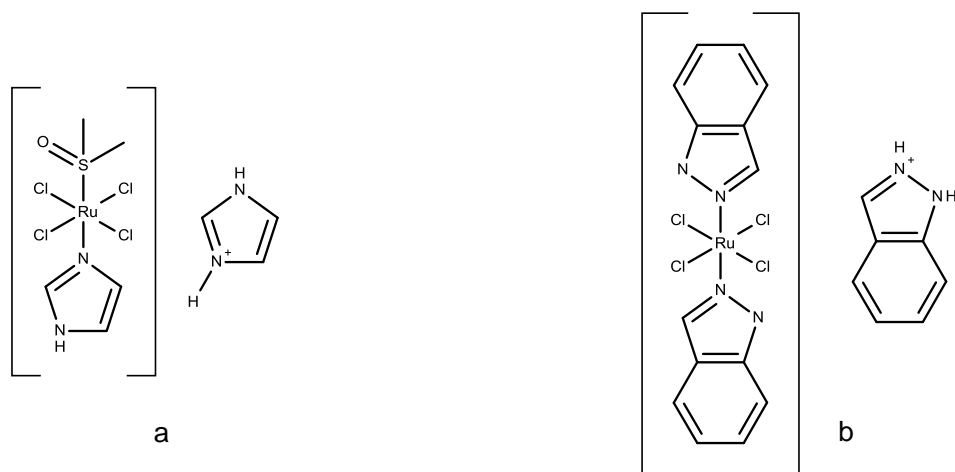
cisplatino,<sup>12</sup> les permitió realizar pruebas en tumores murinos obteniendo excelentes resultados publicados en el ahora clásico trabajo “Platinum compounds: A new Class of Antitumor Agents” en la prestigiosa revista Nature en 1969<sup>13</sup> abriendo las puertas para una nueva era en la quimioterapia del cáncer. Después de estos impresionantes resultados, el cisplatino entra en estudios de fase clínica en 1971 y Bristol-Meyer Squibb lo comercializó de manera exclusiva a partir de 1977.<sup>14</sup>

En las últimas décadas se ha observado un enorme avance respecto a la evaluación de compuestos de coordinación y organometálicos en modelos *in vitro* e *in vivo* como potenciales agentes antitumorales.<sup>15-22</sup> La gran mayoría de compuestos se generan con metales de la segunda y tercera serie de transición como Pt, Pd, Rh, Ir, Ru, Os, Au y con metales de la primera serie de transición clasificados como esenciales entre los que encontramos Fe, Co, Cu y Zn.

En los siguientes párrafos sólo se resumirán características generales de algunos compuestos de coordinación con los metales antes mencionados, para una revisión más exhaustiva de los modelos evaluados y los mecanismos de acción sugeridos se puede consultar el capítulo del libro “Compuestos inorgánicos en el tratamiento del cáncer” que se publicó en el libro “Aplicaciones de los compuestos metálicos en medicina”.<sup>23</sup>

Los compuestos de Ru(II) y Ru(III) fueron probados como posibles agentes antitumorales debido a que la cinética de sustitución de los ligantes de su esfera de coordinación es muy similar a la que presenta el Pt(II) presentando resultados muy interesantes. Los compuestos que actualmente se encuentran en estudios de fase clínica  $\text{trans-[RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]\text{ImH}$  (NAMI-A, donde Im = imidazol, Fig. 8a) y  $\text{trans-[RuCl}_4(\text{Ind})_2]\text{IndH}$  (KP1019, donde Ind = indazol, Fig. 8b) a pesar de tener una gran similitud estructural presentan actividades muy diferentes frente a los tejidos tumorales pues mientras NAMI-A presenta una gran actividad

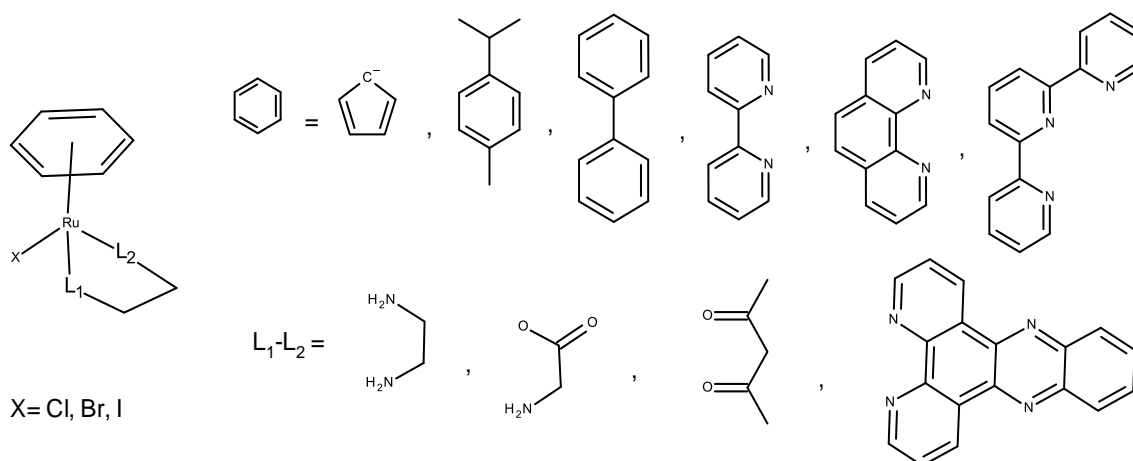
en tejido metastásico respecto al tejido primario,<sup>24</sup> el compuesto KP1019 muestra una mayor actividad en tejido primario que en tejido metastásico,<sup>25</sup> haciendo patente la importancia de la naturaleza del sistema aromático con respecto a la actividad antitumoral que muestran los compuestos.



**Figura 8.** Algunos compuestos de Rutenio que se encuentran en estudios de fase clínica. a) NAMI-A, b) KP1019.

Con respecto al estudio de la modulación de la actividad antitumoral en función del sistema aromático presente en los compuestos de Ru(II) el grupo del profesor Sadler ha generado una gran cantidad de información con los compuestos denominados “taburete de piano” (piano stool) de fórmula general  $[Ru(\text{areno})(XY)Z]^{n+}$ . Estos compuestos constan de tres bloques básicos de construcción: los arenos (p-cimeno, bipyridina, fenantrolina, terpiridina, ciclopentadienilo, entre otros) que estabilizan el estado de oxidación del metal y le proporcionan el componente hidrofóbico al metal, un ligante monodentado Z, que generalmente es fácilmente sustituible y corresponde al sitio de activación y ligantes bidentados XY que completan la esfera de coordinación y modulan sus propiedades redox.<sup>26-33</sup>

Estos compuestos parecen tener muchos blancos celulares que ayudan a cumplir su función citotóxica. Los compuestos que presentan el enlace lábil Ru-Z (donde Z generalmente es Cl) atacan el ADN, aunque otros blancos están asociados con la actividad biológica como la interacción con proteínas cinasas, anhidras carbónica y topoisomerasas.<sup>34-37</sup> Algunos ejemplos de estos compuestos se presentan en la figura 9.



**Figura 9.** Estructura general de los compuestos de Rutenio denominados como taburete de piano. Se presentan los ligantes aromáticos, los ligantes bidentados y los ligantes lábiles presentes en estas estructuras.

Otro metal que ha sido empleado para generar posibles agentes quimioterapéuticos para el cáncer es el Au, en ambos estados de oxidación Au(I) y Au(III), aunque ahora se sabe que muchos de los primeros compuestos empleados de Au(III) se reducían en medio biológico a Au(0).<sup>38</sup> Los compuestos de Au(I) con fosfina como auranofin o derivados de fosfol como el compuesto [1-fenil-2,5-di(2-piridil)-fosfol}AuCl] presentan una importante actividad antitumoral *in vivo*, especialmente en líneas resistentes al cisplatino.<sup>39-40</sup> La toxicidad de estos compuestos se debe a su capacidad para inhibir la actividad de la glutatión reductasa mitocondrial (hGR) y la tioredoxina reductasa (hTrxR) de manera irreversible.<sup>41</sup> En

particular el compuesto con fosfol presenta su actividad inhibitoria en ambas proteínas a concentraciones en el intervalo nanomolar.<sup>42</sup>

Para disminuir la inestabilidad de los compuestos de Au(III), que es un compuesto isoelectrónico al Pt(II), se emplearon diversos ligantes como la porfirina mostrando actividad en modelos in vitro e in vivo de carcinoma hepatocelular y nasofaríngeo.<sup>43</sup> Otros ligantes empleados incluyen a la biperidina,<sup>44</sup> algunos ditiocarbamatos<sup>45</sup> y compuestos oxo.<sup>46</sup> Se cree que los blancos moleculares para los compuestos de Au(III) son la mitocondria así como la hTrxR<sup>47</sup> y las deubicinasas.<sup>48</sup>

De los metales denominados esenciales, uno de los más empleados es el Fe, en particular en forma de ferroceno. Este compuesto organometálico fue empleado por el profesor Jaouen y su grupo de trabajo para generar un derivado de tamoxifen que resultó muy activo frente al cáncer de mama dependiente e independiente de estrógeno.<sup>49-51</sup> Mientras el tamoxifeno sólo es activo en los tumores dependientes de estrógeno la actividad que presentan los ferrocifenos es asociada a la actividad redox del ion metálico generando daño oxidativo en el ADN. Muchos estudios de correlación cuantitativa estructura-actividad se han realizado con estos compuestos para establecer la importancia de la naturaleza de los sustituyentes así como la posición de los mismos en los grupos aromáticos presentes en los ferrocifenos y su efecto sobre el mecanismo de acción de estos compuestos.<sup>52-54</sup> Tres excelentes libros donde se resume el extenso trabajo del profesor Jaouen se presentan en las referencias 55 a 57.

Otro de los metales esenciales que se ha empleado para generar una gran cantidad de posibles agentes antitumorales es el Cu(II). Los resultados generados con la familia de compuestos conocida como Casiopeínas serán discutidos en el capítulo de antecedentes.

## 2.0 Antecedentes

De acuerdo a Frausto da Silva y Williams,<sup>58</sup> de las cinco características distintivas del cobre, cuatro de ellas son químicas:

- 1) El Cu(II) es el catión divalente más efectivo para unirse con moléculas orgánicas debido a su afinidad electrónica.
- 2) El Cu(I) es el catión monovalente más efectivo para unirse con moléculas orgánicas, nuevamente debido a su afinidad electrónica.
- 3) La tendencia que presenta tanto Cu(II) como Cu(I) a formar compuestos con diferentes ligantes orgánicos sin importar los tamaños o las estequiometrias, hacen al par Cu(II)/Cu(I) particularmente útil y adaptable en el intervalo de potenciales redox +0.2 a +0.8 V (en el intervalo de oxidación de la escala biológica)
- 4) El Cu(I) puede actuar como donador  $\pi$  y puede coordinarse a ligantes tales como O<sub>2</sub> y CO.
- 5) El quinto factor, que no es químico, es que sólo una o dos proteínas con cobre se encuentran en el citoplasma celular (células eucariotas).

Una de las funciones más importantes del cobre dentro del organismo está relacionada con la transferencia electrónica asociada a la respiración celular y por tanto a la proliferación celular. Sin embargo, su participación en reacciones redox también lo hace propenso a generar daño generando especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), participando en la peroxidación de lípidos o afectando directamente a material nucleico como ADN y ARN a través de la ruptura de las cadenas.<sup>59</sup>

En los últimas décadas se han reportado una gran cantidad de compuestos de Cu(II) que presentan actividad antiproliferativa frente a células tumorales humanas evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo*.<sup>20, 59-66</sup> Muchos de estos sistemas tienen como blanco terapéutico principal el ADN y son capaces de generar su ruptura a partir de la generación de ROS.

A los compuestos que tienen la capacidad de romper el material genético se les conoce como nucleasas químicas, ya que emulan la actividad de las enzimas denominadas nucleasas. Las nucleasas son enzimas capaces de romper el enlace fosfodiéster que une a las bases en los ácidos nucleicos, forman parte de la familia de las fosfodiesterasas y están clasificadas de manera general como endonucleasas y exonucleasas. Las endonucleasas son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces fosfodiéster en diferentes regiones ubicadas en el interior de una cadena polinucleotídica mientras que las exonucleasas lo hacen desde los extremos de las cadenas.<sup>67</sup>

Algunas endonucleasas, tales como la Desoxirribonucleasa I, cortan al ADN en forma relativamente inespecífica (sin consideración respecto a la secuencia de bases), mientras que muchas, llamadas típicamente enzimas de restricción, o endonucleasas de restricción, provocan rupturas únicamente en determinadas secuencias de nucleótidos muy específicas. Estas últimas se han convertido en una herramienta indispensable para el desarrollo de la biología molecular.<sup>68</sup>

Las endonucleasas desempeñan un papel importante en la reparación del ADN. Específicamente las endonucleasas AP, catalizan la ruptura del ADN exclusivamente en sitios AP (sitiosapurínicos-apirimidínicos, es decir sitios en los cuales se ha perdido la base nitrogenada, pero se conserva la columna de azúcar-fosfato), y por lo tanto preparan al ADN para la subsecuente escisión, síntesis reparadora y nueva unión. Por ejemplo, cuando se produce una despurinización, esta lesión deja al azúcar desoxirribosa sin su base

nitrogenada. La endonucleasa AP reconoce este azúcar y esencialmente corta el ADN en ese sitio, permitiendo que luego continúe la reparación del ADN.<sup>69</sup>

Por lo general, las nucleasas químicas son complejos de coordinación que rompen el ADN por una vía oxidativa (redox activos, compuestos de Cu(II), Fe(II), Ni(II))<sup>70-79</sup> o por una vía hidrolítica (compuestos de Zn o de lantánidos y actínidos).<sup>80-82</sup> La ruptura directa del ADN por agentes oxidantes o hidrolíticas es materia de varios artículos de revisión actuales. Complejos de metales de transición con actividad redox en presencia de oxidantes se han usado ampliamente para reacciones de ruptura de ADN. En una reacción típica, se añade un agente oxidante como O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o un perácido además del compuesto del metal de transición. También hay ejemplos en los que se genera químicamente o electroquímicamente el compuesto de coordinación en donde el metal presenta un alto estado de oxidación puede actuar como un oxidante en presencia de un reductor. Generalmente, los complejos metálicos capaces de abstraer un hidrógeno de la unidad ribosilo son también capaces de oxidar guanina u otras nucleobases. Los esfuerzos actuales están en el diseño de complejos de metales de transición como nucleasas químicas adecuadas para identificar algún daño en el plásmido o en ADN nuclear o mitocondrial para conseguir rupturas específicas.

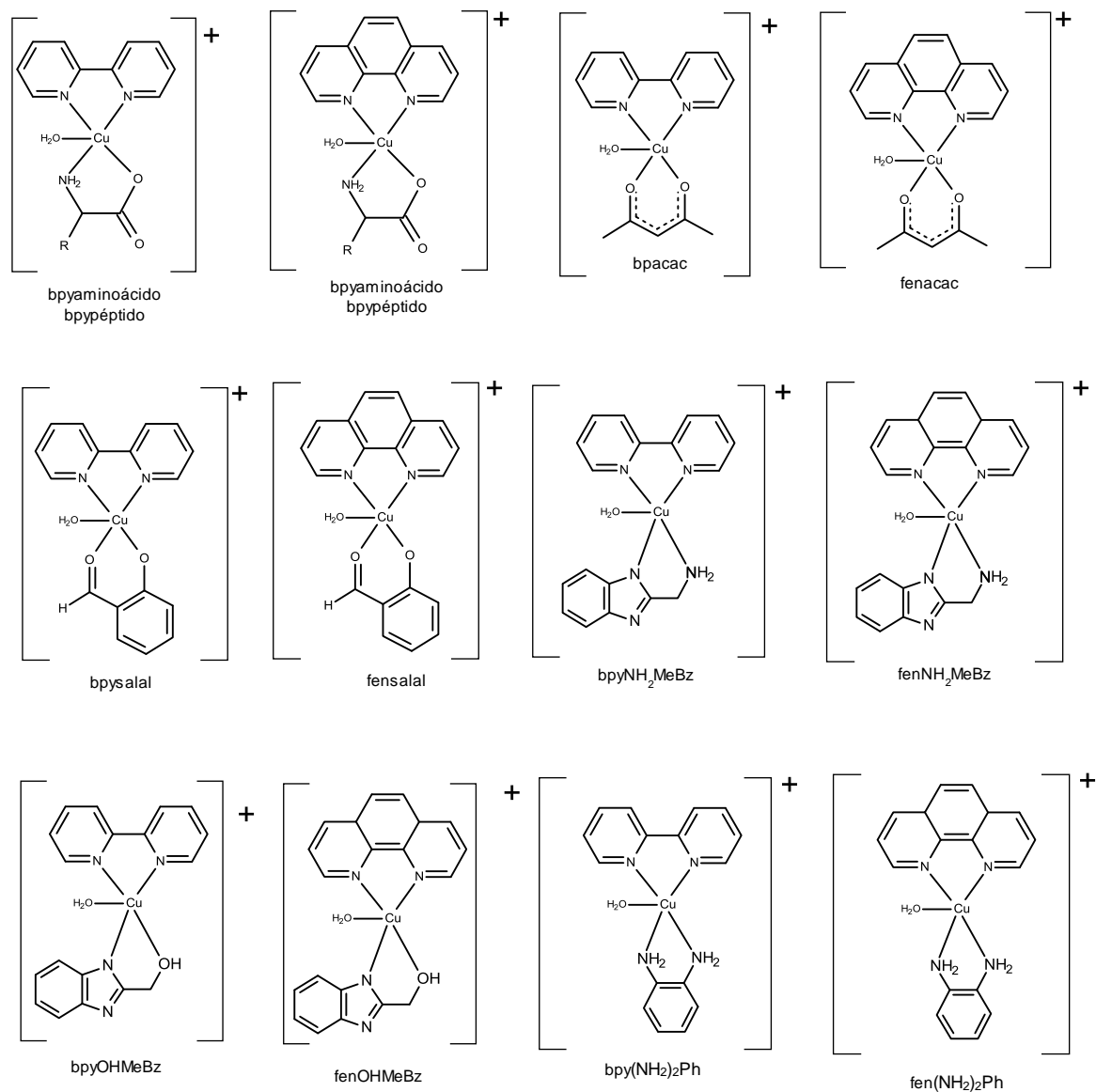
Muchas de las propiedades antes descritas, así como una cuidadosa elección de ligantes fueron consideradas por el grupo de investigación de la Dra. Ruiz-Azuara para la generación de los compuestos de cobre conocidos con el nombre de Casiopeínas (primeros compuestos patentados de Cu(II) con actividad antitumoral). El cobre fue elegido para disminuir en la medida de lo posible la toxicidad generada por la administración de estos compuestos aprovechando los sistemas homeostáticos que tiene el organismo para modular



las concentraciones de este metal, debido a sus propiedades redox y para tratar de disminuir el costo de producción de los compuestos.

La elección de los ligantes aromáticos estuvo influenciada por la búsqueda del ADN como blanco terapéutico. Se ha demostrado que los sistemas con 1, 10-fenantrolina y 2, 2'-bipiridina presentan una gran interacción con ADN, generalmente por procesos de intercalación.<sup>82</sup> Una revisión actualizada de compuestos de coordinación con ligantes aromáticos en su esfera de coordinación que presentan estas interacciones está incluida en el número especial de Química Bioinorgánica publicada por la Journal of the Mexican Chemical Society.<sup>83</sup> Por otro lado, los ligantes bidentados secundarios fueron escogidos para proporcionarles variabilidad con respecto a la biodisponibilidad de estos compuestos dentro del organismo, esperando que los aminoácidos esenciales jugaran un papel importante en este proceso.

Así pues, las Casiopeínas son compuestos de Cu(II) con fórmulas generales  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{O-O})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$  donde N-N= R-1,10-fenantrolina o R-2,2'-bipiridina, N-O= aminoácido esencial o péptido y O-O= acetilacetato o salicilaldehído (Figura 10).<sup>84</sup> Una segunda generación de Casiopeínas involucran las mismas diiminas aromáticas (N-N) y como ligante secundario 2-aminometilbencimidazoles, 2-hidroximetilbencimidazoles o 1,2-fenilendiamina.<sup>85, 86</sup> La tabla 2 muestra las claves de los compuestos en función de los ligantes que conforman la esfera de coordinación del Cu(II). De estos compuestos se ha evaluado su capacidad para inhibir la proliferación de células tumorales humanas,<sup>87-92</sup> su efectividad como antitumoral<sup>93-95</sup> así como su genotoxicidad.<sup>90, 96</sup> Algunas estructuras de Casiopeínas se presentan en la Figura 10.



**Figura 10.** Estructuras generales de Casiopeínas.

**Tabla 2.** Claves de las Casiopeínas

	aa <sup>a</sup>	acac	salal	Péptido <sup>b</sup>	NH <sub>2</sub> MeBz <sup>c</sup>	HOMeBz <sup>d</sup>	(NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> Ph <sup>e</sup>
bpy	CasIX	CasIIIDa	CasIIIs	CasXa	CasXIa	CasXIIa	CasXIIIa
4,4'-dmbpy	CasIV	CasIIIia	CasIIIGs	CasXb	CasXIb	CasXIIb	CasXIIIb
4,7-diφ-fen	CasI	CasIIIHa	CasIIIFs	CasXc	CasXIc	CasXIIc	CasXIIIc
4,7-diMe-fen	CasII	CasIII Ea	CasIIICs	CasXd	CasXI d	CasXII d	CasXIII d
5-Rfen	CasV	CasIII5a	CasIII5s	CasXe	CasXIe	CasXIIe	CasXIIIe
5,6-diMe-fen	CasVI	CasIII La	CasIII Ls	CasXf	CasXI f	CasXII f	CasXIII f
fen	CasVII	CasIII Ba	CasIII As	CasXg	CasXI g	CasXII g	CasXIII g
3,4,7,8-tMefen	CasVIII	CasIII Ma	CasIII Ms	CasXh	CasXI h	CasXII h	CasXIII h

<sup>a</sup> Cualquiera de los 20 aminoácidos esenciales

<sup>b</sup> Dipéptidos de fórmula GlyPhe, GlyHis, GlyGly, TrpGly, ProGly, AlaGly, AlaTyr, AlaPhe

<sup>c</sup> 2-aminometil benzimidazol

<sup>d</sup> 2-hidroximetilbenzimidazol

<sup>e</sup> 1,2-fenilendiamina

Un estudio cuantitativo de correlación estructura-actividad<sup>91</sup> (QSAR, por sus siglas en inglés) indica que:

1) La presencia de un sistema aromático más grande produce una actividad antiproliferativa mayor, esto es, los sistemas con fenantrolina en su esfera de coordinación presentan una mayor actividad de inhibición de la proliferación que aquellos con bipyridina.

2) Hay una fuerte relación entre el potencial redox de los compuestos (medido como el potencial de media onda,  $E_{1/2}$ ) y su actividad de inhibición de la proliferación (medido como  $IC_{50}$  ( $\mu M$ )). Los compuestos menos oxidantes son los compuestos que presentan la mejor actividad.

3) El potencial redox de los compuestos está fuertemente modulada por las diiminas, mientras que el ligante secundario N-O y O-O tienen poca influencia sobre el potencial redox y por ende, sobre la actividad.

Con respecto a su interacción con ADN o sus constituyentes se ha propuesto que estos compuestos presentan una interacción lo suficientemente fuerte con el ADN debido a la presencia del sistema aromático policíclico. Estudios teóricos muestran que las Casiopeínas pueden tener una interacción de apilamiento al interactuar con las bases púricas y pirimidicas aisladas. El apilamiento es mucho más favorecido con adenina, en donde las adeninas funcionan como donadores de densidad electrónica mientras que los aceptores de densidad en este par donador-aceptor formado son los ligantes de la Casiopeína. Con las otras bases se presenta la coordinación de las bases en una posición axial del ion metálico teniendo una mayor preferencia en la coordinación citocina y guanina.<sup>97</sup>

Para tratar de entender que pasaba con las Casiopeínas interactuando con la doble hélice del ADN se realizaron simulaciones de dinámica molecular construyendo cuatro cadenas de ADN de tipo B con las siguientes secuencias: poli-d(AAAAAAAAAA)<sub>2</sub>, poli-

d(ATATATATAT)<sub>2</sub>, poli-d(GGGGGGGGGG)<sub>2</sub> y poli-d(GCGCGCGCGC)<sub>2</sub>, las cuales se hicieron interactuar con el compuesto [Cu(2,2-bipiridina)(acetilacetato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (CasiIIIDa). Los resultados de estas simulaciones muestran que el sitio de reconocimiento preferencial es el surco menor del ADN, en particular el oxígeno del grupo fosfato presente en este surco. La presencia de una molécula de agua en la posición apical opuesta a la que se coordina el oxígeno del fosfato del ADN es indispensable para que el aducto final sea estable.

El análisis de distribución de densidad electrónica dentro del marco teórico de la teoría cuántica de átomos en moléculas (QTAIM por sus siglas en inglés) muestra que si se considera que el cobre en la Casiopeína presenta una geometría cuadrada entonces la densidad electrónica se queda en las inmediaciones del ion metálico. Sin embargo, cuando se introduce una molécula de agua en la posición apical (generando un compuesto con una geometría de pirámide de base cuadrada) entonces la molécula de agua y el ion metálico pierden densidad electrónica que se redistribuye hacia los ligantes bipiridina y acetilacetato. El exceso de densidad en estos ligantes es lo que genera interacciones del tipo O $\cdots\pi$ (C), O $\cdots\pi$  (N) y C-H $\cdots\pi$  entre la Casiopeína y la unidad desoxirribosa incrementando la estabilidad del aducto.<sup>98</sup>

Los resultados obtenidos con los estudios teóricos son coincidentes con las imágenes de microscopía de fuerza atómica que muestran que la interacción entre las Casiopeínas y el ADN existe y que en algunos casos no solo se presenta la interacción con el ADN sino también la ruptura del ADN plasmídico empleado para estos estudios. En este estudio se muestra nuevamente el efecto de la presencia de un sistema aromático con un anillo aromático más (1,10-fenantrolina) con respecto al sistema con bipiridinas, pues en el caso de este último se evidencian deformaciones estructurales del ADN plasmídico pBR322 y un

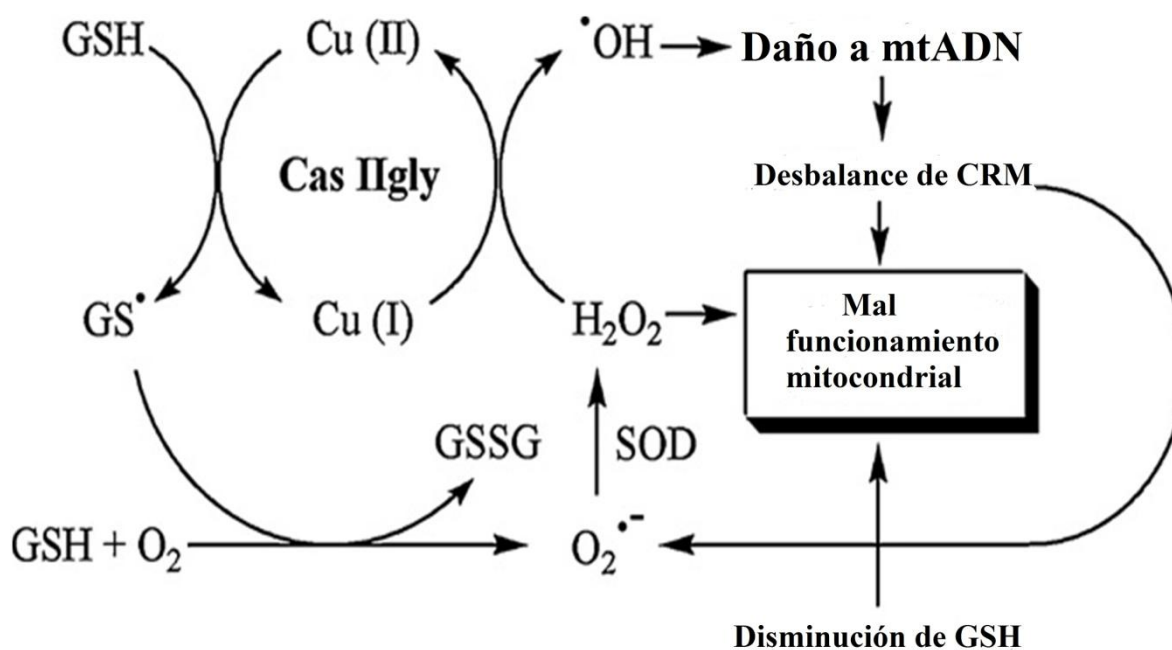
bajo grado de ruptura del ADN, mientras que en los sistemas con fenantrolina se presentó un alto grado de ruptura después de 24 horas de incubación.<sup>99</sup> La ruptura de ADN plasmídico se ha visto en otros sistemas en donde la adición de un agente reductor (ácido ascórbico o  $\beta$ -mercaptoetanol) incrementa la capacidad de estos compuestos para degradar el material genético.<sup>100</sup>

La interacción con el ADN puede ser uno de los factores que desencadenen la muerte de las células tumorales, sin embargo, ésta ruptura también puede ser provocada por otros procesos como la inducción de apoptosis.<sup>101</sup> Otro de los factores que pueden desencadenar la muerte celular son la generación de ROS o el consumo de los agentes antioxidantes que se encargan de controlar las concentraciones de ROS.<sup>102-107</sup> Mecanicamente las ROS controlan la proliferación celular sostenida, están involucradas en la muerte celular tanto apoptótica como necrótica, también están asociadas a la formación de mutaciones en el ADN mitocondrial o nuclear y en algunos casos estimulan la generación de un ambiente pro-angiogénico.<sup>108</sup> Por todo lo anterior, las ROS juegan un rol principal en procesos de muerte celular y procesos inflamatorios haciendo indispensable su estudio para conocer la capacidad de algunos compuestos de generar un desbalance redox que incline la balanza de señalización hacia alguno de los dos extremos: proliferación o muerte celular.

En el caso de las Casiopeínas se tienen evidencias de que estos compuestos son capaces de generar ROS en diferentes células tumorales murinas como melanoma B16,<sup>109</sup> glioma C6<sup>94</sup> o leucemia L1210<sup>87</sup> y en células tumorales humanas entre las que se encuentran carcinoma cervico-uterino (HeLa y SiHa),<sup>89, 91, 110</sup> adenocarcinoma de colon (HCT-15),<sup>95</sup> adenocarcinoma de glándula mamaria (MCF-7),<sup>91</sup> de pulmón (A549, H157 y SKL-U)<sup>89, 92</sup> y meduloblastoma.<sup>88</sup>

En muchos de estos trabajos se informa que la fragmentación del ADN también estaba acompañada por una producción importante de ROS que son responsables en parte de la citotoxicidad mostrada por estos compuestos. Lo anterior se pudo comprobar al adicionar agentes atrapadores de radicales como el DMSO y observar una disminución en la toxicidad con respecto al sistema sin DMSO.<sup>90</sup> La disminución de glutatión (GSH) intracelular fue otra señal del desbalance redox que provocaba la administración de Casiopeínas en cultivos tumorales. Se observó que la disminución de GSH intracelular era dependiente de la concentración de Casiopeína administrada y que aún cuando se administrara Glutatión reductasa no era recuperada en su totalidad. De la misma forma, al administrar butionina sulfoximina (BSO, por sus siglas en inglés) que es un inhibidor de la enzima Glutamato cisteína ligasa<sup>111</sup> se potencia la citotoxicidad de la Casiopeína administrada haciendo evidente que el desbalance redox es un factor fundamental para el mecanismo de acción de éstos compuestos de coordinación.<sup>91,92</sup>

De todos los resultados anteriores, se propone un mecanismo en el cual el GSH intracelular sirve como fuente de electrones para que se lleve a cabo la reducción del Cu(II) presente en la Casiopeína y la generación del radical glutatilo (GSH•). Una vez que eso pasa, el sistema de Cu(I) puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno generado por la reacción entre la superóxido dismutasa (SOD) y el radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para obtener al radical hidroxilo (HO•) y regenerar la especie de Cu(II). El radical hidroxilo generará daños en el ADN mitocondrial que generará una disfuncionalidad importante en la mitocondria que llevara a la muerte celular (figura 11).



**Figura 11.** Mecanismo de acción propuesto para la Casiopeína IIgly ([Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>(47dmfengly) modificado de la referencia 88. GSH= glutatión, mtADN= ADN mitocondrial y CRM= Cadena respiratoria mitocondrial.

Considerando que la finalidad de todos estos estudios es generar un compuesto que pueda emplearse en terapia como agente antitumoral, los compuestos elegidos para las siguientes etapas de este largo camino que conlleva el desarrollo de un nuevo fármaco deben cumplir con un índice terapéutico (ventana terapéutica) lo más grande posible. El índice terapéutico está definido como la relación entre la dosis que produce un efecto tóxico determinado no compatible con la indicación terapéutica (por ejemplo, la dosis tóxica en 50% de los individuos, DT<sub>50</sub>) con respecto a la dosis en la cual se cumple con la función farmacológica deseada (por ejemplo, la dosis efectiva en 50% de los individuos, DE<sub>50</sub>). Un índice terapéutico alto es preferible para que un fármaco para ser considerado como un agente con

un perfil de seguridad favorable, sin embargo, en algunos casos donde los tratamientos son muy limitados un índice terapéutico bajo puede ser una de las únicas opciones.<sup>112</sup>

Los resultados encontrados para una de las Casiopeínas denominada Cas IIIa ( $[\text{Cu}(4,4'$ -dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetato)( $\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ ) en animales con adenocarcinoma de colon (HCT-15) xenotransplantado<sup>N</sup> generó altas expectativas con respecto a la elección de este compuesto para estudios de fase clínica. Aunque no fue uno de los compuestos que presentó la mayor actividad antiproliferativa en los ensayos *in vitro* y tampoco fue de los más activos respecto al retardo en el tiempo de crecimiento del tumor, la Cas III-ia presentó resultados sumamente alentadores pues al administrar el compuesto se logró que el tumor incrementara su volumen en más tiempo (un retardo en días de tres veces para que el tumor llegara al doble de su volumen) con respecto al control con un esquema de tratamiento de 6 dosis de 6 mg/Kg cada 4 días. Además, el tratamiento indujo la muerte del tejido a través de la vía apoptótica de acuerdo a la morfología celular y aunque el análisis histológico revela un efecto de irritación crónica en la serosa peritoneal no fueron registradas pérdidas de peso en los animales tratados que es uno de los indicadores de toxicidad que se manifiesta de manera inmediata.<sup>113</sup>

Todo lo anterior motiva a realizar un estudio sistemático sobre la capacidad de las Casiopeínas para interactuar con el ADN, para generar especies reactivas de oxígeno y en qué condiciones se llevan a cabo estas reacciones, si son capaces de interactuar con el ADN y si son capaces de reaccionar como nucleasas químicas. Una vez reunida toda esta información comprobar si son factores que influyen en la muerte de células tumorales

---

<sup>N</sup>Xenotransplante o transplante heterólogo es el transplante de tejidos, células u órganos entre una especie y otra, idelamente entre especies próximas para evitar el rechazo, como de cerdos a humanos. En el caso de los ensayos con ratones, a los roedores se les suprime el sistema inmunológico para evitar el rechazo de las células tumorales humanas. Éste ratón no presenta vello corporal, por lo que recibe el nombre de ratón desnudo.



humanas y cómo afectan a las células de rápido crecimiento que no están transformadas como los linfocitos y los macrófagos de sangre periférica humana.

### **3.0 Hipótesis**

Los compuestos pertenecientes a la familia de las Casiopeínas interactúan fuertemente con el ADN y funcionan como nucleasas químicas. La capacidad de cada uno de estos compuestos para cumplir con ambas funciones esta modulada por su esfera de coordinación inmediata, misma que influye en su actividad antiproliferativa.

### **4.0 Objetivos**

- Sintetizar y caracterizar los quelatos mixtos de Cu(II) Casiopeínas.
- Estudiar la capacidad de las Casiopeínas para interactuar con ADN.
- Evaluar su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno y las condiciones necesarias para ello.
- Determinar si las Casiopeínas actúan como nucleasas químicas.
- Determinar si existe selectividad de inducción de muerte en células tumorales respecto a células sanas.

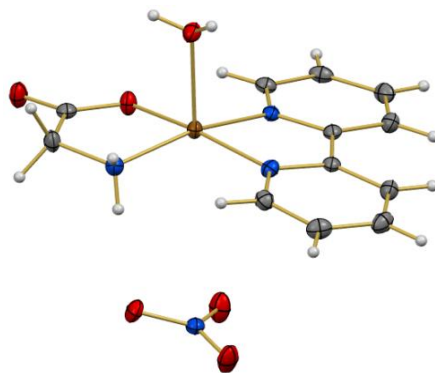
## 5.0 Resultados y Discusión

### 5.1 Síntesis y caracterización de Casiopeínas

Se sintetizaron 35 Casiopeínas de acuerdo a las patentes registradas,<sup>84</sup> el conjunto completo sólo fue empleado para la determinación de la geometría de las Casiopeínas en estado sólido y en disolución. En las secciones posteriores con base a los resultados del estudio QASR se seleccionaron sólo algunas de ellas para los estudios de interacción con adenina, adenosina, 2-desoxiadenosin-5-monofosfato y ADN, actividad nucleasa, actividad antiproliferativa y al inicio de cada sección se indicarán cuales fueron empleadas.

A continuación se presentan los datos de caracterización de los compuestos de coordinación sintetizados.

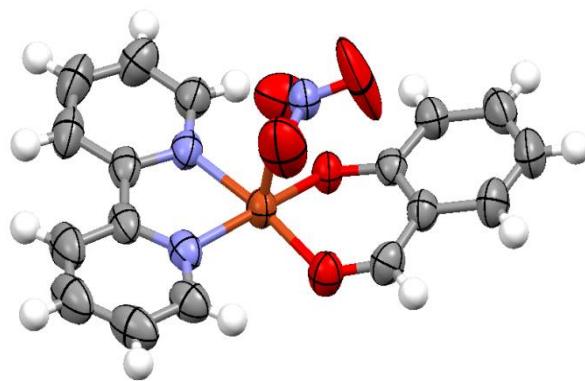
***[Cu(2,2'-bipiridina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (Bpygly)***. Análisis elemental (%) calculado para C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (373.8g mol<sup>-1</sup>): C 38.56, H 3.77, N 14.98; encontrado: C 39.02, H 3.72, N 15.18. IR (KBr):  $\nu=3440, 3200, 1640, 1517, 1426, 1385$  (NO<sub>3</sub>), 820, 729, 650 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\max}(\epsilon)=616$  nm (59M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}=1.80$  MB;  $\Lambda$  (MeOH)=79.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}=2.243, g_{\perp}=2.057, A_{\parallel}=190.0, A_{\perp}=7.6$ . Se obtuvieron monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X a través de la evaporación lenta de la mezcla de disolventes MeOH/H<sub>2</sub>O (50:50, v/v) en la cual se disolvió el compuesto. La estructura obtenida se presenta en la figura 12.



**Figura 12.** Estructura molecular del compuesto **Bpygly**.

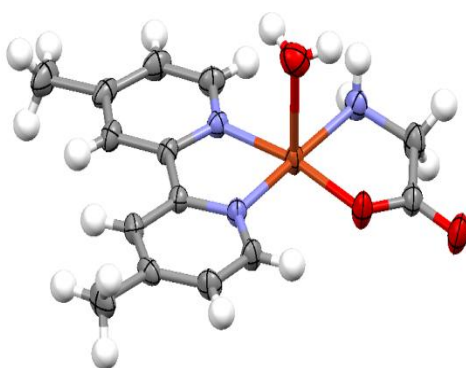
**[Cu(2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (Bpyacac).** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cu (416.5 g mol<sup>-1</sup>): C 43.22, H 4.59, N 10.08; encontrado: C 10.21, H 42.95, N 9.95. IR (KBr):  $\nu$ = 1513, 1600, 1577, 1523, 1446, 1384 (NO<sub>3</sub>), 730, 639 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 606 nm (55 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.74MB;  $\Lambda$  (MeOH)=85.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.252,  $g_{\perp}$ = 2.066,  $A_{\parallel}$ = 188.0,  $A_{\perp}$ = 8.0.

**[Cu(2,2'-bipiridina)(salicilaldehído)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (Bpysalal)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (420.8 g mol<sup>-1</sup>): C 48.51, H 3.59, N 9.98; encontrado: C 49.01, H 4.20, N 10.21. IR (KBr):  $\nu$ = 1645, 1621, 1581, 1487, 1384, (NO<sub>3</sub>), 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 623 nm (62 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.81 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 73 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.253,  $g_{\perp}$ = 2.034,  $A_{\parallel}$ = 171.5,  $A_{\perp}$ = 11.0. Se obtuvieron monocristales por evaporación lenta de metanol. La estructura molecular se presenta en la figura 13.



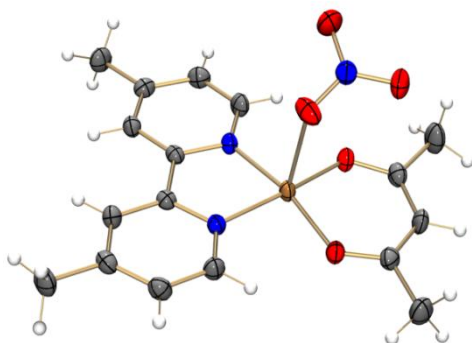
**Figura 13.** Estructura molecular del compuesto **Bpysalal**.

*[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (44dmbpygly)*. Análisis elemental (%) calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu·0.5H<sub>2</sub>O (408.9g mol<sup>-1</sup>): C 41.09, H 3.94, N 13.70; encontrado: C 40.92, H 4.12, N 14.20. IR (KBr):  $\nu$ =3430, 3250, 1629, 1519, 1426, 1384 (NO<sub>3</sub>), 822, 722, 635 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}(\epsilon)$ = 624 nm (62 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.74 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 87.9 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.236,  $g_{\perp}$ = 2.056,  $A_{\parallel}$ = 191.0,  $A_{\perp}$ = 7.6. Monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron evaporando lentamente el disolvente, en este caso H<sub>2</sub>O.



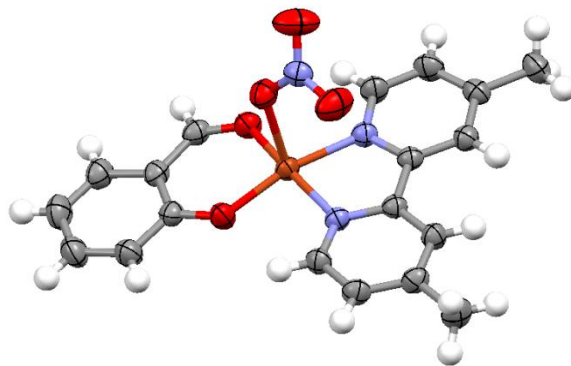
**Figura 14.** Estructura molecular del compuesto **44dmbpygly**.

***[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (44dmbpyacac)***. Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (426.9 g mol<sup>-1</sup>): C 47.83, H 4.96, N 9.84; encontrado: C 47.84, H 5.07, N 9.97. IR (KBr):  $\nu$ = 3463, 1616, 1587, 1525, 1490, 1384 (NO<sub>3</sub>), 730 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 602 nm (58 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.80MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 81.5 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.221,  $g_{\perp}$ = 2.056,  $A_{\parallel}$ = 182.0,  $A_{\perp}$ = 8.0. Se obtuvieron monocristales adecuados para experimentos de difracción de rayos X evaporando lentamente una disolución acuosa saturada. La estructura molecular se muestra en la figura 15.



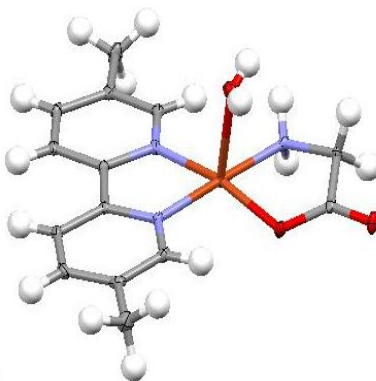
**Figura 15.** Estructura molecular del compuesto **44dmbpyacac**.

***[Cu(4,4'-dimetil-2,2'-bipiridina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (44dmbpysalal)***. Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Cu (430.9 g mol<sup>-1</sup>): C 52.95, H 3.97, N 7.95; encontrado: C 52.60, H 4.11, N 7.69. IR (KBr):  $\nu$ = 1651, 1621, 1583, 1487, 1150, 1384 (NO<sub>3</sub>), 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 607 nm (60 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.75 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 76 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 22.248,  $g_{\perp}$ = 2.032,  $A_{\parallel}$ = 173.0,  $A_{\perp}$ = 11.0. Se obtuvieron monocristales adecuados para experimentos de difracción de rayos X evaporando lentamente una disolución metanólica saturada. La estructura molecular del compuesto se presenta en la figura 16.



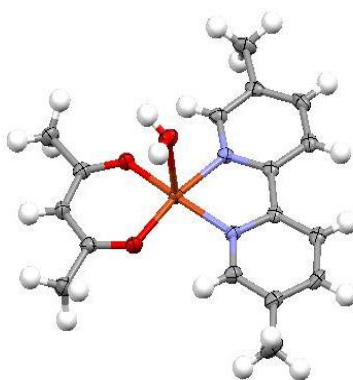
**Figura 16.** Estructura molecular del compuesto **44dmbpysalal**.

*[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (55dmbpygly)*. El análisis elemental (%) calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu·H<sub>2</sub>O (417.9g mol<sup>-1</sup>): C 40.23, H 3.85, N 13.41; encontrado: C 40.92, H 3.92, N13.60. IR (KBr):  $\nu = 3430, 3250, 1629, 1519, 1426, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 822, 722, 635 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 602 nm (59 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}} = 1.88$  MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 85.2 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel} = 2.248, g_{\perp} = 2.060, A_{\parallel} = 189.6, A_{\perp} = 12.6$ . Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de H<sub>2</sub>O. La estructura se presenta en la figura 17.



**Figura 17.** Estructura molecular del compuesto **55dmbpygly**.

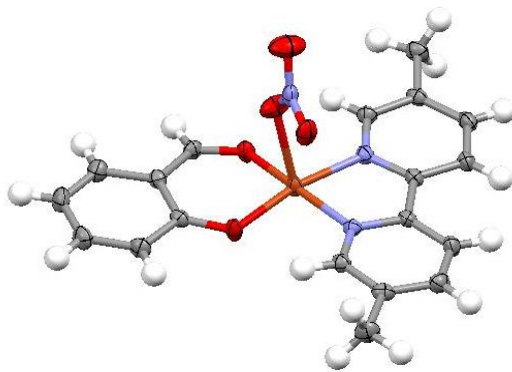
**[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (55dmbpyacac).** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (431.0 g mol<sup>-1</sup>): C 47.83, H 4.96, N 9.84; encontrado: C 47.48, H 5.07, N 9.97. IR (KBr):  $\nu$ = 1623, 1528, 1418, 1577, 1384 (NO<sub>3</sub>), 727, 852 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 606 nm (48 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$  = 1.88 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 80.4 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.251,  $g_{\perp}$ = 2.064,  $A_{\parallel}$ = 189.5,  $A_{\perp}$ = 13.6. Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de H<sub>2</sub>O. La estructura molecular se presenta en la figura 18.



**Figura 18.** Estructura molecular del compuesto **55dmbpyacac**.

**[Cu(5,5'-dimetil-2,2'-bipiridina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (55dmbpysalal)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Cu (430.9 g mol<sup>-1</sup>): C 52.95, H 3.97, N 7.95; encontrado: C 52.60, H 4.11, N 7.69. IR (KBr):  $\nu$ = 1651, 1621, 1583, 1487, 1150, 1384 (NO<sub>3</sub>), 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 628 nm (64 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.81 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 74 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.256,  $g_{\perp}$ = 2.060,  $A_{\parallel}$ = 181.1,  $A_{\perp}$ = 12.0. Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de MeOH. La estructura molecular se presenta en la figura 19.

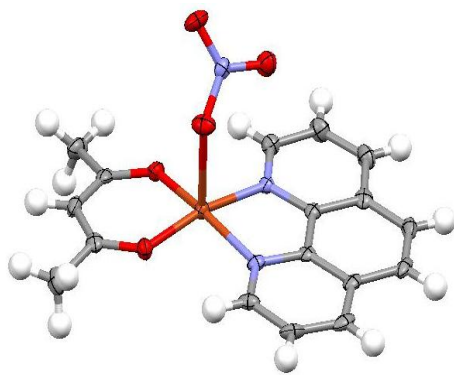




**Figura 19.** Estructura molecular del compuesto **55dmbpysalal**.

**[Cu(1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (Fengly).** El análisis elemental (%) calculado para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Cu (415.8g mol<sup>-1</sup>): C 40.43, H 3.87, N 13.47; encontrado: C 41.12, H 3.95, N 13.62. IR (KBr):  $\nu=3419, 3258, 1612, 1520, 1430, 1384(\text{NO}_3), 851, 722, 649 \text{ cm}^{-1}$ ; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon)=610 \text{ nm} (58 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}}= 1.80 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH})= 72.0 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}= 2.250, g_{\perp}= 2.052, A_{\parallel}= 183.0, A_{\perp}= 7.6$ .

**[Cu(1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (Fenacac)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cu (440.9 g mol<sup>-1</sup>): C 46.31, H 4.34, N 9.53; encontrado: C 46.13, H 4.54, N 9.32. IR (KBr):  $\nu= 3432, 1623, 1587, 1519, 1429, 1384 (\text{NO}_3), 858, 725 \text{ cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon)= 612 \text{ nm} (62 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}}= 1.88\text{MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH})= 85.0 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}= 2.225, g_{\perp}= 2.060, A_{\parallel}= 179.5, A_{\perp}= 8.0$ . Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de una disolución que contenía la mezcla de disolventes H<sub>2</sub>O:MeOH (1:1, v/v). La estructura molecular del compuesto se presenta en la figura 20.



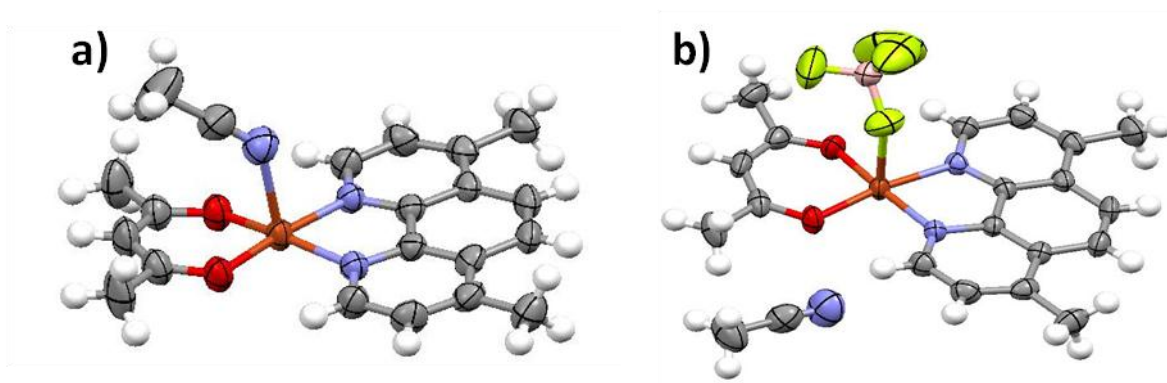
**Figura 20.** Estructura molecular del compuesto **Fenacac**.

***[Cu(1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (Fensalal)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (444.8 gmol<sup>-1</sup>): C 51.29, H 3.39, N 9.44; encontrado: C 50.95, H 4.05, N 9.65. IR (KBr):  $\nu$ = 1623, 1519, 1429, 1587, 1384 (NO<sub>3</sub>), 725, 858 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 625 nm (68 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$  = 1.82 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 78.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.257,  $g_{\perp}$ = 2.038,  $A_{\parallel}$ = 170.2,  $A_{\perp}$ = 11.5.

***[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfengly)*** Se obtuvo un polvo azul después de agitar durante 20 minutos la mezcla final de reacción. El análisis elemental (%) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Cu (443.9 gmol<sup>-1</sup>): C 43.29, H 4.54, N12.62; encontrado: C43.53, H 4.70, N 12.61. IR (KBr):  $\nu$ =3446, 3255, 1602, 1525, 1429,1383 (NO<sub>3</sub>), 871, 726, 637 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )=623 nm (58 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.76 MB;  $\lambda$  (MeOH)= 75.1 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.237,  $g_{\perp}$ = 2.054,  $A_{\parallel}$ = 189.0,  $A_{\perp}$ = 7.6.

***[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfenacac)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (450.9 gmol<sup>-1</sup>): C 50.61, H 4.69, N 9.32; encontrado: C 50.32, H 4.55, N 9.21. IR (KBr):  $\nu$ = 3413, 1622, 1577, 1521, 1425, 1384

(NO<sub>3</sub>), 869, 725 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH): λ<sub>max</sub> (ε)= 608 nm (65 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); μ<sub>eff</sub>= 1.80MB; Λ (MeOH)= 87.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)= g<sub>∥</sub>= 2.226, g<sub>⊥</sub>= 2.055, A<sub>∥</sub>= 182.0, A<sub>⊥</sub>= 8.0. Para este compuesto se pudieron obtener dos tipos de monocristales de muestras diferentes, los primeros de ellos de una disolución concentrada de acetonitrilo que se dejó evaporar lentamente, mientras que los segundos se obtuvieron una vez que se cambió el contra ión de nitrato a hexafluorofosfato cuya fórmula mínima es C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>BF<sub>4</sub>Cu, las estructuras moleculares de los compuestos se presenta en la figura 21.



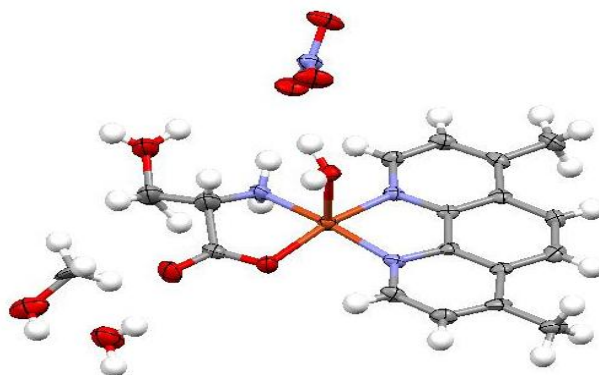
**Figura 21.** Estructura molecular de los compuestos a) **47dmfenacac** y b)

**47dmfenacacBF<sub>4</sub>.**

*[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfensalal)* Análisis elemental (%) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (472.9 gmol<sup>-1</sup>): C 53.33, H 4.04, N 8.88; encontrado: C 53.08, H 4.52, N 8.95. IR (KBr): ν= 1653, 1625, 1583, 1490, 1384 (NO<sub>3</sub>), 1151, 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH): λ<sub>max</sub> (ε)= 613 nm (63 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); μ<sub>eff</sub> = 1.79 MB; Λ (MeOH)= 76.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)= g<sub>∥</sub>= 2.253, g<sub>⊥</sub>= 2.037, A<sub>∥</sub>= 175.0, A<sub>⊥</sub>= 12.0.

*[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(serinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfenser).* Análisis elemental (%) calculado para C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Cu (453.9 gmol<sup>-1</sup>): C 44.98, H 3.99, N 12.34; encontrado: C

45.12, H 4.43, N 12.51. IR (KBr):  $\nu = 3423, 3220, 1625, 1520, 1429, 1384$  ( $\text{NO}_3$ ), 727, 852  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 630 \text{ nm}$  ( $45 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\mu_{\text{eff}} = 1.78 \text{ MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH) =  $86 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.261, g_{\perp} = 2.048, A_{\parallel} = 187.7, A_{\perp} = 7.8$ . Se obtuvieron monocristales por evaporación lenta de metanol. La estructura molecular se presenta en la figura 22.



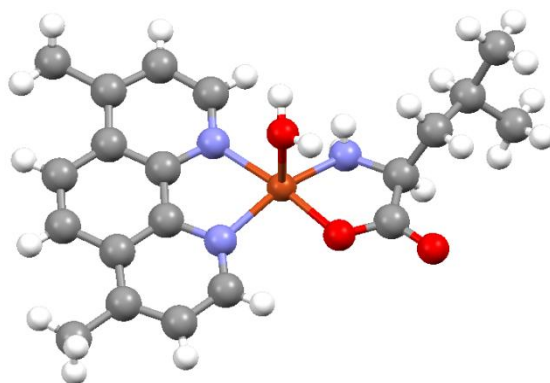
**Figura 22.** Estructura molecular del **47dmfenser**.

**[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(valinato)( $\text{H}_2\text{O}$ )] $\text{NO}_3$  (47dmfenval)** Análisis elemental (%) calculado para  $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_6\text{Cu}$  ( $467.9 \text{ g mol}^{-1}$ ): C 48.67, H 5.3, N 11.98; encontrado: C 48.77, H 11.97, N 5.17. IR (KBr):  $\nu = 3305, 3243, 2961, 164, 1578, 1385$  ( $\text{NO}_3$ ), 1130, 933, 871, 726, 637  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 609 \text{ nm}$  ( $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\mu_{\text{eff}} = 1.81\text{MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH) =  $100.4 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.251, g_{\perp} = 2.050, A_{\parallel} = 184.1, A_{\perp} = 9.5$ .

**[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(alaninato)( $\text{H}_2\text{O}$ )] $\text{NO}_3$  (47dmfenala)** Análisis elemental (%) calculado para  $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_5\text{Cu}$  ( $443.9 \text{ g mol}^{-1}$ ): C 43.57, H 4.58, N 12.52; encontrado: C 43.29, H 4.54, N 12.62. IR (KBr):  $\nu = 3305, 3253, 2945, 1600, 1579, 1430, 1383$  ( $\text{NO}_3$ ), 871, 726, 637  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 611 \text{ nm}$  ( $116 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\mu_{\text{eff}} =$

1.78MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 102.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.235,  $g_{\perp}$ = 2.058,  $A_{\parallel}$ = 183.0,  $A_{\perp}$ = 9.0.

***[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(leucinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfenleu)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (482.0 gmol<sup>-1</sup>): C 49.63, H 5.44, N 11.52; encontrado: C 49.84, H 5.44, N 11.62. IR (KBr):  $\nu$ = 3440, 3261, 2964, 1649, 1580, 1425, 1383 (NO<sub>3</sub>), 1118, 931, 871, 726, 637 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ )= 595 nm (86 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.77MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 100.1 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.234,  $g_{\perp}$ = 2.057,  $A_{\parallel}$ = 179.0,  $A_{\perp}$ = 11.0. Se obtuvieron monocristales por evaporación lenta de metanol. La estructura molecular se presenta en la figura 23.

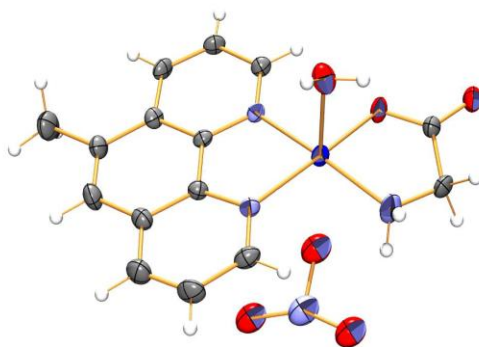


**Figura 23.** Estructura molecular del 47dmfenleu.

***[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(isoleucinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfenile)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>Cu (518.0 gmol<sup>-1</sup>): C 46.42, H 6.02, N 10.58; encontrado: C 46.37, H 5.84, N 10.82. IR (KBr):  $\nu$ = 3463, 2963, 1615, 1579, 1427, 1384 (NO<sub>3</sub>), 1172, 930, 871, 726, 637 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\max}$  ( $\epsilon$ )= 605 nm (76 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.68MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 98.2 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.237,  $g_{\perp}$ = 2.057,  $A_{\parallel}$ = 183.0,  $A_{\perp}$ = 10.5.

**[Cu(4,7-dimetil-1,10-fenantrolina)(norleucinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dmfennle)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Cu (500.0 g mol<sup>-1</sup>): C 48.02, H 5.26, N 11.44; encontrado: C 48.04, H 5.64, N 11.21. IR (KBr):  $\nu$ = 3313, 3243, 2954, 1657, 1579, 1426, 1384 (NO<sub>3</sub>), 1116, 932, 871, 726, 637 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 614 nm (50 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.70 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 126.8 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.234,  $g_{\perp}$ = 2.057,  $A_{\parallel}$ = 184.0,  $A_{\perp}$ = 11.0.

**[Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (5mfengly)** El análisis elemental (%) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>Cu (447.88 g mol<sup>-1</sup>): C 40.22, H 4.50, N 12.50; encontrado: C 39.95, H 4.63, N 12.39. IR (KBr):  $\nu$ = 3404, 3253, 1632, 1524, 1430, 1384 (NO<sub>3</sub>), 816, 730, 622 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 610 nm (57 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$ = 1.85 MB;  $\Lambda$  (MeOH)= 83.3 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel}$ = 2.243,  $g_{\perp}$ = 2.057,  $A_{\parallel}$ = 187.0,  $A_{\perp}$ = 7.6. Los cristales adecuados para el estudio de difracción se obtuvieron por eliminación lenta de metanol. La estructura molecular de este compuesto se muestra en la figura 24.



**Figura 24.** Estructura molecular del compuesto **5mfengly**.

***[Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (5mfenacac)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cu (454.9 g mol<sup>-1</sup>): C 47.52, H 4.65, N 9.24; encontrado: C 47.66, H 4.92, N 9.15. IR (KBr):  $\nu = 3473, 1625, 1577, 1519, 1427, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 811, 729 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 607 \text{ nm} (45 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.89 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH}) = 91.0 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.223, g_{\perp} = 2.058, A_{\parallel} = 178.2, A_{\perp} = 8.0$ .

***[Cu(5-metil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (5mfensalal)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cu (476.9 g mol<sup>-1</sup>): C 50.36, H 4.01, N 8.81; encontrado: C 50.20, H 3.95, N 8.75. IR (KBr):  $\nu = 1648, 1624, 1582, 1485, 1428, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 620 \text{ nm} (61 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.79 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH}) = 75 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.253, g_{\perp} = 2.037, A_{\parallel} = 175.0, A_{\perp} = 12.0$ .

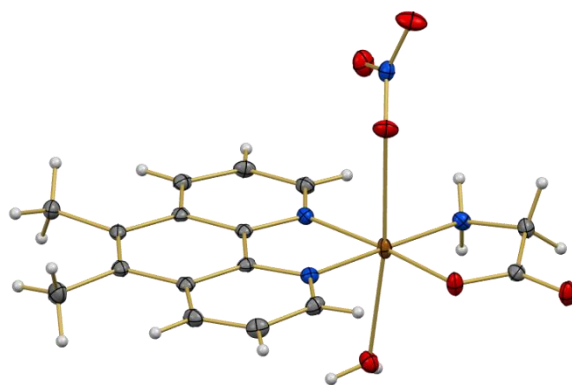
***[Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (4mfengly)*** El análisis elemental (%) calculado para C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Cu (429.87): C 41.91, H 4.22, N 13.03; encontrado: C 43.27, H 4.18, N 12.95. IR (KBr):  $\nu = 3419, 3258, 1612, 1520, 1430, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 851, 722, 649 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} = 610 \text{ nm} (\epsilon) = 61 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.80 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH}) = 87.2 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.243, g_{\perp} = 2.054, A_{\parallel} = 187.0, A_{\perp} = 7.6$ .

***[Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (4mfenacac)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>Cu (418.9 g mol<sup>-1</sup>): C 51.61, H 4.09, N 10.03; encontrado: C 51.45, H 4.16, N 10.24. IR (KBr):  $\nu = 3470, 1623, 1577, 1518, 1428, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 852, 727 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 608 \text{ nm} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.92 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH}) = 81.5 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.220, g_{\perp} = 2.064, A_{\parallel} = 187.0, A_{\perp} = 8.0$ .

**[Cu(4-metil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (4mfensalal)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (458.9 g mol<sup>-1</sup>): C 52.34, H 3.73, N 9.15; encontrado: C 52.68, H 4.56, N 9.42. IR (KBr):  $\nu = 1646, 1621, 1581, 1487, 1384(\text{NO}_3), 884, 767 \text{ cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 615 \text{ nm} (63 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.81 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH}) = 79 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.246, g_{\perp} = 2.052, A_{\parallel} = 180.0, A_{\perp} = 12.0$ .

**[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (56dmfengly)** El análisis elemental (%) calculado para C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (443.89 g mol<sup>-1</sup>): C 45.12, H 4.26, N 13.15; encontrado: C 46.11, H 4.21, N 13.43. IR (KBr):  $\nu = 3421, 3261, 1632, 1525, 1435, 1385 (\text{NO}_3), 822, 709, 597 \text{ cm}^{-1}$ ; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 612 \text{ nm} (60 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.71 \text{ MB}$ ;  $\Lambda (\text{MeOH}) = 76.1 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.242, g_{\perp} = 2.056, A_{\parallel} = 190.0, A_{\perp} = 7.6$ .

Los cristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de la mezcla MeOH/H<sub>2</sub>O. La estructura molecular del compuesto se muestra en la figura 25.



**Figura 25.** Estructura molecular del compuesto **56dmfengly**.

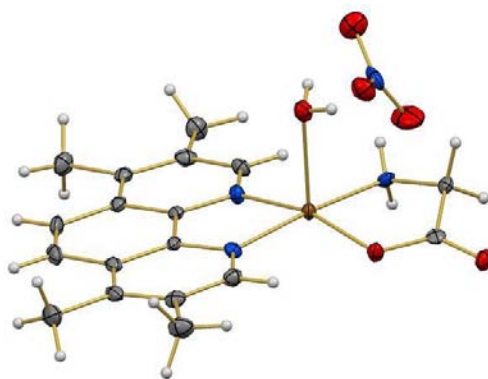


***[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (56dmfenacac)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>Cu (468.9 gmol<sup>-1</sup>): C 48.66, H 4.94, N 8.96; encontrado: C 48.45, H 4.70, N 8.73. IR (KBr):  $\nu = 3488, 1606, 1581, 1517, 1430, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 819, 730 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 604 \text{ nm} (64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.82 \text{ MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH) = 80.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.221, g_{\perp} = 2.056, A_{\parallel} = 178.5, A_{\perp} = 8.0$ .

***[Cu(5,6-dimetil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (56dmfensalal)*** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (472.9 gmol<sup>-1</sup>): C 53.33, H 4.04, N 8.88; encontrado: C 53.08, H 4.52, N 8.95. IR (KBr):  $\nu = 1653, 1625, 1583, 1490, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 1151, 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 616 \text{ nm} (60 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.74 \text{ MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH) = 78.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.250, g_{\perp} = 2.040, A_{\parallel} = 178.0, A_{\perp} = 12.0$ .

***[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (tmphengly)*** El análisis elemental (%) calculado para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (435.9 gmol<sup>-1</sup>): C 47.63, H 4.88, N 12.34; encontrado: C 46.97, H 4.84, N 12.67. IR (KBr):  $\nu = 3395, 3300, 1620, 1533, 1434, 1385$  (NO<sub>3</sub>), 828, 725, 645 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon) = 616 \text{ nm} (61 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ ;  $\mu_{\text{eff}} = 1.78 \text{ MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH) = 79.2 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.243, g_{\perp} = 2.057, A_{\parallel} = 189.0, A_{\perp} = 7.6$ .

Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de metanol. La estructura molecular del compuesto se presenta en la figura 26.



**Figura 26.** Estructura molecular del compuesto **tmfengly**.

***[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (tmphenacac)***

Análisis elemental (%) calculado para C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (479.0 gmol<sup>-1</sup>): C 52.66, H 5.26, N 8.77; encontrado: C 52.46, H 4.90, N 8.50. IR (KBr):  $\nu = 3338, 1618, 1583, 1517, 1430, 1375$  (NO<sub>3</sub>), 833, 727 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 610 nm (M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}} = 1.78$  MB;  $\Lambda$  (MeOH) = 79.5 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.224, g_{\perp} = 2.056, A_{\parallel} = 184.0, A_{\perp} = 8.0$ .

***[Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (tmphensalal)***

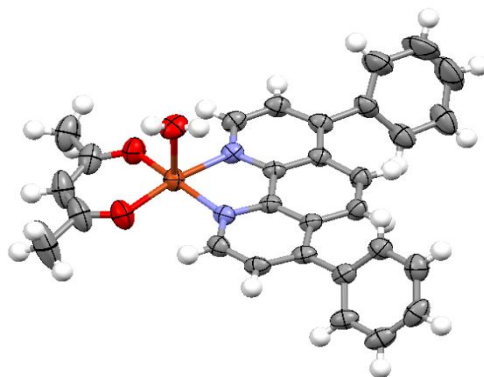
Análisis elemental (%) calculado para C<sub>23</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Cu (498.7 gmol<sup>-1</sup>): C 55.36, H 4.24, N 8.42; encontrado: C 55.60, H 4.52, N 8.51. IR (KBr):  $\nu = 1645, 1621, 1581, 1487, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 1154, 884, 767 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 620 nm (64 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}} = 1.81$  MB;  $\Lambda$  (MeOH) = 79 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K) =  $g_{\parallel} = 2.253, g_{\perp} = 2.037, A_{\parallel} = 175.0, A_{\perp} = 12.0$ .

***[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(glicinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dophengli)*** Análisis elemental

(%) calculado para C<sub>26</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (559.01 gmol<sup>-1</sup>): C 55.81, H 4.11, N 10.01; encontrado: C 55.69, H 4.02, N 9.95. IR (KBr):  $\nu = 3449, 3240, 1604, 1522, 1428, 1384$  (NO<sub>3</sub>), 852,

709, 622  $\text{cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 604 nm ( $52 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\mu_{\text{eff}} = 1.85 \text{ MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH)=  $71.5 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel} = 2.275$ ,  $g_{\perp} = 2.035$ ,  $A_{\parallel} = 183.0$ ,  $A_{\perp} = 7.6$ .

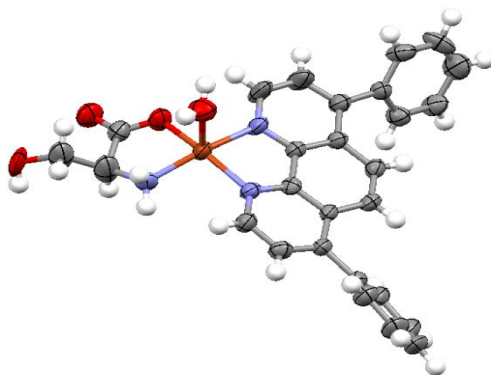
***[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(acetilacetato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dφphenacac)*** Análisis elemental (%) calculado para  $\text{C}_{29}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{Cu}$  ( $575.0 \text{ g mol}^{-1}$ ): C 60.57, H 4.38, N 7.31; encontrado: C 60.43, H 4.22, N 7.22. IR (KBr):  $\nu = 3417, 1620, 1585, 1517, 1427, 1384$  ( $\text{NO}_3$ ),  $854, 736 \text{ cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 609 nm ( $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\mu_{\text{eff}} = 1.87\text{MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH)=  $78.0 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel} = 2.221$ ,  $g_{\perp} = 2.059$ ,  $A_{\parallel} = 179.9$ ,  $A_{\perp} = 6.0$ . Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por evaporación lenta de una disolución metanólica concentrada. La estructura molecular se muestra en la figura 27.



**Figura 27.** Estructura molecular del compuesto **47dφphenacac**.

***[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(salicilaldehidato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dφphensalal)*** Análisis elemental (%) calculado para  $\text{C}_{31}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{Cu}$  ( $597.0 \text{ g mol}^{-1}$ ): C 62.35, H 3.88, N 7.03; encontrado: C 62.76, H 4.60, N 7.15. IR (KBr):  $\nu = 1646, 1623, 1581, 1487, 1151, 1384$  ( $\text{NO}_3$ ),  $884, 767 \text{ cm}^{-1}$ ; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ )= 609 nm ( $64 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ );  $\mu_{\text{eff}} = 1.81 \text{ MB}$ ;  $\Lambda$  (MeOH)=  $78.0 \text{ Scm}^2\text{mol}^{-1}$ . EPR (MeOH, 77K)=  $g_{\parallel} = 2.246$ ,  $g_{\perp} = 2.036$ ,  $A_{\parallel} = 179.6$ ,  $A_{\perp} = 12.0$ .

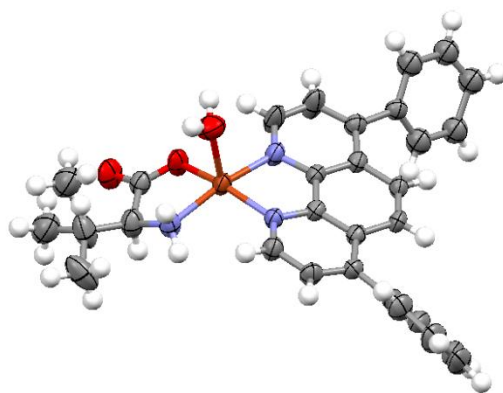
**[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(serinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dϕphenser)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>27</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Cu (578.0 g mol<sup>-1</sup>): C 56.10, H 3.83, N 9.69; encontrado: C 56.43, H 4.32, N 9.82. IR (KBr): ν= 3450, 3225, 1623, 1518, 1428, 1384 (NO<sub>3</sub>), 1577, 727, 852 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH): λ<sub>max</sub> (ε)= 610 nm (51 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); μ<sub>eff</sub> = 1.79 MB; Λ (MeOH)= 81.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)= g<sub>∥</sub>= 2.269, g<sub>⊥</sub>= 2.047, A<sub>∥</sub>= 183.6, A<sub>⊥</sub>= 8.0. Se obtuvieron monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X evaporando lentamente una mezcla de disolventes MeOH:H<sub>2</sub>O (50:50, v/v). La estructura molecular del compuesto se presenta en la figura 28.



**Figura 28.** Estructura molecular del compuesto **47dϕphenser**.

**[Cu(4,7-difenil-1,10-fenantrolina)(valinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (47dϕphenval)** Análisis elemental (%) calculado para C<sub>29</sub>H<sub>29</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (593.1 g mol<sup>-1</sup>): C 58.72, H 4.92, N 9.44; encontrado: C 59.11, H 5.35, N 9.63. IR (KBr): ν= 3445, 3225, 1612, 1586, 1463, 1384 (NO<sub>3</sub>), 890, 776, 643 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH): λ<sub>max</sub> (ε)= 601 nm (48 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>); μ<sub>eff</sub> = 1.79 MB; Λ (MeOH)= 78.0 Scm<sup>2</sup>mol<sup>-1</sup>. EPR (MeOH, 77K)= g<sub>∥</sub>= 2.255, g<sub>⊥</sub>= 2.048, A<sub>∥</sub>= 175.5, A<sub>⊥</sub>= 9.0. Los monocristales adecuados para el estudio de difracción de rayos X se obtuvieron por

evaporación lenta de una disolución acuosa concentrada. La estructura molecular se presenta en la figura 29.



**Figura 29.** Estructura molecular del compuesto **47døfenval**.

## 5.2 Estudios de difracción de rayos X de monocristal

De los compuestos sintetizados se obtuvieron 19 estructuras de las cuales se resumen las distancias y ángulos de enlace seleccionados en las tablas 3 y 4. De acuerdo con Halcrow,<sup>114</sup> un enlace Cu-L axial menor a 2.4 Å puede ser considerado como un enlace formal Cu-L, mientras que distancias entre 2.4 Å y 2.8 Å representan interacciones débiles predominantemente de tipo electrostático. Lo anterior fue tomado en cuenta para definir las geometrías adoptadas por los compuestos estudiados en este trabajo, prácticamente todos ellos presentan una geometría de pirámide de base cuadrada. Aunque cinco de los compuestos estudiados presentan una distancia entre 2.4Å y 2.5Å, se asumirá para ellos también una geometría efectiva de pirámide de base cuadrada. Dicha asignación se sustenta con los resultados de RPE que son discutidos más adelante.

**Tabla 3.** Distancias (Å) y ángulos (°) de enlaces seleccionados.

Compuesto	Cu-N1	Cu-N2	Cu-X1	Cu-X2	Cu-X3	N1-Cu-N2	N1-Cu-X1	N1-Cu-X2
<b>Bpygly</b>	2.013(2)	1.992(2)	2.003(2)	1.941(7)	2.219(8)	81.22(8)	168.73(8)	99.79(8)
<b>Bpysalal</b>	1.997(2)	1.998(2)	1.909(6)	1.957(2)	2.249(3)	81.36(1)	171.72(8)	91.48(9)
<b>44dmbpygly</b>	2.014(2)	1.976(2)	1.997(2)	1.947(2)	2.480(2)	81.07(7)	170.32(7)	102.36(7)
<b>44dmbpyacac</b>	1.994(6)	1.986(8)	1.905(7)	1.910(5)	2.361(4)	81.28(6)	171.49(6)	91.01(6)
<b>44dmbpysalal</b>	1.991(9)	1.991(5)	1.890(2)	1.964(8)	2.286(0)	81.12(6)	167.19(6)	92.65(6)
<b>55dmbpygly</b>	2.013(2)	1.996(2)	2.001(2)	1.937(2)	2.254(2)	80.94(8)	166.72(8)	99.27(8)
<b>55dmbpygly<sup>a</sup></b>	1.999(2)	1.991(2)	1.986(2)	1.949(1)	2.370(2)	81.87(8)	167.92(8)	98.74(9)
<b>55dmbpyacac</b>	1.999(3)	2.003(2)	1.914(2)	1.912(2)	2.342(2)	81.41(1)	170.03(9)	91.42(9)
<b>55dmbpyacac</b>	2.002(2)	1.999(2)	1.905(2)	1.921(2)	2.252(2)	81.40(1)	166.95(9)	91.49(9)
<b>55dmbpysalal</b>	1.990(2)	1.988(4)	1.987(0)	1.966(2)	2.286(1)	81.46(7)	169.01(7)	91.56(7)
<b>Fenacac</b>	2.025(2)	1.998(2)	1.906(4)	1.926(3)	2.326(9)	81.96(9)	165.80(8)	90.71(9)
<b>47dmfenacac</b>	1.999(4)	1.992(5)	1.912(4)	1.903(4)	2.441(6)	81.59(1)	173.89(1)	91.37(1)
<b>47dmfenacacBF<sub>4</sub></b>	1.999(3)	1.997(3)	1.911(3)	1.903(3)	2.455(1)	81.62(1)	171.46(1)	92.63(1)
<b>47dmfenser</b>	2.020(4)	1.998(4)	1.992(5)	1.956(4)	2.220(4)	81.86(1)	166.80(1)	98.18(1)
<b>47dmfenleu</b>	2.025(4)	2.001(6)	1.913(3)	1.991(0)	2.296(4)	81.92(0)	172.82(0)	102.58(3)
<b>5mfengly</b>	2.031(5)	2.006(1)	1.991(5)	1.947(4)	2.276(5)	81.79(1)	170.48(1)	101.40(2)
<b>56dmfengly</b>	2.018(8)	1.984(9)	1.981(6)	1.945(7)	2.514(1)	82.23(6)	174.74(6)	99.86(6)
<b>3478tmfengly</b>	2.010(2)	2.003(2)	1.987(3)	1.955(8)	2.372(2)	82.02(9)	164.52(9)	98.73(1)
<b>47dφfenacac</b>	2.000(2)	1.992(2)	1.916(2)	1.907(2)	2.275(1)	81.35(8)	169.90(9)	89.95(8)
<b>47dφfenser</b>	2.015(5)	1.997(5)	1.933(4)	1.975(5)	2.206(5)	80.83(1)	162.22(0)	99.02(0)
<b>47dφfenval</b>	2.003(5)	2.005(6)	1.935(5)	1.995(6)	2.214(7)	81.22(0)	162.12(0)	98.82(0)

<sup>a</sup> La celda unidad del compuesto **55dmbpyacac** presenta dos unidades de compuesto con distancias de enlace diferente, aquí se presentan los datos de la segunda unidad.

**Tabla 3.** Distancias (Å) y ángulos (°) de enlaces seleccionados. Continuación.

Compuesto	N1-Cu-N3	N2-Cu-X1	N2-Cu-X2	N2-Cu-X3	X1-Cu-X2	X1-Cu-X3	X2-Cu-X3
<b>Bpygly</b>	98.88(7)	91.97(7)	165.43(8)	97.50(7)	96.69(7)	84.56(7)	91.88(7)
<b>Bpysalal</b>	99.53(1)	94.18(8)	172.62(9)	85.23(1)	92.71(8)	86.99(1)	97.99(1)
<b>44dmbpygly</b>	93.62(6)	92.27(7)	175.70(8)	87.68(6)	89.50(7)	84.63(7)	93.12(6)
<b>44dmbpyacac</b>	96.82(6)	91.83(6)	168.24(6)	94.02(6)	94.85(5)	95.72(6)	88.61(5)
<b>44dmbpysalal</b>	91.85(6)	90.68(6)	167.69(6)	105.30(6)	93.50(6)	99.83(6)	85.39(6)
<b>55dmbpygly</b>	95.74(8)	92.07(8)	166.58(1)	96.11(8)	97.21(9)	84.91(8)	96.22(8)
<b>55dmbpygly</b>	99.49(8)	93.92(8)	178.29(9)	93.49(8)	92.07(9)	85.16(8)	92.04(7)
<b>55dmbpyacac</b>	96.08(9)	91.65(9)	169.84(9)	96.67(9)	94.50(9)	91.81(9)	91.23(8)
<b>55dmbpyacac<sup>a</sup></b>	96.72(9)	89.94(9)	164.43(9)	97.67(9)	94.46(9)	91.08(9)	96.90(9)
<b>55dmbpysalal</b>	92.80(7)	91.96(7)	168.67(7)	106.87(7)	93.48(6)	97.55(7)	82.25(7)
<b>Fenacac</b>	97.05(8)	90.60(8)	162.29(9)	95.51(8)	94.95(8)	92.66(8)	95.69(7)
<b>47dmfenacac</b>	94.02(0)	92.43(1)	167.58(1)	96.82(0)	94.27(1)	86.62(0)	95.32(0)
<b>47dmfenacacBF<sub>4</sub></b>	89.97(1)	90.69(1)	173.09(1)	91.57(1)	94.77(1)	92.26(1)	93.97(1)
<b>47dmfenser</b>	97.05(1)	93.61(1)	172.18(1)	92.80(1)	84.63(1)	95.54(1)	94.95(1)
<b>47dmfenleu</b>	89.13(0)	90.92(0)	158.53(0)	98.12(0)	84.43(0)	91.22(0)	103.03(0)
<b>5mfengly</b>	95.37(1)	91.38(1)	168.20(3)	95.09(1)	84.04(1)	96.00(3)	91.80(2)
<b>56dmfengly</b>	85.90(5)	92.71(6)	177.82(6)	87.19(5)	85.21(6)	93.53(6)	92.45(5)
<b>3478tmfengly</b>	98.68(9)	93.27(9)	175.52(1)	93.01(9)	84.86(9)	91.24(1)	96.28(8)
<b>47dφfenacac</b>	91.39(8)	93.16(9)	165.34(8)	92.95(8)	93.59(9)	93.37(9)	99.07(9)
<b>47dφfenser</b>	100.70(2)	92.62(0)	167.42(0)	95.32(0)	83.82(0)	96.32(0)	97.12(0)
<b>47dφfenval</b>	100.90(3)	92.52(0)	166.23(0)	95.43(0)	83.42(0)	96.43(0)	98.13(0)

<sup>a</sup> La celda unidad del compuesto **55dmbpyacac** presenta dos unidades de compuesto con distancias de enlace diferente, aquí se presentan los datos de la segunda unidad.

Tabla 4. Datos cristalográficos seleccionados para los compuestos estudiados							
Compuesto	R <sub>s</sub>	R <sub>I</sub>	ρ (Å)	Θ (°)	φ (°)	T <sup>5</sup>	τ
Bpygly	1.986	2.223	0.259	170.5	160.8	0.893	0.161
Bpyacac <sup>a</sup>	1.959	2.236	0.125	167.7	169.4	0.876	0.028
Bpysalal	1.965	2.429	0.038	171.7	172.6	0.809	0.015
44dmbpygly	1.982	2.480	0.035	170.3	178.4	0.799	0.134
44dmbpyacac	1.949	2.361	0.010	171.4	168.2	0.825	0.053
44dmbpysalal	1.959	2.286	0.255	167.1	167.6	0.857	0.008
55dmbpygly	1.981	2.370	0.053	178.2	167.9	0.835	0.172
55dmbpygly	1.986	2.254	0.110	166.7	166.5	0.881	0.165
55dmbpyacac	1.956	2.296	0.193	167.2	168.3	0.851	0.018
55dmbpyacac	1.956	2.296	0.193	167.2	168.3	0.851	0.018
55dmbpysalal	1.983	2.286	0.135	169.0	168.6	0.867	0.005
Fengly <sup>d</sup>	1.990	2.255	0.211	171.6	162.6	0.882	0.151
Fenacac	1.959	2.330	0.084	171.7	169.8	0.840	0.032
Fensalal <sup>b</sup>	1.961	2.402	0.035	171.4	173.8	0.816	0.040
47dmfengly <sup>c</sup>	2.012	2.460	0.128	169.6	178.3	0.818	0.145
47dmfenacac	1.950	2.450	0.029	174.0	167.6	0.795	0.106
47dmfenser	1.991	2.220	0.196	172.1	166.8	0.897	0.089
47dmfenleu	1.982	2.296	0.177	172.8	158.5	0.863	0.238
5mfengly	1.993	2.276	0.160	170.4	168.2	0.875	0.038
56dmfengly	1.981	2.565	0.057	174.6	178.4	0.772	0.063
56dmfensalal <sup>e</sup>	1.964	2.239	0.148	169.7	165.9	0.877	0.063
3478tmfengly	1.985	2.354	0.134	165.1	175.2	0.843	0.168
47dφfenacac	1.954	2.275	0.292	169.9	165.3	0.858	0.076
47dφfensalal <sup>f</sup>	1.959	2.306	0.021	171.7	169.6	0.849	0.035
47dφfenser	1.980	2.206	0.453	162.2	167.4	0.897	0.086
47dφfenval	1.985	2.214	0.469	162.0	166.2	0.896	0.070

<sup>a</sup> Datos tomados de la referencia 115; <sup>b</sup> Datos tomados de la referencia 116; <sup>c</sup> Datos tomados de la referencia 117; <sup>d</sup> Datos tomados de la referencia 118; <sup>e</sup> Datos tomados de la referencia 119; <sup>f</sup> Datos tomados de la referencia 120.



En todos los compuestos la base de la pirámide se encuentra ligeramente distorsionada alrededor del Cu(II), estando constituida por los átomos N(1), N(2), X(1) y X(2). N(1) y N(2) son los átomos de nitrógeno de las diiminas aromáticas fen y bpy mientras que X(1) y X(2) corresponde a los átomos donadores de los ligantes bidentados aminoácido, acetilacetato y salicilaldehído. Para todos los casos N(1) se refiere al nitrógeno en posición trans al oxígeno del aminoácido o al oxígeno del aldehído en el caso de salal. La posición apical en estos compuestos fue ocupada por moléculas de disolvente (generalmente agua o acetonitrilo como en el caso de 47dmfenacac) o por el contrario iones como nitrato en el caso de **bpysalal**, **44dmbpysalal** y **55dmbpysalal** o tetrafluoroborato como en **47dmfenacacBF<sub>4</sub>**.

Se analizó la distancia de enlace promedio con respecto a la composición de la esfera de coordinación del Cu(II). Para el sistema N<sub>3</sub>O las distancias promedio son: Cu-N<sub>1</sub>= 2.012(1) Å, Cu-N<sub>2</sub>= 2.000(2) Å, Cu-O<sub>1</sub> (Cu-X<sub>1</sub>)= 1.943(1) Å y Cu-N<sub>3</sub> (Cu-X<sub>2</sub>)= 1.987(2) Å. Para los sistemas con acac las distancias fueron Cu-N<sub>1</sub>= 1.997(2) Å, Cu-N<sub>2</sub> = 2.002(1) Å, Cu-O<sub>2</sub> (Cu-X<sub>1</sub>) = 1.910(3) Å and Cu-O<sub>1</sub>(Cu-X<sub>2</sub>) = 1.909(1) Å y finalmente para los compuestos con salal se tienen Cu-N<sub>1</sub>= 1.994(5) Å, Cu-N<sub>2</sub> = 1.994(0) Å, Cu-O<sub>2</sub> (Cu-X<sub>1</sub>) = 1.900(0) Å and Cu-O<sub>1</sub>(Cu-X<sub>2</sub>) = 1.961(1) Å. De estos datos se observa que las distancias Cu-N son ligeramente más pequeñas en los sistemas N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que en los sistemas que tienen aminoácido como segundo ligante, la diferencia se puede asociar a que los ligantes acac y salal pueden participar en la redistribución de la densidad electrónica mejor que los aminoácidos.

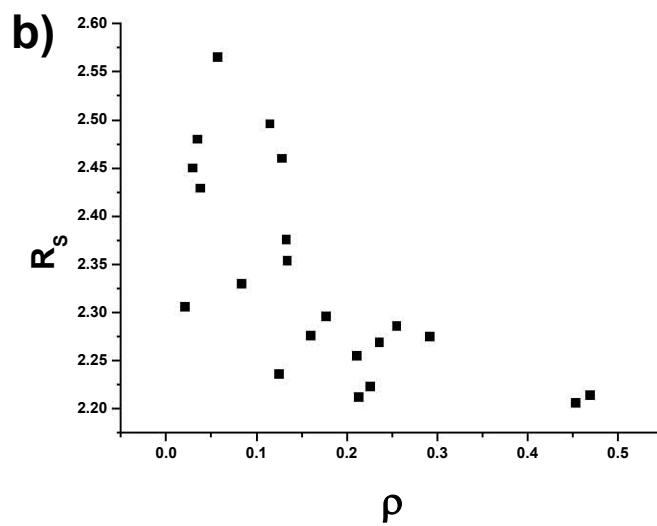
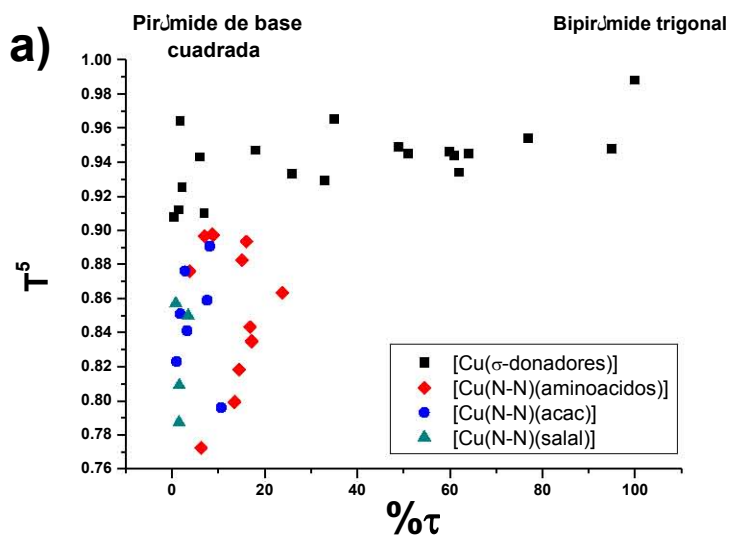
En todos los compuestos se observó que el Cu(II) estaba desplazado una distancia  $\rho$  del plano definido por los átomos N<sub>1</sub>/N<sub>2</sub>/X<sub>1</sub>/X<sub>2</sub>, los valores de  $\rho$  para cada compuesto se presentan en la tabla 4. La distancia de desplazamiento del Cu(II) con respecto al plano

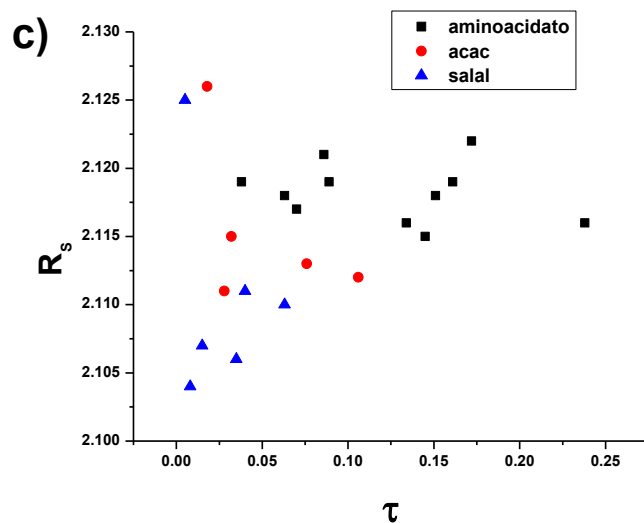
definido por los átomos donadores muestra una relación inversa con la distancia que presenta el Cu(II) con el ligante en la posición apical, tal como fue descrito por Hathaway para sistemas en donde se presentan sólo ligantes  $\zeta$ -donadores.<sup>121</sup>

Para saber un poco más acerca de la distorsión se empleó el valor de tetragonalidad, definido como el promedio de las distancias de enlace en la base de la pirámide ( $R_S$ ) dividido por la distancia de enlace del Cu(II) al ligante en la posición apical ( $R_L$ ),  $T^5 = R_S/R_L$  así como la distorsión angular  $\eta = |(\theta - \phi)/60|$ , donde  $\theta = \angle N_1-Cu-X_1$  y  $\phi = \angle N_2-Cu-X_2$ .<sup>122</sup>

Los valores de tetragonalidad para ligantes  $\zeta$ -donadores se encuentran en el intervalo de 0.90 a 0.95, mientras que los valores encontrados para los compuestos estudiados en este trabajo se encuentran en el intervalo de 0.77 a 0.89. La disminución en los valores de tetragonalidad pueden asociarse a dos factores: i) una elongación excesiva del enlace entre el cobre y el átomo donador de la posición apical (posición apical ocupada por átomos voluminosos como sulfuro, cloruro, bromuro o yoduro); ii) acortamiento en las distancias de enlace de la base de la pirámide si estos ligantes poseen orbitales desocupados que puedan participar en interacciones de retrodonación (por ejemplo, fenantrolinas y bipyridinas). En el caso de las Casiopeínas, ambos efectos son observados de acuerdo a los valores de las tablas 4. Los resultados se presentan de manera gráfica en la figura 30. El efecto de la distorsión angular con respecto al traslape entre los orbitales de los átomos donadores de la base de la pirámide de los compuestos de coordinación se aprecian bien en la figura 30c, en donde al incrementar la distorsión angular se incrementa el promedio de las distancias presentes en la base de la pirámide. En esta figura también es posible observar que los compuestos que presentan la menor distorsión angular son los que cuentan con salal

como ligante secundario seguidos por los compuestos con acac y los que presentan la mayor distorsión son los que tienen aminoacidato en su estructura.





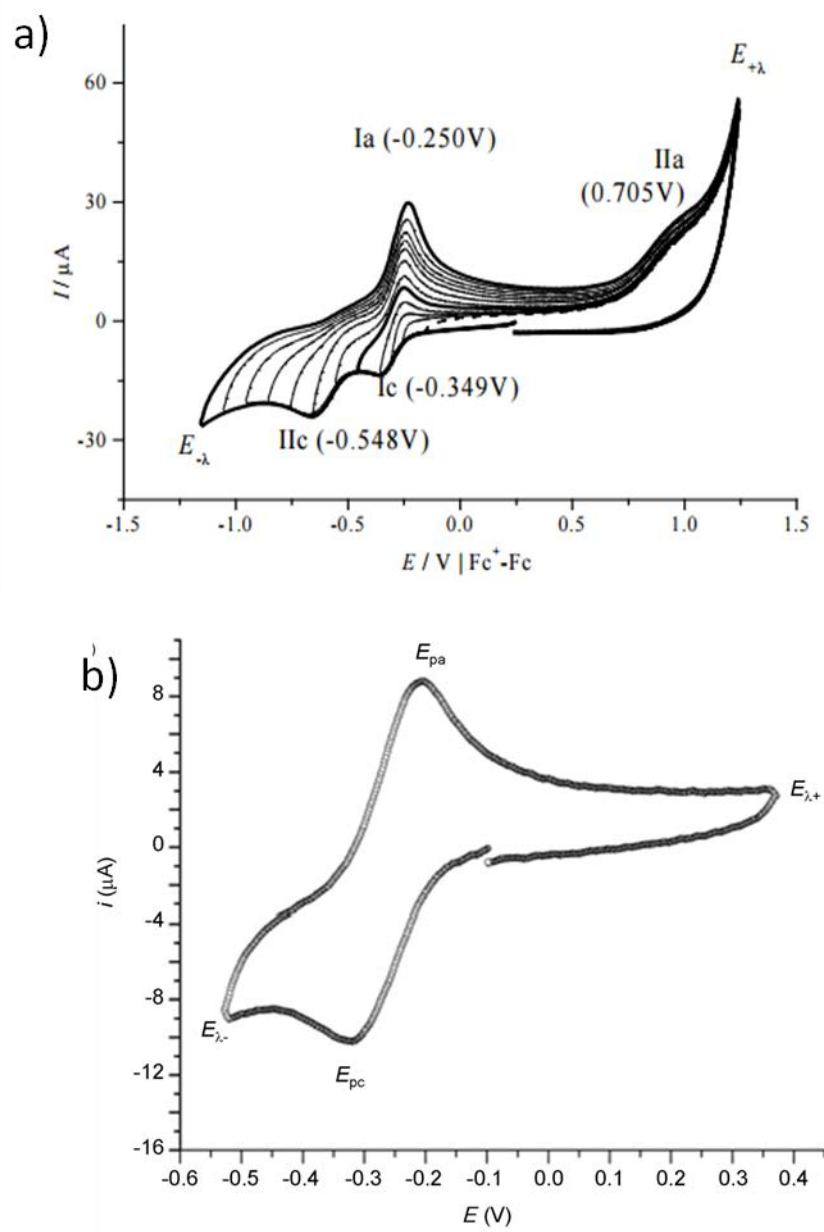
**Figura 30.** Características estructurales de las Casiopeínas en estado sólido. a) Desviación de la geometría adoptada por los compuestos respecto a la geometría regular en función del cambio en la tetragonalidad para ligantes  $\zeta$ -donadores (negro) y con ligantes aceptores  $\pi$  (rojo, azul y verde). b) Relación entre la distancia del cobre al plano  $N_1/N_2/X_1/X_2$  con respecto a la distancia Cu-L<sub>5</sub>. c) Cambio en el promedio de la distancia de la base de la pirámide respecto al cambio en la distorsión angular.

### 5.3 Comportamiento electroquímico

Dado que el potencial redox de estos compuestos ya ha sido utilizado como descriptor electrónico en estudios QSAR, en este trabajo se realizó un estudio electroquímico con la finalidad de profundizar en el comportamiento electroquímico de estos compuestos en diversos disolventes. Este estudio se realizó en metanol empleando hexafluorofosfato de tetrabutilamonio como electrólito soporte y un arreglo de tres electrodos: carbón vítreo como electrodo de trabajo, platino como electrodo auxiliar y un electrodo de plata como pseudo-referencia.

El voltamperograma de la figura 31a muestra el comportamiento general del compuesto **56dmfengly**. Se presentan dos señales de reducción  $I_c$  y  $II_c$  con valores de potencial -0.349

V y  $-0.548\text{V}$  respectivamente y dos señales de oxidación  $I_a = -0.250\text{ V}$  y  $II_a = 0.705\text{ V}$  con respecto al par  $\text{Fc}|\text{Fc}^+$ . Los cortes de potencial de la figura 31b muestran la dependencia de las señales observadas en donde es claro que ambas señales de reducción  $I_c$  y  $II_c$  están asociadas con la señal de oxidación  $I_a$ . La señal  $II_a$  se asocia a la oxidación de especies electrogeneradas cuando el barrido se llevó cerca de la barrera impuesta por el electrolito soporte ( $-1.25\text{V}$ ).



c) 30.0

**Figura 31.** Comportamiento electroquímico general. a) Voltamperograma que muestra el comportamiento general del compuesto **56dmfengly** con el estudio de inversión de potencial para asociar la dependencia de las señales observadas a una velocidad de 100 mV/s. b) Voltamperograma asociado al proceso  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+/\text{Cu}^+ \rightarrow \text{Cu}^{2+}$  de los cuales se obtuvieron los valores de potencial de media onda mostrados en la tabla 5. c) comportamiento de las corrientes de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad.

El comportamiento descrito anteriormente es el mismo que el observado cuando el estudio se realiza en una mezcla de disolventes MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). En dicho estudio se concluye que el primer pico de reducción está asociado al proceso  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ , mientras que el segundo proceso (IIc) es una reducción del Cu(II) que se encuentra en el seno de la disolución pero que se lleva a cabo en un electrodo modificado debido a la adsorción de las especies de Cu(I) electrogeneradas.<sup>123</sup> El proceso de adsorción se explica por la afinidad de los ligantes aromáticos por la superficie de carbón vítreo del electrodo de trabajo.<sup>124</sup> Las señales I<sub>a</sub>, II<sub>a</sub> y I<sub>c</sub> son procesos cuasi-reversibles controlados por difusión de acuerdo al comportamiento de los gráficos de corriente de pico frente a la raíz cuadrada de la velocidad ( $i_p$  vs  $v^{1/2}$ ) (figura 31c) y la diferencia de potenciales de pico que se encuentran en

el intervalo de 70 a 190 mV para todos los compuestos.<sup>125</sup> El comportamiento cuasi-reversible en el proceso  $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$  de las Casiopeínas se atribuye al cambio de la geometría efectiva alrededor del ion metálico pasando de una pirámide de base cuadrada a una geometría tetraédrica después de la transferencia electrónica.<sup>126</sup> Por lo anterior, los datos de  $E_{1/2}$  se obtuvieron empleando los valores de potencial de los picos  $I_c$  y  $I_a$  para cada compuesto estudiado como se muestra en la figura 31b. Los resultados de potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) se presenta un la tabla 5.

**Tabla 5.** Potenciales de media onda ( $E_{1/2}$ ) en mV de los compuestos estudiados.

	gly	acac	salal	pK <sub>a</sub> *	Log ( $[\text{K}_{\text{Cu}}^{(II)}]/[\text{K}_{\text{Cu}}^{(I)}]$ )		
					gly	acac	salal
<b>bpy</b>	-295	-318	-336	4.42	-3.83	-4.21	-4.41
<b>4,4-dmbpy</b>	-316	-338	-348	5.34	-4.18	-4.55	-4.76
<b>5,5-dmbpy</b>	-310	-332	-345	5.18	-4.08	-4.45	-4.66
<b>Fen</b>	-259	-271	-293	4.93	-3.23	-3.43	-3.80
<b>4mfen</b>	-281	-290	-312	5.49	-3.60	-3.75	-4.11
<b>5mfen</b>	-273	-282	-305	5.27	-3.46	-3.61	-4.00
<b>47dmfen</b>	-310	-318	-337	5.95	-4.08	-4.21	-4.53
<b>56dmfen</b>	-292	-298	-321	5.6	-3.78	-3.88	-4.26
<b>Tmfen</b>	-302	-307	-330	5.81	-3.95	-4.03	-4.41
<b>47dφfen</b>	-267	-278	-300	5.16	-3.36	-3.55	-3.91

\* Los valores de pKa fueron tomados de la referencia 91 a excepción del pKa del compuesto 55dmbpyacac, cuyo valor fue tomado de la referencia 127.

Los valores de  $E_{1/2}$  en compuestos de coordinación de cobre pueden estar influenciados fuertemente por dos factores, el primero de ellos es el carácter aceptor o donador  $\pi$  del ligante y el segundo es que se presenten restricciones estructurales debidas al ligante coordinado para adoptar la nueva conformación debida al cambio en el estado de oxidación,<sup>128</sup> aunque este segundo factor no representa un factor determinante, pues de acuerdo a Rorabacher una vez que se da la transformación a Cu(I), la estabilidad de los compuestos

formados es prácticamente insensible a los átomos donadores que conformen su esfera de coordinación o alteraciones estructurales en disolución acuosa, siendo la estabilidad de las especies de Cu(II) las que definen los valores de potencial redox que presentará cada compuesto.

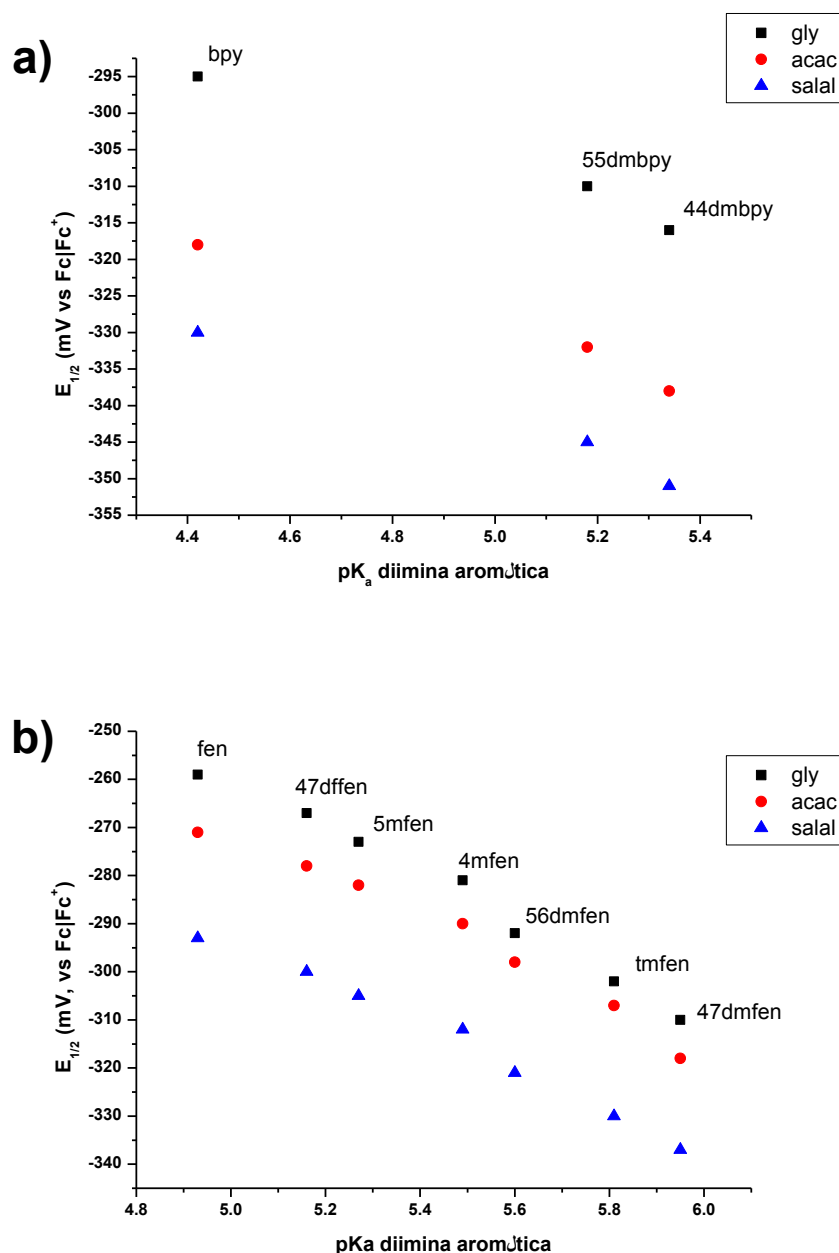
En todos los compuestos se encuentra presente un ligante con un marcado carácter aceptor  $\pi$  (fenantrolina o bipyridina), lo cual proporciona una gran estabilidad al compuesto ternario, esa estabilidad es atribuida a la retrodonación  $\pi$  del ion metálico al sistema aromático.<sup>129-132</sup> Sigel y colaboradores mostraron que los compuestos que involucran fenantrolina son más sensibles a la deslocalización de la densidad electrónica que aquellos con bipyridina.<sup>129</sup> La sensibilidad a la deslocalización de la densidad electrónica puede observarse al comparar los valores de  $E_{1/2}$  de los compuestos con fenantrolina con sus análogos de bipyridina. De acuerdo a Sigel y otros autores, la facilidad con la que se reducen los compuestos que tienen fenantrolina en su estructura puede asociarse a la mayor capacidad de participar en enlaces de retrodonación, debido a que la fenantrolina respecto a la bipyridina es un sistema conjugado con un anillo aromático más, que puede deslocalizar la densidad electrónica de manera más eficiente y facilita así que se reduzca el centro metálico.<sup>128, 129</sup>

Considerando que el valor de  $pK_a$  de los ligantes nos proporciona su capacidad para proporcionar densidad electrónica al metal, de la gráfica de  $pK_a$  vs  $E_{1/2}$  es posible establecer que entre mayor sea la donación  $\zeta$  de estos compuestos, más negativo será el potencial redox registrado en los mismos y más estable la coordinación de la especie oxidada con los ligantes involucrados de acuerdo a los valores de  $\log (K_{CuL^+}^f / K_{CuL^{2+}}^f)$ <sup>126, 133, 134</sup> presentados en la tabla 5. El valor del potencial redox para el nitrato de cobre (II) en



metanol es de  $-65$  mV, valor que fue empleado para calcular los valores de  $\log(K'^f_{CuL^+}/K'^f_{CuL^{2+}})$  de acuerdo a la ecuación:

$$E^f_{Cu^{II}/L} = E^{ac}_{Cu^{II}/L} + \frac{0.059}{n} \log \frac{K'^f_{Cu'L}}{K'^f_{Cu^{II}L}}$$



**Figura 32.** Comportamiento del potencial redox de los compuestos de coordinación con a) bipyridinas y b) fenantrolinas en función del  $pK_a$  de las diiminas aromáticas empleadas.

La dependencia encontrada entre el potencial redox y el pK<sub>a</sub> de las diiminas libres se resume en las siguientes ecuaciones:

$$E_{1/2}^{[Cu(bpy)(gly)]} / [Cu(bpy)(gly)]^+ = -198.16 - 21.85 pK_a, R^2 = 0.972 \dots \dots \dots (1)$$

$$E_{1/2}^{[Cu(bpy)(acac)]} / [Cu(bpy)(acac)]^+ = -226.27 - 20.69 pK_a, R^2 = 0.964 \dots \dots \dots (2)$$

$$E_{1/2}^{[Cu(bpy)(salal)]} / [Cu(bpy)(salal)]^+ = -265.43 - 15.98 pK_a, R^2 = 0.998 \dots \dots \dots (3)$$

$$E_{1/2}^{[Cu(fen)(gly)]} / [Cu(fen)(gly)]^+ = -3.59 - 51.26 pK_a, R^2 = 0.983 \dots \dots \dots (4)$$

$$E_{1/2}^{[Cu(fen)(acac)]} / [Cu(fen)(acac)]^+ = -43.28 - 45.56 pK_a, R^2 = 0.973 \dots \dots \dots (5)$$

$$E_{1/2}^{[Cu(fen)(salal)]} / [Cu(fen)(salal)]^+ = -73.36 - 44.08 pK_a, R^2 = 0.984 \dots \dots \dots (6)$$

De las ecuaciones anteriores se concluye que el principal modulador de la densidad electrónica es la diimina aromática, pues sólo con el valor de pK<sub>a</sub> del ligante libre se ha podido describir el comportamiento del potencial redox de todos los compuestos, independientemente del ligante secundario que se presenta en la esfera de coordinación del metal. Como se puede apreciar en los gráficos de la figura 32a y 32b, los compuestos con bipyridina presentan valores de potencial redox más negativos que los sistemas análogos de fenantrolina. Para que se pueda presentar la reducción del centro metálico debe de existir una disminución de la densidad electrónica que es facilitada por la diimina aromática al participar en la interacción de retrodonación. La bipyridina al contar con un sistema aromático menor puede retirar menos densidad del metal, lo que provoca que tenga valores de potencial redox más negativos que el sistema con fenantrolina. Para todos los sistemas

sustituidos al introducir grupos electrodonadores en las diferentes posiciones se incrementa la densidad electrónica sobre el metal, pero sin disminuir la capacidad de las diiminas para participar en la retrodonación, con excepción de los sistemas **tmfen** y **55dmbpy**.

Por otro lado, de la pendiente y la ordenada al origen de cada ecuación es posible estimar la contribución de cada ligante secundario en el potencial redox y por tanto en la participación de estos ligantes en la distribución de la densidad electrónica. Si consideramos los valores de potencial redox cuando el  $pK_a = 0$  tendremos que  $E_{1/2} = b$ , entonces los valores más positivos de potencial redox representarán a aquellos sistemas en donde la estabilización del sistema reducido es mayor, para las familias analizadas corresponde al sistema con glicinato como ligante secundario. El incremento en los valores de potencial redox en los sistemas con acac y salal como ligantes secundarios se atribuye a la capacidad de estos sistemas a participar en la retrodonación debido a la pseudo-aromaticidad adquirida una vez que estos ligantes se coordinan al catión metálico.<sup>135</sup>

#### **5.4 Resonancia Paramagnética Electrónica (RPE)**

Para continuar con el estudio del comportamiento de estos compuestos en disolución se llevó a cabo un estudio de resonancia paramagnética electrónica (RPE) a 77 K empleando disoluciones de metanol. Los resultados se resumen en la tabla 6 y en la figura 33.

Los espectros colectados a 77 K a partir de una disolución de metanol 1mM se presentan en la figura 16. El espectro presenta cuatro líneas hiperfinas que corresponden al acoplamiento del electrón desapareado del Cu(II) acoplándose con el núcleo de Cu ( $I = 3/2$ ), señales características para especies monoméricas de Cu(II).

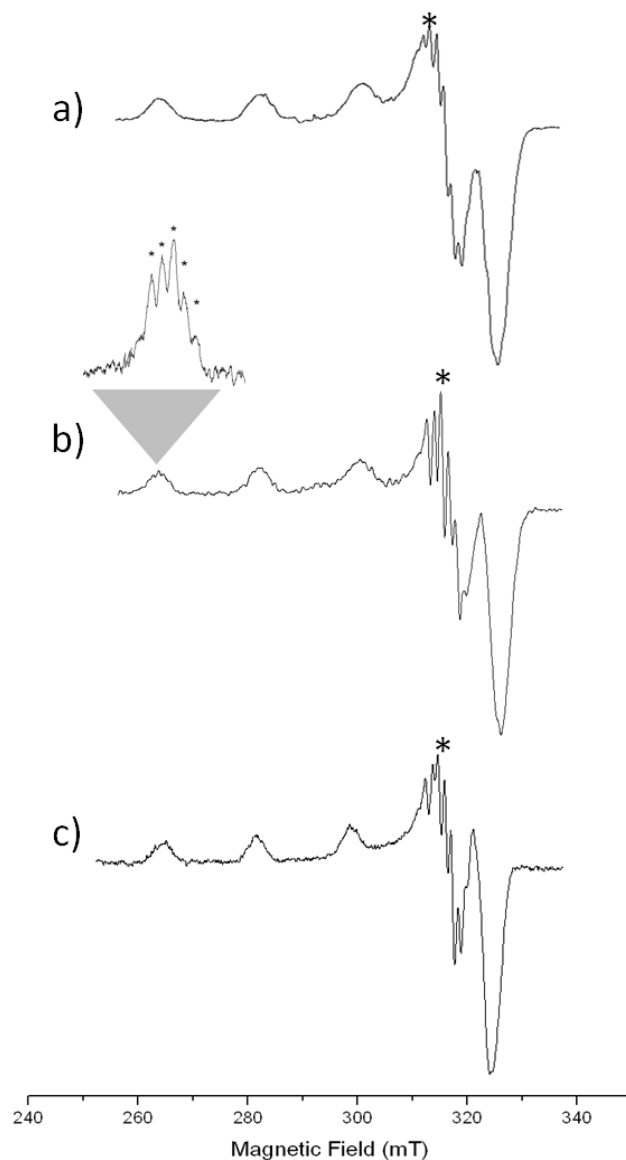
**Tabla 6.** Parámetros RPE para los compuestos de coordinación de Cu(II) con fórmula general [Cu (N-N) (X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>

Compuesto	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}^{[a]}$	$A_{\perp}^{[a]}$	$g_0$	$A_0^{[a]}$	$\Delta E_{xy}^{[b]}$	$\Delta E_{xz}^{[b]}$	$\alpha^2$	$\beta_1^2$	$\beta^2$
<b>Bpygly</b>	2.243	2.057	190.0	7.60	2.119	68.4	18656	16501	0.8319	0.7207	0.7407
<b>Bpyacac</b>	2.221	2.056	182.0	8.00	2.111	66.0	18726	16501	0.7872	0.6920	0.7713
<b>Bpysalal</b>	2.253	2.034	171.5	11.0	2.107	64.5	18445	16042	0.7806	0.7777	0.4522
<b>44dmbpygly</b>	2.236	2.056	191.0	7.60	2.116	68.7	18879	16556	0.8272	0.7060	0.7400
<b>44dmbpyacac</b>	2.252	2.066	188.0	8.00	2.128	68.0	18832	16611	0.8392	0.7461	0.8631
<b>44dmbpysalal</b>	2.248	2.032	173.0	11.0	2.104	65.0	20500	16459	0.7789	0.7837	0.4719
<b>55dmbpygly</b>	2.248	2.060	189.6	12.6	2.122	71.6	18726	16501	0.8371	0.7311	0.7794
<b>55dmbpyacac</b>	2.251	2.064	189.5	13.6	2.126	72.2	18656	16477	0.8415	0.7351	0.8259
<b>55dmbpysalal</b>	2.256	2.060	181.1	12.0	2.125	68.3	18450	15923	0.8212	0.7426	0.7828
<b>Phengly</b>	2.250	2.052	183.0	7.60	2.118	66.0	18450	16339	0.8173	0.7475	0.6774
<b>Phenacac</b>	2.225	2.060	179.5	8.00	2.115	65.1	18656	16339	0.7846	0.7000	0.8284
<b>Phensalal</b>	2.257	2.038	170.2	11.5	2.111	64.4	18341	15981	0.7822	0.7855	0.5054
<b>47dmphengly</b>	2.237	2.054	189.0	7.60	2.115	68.0	18867	16559	0.8218	0.7138	0.7167
<b>47dmphenacac</b>	2.226	2.055	182.0	8.00	2.112	66.0	18518	16501	0.7918	0.7037	0.7442
<b>47dmphensalal</b>	2.253	2.037	175.0	12.0	2.109	66.3	20000	16778	0.7916	0.8020	0.5293
<b>47dmphenser</b>	2.261	2.048	187.7	7.80	2.119	67.7	19000	16080	0.8396	0.7479	0.6244
<b>47dmphenval</b>	2.251	2.050	184.1	9.50	2.117	67.7	20687	16713	0.8205	0.7647	0.7262
<b>47dmphenala</b>	2.235	2.058	183.0	9.00	2.117	67.0	20764	16778	0.8049	0.7322	0.8676
<b>47dmphenleu</b>	2.234	2.057	179.0	11.0	2.116	67.0	19852	16792	0.7923	0.7412	0.8275
<b>47dmphenile</b>	2.237	2.057	183.0	10.5	2.117	68.0	20263	16515	0.8064	0.7255	0.8299
<b>47dmphennle</b>	2.234	2.057	184.0	11.0	2.116	68.6	20055	16260	0.8062	0.7054	0.8216
<b>5mphengly</b>	2.243	2.057	187.0	7.60	2.119	67.4	18450	16393	0.8235	0.7232	0.7399
<b>5mphenacac</b>	2.223	2.058	178.2	8.00	2.113	64.7	18450	16447	0.7795	0.7029	0.7960
<b>4mphengly</b>	2.243	2.054	187.0	7.60	2.117	67.4	18460	16370	0.8223	0.7233	0.7008
<b>4mphenacac</b>	2.220	2.064	187.0	8.00	2.116	67.6	18450	16447	0.8035	0.6726	0.8554
<b>56dmgly</b>	2.242	2.056	190.0	7.60	2.118	68.4	18518	16501	0.8304	0.7189	0.7230
<b>56dmacac</b>	2.221	2.056	178.5	8.00	2.111	64.8	18726	16501	0.7775	0.7006	0.7809
<b>56dmphensalal</b>	2.250	2.040	178.0	12.0	2.110	67.3	20576	16891	0.7983	0.7912	0.5867
<b>Tmphengly</b>	2.243	2.057	189.0	7.60	2.119	68.0	18656	16656	0.8291	0.7299	0.7432
<b>Tmphenacac</b>	2.224	2.056	184.0	8.00	2.112	66.6	18518	16393	0.8097	0.6776	0.7416
<b>47dφphengli</b>	2.275	2.035	183.0	7.60	2.115	66.0	19000	16403	0.8350	0.8086	0.4492
<b>47dφphenacac</b>	2.221	2.059	179.9	6.00	2.113	63.9	18950	16379	0.7827	0.6908	0.8289
<b>47dφphensalal</b>	2.246	2.036	179.6	12.0	2.106	67.8	18433	16051	0.7970	0.7409	0.4706
<b>47dφphenser</b>	2.269	2.047	183.6	8.00	2.121	66.5	19068	16447	0.8358	0.7922	0.6157
<b>47dφphenval</b>	2.255	2.048	175.5	9.00	2.117	64.5	18914	16434	0.7997	0.7838	0.6526

<sup>a</sup>Unidades en  $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ; <sup>b</sup> Transiciones electrónicas obtenidas de disoluciones en metanol, las unidades empleadas son  $\text{cm}^{-1}$

**Tabla 6.** Parámetros RPE para los compuestos de coordinación de Cu(II) con fórmula general [Cu (N-N) (X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>

Compuesto	$\alpha_{1,2}$	$\beta_{1,2}$	$\beta_{3,2}$	$\kappa_{1,2}$	$\kappa_{1,2}$	$\kappa_{0,2}$	Fermi	f( $\alpha$ )
<b>Bpygly</b>	0.3697	0.8603	0.8703	0.5996	0.6162	0.6106	0.3067	118.05
<b>Bpyacac</b>	0.4218	0.8460	0.8856	0.5448	0.6072	0.5864	0.2920	122.03
<b>Bpysalal</b>	0.4290	0.8888	0.7261	0.6071	0.3530	0.4377	0.2838	131.37
<b>44dmbpygly</b>	0.3754	0.8530	0.8700	0.5841	0.6122	0.6028	0.3045	117.06
<b>44dmbpyacac</b>	0.3606	0.8730	0.9315	0.6261	0.7244	0.6916	0.3145	119.78
<b>44dmbpysalal</b>	0.4308	0.8918	0.7359	0.6105	0.3676	0.4486	0.2822	129.94
<b>55dmbpygly</b>	0.3633	0.8655	0.8897	0.6120	0.6524	0.6390	0.3185	118.56
<b>55dmbpyacac</b>	0.3577	0.8675	0.9129	0.6186	0.6950	0.6696	0.3242	118.78
<b>55dmbpysalal</b>	0.3827	0.8713	0.8914	0.6098	0.6428	0.6318	0.3124	124.64
<b>fengly</b>	0.3874	0.8737	0.8387	0.6109	0.5537	0.5728	0.2990	122.95
<b>fenacac</b>	0.4231	0.8500	0.9142	0.5493	0.6500	0.6164	0.2935	124.30
<b>fensalal</b>	0.4267	0.8927	0.7527	0.6144	0.3953	0.4684	0.2875	132.76
<b>47dmphengly</b>	0.3820	0.8569	0.8583	0.5867	0.5890	0.5882	0.3015	118.35
<b>47dmphenacac</b>	0.4167	0.8518	0.8721	0.5572	0.5893	0.5786	0.2930	122.30
<b>47dmphensalal</b>	0.4169	0.9010	0.7646	0.6350	0.4190	0.4910	0.2908	128.74
<b>47dmphenser</b>	0.3600	0.8739	0.8122	0.6280	0.5243	0.5588	0.3047	120.45
<b>47dmphenval</b>	0.3836	0.8823	0.8631	0.6274	0.5958	0.6064	0.3027	122.27
<b>47dmphenala</b>	0.4019	0.8661	0.9338	0.5894	0.6984	0.6620	0.3008	122.13
<b>47dmphenleu</b>	0.4161	0.8706	0.9137	0.5873	0.6557	0.6329	0.2998	124.80
<b>47dmphenile</b>	0.4001	0.8627	0.9149	0.5851	0.6693	0.6412	0.3035	122.24
<b>47dmphenle</b>	0.4003	0.8527	0.9108	0.5687	0.6624	0.6312	0.3042	121.41
<b>5mphengly</b>	0.3799	0.8616	0.8699	0.5956	0.6094	0.6048	0.3039	119.94
<b>5mphenacac</b>	0.4302	0.8514	0.8980	0.5479	0.6205	0.5963	0.2904	124.74
<b>4mphengly</b>	0.3814	0.8617	0.8504	0.5948	0.5763	0.5824	0.3019	119.94
<b>4mphenacac</b>	0.4034	0.8363	0.9277	0.5405	0.6874	0.6384	0.3014	118.71
<b>56dmgly</b>	0.3715	0.8594	0.8615	0.5971	0.6004	0.5993	0.3057	118.00
<b>56dmacac</b>	0.4324	0.8503	0.8904	0.5448	0.6072	0.5864	0.2887	124.42
<b>56dmphensalal</b>	0.4094	0.8956	0.7933	0.6316	0.4684	0.5228	0.2946	126.40
<b>Tmphengly</b>	0.3963	0.8649	0.8716	0.6052	0.6162	0.6125	0.3055	118.67
<b>Tmphenacac</b>	0.4122	0.8388	0.8708	0.5486	0.6004	0.5832	0.2947	117.67
<b>47dφphengli</b>	0.3658	0.9043	0.7246	0.6752	0.3751	0.4752	0.2960	124.31
<b>47dφphenacac</b>	0.4268	0.8454	0.9144	0.5407	0.6488	0.6128	0.2882	123.45
<b>47dφphensalal</b>	0.4109	0.8704	0.7353	0.5905	0.3751	0.4469	0.2920	125.05
<b>47dφphenser</b>	0.3648	0.8961	0.8078	0.6622	0.5147	0.5638	0.3034	123.58
<b>47dφphenval</b>	0.4078	0.8919	0.8263	0.6269	0.5219	0.5569	0.2938	128.49



**Figura 33.** Espectros de RPE de los compuestos a) 55dmbpygly, b) 55dmbpyacac y c) 55dmbpysalal. En el espectro de 55dmbpyacac es posible apreciar el acoplamiento con los dos átomos de nitrógeno en la señal hiperfina. El asterisco de la región central indica la componente perpendicular del acoplamiento del electrón desapareado con el núcleo de cobre (II).

En el centro del campo se puede identificar un patrón de seis líneas. Una de estas señales, marcada en cada espectro con asterisco en la figura 33, está asociada con el componente perpendicular ( $g_{\perp}$ ) de la interacción entre el electrón desapareado y el centro

metálico. Las cinco señales restantes son atribuidas al acoplamiento del electrón desapareado con los átomos de nitrógeno donadores coordinados al centro metálico (constantes de acoplamiento superhiperfino). Es interesante destacar en este punto que a pesar de la esfera de coordinación para el cobre en cada caso,  $N_3O$  para los compuestos con glicinato y  $N_2O_2$  para los compuestos con acac y salal, el número de líneas presentes en los espectros son las mismas en todos los casos.

Las cinco líneas observadas ( $m=2nI+1$ , donde  $n$  es el número de núcleos con los que el electrón desapareado interactúa e  $I$  es el espín nuclear de los átomos donadores,  $I^{14}_N=1$ ,  $I^{16}_O=0$ ) deja claro que sólo son dos los átomos de nitrógeno que interactúan fuertemente con el centro metálico. De acuerdo con los valores de las constantes de formación ( $\log K_{Cu-phen} = 9.1$ ,  $\log K_{Cu-bpy} = 8.1$ ,  $\log K_{Cu-gly} = 8.1$ ,<sup>133</sup> así como los resultados encontrados en el estudio electroquímico y los estudios de difracción de rayos X los átomos que interactúan más fuertemente con el Cu(II) son los nitrógenos de la diimina aromática. La asignación se realizó de acuerdo a los parámetros obtenidos en la simulación cuyos valores se enlistan en la tabla 6.

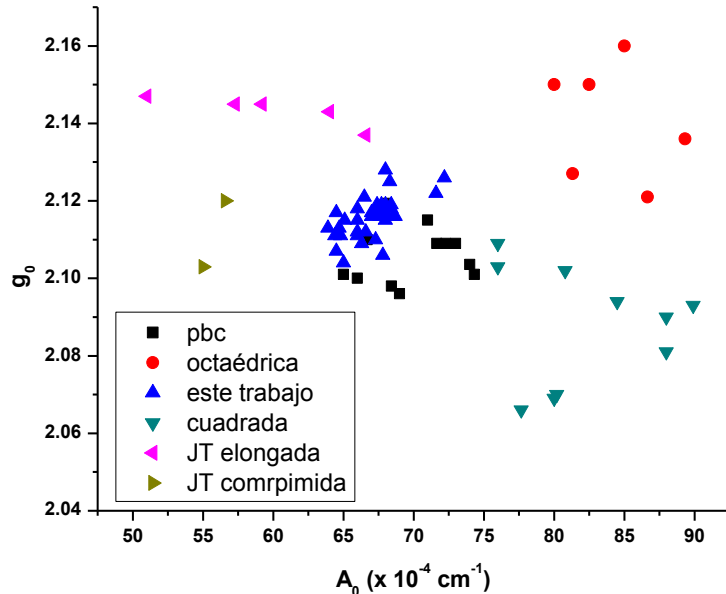
Una de las características principales de la espectroscopia RPE es la de proporcionar información acerca del ambiente electrónico en el que se encuentra el ión metálico y la geometría que adopta el mismo dentro de este ambiente. Sin embargo, muy poca información relacionada con moléculas pequeñas de Cu(II) se ha compilado y analizado detalladamente de aquellas especies que no estén relacionadas con sitios activos de proteínas o modelos biomiméticos.

En la gran mayoría de los casos la información obtenida sólo está asociada al estado basal de los compuestos de Cu(II). Para un estado basal  $d_{x^2-y^2}$  los valores de  $g$  presentan los valores  $g_{||} \gg g_{\perp} > 2.0023$ , mientras que para un estado basal  $d_{z^2}$  los valores encontrados son

$g_{\perp} \gg g_{\parallel} = 2.0023$ .<sup>117</sup> Kivelson y Nieman<sup>136</sup> sugieren emplear los valores de  $g_{\parallel}$  para poder diferenciar un ambiente puramente iónico del enlace del centro metálico con los átomos donadores,  $g_{\parallel} > 2.3$ , de aquel en donde el ambiente tiene predominantemente un carácter covalente  $g_{\parallel} < 2.3$ . Los valores mostrados en la tabla 6 para los compuestos estudiados en este trabajo muestran que todos tienen al orbital  $d_{x^2-y^2}$  como el estado basal y que en todos los casos los enlaces entre el centro metálico y los átomos donadores (al menos los de la base de la pirámide) presentan un predominante carácter covalente.

Desde la mitad de la década de los 70's, muchos autores emplearon los parámetros de RPE para determinar la geometría que adoptaba el Cu (II), principalmente en sitios activos de proteínas.<sup>137-140</sup> En este trabajo, se encontraron resultados muy importantes con respecto al uso de parámetros espectroscópicos de RPE para identificar la geometría adoptada por el cobre(II) en varios compuestos de coordinación. Una compilación de datos reportados en la literatura muestra que los compuestos de coordinación que se encuentran en diferentes geometrías poseen valores diferentes de  $g$  y de la constante de acoplamiento  $A$ . La diferencia que tienen los valores isotrópicos de estos compuestos es suficiente para distinguir distintos grupos de compuestos en función de su geometría.<sup>139, 141-145</sup> La figura 34 muestra la geometría de los diferentes grupos de compuestos de coordinación de Cu(II) identificados por colores de acuerdo a los valores de  $g_0$  y  $A_0$  que presentan. La geometría de los compuestos empleados para elaborar el gráfico con los parámetros de RPE fue confirmada por la estructura molecular obtenida por difracción de rayos X.





**Figura 34.** Gráfico de los valores  $g_0$  frente  $A_0$  para diferentes compuestos de coordinación cuya estructura fue confirmada por rayos X.

En la figura 34 se puede apreciar que los compuestos se agrupan de manera muy similar a los descritos por Peisach y Blumberg para Cu(II) en sitios activos de proteínas.<sup>138-140</sup> Los compuestos con una geometría octaédrica regular y con una geometría cuadrada presentan valores de  $A_0$  entre 75 y 95  $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , la diferencia entre estos dos grupos radica en los valores de  $g_0$ , siendo entre 2.06 y 2.12 para los compuestos cuadrados y de 2.12 a 2.16 para los compuestos octaédricos. Cuando los compuestos presentan una geometría de pirámide de base cuadrada los valores de  $A_0$  y  $g_0$  son de 65 a 75  $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  y de 2.09 a 2.13, respectivamente. Finalmente, para aquellos compuestos que presentan un marcado efecto Jahn-Teller de elongación y de compresión, los valores de  $A_0$  disminuyen siendo ahora de 50 a 65  $\times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  mientras que los valores de  $g_0$  se encuentran en el intervalo de 2.10 a 2.15. Es posible establecer un comportamiento general considerando a las geometrías cuadrada, pirámide de base cuadrada y las octaédricas que presentan distorsión Jahn-Teller,

para éstas entre mayor sea la distorsión de la geometría, menores son los valores encontrados para la constante de acoplamiento  $A_0$  mientras que los valores para la constante de proporcionalidad  $g_0$  incrementan. El mismo comportamiento se observa cuando en lugar de emplear los valores isotrópicos se emplean los componentes paralelos de  $A$  y de  $g$ , lo cual puede explicarse por la gran contribución que tienen estos componentes cuando el espectro es de tipo axial de acuerdo a las siguientes fórmulas  $A_0 = (A_{\parallel} + A_{\perp})/3$  y  $g_0 = (g_{\parallel} + 2g_{\perp})/3$ .

La figura generada y los datos previamente discutidos representan una herramienta muy importante en la asignación de la geometría adoptada en disolución por compuestos de Cu(II), una tarea muy difícil de resolver cuando otras técnicas espectroscópicas como el UV-Vis o el dicroísmo circular no proporcionan información concluyente y se depende totalmente de los resultados de rayos X. De esta manera, adquiriendo los espectros de RPE de las disoluciones congeladas de los compuestos de Cu(II) se tiene una representación acertada de la geometría adoptada por el ion metálico en la gran mayoría de las moléculas, lo que proporciona una herramienta sencilla para conocer la geometría de los compuestos si el espectro obtenido es de tipo axial.

## **5.5 Correlación de propiedades encontradas**

### **5.5.1 Evaluación de la ionicidad, la covalencia del enlace y efecto del sustituyente**

Empleando los parámetros obtenidos de los espectros de RPE, también es posible conocer el grado de ionicidad y covalencia del enlace como se mencionaba en párrafos anteriores.

Para simplificar el sistema se considerará que la interacción de los átomos donadores de la base de la pirámide tienen una mayor contribución a la deslocalización de la densidad electrónica que el átomo donador que se encuentra en una posición apical, de tal forma que se pueda definir el hamiltoniano de espín para un Cu(II) con un estado basal  $d_{x^2-y^2}$  como sigue:

$$\hat{H} = g_{\parallel}\beta B_z S_z + g_{\perp}\beta(B_x S_x + B_y S_y) + A^{Cu} I_z S_z + B^{Cu}(I_x S_x + I_y S_y)$$

donde  $\beta$  es el magnetón de Bohr,  $B$  es el campo magnético aplicado,  $I$  es el operador momento angular de espín del núcleo y  $S$  es el operador momento angular de espín del electrón. En el marco teórico proporcionado por la teoría de orbitales moleculares, la idea de construir éstos como una combinación lineal de orbitales atómicos que expresen la interacción entre el átomo central y los átomos donadores del ligante puede expresarse de la siguiente forma:

$$\Psi_{OM_{ij}} = \sum_i C_{ij} \Psi_{Mi}$$

Considerando lo anterior se pueden obtener los cinco orbitales moleculares  $\Psi_{OM}$ :

$$\Psi(B_{1g}) = \alpha d_{(x^2-y^2)} - \alpha' \{ (\zeta_x^1 - \zeta_y^2 - \zeta_x^3 + \zeta_y^4) / 2 \}$$

$$\Psi(B_{2g}) = \beta_1 d_{(xy)} - \beta_1' \{ (p_y^1 + p_x^2 - p_y^3 - p_x^4) / 2 \}$$

$$\Psi(A_{1g}) = \alpha_1 d_{(z^2)} - \alpha_1' \{ (\zeta_x^1 + \zeta_y^2 - \zeta_x^3 - \zeta_y^4) / 2 \}$$

$$\Psi(E_g) = \beta d_{(xz)} - \beta' \{ (p_z^1 - p_z^3) / 2^{(1/2)} \}$$

$$\Psi(E_g) = \beta d_{(yz)} - \beta' \{ (p_z^2 - p_z^4) / 2^{(1/2)} \}$$

La nomenclatura empleada es la misma que la que usaron Kivelson y Nieman. Dado que el estado  $A_{1g}$  puede ser ignorado porque no influencia los parámetros magnéticos cuando se considera, una aproximación de segundo orden. Los parámetros  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_1'$ ,  $\beta$  y  $\beta'$  representan los coeficientes tanto del metal como de los átomos donadores para la

formación de los enlaces  $\zeta$ ,  $\pi$  en el plano y  $\pi$  fuera del plano, respectivamente. Los valores cuadráticos de estos parámetros iguales o cercanos a 1 están asociados a un carácter del enlace predominantemente iónico, mientras que valores cercanos o iguales a 0.5 están asociados a un carácter predominantemente covalente en el enlace del ion metálico con los átomos donadores.<sup>136</sup> Las siguientes expresiones fueron empleadas para obtener los valores de los coeficientes cuadráticos requeridos y que se presentan en la tabla 6:

$$\alpha^2 = - (A_1 / P) + (g_{\parallel} - 2.0023) + 3/7 (g_{\perp} - 2.0023) + 0.04$$

$$\alpha^2 \beta_1^2 = ((g_{\parallel} - 2.0023) \Delta E_{xy}) / (8\lambda_0)$$

$$\alpha^2 \beta^2 = ((g_{\perp} - 2.0023) \Delta E_{xz}) / (2\lambda_0)$$

$$\beta_1^2 = 2\beta_1'^2 - 1$$

$$\beta^2 = 2\beta^2 - 1$$

donde el coeficiente dipolar  $P = -0.036 \text{ cm}^{-1}$ , la constante de acoplamiento espín-órbita para el ion Cu(II) libre  $\lambda_0 = -828 \text{ cm}^{-1}$  mientras que  $\Delta E_{xy}$  y  $\Delta E_{xz}$  son las transiciones electrónicas  ${}^2B_{2g} \leftarrow {}^2B_{1g}$  and  ${}^2E_g \leftarrow {}^2B_{1g}$ , respectivamente (los valores de las transiciones también se presentan en la tabla 6). Se asume que el máximo asociado a la transición d-d del Cu(II) corresponde a la transición  $\Delta E_{xy}$ , mientras que el valor de  $\Delta E_{xz}$  puede ser tomado de la misma banda tomando el máximo de absorción que corresponde a la mitad de la absorbancia que presenta el máximo  $\Delta E_{xy}$  hacia los valores de longitud de onda más energéticos.

La función que describe el enlace  $\zeta$  ( $\Psi(B_{1g})$ ) es  $\alpha^2 - 2\alpha\alpha'S + \alpha'^2 = 1$ , donde la integral de traslape (S) entre  $\text{Cu}_{d(x^2-y^2)}$  y el orbital del ligante tiene un valor de  $S_{\text{nitrogen}} = 0.093$ . De esta ecuación y derivado de la condición de normalización  $\alpha'^2$  representa la fracción de densidad electrónica proveniente del ligante involucrada en la formación del enlace  $\zeta$ . La

contribución de los átomos donadores para la formación del enlace  $\pi$  en el plano y fuera del plano está considerado en los valores de  $\beta_1'^2$  y  $\beta^2$  respectivamente.

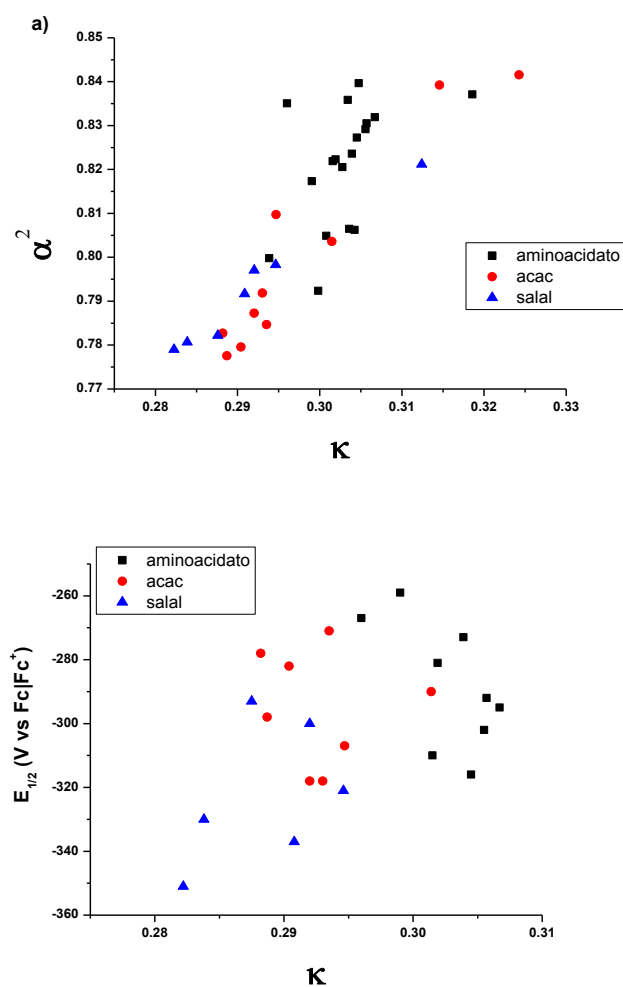
De manera general, analizando los valores de la tabla 6 se aprecia que para la misma diimina aromática, la covalencia en el enlace  $\zeta$  incrementa (valores de  $\alpha^2$  menores) cuando el ligante secundario es salal, seguido de acac y finalmente los aminoácidos. Para el enlace  $\pi$  en el plano el ligante secundario que proporciona una disminución en el valor de  $\beta_1'^2$  es el acac, seguido por los aminoácidos y el salal. Finalmente para el enlace  $\pi$  fuera del plano se tiene que el carácter covalente en el enlace aumenta en función del siguiente orden de ligantes secundarios: salal > aminoácidos > acac. Como es de esperarse, el incremento en el carácter covalente del enlace  $\zeta$  está relacionada con la fracción de densidad electrónica proporcionada por los ligantes ( $\alpha'^2$ , de 35 a 43 %). Para estos compuestos, entre mayor es la participación de los átomos donadores, mayor es la covalencia del enlace  $\zeta$  (Figura 34).

Una evidencia adicional de la fuerte participación de los átomos donadores en la covalencia del enlace  $\zeta$  es el cambio observado en el parámetro conocido como contacto de Fermi ( $\kappa$ )\*. Se ha sugerido que la modificación de la carga total del orbital 4s del ion metálico puede ser una de las razones para la modificación del contacto de Fermi.<sup>146-148</sup> Vänngård y sus colaboradores<sup>149</sup> proporcional la siguiente ecuación para calcular  $\kappa$  de manera empírica:

$$\kappa = (A_{||} / P) + (g_0 - 2.0023)$$

Los valores de la tabla 6 y la figura 35 muestran una relación lineal entre el contacto de Fermi y el enlace  $\zeta$ . Un incremento en la densidad de carga del orbital 4s provocará una

disminución en el valor de  $\kappa$  a través de la polarización de espín de este orbital, teniendo como consecuencia un incremento en el carácter covalente del enlace. La geometría de pirámide de base cuadrada adoptada por estos compuestos permite el incremento del enlace axial y por lo tanto el incremento de la densidad en el orbital 4s por medio de la hibridación del orbital sp del aceptor, consistente con el diagrama de orbital molecular propuesto por Ross para  $\text{Cu}(\text{HD})_2$ , en donde coloca los orbitales vacíos  $3b_{1u}$  (con carácter 4p) y  $4a_g$  (predominantemente 4s) muy cercanos en valores bajos de energía.<sup>150</sup>



**Figura 35.** Efecto del cambio de la densidad de carga sobre la covalencia del enlace  $\zeta$  (a) y sobre el potencial redox (b) de los compuestos ternarios de Cu(II).

La participación del orbital  $s$  del metal también tendrá efecto sobre el potencial redox de los compuestos, pues un incremento en la densidad de carga sobre el orbital  $4s$  provoca una mayor energía empleada para generar la reducción del centro metálico que se verá reflejado en un valor de potencial redox más negativo como se muestra en la figura 35b. Las excepciones se presentan para los compuestos que tienen al ligante  $55dmbpy$  en su esfera de coordinación.

Por otro lado, los enlaces  $\pi$  en el plano y fuera del plano se comportan diferente en función del ligante secundario presente. Para el enlace  $\pi$  en el plano, el mayor carácter covalente se encuentra para los compuestos que presentan  $acac$  como ligante secundario, seguido por los aminoacidatos y finalmente los derivados con  $salal$ . Con respecto al enlace  $\pi$ -fuera del plano el carácter covalente del enlace presenta el siguiente orden:  $salal > aa > acac$ . Esto implica que cuando se tienen compuestos con  $acac$  la vía por la cual se hace la retrodonación es por el enlace  $\pi$  en el plano principal de la molécula, mientras que aquellos compuestos con  $salal$  en su esfera de coordinación la retrodonación se presenta a través de los enlaces  $\pi$  fuera del plano. Un dato importante a destacar es que en todos los casos el ligante aminoacidato presenta una participación importante en las interacciones de retrodonación empleando ambos enlaces  $\pi$ .

Otra forma de visualizar la participación del enlace  $\pi$  en la covalencia de los enlaces de  $Cu(II)$  es aquella sugerida por Hathaway e involucra el factor de reducción orbital  $k^{151}$  (el símbolo que emplea Hathaway para designar el factor de reducción orbital es el mismo que se emplea para designar el contacto de Fermi, por ello, en este trabajo el factor de reducción orbital se designará como  $k$ ). Para compuestos de  $Cu(II)$  con un estado basal  $^2B_{1g}$  los valores de  $g$  pueden expresarse de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$k_{\parallel}^2 = ((g_{\parallel} - 2.0023)\Delta E_{xy}) / (8\lambda_0)$$

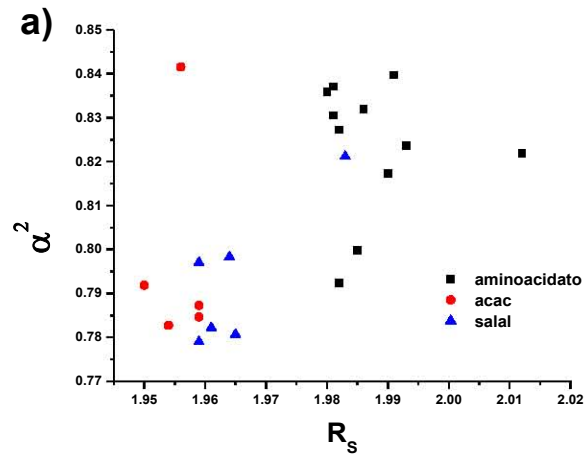
$$k_{\perp}^2 = ((g_{\perp} - 2.0023) \Delta E_{xz}) / (2\lambda_0)$$

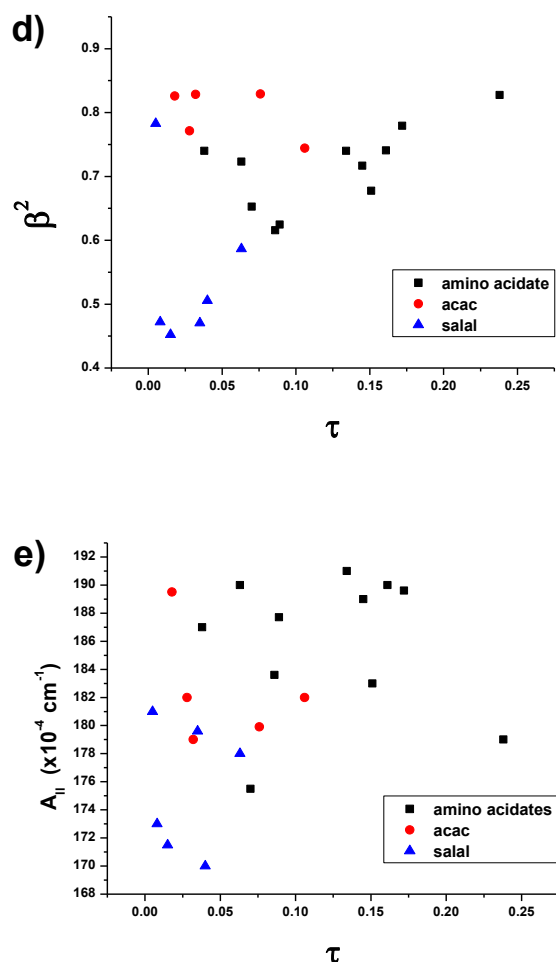
$$k_0^2 = (k_{\parallel}^2 + 2k_{\perp}^2) / 3$$

donde  $k_{\parallel}$  y  $k_{\perp}$  son los componentes paralelo y perpendicular respectivamente del factor de reducción orbital. Existen diferentes valores para la relación entre el componente paralelo y perpendicular del factor de reducción orbital en función del tipo de enlace que predomine en el compuesto, de acuerdo a esto, para compuestos cuya esfera de coordinación esté constituida por  $\zeta$ -donadores  $k_{\parallel} \cong k_{\perp} \cong 0.77$ , para aquellos compuestos donde el enlace p en el plano predomine en la covalencia del compuesto  $k_{\parallel} < k_{\perp}$ , mientras que al tener una relación  $k_{\parallel} > k_{\perp}$  implica un fuerte enlace  $\pi$  fuera del plano.<sup>151, 152</sup> De manera general todos los compuestos con salal como ligante secundario presentan un fuerte enlace  $\pi$  fuera del plano, mientras que los compuestos con acac y aminoacidoato presentan un fuerte enlace  $\pi$  en el plano.

Empleando los resultados de las distancias de enlace así como los parámetros de RPE encontramos más tendencias que nos ayudan a entender un poco más las interacciones existentes entre los átomos donadores y el catión metálico. Por ejemplo, la covalencia encontrada en los enlaces  $\zeta$  de los compuestos estudiados sugiere una compartición importante de densidad electrónica entre el ion metálico y los átomos donadores que debe verse reflejada en las distancias de enlace de la base de la pirámide. Como era de esperarse, en la figura 36a se puede observar que los compuestos se encuentran agrupados en función de los átomos donadores que conforman la esfera de coordinación del metal.







**Figura 35.** Cambio en la covalencia del enlace (a), en el valor del contacto de Fermi (b) y en el valor de  $g_0$  (c) respecto al cambio en el promedio de las distancias de enlace de la base de la pirámide. Las figuras d) y e) muestran el cambio en la covalencia del enlace  $\pi$  fuera del plano y del acoplamiento del electrón desapareado con los nitrógenos en función de la distorsión angular presente en los compuestos.

Los compuestos con acac o salal como ligantes secundarios son los que presentan un alto grado de covalencia y también presentan las distancias de enlace más cortas. El alto grado de covalencia así como la disminución en las distancias de enlace con respecto a los compuestos que tienen aminoácidos puede ser el resultado de la pseudo-aromaticidad alcanzada una vez que los oxígenos del acac y del salal se coordinan al ion metálico, como ya se había mencionado en la discusión del comportamiento electroquímico. Los

compuestos con esfera de coordinación  $N_3O$  presentan la menor covalencia en el enlace  $\zeta$  y también las mayores distancias de enlace. Los únicos compuestos que no mantienen la tendencia descrita son aquellos que tienen 5,5'-dimetil-bipiridina como ligante principal, lo cual puede deberse al efecto inductivo de los grupos metilo que impiden una participación efectiva de la diimina aromática en las interacciones de retrodonación, tal como ocurre cuando se colocan grupos metilo en las posiciones 3 y 8 de la fenantrolina (figura 36b).

La compartición de densidad electrónica en estos compuestos también puede ser apreciada al evaluar los valores de densidad electrónica sobre el orbital 4s del metal a través de los valores de  $\kappa$ . Así al incrementar la densidad electrónica sobre este orbital, menores valores de  $\kappa$ , lo que implica que el traslape tiene que ser mucho más efectivo para lograr el exceso de densidad sobre dicho orbital, lo que traería como consecuencia una disminución en la distancia de enlace (figuras 36a y 36b). El máximo traslape se alcanza en las estructuras con geometría de pirámide de base cuadrada y disminuye conforme se incrementa la distorsión trigonal en la estructura. Lo anterior puede apreciarse en la figura 36d, donde a una mayor distorsión angular (mayores valores de  $\eta$ ) se produce una menor densidad de carga sobre el orbital 4s y por tanto una disminución en la distancia de enlace (Figura 36c). La distorsión angular debe tener una relación directa con la covalencia de los enlaces  $\pi$  en el plano y fuera del plano. Un mayor traslape de los orbitales del metal con el ligante genera un mayor acoplamiento entre el electrón desapareado con el centro metálico lo que genera una disminución en el valor  $g$  (Figura 36c). La figura 36d ilustra dicha dependencia en donde se observa que aquellos compuestos que presentaron el mayor grado de covalencia también son los que presentan la menor distorsión angular tanto en disolución (menores valores de  $\beta^2$ ) como en estado sólido (menores valores de  $\eta$ ). De la

misma forma una mayor distorsión angular provoca una disminución en el acoplamiento del electrón desapareado con el núcleo de cobre como se puede apreciar en la figura 36e.

### ***Resumen de los estudios de caracterización de los compuestos de Cu(II)***

En resumen, se ha encontrado que los compuestos de coordinación de Cu(II) conocidos como Casiopeínas presentan una geometría de pirámide de base cuadrada tanto en disolución como en estado sólido. La geometría que adoptan estos compuestos en disolución puede ser determinada empleando únicamente los parámetros obtenidos de los espectroscopia RPE, siendo la gráfica y la información de los parámetros isotrópicos una herramienta muy poderosa para la determinación de la geometría sin necesidad de obtener monocristales para los estudios de difracción de rayos X. Fue posible encontrar la vía por la cual los ligantes participan en las interacciones de retrodonación con el ion metálico, siendo el enlace  $\pi$  en el plano la vía principal de retrodonación para los compuestos con acac y el enlace  $\pi$  fuera del plano la vía por la que se da la redistribución electrónica en los compuestos con salal como ligante secundario. De la misma forma fue posible identificar la participación de los átomos donadores en la formación de los enlaces  $\zeta$  y  $\pi$  así como la contribución de los mismos en la covalencia total del sistema.

### **Química computacional**

La forma en cómo se distribuye la densidad electrónica en todo el compuesto tendrá que verse reflejado directamente en la densidad electrónica alrededor del ion metálico. Para conocer a mayor profundidad como se lleva a cabo tal redistribución se procedió a realizar un estudio teórico dentro de la teoría de átomos en moléculas (AIM) con los compuestos

que presentan glicina como ligante secundario y que están numerados del 1 al 9 de acuerdo a lo siguiente: **bpygly (1)**, **44dmbpygly (2)**, **55dmbpygly (3)**, **fengly(4)**, **4mfengly(5)**, **5mfengly (6)**, **47dmfengly (7)**, **56dmfengly (8)** y **3478tmfengly (9)**.

En el marco de la teoría AIM las interacciones metal-ligante pueden caracterizarse empleando las propiedades obtenidas de los puntos críticos de enlace.<sup>153</sup> Las propiedades calculadas para cada uno de los puntos críticos seleccionados de los compuestos estudiados se enlistan en la tabla 7 donde se presentan los valores de densidad ( $\rho$ ), el laplaciano de la densidad ( $\nabla^2\rho$ ), la elipticidad del enlace ( $\epsilon$ ),  $G/\rho$  y  $H/\rho$ . De manera general se observa que existe un balance entre las propiedades de los puntos críticos de enlace del Cu con los átomos donadores, analizando los valores del laplaciano de la densidad electrónica que cuantifica la concentración o disminución de carga presente en los enlaces se puede establecer que cuando un enlace presenta una disminución de densidad electrónica, el enlace en una disposición trans al primero presenta un incremento en la densidad electrónica siendo así el balance entre Cu-N<sub>1</sub> y Cu-O<sub>1</sub> así como en Cu-N<sub>2</sub> y Cu-N<sub>3</sub>, el mismo comportamiento que se observa en las distancias de enlace en el estado sólido.

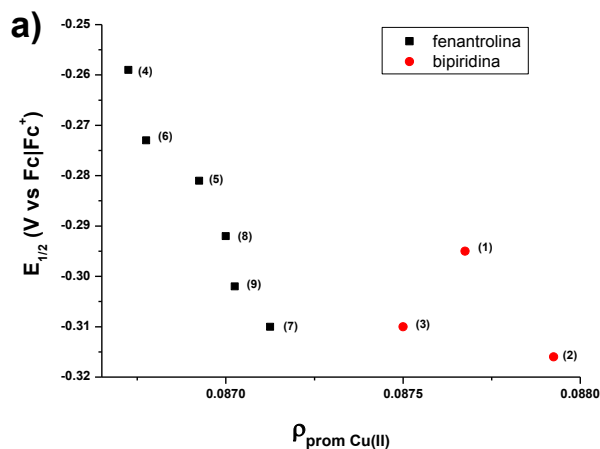
La suma de la densidad de los cuatro puntos críticos de enlace (PCE) para los compuestos de Cu(II) que presentan fenantrolinas en su esfera de coordinación presenta una correlación con el potencial redox de acuerdo a la ecuación

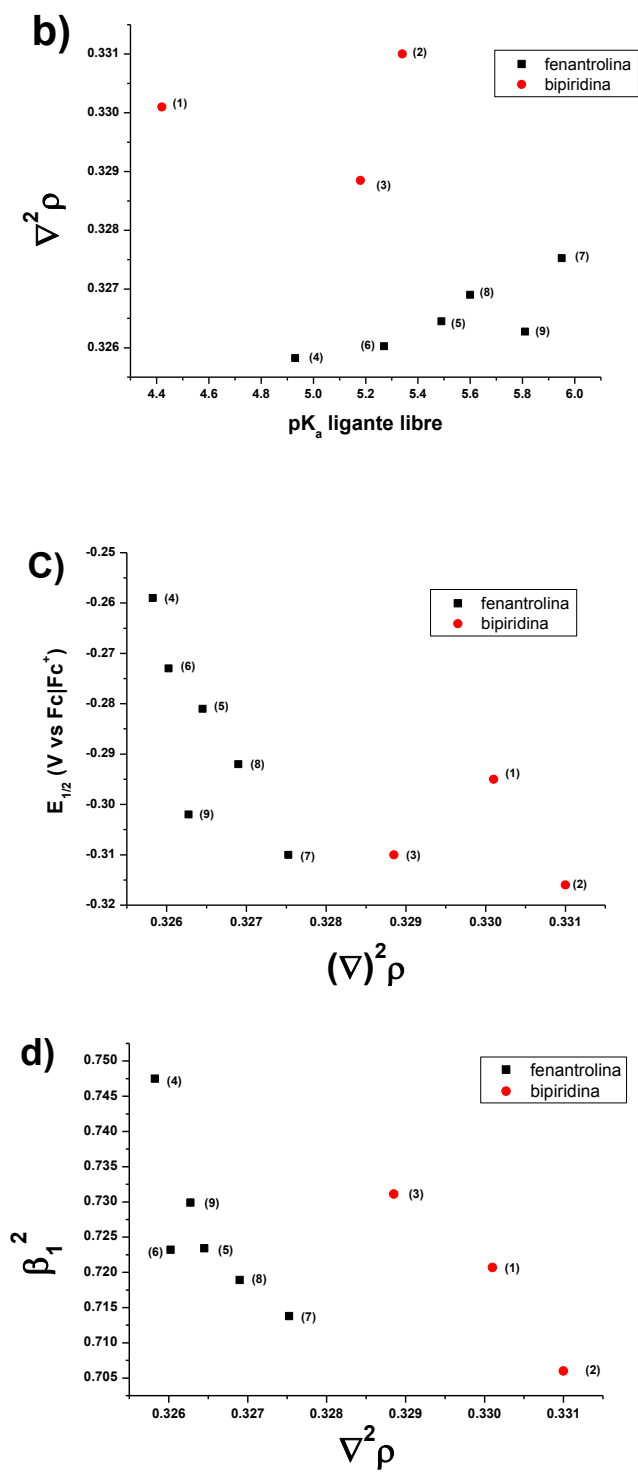
$$E_{1/2} = 10.1699 - 120.28 \Sigma_{\rho_{pce}(Cu-x)}$$

De donde se obtiene que al incrementar la densidad electrónica en estos enlaces, el potencial redox de los compuestos presenta un valor más negativo, de acuerdo a la figura 37.

**Tabla 7.** Propiedades seleccionadas de puntos críticos de enlace en unidades atómicas.

	1 (bpy)	2 (44dmbpy)	3 (55dmbpy)	4 (phen)	5 (4mphen)	6 (5mphen)	7 (47dmphen)	8 (56dmphen)	9 (3478tmphen)
CuI – N1									
$\rho$	0.0837	0.0845	0.0836	0.0808	0.0808	0.0813	0.0821	0.0817	0.0821
$\nabla^2\rho$	0.2892	0.2924	0.2876	0.2763	0.2763	0.2786	0.2819	0.2797	0.2806
$\varepsilon$	0.0156	0.0153	0.0152	0.0207	0.0207	0.0203	0.0191	0.0194	0.0193
G/ $\rho$	1.2511	1.2535	1.2475	1.2374	1.2374	1.2397	1.2426	1.2404	1.2398
H/ $\rho$	-0.386	-0.3883	-0.3875	-0.382	-0.3827	-0.3835	-0.3846	-0.3842	-0.3854
CuI – N2									
$\rho$	0.0872	0.0880	0.0871	0.0851	0.0864	0.0850	0.0865	0.0859	0.0864
$\nabla^2\rho$	0.3036	0.3068	0.3013	0.2943	0.3001	0.2934	0.3002	0.2975	0.2989
$\varepsilon$	0.0198	0.0189	0.0199	0.0234	0.0219	0.0232	0.0217	0.0221	0.0218
G/ $\rho$	1.2608	1.2630	1.2563	1.2522	1.2573	1.2507	1.2574	1.2547	1.2548
H/ $\rho$	-0.390	-0.3919	-0.3912	-0.387	-0.3894	-0.3876	-0.3893	-0.3889	-0.3900
CuI – N3									
$\rho$	0.0840	0.0838	0.0834	0.0846	0.0847	0.0845	0.0842	0.0843	0.0842
$\nabla^2\rho$	0.2725	0.2722	0.2698	0.2747	0.2756	0.2742	0.2735	0.2737	0.2737
$\varepsilon$	0.0550	0.0547	0.0548	0.0536	0.0531	0.0538	0.0534	0.0538	0.0529
G/ $\rho$	1.2059	1.2068	1.2029	1.2071	1.2092	1.2066	1.2072	1.2068	1.2078
H/ $\rho$	-0.395	-0.3946	-0.3940	-0.395	-0.3958	-0.3955	-0.3949	-0.3952	-0.3953
CuI – O1									
$\rho$	0.0958	0.0954	0.0959	0.0964	0.0958	0.0963	0.0957	0.0961	0.0954
$\nabla^2\rho$	0.4551	0.4526	0.4567	0.4580	0.4538	0.4579	0.4545	0.4567	0.4519
$\varepsilon$	0.0432	0.0430	0.0420	0.0404	0.0413	0.0406	0.0411	0.0410	0.0412
G/ $\rho$	1.4938	1.4930	1.4962	1.4943	1.4907	1.4948	1.4931	1.4943	1.4908





**Figura 37.** Propiedades calculadas frente a experimentales. a) cambio en el potencial redox en función del cambio de la densidad de enlace promedio. b) cambio en el gradiente de densidad de enlace en función de la capacidad de donación de las diiminas aromáticas. c) cambio en el potencial redox en función del cambio del laplaciano de la densidad de enlace. d) cambio en la covalencia del enlace p en el plano respecto al cambio del laplaciano de la densidad electrónica.

Los valores de PCE presentados en la tabla 7 muestran que hay una mayor acumulación de densidad electrónica en los enlaces Cu-L de los sistemas con bipyridina que en los sistemas con fenantrolina, lo cual sustenta la hipótesis de que una gran acumulación de densidad electrónica alrededor del ion metálico es producto de la menor capacidad de la bipyridina de participar en la retrodonación con el cobre lo que provoca que se registren valores de potencial redox más negativos comparado con los sistemas que presentan fenantrolinas en su esfera de coordinación.

Es muy interesante hacer notar que tanto los compuestos con fenantrolina como los de bipyridina emplean los enlaces  $\pi$  para redistribuir la densidad electrónica hacia el centro metálico, tal como se había concluido sólo con los datos de espectroscopia RPE. Por otro lado, el mismo comportamiento se observa cuando se analizan los datos del laplaciano de la densidad ( $\nabla^2\rho$ ) en lugar de los datos de densidad ( $\rho$ ). Con estos datos fue posible identificar el efecto que tiene la posición de los sustituyentes sobre la diimina aromática respecto a la distribución de la densidad electrónica, identificando que el colocar grupos electrodonadores en las posiciones 5,5' de la bipyridina así como en las posiciones 3 y 8 de la fenantrolina disminuyen la participación de las diiminas aromáticas en la retrodonación, como se muestra en la figura 37b. Finalmente en la figura 37d se muestra como cambia la covalencia del enlace  $\pi$  en el plano principal de la molécula conforme cambia la densidad electrónica de los enlaces de la base de la pirámide, soportando la propuesta de que tanto la densidad como el laplaciano de la densidad electrónica pueden ser empleados como descriptores electrónicos para explicar las propiedades experimentales.

Por otro lado, la redistribución de la densidad electrónica dentro de la esfera de coordinación del metal que afecta los valores de potencial redox así como el ambiente



magnético en el que se encuentra el ion metálico pueden ser explicados a partir de la deslocalización electrónica en el átomo así como los momentos de polarización atómica del cobre, tal como lo sugieren Bader y colaboradores.<sup>154</sup>

La localización y deslocalización electrónica fueron calculadas de acuerdo a la integración atómica de densidad de intercambio a nivel DFT como se describe en las siguientes ecuaciones:

$$\lambda(A) = \sum_{i,j} \eta_i^{1/2} \eta_j^{1/2} S_{ij}(A)^2$$

$$\delta(A,B) = 2 \sum_{i,j} \eta_i^{1/2} \eta_j^{1/2} S_{ij}(A)S_{ij}(B)$$

En estas definiciones  $n_i$  y  $n_j$  denotan los números de ocupación de orbitales naturales  $\theta_i$  y  $\theta_j$  mientras que  $S_{ij}$  es la integral de traslape de los orbitales  $\theta_i$  y  $\theta_j$ . Los índices de localización y deslocalización empleados en las ecuaciones anteriores son exactos para un determinante de Slater y aproximados para métodos de correlación.

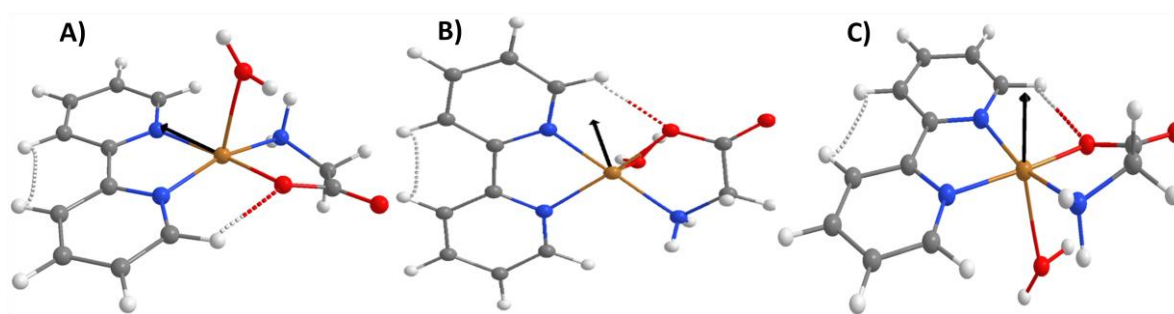
Las poblaciones atómicas y moleculares  $N$  y  $N(A)$  se pueden dividir en dos contribuciones, esto es, la localización electrónica ( $\lambda(A)$ ) y la deslocalización electrónica ( $\delta(A,B)$ ) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$N = \sum_A N(A) + \sum_A \Delta(A) = \lambda + \Delta$$

$$\Delta(A) = \frac{1}{2} \sum_{AB \text{ enlace}} \delta(A,B) + \frac{1}{2} \sum_{AB \text{ no enlace}} \delta(A,B)$$

Donde  $\lambda(A)$  proporciona una medida de los electrones localizados en el átomo, mientras  $\delta(A,B)$  es una medida de los electrones compartidos por dos átomos en la molécula, los cuales no tienen que estar necesariamente enlazados.  $\lambda(A)$  y  $\delta(A,B)$  proporcionan el total de la localización y deslocalización electrónica respectivamente.<sup>155</sup> Estos dos términos son la suma de la población electrónica atómica y molecular y han sido empleadas para entender las interacciones de retrodonación metal-ligante en compuestos de tipo  $M(\text{CO})_n$ .<sup>156-157</sup>

Por otro lado, el momento dipolar molecular presenta dos contribuciones: transferencia de carga ( $\mu_{TC}$ ) y polarización atómica ( $\mu(A)$ ). Esta última proporciona una medida del desplazamiento del centroide atómico de la carga negativa con respecto a la posición del núcleo y generalmente es opuesta a  $\mu_{TC}$ . Además, el momento cuadrupolar atómico ( $Q(A)$ ) describe la acumulación de densidad electrónica a lo largo del eje (Figura 38). Los cambios en los componentes paralelo y perpendicular de  $Q(A)$  proporciona una medida de la transferencia de densidad entre los componentes  $\zeta$  y  $\pi$ . Cortés-Guzmán y Bader emplearon  $Q(A)$  como una demostración cuantitativa de la retrodonación  $d\pi$ - $\pi\pi^*$ , donde se incrementa la densidad  $\pi$  de un átomo donador del ligante en una interacción metal-ligante.<sup>158</sup>



**Figura 38.** Momento dipolar y cuadrupolar del ion Cu(II) en los compuestos de coordinación. De izquierda a derecha: Momento dipolar atómico, componente paralelo del momento cuadrupolar y componente perpendicular del momento cuadrupolar atómico.

El momento dipolar y cuadrupolar atómico antes descritos están definidos de acuerdo a lo siguiente:

$$\mu(\Omega) = - \int_{\Omega} \mathbf{r}_{\Omega} \rho(\mathbf{r}) d\tau$$

$$Q(\Omega) = - \int_{\Omega} \mathbf{r}_{\Omega} \mathbf{r}_{\Omega} \rho(\mathbf{r}) d\tau$$

En el caso de las Casiopeínas, el momento dipolar atómico del cobre está direccionado hacia el ligante aromático, de manera opuesta a la transferencia de carga metal-ligante. El

momento dipolar atómico del cobre ( $\mu(\text{Cu})$ ) puede ser relacionado con la donación  $\zeta$  del ligante hacia el metal, como un camino de donación  $\zeta$ . Los componentes paralelo y perpendicular del momento cuadrupolar del átomo de cobre ( $Q_{\parallel}(\text{Cu})$  y  $Q_{\perp}(\text{Cu})$ ) pueden relacionarse con los componentes  $\zeta$  y  $\pi$  de la densidad del cobre. Empleando los descriptores de la tabla 8 es posible obtener correlaciones multilineares para entender los cambios que se presentan en los parámetros experimentales como el potencial redox o los parámetros de la espectroscopia RPE ( $\alpha^2$ ,  $\beta^2$ ,  $g_0$ ) producto de los cambios en la densidad electrónica alrededor del cobre.

**Tabla 8.** Parámetros electrónicos obtenidos de cálculo DFT que describen el número total de electrones alrededor del ion metálico ( $N(\text{Cu})$ ), electrones del cobre que permanecen en el cobre ( $\lambda(\text{Cu})$ ) y los electrones del cobre que se deslocalizan en los átomos donadores ( $\Delta(\text{Cu})$ ), momento dipolar atómico ( $\mu(\text{Cu})$ ) y componentes paralelo ( $Q_{\parallel}(\text{Cu})$ ) y perpendicular ( $Q_{\perp}(\text{Cu})$ ) del momento cuadrupolar atómico.

	$N(\text{Cu})$	$\lambda(\text{Cu})$	$\Delta(\text{Cu})$	$N(\text{Cu})/\text{Vol}$ (Å)	$\mu_{\text{Cu}}$	$Q_{\parallel}(\text{Cu})$	$Q_{\perp}(\text{Cu})$
<b>1 (bpy)</b>	27.7850	26.7563	1.0287	0.35741	0.61998	0.57891	-1.8702
<b>2 (44dmbpy)</b>	27.7869	26.7556	1.0313	0.35744	0.54641	0.58816	-1.8880
<b>3 (55dmbpy)</b>	27.7867	26.7578	1.0290	0.35742	0.51538	0.57761	-1.8680
<b>4 (phen)</b>	27.7831	26.7597	1.0234	0.35835	0.58728	0.60602	-1.8225
<b>5 (4mphen)</b>	27.7840	26.7589	1.0251	0.35617	0.56520	0.61697	-1.8711
<b>6 (5mphen)</b>	27.7840	26.7597	1.0243	0.35813	0.54734	0.59542	-1.8235
<b>7 (47dmphen)</b>	27.7852	26.7582	1.0270	0.35852	0.52594	0.60754	-1.8420
<b>8 (56dmphen)</b>	27.7839	26.7589	1.0250	0.35842	0.51348	0.59748	-1.8296
<b>9 (3478tmphen)</b>	27.7865	26.7591	1.0274	0.35535	0.48412	0.61633	-1.8832

De manera general se observa que las propiedades dependen principalmente de la población total de electrones  $N(\text{Cu})$  o de los electrones del cobre deslocalizados en los átomos donadores ( $\Delta(\text{Cu})$ ), mientras que el momento dipolar atómico  $|\mu(\text{Cu})|$  y el momento cuadrupolar atómico  $Q(\text{Cu})$  funcionan como moduladores de estas propiedades. En este sentido, un incremento en la población electrónica del cobre dificulta la adición de otro electrón en el compuesto, lo que se refleja en un incremento en el carácter covalente del enlace así como un incremento en los valores de potencial redox.

Lo anterior puede relacionarse directamente con la actividad de inhibición de la proliferación de células tumorales que muestran las Casiopeínas *in vitro*, los compuestos con potencial redox más negativos son los más potentes para inhibir el crecimiento celular y de acuerdo a la discusión anterior tendrán que ser los compuestos más estables al tener un mayor grado de covalencia en sus enlaces. El incremento en la covalencia del enlace permite explicar la estabilización del estado de oxidación +2 en los compuestos de coordinación que tienen el potencial redox más negativo al existir un mayor grado de retrodonación. Lo anterior afectará en su reactividad, pues sólo aquellos agentes reductores que presenten una diferencia de potencial importante respecto al encontrado en las Casiopeínas serán capaces de generar las especies de Cu(I) necesarias para completar el ciclo de reacciones que darán lugar a los radicales hidroxilos, principales responsables de la citotoxicidad en las células.

Los valores de potencial redox pueden ser descritos principalmente como una función del número total de electrones en el metal con respecto al volumen atómico ( $N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu})$ ), en donde valores pequeños de ( $N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu})$ ) proporciona valores grandes de potencial redox ( $E_{1/2}$ ). Por otro lado, la forma en cómo se distribuyen los electrones alrededor del átomo de cobre, cuantificado por los parámetros moduladores  $\mu(\text{Cu})$  y  $Q(\text{Cu})$  presentan el comportamiento contrario, cuando estos valores se incrementan, el valor del potencial redox se incrementa ligeramente también.

Para el caso de los valores de  $g_0$  y  $\alpha^2$  obtenidos de los experimentos de RPE, el descriptor principal es nuevamente ( $N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu})$ ), seguido por los electrones del cobre que se encuentran deslocalizados en los átomos donadores ( $\Delta(\text{Cu})$ ). De las ecuaciones que describen estos parámetros es posible darse cuenta que un incremento en ( $N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu})$ ) y una disminución en ( $\Delta(\text{Cu})$ ) genera valores pequeños de  $g_0$  y de  $\alpha^2$ . Finalmente  $\beta^2$  que

describe el enlace  $\pi$  en el plano depende de  $(N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}))$  y del componente paralelo del momento cuadrupolar atómico ( $Q_{\parallel}(\text{Cu})$ ). Un incremento en ambos parámetros genera una disminución en los valores de  $\beta^2$ .

En resumen, en un sistema  $\zeta$ -donador/ $\pi$ -aceptor, los valores experimentales encontrados para potencial redox ( $E_{1/2}$ ) y el ambiente magnético del electrón desapareado pueden ser descritos como una función de la población electrónica del ion metálico, de su momento dipolar atómico y del momento cuadrupolar atómico, que están estrechamente relacionadas con la transferencia de carga y la retrodonación.

$$E_{1/2}(\text{V}) = 0.246|\mu(\text{Cu})| - 16.136N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) + 0.946 Q_{\perp}(\text{Cu}) + 7.096; \quad n=9, R^2 = 0.925$$

$$g_{\text{iso}} = -3.707N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) + 1.396\Delta(\text{Cu}) + 0.188Q_{\perp}(\text{Cu}) + 2.277; \quad n=9, R^2 = 0.9429$$

$$\alpha^2 = -7.488 N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) + 4.230\Delta(\text{Cu}) - 0.324Q_{\perp}(\text{Cu}) - 0.485; \quad n=9, R^2 = 0.8768$$

$$\beta^2 = -0.393|\mu(\text{Cu})| - 11.259N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) - 1.882Q_{\parallel}(\text{Cu}) + 6.094; \quad n=9, R^2 = 0.9178$$

Las propiedades electrónicas y estructurales de los compuestos de coordinación de Cu(II) que involucran sistemas  $\zeta$ -donadores/ $\pi$ -aceptores están determinadas por la capacidad que tengan los ligantes para participar en interacciones de retrodonación con el ion metálico. La capacidad de las diiminas aromáticas para participar en la retrodonación está fuertemente relacionada con la posición de los grupos sustituyentes del sistema aromático. Para los compuestos analizados en este trabajo, en particular para los compuestos con glicinato como ligante secundario se encuentra que el efecto del sustituyente es aditivo, siendo la sustitución en las posiciones 4,4' de la bipyridina y 4,7 de la fenantrolina los que producen los mayores cambios en las características de estos compuestos como distancia de enlace,

potencial redox y ambiente electrónico del ion metálico, mientras que las posiciones 5,5' de la bipyridina y 3,8 de la fenantrolina disminuyen la capacidad de la diimina aromática de participar en las interacciones de retrodonación. El enlace de retrodonación  $\pi$  es el principal modulador de la distribución de la densidad electrónica alrededor del ion metálico.

Hasta este punto del trabajo se puede concluir que las propiedades experimentales de estos compuestos de Cu(II) pueden describirse conociendo la densidad electrónica alrededor del catión metálico, el grado de deslocalización así como la deformación de la nube electrónica alrededor del ion metálico. Es importante hacer notar aquí que aunque existe una participación importante de los ligantes primario y secundario en la distribución de densidad electrónica y en la retrodonación, el que se pueda emplear sólo la densidad electrónica que se encuentra alrededor del ion metálico facilita sustancialmente la búsqueda de nuevos descriptores electrónicos para este tipo de compuestos que puedan ser emplearlos en estudios QSAR para describir la actividad biológica que presenten los compuestos de coordinación de Cu(II) ayudando con esto al diseño racional de mejores candidatos de medicamentos de base metálica.

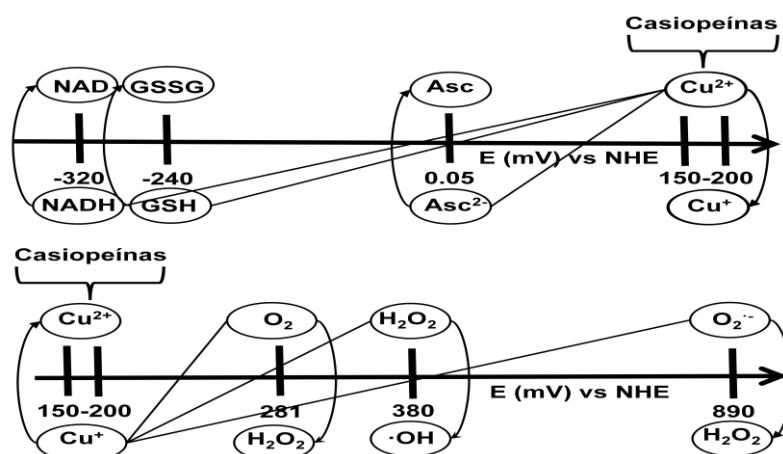
Los resultados que involucran a los compuestos con glicinato como ligante secundario fueron publicados en el trabajo *The  $\pi$ -Back-Bonding Modulation and Its Impact in the Electronic Properties of CuII Antineoplastic Compounds: An Experimental and Theoretical Study.*<sup>159</sup>

## 5.6 Interacción de Casiopeínas con tioles

Con la intención de conocer la capacidad de las Casiopeínas para generar ROS y conocer cuáles son las condiciones en las cuales se llevan a cabo estas reacciones, se realizó el estudio de la interacción de diez Casiopeínas con cisteína (Cys) y glutatión (GSH). En este trabajo sólo se presentarán los resultados de la interacción de una Casiopeína (CasIIIia) con Cys y GSH, los otros resultados se muestran en la tesis de licenciatura de Ana Luisa Alonso Saenz en la cual participé como supervisor técnico.

Termodinámicamente la reacción entre las Casiopeínas y los tioles GSH, Cys así como otros agentes reductores como el ácido ascórbico se favorece como se muestra en la figura 39. Una vez que se da la reacción de reducción del centro metálico, es capaz de reaccionar con el oxígeno molecular para generar peróxido de hidrógeno, con el peróxido de hidrógeno para generar radical hidroxilo o con el ion superóxido para generar peróxido de hidrógeno como se presenta en la parte inferior de la figura 39.

En la literatura también se ha reportado que los compuestos de coordinación de Cu(I) con diiminas aromáticas en su esfera de coordinación son capaces de reaccionar con el oxígeno molecular para generar superóxido a través de la oxidación del ion metálico, aún cuando este proceso es termodinámicamente desfavorecido. El ion superóxido es capaz de reaccionar con Cu(II) presente en la disolución generando especies de Cu(I) y peróxido de hidrógeno cerrando el ciclo catalítico. La generación de peróxido de hidrógeno es dependiente del consumo de oxígeno así como de la concentración de la especie de cobre que debe de encontrarse en estado de oxidación +1 o en presencia de agentes reductores que generen la especie de Cu(I) in situ.<sup>160-163</sup>



**Figura 39.** Potenciales redox respecto al electrodo normal de hidrógeno (ENH) de las Casiopeínas, de los diferentes agentes reductores y los agentes oxidantes que participan en la generación de especies reactivas de oxígeno.

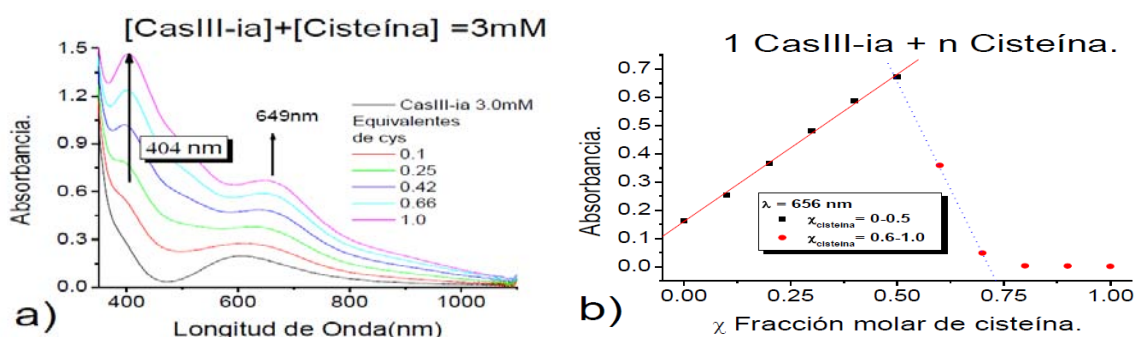
Para saber si las Casiopeínas son capaces de generar especies reactivas de oxígeno participando en un ciclo catalítico como el descrito anteriormente se realizó un estudio empleando titulaciones espectrofotométricas, voltamperometría cíclica, estudios de RPE y cálculos DFT, los resultados se discuten a continuación.

Los resultados de las titulaciones espectrofotométricas obtenidos por Alonso-Saenz<sup>164</sup> muestran que la interacción de las Casiopeínas con tioles, tanto con GSH como cisteína, presenta un incremento en la absorbancia en los máximos que aparecen en la región visible del espectro electrónico conforme se adicionan fracciones de equivalente del tiol. El comportamiento antes descrito continúa hasta alcanzar un equivalente de tiol agregado, una vez que se alcanza la relación estequiométrica 1:1 (Casiopeína: tiol), se presenta una disminución en la absorbancia en los máximos que se encuentran alrededor de 600 nm indicativo de la reducción del Cu(II) presente en la disolución. A partir de este momento la propuesta con respecto a la interacción entre las Casiopeínas y los tioles se hará describiendo sólo los resultados con cisteína, que es en donde se pueden apreciar mejor los



cambios al ser la constante de transferencia electrónica menor para Cys que para GSH cuando reacciona con los compuestos de Cu(II).<sup>165</sup>

De acuerdo a los valores de potencial redox presentados para las Casiopéinas y para los tioles en la figura 39, se esperaba que la reducción del ion metálico se presentara de manera inmediata con las primeras fracciones de equivalente de tiol agregadas, sin embargo, esto no ocurrió así. El máximo de absorción asociado a la transición d-d del compuesto de coordinación **44dmbpyacac** se presenta a 600 nm, durante la adición de cisteína el máximo de absorción presenta un corrimiento a mayores longitudes de onda hasta 649 nm y un nuevo máximo en la región del visible se presenta en 404 nm (Figura 40). Los máximos observados son asociados a la formación de una nueva especie de coordinación en donde la cisteína se coordina al centro metálico a través de su átomo de azufre, con lo que se explica el corrimiento hacia el rojo del máximo de absorción asociado a la transición d-d y la nueva banda a 404 nm asociada a la transferencia de carga Cu(II)-S.<sup>166-167</sup>

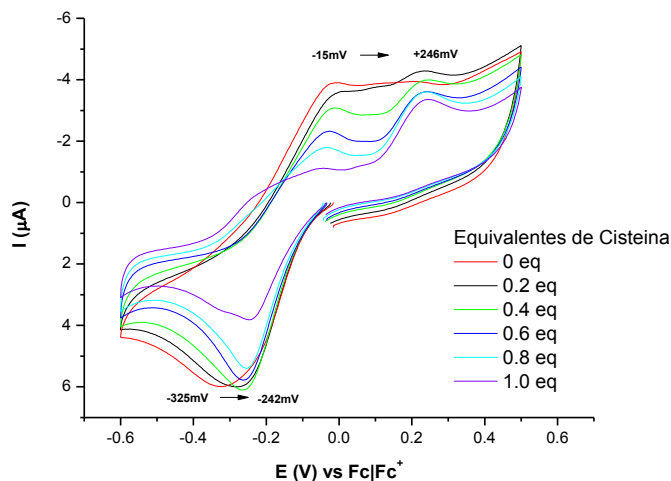


**Figura 40.** Espectro electrónico (a) y comportamiento de la absorbancia en función de la fracción mol de reductor (b) tomada de Ana Luisa Alonso Saenz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2013.

Para comprobar que la coordinación era el proceso observado en la titulación espectrofotométrica y no era un proceso de reoxidación se llevó a cabo un experimento de voltamperometría cíclica para los diferentes equivalentes de cisteína agregados. En la figura 41 se muestra en rojo el voltamperograma para el compuesto **44dmbpyacac** en una disolución de fosfatos 0.1 M con un valor de pH de 7.2. El cambio de disolvente obligó a cambiar el electrodo de trabajo a platino, por lo que la diferencia en los valores de pico es mucho más grande que los registrados en un sistema de metanol empleando carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Con las respectivas adiciones de cisteína marcadas en la figura se puede constatar que no hay una reducción del Cu(II) presente en la disolución, el desplazamiento del potencial de reducción hacia valores más positivos (-325 mV a -242 mV) indica un cambio en la esfera de coordinación con la incorporación de átomos que proporcionen una mayor cantidad de densidad electrónica como el grupo tiol de la cisteína. También es importante notar que la corriente de reducción no disminuye hasta que se alcanzan 0.6 equivalentes y sigue disminuyendo poco a poco hasta alcanzar menos de la mitad de su valor original al alcanzar un equivalente de cisteína adicionada. Con respecto a la oxidación se observa que por cada fracción de equivalente adicionado la señal original en -15mV disminuye su valor de corriente y aparece una nueva señal de oxidación en +246 mV, haciendo patente la formación de una nueva especie en función de la cantidad de cisteína agregada. La cuasi-reversibilidad encontrada en el sistema se atribuye nuevamente al cambio de geometría asociado al cambio en el estado de oxidación del metal de +2 a +1. Es importante destacar que los potenciales para la nueva especie son más positivos que para la Casiopeína, lo que significa que el Cu(I) está enlazado más fuertemente que el Cu(II) a los ligantes, siendo

consistente con la teoría de ácidos y bases duros y blandos donde la coordinación de Cu(I) con azufre es más estable que una coordinación con Cu(II).

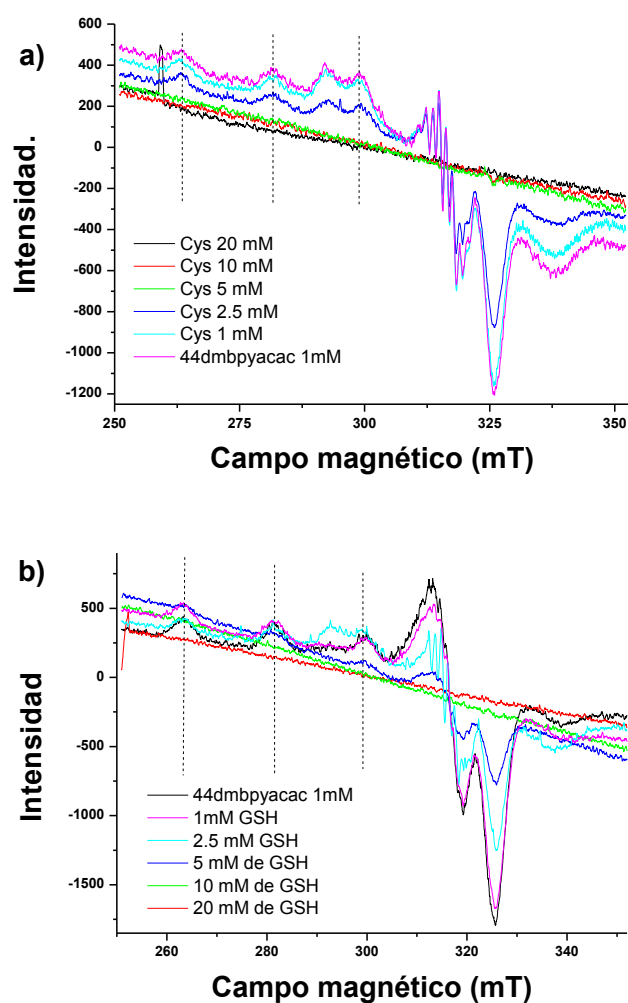


**Figura 41.** Voltamperogramas de **44dmbpycac** en ausencia (rojo) y en presencia de diferentes equivalentes de cisteína en donde se puede apreciar que la reducción no es inmediata y se confirma la coordinación del azufre al centro metálico.

Una vez identificado que es necesario adicionar un exceso de tiol para producir la reducción del ion metálico, se realizaron varios experimentos de RPE a temperatura ambiente y en presencia de un atrapador de radicales para saber si las Casiopeínas eran capaces de generar especies reactivas de oxígeno cuando están presentes en la disolución un agente reductor y oxígeno molecular.

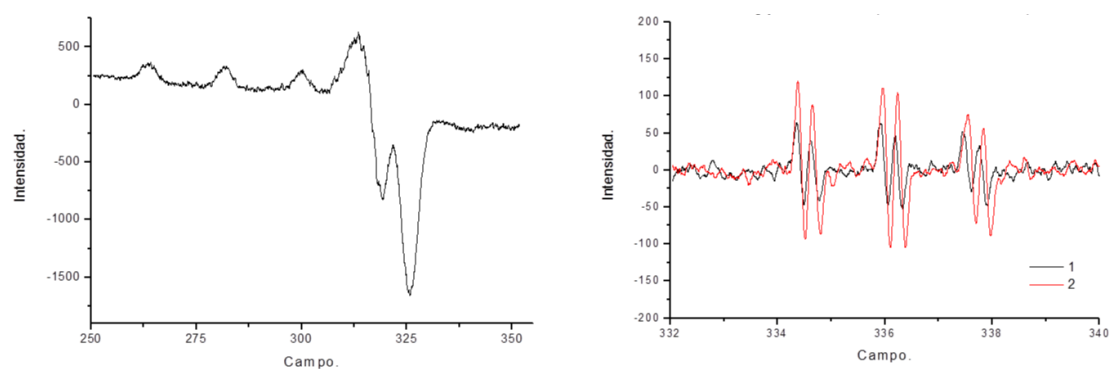
Para ellos se emplearon dos atrapadores de radicales POBN ( $\alpha$ -(4-Piridil-1-oxido)-N-terbutilnitrona) y DMPO (5,5-Dimetil-1-pirrolina-N-óxido) y se emplearon dos agentes reductores, el GSH y la cisteína. La figura 42 muestra la reducción de compuesto **44dmbpycac** en función de los equivalentes agregados de cisteína y GSH, la reducción total de la especie se alcanza a los 5 equivalentes de cisteína y a los 10 equivalentes de GSH. El comportamiento se explica por la presencia de oxígeno que cataliza la reacción de

transformación de Cu(II) a Cu(I) y viceversa. Las líneas punteadas en ambos espectros muestran las señales correspondientes a la Casiopeína, las señales hiperfinas que no coinciden con estas líneas se asocian a la nueva especie de Cu(II) formada una vez que se coordina el azufre tanto de la cisteína como del GSH. Las señales son más notorias en el espectro cuando se agrega cisteína por la velocidad en la que se lleva a cabo la reacción redox, siendo mucho más rápida con GSH.



**Figura 42.** Espectros RPE del compuesto con diferentes equivalentes de tiol para asegurar la completa reducción del Cu(II) presente en la disolución a) 44dmbpyacac + Cys, b) 44dmbpyacac+ GSH.

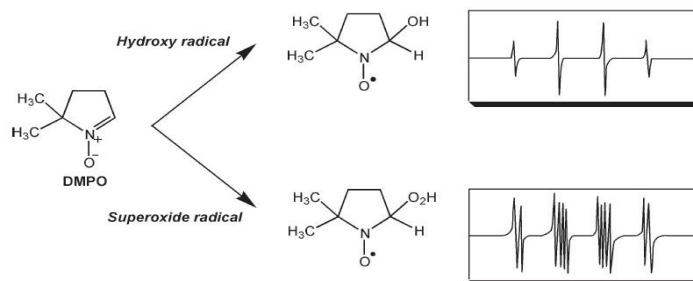
Una vez establecido el número de equivalentes a emplear para asegurar que todo el cobre en disolución se encontrara reducido se procedió a preparar las disoluciones de trabajo. A disoluciones con 1 mM del compuesto **44dmbpyacac** se le agregan 6 mM de POBN, el espectro de la derecha de la figura 43 muestra que el atrapador de radicales no presenta interacción con el compuesto de Cu(II). A una disolución independiente con 1 mM del compuesto de cobre y 6mM de POBN se le agregan los 5 equivalentes de GSH y se adquiere el espectro en negro de la figura de la derecha, al aumentar la concentración del agente reductor a 10 equivalentes se incrementa la intensidad de las señales obtenidas (espectro en rojo). En todos los casos las disoluciones preparadas fueron mezcladas con la micropipeta introduciendo aire para incrementar la presencia de oxígeno en el medio de reacción. Dado que POBN no es capaz de distinguir entre las especies reactivas de oxígeno formadas, se emplea el atrapador de radicales DMPO.



**Figura 43.** Izquierda. Espectro RPE de 44dmbpyacac en presencia de POBN adquirido a temperatura ambiente. Derecha. Espectro RPE de 44dmbpyacac en presencia de POBN y 5 equivalentes de GSH (línea negra) y 10 equivalentes de GSH (línea roja).

El atrapador de radicales DMPO es capaz de diferenciar entre superóxido y radical hidroxilo de acuerdo a los desdoblamientos que se muestran en la figura 44. Este atrapador también es capaz de diferenciar a aquellos radicales formados que presenten el electrón

desapareado sobre un átomo de carbono. Con el desdoblamiento ya conocido para cada una de las especies que se pueden formar en disolución por la interacción de el compuesto de Cu(II) con el agente reductor y el oxígeno molecular y con la ayuda de la simulación de cada uno de los espectros se procedió a identificar las especies formadas.

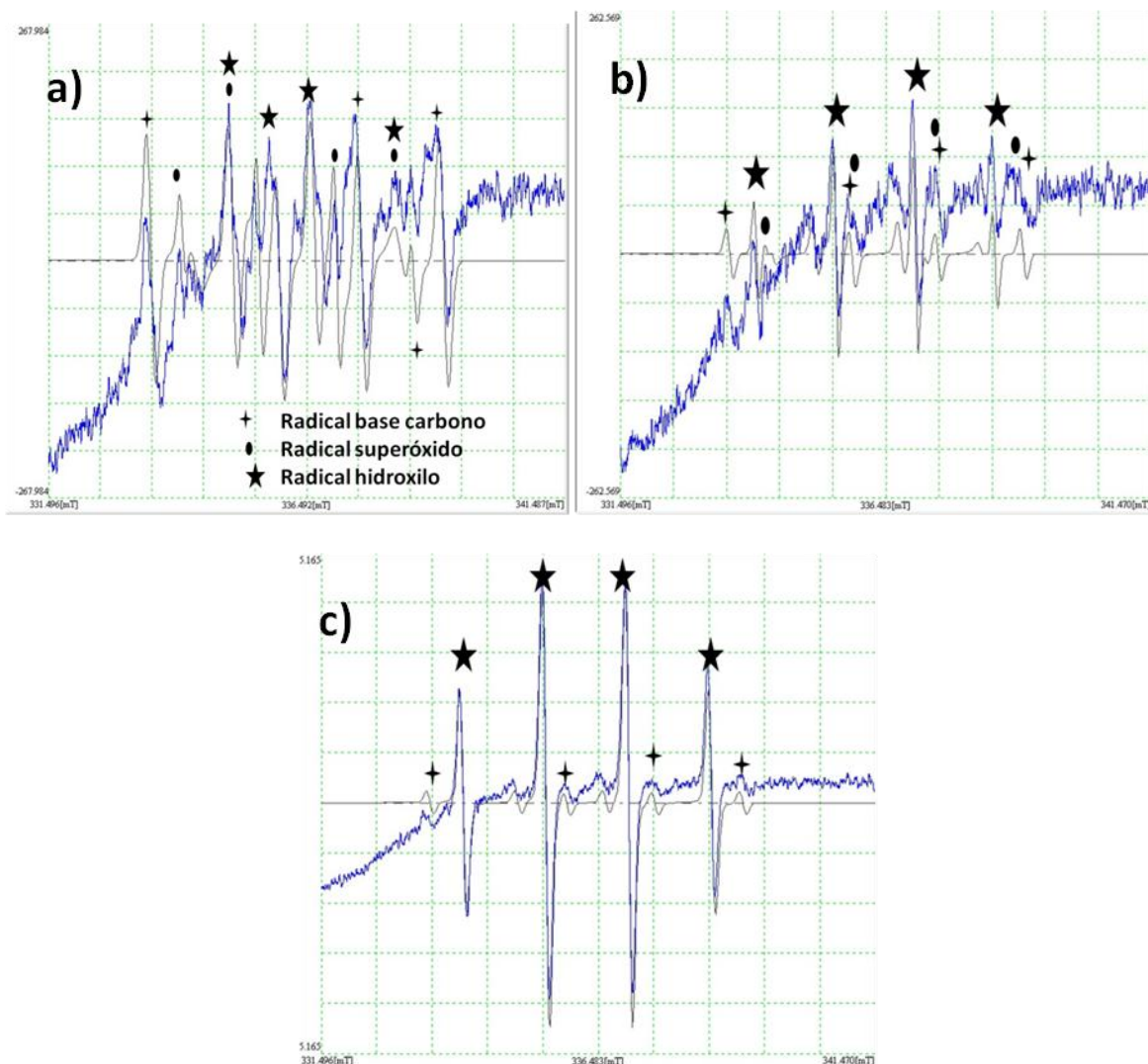


**Figura 44.** Desdoblamiento del espectro de DMPO al formarse el aducto con radical hidroxilo (parte superior) y con el radical superóxido (parte inferior).

Para los espectros en donde se emplea DMPO como atrapador de radicales se emplearon concentraciones del compuesto de coordinación 1 mM, 6mM de DMPO y 10 mM de GSH, Los espectros se adquirieron con respecto al tiempo realizándose tres ensayos independientes en cada caso. La figura 45 muestra los resultados obtenidos.

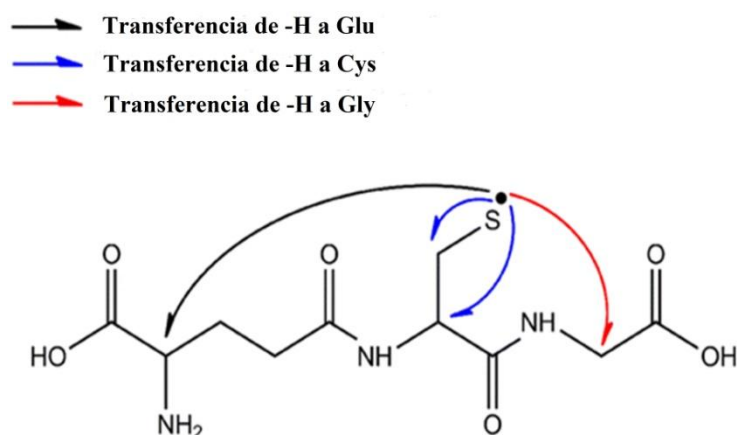
Cada una de las figuras muestra el espectro experimental en azul y la simulación en negro. El primer espectro se adquirió justo después de hacer la mezcla de reacción y se pueden identificar tres tipos de radicales: i) radical soportado en carbono (◆), ii) radical superóxido (●) y iii) radical hidroxilo (★). A los cinco minutos después de haber realizado la mezcla de reacción disminuye sustancialmente la cantidad de radicales soportados en carbono e incrementa la cantidad de radicales hidroxilo.

Finalmente, después de 15 minutos de reacción prácticamente no existen radicales soportados en carbono, la cantidad de radicales hidroxilo es mínima y la especie que se genera es prácticamente radical hidroxilo.



**Figura 45.** Espectros RPE de **44dmbpyacac** (1mM) en presencia de GSH (10 mM) y DMPO (6mM). a) Espectro adquirido inmediatamente después de realizar la mezcla de los reactivos. b) espectro adquirido después de 5 minutos de realizada la mezcla y c) 15 minutos después de realizada la mezcla de reacción.

La generación de especies reactivas soportadas en carbono se explica por la migración del radical del azufre de GSH a algunos de los carbonos del tripéptido tal como lo indican Mozziconacci y colaboradores<sup>168</sup> y que se ilustra en la figura 46. La migración de hidrógenos de la cadena hacia el azufre genera radicales secundarios y terciarios que son más estables que el radical sobre el azufre terminal. Con todos estos resultados se propone que el sistema de Casiopeínas es capaz de generar especies reactivas de oxígeno, tanto superóxido como radical hidroxilo cuando se encuentra en el medio de reacción oxígeno molecular y un agente reductor.

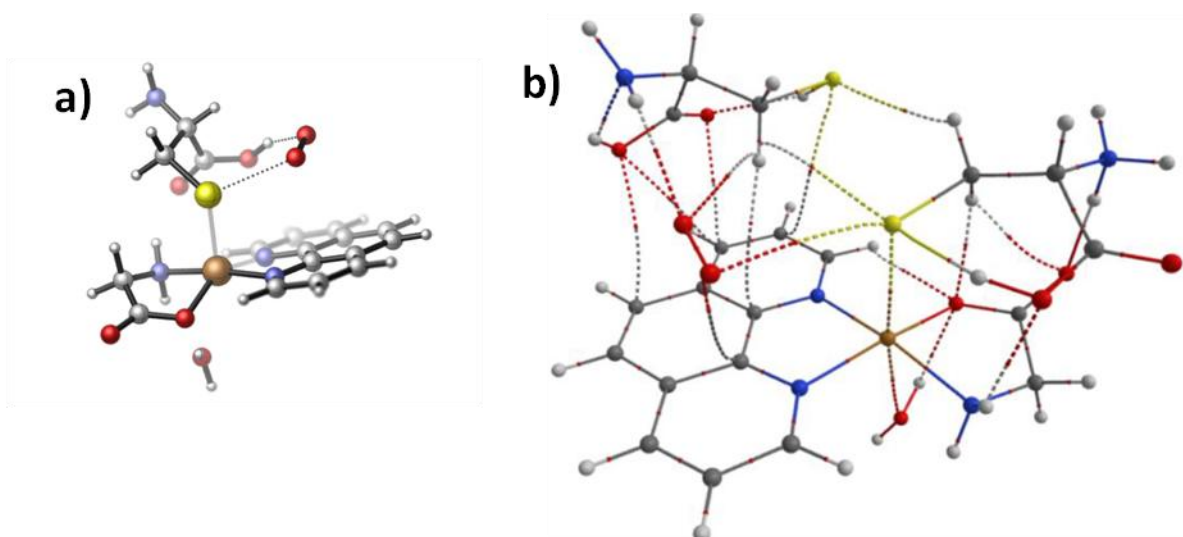


**Figura 46.** Migración de hidrógeno que genera radicales en base carbono más estables que el radical tionilo formado al inicio. Modificada de la referencia 168.

Para complementar el estudio de la generación de radicales se realizó un estudio teórico en donde se busca conocer si la especie propuesta donde se coordina el azufre al centro metálico es estable y si posteriormente puede interactuar con el oxígeno para realizar la transferencia electrónica y generar de esta forma el radical superóxido, la especie de coordinación reducida y el puente disulfuro proveniente de la oxidación de dos cisteínas. La figura 47a muestra el estado de transición para la interacción entre la Casiopeína cuando se



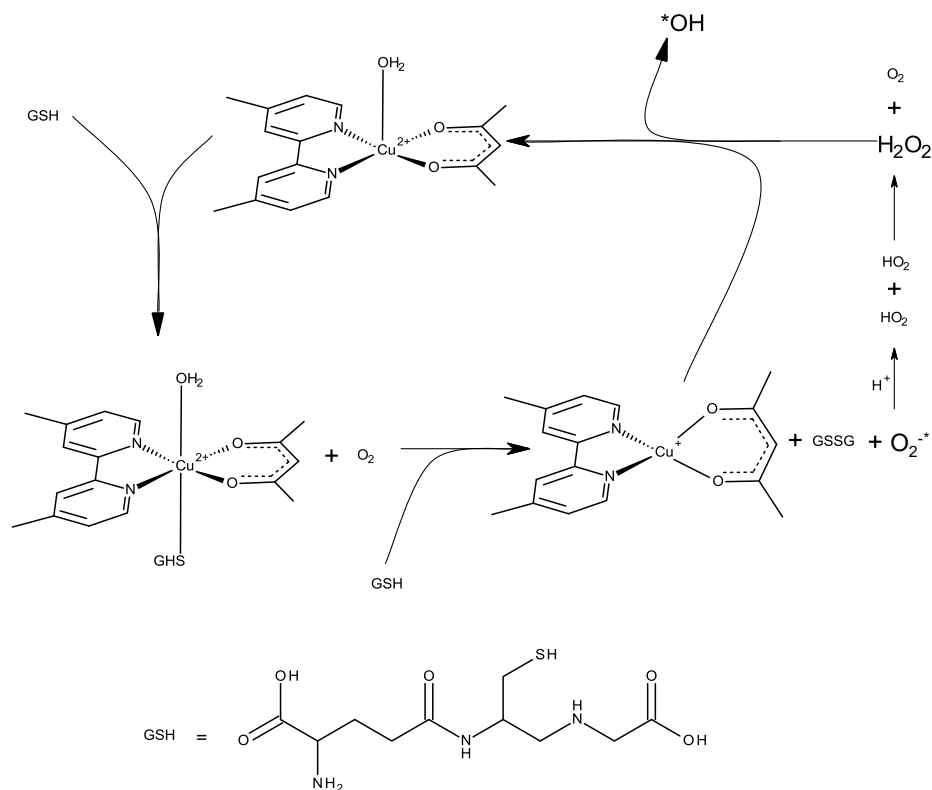
encuentra coordinada la cisteína por el azufre en la posición apical del ion metálico y el oxígeno molecular, el cual interactúa con el azufre coordinado y se estabiliza a través de la formación de un puente de hidrógeno con el carboxilato. Para facilitar la transferencia electrónica del azufre al oxígeno molecular y al centro metálico es necesario que se aproxime una segunda unidad de cisteína como se muestra en la figura 47b. La estabilización de este compuesto se da por los múltiples puentes de hidrógeno formados entre los aminoácidos presentes. En todos los casos existe una molécula de agua en una de las posiciones apicales del cobre, esta molécula de agua ayuda a que el centro metálico quede con una menor densidad electrónica como ya se había determinado en estudios teóricos de la interacción de adenina con las Casiopéinas. Estando pues el centro metálico con una deficiencia importante de densidad electrónica se favorece la coordinación del azufre en la posición apical no ocupada. El oxígeno molecular interactúa con el átomo de azufre coordinado al cobre pero también se estabiliza formando puentes de hidrógeno con la segunda unidad de cisteína que se aproxima.



**Figura 47.** a) Estado de transición encontrado para la reacción entre **bpyacac**, Cisteína y oxígeno molecular. La figura b) muestra las fuerzas intermoleculares involucradas en la estabilización del estado de transición.

Con estos resultados se puede proponer un nuevo mecanismo de acción en donde la reducción del centro metálico está precedida por la coordinación del azufre ya sea de la cisteína o del glutatión (figura 48). Una vez formada la nueva especie de coordinación reacciona con un exceso de tiol y en presencia de oxígeno molecular se produce radical superóxido y la Casiopeína reducida. El radical superóxido en un medio acuoso o en un disolvente prótico reacciona con iones hidronio para generar el radical hidroperoxilo que reacciona consigo mismo en un proceso de desproporción para generar como producto final el peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.<sup>169</sup> El  $H_2O_2$  generado puede reaccionar con la especie de Cu(I) y regenerar la Casiopeína con el Cu(II) y producir radical hidroxilo como producto final. De esta manera la reacción es dependiente de la cantidad de agente reductor y de oxígeno molecular presente en el medio de reacción generando como producto final radical superóxido, tal como se observó en los experimentos de RPE. El mecanismo entonces difiere con el previamente reportado en que primero se da una coordinación del azufre del tiol al centro metálico, lo cual reduce la energía de transferencia electrónica para la generación del radical superóxido.<sup>170-166</sup>

Una vez que se evidenció que las Casiopeínas son capaces de generar radical superóxido y radical hidroxilo en disolución cuando se encuentran presentes oxígeno molecular y un agente reductor, se procedió a identificar el tipo de interacción que tenían las Casiopeínas con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato para identificar la preferencia de coordinación de todos los átomos donadores con el cobre de las Casiopeínas.



**Figura 48.** Mecanismo de reacción propuesto en función de los resultados descritos en el texto de esta sección.

### 5.7 Interacción de Casiopeínas con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato.

La interacción entre las Casiopeínas con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato se realizó empleando espectrofotometría UV-vis, RPE y en los casos donde fue posible por difracción de rayos X. Para todos los casos se emplearon disoluciones de adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato 25 mM y Casiopeínas 10 mM, de las cuales se agregaron los mililitros correspondientes para que la disolución final quedara con relaciones estequiométricas Casiopeína: ligante de 1:0.5, 1:1, 1:1.5, 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5,

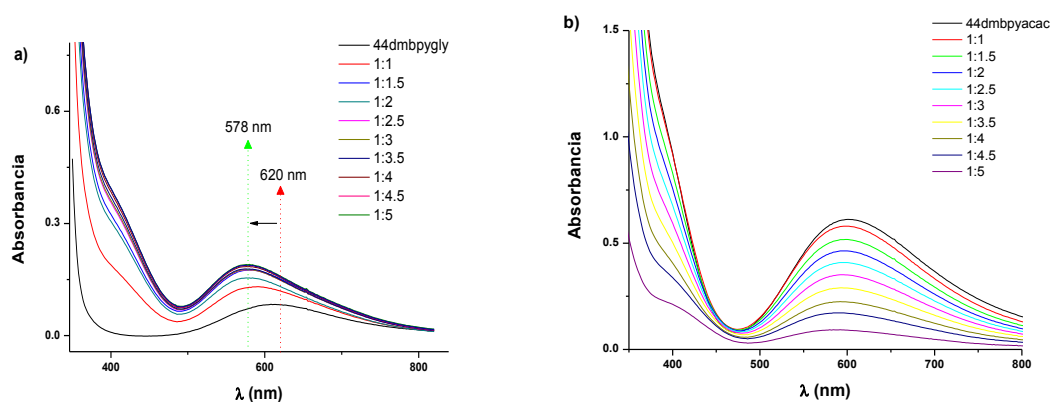
1:4, 1:4.5 y 1:5. Las Casiopeínas empleadas para esta parte del trabajo fueron **44dmbpygly**, **47dmfengly**, **56dmfengly**, **3478tmfengly**, **44dmbpyacac**, **47dmfenacac**, **56dmfenacac** y **3478tmfenacac** por ser de los compuestos que presentan las mejores actividades de inhibición de la proliferación celular in vitro y **Bpygly**, **fengly**, **Bpyacac** y **fenacac**, como compuestos de referencia.

En todos los casos el comportamiento de los compuestos con glicina es muy diferente a los compuestos con acetilacetato, la descripción general del comportamiento se hará a partir de las interacciones con adenina y si existe alguna diferencia sustancial de comportamiento de los otros ligantes, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato con respecto a lo descrito con adenina se indicará en esa parte del texto.

Al adicionar adenina a las disoluciones de los compuestos con gly, las disoluciones presentan un cambio de coloración inmediato de azul a un verde esmeralda muy intenso y los máximos de absorción se desplazan entre 30 y 40 nm hacia menores longitudes de onda, en el caso del espectro electrónico del compuesto **44dmbpygly** que se encuentra en la figura 49a el máximo se desplaza de 620 nm para la Casiopeína en ausencia de adenina hasta 578 nm cuando se agregan los 5 equivalentes de adenina. Por otro lado, cuando se realiza el mismo procedimiento con la Casiopeína **44dmbypacac** en ningún caso se observó algún desplazamiento del máximo de absorbancia el cual se mantiene constante en 602 nm.

El cambio en el máximo de absorbancia del compuesto **44dmbpygly** hacia valores de longitud de onda menores es indicativo de un cambio importante en la esfera de coordinación, en donde los ligantes presentes generan un desdoblamiento de los orbitales del metal mucho mayor que el que genera la esfera de coordinación original. Dado que se está trabajando en agua y que no existen otros átomos donadores que puedan generar un

desdoblamiento mayor que el que se tenía con la esfera original se propone que se esté coordinando la adenina sustituyendo al aminoacidato. Por otro lado, al no presentarse cambio en el máximo de absorción cuando se agrega adenina al compuesto **44dmbypacac**, se propone que no hay una interacción directa entre la adenina y el centro metálico.

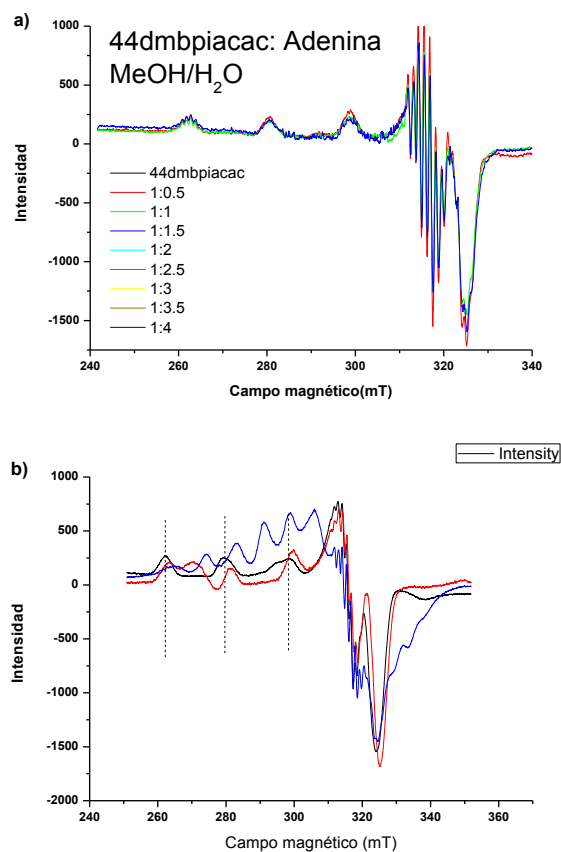


**Figura 49.** Interacción de **44dmbpygly** (a) y **44dmbpyacac** (b) interactuando con diferentes equivalentes de adenina.

En el caso de la adición de adenosina a los compuestos de coordinación Casiopeínas, no se presentó cambio en el espectro de absorción hasta 6 meses después de realizada la mezcla en donde se presentó un cambio en el máximo de absorción de 610 nm (**44dmbypacac**) y 620 nm (**44dmbpygly**) a 588 nm en ambos casos, el sólido resultante es de color azul y el análisis elemental coincide para un compuesto que tiene fórmulas mínimas  $[\text{Cu}(\text{44dmbpy})(\text{gly})(\text{adenosina})]\text{NO}_3$  y  $[\text{Cu}(\text{44dmbpy})(\text{acac})(\text{adenosina})]\text{NO}_3$ .

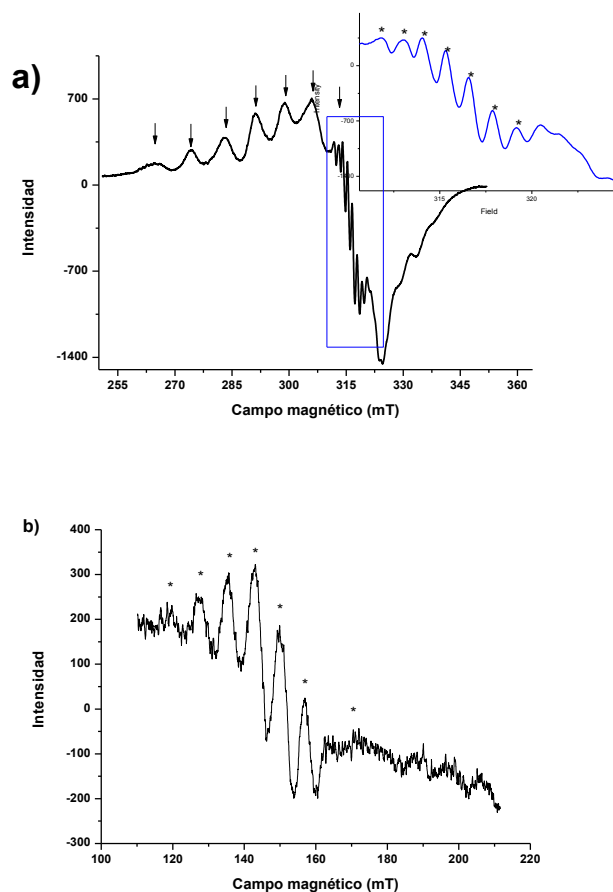
Los espectros de RPE para la Casiopeína **44dmbpyacac** soportan la propuesta de que no se presenta una interacción directa entre la adenina con el centro metálico pues se conserva el comportamiento general del espectro del compuesto sin adenina agregada, incluso es posible apreciar el acoplamiento con los nitrógenos de la bipyridina en la primera señal

hiperfina durante todas las adiciones. Por otro lado, el compuesto **44dmbpygly** presenta señales adicionales producto de la presencia de una nueva especie de Cu(II) en la disolución. Las líneas punteadas en el espectro de la figura 50 indican los valores a los que se presentan las señales hiperfinas del compuesto antes de añadir la adenina. El espectro en rojo se obtiene con dos equivalentes de adenina, mientras que el compuesto en azul se observa cuando se han adicionado 4 equivalentes de adenina. Aún con el cambio tan drástico que se presenta en el espectro azul con respecto al negro, la transformación de la Casiopeína a la nueva especie no se ha dado por completo.



**Figura 50.** Espectros RPE de **44dmbpyacac** (a) y **44dmbpygly** (b) con diferentes equivalentes de adenina. En la figura b) se eliminaron varios espectros intermedios para que se puedan apreciar las siete señales asociadas al acoplamiento de un electrón con dos núcleos de Cu(II).

El número de señales hiperfinas así como las superhiperfinas proporcionan información acerca de la esfera de coordinación del Cu(II) así como del acoplamiento que se pueda presentar con otros núcleos que se encuentren cerca. Analizando el espectro adquirido para **44dmbpygly** con 4 equivalentes de adenina se observan seis señales centradas en 290 mT. Para compuestos en donde el electrón desapareado se encuentra acoplándose con dos núcleos de Cu(II) aparecen seis señales en esta región del espectro, por lo que la séptima señal del sistema se encuentra traslapada con las señales superhiperfinas, las flechas de la figura 51a señalan los valores de campo a los que se presentan las siete señales hiperfinas mencionadas.



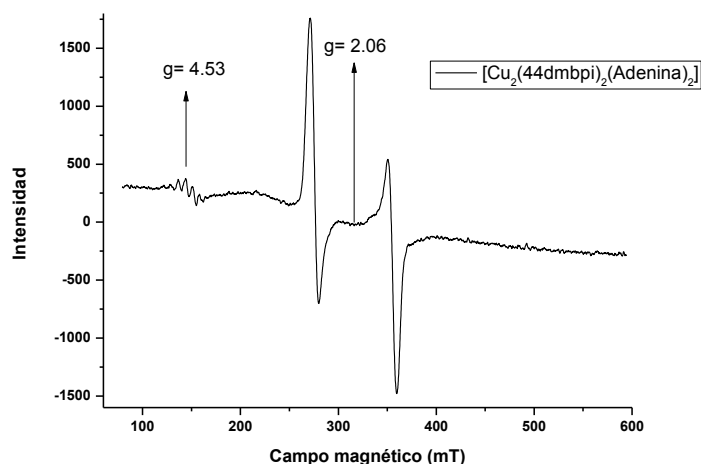
**Figura 51.** a) Región central del espectro RPE donde se observan las siete señales asociadas al acoplamiento de un electrón con dos núcleos de cobre. b) Región del espectro donde se observa la transición prohibida  $\Delta M_s = \pm 2$ .

Haciendo una ampliación a la zona donde aparecen las señales superhiperfinas se distinguen siete señales marcados con asterisco que corresponden al acoplamiento del electrón desapareado con los átomos de nitrógeno presentes en la esfera de coordinación. Por el número de señales presentes, considerando que los átomos donadores involucrados son nitrógenos ( $I= 1$ ) y oxígenos ( $I= 0$ ) y de acuerdo a la regla de multiplicidad  $m= 2nI+1$ , entonces deben existir tres nitrógenos coordinados de una manera equivalente al centro metálico y las adeninas coordinadas deben de estar formando puentes entre ambos núcleos de cobre para poder tener un acoplamiento como el que se observa en la figura 51a. Para confirmar que se trata de una especie dinuclear de cobre se analiza la región entre 100 y 200 mT donde aparece la transición prohibida  $\Delta Ms= \pm 2$ , cuando los dos núcleos de cobre se encuentran lo suficientemente cerca uno del otro para que se dé el acoplamiento del electrón desapareado con tales núcleos o cuando el ligante está facilitando el acoplamiento. En la región mencionada aparece un conjunto de siete señales centradas en un valor de campo de 143 mT ( $g= 4.53$ ) lo que confirma la existencia de la especie dinuclear de Cu(II). Una característica importante a destacar en este sistema es que sin necesidad de hacer una ampliación a la región y con sólo tres acumulaciones fue posible observar el acoplamiento y la multiplicidad debido a dicho acoplamiento del electrón con los dos núcleos de cobre, generalmente solo se observa la transición sin el desdoblamiento, lo cual sugiere que la distancia entre los cobres es realmente pequeña (Figura 51b).

En la literatura se han descrito espectros similares para sistemas dinucleares de Cu(II) en donde las distancia entre los átomos de cobre se encuentran a 3.3 Å en el sistema  $[\text{Cu}(\text{tidioacetato})(\text{fenantrolina})]_2 \cdot \text{H}_2\text{tda}$  o entre 6.9 a 9.1 Å con espaciadores alifáticos como en  $[\text{Cu}_2(\text{dimp})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2](\text{NO}_3)_2$  donde  $\text{dimp}= 2,8\text{-dimetil-5,11-bis}(\text{piridin-2-ilmetil})\text{-1,4,5,6,7,10,11,12-octahidroimidazo}[4,5\text{-h}]\text{imidazo-[4,5-c}][1,6]\text{-diazecina}$ .<sup>173-177</sup>

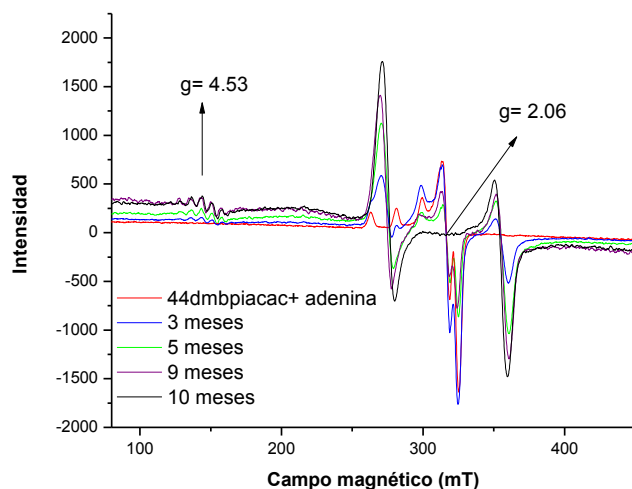


Un mes después, la transformación de la especie mononuclear de cobre a la dinuclear se da por completo generando un sistema triplete donde la interacción del electrón desapareado con los núcleos de cobre es muy fuerte, lo que hace desaparecer en su totalidad las siete señales que aparecían en el campo central generando ahora el espectro que se muestra en la figura 52 centrado en  $g = 2.06$  y la transición prohibida  $\Delta M_s = \pm 2$  en  $g = 4.53$ .



**Figura 52.** Espectro RPE en donde se muestra el estado triplete debido a la gran cercanía de los núcleos de Cu(II).

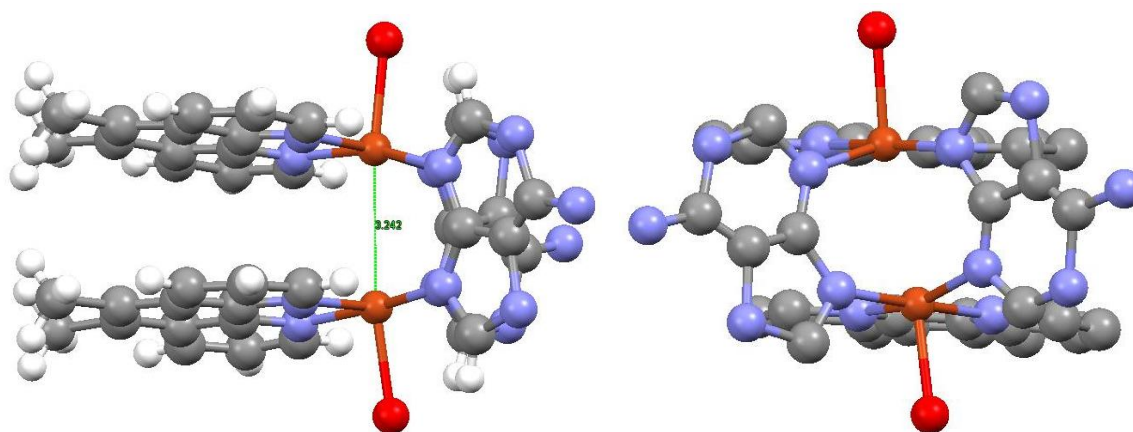
Los sistemas que presentan acac en su esfera de coordinación son mucho más estables que los compuestos con glicinato, sin embargo, también sufren la sustitución del ligante secundario. La transformación total de los sistemas con acac es realmente lenta llegando a tardar hasta 10 meses en completarse. Como se muestra en la figura 53, el espectro en rojo corresponde al compuesto **44dmbpyacac** justo después de mezclarse con 4 equivalentes de adenina. Los siguientes espectros muestran la transformación gradual del sistema monomérico al sistema dinuclear (espectro negro en la figura). Al obtener los mismo valores que cuando se empleó **44dmbpygly** se concluye que la especie formada es exactamente la misma  $[\text{Cu}_2(44\text{dmbpyacac})_2(\text{adenina})_2]$ .



**Figura 53.** Espectros RPE del compuesto **44dmbpyacac** con 4 equivalentes de adenina donde se muestra el grado de transformación con el paso del tiempo hasta llegar al estado triplete.

La difracción de rayos X de uno de los compuestos estudiados el cual se obtuvo de la reacción entre **56dmfengly** y adenina permite afirmar entonces la formación del compuesto dinuclear en donde se tienen dos unidades de diimina aromática, dos adeninas, dos átomos de Cu(II) y completando la esfera de coordinación de los cobres se tiene dos moléculas de agua, cada una coordinada a un cobre y se presenta en la figura 54. Desafortunadamente, el cristal empleado para el estudio de rayos X no es de la mejor calidad y sumado al desorden en la parte de las adeninas, la estructura no es de una calidad suficiente para publicarse. Sin embargo, la resolución nos permite conocer la conectividad en esta estructura y considerando el alto desorden encontrado en las adeninas podemos proponer que un paso intermedio para la formación del compuesto dinuclear involucra la coordinación de una adenina a dos cobres, teniendo dos posibles orientaciones, lo que provoca que el grupo amino de la adenina quede cerca del cobre que está en la parte superior o en la parte inferior. Al tener estas dos orientaciones, la adenina que completa la esfera de coordinación

tendrá que acomodarse de tal forma que los grupos amino de ambas adeninas queden alternados teniendo entonces que los carbonos y los nitrógenos intercambiaran posiciones al momento de hacer el promedio de ocupación para poder definir la unidad asimétrica de este cristal. Es interesante notar que a pesar de tener un grupo amino con el cual se podría coordinar una adenina de manera bidentada a un mismo cobre formando anillos de cinco miembros, prefiere la conformación mostrada en la figura 54 donde la coordinación es por los átomos de nitrógeno N3 y N9. Dada la mala calidad de los datos cristalográficos no se discutirán las interacciones débiles que mantienen al cristal.

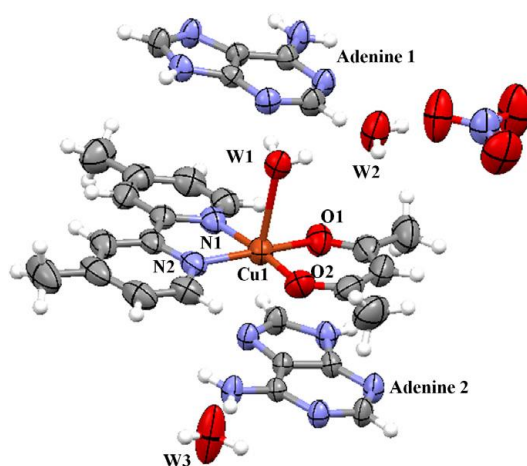


**Figura 54.** Estructura molecular del compuesto  $[\text{Cu}_2(56\text{dmfen})_2(\text{adenina})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$  mostrado a un 50% de ocupación. Las moléculas que actúan como contraion no se presentan para mayor claridad.

La obtención del compuesto dinuclear depende de la estabilidad del compuesto de coordinación de partida, pero también influye la cantidad de adenina presente en el sistema. Para obtener el compuesto dinuclear se necesitaron 4 equivalentes de adenina y 10 meses, pero si se colocan solo dos equivalentes de adenina y esta disolución se deja a temperatura ambiente para que se evapore el agua que tiene como disolvente, entonces es posible aislar un cristal donde las adeninas están interactuando con el compuesto de coordinación a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$ . La figura 55 muestra la unidad asimétrica del cristal donde se tienen

dos adeninas, dos moléculas de agua de solvatación, un ion nitrato y el compuesto de coordinación  $[\text{Cu}(44\text{dmbpy})(\text{acac})(\text{H}_2\text{O})]^+$ . El cristal fue obtenido por Araceli Tovar-Tovar (Tesis doctoral).

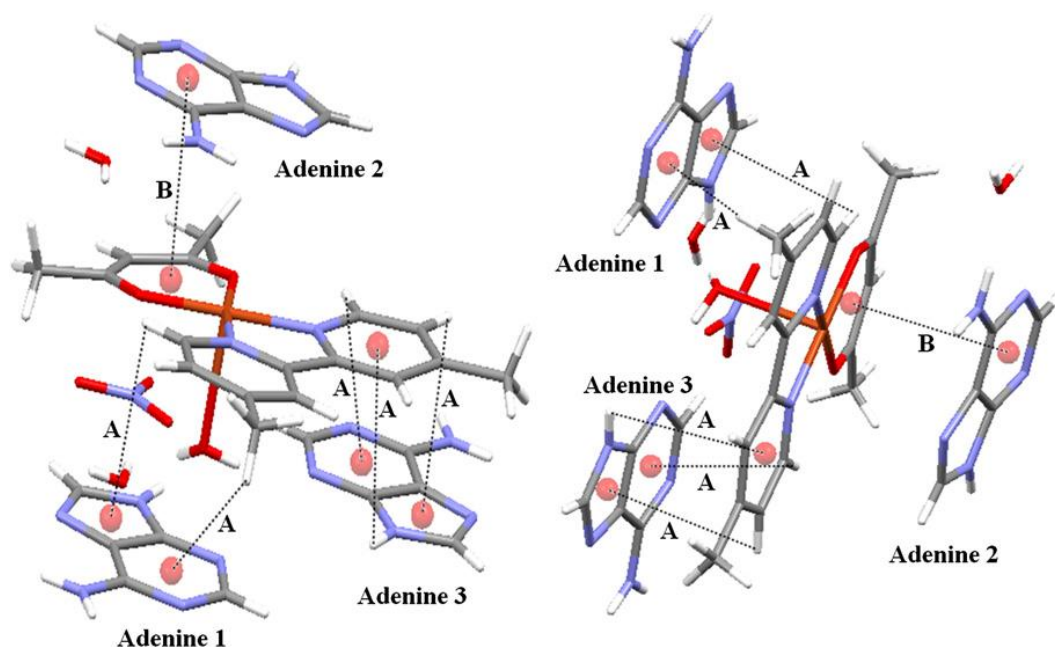
El Cu(II) adopta una geometría de pirámide de base cuadrada donde la base de la pirámide la conforman la 44dmbpy y el acac con la molécula de agua en la posición apical, la misma conformación espacial que otros compuestos reportados previamente<sup>178-186</sup> así como todos los obtenidos en este trabajo. Las distancias de enlace encontradas para este compuesto son muy parecidas a las que se presentan cuando el compuesto tiene una geometría cuadrada con una fórmula molecular  $[\text{Cu}(44\text{dmbpy})(\text{acac})]\text{ClO}_4$ .<sup>187</sup>



**Figura 55.** Diagrama ORTEP (50% de ocupación) que presenta la unidad asimétrica del aducto formado entre el compuesto  $[\text{Cu}(44\text{dmbpy})(\text{acac})(\text{H}_2\text{O})]^+$  y la adenina.

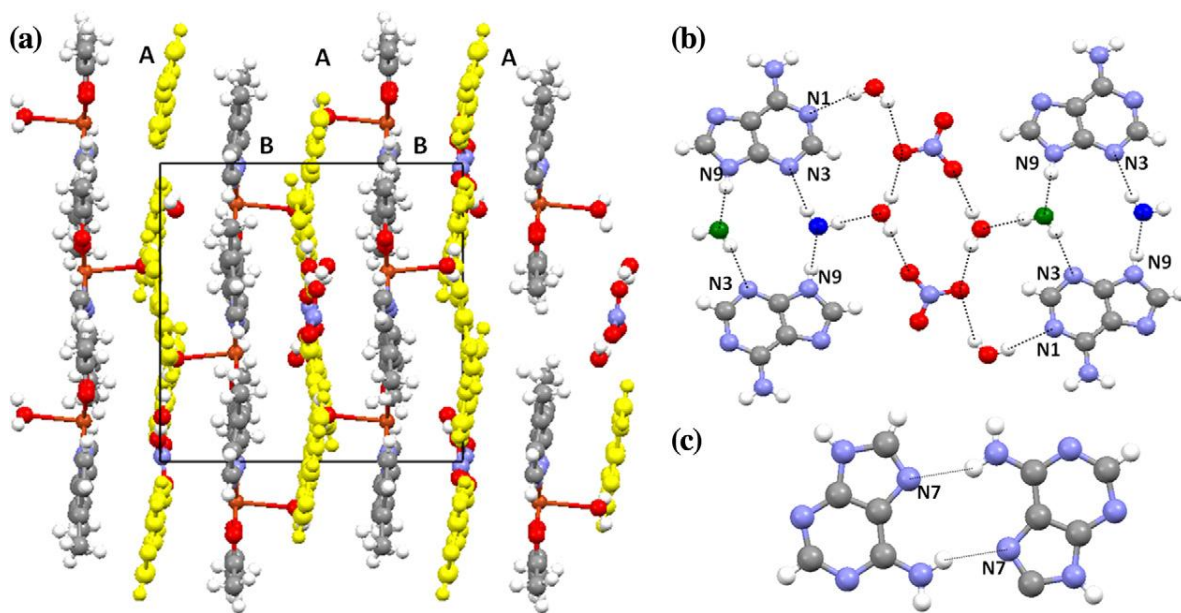
De acuerdo a la figura 56 se presentan interacciones de apilamiento entre la adenina marcada como 2 y el anillo pseudo-aromático formado por la coordinación del acac con el Cu(II), la distancia entre los centroides marcados en rojo es de 3.624 Å, ésta distancia se encuentra en el intervalo de 3.3 a 3.8 Å definido por Janiak para una interacción de apilamiento  $\pi$  desplazada de manera paralela.<sup>188</sup> Por otro lado las adeninas marcadas como 1 y 3 en la figura 39 presentan interacciones de tipo  $\text{C-H}\cdots\pi$  con una distancia del centroide

del anillo aromático al átomo de hidrógeno entre 3.258 y 3.524 Å. Las distancias encontradas son comparables con las reportadas para interacciones de apilamiento típicas en sistemas orgánicos.<sup>189</sup>



**Figura 56.** Fuerzas intermoleculares involucradas en la estabilización del aducto formado entre las adeninas y el compuesto **44dmbpyacac**.

Las moléculas presentes en el cristal adoptan un arreglo laminar alineado con el eje b de la celda unidad. La celda unidad contiene dos láminas del compuesto de coordinación intercaladas entre dos láminas de adenina como se muestra en la figura 57a. La distancia entre las laminas de adenina es la mitad de lo que mide el eje a de la celda unidad ( $a = 13.015(2)$  Å); que es la misma distancia existente entre las láminas de compuestos de coordinación. En este arreglo laminar las adeninas están involucradas en dos tipos de interacciones: i) formando puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y los iones nitrato (figura 57b) y ii) formando puentes de hidrógeno con otras adeninas.



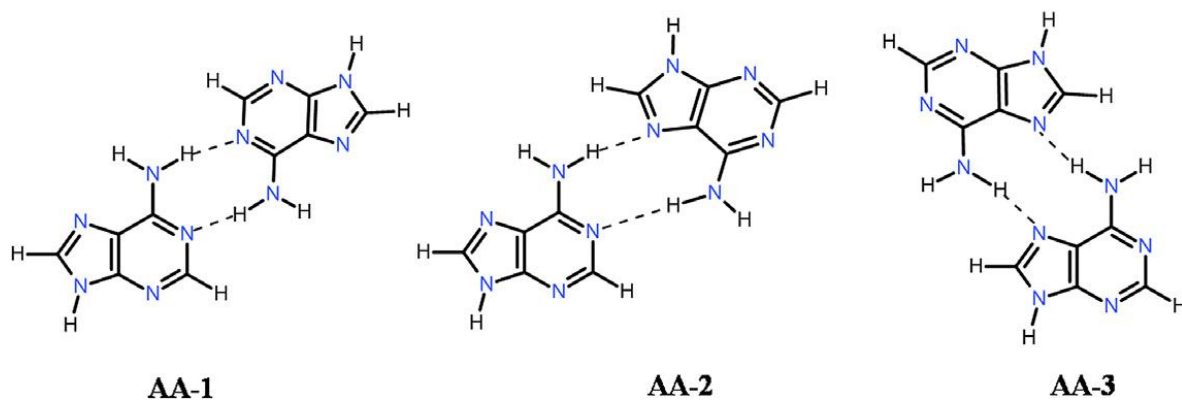
**Figura 57.** Interacciones intermoleculares en el aducto 44dmbpyacac y adenina. a) Vista a través del eje cristalográfico c que muestra a la adenina (A) y al compuesto 44dmbpyacac (B) acomodándose en láminas dentro del cristal. b) y c) Puentes de hidrógeno en donde participan las adeninas, las moléculas de agua coordinadas y de solvatación así como los iones nitrato.

De la primera interacción mencionada, dos moléculas de agua provenientes de dos compuestos de coordinación interactúan con el N3 y el N9 de las dos adeninas adyacentes formando estructuras  $R_4^4(12)$  donde dos nitrógenos y las dos moléculas de agua funcionan como aceptores de puentes de hidrógeno mientras que los dos nitrógenos N9 y las dos moléculas de agua funcionan como donadores del puente de hidrógeno. Las moléculas de marcadas de color verde provienen de la lámina superior de compuestos de coordinación, mientras que las moléculas de agua marcadas de color azul provienen de los compuestos de coordinación de la capa inferior.

Dos unidades idénticas como las que se acaban de describir interactúan entre ellas a través de un arreglo de dos iones nitrato y cuatro moléculas de agua que forman puentes de hidrógeno entre ellos formando tres anillos interconectados. Para formar estos puentes de

hidrógeno participan el nitrógeno 1 de las adeninas y dos moléculas de agua del compuesto de coordinación como se muestra en la figura 57b.

Hobza y Sponer<sup>190</sup> describen tres tipos de puentes de hidrógeno que se presentan entre dos unidades de adenina clasificados como AA-1, AA-2 y AA-3 y que se presentan en la figura 58. En AA-1, N1 de una adenina y el grupo amino de la otra forman el puente de hidrógeno, en AA-2 la formación de los puentes de hidrógeno se da entre el N1 de una adenina con el grupo amino de la segunda y el N7 de la segunda con el grupo amino de la primera, finalmente para el arreglo AA-3 los puentes de hidrógeno se forman al interactuar los grupos amino de ambas adeninas con el N7 correspondiente. La energía total de asociación para estos sistemas es -11.0, -10.3 y -9.4 Kcal/mol, respectivamente.<sup>190</sup>



**Figura 58.** Puentes de hidrógeno que pueden formarse entre dos unidades de adenina.

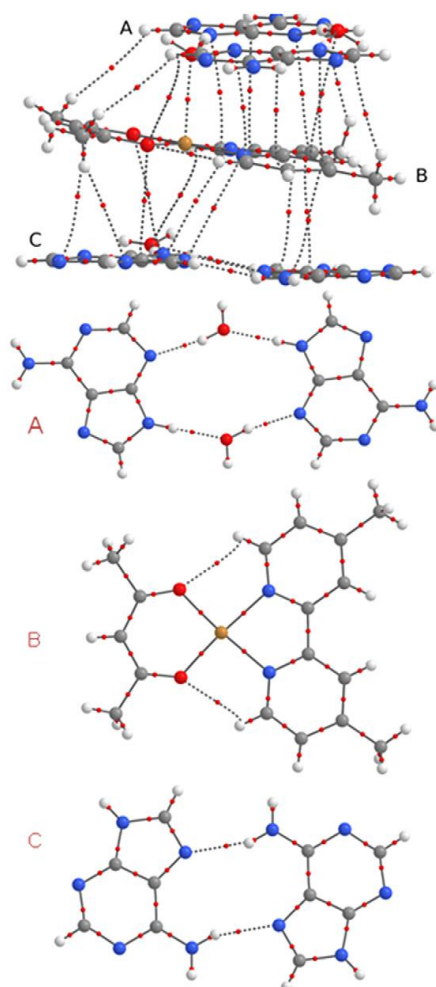
Aún cuando el arreglo AA-3 es el menos favorecido energéticamente, es el que se está presentando en el cristal, esto se debe a la formación de los otros puentes de hidrógeno que fuerzan al sistema a adoptar tal conformación para las adeninas. En este punto es importante mencionar que se intentó hacer el estudio de interacción del compuesto de coordinación con las otras bases (citosina, guanina y timina), sin embargo no hubo un resultado favorable.

Con la intención de obtener toda la información posible respecto a las interacciones presentes en este sistema se decidió realizar un estudio computacional. La estructura de rayos X mostrada en la figura 55 fue empleada como geometría inicial para obtener una optimización de la estructura a un nivel de cálculo M052x/LANL2DZ<sup>191</sup> empleando el programa Gaussian 09.<sup>192</sup> Recientemente Jeanvoine y Spezia<sup>193</sup> encontraron que el intercambio no local de Hartree-Fock juega un papel fundamental en la descripción de los compuestos de Cu(II) en donde el orbital híbrido M05-2x es el que proporciona los resultados que más concuerdan con los datos experimentales y cálculos CCSD(T). Se realizó un cálculo de energía de punto único con M052x/6-311++g(2d,2p) para obtener una función de onda con todos los sets de bases de electrones. La adenina aislada así como el compuesto de coordinación y las moléculas de agua fueron optimizadas al mismo nivel de teoría para calcular la energía y los cambios en la población electrónica. Las funciones de onda obtenidas de dichos cálculos fueron empleadas para calcular las propiedades locales e integradas de la densidad electrónica empleando el programa AIMALL.<sup>194</sup>

Teniendo los datos de las propiedades locales e integradas de la densidad electrónica se procedió a realizar el análisis de los resultados.<sup>195</sup> La figura 59 muestra la gráfica molecular de los compuestos involucrados en las tres láminas antes descritas. En la lámina A, los dos puentes de hidrógeno N $\cdots$ H-O y O $\cdots$ H-N presentan valores de densidad electrónica en el punto crítico de enlace ( $q_{bcp}$ ) de 0.028 y 0.027 unidades atómicas respectivamente que son valores típicos para los puentes de hidrógeno. Existen 18 interacciones entre las tres capas de compuestos, 13 de ellas asociadas con la bipyridina y las 5 restantes con el acac. Todas ellas pueden ser clasificadas como interacciones de capa cerrada donde las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , C $\cdots$ H- $\pi$  y C-H $\cdots$ X (X= N, O) están presentes. Las interacciones débiles  $\pi$ - $\pi$  y C-H $\cdots$  $\pi$



más importantes se presentan entre la bipyridina y las adeninas adyacentes con un valor de  $q_{pcc}$  de 0.0035 u.a.



**Figura 59.** Interacciones intermoleculares obtenidas del análisis QTAIM en donde se observan los puntos críticos de enlace y de las interacciones intermoleculares en el aducto, las adeninas y el compuesto de coordinación.

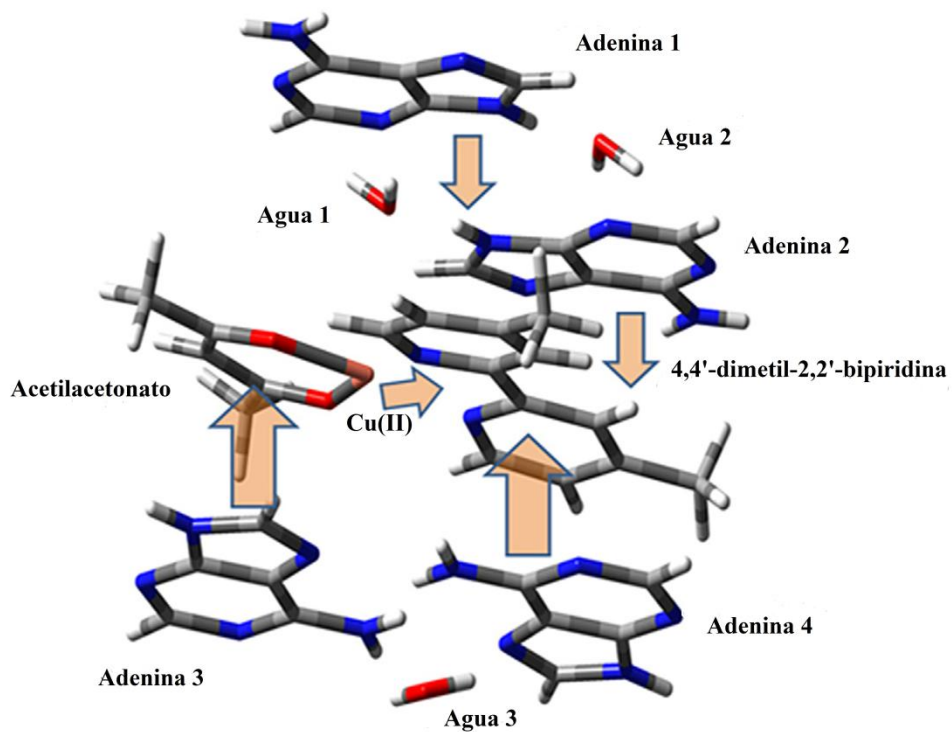
La población electrónica de cada grupo (N) en el compuesto fue comparada con las moléculas aisladas de acuerdo a la ecuación:

$$\Delta N (\text{grupo}) = N(\text{grupo@compuesto}) - N(\text{especies aisladas})$$

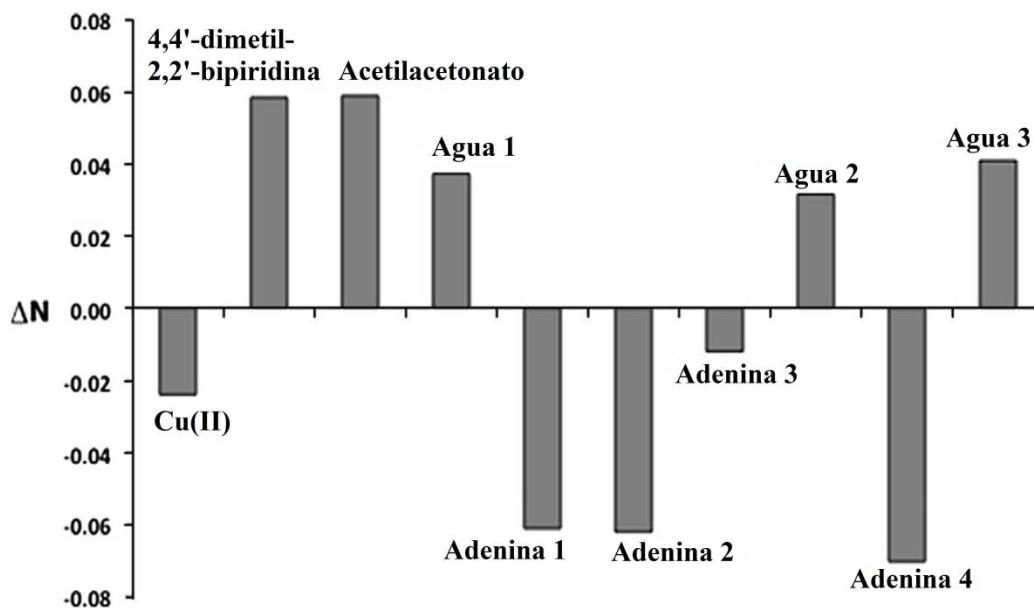
La figura 60 muestra la transferencia electrónica de las adeninas hacia los ligantes que se encuentran en la esfera de coordinación del Cu(II). La población electrónica del átomo de cobre disminuye en 0.02e, mientras que la población de 44dmbpy y acac incrementan en 0.06e cada una. Las moléculas de agua 1, 2 y 3 ganan 0.04, 0.03 y 0.04e respectivamente. Por otro lado, las adeninas 1 a 4 pierden 0.06, 0.06, 0.01 y 0.07 e respectivamente, de donde es posible notar que la transferencia electrónica es mayor para las adeninas que están interactuando con la bipyridina. Las moléculas de adenina transfieren densidad electrónica hacia los ligantes deficientes compensando la donación que hicieron estos hacia el átomo de Cu(II). Todos estos datos se presentan de manera gráfica en la figura 61.

Es interesante hacer notar aquí que la densidad electrónica donada por las adeninas no es transferida al centro metálico como sugiere Yamauchi para los compuestos de platino.<sup>196-197</sup> Así el mecanismo de apilamiento entre las moléculas de adenina y el compuestos de coordinación debe entenderse a través de la redistribución de la densidad electrónica en la supramolécula que estabiliza el aducto de adenina con una energía de -92.13 Kcal/mol, lo cual era de esperarse ya que la energía es una función de la densidad electrónica.<sup>198</sup>

Además, es importante analizar la densidad electrónica calculada alrededor del Cu(II) empleando el momento cuadrupolar tanto del compuesto de coordinación como del aducto formado con las adeninas. El momento cuadrupolar del cobre está orientado respecto al plano principal de la molécula formado por la bipyridina y el acac, por esta razón, el valor del elipsoide estará directamente relacionado con la deformación de la densidad electrónica del cobre debido a la interacción de retrodonación  $\pi$  con los ligantes.



**Figura 60.** Representación gráfica (flechas naranjas) de la transferencia de carga entre los ligandos del compuesto de coordinación y las adeninas que se presentan en el aducto.



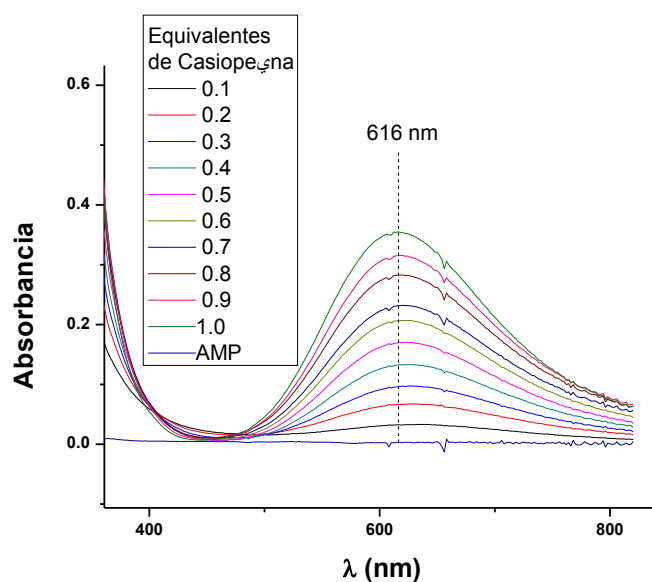
**Figura 61.** Cambio en la población electrónica de todos los grupos involucrados en el aducto. Se toma como referencia el compuesto de coordinación 44dmbpyacac para obtener los valores de la diferencia.

El radio mayor del elipsoide en el compuesto de coordinación es de 2.6541, mientras que en el aducto con las adeninas el valor es de 2.0915, lo que representa una disminución del 21.2%. Esta disminución en el valor del radio elipsoidal representa una menor participación en la retrodonación  $\pi$  por parte de los ligantes cuando la adenina está presente. La formación del par donador-aceptor de densidad electrónica que se da entre las adeninas y los ligantes presentes en la esfera de coordinación de cobre proporciona un exceso de densidad electrónica sobre estos últimos disminuyendo su capacidad de aceptor  $\pi$ , haciendo que la densidad se quede sobre ellos y no pueda ser transferida al centro metálico, sobre todo porque el mejor par aceptor-donador se forma entre las adeninas y la bipyridina.

De esta forma se tiene que el momento cuadrupolar nos ayuda a entender como se está llevando a cabo la redistribución de densidad electrónica, tal como lo vimos al analizar el comportamiento de los compuestos de coordinación de manera independiente y explicar con los datos de momento dipolar y cuadrupolar sus propiedades electrónicas. La parte que corresponde al aducto formado entre el compuesto de coordinación  $[\text{Cu}(\text{44dmbpi})(\text{acac})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$  (**44dmbpyacac**) y adeninas fue publicado en la revista *Polyhedron*.<sup>199</sup>

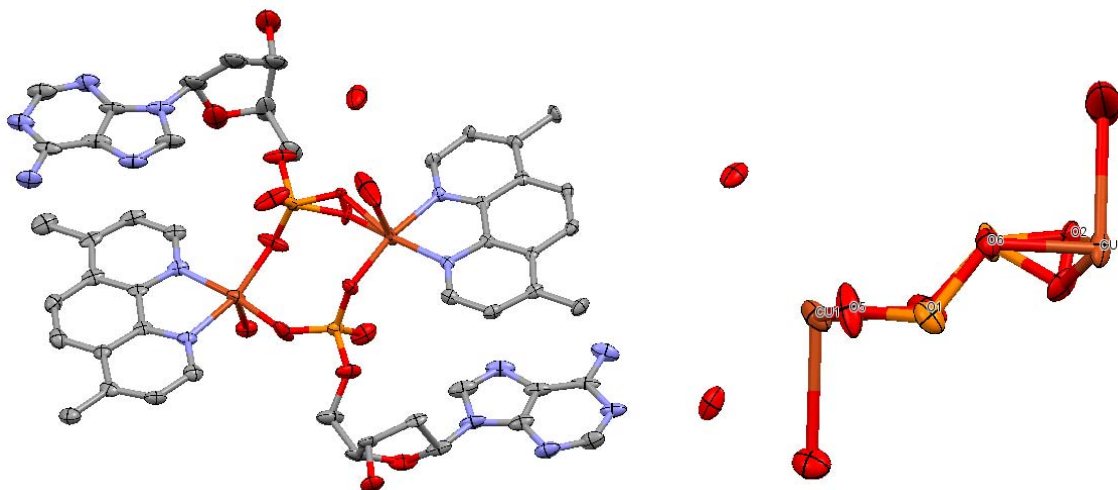
Con respecto a las interacciones con los 2-desoxiadenosin-5-monofosfato, el comportamiento es muy similar al descrito para las interacciones con adenina, siendo los compuestos con glicina los más susceptibles a sufrir reacciones de sustitución de ligante con respecto a los compuestos con acac, sin embargo, para éstos sistemas el cambio es menos evidente. La figura 62 muestra el espectro electrónico para la interacción de **44dmbpyacac** con 2-desoxiadenosin-5-monofosfato en donde se puede apreciar que después de la mezcla aparece un ligero desplazamiento del máximo de absorción de 620 a 616 nm, en estos sistemas no existe un cambio de color en la disolución después de realizar

la mezcla como en el caso de las adeninas. Todos los compuestos presentan el mismo comportamiento cuando interactúan con 2-desoxiadenosin-5-monofosfato y el producto final después de alrededor de 10 meses es la sustitución del ligante secundario como se muestra en la siguiente parte de la discusión.



**Figura 62.** Espectro electrónico de **44dmbpyacac** con diferentes concentraciones de 2-desoxiadenosin-5monofosfato.

Para algunos de los compuestos estudiados fue posible obtener los monocristales adecuados para realizar un estudio de difracción de rayos X. Al igual que con las interacciones con adenina en estos cristales se presenta un alto grado de desorden en una de las unidades de 2-desoxiadenosin-5-monofosfato, por lo que se propone el mismo tipo de vía para llegar al compuesto dinuclear. La figura 66 muestra la estructura del compuesto dinuclear obtenido. Aun cuando fue posible obtener dos estructuras más en donde se puede apreciar la misma conectividad, la calidad de los datos obtenidos no es suficiente para publicar dichas estructuras.



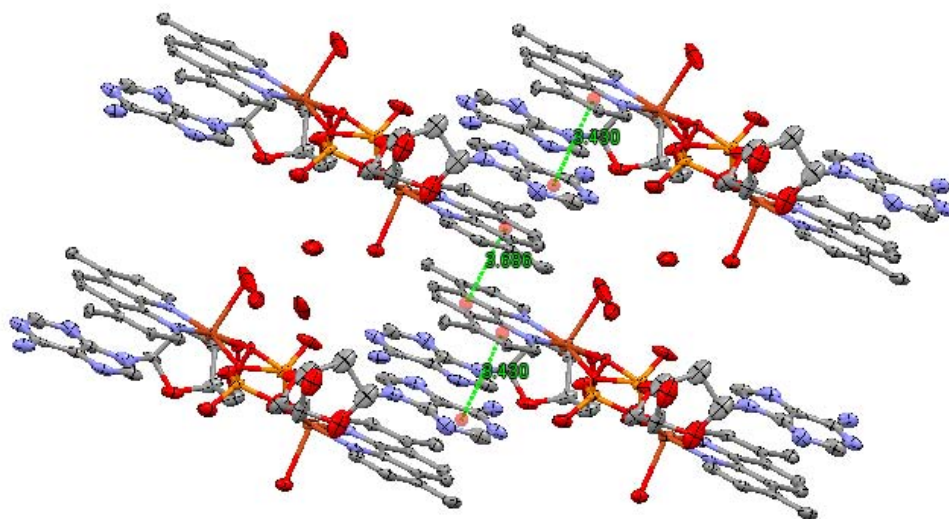
**Figura 63.** Estructura molecular del compuesto dinuclear obtenido de la interacción de **47dmfenacac** con 2-desoxiadenosin-5-monofosfato. La figura de la izquierda muestra la geometría que adoptan los átomos de cobre y los oxígenos del grupo fosfato dentro del compuesto.

La figura 63 muestra que el cobre mantiene una geometría de pirámide de base cuadrada para cada uno de los cobres presentes en el compuesto. La base de la pirámide está conformada por los nitrógenos de la diimina aromática y por dos oxígenos de fosfato, cada uno de ellos de una unidad independiente de 2-desoxiadenosin-5-monofosfato de tal forma que cada grupo fosfato interactúa con los dos átomos metálicos. La esfera de coordinación es completada por una molécula de agua que ocupa la posición apical. En todos los casos estudiados se ha presentado la geometría de pirámide de base cuadrada que parece ser la preferencial cuando se presenta una sola unidad de diimina aromática en la esfera de coordinación y ligantes monodentados o bidentados que no presenten un efecto de repulsión con los átomos de hidrógeno presentes en las posiciones 2 y 9 de fenantrolina o las posiciones 6 y 6' de la bipyridina.

En el compuesto con 47dmfen (figura 63) ambos átomos de cobre se encuentran ligeramente desplazados del plano conformado por los átomos donadores  $N_1/N_2/O_1/O_5$  para

el caso del Cu<sub>1</sub> y de N<sub>3</sub>/N<sub>4</sub>/O<sub>2</sub>/O<sub>6</sub> en el caso de Cu<sub>2</sub> distancias  $\rho$  iguales a 0.159 y 0.099 Å respectivamente. Por otro lado, las distancias Cu-L<sub>5</sub> se comportan de manera opuesta a los compuestos mononucleares, en este caso a mayor distancia  $\rho$  del plano, mayor es la distancia Cu-L<sub>5</sub> siendo estas distancias Cu1-Ow=2.367 Å y Cu2-Ow= 2.337 Å. La distancia entre los dos átomos de cobre es de 4.954 Å como se muestra en la figura, pero éstos no se encuentran en el mismo plano, la coordinación de los oxígenos de fosfato hacen que todo el esqueleto adopte una conformación tipo silla como se muestra en la figura 63b.

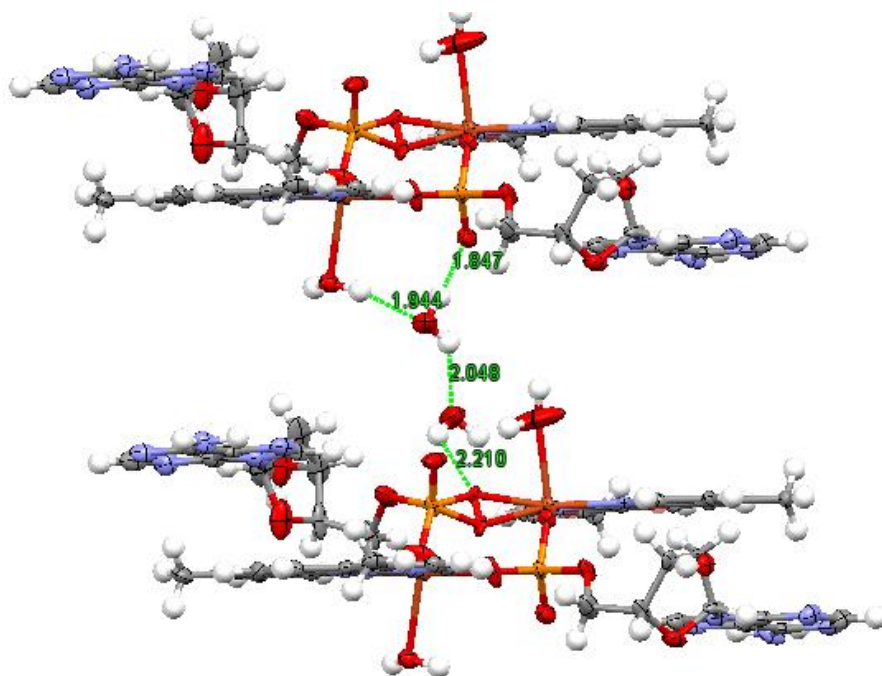
Existen dos tipos de interacciones débiles que estabilizan el cristal. La primera es la formación de puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua de solvatación con las moléculas de agua coordinadas así como con los oxígenos de fosfato de dos moléculas adyacentes, esto hace que dos bloques de compuestos interactúen empleando a las moléculas de agua de solvatación como puente. El segundo tipo de interacción existente son las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  que se dan entre los anillos aromáticos de las fenantrolinas con los anillos aromáticos de las adeninas en un caso y con otras fenantrolinas, pues estas estructuras están ordenadas de una manera alternada. La figura 64 muestra las interacciones de apilamiento donde la distancia fenantrolina-adenina es de 3.430 Å, mientras que la distancia entre fenantrolinas es de 3.686 Å.



**Figura 64.** Interacciones  $\pi$ - $\pi$  que se presentan entre los anillos de la fenantrolina y la adenina, así como entre fenantrolinas en el compuesto  $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

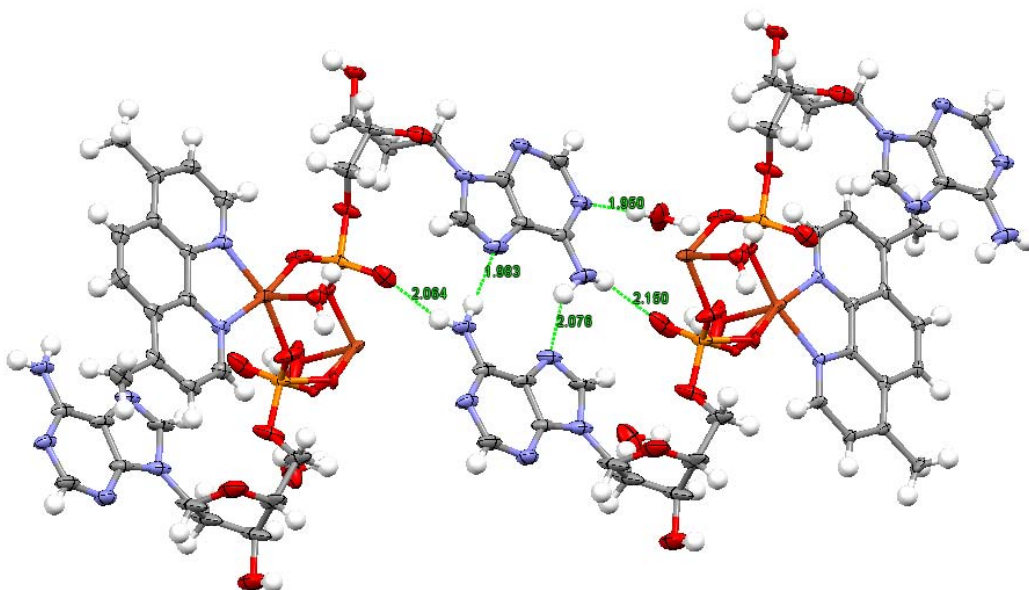
Para la formación de los puentes de hidrógeno participan tanto los oxígenos de fosfato coordinados como los no coordinados tal como se muestra en la figura 65. En la parte superior de la figura se puede observar la formación de dos puentes de hidrógeno, ambos involucran a la molécula de agua de solvatación que funciona como aceptor de puente de hidrógeno al interactuar con la molécula de agua coordinada (1.944 Å) y como donador del puente de hidrógeno al interactuar con el oxígeno del fosfato no coordinado (1.847 Å) y con la segunda molécula de agua de solvatación (2.048 Å). A su vez, la segunda molécula de agua de solvatación es donadora en otro puente de hidrógeno y el aceptor es un oxígeno de fosfato que está coordinado a un Cu(II) de una unidad dinuclear independiente.





**Figura 65.** Puentes de hidrógeno presentes entre distintas unidades del compuesto dinuclear  $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . La conectividad se presenta a través de las moléculas de agua coordinadas y de solvatación, así como los oxígenos de fosfato.

Más puentes de hidrógeno se forman ahora entre dos adeninas de moléculas independientes que se encuentran adyacentes, nuevamente como en el caso de las adeninas, la conformación adoptada es la menos favorecida energéticamente, la AA-3, en donde interactúan los grupos amino de ambas adeninas con el N7 correspondiente. Dos puentes de hidrógeno más se forman entre los grupos amino y oxígenos de fosfato no coordinado (2.064 y 2.150 Å). Un último puente de hidrógeno se forma entre el N1 de la adenina y una molécula de agua de solvatación. En la figura 66 se ocultaron las unidades de fenantrolina que están por arriba y por debajo de las adeninas interactuantes para poder visualizar bien los puentes de hidrógeno formados.



**Figura 66.** Puentes de hidrógeno formados entre las unidades de adenina presentes en los compuestos dinucleares  $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . En la figura se han eliminado las unidades de fenantrolina que quedan justo por arriba y por debajo de las interacciones marcadas para mejorar su visualización.

En este punto hay que recordar que la coordinación que se presentó con la adenina, la adenosina y con 2-desoxiadenosin-5monofosfato, se da por los grados de libertad con que cuentan las moléculas para acomodarse de tal manera que favorezcan las reacciones de sustitución. La preferencia de coordinación cuando se encuentran las Casiopeínas en presencia de 4 equivalentes o más de adenina es la formación de especies dinucleares que involucran a dos adeninas haciendo puentes entre los dos núcleos de Cu(II) en una conformación alternada de una adenina respecto a la otra empleando a los nitrógenos N3 y N9 para conformar la especie dinuclear, tal como se presenta un una gran cantidad de sistemas dinucleares que involucran a Cu(II) con adenina.<sup>200-203</sup>

Al bloquear N9 con una unidad de ribosa, las únicas posibilidades de coordinación se presentan con el grupo amino de la adenina y con el grupo OH de la ribosa, ambos con una capacidad de coordinación pobre lo que genera un cambio muy pequeño en el máximo de

absorción descrito en los experimentos de espectroscopia UV-Vis y que pueden ser sustituidos nuevamente por moléculas de agua. Por otro lado cuando se agrega una unidad fosfato al nucleósido para formar la unidad nucleótido monofosfato, se presenta nuevamente la posibilidad de generar especies dinucleares ahora empleando como puentes los oxígenos del fosfato. La preferencia de coordinación será con los oxígenos del fosfato pues el N3 de la adenina esta estéricamente impedido y la coordinación con N7 sólo se presenta cuando el grupo amino es capaz de formar puentes de hidrógeno con unidades cercanas que funcionen como aceptores de puentes de hidrógeno.<sup>204-205</sup> Así pues, en un sistema donde se presente la posibilidad de coordinación entre el N7 de la adenina o la coordinación de un oxígeno de un grupo fosfato como en el caso de las adeninas que se encuentran en el ADN, la coordinación preferencial se dará por los oxígenos del grupo fosfato como primer paso en el reconocimiento molecular. Las distancias y ángulos de enlace seleccionados para el compuesto dinuclear  $[\text{Cu}_2-\mu^2-(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(4,7\text{-dimetil-1,10-fenantrolina})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  se presentan en la tabla 9.

**Tabla 9.** Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para el compuesto  $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)_2 (\text{H}_2\text{O})$ .

Cu1-N1= 2.020(4)	Cu2-O2w= 2.337(5)	O1-Cu1-O1w= 91.13(14)	O6-Cu2-O2w= 92.00 (17)
Cu1-N2= 2.015(4)	Cu2-O2a= 1.891(6)	N2-Cu1-O1w= 103.88(14)	O2w-Cu2-N3= 99.96 (17)
Cu1-O1= 1.935(3)	O5-Cu1-O1= 97.57(16)	N1-Cu1-O1w= 83.57(14)	O2w-Cu2-O2= 75.5 (5)
Cu1-O5= 1.929(3)	O5-Cu1-N2= 88.99(15)	O6-Cu2-N3= 167.33 (14)	O2w-Cu2-N4= 94.8 (2)
Cu1-O1w= 2.367(4)	O1-Cu1-N2= 162.39(16)	O6-Cu2-N4= 94.11 (14)	O2a-Cu2-O2= 24.5 (2)
Cu2-O2= 2.015(10)	O1-Cu1-N1= 92.09(18)	N3-Cu2-N4= 80.82 (14)	O2a-Cu2-N4= 163.8 (4)
Cu2-O6= 1.927(3)	N2-Cu1-N1= 80.69(16)	O6-Cu2-O2= 98.4 (2)	O2a-Cu2-N3= 89.1 (2)
Cu2-N3= 2.009(3)	O5-Cu1-N1= 169.65(16)	O2-Cu2-N3= 88.7 (2)	O2a-Cu2-O6= 93.1 (3)
Cu2-N4= 2.009(4)	O5-Cu1-O1w= 99.90(16)	O2-Cu2-N4= 164.3 (4)	O2w-Cu2-O2a= 99.5 (5)

Las distancias encontradas para el compuesto  $[\text{Cu}_2(47\text{dmfen})_2(2\text{-desoxiadenosin-5-monofosfato})_2(\text{H}_2\text{O})] 3\text{H}_2\text{O}$  son similares a las distancias de los compuestos mononucleares

de cobre. La distorsión angular ( $\eta$ ) en este compuesto también es similar con valores de 0.126 y 0.05 para Cu1 y Cu2 respectivamente.

### 5.8 Interacción de Casiopeínas con ADN de timo de bovino

Una vez identificada la preferencia de coordinación con adenina, adenosina y 2-desoxidenosin-5-monofosfato, se realizó un estudio espectrofotométrico para determinar las constantes de asociación de 12 Casiopeínas (**bpygly**, **bpyacac**, **44dmbpygly**, **44dmbpyacac**, **fengly**, **fenacac**, **47dmfengly**, **47dmfenacac**, **56dmfengly**, **56dmfenacac**, **3478tmfengly**, **3478tmfenacac**) con ADN de timo de bovino (ADN-TB). La determinación de la interacción de Casiopeínas con ADN empleando fluorescencia es realizada por otros integrantes del grupo de investigación.

Para preparar las disoluciones se empleó agua bidestilada. La disolución inicial de ADN-TB fue preparada a una concentración 5mM empleando Tris-HCl 50mM/NaCl 100mM como amortiguador (pH= 7.2). Para la disolución preparada la relación de absorbancias a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) fue de 1.84, lo que indica que el ADN está lo suficientemente libre de proteína para poder realizar los estudios de interacción con las Casiopeínas.<sup>206</sup> La concentración de ADN en cada experimento fue determinada empleando la absorbancia a 260 nm con un coeficiente de absortividad molar  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .<sup>207</sup>

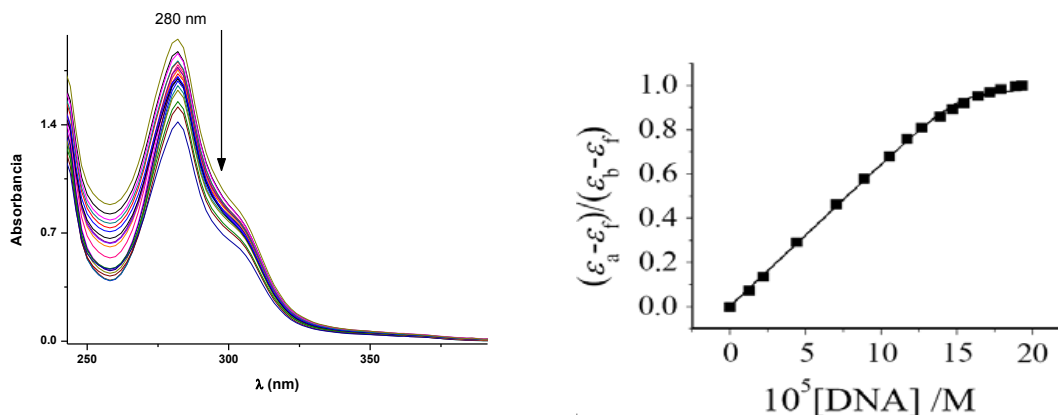
La titulación espectrofotométrica es uno de los métodos más utilizados para estudiar la interacción de diferentes compuestos de coordinación con el ADN.<sup>208, 209</sup> Si la interacción involucra intercalación, los orbitales  $\pi^*$  del ligante intercalado puede interactuar con los orbitales p de las bases del ADN produciendo una disminución en la energía de transición  $\pi-\pi^*$  que resulta en un efecto batocrómico (corrimiento hacia mayores longitudes de onda)

e hipocrómico.<sup>210-211</sup> En general el efecto hipocrómico registrado durante la interacción de compuestos de coordinación con el ADN se asocia a un proceso de intercalación del compuesto en el ADN, el cual tiene un efecto de estabilización cuando se presenta con la doble hélice de ADN,<sup>212</sup> como en el caso del compuesto  $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^{2+}$  el cual se une al ADN a través de un proceso de intercalación en el surco menor del ADN.<sup>213</sup>

El espectro de absorción del compuesto **47dmfengly** en la región de 250 a 400 nm con diferentes concentraciones de ADN-TB se presenta en la figura 67. En el espectro es posible observar un importante efecto hipocrómico conforme se incrementa la concentración agregada de ADN-TB. La disminución de la absorbancia es pequeña con respecto a la adición de las diferentes alícuotas de ADN-TB. Tal comportamiento también fue observado en el estudio de las interacciones de ADN-TB con porfirinas en donde se describe que los cambios de absorbancia más pequeños en el espectro UV-Vis se registran cuando la porfirina interactúa con zonas ricas en A-T y que la interacción se da por intercalación de los anillos heteroaromáticos de la porfirina.<sup>214</sup> Todos los compuestos estudiados en esta parte del trabajo presentan el mismo comportamiento general que el antes descrito, por lo que se propone que la interacción con el ADN se presente preferentemente en regiones del ADN ricas en A-T.

Para determinar la fuerza de interacción entre los compuestos de Cu(II) con el ADN-TB se determinó la constante de asociación entre los compuestos de coordinación y el ADN-TB empleando la ecuación<sup>215</sup>:

$$\frac{[\text{ADN}]}{(\varepsilon_a - \varepsilon_f)} = \frac{[\text{ADN}]}{(\varepsilon_b - \varepsilon_f)} + \frac{1}{K_b(\varepsilon_b - \varepsilon_f)}$$



**Figura 67.** Interacción de Casiopeínas con ADN-TB. Derecha. Espectro electrónico de **47dmfengly** en presencia de diferentes concentraciones de ADN-TB donde es posible apreciar el efecto hipocrómico. Izquierda. Gráfica del cambio de la relación  $(\epsilon_a - \epsilon_f)/(\epsilon_b - \epsilon_f)$  como función del cambio en la concentración de ADN de donde se obtiene la constante de asociación.

Donde  $[\text{ADN}]$  es la concentración de ADN expresada en pares de bases, el coeficiente de extinción aparente  $(\epsilon_a)$  se calcula mediante  $A_{\text{obs}}/[\text{Cu}]$  y los términos  $\epsilon_f$  y  $\epsilon_b$  corresponden a los coeficientes de extinción molar de los compuestos de Cu(II) en su forma libre y totalmente unido, respectivamente. Una gráfica de  $[\text{ADN}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  con respecto a la concentración de  $[\text{ADN}]$  proporciona un valor de pendiente igual a  $1/(\epsilon_b - \epsilon_f)$  y una ordenada al origen igual a  $1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f)$ . Para calcular  $K_b$  se necesita dividir la pendiente entre el intercepto. El valor de  $K_b$  para el compuesto **47dmfengly** es de  $7.5 \times 10^5$  que son valores muy similares a los reportados para otros compuestos de Cu(II) con una unidad de fenantrolina o bipyridina en su esfera de coordinación y que son mostrados en la tabla 10.

De la tabla podemos observar que entre mayor es el sistema aromático, mayor es la constante de asociación registrada como en el caso de  $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{gly})]\text{ClO}_4$  con una  $K_b = 2.10 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , sin embargo, aun cuando exista el sistema aromático grande si el segundo o tercer ligante en la esfera de coordinación presenta grupos alifáticos o aromáticos voluminosos la constante de asociación disminuye como en el caso de

$[\text{Cu}(\text{L}^*)(\text{dppz})](\text{ClO}_4)$  en donde  $\text{L}^* = 2\text{-}[1\text{-}(2\text{-dimetilamino-etilimino})\text{-metil}]\text{-fenol}$  en donde  $K_b = 1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , ya que el ligante  $\text{L}^*$  a pesar de poder formar puentes de hidrógeno con el nitrógeno de la amina terciaria e incluso con el grupo azometino, presenta un efecto de repulsión por el largo de la cadena. Conforme se incrementa el tamaño de los ligantes presentes en la esfera de coordinación del  $\text{Cu}(\text{II})$  se tiene un efecto negativo en la asociación de estos compuestos con el ADN, esto se observa en los valores de  $K_b$  de los compuestos que involucran dipéptidos que se encuentran entre  $1$  y  $10 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ . Así mismo, si se disminuye el tamaño del sistema aromático involucrado se observa una disminución en los valores de la constante de asociación, pasando de  $2.10 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  en  $[\text{Cu}(\text{dppz})(\text{gly})]$  a  $7.04 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  en el compuesto  $[\text{Cu}(\text{fen})(\text{gly})]^+$  y  $3.23 \times 10^5$  para el compuesto  $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{gly})]^+$ .

Por otro lado, los sustituyentes que existen sobre las diiminas aromáticas también presentan un efecto sobre la constante de asociación observada, Chikira<sup>216, 217</sup> ya había mostrado que la sustitución en las posiciones 4 y 7 de la fenantrolina disminuían la asociación entre los compuestos de  $\text{Cu}(\text{II})$  y el ADN, mientras que la sustitución en las posiciones 5 y 6 ayudaban a estabilizar la interacción. Esto se observa en los valores de constante obtenidos para **47dmfengly** y **56dmfengly** donde la  $K_b$  para el primero es de  $7.15 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , mientras que en el segundo el valor de la  $K_b$  es ligeramente mayor  $7.89 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . La sustitución de las posiciones 3 y 8 de la fenantrolina hace que el valor de  $K_b$  disminuya aún más ( $6.87 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ). La disminución de la  $K_b$  para el compuesto tetrametilado puede deberse a la disminución de la capacidad de la fenantrolina para participar en procesos de retrodonación cuando están ocupadas las posiciones 3 y 8 de la diimina aromática haciendo que existan una menor cantidad de movilidad en la densidad electrónica de estos sistemas haciendo menos favorable la formación del par aceptor-donador que provocan las interacciones  $\pi\text{-}\pi$

entre los sistemas aromáticos, el mismo efecto que se encontró como factor modulador para describir las propiedades redox y el ambiente magnético de estos compuestos en los estudios de electroquímica y RPE además de los efectos estéricos que puedan presentar los grupos metilos en estas posiciones.

El mismo comportamiento general se observa cuando se comparan los valores de los compuestos que tienen la misma fenantrolina pero ahora con acac como segundo ligante, observándose ligeros incrementos en los valores de  $K_b$  en cada caso, lo cual debe ser producto de la naturaleza pseudo-aromática que presenta el acac cuando se coordina al centro metálico y que ayuda en las interacciones de apilamiento, tal como se observa en el aducto formado entre **44dmbpyacac** y adeninas descrito en secciones anteriores.

**Tabla 10.** Constantes de asociación de compuestos de coordinación de Cu(II) con ADN.

Compuesto	$K_b$ ( $M^{-1}$ )	Referencia
[Cu(bpy)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>bpygly</b> )	3.23x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(bpy)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>bpyacac</b> )	3.45x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(dmbpy)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>44dmbpygly</b> )	3.11x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(dmbpy)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>44dmbpyacac</b> )	3.31x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(fen)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>fengly</b> )	7.15x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(fen)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>fenacac</b> )	7.60x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(47dmfen)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>47dmfengly</b> )	7.05x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(47dmfen)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>47dmfenacac</b> )	7.90x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(56dmfen)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>56dmfengly</b> )	7.89x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(56dmfen)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>56dmfenacac</b> )	7.21x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(3478tmfen)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>3478tmfengly</b> )	6.87x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(3478tmfen)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>3478dmfenacac</b> )	7.10x 10 <sup>5</sup>	Este trabajo
[Cu(dppz)(gly)]ClO <sub>4</sub>	2.10x 10 <sup>6</sup>	218
[Cu(II)(boc(tos)-his-trp-ome)(phen)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3.33 x10 <sup>4</sup>	219
[Cu(II)(boc(tos)-his-tyr-ome)(phen)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	2.82x10 <sup>4</sup>	219
[Cu(tptz) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	1.5x10 <sup>4</sup>	219
[Cu(SMe-L-cys)(dpq)(H <sub>2</sub> O)]	1.3x10 <sup>4</sup>	220
[Cu(SMe-L-cys)(dppz)(H <sub>2</sub> O)]	2.15x10 <sup>4</sup>	221
[Cu(L*)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.3x10 <sup>2</sup>	222
[Cu(L*)(bpy)](ClO <sub>4</sub> )	3.6x10 <sup>3</sup>	222
[Cu(L*)(phen)](ClO <sub>4</sub> )	1.02x10 <sup>4</sup>	222



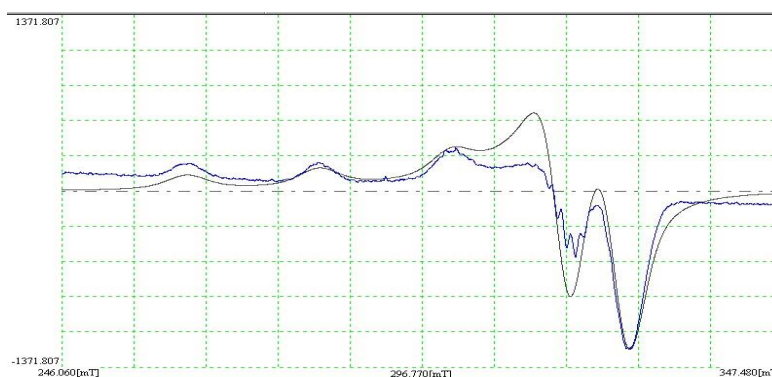
[Cu(L*)(dpq)](ClO <sub>4</sub> )	2.14x10 <sup>4</sup>	222
[Cu(L*)(dppz)](ClO <sub>4</sub> )	1.02x10 <sup>5</sup>	222
[Cu(L*)(dmdppz)](ClO <sub>4</sub> )	7.43x10 <sup>3</sup>	222
[Cu <sub>2</sub> (glygly)(ppz)(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ]2H <sub>2</sub> O	2.14x 10 <sup>5</sup>	223
[Cu(HisLeu)(fen)]Cl	4.2 x 10 <sup>3</sup>	224
[Cu(HisSer)(fen)]Cl	4.2 x 10 <sup>3</sup>	224
[Cu(Gly-L-Val)(fen)]nH <sub>2</sub> O	2.82 x 10 <sup>3</sup>	225
[Cu(Gly-L-Val)(TATP)]nH <sub>2</sub> O	5.2 x 10 <sup>3</sup>	225
[Cu(Gly-L-Val)(dppz)]nH <sub>2</sub> O	8.44 x 10 <sup>3</sup>	225
[Cu(tdp)(bpy)]ClO <sub>4</sub>	7.1x10 <sup>3</sup>	226
[Cu(tdp)(fen)]ClO <sub>4</sub>	9.0x10 <sup>4</sup>	226
[Cu(tdp)(3478tmfen)]ClO <sub>4</sub>	7.0x10 <sup>5</sup>	226
[Cu(tdp)(dpq)]ClO <sub>4</sub>	9.0x10 <sup>5</sup>	226
[Cu(L <sup>a</sup> )Cl](ClO <sub>4</sub> )CH <sub>3</sub> OH	5.47x10 <sup>4</sup>	227
[Cu(L <sup>b</sup> )](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.33x10 <sup>4</sup>	227
[Cu(Lc)(bpy)]	2.97x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Ld)(bpy)]	3.05 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Le)(bpy)]	3.07 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Lf)(bpy)]	2.63 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Lc)(phen)]	2.07 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Ld)(phen)]	2.81 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Le)(phen)]	2.85 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(Lf)(phen)]	2.92 x10 <sup>4</sup>	228
[Cu(fen)(L-Thr)(BPEI)]ClO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.48 x10 <sup>5</sup>	229
[Cu(glygly)(HPB)Cl]2H <sub>2</sub> O	7.28 x 10 <sup>5</sup>	230
[Cu(47dmfen) <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> ] <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>	1.77x10 <sup>5</sup>	231
[Cu(47dmfen)(tyr)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> O	1.56x10 <sup>5</sup>	231
[Cu <sub>2</sub> (fen) <sub>2</sub> Cl <sub>4</sub> ]	4.75 x10 <sup>4</sup>	232
[Cu(fen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]	2.70 x10 <sup>3</sup>	233
[Cu(fen)(L-Thr)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub>	6.35 x10 <sup>3</sup>	234
(Cu(sal-tau)(fen)]1.5H <sub>2</sub> O	1.66x10 <sup>4</sup>	235
[Cu(sal-L-val)(fen)]	6.48x10 <sup>3</sup>	236
[Cu(naph-L-val)(fen)]	4.87x10 <sup>3</sup>	237
[Cu <sub>2</sub> (fen) <sub>2</sub> (L-PDIAIa)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 2.5H <sub>2</sub> O	0.89x10 <sup>5</sup>	238
[Cu <sub>4</sub> (fen) <sub>6</sub> (D,L-PDIAIa)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> 3H <sub>2</sub> O	1.14x10 <sup>5</sup>	238
[Cu <sub>2</sub> (fen) <sub>2</sub> (D,L-PDIAIa)(H <sub>2</sub> O)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> 0.5H <sub>2</sub> O	1.72x10 <sup>5</sup>	238
[(fen)Cu(bipp)Cu(fen)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>	1.6x10 <sup>4</sup>	239
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	2.55x10 <sup>3</sup>	240
[Cu(fen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3.25x10 <sup>3</sup>	240
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen) (Tyr)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.05x10 <sup>3</sup>	240
[Cu(fen)(Tyr)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> 2H <sub>2</sub> O	1.89x10 <sup>3</sup>	240
[Cu(fen) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ] <sub>6</sub> H <sub>2</sub> O	1.89x10 <sup>4</sup>	241
[Cu(fen)(Tyr)(H <sub>2</sub> O)]	3.75x10 <sup>3</sup>	242
[Cu(fen)(Tyr)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub>	4.0x10 <sup>3</sup>	243
[Cu(fen)(tyr)(H <sub>2</sub> O)]ClO <sub>4</sub>	2.44x10 <sup>4</sup>	244
[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen)(DMF) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1.47x10 <sup>5</sup>	245

[Cu(5-NO <sub>2</sub> -fen)(sparfloxacino)Cl]5H <sub>2</sub> O	5.19x10 <sup>4</sup>	246
[Cu(fen)(fenilalanina)(BPEI)]ClO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	6.72x10 <sup>5</sup>	247
[Cu(Gly-Val)(fen)]	4.3x10 <sup>3</sup>	248
[Cu(Ala-Gly)(fen)]	2.0x10 <sup>4</sup>	248
[Cu(Ala-Phe)(fen)]	2.25x10 <sup>4</sup>	248
[Cu(Phe-Ala)(fen)]	7.4x10 <sup>3</sup>	248
[Cu(Phe-Val)(fen)]	4.6x10 <sup>3</sup>	248
[Cu(Phe-Phe)(fen)]	1.31x10 <sup>4</sup>	248
[Cu(L1)(fen)]	1.27x10 <sup>4</sup>	249
[Cu(L2)(fen)]	1.20x10 <sup>4</sup>	249
[Cu(L3)(fen)]	0.85x10 <sup>4</sup>	249
[Cu(L4)(fen)]	1.30x10 <sup>4</sup>	249
[Cu(L5)(fen)]	1.43x10 <sup>4</sup>	249
[Cu(L6)(fen)]	1.88x10 <sup>4</sup>	249
[Cu(dipica)(phen)](ClO <sub>4</sub> )	2.0 × 10 <sup>4</sup>	250
[Cu(imda)(phen)(H <sub>2</sub> O)]	6.0 × 10 <sup>2</sup>	251
[Cu(L-tyr)(phen)](ClO <sub>4</sub> )	4.0 × 10 <sup>3</sup>	252
[Cu(pmdt)(phen)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	3.0 × 10 <sup>3</sup>	253

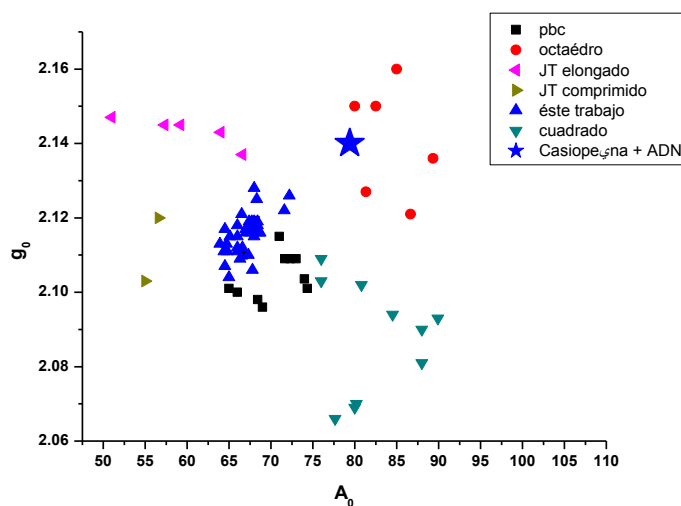
HPB= 2-(2α-piridil)benzimidazol; tatp=1,4,8,9-tetranitrogeno; dppz =dipirido [3,2-a; 2,3-c]fenazina; ppz: 2-(pirido(1,2-e)purin-4-il)amino-etanol; BPEI = polietilenimina ramificada; H<sub>2</sub>PDIAla = ácido N,N'-(p-xililene)di-alanina ; bipp=2,9-bis(2-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina)-1,10-fenantrolina; L1= 2-(2-(1H-benzimidazol-2-il)etiliminometil) fenol; L2= 2-(2-(1H-benzimidazol-2-il)etil-imino)metil)-4-metilfenol; L3= (2-piridin-2-iletíl)piridin-2-ilmetileneamina; L4= 2-(1H-benzimidazol-2-il)etil)-piridin-2-il-metileneamina; L5= 2-(1H-benzimidazol-2-il)etil)(1H-imidazol-2-ilmetilen)-amina; L6= 2-(1H-benzimidazol-2-il)etil)(4,4a-dihidroquinolin-2-ilmetilen)amina; tptz= 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina; dpq= dipiridoquinoxalina; L\*= 2-[(2-dimetilaminoetilimino)metil]fenol; tdp= 2-[(2-(2-hidroxietilamino)-etilimino)metil]fenol; dpq= dipirido-[3,2-d:2',3'-f]-quinoxalina; La= N,N'-bis((piridin-2-il)pheniliden)-1,3-diaminopropan-2-ol; Lb= N-(1-piridin-2-ilpheniliden)-N'-[2-((1-piridin-2-ilfeniliden)amino)etil]amino)etil]etan-1,2diamina; Lc= 2-((2-(piperazin-1-il)etilimino)metil) fenol; Ld= 2-((2-(piperazin-1-il)etilimino)metil)-4-metil fenol; Le= 2-((2-(piperazin-1-il)etilimino)metil)-4-Cloro fenol; Lf= 2-((2-(piperazin-1-il)etilimino)metil)-4-Bromo fenol; imida= ácido iminodiacético

Continuando con la caracterización de la interacción de las Casiopeínas con ADN-TB en disolución se obtuvieron los espectros RPE de la Casiopeína [Cu(bpy)(acac)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> en ausencia y presencia de ADN y con los valores obtenidos se empleó la gráfica g<sub>0</sub> vs. A<sub>0</sub> con la finalidad de conocer la geometría alrededor del ion metálico una vez que se forma el aducto con ADN-TB. La figura 68 muestra los espectros experimental (línea azul) y simulado (línea negra) de la mezcla de reacción. Para obtener los espectros de EPR se

emplearon disoluciones acuosas en las que se amortiguaron a un valor de pH=7.2 empleando Tris-HCl 50mM/NaCl 100mM, para poder obtener un buen vidrio y coleccionar el espectro a 77 K se le agregó un poco de etilenglicol a la mezcla de reacción. La mezcla de reacción con el ADN-TB y la Casiopeína (ADN-TB: Casiopeína; 0.001mM: 1 mM) en el tubo de cuarzo se deja incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente y después de transcurrido ese tiempo se le agrega el etilenglicol y se congela con nitrógeno líquido (77K). Los parámetros obtenidos de la simulación del espectro experimental arrojan los valores  $g_{||} = 2.271$ ,  $g_{\perp} = 2.074$ ,  $A_{||} = 215 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ ,  $A_{\perp} = 11.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ , lo que genera valores de  $g_0 = 2.14$  y  $A_0 = 79.4 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ . En la gráfica de la figura 69 podemos observar que esos valores corresponden para una geometría octaédrica adoptada por el ion metálico y dadas las preferencias de coordinación que se plantearon en el estudio con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato, se propone que la sexta posición de coordinación del Cu(II) sea ocupada muy probablemente por un oxígeno de una unidad fosfato del ADN.



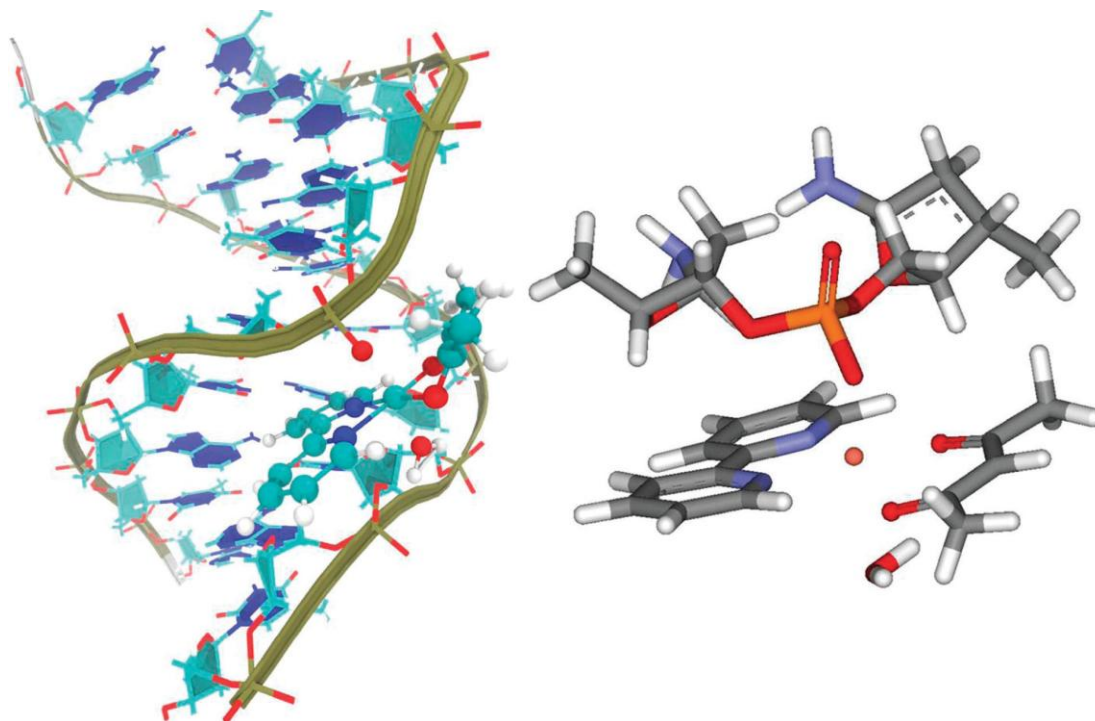
**Figura 68.** Espectro RPE experimental (azul) y simulado (negro) de una disolución que contiene 1mM de **bpzacac** con 0.001 mM de ADN-TB en una disolución amortiguada a pH= 7.2. Para congelar a 77K se agregó un poco de etilenglicol.



**Figura 69.** Gráfico donde se presentan los grupos de compuestos de Cu(II) con diferentes geometrías y el resultado de la interacción entre **bpyacac** y ADN-TB.

Estos resultados concuerdan completamente con el estudio realizado por Galindo-Murillo y colaboradores<sup>98</sup> en donde se realiza una dinámica molecular para conocer cuál es el primer sitio de reconocimiento en la interacción Casiopeína-ADN. Para la dinámica se emplearon cuatro cadenas de ADN-B con las secuencias poli-d(AAAAAAAAAA)<sub>2</sub>, poli-d(ATATATATAT)<sub>2</sub>, poli-d(GGGGGGGGGG)<sub>2</sub> y poli-d(GCGCGCGCGC)<sub>2</sub> y la Casiopeína [Cu(bpy)(acac)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> (**bpyacac**). Para todas las simulaciones realizadas, se encontró que la Casiopeína se estabilizaba en el surco menor del ADN y no se observaba intercalación alguna. Una vez identificado el sitio de interacción, se seleccionó la zona de la cadena donde estaba presente la Casiopeína y el promedio de esas geometrías fueron empleadas como puntos de partida para una optimización completa con un nivel de teoría M05-2x/6-31G(d,p) (Figura 70). Se obtuvieron las funciones de onda a partir de estos cálculos, las cuales se emplean para calcular las propiedades locales e integradas de la

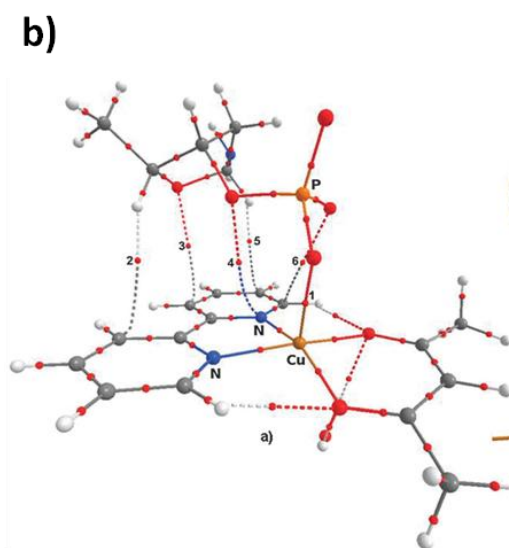
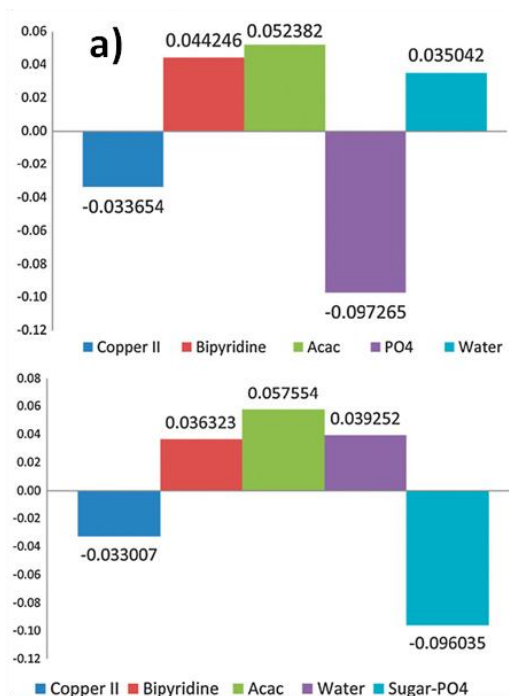
densidad electrónica y su laplaciano en el marco teórico de la teoría cuántica de los átomos en moléculas (QTAIM)<sup>195</sup> utilizando el programa AIMALL.<sup>194</sup>



**Figura 70.** Resultado promedio de la dinámica molecular de la interacción entre bpyacac y AND. La figura de la izquierda es el recorte de la interacción entre Casiopeína y el oxígeno del grupo fosfato del surco menor. Figura tomada de la referencia 98.

Después de la optimización la geometría que se mantiene es la interacción de la Casiopeína con un fosfato del surco menor de la cadena de ADN. Esta interacción es factible dado que como se discutió en la sección de antecedentes, la formación del compuesto de coordinación  $[\text{Cu}(\text{bpy})(\text{acac})(\text{H}_2\text{O})]^+$  genera una disminución de la densidad electrónica del ion metálico así como en la molécula de agua y un incremento de la densidad electrónica en los ligantes bpy y acac. La deficiencia de densidad favorece la coordinación del oxígeno del fosfato en la posición apical disponible del cobre y genera una nueva redistribución de densidad electrónica en donde ahora el cobre sigue estando deficiente de densidad electrónica mientras que bpy, acac y la molécula de agua coordinada presentan un

incremento de densidad electrónica a expensas de la disminución de densidad en la unidad ribosa fosfato (Figura 71a).



**Figura 71.** a) Cambio en la población electrónica de los participantes provenientes de la estructura promedio de las dinámicas moleculares. b) Interacciones débiles presentes en la estructura una vez que se coordina el oxígeno del fosfato que muestran la interacción de los hidrógenos de la ribosa con los anillos aromáticos de la bpy. Adaptado de la referencia 98.

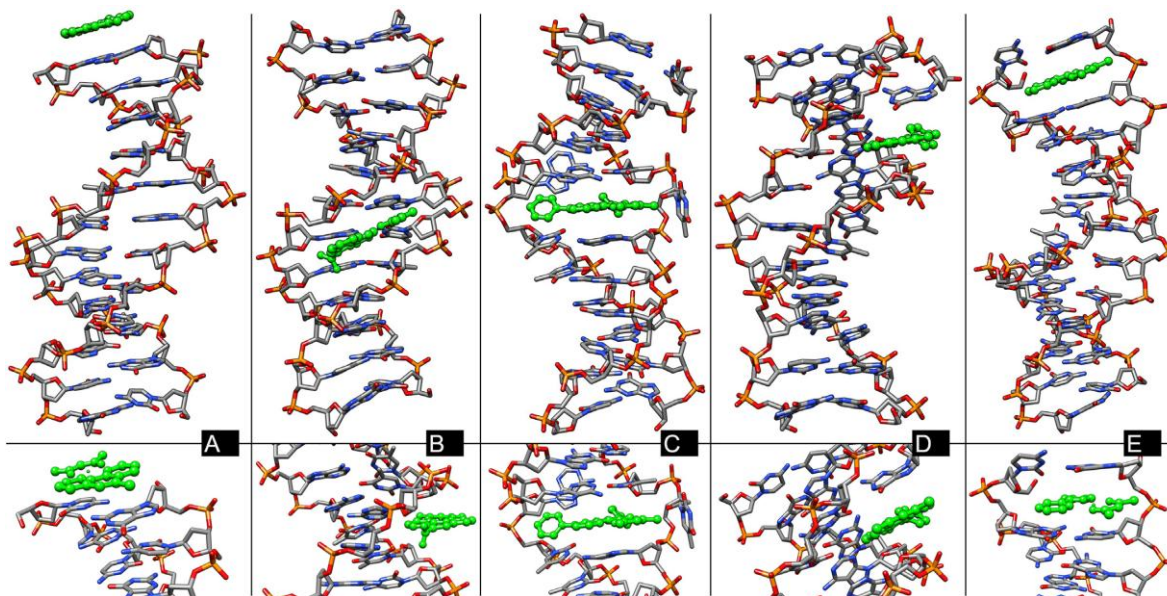
La disminución de densidad electrónica en la ribosa disminuye a su vez la densidad electrónica de los hidrógenos que están presentes en esta unidad, lo que los convierte en excelentes aceptores de la densidad electrónica proveniente de la bipyridina que cuenta con el exceso de densidad proveniente de la redistribución electrónica una vez que se da la coordinación del fosfato (figura 71b). Además como se discutirá más adelante en la sección de actividad nucleasa, justamente los hidrógenos de la unidad ribosa son los más

susceptibles a ser retirados para formar en ese punto un radical libre que promueva la ruptura de la cadena de ADN.

Con el oxígeno del fosfato del surco menor de la cadena de ADN como sitio inicial de reconocimiento entre las Casiopeínas y el ADN, Galindo-Murillo realizó estudios de dinámica molecular de 10  $\mu$ s de duración en donde se emplea como sistema modelo una secuencia más común de encontrarse en el ADN, el dodecámero de Dickerson-Drew ( $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$ ) (PDB = 1BNA) tomando como posición inicial para el estudio la interacción identificada anteriormente. Los resultados de las dinámicas moleculares muestran tres tipos de interacción con el ADN: i) unión con el final de la cadena, ii) enlace con el surco menor y iii) intercalación. Éstas ejemplifican las diferencias en la interacción producto del ligante secundario. Las diferentes formas de interacción encontradas se presentan en la figura 72.

En general, a partir de las 35 simulaciones realizadas se encuentra que la mayoría de las interacciones son del tipo A (~66%) mientras que el resto de las interacciones presentadas en la figura J presentan una frecuencia similar en las veces que ocurren entre ellas, tipo B (~ 9%), tipo C (~ 11%), tipo D (~ 6%) y tipo E (~ 9%). En las interacciones tipo A los compuestos de Cu(II) se acomodan en uno de los extremos de la cadena de ADN, siendo ésta la más débil de todas las interacciones que se presentan. Las interacciones de tipo B se caracterizan por las interacciones de los ligantes dentro del surco menor del ADN. En las interacciones tipo C se presenta la ruptura de los puentes de hidrógeno de las bases, las cuales giran hacia el exterior de la cadena generando un hueco hacia el surco mayor en donde el compuesto de coordinación se acomoda y se estabiliza por interacciones de intercalación, este tipo de interacción es la que presenta la mayor energía de estabilización. Las interacciones tipo D son aquellas en donde el compuesto se mantiene en el surco menor

pero presenta interacciones de apilamiento con bases que han dejado de participar en los puentes de hidrógeno cercanos al final de la estructura. Finalmente la interacción tipo E es donde el compuesto de coordinación se intercala entre el par de bases que se encuentra en uno de los extremos de la cadena.



**Figura 72.** Representaciones del resultado de las interacciones encontradas en las simulaciones. El panel inferior es un acercamiento a la zona donde se encuentra la interacción entre las Casiopeínas y el ADN mostrada en el panel superior. Cada letra representa una de las configuraciones predominantes en la interacción. A: apilamiento en el par de bases terminal del ADN, B: interacción con el surco menor, C: intercalación con apertura/desplazamiento de bases, D: apilamiento en el surco menor con una de las bases terminales giradas al exterior de la estructura del ADN, E: intercalación cerca del final de la cadena de ADN. El compuesto de cobre se presenta en verde. Las moléculas de agua, los contraiones y los átomos de hidrógeno no se muestran para facilitar la visualización. Las figuras corresponden a los compuestos **5mfenacac**, **5NO2fenacac**, **47dffenacac**, **5ffenacac** y **bpyacac**.

La interacción tipo A puede explicarse con base en tres observaciones: i) que no existe una interacción lo suficientemente fuerte entre el compuesto y el surco menor lo que provoque que el compuesto se desplace a través de la cavidad hasta que ya no exista ADN; ii) la completa disociación del compuesto del surco menor hacia el disolvente; iii) impedimento



estérico causado por los sustituyentes de la diimina aromática que provoca que las interacciones del compuesto de coordinación con el surco menor se estabilicen o se pierda completamente la interacción con el ADN. Prácticamente todos los compuestos que presentan sustitución en las posiciones 4 y 7 de la fenantrolina o 4 y 4' de la bipyridina, ya sean mono-, di- o tetra-sustituidos presentan una interacción tipo A a excepción de los compuestos **44dmbpyacac**, **47døfenacac** y **47døfengly**. En general los compuestos con glicinato favorecen menos el proceso de estabilización, sobre todo cuando el carboxilato se encuentra orientado hacia dentro del surco menor, como en el caso de **47døfengly**, en donde los anillos aromáticos estabilizan las interacciones con el surco menor a través de puentes de hidrógeno formados con el esqueleto de la cadena y con los nitrógenos de la adenina.

Para los compuestos **44dmbpyacac** y **47døfenacac** así como para los compuestos **fenacac** y **5Mefenacac** el proceso de intercalación sigue la siguiente secuencia general: 1) el compuesto se une al surco menor; 2) los ligantes se reacomodan; 3) apertura parcial de los pares de bases e inserción parcial de los ligantes del compuesto de coordinación; 4) desacoplamiento total de las bases haciéndolas girar hacia afuera generando un surco en la cadena permitiendo la inserción total del compuesto de coordinación y 5) reacomodo de los ligantes del compuesto de coordinación dentro del hueco formado. Para todos estos compuestos la diferencia se presenta en el tiempo que ocupan para cada uno de los pasos descritos. La mayor diferencia se presenta en el paso 3 en el que el compuesto de Cu(II) empuja las bases hasta romper los puentes de hidrógeno haciendo que se desplacen hacia el surco mayor. La ruptura de los puentes de hidrógeno se da en las bases AT.

Por otro lado, las sustituciones en la posición 5 y 6 de la fenantrolina proporcionan estabilidad adicional en las interacciones con el surco menor o en las intercalaciones

siempre que los sustituyentes metilo o fenilo se encuentre orientados en el surco menor y los sustituyentes cloro y los grupos carboxilato para los compuestos con glicina se encuentren orientados hacia fuera del surco como en los compuestos **5mfenacac** (interacción tipo C), **56dmfenacac** (interacción tipo E), **5føfenacac** (interacción tipo D), **5Clfenacac**(interacción tipo E), **56dmfengly** (interacción tipo B) y **5Clfengly** (interacción tipo D). En todos los casos el grupo nitro como sustituyente en la fenantrolina no favorece las interacciones con el surco menor o de apilamiento.

En resumen, ninguno de los compuestos con acac se encontró interactuando con el surco menor y ninguno de los compuestos con glicina provocó la ruptura de los puentes de hidrógeno en los pares de bases. Lo anterior sugiere que la glicina favorece la interacción con el surco menor mientras que el acac favorece la intercalación siendo ambos derivados ayudados fuertemente por el sistema aromático que interviene en la estabilización de cada uno de los pasos a través de interacciones de apilamiento con los pares de bases del ADN. Finalmente, sustituciones en las posiciones 4 y 7 de la fenantrolina desfavorecen las interacciones de apilamiento con el ADN, mientras que las sustituciones en las posiciones 5 y 6 de la diimina aromática tienen el efecto contrario, todo esto acorde al impedimento estérico generado cuando ambos sistemas están interactuando como lo sugiere Chikira.<sup>216-</sup>

217

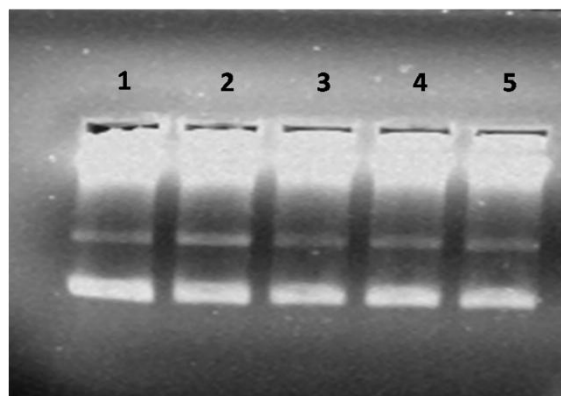
Los resultados encontrados con la dinámica molecular sostienen la diferencia de reactividad sugerida con los resultados de espectroscopia electrónica para los compuestos con acac respecto a los compuestos con glicina, además motiva a realizar estudios de interacción entre ADN y los compuestos de coordinación empleando otras técnicas como el dicroísmo circular, dicroísmo circular magnético, fluorescencia, microscopia de fuerza atómica y micro calorimetría enfocadas a hacer más evidentes las diferencias de reactividad sugeridas

por las dinámicas moleculares y que la espectroscopia electrónica no fue capaz de diferenciar tan evidentemente. Los resultados de las dinámicas moleculares fueron publicados en la revista *Nucleic Acids Research*.<sup>254</sup>

## 5.9 Actividad nucleasa

Una vez establecido que las Casiopeínas son capaces de generar especies reactivas de oxígeno en presencia de oxígeno molecular y un agente reductor así como que existe la interacción entre las Casiopeínas con el ADN, se realizaron ensayos para determinar que tan eficaces son estos compuestos para generar la ruptura de la cadena. Las Casiopeínas empleadas en esta parte del trabajo son las siguientes: **bpygly**, **bpyacac**, **44dmbpygly**, **44dmbpyacac**, **fengly**, **fenacac**, **47dmfengly**, **47dmfenacac**, **56dmfengly**, **56dmfenacac**, **3478tmgly** y **3478tmacac**.

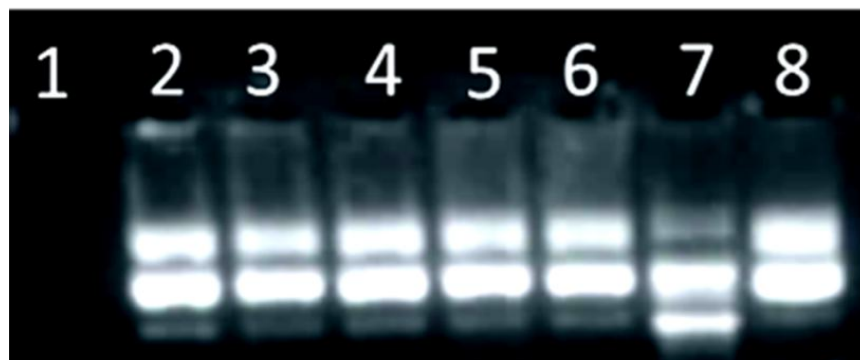
Para tales ensayos se empleó el plásmido pRSET-B que tiene 2800 pares de bases cuya secuencia y forma de obtención se presenta en la parte experimental. Uno de los primeros estudios que se realizan es para escoger el amortiguador, pues éste puede producir daños en el ADN que pueden ser interpretados de manera errónea como resultado de la interacción del compuesto con supuesta actividad nucleasa, para comprobar que el medio no será un factor adicional de corte sobre el ácido nucleico se probaron diferentes amortiguadores (figura 73). Ninguno de los medios mostraron daño al ADN plasmídico pRSET-B. En todos los casos se presentan las tres isoformas del plásmido: superenrollado, circular y lineal después de 30 minutos de incubación.



**Figura 73.** pRSET en presencia de diferentes amortiguadores. Línea 1) ADN + HEPES 0.1M; línea 2) ADN + MOPS 0.1 M; línea 3) ADN + Tris-HCl 0.1 M; línea 4) ADN + amortiguador de fosfatos 0.1 M; línea 5) ADN + MES 0.1M.

Todos los amortiguadores presentaron las tres bandas correspondientes a las isoformas características del ADN plasmídico, sin embargo, los amortiguadores Tris-HCl y el amortiguador de fosfatos fueron descartados pues algunos de los compuestos estudiados precipitaban durante los tiempos de incubación empleados.

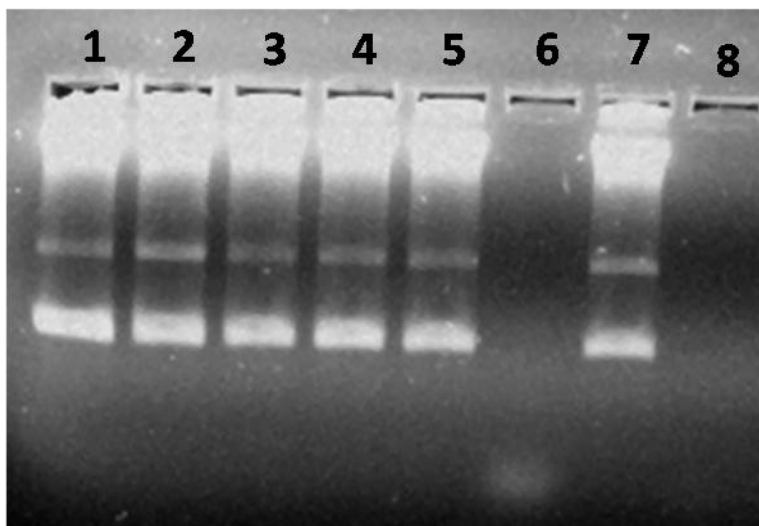
El amortiguador elegido después de comparar la resolución de los geles de agarosa fue HEPES. Como se aprecia en la figura 74 las bandas correspondientes a las isoformas superenrollada y circular del ADN cuando se encuentran presentes el compuesto de coordinación y el agente reductor se definen mucho mejor cuando se emplea  $\beta$ -mercaptoetanol (BME) como agente reductor y dado que presenta el mismo potencial redox que el GSH se empleará como agente reductor de aquí en adelante. El tiempo de incubación para estos experimentos fue de 30 minutos.



**Figura 74.** Estudio de electroforesis con MOPS y HEPES en presencia y ausencia de Casiopeína **47dmfengly**. Línea 1) vacío; línea 2) ADN + HEPES; línea 3) ADN + 47dmfengly 1  $\mu\text{M}$ ; línea 4) ADN + 47dmfengly 10  $\mu\text{M}$ ; línea 5) ADN +BME 100  $\mu\text{M}$ ; línea 6) ADN + GSH 100  $\mu\text{M}$ ; línea 7) ADN + 47dmfengly 10  $\mu\text{M}$  + BME 100  $\mu\text{M}$  ; línea 8) ADN + 47dmfengly 10  $\mu\text{M}$  + GSH 100  $\mu\text{M}$ .

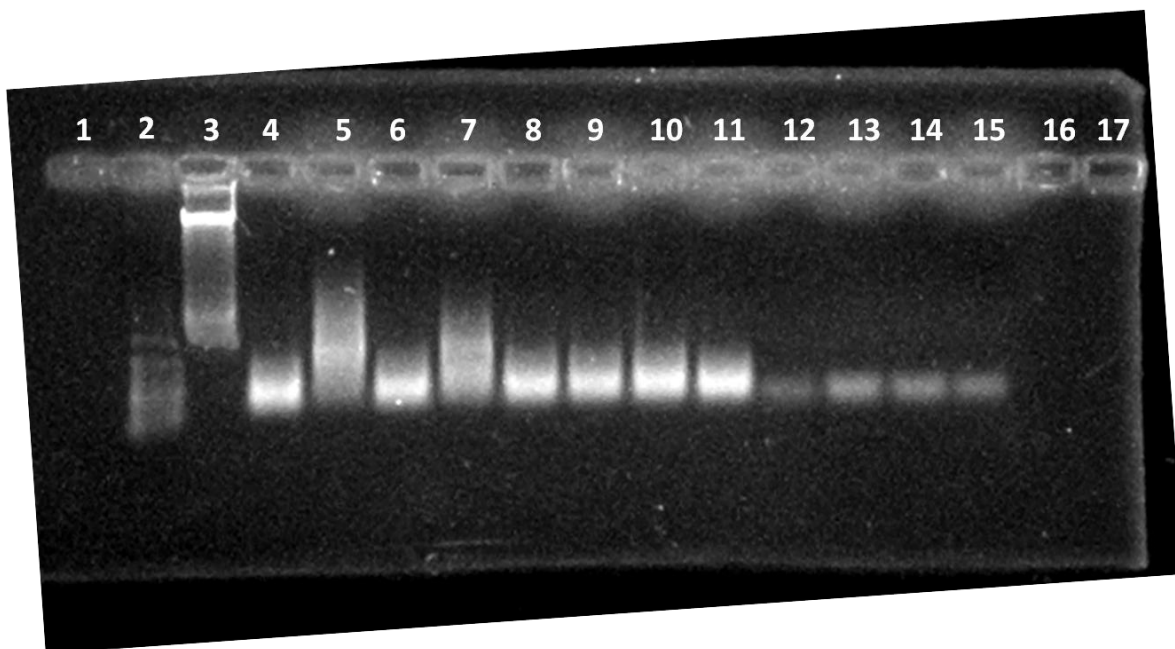
Puesto que los compuestos **44dmbpyacac (CasIIIa)** y **47dmfengly (CasIIgly)** son dos de los compuestos más estudiados por el grupo de trabajo se presentaran los resultados de éstos de forma más detallada y el resultado de los demás se presentará más adelante en el texto. La figura 75 muestra la capacidad de producir cortes en el ADN de ambos compuestos de coordinación, en ambos ensayos se empleó un tiempo de incubación de 15 minutos a 37 °C y BME 100 $\mu\text{M}$  como agente reductor. En el gel sin reductor no se aprecian cambios significativos en ninguna de las líneas (líneas 3 y 4). Sin embargo, cuando el reductor está presente es posible distinguir una diferencia en el comportamiento entre las dos Casiopeínas respecto a su capacidad para romper el ADN. Mientras que **47dmfengly** mostró un daño muy importante a los 10 minutos como se aprecia en la línea 6 y una degradación total a los 15 minutos de incubación (línea 8), el compuesto **44dmbpyacac** no genera daño en ninguno de los dos tiempos de incubación y son necesarios 30 minutos de incubación con las mismas concentraciones empleadas para que se observe daño en el ADN

y 60 minutos de incubación para que se presente una degradación igual a la mostrada por **47dmfengly** en la línea 8.



**Figura 75.** Interacción entre ADN y las Casiopeínas **44dmbpyacac** y **47dmfengly**. Línea 1) ADN; línea 2) ADN+ BME 100  $\mu\text{M}$ ; línea 3) ADN + 44dmbpyacac10  $\mu\text{M}$ ; línea 4) ADN + 47dmfengly10 $\mu\text{M}$ ; línea 5) ADN + 44dmbpyacac 10  $\mu\text{M}$  + BME 100  $\mu\text{M}$  (10 min 37°C); línea 6) ADN + 47dmfengly 10  $\mu\text{M}$  + BME 100  $\mu\text{M}$  (10 min 37°C); línea 7) ADN + 44dmbpyacac 10  $\mu\text{M}$  +BME 100  $\mu\text{M}$  (15 min 37°C); línea 8) ADN + 47dmfengly 10  $\mu\text{M}$  BME 100  $\mu\text{M}$  (15 min 37°C).

A pesar de estas diferencias en los tiempos de incubación, todos los compuestos fueron capaces de generar la ruptura del material genético, esto se puede apreciar en la figura 76, en donde se modificaron las condiciones para que todos los compuestos pudieran presentar un daño importante en el material genético. Para lograr lo anterior se disminuyó la concentración de Casiopeínas hasta 2.5  $\mu\text{M}$  y la concentración de agente reductor a 50  $\mu\text{M}$ . Se siguieron empleando los 50 ng de ADN plasmídico para cada carril, pero ahora el tiempo de incubación se incrementó a 180 minutos a una temperatura de 37°C.



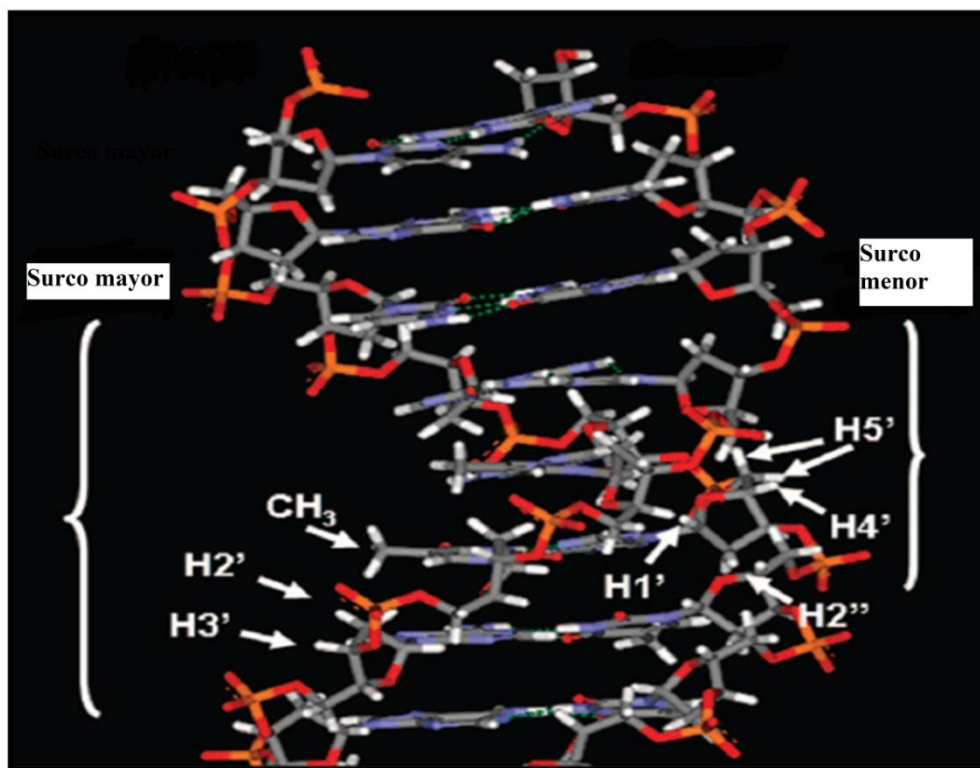
**Figura 76.** Interacción de 500 ng de pRSET-B con las Casiopeínas estudiadas a una concentración 2.5 mM en presencia de BME 50 mM. Línea 1) vacío; línea 2) marcador de peso molecular; línea 3) ADN; línea 4) bpyacac + ADN; línea 5) bpygly +ADN; línea 6) 44dmbpyacac + ADN; línea 7) 44dmbpygly +ADN; línea 8) fenacac + ADN; línea 9) fengly +ADN; línea 10) 56dmfenacac + ADN; línea 11) 56dmfengly +ADN; línea 12) 47dmfenacac + ADN; línea 13) 47dmfengly +ADN; línea 14) 3478tmfenacac + ADN; línea 15) 3478tmfengly +ADN; líneas 16 y 17 vacías. El tiempo de incubación fue de 180 min a 37°C.

De la figura 76 es posible apreciar que en las mismas condiciones de reactividad las Casiopeínas con bipyridina en su esfera de coordinación son menos capaces de generar daño en el material genético con respecto a los compuestos que presentan fenantrolina. Comparando a los compuestos que tienen bipyridina se puede observar que los compuestos con acac como ligante secundario generan un mayor daño que los compuestos con glicina. El mismo comportamiento se presenta para los derivados con fenantrolina, un ejemplo en donde se puede apreciar fácilmente dicho comportamiento es comparando las líneas 12 y 13 de la figura 60. Ambos compuestos son los más activos, pero es claro que **47dmfenacac** (línea 12) produce un mayor daño que **47dmfengly** (línea 13). Debido al patrón de barrido

encontrado en el gel es muy complicado determinar una densidad óptica que pueda servir como medida cuantitativa del grado de ruptura del material genético, sin embargo, si tomamos la zona en donde todos presentan fragmentos de ADN y se determinó la densidad óptica de cada franja correspondiente a cada compuesto considerando un cuadrado de las mismas dimensiones para cada caso se puede generar la siguiente secuencia de grado de daño sobre el material genético: **47dmacac>3478tmacac>3478tmgly>47dmgly>fengly ≈ fenacac>56dmgly ≈ 56dmacac>47dmbpyacac >47dmbpygly>bpyacac>bpygly.**

Estos resultados presentan una tendencia general muy similar a la encontrada en los potenciales redox en donde los compuestos con acac presentan valores más negativos que los compuestos con glicina. Esto permite proponer que entre más negativo sea el potencial redox, menor será la estabilidad de los compuestos reducidos generados, lo que provocará un rápido regreso al estado oxidado del metal. Puesto que en el estudio de interacción con los agentes reductores se estableció que las Casiopeínas generaban los productos necesarios para completar su propio ciclo catalítico, entre menos estable sea el estado reducido y en presencia de un exceso de agente reductor, una mayor cantidad de radicales serán generados, produciendo un mayor daño en el material genético muy probablemente sustrayendo hidrógenos de la unidad ribosa, siendo las unidades H1' y H4' de la ribosa del surco menor las más susceptible a sufrir esta reacción (figura 77) y generar radicales en la cadena de ADN que llevará a la ruptura total como han propuesto Sigman, Meunier, Prativiel y algunos otros investigadores.<sup>73, 77, 79, 255</sup>



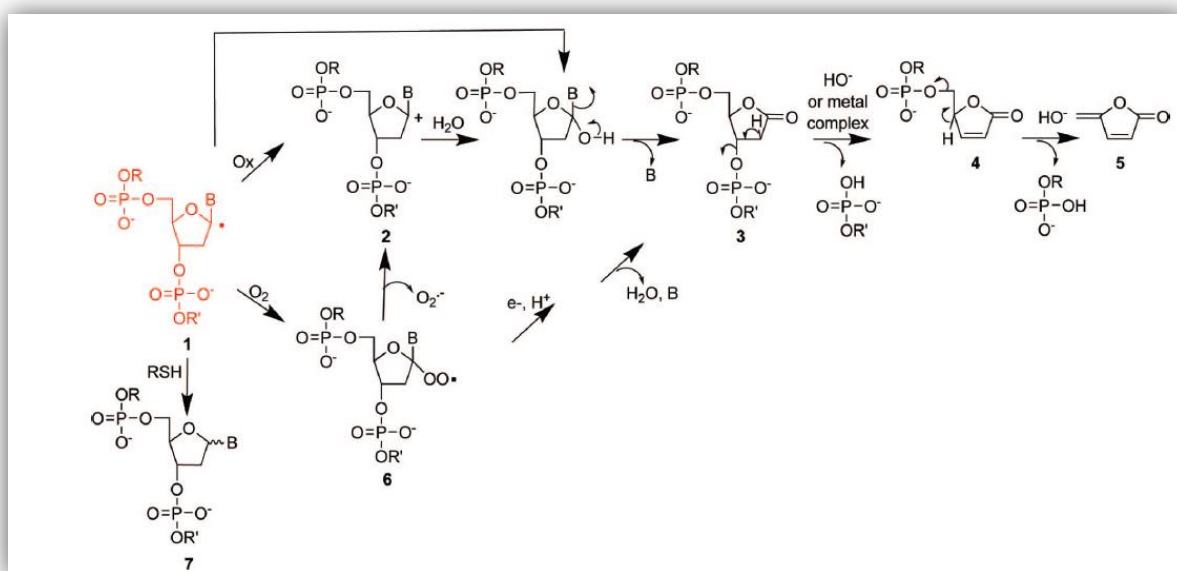


**Figura 77.** Átomos de hidrógeno que pueden ser sustraídos más fácilmente de la cadena de ADN. Los hidrógenos más propensos a ser sustraídos son H1' y H4' que se encuentran en el surco menor del ADN. Figura tomada de la referencia 74.

La identificación de la interacción del oxígeno de la unidad fosfato del surco menor de la cadena de ADN, la identificación de las Casiopeínas para generar especies reactivas de oxígeno en presencia de oxígeno molecular y un agente reductor así como los resultados encontrados en los estudios de actividad nucleasa muestran que la generación de radicales sobre la cadena de ADN mediada por estos compuestos es uno de los mecanismos involucrados en la citotoxicidad presentada por estos compuestos. El mecanismo tiene que ser similar al mostrado por  $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$  que muestra una alta preferencia a oxidar a la unidad ribosa sustrayendo al H1' .<sup>73, 77, 255, 256</sup>

Varios mecanismos son los propuestos para la degradación de la cadena de ADN una vez que se genera el radical sobre la unidad ribosa, tal como se muestra en la figura 78. De

acuerdo al mecanismo propuesto, una de las cosas que es necesaria hacer para identificar si las Casiopeínas están siguiendo el camino sugerido y que queda como una de las perspectivas de este trabajo es el tratar de aislar el producto final de la degradación, la 5-metilenfuranona, marcado con el número 5 en el mecanismo de ruptura de la figura 81 o cualquiera de los otros intermediarios.

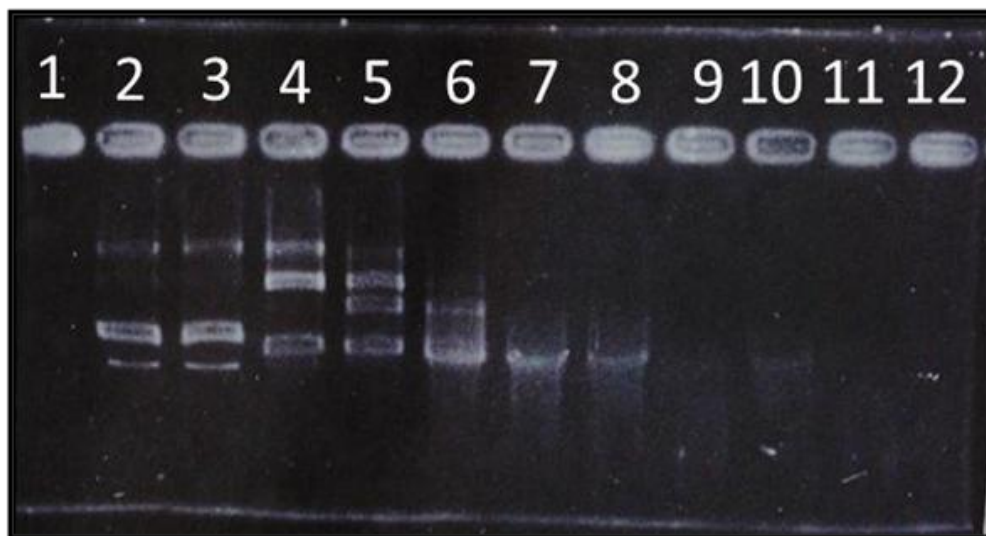


**Figura 78.** Posibles mecanismos de ruptura una vez formado el radical sobre C1'. El radical generado sobre C1' por la sustracción de H1' se muestra en rojo. Figura tomada de la referencia 77.

La posición del C1' dentro del surco menor lo hace difícilmente accesible para especies que difunden como el radical hidroxilo para sustraer H1', que era el mecanismo de acción propuesto para la especie  $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$ .<sup>257</sup> Sin embargo, Oyoshi y Sugiyama<sup>258</sup> explorando el mecanismo de ruptura de ADN de manera más detallada encuentran que la ruptura no sólo se da por la sustracción de H1' para generar el producto 5-metilenfuranona, sino que la principal vía de ruptura se presenta afectando C4' y C5' ya sea por la formación del intermediario 1',2'-dihidronucleotido o por la eliminación  $\beta$  de la ribonolactona catalizada por  $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$ . Tanto C1', C4' y C5' se encuentran en el surco menor y las reacciones de

sustracción de los hidrógenos son catalizadas por la reacción de la especie de Cu(I) formada una vez que reacciona el compuesto de Cu(II) con el tiol (en este caso ácido 3-mercaptopropiónico) en presencia de oxígeno molecular,<sup>259</sup> el mismo proceso que el descrito para las Casiopeínas para formar radical superóxido y radical hidroxilo, que por ser el surco menor el sitio de reconocimiento inicial para los compuestos ternarios, los radicales generados estarán en una posición realmente ventajosa para sustraer los protones de la unidad ribosa.

Dado que en los estudios de actividad nucleasa para  $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$  se propone que la ruptura del ADN se incrementa por la presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se realizaron los experimentos correspondientes para saber si las Casiopeínas presentaban el mismo comportamiento. En la figura 79 se puede constatar que a mayor concentración del compuesto de cobre con un exceso de agente reductor (BME), la ruptura es cada vez mayor. De la misma forma, cuando se adiciona  $\text{H}_2\text{O}_2$  al sistema el daño que se observa es mucho mayor que cuando se tiene el compuesto de Cu(II) sólo con el agente reductor, confirmando de esta manera que las Casiopeínas son nucleasas químicas que siguen un mecanismo similar de ruptura que  $[\text{Cu}(\text{fen})_2]^+$  que involucra la generación de especies reactivas de oxígeno y muy probablemente la sustracción de los hidrógenos H1', H4' y H5' que se encuentran en el surco menor de la cadena de ADN, que es el primer sitio de reconocimiento de las Casiopeínas.



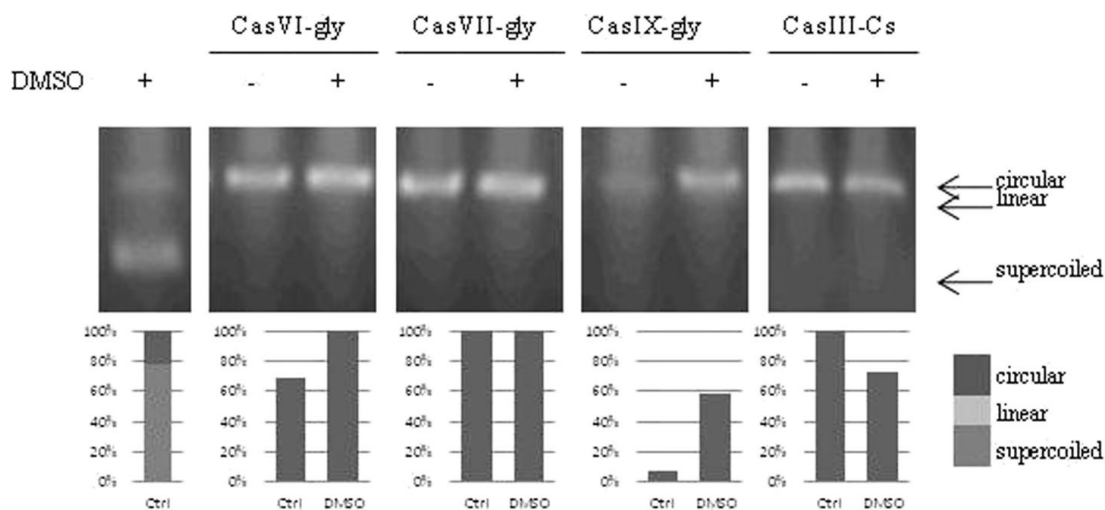
**Figura 79.** pRSET-B (500 ng) tratado con Casiopeína II-gly en presencia y ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Línea 1) vacía; línea 2)ADN; línea 3)ADN + BME 100μM; línea 4) ADN + BME 100μM+ 47dmfengly 5 μM; línea 5)ADN + BME 100μM + Casiopeína II-gly 5 μM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 μM; línea 6)ADN + BME 100μM + 47dmfengly 10 μM; línea 7)ADN + BME 100μM + 47dmfengly 10 μM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>5μM; línea 8)ADN + BME 100μM + 47dmfengly 20 μM; línea 9)ADN + BME 100μM + 47dmfengly 20 μM + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>5μM; líneas 10, 11 y 12 vacías. Tiempo de incubación 30 minutos.

Por otro lado, en un trabajo de colaboración con el grupo de investigación de la Dra. Dinorah Gambino se estudió la interacción de cuatro Casiopeínas con diferencias estructurales provenientes de la sustitución del ligante primario (diimina) y secundario. Los compuestos estudiados son **56dmfengly**, **fengly**, **bpygly** y **47dmfensalal**.

En esta parte del trabajo se encontró que al comparar el compuesto **56dmfengly** con el compuesto **fengly** es posible apreciar el efecto de la sustitución sobre el anillo central de la fenantrolina. En este caso, la sustitución con grupos metilo del anillo central de la fenantrolina parece desfavorecer la interacción con el ADN pues hay que emplear una mayor cantidad de compuesto para generar la forma lineal del ADN plasmídico. También es posible observar que la presencia del anillo aromático produce una mayor interacción

con el ADN a pesar de la contribución negativa generada por la sustitución, pues en el caso del compuesto **bpygly** que tiene una biperidina en su estructura hay que emplear una cantidad muy superior (20 veces más) a la empleada para aquellos compuestos que cuentan con fenantrolina en su estructura.

Por otro lado, también se evidenció que al agregar un atrapador de radicales (DMSO), la ruptura del material genético era disminuida en un cierto porcentaje en el caso de los compuestos que tienen fenantrolina en su estructura (**56dmfengly**, **fengly** y **47dmfensalal**), mientras que con el compuesto que presenta una biperidina en su estructura la inhibición de corte sobre el material genético es total (**bpygly**). Lo anterior puede apreciarse en los geles que se presentan en la figura 80.



**Figura 80.** Ruptura de ADN plasmídico por la presencia de Casiopeínas e inhibición del proceso por adición del atrapador de radicales DMSO. **56dmfengly**= CasVIgly, **fengly**= CasVIIgly, **bpygly** = CasIXgly y **47dmfensalal**= CasIIICs

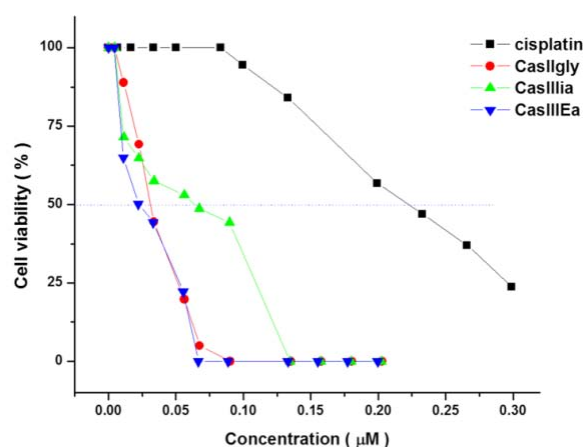
De esta forma se comprueba que la generación de radicales libres mediada por los sistemas ternarios de Cu(II) son los responsables de la ruptura observada en el material genético confirmando su comportamiento de nucleasas químicas. Esta parte del trabajo fue publicada en la revista Biological Trace Elements Research.<sup>260</sup>

### 5.10 Citotoxicidad en células tumorales

Como parte final de este trabajo se planteó evaluar la actividad citotóxica de los compuestos de coordinación **44dmbpyacac**, **47dmfengly**, **47dmfenacac** y **56dmfenacac** en líneas tumorales de neuroblastoma en tiempos cortos de exposición al compuesto. La elección de tiempos cortos de exposición se debió a los resultados encontrados en los estudios de actividad nucleasa en donde la ruptura fue dependiente de la concentración de los compuestos de coordinación y los tiempos de exposición. En esta parte también se puso mucha atención en la cantidad de GSH intracelular consumido, la generación de especies reactivas de oxígeno así como el daño mitocondrial provocado por la administración de Casiopeínas.

La citotoxicidad que presentan estos compuestos en la línea tumoral humana neuroblastoma CHP-212 determinadas después de 24 horas de exposición del compuesto son: **47dmfengly**  $31.5 \pm 2.34 \mu\text{M}$ , **47dmfenacac**  $18.6 \pm 2.09 \mu\text{M}$ , **44dmbpyacac**  $47.5 \pm 1.70 \mu\text{M}$  y cisplatino  $226.7 \pm 1.03 \mu\text{M}$ . La gráfica de viabilidad celular respecto a la concentración administrada de compuesto se presenta en la figura 94. Es importante hacer notar el efecto de cada uno de los compuestos evaluados respecto a la inhibición de la proliferación, como se muestra en la figura 81, todos los compuestos de Cu(II) presentan un efecto importante sobre la población celular desde las dosis más bajas, mientras que a las mismas dosis el cisplatino no presenta un efecto significativo de disminución de población celular. De hecho, el cisplatino no presenta efecto hasta después de una concentración de  $100 \mu\text{M}$ , una vez pasada dicha concentración la población celular disminuye de manera lineal con la concentración de cisplatino agregado. El cisplatino es uno de los compuestos empleados en

el tratamiento de neuroblastoma de alto riesgo,<sup>261</sup> por lo que los valores de  $CI_{50}$  encontrados para los compuestos de coordinación de Cu(II) sugiere que pueden ser una mejor alternativa de tratamiento si cumplen con las características necesarias para cumplir con las fases clínicas. Volviendo al comportamiento que presentan estos compuestos respecto a su capacidad de inhibir la proliferación celular, la tendencia general encontrada es la misma que la observada en otras líneas tumorales humanas como HeLa, SiHa, HCT-15 y MCF-7, en donde los compuestos con fenantrolina son más potentes para inhibir la proliferación celular respecto a los compuestos con bipyridina.



**Figura 81.** Efecto de las Casiopeínas sobre la proliferación de células de neuroblastoma CHP-212. Las células fueron expuestas al compuesto durante 24h a diferentes concentraciones: 0.1, 1, 10 and 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Con respecto al efecto del ligante secundario se presentan ejemplos en donde los compuestos con acac son más activos que los compuestos con glicina como en HeLa ( $CI_{50}$  **47dmfenacac**=  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , **47dmfengly**=  $5.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$ ) y en SiHa ( $CI_{50}$  **47dmfenacac**=  $0.96 \pm 0.09 \mu\text{M}$ , **47dmfengly**=  $5.5 \pm 0.8 \mu\text{M}$ ), mientras que en otros tejidos tumorales como en HCT-15 ( $CI_{50}$  **47dmfenacac**=  $2.1 \pm 0.19 \mu\text{M}$ ,

**47dmfengly**= $2.0\pm 0.2$   $\mu\text{M}$ ) o en MCF-7 ( $\text{CI}_{50}$ **47dmfenacac**=  $4.9\pm 0.6$   $\mu\text{M}$ , **47dmfengly**= $4.6\pm 0.4$   $\mu\text{M}$ ) las diferencias prácticamente no existen.

Un efecto más sutil pero que también está presente es el que tiene la posición de los sustituyentes de la diimina, lo cual puede comprobarse analizando los resultados obtenidos en las diferentes líneas tumorales. En algunos casos se tendrá diferentes efectos citotóxicos  $0.1$   $\mu\text{M}$ , **47dmfengly**= $3.4 \pm 0.5$   $\mu\text{M}$ ) y SiHa ( $\text{CI}_{50}$ **47dmfenacac**=  $0.96\pm 0.09$   $\mu\text{M}$ , **56dmfengly**= $1.7\pm 0.2$   $\mu\text{M}$ ) o tendrán efectos citotóxicos similares como en MCF-7 ( $\text{CI}_{50}$ **47dmfenacac**=  $4.9\pm 0.6$   $\mu\text{M}$ , **56dmfengly**= $3.9\pm 0.4$   $\mu\text{M}$ ) y HCT-15 ( $\text{CI}_{50}$ **47dmfenacac**=  $2.1\pm 0.19$   $\mu\text{M}$ , **56dmfengly**=  $1.9\pm 0.3$   $\mu\text{M}$ ).

Los resultados anteriores sugieren que la potencia de los compuestos de coordinación para inhibir la proliferación celular depende de sus propiedades fisicoquímicas como del tejido al que se esté administrando. Lo anterior permite sugerir un cierto grado de selectividad con respecto al tejido tratado. Más adelante continuaremos con la discusión de la selectividad cuando se presenten los datos de citotoxicidad en macrófagos y linfocitos de sangre periférica humana.

Una vez que se obtienen la  $\text{CI}_{50}$  a 24 horas, este valor se emplea para asegurar que existirá un efecto citotóxico en las células de neuroblastoma cuando se realicen los ensayos a tiempos cortos de exposición. La elección de los tiempos de exposición se basó en los resultados de expresión de caspasa 3 activa, una caspasa efectora que se expresa cuando alguna de las dos vías apoptóticas se prenden, ya sea la vía extrínseca (unión a receptores de muerte) o intrínseca (mitocondrial). Los detalles de esta cinética se pueden consultar en la tesis de maestría de Anllely Lizett Gutiérrez.<sup>262</sup>



Para esta línea celular, la expresión de caspasa 3 se dio a las 2 horas de incubación, tiempo que fue definido para realizar las determinaciones de GSH intracelular, daño mitocondrial y generación de especies reactivas de oxígeno.

La determinación de GSH intracelular se llevó a cabo empleando el marcador fluorescente monoclorobimano (MCB). El GSH intracelular cuantificado en células no tratadas se consideró como el 100%, las lecturas se realizaron en un lector de placas de 96 pozos con las longitudes de onda Ex/Em = 380nm/461nm.

Las células tratadas con cisplatino disminuyeron de manera importante la concentración de GSH intracelular (70%), mientras que la disminución producida por las Casiopeínas tienen los valores **47dmfengly**= 35%, **47dmfenacac**= 29% y **44dmbpyacac**= 21%. Se ha planteado que la disminución de GSH por cisplatino es producto de la formación de un aducto entre ambos.<sup>263, 264</sup> La formación del aducto es catalizada por la enzima Glutación-S-transferasa que se sabe se sobre-expresa en líneas tumorales humanas que presentan alta agresividad como en los neuroblastomas.<sup>265-267</sup> Los aductos formados entre GSH y medicamentos antitumorales pueden ser exportados de las células a través de la bomba GS-X o a la proteína asociada a la multi-resistencia de fármacos (MRP).<sup>268</sup>

Las propuestas anteriores son soportadas fuertemente por los productos Pt-GSH aislados y caracterizados.<sup>269-270</sup> El gran consumo de GSH intracelular y las altas dosis empleadas para alcanzar la CI<sub>50</sub> con cisplatino son consistentes con la propuesta de que GSH actúa como un importante mecanismo de desintoxicación celular cuando se administra cisplatino y ayuda a comprender la poca efectividad mostrada por este compuesto en el tratamiento.

Por otro lado, la menor disminución de GSH cuando las células fueron tratadas con Casiopeínas puede asociarse a la gran capacidad que tienen los compuestos de Cu(II) para participar en reacciones redox con tioles como GSH y cisteína como se mostró en secciones

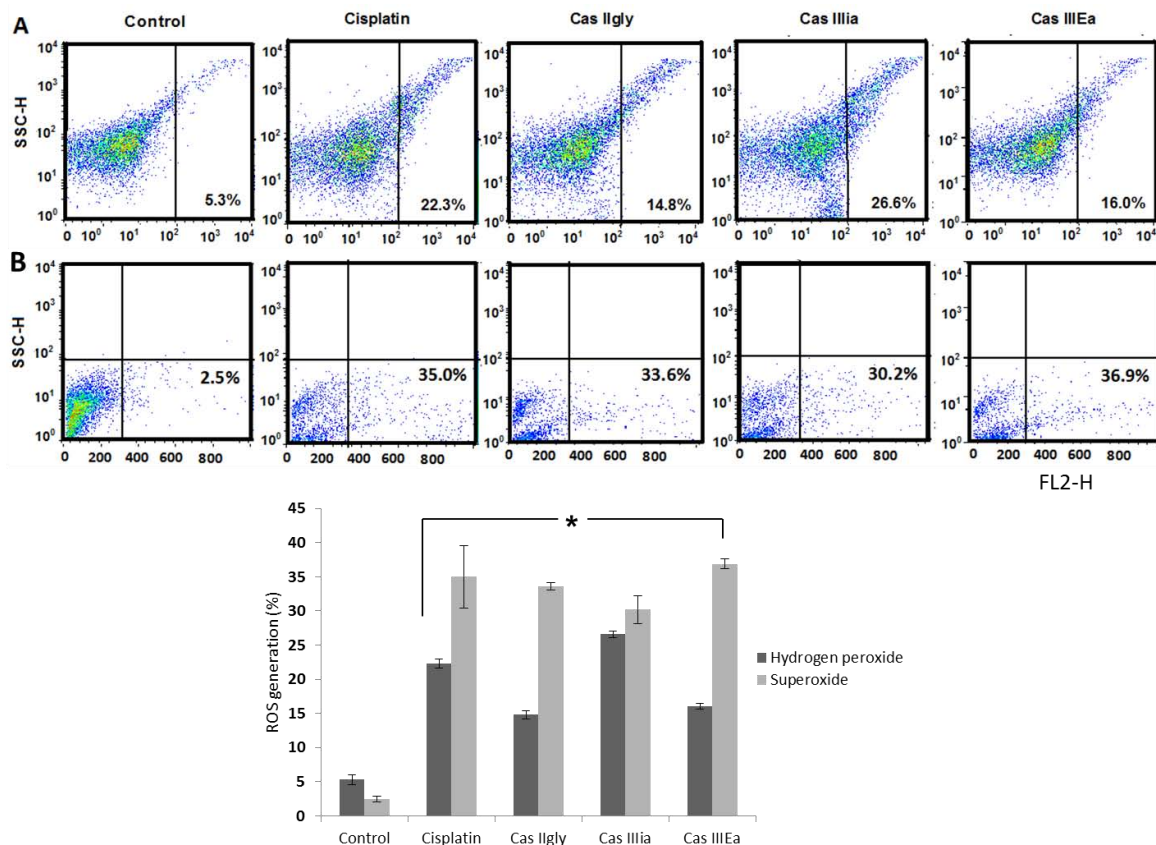
anteriores de esta tesis.<sup>271</sup> Aunque una pequeña fracción de GSH se queda interactuando de manera covalente con las Casiopeínas generando un producto que la glutatión reductasa (GR) no puede reconocer y reducir nuevamente a GSH, sin embargo, la gran mayoría del GSH es liberado en su forma de disulfuro GSSG una vez que se presenta la reacción redox autocatalizada para que GR lo reduzca nuevamente.

En este punto es importante recordar que los mecanismos de acción de las Casiopeínas y del cisplatino son muy diferentes, mientras que el mecanismo principal del cisplatino es la formación de enlaces covalentes entre el Pt y las nucleobases, las Casiopeínas reaccionan con GSH para generar especies reactivas de oxígeno como superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo. Las reacciones propuestas para que se lleven a cabo tales procesos se plantean en la figura 31.

Para las células tratadas con cisplatino (Figura 82) se encontró un incremento de las especies reactivas de oxígeno determinadas por citometría de flujo de 22% para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 35% para el superóxido, dicho incremento se asocia a la participación de enzimas de la familia NOX<sup>272-274</sup> además de la disminución de GSH antes mencionado.

Las Casiopeínas presentan un incremento similar al de cisplatino con intervalos de 30 a 37% para superóxido y 15 a 27% para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 82). Los potenciales redox de las tres Casiopeínas estudiadas respecto a ENH son **47dmfengly**= 0.147 V, **47dmfenacac**= 0.139 V y **44dmbpyacac**= 0.119V, valores que termodinámicamente favorecen la reacción con GSH intracelular, cuyo valor de potencial redox para el par GSSG/2GSH ha sido reportado entre -0.240 V y -0.170 V<sup>275</sup> para generar Cu(I) y GSSG. Una vez que se genera el Cu(I) puede reaccionar con el oxígeno molecular para generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (E<sub>O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></sub> = 0.281 V) y a su vez el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado puede reaccionar con el Cu(I) para producir radicales hidroxilo

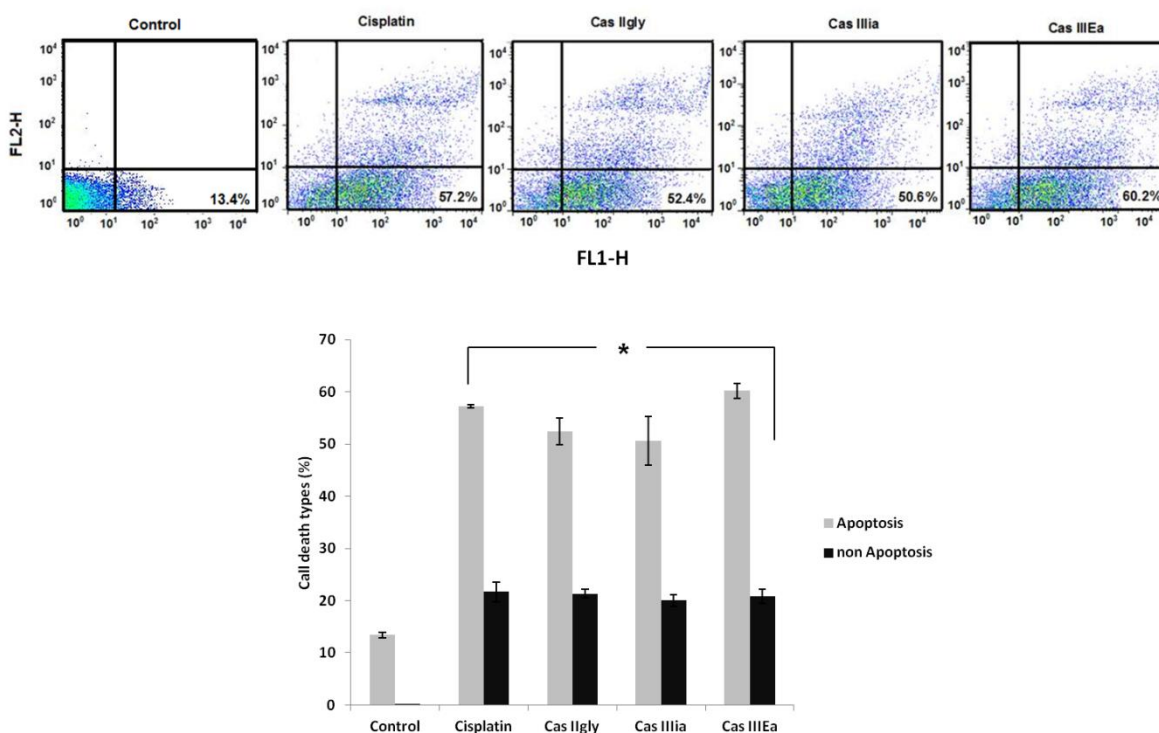
( $E_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{HO}\cdot} = 0.380 \text{ V}$ ), tal como se había descrito en la sección de interacción de Casiopeínas con tioles en el esquema de mecanismo propuesto.<sup>276</sup>



**Figura 82.** A) Especies reactivas de oxígeno generadas por el tratamiento con Casiopeínas. La cuantificación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (gris oscuro) y superóxido (gris claro) se realice empleado AmplexRed® y MitoSox™ respectivamente por citometría de flujo en el canal FL2-H. Todos los compuestos fueron expuestos durante dos horas a la  $\text{CI}_{50}$  determinada para cada compuesto. Los controles positivos corresponden a células tratadas con radiación UV durante 3h.

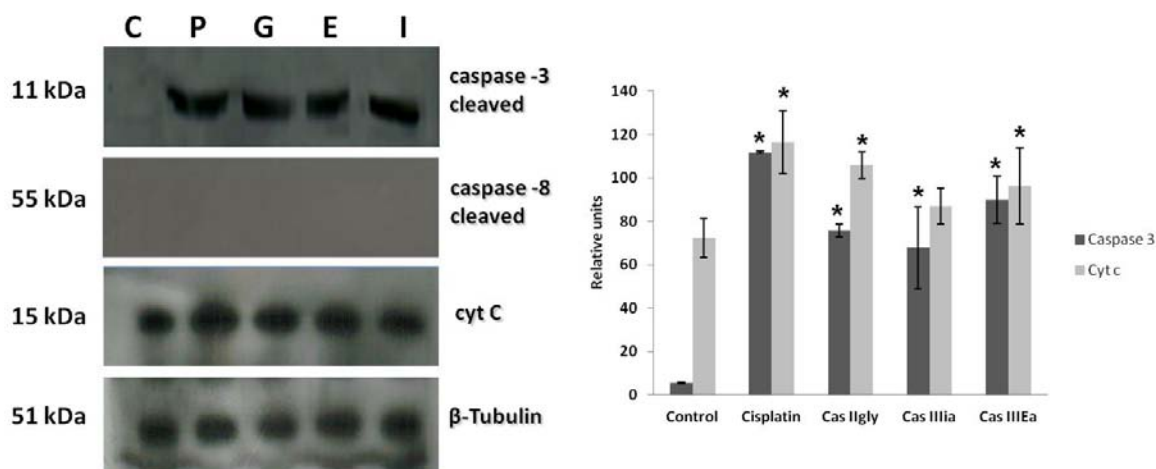
Con todos estos resultados se explora cual era la vía de muerte que se desencadena por la administración de Casiopeínas en estos tiempos cortos de exposición y se realizó un ensayo empleando Anexina V y yoduro de propidio como marcadores fluorescentes para determinar si la apoptosis era inducida. En la figura 83 se muestran las diferentes poblaciones celulares resultantes del tratamiento con Casiopeínas observadas por citometría

de flujo. El panel inferior derecho corresponde en todos los casos a las células que presentan un proceso apoptótico, las células que aparecen en el extremo superior izquierdo son aquellas que presentan un proceso necrótico, mientras que el cuadrante superior derecho presenta células con el doble marcaje (anexina V/ yoduro de propidio) que puede ser producto de un proceso apoptótico que por el grado de daño terminó como un proceso necrótico. Se puede apreciar que todos los compuestos generan una inducción de apoptosis superior al 40%, mientras que la inducción de necrosis se encuentra entre el 1 y 3%, siendo la vía apoptótica la principal ruta de muerte celular.



**Figura 83.** Las Casiopeínas inducen apoptosis. A) Determinación de muerte celular determinado por citometría de flujo empleando Annexina V (canal FL1-H) y yoduro de propidio (canal FL2-H). Las células de neuroblastoma fueron tratadas durante 2h con la concentración correspondiente a la CI<sub>50</sub> de cada compuesto. (B) Las barras representan el número de eventos apoptóticos registrados (barras gris claro) y otro tipo de muerte celular no programada (barras negras). El control positivo son células irradiadas con UV durante 3h.

Para diferenciar la ruta apoptótica inducida se realizaron determinaciones de expresión de caspasa 8, citocromo C, Bax y Bcl-2. Un resultado muy importante fue la ausencia de expresión de caspasa 8, aunado con el incremento de la expresión de citocromo C y la identificación de caspasa 3. La liberación de citocromo C de la mitocondria al citosol está asociado con un daño provocado por agentes exógenos en la estructura celular o en el flujo de electrones en la cadena respiratoria. Una vez presente en el citosol, el citocromo C se une al factor de activación de la apoptosis (Apaf-1) para generar el apoptosoma y dar comienzo a la vía intrínseca. El apoptosoma interactúa con la procaspasa 9 generando la caspasa 9 activa que a su vez genera la caspasa 3 que es la última caspasa efectora de esta ruta de muerte celular.<sup>267</sup> El incremento de expresión de citocromo C y caspasa 3 ayudan a comprobar que la vía principal de muerte celular de las células de neuroblastoma tratadas con Casiopeínas es la ruta mitocondrial (vía intrínseca).



**Figura 84.** La apoptosis es principalmente por vía mitocondrial en células CHP-212 tratadas con Casiopeínas. Las células fueron tratadas durante 2 h con la  $CI_{50}$  de cada compuesto P: cisplatino (68  $\mu\text{g/ml}$ ), G: 47dmfengly (14  $\mu\text{g/ml}$ ), I: 44dmbpycac (21  $\mu\text{g/ml}$ ) y E: 47dmfenacac (8  $\mu\text{g/ml}$ ), C: células control. (A) Western blot obtenido con la fracción citosólica después de 2h de tratamiento para determinar la presencia de caspasa-3 activa, caspasa-8 activa, citocromo C y  $\beta$ -tubulina como control. (B) Cada barra representa el promedio de tres experimentos independientes y está expresado en unidades relativas.

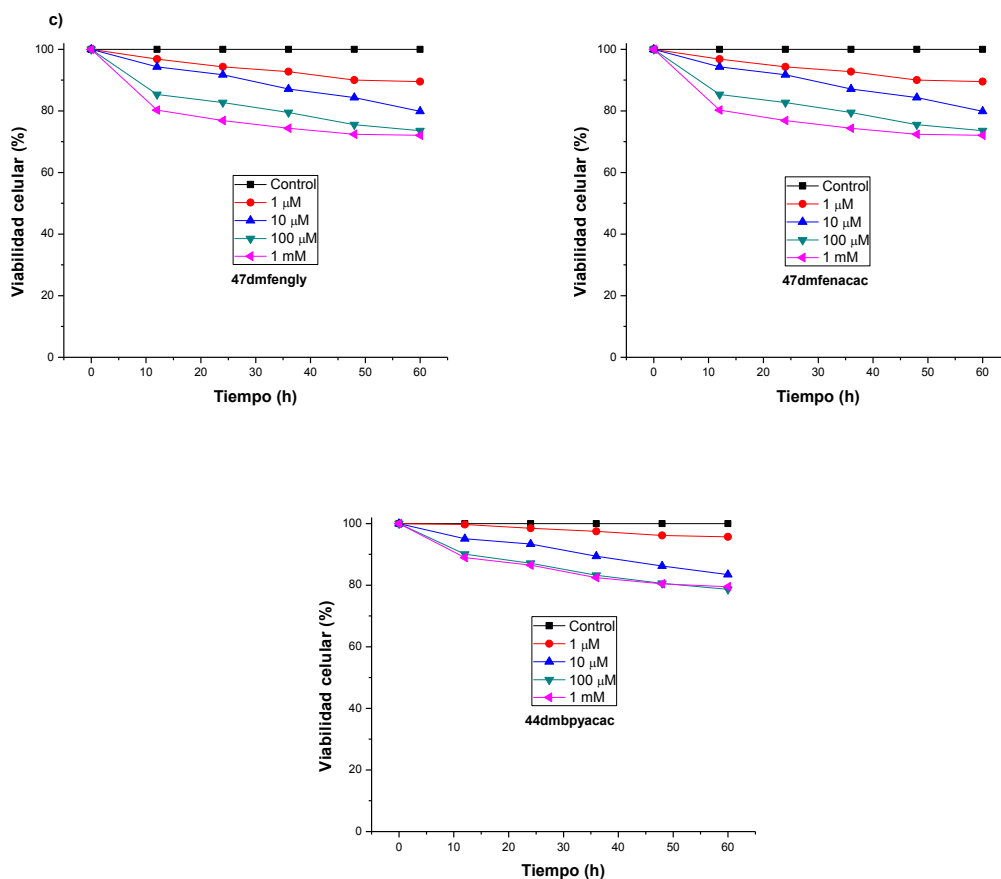
Es importante hacer notar la presencia de la proteína pro-apoptótica Bax y la anti-apoptotica Bcl-2. De manera general se espera que en el proceso apoptótico, cuando Bax incrementa su expresión la expresión de Bcl-2 disminuya, constituyendo así la relación Bax/Bcl-2 un excelente marcador de los procesos que se están desarrollando en la célula.<sup>268,</sup>  
<sup>269</sup> La relación Bax/Bcl-2 indica que el proceso apoptótico es predominante debido a la incorporación de Bax en el interior de la mitocondria identificado como la disminución de la expresión en el Western-Blot y la expresión constante de Bcl-2 (alrededor del 20%) en cada muestra (Figura 84). Así se puede afirmar que el proceso de muerte celular que desencadena la administración de Casiopeínas es la apoptosis por la vía mitocondrial.

### **5.11 Citotoxicidad en células sanas**

Para finalizar el trabajo se determinó la citotoxicidad de tres Casiopeínas **47dmfengly**, **47dmfenacac** y **44dmbpyacac** en células sanas: linfocitos y macrófagos de sangre periférica de humano. La figura 85 muestra los resultados obtenidos después de un experimento donde se administraron las tres Casiopeínas a diferentes concentraciones 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{M}$  y se realizaron determinaciones de viabilidad celular cada 12 horas durante 60 horas. De las gráficas se observa que para todas las concentraciones el efecto más importante se presenta en las primeras 12 horas, registrándose un pequeño incremento en la citotoxicidad con el paso del tiempo de exposición. La disminución de la población celular más importante se presentó en las concentraciones más altas empleadas (1mM) llegando al 80, 75 y 72 % de viabilidad para **47dmfengly**, **47dmfenacac** y **44dmbpyacac**, respectivamente.

Tabla 11. Viabilidad celular en cultivos de macrófagos de sangre periférica humana con diferentes dosis de las Casiopeínas **44dmfengly**, **47dmfenacac**, **44dmbpyacac**.

T	47dmfengly					47dmfenacac					44dmbpyacac				
	C	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	C	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1000 $\mu$ M	C	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1000 $\mu$ M
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12	100	96.8	94.3	85.3	80.3	100	96.8	94.3	85.3	80.3	100	99.7	95.0	90.0	88.9
24	100	94.3	91.7	82.7	76.9	100	94.3	91.7	82.7	76.9	100	98.5	93.3	87.1	86.5
36	100	92.7	87.1	79.4	74.3	100	92.7	87.1	79.4	74.3	100	97.4	89.4	83.2	82.4
48	100	90.0	84.3	75.5	72.4	100	90.0	84.3	75.5	72.4	100	96.1	86.2	80.6	80.4
60	100	89.5	79.8	73.6	72.0	100	89.5	79.8	73.6	72.0	100	95.7	83.4	78.6	79.5



**Figura 85.** Efecto de la administración de Casiopeínas sobre la viabilidad celular de macrófagos de sangre periférica humana. a) **47dmfengly**, b) **47dmfenacac** y c) **44dmbpyacac** administradas a diferentes concentraciones con un tiempo máximo de exposición de 60h.

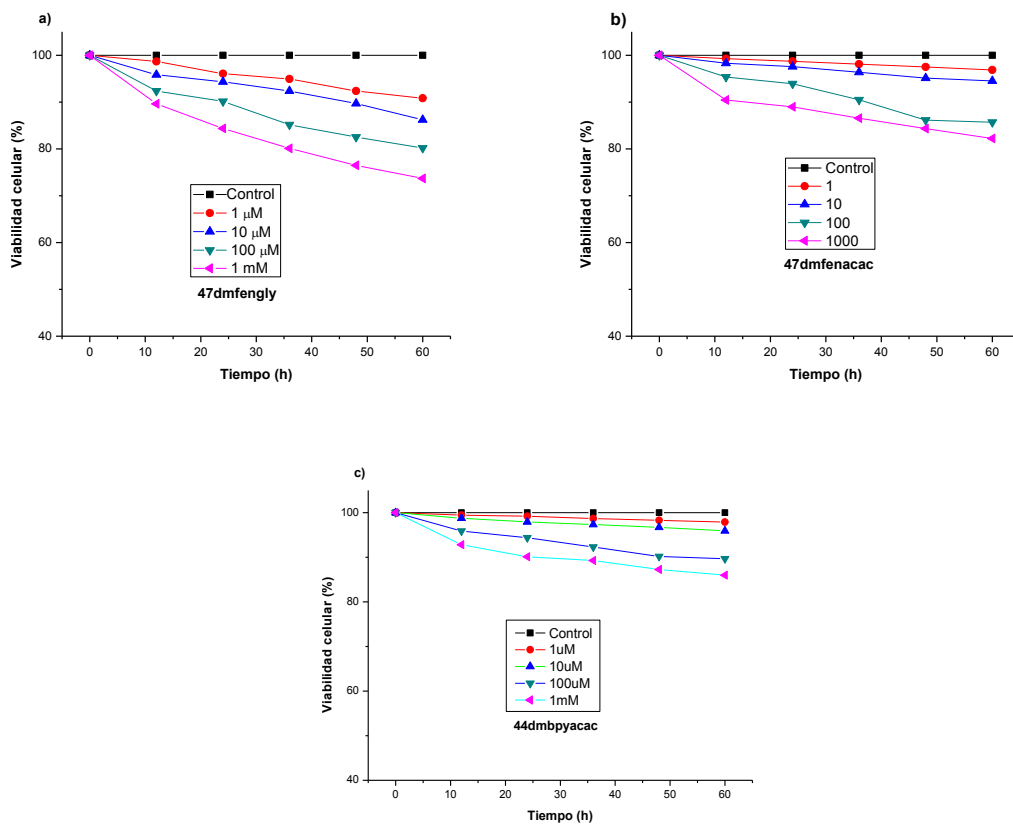
Un comportamiento similar es observado en los linfocitos de sangre periférica tratados con el mismo esquema como se puede observar en la figura 86. En este caso los porcentajes de viabilidad celular son 86, 82 y 73 % cuando se administró 1mM de **44dmbpyacac**, **47dmfenacac** y **47dmfengly**, respectivamente. Es importante tener en cuenta que tanto en los macrófagos como en los linfocitos la disminución de viabilidad presenta cambios muy pequeños con respecto al tiempo aún en la concentración más alta empleada

Tabla 12. Viabilidad celular en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana con diferentes dosis de las Casiopeínas **44dmbpyacac**, **47dmfenacac**, **47dmfengly**.

T	47dmfengly					47dmfenacac					44dmbpyacac				
	C	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	C	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM	C	1 μM	10 μM	100 μM	1000 μM
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
12	100	98.6	95.8	92.3	89.6	100	99.2	98.2	95.3	90.4	100	99.4	98.7	95.8	92.8
24	100	96.0	94.3	90.1	84.3	100	98.7	97.5	93.9	88.9	100	99.2	97.9	94.3	90.1
36	100	94.9	92.3	85.1	80.1	100	98.1	96.3	90.4	86.5	100	98.7	97.33	92.3	89.2
48	100	92.3	89.6	82.5	76.4	100	97.5	95.1	86.1	84.3	100	98.2	96.7	90.2	87.2
60	100	90.8	86.2	80.1	73.7	100	96.8	94.5	85.6	82.2	100	97.8	95.9	89.6	86.0

La citotoxicidad que presentan las Casiopeínas en las diferentes líneas tumorales humanas empleadas así como en las células sanas es cuantificada a través de los valores de CI<sub>50</sub>. El intervalo de concentraciones encontrado para disminuir al 50% la población celular en las líneas tumorales discutidas en este trabajo es de 0.5 a 50 μM después de 24 h de exposición. Dichas concentraciones sólo disminuyen en un 20% la población de linfocitos y macrófagos de sangre periférica humana después de 60 horas de exposición. Lo anterior permite concluir que las Casiopeínas presentan una mayor selectividad en inducir la muerte celular en líneas tumorales humanas que en células sanas.





**Figura 86.** Citotoxicidad en linfocitos aislados de sangre periférica humana debida a la administración de Casiopeínas. a) **47dmfengly**, b) **47dmfenacac** y c) **44dmbyacac**.

## 6. Conclusiones

Los compuestos de coordinación de Cu(II) Casiopeínas adoptan una geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada tanto en disolución como en estado sólido.

El principal modulador de la cantidad de densidad electrónica presente en el centro metálico es el ligante primario (diimina aromática). Dicha densidad determinada experimentalmente como el potencial redox y el comportamiento magnético presentan una dependencia lineal con la capacidad donadora de las diiminas aromáticas ( $pK_a$  ligante).

El ligante secundario presenta una contribución menor en la modulación de la densidad electrónica del compuesto de coordinación. Dicha contribución se midió con el grado de estabilización sobre la especie de Cu(II) con respecto a la especie de Cu(I) presentando el siguiente orden de estabilidad para cuando se mantiene fijo el ligante primario: salal>acac>gly.

El potencial redox, los parámetros de RPE, la naturaleza del enlace presente entre el ion metálico y el átomo donador, así como la participación de los ligantes en interacciones de retrodonación se pueden explicarse empleando los descriptores electrónicos momento dipolar ( $\mu_{Cu}$ ), momento cuadrupolar ( $Q(Cu)$ ), el valor de densidad electrónica de enlace ( $\rho$ ) y el laplaciano de la densidad electrónica de enlace ( $\nabla^2\rho$ ) obtenidos de la química computacional. Los valores teóricos pueden ser empleados como descriptores electrónicos en estudios de correlación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), sustituyendo a otros descriptores electrónicos como el  $E_{1/2}$ .

La distorsión angular es mayor en los sistemas en donde la participación de los ligantes secundarios en las interacciones de retrodonación es menor. Para los sistemas estudiados la distorsión angular se presenta el orden siguiente: glicinato > acac > salal. Entre mayor distorsión menor participación de los ligantes en la retrodonación y menor covalencia en los enlaces, por lo tanto, menor estabilidad de los compuestos.

La estabilidad de los compuestos tiene un efecto inmediato en la reactividad de las Casiopeínas frente a adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato. Se encontraron diferencias importantes entre los compuestos que contienen acetilacetato en su esfera de coordinación con respecto a los que presentan glicina. En el caso de los compuestos con acetilacetato se logró obtener un compuesto en donde se evidencian las interacciones de apilamiento entre los ligantes de la Casiopeína y las adeninas, mientras que en los compuestos con glicina se logró obtener un cristal en donde se muestra la conectividad del compuesto dinuclear formado producto de la sustitución del ligante secundario.

Aún con las diferencias mencionadas, ambos tipos de compuestos generan los compuestos dinucleares de Cu (II) después de 10 meses de preparada la disolución. De estos estudios también se establece la preferencia de reactividad del ion metálico con los oxígenos del grupo fosfato del 2-desoxiadenosin-5-monofosfato respecto a los nitrógenos capaces de coordinarse presentes en este mismo ligante.

Respecto a la reactividad de las Casiopeínas frente a cisteína y glutatión, se concluye que el primer paso en la reacción es la coordinación del grupo tiol al centro metálico seguido por la reducción del Cu(II) una vez que existe un exceso del agente reductor. En presencia de

oxígeno molecular las Casiopeínas son capaces de generar superóxido, el cual en un medio acuoso genera peróxido de hidrógeno que a su vez reaccionará con la especie de Cu(I). Como producto final de todo este ciclo de reacciones se genera el radical hidroxilo (identificado empleando RPE y un atrapador de radicales), al que se le atribuye la actividad citotóxica que presentan estos compuestos.

La interacción de las Casiopeínas con el ADN es importante y presenta valores, para la constante de asociación ( $K_b$ ), en el intervalo de 1 a  $10 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Los valores de  $K_b$  se modifican en función del tamaño del sistema aromático involucrado y de la posición de los sustituyentes en los ligantes diimina aromática. Cuando los sustituyentes son metilos, la sustitución en posiciones 3, 4, 7, 8 de la fenantrolina contribuye de manera negativa con la asociación del compuesto al ADN, mientras que la sustitución en las posiciones 5 y 6 de la fenantrolina favorece la interacción. Por otro lado, los compuestos con acetilacetato en su esfera de coordinación siempre presentan valores de  $K_b$  más altos que sus análogos con glicina, pero la cinética es más lenta. Además conjuntando los resultados experimentales y los resultados obtenidos con las dinámicas moleculares se plantea como primer sitio de reconocimiento en la interacción entre las Casiopeínas y el ADN al oxígeno del grupo fosfato presente en el surco menor de la doble hélice.

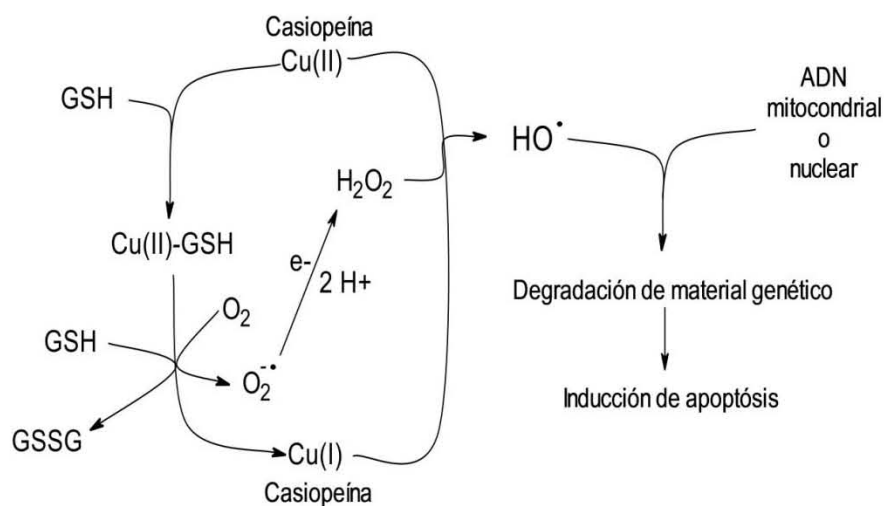
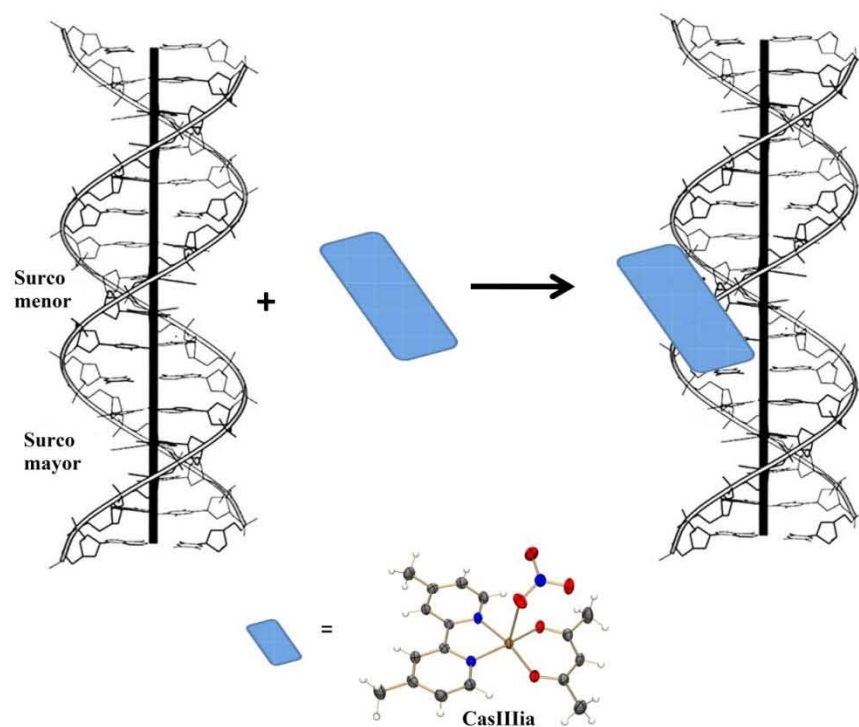
La identificación del surco menor como primer sitio de interacción es muy importante para explicar el que las Casiopeínas sean capaces de romper el ADN cuando en el medio de reacción se encuentra presente un agente reductor (glutatión o  $\beta$ -mercaptoetanol) y oxígeno molecular. La capacidad de las Casiopeínas para degradar el material genético se incrementa de manera sustancial cuando en el sistema de reacción se encuentra presente  $\text{H}_2\text{O}_2$  y dicho efecto es disminuido cuando en el medio se le adiciona un atrapador de

radicales como DMSO. Con todo lo anterior se concluye que las Casiopeínas son nucleasas químicas.

Todos los resultados encontrados de manera independiente ayudan a explicar que las Casiopeínas son capaces de inducir la muerte de células tumorales humanas (neuroblastoma CHP-212) a través de la inducción de apoptosis por la vía mitocondrial. En estas células se incrementa la concentración de superóxido y peróxido de hidrógeno. Se disminuye de manera importante la cantidad de glutatión intracelular en tiempos cortos de exposición lo cual permite concluir que el desbalance redox provocado en la célula es parte fundamental del mecanismo de muerte ejercido por estos compuestos de coordinación. Estos estudios permiten deducir que el efecto *in vivo* es provocado por la reducción del Cu(II) a Cu(I) vía reductores endógenos e interacción de las Casiopeínas con ADN. Estos resultados en conjunto con los del grupo de investigación donde se ha reportado la inducción de apoptosis como vía principal de muerte celular permiten profundizar en el mecanismo de los compuestos quelatos mixtos de Cu(II) Casiopeínas.

Las Casiopeínas presentan un grado importante de selectividad. La citotoxicidad sobre líneas tumorales humanas es mucho mayor ( $CI_{50}$  de  $50\mu\text{M}$  en las líneas evaluadas más resistentes) con respecto a la citotoxicidad observada en linfocitos y macrófagos de sangre periférica humana ( $1\text{ mM}$ , 20% de disminución de viabilidad celular). Estos resultados apoyan el uso de estos compuestos como una alternativa terapéutica para el tratamiento de cáncer.

Con todos estos resultados se propone un nuevo mecanismo de reacción para las Casiopeínas:



Mecanismo de acción de Casiopeínas. En la parte superior se presenta el primer sitio de reconocimiento en la interacción de Casiopeínas con ADN. En el diagrama de la parte inferior se presenta el ciclo catalítico propuesto para la formación de radicales hidroxilo que por su interacción con ADN inducen apoptosis en células tumorales humanas.

## **7.0 Sección experimental**

### **7.1 Síntesis de compuestos ternarios de Cu(II)**

A continuación se menciona de manera general el procedimiento empleado para la síntesis de los compuestos siguiendo la patente X. 1 equivalente de la diimina correspondiente (X-2,2'-bipiridina o X-1,10-fenantrolina) a 1 equivalente de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  disuelto en agua. Una vez finalizada dicha adición se agrega 1 equivalente del ligante secundario correspondiente (aminoacidato, acetilacetonato o salicilaldehidato). Se obtienen disoluciones de diversas tonalidades de azul cuando los ligantes secundarios son aminoacidatos o acetilacetonato o disoluciones de tonalidades verde esmeralda cuando el ligante secundario es salicilaldehidato. Algunos compuestos precipitan durante los 20 minutos de agitación, estos compuestos se filtran y se lavan con etanol. Los sólidos obtenidos después de este paso son los que se caracterizan y de los cuales se presentan los datos de caracterización en la sección de resultados.

### **7.2 Caracterización de los compuestos de coordinación**

El análisis elemental se realizó en un analizador Fissons EA 1108 (USAI). Para la determinación de los espectros electrónicos se empleó un espectrofotómetro Hewlett-Packard de arreglo de diodos usando disoluciones en metanol cuyas concentraciones finales están en el intervalo de 0.5 a 4 mM. Las determinaciones de conductividad se realizaron empleando un conductímetro marca Jenway 4330. La susceptibilidad magnética se determinó empleando una balanza magnética Sherwood Scientific MK-1 Magnetic

Susceptibility Balance. Las determinaciones electroquímicas se realizaron en un potencióstato/galvanostato PAR modelo 263A. Los espectros de RPE se adquirieron en un equipo Jeol-TE300 operando en banda X a 77K a partir de una disolución de metanol. Las determinaciones de difracción de rayos X de monocristal se llevaron a cabo en un equipo de difracción Oxford Gemini-Atlas.

### 7.2.1 Difracción de rayos X de monocristal

Los datos de difracción se obtuvieron usando radiación monocromática de Mo ( $\lambda=0.71073$ ). El equipo de difracción Oxford Gemini A cuenta con un detector de área. Se emplearon los programas CrysAlis Pro y CrysAlis RED para la adquisición y procesamiento de los datos.<sup>280</sup> La resolución de la estructura y el refinamiento se realizaron empleando los programas SHELXS97 y SHELXL97.<sup>281</sup> Todos los átomos diferentes a hidrógeno fueron refinados de forma anisotrópica. Los átomos de hidrógeno de las moléculas de agua y del grupo amino fueron localizados con los mapas de diferencia y refinados de manera isotrópica  $U_{iso}(H)=1.5$  y  $1.2U_{eq}$  para (O) y (N) respectivamente. Los hidrógenos enlazados a átomos de carbono fueron colocados a partir de una geometría idealizada y refinados con respecto a sus átomos de enlace con valores  $C-H=0.93-0.99 \text{ \AA}$  y  $U_{iso}(H)=1.2U_{eq}(C)$ , o  $1.5U_{eq}(C)$  para los grupos aromáticos, grupos metilo y metilenos. Los detalles experimentales de colección se presentan en la tabla 13.

Datos de colección de las estructuras de rayos X de compuestos ternarios de Cu(II)



Tabla 13. Resumen de datos de colección y refinamiento de las estructuras de rayos X.

	<b>5mfengly</b>	<b>fenacac</b>	<b>bpygly</b>	<b>3478tmfengly</b>	<b>56dmfengly</b>
Fórmula	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>34</sub> Cu <sub>2</sub> N <sub>6</sub> O <sub>14</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>6</sub>
Peso molecular	411.86	877.75	373.81	453.93	425.88
Temperatura	130(2) K	130(2) K	130(2) K	130(2) K	130(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Sistema cristalino	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo especial	P2 <sub>1/n</sub>	C 2/c	P 2 <sub>1/c</sub>	P 2 <sub>1/n</sub>	P 2 <sub>1/c</sub>
Dimensiones de la celda	a = 13.847(2) Å	a = 25.350(4) Å	a = 10.0189(3) Å	a = 17.7591(12) Å	a = 7.1436(2) Å
	α = 90°	α = 90°	α = 90°	α = 90°	α = 90°
	b = 6.7530(14) Å	b = 8.3428(6) Å	b = 6.7627(2) Å	b = 5.4165(3) Å	b = 12.7947(3) Å
	β = 105.020(10)°	β = 119.120(17)°	β = 102.701(3)°	β = 105.112(7)°	β = 96.229(3)°
	c = 18.336(3) Å	c = 19.461(2) Å	c = 21.7224(7) Å	c = 19.9745(13) Å	c = 18.0961(5) Å
	γ = 90°	γ = 90°	γ = 90°	γ = 90°	γ = 90°
Volumen	1656.0(5) Å <sup>3</sup>	3595.6(9) Å <sup>3</sup>	1435.78(8) Å <sup>3</sup>	1854.9(2) Å <sup>3</sup>	1644.22(8) Å <sup>3</sup>
Z	4	4	4	4	4
Densidad (calculada)	1.652 Mg/m <sup>3</sup>	1.621 Mg/m <sup>3</sup>	1.729 Mg/m <sup>3</sup>	1.625 Mg/m <sup>3</sup>	1.720 Mg/m <sup>3</sup>
Coeficiente de absorción	1.361 mm <sup>-1</sup>	1.262 mm <sup>-1</sup>	1.560 mm <sup>-1</sup>	1.224 mm <sup>-1</sup>	1.374 mm <sup>-1</sup>
F(000)	844	1800	764	940	876
Barrido de teta	99.6 %	99.8 %	99.8 %	99.8 %	99.8 %
Método de refinamiento	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos
Ajuste sobre F <sup>2</sup>	1.016	1.032	1.053	1.046	1.039
Índices Final R finales [I>2σ(I)]	R1 = 0.0665, wR2 = 0.1540	R1 = 0.0361, wR2 = 0.0804	R1 = 0.0363, wR2 = 0.0982	R1 = 0.0403, wR2 = 0.0818	R1 = 0.0251, wR2 = 0.0631
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1160, wR2 = 0.1804	R1 = 0.0494, wR2 = 0.0883	R1 = 0.0385, wR2 = 0.1003	R1 = 0.0612, wR2 = 0.0935	R1 = 0.0298, wR2 = 0.0657
Diferencias más grandes picos y hoyos	0.913 and -0.911 e.Å <sup>-3</sup>	0.365 and -0.387 e.Å <sup>-3</sup>	0.668 and -0.505 e.Å <sup>-3</sup>	0.395 and -0.378 e.Å <sup>-3</sup>	0.341 and -0.279 e.Å <sup>-3</sup>

Tabla 13. Continuación.

	<b>47dmfenacacPF<sub>6</sub></b>	<b>47dmfenacacBF<sub>4</sub></b>	<b>47dmfenser</b>	<b>55dmbpyacac</b>	<b>55dmbpysalal</b>
Fórmula	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> CuF <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> P	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> BCuF <sub>4</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>35</sub> H <sub>48</sub> Cu <sub>2</sub> N <sub>8</sub> O <sub>17</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> CuN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> CuN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>
Peso molecular	556.93	498.77	979.89	462.94	430.90
Temperatura	130(2) K	130(2) K	130(2) K	130(2) K	130(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo especial	P-1	P-1	P-1	P 2 <sub>1/c</sub>	P-1
Dimensiones de la celda	a = 8.118(2) Å	a = 9.8921(8) Å	a = 7.2306(6) Å	a = 21.7507(9) Å	a = 9.2430(5) Å
	α = 71.810(10)°	∑ = 80.167(8)°	α = 101.577(7)°	α = 90°	α = 96.488(4)°
	b = 11.558(2) Å	b = 10.5574(10) Å	b = 10.9714(9) Å	b = 14.5099(6) Å	b = 9.9860(4) Å
	β = 74.350(10)°	β = 66.349(8)°	β = 100.655(7)°	β = 105.807(5)°	β = 108.330(4)°
	c = 14.178(2) Å	c = 11.5912(10) Å	c = 13.2944(12) Å	c = 13.4460(6) Å	c = 10.4260(5) Å
	γ = 70.04(2)°	γ = 87.325(8)°	γ = 90.614(7)°	γ = 90°	γ = 96.573(4)°
Volumen	1167.9(4) Å <sup>3</sup>	1092.24(17) Å <sup>3</sup>	1014.12(15) Å <sup>3</sup>	4083.1(3) Å <sup>3</sup>	896.09(7) Å <sup>3</sup>
Z	2	2	1	8	2
Densidad (calculada)	1.584 Mg/m <sup>3</sup>	1.517 Mg/m <sup>3</sup>	1.604 Mg/m <sup>3</sup>	1.506 Mg/m <sup>3</sup>	1.597 Mg/m <sup>3</sup>
Coeficiente de absorción	1.075 mm <sup>-1</sup>	1.057 mm <sup>-1</sup>	1.134 mm <sup>-1</sup>	1.119 mm <sup>-1</sup>	1.257 mm <sup>-1</sup>
F(000)	566	510	508	1928	442
Barrido de teta	100.0 %	98.9 %	99.5 %	99.7 %	99.7 %
Método de refinamiento	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos
Ajuste sobre F <sup>2</sup>	1.087	1.130	1.069	1.022	1.074
Índices Final R finales [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0840, wR2 = 0.2411	R1 = 0.0598, wR2 = 0.1687	R1 = 0.0656, wR2 = 0.1342	R1 = 0.0432, wR2 = 0.0833	R1 = 0.0308, wR2 = 0.0766
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.1204, wR2 = 0.2818	R1 = 0.0770, wR2 = 0.2058	R1 = 0.0992, wR2 = 0.1528	R1 = 0.0739, wR2 = 0.0959	R1 = 0.0367, wR2 = 0.0805
Diferencias más grandes picos y hoyos	0.880 and -1.858 e.Å <sup>-3</sup>	0.862 and -1.096 e.Å <sup>-3</sup>	0.923 and -0.545 e.Å <sup>-3</sup>	0.545 and -0.369 e.Å <sup>-3</sup>	0.427 and -0.257 e.Å <sup>-3</sup>

Tabla 13. Continuación.

	<b>55dmbpygly</b>	<b>44dmbpyacac</b>	<b>47dmfenleu</b>	<b>47dϕfenval</b>	<b>47dϕfenacac</b>
Fórmula	C <sub>56</sub> H <sub>76</sub> Cu <sub>4</sub> N <sub>16</sub> O <sub>26</sub>	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> CuN <sub>3</sub> O <sub>8</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> CuF <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> CuN <sub>3</sub> O <sub>6</sub>
Peso molecular	1643.49	462.94	563.94	663.19	575.06
Temperatura	130(2) K	130(2) K	293(2) K	293(2) K	130(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Sistema cristalino	Triclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	Triclínico
Grupo especial	P-1	P-1	P 2 <sub>1</sub>	P 2 <sub>1/n</sub>	P -1
Dimensiones de la celda	a = 7.4340(3) Å	a = 8.0039(3) Å	a = 11.7034(10) Å	a = 17.09(5) Å	a = 10.426(7) Å
	α = 91.254(4)°	α = 76.343(5)°	α = 90°	α = 90°	α = 67.89°
	b = 10.0615(5) Å	b = 11.1682(6) Å	b = 6.9630(3) Å	b = 8.10(7) Å	b = 10.504(3) Å
	β = 96.848(4)°	β = 84.610(4)°	β = 100.287(4)°	β = 102.64(4)°	β = 89.66(6)°
	c = 22.7602(11) Å	c = 11.5397(7) Å	c = 14.4071(5) Å	c = 20.519(1) Å	c = 13.091(10) Å
	γ = 101.963(4)°	γ = 89.379(4)°	γ = 90°	γ = 90°	γ = 78.55°
Volumen	1651.64(13) Å <sup>3</sup>	997.86(9) Å <sup>3</sup>	1155.17(12) Å <sup>3</sup>	2774.8 Å <sup>3</sup>	1298.1(8) Å <sup>3</sup>
Z	1	2	2	4	2
Densidad (calculada)	1.652 Mg/m <sup>3</sup>	1.541 Mg/m <sup>3</sup>	1.621 Mg/m <sup>3</sup>	1.588 Mg/m <sup>3</sup>	1.471 Mg/m <sup>3</sup>
Coeficiente de absorción	1.367 mm <sup>-1</sup>	1.144 mm <sup>-1</sup>	1.091 mm <sup>-1</sup>	0.849 mm <sup>-1</sup>	0.891 mm <sup>-1</sup>
F(000)	848	482	576	1384	594
Barrido de teta	99.7 %	99.7 %	99.7%	100%	97.3%
Método de refinamiento	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos
Ajuste sobre F <sup>2</sup>	1.063	1.059	1.038	1.142	1.020
Índices Final R finales [I>2σ(I)]	R1 = 0.0380, wR2 = 0.0896	R1 = 0.0335, wR2 = 0.0716	R1 = 0.0421, wR2 = 0.1073	R1 = 0.0950, wR2 = 0.2842	R1 = 0.0441, wR2 = 0.1103
Índices R (todos los datos)	R1 = 0.0475, wR2 = 0.0950	R1 = 0.0416, wR2 = 0.0762	R1 = 0.0471, wR2 = 0.1126	R1 = 0.1137, wR2 = 0.2998	R1 = 0.0647, wR2 = 0.1228
Diferencias más grandes picos y hoyos	0.578 and -0.865 e.Å <sup>-3</sup>	0.330 and -0.299 e.Å <sup>-3</sup>	0.453 and -0.414 e.Å <sup>-3</sup>	1.682 and -0.939 e.Å <sup>-3</sup>	0.504 and -0.228 e.Å <sup>-3</sup>

Tabla 13. Continuación.

	<b>47dmval</b>	<b>44dmbpygly</b>	<b>44dmbpysalal</b>	<b>Bpysalal</b>	<b>47dmfenAMP</b>
Fórmula	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> CuN <sub>3</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>34</sub> H <sub>26</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>10</sub>	C <sub>48</sub> H <sub>58</sub> Cu <sub>2</sub> N <sub>14</sub> O <sub>17</sub> P <sub>2</sub>
Peso molecular	467.96	419.88	430.90	805.69	1292.10
Temperatura	130(2) K	130(2) K	298(2) K	293(2) K	130(2) K
Longitud de onda	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å	0.71073 Å
Sistema cristalino	Ortorrómbico	Triclínico	Triclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo especial	P 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P-1	P -1	P -1	P 2 <sub>1</sub>
Dimensiones de la celda	a = 6.8645(4) Å	<b>a</b> = 7.5105(8) Å	a = 8.4540(13) Å	a = 8.4870(8) Å	a = 10.8309(4) Å
	α = 90°	α = 77.263(9)°	α = 72.401(12)°	α = 76.951(10)°	α = 90°
	b = 10.6608(4) Å	<b>b</b> = 9.8970(12) Å	b = 10.923(2) Å	b = 9.6870(8) Å	b = 21.9118(7) Å
	β = 90°	β = 85.386(8)°	β = 68.728(11)°	β = 68.358(10)°	β = 109.67(4)°
	c = 27.3165(14) Å	<b>c</b> = 12.2543(13) Å	c = 11.0090(16) Å	c = 10.8470(15) Å	c = 12.7858(5) Å
	γ = 90°	γ = 75.870(8)°	γ = 79.730(12)°	γ = 82.440(7)°	γ = 90°
Volumen	1999.05(17) Å <sup>3</sup>	861.24(17) Å <sup>3</sup>	900.3 Å <sup>3</sup>	806.35(15) Å <sup>3</sup>	2857.32(18) Å <sup>3</sup>
Z	4	2	2	1	2
Densidad (calculada)	1.555 Mg/m <sup>3</sup>	1.619 g/cm <sup>3</sup>	1.590 Mg/m <sup>3</sup>	1.659 Mg/m <sup>3</sup>	1.502 Mg/m <sup>3</sup>
Barrido de teta	99.8%	99.8%	99.3%	97.9%	99.7%
Método de refinamiento	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos	Matriz completa de cuadrados mínimos
Ajuste sobre F <sup>2</sup>	1.053	1.021	1.032	1.038	1.286
Índices Final R finales [I>2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0355, wR <sub>2</sub> = 0.0783	R <sub>1</sub> = 0.0316 wR <sub>2</sub> = 0.0880	R <sub>1</sub> = 0.0354, wR <sub>2</sub> = 0.0982	R <sub>1</sub> = 0.0385, wR <sub>2</sub> = 0.1017	R <sub>1</sub> = 0.0432, wR <sub>2</sub> = 0.0932
Índices R (todos los datos)	R <sub>1</sub> = 0.0428, wR <sub>2</sub> = 0.0821	R <sub>1</sub> = 0.0320 wR <sub>2</sub> = 0.0884	R <sub>1</sub> = 0.0405, wR <sub>2</sub> = 0.1010	R <sub>1</sub> = 0.0451, wR <sub>2</sub> = 0.1076	R <sub>1</sub> = 0.0484, wR <sub>2</sub> = 0.0955
Diferencias más grandes picos y hoyos	0.341 and -0.344 e.Å <sup>-3</sup>	0.439 and -0.416 e.Å <sup>-3</sup>	0.439 and -0.416 e.Å <sup>-3</sup>	0.792 and -0.391 e.Å <sup>-3</sup>	0.849 and -0.878 e.Å <sup>-3</sup>

### 7.2.2 Estudio electroquímico

Todas las determinaciones electroquímicas se llevaron a cabo en metanol con hexafluorofosfato de tetrabutilamonio como electrolito soporte a una concentración 0.1M. Los compuestos de coordinación se estudiaron con una concentración final 1 mM con un arreglo clásico de tres electrodos: carbón vítreo o platino como electrodo de trabajo, electrodo de platino como electrodo auxiliar y electrodo de plata como pseudo-referencia. Todos los valores de potencial se reportan respecto al par  $\text{Fc}|\text{Fc}^+$  de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC.<sup>282</sup> Los voltamperogramas se inician en potencial de circuito abierto en ambas direcciones, anódica y catódica a diferentes velocidades de barrido 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1  $\text{Vs}^{-1}$ .

### 7.2.3 Espectroscopia RPE.

Los espectros RPE se adquirieron a 77 K con una frecuencia de modulación de 100 KHz y la cavidad cilíndrica en el modo  $\text{TE}_{011}$ . La calibración del campo magnético externo se realizó con un gaussímetro de precisión Jeol ES-FC5 y un contador de frecuencia 5350B-HP. Las condiciones para la adquisición de todos los espectros fueron las siguientes: Centro del campo 294.5 mT, potencia de la microonda 1mW, frecuencia de la microonda 9.10GHz, ancho de barrido 40 mT, modulación de anchura 0.032 mT, constante de tiempo 0.1s, amplitud 160, tiempo de barrido 120s, acumulación 1 scan. Las simulaciones se realizaron en el programa ESPRIT-382 v1.916. Los espectros en donde se emplean atrapadores de radicales y ADN se adquiere a temperatura ambiente empleando una celda plana en lugar de los tubos de cuarzo de 3 mm de diámetro.

#### 7.2.4 Química Computacional

Las estructuras de rayos X fueron empleadas como punto de partida para la optimización realizada a un nivel de teoría M05-2X/6-31++g(d,p)<sup>191</sup> con un modelo de polarización continua (PCM) de disolvente, agua para este trabajo empleando Gaussian 09.<sup>192</sup> Los funcionales M05-2X han sido empleados de manera exitosa para describir interacciones débiles<sup>273</sup> y compuestos de cobre.<sup>193</sup> Las propiedades atómicas fueron calculadas usando el programa AIMAll.<sup>194</sup> La mejor correlación multiparamétrica entre propiedades experimentales y las propiedades teóricas fueron obtenidas con Codessa 3<sup>278</sup> usando las propiedades atómicas como descriptores.

#### 7.3 Interacción de Casiopeínas con adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato

El estudio de espectrofotometría UV-Vis se realizó usando el método de las variaciones continuas. Se parte de disoluciones con una concentración 10mM para Casiopeínas, adenina, adenosina y 2-desoxiadenosin-5-monofosfato. La mezcla de reacción tuvo un volumen final de 5mL. Los espectros se obtuvieron en una celda de cuarzo en un intervalo de 200 a 800 nm a temperatura ambiente. En la primera etapa se realizaron determinaciones de absorbancia diariamente. Después de dos semanas las determinaciones se realizaron cada semana. Después de dos meses las determinaciones de absorbancia se realizaron cada 15 días hasta los 4 meses en donde se da la transformación de los compuestos con glicina como ligante secundario y hasta 10 meses que es cuando se alcanza la transformación total para los compuestos con aetilacetato como ligante secundario. Las mismas disoluciones fueron empleadas para las determinaciones de RPE, pero para realizar

dichos experimentos las disoluciones se diluyeron con metanol para alcanzar una proporción de disolventes 3:1v/v (H<sub>2</sub>O:MeOH).

#### **7.4 Interacción de Casiopeínas con ADN-TB**

Las disoluciones de ADN-TB fueron preparadas en un amortiguador que contenía 100 mM de NaCl y 50 mM de Tris-HCl (pH= 7.2). Para la disolución preparada la relación de absorbancias a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) fue de 1.84, lo que indica que el ADN está lo suficientemente libre de proteína para poder realizar los estudios de interacción con las Casiopeínas.<sup>206</sup> La concentración de ADN en cada experimento fue determinada empleando la absorbancia a 260 nm con un coeficiente de absortividad molar  $\epsilon= 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .<sup>207</sup> Las disoluciones de ADN preparadas se guardaron a 4°C y no se usaron después de 4 días de preparadas. Las disoluciones de los compuestos de coordinación fueron preparadas con el mismo amortiguador que el empleado para preparar las disoluciones de ADN.

#### **7.5 Actividad nucleasa**

Para la obtención del plásmido pRSET-B se trabajaron con células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  de acuerdo al siguiente procedimiento:

##### **7.5.1 Obtención de células competentes**

1. Estriar las células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en una caja Petri con medio PSI-a (PSI a: Extracto de levadura 5g/l, Triptona 20 g/l, MgSO<sub>4</sub> 5g/l, Ajustar el pH a 7,6 con KOH. Añadir 14 g/l de agar. Esterilizar en autoclave). Almacenar a temperatura ambiente PSI-a e incubar toda la noche a 37°C.

2. Inocular 5 ml de medio PSI-b (PSIb= medio PSIa sin agar) con una colonia aislada (utilizar un matraz de 125 ml) e incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 a 550 nm.
3. Inocular, con el cultivo anterior, 100 ml de medio PSI-b en un matraz de 1 litro precalentado a 37°C. Incubar a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0,48 a 550 nm.
4. Enfriar el matraz del paso anterior durante 5 minutos en hielo y posteriormente recoger las células por centrifugación a 6000 rpm, 5 minutos a 4°C.
5. Resuspender el pellet en 40 ml de TFB-1 (TFB-1= Acetato potásico 30 mM, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, MnCl<sub>2</sub> 50 mM, Glicerol 15% v/v, Ajustar el pH a 5,8 con ácido acético 0,2 M. Esterilizar por filtración. Almacenar en frío) frío. Mantener 5 minutos en hielo.
6. Recoger las células por centrifugación a 6000 rpm 5 minutos a 4°C.
7. Resuspender las células en 4 ml de TFB-2 (TFB-2= MOPS 10 mM, CaCl<sub>2</sub> 75 mM, KCl 10 mM, GlicROSI 15% v/v, Ajustar el pH a 6,5 con KOH. Esterilizar por filtración. Almacenar en frío). Mantener en hielo durante 15 minutos.
8. Separar en alícuotas las células y congelar a -80°C o en nitrógeno líquido.

### **7.5.2 Transformación de células competentes**

1. Descongelar las células en hielo. Inmediatamente después, añadir 1/10 de β-mercaptoetanol 1,8% v/v. Para ello añadir 15 µl de β-mercaptoetanol 1,8% a 150 µl de células.
2. Mantener 10 minutos en hielo. Enfriar las muestras que contienen las ligaciones del inserto de DNA y el vector pRSET-B en hielo durante este tiempo.
3. Añadir 50 µl de células a cada ligación. Mantener en hielo durante 30 minutos.
4. Someter las células a un choque térmico de 3 minutos a 37°C en un baño termostatzado.
5. Enfriar en hielo durante 2 minutos.



6. Añadir 500 µl de medio de cultivo LB (Medio LB= Extracto de levadura 5g/l, Triptona 10 g/l, NaCl 5g/l. Esterilizar en autoclave. Almacenar en frío). Incubar 1 hora a 37°C en agitación.

7. Transferir todo el volumen a placas LB/ampicilina/IPTG/X-Galn. (placas de cultivo= Medio de cultivo LB, Agar 1,6%, Ampicilina 100 µg/ml, IPTG 500 µM, X-Gal 40 µg/ml)

8. Incubar toda la noche a 37°C.

Una vez transformadas las células pueden ser almacenadas a -80°C y cultivarse en medio LB para expandir el cultivo. La extracción y purificación del plásmido se realizó empleando PureLink® Genomic DNA de Invitrogen.

Para conocer la capacidad de interacción que tienen estos compuestos con ADN se empleó como modelo el ADN plasmídico pRSET-B y pBSK II BlueScript (Stratagene) del cual se empleó de 250 a 500 ng en cada sistema evaluado. Una vez purificado el plásmido se llevó a un volumen final de 20 µL de una disolución amortiguada a pH= 7.4 con HEPES 0.1 M. Las relaciones estequiométricas Casiopeínas: ADN de acuerdo a la relación  $r_i = \text{mol Casiopeína/mol ADN (pares de bases)}$  fueron 1,5, 10, 20, 50 y 100. El estudio se realizó en presencia y ausencia de agentes reductores como ácido ascórbico (1 mM) y β-mercaptoetanol (1mM), así como en presencia de DMSO (4%) como atrapador de radicales y las concentraciones correspondientes de las Casiopeínas a evaluar. Todas las disoluciones fueron incubadas a 37° durante 24 horas en el caso de la adición de Casiopeínas, mientras que en los sistemas con agente reductor o DMSO el tiempo de incubación es de 30 minutos. Las disoluciones incubadas se colocaron en geles de agarosa al 1% para analizar el efecto de los compuestos de coordinación sobre el ADN a través de electroforesis horizontal. Los geles

fueron teñidos con bromuro de etidio y las intensidades analizadas empleando el programa ImageTool 3.0 (IMG).

## 7.6 Viabilidad de células tumorales

Las células de neuroblastoma humano CHP-212 (ATCC, Rockville, Maryland, USA) se mantuvieron en medio de cultivo Dulbecco's Eagle con medio F-12 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Las células se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones (0.1, 1, 10 y 100  $\mu\text{g/ml}$ ) del compuesto a evaluar (cisplatino, **47dmfengly**, **47dmfenacac** y **44dmbpyacac**). Dos diferentes observadores determinaron la viabilidad celular empleando el colorante Azul tripano. Se realizaron tres experimentos por triplicado. La determinación de la  $\text{CI}_{50}$  fue determinada a partir de las curvas obtenidas de la viabilidad de las diferentes concentraciones empleadas. La  $\text{CI}_{50}$  fue usada para las determinaciones a tiempos cortos de exposición (2h) de acuerdo a la cinética de expresión de caspasa 3. Dicho tiempo también fue empleado para las determinaciones de especies reactivas de oxígeno y determinación del tipo de muerte celular.

La presencia de peróxido de hidrógeno y radical superóxido se determinó empleando los marcadores fluorescentes AmplexRed (Invitrogen) y MitoSox (Molecular Probes Inc.), respectivamente. AmplexRed es un sustrato incoloro que al reaccionar estequiometricamente con  $\text{H}_2\text{O}_2$  genera resorufina que puede ser detectada por citometría de flujo. Células con y sin tratamiento ( $1.5 \times 10^4$  células) fueron lavadas con la disolución amortiguadora de Krebs-Ringer (Merck-Millipore) y después fueron incubadas por 30 minutos con la mezcla de reacción 50mM AmplexRed más 0.1U/ml de peróxidasa de rábano picante (HRP) en ausencia de luz. La fluorescencia de cada muestra fue analizada en un citómetro de flujo FACScan

(Becton Dickinson Biosciences) empleando el canal FL2-H. Se emplearon células irradiadas con UV por 3 horas como control positivo.

Para la determinación de superóxido se emplearon 250  $\mu$ L de Mitosox diluido en DMSO (disolución inicial 5 mM) los cuales fueron agregados a las células y se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Los productos de la oxidación se registraron en el canal FH2-L del citómetro de flujo FACScan. Se emplearon células irradiadas con UV por 3 horas como control positivo.

La determinación de GSH intracelular se llevó a cabo empleando el kit de monoclorobimano (Calbiochem, California, USA). El monoclorobimano (MCB) forma un aducto con GSH mediado por la acción de la glutatión-S-transferasa (GST). El agregado celular fue resuspendido en amortiguador celular de lisis en presencia de 25  $\mu$ M de MCB y 50 U/ml de GST. El GSH cuantificado en células no tratadas fue considerado el 100%, mientras que el control negativo fueron células sin tratamiento con MCB en amortiguador celular de lisis. Todas las muestras fueron incubadas por 30 minutos a 37 °C. Después de dicho tiempo se determinó la fluorescencia en un lector de placas con máximos de absorción/ emisión en 380/460 nm.

La expresión de proteínas apoptóticas en la porción citoplasmática fue determinada empleando Western Blot (WB) después del fraccionamiento celular empleando el kit de fraccionamiento cito sol/mitocondria de Calbiochem (Calbiochem, California, USA). Las células se mezclaron con el amortiguador de extracción de citosol en presencia de 1 mM de ditioneitol (DTT) y la mezcla de inhibidores de proteasas (ambos de BioRad, California, USA). Las muestras que contenían 10  $\mu$ g/ml de proteína y amortiguador de carga SDS-PAGE con 5% de BME fueron calentadas hasta ebullición durante 5 minutos y después colocadas en un gel de poliacrilamida. La transferencia electroforética a membranas de nitrocelulosa se realizó por inmunotransferencia empleando Caspasa 3 (cat. Sc-1224), caspasa 8 (cat. Sc-5263), cyt C

(cat. Sc-8385), Bcl-2 (cat. Sc-7382), Bax (cat. Sc-7480) y b-tubulina (cat. Sc-9104), seguido de la hibridación con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (todos de Santa Cruz Biotechnology, California, USA). Las intensidades de cada banda fueron determinadas por quimioluminiscencia empleando SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate kit (Thermo Scientific) y cuantificado con el programa ImageJ versión 1.41e.

Las alteraciones en membrana citoplasmática fueron identificadas empleando Anexina V del kit Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Sigma Chemical Co. Sant Louis, Missouri, USA) como un método de determinar el tipo de muerte celular. Las células ( $1 \times 10^6$ ) son incubadas por 10 minutos a 37 °C en oscuridad en presencia de 5  $\mu$ L de Anexina V y 5  $\mu$ L de yoduro de propidio (Merck Millipore). Se expusieron células a 50  $\mu$ g/ml de estaurosporina (ENZO Life Science) por 18 horas como control positivo de apoptosis. La fluorescencia de cada especie se determinó empleando un citómetro de flujo FACScan usando el canal FLH-1 para Anexina 5 y FL2-H para yoduro de propidio. Como control de necrosis se usaron células en presencia de Tween 20 al 15% (Merck Millipore).

### **7.7 Cultivo de linfocitos y macrófagos de sangre periférica humana**

A partir de 10 muestras de sangre de diferentes individuos sanos, se aislaron células mononucleares utilizando un gradiente de Ficoll Histopaque (GE Healthcare, E.U.A). Brevemente, se diluyen 15 ml de sangre periférica humana con anticoagulante en 15 ml de PBS, posteriormente se colocan sobre 10 ml de Ficoll. Se centrifuga el tubo a 400 g por 20 min, procedimiento que genera cuatro estratos en el tubo y con una micropipeta se retira el tercer estrato de abajo hacia arriba que es el que contiene las células mononucleares. Las células aisladas se lavan 3 veces resuspendiendo en 5 ml de PBS y centrifugando a 100 g por

10 min. Finalmente, se sembraron  $1 \times 10^5$  células/ml RPMI 1640 suplementado con 10% de suero autólogo, 1% gentamicina, y 1% de 2-mercaptoetanol, en cajas de cultivo de 50 ml con recubrimiento para células adherentes. Después de 2h de incubación a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ , las células no adherentes (linfocitos) fueron removidas lavando 2 veces con PBS. Los linfocitos se siembran en 50 ml de medio RPMI, se pusieron a proliferar y de ahí se toma la cantidad de células para los ensayos de citotoxicidad. Los monocitos se dejaron madurar durante 6 días realizando cambios de medio cada 48h. Una vez diferenciados a macrófagos, se colocan las células durante 10 min sobre hielo para desprenderlas, se toman alícuotas de  $10 \mu\text{l}$  que se tiñen con azul tripano para asegurar la viabilidad y conocer el número de células. Para confirmar la diferenciación de monocitos a macrófagos se utilizó el anticuerpo específico F4/80 marcado con fluorescencia y se analizaron alícuotas de  $1 \times 10^6$  células por citometría de flujo.

## **8. Referencias**

## Introducción

1. World Health Organization 2014. World Health Statistics 2014. WHO Press. Ginebra, Suiza.
2. Instituto Nacional de Geografía y Estadística. Principales causas de muerte 2013. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>. Consultada 13/04/2015.
3. Terapias contra el cáncer. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/treatment/types-of-treatment>. Consultada el 19/03/2015.
4. C. Carr, J. Ng, T. Wigmo. *The side effects of chemotherapeutic agents*. Current Anaesthesia & Critical Care (2008) 19, 70–79.
5. G.L. Finch, L.A. Burn-Naas. *Cancer Chemotherapeutic Agents*. En Encyclopedia of Toxicology. 3ª edición. P. Wexler (Editor). Associated Press, 2014, Oxford, Reino Unido. Vol. 1 Pg. 630-641.
6. *Principles of Chemotherapy*, en Oxford Handbook of Oncology. J. Cassidy, D. Bissett, R.A.J. Spence Obe (Editores). Oxford University Press, 2002, Oxford, Reino Unido. Capítulo 9 Pg. 136-180.
7. V. Malhotra, M.C. Perry. *Cancer Chemotherapeutic Agents*. Cancer Biology & Therapy. (2003) 2:4. Suppl. 1, S2-S4.
8. J.M. Berger, S.J. Gamblin, S.C. Harrison, J.C. Wang. *Structure and mechanism of DNA topoisomerase II*. Nature (1996) 379, 225-232.
9. J.C. Wang. *DNA Topoisomerases*. Annual Review of Biochemistry (1996) 65, 635-692.
10. American Chemical Society National Historic Chemical Landmarks. *Discovery of Camptothecin and Taxol®*. <http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/camptothecintaxol.html>. Visitado 04/04/2015.

11. S. Haldar, A. Basu, C.M. Croce. *Bcl2 Is the Guardian of Microtubule Integrity*. *Cancer Research* (1997) 57, 229-233.
12. B. Rosenberg, L. van Camp, T. Krigas. *Inhibition of Cell Division in Escherichia coli by Electrolysis Products from a Platinum Electrode*. *Nature* (1997) 205, 698 – 699
13. B. Rosenberg, L. van Camp, J.E. Trosko, V.H. Mansour. *Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents*. *Nature* (1969) 222, 385-386.
14. Stephen Trzaska, Cisplatin in *The Top Pharmaceuticals That Changed The World*. *C&EN Special Issue* (2005) 83, Issue 25.
15. K. D. Mjos, C. Orvig. *Metallo drugs in Medicinal Inorganic Chemistry*. *Chem. Rev.* (2014) 114, 4540–4563.
16. A. I. Anzellotti, N. P. Farrell. *Zinc metalloproteins as medicinal targets*. *Chem. Soc. Rev.* (2008)37, 1629-1651.
17. G. Grasso, S. Bonnet. *Metal complexes and metalloproteases: targeting conformational diseases*. *Metallomics* (2014) 6, 1346-1357.
18. G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte. *Organometallic Anticancer Compounds*. *J. Med. Chem.* (2011), 54, 3–25.
19. C.G. Hartinger, N. Metzler-Nolte, P.J. Dyson. *Challenges and Opportunities in the Development of Organometallic Anticancer Drugs*. *Organometallics* (2012), 31, 5677-5685.
20. C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano. *Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents*. *Chem. Rev.* (2014) 114, 815–862.
21. G. Barone, A. Terenzi, A. Lauria, A. M. Almerico, J.M. Leal, N. Busto, B. García. *DNA-binding of nickel(II), copper(II) and zinc(II) complexes: Structure–affinity relationships*. *Coord. Chem. Rev.* (2013) 257, 2848-2862.

22. A.F.A. Peacock, P.J. Sadler. Medicinal Organometallic Chemistry: Designing Metal Arene Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Asian J.* (2008) 3, 1890-1899.
23. J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, V. Moreno. *Compuestos inorgánicos en el tratamiento del cáncer*, en *Aplicación de los compuestos metálicos en medicina. Una visión bioinorgánica*. D. Gambino, V. Moreno, M. Navarro (editoras). Editorial Académica Española. (2012), Cap.1, Pags. 2-79.
24. J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H. Schellens. *A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent*. *Clin. Cancer Res.* (2004) 10, 3717–3727.
25. M.A. Jakupec, V.B. Arion, S. Kapitzka, E. Reisner, A. Eichinger, M. Pongratz, B. Marian, N. Graf von Keyserlingk, B.K. Keppler. *KP1019 (FFC14A) from bench to bedside: preclinical and early clinical development – an overview*. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* (2005) 43, 595–596.
26. Morris, R. E.; Aird, R. E.; Murdoch, P. D. S.; Chen, H.; Cummings, J.; Hughes, N. D.; Parsons, S.; Parkin, A.; Boyd, G.; Jodrell, D. I.; Sadler, P. J. *J. Med. Chem.* 2001, 44, 3616–3621.
27. C. Scolaro, A. Bergamo, L. Brescacin, R. Delfino, M. Cocchietto, G. Laurency, T.J. Geldbach, G. Sava, P.J. Dyson. *In Vitro and in Vivo Evaluation of Ruthenium(II)–Arene PTA Complexes*. *J. Med. Chem.* (2005) 48, 4161–4171.
28. F. Wang, A. Habtemariam, E. Van der Geer, R. Fernández, M. Melchart, R.J. Deeth, R. Aird, S. Guichard, F.P. Fabbiani, P. Lozano-Casal, I.D.H. Oswald, D. I. Jodrell, S. Parsons, P.J. Sadler. *Controlling ligand substitution reactions of organometallic complexes: Tuning cancer cell cytotoxicity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2005) 102, 18269–18274.



29. A. Habtemariam, M. Melchart, R. Fernandez, S. Parsons, I.D.H. Oswald, A. Parkin, F.P. Fabbiani, J.E. Davidson, A. Dawson, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.J. Sadler. *Structure–Activity Relationships for Cytotoxic Ruthenium(II) Arene Complexes Containing N,N-, N,O-, and O,O-Chelating Ligands*. *J. Med. Chem.* (2006) 49, 6858–6868.
30. A.F.A. Peacock, A. Habtemariam, R. Fernández, V. Walland, F. Fabbiani, S. Parsons, R.E. Aird, D.I. Jodrell, P.J. Sadler. *Tuning the Reactivity of Osmium(II) and Ruthenium(II) Arene Complexes under Physiological Conditions*. *J. Am. Chem. Soc.* (2006) 128, 739–1748.
31. P.C. Bruijninx, P. J. Sadler. *Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design*. *Adv. Inorg. Chem.* 2009, 61, 1–62.
32. Y.K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P.J. Sadler. *Organometallic chemistry, biology and medicine: ruthenium arene anticancer complexes*. *Chem. Commun.* (2005) 4764–4776.
33. G. Süß-Fink. *Arene ruthenium complexes as anticancer agents*. *Dalton Trans.* (2010) 39, 1673–1688.
34. A. Casini, C.G. Hartinger, A.A. Nazarov, P.J. Dyson. *Organometallic Antitumour Agents with Alternative Modes of Action*. *Top. Organomet. Chem.* 2010, 32, 57–80.
35. B.T. Loughrey, M.L. Williams, P.C. Healy, A. Innocenti, D. Vullo, C.T. Supuran, P.G. Parsons, S.A. Poulsen. *Novel organometallic cationic ruthenium(II) pentamethylcyclopentadienyl benzenesulfonamide complexes targeted to inhibit carbonic anhydrase*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009, 14, 935–945.
36. F. Gao, H. Chao, J.Q. Wang, Y.X. Yuan, B. Sun, Y.F. Wei, B. Peng, L.N. Ji, *Targeting topoisomerase II with the chiral DNA-intercalating ruthenium(II) polypyridyl complexes*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2007, 12, 1015–1027.

37. K.J. Du, J.Q. Wang, J.F. Kou, G.Y. Li, L.L. Wang, H. Chao, L.N. Ji. *Synthesis, DNA-binding and topoisomerase inhibitory activity of ruthenium(II) polypyridyl complexes*. Eur. J. Med. Chem. 2011, 46, 1056–1065.
38. C.F. Shaw III. *Gold-based therapeutic agents*. Chem. Rev. (1999) 99, 2589–2600.
39. P.J. Barnard, S.J. Berners-Price. *Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds*. Coord. Chem. Rev. (2007) 251, 1889–1902.
40. M. Deponte, S. Urig, L.D. Arscott, K. Fritz-Wolf, R. Réau, C. Herold-Mende, S. Koncarevic, M. Meyer, E. Davioud-Charvet, D.P. Ballou, C.H. Williams Jr., K. Becker. *Mechanistic Studies on a Novel, Highly Potent Gold-Phosphole Inhibitor of Human Glutathione Reductase*. J. Biol. Chem. (2005) 280, 20628–20637.
41. G. Powis, D.L. Kirkpatrick. *Thioredoxin signaling as a target for cancer therapy*. Curr. Opin. Pharmacol. (2007) 7, 392–397.
42. S. Urig, K. Fritz-Wolf, R. Réau, C. Herold-Mende, K. Tóth, E. Davioud-Charvet, K. Becker. *Undressing of phosphine gold(I) complexes as irreversible inhibitors of human disulfide reductases*. Angew. Chem. Int. Ed. (2006) 45, 1881–1886.
43. C.M. Che, R.W. Sun, W.Y. Yu, C.B. Ko, N. Zhu, H. Sun. *Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs: cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells*. Chem. Commun. (2003) 14, 1718–1719.
44. C. Ka-Lei Li, R. Wai-Yin Sun, S. Chi-Fai Kui, N. Zhu, C.-M. Che. *Anticancer cyclometalated  $[Au^{III}_m(C^AN^AC)_mL]^{n+}$  compounds: synthesis and cytotoxic properties*. Chem. Eur. J. (2006) 12, 5253–5266.
45. D. Saggioro, M.P. Rigobello, L. Paloschi, A. Folda, S.A. Moggach, S. Parsons, L. Ronconi, D. Fregona, A. Bindoli. *Gold(III)-dithiocarbamate complexes induce cancer cell*

*death triggered by thioredoxin redox system inhibition and activation of ERK pathway.* Chem. Biol. (2007) 14, 1128–1139.

46. C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, A. Guerri, M.A. Cinellu, G. Minghetti, M. Corsini, C. Rosani, P. Zanello, M. Arca. *Structural characterization, solution studies, and DFT calculations on a series of binuclear gold(III) oxo complexes: relationships to biological properties.* Inorg. Chem. (2008) 47, 2368–2379.

47. A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori. *Thioredoxin reductase: a target for gold compounds acting as potential anticancer drugs.* Coord. Chem. Rev. (2009) 253, 1692–1707.

48. J.J. Zhang, K.M. Ng, C.N. Lok, R.W. Sun, C.M. Che. *Deubiquitinases as potential anti-cancer targets for gold (III) complexes.* Chem Commun (2013) 49, 5153-5155.

49. S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché, G. Jaouen. *Synthesis, biochemical properties and molecular modelling studies of organometallic specific estrogen receptor modulators (SERMs), the ferrocifens and hydroxyferrocifens: evidence for an antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on both hormone-dependent and hormone-independent breast cancer cell lines.* Chemistry. (2003) 9, 5223-36.

50. A. Vessières, S. Top, P. Pigeon, E. Hillard, L. Boubeker, D. Spera, G. Jaouen. *Modification of the estrogenic properties of diphenols by the incorporation of ferrocene. Generation of antiproliferative effects in vitro.* J. Med. Chem. (2005) 48, 3937–3940.

51. E. Hillard, A. Vessières, L. Thouin, G. Jaouen, C. Amatore. *Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates.* Angew. Chem. Int. Ed. (2005) 45, 285–290.

52. P. Messina, E. Labbé, O. Buriez, E.A. Hillard, A. Vessières, D. Hamels, S. Top, G. Jaouen, Y.M. Frapart, D. Mansuy, C. Amatore. *Deciphering the activation sequence of ferrociphenol anticancer drug candidates*. *Chemistry* (2012) 18, 6581-6587.
53. Y.L. Tan, P. Pigeon, S. Top, E. Labbé, O. Buriez, E.A. Hillard, A. Vessières, C. Amatore, W.K. Leong, G. Jaouen. *Ferrocenyl catechols: synthesis, oxidation chemistry and anti-proliferative effects on MDA-MB-231 breast cancer cells*. *Dalton Trans.* (2012) 41, 7537-7549.
54. A. Citta, A. Folda, A. Bindoli, P. Pigeon, S. Top, A. Vessières, M. Salmain, G. Jaouen, M.P. Rigobello. *Evidence for targeting thioredoxin reductases with ferrocenyl quinone methides. A possible molecular basis for the antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on cancer cells*. *J. Med. Chem.* (2014) 57, 8849-8859.
55. Gérard Jaouen. *Bioorganometallics. Biomolecules, Labeling, Medicine*. (2006) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania.
56. Topics in Organometallic Chemistry. Volume 32. *Medicinal Organometallic Chemistry*. Gérard Jaouen y Nils Metzler-Nolte Editores. (2010) Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Alemania.
57. Gérard Jaouen y Michèle Salmain. *Bioorganometallic Chemistry: Applications in Drug Discovery, Biocatalysis and Imaging*. (2015) Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Alemania.

### **Antecedentes**

58. J. J. R. Fraústo da Silva, R. J. P. Williams. *The Biological Chemistry of the Elements. The Inorganic Chemistry of Life*. Segunda Edición. (2001) Oxford University Press. Oxford, Reino Unido. Cap. 15. Pag.388-399.

59. B. Halliwell, J. M. Gutteridge. *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. *Methods Enzymol.* 1990, 186, 1–85.
60. I. Haiduc, C. Silvestru. *Rhodium, iridium, copper and gold antitumor organometallic compounds*. *In Vivo.* (1989) 3, 285-93.
61. G. Zhao, L. Lin. *Metal complexes with aromatic N-containing ligands as potential agents in cancer treatment*. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* (2005), 5,137-147.
62. T. Wang, Z. Guo. *Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design*. *Curr. Med. Chem.* (2006), 13, 525-537.
63. C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, C. Santini. *Copper complexes as anticancer agents*. *Anticancer Agents Med. Chem.* (2009), 9, 185-211.
64. F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, C. Santini. *Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies*. *Med. Res. Rev.* (2010), 30, 708-749.
65. S.J. Tan, Y.K. Yan, P.P. Lee. K.H. Lim. *Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs*. *Future Med. Chem.* (2010), 2, 1591-1608.
66. L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gómez. *Copper compounds in cancer chemotherapy*. *Curr. Med. Chem.* (2010), 17, 3606-3615.
67. A.F. Weir. *Nucleases: An overview* en *Methods In Molecular Biology, Vol 16 Enzymes of Molecular Biology*. Editado por M. M. Burrell. 1993 Humana Press Inc, Totowa, NJ. EUA.
68. A. Pingoud, G.G. Wilson, W. Wendel. *Type II restriction endonucleases- a historical perspective and more*. *Nucleic Acids Research* (2014) 42, 7489–7527.
69. T. Nishino, K. Morikawa. *Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors*. *Oncogene.* (2002) 21, 9022-9032.
70. J.A. Cowan. *Chemical nucleases*. *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2001) 5, 634-642.

71. D.M. Perrin, A. Mazumder, D.S. Sigman. *Oxidative chemical nucleases*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. (1996) 52, 123-151.
72. B. Lippert. *From cisplatin to artificial nucleases--the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology*. Biometals (1992) 5, 195-208.
73. D.S. Sigman. *Chemical nucleases*. Biochemistry (1990) 29, 9097-9105.
74. Y. Aiba, J. Sumaoka, M. Komiyama. *Artificial DNA cutters for DNA manipulation and genome engineering*. Chem. Soc. Rev. (2011) 40, 5657-5668.
75. W.-W. Zhao, J.-J. Xu, H. -Y. Chen. *Photoelectrochemical DNA Biosensors* Chem. Rev. (2014) 114, 7421–7441.
76. D. Desbouis, I.P. Troitsky, M.J. Belousoff, L. Spiccia, B. Graham. *Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics*. Coord. Chem. Rev. (2012) 256, 897-937.
77. M. Pitié, G. Pratviel. *Activation of DNA Carbon–Hydrogen Bonds by Metal Complexes* Chem. Rev. (2010) 110, 1018–1059.
78. C. Wende, C. Lüdtkke, N. Kulak, *Copper Complexes of N-Donor Ligands as Artificial Nucleases*. Eur. J. Inorg. Chem. (2014) 16, 2597–2612.
79. G. Pratviel, J. Bernadou, B. Meunier. *Carbon–Hydrogen Bonds of DNA Sugar Units as Targets for Chemical Nucleases and Drugs*. Angew. Chemie Int. Ed. Eng. (1995) 34, 746–769.
80. F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, U. Tonellato. *Artificial metallonucleases*. Chem. Commun. (2005) 28, 2540-2548.
81. C. A. Chang, B. H. Wu, B.Y. Kuan. *Macrocyclic Lanthanide Complexes as Artificial Nucleases and Ribonucleases: Effects of pH, Metal Ionic Radii, Number of Coordinated Water Molecules, Charge, and Concentrations of the Metal Complexes*. Inorg. Chem. (2005) 44, 6646–6654.

82. A. Bencini y V. Lippolis. *1, 10-Phenanthroline: A versatile building block for the construction of ligands for various purposes*. *Coord. Chem. Rev.* (2010), 254, 2096-2180.
83. J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, F. Cortés-Guzman, L. Ruiz-Azuara. *Metal-Based Drug-DNA Interactions*. *J. Mex. Chem. Soc.* (2013), 57, 245-259.
84. L. Ruiz-Azuara, US Patent April 21 (1992), Number 5, 107, 005. US Patent Re35, 458, February 18 (1997). L. Ruiz-Azuara. US Patent No. 5, 576, 326. November 19 (1996).
85. M. Reina Tapia. *Síntesis, caracterización y evaluación antiproliferativa de compuestos ternarios de Cu(II) con diiminas y el ligante 2-aminometilbencimidazol*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2012.
86. C. P. Jiménez Ayala. *Síntesis y Caracterización de 5,6-dimetil-1,10-fenantrolina y sus derivados mixtos de Cobre (II)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2015.
87. A. de Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramírez, G. E. N. Kass, L. R. Kelland, R. M. Orr, M. Dobrota. *Induction of Apoptosis by a Novel Copper-based Anticancer Compound, Casiopeína II, in L1210 Murine Leukaemia and CH1 Human Ovarian Carcinoma Cells*. *Toxicol. in Vitro* (2000) 14, 1-5.
88. C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, *Casiopeínas IIgly and IIIia Induce Apoptosis in Medulloblastoma Cells*. *Pathol.Oncol. Res.* (2008) 14, 467-472.
89. M. E. Bravo-Gómez, S. Dávila-Manzanilla, J. Flood-Garibay, M. A. Muciño-Hernández, A. 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.* (2012), 56, 85-92.
90. R. Alemón-Medina, J.L. Muñoz-Sánchez, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora. *Casiopeína IIgly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide*. *Toxicol. in Vitro* (2008) 22, 710-715.

91. 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)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopéinas)*. J. Inorg. Biochem. (2009) 103, 299–309.
92. R. Kachadouriana, H. M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B.J. Day. *Casiopéina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells*. Toxicology (2010) 268,176–183.
93. 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: casiopéina II*. Toxicology (2003) 194, 103–113.
94. C. Trejo-Solís, G. Palencia, S. Zúñiga, A. Rodríguez-Ropón, L. Osorio-Rico, S. T. Luvia, I. Gracia-Mora, L. Márquez-Rosado, A. Sánchez, M. E. Moreno-García, A. Cruz, M. E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enríquez, J. Sotelo. *Cas IIgly Induces Apoptosis in Glioma C6 Cells In Vitro and In Vivo through Caspase-Dependent and Caspase-Independent Mechanisms*. Neoplasia (2005) 7, 563 –574.
95. 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. *Casiopéina IIIa induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo*. Biometals (2008) 21, 17–28.
96. J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sánchez, E. Reyes-Pérez, F. Velázquez-García, M. E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Azuara. *Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopéinas<sup>®</sup>*. Toxicol. in Vitro 2011, 25, 1376 –1384.



97. R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza.  *$\pi$ -Stacking between Casiopeinas and DNA bases*. Phys. Chem. Chem. Phys. (2011) 13, 14510–14515.
98. R. Galindo-Murillo, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Cortés-Guzmán. *Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex*. Phys. Chem. Chem. Phys. (2012) 14, 15539–15546.
99. 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 Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity*. J. Inorg. Biochem. (2012) 109, 49–56.
100. 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. Interac. (2007) 165, 189–199.
101. Y. Gavrieli, Y. Sherman, S.A. Ben-Sasson. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J. Cell. Biol. (1992) 119, 493-501.
102. B. Lipinski. *Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease*. Oxid. Med. Cell. Longev. (2011), Article ID 809696, doi:10.1155/2011/809696.
103. A. Acharya, I. Das, D. Chandhok, T. Saha, *Redox Regulation in Cancer: A Double-edged Sword with Therapeutic Potential*. Oxid. Med. Cell. Longev. (2010) 3, 23-34.
104. M.L. Circu, T.Y. Aw. *Reactive Oxygen Species, Cellular redox Systems and Apoptosis*. Free Radic. Biol. Med. (2010) 48, 749–762.
105. J.L. Franklin. *Redox Regulation of the Intrinsic Pathway in Neuronal Apoptosis*. Antioxid. Redox Sign. (2011) 14, 1437-1448.

106. J. Pourova, M. Kottova, M. Voprsalova, M. Pour. *Reactive oxygen and nitrogen species in normal physiological processes*. Acta Physiol. (2010) 198, 15-35.
107. S.W. Ryter, H.P. Kim, A. Hoetzel, J.W. Park, K. Nakahira, X. Wang, A.M. Choi. *Mechanisms of cell death in oxidative stress*. Antioxid.Redox Signal. (2007) 9, 49-89.
108. R.A. Roberts, R.A. Smith, S. Safe, C. Szabo, R.B. Tjalkens, F.M. Robertson. *Toxicological and pathophysiological roles of reactive oxygen and nitrogen species*. Toxicology (2010) 276, 85-94.
109. R. Alemón-Medina, M.E. Bravo-Gómez, M.I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara. *Comparison between the antiproliferative effect and intracellular glutathione depletion induced by Casiopeína IIgly and cisplatin in murine melanoma B16 cells*. Toxicol. in Vitro (2011) 25, 868-873.
110. R. Alemón-Medina, M. Breña-Valle, J.L. Muñoz-Sánchez, M.I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara. *Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®)*. Cancer Chemoth. Pharm. (2007) 60, 219-228.
111. S. C. Lu. *Regulation of Glutathione synthesis*. Mol. Aspects Med. (2009) 30, 42-59.
112. P.Y. Muller, M.N. Milton. *The determination and interpretation of the therapeutic index in drug development*. Nat. Rev. Drug Discov. (2012) 11, 751-761.
113. F. R. Carvalho Chaigneau. Efectos antiproliferativos y apopticos de las Casiopeínas<sup>(R)</sup> IIgli y III-ia en lineas tumorales humanas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. 2006.

## **Resultados y discusión**

114. M. A. Halcrow. *Jahn–Teller distortions in transition metal compounds and their importance in functional molecular and inorganic materials*. Chem. Soc. Rev. (2013) 42, 1784–1795.
115. A.M.Madalan, M.Andruh, N.Avarvari, M.Fourmigué. *Supramolecular Bimetallic Systems Constructed through  $\pi$ - $\pi$  Stacking and Hydrogen Bond Interactions*. Synth.React. Inorg. Met.-Org.Nano-Met. Chem. (2007) 37, 757-764.
116. A.M. Madalan, V.Ch. Kravtsov, D. Pajic, K. Zadro, Y.A. Simonov, N. Stanica, L. Ouahab, J. Lipkowski, M. Andruh. *Chemistry at the apical position of square-pyramidal copper(II) complexes: synthesis, crystal structures, and magnetic properties of mononuclear Cu(II), and heteronuclear Cu(II)–Hg(II) and Cu(II)–Co(II) complexes containing [Cu(AA)(BB)]<sup>+</sup> moieties (AA=acetylacetonate, salicylaldehydate; BB=1,10-phenanthroline, Me<sub>2</sub>bipy=4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)*. Inorg. Chim. Acta (2004), 357, 4151-4164.
117. X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza. *Mixed chelate complexes.II. Structures of L-alaninato(aqua)(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate*. Acta Cryst. C (1993) 49, 890-893.
118. Q.-H. Jin, L. Yang, X.-L. Xin, H.-W. Gao, J.-C. Dong, P.-Z. Li. *Crystal structure of aqua(phenanthroline-*N,N'*)(glycinato-*N,O*) copper(II) bromide hydrate [Cu(NH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COO)(C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>)(H<sub>2</sub>O)]Br · H<sub>2</sub>O*. Z. Kristallogr. New Cryst. Struct. (2006) 221, 383-384.
119. L. Gasque, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Medina-Dickinson. *(5,6-Dimethyl-1,10-phenanthroline)(nitrate)(salicylaldehydato)copper(II)* Acta Cryst. C (1999) 55, 1063-1065.

120. L. Gasque, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Medina-Dickinson. *Aqua(4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline)(salicylaldehydato)copper(II) nitrate monohydrate*. Acta Cryst. C (1999)55, 1065-1067.
121. B.J. Hathaway. *Copper* en Comprehensive Coordination Chemistry. The Synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds. Vol.5 Late Transition Elements. G. Wilkinson., R.D. Gillard, J.A. McCleverty Editores. Pergamon Press. 1987, Oxford, Reino Unido. Pg.594-744.
122. B. J. Hathaway, D.E. Billing. *The electronic properties and stereochemistry of mono-nuclear complexes of the copper(II) ion*. Coord. Chem. Rev. (1970) 5, 143-207.
123. J.C. García-Ramos. *Estudio QSAR de compuestos de coordinación de cobre de tipo [Cu(N-N)(glicinato)]NO<sub>3</sub>*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2007.
124. C.W. Lee, F.C. Anson. *Electron Exchange between Cu(phen)<sub>2</sub><sup>+</sup> adsorbed on graphite and Cu(phen)<sub>2</sub><sup>+</sup> in solution*. Inorg. Chem. (1984) 23, 837-844.
125. A.J. Bard, L.R. Faulkner. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*. 2a. Edición. John Wiley and Sons. Nueva York. Estados Unidos de América. (2001) 191-197.
126. E.A. Ambundo, M.-V. Deydier, A.J. Grall, N. Aguera-Vega, L.T. Dressel, T.H. Cooper, M.J. Heeg, L. A. Ochrymowycz, D. B. Rorabacher. *Influence of Coordination Geometry upon Copper(II/I) Redox Potentials. Physical Parameters for Twelve Copper Tripodal Ligand Complexes*. Inorg. Chem. (1999) 38, 4233–4242.
127. E. Craven, C. Zhang, C. Janiak, G. Rheinwald, H. Lang. *Synthesis, Structure and Solution Chemistry of (5, 5'-Dimethyl-2, 2'-bipyridine)(IDA)copper(II) and Structural Comparison With Aqua(IDA)(1, 10-phenanthroline)copper(II) (IDA = iminodiacetato)*. Z. Anorg. Allg. Chem. (2003) 629, 2282– 2290.

128. B.R. James, R.J.P. Williams. *The oxidation–reduction potentials of some copper complexes*. J. Chem. Soc. (1961) 2007-2019.
129. H. Sigel. *Ternary  $Cu^{2+}$  Complexes: Stability, Structure, and Reactivity*. Angew. Chem. Internat. Edit. (1975) 14, 394-402.
130. R. Griesser, H. Sigel. *Ternary complexes in solution. VIII. Complex formation between the copper(II)-2,2'-bipyridyl 1:1 complex and ligands containing oxygen and/or nitrogen donor atoms*. Inorg. Chem. (1970) 9, 1238-1243.
131. P.R. Huber, R. Griesser, H. Sigel. *Ternary complexes in solution. IX. Stability-increasing effect of the pyridyl and imidazole groups on the formation of mixed-ligand-copper(II)-pyrocatecholate complexes*. Inorg. Chem. (1971) 10, 945-947.
132. H. Sigel, P.R. Huber, R. Griesser, B. Prijs. *Ternary complexes in solution. XV. Mixed-ligand copper(II) complexes with 2,2'-bipyridyl or 1,10-phenanthroline and pyrocatecholate or derivatives thereof*. Inorg. Chem. (1973) 12, 1198-1200.
133. A. Ringbom. *Formación de complejos en química analítica*. Ed. Alhambra. 1979. Madrid, España. Pag 81-84.
- 134 B.C. Dunn, P. Wijetunge, J.R. Vyvyan, T.A. Howard, A.J. Grall, L. A. Ochrymowycz, D. B. Rorabacher. *Electron-Transfer Kinetics and Thermodynamic Characterization of Copper(II/I) Complexes with Acyclic Tetrathiaethers in Aqueous Solution*. Inorg. Chem. (1997) 36, 4484-4489.
135. J.P. Collman. *The Chemistry of Quasiaromatic Metal Chelates en Reactions of Coordinated Ligands and Homogeneous Catalysis*. Advances in Chemistry Series 37. ACS Editorial Library. Washington D.C. Estados Unidos de America. 1963. Capítulo 5. Pag.78-98.
136. D. Kilverson and R. Neiman. *ESR Studies on the Bonding in Copper Complexes*. J. Chem. Phys., 1961, 35, 149-155.

137. J. Peisach, W. E. Blumberg. *Structural implications derived from the analysis of electron paramagnetic resonance spectra of natural and artificial copper proteins*. Arch. Biochem. Biophys. (1974) 165, 691-708.
138. H. Yokoi. *ESR and Optical Absorption Studies of Various Bis(N-salicylidenealkylamino) copper(II) Complexes with Tetrahedrally Distorted Coordination Geometry*. Bull. Chem. Soc. Jpn. (1987) 47, 3037-3040.
139. H. Yokoi, A.W. Addison. *Spectroscopic and redox properties of pseudotetrahedral copper(II) complexes. Their relation to copper proteins*. Inorganic Chemistry, (1977) 16, 1341-1349.
140. A. Gembus, B. Corzilius, R.-A. Eichel, K.-P. Dinse, S. Immel, D. Stumm, M. Flauaus, H. Plenio. *Electron Paramagnetic Resonance Structure Investigation of Copper Complexation in a Hemicarcerand*. J. Phys. Chem. B (2006) 110, 15012-15020.
141. W.L. Kwik, P. Ang, G. Chen. *Complexes of (2,2'-bipyridyl) copper(II) and (1,10-phenanthroline) copper(II) with some amino acids*. J. Inorg. Nucl. Chem. (1980) 42, 303-313.
142. T. Sawada, K. Fukumaru, H. Sakurai. *Coordination-Dependent ESR Spectra of Copper(II) Complexes with a CuN<sub>4</sub> Type Coordination Mode : Relationship between ESR Parameters and Stability Constants or Redox Potentials of the Complexes*. Chem. Pharm. Bull. (1996) 44, 1009-1016.
143. A. W. Addison, M. Carpenter, L.K.-M. Lau, M. Wicholas. *Coordination sphere flexibility at copper: chemistry of a unipositive copper(II) macrocycle, [Cu(cyclops)]<sup>+</sup>*. Inorg. Chem. (1978), 17, 1545-1552.
144. C-C. Su, Y.-L. Liu, T-H. Chang, S.-L. Wang, F.-L. Liao. *Bonding properties of copper(II)—N chromophores: Molecular and electronic structures of copper(II) complexes*

containing ethylenediamine and heterocyclic diimine ligands. *Polyhedron*, 1993, 12, 2687-2696.

145. R. C. Chikate, A.R. Belapure, S. B. Padhye, D. X. West. *Transition metal quinone–thiosemicarbazone complexes I: Evaluation of EPR covalency parameters and redox properties of pseudo-square-planar copper(II)–naphthoquinone thiosemicarbazones*. *Polyhedron* (2005) 24, 889–899.

146. H. A. Kuska, M. T. Rogers, R. E. Drullinger. *Effect of substituents on the anisotropic electron spin resonance parameters in copper acetylacetonates*. *J. Phys. Chem.* (1967) 71, 109-114.

147. A. H. Maki, B. R. McGarvey. *Electron Spin Resonance in Transition Metal Chelates. II. Copper(II) Bis-Salicylaldehyde-Imine*. *J. Chem. Phys.* (1958) 29, 35-38.

148. A. H. Maki, B. R. McGarvey. *Electron Spin Resonance in Transition Metal Chelates. I. Copper (II) Bis-Acetylacetonate*. *J. Chem. Phys.* (1958) 29, 31-35.

149. K. E. Falk, E. Ivanova, B. Roos, T. Vännngård. *Electron paramagnetic resonance study of copper(II) dimethylglyoxime. I. Theoretical and experimental study of the effect of axial ligands*. *Inorg. Chem.* (1970) 9, 556-562.

150. B. Roos. *A Theoretical Investigation of the Electronic Structure of the Normal and Excited States of Copper Dimethylglyoxime and its Adducts with Water and Amines*. *Acta Chem. Scand.* (1967) 21, 1855-1870.

151. B.J. Hathaway. *The evidence for “out-of-the-plane” bonding in axial complexes of the copper(II) ion*. *Struct. Bond.* (1973) 14, 49-67.

152. R.K. Ray, G.B. Kauffman. *An EPR study of some copper(II) coordination compounds of substituted biguanides. Part IV*. *Inorg.Chim. Acta* (1990) 174, 257-262.

153. R. F. W. Bader, H. Essien. *The characterization of atomic interactions*. J. Chem. Phys. (1984) 80, 1943–1960.
154. R. F. W. Bader, A. Streitwieser, A. Neuhaus, K. E. Laidig, P. Speers. *Electron Delocalization and the Fermi Hole*. J. Am. Chem. Soc. (1996) 118, 4959–4965.
155. C. F. Matta. *Modeling biophysical and biological properties from the characteristics of the molecular electron density, electron localization and delocalization matrices, and the electrostatic potential*. J. Comput. Chem. (2014) 35, 1165–1198.
156. E. Matito, M. Solà. *The role of electronic delocalization in transition metal complexes from the electron localization function and the quantum theory of atoms in molecules viewpoints*. Coord. Chem. Rev. (2009) 253, 647–665.
157. P. Macchi, P. Sironi. *Chemical bonding in transition metal carbonyl clusters: complementary analysis of theoretical and experimental electron densities*. Coord. Chem. Rev. (2003) 238, 383–412.
158. F. Cortés-Guzmán, R. F. W. Bader. *Complementarity of QTAIM and MO theory in the study of bonding in donor–acceptor complexes*. Coord. Chem. Rev. (2005) 249, 633–662.
159. J.C. García-Ramos, R. Galindo-Murillo, A. Tovar-Tovar, A.L. Alonso Saenz, V. Gómez-Vidales, M. Flores-Alamo, L. Ortiz-Frade, F. Cortés-Guzmán, R. Moreno-Esparza, A. Campero, L. Ruiz-Azuara. *The  $\pi$ -backbonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu(II) Antineoplastic compounds: Casiopeínas: An experimental and Theoretical study*. Chem.-Eur. J. (2014) 20, 13730-13741.
160. G. Starkebaum, R.K. Root. *D-Penicillamine: analysis of the mechanism of copper-catalyzed hydrogen peroxide generation*. J. Immunol. (1985) 134, 3371-3378.



161. S. Goldstein, G. Czapski. *Mechanisms of the dismutation of superoxide catalyzed by the copper(II) phenanthroline complex and of the oxidation of the copper(I) phenanthroline complex by oxygen in aqueous solution*. J. Am. Chem. Soc. (1983) 105, 7276–7280.
162. S. Goldstein, G. Czapski. *Mechanisms of the reactions of some copper complexes in the presence of DNA with superoxide, hydrogen peroxide, and molecular oxygen*. J. Am. Chem. Soc. (1986) 108, 2244–2250.
163. S. Goldstein, G. Czapski, R. Van Eldik, H. Cohen, D. Meyerstein. *Determination of the volume of activation of the key reaction steps in the oxidation of phenanthroline-copper(I) by molecular oxygen*. J. Phys. Chem. (1991) 95, 1282–1285.
164. A. L. Alonso Saenz. *Estudio de la reactividad de la casiopeína IIgly y casiopeína III-Ia cisteína, glutatión y 2-mercaptoetanol*. 2013. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
165. C.C. Winterbourn. *Radical Scavenging by thiols and the Fate of Thiyl Radicals en Oxidative Stress and Redox Regulation*. U. Jakob, D. Reichmann Editores. Springer, Dordrecht, Alemania. 2013. Página 49.
166. E.L. Klein, M.A. Khan, R.P. Houser. *Synthesis, Characterization, and Reactivity of New Copper(II) Complexes of 2-Methylthio-N-(2-pyridylmethyl)acetamide*. Inorg. Chem. (2004) 43, 7272-7274.
167. J. M. Downes, J. Whelan, B. Bosnich. *Biological analogs. Spectroscopic characteristics of mercapto- and disulfide-copper(II) coordination in relation to type I proteins*. Inorg. Chem. (1981) 20, 1081–1086.
168. O. Mozziconacci, T. D. Williams, C. Schöneich. *Intramolecular hydrogen transfer reactions of thiyl radicals from glutathione: formation of carbon-centered radical at Glu, Cys and Gly*. Chem. Res. Toxicol. (2012) 25, 1842–1861.

169. B. H. J. Bielski, D.E. Cabelli, R.L. Arudi, A.B. Ross. *Reactivity of  $HO_2/O_2^-$  Radicals in Aqueous Solution*. J. Phys. Chem. Ref. Data (1985) 14, 1041-1100.
170. B. Halliwell, J.M. Gutteridge. *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*. Biochem. J. (1984) 219, 1–14.
171. H. Speisky, M. Gómez, F. Burgos-Bravo, C. López-Alarcón, C. Jullian, C. Olea-Azar, M.E. Aliaga. *Generation of superoxide radicals by copper–glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione*. Bioorg. Med. Chem. (2009) 17, 1803-1810.
172. H.P. Mirsa. *Generation of superoxide free radical during the autooxidation of thiols*. J. Biol. Chem. (1974) 249, 2151-2155.
173. J. Sánchez Costa, N.A. G. Bandeira, B. Le Guennic, V. Robert, P. Gamez, G. Chastanet, L. Ortiz-Frade, L. Gasque. *Coexistence of Intramolecular Ligand-Mediated and Through Hydrogen-Bond Magnetic Interactions in a Chain of Dicopper(II) Units*. Inorg. Chem. (2011) 50, 5696–5705.
174. E. Monzani, L. Quinti, A. PROStti, L. Casella, M. Gullotti, L. Randaccio, S. Geremia, G. Nardin, P. Faleschini, G. Tabbi. *Tyrosinase Models. Synthesis, Structure, Catechol Oxidase Activity, and Phenol Monooxygenase Activity of a Dinuclear Copper Complex Derived from a Triamino Pentabenzimidazole Ligand*. Inorg. Chem. (1998) 37, 553–562.
175. S. K. Mandal, L. K. Thompson, M. J. Newlands, E. J. Gabe, F. L. Lee. *Binuclear metallacyclic copper(II) complexes with a large unoccupied cavity derived from a tetradentate, nonmacrocyclic polyhydroimidazole ligand*. Inorg. Chem. (1990) 29, 3556–3561.
176. S. S. Tandon, L. K. Thompson, J. N. Bridson, J. C. Dewan. *Dinuclear copper(II) and cobalt(II) complexes of the tetradentate ligand 1,2,4,5-tetrakis(benzimidazol-2-yl)benzene (BTBI): metallacyclic and nonmetallacyclic derivatives. X-ray crystal structures of*

$[Cu_2(BTBI)_2Cl_2][Cu_2(BTBI)Cl_2(DMF)_4]Cl_4 \cdot 12DMF$  and  $[Co_2(BTBI)Br_4] \cdot 4DMF$ . Inorg. Chem. (1994) 33, 54–61.

177. F. Bentiss, M. Lagreneé, O. Mentré, P. Conflant, Hervé Vezin, J.P. Wignacourt, E.M. Holt. *Intermolecular Magnetic Couplings in the Dinuclear Copper(II) Complex  $\mu$ -Chloro- $\mu$ -[2,5-bis(2-pyridyl)-1,3,4-thiadiazole] Aqua Chlorocopper(II)Dichlorocopper(II): Synthesis, Crystal Structure, and EPR and Magnetic Characterization*. Inorg. Chem. (2004) 43, 1865-1873.

178. X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, *Mixed chelate complexes. III. Structures of (L-alaninato)(aqua)(2,2'-bipyridine)copper(II) nitrate monohydrate and aqua(2,2'-bipyridine)(L-tyrosinato)copper(II) chloride trihydrate*. Acta Crystallogr. C (1992), 48, 1785-1788.

179. X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, J.L. Brioso. *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. C (1988) 44, 628-631.

180. H.J. Zhao, M.-X. Li, M. Shao, H.J. Liu. *Aqua-(L-aspartato-[kappa]2N,O)(2,2'-bipyridine-[kappa]2N,N)copper(II) penta-hydrate*. Acta Crystallogr. E (2006) 62, m965-m967.

181. D.K. Saha, S. Padhye, C.E. Anson, A.K. Powell. *Antimycobacterial activity of mixed-ligand copper quinolone complexes*. Trans. Metal Chem. (2003) 28, 579-584.

182. A.K. Patra, M. Nethaji, A.R. Chakravarty. *Red-light photosensitized cleavage of DNA by (L-lysine)(phenanthroline base)copper(II) complexes*. Dalton Trans. (2005) 2798- 2804.

183. S. Ciattini, F. Constantino, P. Lorenzo-Luis, S. Midollini, A. Orlandini, A. Vaca. *Inorganic–Organic Hybrids Formed by P,P'-Diphenylmethylenediphosphate, pcp<sub>2</sub>, with*

- the Cu<sup>2+</sup> Ion. X-ray Crystal Structures of [Cu(pcp)(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O and [Cu(pcp)(bipy)(H<sub>2</sub>O)].* Inorg. Chem. (2005) 44, 4008-4016.
184. W. Fitzgerald, J. Foley, D. McSweeney, N. Ray, D. Sheahan, S. Tyagi, B. Hathaway, P. O'Brien. *Electronic properties and crystal structure of (2,2'-bipyridyl)-catena-μ-(oxalato-O<sup>1</sup>O<sup>2</sup>: O<sup>1</sup>O<sup>2</sup>)-copper(II) dihydrate and aqua(2,2'-bipyridyl)-(oxalato-O<sup>1</sup>O<sup>2</sup>)copper(II) dehydrate.* J. Chem. Soc. Dalton Trans. (1982) 1117-1121.
185. G.H. Cui, J.R. Li, T.-L. Hu, X.H. Bu. *Synthesis, characterization and crystal structures of two discrete Cu(II) complexes with mixed-ligands: [Cu(mal)(L)(H<sub>2</sub>O)]·H<sub>2</sub>O and [Cu(Phmal)(L)<sub>2</sub>] (mal=malonate dianion, phmal=phenylmalonate dianion and L=5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine).* J. Mol. Struct. (2005) 738, 183-187.
186. A.K. Patra, S. Dhar, M. Nethaji, A.R. Chakravarty. *Metal-assisted red light-induced DNA cleavage by ternary L-methionine copper(II) complexes of planar heterocyclic bases.* Dalton Trans. (2005) 896-902.
187. A. Tovar-Tovar, L. Ruiz-Ramírez, A. CampROS, A. RomROSsa, 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. (2004) 98, 1045-1053.
188. C. Janiak. *A critical account on π-π stacking in metal complexes with aromatic nitrogen-containing ligands.* J. Chem. Soc. Dalton Trans. (2000) 1, 3885-3896.
189. E.A. Meyer, R.K. Castellano, F. Diederich. *Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition.* Angew.Chem. Int. Ed. (2003) 42, 1210-1250.
190. P. Hobza, J. Šponer. *Structure, Energetics, and Dynamics of the Nucleic Acid Base Pairs: Nonempirical Ab Initio Calculations.* Chem. Rev. (1999) 99, 3247-3276.

191. Y. Zhao, D.G. Truhlar. *Density Functionals for Noncovalent Interaction Energies of Biological Importance*. J. Chem. Theory Comput. (2007) 3, 289-300.
192. 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 Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. 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, D.J. Fox, GAUSSIAN 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
193. Y. Jeanvoine, R. Spezia. *Cu<sup>2+</sup> binding chalcogen–chalcogen bridges: A problematic case for DFT*. J. Mol. Struct.: (THEOCHEM) (2010) 954, 7-15.
194. AIMALL (Version 10.03.25), Todd A. Keith, 2010 (aim.tkgristmill.com).
195. R.F.W. Bader. *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, England, 1990.
196. H. Masuda, O. Yamauchi. *A structural basis for nucleic base–metallointercalator Interactions: crystal structure of [Pt(2,2'-bipyridine)(ethylenediamine)]·AMP·10H<sub>2</sub>O (AMP = adenosine 5'-monophosphate)*. Inorg.Chim. Acta (1987) 136, L29-L31;
197. O. Yamauchi, A. Odani, R. Shimata, Y. Kosaka. *Spectroscopic evidence for stacking and electrostatic interactions between nucleoside 5'-monophosphates and a platinum DNA*

*intercalator, (2,2'-bipyridine)(ethylenediamine)platinum(II) in dilute aqueous solution.* Inorg. Chem. (1986) 25, 3337-3339.

198. P. Hohenberg, W. Kohn. *Inhomogeneous Electron Gas.* Phys. Rev. (1964) 136, B864-B871.

199. 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) mixedchelate complex (Casiopéina III-ia) and adenine.* Polyhedron (2011) 30, 2697-2703.

200. R.W. Duerst, S.J. Baum, G.F. Kokoszka. *Exchange Coupling in Two Dimeric Copper Adenine Complexes.* Nature (1969) 222, 665 – 666.

201. J. Thomas-Gipson, G. Beobide, O. Castillo, J. Cepeda, A. Luque, S. Pérez-Yáñez, A. T. Aguayo, P. Román. *Porous supramolecular compound based on paddle-wheel shaped copper(II)-adenine dinuclear entities.* CrystEngComm (2011)13, 3301-3305.

202. J. Thomas-Gipson, G. Beobide, O. Castillo, M. Fr. ba, F. Hoffmann, A. Luque, S. Pérez-Yáñez, P. Román. *Paddle-Wheel Shaped Copper(II)-Adenine Discrete Entities As Supramolecular Building Blocks To Afford Porous Supramolecular Metal–Organic Frameworks (SMOFs).* Cryst. Growth Des. (2014) 14, 4019–4029.

203. C. Jia, J. Wang, X. Feng, Q. Lin, W. Yuan. *Efficient vapour-assisted aging and liquid-assisted grinding synthesis of a microporous copper-adeninate Framework.* CrystEngComm (2014) 16, 6552-6255.

204. E. Bugella-Altamirano, D. Choquesillo-Lazarte, J.M. González-Pérez, M.J. Sánchez-Moreno, R. Marín-Sánchez, J.D. Martín-Ramos, B. Covelo, R. Carballo, A. Castiñeiras, J. Niclós-Gutiérrez. *Three new modes of adenine-copper(II) coordination: interligand interactions controlling the selective N3-, N7- and bridging  $\mu$ -N3, N7/metal-bonding of*

- adenine to different N substituted iminodiacetato-copper(II) chelates. Inorg. Chim. Acta (2002) 339, 160-170.*
205. D. Kumar Patel, A. Domínguez-Martín, M.P. Brandi-Blanco, D. Choquesillo-Lazarte, V. Marina Nurchi, J. Niclós-Gutiérrez. *Metal ion binding modes of hypoxanthine and xanthine versus the versatile behaviour of adenine. Coord. Chem. Rev. (2012) 256, 193-211.*
206. M.J. Waring. *Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. J. Mol. Biol. 13 (1965) 269–282.*
207. M.F. Reichmann, C.A. Rice, C.A. Thomas, P. Doty. *A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid. J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 3047–3053.*
208. J.M. Kelly, A.B. Tossi, D.J. McConnell, C. Ohuigin. *A study of the interactions of some polypyridylruthenium(II) complexes with DNA using fluorescence spectroscopy, topoisomerisation and thermal denaturation. Nucleic Acids Res. 13 (1985) 6017–6034.*
209. K.E. Erkkila, D.T. Odom, J.K. Barton. *Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. Chem. Rev. (1999) 99, 2777–2795.*
210. A.M. Pyle, J.P. Rehmman, R. Meshoyrer, C.V. Kumar, N.J. Turro, J.K. Barton. *Mixed-ligand complexes of ruthenium(II): factors governing binding to DNA. J. Am. Chem. Soc. (1989) 111, 3051–3058.*
211. H. Chao, W.J. Mei, Q.W. Huang, L.N. Ji. *DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. J. Inorg. Biochem. (2002) 92, 165-170.*
212. E.C. Long, J.K. Barton. *On demonstrating DNA intercalation. Acc. Chem. Res. (1990) 23, 271–273.*
213. L.P. Lu, M.L. Zhu, P. Yang. *Crystal structure and nuclease activity of mono(1,10-phenanthroline) copper complex. J. Inorg. Biochem. (2003) 95, 31–36.*

214. R.F. Pasternack, E.J. Gibbs, J.J. Villafranca. *Interactions of porphyrins with nucleic acids*. *Biochemistry* 22 (1983) 2406–2414.
215. A. Wolfe, G.H. Shimer, T. Meehan. *Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA*. *Biochemistry* (1987) 26, 6392–6396.
216. M. Chikira, Y. Tomizawa, D. Fukita, T. Sugizaki, N. Sugawara, T. Yamazaki, A. Sasano, H. Shindo, M. Palaniandavar, W. 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) 89, 163–173.
217. M. Chikira. *DNA-fiber EPR spectroscopy as a tool to study DNA-metal complex interactions: DNA binding of hydrated Cu(II) ions and Cu(II) complexes of amino acids and peptides*. *J Inorg. Biochem.* (2008) 102, 1016-1024.
218. A. Terenzi, L. Tomasello, A. Spinello, G. Bruno, C. Giordano, G. Barone. *(Dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine)(glycinato)copper(II) perchlorate: A novel DNA-intercalator with anti-proliferative activity against thyroid cancer cell lines*. *J. Inorg. Biochem.* (2012)117, 103-110.
219. P. R. Reddy, N. Raju. *Synthesis and characterization of novel square planar copper(II)–dipeptide–1,10-phenanthroline complexes: Investigation of their DNA binding and cleavage properties*. *Polyhedron* (2012) 44, 1–10.
220. K. Abdi, H. Hadadzadeh, M. Salimi, J. Simpson, A.D. Khalaji. *A mononuclear copper(II) complex based on the polypyridyl ligand 2,4,6-tris(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (tptz), [Cu(tptz)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup>: X-ray crystal structure, DNA binding and in vitro cell cytotoxicity*. *Polyhedron*, (2012) 44, 101-112.



221. A.K. Patra, M. Nethaji, A.R. Chakravarty. *Synthesis, crystal structure, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity of (S-methyl-L-cysteine)copper(II) complexes of heterocyclic bases*. J. Inorg. Biochem. (2007) 101, 233-244.
222. P. Jaividhya, R. Dhivya, M. A. Akbarsha, M. Palaniandavar. *Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper(II) phenolate complexes: The role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity*. J. Inorg. Biochem. (2012) 114, 94-105.
223. S. Tabassum, W.M. Al-Asbahy, M. Afzal, F. Arjmanda, V. Bagchib. *Molecular drug design, synthesis and structure elucidation of a new specific target peptide based metallo drug for cancer chemotherapy as topoisomerase I inhibitor*. Dalton Trans. (2012) 41, 4955–4964.
224. P.R. Reddy, P. Manjula. *Mixed-ligand copper(II)-phenanthroline-dipeptide complexes: synthesis, characterization, and DNA-cleavage properties*. Chem. Bio. 4 (2007) 468–480.
225. Y. Ding, X.X. Ren, C.X. Zhuang, X.Y. Le, Chin. J. Inorg. Chem. 25 (2009) 656–662.
226. V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V.S. Periasamy, M.A. Akbarsha, B.S. Srinag, H. Krishnamurthy. *Mixed-Ligand Copper(II)-phenolate Complexes: Effect of Coligand on Enhanced DNA and Protein Binding, DNA Cleavage, and Anticancer Activity*. Inorg. Chem. (2007) 46, 8208-8221.
227. A. Pal, B. Biswas, S.K. Mondal, C.-H. Lin, R. Ghosh. *Copper(II) complexes with neutral Schiff bases: Syntheses, crystal structures and DNA interactions*. Polyhedron (2012) 31, 671–675.
228. J. Ravichandran, P. Gurumoorthy, M.A. Imran Musthafa, A. Kalilur Rahiman. *Antioxidant, DNA binding and nuclease activities of heteroleptic copper(II) complexes derived from 2-((2-(piperazin-1-yl)ethylimino)methyl)-4-substituted phenols and diimines*. Spectrochim. Acta A (2014) 133, 785-793.

229. R. Senthil Kumar, S. Arunachalam. *DNA binding and antimicrobial studies of some polyethyleneimine-copper(II) complex samples containing 1,10-phenanthroline and l-threonine as co-ligands*. Polyhedron (2007) 26, 3255–3262.
230. X.-B. Fu, Z.-H. Lin, H.-F. Liu, X.-Y. Le. *A new ternary copper(II) complex derived from 2-(2'-pyridyl)benzimidazole and glycylglycine: Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, antioxidation and HSA interaction*. Spectrochim. Acta A. (2014) 122, 22-33.
231. D. İnci, R. Aydın, D. Yılmaz, H. M. Gençkal, Ö. Vatan, N. Çinkılıç, Y. Zorlu. *New water-soluble copper (II) complexes including 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline and l-tyrosine: Synthesis, characterization, DNA interactions and cytotoxicities*. Spectrochim. Acta A (2015) 136, 761-770.
232. Q.-Q. Zhang, F. Zhang, W.-G. Wang, X.-L. Wang. *Synthesis, crystal structure and DNA binding studies of a binuclear copper(II) complex with phenanthroline*. J. Inorg. Biochem. (2006) 100, 1344-1352.
233. T. Gupta, S. Dhar, M. Nethaji, A.R. Chakravarty. *Bis(dipyridophenazine)copper(II) complex as major groove directing synthetic hydrolase*. Dalton Trans. (2004) 1896-1900.
234. S. Zhang, Y. Zhu, C. Tu, H. Wei, Z. Yang, L. Lin, J. Ding, J. Zhang, Z. Guo. *A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity*. J. Inorg. Biochem. (2004) 98, 2099-2106.
235. L. Li, Q. Guo, J. Dong, T. Xu, J. Li. *DNA binding, DNA cleavage and BSA interaction of a mixed-ligand copper(II) complex with taurine Schiff base and 1,10-phenanthroline*. J. Photoch. Photobio. B (2013) 125, 56–62.
236. J. Li, J. Dong, H. Cui, T. Xu, L. Li. *A copper(II) complex of the Schiff base from L-valine and 2-hydroxy-1-naphthalidene plus 1,10-phenanthroline: synthesis, crystal structure, and DNA interaction*. Trans. Met. Chem. (2012) 37, 175–182.

237. J. Dong, L. Li, G. Liu, T. Xu, D. Wang. *Synthesis, crystal structure and DNA binding properties of a new copper(II) complex with L-valine Schiff base and 1,10-phenanthroline*. J. Mol. Struct. (2011) 986, 57–63.
238. L. Jia, P. Jiang, J. Xu, Z.-Y. Hao, X.-M. Xu, L.-H. Chen, J.-C. Wu, N. Tang, Q. Wang, J. J. Vittal. *Synthesis, crystal structures, DNA-binding properties, cytotoxic and antioxidation activities of several new ternary copper(II) complexes of N,N'-(p-xylylene)di-alanine acid and 1,10-phenanthroline*. Inorg. Chim. Acta (2010) 363, 855–865.
239. J.Z. Wu, L. Yuan, J.F. Wu. *Synthesis and DNA binding of  $\mu$ -[2,9-bis(2-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)-1,10-phenanthroline]bis[1,10-phenanthrolinecopper(II)]*. J. Inorg. Biochem. (2005) 99, 2211–2216.
240. D. İnci, R. Aydın, Ö. Vatan, D. Yılmaz, H. M. Gençkal, Y. Zorlu, T. Cavaş. *Binary and ternary new water soluble copper(II) complexes of l-tyrosine and substituted 1,10-phenanthrolines: Effect of substitution on DNA interactions and cytotoxicities*. Spectrochim. Acta A (2015) 145, 313–324.
241. X. Liu, X. Li, Z. Zhang, Y. Dong, P. Liu, C. Zhang. *Studies on Antibacterial Mechanisms of Copper Complexes with 1, 10-phenanthroline and Amino Acid on Escherichia coli*. Biol. Trace Elem. Res. (2013) 154, 150–155.
242. P.R. Reddy, P. Manjula. *Synthesis, Characterization, and DNA-Binding Studies of Mononuclear Copper(II)–Phenanthroline–Tyrosine Complex*. Chem. Biodivers. (2009) 6, 71–78.
243. S. Ramakrishnan, V. Rajendiran, M. Palaniandavar, V.S. Periasamy, B.S. Srinag, H. Krishnamurthy, M. Abdulkader, Akbarsha. *Induction of Cell Death by Ternary Copper(II) Complexes of l-Tyrosine and Diimines: Role of Coligands on DNA Binding and Cleavage and Anticancer Activity*. Inorg. Chem. (2009) 48, 1309–1322.

244. Z. Yang, Y. Wang, G. Yang. *Copper (II) complex of 1,10-phenanthroline and l-tyrosine with DNA oxidative cleavage activity in the gallic acid*. *Biometals* (2011) 24, 737-745.
245. S. Dey, T. Mukherjee, S. Sarkar, H.S. Evans, P. Chattopadhyay. *5-Nitro-1,10-phenanthroline bis(N,N-dimethylformamide-K'O)-bis(perchlorato) copper(II): synthesis, structural characterization, and DNA-binding study*. *Trans. Met.Chem.* (2011) 36, 631-636.
246. M.N. Patel, D.S. Gandhi, P.A. Parmar. *Synthesis, biological aspects and SOD mimic activity of square pyramidal copper(II) complexes with the 3rd generation quinolone drug sparfloxacin and phenanthroline derivatives*. *Inorg.Chem. Commun.* (2011) 14, 128-132.
247. R.S. Kumar, S. Arunachalam. *DNA binding and antimicrobial studies of polymer-copper(II) complexes containing 1,10-phenanthroline and l-phenylalanine ligands*. *Eur. J. Med. Chem.* (2009) 44, 1878-1883.
248. S. Iglesias, N. Alvarez, M.H. Torre, E. Kremer, J. Ellena, R.R. Ribeiro, R.P. Barroso, A.J. Costa-Filho, M. G. Kramer, G. Facchin. *Synthesis, structural characterization and cytotoxic activity of ternary copper(II)-dipeptide-phenanthroline complexes. A step towards the development of new copper compounds for the treatment of cancer*. *J. Inorg. Biochem.* (2014) 139, 117-123.
249. C. Rajarajeswari, M. Ganeshpandian, M. Palaniandavar, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha. *Mixed ligand copper(II) complexes of 1,10-phenanthroline with tridentate phenolate/pyridyl/(benz)imidazolyl Schiff base ligands: Covalent vs non-covalent DNA binding, DNA cleavage and cytotoxicity*. *J. Inorg. Biochem.* (2014) 140,255-268.
250. S. Ramakrishnan, M. Palaniandavar. *Mixed-ligand copper(II) complexes of dipicolylamine and 1,10-phenanthrolines: The role of diimines in the interaction of the complexes with DNA*. *J. Chem. Sci.* (2005) 117, 179-186.

251. B. Selvakumar, V. Rajendiran, P. Uma Maheswari, H.S. Evans, M. Palaniandavar. *Structures, spectra, and DNA-binding properties of mixed ligand copper(II) complexes of iminodiacetic acid: The novel role of diimine co-ligands on DNA conformation and hydrolytic and oxidative double strand DNA cleavage.* J. Inorg. Biochem. (2006) 100, 316-330.
252. S. Ramakrishnan, V. Rajendiran, M. Palaniandavar, V.S. Periasamay, M.A. Akbarsha, B.S. Srinag, H. Krishnamurthy. *Induction of Cell Death by Ternary Copper(II) Complexes of l-Tyrosine and Diimines: Role of Coligands on DNA Binding and Cleavage and Anticancer Activity.* Inorg. Chem. (2009) 48, 1309–1322.
253. M. Ganeshpandian, R. Loganathan, S. Ramakrishnan, A. Riyasdeen, M.A. Akbarsha, M. Palaniandavar. *Interaction of mixed ligand copper(II) complexes with CT DNA and BSA: Effect of primary ligand hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and anticancer activities.* Polyhedron (2013) 52, 924–938.
254. R. Galindo-Murillo, J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, T. E. Cheatham III, F. Cortés-Guzmán. *Intercalation processes of copper complexes in DNA.* Nucleic Acids Res. (2015) 43, 5364-5376.
255. D.S. Sigman, A. Mazumder, D.M. Perrin. *Chemical Nucleases.* Chem. Rev. (1993) 93, 2295-2316.
256. W. K. Pogozelski, T. D. Tullius. *Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety.* Chem. Rev. (1998) 98, 1089-1108.
257. B. Balasubramanian, W.K. Pogozelski, T.D. Tullius. *DNA strand breaking by the hydroxyl radical is governed by the accessible surface areas of the hydrogen atoms of the DNA backbone.* Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1998) 95, 9738-9743.
258. T. Oyoshi, H. Sugiyama. *Mechanism of DNA Strand Scission Induced by (1,10-Phenanthroline)copper Complex: Major Direct DNA Cleavage Is Not through 1',2-*

- Dehydronucleotide Intermediate nor  $\beta$ -Elimination of Forming Ribonolactone.* J. Am. Chem. Soc. 2000, 122, 6313-6314.
259. M. M. Meijler, O. Zelenko, D.S. Sigman. *Chemical Mechanism of DNA Scission by (1, 10-Phenanthroline)copper. Carbonyl Oxygen of 5-Methylenefuranone Is Derived from Water.* J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 1135-1136.
260. L. Becco, J.C. García-Ramos, L. Ruiz-Azuara, D. Gambino, B. Garat. *Analysis of the DNA Interaction of Copper compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series.* Biol. Trace Elem. Res. (2014), 161, 210-215.
261. K.K. Matthay, J.G. Villablanca, R.C. Seeger, D.O. Stram, R.E. Harris, N.K. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C.T. Black, G.M. Brodeur, R.B. Gerbing, C.P. Reynolds. *Treatment of High-Risk Neuroblastoma with Intensive Chemotherapy, Radiotherapy, Autologous Bone Marrow Transplantation, and 13-cis-Retinoic Acid.* N. Engl. J. Med. 341 (1999) 1165–1173.
262. A.G. Gutiérrez Rodríguez. *Apoptosis mediante especies reactivas de oxígeno en el neuroblastoma, por efecto de Casiopeínas®.* Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 2013.
263. A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson. *High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1992) 89, 3070–3074.
264. K. Zhang, M. Chew, E.B. Yang, K.P. Wong, P. Mack. *Modulation of Cisplatin Cytotoxicity and Cisplatin-Induced DNA Cross-Links in HepG2 Cells by Regulation of Glutathione-Related Mechanisms.* Mol. Pharmacol. (2001) 59, 837–843.
265. T.R. Wilson, D.B. Longley, P.G. Johnston. *Chemoresistance in solid tumours.* Ann. Oncol. (2006) 17, x315–x324.

266. S. Piaggi, Ch. Raggi, A. Corti, E. Pitzalis, M.C. Mascherpa, M. Saviozzi, A. Pompella, A.F. Casini. *Glutathione transferase omega 1-1 (GSTO1-1) plays an anti-apoptotic role in cell resistance to cisplatin toxicity*. *Carcinogenesis* (2010) 31, 804–811.
267. G.C. Adam, J. Burbaum, J.W. Kozarich, M.P. Patricelli, B.F. Cravatt. *Mapping Enzyme Active Sites in Complex Proteomes*. *J. Am. Chem. Soc.* (2004) 126, 1363–1368.
268. T. Ishikawa, C.D. Wrigth, H. Ishizuka. *Coordinated Induction of MRP/GS-X Pump and g-Glutamylcysteine Synthetase by Heavy Metals in Human Leukemia Cells*. *J. Biol. Chem.* (1994) 269, 29085–29093.
269. A. Bernareggi, L. Torti, R.M. Facino, M. Carini, G. Depta, B. Casetta, N. Farrell, S. Spadacini, R. Ceserani, S. Tognella. *Characterization of cisplatin-glutathione adducts by liquid chromatography-mass spectrometry. Evidence for their formation in vitro but not in vivo after concomitant administration of cisplatin and glutathione to rats and cancer patients*. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 669 (1995) 247–263.
270. T. Ishikawa, F. Ali-Osman. *Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance*. *J. Biol. Chem.* (1993) 268, 20116–20125.
271. C. Carrasco-Pozo, M.E. Aliaga, C. Olea-Azar, H. Speisky. *Double edge redox-implications for the interaction between endogenous thiols and copper ions: In vitro studies*. *Bioorg. Med. Chem.* 16 (2008) 9795–9803.
272. C. Casares, R. Ramírez-Camacho, A. Trinidad, A. Roldán, E. Jorge, J.R. García-Berrocal. *Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models*. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* (2012) 269, 2455–2459.

273. T. Itoh, R. Terazawa, K. Kojima, K. Nakane, T. Deguchi, M. Ando, Y. Tsukamasa, M. Ito, Y. Nozawa. *Cisplatin induces production of reactive oxygen species via NADPH oxidase activation in human prostate cancer cells*. *Free Radic. Res.* (2011) 45, 1033–1039.
274. K. Bedard, K.H. Krause. *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. *Physiol. Rev.* (2007) 87, 245–313.
275. F.Q. Schafer, G.R. Buetner. *Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple*. *Free Radic. Biol. Med.* (2001) 30, 1191–1212.
276. P.M. Wood. *The potential diagram for oxygen at pH 7*. *Biochem. J.* (1988) 253, 287–289.
277. S.J. Riedl, Y. Shi. *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* (2004) 5, 897-907.
278. S. Cory, J.M. Adams. *The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch*. *Nat. Rev. Cancer* (2002) 2, 647–665.
279. K. Tanaka, M. Asanuma, N. Ogawa. *Molecular basis of anti-apoptotic effect of immunophilin ligands on hydrogen peroxide-induced apoptosis in human glioma cells*. *Neurochem. Res.* (2004) 29, 1529–1536.
280. Oxford Diffraction. CrysAlis CCD and CrysAlis RED. Oxford Diffraction Ltd, Abingdon, 2007 England.
281. G. M. Sheldrick, SHELXS97 and SHELXL97, 2008, University of Gottingen, Germany.
272. G. Gritzner, J. Küta. *Recommendations on reporting electrode potentials in nonaqueous solvents*. *Pure Appl. Chem.* (1984) 4, 461–466.
273. Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar. *Design of Density Functionals by Combining the Method of Constraint Satisfaction with Parametrization for Thermochemistry*,



*Thermochemical Kinetics, and Noncovalent Interactions*. J. Chem. Theory Comput. (2006) 2, 364–382.

274. Codessa 3, (Version 3.2.5), Semichem Inc., Shawnee KS, USA 2013 ([www.semichem.com](http://www.semichem.com)).

## 9.0 Apéndice I. Publicaciones.

### Aplicaciones de los compuestos metálicos en Medicina

Este libro presenta una visión panorámica de las aplicaciones farmacológicas de los compuestos metálicos. Es una obra interdisciplinar que incluye, junto a la situación actual de la investigación en el campo, los resultados de proyectos científicos, innovaciones y publicaciones de los investigadores integrantes de la Red Española CTED 2006/0290. Los capítulos abordan temas como: "Compuestos metálicos en la administración del cáncer", "Compuestos metálicos en el tratamiento de malaria, hipertensión, amorfosis (osteoporosis) y labirintitis", "Compuestos orgánicos como fármacos potenciadores de la tuberculosis y la artritis", "Estatos y compuestos de sodio en su tratamiento", "Sustitución de sodio en enzimas", "Análisis toxicológico de los quelantes", "Investigaciones y aplicaciones en química de la coordinación, química bioorgánica, bioquímica, biología, toxicología, oncología y otros, métodos epidemiológicos encontrados en este libro", "declarativa biomolécula sobre el sistema preneural que los compuestos de los iones metálicos pueden afectar tanto para el tratamiento de enfermedades muy estudiadas como para aquellos aún no estudiados presentados en muchos lugares del planeta".

**Diversity (Spanish)**  
Este libro es resultado de la colaboración entre 12 grupos de investigación en el área de Química Inorgánica Médica del Departamento de Química Inorgánica, que integran la red española CTED (Programa de Ciencia y Tecnología del Consejo "Real" de Investigaciones Científicas y Desarrollo de España) basado en Compañías Mineras."



978-84-9654-71-8

editorial académica española





Deborah Gamero · Viridica Moreno · Mariel Navarro  
**Aplicaciones de los compuestos metálicos en Medicina**  
Una visión bioinorgánica

Deborah Gamero, Viridica Moreno, Mariel Navarro

## CAPÍTULO 1

### COMPUESTOS INORGÁNICOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Juan Carlos García Ramos,<sup>a</sup> Lena Ruiz Azuara,<sup>a</sup> Virtudes  
Moreno<sup>\*b</sup>

<sup>a</sup> *Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México*

<sup>b</sup> *Facultad de Química, Universitat de Barcelona*

#### Resumen

En este capítulo se describen los compuestos inorgánicos que son actualmente utilizados en el tratamiento del cáncer, el estado de la investigación sobre posibles nuevos fármacos, una breve historia de los descubrimientos más relevantes, los mecanismos implicados en la acción anticancerígena y las perspectivas que se abren en este campo.

*Palabras Clave:* cáncer, actividad antitumoral, actividad citotóxica, metales de transición, metales representativos, cisplatino;  $\pi$ -arenos de rutenio, compuestos de galio, complejos de otros metales.

*Correo electrónico:* [virtudca.moreno@qi.ub.es](mailto:virtudca.moreno@qi.ub.es); [ruizazuara@gmail.com](mailto:ruizazuara@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

El profesor Barnett Rosenberg (1926-2010), biofísico en la Michigan State University, no podía imaginar cuando publicó sus sorprendentes resultados en la revista *Nature* en 1965 [1], la repercusión que tendrían sus descubrimientos en la investigación anticancerígena posterior a nivel mundial. El cisplatino, *cis*-diclorodiamminoplatino(II), producía una inhibición en el crecimiento de un cultivo de *Escherichia Coli* y ponía en marcha la nueva era de los fármacos antitumorales basados en compuestos inorgánicos [2]. Este compuesto, además, realizó una sorprendente carrera en el tiempo para pasar a uso clínico oficial mundial en pacientes en 1978. El platino se convertía así en el primer elemento metálico cuyos complejos eran capaces de alcanzar la diana nuclear que disparaba los mecanismos de muerte celular por apoptosis: el ADN. Hoy día, pasadas ya más de cuatro décadas, el cisplatino se sigue utilizando con éxito en el tratamiento quimioterapéutico de muchos tumores. Se han estudiado exhaustivamente los mecanismos químicos y bioquímicos de su actuación, sus efectos secundarios, la adquisición de resistencia por parte de líneas celulares que inicialmente fueron sensibles a su acción. Se han sintetizado varias generaciones de compuestos de platino siempre en búsqueda de una mayor eficacia en los tratamientos, evitando efectos secundarios y tratando de dirigir los compuestos específicamente a las células tumorales en vehículos diseñados con diversas estrategias. Sólo unos pocos compuestos de platino han llegado al uso en pacientes. Mientras tanto, compuestos de otros iones metálicos han ido apareciendo en el horizonte de los posibles fármacos antitumorales: el galio, el rutenio, el titanio, el estaño, el hierro, el cobre, el oro. El objetivo de este capítulo es dar a conocer

la actualidad de la investigación de posibles fármacos inorgánicos antitumorales y los rasgos más importantes de la actuación y mecanismos de estos compuestos.

## ELEMENTOS REPRESENTATIVOS

### 1. Galio

#### 1.1 El galio como agente antitumoral

Aunque la investigación en la actividad medicinal de los compuestos de galio se remonta a las décadas de mediados del siglo XX (1931-1952), los objetivos fueron entonces el tratamiento de enfermedades como la sífilis o infecciones en las que había mostrado cierta actividad beneficiosa. El seguimiento de la distribución del galio en tejidos, principalmente tejido óseo, hígado y riñón, pudo realizarse por el radioisótopo  $^{72}\text{Ga}$  que se acumulaba principalmente en tumores óseos. De ahí surgió la primera investigación de la posible acción del  $^{72}\text{Ga}$  sobre los tumores metastáticos en huesos. Sin embargo, la utilización de galio no radiactivo con fines terapéuticos no se inició hasta la década de los 70. A su actividad de inhibición de la resorción mineral en huesos asociada con hipercalcemias, habría que añadir la de su actividad inmunológica selectiva y su eficacia en el tratamiento de infecciones originadas por organismos intracelulares, y sobre todo el descubrimiento de que algunos compuestos de galio han mostrado ser inhibidores de la proliferación neoplásica [3].

Actualmente sólo un compuesto de galio, el nitrato-citrato de Galio(III), ha sido aprobado para uso terapéutico en Estados Unidos de América (Figura 1). Otros compuestos de galio que se hallan en

pruebas clínicas son el cloruro de galio, el maltolato de galio y el B-quinolinato de galio.

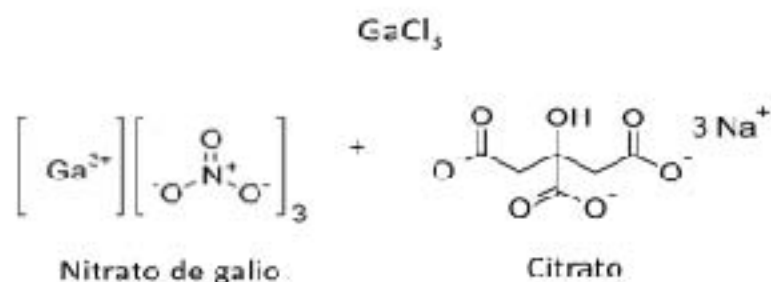


Figura 1. Compuestos de galio con actividad antitumoral.

## 1.2 Mecanismos de transporte y actuación

El galio(III) tiene un radio muy parecido al del Fe(III) (Figura 2) y ha mostrado ser capaz de unirse a la transferrina en el sitio de la proteína que enlaza el hierro de forma específica. La ocupación del sitio de enlace de la proteína por Fe(III) o Ga(III) induce un cambio conformacional idéntico respecto a la apo-proteína.

$\text{Fe}^{3+}$	$\text{Ga}^{3+}$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Zn}^{2+}$
0.65	0.67	0.77	0.99	0.74

Figura 2. Comparación del radio del  $\text{Ga}^{3+}$  con el de otros iones metálicos.

La transferrina de galio es así igualmente reconocida por el receptor en la membrana celular y de esta forma el galio se internaliza por endocitosis en el citoplasma y se dirige hacia los mismos componentes intracelulares que el hierro.

En el paso de la fase G1 a la G2 a través de la fase S del ciclo celular en tumores hematológicos, se produce una expresión mayor del receptor de la transferrina y se ha observado que la adquisición del galio aumenta. El Ga(III) puede reemplazar al Fe(II) en proteínas de la matriz ósea, en la colagenasa, en metaloproteinasas y en la ATP-asa vacuolar responsable del paso de H<sup>+</sup> que acidifica la secreción implicada en la actividad osteoclástica de los osteoclastos. El galio(III) se ha visto que inhibe esta ATP-asa.

En el enzima ribonucleótido reductasa R2, (Figura 3) el centro activo de Fe(III), es susceptible de ser desplazado por Ga(III).

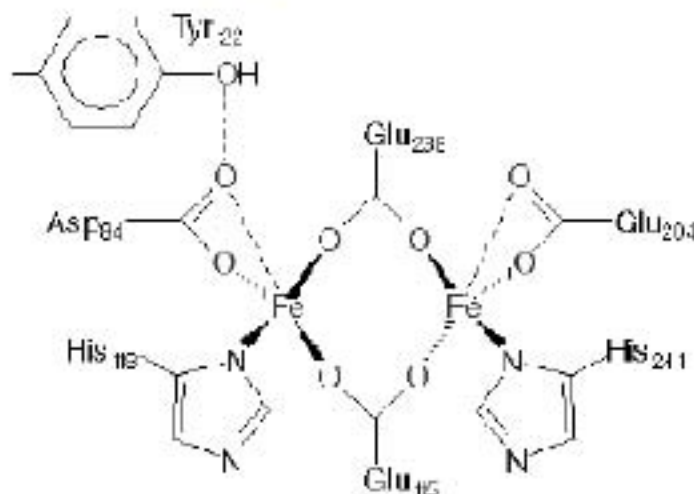


Figura 3. Centro activo del enzima Ribonucleótido reductasa donde el Fe<sup>3+</sup> puede ser desplazado por el Ga<sup>3+</sup>.

La tirosina estabiliza el sitio activo cuando tiene Fe(III) enlazado, pero cuando se introduce Ga(III) se desestabiliza y el enzima pierde su actividad. La inhibición de la acción de este enzima se ha pensado que puede ser uno de los modos de actuación del Ga(III) como antitumoral [4].

Otro posible mecanismo de actuación es el bloqueo de la polimerización de la tubulina. La polimerización de la tubulina incide en la formación de los microtúbulos que intervienen entre la profase y metafase de la mitosis (Figura 4).

El ion  $Mg^{2+}$  es necesario para que se produzca la polimerización, pero el Ga(III) puede competir con él y como consecuencia inhibir la formación de los microtúbulos interrumpiendo el proceso de la mitosis [5].

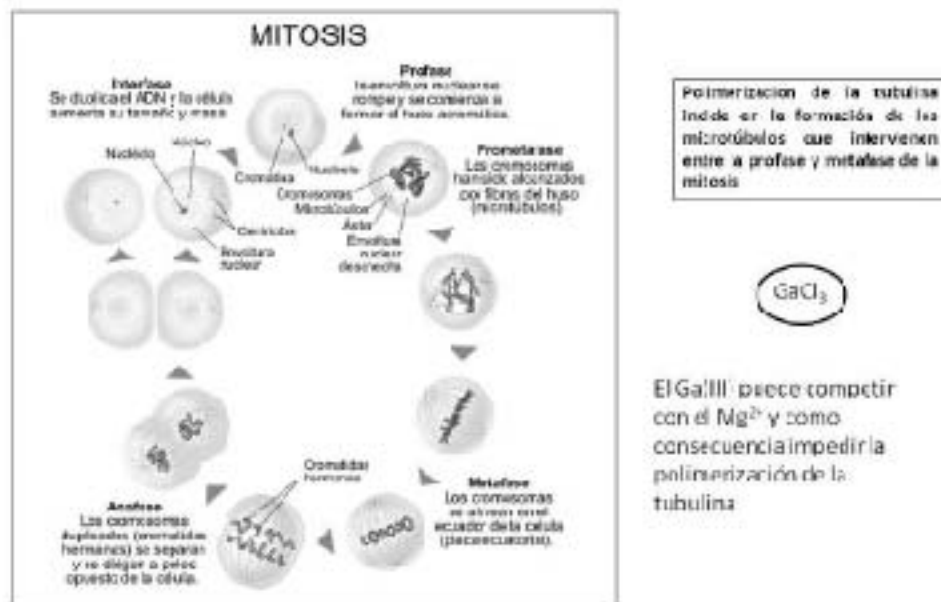


Figura 4. Incidencia del Ga<sup>3+</sup> en el ciclo celular.



El nitrato de galio(III)-citrato, GCN (Ganite™), fue aprobado en USA para usos terapéuticos en hipercalcemias relacionadas con algunos cánceres. El galio se encuentra en forma de complejo con el citrato, soluble, inyectable. Se utiliza en procesos de hipercalcemia porque inhibe la resorción osteoclástica de los huesos. No entra en la red del hidroxapatito pero se deposita en la superficie de los huesos como fosfato de galio. Ha mostrado también actividad immuno-moduladora debido a la activación y proliferación de algunas células T y a la inhibición de la secreción inflamatoria de citoquinas.

El cloruro de galio(III),  $GaCl_3$ , se encuentra en fase de pruebas clínicas y es uno de los compuestos con potencial uso terapéutico. Es activo en tumores en fase de crecimiento rápido aunque ha demostrado mayor eficacia en ausencia de procesos de metástasis. Posee gran ventaja al ser administrable por vía oral y no presentar efectos tóxicos considerables salvo los relacionados con el suave descenso del magnesio y de la hemoglobina. En los ensayos realizados se ha observado una importante acción potenciadora del cisplatino en tratamientos de cáncer de pulmón [6].

### 1.3 Complejos de Galio(III)

El primer complejo de galio que entró en fase clínica fue el maltolato de Ga(III), Tris(3-hidroxi-2metil-4H-piran-4-onato) de galio (III), GM (Figura 5).

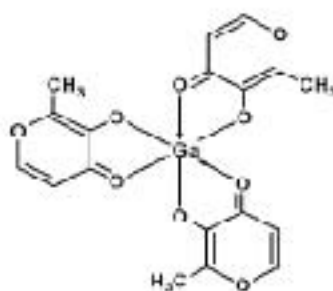


Figura 5. Maltolato de Ga(III), en fase de estudios clínicos.

Es un compuesto activo que se suministra oralmente y es moderadamente soluble en agua y en lípidos. Ha demostrado actividad en cáncer de próstata, mieloma, linfoma y cáncer de vejiga. Tiene aplicación en procesos inflamatorios, y contribuye considerablemente a la reducción de la degradación de los huesos en la artritis reumatoide.

Un complejo de estructura similar, el tris-(8-quinolinato) de galio(III), GQ, (Figura 6) entró en pruebas clínicas humanas en 2004 y presenta elevada biodisponibilidad en el tratamiento del cáncer por vía oral. Inhibe la proliferación de células de adenocarcinoma humano de pulmón y se han observado también efectos de descenso del calcio en hipercalcemias.



Figura 6. Otro complejo de Ga(III), 8-oxiquinolinato de galio, en fase clínica.

Entre otros complejos de Ga(III) que están en estudio, el  $[Ga(2-Am4Et)_2]NO_3$  (2-Am4Et = <sup>4</sup>N- dimetil-tiosemicarbazona de 2-acetilpiridina), ha dado valores de IC<sub>50</sub> de orden nanomolar en ensayos antiproliferativos con líneas tumorales de cáncer de ovario (41M), de mama (SK-BR-3) y de colon SW-480). Sin embargo, los valores obtenidos para el ligando son de orden similar y por tanto es necesario completar la investigación del papel del galio como introductor del compuesto en células cancerígenas.

Finalmente, el conjugado de doxorubicina con transferrina a la que el Ga(III) puede enlazarse (Figura 7) ha mostrado poseer una actividad contra el cáncer de mama 100 veces superior a la de la doxorubicina sola y 10 veces superior a la de la doxorubicina conjugada con transferrina portadora de Fe(III).

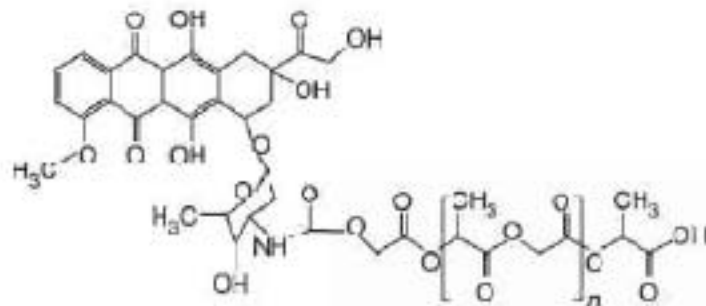


Figura 7. Conjugado de doxorubicina, transportador de Ga(III).

Como conclusión, el galio(III) fue el segundo metal que mostró actividad contra tumores malignos en humanos, después de la incorporación de los fármacos de platino en la práctica rutinaria clínica. Tiene la exclusividad de inhibir el crecimiento de tumores

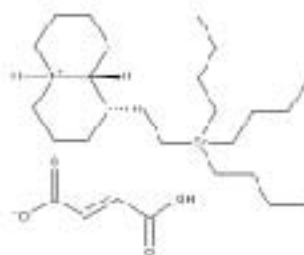
como un simple catión, principalmente a causa de su semejanza con el Fe(III). A pesar de su incapacidad para cambiar de estado de oxidación, como hace el Fe(II) a Fe(III), interfiere seriamente en la adquisición celular del hierro en la sangre por su interacción competitiva con la transferrina y su capacidad de ser reconocida la Tf-galio por el receptor. La inhibición de la polimerización de la tubulina es un hecho importante por bloquear el ciclo celular e impedir la reproducción celular. En este caso compete con el Mg(II). Los complejos de Galio pueden superar los inconvenientes de las sales simples de galio. La investigación sobre los mecanismos de actuación que no están suficientemente explorados hasta el presente constituye un importante reto.

## 2. Estaño

Desde que en 1972 se mostró que el acetato de trifenilestaño (el cloruro no tiene efecto) provocaba un retardo en el crecimiento tumoral en ratones una serie de compuestos de estaño han sido sintetizados y evaluados en modelos *in vitro* e *in vivo* [1]. Se ha sugerido que en disolución los compuestos tri organoestaño pueden sufrir una desproporción espontánea a los correspondientes derivados di-organoestaño y tetra-organoestaño mientras que *in vivo* se puede producir la pérdida de una unidad alquilo o arilo por la intervención de enzimas como la aromatasas [3]. Considerando lo anterior podemos decir que los compuestos di-organoestaño son los agentes citotóxicos finales y que la mayor actividad observada para los compuestos tri-organoestaños puede ser asociada a su comportamiento cinético.

La citotoxicidad de los organoestaños se debe a la inhibición de la síntesis de macromoléculas, la intervención en el metabolismo energético mitocondrial, la reducción de la síntesis de ADN, la interacción directa con la membrana celular (incremento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico) y la promoción de daño oxidativo al ADN [9]. En células tratadas con organoestaños el daño oxidativo y el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provoca una inducción de apoptosis en una gran parte de la población celular. Aunque los compuestos de Sn(IV) pueden inducir apoptosis, el mecanismo completo por el que llevan a cabo la actividad antitumoral aún no ha sido elucidado. Se ha sugerido que la actividad antiproliferativa se da por la unión a grupos  $\text{SH}$  de diferentes proteínas, mecanismo muy diferente al encontrado para otros compuestos metálicos.

Un ejemplo de la actividad de los compuestos de estaño es el hidrogeno fumarato de (lupunilsulfuro) tri-n-butil Sn (IV) (IST-GS 35) cuya estructura se muestra en la figura 8, inhibe el crecimiento tumoral en la líneas P388 de leucemia mielomonocítica y melanoma B16-F10 implantados de manera subcutánea en ratones BDF-1 con una reducción tumoral del 96% al onceavo día después de la administración de una sola dosis intravenosa



**Figura 8.** Estructura del compuesto de estaño hidrogeno fumarato de (lupunilsulfuro) Tri-n-butil Sn (IV) (IST-GS 35).

Una revisión bastante completa acerca de compuestos de estaño que tienen actividad antitumoral ha sido publicada recientemente por S.K. Hadjikakou & N. Hadjiladis [10].

## ELEMENTOS DE LA PRIMERA SERIE DE TRANSICIÓN

### 3. Titanio

#### 3.1 Diclorotitanoceno y budotitano

Después de confirmarse la actividad del cisplatino en dos modelos animales, se comenzó la exploración de diferentes compuestos inorgánicos que presentaran actividad citotóxica en células tumorales. Los primeros avances en ese campo son reportados en 1979 por Köpf y Köpf-Maier quienes estudiaron la actividad citotóxica del compuesto organometálico diclorobis( $\eta^5$ -pentadienil) titanio (IV) (diclorotitanoceno,  $[(Cp)_2TiCl_2]$ ) en células ascíticas de Ehrlich y otras líneas celulares [11].

La razón principal para evaluar la actividad de éste compuesto fue que, al igual que el cisplatino, el titanoceno contaba con dos cloruros en una disposición espacial *cis* y era un compuesto neutro. Las características estructurales mencionadas, así como la ausencia de nefrotoxicidad y mielotoxicidad (efectos que sí presentaban compuestos análogos con Mo, V y Nb) hicieron que el compuesto  $[(Cp)_2TiCl_2]$  fuera elegido como el primer compuesto inorgánico diferente al platino en entrar en estudios de fase clínica I [12].

El diclorotitanoceno puede obtenerse al hacer reaccionar la sal de sodio del ciclopentadienilo (Cp) con  $TiCl_4$  empleando THF como medio de reacción, de la cual se obtiene el compuesto rojo brillante

$[(Cp)_2TiCl_2]$  cuyo esquema se presenta en la figura 9. La estabilidad del compuesto en disolución acuosa no amortiguada es relativa ya que pierde el primer cloruro de la esfera de coordinación que es sustituido por una molécula de agua generando el derivado monoacuoso en un periodo largo de tiempo, mientras que la pérdida del segundo cloruro es mucho más rápida  $0.84 (\pm 0.14) h^{-1}$  con  $t_{1/2} = 50$  minutos. De la misma forma, en medios no amortiguados se presenta la pérdida de ambos grupos Cp, probablemente por la desprotonación del ciclopentadienilo, la constante de velocidad para la pérdida del primer grupo Cp es  $k = 6.4 (\pm 0.1) \times 10^{-3} h^{-1}$  con  $t_{1/2} = 108$  h.

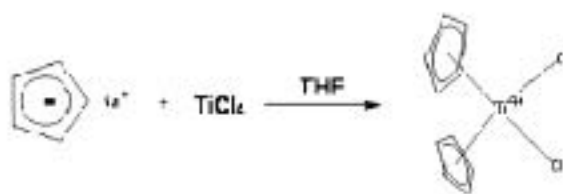


Figura 9. Reacción de obtención de  $[(Cp)_2TiCl_2]$ .

Kopf-Maier empleando una modificación a la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) pudo demostrar que el titanio proveniente del compuesto  $[(Cp)_2TiCl_2]$  se concentraba en los núcleos de células tumorales humanas injertadas subcutáneamente en ratones. Dado que el compuesto inhibe la síntesis de ADN, se sugirió que el diclorotitanoceno o sus productos de biotransformación atacan al ADN genómico.

El compuesto se une a la doble hebra de ADN de timo de bovino con una constante de asociación de  $7.61 (\pm 0.08) \times 10^5 M^{-1}$  y hay una molécula del compuesto organometálico por cada cuatro pares de bases del ADN en disoluciones saturadas de compuesto

[13]. Otros estudios empleando espectroscopia UV-vis y fluorescencia sugieren que a concentraciones bajas de diclorotitanoceno la interacción con el ADN está dominada por la coordinación con el oxígeno de los grupos fosfato, mientras que a concentraciones más elevadas tanto el oxígeno de los fosfatos como los nitrógenos de las bases púricas y pirimidicas se coordinan al titanio [14]. Además de unirse al ADN se ha probado que el compuesto  $[(Cp)_2TiCl_2]$  interacciona con proteínas como la transferrina o la albúmina. Para la primera proteína, Sadler y su grupo muestran que el compuesto pierde rápidamente los ligandos Cp y se une a los lóbulos C y N de la transferrina produciendo cambios conformacionales similares a los que induce el Fe(III), siempre y cuando se encuentre presente el ión carbonato en el medio [15]. Para la segunda proteína, el grupo de Valentino sugiere que la unión a albúmina puede ser una de las vías para el transporte del compuesto ya que se pueden unir hasta 20 moléculas del titanoceno a diferentes sitios de la proteína, así mismo, la interacción con albúmina provoca que los ligandos Cp sean más resistentes a perderse por hidrólisis [16]. Sin embargo, aunque la unión a la proteína funciona como protector del compuesto frente a los procesos de hidrólisis, el destino final del aducto es desconocido.

Los resultados obtenidos con  $[(Cp)_2TiCl_2]$  motivaron a Keppler y su grupo de trabajo a estudiar compuestos de Ti(IV) con ligandos  $\beta$ -dicetona, uno de estos, el *cis*-dietoxibis(1-fenilbutan-1,3-dionato) Ti(IV)  $[Ti(Lzac)_2(EtO)_2]$ , después conocido como budotitano, mostró una gran actividad citotóxica en diversas líneas tumorales, pero principalmente en la de colon [17]. El budotitano puede obtenerse al hacer reaccionar la  $\beta$ -dicetona con  $TiCl_4$  en etanol. El protón



involucrado en el equilibrio ceto-enol del ligando  $\beta$ -dicetona es ácido y puede ser fácilmente removido ( $pK_a \sim 9$ ). El Ti(IV) al ser un ácido duro, facilita la desprotonación del etanol coordinado para obtener finalmente dos etóxidos en la esfera de coordinación del metal. Un aspecto interesante de la reacción es que sólo se produce el isómero *cis*-etóxido. La figura 10 muestra el equilibrio ceto-enol del ligando  $\beta$ -dicetona y la reacción general para la obtención de budotitano

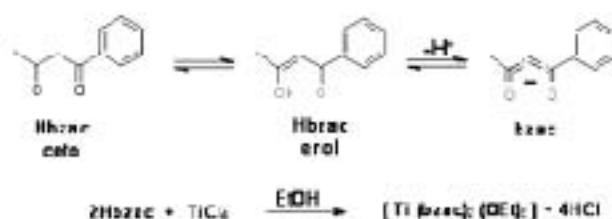


Figura 10. Equilibrio ceto-enol del ligando  $\beta$ -dicetona y reacción de obtención de budotitano.

El budotitano también alcanzó la fase clínica I de estudio. Una de las grandes dificultades para emplear este compuesto en terapia fue la poca estabilidad que presenta en disolución. Con la finalidad de incrementar la estabilidad del compuesto, Keppler y su grupo buscaron diferentes soluciones para obtener una formulación estable. Uno de los intentos fue disolver el budotitano en un medio que contenía, 1,2-propilenglicol, etanol y el polímero glicerilpolietilenglicolericinoleato (CremophorE1) y posteriormente evaporar todo el disolvente para generar un co-precipitado. El co-precipitado era redisoluto en agua y se formaban micelas que encapsulaban al compuesto de titanio y en principio lo protegían de la hidrólisis, sin embargo, la descomposición seguía teniendo lugar.

Los estudios de  $[(Cp)_2TiCl_2]$  y budotitano han llevado a concluir que aunque los compuestos presentaban una mayor toxicidad frente a células tumorales que el cisplatino, son muy inestables para una formulación que pueda emplearse en clínica. Aunque los estudios de fase clínica para ambos compuestos se han cancelado, la búsqueda de nuevos compuestos de titanio sigue siendo una prometedora área de investigación.

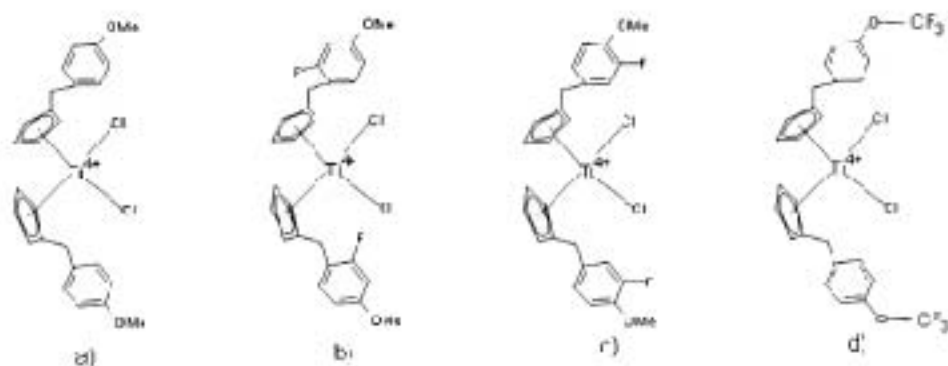
### 3.2 Nuevos compuestos de titanio

El trabajo de McGowan para obtener compuestos iónicos con grupos catiónicos como sustituyentes del anillo ciclopentadienilo para resolver el problema de la solubilidad en agua y la poca estabilidad dio un nuevo impulso al estudio de los compuestos de titanio empleados como antitumorales. Los compuestos obtenidos por este método presentaron una muy buena actividad citotóxica frente a la línea celular de cáncer ovárico A2780 y cérvico-uterino HeLa y en particular en la línea A2780cis que presenta resistencia a cisplatino.

Se han desarrollado nuevos métodos de síntesis para obtener una sustitución directa de los ciclopentadienilos de los titanocenos. Empleando una dimerización reductiva con  $TiCl_3$ , la carbolitiación o hidrolitiación de fulvenos y la posterior transmetalación con  $TiCl_4$  se pueden obtener compuestos del tipo *ansa-titanocenos*, titanocenos sustituidos con grupos bencilo o funcionalizados con grupos 6-N,N'-dimetilamino que pueden ser quirales o aquirales con un rendimiento superior o igual al 95%.

Uno de los compuestos obtenidos empleando fulvenos como material de partida es el dicloro bis (*p*-metoxibencilciclopentadienilo)

titanio (IV) conocido como titanoceno Y (figura 11). El titanoceno Y presenta muy buena actividad frente a la línea LLC-PK (línea de células de riñón de cerdo con un periodo muy largo de vida) con una concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) igual a 21  $\mu M$ . Para la misma línea  $[(Cp)_2TiCl_2]$  presenta una  $CI_{50}$  de 2000  $\mu M$  mientras que el valor de  $IC_{50}$  de cisplatino de 3.3  $\mu M$ . La línea LLC-PK fue seleccionada para evaluar la actividad de los nuevos compuestos de titanio al considerar los resultados obtenidos en los estudios de fases clínicas I y II del compuesto  $[(Cp)_2TiCl_2]$ . En esos estudios las células de cáncer renal fueron identificadas como uno de los blancos principales. A pesar de que la  $IC_{50}$  del titanoceno Y era mucho mayor que el valor presentado por el cisplatino en esa línea celular, el incremento de la toxicidad en dos órdenes de magnitud respecto al compuesto  $[(Cp)_2TiCl_2]$  representó un avance muy importante para el desarrollo de los compuestos de titanio con actividad antineoplásica.



**Figura 11.** Compuestos de Titanio con muy buena actividad inhibitoria frente a la línea LLC-PK. a) Titanoceno Y,  $IC_{50}= 21 \mu M$ ; b) derivado fluorado en el carbono 2 del fenilo,  $IC_{50}= 6 \mu M$ ; c) derivado fluorado en el carbono 3, producto insoluble; d) derivado trifluorometoxi,  $IC_{50}= 7.3 \mu M$ .

La carbolitiación es otro método importante para la obtención de derivados de titanocenos sustituidos, en este caso se hace reaccionar un anil o heterocianil litio con 6-N,N-dimetilaminofulveno y la posterior transmetalación produce compuestos con una alta actividad citotóxica. Los compuestos obtenidos por el método de carbolitiación que presentan la mayor actividad inhibitoria frente a la línea LLC PK son aquellos que poseen anillos heterocíclicos como sustituyentes del N,N-dimetilaminofulveno. El derivado N-metilpirrol presenta una  $IC_{50}$  de  $5.5 \mu M$ , el compuesto con N,N-dimetilaminometilindol cuenta con una  $IC_{50}$  igual a  $8.8 \mu M$ , mientras que los sustituyentes N-metil-7-azaindol y 2-N-(N,N-dimetilamino)metilimidazol presentan valores de  $IC_{50}$  de  $8.8 \mu M$  y  $5.4 \mu M$  respectivamente.

Una forma más de incrementar la actividad citotóxica de los compuestos de titanio es sustituyendo los cloruros por otro grupo. Un ejemplo de lo anterior es el compuesto bis(*p*-metoxibencilciclopentadienil) oxalato titanio(IV) también conocido como oxali-titanoceno Y. El compuesto puede obtenerse con muy buen rendimiento al hacer reaccionar el titanoceno Y con oxalato de plata anhidro en THF. El producto es soluble en una mezcla de DMSO/solución salina y presenta una impresionante actividad citotóxica frente a la línea LLC-PK ( $IC_{50} = 1.6 \mu M$ ).

Otros procedimientos para tratar de incrementar la estabilidad y la citotoxicidad de los compuestos de titanio es evitar la interacción con proteínas como la transferrina o la albúmina. Para ello, Meléndez y su grupo [13] sintetizaron un compuesto tetranuclear empleando como ligando el 3-hidroxi-2-metil-4-pirona conocido

comúnmente como maltol, cuya fórmula es  $[\text{Ti}(\text{ma})_3(\text{m-O})_4]$ . El maltol es un compuesto que presenta una muy baja toxicidad y fue aprobado para su empleo como aditivo de pasteles, panes, cerveza y otras bebidas a las que les proporciona el particular sabor a malta. En estado sólido el compuesto posee un color naranja brillante y en disolución a pH neutro es estable durante 10 días. La actividad de éste compuesto cuando se administra en células tumorales de colon IIT-29 es aceptable ( $\text{IC}_{50} \sim 10^{-4}$  M) en tratamientos de 96 horas de duración.

Harding y sus colaboradores encapsularon al  $[(\text{Cp})_2\text{TiCl}_2]$  en una estructura tipo barril llamada curcubit[n]urilo [19]. Estas moléculas tienen entre 5 y 10 unidades de glucourilos conectados por grupos metileno con diámetros entre 7 y 13 Å. Al encapsular al  $[(\text{Cp})_2\text{TiCl}_2]$  en curcubit[7]urilo, el compuesto se estabiliza, se bloquea la posibilidad de que se protone el grupo ciclopentadienilo lo que lo hace una muy buena aproximación para una formulación que pueda emplearse en clínica. Estos son ejemplos del esfuerzo que se ha realizado en el desarrollo de nuevos compuestos antineoplásicos de titanio.

## 4. Hierro

### 4.1 Derivados de ferroceno

Las primeras descripciones del empleo del ferroceno y sus derivados como agentes antitumorales aparecen en los últimos años de la década de los 70. Al igual que sucedió con los compuestos de titanio son los trabajos de Hartrut Köpf y Petra

Köpf-Maier los que impulsan el estudio del ferroceno y sus derivados como posibles antitumorales al descubrir las propiedades antiproliferativas de las sales de ferricinio en las células ascíticas de Ehrlich [20]. Aunque la dosis era muy alta para observar efecto (250 mg/Kg en tumores implantados en ratón) y el ferroceno no mostraba actividad, estos trabajos dieron pauta a proponer que los derivados ferrocénicos podían oxidarse *in vivo* y que tanto el ferricinio como los compuestos que contuvieran ferroceno podrían manifestar efectos citotóxicos.

El ferroceno se incorpora a polímeros solubles en agua, unido a moléculas que se intercalan en el ADN, con grupos fosfina, unido a péptidos, vitamina B1 y a otras biomoléculas, compuestos diferrocénicos, formando parte de los ligandos de compuestos de coordinación y una variedad de moléculas pequeñas en donde el ferroceno forma parte de la estructura. En muchos de estos estudios se ha sugerido que la toxicidad está relacionada a la producción de radicales libres y al daño provocado al ADN [21,22].

Muchos tipos de cáncer son dependientes de hormonas o sobreexpresan receptores de hormonas, en el caso de los tumores de mama y próstata representan dos tercios de los casos descritos. La proliferación de células tumorales es inducida por estradiol ( $E_2$ ), testosterona (el metabolito activo es la dihidrotestosterona) o por xenobióticos sintéticos como el bifenol A. Los tumores de mama se clasifican de acuerdo a la situación de sus receptores de estrógeno: tumores dependientes de hormona (receptor a estrógeno positivo, ER+) y tumores independientes de hormona (receptor a estrógeno negativo, ER-). Generalmente los pacientes a los que se les ha diagnosticado tumores dependientes de hormona reciben una terapia consistente en anti-estrógenos,

inhibidores de aromatasa o anti andr6genos, generalmente se emplea el modulador selectivo no esteroidal de receptores de estr6geno (SERM, por sus siglas en ingl6s) tamoxifeno (Tam) y nilutamida, flutamida o bicalutamida para tumores de pr6stata tipo AR+ (receptores de andr6geno positivo). Sin embargo, los tumores tienden a desarrollar resistencia a estos medicamentos, alcanz6ndose resultados favorables s6lo en un tercio de los pacientes tratados en un periodo largo de tratamiento (5 a6os), adem6s de que Tam est6 asociado a da6os colaterales como un alto grado de riesgo para desarrollar c6ncer del endometrio uterino y la formaci6n de co6gulos en los pulmones.

En un intento de incrementar la actividad citot6xica del tamoxifeno, Jaouen y su grupo [23] sintetizaron varios compuestos en donde una unidad de ferroceno forma parte de la estructura del metabolito activo del tamoxifeno, el hidrotamoxifeno (OH-Tam). Los compuestos resultantes conocidos como hidroxiferrocifenos se muestran en la figura 12 y fueron dise6ados para combinar las propiedades anti-estr6genas del tamoxifeno con las potenciales propiedades citot6xicas del ferroceno. La reacci6n de acoplamiento cruzado de McMurry es una ruta de s6ntesis muy eficiente para obtener este tipo de compuestos, que en algunos casos pueden ser separados por cristalizaci6n fraccionada (n=2) o por placa cromatogr6fica (n=5).

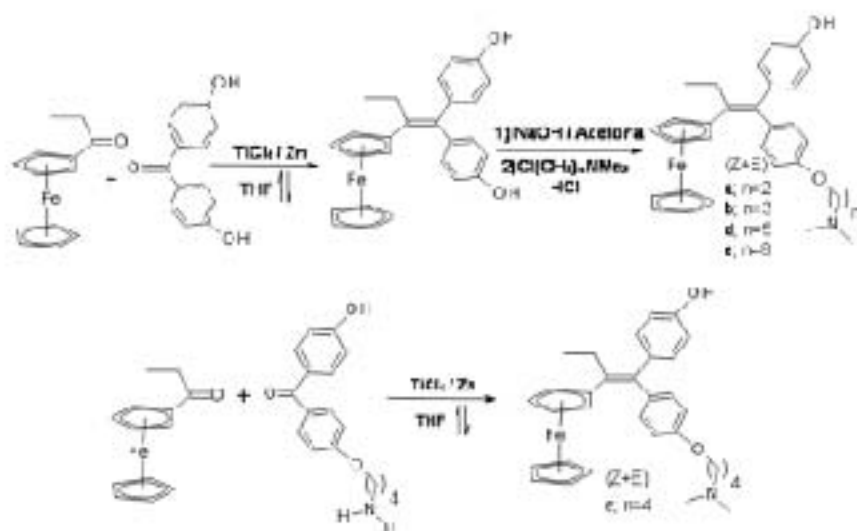


Figura 12. Síntesis de los hidroxiferrocenos

Dos tipos de efectos están asociados a los hidroxiferrocenos, el primero es el efecto anti-estrogénico como el de OH-Tam en los ER y la citotoxicidad asociada al ferroceno. Lo anterior se comprobó al tratar células con una cantidad prácticamente nula de  $ER\alpha$  y muy baja de  $ER\beta$  (MDA-MB-231) en donde la  $IC_{50}$  de los hidroxitamoxifenos llegaba a  $0.5 \mu M$ , mientras que OH-Tam y ferroceno no presentaban actividad. El efecto citotóxico de la unidad ferrocénica es evidenciada cuando se elimina o sustituye la cadena  $N,N$ -dimetilamino. En el primer caso se obtiene el compuesto monofenol y en el segundo cuando el sustituyente es  $p$ -hidroxilo se obtiene el difenol. Ambos presentan una actividad citotóxica muy importante en la línea MCF-7 con  $IC_{50}$  de  $4.9$  y  $0.7 \mu M$  respectivamente, sin embargo, en esta línea todavía se puede pensar en una actividad anti-estrogénica y la citotoxicidad del ferroceno actuando juntos, pues MCF-7 cuenta con los receptores de estrógeno. Para eliminar cualquier duda respecto a la



citotoxicidad de la unidad ferrocénica se empleó nuevamente la línea MDA-MB-231, en donde el compuesto difenólico presentó una  $IC_{50}$  de 0.4-0.6  $\mu\text{M}$ , muy parecida a la que se encontró para el hidroxiferrocifeno con tres carbonos en la cadena con 0.5  $\mu\text{M}$ , mientras que el compuesto monofenólico tiene un valor de  $IC_{50}$  de 1.13  $\mu\text{M}$  en esta misma línea.

El grupo fenol también es un factor importante para la citotoxicidad presentada por los compuestos. Para evaluar que tan crucial es su papel se sintetizaron una serie de compuestos con uno o dos grupos hidroxilo en las posiciones *meta*- y *para*- [24]. El resultado de la evaluación de la citotoxicidad de estos compuestos mostró que los grupos hidroxilo en posición *meta*- tenían una menor actividad ( $IC_{50}$  entre 2.7 y 3.5  $\mu\text{M}$ ) que los que se encontraban en posición *para*- ( $IC_{50} \sim 1 \mu\text{M}$ ), así mismo, incluir una segunda unidad ferrocénica disminuía la citotoxicidad del compuesto. Los compuestos más activos con un grupo fenilo en la posición *para*- pueden presentar una actividad mayor al adicionar un segundo grupo fenilo para alcanzar  $IC_{50}$  de 0.6  $\mu\text{M}$ .

Aún con la gran actividad citotóxica mostrada por estos compuestos, la alta hidrofobicidad que presentan hace necesario que se desarrolle un sistema de transporte y liberación. Uno de los primeros intentos fue la inclusión en  $\beta$  ciclodextrinas metiladas (CM) con las cuales los hidroxiferrocifenos formaban un compuesto 1:1 soluble en agua. La citotoxicidad de los compuestos evaluados en la línea celular MDA-MB-231 encapsulados en CD es prácticamente la misma que en ausencia del agente auxiliar para solubilizar el compuesto. Una estrategia más fue el encapsular al compuesto en nanocápsulas lipídicas, que resultaron muy efectivas frente a células de glioma mostrando una actividad muy similar al

compuesto no encapsulado ( $IC_{50} = 0.5 \mu M$ ). En estudios *in vivo* se demostró que con la administración de una sola dosis de 2.5 mg/Kg del compuesto incluido en las nanocápsulas lipídicas el tumor crecía tres veces más lento con respecto al control.

En otro estudio los compuestos son incorporados en nanoesferas y nanocápsulas de polietilenglicol y ácido poliláctico (PEG/PLA). Cuando células de la línea MCF-7 fueron incubadas con las nanocápsulas y las nanoesferas que contenían los compuestos, las células detuvieron su ciclo celular en la fase S y hubo inducción de apoptosis. Se registró una disminución en la actividad antiproliferativa cuando se agregó tocoferol en el medio de reacción, sugiriendo que la producción de ROS puede estar involucrada en el mecanismo de citotoxicidad.

La incorporación de unidades ferrocénicas en compuestos que se emplean para el tratamiento de cáncer de próstata como la nilutamida ha tenido resultados muy satisfactorios. Aunque el anclaje del ferroceno en el grupo amino libre de la nilutamida no tuvo tan buenos resultados como se esperaba, la sustitución en el carbono 5 del anillo hidantoinico tanto con una unidad ferroceno como con 4 ciano 3 trifluorometilfenilo da como resultado un compuesto muy voluminoso y también bastante activo frente a la línea LNCaP con una  $IC_{50}$  de  $5.4 \mu M$ . Así mismo fue sintetizado un compuesto con fines de comparación en donde la unidad ferroceno es sustituida por un grupo anisilo, el compuesto resultante también presenta una gran actividad citotóxica en la línea LNCaP con una  $IC_{50}$  de  $5.6 \mu M$ . El efecto citotóxico no fue disminuido al agregar dihidrotestosterona, por lo que se sugiere que el efecto citotóxico de los compuestos no está asociado a los receptores androgénicos.

Claramente, el ferroceno es un sustituyente muy interesante debido a sus características entre las que se pueden destacar su tamaño compacto, la aromaticidad, es lipofílico además de que puede ser un agente redox estable en medios biológicos. Todas estas propiedades pueden y serán empleadas en nuevos campos de aplicación, pero sobre todo en terapia.

#### 4.2 Bleomicina

La bleomicina (BLM) cuya estructura se presenta en la figura 13, es un tipo de antibiótico glicopeptídico aislado de *Streptomyces Verticillus* empleado en combinación con otros agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, ciertos tipos de linfomas y cáncer testicular. Aunque la bleomicina fue aislada como un compuesto de coordinación de Cu(II), el compuesto se administra libre de metales. La determinación de qué metal es responsable de la actividad de BLM en el organismo (Fe(II) o Cu(I)) es una tarea muy complicada, aunque las evidencias sugieren que es mucho más probable que sea el Fe(II), razón por la cual se incluye en esta sección.

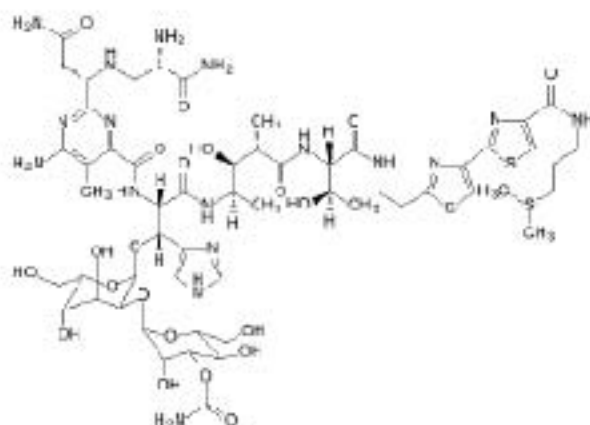


Figura 13. Estructura de la bleomicina (BLM).

La citotoxicidad de la bleomicina está asociada al daño producido al ADN por ruptura oxidativa en presencia de hierro (también es activa con cobre),  $O_2$  y agentes reductores. La especie activa se genera cuando la bleomicina coordinada al metal interactúa con el oxígeno molecular y éste último ocupa la posición de coordinación vacante del metal. Una vez formada esta especie se produce un daño oxidativo en el ADN que siempre involucra la eliminación del hidrógeno de C-4' de la unidad desoxirribosa por las especies reactivas de oxígeno generadas por el compuesto. El principal sitio de corte en el ADN generado por el compuesto es el nucleósido pirimidínico de la secuencia 5'-GPyr-3'.

La cantidad de cortes producidos sobre la doble hélice del ADN es mucho menor que los producidos sobre la hebra sencilla, sin embargo, el corte en la doble hebra es el que se asocia a la citotoxicidad del compuesto BLM Fe. Además del daño al ADN se ha encontrado que el daño oxidativo al ARN también contribuye a la citotoxicidad del compuesto así como su capacidad en la lipoperoxidación de lípidos.

La estructura única y la gran capacidad para dañar el ADN cuando se encuentra en la forma BLM-Fe han hecho que distintos grupos lo hayan estudiado durante los últimos 40 años [25,26], sin embargo, aún con toda esta investigación alrededor de ELM, no se han resuelto completamente algunos puntos clave como la verdadera especie activa de BLM, la unión y el reconocimiento al ADN y el mecanismo de la ruptura de la doble hélice.

### 4.3 Compuestos quelatantes de hierro

Una estrategia que se ha empleado recientemente para el tratamiento del cáncer es el de privar a las células tumorales del hierro que les es necesario para su desarrollo. Muchos estudios han demostrado que las células tumorales son mucho más sensibles a la privación de hierro que las células normales, dado que muchas proteínas que contienen Fe realizan funciones clave en el metabolismo energético y en la síntesis de ADN. De hecho, el paso limitante en la síntesis de ADN está catalizado por una enzima que contiene hierro, la ribonucleótido reductasa. Además de ello, se ha identificado que las células tumorales poseen altos niveles de ribonucleótido reductasa y del receptor de transferrina 1 (TfR1) para facilitar la rápida reproducción que caracteriza a este tipo de células.

Los compuestos quelatantes de Fe de tipo dipiridilcetona tiosemicarbazona (HDpT) han mostrado una potente actividad antitumoral además de selectiva en ensayos *in vitro* e *in vivo* [27]. Empleando modelos de tumor humano xenotransplantado en ratón se encontró que la dipiridilcetona 4,4-dimetil-3-tiosemicarbazona (HDp44mT) con dosis de 0.4-0.75 mg/Kg inhibía el crecimiento del

tumor sin inducir la disminución de Fe en todo el cuerpo como sucede con otros quelatantes de Fe como la desferrioxamina (DFO).

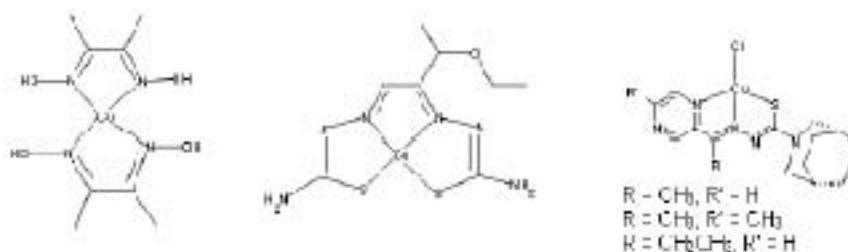
La generación de una especie redox intracelular que puede originar especies reactivas de oxígeno es el mecanismo de acción sugerido para la citotoxicidad mostrada por estos compuestos. La citotoxicidad así como la actividad redox puede modularse modificando los sustituyentes del anillo aromático como sucede con los compuestos de las familias 2-benzoilpiridintiosemicarbazona (HBpT) y 2-(3-nitrobenzoil)-piridin-tiosemicarbazona (HNBpT). Ambas familias cuentan con el mismo tipo de átomos donadores (N, N, S) y forman compuestos de coordinación en una proporción 2:1 ligando metal. Ambas familias presentan  $IC_{50}$  entre 0.002 y 4.66  $\mu$ M al tratar células de neuroepitelioma SK-N-MC; en todos los casos los derivados de éstas familias presentan una mayor actividad que sus homólogos de la familia HDpT.

## 5. Cobre

Una gran variedad de compuestos de cobre se han probado en modelos *in vitro* e *in vivo*. Entre las primeras aportaciones se encuentra el compuesto  $[Cu(dimetilgloxima)_2]$  (figura 14) que mostró una buena actividad en líneas tumorales murinas como el tumor ascítico de Ehrlich y la línea S180, sin embargo, las pruebas *in vivo* resultaron desalentadoras. Entre 1965 y 1968 varios estudios *in vitro* e *in vivo* empleando el compuesto  $[Cu(3-etoxicxibutiraldehído-bis(tiosemicarbazona)]$  también conocido como  $[Cu(KTS)_2]$  (figura 14) mostraban su buena actividad citotóxica y lo postulaban como un excelente candidato para

alcanzar la fase clínica [28]. Se propuso que el compuesto inhibía la biosíntesis de ADN por la disminución en la formación de nucleótidos de pirimidina. Aunque no se continuaron los estudios con  $[\text{Cu}(\text{KTS})_2]$ , esta aportación fue preámbulo para la investigación de compuestos de cobre con tiosemicarbazonas (TSC) con actividad antineoplásica.

Hay dos puntos importantes a tratar relacionados con los compuestos de  $\text{Cu}(\text{II})$  con TSC, uno es la baja solubilidad que presentan los compuestos en agua y el segundo, la alta toxicidad que presentan en modelos *in vivo*. La solubilidad de los compuestos se incrementa 100 veces cuando el grupo 2-piridina de las TSC clásicas es reemplazado por el grupo 1,2-diazina, pero con una disminución en la citotoxicidad en un factor de 50. Sin embargo, si se reemplaza el grupo amino terminal o amino secundario por un grupo amino terciario, se incrementa marcadamente la citotoxicidad de los compuestos y se mantiene una buena solubilidad en agua. Los hallazgos anteriores llevaron a la síntesis y evaluación de derivados de TSC con un grupo  $\text{N}^4$ -aza [3.2.2] nonano biciclo manteniendo el grupo 1,2-diazina. Los ligandos por sí mismos presentan una actividad citotóxica importante con  $\text{IC}_{50}$  de 0.011-2.22  $\mu\text{M}$  en células de adenocarcinoma de colon HT-29, mientras que los compuestos de coordinación de cobre muestran un incremento en la citotoxicidad en un factor de 3 en la misma línea celular con  $\text{IC}_{50}$  de 0.004-1.51  $\mu\text{M}$ . Las estructuras generales de estos compuestos se presentan en la figura 14.



**Figura 14.** Compuestos de cobre con actividad antitumoral, de izquierda a derecha:  $[\text{Cu}(\text{dimetilgloxima})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{KTS})_2]$  y los derivados de tiosemicarbazona con  $\text{N}^4$ -aza[3.2.2.]nonanbiciclo.

Otros compuestos de cobre que han mostrado actividad citotóxica son aquellos que tienen bases de Schiff en su esfera de coordinación. Padhye y su grupo emplearon bases de Schiff derivadas de la nimesulida y evaluaron su actividad citotóxica en las líneas de tumor de páncreas BxPC-3 (ciclooxigenasa -2(COX-2) positiva) y MiaPaCa (COX-2 negativa) mostrando una gran capacidad para inhibir el crecimiento celular con valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $3.26 \mu\text{M}$  para la línea BxPC 3 y  $5.9 \mu\text{M}$  para la línea MiaPaCa, una efectividad mucho mayor que la reportada para la nimesulida, para la cual se tiene una  $\text{IC}_{50}$  de  $35 \mu\text{M}$  para la línea que expresa COX-2 y  $> 100 \mu\text{M}$  para aquella que no expresa esta proteína. El mecanismo propuesto para explicar la actividad biológica de los compuestos involucra la inhibición de VEGF (siglas en inglés para factor de crecimiento vascular- endotelial) así como la desregulación de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-XL. Los compuestos de  $\text{Cu}(\text{II})$  con la base de Schiff obtenida con derivados de isatina, sintetizados por el grupo de Cerchiaro [29], presentan equilibrios keto-enol y una alta estabilidad. Los derivados de isatina con 1,3-diaminopropano y 2-(2-aminoetil) piridina inducen apoptosis a través



de la vía mitocondrial con mecanismos dependientes e independientes de p53, presentando una correlación de inducción de apoptosis con la cantidad de cobre asimilado por la célula. Por ello se sugiere que esos compuestos son capaces de transportar al cobre al interior de la célula con la consecuente producción de especies reactivas de oxígeno. Por otro lado, considerando la estructura de estos compuestos, podrían comportarse como cationes lipofílicos deslocalizados, cuyo blanco principal es la mitocondria. La estructura de estos compuestos se muestra en la figura 15.

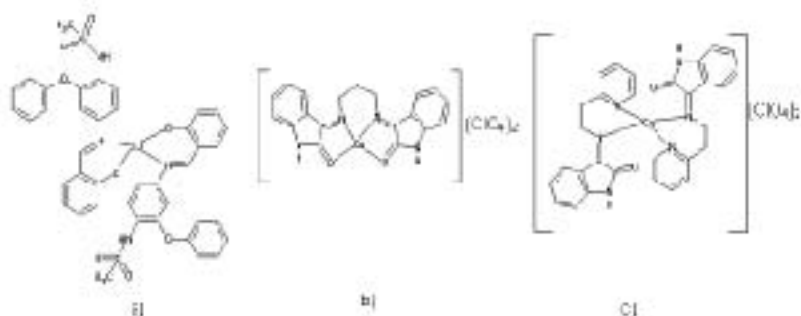
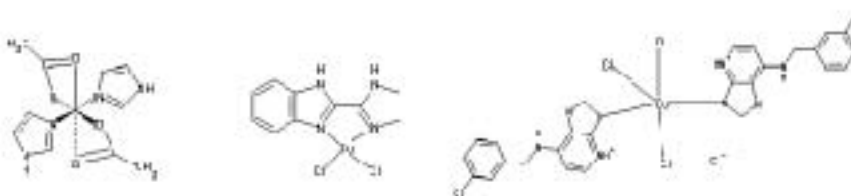


Figura 15. Estructura de compuestos de cobre con bases de Schiff, a) derivados de nimesulida, b) y c) derivados de isatina.

El estudio de los derivados imidazólicos comenzó con la gran actividad que presentaba el compuesto *trans*-bis(acetato) bis(imidazol) Cu(II) (figura 16) frente a la línea de melanoma murina B16. Saczewski y colaboradores prepararon ligandos bidentados derivados de bencimidazol, 2-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-bencimidazol (figura 16), con una muy potente actividad tipo SOD con una IC<sub>50</sub> de 0.09 μM comparable con las concentraciones más bajas de compuestos miméticos Cu,Zn-SOD de bajo peso

molecular. Al evaluar su potencial citotóxico frente a siete diferentes líneas tumorales humanas, mostró una actividad inhibitoria de la proliferación moderada, siendo la línea tumoral de hígado A-427 la más sensible a este compuesto con una  $IC_{50}$  entre 4.76 y 10.12  $\mu$ M.

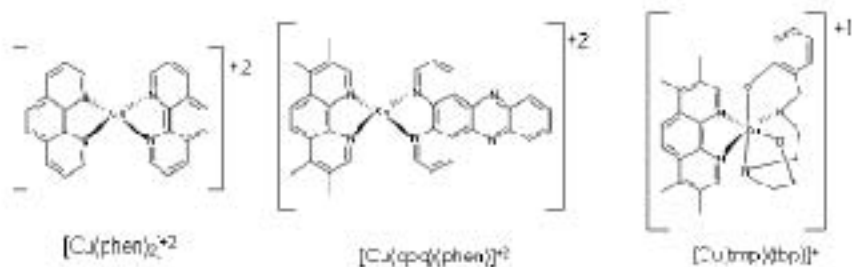


**Figura 16.** Compuestos de coordinación de cobre con derivados imidazol y benzimidazol.

Derivados de 6-(2-clorobencilamino)purina y 6-(3-clorobencilamino)purina (figura 16) descritos por Travnyock y colaboradores fueron probados frente a diferentes líneas celulares humanas como melanoma G361, sarcoma osteogénico HOS y adenocarcinoma de mama MCF-7, en los cuales los ligandos presentaban actividad que se incrementaba cuando se formaba el compuesto de coordinación de cobre (II), aunque la citotoxicidad era realmente moderada con  $IC_{50}$  entre 20 y 88  $\mu$ M.

Zhou y colaboradores describieron que el compuesto  $[Cu(phen)_2]^{2+}$  donde phen es 1,10-fenantrolina (figura 17), induce apoptosis en la fase G1 del ciclo celular en la línea celular de carcinoma de hígado Bel-7402. Cai y su grupo demostraron que la vía apoptótica de las células Bel-7402 tratadas con  $[Cu(phen)_2]^{2+}$  puede ser iniciada por el exceso de cobre dentro de las células transportado por el ligando lipofílico fenantrolina. El compuesto puede participar también como catalizador de reacciones redox que

producen especies reactivas de oxígeno y disminuyen la relación GSII / GSSG existente en la célula. Este mismo compuesto presenta una gran actividad citotóxica frente a las líneas tumorales humanas de leucemia HL60 y estomacal SGC-7901 con una inhibición mayor al 90%.



**Figura 17.** Compuestos de cobre con ferantrolina con actividad antitumoral.

Palanandiavar y su grupo han sintetizado una serie de compuestos de Cu(II) con ligandos bidentados que incluyen phen, bipy (2,2'-bipiridina) y dpq (dipirido-[3,2-d:2',3'-f]-quinoxalina) (figura 17). Los compuestos de dpq y phen están involucrados en una intercalación parcial con el surco menor del ADN. Todos los compuestos rompen el ADN en presencia de ácido ascórbico como agente reductor. Uno de los compuestos sintetizados por este grupo  $[Cu(tmp)(btp)]ClO_4$  presenta tanto una pobre unión a ADN como una pobre actividad nucleasa, sin embargo, presenta la actividad antitumoral más alta frente a la línea tumoral ME18U (carcinoma epidermoide cervical) incluso comparado con el cisplatino y la mitomicina C que son los medicamentos que se emplean en el tratamiento de este tipo de cáncer.

Otros compuestos mixtos de cobre(II) que involucran a las diiminas fenantrolinas y bipyridinas y ligandos bidentados homodonadores o donadores mixtos han sido registrados y patentados bajo el nombre de Casiopeinas® [30,31]. Estos compuestos presentan fórmulas generales  $[Cu(N-N)(N-O)]NO_3$  y  $[Cu(N-N)(O-O)]NO_3$  donde N-N = fenantrolinas (phen) o bipyridinas (bipy) que pueden estar sustituidas o no; N-O =  $\alpha$ -aminoacido o péptidos y O-O = acetilacetato (acac) o salicilaldehidato (salal) (Figura 18). Las evaluaciones realizadas en modelos *in vitro* e *in vivo* muestran que los compuestos presentan actividad antiproliferativa, citotóxica, genotóxica y antitumoral [32,33]. De acuerdo a estudios cuantitativos de correlación estructura actividad, la presencia del anillo central de la fenantrolina es un factor importante en el incremento de la actividad antiproliferativa respecto a los compuestos con bipyridina en su estructura, así mismo, existe una relación importante entre la  $K_{50}$  y el potencial redox de los compuestos de coordinación, siendo más activos aquellos compuestos que son oxidantes más débiles. En el mismo trabajo también se pudo constatar que la influencia del ligando secundario tiene una menor influencia en la actividad biológica que una modificación en el ligando diimina.

Aunque el mecanismo de acción no ha sido elucidado completamente, existe evidencia que sugiere que estos compuestos son capaces de inducir muerte celular de manera dosis dependiente induciendo apoptosis en diferentes modelos tumorales humanos como meduloblastoma, HCT-15 y glioma CG murino. La apoptosis se desencadena involucrando mecanismos dependientes e independientes de la activación de caspasas que pueden ser resultado de diversas señalizaciones que tienen como

consecuencia la muerte celular programada. Estas señales pueden ser mediadas por la generación de especies reactivas de oxígeno, por el daño mitocondrial o por ambos procesos, actuando de manera independiente o cooperativamente

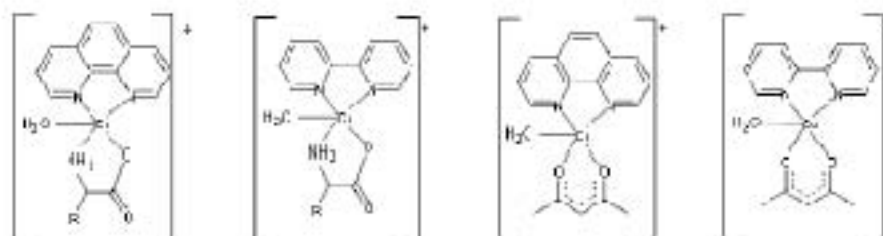


Figura 18. Estructuras generales de la familia de compuestos Casiopeínas. Los ligandos dimina pueden estar sustituidos con grupos electrodonadores o electroattractores. El ligando bidentado O-O también puede ser salicilaldehidato

Por otra parte, en algunos estudios se ha observado que la inhibición de la proliferación y la degradación del ADN en presencia de agentes reductores se presentan de manera simultánea a la generación de especies reactivas de oxígeno. Se ha observado lipoperoxidación y una disminución de GSH después de la administración de Casiopeínas. Los efectos antes descritos sugieren que la oxidación de ADN y otros componentes celulares puede ser la señal que desencadene el proceso apoptótico. También existe la posibilidad de que estos compuestos interactúen directamente con el ADN nuclear o mitocondrial a través de interacciones de intercalación o semi intercalación a través de la parte plana que le confiere el ligando dimina. Como es posible observar, los blancos celulares pueden ser otros además de la mitocondria o el ADN.

Dentro de los derivados de fenantrolina se han estudiado compuestos dinucleares. Recientemente el grupo de Deveraux reportó la síntesis del compuesto  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-oda})(\text{phen})_4](\text{ClO}_4)_2$  donde  $\text{H}_2\text{oda}$  = ácido octanodioico [31]. La actividad citotóxica de este compuesto alcanza valores de  $\text{LD}_{50}$  del orden nanomolar y picomolar después de 96 horas de exposición en líneas tumorales humanas en estadios progresivos de cáncer colo-rectal HT29, SW480 y SW620, con la ventaja adicional de la alta solubilidad en agua.

## 6. Zinc

Los compuestos de Zn con ligandos 1-hidroxipiridin-2-ona inhiben el crecimiento tumoral de células de las líneas de hígado A549 y de próstata PC3 en modelos xenotransplantados en ratón. Los perfiles de expresión génica de cultivos de A549 tratados con estos compuestos revelan activación de vías de respuesta a estrés bajo el control del factor de transcripción dependiente de metal 1 (MTF-1), factor de transcripción inducible a hipoxia 1 (HIF-1) y factores de transcripción por choque térmico.

Recientemente, el grupo de Wang [35] ha reportado un compuesto de coordinación de zinc con el ligando tetraazamacrociclo 3,6,9,15-tetraazabicyclo[9.3.1]penadeca-1(15), 11, 13-trieno-3,6,9-trimetilnaftaleno, cuya estructura se muestra en la figura 19 que presenta una muy buena actividad citotóxica en la líneas tumorales humanas HeLa (cárvix), MCF-7 (mama) y NCI-H157 (pulmón) con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 6.7, 4.8 y 7.0  $\mu\text{M}$  respectivamente. Se propone que el daño en la célula es provocado

por la ruptura del ADN a través de un mecanismo hidrolítico induciendo la muerte por apoptosis [36].

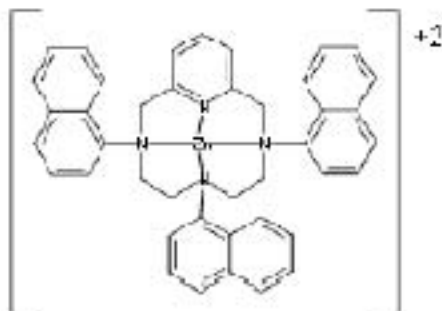


Figura 19. Macrociclo de Zn (II) con actividad antitumoral

## ELEMENTOS DE LA SEGUNDA Y TERCERA SERIE DE TRANSICIÓN

### 7. Rutenio

#### 7.1 Características de los complejos de rutenio

Los compuestos de Ru(II) y Ru(III) se consideran buenos candidatos para el diseño de fármacos antitumorales por varios motivos:

^ La geometría octaédrica típica del ión rutenio, en ambos estados de oxidación, amplía los modos de unión a otras posibles dianas terapéuticas respecto a la geometría plano cuadrada del Pt(II). Por otro lado, al igual que éste, el rutenio presenta buena afinidad por ligandos nitrogenados y sulfurados. En un sistema biológico, sólo la presencia de agentes reductores como glutatión, ascorbato o de

ciertas proteínas, pueden reducir el Ru(III), mientras que el oxígeno molecular o la citocromo oxidasa oxidan fácilmente el Ru(II). Las especies de Ru(II) únicamente permanecen inertes a la oxidación del aire en presencia de buenos ligandos  $\pi$ -aceptores en la esfera de coordinación del metal. Ello hace que el potencial redox de los compuestos de rutenio también pueda ser explotado para mejorar su eficacia en tejidos hipóxicos o en ambientes reductores.

\* La cinética de intercambio de ligandos en los complejos de rutenio (III y II) es similar a la de los complejos de Pt(II), siendo los complejos de Ru(III) generalmente más inertes a la sustitución de ligandos que las correspondientes especies de Ru(II). Las reacciones de intercambio de ligandos son un importante determinante de la actividad biológica, al estar directamente relacionadas con la estabilidad del complejo y con los procesos de activación, desactivación y detoxificación del fármaco.

\* La habilidad del rutenio de actuar como mimético del hierro en la unión a moléculas biológicas tales como las proteínas del suero (albúmina y transferrina) contribuye a la reducción de los niveles de toxicidad de los fármacos de rutenio. Estas dos proteínas son utilizadas por los mamíferos para solubilizar, transportar y eliminar otros metales como el hierro. La transferrina normalmente transporta el Fe(III) en la sangre, pero solo 1/3 está ocupada por dicho metal, por lo que hay vacantes disponibles para la unión a Ru(III). Es interesante destacar que las células tumorales, al multiplicarse rápidamente, presentan una demanda de hierro superior a las células sanas, por lo que multiplican el número de receptores de transferrina en la superficie celular con el fin de secuestrar más hierro.



## 7.2 Complejos de rutenio antitumorales

Clarke fue el primero que descubrió en los años 70 que algunos complejos de Ru(III) poseían propiedades antitumorales. Las primeras investigaciones llevaron a pensar que la diana biológica de estos compuestos era también el ADN. Sin embargo, las pruebas de las fases clínicas no llegaron a culminar satisfactoriamente debido a las propiedades mutagénicas de estos compuestos y a la facilidad de sustitución de los ligandos que hacía muy versátiles las uniones a las bases del ADN [37].

El complejo de Ru(III) llamado NAMI-A, (ImI)(*trans*-RuCl<sub>2</sub>(DMSO-S)(Im)), (Im=imidazol, DMSO-S=dimetilsulfóxido enlazado por el átomo de S) es el primer compuesto antitumoral de rutenio que ha completado satisfactoriamente las pruebas clínicas en Fase I (Figura 20).

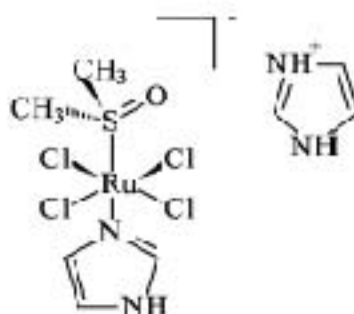


Figura 20 NAMI A, primer compuesto de Ru(III) en estudios clínicos.

Presenta una notable actividad contra metástasis de pulmón de tumores sólidos pero es ineficaz en la reducción de tumores primarios. Los compuestos con estructura similar  $(ImH)[trans-RuCl_4(Im)_2]$ , KP410, y el análogo de indazol, KP1019, son fármacos prometedores en el tratamiento de cáncer de colon, pero sin embargo, no presentan actividad antimetastática. A pesar de la relevancia farmacológica de estos compuestos no se ha podido justificar hasta ahora la notable diferencia de su actividad. Se han estudiado los posibles procesos de hidrólisis de los compuestos NAMI-A y KP410 en ambos estados de oxidación Ru(II) y Ru(III). La realidad es que el NAMI-A conduce a una serie de reacciones de intercambio de ligandos en el medio fisiológico que complica mucho el estudio.

Se estudia la unión a las proteínas llamadas integrinas, localizadas en la membrana celular que son la diana probable del NAMI-A y que desencadenan el proceso de actividad anticancerígena [38]. Se ha comprobado la posibilidad de interacción efectiva del NAMI-A con las integrinas, proteínas que presentan una cadena peptídica adecuada para enlazar el complejo de Ru.

### 7.3 Areno complejos de Ru(II)

Los complejos organometálicos de Ru(II), de estructura general  $[(\eta^6\text{-areno})Ru(X)(Y)(Z)]$  (Figura 21), son una familia de complejos de gran estabilidad química y versatilidad sintética, que ofrece un amplio espectro de posibilidades en el diseño de biosensores, agentes terapéuticos y de diagnóstico del cáncer.

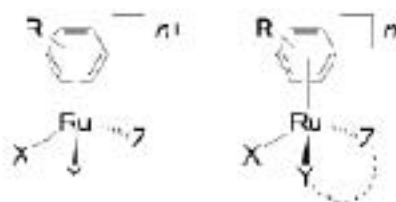


Figura 21. Estructura de los compuestos organometálicos de rutenio(II) con potencial actividad antitumoral.

Los areno complejos de Ru(II) adoptan una estructura *pseudo-octaédrica* en la que el ligando areno ocupa tres de las posiciones de coordinación posibles y estabiliza el estado de oxidación (+2) del ión rutenio, mientras que las tres restantes son ocupadas por un ligando que actuará como grupo saliente (Z), y por dos ligandos monodentados (X,Y) o uno bidentado (X-Y), formando lo que se denomina una estructura de banqueta de piano (*piano stool*) [39]. A través del diseño racional de los ligandos es posible controlar además de la estructura global de los complejos, las características cinéticas y termodinámicas del sistema.

#### 7.4 Diseño de areno complejos de Ru(II): Flección de los ligandos y relación estructura actividad

El ligando areno se coordina al átomo metálico de rutenio como  $\eta^6$ -dador y  $\pi$ -aceptor, confiriendo estabilidad al estado de oxidación (II). Su naturaleza apolar proporciona una cara hidrofóbica que puede facilitar el transporte del complejo a través de la membrana celular, contribuyendo así a la citotoxicidad del complejo.

Se ha observado, además, un incremento de la actividad biológica en complejos con ligandos areno que contienen dos o más

anillos aromáticos capaces de intercalarse entre los pares de bases del ADN. No obstante, un excesivo número de anillos puede afectar a otras propiedades importantes como la solubilidad o la capacidad de interacción con proteínas, por lo que este aspecto debe modularse junto al resto de ligandos. El ligando areno también está relacionado con la resistencia frente al fármaco, ya que se ha comprobado que los complejos formados por un único anillo aromático son eliminados más rápidamente que los que tienen dos o tres anillos. Por otra parte, todos ellos son expulsados por mecanismos diferentes a los de reparación por escisión de nucleótidos habituales de los complejos de platino, lo que pone de manifiesto las diferencias en los modos de actuación de los complejos de rutenio frente a los de platino.

La naturaleza del grupo saliente es otro aspecto importante debido a su implicación en los procesos de activación. En general, se considera que los areno complejos de Ru(II) son estables y no presentan actividad biológica hasta que son activados mediante algún proceso físico-químico y, por este motivo, también son considerados *pro-fármacos*. En este sentido, la activación de complejos de fórmula general  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{X})(\text{Y})(\text{Z})]$ , donde Z es un grupo saliente proclive a la sustitución, tiene lugar a través de la hidrólisis del enlace Ru-Z, de manera similar a lo que ocurre al cisplatino, generándose una posición vacante para la coordinación a biomoléculas. La velocidad de hidrólisis guarda una estrecha relación con su actividad antitumoral, siendo generalmente mayor en complejos con ligando lábiles como cloruros y nula en aquellos que no son capaces de dar este tipo de procesos como, por ejemplo, piridinas.

La naturaleza (estérica y electrónica) y las propiedades de los otros ligandos presentes también influyen sobre la estabilidad global

del complejo y sobre la capacidad de modular las propiedades electrónicas del centro metálico. Así, la incorporación de ligandos bidentados quelatos en la estructura de los complejos confiere una mayor estabilidad a la molécula y permite controlar la cinética de hidrólisis del grupo saliente.

La elección de los ligandos coordinantes, el grupo saliente y el areno, determina la carga global del complejo, que es otro factor importante en el diseño y en la predicción de las propiedades y el comportamiento en el medio fisiológico de estos compuestos. Se ha postulado que los compuestos con carga positiva, pueden ser atraídos electrostáticamente hacia los grupos fosfato negativos del ADN, lo que incrementaría su afinidad por dicha molécula.

Así pues, la estructura de banqueta de piano en este tipo de complejos organometálicos ofrece una gran versatilidad en el diseño de nuevas moléculas, ya que pequeñas modificaciones en el tamaño o en la naturaleza de los sustituyentes del areno o de los ligandos X,Y,Z, permiten modular propiedades farmacocinéticas relevantes como la acumulación y distribución celular del complejo, la interacción con biomoléculas, los efectos secundarios y los mecanismos de detoxificación. De esta manera, los areno complejos de Ru(II) se han convertido en la familia más numerosa de compuestos de rutenio con actividad antitumoral, con resultados muy prometedores, *in vivo* e *in vitro*, en un amplio espectro de tumores, incluyendo cánceres resistentes al tratamiento con cisplatino.

La mayor parte de estos complejos fueron desarrollados, en su inicio, por los grupos de investigación del Prof. Dyson y del Prof. Sadler, y actualmente representan dos de las familias principales de areno complejos de Ru(II) con actividad antitumoral (Ru-RAPTA y  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{X}_2]$ , respectivamente) [41-42]

Como se puede observar en la figura 22, ambas familias tienen características comunes (areno y grupo saliente) pero presentan diferencias significativas en la naturaleza del resto de ligandos (diamina quelante vs tostina cíclica). La familia RAPTA se caracteriza por el ligando monodentado PTA (1,3,5-triaza-7-fosfatriciclo[3.3.1]heptano), una fosfina cíclica fácil de funcionalizar, relativamente compacta y poco impedida estéricamente, considerada como la responsable aparente de la selectividad de esta familia de compuestos, a través de un mecanismo dependiente del pH, hacia células cancerígenas y no hacia células sanas -ya que las primeras exhiben, generalmente, un pH más bajo debido a alteraciones en su metabolismo.

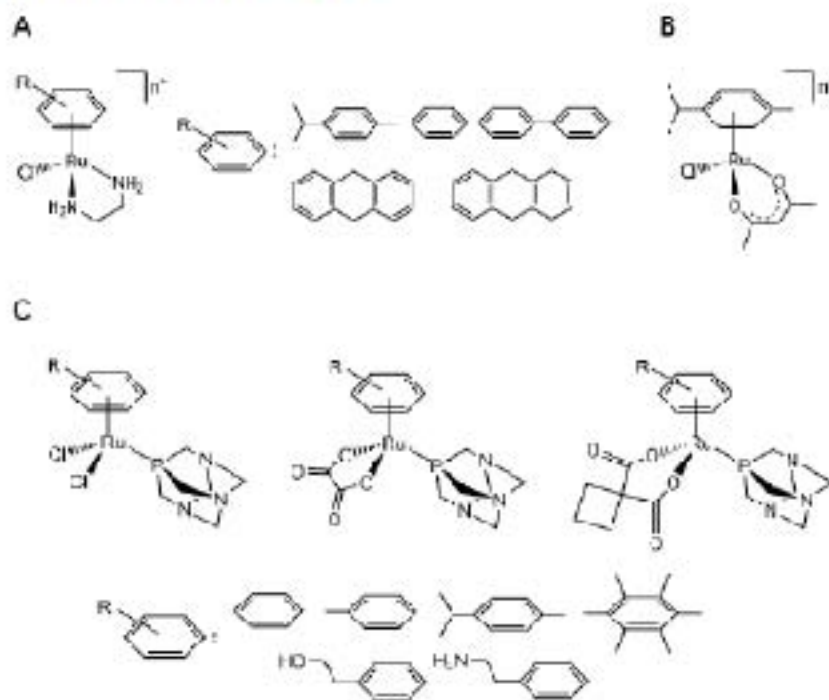


Figura 22. a) Diferentes ligandos areno de complejos de Ru(II) tipo  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})\text{Cl}]$ ; b) Complejo tipo  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{XY})\text{Cl}]$ , con XY acetilacetato, c) Algunos ejemplos de complejos de Ru(II) de la familia RAPTA.

La segunda familia mencionada incorpora un ligando bidentado quelante constituido en su inicio por una diamina, que permite controlar las características cinéticas y la actividad biológica de los complejos. Desde los inicios de estas investigaciones hasta la actualidad, se han desarrollado una gran variedad de derivados cuyo estudio exhaustivo ha permitido establecer, en algunos casos, una cierta relación estructura actividad

Así, por ejemplo, la presencia de un ligando bidentado X Y puede ayudar a controlar la estabilidad y la cinética de intercambio de ligandos, mientras que la naturaleza del areno puede mejorar el proceso de reconocimiento molecular y el transporte a través de la membrana celular. Cuando el ligando quelato es etilendiamina y el grupo saliente es cloruro, la actividad citotóxica frente a células A2780 de cáncer de ovario mejora al aumentar el tamaño del areno coordinado. No obstante, al reemplazar dicho ligando quelante por un ligando aniónico C,O-quelato tipo acetilacetato la cinética de hidrólisis se incrementa significativamente.

Por otro lado, la sustitución del quelante por dos ligandos monodentados relativamente lábiles, lleva a la obtención de complejos de menor citotoxicidad, especialmente con acetonitrilo e isonicotinamida como ligandos. Los valores de  $IC_{50}$  obtenidos superan en más de 10 veces el valor obtenido para el complejo con etilendiamina, probablemente debido a su alta reactividad, que impide que el complejo permanezca inalterado antes de llegar a la diana. Al igual que en el caso del cisplatino, en compuestos con cloruro como ligando lábil, la hidrólisis a pH fisiológico (pH 7.4) se produce con una cinética dependiente de la concentración de iones cloruro del medio (Figura 23).

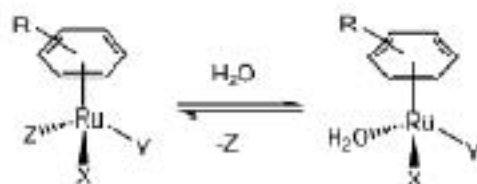


Figura 23. Mecanismo de activación de areno complejos de Ru(II) por hidrólisis del enlace Ru-Z.

### 7.5 Mecanismos de actuación

De esta manera, en el interior de las células, ([Cl<sup>-</sup>]: 22.7 mM citoplasma, 4 mM núcleo), se producirá la activación del complejo y la formación de las especies hidrolizadas (Ru-H<sub>2</sub>O/OH) que pueden coordinarse a biomoléculas como el ADN, el ARN o proteínas. Como ya se ha comentado, la actividad citotóxica de areno complejos de la familia RAPTA depende del pH. En un inicio se consideró que la activación del complejo transcurría a partir de la protonación del ligando PTA a valores de pH próximos a los del medio fisiológico; sin embargo, estudios posteriores relacionados con la dependencia del pH en la unión al ADN, han revelado que la activación del complejo depende de la hidrólisis del enlace Ru-Cl.

De la misma importancia que la velocidad de hidrólisis, es el pK<sub>a</sub> de la molécula de agua coordinada a la especie activada, ya que determinará si las especies activas contienen la forma más lábil (Ru-H<sub>2</sub>O) o la especie hidroxilo menos activa (Ru-OH). Los valores de pK<sub>a</sub> en la mayoría de los areno complejos de Ru se encuentran alrededor de 8, por lo que a pH ~7 predominan las especies Ru-H<sub>2</sub>O. En cuanto a su mecanismo de acción, los areno complejos de rutenio(II) han sido diseñados bajo la hipótesis clásica que considera el ADN como su diana principal, habiéndose demostrado



la formación de aductos con modelos de ADN de cadena sencilla y doble, que muestran una fuerte preferencia por el *N7* de las guaninas. Sin embargo, estos complejos, ofrecen un modo de interacción con la doble hélice de ADN más elaborado que la simple coordinación a las bases, siendo habitual la contribución de otro tipo de interacciones como la intercalación del areno entre los pares de bases o la formación de enlaces de hidrógeno entre alguno de los ligandos y el ADN, pudiendo esta última contribuir a la que la unión selectiva a las nucleobases. Por ejemplo, en el caso de complejos  $[(\eta^6\text{-areno})\text{Ru}(\text{en})(\text{Cl})]$ , (areno: bifenilo, dihidroantraceno, tetrahidroantraceno, benceno o *p*-cimeno), se ha observado que la unión al ADN combina la coordinación preferente al *N7* con interacciones hidrofóbicas no covalentes entre el areno y el ADN, que incluyen la intercalación (no en el caso del *p*-cimeno) y la unión al surco mayor (Figura 24).

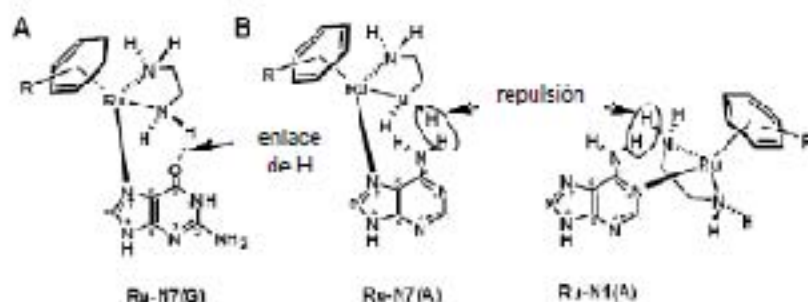


Figura 24. A) Interacción de enlace de hidrógeno entre el grupo  $\text{NH}_2$  de la etilendiamina y el oxígeno exocídico de la guanina; B) Repulsión entre el grupo  $\text{NH}_2$  del ligando y los grupos amino de adenina.

La selectividad hacia el *N7* de la guanina parece deberse al grupo  $\text{NH}_2$  del ligando quelato, el cual forma enlaces de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo de dicha nucleobase, mientras

que es repelido por los grupos amino exocíclicos de las otras nucleobases. P.J. Sadler ha estudiado las relaciones estructura actividad de estos compuestos [43]. Así, al sustituir el ligando H-dador etilendiamina por el H-aceptor acetilacetato, la selectividad hacia las nucleobases cambia, observándose la unión preferente a adoninas a través de los *N1* y *N7*.

Sin embargo, el ADN no es la única diana ni la determinante en todos los casos de la actividad de los areno complejos de Ru(II). Se ha descrito la unión de areno complejos de Ru(II) tipo RAPTA a enzimas involucrados en la progresión (tioredoxina reductasa y catepsina B) y desarrollo (glutación *S*-transferasa) del cáncer, inhibiendo su función mediante la unión específica del complejo en los residuos de cisteína o selenocisteína del centro activo del enzima [44].

Aunque todavía hay pocos compuestos de rutenio en fase clínica, la investigación básica está avanzando mucho y los resultados realizados *in vitro* e *in vivo* en distintas líneas celulares tumorales dan resultados óptimos que hacen pensar en que en el futuro la quimioterapia con compuestos de rutenio pueda desplazar a la del platino por la menor incidencia en los organismos con efectos secundarios menos agresivos que los de los compuestos de platino. Por otra parte, se continúan investigando los distintos blancos de actuación de los complejos de rutenio, tanto ambos ácidos nucleicos ADN y ARN como muchas proteínas presentes en la sangre, transferrina, albúmina, como diversos enzimas o proteínas involucradas en el ciclo celular. El volumen de artículos sobre compuestos de rutenio con potencial actividad antitumoral y sus mecanismos de actuación ha aumentado espectacularmente en los últimos cinco años.

## 8. Paladio

Los procesos de hidrólisis e intercambio de ligandos en los complejos plano cuadrado de Pd(II) son  $10^5$  veces más rápidos que los correspondientes de Pt(II). Esta es la causa de que los compuestos de paladio sean mucho más tóxicos y con una actividad antitumoral más baja que el cisplatino. Esta propiedad de los complejos de paladio les impide alcanzar los blancos biológicos, como el ADN, ya que reaccionan preferentemente con otras biomoléculas del organismo lo cual es también la causa de su alta toxicidad. No obstante, algunos ligandos S- y N- dadores han dado resultados diferentes. Das y Livingstone [45] habían propuesto que los ligandos quelantes S,N- podrían presentar actividades antitumorales. A veces hay un efecto sinérgico con el centro metálico de Pd(II).

### 8.1 Ligandos S-dadores

#### *Ligandos Tiosemicarbazonas*

Una serie de moléculas con átomos de S dadores como las tiosemicarbazonas y otros ligandos se han utilizado para obtener complejos de Pd(II) con propiedades antitumorales. Se presentan una serie de ligandos con estas características en la figura 25

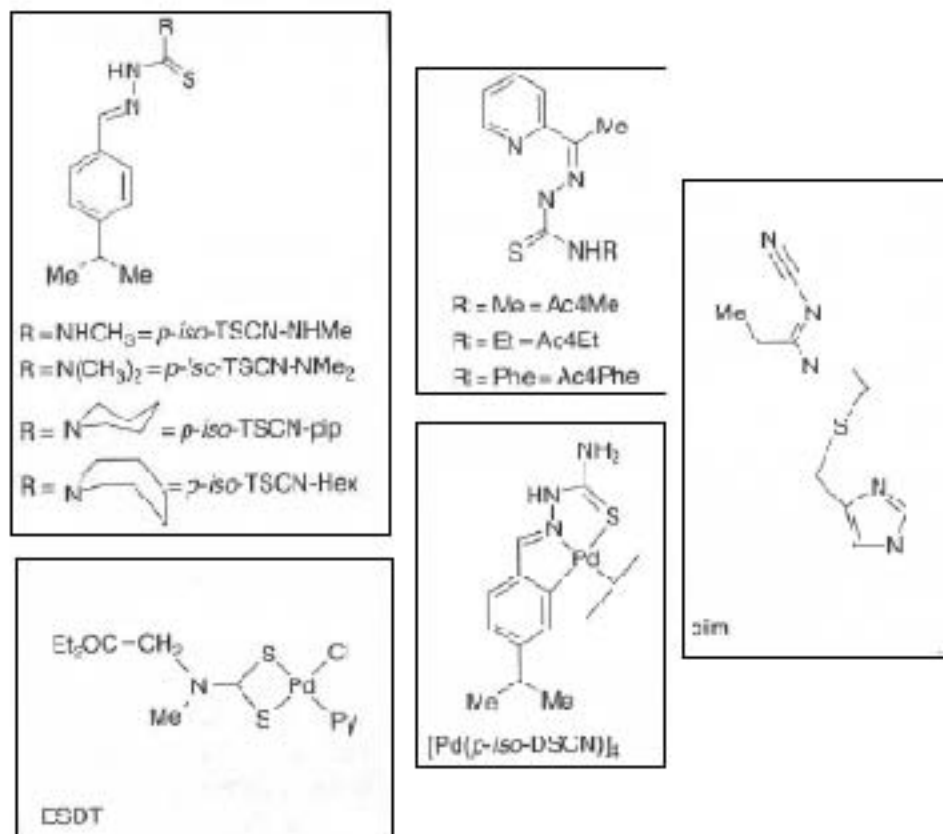


Figura 25. Ligandos y complejos S-dadores de Paladio(II).

#### Otros ligandos con átomos de S- dadores

El primer complejo de Pd(II) activo frente al carcinoma epidérmico de nasofaringe humano fue el de la forma aniónica de la base de Schiff de acetona de S metilditiocarbazato (asmc) de fórmula  $[\text{Pd}(\text{asmc})_2]$ . Este complejo y  $[\text{Pd}(\text{asbz})_2]$  donde asbz es la forma aniónica de la base de Schiff de S-benciditiocarbazato son activos frente a células de leucemia linfoplástica con valores de  $\text{IC}_{50}$  de 2.5 y 2.9  $\mu\text{M}$  respectivamente, siendo importante observar que los correspondientes complejos de Pt(II) son inactivos frente a las mismas células leucémicas. Complejos de Pd(II) con ligandos

mixtos, ditiocarbamato (ddtc) y ligandos bidentados aromáticos como 1,10- fenantrolina o 2,2'-bipiridina son también activos frente a células leucémicas. De la misma forma complejos de Pd(II) con ditiocarbamato, tiomorfolina, piperidina y morfolina, sus correspondientes ésteres metílicos y los correspondientes tiuram-disulfuros mostraron una intensa actividad frente a células KB, L1210 y P388. Los complejos de la serie  $[Pd(MPH)_2X]X$  donde X es Cl o Br y MPH es *N*-mercaptopiridina, son activos frente a líneas celulares tumorales F10 (hibridoma), Fohn (carcinoma de riñón), LoVo (carcinoma humano de colon), HeLa y 3T3.

Los complejos de Pd(II) con ligandos mixtos cis-diclorometionina, 2-mercaptopirimidina y 2-aminopirimidina resultaron activos *in vitro* frente a líneas celulares HeLa y CHO. Finalmente, complejos del tipo  $Pd(L-L)(SR)Cl$  donde L-L es una difosfina y RSH glutatión, L-cisteína o N-acetil-L-cisteína mostraron actividad frente a líneas celulares L1210 y CH1 (carcinoma humano de ovario). Todos ellos podrían ser susceptibles de suministrarse en terapias combinadas con fármacos ya establecidos como el cisplatino.

## 8. 2 Ligandos N-dadores

### *Organopaladatos*

Los complejos ciclopaladatos de derivados de imidazolina (Imd)  $[PdCl_2(C_6H_5Cl_2C_3H_5N_2)_2]$  y  $[PdCl(SEt_2)(C_6H_4-C_3H_5-N_2)_2]$  presentan una actividad citotóxica importante frente a HL-60 con valores de  $Cl_{50}$  inferiores a los del ligando libre. La citotoxicidad mejora al coordinarse al paladio.

### Amino complejos

Los complejos dimeros de Pd(II) con putrescina (put)  $[\text{Pd}_2(\text{put})_2\text{Cl}_4]$  y  $[\text{putH}_2][\text{PdCl}_4]$ , y espermina (sperm),  $[\text{Pd}_2(\text{sperm})_2\text{Cl}_4]$  y  $[\text{PdCl}_2(\text{sperm})_2][\text{PdCl}_4]$  fueron ensayados *in vitro* para probar la actividad antiproliferativa frente a las líneas celulares cancerígenas MDA MB468 (cáncer de mama) y HL 60 (leucemia humana). Los complejos de putrescina dieron valores de  $\text{CI}_{50}$  inferiores al del cisplatino, aunque no los que contienen espermina.

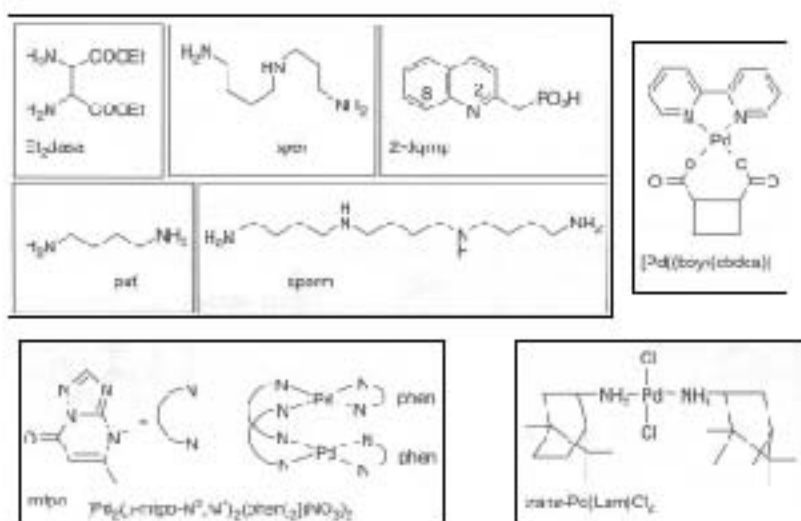


Figura 26. Ligandos y complejos aminados de Pd(II).

Sin embargo, los compuestos de espermidina (sperm)  $[\text{Pd}(\text{spermH})_2][\text{PdCl}_4]$  y  $[(\text{PdCl}_2)_2(\text{sperm})_2]$  resultaron ser muy activos frente a la línea MDA MB468 con valores similares al del cisplatino (Figura 26).

Por otra parte, las propiedades antitumorales frente a fibroblastoma de murino L929, K562 (leucemia humana mielógena)

y HeLa del complejo enantioméricamente puro *trans*-PdCl<sub>2</sub>[(R)-]bomilamino]<sub>2</sub> resultaron ser análogas a las del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino.

Los complejos con ligandos mixtos [Pd(dach)(3-metilrot)] y [Pd(dach)(5-fluoro-orot)] presentan actividad frente a líneas celulares de sarcoma 180. Es interesante citar que los correspondientes complejos de platino son inactivos. Este hecho se explica por la lenta cinética de la hidrólisis de los complejos de paladio en este caso y la nula hidrólisis de los de platino.

Muchos otros complejos mixtos de Pd(II) con ligandos bidentados y diversos tipos de aminas alifáticas y aromáticas han sido estudiados. Algunos de ellos han dado valores para el CI<sub>50</sub> del mismo orden que el del cisplatino. Hasta el presente, ningún compuesto de Pd(II) ha alcanzado los estudios en fase clínica [46].

## 9. Platino

### 9.1 Cisplatino. Mecanismos de actuación

El descubrimiento de las propiedades anticancerígenas del cisplatino fue el comienzo de una nueva etapa en la quimioterapia del cáncer. Al diseño de los fármacos procedentes de la química orgánica, se unía entonces el nuevo aliciente para los químicos inorgánicos: el del diseño de complejos de platino [47]. Una vez conocido el blanco de actuación y los mecanismos implicados, el esfuerzo se centró en el diseño y síntesis de nuevos compuestos de platino que mejoraran las propiedades mostradas por la sencilla molécula neutra *cis*-[PtCl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]. El carboplatino fue el segundo compuesto aprobado para su uso en hospitales. Siguiendo las

reglas estructurales que se establecieron al principio del cambio de uno o dos ligandos en la esfera de coordinación del platino, fueron sustituidos los dos cloruros en posición *cis* por un ligando bidentado, un ácido dicarboxílico, en este caso el ácido ciclobutano dicarboxílico. La cinética sería diferente pero el metabolito resultante, apto para coordinarse al ADN, era el mismo que para el cisplatino (Figura 27).

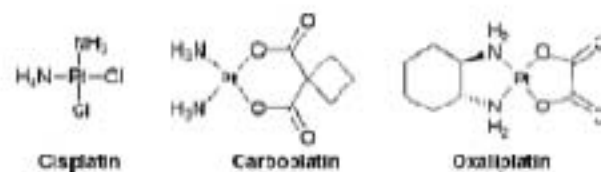


Figura 27. Compuestos de platino antitumorales.

El cisplatino, que mantiene su identidad molecular en el torrente sanguíneo debido a la elevada concentración de ion Cl<sup>-</sup>, llega a la célula y atraviesa la membrana celular liberándose en el citoplasma acuoso donde la concentración de Cl es inferior. Es entonces cuando se implica en una serie de equilibrios de acuación (Figura 28) que originan especies catiónicas reactivas aptas para enlazarse a componentes celulares que tengan sitios nucleofílicos.



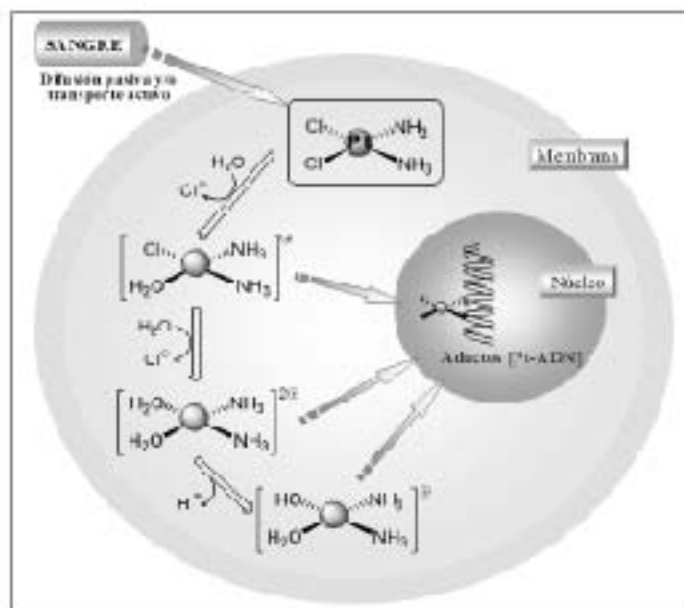


Figura 28. Equilibrios de acutación o hidrólisis del cisplatino en el citoplasma celular.

El ADN y el ARN ofrecen posiciones nucleófilas en los N de las bases, principalmente el N7 de las guaninas. Aunque en el medio celular hay muchas otras moléculas presentes, proteínas, fosfolípidos de la membrana, microfilamentos del citoesqueleto o moléculas con grupos tiol como las metalotioneínas o el glutatión, se acepta que la diana para los complejos de platino es el ADN. Se calcula que un 1% del cisplatino suministrado enlaza al ADN principalmente a través de los átomos de N7 que están expuestos al medio externo en el surco principal y que no están implicados en los enlaces de hidrógeno entre pares de bases. Los aductos del cisplatino-ADN bifuncionales pueden ser intra o intercatenarios y se han descrito hasta seis posibles tipos de unión: (Figura 29) 1,2-intracatenario d(GpG) en guaninas adyacentes de la misma cadena; 1,2-intracatenario d(ApG) en adenina y guanina adyacentes de la

misma cadena; intracatenario entre purinas separadas por una o más bases; intercatenano con uniones a cadenas diferentes y entrecruzamientos proteína—ADN.

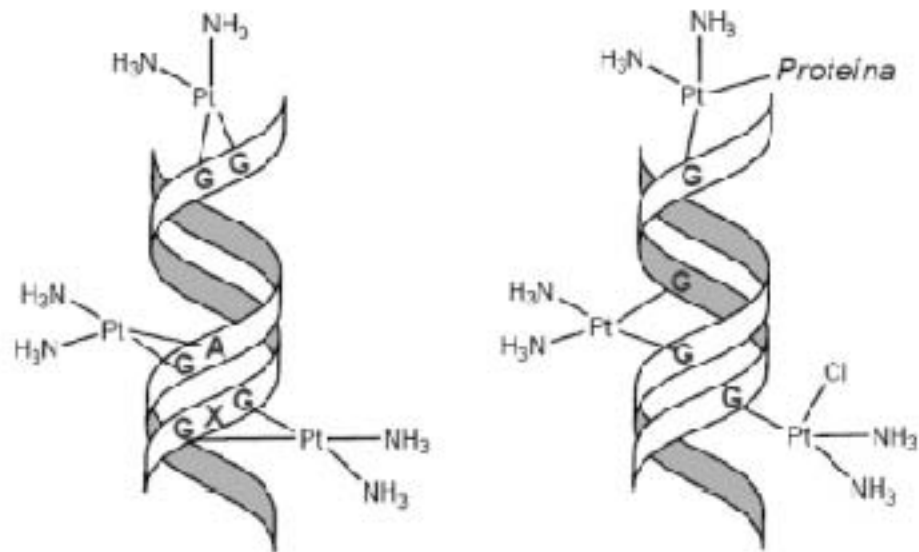


Figura 29. Modos posibles de unión del cisplatino al ADN.

La proporción en que se une del modo descrito en primer lugar es bastante superior a los otros modos, aunque no pueden descartarse.

Los mecanismos bioquímicos que se suceden hasta producir la muerte celular no están todavía completamente esclarecidos. Los datos obtenidos en diversos estudios en diferentes líneas celulares parecen indicar que el cambio estructural originado por el cisplatino en el ADN dañado produce una detención del ciclo celular en la fase G2 y en ausencia de la reparación adecuada, se aborta el proceso de la mitosis y se pone en marcha un mecanismo apoptótico (Figura 30).

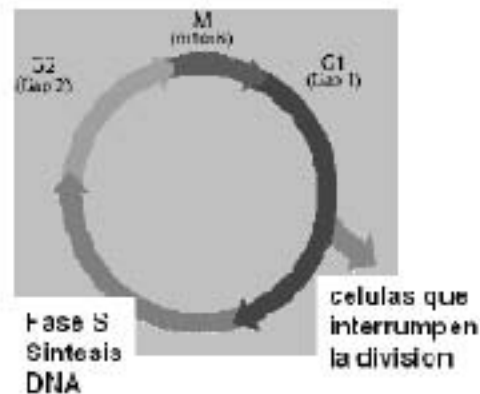


Figura 30. Ciclo celular.

Sin embargo, como consecuencia de las investigaciones realizadas en los últimos años se ha progresado mucho en el conocimiento de las causas de muerte celular. Las primeras hipótesis suponían que el cisplatino causaba la inhibición de la síntesis del ADN, hoy se acepta que la muerte se produce por un proceso apoptótico. La apoptosis es un proceso activo de muerte celular que se manifiesta por la pérdida de contacto entre células, la condensación y fragmentación de la cromatina, el reconocimiento por células fagocíticas, la degradación del ADN, pérdida de capacidad de síntesis de proteínas, entre otros hechos [48]. Lo que no se conoce todavía bien es el mecanismo específico que pone en marcha la apoptosis en respuesta al daño producido en el ADN por el cisplatino. El daño causado por el cisplatino origina un proceso de muerte celular por apoptosis en el que se implican varias proteínas como la p53 y la familia de las caspasas entre otras. El gen BAX acelera la muerte programada al expresar una proteína que en la membrana mitocondrial provoca la salida del citocromo-C. Como consecuencia, se produce la activación de la caspasa-3 que conduce a la muerte por apoptosis. Por otra parte, la proteína PIDD

codificada por un gen regulado por la p53 activa una caspasa que provoca salida del factor inductor de la apoptosis AIF (Figura 31).

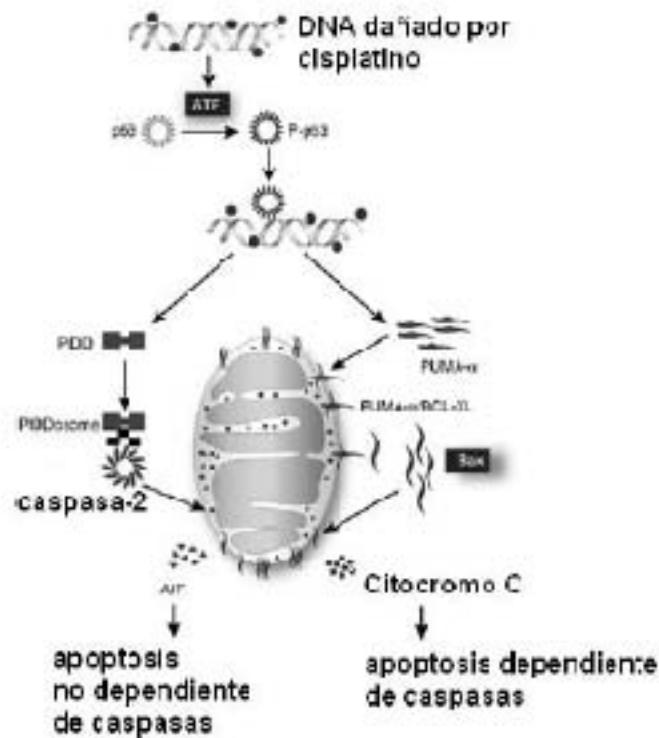


Figura 31. Mecanismo de inducción de apoptosis por enlace del cisplatino al ADN.

Se ha avanzado mucho en la identificación y caracterización de las proteínas que reconocen el daño inferido al ADN por el cisplatino. Las familia de proteínas más importantes implicadas en estos procesos son la NER (proteínas de reparación y escisión de nucleótidos), las MMR, proteínas de reparación de errores, la proteína quinasa dependiente del ADN y las HMC, grupo de proteínas de alta movilidad. Las proteínas reparadoras reconocen el daño causado en el ADN por la unión covalente del complejo de

platino, escinden por ambos extremos los nucleótidos de la zona dañada y una polimerasa restaura la secuencia perdida. Es una de las causas de la resistencia a los fármacos de platino.

La toxicidad del cisplatino afecta principalmente a células en rápida división como las células tumorales, aunque no de manera específica, por lo que células sanas como las de epitelio, médula ósea o intestino también resultan afectadas. Este hecho constituye una de las principales limitaciones del tratamiento. Otros inconvenientes igualmente importantes son su elevada toxicidad a nivel renal, ya que la orina es uno de las principales vías de eliminación del fármaco, la resistencia inherente o adquirida que ciertos tipos de tumores presentan y su escasa solubilidad en agua, que dificulta la administración oral del fármaco.

Estos factores han propiciado el desarrollo de derivados de cisplatino en los se han incorporado modificaciones racionales que actúan sobre aspectos como la velocidad de hidrólisis del fármaco, para así aumentar el tiempo de permanencia del compuesto en su forma inactiva y minimizar la interacción con biomoléculas (carboplatino), mejorando su disponibilidad oral (satraplatin) o mejorando su especificidad mediante la conjugación a sistemas de transporte activos o pasivos (lipoplatino).

En la actualidad, muchos compuestos de Pt se encuentran en proceso de evaluación, mientras que otros han sido descartados por diferentes motivos, generalmente asociados a algún tipo de toxicidad o resistencia por lo que sigue siendo necesario el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos que empleen otros mecanismos de acción. La toxicidad y la resistencia al cisplatino

han conducido al desarrollo de nuevos compuestos basados en platino capaces de superar estas limitaciones.

Durante muchos años parecía evidente que para que un complejo resultara activo debía de cumplir una serie de requisitos mínimos. En 1973 Cleare y Hooschele [49] postularon una serie de reglas empíricas que debían cumplir los compuestos análogos al cisplatino para que existiera actividad antitumoral:

1. Debían responder a la fórmula general  $[PtL_2X_2]$  donde el platino tiene siempre estado de oxidación +2, X es un ligando saliente, fácil de sustituir y L un ligando inerte mono o bidentado que permanece unido al platino
2. Los ligandos debían disponerse en posición cis
3. Los ligandos X debían ser un grupo monocariónico de manera que el compuesto fuese neutro. Además debían de tener una reactividad intermedia, como la de los iones cloruro o bromuro. Especies más reactivas aumentarían la toxicidad del compuesto, mientras que grupos menos lábiles conducirían a compuestos inertes a la reacción con el DNA
4. Los compuestos con grupos inertes monoaminados presentaban mejores actividades que los que contenían ligandos diaminados. Los compuestos con el ligando amoníaco eran los que presentaban mejores actividades. Este comportamiento se asoció con la disminución de la capacidad de formar puentes de hidrógeno en las aminas más sustituidas.

## 9.2 Nuevos compuestos de platino con acción antitumoral

Aunque inicialmente los compuestos ensayados respondían a estos esquemas, comenzaron a introducirse nuevos compuestos de platino con estructuras que no se ajustaban a las primeras normas. Así, pronto se introdujeron compuestos de Pt(IV), como el iroplatino, (*cis,cis,trans*-[PtCl<sub>2</sub>(ipa)<sub>2</sub>(OH)<sub>2</sub>]), que llegó a superar las fases preclínicas II y III pero al ser menos activo que el carboplatino no fue admitido para uso clínico. El tetraplatino ([Pt(*R,R*-chxn)Cl<sub>4</sub>]), llegó a la fase I pero los efectos secundarios en el sistema neurológico que se observaron hicieron que se descartara. Por otro lado, el compuesto JM216, (*cis,cis,trans*-[Pt(cha)Cl<sub>2</sub>(NH<sub>3</sub>)(OAc)<sub>2</sub>]), más lipofílico, llegó a la fase III de los ensayos clínicos como agente activo oral, pero éstos fueron abandonados debido a la variabilidad en la absorción del fármaco (Figura 32).

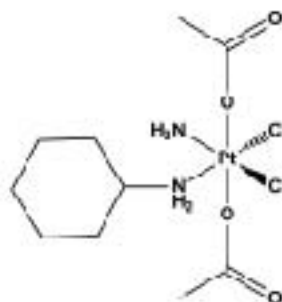


Figura 32. Compuesto de Pt(IV) JM216 en fase clínica.

También se han desarrollado compuestos multinucleares. Para estos compuestos la actividad depende en gran medida de las características del ligando puente. Suelen ser activos a dosis mucho menores que el cisplatino, a pesar de ello la elevada toxicidad que presentan los descarta como candidatos para estudios clínicos [50].

De todos los compuestos polinucleares el más importante por haber alcanzado estudios en fase clínica es el BBR3464 [51] (Figura 33), activo frente a tumores resistentes al cisplatino como algunos melanomas y tumores de páncreas y pulmón. La actividad de este compuesto se explica por su distinta interacción frente al DNA. El compuesto forma aductos intracatenarios fácilmente reparables, aductos 1,2- y 1,4-intercatenarios, y en menor medida 1,6-intercatenarios. Estos aductos provocan una torsión de la doble hélice de entre 15-21° hacia el surco principal y un desenrolle de unos 14° [52]. Estas lesiones no son reconocidas por las proteínas HMG pero tampoco son reparadas por las proteínas NER, lo que provoca que los aductos formados persistan en el tiempo y bloqueen la replicación y la transcripción del DNA.

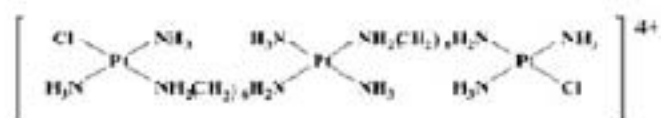


Figura 33. Compuesto multinuclear BBR3451 en fase clínica.

Se han investigado también compuestos con geometría *trans*. Farrell publicaba en 1989 los primeros compuestos con geometría *trans* que presentaban actividad *in vitro* [53]. A partir de ese momento y hasta la actualidad se han estudiado multitud de compuestos con esta geometría, mostrándose muchos de ellos activos, incluso con actividad superior a los correspondientes isómeros *cis* [54]. Los compuestos de platino con geometría *trans* se caracterizan por presentar un espectro de actividad diferente a la del cisplatino y suelen ser activos en líneas celulares resistentes a éste. El transplatino forma aductos monofuncionales con el DNA



que lentamente se convierten en aductos intercatenarios. La ineficiencia clínica del fármaco se relaciona con el largo periodo de tiempo en que el aducto monofuncional se mantiene como tal y con su alta reactividad frente al glutatión. Por otra parte, el transplatino no forma aductos 1,2-intracatenarios, debido a restricciones estéricas, sino que forma aductos 1,3-intracatenarios entre guaninas separadas por una tercera base, los cuales evolucionan a aductos intercatenarios con la N7 de una guanina y N3 de una citosina complementaria. Esta observación pone de manifiesto que el tipo de aducto formado entre el DNA y los compuestos de platino no es determinante en su citotoxicidad.

La presencia de ligandos voluminosos en la estructura de los compuestos de Pt(II) dificulta la inactivación del platino debido a reacciones con biomoléculas que contengan azufre, como el GSH o las Metalotioneínas.

Compuestos de coordinación con ligandos bioactivos que tienen una afinidad intrínseca por el DNA también han sido investigados. Estos ligandos proporcionan al fármaco mayor selectividad y especificidad en su ataque a la biomolécula. Algunos ejemplos son los compuestos preparados por Denny [55], en los que el metal se enlaza a moléculas intercalantes del DNA como las anilinoacridinas o las acridinocarboxamidas.

De los varios miles de compuestos de platino (II) sintetizados, sólo unos 23 han llegado a entrar a ensayos clínicos y de ellos, sólo dos tienen aprobación global y tres tienen mercado en diversos países.

En la Figura 35 se presentan los compuestos de platino con aprobación de mercado para aplicación en humanos, al menos en una nación y sus estructuras.

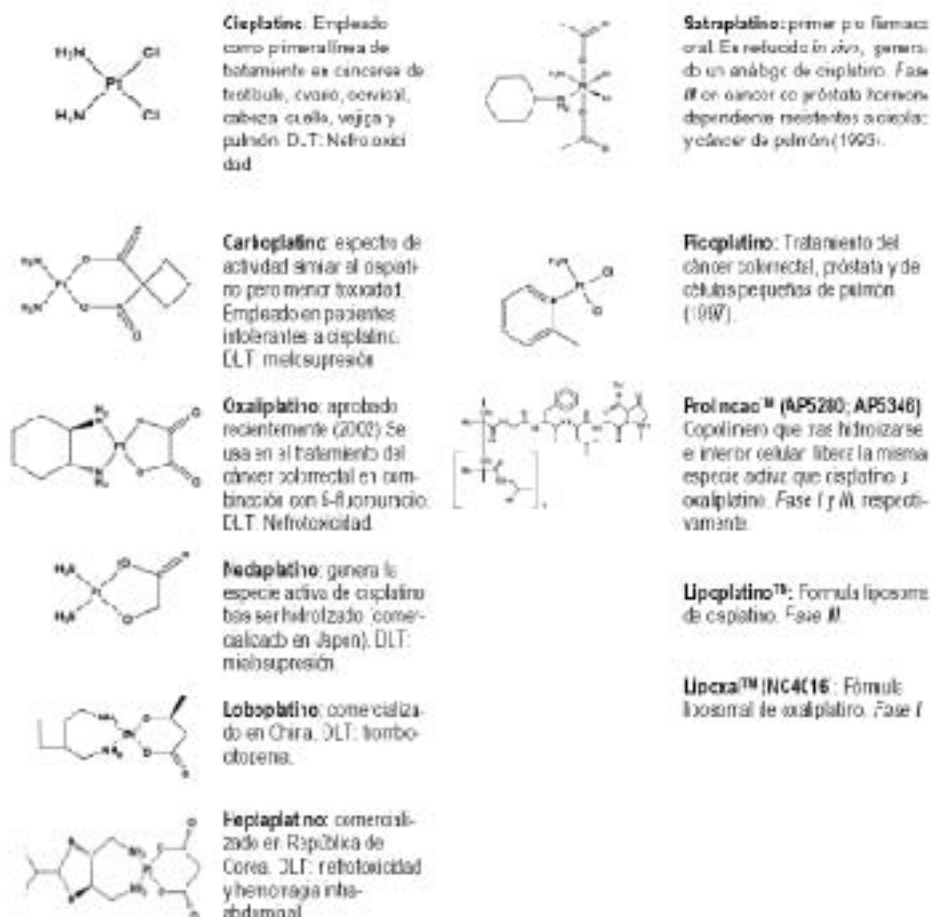


Figura 35. Compuestos de platino aprobados (izquierda) y en estudios clínicos (derecha).

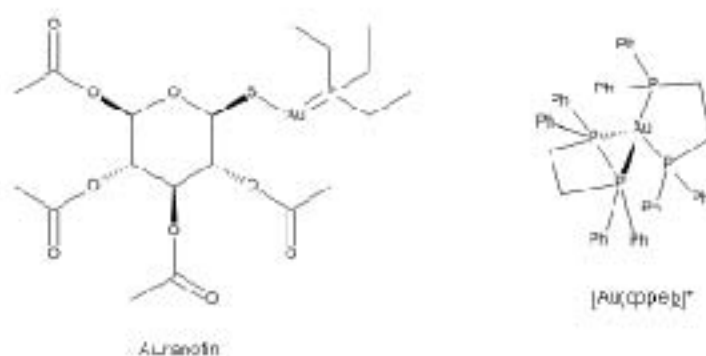
Actualmente sigue habiendo un interés creciente en la síntesis de fármacos antitumorales basados en platino. La disección del ciclo celular, de los procesos de transducción de la señal mitogénica desde la membrana al núcleo celular, de la regulación de la

expresión génica, del proceso de apoptosis, y los conocimientos cada vez mayores sobre invasividad y angiogénesis permiten el diseño de nuevos fármacos más dirigidos que están aún por explorar.

## 10. Oro

En los últimos años el estudio de compuestos de oro con posible actividad antitumoral se ha desarrollado de forma creciente [56]. Las particularidades de la química de este metal, en especial, la alta afinidad a los grupos tioles y selenoles proporcionan un abanico de opciones debido a los nuevos blancos terapéuticos que involucran residuos cisteína o selenocisteína.

Los compuestos de oro con actividad antitumoral pueden clasificarse, de acuerdo con la coordinación del metal, con sus propiedades lipofílicas y con la capacidad que tengan para llevar a cabo reacciones de intercambio de ligandos con tioles o selenoles, en dos grupos: 1) compuestos neutros y lineales como el auranofin {(tetraacetyl- $\beta$ -D tioglucosa)(trifenilfosfina)Au(I)} y 2) cationes lipofílicos como el  $[Au(dppe)_2]^+$  donde  $dppe = Ph_2P(CH_2)_2PPh_2$  (Figura 36). Para ambos grupos, el blanco principal es la mitocondria y la inducción de apoptosis se da por la ruptura del balance redox de los tioles.



**Figura 36.** Estructura de los compuestos de oro con actividad antineoplásica con geometría lineal Auranofin y tetraédrico  $[Au(dppe)_2]Cl$ .

### 10.1 Compuestos de Au (I)

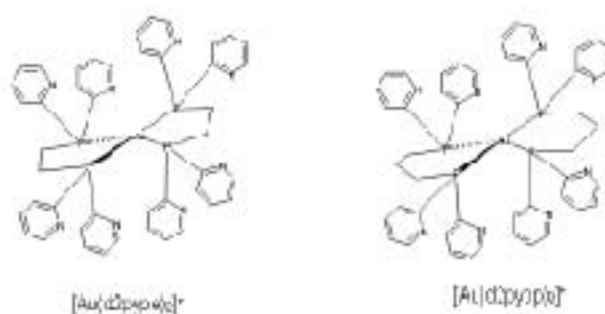
La actividad de auranofin frente a células HeLa fue descrita por Lorber y su grupo en el año 1979 y estudios posteriores revelaron que incrementaba el tiempo de supervivencia de ratones con leucemia P388. Un estudio estructura-actividad de la actividad citotóxica *in vitro* y la actividad antitumoral *in vivo* de una serie de compuestos lineales de Au (I) de tipo  $LAuX$  (donde L es generalmente, aunque no exclusivamente fosfina) mostró que la actividad antitumoral frente a leucemia P388 se optimiza para compuestos con ambos ligandos fosfina o tioazúcar, modulando la actividad antitumoral modificando los sustituyentes de la fosfina. Desde entonces se han incrementado los estudios de la actividad citotóxica de otros compuestos lineales de Au(I) que incorporan ligandos azufrados como tionucleobases y ditiocarbamatos, sulfanilpropenoatos, vitamina K3 bioactiva, azacumarina y naftalimida.

De las relaciones estructura-actividad obtenidas para ligandos ditostina y los correspondientes compuestos tetraédricos de oro del tipo  $[\text{Au}(\text{R}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{PR}_2)_2]\text{Cl}$  se puede concluir que se presenta una mayor actividad cuando los grupos R son fenilos y cuando  $n = 2,3$  o *cis* Cl=Cl. En general, la actividad disminuye drásticamente o se pierde por completo cuando los sustituyentes R son diferentes a fenilo. Para los compuestos dinucleares de oro lineales de tipo  $[\text{ClAu}(\text{Ph}_2\text{P}(\text{CH}_2)_n\text{Ph}_2\text{P})\text{AuCl}]$  y  $\text{XAu}(\text{dppe})\text{AuX}$  [ $\text{X} = \text{Cl}, \text{Br}, \text{OAc}, \text{SMan}, \text{SGlu}, \text{SGlu}(\text{Ac})_4, \text{SMan}(\text{Ac})_4$ ] las relaciones estructura actividad muestran que la actividad antitumoral de estos compuestos está relacionada con su capacidad para formar las especies bisquelato  $[\text{Au}(\text{P-P})]^+$  *in vivo* una vez que reacciona con tioles.

El estudio clínico de  $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$  se detuvo cuando estudios en perros y conejos mostraron que el tratamiento producía una gran toxicidad en corazón, hígado y pulmón atribuidos a una disfunción mitocondrial. El comportamiento de  $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$  y compuestos relacionados permite incluirlos en el grupo de agentes antitumorales conocidos como cationes lipofílicos deslocalizados (DLCL, por sus siglas en inglés), cuya característica es acumularse en las mitocondrias de células tumorales, acumulación promovida por el alto potencial de membrana que es una característica de éste tipo de células.

La alta lipofilia de  $[\text{Au}(\text{dppe})_2]^+$  trae como resultado una acumulación no selectiva en la mitocondria produciendo una permeabilización general de la membrana. Para disminuir la falta de selectividad, se modificó el compuesto sustituyendo los grupos fenilo por grupos piridilo donde el nitrógeno ocupa la posición 2, 3 o 4 del anillo aromático generando la serie de compuestos con

fórmula general  $[Au(dnpype)_2]Cl$  que son estructuralmente muy parecidos a  $[Au(dppe)_2]^+$  y que presentan una modulación del carácter hidrofílico-lipofílico (Figura 37). Un estudio *in vivo* con 38 tumores de colon en un modelo de ratón muestra que de los compuestos de la nueva familia, aquellos muy lipofílicos o los muy hidrofílicos no presentan un retardo significativo en el crecimiento del tumor, mientras que el compuesto 2-piridina con una lipofilia media presenta una gran actividad antitumoral que está en función de la alta concentración del compuesto en plasma y en tejido tumoral. Se ha probado que el compuesto se acumula preferencialmente en las mitocondrias de células tumorales.



**Figura 37.** Compuestos de Au(I) tetraédricos con actividad antitumoral.

En busca de una mayor modulación de la lipofilia-hidrofilia en éste tipo de compuestos se sintetizó y evaluó el derivado con un puente propilo que une a las fosfinas del ligando con sustituyentes 2-piridina  $[Au(d_2pypp)_2]^+$ , el compuesto se diseñó con la intención de mantener la lipofilia mostrada por los compuestos tetraédricos y mantener su acumulación en la mitocondria así como incrementar la reactividad frente a proteínas con grupos tioles o selenoles

facilitando el intercambio de ligandos como consecuencia del incremento en el tamaño del anillo. Estudios recientes muestran que  $[\text{Au}(\text{d}_2\text{pypp})_2]^+$  presenta toxicidad en células tumorales de mama y no presenta efecto en células normales. Se acumula en la mitocondria por el alto potencial de membrana e induce apoptosis de manera selectiva en células tumorales de mama y no lo hace en células normales. La actividad de tioredoxina (Trx) y tioredoxina reductasa (TrxR) son inhibidas por  $[\text{Au}(\text{d}_2\text{pypp})_2]^+$  siendo mayor la inhibición en la línea tumoral comparada con las células normales, indicando que la mitocondria y el sistema de tioredoxinas son los blancos principales asociados a la toxicidad selectiva mostrada en las líneas tumorales de mama. A las mismas concentraciones  $[\text{Au}(\text{dppp})_2]^+$  presenta una toxicidad no selectiva en ambas líneas celulares causando necrosis y no apoptosis.

## 10.2 Compuestos de Au (III)

Poco después de los primeros reportes de la actividad de los compuestos de Pt(II), muchos investigadores comenzaron a investigar los compuestos del catión isoelectrónico Au(III), sin embargo, a diferencia de los compuestos de Pt(II) que son estables frente a la reducción, la gran mayoría de los compuestos de Au(III) se reducen fácilmente, en especial por grupos tioles. Por lo anterior muchos grupos se dieron a la tarea de estabilizar el estado de oxidación (III) del oro y así evitar que muchos compuestos con potencial antitumoral fueran reducidos rápidamente (probablemente en sangre) y no alcanzaran sus principales blancos moleculares en el interior de la célula.

Uno de los primeros logros en la estabilización de los compuestos de Au(III) fue la síntesis del compuesto  $[Au(damp)X_2]$  (donde damp es 2-((dimetilamino)metil)fenilo y X puede ser  $Cl^-$ ,  $SCN^-$ ,  $OAc^-$ ,  $\frac{1}{2}$  oxalato o  $\frac{1}{2}$  malonato) por el grupo de Fricke en la segunda mitad de la década de 1990. Dado que el ligando damp se coordina con el metal con un enlace  $\eta^1$  con el anillo aromático (véase figura 38), la fuerte donación de densidad electrónica del enlace  $\sigma$  hace más difícil la reducción, cumpliendo así con la estabilización de Au (III). Un atractivo adicional de este compuesto era la presencia de dos grupos fácilmente sustituibles en posición *cis*. Estos compuestos mostraron una buena actividad citotóxica frente a cáncer de ovario y vejiga [200].

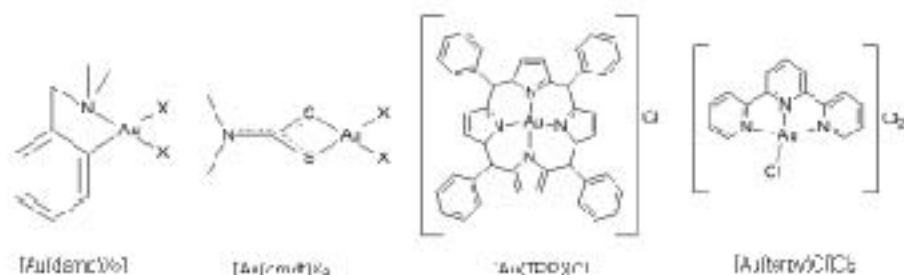


Figura 38. Algunos compuestos de Au(III) con actividad antineoplásica.

Fregona y sus colaboradores sintetizaron un interesante grupo de compuestos empleando ligandos ditiocarbamatos, uno de los cuales es  $[Au(dmdt)X_2]$ , donde dmdt es N, N-dimetilditiocarbamato y X es cloruro o bromuro. Al igual que en el ligando damp, la donación  $\sigma$  de densidad electrónica, en este caso, por dos átomos de azufre que forman un anillo de cuatro miembros al coordinarse con el oro, estabiliza el estado de oxidación (III). Nuevamente se cuenta con



ligandos fácilmente sustituibles en posición *cis* siguiendo el paradigma del cisplatino. Los compuestos con ditiocarbamato mostraron ser más eficaces que el cisplatino en diferentes líneas celulares y se propone un mecanismo de acción diferente al que presenta cisplatino, pues presenta una gran actividad citotóxica en líneas tumorales resistentes a este compuesto.

Che y su grupo sintetizaron el compuesto  $[Au(TTP)]Cl$  con el conocido ligando tetrafenilporfirina para incrementar la estabilidad de Au(III). El compuesto mostró una gran actividad anticancerígena con valores de  $Cl_{50}$  en el intervalo submicromolar después de 48 horas de incubación con el compuesto, y mucho mayor actividad que la mostrada por cisplatino, en particular en carcinoma nasofaríngeo. Este mismo grupo también ha descrito compuestos ciclometalados con fórmula general  $[Au_m(C^N^C)_mL]^n$  ( $m = 1-3$ ;  $n = 0-3$ ;  $C^N^C = 2,6$ -difenilpiridina) que contiene varios grupos N o ligandos fosfina (L) que presentan una potente actividad citotóxica frente a varias líneas celulares incluyendo algunas resistentes a cisplatino. Los compuestos parecen presentar diferentes mecanismos de acción dependientes del ligando auxiliar presente que influencia su afinidad para unirse con ADN. Las estructuras de algunos de los compuestos reportados por el grupo de Che se presentan en la figura 38.

Messori y su grupo han descrito una serie de compuestos con actividad citotóxica en donde el potencial redox del metal ha disminuido al emplear ligandos poliamínicos simples para formar los compuestos  $[Au(en)_2]Cl_3$ ,  $[Au(dien)Cl]Cl_2$ ,  $[Au(bipy)(OH)_2]PF_6$ ,  $[Au(bipy^{dmb}-H)(OH)]PF_6$  donde  $en =$  etilendiamina,  $dien =$  dietilentriamina,  $bipy = 2,2'$ -bipiridina y  $bipy^{dmb} = 5$ -(1,1-dimetilbenzyl)-2,2'-bipiridina. Otras aminas empleadas por el grupo

de Guo para obtener compuestos de Au(III) citotóxicos son la aminoquinolina, 1,4,7-triazacilononano (TACN) y terpiridinas para formar los correspondientes compuestos  $[\text{Au}(\text{Quinpy})\text{Cl}]\text{Cl}$ ,  $[\text{Au}(\text{TACN})\text{Cl}_2]\text{Cl}$  y  $[\text{Au}(\text{terpy})\text{Cl}]\text{Cl}_2$ , cuyas estructuras se muestran en la figura 39.

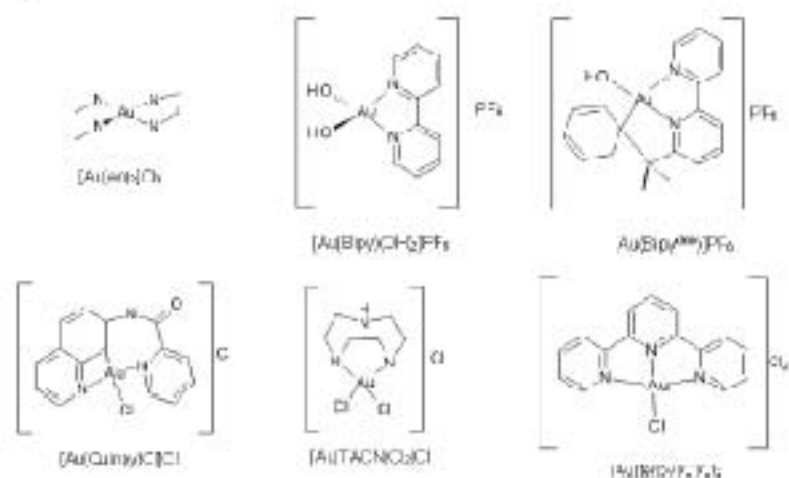


Figura 39. Compuestos citotóxicos de Au(III) con polipiridinas.

El mecanismo de citotoxicidad sugerido para el auranofin y otros compuestos de Au(I) con fosfinas (monodentadas o bidentadas) y fosfoles se relacionan con la inhibición de la tioredoxina reductasa TrxR. Se supone que la inhibición es debida a la interacción del Au(I) con el sitio activo de la proteína que posee un residuo selenocisteína. Evidencia indirecta de éste hecho es la obtención de una estructura de rayos X de la interacción del compuesto de Au(I) con la glutatión reductasa (GR) -la glutatión reductasa es una proteína relacionada con TrxR pero que no cuenta con el residuo selenocisteína- en donde se constata la coordinación S-Au-S en el sitio activo de GR.

La citotoxicidad mostrada por los compuestos de Au(III) también se relaciona con la inhibición de la TrxR mitocondrial y citosólica promoviendo la inducción a apoptosis. Algunos estudios de la inhibición de la TrxR aislada sugieren que hay un daño oxidativo importante en la enzima debido a la oxidación indiscriminada de grupos tioles y selenoles. Teniendo en cuenta lo anterior, tampoco hay que perder de vista el hecho de que el metabolito activo de los compuestos de Au(III) pueden ser los compuestos de Au(I) obtenidos por la reducción *in vivo*. Recientemente Bindoli y colaboradores sugieren un mecanismo que involucra la inhibición de TrxR citosólica y mitocondrial para explicar la citotoxicidad de los compuestos de Au(I) y Au(III) en donde en primer lugar, la inducción de apoptosis por parte del auranofin involucra la oxidación de peroxiredoxina 3 y es regulado por la familia de proteínas Dcl-2 y en segundo lugar, tanto auranofin como compuestos de Au(III) con tiocarbamatos estimulan la vía MAP-quinasa que lleva a la muerte celular. Finalmente, el mecanismo propuesto para los compuestos con porfirinas involucra la inducción de apoptosis por ambas vías, dependientes e independientes de caspasas incluyendo la activación de la proteína quinasa p38.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología en el Desarrollo (CYTED), red temática RIIFCM 209RT0300.

## Referencias

- [1] B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Krigas, *Nature* 205, 698 (1965).
- [2] B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, 222, 385 (1963).

- [3] L. R. Bernstein in M. Gielen & E.R. Tiekink (eds.) "Metallotherapeutic Drugs & Metal-Based Diagnostic Agents". John Wiley & Sons, Chichester, 2005, p 259.
- [4] J. Narasimhan, W. F. Antholine & C. R. Chitambar, *Biochem Pharmacol.* **44**, 2403 (1992).
- [5] M. A. Jakupcic & B.K. Kopplor, *Curr. Top. Mod. Chem.*, **4**, 1575 (2004).
- [6] L. R. Bernstein, *Pharmacol. Rev.* **50**, 665 (1998).
- [7] A. Alama, B. Iasso, F. Novelli & F. Sparatore, *Drug Discov. Today* **14**, 500 (2009).
- [8] C. Pettinari, F. Marchetti, R. Pettinari, A. Cingolani, A. Drozdov & S. Troyanov, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2**, 188 (2002).
- [9] H.-G. Liu, Y. Wang, L. Lian & L.-H. Xu, *Environ. Toxicol.* **21**, 166 (2006).
- [10] S. K. Hadjikakou & N. Hadjiladis, *Coord. Chem. Rev.* **253**, 235 (2009).
- [11] H. Kopf & P. Kopf-Maier, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **18**, 477 (1979).
- [12] M.M. Harding & J.B. Waern, *Inorg. Chem.* **43**, 206 (2004).
- [13] L.Y. Kuo, A.H. Liu & T.J. Marks in *Metal Ions in Biological Systems*. A. Sigel & H. Sigel (Eds.) Vol. 33. Marcel Dekker, New York, 1996.
- [14] P. Yang & M. Guo, *Coord. Chem. Rev.* **105-106**, 109 (1999).
- [15] M. Guo, H. Sun, H.J. McArdle, L. Gambling & P.J. Sadler, *Biochemistry*, **39**, 10023 (2000).
- [16] A.D. Tinoco, E.V. Eames & A.M. Valentine, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 7767 (2008).
- [17] B. K. Keppler, C. Friesen, H. G. Moritz, H. Vongerichten & E. Vogel, *Struct. Bond.* **78**, 97 (1991).

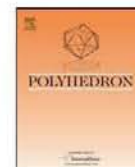
- [18] R. Hernández, J. Lamboy, I. M. Gao, J. Matta, F. R. Román & F. Meléndez *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 685 (2008).
- [19] D.F. Buck, P.M. Aheysinghe, C. Cullinane, A.I. Day, J.G. Collins & M.M. Harding, *Dalton Trans.* 2328 (2006).
- [20] P. Kopf-Maier, H. Kopf & E.W. Neuse. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **23**, 456 (1904).
- [21] X. Wu & M.I. Go in M. Gielen & F.R. Isekink (eds) *Metallotherapeutic Drugs & Metal-Based Diagnostic Agents*, Wiley, Chichester, 2005, p 193
- [22] W. Cao, C.E. Bohl & J.T. Dalton, *Chem. Rev.* **105**, 3352 (2005).
- [23] S. Top, A. Vessières, G. Ledercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché & G. Jaouen, *Chem. Eur. J.* **9**, 5223 (2003).
- [24] F.A. Hillard, P. Pigeon, A. Vessières, C. Amatore & G. Jaouen *Dalton Trans.* **43**, 5073 (2007).
- [25] C. A. Claussen & F. C. Long, *Chem Rev* **99**, 2797 (1999)
- [26] R. M. Burger, *Chem. Rev.* **98**, 1153 (1998).
- [27] M. Whittall, J. Howard, P. Ponka & D. R. Richardson, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 14901 (2006).
- [28] J.A. Cim & H.G. Petering, *Cancer Res.* **27**, 1278-1285 (1967).
- [29] G. Cerchiano, K. Aquilano, G. Filomeni, G. Rotilio, M. R. Ciriolo & A. M. D. C. Ferreira, *J Inorg Biochem* **99**, 1433-1440 (2005)
- [30] L. Ruiz-Azuara, *Preparation of new mixed copper aminoacidate complexes from phenylate phenanthrolines to be used as anticancerogenic agents*. US Patent 5, 107, 005, April 21, 1992.
- [31] L. Ruiz-Azuara, *Copper amino acidate dimine nitrate compounds and their methyl derivatives and a process for preparing them*. US Patent 5, 576, 326, November 19, 1996.
- [32] R. Alemón-Medina, M. Breña-Valle, J.L. Muñoz-Sánchez, M.I. Gracia-Mora & L. Ruiz-Azuara *Cancer Chemother Pharmacol* **60**, 219-220 (2007)

- [33] M. E. Bravo-Gómez, J.C. Garcia-Ramos, I. Gracia-Mora & L. Ruiz Azuara, *J. Inorg. Biochem.* **103**, 299-309 (2009).
- [34] A. Kellott, M. O'Connor, M. McCann, O. Howe, A. Casey, P. McCarron, K. Kavanagh, M. McNamara, S. Kennedy, D. D. May, P.S. Skell, D. O'Shea & M. Devereux, *Med. Chem. Commun.* **2**, 579-584 (2011).
- [35] J. H. Wen, C.-Y. Li, Z.-R. Geng, X.-Y. Ma & Z.-L. Wang *Chem. Commun.* **47**, 11330-11332 (2011).
- [36] D. Magda, P. Lecare, Z. Wang, W. Hu, P. Thiemann, X. Ma, P.K. Dranchak, X. Wang, V. Lynch, W. Wei, V. Csokai, J.G. Hacia, & J.L. Sessler, *Cancer Res.* **68**, 5318 (2008).
- [37] M.J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* **236**, 209 (2003)
- [38] P. J. Dyson & Gianni Sava, *Dalton Trans.*, 1929 (2006).
- [39] G. Gasser, I. Ott, & N. Metzler-Nolte, *J. Med. Chem.* **54**, 3 (2011)
- [40] Y. K. Yan, M. Melchart, A. Habtemariam, P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 4764 (2005).
- [41] H. K. Liu, F. Wang, J. A. Parkinson, J. Bella, P. J. Sadler, *Chem. Eur. J.* **12**, 6151 (2006).
- [42] C. Scolaro, A. B. Chaplin, C. G. Hartinger, A. Bergamo, M. Cocchietto, B. K. Keppler, G. Sava, P. J. Dyson, *Dalton Trans.* **43**, 5065 (2007).
- [43] A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, R. Fernandez, V. Walland, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons, R. E. Aird, D. I. Jodrell, P. J. Sadler, *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1739 (2006).
- [44] I. W. McNae, K. Fishburne, A. Habtemariam, T. M. Hunter, M. Melchart, F. Y. Wang, M. D. Walkinshaw & P. J. Sadler, *Chem. Commun.*, 1786 (2004).
- [45] M. Das & S. E. Livingstone, *Br.J.Cancer* **37**, 466 (1978).

- [46] A. Garoufis, S. K. Hadjikakou & N. Hadjiliadis in M. Gielen & F. R.T. Tiekink (eds.) "Metallotherapeutic Drugs & Metal-Based Diagnostic Agents", John Wiley and Sons, Chichester, 2005, cap 21.
- [47] B. Lippert (ed.) "Cisplatin", Wiley-VCH, Zurich, 1999.
- [48] R. Kim, K. Tanabe, Y. Uchida, M. Fmi, H. Inoue, & T. Toge, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **50**, 343 (2002).
- [49] M. J. H. Cleare & J. D. Hoeschele, *Bioinorg. Chem.* **2**, 167 (1973).
- [50] N. J. C. Wheate & J.G. Collins, *Coord. Chem. Rev.* **241**, 133 (2003).
- [51] N. Farrell, S. G. de Almeida, K. A. Skov, *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5018 (1988).
- [52] J. W. Cox, S. J. Berners-Price, M. S. Davies, Y. Qu, N. Farrell, *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 1316 (2001).
- [53] N. Farrell, T.T.B. Ha, J. P. Souchard, F. L. Wimmer, S. Cros & N. P. Johnson, *J. Med. Chem.* **32**, 2241 (1989)
- [54] A. N. Zakovska, O. Novakova, Z. Balcarova, U. Bierbach, N. Farrell & V. Drabec, *Eur. J. Biochem.* **254**, 547 (1990).
- [55] H. H. Lee, B. D. Palmer, B. C. Baguley, M. Chin, W. D. McFayden, G. Wickham, & W. A. Denny, *J. Med. Chem.* **35**, 2983 (1992).
- [56] P.J. Barnard & S.J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **251**, 1869 (2001).
- [57] I. Ott, *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1670 (2009).
- [58] T.M. Simon, D.H. Kunishima, G.J. Vibert, & A. Lorber, *Cancer*, **44**, 1965 (1979).
- [59] F. R. T. Tiekink *Crit Rev Oncol Hematol* **42**, 225–248 (2002)
- [60] C. K. L. Li, R.W-Y Sun, S.C-F. Kui, N. Zhu & C-M. Che, *Chem. Eur. J.* **12**, 5253 (2006).

- [61] A. Bindoli, M.P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini & L. Messori *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1692–1707 (2009).
- [62] R.W-Y. Sun & C-M. Che *Coord. Chem. Rev.* **253**, 1682–1691 (2009)





## A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine

Juan Carlos García-Ramos<sup>a</sup>, Araceli Tovar-Tovar<sup>a</sup>, Joseelyne Hernández-Lima<sup>b,c</sup>,  
Fernando Cortés-Guzmán<sup>b,c</sup>, Rafael Moreno-Esparza<sup>a,\*</sup>, Lena Ruiz-Azuara<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, Mexico D.F. 04510, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico D.F. 04510, Mexico

<sup>c</sup> Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, carretera Toluca-Atlacomulco, km 14.5, Toluca, Mexico 50200, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 1 April 2011

Accepted 25 July 2011

Available online 6 August 2011

#### Keywords:

Casiopeínas

Anticancer inorganic compounds

Stacking interactions

Binding affinity

Charge transfer adduct

Density functional theory

Copper compounds

### ABSTRACT

Casiopeínas<sup>®</sup> are Cu (II) mixed chelate complexes that have shown cytotoxic, genotoxic and antineoplastic activity. In order to understand the interaction of these complexes with biomolecules, we have studied in this work the interaction of Casiopeína III-ia [CAS 223930-33-4] with adenine, cytosine, thymine and guanine. X-ray diffraction analysis shown the molecular structure of an adduct  $[\text{Cu}(\text{dmbipy})(\text{acac})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3(\text{adenine})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  where  $\text{dmbipy} = 4,4'$ -dimethyl-2,2'-bipyridine and  $\text{acac} =$  acetylacetonate, which is an example of intermolecular interaction between a ternary Cu (II) compound and adenine. Adduct is stabilized by hydrogen bonds, which include water molecules and adenines, and by  $\pi$ - $\pi$  and  $\text{C}-\text{H} \cdots \pi$  interactions between the ligands attached to the copper ion and the adenines. DFT calculations shown charge transfer between complex ligands and adenines being the former the acceptor and the latter the donor; these results reproduce very well the weak interactions found in the crystalline structure. DFT results shown the same behavior for thymine and guanine, meanwhile, cytosine has shown a direct coordination to metal center.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The intermolecular interactions between aromatic rings play an important role in chemical and biological recognition processes such as the interaction between nucleic acid-protein, enzyme-substrate, neurotransmitter-receptor, and many drugs with any of the mentioned biological targets [1–4].

Lippard and collaborators have shown that Pt (II) complexes with large heteroaromatic rings such as 1,10-phenanthroline (phen) or 2,2'-bipyridine (bipy) intercalate into DNA base pairs [5–9] and other important biological molecules [10,11]. Yamauchi and coworkers also studying Pt (II) intercalator complexes with mononucleotides observe an unexpected increase in the stability constant for the adducts. The authors suggests an electronic density redistribution from the ligand to the Pt center, electron withdrawing by Pt (II) making the electron density of the ligand decrease, fact that further stabilizes the adduct favoring the charge transfer (CT) interaction with the nucleobases [12,13].

The capacity of these diimines to participate in CT interactions has been widely studied by many groups analyzing the

intramolecular stacking interactions presented between copper (II) compounds with phen or bipy as a primary ligand with aromatic rings of diverse systems such as substituted aromatic amino acids [14–16], nucleotides [17–20] and nucleotides derivatives [21–23] completing the coordination sphere of the metal ion.

Ternary Cu (II) compounds with phen or bipy in their coordination spheres were also tested as anticancer compounds. The Cu (II) complexes of general formula  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})]\text{NO}_3$  or  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{N})]\text{NO}_3$  have been patented and registered under the name of Casiopeínas<sup>®</sup> [24–26]. These compounds have shown promising antineoplastic activity against cancer cells and tumors in *in vitro* and *in vivo* assays, respectively [27–30]. The mode of action still is not elucidated, but we suggest intercalating interactions with DNA as one possible step, followed by a redox reaction which produce some radical species, principally  $\cdot\text{OH}$ , that promotes DNA degradation and consequently cellular death, by apoptosis (ROS generation) [31–34].

In this work we study the interaction between copper (II) mixed chelate complex  $[\text{Cu}(4,4'$ -dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonate)( $\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$  (CasIII-ia) and adenine in order to understand the nature of stacking interactions presented in the system. The complex is stabilized by several hydrogen bonds,  $\pi$ - $\pi$  and  $\text{C}-\text{H} \cdots \pi$  interactions between acetylacetonate and 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine coordinated to Cu (II) ion and adenine molecules.

\* Corresponding authors. Tel./fax: +52 55 56223529.

E-mail addresses: [moresp@servidor.unam.mx](mailto:moresp@servidor.unam.mx) (R. Moreno-Esparza), [ruizazuara@gmail.com](mailto:ruizazuara@gmail.com) (L. Ruiz-Azuara).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Synthesis of aqua (4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) (acetylacetonato) copper (II) nitrate (CasIII-ia)

The compound was prepared following the reported patent [24,25]. The complex was characterized by elemental analysis, FTIR, UV–Vis spectroscopy, X-ray crystallography and EPR spectroscopy. *Anal. Calc.* for  $\text{CuC}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ : C, 47.48; H, 5.07; N, 9.97. Found: C, 47.83; H, 4.96; N, 9.84%. IR (KBr,  $\lambda/\text{cm}^{-1}$ ): 1577, 1520, 3074, 1384 ( $\text{NO}_3^-$ ), 822, 722, 635. EPR parameters  $g_{\parallel} = 2.25$ ,  $g_{\perp} = 2.03$ ,  $A_{\parallel} = 185$  G,  $A_{\perp} = 8$  G.

### 2.2. Syntheses of Casiopeína–adenine adduct

The adduct was obtained mixing 1 mmol of CasIII-ia (0.427 g) and a large excess of adenine (4 mmol, 0.54 g) with constant stirring for 2 h. The solution was left for several weeks until blue crystals suitable for X-ray determination were obtained. All attempts to obtain crystals of the adducts with all the other bases were unsuccessful.

### 2.3. X-ray structure determination

Diffraction data for the adduct was collected at 293 K on a Bruker 6000 CCD, using a monochromated  $\text{Mo K}\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073$  Å). The structure was solved by direct methods using SHELXS-97-2, least-squares refinement based on  $F^2$  was carried out by full-matrix method [35]. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The hydrogen atoms for all the reported structures were located in the difference map and included in the refinement with an isotropic fixed thermal parameter using a “riding” model. Neutral atom scattering factors and anomalous dispersion corrections were obtained from the International Tables for Crystallography vol. A [36]. Unit cell parameters

**Table 1**  
Crystal data and structure refinement for adduct.

Identification code	rm08
Empirical formula	$\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{CuN}_{13}\text{O}_8$
Formula weight	733.22
T (K)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system	monoclinic
Space group	$P2_1/n$
Unit cell dimensions	
a (Å)	13.015(2)
b (Å)	12.803(3)
c (Å)	20.158(4)
$\beta$ (Å)	91.03(5)
V (Å <sup>3</sup> )	3358.3(12)
Z	4
$D_{\text{calc}}$ (mg/m <sup>3</sup> )	1.450
Absorption coefficient (mm <sup>-1</sup> )	0.718
$F(0\ 0\ 0)$	1524
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	$0.42 \times 0.4 \times 0.34$
Theta range for data collection (°)	1.85–26.03
Index ranges	$-16 < h < 16$ , $-15 < k < 15$ , $-18 < l < 24$
Reflections collected	21 464
Independent reflections	6590 [ $R_{\text{int}} = 0.0349$ ]
Completeness to $\theta = 26.03^\circ$	99.4%
Refinement method	full-matrix least-squares on $F^2$
Data/restraints/parameters	6590/6/464
Goodness-of-fit (GOF) on $F^2$	1.052
Final R indices [ $I > 2\sigma(I)$ ]	$R_1 = 0.0497$ , $wR_2 = 0.1416$
R indices (all data)	$R_1 = 0.0690$ , $wR_2 = 0.1535$
Largest difference peak and hole (e Å <sup>-3</sup> )	0.420 and $-0.491$

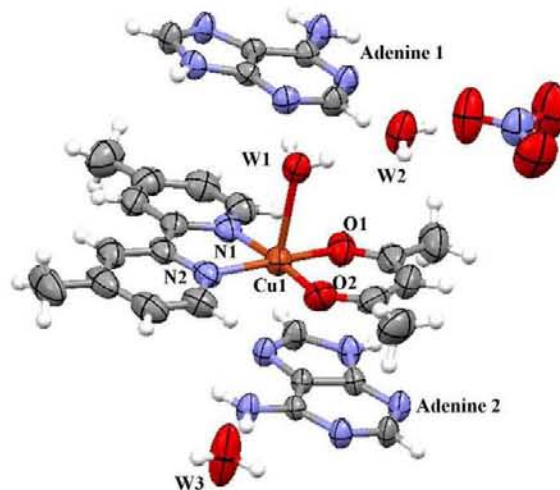
along with data collection and refinement details for these complexes are listed in Table 1. All molecular structure drawings were generated using the WINGX suite of crystallographic programs for Windows [37].

## 3. Results and discussion

### 3.1. X-ray analysis

The structure of 1:2 adduct of CasIII-ia with adenine has been determined. The asymmetric unit contains one  $[\text{Cu}(\text{dmbipy})(\text{aca-c})(\text{H}_2\text{O})]^+$  cation, two adenines, one  $\text{NO}_3^-$  anion and two solvent water molecules (dmbipy is 4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine and aca-c is acetylacetonato) (Fig. 1). The Cu (II) ion adopts a square-pyramidal geometry coordinated by two N of dmbipy, two O of aca-c and a water molecule in the apical position in agreement with many molecular structures previously reported [38–46]. The bond lengths and angles around Cu (II) are not significantly different from the previously reported [47]. Table 2 enlist selected bond lengths and angles of the adduct.

Stacking interactions are observed between adenine 2 and the pseudo-aromatic ring conformed by the copper center and aca moiety with a centroid–centroid distance of 3.624 Å, the distance



**Fig. 1.** ORTEP diagrams (50% probability level) of the contents of the unit cell of adduct.

**Table 2**  
Selected bond lengths (Å) and angles (°) for adduct.

Cu(1)–O(1)	1.907(2)
Cu(1)–O(2)	1.913(2)
Cu(1)–N(2)	1.988(3)
Cu(1)–N(1)	1.999(3)
Cu(1)–O(3)	2.560(2)
O(1)–Cu(1)–O(2)	94.47(11)
O(1)–Cu(1)–N(2)	173.41(11)
O(2)–Cu(1)–N(2)	91.71(11)
O(1)–Cu(1)–N(1)	92.88(12)
O(2)–Cu(1)–N(1)	171.27(11)
N(2)–Cu(1)–N(1)	80.78(11)
O(1)–Cu(1)–O(3)	88.18(9)
O(2)–Cu(1)–O(3)	90.60(9)
N(2)–Cu(1)–O(3)	94.07(9)
N(1)–Cu(1)–O(3)	94.34(9)

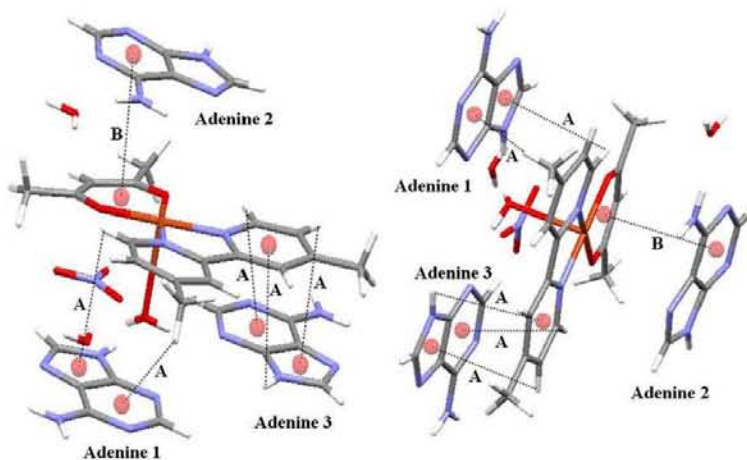


Fig. 2. Different views of the adduct showing the C–H... $\pi$  (A) and  $\pi$ ... $\pi$  (B) interactions. A type interactions distance range of 3.258–3.524 Å, B type 3.624 Å.

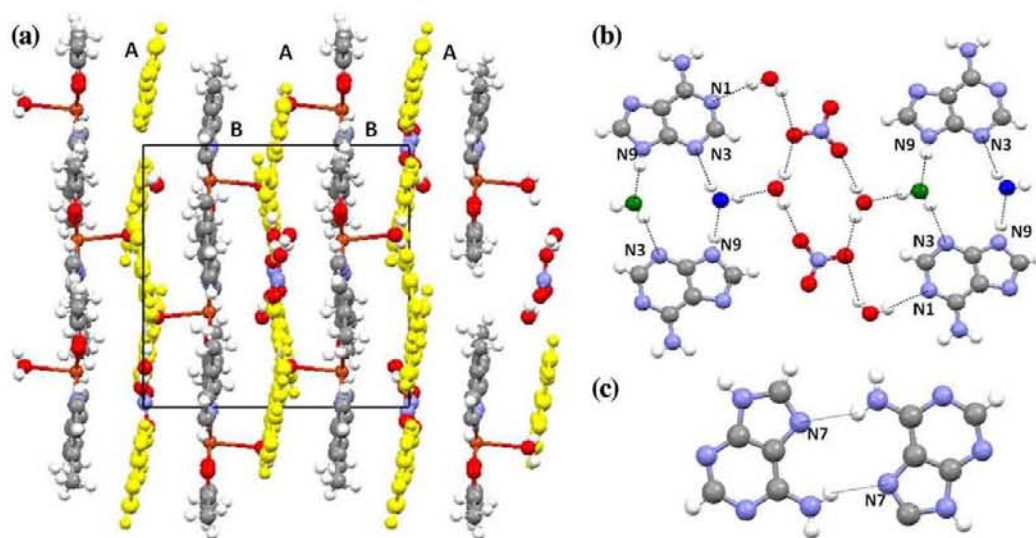


Fig. 3. (a) View along crystallographic axis *c* showing the adenine (A) and CasIII-ia (B) layers packing in the crystal, (b) and (c) hydrogen bonds formed with the involvement of adenines, water molecules and nitrate anions.

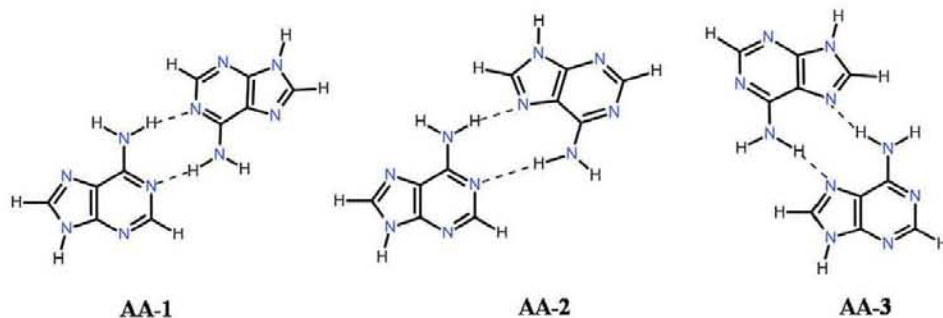
is in the range of 3.3 to 3.8 Å found by Janiak [48] for a parallel displaced  $\pi$ -stacking interaction. On the other side, adenines 1,3 and bipyridine moiety presents a C–H... $\pi$  interaction with an H-centroid distances between 3.258 and 3.524 Å (Fig. 2). These distances are comparable with those reported for typical stacking interactions between organic systems [4].

The molecules adopts a laminar arrangement aligned with *b* axis unit cell. The unit cell contains two layers of CasIII-ia intercalated between three layers of adenine as shown in Fig. 3a. Distance between adenine layers is a half of *a* cell axis dimension (*a* = 13.015(2) Å); the same occurs with the distance between CasIII-ia layers. In the laminar arrangement the adenines present two kinds of interactions, hydrogen bonds with the involvement of water molecules and nitrate anion (Fig. 3b), and hydrogen bonds between two adenines (Fig. 3c).

In the former, two water molecules of different coordination compounds interacts with N3 and the hydrogen of N9 of adenines;

deep green oxygen in Fig. 3b belongs to the upper layer coordination compound, the deep blue one belongs to the lower coordination complex. Two identical structures of the above description communicate themselves with the participation of a particular arrangement conformed by two nitrates and four water molecules, two of these water molecules interacts directly with N1 of the corresponding adenine and with one oxygen of the nitrate anion, meanwhile, the remainder water molecules lock the ring with the nitrate anions and also interact with water molecule caged between adenines as shown Fig. 3b.

Hobza and Spöner [49] describe three kinds of hydrogen bond arrangement between two adenine molecules AA-1, AA-2 and AA-3 (Scheme 1). In AA-1, N1 and –NH<sub>2</sub> group are involved in the hydrogen bond formation; for AA-2, hydrogen atoms of amino group interacts with N1 of the first adenine and N7 of the second, meanwhile for AA-3, N7 of the adenines form the hydrogen bonds with the amino group. The total complexation energies of



Scheme 1. AA-1, AA-2 and AA-3 hydrogen bond interactions between adenine molecules (adapted from Ref. [49]).

Table 3  
Hydrogen bond geometry (Å, °).

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D-A)	<(DHA)
O(3)-H(31)···O(4)	0.874(19)	1.92(2)	2.792(4)	171(4)
O(3)-H(32)···N(12)	0.878(19)	1.92(2)	2.782(3)	166(4)
N(4)-H(4A)···N(9)#1	0.86	2.02	2.880(3)	174.8
N(7)-H(7A)···O(5)	0.86	1.97	2.810(4)	166.6
N(7)-H(7B)···N(3)#2	0.86	2.14	2.935(3)	152.8
N(8)-H(8)···O(3)#3	0.86	1.90	2.760(3)	173.4
N(10)-H(10A)···N(6)#4	0.86	2.24	3.042(3)	155.3
N(10)-H(10B)···N(5)#5	0.86	2.31	3.128(3)	158.7
O(4)-H(41)···O(6)#1	0.900(14)	1.94(2)	2.803(5)	161(5)
O(4)-H(42)···O(7)#6	0.81(6)	1.98(6)	2.784(4)	174(6)
O(5)-H(51)···N(11)#7	0.90(2)	1.94(2)	2.836(4)	174(7)
O(5)-H(52)···O(6)#2	0.89(2)	2.19(4)	2.992(4)	149(7)
O(5)-H(52)···O(8)#2	0.89(2)	2.23(4)	3.056(5)	153(7)
O(5)-H(52)···N(13)#2	0.89(2)	2.53(2)	3.418(4)	177(7)

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

#1  $-x + 1/2, y + 1/2, -z + 3/2$ ; #2  $-x + 1, -y, -z + 2$ ; #3  $-x, -y, -z + 2$ .

#4  $x - 1/2, -y + 1/2, z - 1/2$ ; #5  $-x + 1/2, y - 1/2, -z + 3/2$ .

#6  $x - 1/2, -y + 1/2, z + 1/2$ ; #7  $x + 1/2, -y + 1/2, z + 1/2$ .

the systems are  $-11.0$ ,  $-10.3$  and  $-9.4$  kcal/mol, respectively. Even when the AA-3 conformation presents the lower interaction energy of the adenine arrangements above discussed, the adenines in the crystal structure adopt this conformation (Fig. 3c), probably due the hydrogen bonds formed between the water molecules, anions and adenines forced the orientation of the adenine molecules and favors the AA-3 conformation over the other two possible forms of adenine dimer. The hydrogen bonds observed are listed in Table 3.

It is important to point out that efforts to obtain single-crystal using the other three DNA bases (cytosine, thymine and guanine) were unsuccessful. Guanine was completely insoluble in the reaction media. Cytosine produced a color turn of the solution after 5 days, from blue to green, corresponding to direct pyrimidine coordination to Cu (II) center. Mixtures of thymine-Casiopina III-ia do not present any change in the electronic spectra of reaction mixture, neither a suitable crystal for X-ray diffraction study was obtained.

### 3.2. Computational study

In order to obtain the complete interactions presented in the crystal, four adenine molecules, copper (II) coordination compound and two water molecules were used in theoretical calculations. The crystallographic structure was used as initial geometry to perform a full optimization calculation at the M052x/LANL2DZ [50] theoretical level using GAUSSIAN 09 program [51]. Recently Jeanvoine and Spezia [52] found that the role of nonlocal Hartree-Fock

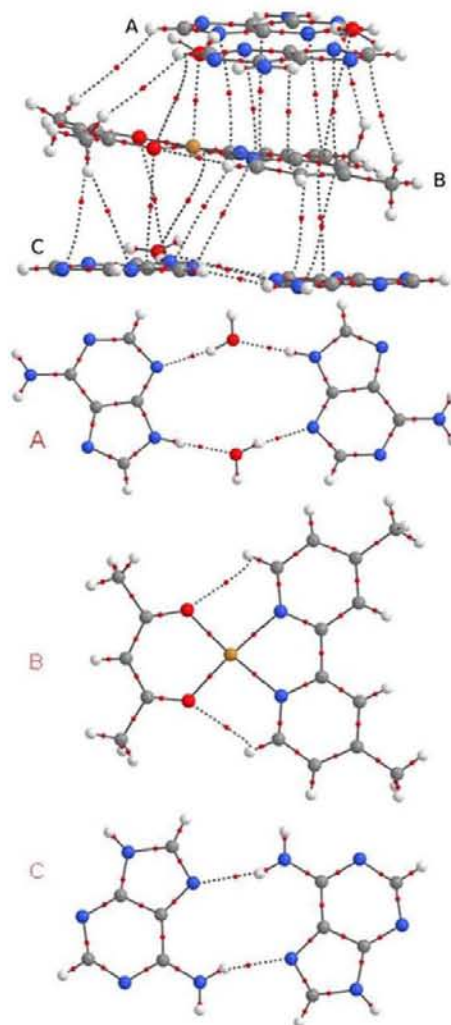


Fig. 4. Molecular graph of the complex and the layer A, B and C.

exchange is crucial to describe Cu (II) complexes where the M05-2x hybrid functional has the better agreement with experiments and CCSD(T) calculations. A single point energy calculation at

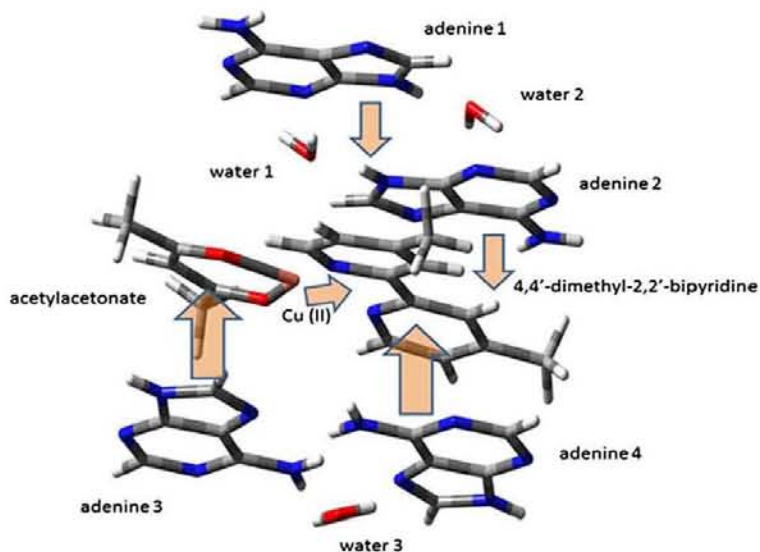


Fig. 5. Description of the charge transfer between the groups in the complex, indicated by orange arrows. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

M052x/6-311+g(2d,2p) was carried out to obtain a wave function with an all electron basis set. Isolated adenine, CasIII-ia and water molecules were also optimized at the same theoretical level to calculate energy and population changes. The wave functions obtained from these calculations were used to calculate local and integrated properties of the electron density using AIMALL program [53].

The local and integrated properties of the electron density [54] of the complex were calculated to understand the interactions between Casiopeína III-ia and the adenines. Fig. 4 presents the molecular graph [54] of the complex and the three layers. In layer A, the two N···H–O and O···H–N bonds present a value of electron density at the bond critical point ( $\rho_{\text{BCP}}$ ) of 0.028 and 0.027 a.u. respectively, typically for hydrogen bond.  $\rho_{\text{BCP}}$  of N···H–N at layer C is 0.020 a.u. In the layer B, the density at the Cu–N and Cu–O CPs are 0.0888 and 0.9515 a.u. and Cu–OH<sub>2</sub> has a  $\rho_{\text{BCP}}$  is 0.023 a.u.

There are 18 interactions between the three layers, 13 are related with the bipy ligand and five with the acac. All of them

can be classified as closed shell interactions where  $\pi$ – $\pi$ , C–H··· $\pi$  and C–H···X (X = N, O) interactions are presented. The average value of  $\rho_{\text{BCP}}$  of the weak interactions is 0.0035 a.u. The more important weak interactions are the  $\pi$ – $\pi$  and C–H··· $\pi$  between the bipyridine and adjacent adenines with an average value of  $\rho_{\text{BCP}}$  of 0.0057 a.u. The interactions of the acac moiety are weaker with an average  $\rho_{\text{BCP}}$  of 0.0035 a.u.

The atomic electronic populations of each group (N) in the complex were compared with that of the isolated molecules as shown in Fig. 6 and Eq. (1).

$$\Delta N(\text{group}) = N(\text{group@complex}) - N(\text{isolated group}) \quad (1)$$

Fig. 6 shows the electron transfer from the adenines to the ligands of Casiopeína III-ia as is presented in Fig. 5. Cu atom decreases its electron population by 0.02 whereas bipy and acac increase both in 0.06 e. Water molecules 1, 2 and 3 wins 0.04, 0.03 and 0.04 e, respectively. On the other hand, adenines 1–4 lose 0.06, 0.06, 0.01 and 0.07 e, respectively, where it is possible to

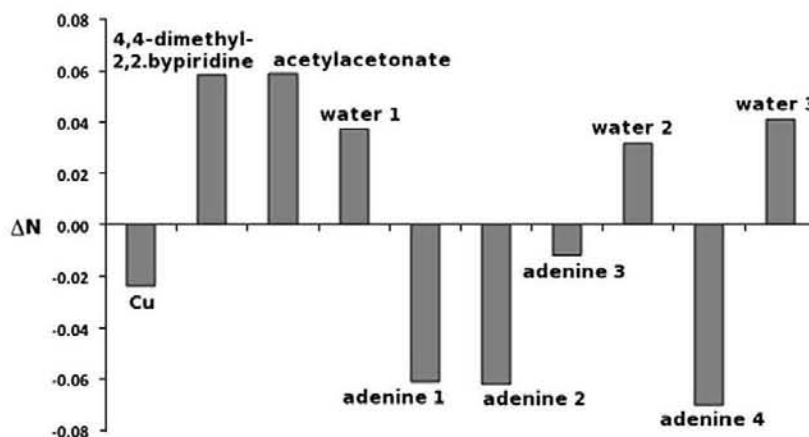


Fig. 6. Change in the electronic population of groups in the complex taking the isolated molecules as reference.

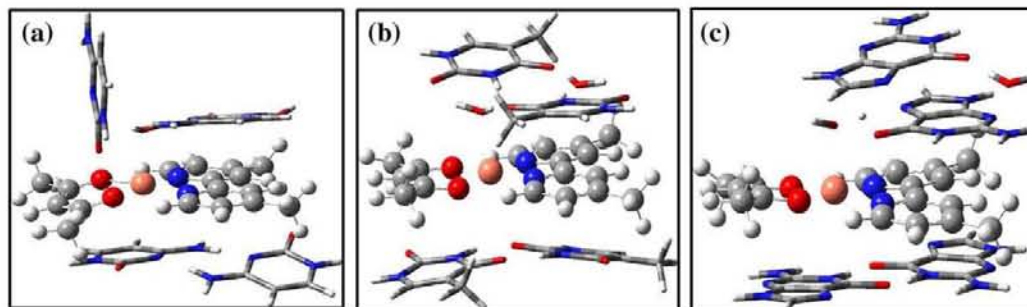


Fig. 7. Possible arrangements between Casiopeína III-ia and DNA bases: (a) cytosine, (b) thymine and (c) guanine.

observe that the electron transfer is greater for adenines stacked to bipyridine. The adenine molecules transfer electrons to the deficient ligands, compensating the electron donation to the Cu atom. It is interesting to mention that the donated charge from adenines is not transferred to the metal center as suggest Yamauchi for the platinum complexes [12,13]. Then the stacking mechanism between adenine molecules and Casiopeína III-ia can be understood as electron redistribution in the supramolecule which stabilize the adenine adduct by  $-92.13$  kcal/mol, as it is expected, because energy is a functional of the electron density [55].

Also, it is useful to analyse the calculated electron density around the copper ion employing the quadrupolar moment of both systems, coordination compound and adenine adduct. The quadrupolar moment was oriented respect to the plane formed by the donor atoms of bipy and acac, for this reason, the value of ellipsoid radii is directly related with the copper electron density deformation due the  $\pi$  interactions with the ligands. The ellipsoid radii value for coordination compound is 2.6541, meanwhile, the value for the adenine adduct is 2.0915, a 21.2% of decrease. This behavior in the ellipsoid radii suggests a weaken participation in back-bonding interaction when adenine is present.

In a previous theoretical work for  $[\text{Cu}(2,2\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonato})\text{NO}_3]$ , we found an affinity order to DNA bases:  $G > C > A > T$ . But also we observed that the direct coordination of G and C bases to Cu (II) center gives the most stable arrangement, stacking interactions were observed only for A and T [56]. These findings can explain the experimental problem to obtain adducts with the other three DNA bases.

We calculated the possible arrangements between Casiopeína III-ia and the other three DNA bases using the more stable configurations of each as found by Hobza [49] and presented in Fig. 7. The interaction energies for the possible adducts for G, C and T are  $-110.43$ ,  $-99.22$  and  $-87.88$  kcal/mol, respectively. Cytosine does not show a planar arrangement but perpendicular with oxygen oriented to the metal center, coincident with the experimental shift in absorption maxima. Thymine and guanine have better disposition to stack with Casiopeína III-ia.

#### 4. Conclusions

We studied the interaction between some promising antineoplastic agents with adenine as an on-going attempt to elucidate the action mechanism. The literature propose that the stacking is formed by dbmpip or phen and adenine rings for intercalating agents being the former the acceptor and the latter the donor entities with a fundamental participation of the metal center to favor the CT interaction. X-ray and theoretical analysis of the studied system in this work show that the stacking interaction is due to several  $\pi$ - $\pi$  and C-H... $\pi$  interactions between the Casiopeína's ligands and adenine molecules observing a charge transfer of

0.06 e from the adenines to the Casiopeína III-ia with a slight participation of the copper center. In the solid state, the framework is stabilised by the network of hydrogen bonds binding the adenines with the water molecules that occupy the apical position of the copper coordination compound. The affinity order of Casiopeína III-ia to DNA bases has the follow order:  $G > C > A > T$ . Then the stacking mechanism between adenine molecules and Casiopeína III-ia can be understood as electron redistribution in the supramolecule, which stabilize the adenine adduct.

#### Acknowledgements

J.C.G.R., A.T.T. and J.H.L. would like to acknowledge CONACyT for the scholarship. We also acknowledge DGAPA-UNAM (IN207393, IN209995, IN209907, IN227110), Fideicomiso 634-3, CONACyT (60085, 87806) and DGTIC-UNAM for the supercomputer time.

#### Appendix A. Supplementary data

CCDC 737505 contains the supplementary crystallographic data for adduct. These data can be obtained free of charge via <http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: [deposit@ccdc.cam.ac.uk](mailto:deposit@ccdc.cam.ac.uk).

#### References

- [1] E. Frieden, *J. Chem. Educ.* 52 (1975) 754.
- [2] W.P. Jencks, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 42 (1975) 219.
- [3] C.A. Hunter, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* 32 (1993) 1584.
- [4] E.A. Meyer, R.K. Castellano, F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.* 42 (2003) 1210.
- [5] K.W. Jennette, S.J. Lippard, G.A. Vassiliades, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 3839.
- [6] S.J. Lippard, P.J. Bond, K.C. Wu, W.R. Bauer, *Science* 194 (1976) 726.
- [7] S.J. Lippard, *Acc. Chem. Res.* 11 (1978) 211.
- [8] M. Howe-Grant, K.C. Wu, W.R. Bauer, S.J. Lippard, *Biochemistry* 15 (1976) 4339.
- [9] U.M. Ohndorf, M.A. Rould, Q. He, C.O. Pabo, S.J. Lippard, *Nature* 399 (1999) 708.
- [10] Y. Nakabayashi, M. Tashiro, T. Yajima, M. Takani, A. Tani, T. Motoyama, A. Odani, O. Yamauchi, *Inorg. Chim. Acta* 362 (2009) 777.
- [11] H. Masuda, O. Yamauchi, *Inorg. Chim. Acta* 136 (1987) L29.
- [12] O. Yamauchi, A. Odani, R. Shimata, Y. Kosaka, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 3337.
- [13] A. Odani, R. Shimata, H. Masuda, O. Yamauchi, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 2133.
- [14] O. Yamauchi, A. Odani, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 5938.
- [15] A. Odani, H. Masuda, O. Yamauchi, S. Ishiguro, *Inorg. Chem.* 30 (1991) 4484.
- [16] T. Sugimori, H. Masuda, O. Yamauchi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 67 (1994) 131.
- [17] E.M. Bianchi, S.A.S. Sajadi, B. Song, H. Sigel, *Inorg. Chim. Acta* 300–302 (2000) 487.
- [18] H. Sigel, *Chem. Soc. Rev.* (1993) 255.
- [19] C.F. Naumann, H. Sigel, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1994) 2750.
- [20] O. Yamauchi, A. Odani, H. Masuda, H. Sigel, in: H. Sigel, A. Sigel (Eds.), *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 32, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 207–262.
- [21] R.B. Gómez-Coca, L.E. Kapinos, A. Holý, R.A. Vilaplano, F. González-Vilchez, H. Sigel, *J. Inorg. Biochem.* 84 (2001) 39.

- [22] A. Fernández-Botello, A. Holý, V. Moreno, H. Sigel, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 2114.
- [23] M. Mizutani, I. Kubo, K. Jitsukawa, H. Masuda, H. Einaga, *Inorg. Chem.* 38 (1999) 420.
- [24] L. Ruiz-Azuara, United States Patent April 21, 1992, No. 5, 107, 005. US Patent Re35, 458, February 18, 1997.
- [25] L. Ruiz-Azuara, United States Patent 1996, vol. 5576,326.
- [26] Mark Tittle Casiopeina, Reg. 407543 SECOFI, 1992, 2002.
- [27] L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gómez, *Curr. Med. Chem.* 17 (2010) 3606.
- [28] A. De Vizcaya, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramírez, E. Kass, R. Kelland, M. Orr, M. Dobrota, *Toxicol. In Vitro* 14 (2000) 1.
- [29] F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solis, 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, *Biometals* 21 (2008) 17.
- [30] C. Trejo-Solis, G. Palencia, S. Zuñiga, A. Rodríguez-Ropon, L. Osorio-Rico, L. Sánchez Torres, I. Gracia-Mora, L. Márquez-Rosado, A. Sánchez, M.E. Moreno-García, A. Cruz, M.E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enriquez, J. Sotelo, *Neoplasia* 7 (2005) 563.
- [31] R. Alemón-Medina, M. Breña-Valle, J. Muñoz-Sánchez, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60 (2007) 219.
- [32] R. Alemón-Medina, J.L. Muñoz-Sánchez, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, *Toxicol. In Vitro* 22 (2008) 710.
- [33] A. Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Plant, L. Ruiz, M. Dobrota, *Chem. Biol. Interact.* 165 (2007) 189.
- [34] R. Kachadourian, H.M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, *B.J. Day, Toxicology* 268 (2010) 176.
- [35] *SHXLX-97-2* [Includes *SHXLX97*, *SHXLX97*, *CIFTAB* (and *SHXLX*)], Programs for Crystal Structure Analysis (Release 97-2). Sheldrick, G.M., Institut für Anorganische Chemie der Universität, Tammanstrasse 4, D-3400 Göttingen, Germany, 1998.
- [36] T. Hahn (Ed.), *International Tables for Crystallography*, vol. A, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- [37] L.J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837.
- [38] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, *Acta Cryst. C* 48 (1992) 1785.
- [39] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, J.L. Brioso, *Acta Crystallogr. C* 44 (1988) 628.
- [40] H.J. Zhao, M.-X. Li, M. Shao, H.J. Liu, *Acta Cryst. E* 62 (2006) m965.
- [41] D.K. Saha, S. Padhye, C.E. Anson, A.K. Powell, *Trans. Metal Chem.* 28 (2003) 579.
- [42] K. von Deuten, G. Klar, *Cryst. Struct. Commun.* 9 (1980) 479.
- [43] S. Ciattini, F. Constantino, P. Lorenzo-Luis, S. Midollini, A. Orlandini, A. Vaca, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 4008.
- [44] W. Fitzgerald, J. Foley, D. McSweeney, N. Ray, D. Sheahau, S. Tyagi, B. Hathaway, P. O'Brien, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1982) 1117.
- [45] G.H. Cui, J.R. Li, T.-L. Hu, X.H. Bu, *J. Mol. Struct.* 738 (2005) 183.
- [46] A.K. Patra, S. Dhar, M. Nethaji, A.R. Chakravarty, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2005) 896.
- [47] A. Tovar-Tovar, L. Ruiz-Ramírez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosales-Hoz, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1045.
- [48] C. Janiak, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 1 (2000) 3885.
- [49] P. Hobza, J. Sponer, *Chem. Rev.* 99 (1999) 3247.
- [50] Y. Zhao, D.G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* 3 (2007) 289.
- [51] 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 Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J.J. Heyd, E. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J.M. 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, D.J. Fox, *GAUSSIAN 09*, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [52] Y. Jeanvoine, R. Spezia, *J. Mol. Struct.: (THEOCHEM)* 954 (2010) 7.
- [53] *AIMALL* (Version 10.03.25), Todd A. Keith, 2010 ([aim.tkgristmill.com](http://aim.tkgristmill.com)).
- [54] R.F.W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*, Oxford University Press, Oxford, England, 1990.
- [55] P. Hohenberg, W. Kohn, *Phys. Rev.* 136 (1964) B864.
- [56] R. Galindo-Murillo, J. Hernandez-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 (2011) 14510–14515.

## Metal-Based Drug-DNA Interactions

Juan Carlos García-Ramos<sup>1</sup>, Rodrigo Galindo-Murillo<sup>2</sup>, Fernando Cortés-Guzmán<sup>3,4</sup>, and Lena Ruiz-Azuara\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000, 04510, México City, México.

<sup>2</sup> Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, University of Utah, 2000 East 30 South Skaggs 201, Salt Lake City, UT 84112, USA.

<sup>3</sup> Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, México. fercor@unam.mx

<sup>4</sup> Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, carretera Toluca-Atlacomulco km 14.5, Toluca, México, 50200

Received June 20, 2013; Accepted July 22, 2013.

**Abstract.** Coordination compounds that bind to DNA have been an active area of research since the discovery of cisplatin and the platinum based drugs. In this review we offer a general overview about transition-metal compounds that binds DNA through several ways and some examples are given to understand the role played by the different factors that promotes it, such as the intercalant ligand and the nature and position of the substituent over it. Several techniques to follow metal-based drugs interactions with DNA are mentioned as well as a brief description of computational techniques that can be used as a powerful tool in order to reach a deep knowledge of the parameters involved in the stabilization of coordination compound-DNA adduct.

**Keywords:** Coordination compounds, transition metals, DNA-interaction, antitumoral, experimental methods, theoretical methods

**Resumen.** El estudio de los compuestos de coordinación que se unen directamente al ADN ha sido un área activa de investigación desde el descubrimiento del cisplatino y compuestos relacionados con éste. En esta revisión se ofrece una visión general sobre los compuestos de metales de transición que se une el ADN a través de varias formas y damos algunos ejemplos para comprender el papel de los diferentes factores que lo promueven, como el ligante intercalante así como de la naturaleza y la posición del sustituyente sobre el mismo. Varias técnicas para seguir las interacciones compuesto de coordinación-ADN son mencionadas, así como una breve descripción de las técnicas computacionales que se pueden utilizar como una herramienta poderosa con el fin de llegar a un conocimiento profundo de los parámetros involucrados en la estabilización del aducto compuesto de coordinación-ADN.

**Palabras clave:** Compuestos de coordinación, metales de transición, interacción con ADN, anticáncer, métodos experimentales, métodos teóricos.

### Introduction

DNA is the library of life and all the knowledge encrypted therein becomes more accessible every day. It has been 10 years now since the Human Genome Project announced that the total human genome was decoded providing us a huge quantity of new specific therapeutic targets [1]. The knowledge of specific targets in rational design of chemotherapeutics is a fundamental factor, principally, for the design of molecules that can be used in the treatment of oncologic diseases. Since the development of cisplatin, DNA became one of the main biological targets for the antitumor compounds [2, 3], even though some researchers consider that this strategy seems unproductive today for the area of new drug development where the knowledge on cancer genomics is suggesting the use of targets selectively expressed, or over-expressed by cancer cells [4]. The intention of this review is to provide several examples of coordination compounds that possess an intercalating ligand in its coordination sphere in order to understand the influence of several factors such as the preferential geometry of the metal center, the nature of the intercalating ligand and the nature, number and position of the substituents over the intercalating ligand in the capacity and selectivity of the coordination compounds to interact with DNA. Also, experimental and theoretical approaches to evaluate the metal-based drugs interactions with DNA are discussed.

### DNA structure

A simple unit of DNA known as “nucleotide” is constituted by a five-membered carbohydrate deoxyribose bonded in its C1' to a heterocyclic base that can be either adenine (A), guanine (G), cytosine (C) or thymine (T), and on the other side of the carbohydrate ring, at C5'. A phosphodiester linker bonds the 5'-end of one sugar and the 3'-end of the other. Accordingly, the polymerization of nucleotides gives rise to long, single-stranded polyanionic chains with a well-defined directionality (traditionally described in the 5' - to 3' - direction) which essentially constitutes the primary structure of the nucleic acid [5].

The first DNA structure was published in 1953 by James Watson and Francis Crick [6] without the appropriate recognition to the Rosalind Franklin contributions. Franklin was the first to discover that DNA fibers yield two different diffraction patterns: the “crystalline” or A-form and the “wet” or B-form. John Randall gave Franklin the A-form and Maurice Wilkins the B-form, assigning them each the task of elucidating their molecular structure. However, it was a titanic job due that the samples contain both structures and provided “muddy” diffraction patterns that were near impossible to interpret. After discovering the existence of the A and B forms of DNA, Rosalind Franklin also succeeded in developing an ingenious and laborious method to separate the two forms, providing the first DNA crystals pure enough to yield interpretable diffraction



patterns. She then went on to obtain excellent X-ray diffraction patterns of crystalline B-form DNA and, using a combination of crystallographic theory and chemical reasoning, discovered important basic facts about its structure. She discovered that the sugar-phosphate backbone of DNA lies on the outside of the molecule, not the inside as was previously thought. She also discovered that the helical structure of DNA has two strands, not three as proposed in competing theories. She gave quantitative details about the shape and size of the double helix, but the missing piece of the puzzle, how the base paired on the inside of the helix, and thus the secret of heredity itself, was the part provided by Watson and Crick to complete the famously structural model [7]. DNA adopts a double-stranded arrangement as their secondary structure. The two strands of the duplex are held together by hydrogen bonding between bases on opposite strands: the most common "base-pairing" scheme (often called "Watson-Crick base pairing") involves G-C and A-T purine-pyrimidine inter-strand pairs. The overall stability of the double-helical arrangement is further supported by  $\pi$ - $\pi$  interactions between the stacked hydrophobic aromatic rings of adjacent bases on the polynucleotide chains. This structure forms two distinct grooves labeled major and minor, the major groove is narrow and deep, while the minor groove is wide and shallow [8, 9].

### Conformations

DNA is able to adopt a variety of different conformations that are influenced by environmental factors (hydration and ionic strength) and the primary structure (base sequence) of the polynucleotide [10] and are classified as A-, B-, C-, D- and Z-form [11]. However, under physiological conditions, the B-form of DNA is predominant. A-form is a right-handed helix that consists of 11 base residues per full turn with a closer distance (2.25 Å) between the bases and a helix diameter of 23 Å. A-DNA is also characterized by a 20° tilting of the base

pairs and their net migration away from the central axis. This produces a more compacted structure with a hollow core. On the other hand, the base pairs of the right-handed B-DNA are stacked 3.4 Å apart with ten and a half base pairs residues per full rotation of the helix and a helix diameter of 20 Å. The minor groove in this structure is 4.8 Å while the major groove is 10.5 Å wide (Figure 1).

A third (C-DNA) and fourth (D-DNA) allomorphs, both B-like in structure but with reduced rise per residue (3.31 and 3.05 Å, respectively) and increased helical twists (38.6-40.0 and 45.0°, respectively), are obtained with Li and Na ions under low hydration conditions, which is when the salt content is between the A- or B-DNA states. Alternating purine and pyrimidine sequences also produces D-DNA form [11].

The Z-DNA conformation is adopted at high salt concentration and is characterized by the adoption of left-handed geometry. The helix in this form is elongated and slender (diameter of 18 Å) and can be induced by the covalent bindings of various metal complexes. It has twelve base pairs per turn with the sugar phosphate adopting a zigzag shape. The orientation of the carbohydrates groups alternates every second unit, revealing a departure from the standard mononucleotide repeating unit of B-DNA in favor of a dinucleotide motif. The minor groove in this arrangement is deeper than that observed in the B-DNA extending all the way down to the axis of the molecule, thus, the major groove is absent here (Figure 1).

DNA can also adopt other conformations such as hairpin, triplex (H-DNA), cruciform, or tetraplex (G-quadruplex and *i*-motif). In order to form those structures, DNA strands should be folded in a different manner from B-DNA or make unusual base pairs such as Hoogsteen base pairs that are the unusual pairs of hydrogen bonding among nucleic bases compared with Watson-Crick base pairs. Self-complementary sections of single strand DNA can form hairpin structures or cruciform structures, where two opposite hairpins are interacting [12]. Hairpin structures have been identified in genomic DNA and

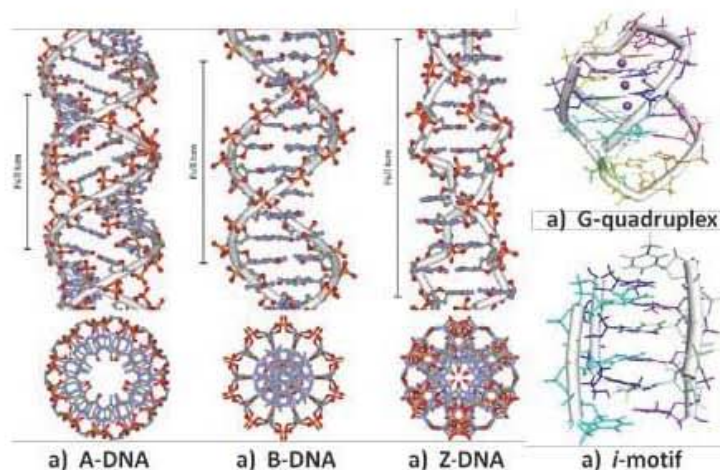


Fig. 1. Different conformations adopted by DNA.

are considered potential sites for controlling gene expression. So, drugs that can target hairpin and cruciform structures in promoter regions may be able to modify transcription and control gene expression [13-16]. Guanine (G)-rich sequences can form G-quadruplex structures consisting of  $\pi$ - $\pi$  stacking of planar G-tetrads, cyclically bound to each other through eight hydrogen bonds according to the Hoogsteen base pairs [17-19]. G-rich sequences are observed frequently in the promoter region of oncogenic and human telomeric DNA [20-22]. The *i*-motif structure is formed from a cytosine (C)-rich strand at slightly acidic pH or even neutral pH [23]. It is known that C-rich sequences are present in or near the regulatory regions of >4% of all genes, especially in the promoter region of oncogene and human telomeric DNA [24]. The *i*-motif structure consists of two parallel-stranded C<sup>+</sup> hemi protonated base-paired duplexes that are intercalated in an antiparallel manner. The *i*-motif structures are significantly affected by the number of cytosine bases [25], loop length [26], environmental condition [27, 28], and attached or interacting material with the DNA strands [28-30].

Double stranded DNA can also bind to a third strand under acidic conditions to form a triple helix, also known as H-DNA [31-33]. The bases of the third strand bind to the existing base pairs via Hoogsteen base pairing, where T binds to A in a novel fashion and protonated C binds to G, forming the triplets T•AT and C•GC complementary sequence. Triple helices are not as stable as duplex, and are thought to relieve torsional stress caused by supercoiling.

### Modes of binding of bioinorganic structures to DNA

A search using the Nucleic Acids database [34] produces 247 crystal and NMR structures of DNA with various types of binders, from which only a handful relates to any kind of bioinorganic or metal-containing drug. Some examples of experimental drug-DNA interactions using transition metal compounds include Ru [35], Co [36], Ni, Cu, Zn [36], and rare-earths compounds [37]. Since DNA offers many potential binding sites due to its size and complexity, coordination compounds are able to bind to DNA via two main interaction modes: irreversible (covalent or coordination binding) and reversible (intermolecular association). The latter binding mode can be further divided into electrostatic interactions, groove binding and intercalation.

### Covalent binding

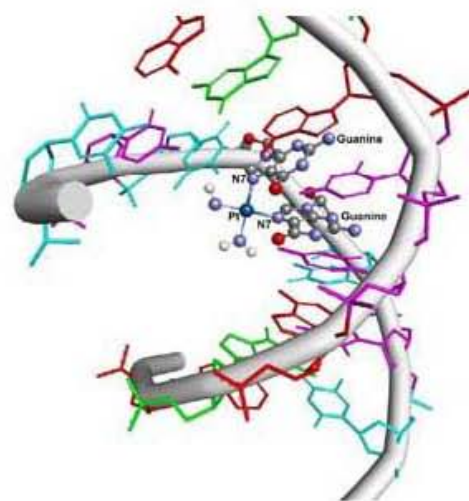
Coordination compounds may exhibit a preference for a particular binding mode or nucleotide sequence depending on the size and shape of the molecule. Cisplatin is a well-known antitumor drug which principal target is DNA. It is responsible for the cure of over 90% of testicular cancer [38] and plays an important role in the treatment of other kinds of cancer such as ovarian, bladder, head and neck, lymphomas and melanomas [39]. Even though the great knowledge achieved, cisplatin is only effective in a limited range of cancer and also produce

severe side-effects: often causing severe nausea and vomiting, bone marrow suppression and kidney toxicity. In spite of that, cisplatin is still one of the world's best-selling anticancer drugs.

The action mechanism of cisplatin has been extensively studied as well as the solvation process that it suffers to produce the "activated" molecules  $\text{cis-}[\text{PtCl}(\text{H}_2\text{O})(\text{NH}_3)_2]^+$  and  $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NH}_3)_2]^{2+}$  [39-46]. Antitumor activity of solvated cisplatin derives from its capability to form bifunctional DNA cross-links [47]. The predominant adducts formed by cisplatin with DNA are guanine-guanine (GG) intrastrand cross-links throughout the coordination of Pt to N7 of guanine (Figure 2). The coordination to N7 of guanines is not surprising as nitrogen N7 atoms of purines are the most electron-dense and accessible sites in DNA for electrophilic attack by platinum. They are exposed in the major groove of the double helix, and not involved in base pair hydrogen-bonding. This particular platinum-induced kink in the DNA is considered to be the critical lesion due to the chain of events that the biomolecular recognition eventually provokes in the cell [47-51].

The significant prevalence of intrastrand GG cross-links over any other adduct has been examined in the context of contributions of H-bonding, the electrostatics in the vicinity of the binding site, and the steric effects of adduct conformation. It has been argued that hydrogen bonding between the  $\text{NH}_3$  of the DNA-cisplatin complex and O6 of a nearby guanine—not possible for adenine—has a large impact on the adduct configuration, being essential for stability and eventual cytotoxic activity [52-54].

Some other platinum derivatives present a covalent interaction with DNA. Platinum (IV) complexes with octahedral geometry are believed to be reduced to platinum (II) in vivo [55]. Satraplatin ((OC-6-43)-bis(acetato)amminedichloro(cycl hexethylamine) platinum, JM216) is the most successful of the



**Fig. 2.** Cisplatin forms adducts with the N7 nitrogen from guanine bases (adapted from PDB entry code 3LPV).

platinum(IV) complexes [56], on the other hand, iproplatin (cis-dichloro-trans-dihydroxy-bis-isopropylamine platinum(IV)) and tetraplatin (1,2-diaminocyclohexane tetrachloroplatinum (IV)) [57] are also undergoing clinical development. A number of multinuclear platinum complexes have also been developed [58, 59], some of which have shown activity in both cisplatin-sensitive and cisplatin resistant cell lines.

All mononuclear platinum complexes could form intra-strand and interstrand adducts with DNA. When interstrand lesion is formed, massive distortions of the B-DNA are observed. Similarly, the intrastrand lesion, while it forms much more readily than the interstrand lesion, it induces mutational events via the distortion of its nucleic acid target [60]. These detrimental issues have been addressed by a generation of dinuclear Pt complexes which possess two Pt (II) centers, each of which carries only one chloride ligand thus relegating each Pt (II) capable of only one coordination event. Farrell and his group designed and synthesized binuclear platinum (II) complexes and studied their interactions with calf thymus DNA and a small 49 base pair oligodeoxyribonucleotide, see Figure 2 [61]. Owing to the presence of the pyridyl ligands, this compound induces a much higher degree of DNA unwinding than that seen with either of the ammonia-bound complexes, as well as the mononuclear trans-[PtCl<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>]. Similarly, to the mononuclear compound [(Pt(*trans*-(py)<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>-μ-(diamminobutane)]<sup>2+</sup> stabilizes B-form DNA while the other complexes with amino groups instead pyridine rings induce B-Z transitions upon DNA binding. These alterations likely involve the ability of [(Pt(*trans*-(py)<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>-μ-(diamminobutane)]<sup>2+</sup> to undergo π-stacking interactions upon DNA association which in turn, disfavors the Z-DNA conformation. Importantly, interstrand-cross links formation is very efficient for all three complexes with yields of 80%, 52%, and 41% for [(Pt(*cis*-(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>-μ-(diamminobutane)]<sup>2+</sup>, [(Pt(*trans*-(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>-μ-(diamminobutane)]<sup>2+</sup>, and [(Pt(*trans*-(py)<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>-μ-(diamminobutane)]<sup>2+</sup> respectively. Further, only [(Pt(*trans*-(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>-μ-(diamminobutane)]<sup>2+</sup> was capable of intrastrand adduction.

DNA binding of BBR3464 was the formation of {Pt,Pt} inter-strand cross-links (IXL), expected to be structurally distinct from those formed by cisplatin because each Pt unit will bind to one strand of the DNA duplex [62]. For this compound the crosslinks occur not only in the "normal" 5'-5' direction, since the DNA helix is normally read from the 5'-side, but also in the "opposite" antiparallel 3'-3' direction [63]. The directionality is dependent on the nature of the cross-link. Interestingly and according to Farrell, this is the unique example of anti-cancer drugs behaving in this manner [64, 65].

Trinuclear platinum complex BBR3464 is one of the most studied of this kind [66-69]. This compound has shown a higher potency than cisplatin in vitro [70-72], while in vivo studies have shown it to be effective towards human xenograft tumors with intrinsic or acquired resistance to cisplatin [73]. In phase II clinical trials only partial responses have been observed with cisplatin-resistant ovarian and non-small cell lung cancers [74]. Even though Phase I and II clinical studies gave preliminary indications of activity in melanoma, pancreatic, lung and ovar-

ian cancers, further phase II studies have shown to have minimal antitumor activity against gastric carcinomas, with significant hematological toxicities encountered by patients, the authors conclude that further studies with BBR3464 in gastric or gastro-esophageal adenocarcinoma are not recommended [75].

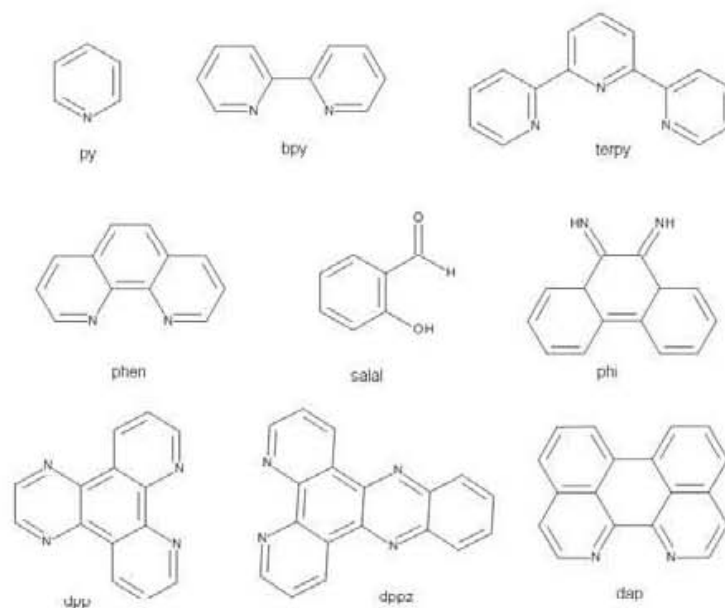
### Groove binding

Molecules normally reach DNA through one of the grooves and react to either the backbone or the nucleobases. Reversible intermolecular associations such as electrostatic binding occur due the interaction between cations with the negatively charged phosphate backbone at the exterior surface of the DNA helix [76]. Some of the most common ligands which have been studied as intercalator are shown in Fig. 3.

### Major groove

Ruthenium (II) polypyridyl complexes can bind by direct interactions in either the major or minor groove of DNA due to their great diversity in overall shape, size, hydrogen-bonding potential, polarizability of ligands and charge. Even though if the structure has an adequate intercalation motif, compounds with bulky substituent preferentially occupy the major groove. Examples of this kind of complexes include the ruthenium derivatives with the ability to hydrogen-bond that appear to favor major-groove binding like Λ-[Ru(TMP)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> (TMP = 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline) [77] and [Ru(phen)<sub>2</sub>(11-(9-acridinyl)dipyrido[3,2-a:2',0,3'-c]phenazine)]<sup>2+</sup> which present a preference to intercalate on GC rich region of the major groove than the AT rich one [78]. Copper compounds also present this binding mode, like [Cu(ferrocenylmethylbis(2-pyridylmethylamine)(dppz))(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] which shows dual chemical nuclease activity involving both metal centers and displays efficient photo-induced DNA cleavage activity in visible laser light of 458 and 568 nm and also in red light of 647 nm within the photodynamic therapy (PDT) window [79] or [Cu(salicylaldehyde-N(4)-phenylthiosemicarbazone) (dppz)] which also present nuclease activity [79].

Tetracationic triple helical supramolecular cylinder [Fe<sub>2</sub>(C<sub>25</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]Cl<sub>4</sub> was one of the first reported examples of this type of complexes that interact with DNA major groove. Major groove interaction was suggested by the DNA kinking observed in atomic force microscopy (AFM) images of the interaction between the helicate and plasmidic DNA pBR322. The major groove binding was confirmed by NOESY experiments [80]. Further studies of the interaction of this helicate structure with DNA show that exist an enantiomeric preference for the binding process that is reflected in the DNA deformation degree [81]. Binding strength and groove selectivity can be modified adding methyl groups to the helicate that produce width increase or lengthening of the structure. Increasing the width reduces the DNA binding strength, the bending and coiling effect and the groove selectivity of the enantiomers compared with the parent compound, while the lengthening results



**Fig. 3.** Some intercalating ligands mentioned in this review py = pyridine, bpy = bipyridine, terpy = terpyridine, phen = phenanthroline, salal = salicylaldehyde, phi = phenanthrene-9,10-dimine, dpp = 2,3-bis(2-pyridyl)pyrazine, dppz = dipyridyl[3,2-a:2'3'-c]phenazine, dap = 1,12-diazaperylene.

in DNA interactions similar to those of the parent compounds, with an increased preference of the *P* enantiomer for the minor groove indicating an enhancement of mode (*P* enantiomer of these iron supramolecular helicates deviates polarized light to the left) [82]. Another examples of helicate structures that provide certain groove selectivity degree are the enantiomerically pure dinuclear complexes of the form  $[\text{Ru}_2(1,10\text{-phen})_4\text{L1}]^{4+}$  and  $[\text{Ru}_2(\text{bpy})_4\text{L1}]^{4+}$ , where  $\text{L1} = (\text{C}_5\text{H}_4\text{N})\text{C}=\text{N}(\text{C}_6\text{H}_4)_2\text{CH}_2$ . In contrast to the di-iron helicates, the phen complexes show DNA sequence effects with  $\Delta$ ,  $\Delta$ - $[\text{Ru}_2(\text{phen})_4\text{L1}]^{4+}$  binding preferentially to GC and  $\Lambda$ ,  $\Lambda$ - $[\text{Ru}_2(\text{phen})_4\text{L1}]^{4+}$  to AT [83].

### Intercalation

Intercalation is distinguished by the insertion of generally planar polycyclic aromatic systems between the stacked base pairs of DNA. This interaction is stabilized by the overlap of the  $\pi$ -clouds of the intercalator and the nearby nucleobases [84] and can occur from either the major [85] or the minor groove [86]. Intercalation increases the separation of adjacent base pairs, and the resulting helix distortion is compensated by adjustments in the sugar-phosphate backbone and, generally, by an unwinding of the duplex. These systems have a planar surface area of approximately  $28 \text{ \AA}^2$  [87] and they must be positively charged so that electrostatic interactions can occur between the intercalating molecule and the negatively charged DNA [88]. The inclusion of a metal center into the design of intercalating compounds gives rise to a greater range of geometric diversity

and structural flexibility than any purely organic molecules can achieve.

Due the remarkable results obtained with cisplatin, for much time was believed that compounds with square geometries possessing an intercalator moiety were the perfect candidates for the accomplishment of the interaction with DNA. In 1974, the intercalative binding of platinum (II) complexes containing the bidentate ligands bpy, phen and terpy were investigated using X-ray diffraction and electrophoresis [59, 89, 90]. However, intercalation is not restricted to square planar complexes, a series of chiral octahedral complexes using zinc [91], indium [92], iron [93, 94], cobalt [95, 96], osmium [97, 98], rhodium [99-101] and ruthenium [75-105, 123, 124, 141-148] as well as tetrahedral complexes such as  $[\text{Co}(\text{phen})_2]^{2+}$  [102],  $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$  [103], were synthesized and their interactions with DNA investigated.

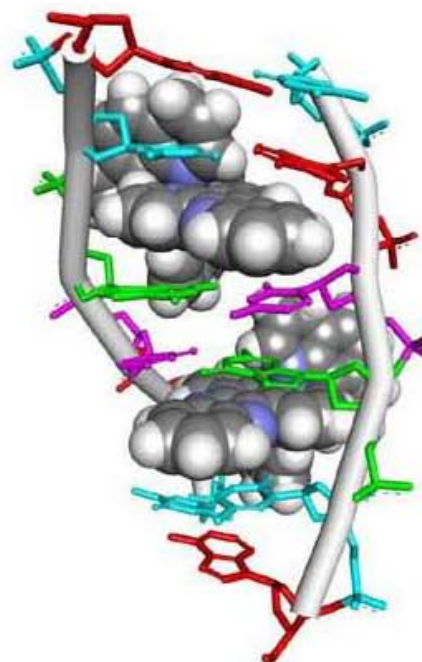
A series of related platinum (II) compounds containing bpy, phen and TMP as intercalating ligand and ethylenediamine (en) or diaminopropane completing the coordination sphere were tested against the L1210 murine leukaemia cell line to assess their cytotoxicity.

The effect of the intercalating moiety in metallo drugs was investigated by comparing the cytotoxicity of different methyl-substitution on the phenanthroline of  $[\text{Pt}(\text{R-phen})(\text{en})]^{2+}$  complexes [104], where R-phen = phen, 4-Me-phen, 5-Me-phen, 4,7-Me<sub>2</sub>-phen, 5,6-Me<sub>2</sub>-phen and TMP in the L1210 cell line. These achiral complexes present  $\text{IC}_{50}$  values in the range 0.7-2 mM that suggest to the investigation group that the combination of intercalating and ancillary ligand coordinated to the

platinum has a significant effect on the biological activity of these complexes [105]. These experiments also did show that methyl substitution on specific endocyclic carbon atoms of phen can affect the biological activity of a complex. The order of activity is 5,6-Me<sub>2</sub>-phen > 5-Me-phen > phen > 4-Me-phen = 4,7-Me<sub>2</sub>-phen = TMP. NMR studies revealed that they all insert into the hexanucleotide d(GTCGAC)<sub>2</sub> from the minor groove, predominantly between the T2A5 and C3G4 base pairs. The NMR evidence also indicated that the intercalator is inserted into the DNA with the ethylenediamine moiety in the minor groove. It is probable that the observed enhancement in biological activity is due to favorable hydrogen bonding or steric interactions. For the complexes [Pt(4-Me-phen(en))]<sup>2+</sup>, [Pt(4,7-Me<sub>2</sub>-phen(en))]<sup>2+</sup> and [Pt(TMP(en))]<sup>2+</sup>, results from DNA-NMR binding experiments suggest that the hydrogens of the methyl groups on C4 and C7 are close to the base pairs and possibly interacting unfavorably and this may result in the reduced biological activity of these complexes. In addition, it is possible that the methyl groups interact with phosphodiester groups of the sugar-phosphate backbone, affecting the depth of intercalation [104]. Most platinum (II) intercalators binding have association constants in the range of 10<sup>4</sup>-10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>. Variance in binding strength appears to be due to differences in the charge and extent of the aromatic system of individual molecules, with the general trend being phen > terpy > bpy [106-108].

Similar results were reported by Chikira [109] employing ternary Cu(II) complexes with phenanthroline and amino acids, [Cu(phen)(α-aminoacidate)], shown that the three-fused aromatic rings in phenanthroline are critical for the intercalative binding of the complexes. The intercalative binding was promoted by 5,6-dimethyl groups on the phenanthroline ring, whereas it was disturbed by 2,9-dimethyl groups, indicating that the planarity of the coordination sphere is important for the intercalative binding. For these compounds, the inhibitory concentrations are in the micromolar range in several cell lines such as cervix (HeLa and SiHa), breast (MCF-7), and colon (HCT-15). Even though these ternary Cu(II) coordination compounds have shown a remarkable cytotoxic, cytostatic, genotoxic and antitumoral activity [110], the paramagnetism of these molecules made hard the study of interaction with oligonucleotides, studies that were done as a routine analysis with metals such as Pt(II) and Ru(II) employing NMR spectroscopy.

This is the case of mononuclear ruthenium (II) complexes that were extensively studied in the middle of the 1980s and during the 1990s [85, 111-140]. One of the first examples of transition metal complexes that interact with DNA extensively studied was Λ- and Δ-[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup>. Different biological activity was established for both isomers by studies carried out on mice [141]. The results of these experiments allowed setting out the hypotheses that the interaction of these complexes with the biological system was physical instead chemical, and that the biological effect must be due to the overall three-dimensional shape of the complex, rather than simply the constituent ligands (Figure 4). Association constants are reported to be of the order of 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup> [102].



**Fig. 4.** Intercalation binding of a ruthenium complex with B-DNA form (adapted from PDB entry code 4E87).

Berton [142-144] suggested that binding of [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> could occur by two possible modes: intercalation and surface interaction. However, other studies published some years later employing linear and circular dichroism studies suggested that both isomers do not intercalate [144]. DNA interaction discrepancies were solved by posterior NMR studies where were established that [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> exhibit different binding modes, depending on the chirality of the enantiomer of the complex, the DNA sequence and, for the Δ-enantiomer, the concentration of the complex, at high metal complex to DNA ratios, the minor groove is saturated by surface bound complexes, whereas the major groove is partly filled in a partially intercalative geometry [137, 139, 145].

On the other hand, bis-intercalating compounds consisting of two intercalating moieties joined by a linking chain or spacer were developed to improve cytotoxicity. Bis intercalating compounds may have higher affinities due to their increased charge and ability to span a greater number of DNA base pairs unobtainable by mono intercalators [146]. For platinum derivatives of this kind of compounds the cytotoxicity was reported to depend on three variables; linker length, charge density and counter ions [147]. Complexes with shorter linkers displayed higher activity than those with longer linkers [147]. The more highly charged complexes were also more cytotoxic [146, 147]. The high charge density and greater electrostatic stress of the shorter linked complexes is believed to increase the platination of DNA, which leads to their greater cytotoxicity [147].

Dimers of rhodium (III) complexes such as  $[\text{Rh}(\text{bpy})_2(\text{phi})]^{3+}$  ( $\text{phi} = 9,10\text{-phenanthrenequinone diimine}$ ) and  $[\text{Rh}(\text{phi})_2(\text{bpy})]^{3+}$  have also been found to show some DNA recognition. Dimers of  $\Delta\text{-}[\text{Rh}(4,4'\text{-diphenylbpy})_2(\text{phi})]^{3+}$  ( $4,4'\text{-diphenylbpy} = 4,4'\text{-diphenyl-2,2' - bipyridine}$ ) specifically targeted the palindromic DNA sequence  $5'\text{-CTCTAGAG-}3'$  [122, 148]. These rhodium (III) complexes demonstrated the significance of shape complementarity for specific binding between the octahedral complexes and DNA. Complexes with sterically bulky methyl or phenyl groups on the non-intercalating ligands showed sequence preferences [149].

As well as in platinum complexes, Rh(III) derivatives combining intercalating and coordinated easily leaving groups have also been studied [150-151]. 2D NMR shows combined coordinative and intercalative interactions between the dirhodium(II) complex  $\text{cis-}[\text{Rh}_2(\text{dap})(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_2(\eta^1\text{-O}_2\text{CCH}_3)(\text{CH}_3\text{OH})](\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$  ( $\text{dap} = 1,12\text{-diazaperylene}$ ) and the duplex ( $5'\text{-GGAAAGTTGAGAG-}3'$ )/( $5'\text{-CTCTCAACTTCC-}3'$ ). One rhodium atom binds coordinatively to the N7 of A6 base, while the dap ligand intercalates classically into the central A6pA7 base step.

Besides NMR spectroscopy and X-ray diffraction, the atomic force microscopy has been employed in the study of metal/drugs-DNA interactions in recent years with remarkable results. In this field the indispensable reference is the group of Professor Virtudes Moreno, who has studied the interaction of an endless number of coordination compounds. Among the studied compounds some of them present antitumor activity such as derivatives of Pt (II) and Pd (II) [152-154], Ru (II) [155-157], Co (III) [158], Cu (I) [159], Cu (II) [160]. This technique made possible to identify the interaction of paramagnetic compounds such as Casiopeínas (Cas III-ia,  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'-bipyridine})(\text{acetylacetonate})]\text{NO}_3$ ; Cas III-Ea,  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{acetylacetonate})]\text{NO}_3$ , and Cas II-gly,  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{glycinate})]\text{NO}_3$ ) with plasmidic DNA pBR322 establishing interaction differences derived from the structural modifications [160].

In addition to the antitumor compounds, some metallo-drugs have been designed to be used in the treatment of other diseases also trying to reach DNA as main target. Some examples are oxovanadium compounds tested as antileishmanial [161] and antitrypanosomal [162, 163] agents. Metals usually employed to get antitumor agents such as Pt(II), Pd(II) were recently tested against *Trypanosoma cruzi* with very good results [164]. Ru(II) compounds with phosphine and diimine ligands were tested against tuberculosis [165], while Au(III) compound  $[\text{Au}(\text{dppz})_2]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$  and trans-platinum (II) compounds with chloroquine have shown noteworthy results in the proliferative inhibition of *Leishmania mexicana* cultures [166-168].

Although a lot of experimental work has been done studying the interaction of coordination compounds with DNA, much of this knowledge is still the peak of the iceberg, due that in many cases the information obtained with experimental designs that do not involve expensive procedures and equip-

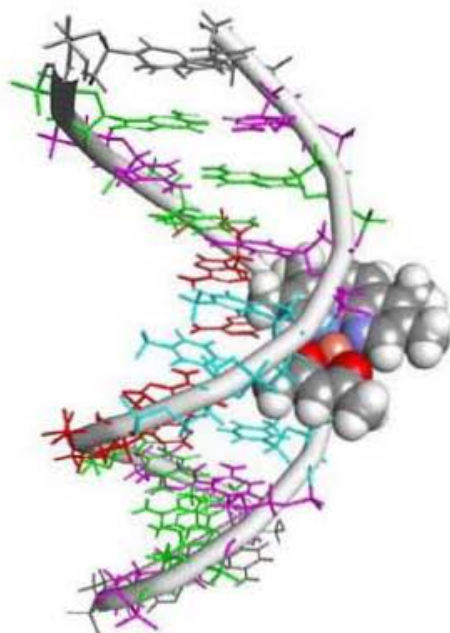
ments is extremely poor. However, in recent years the computational methods have been suffering an incredible growth related with the size of the systems that can be calculated and the time expended to get results. The next part of this review is focused in the description of some computational approaches employed in the investigation of metal based drugs-DNA interactions.

### Computational Chemistry approach of coordination compounds binding to DNA

While extensive research has been done about drug-DNA binders, work about coordination compounds interacting with DNA is still an exciting and active field of research. Experimental techniques and analysis used for routine DNA studies can be extrapolated to coordination complexes in most cases and this is also true with Computational Chemistry tools, except by the fact that transition metals are still complex to simulate due to their multiple oxidation states and resulting geometry change, therefore, special care has to be accounted when generating force field parameters or applying a Quantum Mechanical method to these molecules. Extensive work has been done to understand the interaction of metals and transition-metals with DNA as cations present in the solvent (for an in-depth review, refer to the work by Sponer and co-workers [169]). In this manuscript, we focus on research about metal-containing compounds that interact directly with DNA.

### Molecular Dynamics studies

Studies using Molecular Dynamics (MD) are numerous and provide insight about the general structure of the mechanism of binding. Even if no electronic effect is taken into account, these simulations provide useful information of the dynamics not only in the place where the metal-compound is binding but also the conformational changes of the whole system. The AMBER and the CHARMM family of force fields for nucleic acids are able to simulate a stable B-DNA chain in the micro second realm and realistic sampling of the global and local parameters is now possible [170]. MD also allows refinement based on Nuclear Overhauser Effect (NOE) restraints of distance, angle and penalty functions based on NMR spectra. This type of analysis tools is probably the most efficient way to study the structure of a metal compound and the way it binds to nucleic acids, but it requires the restrain information obtained by NMR spectroscopy. The technique has been used to build models and study the structure of many systems [171-173] and also in depth study of DNA-protein binding and triple-helix DNA [174]. In the field of metal-DNA binding, recent work includes studies of the ruthenium complex  $[\text{Ru}_2\text{bidppz}(\text{bipy})_4]^{4+}$  and the dodecamer  $[\text{d}(\text{CGCGAATTCGCG})_2]$  using NMR spectroscopy showed a minor-groove binding interaction that was stable after 10ns of simulation (Figure 4) [175]. Force Field (FF) parameters of small organic molecules are available and provide acceptable results, however, these general force fields do not have the parameters to describe a bioinorganic compound which includes



**Fig. 5.** Intercalation binding of Casiopeína III-Da [Cu(2,2'-bipyridine)(acetylacetonato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> with B-DNA form.

a transition metal, so this is a concern that has to be resolved to be able to run a MD simulation. There are several options available that will generate the bonded and non-bonded parameters around a metal center, one of this is the Metal Center Parameter Builder [176, 177] available in the Amber programs [178]. If the X-ray or NMR structure of the metal-compound is available, then it will be relatively easier to generate the required FF parameters using the bond, angle and dihedral values from the experimental structure. Non-bonded parameters are available for a number of metals [179]. The resulting FF values can be used to recreate the metal-compound and run MD for several nanoseconds to guarantee its stability and correct representation for the simulation. An example of this methodology is shown in our previous work using the copper-compound [Cu(2,2'-bipyridine)(acetylacetonato)(H<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> (Casiopeína®), [180]. Since an X-ray of the binding of this copper compounds is still not available, we manually docked the molecule in 4 possible starting binding configurations with the B-DNA and run MD for 100ns to study the energetics of each resulting trajectory (Fig. 5) [181].

If no experimental structure is available, Quantum Mechanical (QM) methods can be used to optimize an initial structure and with this structure, generate the appropriate FF parameters. In a recent work from Liu, Chen and Tang with a new family of mononuclear copper and dinuclear copper-platinum nucleases Density Functional Theory (DFT) methodology was used to generate the optimized geometries FF parameters for the nucleases, minus the copper and platinum atoms, were obtained from the Generalized Amber Force Field (GAFF) using

the programs available in AMBER11. The charge calculation for each atom was obtained following the Restrained Electrostatic Potential (RESP) procedure that allows a multi-conformation, multi-orientation approach, yielding a more accurate representation of the electronic distribution of the molecule [182]. As mentioned above, van-der-Waals and Lennard-Jones parameters for both metals were adopted from available databases and previous work. B-DNA was generated using the *nucgen* program available in AMBER11. To generate the initial structure prior to the MD simulation, docking methodology was used over 1000 docking predictions using Autodock4.0. Docking methodology will sample through different conformations between two molecules evaluating the total interaction energy for every conformation until a certain threshold is reached. In this case, the metal binders were located among the minor groove of the B-DNA chain. With this starting structure, MD was run for 40ns. Information about the structural changes and movement of the binders along the groove is extracted from the trajectories and information about the global and local inter and intra base conformation.

#### Quantum Mechanical studies

The use of Quantum Mechanical methods allow full electronic study of the system and considerable reduction of empirical approximations, although, this methods are extremely computational and memory demanding and the representation of solvent interactions are limited. Explicit solvent representation is simply not reachable with current methods, but one can use a previously generated Molecular Dynamics simulation with explicit solvent and transfer specific water molecules for the QM treatment. It is important to mention that transition metals contain a considerable amount of electrons which will take a lot of computing time. Although is important to include every electron of the metal atom, in most cases the core electrons are not used for reactions or energetics. This can be simulated using effective core potentials (ECP) which "freezes" core electrons and facilitate the electronic representation of the metal, requiring less time to achieve convergence. A simple approach to study these interactions is using isolated bases and nucleotides, basically, stripping apart the DNA or RNA chain. This allows the use of high-level computational methods and analysis procedures. An example is the work done by Hirao and Matsubara using divalent cyclen-coordinated metal complexes (Zn, Cu and Ni) where the metal center is treated with the LANL2dz ECP basis set, the rest of the atoms using the 6-31G\* and using the B3LYP functional. They study the binding of DNA bases guanine, thymine and uracil to the metal complexes and the effect of the solvent using the polarized-continuum-model (PCM) approximation. They report detailed information about the charge transfer and electrostatic interactions using this methodology [183]. Another advantage about QM methods is the possibility to obtain spectroscopic data (for example: UV-VIS, fluorescence and RAMAN), this allows a way to compare between experiments and simulations starting with specific configurations [184].

### Hybrid QM/MM studies

Quantum Mechanics and Molecular Dynamics are both methods that give detailed information about some aspect of a molecular system, each with its own advantages and flaws. In an attempt to bring up together the best of both worlds, Warshel and Levitt [185] created a hybrid approach in which the system was split between two zones or layers. The high layer or QM part is where the reaction is taken place, as it occurs in the active site inside enzymes, and the low layer or MM part, which in this case is the rest of the tertiary structure of the same protein. In most cases, the dynamics and fluctuations of the whole protein are not directly involved in the reaction mechanism; therefore, it is not required to employ such a detailed level of calculation like the ones attainable with a QM method. On the contrary, on the active site, we want to study bond breaking, bond forming, electronic interactions, etc., and if possible avoid the use of empirical approximations. The main idea of the QM/MM approach is to split the system of study so that the binder and the area involved in the binding process are simulated with QM and the rest of the system is modeled with MD. The energy of the system is then given by equation:

$$E_{\text{ele}} \approx E_{\text{QM}} + E_{\text{MM}} + E_{\text{QM/MM}}$$

$E_{\text{QM}}$  and  $E_{\text{MM}}$  can be obtained using any of the methodologies already mentioned. The differences between the available QM/MM implementations reside in how to calculate the term  $E_{\text{QM/MM}}$ . Most common methods include ONIOM [186, 187], Car-Parinello QM/MM [188], effective fragment potential [189] and empirical valence bond method [190].

One of the earliest works using hybrid methods to study the binding of coordination compounds to DNA was done using the cisplatin system with the Car-Parinello/MM scheme [191, 192]. This methodology has been proved efficient to study the non-covalent interactions and dynamics of new cisplatin derivatives with DNA [193]. The ONIOM partitioning scheme was applied in the study of Ruthenium compounds binding to B-DNA. First, the DNA molecule is generated and solvated using explicit solvent and counter ions are added. The system is then heated and equilibrated over a 100ps time frame using MD simulations. The resulting structure is extracted from the solvent and the ruthenium complex is manually placed near two guanine bases. The QM layer was defined as the metal complex, including the two guanine bases, and the MM part is the rest of the DNA chain. This allowed to generate a fully optimized geometry of the placement of the metal complex and the guanine bases and then, use only those three molecules to run a series of transition states to study two possible reaction mechanisms [194].

Even though the information of the rest of the DNA chain is lost, following this methodology allows to study a possible reaction mechanism starting from an explicitly solvated structure.

### Final remarks

The development of new coordination compounds that specifically interact with DNA—one of the main targets used in the treatment of several diseases, principally cancer—is the Holy Grail for all the researchers devoted to medicinal chemistry. The treatment of cancer focusing on the interruption of reproductive cycle has been a main objective for many years. Now, with the knowledge of complete genome and the fast growth experimented by the epigenetic, nucleic acids have to be one of the main targets of which chemists have to aim when developing new compounds. The use of transition metals gives a superb tool to drug chemists to develop and study molecules capable of obtaining specific DNA-drug interactions considering the multiple options of d-block metals available in the periodic table. Transition metals are dynamic in geometry, electron affinity and reactivity, making them excellent choices to feed the ongoing field of antineoplastic drug development. Even though the enormous advantages provided by the employment of transition metals related with the three-dimensional arrangement and with the knowledge of the fundamental role played by the intercalating moieties to provide a reversible interaction with DNA, the fundamental factors of this interactions still possess greatest gaps inasmuch as the results provided by experimental designs that do not involve expensive protocols and equipments are extremely poor to identify the specific interactions due the lower energetic changes involved, making clear the use of methodologies such as computational chemistry to help solve these problems. In this review we try to provide a general scope about experimental and theoretical approaches that are used in current research and some of the limitations and success stories found. We consider this area of research a hot and current topic considering the improved experimental and analysis techniques available to synthesize novel coordination compounds designed to accomplish determined task, such as direct and specific interaction with a particular region of DNA.

### Acknowledgements

JCGR acknowledge CONACYT for the scholarship grant. The authors acknowledge CONACYT 179119, ICyT DF PIN-VII-32 and PAPIIT UNAM IN 218013 and IN 208113 for the financial support.

### References

1. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* **2004**, *431*, 931-45.
2. Huang, R.; Wallqvist, A.; Covell, D. G. Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 1009-39.
3. Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* **2009**, *91*, 1198-211.
4. Sava, G.; Jaouen, G.; Hillard, E. A.; Bergamo, A. Targeted therapy vs. DNA-adduct formation-guided design: thoughts about



- the future of metal-based anticancer drugs. *Dalton Transactions* **2012**, *41*, 8226-34.
5. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5th ed.; Garland Science, 2002; p. 1268.
  6. Watson, J. D.; Crick, F. H. C. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **1953**, *171*, 737-738 (1953).
  7. Maddox, B. The Double Helix and the "wronged heroine". *Nature* **2003**, *421*, 407-8.
  8. Hunter, C. A.; Lawson, K. R.; Perkins, J.; Urch, C. J. Aromatic interactions. *J. Chem. Soc., Perkin Transactions 2* **2001**, 651-669.
  9. Sriram, M.; Wang, A. H.-J. Structure of DNA and RNA. In *Bioorganic Chemistry: Nucleic Acids*; Hecht, S. M., Ed.; Oxford University Press: New York, 1996; pp. 105-143.
  10. Shakked, Z.; Guenstein-Guzikevich, G.; Eisenstein, M.; Frolow, F.; Rabinovich, D. The conformation of the DNA double helix in the crystal is dependent on its environment. *Nature* **1989**, *342*, 456-60.
  11. Neidle, S. *Oxford Handbook of Nucleic Acid Structure*; Oxford University Press: New York, NY, 1999; p. 8.
  12. Wadkins, R. M.; Vladu, B.; Tung, C. S. Actinomycin D binds to metastable hairpins in single-stranded DNA. *Biochemistry* **1998**, *37*, 11915-23.
  13. Hägerlöf, M.; Papsai, P.; Chow, C. S.; Elmroth, S. K. C. More pronounced salt dependence and higher reactivity for platination of the hairpin r(CGCGUUGUUCGCG) compared with d(CGCGTTGTTCGCG). *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 974-90.
  14. Brown, D. R.; Kurz, M.; Hsu, V. L.; Keams, D. R. Formation of multiple complexes between actinomycin D and a DNA hairpin: structural characterization by multinuclear NMR. *Biochemistry* **1994**, *33*, 651-664.
  15. Henderson, P. T.; Armitage, B.; Schuster, G. B. Selective photocleavage of DNA by anthraquinone derivatives: targeting the single-strand region of hairpin structures. *Biochemistry* **1998**, *37*, 2991-3000.
  16. François, J.; Thuong, N. T.; Hélène, C. Recognition and cleavage of hairpin structures in nucleic acids by oligodeoxynucleotides. *Nucl. Ac. Res.* **1994**, *22*, 3943-3950.
  17. Phan, A. T.; Kuryavyi, V.; Patel, D. J. DNA architecture: from G to Z. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 288-98.
  18. Huppert, J. L. Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *The FEBS Journal* **2010**, *277*, 3452-8.
  19. Davis, J. T. G-quartets 40 years later: from 5'-GMP to molecular biology and supramolecular chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 668-98.
  20. Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
  21. Brooks, T. A.; Hurley, L. H. The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics. *Nature Rev. Cancer* **2009**, *9*, 849-61.
  22. Brooks, T. A.; Kendrick, S.; Hurley, L. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters. *The FEBS Journal* **2010**, *277*, 3459-69.
  23. Guéron, M.; Leroy, J. The i-motif in nucleic acids. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2000**, *10*, 326-331.
  24. Huppert, J. L.; Balasubramanian, S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucl. Ac. Res.* **2007**, *35*, 406-13.
  25. Mergny, J.; Lacroix, L.; Han, X.; Leroy, J.; Helene, C. Intramolecular Folding of Pyrimidine Oligodeoxynucleotides into an i-DNA Motif. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8887-8898.
  26. Kendrick, S.; Akiyama, Y.; Hecht, S. M.; Hurley, L. H. The i-motif in the bcl-2 P1 promoter forms an unexpectedly stable structure with a unique 8:5:7 loop folding pattern. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17667-76.
  27. Zhou, J.; Wei, C.; Jia, G.; Wang, X.; Feng, Z.; Li, C. Formation of i-motif structure at neutral and slightly alkaline pH. *Molecular bioSystems* **2010**, *6*, 580-6.
  28. Miyoshi, D.; Karimata, H.; Sugimoto, N. Hydration regulates thermodynamics of G-quadruplex formation under molecular crowding conditions. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 7957-63.
  29. Shin, S. R.; Jin, K. S.; Lee, C. K.; Kim, S. I.; Spinks, G. M.; So, I.; Jeon, J.-H.; Kang, T. M.; Mun, J. Y.; Han, S.-S.; Ree, M.; Kim, S. J. Fullerene Attachment Enhances Performance of a DNA Nanomachine. *Adv. Mat.* **2009**, *21*, 1907-1910.
  30. Li, X.; Peng, Y.; Ren, J.; Qu, X. Carboxyl-modified single-walled carbon nanotubes selectively induce human telomeric i-motif formation. *Proc. Nat. Ac. Sc. USA* **2006**, *103*, 19658-63.
  31. Mukherjee, A.; Vasquez, K. M. Triplex technology in studies of DNA damage, DNA repair, and mutagenesis. *Biochimie* **2011**, *93*, 1197-208.
  32. Vasquez, K. M.; Glazer, P. M. Triplex-forming oligonucleotides: principles and applications. *Quart. Rev. of Biophys.* **2002**, *35*, 89-107.
  33. Choi, J.; Majima, T. Conformational changes of non-B DNA. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5893-909.
  34. Berman, H. M.; Olson, W. K.; Beveridge, D. L.; Westbrook, J.; Gelbin, A.; Demeny, T.; Hsieh, S. H.; Srinivasan, A. R.; Schneider, B. The Nucleic Acid Database. A comprehensive relational database of three-dimensional structures of nucleic acids. *Biophys. J.* **1992**, *63*, 751-9.
  35. Song, H.; Kaiser, J. T.; Barton, J. K. Crystal structure of  $\Delta$ -[Ru(bpy)<sub>3</sub>dppz]<sup>2+</sup> bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation. *Nature Chemistry* **2012**, *4*, 615-20.
  36. Zhou, C.; Du, X.; Li, H. Studies of interactions among cobalt(III) polypyridyl complexes, 6-mercaptopurine and DNA. *Bioelectrochem.* **2007**, *70*, 446-51.
  37. Wang, B.; Yang, Z.; Li, T. Synthesis, characterization, and DNA-binding properties of the Ln(III) complexes with 6-hydroxy chromone-3-carbaldehyde-(2'-hydroxy) benzoyl hydrazone. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 6012-21.
  38. Calabrò, F.; Albers, P.; Bokemeyer, C.; Martin, C.; Einhorn, L. H.; Horwich, A.; Krega, S.; Schmoll, H. J.; Sternberg, C. N.; Daugaard, G. The contemporary role of chemotherapy for advanced testis cancer: a systematic review of the literature. *Eur. Urol.* **2012**, *61*, 1212-21.
  39. Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467-2498.
  40. Berners-Price, Sue; Appleton, T. G. The Chemistry of Cisplatin in Aqueous Solution. In *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; Humana Press: New Jersey, USA, 2000; pp. 3-35.
  41. Kozelka, J.; Legendre, F.; Reeder, F.; Chottard, J.-C. Kinetic aspects of interactions between DNA and platinum complexes. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *190-192*, 61-82.
  42. Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. Slowing of Cisplatin Aquation in the Presence of DNA but Not in the Presence of Phosphate: Improved Understanding of Sequence Selectivity and the Roles of Monoaquated and Diaquated Species in the Binding of Cisplatin to DNA. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5603-5613.
  43. Legendre, F.; Bas, V.; Kozelka, J.; Chottard, J. C. A complete kinetic study of GG versus AG platination suggests that the doubly aquated derivatives of cisplatin are the actual DNA binding species. *Chemistry-A Eur. J.* **2000**, *6*, 2002-10.
  44. Davies, M. S.; Berners-Price, S. J.; Hambley, T. W. Rates of Platination of AG and GA Containing Double-Stranded Oligonucleotides: Insights into Why Cisplatin Binds to GG and AG but Not GA Sequences in DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 11380-11390.

45. Berners-Price, S. J.; Frenkiel, T. A.; Frey, U.; Ranford, J. D.; Sadler, P. J. Hydrolysis products of cisplatin: pK<sub>a</sub> determinations via [1H, 15N] NMR spectroscopy. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 789.
46. Eastman, A. The mechanism of action of cisplatin: from adducts to apoptosis. In *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*; Lippert, B., Ed.; Verlag Helvetica Chimica Acta: Zurich, 1999; pp. 111-134.
47. Caradonna, J. P.; Lippard, S. J.; Gait, M. J.; Singh, M. The antitumor drug cis-dichlorodiammineplatinum forms an intrastrand d(GpG) crosslink upon reaction with [d(ApGpGpCpCpT)]<sub>2</sub>. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5793-5795.
48. Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Van Oosterom, A. T.; Lohman, P. H. M.; Berends, F. cis-Diamminedichloroplatinum(II)-induced DNA Adducts in Peripheral Leukocytes from Seven Cancer Patients: Quantitative Immunochemical Detection of the Adduct Induction and Removal after a Single Dose of cis-Diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res.* **1987**, *47*, 3000-3004.
49. Fichtinger-Schepman, A. M. J.; Van der Veer, J. L.; Den Hartog, J. H. J.; Lohman, P. H. M.; Reedijk, J. Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* **1985**, *24*, 707-713.
50. Filipski, J.; Kohn, K. W.; Bonner, W. M. The nature of inactivating lesions produced by platinum (II) complexes in phage λ DNA. *Chemico-Biological Interactions* **1980**, *32*, 321-330.
51. Eastman, A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA. *Biochemistry* **1986**, *25*, 3912-3915.
52. Hambley, T. W. Modelling the interaction of cisplatin with DNA. *Drug Design and Delivery* **1988**, *3*, 153-8.
53. Baik, M.-H.; Friesner, R. A.; Lippard, S. J. Theoretical study of cisplatin binding to purine bases: why does cisplatin prefer guanine over adenine? *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 14082-92.
54. Struik, A. Guanine-06 methylation reduces the reactivity of d(GpG) towards platinum complexes. *J. Inorg. Biochem.* **1991**, *44*, 249-260.
55. Hall, M. D.; Hambley, T. W. Platinum(IV) antitumor compounds: their bioinorganic chemistry. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 49-67.
56. Satraplatin: BMS 182751, BMY 45594, JM 216. *Drugs in R&D* **2007**, *8*, 125-32.
57. Lebowitz, D.; Canetta, R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 1522-34.
58. Nordén, B.; Tjerneld, F. Binding of inert metal complexes to deoxyribonucleic acid detected by linear dichroism. *FEBS Letters* **1976**, *67*, 368-370.
59. Jennette, K. W.; Gill, J. T.; Sadownick, J. A.; Lippard, S. J. Metallointercalation reagents. Synthesis, characterization, and structural properties of thiolato(2,2',2''-terpyridine)platinum(II) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 6159-6168.
60. Yang, D.; Van Boom, S. S.; Reedijk, J.; Van Boom, J. H.; Farrell, N.; Wang, A. H. A novel DNA structure induced by the anticancer bisplatinum compound crosslinked to a GpC site in DNA. *Nature Struct. Biol.* **1995**, *2*, 577-8.
61. Farrell, N.; Appleton, T. G.; Qu, Y.; Roberts, J. D.; Fontes, A. P. S.; Skov, K. A.; Wu, P.; Zou, Y. Effects of Geometric Isomerism and Ligand Substitution in Bifunctional Dinuclear Platinum Complexes on Binding Properties and Conformational Changes in DNA. *Biochemistry* **1995**, *34*, 15480-15486.
62. Roberts, J. D.; Van Houten, B.; Qu, Y.; Farrell, N. P. Interaction of novel bis(platinum) complexes with DNA. *Nuc. Ac. Res.* **1989**, *17*, 9719-9733.
63. Kasparkova, J.; Zehmulova, J.; Farrell, N.; Brabec, V. DNA interstrand cross-links of the novel antitumor trinuclear platinum complex BBR3464. Conformation, recognition by high mobility group domain proteins, and nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 48076-86.
64. Noll, D. M.; Mason, T. M.; Miller, P. S. Formation and repair of interstrand cross-links in DNA. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 277-301.
65. Rajski, S. R.; Williams, R. M. DNA Cross-Linking Agents as Antitumor Drugs. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2723-2796.
66. Roberts, J. D.; Peroutka, J.; Farrell, N. Cellular pharmacology of polynuclear platinum anti-cancer agents. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 51-7.
67. Wheate, N. Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 133-145.
68. Gourley, C.; Cassidy, J.; Edwards, C.; Samuel, L.; Bisset, D.; Camboni, G.; Young, A.; Boyle, D.; Jodrell, D. A phase I study of the trinuclear platinum compound, BBR 3464, in combination with protracted venous infusional 5-fluorouracil in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2004**, *53*, 95-101.
69. Boulikas, T.; Vougiouka, M. Cisplatin and platinum drugs at the molecular level. (Review). *Oncology Rep.* **2003**, *10*, 1663-82.
70. Roberts, J. D.; Peroutka, J.; Beggiolin, G.; Manzotti, C.; Piazzoni, L.; Farrell, N. Comparison of cytotoxicity and cellular accumulation of polynuclear platinum complexes in L1210 murine leukemia cell lines. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 47-50.
71. Perego, P.; Gatti, L.; Caserini, C.; Supino, R.; Colangelo, D.; Leone, R.; Spinelli, S.; Farrell, N.; Zunino, F. The cellular basis of the efficacy of the trinuclear platinum complex BBR 3464 against cisplatin-resistant cells. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 59-64.
72. Perego, P.; Caserini, C.; Gatti, L.; Carenini, N.; Romanelli, S.; Supino, R.; Colangelo, D.; Viano, I.; Leone, R.; Spinelli, S.; Pezzoni, G.; Manzotti, C.; Farrell, N.; Zunino, F. A novel trinuclear platinum complex overcomes cisplatin resistance in an osteosarcoma cell system. *Molec. Pharmacol.* **1999**, *55*, 528-34.
73. Manzotti, C.; Pratesi, G.; Menta, E.; Di Domenico, R.; Cavalletti, E.; Fiebig, H. H.; Kelland, L. R.; Farrell, N.; Polizzi, D.; Supino, R.; Pezzoni, G.; Zunino, F. BBR 3464: a novel triplatinum complex, exhibiting a preclinical profile of antitumor efficacy different from cisplatin. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2626-34.
74. Hensing, T. A.; Hanna, N. H.; Gillenwater, H. H.; Gabriella Camboni, M.; Allievi, C.; Socinski, M. A. Phase II study of BBR 3464 as treatment in patients with sensitive or refractory small cell lung cancer. *Anti-Cancer Drugs* **2006**, *17*, 697-704.
75. Jodrell, D. I.; Evans, T. R. J.; Steward, W.; Cameron, D.; Prendiville, J.; Aschele, C.; Noberasco, C.; Lind, M.; Carmichael, J.; Dobbs, N.; Camboni, G.; Gatti, B.; De Braud, F. Phase II studies of BBR3464, a novel tri-nuclear platinum complex, in patients with gastric or gastro-oesophageal adenocarcinoma. *Eur. J. Cancer* **2004**, *40*, 1872-7.
76. Gessner, R. V.; Quigley, G. J.; Wang, A. H.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich, A. Structural basis for stabilization of Z-DNA by cobalt hexaammine and magnesium cations. *Biochemistry* **1985**, *24*, 237-40.
77. Mei, H. Y.; Barton, J. K. Tris(tetramethylphenanthroline)ruthenium(II): a chiral probe that cleaves A-DNA conformations. *Proc. Nat. Ac. Sci.* **1988**, *85*, 1339-43.
78. Mariappan, M.; Suenaga, M.; Mukhopadhyay, A.; Raghavaiah, P.; Maiya, B. G. Synthesis, structure, DNA binding and photocleavage activity of a ruthenium(II) complex with 11-(9-acridinyl)dipyrido[3,2-a:2',3'-c]phenazine ligand. *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *376*, 340-349.
79. Maity, B.; Roy, M.; Chakravarty, A. R. Ferrocene-conjugated copper(II) dipyridophenazine complex as a multifunctional model nuclease showing DNA cleavage in red light. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 1395-1399.
80. Hannon, M. J.; Moreno, V.; Prieto, M. J.; Moldrheim, E.; Sletten, E.; Meistermann, I.; Isaac, C. J.; Sanders, K. J.; Rodger, A. Intra-

- molecular DNA Coiling Mediated by a Metallo-Supramolecular Cylinder. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 879-884.
81. Meistermann, I.; Moreno, V.; Prieto, M. J.; Moldrheim, E.; Sletten, E.; Khalid, S.; Rodger, P. M.; Peberdy, J. C.; Isaac, C. J.; Rodger, A.; Hannon, M. J. Intramolecular DNA coiling mediated by metallo-supramolecular cylinders: differential binding of P and M helical enantiomers. *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* **2002**, *99*, 5069-74.
  82. Peberdy, J. C.; Malina, J.; Khalid, S.; Hannon, M. J.; Rodger, A. Influence of surface shape on DNA binding of bimetallo helicates. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 1937-45.
  83. McDonnell, U.; Hicks, M. R.; Hannon, M. J.; Rodger, A. DNA binding and bending by dinuclear complexes comprising ruthenium polypyridyl centres linked by a bis(pyridylimine) ligand. *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 2052-9.
  84. Lerman, L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J. Molec. Biol.* **1961**, *3*, 18-30.
  85. Dupureur, C. M.; Barton, J. K. Use of Selective Deuteration and <sup>1</sup>H NMR in Demonstrating Major Groove Binding of .DELTA.-[Ru(phen)2dppz]2+ to d(GTCGAC)2. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10286-10287.
  86. Greguric, A.; Greguric, I. D.; Hambley, T. W.; Aldrich-Wright, J. R.; Collins, J. G. Minor groove intercalation of Δ-[Ru(Me2phen)2dppz]2+ to the hexanucleotide d(GTCGAC)2. *Dalton Transactions* **2002**, 849.
  87. Pindur, U.; Haber, M.; Sattler, K. Antitumor active drugs as intercalators of deoxyribonucleic acid: Molecular models of intercalation complexes. *J. Chem. Ed.* **1993**, *70*, 263.
  88. Berman, H. M.; Young, P. R. The interaction of intercalating drugs with nucleic acids. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **1981**, *10*, 87-114.
  89. Howe-Grant, M.; Wu, K. C.; Bauer, W. R.; Lippard, S. J. Binding of platinum and palladium metallointercalation reagents and antitumor drugs to closed and open DNAs. *Biochemistry* **1976**, *15*, 4339-4346.
  90. Lippard, S.; Bond, P.; Wu, K.; Bauer, W. Stereochemical requirements for intercalation of platinum complexes into double-stranded DNA's. *Science* **1976**, *194*, 726-728.
  91. Barton, J. K.; Dannenberg, J. J.; Raphael, A. L. Enantiomeric selectivity in binding tris(phenanthroline)zinc(II) to DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 4967-4969.
  92. Stinner, C.; Wightman, M. D.; Kelley, S. O.; Hill, M. G.; Barton, J. K. Synthesis and Spectroelectrochemistry of Ir(bpy)(phen)(phi)3+, a Tris(heteroleptic) Metallointercalator. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5245-5250.
  93. Carter, M. T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J. Voltammetric studies of the interaction of metal chelates with DNA. 2. Tris-chelated complexes of cobalt(III) and iron(II) with 1,10-phenanthroline and 2,2'-bipyridine. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901-8911.
  94. Yoshioka, N.; Inoue, H. DNA binding of iron(II) mixed-ligand complexes containing 1,10-phenanthroline and 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *77*, 239-247.
  95. Arounaguirri, S.; Maiya, B. G. Dipyridophenazine Complexes of Cobalt(III) and Nickel(II): DNA-Binding and Photocleavage Studies. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 4267-4270.
  96. Barton, J. K.; Raphael, A. L. Photoactivated stereospecific cleavage of double-helical DNA by cobalt(III) complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 2466-2468.
  97. Holmlin, R. E.; Yao, J. A.; Barton, J. K. Dipyridophenazine Complexes of Os(II) as Red-Emitting DNA Probes: Synthesis, Characterization, and Photophysical Properties. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 174-189.
  98. Holmlin, R. E.; Barton, J. K. Os(phen)2(dppz)2+: A Red-Emitting DNA Probe. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 7-8.
  99. Zeglis, B. M.; Barton, J. K. DNA base mismatch detection with bulky rhodium intercalators: synthesis and applications. *Nature Protocols* **2007**, *2*, 357-71.
  100. Arkin, M. R.; Stemp, E. D. A.; Holmlin, R. E.; Barton, J. K.; Hormann, A.; Olson, E. J. C.; Barbara, P. F. Rates of DNA-Mediated Electron Transfer Between Metallointercalators. *Science* **1996**, *273*, 475-480.
  101. Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777-2796.
  102. Neidle, S.; Abraham, Z. Structural and sequence-dependent aspects of drug intercalation into nucleic acids. *Crit. Rev. Biochem.* **1984**, *17*, 73-121.
  103. Sigman, D. S. Chemical nucleases. *Biochemistry* **1990**, *29*, 9097-9105.
  104. Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Aldrich-Wright, J. R. DNA binding and biological activity of some platinum(II) intercalating compounds containing methyl-substituted 1,10-phenanthrolines. *Dalton Transactions* **2004**, 1145-52.
  105. McFadyen, W. D.; Wakelin, L. P. G.; Roos, I. A. G.; Leopold, V. A. Activity of platinum(II) intercalating agents against murine leukemia L1210. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 1113-1116.
  106. Che, C.-M.; Yang, M.; Wong, K.-H.; Chan, H.-L.; Lam, W. Platinum(II) Complexes of Dipyridophenazine as Metallointercalators for DNA and Potent Cytotoxic Agents against Carcinoma Cell Lines. *Chemistry, Eur. J.* **1999**, *5*, 3350-3356.
  107. McCoubrey, A.; Latham, H. C.; Cook, P. R.; Rodger, A.; Lowe, G. 4-Picoline-2,2':6',2''-terpyridine-platinum(II) - A potent intercalator of DNA. *FEBS Letters* **1996**, *380*, 73-78.
  108. Corral, E.; Hotze, A. C. G.; Den Dulk, H.; Leczkowska, A.; Rodger, A.; Hannon, M. J.; Reedijk, J. Ruthenium polypyridyl complexes and their modes of interaction with DNA: is there a correlation between these interactions and the antitumor activity of the compounds? *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, *14*, 439-48.
  109. Chikira, M.; Tomizawa, Y.; Fukita, D.; Sugizaki, T.; Sugawara, N.; Yamazaki, T.; Sasano, A.; Shindo, H.; Palaniandavar, M.; Antholine, W. 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.
  110. Bravo-Gómez, M. E.; Garcia-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, (Casiopéinas). *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 299-309.
  111. Vagg, R. S.; Williams, P. A. Chiral metal complexes 2. Light-catalysed diastereoisomeric equilibration in aqueous solutions of cis-[Ru(phen)2(L-serine)]+ and its 2,2'-bipyridyl analogue. *Inorg. Chim. Acta* **1981**, *52*, 69-72.
  112. Sardesai, N. Y.; Lin, S. C.; Zimmermann, K.; Barton, J. K. Construction of Coordinatively Saturated Rhodium Complexes Containing Appended Peptides. *Bioconj. Chem.* **1995**, *6*, 302-312.
  113. Rutherford, T. J.; Quagliotto, M. G.; Keene, F. R. Chiral [Ru(pp)2(CO)2]2+ Species (pp = Bidentate Polypyridyl Ligand) and Their Use in the Stereoselective Synthesis of Ligand-Bridge Dinuclear Complexes. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 3857-3858.
  114. Hua, X.; Von Zelewsky, A. Enantiomerically Pure Chiral Ru(II)(L-L)2 Building Blocks for Coordination Compounds. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 5791-5797.
  115. Helms, J. B.; Huang, L.; Price, R.; Sullivan, B. P.; Sullivan, B. A. Coordination Chemistry of Tropone-Based Antimitotic Drugs and the Antineoplastic Behavior of Some Ruthenium(II) and Platinum(II) Derivatives. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 5335-5340.
  116. Sitlani, A.; Barton, J. K. Sequence-specific recognition of DNA by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): importance of steric and van der Waals interactions. *Biochemistry* **1994**, *33*, 12100-8.

117. Sardesai, N. Y.; Zimmermann, K.; Barton, J. K. DNA Recognition by Peptide Complexes of Rhodium(III): Example of a Glutamate Switch. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 7502-7508.
118. Sitlani, A.; Dupureur, C. M.; Barton, J. K. Enantiospecific palindromic recognition of 5'-d(CTCTAGAG)-3' by a novel rhodium intercalator: analogies to a DNA-binding protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12589-12590.
119. Satyanarayana, S.; Dabrowiak, J. C.; Chaires, J. B. Tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomer interactions with DNA: mode and specificity of binding. *Biochemistry* **1993**, *32*, 2573-84.
120. Murphy, C. J.; Barton, J. K. Ruthenium complexes as luminescent reporters of DNA. *Meth. Enzymol.* **1993**, *226*, 576-94.
121. Togano, T.; Nagao, N.; Tsuchida, M.; Kumakura, H.; Hisamatsu, K.; Howell, F. S.; Mukaida, M. One-pot and selective synthesis of a series of [RuCl<sub>6</sub>-2nLn] (L=bidentate ligand, n=0-3) types of complexes with polypyridyl ligands; another example of the synthetic utility of "ruthenium-blue" solution. *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *195*, 221-225.
122. Sitlani, A.; Long, E. C.; Pyle, A. M.; Barton, J. K. DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): shape-selective recognition and reaction. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 2303-2312.
123. Satyanarayana, S.; Dabrowiak, J. C.; Chaires, J. B. Neither delta-nor lambda-tris(phenanthroline)ruthenium(II) binds to DNA by classical intercalation. *Biochemistry* **1992**, *31*, 9319-24.
124. Hartshorn, R. M.; Barton, J. K. Novel dipyrrophenazine complexes of ruthenium(II): exploring luminescent reporters of DNA. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 5919-5925.
125. Peek, B. M.; Ross, G. T.; Edwards, S. W.; Meyer, G. J.; Meyer, T. J.; Erickson, B. W. Synthesis of redox derivatives of lysine and related peptides containing phenothiazine or tris(2,2'-bipyridine)ruthenium(II). *Int. J. Peptide Prot. Res.* **1991**, *38*, 114-23.
126. Morgan, R. J.; Chatterjee, S.; Baker, A. D.; Streckas, T. C. Effects of ligand planarity and peripheral charge on intercalative binding of Ru(2,2'-bipyridine)<sub>2</sub>L<sub>2</sub><sup>2+</sup> to calf thymus DNA. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 2687-2692.
127. Friedman, A. E.; Kumar, C. V.; Turro, N. J.; Barton, J. K. Luminescence of ruthenium(II) polypyridyls: evidence for intercalative binding to Z-DNA. *Nuc. Ac. Res.* **1991**, *19*, 2595-602.
128. Rehmann, J. P.; Barton, J. K. 1H NMR studies of tris(phenanthroline) metal complexes bound to oligonucleotides: characterization of binding modes. *Biochemistry* **1990**, *29*, 1701-9.
129. Patra, A. K.; Rose, M. J.; Murphy, K. A.; Olmstead, M. M.; Mascharak, P. K. Photolabile ruthenium nitrosyls with planar dicarboxamide tetradentate N(4) ligands: effects of in-plane and axial ligand strength on NO release. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4487-95.
130. Friedman, A. E.; Chambron, J. C.; Sauvage, J. P.; Turro, N. J.; Barton, J. K. A molecular light switch for DNA: Ru(bpy)<sub>2</sub>(dppz)<sub>2</sub><sup>2+</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4960-4962.
131. Cathey, C. J.; Constable, E. C.; Hannon, M. J.; Tocher, D. A.; Ward, M. D. A single stranded diruthenium(II) helical complex. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1990**, 621.
132. De Buyl, F.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Tossi, A.; Kelly, J. M. Medium dependence of the spectroscopic and photophysical properties of Ru(bpy)<sub>2</sub>(HAT)<sub>2</sub><sup>2+</sup>. The effect of solvent, pH and binding to polyelectrolytes. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **1991**, *60*, 27-45.
133. Baker, A. D.; Morgan, R. J.; Streckas, T. C. Enantiospecific cleavage of DNA using copper(II) chelated to the periphery of a ligand on a chiral tris-chelate of ruthenium(II). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1992**, 1099.
134. Baker, A. D.; Morgan, R. J.; Streckas, T. C. Enantiomeric resolution of ruthenium complexes Ru(phen)<sub>3</sub><sup>2+</sup> and Ru(bpy)<sub>2</sub>pzz<sub>2</sub><sup>2+</sup> on a DNA-hydroxylapatite column. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1411-1412.
135. Vagg, R. S.; Williams, P. A. Chiral metal complexes. 1. Photochemical inversion in ternary Ru(II) complexes of diimines and L-tryptophane. *Inorg. Chim. Acta* **1981**, *51*, 61-65.
136. Nordén, B.; Kurucsev, T. Analysing DNA complexes by circular and linear dichroism. *J. Mol. Recogn.* **1994**, *7*, 141-55.
137. Eriksson, M.; Leijon, M.; Hiort, C.; Nordén, B.; Gräslund, A. Binding of delta- and lambda-[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> to [d(CGCGATCGCG)]<sub>2</sub> studied by NMR. *Biochemistry* **1994**, *33*, 5031-40.
138. Hiort, C.; Lincoln, P.; Norden, B. DNA binding of DELTA- and LAMBDA-[Ru(phen)<sub>2</sub>DPPZ]<sup>2+</sup>. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3448-3454.
139. Eriksson, M.; Leijon, M.; Hiort, C.; Norden, B.; Gräslund, A. Minor groove binding of [Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> to [d(CGCGATCGCG)]<sub>2</sub> evidenced by two-dimensional NMR. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4933-4934.
140. Hiort, C.; Norden, B.; Rodger, A. Enantiopreferential DNA binding of [ruthenium(II)(1,10-phenanthroline)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> studied with linear and circular dichroism. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1971-1982.
141. Dwyer, F. p.; gyarfás, e. c.; rogers, w. p.; koch, j. h. Biological Activity of Complex Ions. *Nature* **1952**, *170*, 190-191.
142. Barton, J. K. Tris(phenanthroline) metal complexes: probes for DNA helicity. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1983**, *1*, 621-32.
143. Barton, J. K.; Basile, L. A.; Danishefsky, A.; Alexandrescu, A. Chiral probes for the handedness of DNA helices: enantiomers of tris(4,7-diphenylphenanthroline)ruthenium(II). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 1961-5.
144. Barton, J. K.; Goldberg, J. M.; Kumar, C. V.; Turro, N. J. Binding modes and base specificity of tris(phenanthroline)ruthenium(II) enantiomers with nucleic acids: tuning the stereoselectivity. *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 2081-2088.
145. Coggan, D. Z. M.; Haworth, I. S.; Bates, P. J.; Robinson, A.; Rodger, A. DNA Binding of Ruthenium Tris(1,10-phenanthroline): Evidence for the Dependence of Binding Mode on Metal Complex Concentration. *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 4486-4497.
146. Wheate, N. J.; Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Kemp, S.; Aldrich-Wright, J. R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini Rev. Med. Chem.* **2007**, *7*, 627-48.
147. Lowe, G.; Droz, A. S.; Vilaivan, T.; Weaver, G. W.; Park, J. J.; Pratt, J. M.; Tweedale, L.; Kelland, L. R. Cytotoxicity of 2,2':6',2''-terpyridineplatinum(II) complexes against human ovarian carcinoma. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 3167-74.
148. Sitlani, A.; Dupureur, C. M.; Barton, J. K. Enantiospecific palindromic recognition of 5'-d(CTCTAGAG)-3' by a novel rhodium intercalator: analogies to a DNA-binding protein. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12589-12590.
149. Sitlani, A.; Barton, J. K. Sequence-Specific Recognition of DNA by Phenanthrenequinone Diimine Complexes of Rhodium(III): Importance of Steric and van der Waals Interactions. *Biochemistry* **1994**, *33*, 12100-12108.
150. Kang, M.; Chouai, A.; Chifotides, H. T.; Dunbar, K. R. 2D NMR Spectroscopic Evidence for Unprecedented Interactions of Cis-Rh<sub>2</sub>(dap)-(μ-O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(μ-1-O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>OH)(O<sub>2</sub>CCH<sub>3</sub>) with a DNA Oligonucleotide: Combination of Intercalative and Coordinative Binding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6148-6151.
151. Frodl, A.; Herebian, D.; Sheldrick, W. S. Coligand Tuning of the DNA Binding Properties of Bioorganometallic (η<sup>6</sup>-arene) Ruthenium(II) Complexes of the Type [(η<sup>6</sup>-arene)Ru(amino acid)(dppz)]<sup>2+</sup> (dppz = dipyrro[3,2-a:2',3'-c]phenazine), n=1-3. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 3664-3673.
152. Escibano, E.; Font-Bardia, M.; Calvet, T.; Lorenzo, J.; Gamze, P.; Moreno, V. DNA binding studies of a series of cis-[Pt(Am)<sub>2</sub>X<sub>2</sub>] complexes (Am = inert amine, X = labile carboxylato ligand) *Inorg. Chim. Acta* **2013**, *394*, 65-76.

153. Ruiz, J.; Cutillas, N.; Vicente, C.; Villa, M.D.; López, G.; Lorenzo, J.; Avilés, F.X.; Moreno, V.; Bautista, D. New Palladium(II) and Platinum(II) Complexes with the Model Nucleobase 1-Methylcytosine: Antitumor Activity and Interactions with DNA. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (21), 365-7376.
154. Albert, J.; Garcia, S.; Granell, J.; Llorca, A.; Lovelle, M.V.; Moreno, V.; Presa, A.; Rodríguez, L.; Quirante, J.; Calvis, C.; Messeguer, R.; Badia, J.; Baldomà, L. Cyclopalladated benzophenone imines: Synthesis, cytotoxicity against human breast adenocarcinoma cell lines and DNA interaction. *J. Organomet. Chem.* **2013**, *724*, 289-296.
155. Garcia, M.H.; Valente, A.; Florindo, P.; Morais, T.S.; Piedade, M.F.M.; Duarte, M.T.; Moreno, V.; Avilés, F.X.; Lorenzo, J. New ruthenium(II) mixed metallocene derived complexes: Synthesis, characterization by X-ray diffraction and evaluation on DNA interaction by atomic force microscopy *Inorg. Chim. Acta* **2013**, *363*(14), 3765-3775.
156. Moreno, V.; Font-Bardia, M. Calvet, T.; Lorenzo, J.; Avilés, F.X.; Garcia, M.H.; Morais, T.S.; Valente, A.; Robalo, M.P. DNA interaction and cytotoxicity studies of new ruthenium(II) cyclopentadienyl derivative complexes containing heteroaromatic ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*(2), 241-249.
157. Barragán, F.; Carrion-Salip, D.; Gómez-Pinto, I.; González-Cantó, A.; Sadler, P.J.; de Llorens, R.; Moreno, V.; González, C.; Massaguer, A.; Marchán, V. Somatostatin Subtype-2 Receptor-Targeted Metal-Based Anticancer Complexes *Bioconjugate Chem.*, **2012**, *23* (9), 1838-1855.
158. Gómez-Segura, J.; Prieto, M.J.; Font-Bardia, M.; Solans, X.; Moreno, V. Crystal Structure and DNA Interaction of the Facial-Type *rac*-Tris[2-(aminomethyl)benzimidazole]cobalt(III) Complex. *Inorg. Chem.* **2006**, *45* (25), 10031-10033.
159. Arbus, A.; Font, M.; Martínez, M.A.; Fontrodona, X.; Prieto, M.J.; Moreno, V.; Sala, X.; Llobet, A. DNA-Cleavage Induced by New Macrocyclic Schiff base Dinuclear Cu(I) Complexes Containing Pyridyl Pendant Arms. *Inorg. Chem.* **2009**, *48* (23), 11098-11107.
160. Becco, L.; Rodríguez, A.; Bravo, M.E.; Prieto, M.J.; Ruiz-Azuara, L.; Garat, B.; Moreno, V.; Gambino, D. New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: Interaction with DNA and proteins and anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *109*, 49-56.
161. Benítez, J.; Cavalcanti de Queiroz, A.; Correia, I.; Amaral Alves, M.; Alexandre-Moreira, M.S.; Barreiro, E.J.; Moreira Lima, L.; Varela, J.; González, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Gambino, D. New oxidovanadium(IV) *N*-acylhydrazones complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 20-27.
162. Fernández, M.; Becco, L.; Correia, I.; Benítez, J.; Piro, O.E.; Echeverría, G.A.; Medeiros, A.; Comini, M.; Lavaggi, M.L.; González, M.; Cerecetto, H.; Moreno, V.; Costa Pessoa, J.; Garat, B.; Gambino, D. Oxidovanadium(IV) and dioxidovanadium(V) complexes of tridentate salicylaldehyde semicarbazones: Searching for prospective antitrypanosomal agents *J. Inorg. Biochem.* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.02.010>
163. Benítez, J.; Becco, L.; Correia, I.; Leal, S.M.; Guiset, H.; Costa Pessoa, J.; Lorenzo, J.; Tanco, S.; Escobar, P.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 303-312.
164. Vieites, M.; Smircich, P.; Pagano, M.; Otero, L.; Luane Fischer, F.; Terenzi, H.; Prieto, M.J.; Moreno, V.; Garat, B.; Gambino, D. DNA as molecular target of analogous palladium and platinum anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: A comparative study. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1704-1711.
165. Pavan, F.R.; Poelhsitz, G.V.; Barbosa, M.I.F.; Leite, S.R.A.; Batista, A.A.; Ellena, J.; Sato, L.S.; Franzblau, S.G.; Moreno, V.; Gambino, D.; Leite, C.Q.F. Ruthenium(II) phosphine/diimine/picolinate complexes: Inorganic compounds as agents against tuberculosis. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 5099-5107.
166. Navarro, M.; Hernández, C.; Colmenares, I.; Hernández, P.; Fernández, M.; Sierralta, A.; Marchán, E. Synthesis and characterization of [Au(dppz)<sub>2</sub>]Cl<sub>3</sub>. DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) mexicana* *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 111-116.
167. Navarro, M.; Cisneros-Fajardo, E.J.; Fernandez-Mestre, M.; Arrieché, D.; Marchán, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub> *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *97*, 364-369.
168. Navarro, M.; Castro, W.; Higuera-Padilla, A.R.; Sierralta, A.; Abad, M.J.; Taylor, P.; Sánchez-Delgado, R.A. Synthesis, characterization and biological activity of trans-platinum(II) complexes with chloroquine. *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, *105*, 1684-1691.
169. Sponer, J.; Burda, J. V.; Leszczynski, J. Interaction of Metal Cations with Nucleic Acids and their building units. In *Computational Studies of RNA and DNA*; Sponer, J.; Lankaš, F., Eds.; Springer Netherlands, 2006; pp. 389-409.
170. Pérez, A.; Luque, F. J.; Orozco, M. Dynamics of B-DNA on the microsecond time scale. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14739-45.
171. Henriksen, N. M.; Davis, D. R.; T. E. Cheatham, I. Molecular dynamics re-refinement of two different small RNA loop structures using the original NMR data suggest a common structure. *J. Biomol. NMR* **2012**, *53*, 321-39.
172. Young, M. A.; Ravishanker, G.; Beveridge, D. L. A 5-nanosecond molecular dynamics trajectory for B-DNA: analysis of structure, motions, and solvation. *Biophys. J.* **1997**, *73*, 2313-36.
173. Yue, H.; Zhu, Y.; Wang, Y.; Chen, G. Investigation and improvement of DNA cleavage models of polyamide + Cu(II) nuclease + OOH- ligands bound to DNA. *BMC structural biology* **2010**, *10*, 35.
174. Sekharudu, C. Y.; Yathindra, N.; Sundaralingam, M. Molecular dynamics investigations of DNA triple helical models: unique features of the Watson-Crick duplex. *J. Biomol. Struct. Dynam.* **1993**, *11*, 225-44.
175. Wu, L.; Reymer, A.; Persson, C.; Kazimierzczuk, K.; Brown, T.; Lincoln, P.; Nordén, B.; Billeter, M. Initial DNA Interactions of the Binuclear Threading Intercalator  $\Lambda\Lambda$ -[ $\mu$ -bidppz(bipy)<sub>4</sub>Ru<sub>2</sub>]<sup>4+</sup>: An NMR Study with [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub>. *Chemistry, Eur. J.* **2013**, *19*, 5401-5410.
176. Peters, M. B.; Yang, Y.; Wang, B.; Füsti-Molnár, L.; Weaver, M. N.; Merz, K. M. Structural Survey of Zinc Containing Proteins and the Development of the Zinc AMBER Force Field (ZAFF). *J. Chem. Theo. Comput.* **2010**, *6*, 2935-2947.
177. Hoops, S. C.; Anderson, K. W.; Merz, K. M. Force field design for metalloproteins. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 8262-8270.
178. Case, D. A.; Cheatham, T. E. I.; Darden, T.; Gohlke, H.; Luo, R.; Merz, K. M.; Onufriev, A.; Simmerling, C.; Wang, B.; Woods, R. J. The Amber biomolecular simulation programs. *J. Computat. Chem.* **2005**, *26*, 1668-88.
179. Babu, C. S.; Lim, C. Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water. *J. Phys. Chem. A* **2006**, *110*, 691-9.
180. Ruiz-Azuara, L. L. Ruiz-Azuara, *SECOFI Patente*, 26/01/1994. 1996; 21/04/1992 U.S. Patent No. 5, 107, 005. Re35, 458, Feb. 18 (1997); L. Ruiz-Azuara, *SECOFI (1990) Patente*, 09/12/1993 no. 172248. 1997; U.S. Patent No. 5,576,326. 19/11/1996.
181. R. Galindo-Murillo, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, and F. Cortés-Guzmán, Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15539-46.
182. Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. A well-behaved electrostatic potential based method using charge

- restraints for deriving atomic charges: the RESP model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 10269-10280.
183. Matsubara, T.; Hirao, K. Density functional study of the binding of the cyclen-coordinated M(II) (M=Zn, Cu, Ni) complexes to the DNA base. Why is Zn better to bind? *J. Molec. Struct. THEOCHEM* **2002**, *581*, 203-213.
184. Li, J.; Chen, J.; Xu, L.; Zheng, K.; Ji, L. A DFT/TDDFT study on the structures, trend in DNA-binding and spectral properties of molecular "light switch" complexes [Ru(phen)<sub>2</sub>(L)]<sup>2+</sup> (L=dppz, taptp, phehat). *J. Organomet. Chem.* **2007**, *692*, 831-838.
185. Warshel, A.; Levitt, M. Theoretical studies of enzymic reactions: Dielectric, electrostatic and steric stabilization of the carbonium ion in the reaction of lysozyme. *J. Molec. Biol.* **1976**, *103*, 227-249.
186. Dapprich, S.; Komáromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. A new ONIOM implementation in Gaussian98. Part I. The calculation of energies, gradients, vibrational frequencies and electric field derivatives. *J. Molec. Struct. THEOCHEM* **1999**, *461-462*, 1-21.
187. Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. 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)<sub>3</sub>)<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> Oxidative Addition. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 19357-19363.
188. Röhrig, U. F.; Frank, I.; Hutter, J.; Laio, A.; VandeVondele, J.; Rothlisberger, U. QM/MM Car-Parrinello Molecular Dynamics Study of the Solvent Effects on the Ground State and on the First Excited Singlet State of Acetone in Water. *ChemPhysChem* **2003**, *4*, 1177-1182.
189. Webb, S. P.; Gordon, M. S. Solvation of the Menshutkin Reaction: A Rigorous Test of the Effective Fragment Method. *J. Phys. Chem. A* **1999**, *103*, 1265-1273.
190. Warshel, A.; Weiss, R. M. An empirical valence bond approach for comparing reactions in solutions and in enzymes. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6218-6226.
191. Spiegel, K.; Rothlisberger, U.; Carloni, P. Cisplatin Binding to DNA Oligomers from Hybrid Car-Parrinello/Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2699-2707.
192. Spiegel, K.; Magistrato, A. Modeling anticancer drug-DNA interactions via mixed QM/MM molecular dynamics simulations. *Org. Biomolec. Chem.* **2006**, *4*, 2507.
193. Magistrato, A.; Ruggerone, P.; Spiegel, K.; Carloni, P.; Reedijk, J. Binding of Novel Azole-Bridged Dinuclear Platinum(II) Anticancer Drugs to DNA: Insights from Hybrid QM/MM Molecular Dynamics Simulations. *J. Phys. Chem. B* **2005**, *110*, 3604-3613.
194. Futera, Z.; Platts, J. A.; Burda, J. V. Binding of piano-stool Ru(II) complexes to DNA; QM/MM study. *J. Computat. Chem.* **2012**, *33*, 2092-101.



Regular paper

## Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212



Anllely Grizett Gutiérrez<sup>a</sup>, Adriana Vázquez-Aguirre<sup>a</sup>, Juan Carlos García-Ramos<sup>b</sup>, Marcos Flores-Alamo<sup>b</sup>, Enrique Hernández-Lemus<sup>c,d</sup>, Lena Ruiz-Azuara<sup>b</sup>, Carmen Mejía<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Genómica Computacional, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México D.F., Mexico

<sup>d</sup> Centro de Ciencias de la Complejidad, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 20 December 2012

Received in revised form 30 April 2013

Accepted 1 May 2013

Available online 7 May 2013

#### Keywords:

Casiopeínas  
Copper(II) compounds  
Neuroblastoma  
Reactive oxygen species  
Glutathione  
Mitochondrial apoptosis

### ABSTRACT

In the present work we report the antiproliferative activity of Cu(II) coordination compounds, **CasIIgly** ([Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) (glycinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>), **CasIIIa** ([Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine) (glycinato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>), and **CasIIIe** ([Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline) (acetylacetonato) (H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>), against human tumoral cell line CHP-212 (estromal neuroblastoma). Additionally, the molecular structure of **CasIIIe** was reported. The IC<sub>50</sub> values obtained for the evaluated compounds are in the range 18 to 47 μM, representing an inhibition potency increase of 5 to 12 times compared with cisplatin (IC<sub>50</sub> = 226.7 μM). After 2 h of incubation with the evaluated compounds, cells showed high levels of reactive oxygen species and a considerable GSH depletion, besides an important disruption of the mitochondrial membrane with release of cytochrome C and besides the presence of caspase-3, an effector caspase that is activated in the last step of apoptosis cascade. The results confirm that cell death in neuroblastoma CHP-212 treated with Casiopeínas occurs via apoptosis. Due to the lack of expression of caspase-8, cell death is principally by the mitochondrial pathway. Thus, one of the most interesting findings of this work is the identification of a very important damage in neuroblastoma cells induced by Cu(II) coordination compounds in a very short exposition times.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common extra-cranial childhood tumor, and represents 15% of all infantile oncology deaths [1]. Currently, the mainstay of NB chemotherapy is intensive multimodality treatment (IMT). However, IMT is usually inefficient, especially in high-risk patients with metastases. Despite the problems associated with treatments, apoptosis may occur spontaneously in NB, and this is used in the treatment employing chemotherapeutic agents that potentiate or accelerate the apoptotic effect [2]. In CHP-212 cells, there is controversy regarding the expression of caspase-8 – a key player in the extrinsic pathway – which could make the mitochondrial pathway as the preferred route to be carried out apoptosis in this cell line [3,4]. On the other hand, intrinsic pathway may involve endogenous processes such as cytochrome C (cyt C) release, activation of endonucleases, disassembling of nuclear chromatin and degradation of oligonucleosomal DNA [5].

Cyt C release could be a consequence of mitochondrial transmembrane potential disruption ( $\Delta\psi_m$ ) due to reactive oxygen species (ROS)

overproduction. In neuroblastoma this elevated generation can be stimulated by several drugs such as doxorubicin, ellipticin and cisplatin [6].

Cisplatin has shown pro-oxidant effects that include inhibition of thioredoxin reductase and increment of ROS, mainly in mitochondria [7] as a result of the  $\Delta\psi_m$  imbalance, that in turn lead to an incremented release of superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) [8]. The tumoral adaptive response to the increase of ROS levels is to enhance the concentration of their intracellular antioxidants such as glutathione (GSH) [9]. However, an important decrease of this molecule is observed mostly due to the Pt-GSH adduct formation yielding an important increase of ROS concentration. As mentioned before, it is necessary to explore the effect of other compounds which are capable of generating ROS against neuroblastoma.

It has been described that copper and some complexes of this metal can participate in redox reactions that produce ROS [10,11]. Casiopeínas® (Cas) are a family of copper(II) mixed chelate compounds containing bidentate ligands in their coordination sphere such as 1, 10-phenanthroline, 2, 2'-bipyridine, aminoacidate, acetylacetonate and salicylaldehyde. Combination of these ligands with the metal centre provides compounds with general formulas [Cu(N-N)(N-O)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(O-O)]NO<sub>3</sub>. These compounds may catalyze the Fenton reaction generating multiple ROS such as hydroxyl (HO•) and superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) radicals besides including hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [8,12,13].

\* Corresponding author at: Av. Universidad 3000, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, México D.F., Mexico. Tel.: +52 55 5622 3144.

E-mail addresses: carmen.mejia.iib@gmail.com, maria.c.mejia@uv.es (C. Mejía).

Casiopéinas present good therapeutic indexes, both *in vitro* and in animal models [14–16]. Even though many results suggest the main role played by ROS generation and direct DNA interaction after Casiopéinas administration to tumor cells leading them to apoptosis, a detailed description of the particular events that guide to cell death remains unclear [13,17–19]. Since the effect of Cas in NB has not been analyzed, this study explores the mechanisms of **CasIIgly**, **CasIIIia** and **CasIIIeA**, their role in the induction of oxidative stress and its relation with mitochondrial apoptosis in cell line CHP-212. As revealed here, induced overproduction of ROS with concomitant decrease of intracellular levels of GSH and mitochondrial dysfunction cause the induction of intrinsic apoptosis.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials and instruments

All common laboratory chemicals were from commercial sources and were used without further purification. The mixed-ligand copper complexes **CasIIgly**, **CasIIIia** and **CasIIIeA** (Fig. 1) were synthesized and characterized according to previously patented procedures [20]. The compounds were recrystallized and purification was confirmed by elemental analysis. A Fisons Instruments analyzer model EA 1108 was used for elemental analysis determination, using a sulfanilamide standard.

Aqua (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline)(glycinato) copper(II) nitrate dihydrate (**CasIIgly**): (elemental analysis data: calculated (%) for  $\text{CuC}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_5\text{N}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (443.90 g/mol): C, 43.29; N, 12.62; H, 4.54. Found (%): C, 43.59; N, 12.61; H, 4.52).

Aqua (4, 4'-dimethyl-2, 2'-bipyridine) (acetylacetonato) copper(II) nitrate dihydrate (**CasIIIia**): (elemental analysis data: calculated (%) for  $\text{CuC}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (444.93 g/mol): C, 45.89; N, 9.44; H, 5.21. Found (%): C, 46.59; N, 9.80; H 4.93).

Aqua (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) (acetylacetonato) copper(II) nitrate hydrate (**CasIIIeA**): (elemental analysis data: calculated (%) for  $\text{CuC}_{19}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (450.94 g/mol): C, 50.61; N, 9.32; H, 4.69. Found (%): C, 50.37; N, 9.40; H 4.46).

Acetonitrile (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) (acetylacetonato) copper(II) hexafluorophosphate (**CasIIIeA-PF<sub>6</sub>**): (elemental analysis calculated (%) for  $\text{CuC}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{N}_3\text{PF}_6$  (556.92 g/mol): C, 45.28; N, 7.54; H, 3.98. Found (%): C, 44.3; N, 7.62; H 4.10). IR (KBr,  $\nu/\text{cm}^{-1}$ ): 3403, 2950, 1622, 1577, 1521, 1425, 1232, 869, 839 ( $\text{PF}_6^-$ ), 725. UV (MeOH,  $\epsilon/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) nm:  $\lambda_{\text{max}}$  611 (116).  $\mu_{\text{eff}} = 1.80$  BM.  $\Lambda$  (MeOH) = 77 mS.

### 2.2. X-ray crystallography

Diffraction data for Casiopéina IIIeA was collected at 293 K on a Siemens P4 diffractometer, using a monochromated Mo-K $\alpha$  radiation ( $\lambda = 0.71073$  Å). The structure was solved by direct methods using SHELXS-97-2, least-squares refinement based on  $F^2$  was carried out

by full-matrix method [21]. All non-hydrogen atoms were refined with anisotropic thermal parameters. The hydrogen atoms for all the reported structures were located in the difference map and included in the refinement with an isotropic fixed thermal parameter using a "riding" model. Neutral atom scattering factors and anomalous dispersion corrections were obtained from the International Tables for Crystallography vol. A [22]. Unit cell parameters along with data collection and refinement details for this complex are listed in Table 1. All molecular structure drawings were generated using the WINGX suite of crystallographic programs for Windows [23].

### 2.3. Cellular viability

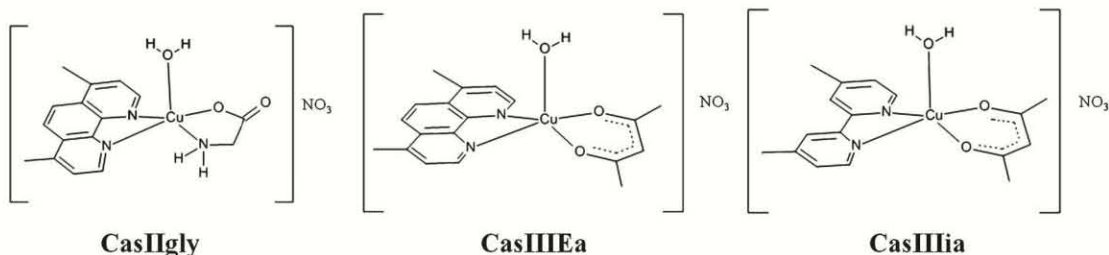
Neuroblastoma CHP-212 cell line (American Tissue Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) was maintained in Dulbecco's modified Eagle medium added with F-12 medium (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO USA). Tumor cells were cultured in the presence of increasing concentrations (0.1, 1, 10, or 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) of cisplatin, **CasIIgly**, **CasIIIia** or **CasIIIeA** by 24 h; untreated cells served as control. The two independent observers determined cellular viability by means of a Neubauer's camera using trypan blue as a vital stain; triplicate experiments were performed. Half-maximal inhibitory concentrations ( $\text{IC}_{50}$ ) were determined and used as work concentrations for each compound. Incubation time with the different treatments was established based on the occurrence of active caspase-3, which appeared at 2 h. Finally, this time was used to develop all determinations of oxidative stress and apoptosis.

### 2.4. Evaluation of $\text{H}_2\text{O}_2$ , $\text{O}_2^-$ , and oxidative stress

The presence of hydrogen peroxide and superoxide radicals was determined by employing fluorescent probes AmplexRed® (Invitrogen) and MitoSox™ [24], respectively. AmplexRed® (Invitrogen) is a non-colored substrate that reacts stoichiometrically with hydrogen peroxide generating resorufin which can be detected by flow cytometry. Treated and untreated cells ( $1.5 \times 10^4$ ) were washed up with Krebs-Ringer phosphate buffer (Merck Millipore) and then, were incubated with the reaction mixture (50  $\mu\text{M}$  AmplexRed® plus 0.1 U/ml Horseradish peroxidase (HRP)) for 30 min in the absence of light. Fluorescence was analyzed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences) by means of the FL2-H channel. FlowJo was used as a tool to perform statistical analysis of the data. Cells UV-irradiated for 3 h were used as a positive control.

When MitoSox™ was used, treated and untreated cells were incubated with 250  $\mu\text{l}$  of MitoSox™ diluted in DMSO (stock solution 5 mM) during 10 min in darkness at 37 °C. The oxidation products were detected in the FL2-H channel flow cytometry of a FACScan (Becton Dickinson Biosciences) using FlowJo in order to develop the statistical analysis of the data. Cells UV-irradiated for 3 h were used as a positive control.

The determination of intracellular GSH levels was done by employing the glutathione kit with monochlorobimane (MCB) (Calbiochem, CA)



**Fig. 1.** Structures of the Casiopéinas. **CasIIgly** [ $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{glycinato})\text{NO}_3$ ], **CasIIIeA** [ $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{acetylacetonato})\text{NO}_3$ ], and **CasIIIia** [ $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})(4,4'\text{-dimethyl-2,2'}\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonato})\text{NO}_3$ ].



**Table 1**  
Crystal data and structure refinement for **CasIIIa**.

Empirical formula	C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> CuF <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> P
Formula weight	556.93
Temperature	298(2) K
Wavelength	0.71073 Å
Crystal system	Triclinic
Space group	P-1
Unit cell dimensions	a = 8.118(2) Å b = 11.558(2) Å c = 14.178(2) Å α = 71.810(10) <sup>o</sup> β = 74.350(10) <sup>o</sup> γ = 70.04(2) <sup>o</sup>
Volume	1167.9(4) Å <sup>3</sup>
Z	2
Density (calculated)	1.584 Mg/m <sup>3</sup>
Absorption coefficient	1.075 mm <sup>-1</sup>
F(000)	566
Crystal size	0.50 × 0.40 × 0.35 mm <sup>3</sup>
Theta range for data collection	1.54 to 26.37 <sup>o</sup>
Reflections collected	6016
Independent reflections	4771 [R(int) = 0.0349]
Completeness to theta = 26.37 <sup>o</sup>	100.0%
Max. and min. transmission	0.7047 and 0.6155
Refinement method	Full-matrix least-squares on F <sup>2</sup>
Data/restraints/parameters	4771/0/312
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.087
Final R indices [I > 2σ(I)]	R <sub>1</sub> = 0.0840, wR <sub>2</sub> = 0.2411
R indices (all data)	R <sub>1</sub> = 0.1204, wR <sub>2</sub> = 0.2818
Largest diff. peak and hole	0.880 and -1.858 e.Å <sup>-3</sup>

that forms a GSH adduct through the action of the glutathione-S-transferase (GST) [25]. The cellular pellet was resuspended in cell lysis buffer and 25 μM of MCB plus 50 U/ml GST. GSH in non-treated cells was considered as a normalizing top value (100%); whereas negative control cells were MCB plus cell lysis buffer. All samples were incubated 30 min at 37 °C and total numbers of cells were counted in a microtiter plate reader at 380/460 nm.

### 2.5. Mitochondrial transmembrane potential assay

Transmembrane mitochondrial potential was measured by the disruption of the Δψ<sub>m</sub>. Cells were incubated with 50 nM of MitoTracker™ Green CmxRos (Molecular Probes) by 20 min at 37 °C. After that, fluorescence was analyzed in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences) by means of the FL2-H channel. Statistical analysis of the data was performed with FlowJo.

### 2.6. Determination of apoptosis

Apoptotic proteins in the cytoplasmic portion were evaluated by means of Western blot (WB) after subcellular fractionation with mitochondria/cytosol fractionation kit (Calbiochem, CA). The cells were mixed with cytosol extraction buffer mix (Calbiochem, CA) plus 1 M dithiothreitol (DTT) and protease inhibitor cocktail (both from BioRad, CA). Samples containing 10 μg/ml of protein and, SDS-PAGE loading buffer with 5% β-mercaptoethanol (BioRad, CA), were boiled during 5 min and loaded on a 10% polyacrylamide gel. Electrophoretic transfer to nitrocellulose membranes (BioRad, CA) was done by means of immunoblotting with caspase-3 (Cat. sc-1224), caspase-8 (Cat. sc-5263), cyt C (Cat. sc-8385), Bcl-2 (Cat. sc-7382), Bax (Cat. sc-7480) and β-tubulin (Cat. sc-9104), followed by hybridization with a secondary antibody conjugated with peroxidase (all of them from Santa Cruz, CA). Signal detection was done by chemi-luminescence using the SuperSignal® West Dura Extended Duration Substrate kit (Thermo Scientific) and quantified with ImageJ® software version 1.41e. According to a preliminary time course for caspase-3 expression, all the following determinations were carried on at 2 h.

Cytoplasmic membrane alterations were identified by Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) as another method to detect the programmed cell death. Cells were incubated with 5 μl of Annexin-V and 10 μl of propidium iodide (PI) (Merck Millipore) stock solution (50 μg/ml), by 10 min in darkness at room temperature. Exposition to staurosporine (50 μg/ml) (ENZO Life Sciences) by 18 h was used as apoptosis control, and fluorescence was detected in a FACScan flow (Becton Dickinson Biosciences) using a FL1-H channel for Annexin-V and FL2-H for PI as well as Tween 20 (15%) (Merck Millipore) employed as necrosis control. Statistical analysis of the data was performed with FlowJo.

### 2.7. Statistical analysis

Data is presented as means ± standard deviation (SD). All determinations correspond to three independent experiments and differences between groups were assessed by one via analysis of variance (ANOVA) where significance was preset at P < 0.05.

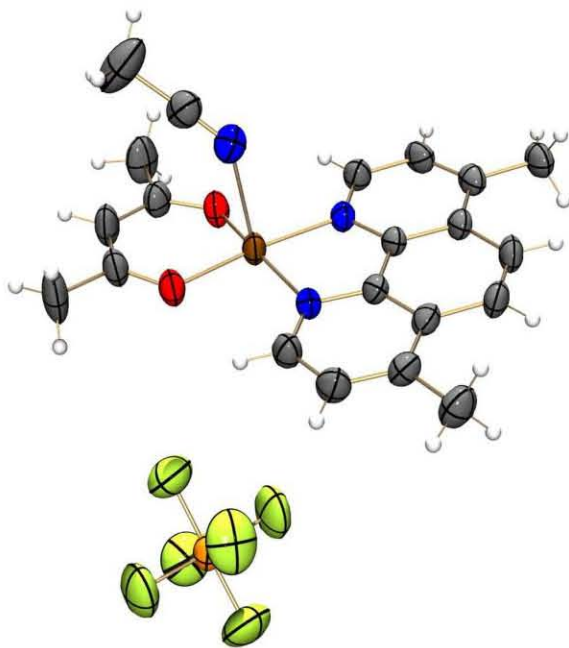
## 3. Results and discussion

### 3.1. X-ray crystallography

**CasIIIa** as a nitrate in all the used solvents yields only fine needles not suitable for X-ray diffraction experiments. In order to obtain suitable single crystals, the nitrate counter-ion was exchanged by hexafluorophosphate and the solvent used was acetonitrile. **CasIIIa-PF<sub>6</sub>** ([Cu(4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline)(acetylacetonato)(MeCN)]PF<sub>6</sub>) was obtained by slow evaporation of acetonitrile. Even though the elemental analyses data for C in this compound is not completely satisfactory, the rest of the characterization such as IR, UV, conductivity, magnetic susceptibility (See Section 2.1 of Materials and methods) and specially the crystal structure definitively support the formula. The compound **Casiopéina IIIa-PF<sub>6</sub>** crystallizes in a triclinic system where the ion Cu(II) is in a slightly distorted square base pyramid geometry. The base of the pyramid is formed by the donor atoms N1 and N2 of 4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline and the oxygen atoms of acetylacetonate O1 and O2. The apical position is occupied by a nitrogen atom of acetonitrile. The ion Cu(II) is displaced out of the plane donor atoms that form N<sub>1</sub>/N<sub>2</sub>/O<sub>1</sub>/O<sub>2</sub> by a distance ρ = 0.032 Å. Geometry adopted by this compound is the same conformation observed in other **Casiopéinas** previously reported [26–30], where the apical position is also occupied by solvent molecules. Average Cu–nitrogen (1.995 Å) and Cu–oxygen (1.907 Å) distances of **CasIIIa** of the base of the pyramid are consistent with distances observed in other copper(II) coordination compounds such as [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> **CasIIgly** (Cu–N = 2.009 Å), [Cu(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub> **CasVIIgly** (Cu–N = 2.001 Å), [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(methioninato)(H<sub>2</sub>O)]O<sub>3</sub> **CasIVmet** (Cu–N = 2.003 Å) and [Cu(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(acetylacetonato)]ClO<sub>4</sub> **CasIIia** (Cu–N = 1.978 Å, Cu–O = 1.890 Å) [26–30]. Fig. 2 shows the structure of the **CasIIIa-PF<sub>6</sub>**. Selected distances and bond angles are listed in Table 2.

### 3.2. Cell growth inhibition

The *in vitro* antiproliferative activity of synthesized compounds was evaluated after 24 h of drug exposure using trypan blue vital stain. All compounds were dissolved in distilled water. The results expressed as IC<sub>50</sub> values (concentration needed to produce a decrease of proliferation culture by 50%) are shown in Table 3 and Fig. 3. For comparison, we have included the antiproliferative data of the standard anticancer drug cisplatin, commonly used in high risk neuroblastoma [31]. In our experience, cisplatin presented an IC<sub>50</sub> value of 68 μg/ml (226.7 μM). In contrast, all the evaluated copper(II) compounds have shown lower IC<sub>50</sub> values; **CasIIIa** showed the lower



**Fig. 2.** Molecular structure of **Casiopeína IIIa** [Cu(acetonitrile) (4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline) (acetylacetonato)]PF<sub>6</sub>. The probability level of thermal ellipsoids is 50%.

IC<sub>50</sub> value of 8 µg/ml (18.6 µM), which represents an increase of 12 times of inhibition potency. The other two copper compounds were not as effective as **Casiopeína IIIa**, however, they still have better antiproliferative capacity than cisplatin with IC<sub>50</sub> of 14 µg/ml (31.7 µM) for **Casiopeína IIIb** and 21 µg/ml (47.5 µM) for **Casiopeína IIIc**. The tendency observed for the antiproliferative activity developed by these compounds against neuroblastoma CHP-212 cell line is in agreement with the results obtained in a QSAR study, where 21 Casiopeínas - 9 derivatives of glycine and 12 of acac - were evaluated against human tumor cell lines HeLa, SiHa, MCF-7 and HCT-15. The results of that work indicate that observed activity differences depend on two main factors, i) the presence of an extended aromatic system in the compound structure, and ii) differences in the secondary ligand present in the coordination sphere of the copper compounds (glycine or acac). Compounds with the best activity were those with phenanthroline instead of bipyridine in their structures. Besides, when the diimine was kept constant, those compounds with acac, have shown a slightly better antiproliferative activity than those with glycine [32].

### 3.3. Glutathione (GSH) depletion

As mentioned before, cytotoxic effect of Casiopeínas against several tumoral cell lines was evaluated; moreover, in some of these lines an intracellular GSH depletion was observed [8,15]. Exploring if the behavior observed in other cell lines is preserved in neuroblastoma

**Table 3**

Half inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of cisplatin, **Casiopeína IIIa**, **Casiopeína IIIb** and **Casiopeína IIIc** against neuroblastoma cells CHP-212.

Compound	IC <sub>50</sub> ± SD (µg/ml)	IC <sub>50</sub> ± SD (µM)
Cisplatin	68 ± 1.03	226.7 ± 1.03
<b>Casiopeína IIIa</b>	14 ± 2.34	31.5 ± 2.34
<b>Casiopeína IIIb</b>	21 ± 1.70	47.5 ± 1.70
<b>Casiopeína IIIc</b>	8 ± 2.09	18.6 ± 2.09

cell line CHP-212, intracellular GSH concentration was determined by glutathione-selective fluorescent dye MCB. GSH on untreated cells was considered as 100%. Cells treated with cisplatin diminished the intracellular GSH by 70%, meanwhile, **Casiopeína IIIa** decreased GSH by 35% and **Casiopeína IIIb** and **Casiopeína IIIc** showed GSH depletion of 29 and 21% respectively, as illustrated in Table 4 and Fig. 4.

It has been suggested that cisplatin inactivation is due to adduct formation with GSH [33,34]. Adduct formation is catalyzed by glutathione S-transferase, that is known to be over-expressed in human cancer cell lines that show enhanced aggressiveness [35–37]. The GSH conjugates of anticancer drugs can be exported from cells by GS-X pump or multidrug resistance-associated protein (MRP) [38]. This hypothesis is strongly supported by the isolated Pt-GSH products [39,40]. All of the above bring as a consequence a substantial decrease of intracellular GSH. Therefore, the intracellular GSH decrease observed in human cell line CHP-212 (70% reduction) as well as the higher concentrations used to decrease cellular proliferation by 50% (IC<sub>50</sub> = 226 µM), are consistent with the description that GSH acts like an important mechanism of cellular detoxification of cisplatin and helps in the explanation of the ineffectiveness observed against this tumor cell line.

The smallest decrease observed when neuroblastoma cells were treated with Casiopeínas could be associated with the higher capacity of copper compounds to participate in redox reactions with thiols such as GSH and cysteine [41] compared with the cisplatin capacity to be involved in this kind of reactions. Even though, a small fraction of Casiopeínas could interact with GSH in a covalent manner yielding products that the glutathione reductase (GR) cannot recognize to produce the regeneration of GSH, hypothesis, which already have been suggested by our group [8].

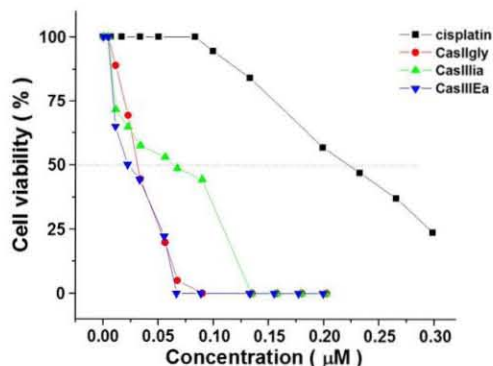
It is important then to note that the action mechanisms of cisplatin and Casiopeínas are completely different. The main action pathway for the former is the covalent interaction of Pt with nucleobases, meanwhile, the Casiopeínas could interact with GSH through redox reaction and catalyze the production of ROS such as superoxide radical, hydroxyl radical, and hydrogen peroxide through generation of Fenton like metal Cu(I) as well as the production of GSSG as illustrated in Eqs. (1) to (7). The generated Cu(I) species react either with molecular oxygen or hydrogen peroxide to produce the above mentioned ROS (Eqs. (2) and (5)). Produced GSSG could be regenerated to GSH by the action of GR and thioredoxins (Trx's) and be incorporated in the catalytic cycle that produces Cu(I) and GSSG (Scheme 1).

### 3.4. Pro-oxidant environment is an effect of Casiopeínas

Cells treated with cisplatin have shown an increase of reactive oxygen species of 22.3% for hydrogen peroxide and 35% for superoxide compared with untreated cells. Recent studies suggest that cisplatin

**Table 2**  
Selected bond lengths (Å) and angles (°) for **Casiopeína IIIa**.

Cu(1)–N(1)	1.992(5)	N(1)–Cu(1)–N(2)	81.59(19)	N(2)–Cu(1)–O(1)	173.89(17)
Cu(1)–N(2)	1.999(4)	N(1)–Cu(1)–N(3)	96.8(20)	N(2)–Cu(1)–O(2)	91.37(18)
Cu(1)–N(3)	2.441(6)	N(1)–Cu(1)–O(1)	92.43(18)	O(1)–Cu(1)–O(2)	94.27(18)
Cu(1)–O(1)	1.912(4)	N(1)–Cu(1)–O(2)	167.58(19)	O(1)–Cu(1)–N(3)	86.6(20)
Cu(1)–O(2)	1.903(4)	N(2)–Cu(1)–N(3)	95.3(20)	O(2)–Cu(1)–N(3)	94.0(20)



**Fig. 3.** Differential effect over survival indexes in neuroblastoma cells after 24 h of treatment. CHP-212 cells were treated with compounds at the following concentrations: 0.1, 1, 10 and 100 µg/ml. All value corresponds to each IC<sub>50</sub> for every treatment with their standard deviation, and each point represents the average of three independent experiments ± SD.

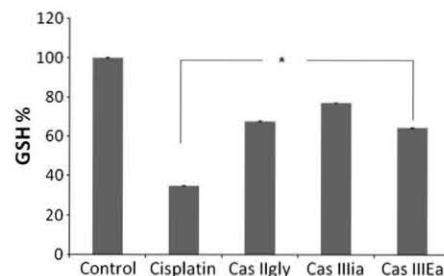
treatment induces an increase of ROS through the participation of NOX family of enzymes [42–44]. ROS overproduction also could be associated with intracellular GSH depletion discussed before.

Casiopeínas also showed an increment in reactive oxygen species such as superoxide and hydrogen peroxide in relation to control cells in ranges of 30 to 37% of increment for the former and 15 to 27% for the latter. Casiopeínas redox potentials versus normal hydrogen electrode (NHE) (**CasIIgly** = 0.147 V, **CasIIIaEa** = 0.139 V and **CasIIIa** = 0.119 V) are in an adequate range to react with GSH – which intracellular half cell potential for the couple GSSG/2GSH varies from  $E \approx -0.240$  V to  $-0.170$  V [45] – to generate Cu(I) and oxidized glutathione. Once Cu(I) was generated it can react with oxygen to produce hydrogen peroxide ( $E_{O_2/H_2O_2} = 0.281$  V) and the hydrogen peroxide generated also react with Cu(I) to produce hydroxyl radicals ( $E_{H_2O_2/HO\cdot} = 0.380$  V) [46]. All these reactions can regenerate Cu(II) which still can react with GSH creating a catalytic cycle. Described reactions are completely agreed with the ROS generation followed by flow cytometry showed in Fig. 5.

The increment of superoxide radical and the hydrogen peroxide compared with control cells supports the hypothesis of the presence of catalytic cycle with the copper(II) complexes as principal players. Reactions (1), (2) and (5) help to explain the observed 30 to 40% increment of superoxide radical, which is the principal product in both processes. It is important to keep in mind that superoxide in aqueous media is always in equilibrium with its conjugate acid, the perhydroxyl radical, which in turn can either suffer a spontaneous disproportionation or reacts with water and superoxide radicals to produce, in both cases, hydrogen peroxide as final product (Reactions (3) and (4)) [47]. Even though the fluorescent probe used to identify intracellular superoxide is not specific and could overestimate the radical production [48], it is important to consider that this specie is only an intermediate to obtain the hydrogen peroxide that finally reacts with Cu(I) to produce hydroxyl radical. This is in complete agreement with the hydrogen peroxide levels found for all the copper compounds and the explanation of the low levels found that can be done with Reactions (5)–(7), where H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is one of the

**Table 4**  
Intracellular GSH level (%) after 2 h of drug exposure.

Control	100 ± 0.18
Cisplatin	34.73 ± 0.21
CasIIgly	67.52 ± 0.27
CasIIIa	77.17 ± 0.13
CasIIIaEa	64.30 ± 0.12



**Fig. 4.** Pro-oxidant environment is an effect of Casiopeínas. Neuroblastoma cells were previously treated by 2 h with every IC<sub>50</sub> [cisplatin (68 µg/ml), **CasIIgly** (14 µg/ml), **CasIIIa** (21 µg/ml), and **CasIIIaEa** (8 µg/ml)]. Data of glutathione produced represent means ± SD from three independent experiments. Differences between groups were assessed by ANOVA analysis with significance at  $P < 0.05$  versus control group.

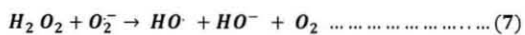
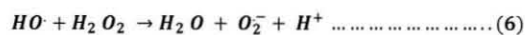
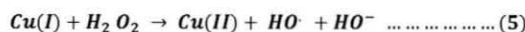
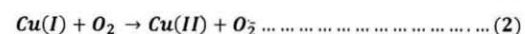
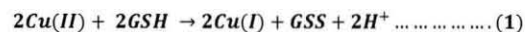
reactants to produce hydroxyl radical, the most aggressive ROS associated with several damages that produces the trigger of apoptosis pathways.

The found quantities of superoxide radical and hydrogen peroxide, related with the time at which the determinations were done could provide several clues about the real damage that could be produced in these cells. According to the above discussion, a very important damage has to be done in the cells due to the observed consumption of hydrogen peroxide and the damage is expected to be greater through the passage of time.

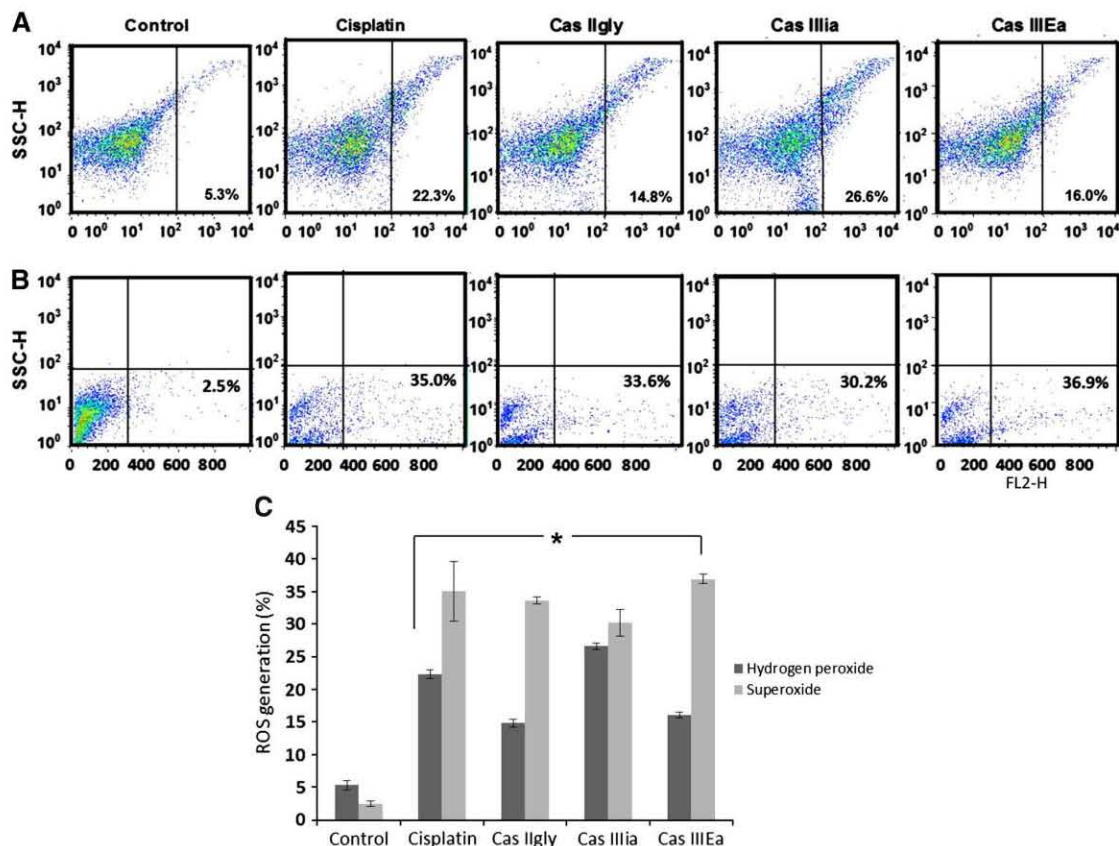
### 3.5. Mitochondrial disruption by Casiopeínas

The substantial increment of ROS on treated cells can be associated to mitochondrial damage. To probe this, mitochondrial activity was monitored by employing MitoTracker™ kit assay. In this assay, functional mitochondria are stained with fluorescent dye meanwhile those that present damage or are dysfunctional remain unstained. A significant degree of mitochondrial activity was detected in the control cells as expected. On the other hand, all treatments produce an increase in mitochondrial damage which may result in a disturbance in  $\Delta\psi_m$  (Fig. 6). The mitochondrial membrane potential has been shown to be significantly higher in carcinoma cells than in normal epithelial cells [49], and increased membrane potential facilitates the incorporation of positively charged compounds, as the lipophilic cations recently used in cancer chemotherapy [50].

Membrane potential increase not only facilitates the interaction with lipophilic cations but also with other positively charged molecules such as Casiopeínas. This could be one of the reasons for the damage induced by these copper compounds. It is necessary to remark that **Cas IIIaEa** with the lowest IC<sub>50</sub> value is the compound that produces the



**Scheme 1.** Reactions involved in the ROS production through Fenton mechanism.



**Fig. 5.** Reactive oxygen species are generated by Casiopeínas treatment. The quantity of neuroblastoma cells expressing hydrogen peroxide (A) or superoxide (B), was detected with AmplexRed® or MitoSox™ respectively by flow cytometry in the FL2-H channel; whereas SSC-H corresponds to side scatter channel. All cells were previously treated by 2 h with their corresponding IC<sub>50</sub>. Positive control corresponds to 3 h UV-irradiated cells. (C) Bar graph represents means  $\pm$  SD from three independent experiments, and differences between groups were assessed by ANOVA analysis with significance at  $P < 0.05$  versus control group.

highest levels of superoxide and the highest consumption of hydrogen peroxide, besides the compound that promotes the highest depletion of intracellular GSH, is also the one which presents the highest mitochondrial damage.

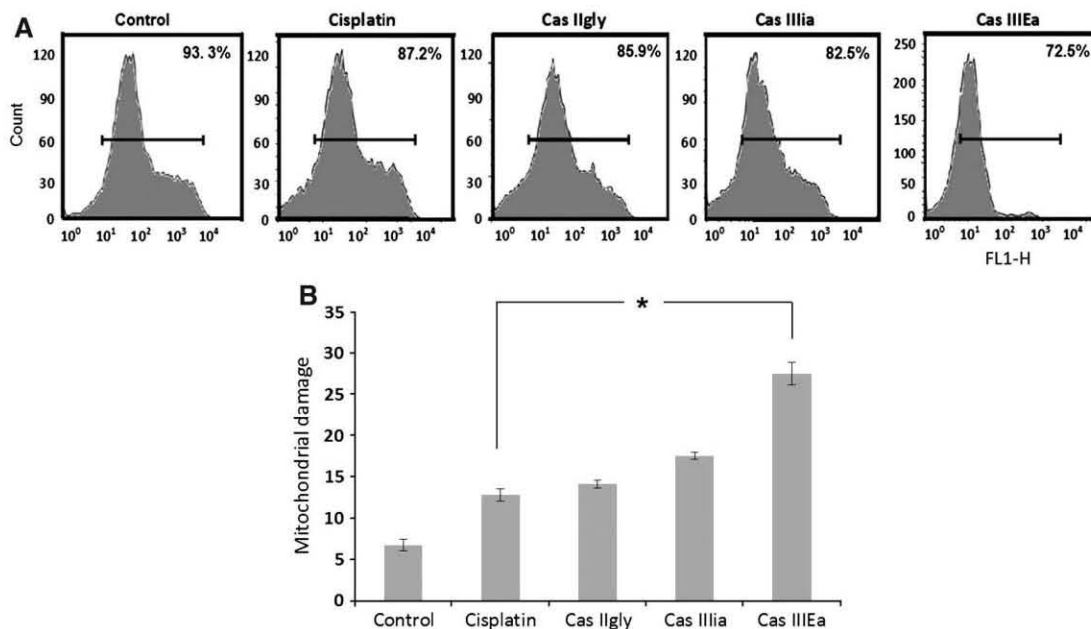
All of these results strongly support the hypothesis of the importance of ROS generation as one of the main components for the cytotoxicity of Casiopeínas previously suggested by quantitative structure-activity relationships (QSAR) studies. Also, the differences observed in the growth inhibition capacity by the three evaluated copper(II) compounds are in agreement with QSAR results, showing that the structure provides a certain degree of selectivity [32].

### 3.6. Casiopeínas favor the intrinsic apoptotic pathway

With all these results in mind, we explore the way by which Casiopeínas produce the cellular death. For this, it was decided to determine if apoptotic process is present by employing Annexin V/PI test. In Fig. 7, the lower-right panel corresponds to apoptotic cells (Annexin V), the upper-left panel to necrotic cells (PI) and the upper-right panel to cells that underwent secondary death processes — i.e. cell death starts as apoptotic but major lesions trigger a necrotic process (double staining Annexin V + PI). We can observe that all treatments show a high degree of apoptosis (higher than 50%), being the treatment with **CasIII**Ea the highest of all with 60%. In all cases, the percentage of necrotic cells ranged between 1.4 and

2.2%; whereas secondary death processes were present in about 18–20% for all treatments. These facts, altogether, may indicate that the mechanism by which Casiopeínas inhibit cell proliferation in NB is mainly apoptotic.

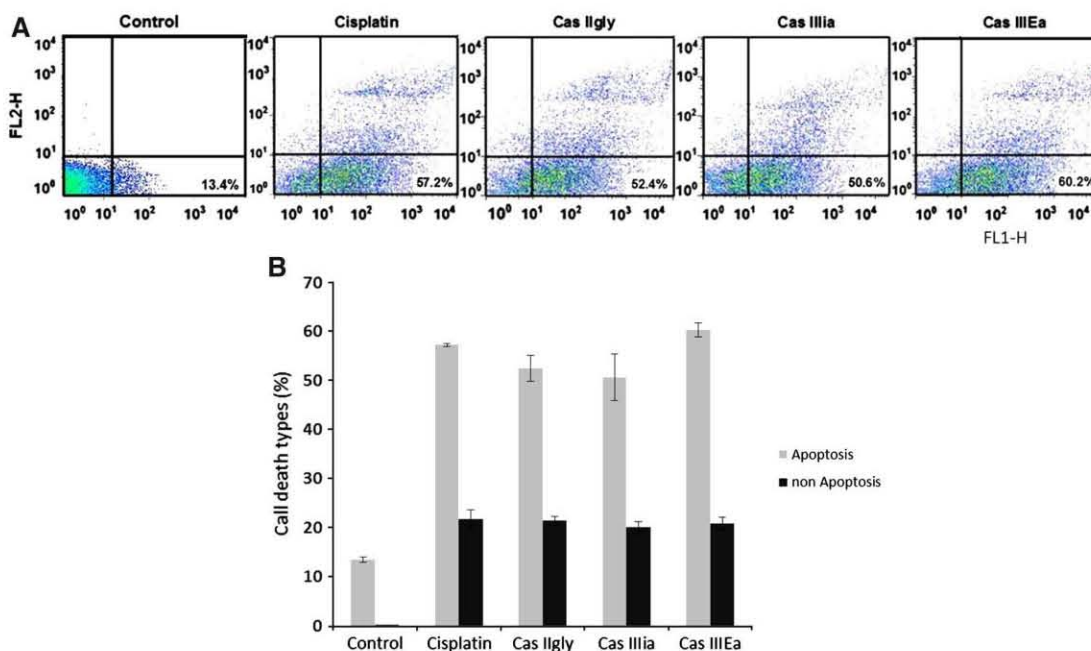
In order to know the preferential apoptotic pathway induced by Casiopeínas treatment, a time course of cleaved caspase-3 was developed including measurements at 30 min, and 1, 2, 4 and 6 h post-treatment. As this protein was found only after 2 h post-treatment, this time was chosen to make the determination of all the apoptotic markers. Given the controversy in the literature as to whether caspase-8 was expressed or not in CHP-212 neuroblastoma cell line [3,4], an important finding is that cleaved caspase-8 was absent (see Fig. 8). Increased amounts of cyt C as well as the identification of expressed cleaved caspase-3 indicate that intrinsic apoptotic pathway is activated (Fig. 8). It is interesting to note the presence of apoptotic protein Bax in addition to anti-apoptotic molecule Bcl-2. Cell survival in the early phase of the apoptotic cascade depends mostly on the balance between the pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family. Therefore, the ratio of Bax/Bcl-2 may be a better marker for the cellular process that is developed in the cells than the absolute concentration of either of the proteins alone [51,52]. Ratio of Bax/Bcl-2 indicates that apoptotic process is predominant due to the incorporation of Bax inside mitochondria recorded as the intensity decrease of WB spot of this protein and the constant expression of Bcl-2 with around 20% in each sample compared with the control (see Fig. 9).



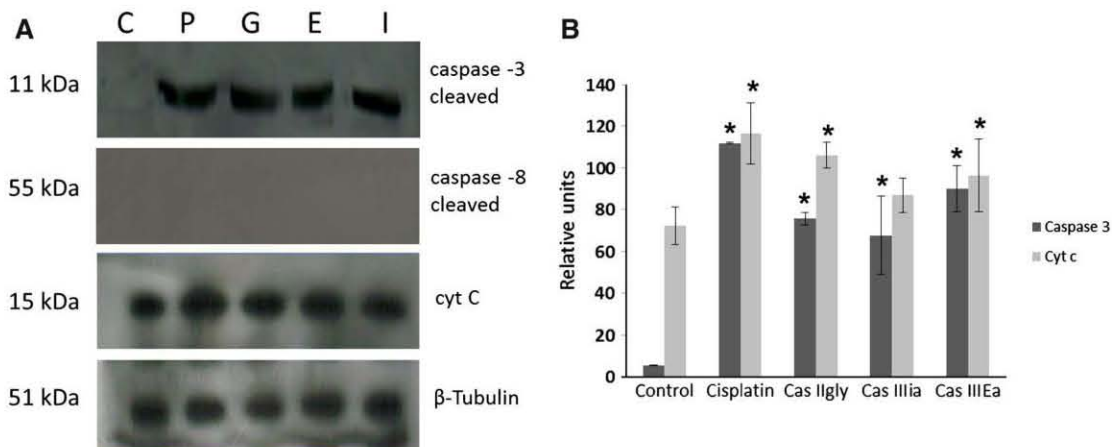
**Fig. 6.** Disruption of  $\Delta\psi_m$  by Casiopeínas. (A) CHP-212 cells were treated by 2 h with their corresponding  $IC_{50}$  by means of flow cytometer (FL1-H channel). (B) In all cases the bars represent the fluorescence emission of the dye; y-axis corresponds to the quantity of cells and data are representative of three independent experiments (means  $\pm$  SD). Positive control corresponds to 3 h UV-irradiated cells. Differences between groups were assessed by ANOVA analysis with significance at  $P < 0.05$  versus control group.

Although the intrinsic apoptotic process is completely established according to the previously discussed results, the presence of Bcl-2 may suggest a process where some cells were able to handle the damage

caused by the different treatments and begin a process of recovery such as autophagy, thus, this hypothesis has to be explored in depth in later works.



**Fig. 7.** Casiopeínas produce an apoptotic phenomenon. (A) Cell death was measured by flow cytometry for Annexin V (FL1-H channel) and PI (FL2-H channel). Neuroblastoma cells were treated by 2 h with each corresponding  $IC_{50}$ . (B) Bars represent Apoptosis and all the other non-programmed cell death. Positive control corresponds to 3 h UV-irradiated cells. Determinations are representative of three independent experiments for each experimental condition as means  $\pm$  SD. Differences between groups were assessed by ANOVA analysis with significance at  $P < 0.05$  versus control group.



**Fig. 8.** Apoptosis is preferentially mitochondrial in CHP-212 cells treated with Casiopeínas. Cells were treated with their corresponding  $IC_{50}$ : P: cisplatin (68  $\mu\text{g/ml}$ ), G: **CasIIgly** (14  $\mu\text{g/ml}$ ), I: **CasIIIia** (21  $\mu\text{g/ml}$ ) and E: **CasIII Ea** (8  $\mu\text{g/ml}$ ), and C: control cells without treatment. (A) Western blot was developed in the cytosolic portion after 2 h of treatment for detection of active caspase-3, caspase-8 cleaved, cyt C and  $\beta$ -tubulin as loading control. Protein expression was normalized with each control. (B) Each bar represents the mean  $\pm$  SD ( $P < 0.05$ ) from three independent experiments and is expressed as Relative units measured by % of optical densitometry (% OD). Differences between groups were assessed by ANOVA analysis versus control group.

#### 4. Conclusions

Our previous results indicate that Casiopeínas are capable to produce cell death via apoptosis pathways in several human tumor cell lines such as HeLa, A549, H157, Daoy and HCT-15 as well as in murine glioma C6, where cytotoxicity was associated principally to ROS overproduction. Due to the promising results obtained in the mentioned cell lines, we tried to explore the behavior of Casiopeínas in neuroblastoma, which is the most common extra-cranial childhood tumor and that, unfortunately, does not have an efficient therapy. The growth inhibition capacity of copper(II) coordination compounds **CasIIgly**, **CasIIIia** and **CasIII Ea** against human neuroblastoma cell line CHP-212 was demonstrated in this work. All of them have shown an increase of growth inhibition potency from 5 to 12 times with respect to the commonly used drug cisplatin. Cytotoxicity of these copper(II) coordination compounds has the following sequence: **CasIII Ea** > **CasIIgly** > **CasIIIia**. As was predicted by QSAR studies, those compounds with phenanthroline are more potent to inhibit cell proliferation than bipyridine derivatives; likewise, acetylacetonate compounds have shown lower  $IC_{50}$  values than those with glycine.

All copper compounds have shown an intracellular GSH depletion, increase of hydrogen peroxide and superoxide radical and the rising

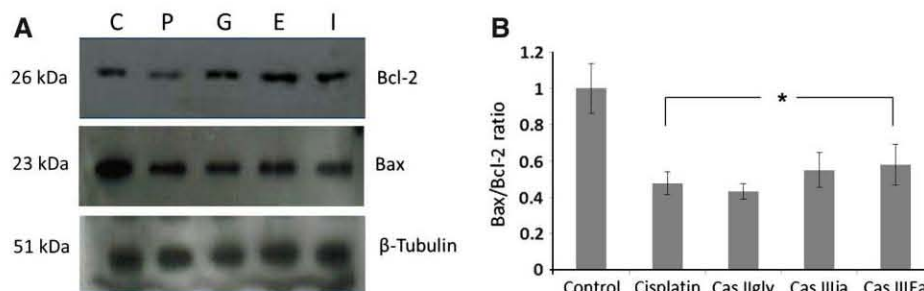
amounts of apoptotic markers Bax and cyt C when administrated to neuroblastoma cells CHP-212. These results suggest that Casiopeínas have an anti-carcinogenic activity on these cells with a strong pro-oxidant environment followed by the mitochondrial apoptosis. Remarkable cytotoxic activities in addition to the induction of intrinsic apoptotic pathway in very short exposition times, promote to consider the Casiopeínas as a good candidates to further studies in tumor systems difficult to treat.

#### Acknowledgments

This work was supported with grants from PAPIIT-UNAM 204511 and 218013, ICYT-DF contracts PICSA10-61, PIN VII-32, PIUTE10-92 and CONACYT 179119. AGG, and JCGR thank CONACYT for their scholarship grants. Authors acknowledge Dr. Ma. Elena Bravo-Gómez for the synthesis of Casiopeínas® and Biol. Gonzalo Acero for technical support.

#### Appendix A. Supplementary data

CCDC 914592 contains the supplementary crystallographic data for **CasIII-Ea**. These data can be obtained free of charge via <http://>



**Fig. 9.** Casiopeínas increase the Bax/Bcl-2 ratio through Bax pathway. CHP-212 cells were treated by 2 h with their corresponding  $IC_{50}$ : P: cisplatin (68  $\mu\text{g/ml}$ ), G: **CasIIgly** (14  $\mu\text{g/ml}$ ), I: **CasIIIia** (21  $\mu\text{g/ml}$ ) and E: **CasIII Ea** (8  $\mu\text{g/ml}$ ), and C: control cells without treatment. (A) Determination of Bcl-2, Bax and  $\beta$ -tubulin loading control, was done in the cytoplasmic fraction by Western blot. (B) Each bar corresponds to mean  $\pm$  SD ( $P < 0.05$ ) from three independent experiments for each experimental condition, expressed as relative units measured by % of optical densitometry (% OD). Differences between groups were assessed by ANOVA analysis versus control group.

www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html, or from the Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK; fax: (+44) 1223 336 033; or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.05.001>.

## References

- [1] J.M. Maris, N. Engl. J. Med. 10 (2010) 2202–2211.
- [2] A. Faisal, L. Vaughan, V. Bavetsias, C. Sun, B. Attrash, S. Avery, Y. Jamin, S.P. Robinson, P. Workman, J. Blagg, F.L. Raynaud, S.A. Eccles, L. Chesler, S. Linardopoulos, Mol. Cancer Ther. 10 (2011) 2115–2123.
- [3] S. Hopkins-Donaldson, J.L. Bodmer, K.B. Bourlond, C.B. Brognara, J. Tschopp, N. Gross, Med. Pediatr. Oncol. 35 (2000) 608–611.
- [4] A. De Geer, R. Kiessling, V. Levisky, J. Leviskaya, J. Immunol. 177 (2006) 7540–7550.
- [5] M.P. Chao, R. Majeti, I.L. Weissman, Nat. Rev. Cancer 12 (2011) 58–67.
- [6] J. Poljaková, T. Eckshlager, J. Hřebáková, J. Hrabeta, M. Stiborova, Interdiscip. Toxicol. 1 (2008) 186–189.
- [7] A.L. Simons, M.A. Fath, D.M. Mattson, B.J. Smith, S.A. Walsh, M.M. Graham, R.D. Hochwald, J.M. Buatti, K. Dornfeld, D.R. Spitz, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 15 (2007) 1222–1230.
- [8] R. Kachadourian, H.M. Brechbuhl, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, B.J. Day, Toxicol. 268 (2010) 176–183.
- [9] R.G. Allen, A.K. Balin, Exp. Cell Res. 289 (2003) 307–316.
- [10] B.M. Paterson, P.S. Donnelly, Chem. Soc. Rev. 40 (2011) 3005–3018.
- [11] L. Ruiz-Azuara, M.E. Bravo-Gómez, Curr. Med. Chem. 17 (2010) 3606–3615.
- [12] R. Alemón-Medina, J.L. Muñoz-Sánchez, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, Toxicol. in Vitro 22 (2008) 710–715.
- [13] A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Müller, L. Ruiz-Ramírez, J.A. Howarth, M. Dobrota, Toxicol. 194 (2003) 103–113.
- [14] F. Carvallo-Chaigneau, 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, BioMetals 21 (2008) 17–28.
- [15] C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, Pathol. Oncol. Res. 14 (2008) 467–472.
- [16] C. Trejo-Solis, G. Palencia, S. Zúñiga, A. Rodríguez-Ropony, L. Osorio-Rico, L. Sanchez, 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, Neoplasia 7 (2005) 563–574.
- [17] R. Alemón-Medina, M.E. Bravo-Gómez, M.I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, Toxicol. in Vitro 25 (2011) 868–873.
- [18] L. Becco, A. Rodríguez, M.E. Bravo, M.J. Prieto, L. Ruiz-Azuara, B. Garat, V. Moreno, D. Gambino, J. Inorg. Biochem. 109 (2012) 49–56.
- [19] R. Galindo-Murillo, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Cortés-Guzmán, Phys. Chem. Chem. Phys. 14 (2012) 15539–15546.
- [20] L. Ruiz-Azuara, Patente, Enero 26, (1994) no. 172967; SECOFI 18802. P. I. (1990), Patente Dic.9 (1993) no. 172248; US Patent Ap 21 (1992) Number 5, 107, 005 Re35, 458, Feb. 18 (1997); U. S. Patent Pat. No. 5,576,326. Nov. 19 (1996) [®Trade Mark: Casiopeína, Reg. 407543 SECOFI (1992), renewal (2002), (2012)]. SHELX-97-2 [Includes SHELXS97, SHELXL97, CIFTAB (and SHELXA)], Programs for Crystal Structure Analysis (Release 97-2), in: G.M. Sheldrick (Ed.), Institut für Anorganische Chemie der Universität, Tammanstrasse 4, D-3400 Göttingen, Germany, 1998.
- [22] In: T. Hahn (Ed.), International Tables for Crystallography, vol. A. Kluwer-Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995.
- [23] L.J. Farrugia, J. Appl. Crystallogr. 32 (1999) 837.
- [24] P. Mukhopadhyay, P.M. Rajesh, K. Yoshihiro, G. Haskó, P. Pacher, Biochem. Biophys. Res. Commun. 358 (2007) 203–208.
- [25] H. Kamencic, A. Lyon, P.G. Paterson, B.H.J. Juurlink, Anal. Biochem. 286 (2000) 35–37.
- [26] X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, Acta Crystallogr. C 48 (1992) 1785–1788.
- [27] A. Alvarez-Larena, J.L. Brioso-Penalva, J.F. Pinella, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Ferrer-Sueta, Acta Crystallogr. C 51 (1995) 852–854.
- [28] R. Moreno-Esparza, E. Molins, J.L. Brioso-Penalva, L. Ruiz-Ramírez, R. Redon, G. Ferrer-Sueta, Acta Crystallogr. C 51 (1995) 1505–1508.
- [29] A. Tovar-Tovar, L. Ruiz-Ramírez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M.J. Rosales-Hoz, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 1045–1053.
- [30] A. Tovar-Tovar, J.C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, L. Ruiz-Azuara, Acta Crystallogr. E 67 (2011) m1796–m1797.
- [31] K.K. Matihay, J.G. Villablanca, R.C. Seeger, D.O. Stram, R.E. Harris, N.K. Ramsay, P. Swift, H. Shimada, C.T. Black, G.M. Brodeur, R.B. Gerbing, C.P. Reynolds, N. Engl. J. Med. 341 (1999) 1165–1173.
- [32] M.E. Bravo-Gómez, J.C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, J. Inorg. Biochem. 103 (2009) 299–309.
- [33] A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992) 3070–3074.
- [34] K. Zhang, M. Chew, E.B. Yang, K.P. Wong, P. Mack, Mol. Pharmacol. 59 (2001) 837–843.
- [35] T.R. Wilson, D.B. Longley, P.G. Johnston, Ann. Oncol. 17 (2006) x315–x324.
- [36] S. Piaggi, Ch. Raggi, A. Corti, E. Pitzalis, M.C. Mascherpa, M. Saviozzi, A. Pompella, A.F. Casini, Carcinogenesis 31 (2010) 804–811.
- [37] G.C. Adam, J. Burbaum, J.W. Kozarich, M.P. Patricelli, B.F. Cravatt, J. Am. Chem. Soc. 126 (2004) 1363–1368.
- [38] T. Ishikawa, C.D. Wrigth, H. Ishizuka, J. Biol. Chem. 269 (1994) 29085–29093.
- [39] A. Bemareggi, L. Torti, R.M. Facino, M. Carini, G. Depta, B. Casetta, N. Farrell, S. Spadacini, R. Ceserani, S. Tognella, J. Chromatogr. B Biomed. Appl. 669 (1995) 247–263.
- [40] T. Ishikawa, F. Ali-Osman, J. Biol. Chem. 268 (1993) 20116–20125.
- [41] C. Carrasco-Pozo, M.E. Aliaga, C. Olea-Azar, H. Speisky, Bioorg. Med. Chem. 16 (2008) 9795–9803.
- [42] C. Casares, R. Ramirez-Camacho, A. Trinidad, A. Roldán, E. Jorge, J.R. García-Bercoval, Eur. Arch. Otorhinolaryngol. 269 (2012) 2455–2459.
- [43] T. Itoh, R. Terazawa, K. Kojima, K. Nakane, T. Deguchi, M. Ando, Y. Tsukamasa, M. Ito, Y. Nozawa, Free Radic. Res. 45 (2011) 1033–1039.
- [44] K. Bedard, K.H. Krause, Physiol. Rev. 87 (2007) 245–313.
- [45] F.Q. Schafer, G.R. Buetner, Free Radic. Biol. Med. 30 (2001) 1191–1212.
- [46] P.M. Wood, Biochem. J. 253 (1988) 287–289.
- [47] B.H.J. Bielski, D.E. Cabelli, R.L. Arudi, A.B. Ross, J. Phys. Chem. 14 (1985) 1041–1100.
- [48] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J.A. Davies, P.A. Dennerly, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts II, H. Ischiropoulos, Free Radic. Biol. Med. 52 (2012) 1–6.
- [49] J.S. Modica-Napolitano, K.K. Singh, Mitochondrion 4 (2004) 755–762.
- [50] L. Biasutto, L.F. Dong, M. Zoratti, J. Neuzil, Mitochondrion 10 (2010) 670–681.
- [51] S. Cory, J.M. Adams, Nat. Rev. Cancer 2 (2002) 647–665.
- [52] K. Tanaka, M. Asanuma, N. Ogawa, Neurochem. Res. 29 (2004) 1529–1536.

## Analysis of the DNA Interaction of Copper Compounds Belonging to the Casiopeínas® Antitumoral Series

Lorena Becco · Juan Carlos García-Ramos ·  
Lena Ruiz Azuara · Dinorah Gambino · Beatriz Garat

Received: 11 June 2014 / Accepted: 31 July 2014 / Published online: 14 August 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

**Abstract** Casiopeínas® are mixed-chelate copper complexes with antitumor tested potential. Their activity, both in vitro and in vivo, as antiproliferative, cytotoxic, and genotoxic drugs has been assessed. Biological results of these copper compounds have deserved some of them entering clinical trials. Significant efforts have been devoted to the in-depth identification of their mechanism of action. Using gel electrophoresis analysis, we have previously shown that the interaction of the Casiopeínas® Cas II-gly, [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinate)]NO<sub>3</sub> with DNA, triggers the cleavage of the biomolecule by a free radical mechanism. In this work, we further study the behavior of different complexes of the same Casiopeínas® series also including glycinate as co-ligand {Cas VI-gly (5,6 dimethyl-1,10-phenanthroline glycinato copper(II) nitrate), Cas VII-gly (1,10-phenanthroline glycinato copper(II) nitrate), and Cas IX-gly (2,2'-bipyridine glycinato copper(II) nitrate)} and of a Casiopeínas® with a different co-ligand (Cas III-Cs; 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline salicylaldehydato-copper(II) nitrate). While all of them produce DNA degradation, the performance in the presence of a radical scavenger suggests the

existence of differences in their mechanism of interaction with DNA.

**Keywords** Copper compounds · Casiopeínas® · DNA interaction · Gel electrophoresis

### Introduction

Although inorganic compounds have been used in medicine since ancient time in an empirical way, the serendipitous discovery of the antitumor compound cisplatin led to the growing development of rational medicinal inorganic chemistry. Current work in this discipline attempts to design new metal-based drugs and to understand the molecular basis of their mechanism of action [1–3].

Metal ions offer wide possibilities for the design of novel antitumor agents [2, 3]. Therefore, compounds of different metals, from early transition metals to elements of the main groups, have been tested to determine their antitumor potential. In particular, different families of copper complexes have been studied based on the proposal that compounds of endogenous metals may be less toxic to normal cells than those of nonessential ones [4–7]. Among the essential metals, copper is found in all living organisms and is a crucial trace element in redox chemistry, growth and development. It is important for the function of several enzymes and proteins involved in energy metabolism, respiration, and DNA synthesis [7].

Casiopeínas® are among the most representative copper complexes with antitumor properties and a clear example of rational design. These are mixed-chelate copper (II) compounds of the general formula [Cu(N-N)(O-O)]NO<sub>3</sub> or [Cu(N-N)(O-N)]NO<sub>3</sub>, where N-N is a substituted aromatic diimine (1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine), O-N is an  $\alpha$ -aminoacidate or peptide, and O-O is acetylacetonate or salicylaldehydato [7, 8]. These compounds have been designed by including a nitrogen-

L. Becco · B. Garat (✉)  
Laboratorio de Interacciones Moleculares, Facultad de Ciencias,  
Universidad de la República, Iguá 4225, 11400 Montevideo,  
Uruguay  
e-mail: bgarat@fcien.edu.uy

J. C. García-Ramos · L. R. Azuara  
Facultad de Química, Departamento de Química Inorgánica y  
Nuclear, Universidad Nacional Autónoma de México, México,  
DF 04510, México

D. Gambino (✉)  
Cátedra de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad  
de la República, Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay  
e-mail: dgambino@fq.edu.uy



donor bidentate ligand with high affinity for copper showing an extended aromatic ring system that allows these ligands to bind to DNA by intercalative and nonintercalative interactions either as free ligands or in metal complexes [9–12].

These copper complexes have been patented and registered [13–15] and have been tested in several models *in vitro* and *in vivo*, showing promising antiproliferative, cytotoxic, genotoxic, and antitumor activities [16–21]. Preclinical studies have shown that, both, the substitution on the diimine ligand and the changes on the co-ligand modify the magnitude of the biological activity as well as the antiproliferative activity on human tumor cell lines tested *in vitro* and the genotoxic activity [16–18, 22–24].

Although the mode of action of Casiopeínas® remains non-completely elucidated, there is evidence suggesting that they inhibit cell proliferation and produce dose-dependent cell death by apoptosis [7, 25]. Apoptosis takes place through mechanisms mediated by generation of ROS, mitochondrial toxicity, or direct interaction with DNA, working separately or cooperatively [7, 21, 25].

Trying to get a deeper insight into the cellular targets of Casiopeínas®, in a previous work, the interaction with DNA of three representative copper complexes of this series was studied through a gel electrophoresis approach, atomic force microscopy, and circular dichroism [8]. Using gel electrophoresis analysis, we have shown that the interaction of the copper complex Cas II-gly, [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)]NO<sub>3</sub> triggers DNA cleavage by a free radical mechanism.

In this work, we further study the interaction with DNA of different complexes from the same Casiopeínas® series bearing also glycinate as co-ligand {Cas VI-gly (5,6 dimethyl-1,10-phenanthroline glycinate copper(II) nitrate), Cas VII-gly (1,10-phenanthroline glycinate copper(II) nitrate), and Cas IX-gly (2,2'-bipyridine glycinate copper(II) nitrate)} and of a Casiopeínas® with a different co-ligand (Cas III-Cs; 4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline salicylaldehydato-copper(II) nitrate) (Fig. 1).

## Materials and Methods

### Materials

All common laboratory chemicals were from commercial sources and were used without further purification. The mixed-ligand copper complexes Cas VI-gly, Cas VII-gly, Cas IX-gly, and Cas III-Cs were synthesized and characterized according to previously patented procedures [13–15].

### DNA Interaction Studies

The interaction study of the four selected Casiopeínas® was performed following an electrophoresis approach. Plasmid

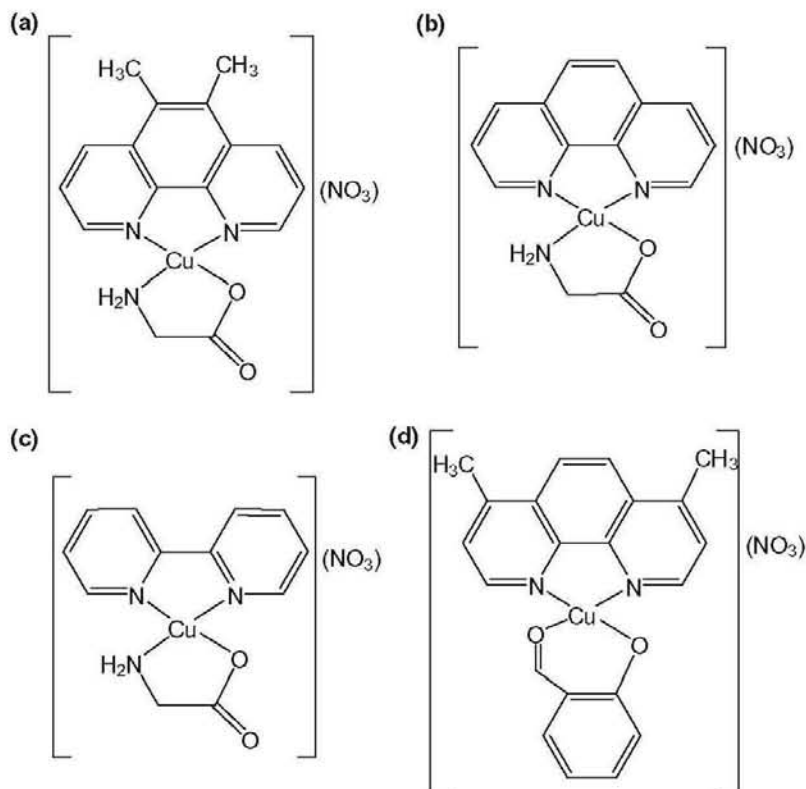
DNA pBSK II BlueScript (Stratagene) (250 or 300 ng per reaction) was obtained and purified according to standard techniques. Briefly, *Escherichia coli* XL1 cells were transformed with pBSK II. Transformation was verified by polymerase chain reaction (PCR) and plasmid DNA was purified (QIAGEN Plasmid Maxi Kit). DNA quantification was carried out using a microvolume UV/Vis spectrophotometer (*ACTGene*). The purified DNA (250–300 ng) was incubated in HEPES buffer (0.1 M pH 7.4) in the presence or absence of Casiopeínas® at various molar ratios,  $r_i$  ( $r_i = \frac{\text{molofcomplex}}{\text{molofbasepair}}$ ), in a final reaction volume of 20  $\mu$ L for 24 h at 37 °C (long-term incubations) or for 20 min at 37 °C (short-term incubations). The incubations were frozen to stop the reaction. Effect on plasmid DNA was determined by horizontal electrophoresis (0.7 % agarose in Tris/Borate/EDTA buffer (TBE) 0.5%). DNA was post-stained with ethidium bromide for 15 min and visualized under UV light. DNA in absence of Casiopeínas®, incubated under the same conditions, was used as negative control. Analysis of the effect of reducing agents was performed in the presence of ascorbic acid (AsA) at a final concentration of 1 mM or beta-mercaptoethanol ( $\beta$ ME) at a final concentration of 1 mM for short-term DNA-Casiopeínas® incubations at 37 °C as previously reported [8, 18]. In order to test the involvement of free radicals, DMSO 4.0 %, as radical scavenger, was included in the incubation mixture in the DNA-Casiopeínas® long-term incubations. The profile of intensities in each assay was determined using Carestream Molecular Imaging Software (Kodak).

## Results and Discussion

### The Four Studied Casiopeínas Interact with DNA

The interaction between the four Casiopeínas under study in this work (Cas VI-gly, Cas VII-gly, Cas IX-gly, and Cas III-Cs) and plasmid DNA was assayed at two  $r_i$  values after an incubation of 24 h at 37 °C. In order to visualize the effect of the complexes on the tertiary structure of DNA, the electrophoresis assay was performed in the absence of any intercalating agent like ethidium bromide. It is worth to note that this approach, using the same plasmid preparation, was used to successfully demonstrate the cleavage effect of Casiopeínas Cas III-ia, Cas III-Ea, and Cas II-gly [8]. The effect on plasmid DNA was similar for the four assayed Casiopeínas (Fig. 2). There is a decrease of the intensity of the band corresponding to the supercoiled form (lower band) that is accompanied by an intensity increase of the band corresponding to the relaxed circular form (upper band), or even the appearance of linear DNA band (intermediate mobility band) is also observed.

**Fig. 1** Structure of the Casiopeínas<sup>®</sup> under study in this work: **a** CasVI-gly (5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline glycinato copper(II) nitrate), **b** CasVII-gly (1,10-phenanthroline glycinato copper(II) nitrate), **c** CasIX-gly (2,2'-bipyridine glycinato copper(II) nitrate), and **d** CasIII-Cs (4,7 dimethyl-1,10-phenanthroline salicylaldehydato copper(II) nitrate)



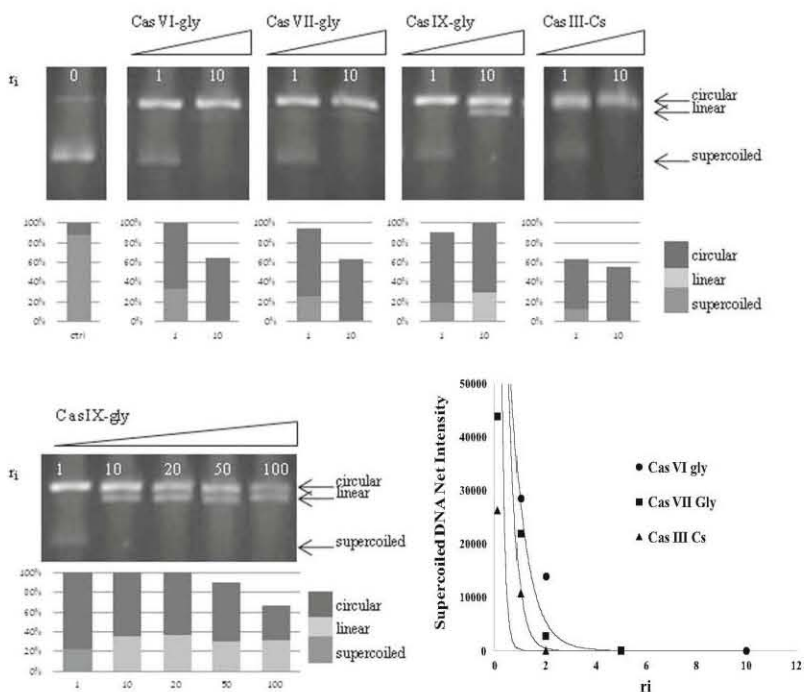
Indeed, Cas IX-gly clearly nicks the plasmid DNA yielding a significant quantity of the linear form. Although, in this case, the global concentration of DNA is only affected at high  $r_f$  values (low panel), for all the other three Casiopeínas, a global lost of DNA is evident even at  $r_f=10$ . This effect is more marked for the Cas III-Cs. The redox potential values of these compounds Cas III-Cs = -360 mV, Cas VI-gly = -292 mV, Cas VII-gly = -259 mV, and Cas IX-gly = -295 mV [26] does not help to explain by themselves the described tendency in a satisfactory way, leading to propose that for these compounds, the molecular recognition exerted by the aromatic moieties has to play a transcendental role. This result supports that the interaction of the tested Casiopeínas triggers the cleavage of the DNA molecule without a reducing agent and only with the presence of molecular oxygen of the environment.

The observed effect can be unambiguously attributed to the specific copper complex, since the intensity of the band of the supercoiled form of DNA decreases as the concentration of the copper complexes is increased (as shown in the graph in Fig. 2), showing a clear dependence on the complex dose. Although the electrophoretic profile may vary depending on the ratio of DNA forms of the original plasmid used, the four complexes interact with plasmid DNA in a concentration-dependent way.

#### The Presence of Antioxidant Agents Promotes DNA Degradation

We have previously reported for other Casiopeínas (Cas II-gly, Cas II-Ea, and Cas III-ia) that reducing agents enhanced the effect of the complexes on DNA [8]. Here, a similar effect was observed for the four Casiopeínas studied (Fig. 3). The incubation with ascorbic acid promotes rapid degradation after a short-term incubation. Indeed, in the absence of any antioxidant, after incubating for 20 min at 37 °C, the Casiopeínas by themselves promote the disappearance of the supercoiled form with the increase of the circular form or even the appearance of the linear form. But, the addition of ascorbic acid in the reaction mixtures clearly enhances DNA degradation leading to the complete disappearance of all the plasmid DNA forms. Nonetheless, when  $\beta$ ME is present, this effect is partially prevented. In fact, though the addition of  $\beta$ ME still produces an enhancement of total DNA degradation caused by the four Casiopeínas, a lesser effect than the one observed with the addition of ascorbic acid is evident. Remarkable, after incubation with  $\beta$ ME, and distinctively to what happens when absent, the persistent DNA corresponds to the supercoiled plasmid form.

**Fig. 2** Electrophoresis analysis of the plasmid DNA interaction with the four studied Casiopeínas: Cas VI-gly, Cas VII-gly, Cas XI-gly, and Cas III-Cs. Reaction mixtures were incubated in HEPES buffer using 250 ng of (pBSK II plasmid) in a final volume of 20  $\mu$ L for 24 h at 37  $^{\circ}$ C. The  $r_i$  values are indicated at the top of each panel. The different plasmid DNA isoforms are depicted with *arrows* as supercoiled (high mobility isoform), linear DNA (intermediate mobility isoform), and circular DNA (low mobility isoform). The quantification of all the band intensities is represented relative to the control, below each lane. For Cas VI-gly, Cas VII-gly, and Cas III-Cs, the effect of the incubation of different  $r_i$  on supercoiled plasmid DNA is plotted ( $r^2=0.82, 0.95, \text{ and } 0.99$ , respectively)

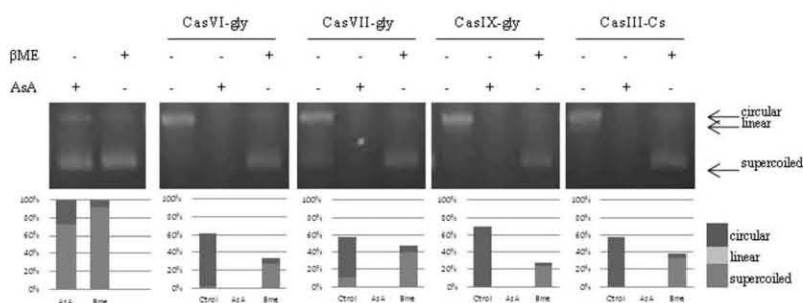


The Radical Scavenger Differentially Affects the Action on Plasmid DNA

Plasmid DNA was incubated with the four Casiopeínas in presence of a radical scavenger (DMSO) in order to achieve a better understanding of the mechanisms of action of these complexes (Fig. 4). The three complexes of the “gly” family have a behavior that is also shared by the Cas II-gly previously studied [8, 18]. For these cases, DMSO seems to partially prevent the degradation of DNA due to the glycinate copper

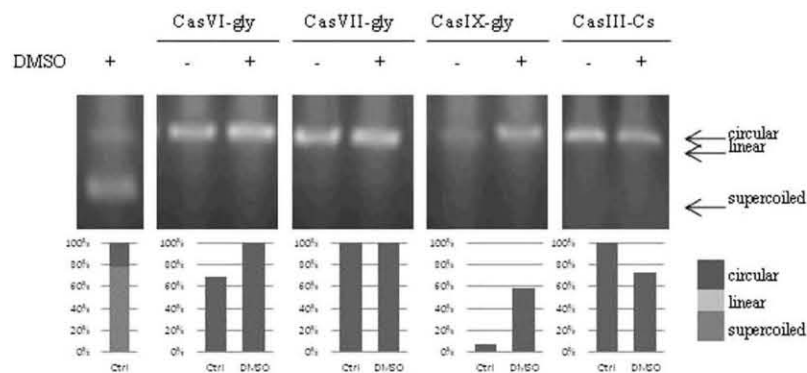
complexes. The extent of the DMSO effect is different depending on the Casiopeínas, being the highest for Cas IX-gly (approximately 50 %) and the lowest Cas VII-gly (approximately 4 %). Meanwhile, the opposite effect is observed for Cas III-Cs (complex with salicylaldehyde co-ligand instead of glycinate). In this case, the change of the band intensity suggests that the activity of Cas III-Cs is partly enhanced when DMSO is added to the incubation assay (approximately 27 %).

In summary, as previously reported by us for other copper complexes of the Casiopeínas<sup>®</sup> series, Cas VI-gly, Cas VII-



**Fig. 3** Electrophoresis analysis of the Cas VI-gly, Cas VII-gly, Cas XI-gly, and Cas III-Cs plasmid DNA degradation in the presence of reducing agents. Reaction mixtures were incubated in HEPES buffer using 250 ng of (pBSK II plasmid) in a final volume of 20  $\mu$ L for 20 min at 37  $^{\circ}$ C using a molar ratio  $r_i=0.5$ . The control was incubated in the same conditions in

the absence of Casiopeínas. The concentrations of the reducing agents used were 1 mM (AsA) and 1 mM ( $\beta$ ME). The different plasmid DNA isoforms are depicted with *arrows* as supercoiled (high mobility isoform) and circular DNA (low mobility isoform). The quantification of all the band intensities is represented relative to the control, below each lane



**Fig. 4** Electrophoresis analysis of the Cas VI-gly, Cas VII-gly, Cas XI-gly, and Cas III-Cs plasmid DNA degradation in the presence of DMSO. Reaction mixtures were exposed to a long-term incubation (24 h at 37 °C) using a molar ratio of 10. The control was incubated in the same

conditions in the absence of Casiopeínas. The concentration of the radical scavenger utilized was 4.0 %. The quantification of all the band intensities is represented relative to the control, below each lane

gly, Cas XI-gly, and Cas III-Cs were shown to trigger DNA cleavage. The observed behavior for these complexes in the presence of reducing agents supports a mechanism of action involving free radicals as previously proposed [18]. However, the addition of a radical scavenger in the incubation mixture made the existence of differences among the mode of action of the Casiopeínas® on the plasmid DNA evident. All the glycinate complexes have shown a similar behavior in the presence of a radical scavenger but different to that of the salicylaldehyde complex tested. Consequently, the nature of the co-ligand could be relevant for determining the intimate mechanism of interaction with DNA. Further studies must be performed to get a better understanding of the differential mechanisms involved.

**Acknowledgments** LB thanks ANII Uruguay for the financial support through the grant BE\_INI\_2010\_1979. Authors would like to thank the Iberoamerican program CYTED, network RIIDFCM (209RT0380), CONACYT 179119 and ICYTDF PINVII-32.

## References

- Thompson KH, Orvig C (2003) Boon and bane of metal ions in medicine. *Science* 300:936–939
- Ronconi L, Sadler PJ (2007) Using coordination chemistry to design new medicines. *Coord Chem Rev* 251:1633–1648
- Brujininx PCA, Sadler PJ (2008) New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr Opin Chem Biol* 12:197–206
- Tisato F, Marzano C, Porchia M, Pellei M, Santini C (2010) Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies. *Med Res Rev* 30:708–749
- Marzano C, Pellei M, Tisato F, Santini C (2009) Copper complexes as anticancer agents. *Anti Cancer Agents Med Chem* 9:185–211
- Wang T, Guo Z (2006) Copper in medicine: homeostasis, chelation therapy and antitumor drug design. *Curr Med Chem* 13:525–537
- Ruiz-Azuara L, Bravo-Gómez ME (2010) Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr Med Chem* 17:3606–3615
- Becco L, Rodríguez A, Bravo ME, Prieto MJ, Ruiz-Azuara L, Garat B, Moreno V, Gambino D (2012) New achievements on biological aspects of copper complexes Casiopeínas®: interaction with DNA and proteins and anti-Trypanosoma cruzi activity. *J Inorg Biochem* 109:49–56
- Galindo-Murillo R, Ruiz-Azuara L, Moreno-Esparza R, Cortés-Guzmán F (2012) Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys Chem Chem Phys* 14:15539–15546
- Galindo-Murillo R, Hernandez-Lima J, González-Rendón M, Cortés-Guzmán F, Ruiz-Azuara L, Moreno-Esparza R (2011)  $\pi$ -Stacking between Casiopeínas® and DNA bases. *Phys Chem Chem Phys* 13:14510–14515
- García-Ramos JC, Tovar-Tovar A, Hernández-Lima J, Cortés-Guzmán F, Moreno-Esparza R, Ruiz-Azuara L (2011) A new kind of intermolecular stacking interaction between copper (II) mixed chelate complex (Casiopeína III-ia) and adenine. *Polyhedron* 30:2697–2703
- Liu H, Sadler PJ (2011) Metal complexes as DNA intercalators. *Acc Chem Res* 44:349–359
- Ruiz-Azuara L, 07/628,628: RE 35,458, Feb. 18 (1997) United States Patent 1992
- Ruiz-Azuara L, 07/628,628: 5,576,326 United States Patent 1996
- Ruiz-Azuara L, 07/628,843: RE 35,458, Feb. 18 (1997) United States Patent 1992
- Bravo-Gomez ME, Garcia-Ramos JC, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L (2009) Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeínas). *J Inorg Biochem* 103:299–309
- Alemon-Medina R, Brena-Valle M, Munoz-Sanchez JL, Gracia-Mora MI, Ruiz-Azuara L (2007) Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas®). *Cancer Chemother Pharmacol* 60:219–228
- Rivero-Muller A, De Vizcaya-Ruiz A, Plant N, Ruiz L, Dobrota M (2007) Mixed chelate copper complex, Casiopeína IIgly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 165:189–199
- Carvalho-Chaigneau F, Trejo-Solis C, Gomez-Ruiz C, Rodriguez-Aguilera E, Macias-Rosales L, Cortes-Barberena E, Cedillo-Pelaez C, Gracia-Mora I, Ruiz-Azuara L, Madrid-Marina V, Constantino-Casas F (2008) Casiopeína III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biometals* 21:17–28
- Trejo-Solis C, Palencia G, Zuniga S, Rodriguez-Ropon A, Osorio-Rico L, Luvia ST, Gracia-Mora I, Marquez-Rosado L, Sanchez A,

- Moreno-García ME, Cruz A, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Ramírez L, Rodríguez-Enriquez S, Sotelo J (2005) *Neoplasia* 7:563–574
21. Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L (2010) Metals in Cancer Treatment. In: Mejía-Vázquez MDC, Navarro S (eds) *New approaches in the treatment of cancer, cancer etiology, diagnosis and treatments*. Nova Sciences Publishers, Inc, New York, pp 139–172
22. Mejía C, Ruiz-Azuara L (2008) Casiopeínas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol Oncol Res* 14:467–472
23. Serment-Guerrero J, Cano-Sanchez P, Reyes-Perez E, Velazquez-García F, Bravo-Gomez ME, Ruiz-Azuara L (2011) Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes Casiopeínas®. *Toxicol in Vitro* 25:1376–1384
24. Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, García-Ramos JC, Flores-Alamo M, Hernández-Lemus E, Ruiz-Azuara L, Mejía C (2013) Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J Inorg Biochem* 126: 17–25
25. Valencia-Cruz AI, Uribe-Figueroa LI, Galindo-Murillo R, Baca-López K, Gutiérrez AG, Vázquez-Aguirre A, Ruiz-Azuara L, Hernández-Lemus E, Mejía C (2013) Whole genome gene expression analysis reveals Casiopeína-induced apoptosis pathways. *PLoS ONE* 8(1):e54664
26. García-Ramos JC, Galindo-Murillo R, Araceli Tovar-Tovar A, Alonso-Saenz AL, Gómez-Vidales V, Flores-Alamo M, Ortiz-Frade LA, Cortes-Guzmán F, Moreno-Esparza F, Campero A, Ruiz-Azuara L (2014) The  $\pi$ -back-bonding as a function of the substituent position in Cu(II) antineoplastic compounds. Experimental and theoretical study. *Chem Eur J*, accepted manuscript, 10th June 2014

## Copper

The  $\pi$ -Back-Bonding Modulation and Its Impact in the Electronic Properties of Cu<sup>II</sup> Antineoplastic Compounds: An Experimental and Theoretical Study

Juan Carlos García-Ramos,<sup>[a]</sup> Rodrigo Galindo-Murillo,<sup>[b]</sup> Araceli Tovar-Tovar,<sup>[a]</sup> Ana Luisa Alonso-Saenz,<sup>[a]</sup> Virginia Gómez-Vidales,<sup>[d]</sup> Marcos Flores-Álamo,<sup>[a]</sup> Luis Ortiz-Frade,<sup>[c]</sup> Fernando Cortes-Guzmán,<sup>[d, e]</sup> Rafael Moreno-Esparza,<sup>[a]</sup> Antonio Campero,<sup>[f]</sup> and Lena Ruiz-Azuara<sup>\*[a]</sup>

**Abstract:** A complete study of the electronic density distribution in antineoplastic mixed chelate complexes of the type [Cu(N–N)(glycinate)H<sub>2</sub>O]NO<sub>3</sub> (N–N = 2,2'-bipyridine (bpy) (1), 4,4'-dimethyl-bpy (2), 5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine (3), 1,10-phenanthroline (phen) (4), 4-methyl-phen (5); 5-methyl-phen (6); 4,7-dimethyl-phen (7), 5,6-dimethyl-phen (8), and 3,4,7,8-tetramethyl-phen (9)), a family known as Casiopeínas, was carried out with cyclic voltammetry, EPR, and computational methods. Crystal structures of 1·H<sub>2</sub>O, 2·H<sub>2</sub>O, 3·H<sub>2</sub>O, 6·H<sub>2</sub>O, and 8·H<sub>2</sub>O show the variability in the geometries adopted by the copper compounds in the solid state. Experimental properties are described employing electronic

descriptors obtained from computational methods. The main descriptors found were: The total electronic population of the metal ion (*N*(Cu)), delocalization of the metal ion electrons over the donor atoms ( $\Delta$ (Cu)), atomic dipolar moment ( $\mu$ (Cu)), and the atomic quadrupole moment (*Q*(Cu)). It was found that  $\pi$ -back-bonding is the principal factor that modulates the distribution of the electron density around the metal ion. The electronic descriptors obtained from the computational approach can be used as electronic descriptors of inorganic compounds that have shown antiproliferative activities instead the experimental data, aiding the rational design of good candidates of metal-based drugs.

[a] J. C. García-Ramos, A. Tovar-Tovar, A. L. Alonso-Saenz, Dr. M. Flores-Álamo, Dr. R. Moreno-Esparza, Prof. L. Ruiz-Azuara  
Departamento de Química Inorgánica y Nuclear  
Facultad de Química, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Av. Universidad 3000  
C.U. Mexico City (Mexico)  
E-mail: lenar701@gmail.com

[b] Dr. R. Galindo-Murillo  
Department of Medicinal Chemistry  
College of Pharmacy, University of Utah  
2000 East 30 South Skaggs 201  
Salt Lake City, Utah 84112 (USA)

[c] Dr. L. Ortiz-Frade  
Electrochemistry Department, Centro de Investigación y  
Desarrollo Tecnológico en Electroquímica  
S.C. Parque Tecnológico Querétaro  
Sanfandila, Pedro de Escobedo, C.P. 76703. Querétaro (México)

[d] V. Gómez-Vidales, Dr. F. Cortes-Guzmán  
Instituto de Química, Universidad Nacional  
Autónoma de México, Av. Universidad 3000  
C.U. Mexico City (Mexico)

[e] Dr. F. Cortes-Guzmán  
Centro Conjunto de Investigación en  
Química Sustentable UAEMex-UNAM  
Carretera Toluca-Atzacomulco Km. 14.5  
Toluca, 50200 (México)

[f] Prof. A. Campero  
Departamento de Química Inorgánica  
Universidad Autónoma Metropolitana (Iztapalapa)  
Av. San Rafael Atlixco No. 186, Col. Vicentina  
Delegación Iztapalapa, 09340 (Mexico)

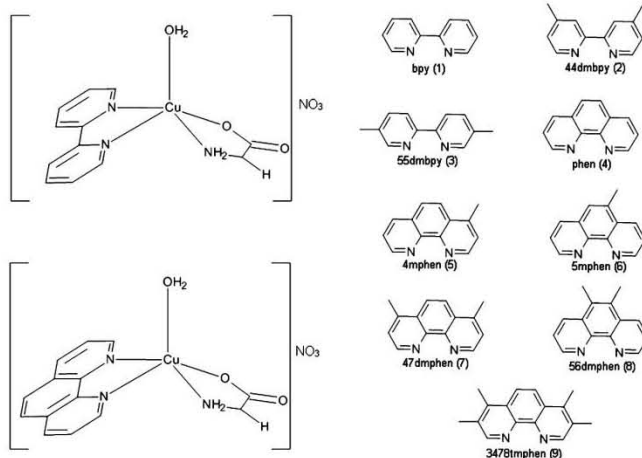
Supporting information for this article is available on the WWW under  
<http://dx.doi.org/10.1002/chem.201402775>.

## Introduction

In the last decades metal complexes have gained a growing interest as pharmaceuticals for their use as diagnostic agents or as chemotherapeutic drugs.<sup>[1]</sup> In this field, one of the main tasks is the development of compounds with anticancer activity that possess a metal center different to platinum such as Sn<sup>IV</sup>, Ti<sup>IV</sup>, Au<sup>III</sup>, Ru<sup>II</sup>, Ru<sup>III</sup>, Pd<sup>II</sup>, Rh<sup>I</sup>, and Cu<sup>II</sup>.<sup>[2]</sup> These compounds have to satisfy several requirements, such as having the lowest possible toxicity, increasing its activity with respect to known compounds and of course, reducing the production costs.

It has been suggested that three-dimensional configurations adopted by the coordination compounds facilitates redox and ligand substitution reactions that allow them to interact in a specific manner with different biomolecules such as proteins or nucleic acids.<sup>[3]</sup> Recent investigations in this area have focused on the use of essential ions to prepare the complexes, such as copper. Copper is an essential trace element important for the function of several enzymes involved in energy metabolism, respiration, and DNA synthesis on the cell.<sup>[4]</sup>

The major functions of biologically active copper compounds involve redox reactions in which copper reacts directly either with molecular oxygen or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to produce free radicals.<sup>[5]</sup> Copper toxicity comes from its ability to produce reactive oxygen species (ROS), displace other metal ions, participate in lipid peroxidation (and) or directly cleave DNA and



**Scheme 1.** General structures of some members of the Casiopeínas family studied in this work.

RNA.<sup>[6]</sup> All these properties were considered in the design of copper(II) coordination compounds patented<sup>[7]</sup> registered under the name Casiopeínas, with the general formula:  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{N}-\text{O})][\text{NO}_3]$  and  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{O}-\text{O})]\text{NO}_3$ , in which N–N = non-substituted and substituted 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline, N–O =  $\alpha$ -aminoacetate or peptide and O–O = acetylacetonate or salicylaldehyde.

Two compounds of this family,  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonate})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$  and  $[\text{Cu}(4,7\text{-dimethyl-1,10-phenanthroline})(\text{glycinate})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ , known as Casiopeína III-ia and Casiopeína II-gly, respectively, are the most studied of the family and have been evaluated *in vitro* and *in vivo* showing cytotoxic,<sup>[8]</sup> genotoxic,<sup>[9]</sup> and antineoplastic<sup>[10]</sup> activity. Although the action mechanism is not known in detail, at the molecular level, several results supports that these compounds are able to inhibit cell proliferation mainly by apoptotic pathways,<sup>[11]</sup> participate in redox reactions that produce reactive oxygen species,<sup>[8,10,11]</sup> and interact directly with DNA and its constituents.<sup>[12]</sup> In quantitative structure–activity relationship (QSAR) studies, compounds with the general formula  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{acetylacetonate})]\text{NO}_3$  and  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{glycinate})]\text{NO}_3$ , have shown that the presence of a third aromatic ring in the molecule structure and the higher energy barrier to produce the  $\text{Cu}^{\text{II}}/\text{Cu}^{\text{I}}$  transformation increases its cell growth inhibition capacity in several human tumor cell lines evaluated. With these results, the redox potential was proposed to be used as an electronic descriptor of the biological activity shown by these compounds.<sup>[13]</sup>

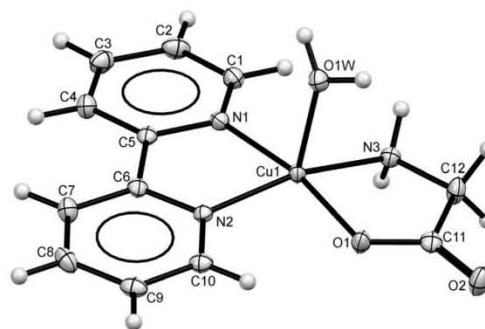
Thus, studying the electronic density distribution around the copper center, the coordinated atoms and how to modulate it, could help us to understand the way in which stacking or redox processes between the Casiopeínas and biologically relevant molecules, such as DNA, can occur. Therefore, in this work we present a detailed characterization of the electronic density distribution of nine Casiopeínas with the general formula  $[\text{Cu}(\text{N}-\text{N})(\text{glycinate})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ , in which N–N is either a substituted or non-substituted 1,10-phenanthroline or 2,2'-bipyridine

(see Scheme 1), employing X-ray diffraction, EPR spectroscopy, electrochemical and theoretical techniques and their correlations with their chemical and biological behavior.

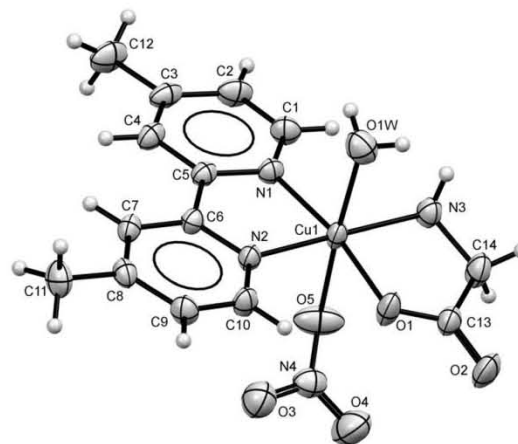
## Results and Discussion

### Structural determinations

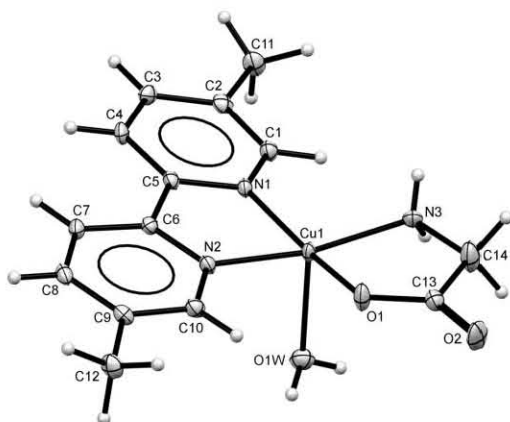
Single crystals of complexes **1** (bpy), **2** (44dmbpy), **3** (55dmbpy), **6** (5mphen) and **8** (56dmpen) suitable for X-ray diffraction structure analysis were obtained (Figures 1–5). These structures allowed us to probe the geometrical diversity that the  $\text{Cu}^{\text{II}}$  ion can adopt in



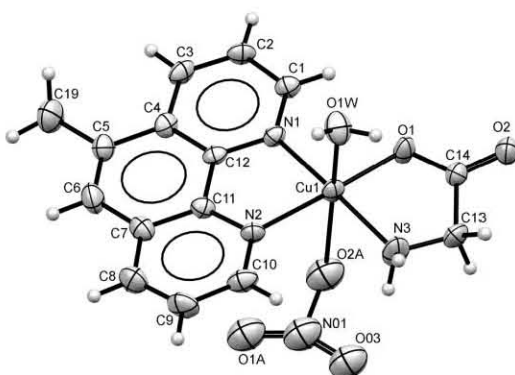
**Figure 1.** X-ray structure of compound **1**  $[\text{Cu}(2,2'\text{-bipyridine})(\text{glycinate})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ . Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability. The counterion is not shown for clarity.



**Figure 2.** X-ray structure of compound **2**  $[\text{Cu}(4,4'\text{-dimethyl-2,2'\text{-bipyridine})(\text{glycinate})(\text{H}_2\text{O})]\text{NO}_3$ . Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability.

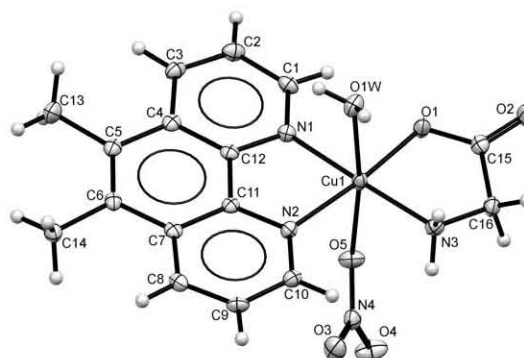


**Figure 3.** X-ray structure of compound **3** [Cu(5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(glycinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability. Counterion is not shown for clarity.



**Figure 4.** X-ray structure of compound **6** [Cu(5-methyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability.

the solid state. For compounds **1** (**bpy**) and **3** (**55 dmbpy**) the metal ion shows a five-coordinated square-pyramidal geometry;



**Figure 5.** X-ray structure of compound **8** [Cu(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability.

try; the base of the pyramid is formed by the N(1) and N(2) nitrogen atoms of the diimine ligand and N(3) and O(1) atoms of the glycinate ligand, with Cu–L base bonds of 1.98–2.01 Å for Cu–N and 1.93–1.95 Å for Cu–O two atoms corresponding to the glycinate ligand, with Cu–L base bonds of 1.98–2.01 Å for Cu–N and 1.93–1.95 Å for Cu–O. The apical position is occupied by a O(1W) water molecule with Cu–O distances of 2.22–2.37 Å. The Cu<sup>II</sup> is situated slightly above the N1/N2/N3/O1 least-squares plane with a distance  $\rho = 0.088$ –0.181 Å.

According to Halcrow,<sup>[14]</sup> an axial Cu–L distance less than 2.4 Å might be considered as a genuine Cu–L bond, whereas distances from 2.4 to 2.8 Å represent weaker interactions, predominantly electrostatic in nature. Considering this, it is possible to suggest an effective geometry of square-pyramid around the copper ion in compound **6** (**5mphen**) with axial bond lengths Cu–O1w = 2.276(5) Å and Cu–O3N = 2.707(1) Å. On the other hand, the last two compounds **2** (**44 dmbpy**) and **8** (**56 dmphen**) exhibit an elongated octahedral geometry product of Jahn–Teller distortion with distances for Cu–O1w of 2.480(2) and 2.514(1) Å and Cu–O3N of 2.545(2) and 2.618(1) Å for compounds **2** and **8**, respectively. It is important to note that in compound **6** only one isomer crystallizes, when the methyl substituent is on the same side as that of the carboxylate moiety of the aminoacidate. Selected distances and angles of the discussed compounds are listed in Table 1.

To know the distortion presented in the geometry of all complexes, the tetragonality (T) and angular distortion ( $\tau$ ) values were evaluated as suggested by Hathaway.<sup>[15]</sup> These parameters are also shown in Table 1. In general, the tetragonality values found in Cu<sup>II</sup> elongated octahedral geometries involving principally  $\sigma$ -donor atoms are in the range 0.95–0.85, whereas those of the five-coordinated geometries are in the range 0.90–0.96. When  $\pi$ -acceptor donor atoms are present, the observed tetragonality values show a decrease due to a decrease of the short copper–ligand distance associated with metal-to-ligand  $\pi$ -bonding.<sup>[16]</sup>

According to the values presented in Table 1, both effects are observed in the complexes studied in this work; this in-



**Table 1.** Selected distances [Å] and angles [°] for compounds **1** (bpy), **2** (44 dmbpy), **3** (55 dmbpy), **6** (5 mfen), and **8** (56 dmfen).

	<b>1</b> (bpy)	<b>2</b> (44 dmbpy)	<b>3</b> (55 dmbpy)	<b>3</b> <sup>[a]</sup> (55 dmbpy)	<b>6</b> (5 mfen)	<b>8</b> (56 dmfen)
Cu–N1	2.013(2)	2.014(2)	2.013(2)	1.999(2)	2.031(5)	2.018(8)
Cu–N2	1.992(2)	1.973(2)	1.996(2)	1.991(2)	2.006(1)	1.984(9)
Cu–N3	2.003(2)	1.997(2)	2.001(2)	1.986(2)	1.991(5)	1.981(6)
Cu–O1	1.941(7)	1.947(2)	1.937(2)	1.949(1)	1.947(4)	1.945(7)
Cu–O1w	2.219(8)	2.480(2)	2.254(2)	2.370(2)	2.276(5)	2.514(1)
Cu–O3N	–	2.545(2)	–	–	2.707(1)	2.618(1)
N1–Cu–N2	81.22(8)	81.07(7)	80.94(8)	81.87(8)	81.79(18)	82.23(6)
N1–Cu–N3	99.79(8)	102.36(7)	99.27(9)	98.74(9)	101.4(2)	99.86(6)
N1–Cu–O1	168.73(8)	170.32(7)	166.72(8)	167.92(8)	170.48(19)	174.74(6)
N1–Cu–O1w	98.88(7)	93.62(6)	95.74(8)	99.49(8)	95.37(19)	85.90(5)
N2–Cu–N3	165.43(8)	175.70(8)	166.58(1)	178.29(9)	168.2(3)	177.82(6)
N2–Cu–O1	91.97(7)	92.27(7)	92.07(8)	93.92(8)	91.38(17)	92.71(6)
N2–Cu–O1w	97.50(7)	87.68(6)	96.11(8)	93.49(8)	95.09(18)	87.19(5)
N3–Cu–O1	84.56(7)	84.63(7)	84.91(8)	85.16(8)	84.04(19)	85.21(6)
N3–Cu–O1w	96.69(7)	89.50(7)	97.21(9)	87.99(9)	96.00(3)	93.53(6)
O1–Cu–O1w	91.88(7)	93.12(6)	96.22(8)	92.04(7)	91.80(2)	92.45(5)
T <sup>5</sup>	0.895	–	0.881	0.8359	0.875	0.788
T <sup>6</sup>	–	0.789	–	–	0.800	0.772
$\tau$ [%]	5.5	8.9	0.23	17.28	3.8	5.1
$\rho$ [Å]	0.226(1)	0.035(9)	0.219(1)	0.111(1)	0.160(1)	0.023(1)

[a] Selected distances and angles for the second unit of compound **3** that appears in the asymmetric unit.

cludes compounds **4** (phen) ( $T^5=0.882$ ), **7** (47 dmphen) ( $T^5=0.818$ ) and **9** (3478 tmphen) ( $T^5=0.843$ ), whose molecular structures were previously reported.<sup>[17]</sup> The decrease in the average distance of the square base is associated with an increase in the bond length of copper to the apical position; this inverse relationship can be attributed to the presence of a strong  $\pi$ -bonding out of the plane that participates in the redistribution of the electronic density in the molecule.<sup>[15]</sup>

In all cases,  $[\text{NO}_3]^-$  acts as a counterion and participates in hydrogen bond interactions. The complexes **1** (bpy), **2** (4,4 dmbpy), **3** (5,5 dmbpy), **6** (5 mphen), **8** (5,6 dmphen), and **9** (3,4,7,8-tmphen) present typical hydrogen bonds through coordinated water molecules, oxygen atoms from the carboxylic group, and  $[\text{NO}_3]^-$  molecules, the anion participating as a linker between two cationic molecules. It should be mentioned that only in complexes **1** (bpy), **3** (55 dmbpy), and **8** (56 dmphen) does the amino group ( $-\text{NH}_2$ ) participate in hydrogen bonding.

### Electrochemical studies

The cyclic voltammogram of compound **1** (bpy) is shown in Figure 6a (all voltammograms present the same pattern). When the scan was initiated from open circuit potential to negative direction, one reduction process (**1c**) and its corresponding oxidation process (**1a**) were detected. For both processes, a linear relationship between the peak current values ( $i_{cp}$  and  $i_{ap}$ ) with scan rate ( $v^{1/2}$ ) were observed. According to the ratio  $i_{ap}/i_{cp}$ , a simple electron transfer is established with no chemical coupled reactions. Hence, the electrochemical process I can be attributed to the reduction process Cu(II) to Cu(I),

with a half-wave potential value  $E_{1/2} = -0.295 \text{ mV}/\text{Fc}^+ | \text{Fc}$ . All other complexes display the same behavior as compound **1** (bpy); the half-wave potential values ( $E_{1/2}$ ) and their potential values are listed in Table 2.

It has been shown that half-wave potential values of coordination compounds could be strongly influenced by two factors: The presence of  $\pi$ -acceptor-donor ligand and the structural restrictions due to ligand conformation when the complex changes their oxidation state.<sup>[18]</sup> Ligands like 1,10-phenanthroline, 2,2'-bipyridil or its derivatives are examples of  $\pi$ -acceptor ligands that produce a stable Cu(II) complex. This stability is attributed to the back-bonding interaction between the copper center and the aromatic system. Sigel and co-workers suggest that Cu<sup>II</sup> complexes with phenanthroline in their coordination sphere are more likely to redistribute the electron density increasing their back-bonding interactions than other nitrogen donor ligands like bipyridines, pyridines, and imidazoles.<sup>[19]</sup>

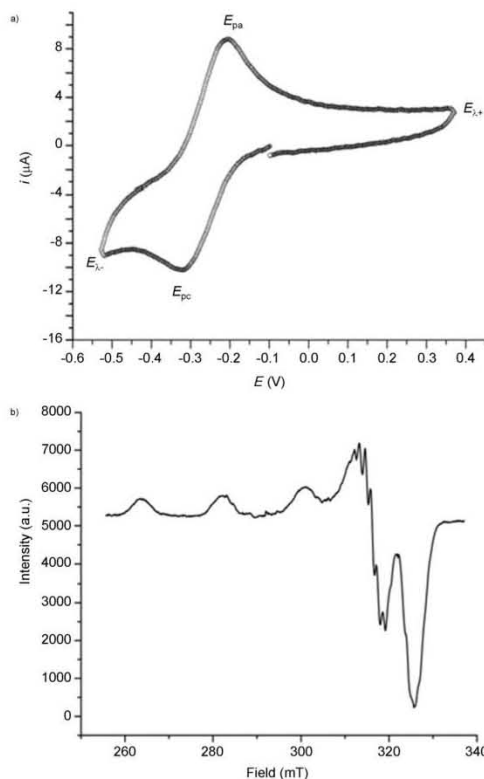
Inspection of Table 2 allowed us to identify the characteristics just described before in the nine Cu<sup>II</sup> coordination compounds studied in this work. No structural limitations were observed in the electrochemical transformation from Cu(II) to Cu(I), allowing the square-pyramid and tetrahedral geometries. The highest negative potentials values were observed in those compounds with the smallest aromatic systems **1–3** (i.e., the bipyridine complexes), whereas compounds with phenanthroline showed lower redox potentials (complexes **4–9**).

Differences in the values of redox potential ( $E_{1/2}^I$ ) for these compounds can be associated to the number and the position of methyl groups on the diimine following the empirical relationship proposed by Hammett.<sup>[20]</sup> This can be observed either in the case of bipyridine derivatives (compounds **1** to **3**) or with the phenanthroline derivatives (compounds **4** to **9**), see Table 2.

The lower redox potential values ( $E_{1/2}$ ) observed for **3** (55 dmbpy) and **9** (3478 tmphen) can be explained considering the increase of electron density in the neighborhood of positions 5,5' of the former and 3 and 8 of the later, which diminishes the capacity of the system to redistribute electron charge producing lower values of redox potential ( $E_{1/2}$ ).

To rationalize these observations, we correlated the redox potential of each compound and the free ligand  $pK_b$  value of the corresponding ligand obtaining linear relationships. For phenanthroline derivatives a very good linear relationship was found without the value of compound **9** (3478 tmphen), allowing us to suggest that the  $pK_b$  value for 3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline has to be 5.81 instead the reported 6.31, which was probably overestimated due the dioxane–water extrapolation.<sup>[21]</sup>

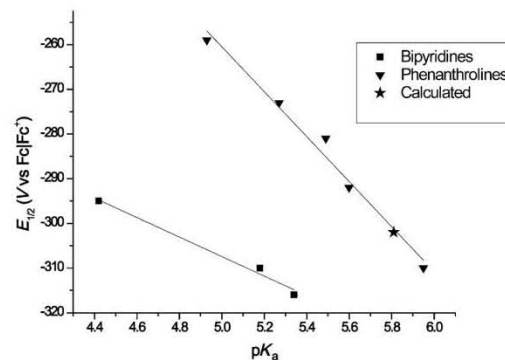
As the electron-donating capacity of the ligand is increased, the greater the electron density on the metal ion, thus, reduction of the system  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  should become more difficult. Equations (1) and (2) found for bipyridine and phenanthroline systems are as follows:



**Figure 6.** a) Cyclic voltammogram and b) EPR spectra of compound **1**. All compounds have shown the same behavior. The cyclic voltammogram was obtained in a MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1) mixture at 0.1 V s<sup>-1</sup> with a carbon disk working electrode. EPR spectra were acquired at 77 K from a MeOH solution of final concentration 1 mM.

$$E_{1/2}^{\text{bpy}} (\text{V}) = -0.1981 - 0.02185 \text{ p}K_{\text{a}}; R^2 = 0.9725 \quad (1)$$

$$E_{1/2}^{\text{phen}} (\text{V}) = -0.0086 - 0.05036 \text{ p}K_{\text{a}}; R^2 = 0.9757 \quad (2)$$



**Figure 7.** Inverse relationship found between non-coordinated pK<sub>a</sub> and half-wave potential (E<sub>1/2</sub>) of the Cu<sup>I</sup> coordination compounds. The Figure shows the different behavior of phenanthroline and bipyridine derivatives.

Figure 7 shows the plot of the observed redox potential of these complexes versus pK<sub>a</sub> of the free ligands. As discussed above, bipyridine systems are much more difficult to reduce than their phenanthroline analogues; this can be attributed to the greater aromatic system of the phenanthroline that aids in the distribution of the negative charge in whole molecule; meanwhile, in the case of bipyridines the charge proceeding from the Cu<sup>II</sup> remains in the nitrogen atoms and close of the metal center due the lack of third aromatic ring.

These results have to be related to the capacity of the systems to participate in a back-bonding interaction, in which the phenanthroline derivatives are the better π-acceptors leading to the lowest redox potentials. From the plot it is also noticeable that the bipyridine derivatives are more susceptible to the inductive effect promoted by the number and position of the methyl groups than the phenanthroline derivatives. These results are similar to those reported by James and Williams<sup>[18]</sup> and the group of Sanna,<sup>[22]</sup> showing that the basicity of the ligand can modify the Lewis acidity of the metal center to stabilize the Cu<sup>I</sup> state relative to the Cu<sup>II</sup> state with ligands having lower pK<sub>a</sub> values.

**Table 2.** Electronic parameters, half-wave potential (E<sub>1/2</sub>), g factor values (isotropic, parallel and perpendicular components), A constant coupling (isotropic, parallel and perpendicular components for Cu interactions and nitrogen interaction (A<sub>N</sub>)), and average Cu–L covalent character descriptors for σ, π-in-plane and π-out-of-plane bonds, α<sup>2</sup>, β<sub>1</sub><sup>2</sup> and β<sub>2</sub><sup>2</sup>.

	pK <sub>a</sub>	E <sub>1/2</sub> <sup>[a]</sup>	g <sub>  </sub>	g <sub>⊥</sub>	A <sub>  </sub> <sup>[b]</sup>	A <sub>⊥</sub> <sup>[b]</sup>	A <sub>N</sub> <sup>[b]</sup>	g <sub>iso</sub>	A <sub>iso</sub> <sup>[b]</sup>	α <sup>2</sup>	β <sub>1</sub> <sup>2</sup>	β <sub>2</sub> <sup>2</sup>
<b>1 (bpy)</b>	4.42	−295	2.2435	2.0572	190.0	7.683	12.45	2.1193	68.45	0.8319	0.7207	0.7407
<b>2 (44 dmbpy)</b>	5.34	−316	2.2389	2.0562	191.0	7.679	12.44	2.1171	68.78	0.8272	0.7060	0.7400
<b>3 (55 dmbpy)</b>	5.18 <sup>[c]</sup>	−310	2.2420	2.0620	183.3	7.679	12.44	2.1220	66.21	0.8371	0.7311	0.7794
<b>4 (phen)</b>	4.93	−259	2.2519	2.0521	183.0	7.664	12.55	2.1187	66.10	0.8173	0.7475	0.6774
<b>5 (4 mphen)</b>	5.49 <sup>[d]</sup>	−281	2.2446	2.0547	187.0	7.673	12.53	2.1180	67.67	0.8223	0.7234	0.7008
<b>6 (5 mphen)</b>	5.27	−273	2.2459	2.0578	187.0	7.685	13.44	2.1205	67.45	0.8235	0.7232	0.7399
<b>7 (47 dmphen)</b>	5.95	−310	2.2398	2.0548	189.0	7.674	12.66	2.1164	68.11	0.8218	0.7138	0.7167
<b>8 (56 dmphen)</b>	5.60	−292	2.2441	2.0569	190.0	7.682	13.44	2.1193	68.45	0.8305	0.7189	0.7230
<b>9 (3478 tmphen)</b>	5.81 <sup>[e]</sup>	−302	2.2435	2.0577	189.0	7.685	12.66	2.1196	68.12	0.8291	0.7299	0.7432

[a] Half-wave potential values expressed in mV. [b] Hyperfine coupling constants are expressed in 1 × 10<sup>-4</sup> units. [c] pK<sub>a</sub> value obtained from ref. [45]. [d] pK<sub>a</sub> calculated obtained employing α values reported in ref. [46]. [e] Calculated pK<sub>a</sub> with the Equation E<sub>1/2</sub><sup>phen</sup> (V) = −0.0086 − 0.05036 pK<sub>a</sub>, obtained in this work.

Moreover, the above results are in agreement with those found by Rorabacher, in which the net conclusion is that any attempts to alter the thermodynamics of Cu(II/I) electron transfer should be focused on the manipulation of the structure and composition of the coordination sphere in terms of its impact upon the Cu<sup>II</sup>-L complexes, since the complex stabilities of the Cu<sup>I</sup>-L complexes appear to be relatively unaffected by the structural alterations in the ligand.<sup>[23]</sup>

### EPR spectroscopy

One of the main features of EPR spectroscopy is to provide information about the electronic environment in which the metal ion is found and the geometry it adopts in this environment. The Hamiltonian spin parameters derived from the methanol glass spectra given in Table 2 are typical for axially symmetric complexes ( $g_{||}, g_{\perp}$ ) in which the unpaired electron occupies the  $d_{x^2-y^2}$  orbital.<sup>[24]</sup> Figure 6 b displays the EPR spectra of compound **1**; the rest of the compounds present nearly the same pattern.

EPR parameters are highly susceptible to the electron density around the copper(II) ion. Kivelson and Nieman, Peisach and Blumberg, as well as Zink and Drago found a decrease in  $g_{||}$  values for several Cu<sup>II</sup> compounds as the covalent character of the Cu-L bond increases.<sup>[25]</sup>

The  $g_{||}$  value decreases as the  $pK_a$  of the free diimine increases as a consequence of the electronic inductive effect produced by the methyl groups; a similar trend can be found with the redox potential. In fact, both trends have the same distribution allowing us to differentiate between the phenanthroline and bipyridine systems.

Dependence of  $g_{||}$  values give some information about the  $\sigma$ -donor capacity of each diimine employed. To explore the covalent character of Cu-L bonds and also to separate the  $\sigma$  and  $\pi$  contribution to these bonds,  $\alpha^2$ ,  $\beta^2$ , and  $\beta_1^2$  were calculated employing the following Equations:<sup>[26]</sup>

$$\alpha^2 = -A_{||}/P + (g_{||} - 2.0023) + 3/7 (g_{\perp} - 2.0023) + 0.04 \quad (3)$$

$$\alpha^2\beta^2 = ((g_{\perp} - 2.0023) ((\Delta E_{xz})/2\lambda_0)) \quad (4)$$

$$\alpha^2\beta_1^2 = ((g_{||} - 2.0023) ((\Delta E)_{xy})/(8\lambda_0)) \quad (5)$$

in which  $A_{||}$  and  $A_{\perp}$  are the parallel and perpendicular electron nuclear interaction hyperfine constants,  $P = -0.036 \text{ cm}^{-1}$  is the dipole coefficient and  $\lambda_0 = 828 \text{ cm}^{-1}$  is the spin-orbit coupling constant.  $\alpha^2$ ,  $\beta_1^2$ , and  $\beta^2$  represent the coefficients of each molecular orbitals that contribute to the formation of  $\sigma$ -bonding,  $\pi$ -bonding in-plane, and  $\pi$ -bonding out-of-plane, respectively.

Quadratic values of these parameters equal to or near to 1 are associated with the prevalence of ionic character for the interactions, whereas values of 0.5 or closer to this value are considered to be principally covalent in nature.<sup>[25a]</sup> The obtained values are listed in Table 2.

Analyzing the covalence character of the Cu-L bond for the phenanthroline derivatives (Table 2) allowed us to determine

the effect of the number and the position of the methyl groups hanging on the diimine.

The decrease in the covalence of the  $\sigma$ -bond ( $\alpha^2$ ) in one hand, with the increase of the  $\sigma$ -donor capacity of the diimine ( $pK_a$ ) on the other, leads to suggest that the  $\pi^*$  bonds of the phenanthroline are employed to redistribute the excess of electronic charge.

Then is clear that participation of diimine  $\pi^*$  bonds in back-bonding interactions for the employed diimines can also be observed analyzing the behavior of the  $\sigma$ -bond covalent character versus the redox potential (see the Supporting Information, Figure S1).

The excess of electronic density delivered by the methyl groups of the corresponding diimine through the  $\sigma$  bond should be back-donated from the Cu ion to the aromatic moiety employing the  $\pi$  bond in plane, which would increase the covalence of this bond.

From this is possible to suggest that the higher  $\sigma$ -donor capacity of the diimine, the higher the  $\pi$ -acceptance capacity of the ligands for these compounds.

This behavior is shown by all the compounds with exception of **3** (**55 dmbpy**) and **9** (**3478 tmphen**) for which the back-bonding is not so effective due the substitution of position 5,5' and 3,4,7,8 (where the methyl groups to hetero N are present) of the corresponding diimine, this can also be suggested from the electrochemical results.

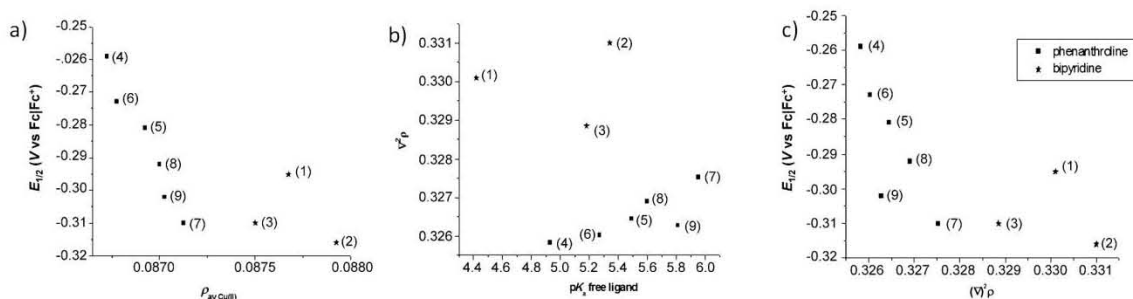
A good estimation of the geometry adopted by the compounds can be obtained employing the isotropic parameters of the EPR spectra, that is,  $A_{iso} = (A_{||} + 2A_{\perp})/3$  and  $g_{iso} = (g_{||} + 2g_{\perp})/3$ .

Several compounds found in the literature with  $d_{x^2-y^2}$  ground state and square-base pyramid geometry confirmed by X-ray crystallography present  $A_{iso}$  values in the range 65 to  $75 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  and  $g_{iso}$  values between 2.09 and 2.13.<sup>[27]</sup>

$A_{iso}$  and  $g_{iso}$  values found for the nine coordination compounds studied here display values in the range of 66 to  $69 \times 10^{-4} \text{ cm}^{-1}$  and 2.115 to 2.122, respectively. These values suggest a square-base pyramid as the geometry adopted by these Cu<sup>II</sup> coordination compounds in solution, in complete agreement with the effective geometry found in solid state.

### Theoretical studies

In Table S1 of the Supporting Information, we show the properties of the Cu-L bond critical points (BCP) that can be used to characterize the metal-ligand interactions.<sup>[28]</sup> In general, Cu-N and Cu-O BCPs have a density around 0.082 and 0.096 a.u., respectively. The laplacian of electron density, which describes the charge concentrations and depletions, is in average 0.29 and 0.46 a.u. for Cu-N and Cu-O, respectively. It seems that there is a balance between the properties of N1-Cu and O1-Cu BCPs and between N2-Cu and N3-Cu BCPs. The decrease of the density at the N1-Cu BCP goes with the increase of the density at O1-Cu BCP. On the other hand, Cu1-N2 presents a larger density than Cu1C->N3, agreeing with the behavior observed in the Cu-L distances of these compounds in the solid state.



**Figure 8.** a) Redox potential of  $\text{Cu}^{\text{I}}$  coordination compounds as a function of the average Cu–L bond electron density; b) Electron density change ( $\nabla^2\rho$ ) as a function of the  $s$ -donor capacity of the diimine; c) Half-wave redox potential values as a function of the electron density change ( $\nabla^2\rho$ ) in Cu–L bonds.

The sum of the density of the four BCPs involving the copper center in phenanthroline complexes correlate with the  $E_{1/2}$  according to the Equation  $E_{1/2} = 10.1699 - 120.28 \sum \rho_{\text{bcpl}(\text{Cu}-x)}$  with  $R^2 = 0.95$ , whereas the electronic density of the bonds increase, the half-wave potential of the copper compounds becomes more negative (Figure 8a).

The same behavior was expected for compound **3** (5,5-dmbpy) and **9** (3,4,7,8-tmphen), which do not follow the described tendency; this behavior could be associated with the higher inductive effect produced by the methyl groups that occupy the positions 5 and 5' of the bipyridine and 3,8 of the phenanthroline, which block the effective back-bonding.

Moreover, higher accumulation of electronic density at Cu–L BCPs of bipyridine systems can be observed than for those presented in phenanthroline. This fact supports the hypothesis of a greater electron density close to the metal ion provoked by the poorer capacity of the bipyridine systems to participate in back-bonding interactions as it has been observed in the voltammetric results.

It is interesting to note that for phenanthroline compounds as the electron density of Cu–L bonds increases, the covalence in the sigma bond ( $\alpha^2$ ) decreases as well as the  $\pi$ -bond out of the plane ( $\beta^2$ ), whereas the  $\pi$ -bond in the plane ( $\beta_1^2$ ) increases its covalent character. On the other hand, bipyridine compounds present an increase in the  $\sigma$ - and  $\pi$ -bonds covalence as the electron density in bonds increases.

These results show that both the phenanthroline and bipyridine ligands employ  $\pi$ -bonds to redistribute the excess of electron density that reaches the metal center. However, the influence of the lack of the third aromatic ring in bipyridine systems is observed in the electron density of Cu–L bonds, which is greater than in phenanthroline ones, leading to the increase in the  $\sigma$ -covalent character observed.

The same behavior is observed when the concentration of electron density ( $\nabla^2\rho$ ) is considered instead the electron density, in which case it is possible to distinguish the influence of the position of the methyl group on the diimine in the complete redistribution of the electron density (Figure 9c), in which neither compounds **3** (5,5-dmbpy) nor **9** (3,4,7,8-tmphen) follow the tendency described by the others.

Redistribution of electron density within the coordination sphere of the metal center, observed by the electrochemical and paramagnetic properties, can be explained by the atomic electron delocalization and atomic polarization moments of the copper atom. These concepts have been reviewed by Bader and co-workers.<sup>[29]</sup>

Molecular and atomic electron populations,  $N$  and  $N(A)$ , can be split into two contributions, that is, electron localization ( $\lambda(A)$ ) and delocalization ( $\delta(A,B)$ ) according to Equations (6) and (7):

$$N = \sum_A N(A) + \sum_A \Delta(A) = \lambda + \Delta \quad (6)$$

$$\Delta(A) = \frac{1}{2} \sum_{\text{AB bond}} \delta(A,B) + \frac{1}{2} \sum_{\text{AB no bond}} \delta(A,B) \quad (7)$$

$\lambda(A)$  provides a measure of the number of electrons localized on that atom, whereas  $\delta(A,B)$  accounts for the number of electrons shared by two different atoms, A and B, in the molecule (not necessarily bonded).  $\lambda(A)$  and  $\delta(A,B)$  add up to the total electron localization and delocalization, respectively.<sup>[30]</sup> These two terms are also the sum of the atomic and molecular electron populations and have been used to understand metal–ligand back-donation such as in the case of  $M(\text{CO})_n$  complexes.<sup>[31]</sup>

Furthermore, the molecular dipole moment consists of two contributions: Charge transfer ( $\mu_{\text{CT}}$ ) and atomic polarization ( $\mu(A)$ ). The latter provides a measure of the displacement of the atomic centroid of negative charge from the position of its nucleus and usually opposes  $\mu_{\text{CT}}$ .<sup>[32]</sup> Also, the atomic quadrupole moment ( $Q(A)$ ) describes the accumulation of density along a molecular axis. The changes in the parallel or perpendicular components of  $Q(A)$  provide a measure of the transfer between  $\sigma$  and  $\pi$  density components. Cortes-Guzman and Bader used  $Q(A)$  as a quantifiable demonstration of  $d\pi$ - $p\pi^*$  back donation, which increase  $\pi$  density of a ligand atom in a metal–ligand interaction.<sup>[33]</sup> See Equations S1 and S2 (see the Supporting Information) for definitions of atomic polarization moments.

In the case of the Casiopeinas, the dipole moment of copper atom ( $\mu(\text{Cu})$ ) is directed toward the aromatic ligand, opposing

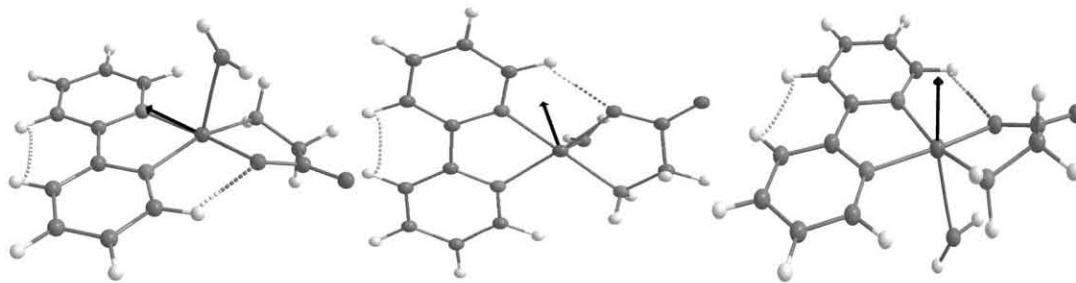


Figure 9. Dipole and quadrupole moment of Cu<sup>II</sup> ion in coordination compounds. From top to bottom: Atomic dipole moment, parallel component of the quadrupole moment, and perpendicular component of the quadrupole moment.

Table 3. Electronic parameters obtained from the DFT calculations.<sup>[a]</sup>

	<i>N</i> (Cu)	$\lambda$ (Cu)	$\Delta$ (Cu)	<i>N</i> (Cu)/Vol(A)	$\mu$ <sub>Cu</sub>	<i>Q</i> <sub>  </sub> (Cu)	<i>Q</i> <sub>⊥</sub> (Cu)
1 (bpy)	27.7850	26.7563	1.0287	0.35741	0.61998	0.57891	-1.8702
2 (44 dmbpy)	27.7869	26.7556	1.0313	0.35744	0.54641	0.58816	-1.8880
3 (55 dmbpy)	27.7867	26.7578	1.0290	0.35742	0.51538	0.57761	-1.8680
4 (phen)	27.7831	26.7597	1.0234	0.35835	0.58728	0.60602	-1.8225
5 (4 mphen)	27.7840	26.7589	1.0251	0.35617	0.56520	0.61697	-1.8711
6 (5 mphen)	27.7840	26.7597	1.0243	0.35813	0.54734	0.59542	-1.8235
7 (47 dmphen)	27.7852	26.7582	1.0270	0.35852	0.52594	0.60754	-1.8420
8 (56 dmphen)	27.7839	26.7589	1.0250	0.35842	0.51348	0.59748	-1.8296
9 (3478 tmphen)	27.7865	26.7591	1.0274	0.35535	0.48412	0.61633	-1.8832

[a] *N*(Cu) = the total number of electrons around the metal ion;  $\lambda$ (Cu) = electrons of copper remaining in copper;  $\Delta$ (Cu) = electrons of copper delocalized in donor atoms;  $\mu$ (Cu) = atomic dipolar moment; *Q*<sub>||</sub>(Cu) and *Q*<sub>⊥</sub>(Cu) = parallel and perpendicular atomic quadrupole moments, respectively.

to the ligand–metal charge-transfer (Figure 9a).<sup>[12a]</sup>  $\mu$ (Cu) can be related with the  $\sigma$  donation from the ligand to the metal, like a  $\sigma$ -donation pathway. Parallel (*Q*<sub>||</sub>(Cu)) and perpendicular (*Q*<sub>⊥</sub>(Cu)) terms of the quadrupole moment of the copper atom can be related with  $\sigma$  and  $\pi$  components of copper density (Figure 9b and 9c).

Employing the descriptors enlisted in Table 3 it is possible to obtain multilinear correlations (see Equations (8)–(11), below) to understand the experimental parameters further the covalence bond descriptors derived from the EPR parameters ( $\alpha^2$ ,  $\beta^2$ , and  $g_{\text{iso}}$ ).

In general, the experimental properties depend mainly on *N*(Cu) or  $\Delta$ (Cu), meanwhile  $|\mu$ (Cu)| and *Q*(Cu) modulate the relationships. In this regard, an increment of the electron population of the copper atom difficult the addition of another electron to the complex and this has to be reflected as an increase in the covalent character of the bonds as well as an increase in the redox potential values.

The redox potential values can be described mainly [Eq. (8)] as a function of the total number of electrons on the metal center weighted by the atomic volume (*N*(Cu)/Vol(Cu)), in which smaller *N*(Cu)/Vol(Cu) gives larger  $E^{1/2}$  values. On the other hand, the way that electrons distribute around the copper atom, accounted by the modulation factors  $|\mu$ (Cu)| and *Q*(Cu), have the opposite behavior, as they increase,  $E^{1/2}$  values slightly increase.

In the case of the description of the isotropic *g* values and  $\alpha^2$ , obtained from the EPR experiments, the main descriptor is also *N*(Cu)/Vol(Cu), followed by the electrons of the metal that are delocalized on the ligands atoms ( $\Delta$ (Cu)). From Equations (9) and (10), it is possible to note that an increment of *N*(Cu)/Vol(Cu) and a decrease of  $\Delta$ (Cu) leads to smaller  $g_{\text{iso}}$  and  $\alpha^2$  values. Finally,  $\beta^2$  [Eq. (11)] mainly depends on *N*(Cu)/Vol(Cu) and the parallel component of the quadrupole atomic

moment (*Q*<sub>||</sub>(Cu)) modulates the description of  $\beta^2$ . An increment of *N*(Cu)/Vol(Cu) and *Q*<sub>||</sub>(Cu) reduce  $\beta^2$  values.

In summary, in a  $\sigma$ -donor/ $\pi$ -acceptor system the experimental properties, redox potential, and magnetic environment of the unpaired electron of Cu<sup>II</sup> complexes can be described as a function of the electron population of the metal ion, the atomic dipole moment and the atomic quadrupole moment, closely related with the charge transfer and the back bonding.

$$E_{1/2}(\text{V}) = 0.246|\mu(\text{Cu})| - 16.136N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) + 0.946Q_{\perp}(\text{Cu}) + 7.096 \quad (8)$$

*n* = 9, *R*<sup>2</sup> = 0.925

$$g_{\text{iso}} = -3.707N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) + 1.396\Delta(\text{Cu}) + 0.188Q_{\perp}(\text{Cu}) + 2.277 \quad (9)$$

*n* = 9, *R*<sup>2</sup> = 0.9429

$$\alpha^2 = -7.488N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) + 4.230\Delta(\text{Cu}) - 0.324Q_{\perp}(\text{Cu}) - 0.485 \quad (10)$$

*n* = 9, *R*<sup>2</sup> = 0.8768

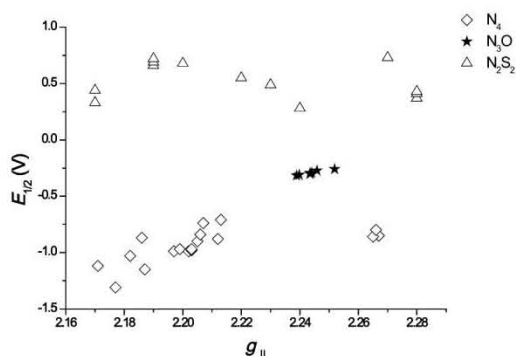
$$\beta^2 = -0.393|\mu(\text{Cu})| - 11.259N(\text{Cu})/\text{Vol}(\text{Cu}) - 1.882Q_{||}(\text{Cu}) + 6.094 \quad (11)$$

*n* = 9, *R*<sup>2</sup> = 0.9178

With the results obtained in this work used to describe the electron density distribution of these compounds, it is possible to explore other Cu<sup>II</sup> coordination compounds with different coordination spheres that also exhibit experimental relationship amid electronic parameters  $E_{\text{red}}$  and  $g_{\parallel}$ .

A preliminary evaluation of the effect in the electron density redistribution due to the changes in coordination sphere of Cu<sup>II</sup> ion can be seen in Figure 10. Complexes with coordination spheres of type N<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>[25b,34]</sup> mimic the active sites of several proteins, whereas compounds with coordination sphere N<sub>3</sub>O, studied in this work, present antineoplastic activity.

With the developed tools it is possible not only to describe the changes produced by varying the nature of donor atoms of the Cu<sup>II</sup> coordination sphere but also describe and predict the fine tuning of electron density distribution produced by the substituent of the ligands.



**Figure 10.** Comparison of several Cu<sup>II</sup> coordination compounds with different donor atoms (N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>O, N<sub>4</sub>) in its coordination spheres; the apical position was occupied by solvent molecules. Compounds studied in this work appear as stars.

## Conclusion

The structural and electronic properties of mixed chelate Cu<sup>II</sup> compounds that involve  $\sigma$ -donor/ $\pi$ -acceptor systems are determined by the capacity of the ligands to participate in  $\pi$ -back-bonding interactions with the metal ion. The capacity of the diimines to participate in the  $\pi$ -back-bonding is strongly related with the nature and position of the substituent of the aromatic system.

For the complexes studied in this work with methyl group as substituent, the substituent effect is additive. Methyl groups in positions 4,7 of phenanthroline and 4,4' of bipyridine (*para*-methyl groups to hetero-N) produce the main changes in the experimental properties determined such as bond lengths, redox potential, and magnetic parameters, whereas substitution in positions 3 and 8 for phenanthroline or 5 and 5' for bipyridine (*meta*-methyl groups to hetero-N) decrease the capacity of the diimine to contribute in back-bonding interactions.  $\pi$ -Back-bonding is the principal factor that modulates the distribution of the electron density around the metal ion.

In this work it has been found that all the studied phenomena can be described with the knowledge of the electron density around the metal ion, its delocalization, and the electronic cloud deformation. Redox potential and magnetic environment of the metal ion in each compound was described employing electronic descriptors obtained from the computational methods in the context of the theory of atoms in molecules such as the total electronic population of the metal atom ( $N(\text{Cu})$ ), delocalization of the metal ion electrons over the donor atoms ( $\Delta(\text{Cu})$ ), atomic dipolar moment ( $\mu(\text{Cu})$ ), and the atomic quadrupole moment ( $Q(\text{Cu})$ ). The main descriptors for the Equations found were  $N(\text{Cu})$  and  $\Delta(\text{Cu})$ , whereas the dipolar and quadrupole atomic moments function as modulators of these properties.

Describing the redox potential and the magnetic parameters as a function of the distortion of the electron density around the Cu<sup>II</sup> ions and considering that the redox potential has already been established as a good electronic descriptor of the biological activity of these kind of compounds, thus, it can be concluded that the electronic descriptors obtained from the computational approach can be used as descriptors of biological activity of inorganic compounds helping this in the rational design of good candidates of metal-based drugs.

## Experimental Section

### Physical measurements

A Fisons Instruments analyzer model EA 1108 was used for elemental analysis determination, using a sulfanilamide standard. A Hewlett-Packard 5484 A diode array spectrophotometer was used to acquire UV/Vis spectra were recorded using methanol solutions at 1 mM final concentration. Conductivity data were obtained using samples with final concentrations of 1 mM in methanol at 25.0 °C on a JENWAY 4330 conductivity-pH meter. Magnetic susceptibility data were collected with a Sherwood Scientific MK-1 Magnetic Susceptibility Balance. All electrochemical measurements were performed in water/methanol using a potentiostat/galvanostat EG&G PAR model 263 controlled by PC software. X-ray diffraction measurements were performed on a Siemens P4 diffractometer and on an Oxford Diffraction Gemini-Atlas diffractometer.

### General synthesis of [Cu(N-N)(glycinato)(H<sub>2</sub>O)]NO<sub>3</sub>

All compounds were synthesized following the reported patents.<sup>[6]</sup> In the next paragraphs are described the general characterization results and the conditions to obtain single crystals (if is the case).

**Aqua(2,2'-bipyridine)(glycinato)copper(II) nitrate (Casiopaina IX-gly) (1):** IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3440, 3200, 1640, 1517, 1426, 1385 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 820, 729, 650 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 616 nm (59 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$  = 1.80 BM;  $\Lambda(\text{MeOH})$  = 79.0 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>Cu (373.8 g mol<sup>-1</sup>): C 38.56, H 3.77, N 14.98; found: C 39.02, H 3.72, N 15.18. Suitable single crystals for X-ray structure analysis were obtained from slowly evaporation of MeOH/H<sub>2</sub>O mixture (50:50, v/v);

**Aqua(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(glycinato)copper(II) nitrate-demihydrate (Casiopaina IV-gly) (2):** IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3430, 3250, 1629, 1519, 1426, 1384 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 822, 722, 635 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) = 624 nm (62 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{\text{eff}}$  = 1.74 BM;  $\Lambda(\text{MeOH})$  = 87.9 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for

$C_{14}H_{16}N_4O_6Cu \cdot 0.5H_2O$  (408.9 g mol<sup>-1</sup>): C 41.09, H 3.94, N 13.70; found: C 40.92, H 4.12, N 14.20. Suitable single crystals for X-ray structure analysis were obtained from slow evaporation of water.

**Aqua(5,5'-dimethyl-2,2'-bipyridine)(glycinato)copper(II) nitrate-hydrate (Casiopéina XI-gly) (3):** IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3430, 3250, 1629, 1519, 1426, 1384 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 822, 722, 635 cm<sup>-1</sup>; UV/Vis (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 602 nm (59 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.88 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 85.2 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu H<sub>2</sub>O (417.9 g mol<sup>-1</sup>): C 40.23, H 3.85, N 13.41; found: C 40.92, H 3.92, N 13.60. Suitable single crystals for X-ray structure analysis were obtained by slow evaporation of water.

**Aqua(1,10-phenanthroline)(glycinato)copper(II) nitrate hydrate (Casiopéina VII-gly) (4):** Blue powder was obtained after solvent evaporation. IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3419, 3258, 1612, 1520, 1430, 1384 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 851, 722, 649 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 610 nm (58 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.80 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 72.0 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu·H<sub>2</sub>O (415.8 g mol<sup>-1</sup>): C 40.43, H 3.87, N 13.47; found: C 41.12, H 3.95, N 13.62. Suitable single crystals for X-ray structure analysis were obtained by slow water evaporation.

**Aqua(4-methyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)copper(II) nitrate hydrate (Casiopéina 4-mgly) (5):** The complex was isolated on EtOH/H<sub>2</sub>O mixture, a blue crystalline powder was obtained. IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3419, 3258, 1612, 1520, 1430, 1384 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 851, 722, 649 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  = 610 nm ( $\epsilon$  = 61 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.80 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 87.2 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu·H<sub>2</sub>O (429.87): C 41.91, H 4.22, N 13.03; found: C 43.27, H 4.18, N 12.95.

**Aqua(5-methyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)copper(II) nitrate dihydrate (Casiopéina V-mgly) (6):** IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3404, 3253, 1632, 1524, 1430, 1384 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 816, 730, 622 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 610 nm (57 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.85 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 83.3 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu·2H<sub>2</sub>O (447.88): C 40.22, H 4.50, N 12.50; found: C 39.95, H 4.63, N 12.39. Suitable single crystals for X-ray structure analysis were obtained by slow evaporation of MeOH/H<sub>2</sub>O mixture.

**Aqua(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)copper(II) nitrate dihydrate (Casiopéina II-gly) (7):** Blue powder was obtained after solvent evaporation, then washed twice with a water/methanol mixture (50:50, v/v). IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3446, 3255, 1602, 1525, 1429, 1383 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 871, 726, 637 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 623 nm (58 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.76 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 75.1 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (443.9): C 43.29, H 4.54, N 12.62; found: C 43.53, H 4.70, N 12.61.

**Aqua(5,6-dimethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)copper(II) nitrate (Casiopéina VI-gly) (8):** IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3421, 3261, 1632, 1525, 1435, 1385 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 822, 709, 597 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 612 nm (60 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.71 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 76.1 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Cu (443.89): C 45.12, H 4.26, N 13.15; found: C 46.11, H 4.21, N 13.43. Suitable crystals for X-ray structure analysis were obtained from slowly evaporation of MeOH/H<sub>2</sub>O mixture.

**Aqua(3,4,7,8-tetramethyl-1,10-phenanthroline)(glycinato)copper(II) nitrate (Casiopéina VIII-gly) (9):** Blue powder was obtained after solvent evaporation and washed with a mixture of water/methanol (50:50, v/v) several times. IR (KBr):  $\tilde{\nu}$  = 3395, 3300, 1620, 1533, 1434, 1385 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 828, 725, 645 cm<sup>-1</sup>; UV (MeOH):  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) = 616 nm (61 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>);  $\mu_{eff}$  = 1.78 BM;  $\Lambda$  (MeOH) = 79.2 S cm<sup>2</sup> mol<sup>-1</sup>; elemental analysis calcd (%) for C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>CuN<sub>4</sub>O<sub>6</sub> (435.9): C 47.63, H 4.88, N 12.34; found (%): C 46.97, H 4.84, N 12.67.

## Single-crystal X-ray diffraction

Crystals of **2** and **6** were collected at 298 K on a Siemens P4 diffractometer, using a monochromated MoK $\alpha$  radiation ( $\lambda$  = 0.71073 Å). Crystal **1**, **3**, and **8** mounted on glass fiber were studied with an Oxford Diffraction Gemini "A" diffractometer with a CCD area detector, with radiation source of  $\lambda_{MoK\alpha}$  = 0.71073 Å using graphite-monochromatized radiation. CrysAlisPro and CrysAlis RED software packages<sup>35</sup> were used for data collection and data integration. A data sets consisted of frames of intensity data collected with a frame width of 1° in  $\omega$ , a counting time of 1.6 s/frame, and a crystal-to-detector distance of 55.00 mm. The double pass method of scanning was used to exclude any noise. The collected frames were integrated by using an orientation matrix determined from the narrow frame scans. Final cell constants were determined by a global refinement; collected data were corrected for absorbance by using analytical numeric absorption correction using a multifaceted crystal model based on expressions upon the Laue symmetry using equivalent reflections. Structure solution and refinement were carried out with the program(s): SHELXS97; SHELXL97; for molecular graphics: ORTEP-3 for Windows;<sup>36</sup> and the software used to prepare material for publication: WinGX 1.80.05.<sup>37</sup> Full-matrix least-squares refinement was carried out by minimizing ( $F_o^2 - F_c^2$ )<sup>2</sup>. All non-hydrogen atoms were refined anisotropically. H atoms of the water group (H–O) and amine group (H–N) were located in a difference map and refined isotropically with  $U_{iso}(H)$  = 1.5 and 1.2  $U_{eq}$  for (O) and (N) respectively. H atoms attached to C atoms were placed in geometrically idealized positions and refined as riding on their parent atoms, with C–H = 0.93–0.99 Å and  $U_{iso}(H)$  = 1.2  $U_{eq}(C)$ , or 1.5  $U_{eq}(C)$  for aromatic, methylene and methyl groups. Crystal data and experimental details of the structures determination are listed in Table 1. Crystallographic data for the structures reported in this paper have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) as supplementary publication nos. CCDC-736760 (**1**), CCDC-736761 (**2**), CCDC-991244 (**3**), CCDC-736763 (**6**), and CCDC-736759 (**8**). These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre via [www.ccdc.cam.ac.uk/data\\_request/cif](http://www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif).

## Electrochemistry

All electrochemical measurements were performed in a water/methanol mixture (1:1, v: v) solution containing 0.1 M potassium nitrate (KNO<sub>3</sub>) as supporting electrolyte and bis-tris propane (BTP, 99 + %) as buffer solution (pH 7.00). The experiments were obtained at sample concentrations of 1 mM in the presence of supporting electrolyte. A potentiostat/galvanostat EG&G PAR model 263 controlled by a PC software was used. A typical three-electrode array was employed for all electrochemical measurements: Glassy carbon disk as working electrode, platinum wire as the counter-electrode, and a silver wire as the reference electrode. The silver electrode was immersed in a water solution with 0.1 M sodium chloride (NaCl) in a separate compartment that was connected to the working cell through a BAS vycor tip. All potentials were reported versus the couple Fc/Fc<sup>+</sup> according to IUPAC. Cyclic voltammetry was initiated from open circuit potential ( $E_{ocp}$ ), the scan rate employed was 0.1 V s<sup>-1</sup> in both cathodic and anodic directions.

## EPR spectroscopy

The EPR measurements were made in quartz tube at 77 K, with a Jeol JES-TE300 spectrometer operating at X-Band fashions at 100 KHz modulation frequency and a cylindrical cavity in the mode

TE<sub>011</sub>. The external calibration of the magnetic field was made with a precision gauss meter Jeol ES-FC5 and microwave frequency with a frequency counter 5350B HP. The spectrometer settings for all spectra were as follows: Center field, 294.5 mT; microwave power 1 mW; microwave frequency 9.10 GHz; sweep width,  $\pm 40$  mT; modulation width, 0.032 mT; time constant, 0.1 s; amplitude, 160; sweep time 120 s; accumulation, 1 scan. Spectral acquisition, manipulations and simulation were performed using the program ESPRIT-382, v1.916. The EPR spectrum was recorded as a first derivation and the main parameter such as g-factor values were calculated according to Weil, Bolton and Wertz<sup>[38]</sup>. All samples were used in a final concentration of 1.0 mM in methanol.

#### Computational details

Crystal structure of complexes were used as starting for optimization at M05-2X/6-31++g(d,p) theoretical level<sup>[39]</sup> with PCM solvent model (water as solvent), using Gaussian 09.<sup>[40]</sup> The M05-2X functional has been successfully used to study weak interactions<sup>[41]</sup> and copper complexes.<sup>[42]</sup> In particular, this functional provides a suitable description of the stacking in the adenine-Casiopina adduct.<sup>[12]</sup> Atomic properties were calculated using AIMAll program.<sup>[43]</sup> Best Multilinear Regressions with experimental properties were obtained with Codessa3 program using atomic properties as descriptors.<sup>[44]</sup>

#### Acknowledgements

The authors thank CONACyT 130500, 179119, 194130, PAPIIT-UNAM IN217613 and IN208113, ICYTDF PINVII-32, Red FARMED for the financial support. J.C.G.-R. and A.L.A.-S. thank CONACyT for a scholarship. Also we want to thank to DGTIC-UNAM for the computer time.

**Keywords:** antitumoral agents • copper • density functional calculations • EPR spectroscopy • pi interactions

- [1] a) T. W. Hambley, *Science* **2007**, *318*, 1392–1393; b) C. X. Zhang, S. J. Lip-pard, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 481–489; c) Z. Guo, P. J. Sadler, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1610–1630; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1512–1531.
- [2] a) S. K. Hadjilakou, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 235–249; b) E. Dubler, R. Buschmann, H. W. Schmalke, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *95*, 97–104; c) S. Gómez-Ruiz, G. N. Kaluderovic, S. Prashar, D. Poloceron, M. Fajardo, Z. Zizak, T. J. Sabo, Z. D. Juranic, *J. Inorg. Biochem.* **2008**, *102*, 1558–1570; d) E. Y. Tshuva, D. Peri, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2098–2115; e) M. J. McKeage, M. J. Maharaj, S. J. Berners-Price, *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 127–135; f) A. Bindoli, M. P. Rigobello, G. Scutari, C. Gabbiani, A. Casini, L. Messori, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1692–1707; g) M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger, B. K. Keppler, *Dalton Trans.* **2008**, 183–194; h) M. J. Clarke, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 209–233; i) B. Serli, E. Zangrando, T. Gianferrara, L. Yel-lowlees, E. Alessio, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 73–83; j) A. Bergamo, G. Sava, *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7817–7823; k) A. Habtemariam, B. Watchman, B. S. Potter, R. Palmer, S. Parsons, A. Parkin, P. J. Sadler, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, 1306–1318; l) A. Garoufis, S. K. Hadjika-kou, N. Hadjiliadis, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 1384; m) H. T. Chifoti-des, K. R. Dunbar, *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 146; n) M. Harlos, I. Ott, R. Gust, H. Alborzina, S. Wölfl, A. Kromm, W. S. Sheldrick, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 3924–3933; o) C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, P. Santini, *Anti-cancer Agents Med. Chem.* **2009**, *9*, 185–211; p) S. Tardito, L. Marchio, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1325–1348; q) M. E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Azuara, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3606–3615.
- [3] K. L. Haas, K. J. Franz, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4921–4960.
- [4] J. J. R. Frausto Da Silva, R. J. P. Williams, *The Biological Chemistry of the Elements*, Clarendon Press, Oxford, **1991**, pp. 388–399.
- [5] S. D. Aust, L. A. Morehouse, C. E. Thomas, *Free Radical Biol. Med.* **1985**, *7*, 3–25.
- [6] B. Halliwell, J. M. Gutteridge, *Methods Enzymol.* **1990**, *186*, 1–85.
- [7] a) L. Ruiz-Azuara, US Patent April 21 (, **1992**), Number 5, 107, 005. US Patent Re35,458, February 18 (**1997**); b) L. Ruiz-Azuara. US Patent No. 5, 576, 326. November 19 (**1996**).
- [8] a) C. Mejía, L. Ruiz-Azuara, *Pathol. Oncol. Res.* **2008**, *14*, 467–472; b) A. G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, J. C. García-Ramos, M. Flores-Alamo, E. Hernández-Lemus, L. Ruiz-Azuara, C. Mejía, *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *126*, 17–25.
- [9] J. Serment-Guerrero, P. Cano-Sanchez, E. Reyes-Perez, F. Velazquez-García, M. E. Bravo-Gomez, L. Ruiz-Azuara, *Toxicol. in Vitro* **2011**, *25*, 1376–1384.
- [10] a) C. Trejo-Solis, G. Palencia, S. Zúñiga, A. Rodríguez-Ropón, L. Osorio-Rico, S. T. Luvia, I. Gracia-Mora, L. Márquez-Rosado, A. Sánchez, M. E. Moreno-García, A. Cruz, M. E. Bravo-Gómez, L. Ruiz-Ramírez, S. Rodríguez-Enríquez, J. Sotelo, *Neoplasia* **2005**, *7*, 563–574; b) F. Carvallo-Chaigneau, C. Trejo-Solis, 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, *Biomaterials* **2008**, *21*, 17–28.
- [11] a) A. De Vizcaya-Ruiz, A. Rivero-Muller, L. Ruiz-Ramírez, G. E. Kass, L. R. Kelland, R. M. Orr, M. Dobrota, *Toxicol. in Vitro* **2000**, *14*, 1–5; b) R. Alemón-Medina, J. L. Muñoz-Sánchez, L. Ruiz-Azuara, I. Gracia-Mora, *Toxicol. in Vitro* **2008**, *22*, 710–715; c) A. Rivero-Müller, A. De Vizcaya-Ruiz, N. Plant, L. Ruiz, M. Dobrota, *Chem.-Biol. Interact.* **2007**, *165*, 189–199; d) L. Hernández-Esquivel, A. Marin-Hernández, N. Pavon, K. Carvajal, R. Moreno-Sánchez, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *212*, 79–88; e) A. Marin-Hernández, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Ramírez, R. Moreno-Sánchez, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, *65*, 1979–1989; f) R. Alemón-Medina, M. Breña-Valle, J. L. Muñoz-Sánchez, M. I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *60*, 219–228; g) A. I. Valencia-Cruz, L. I. Uribe-Figueroa, R. Galindo-Murillo, K. Baca-López, A. G. Gutiérrez, A. Vázquez-Aguirre, L. Ruiz-Azuara, E. Hernández-Lemus, C. Mejía, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e54664.
- [12] a) R. Galindo-Murillo, J. Hernández-Lima, M. González-Rendón, F. Cortés-Guzmán, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 14510–14515; b) J. C. García-Ramos, A. Tovar-Tovar, J. Hernández-Lima, F. Cortés-Guzmán, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Azuara, *Polyhedron* **2011**, *30*, 2697–2703; c) R. Galindo-Murillo, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Esparza, F. Cortés-Guzmán, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 15539–15546.
- [13] M. E. Bravo-Gómez, J. C. García-Ramos, I. Gracia-Mora, L. Ruiz-Azuara, *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 299–309.
- [14] M. A. Halcrow, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 1784–1795.
- [15] B. J. Hathaway in *Comprehensive Coordination Chemistry: The Synthesis Reactions, Properties and Applications of Coordination Compounds, Vol. 5, Late Transition Elements* (Eds.: G. Wilkinson, R. D. Gillard, J. A. McCleverty), Pergamon Press, Oxford, UK, **1987**, pp. 596–729.
- [16] B. J. Hathaway, *Struct. Bonding (Berlin)* **1973**, *14*, 49–67.
- [17] a) Q.-H. Jin, L. Yang, X.-L. Xin, H.-W. Gao, J.-C. Dong, P.-Z. Li, *Z. Kristallogr. New Cryst. Struct.* **2006**, *221*, 383; b) X. Solans, L. Ruiz-Ramírez, A. Martínez, L. Gasque, R. Moreno-Esparza, *Acta Crystallogr.* **1993**, *C49*, 890; c) A. Alvarez-Larena, J. L. Briansó-Penalva, J. F. Piniella, R. Moreno-Esparza, L. Ruiz-Ramírez, G. Ferrer-Sueta, *Acta Crystallogr.* **1995**, *C51*, 852–854.
- [18] B. R. James, R. J. P. Williams, *J. Chem. Soc.* **1961**, 2007–2019.
- [19] a) H. Sigel, *Angew. Chem.* **1975**, *87*, 391–400; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1975**, *14*, 394–402; b) R. Griesser, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **1970**, *9*, 1238–1243; c) P. R. Huber, R. Griesser, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **1971**, *10*, 945–947; d) H. Sigel, P. R. Huber, R. Griesser, B. Pijls, *Inorg. Chem.* **1973**, *12*, 1198–1200.
- [20] L. P. Hammett, *Physical Organic Chemistry*, McGraw-Hill Book, New York, **1940**, pp. 184–207.
- [21] A. A. Schilt, G. F. Smith, *J. Phys. Chem.* **1956**, *60*, 1546–1548.
- [22] G. Sanna, M. I. Pilo, M. A. Zoroddu, R. Seeberand, S. Mosca, *Inorg. Chim. Acta* **1993**, *208*, 153–158.
- [23] D. B. Rorabacher, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 651–697.
- [24] B. A. Goodman, J. B. Raynor, *Adv. Inorg. Chem. Rad.* **1970**, *12*, 135–362.



- [25] a) D. Kilverson, R. Neiman, *J. Chem. Phys.* **1961**, *35*, 149–155; b) J. Peisach, W. E. Blumberg, *Arch. Biochem. Biophys.* **1974**, *165*, 691–708; c) J. I. Zink, R. S. Drago, *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4550–4554.
- [26] A. Tovar-Tovar, L. Ruiz-Ramirez, A. Campero, A. Romerosa, R. Moreno-Esparza, M. J. Rosales-Hoz, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1045–1053.
- [27] a) E. Bill, J. Müller, T. Weyhermüller, K. Wieghardt, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 5795–5802; b) R. P. John, A. Sreekant, V. Rajakannau, T. A. Ajith, M. R. P. Kurup, *Polyhedron* **2004**, *23*, 2549–2559; c) M. A. Ali, A. H. Mirsa, R. J. Fereday, R. J. Butcher, J. M. Fuller, S. C. Drew, L. R. Gahan, G. R. Hanson, B. Moubarak, K. S. Murray, *Inorg. Chim. Acta* **2005**, *358*, 3937–3948; d) P. B. Sreeja, M. R. P. Kurup, A. Kishore, S. G. Bath, *Polyhedron* **2006**, *25*, 61–70; e) I. Uçar, B. Karabulut, A. Bulut, O. Büyükgüngör, *J. Mol. Struct.* **2007**, *834–836*, 336–344; f) M. A. Ali, H. J. H. A. Bakar, A. H. Mirza, S. J. Smith, L. R. Gahan, P. V. Bernhardt, *Polyhedron* **2008**, *27*, 71–79.
- [28] R. F. W. Bader, H. Essén, *J. Chem. Phys.* **1984**, *80*, 1943–1960.
- [29] R. F. W. Bader, A. Streitwieser, A. Neuhaus, K. E. Laidig, P. Speers, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4959–4965.
- [30] C. F. Matta, *J. Comput. Chem.* **2014**, *35*, 1165–1198.
- [31] a) E. Matito, M. Solá, *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 647–665; b) P. Macchi, P. Sironi, *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *238*, 383–412.
- [32] C. F. Matta in *The Quantum Theory of Atoms in Molecules: From Solid State to DNA and Drug Design* (Eds.: C. F. Matta, R. J. Boyd), Wiley, Weinheim, **2007**, pp. 1–34.
- [33] F. Cortés-Guzmán, R. F. W. Bader, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 633–662.
- [34] a) H. Yokoi, W. Addison, *Inorg. Chem.* **1977**, *16*, 1341–1349; b) T. Sawada, K. Fukumaru, H. Sakurai, *Chem. Pharm. Bull.* **1996**, *44*, 1009–1016; c) E. I. Solomon, R. K. Szilagy, S. DeBeer, G. L. Basumallick, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 419–458; d) E. I. Solomon, D. E. Heppner, E. M. Johnston, J. W. Ginsbach, J. Cirera, M. Qayyum, M. T. Kieber-Emmons, C. H. Kjaergaard, R. G. Hadt, L. Tian, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 3659–3853.
- [35] Oxford Diffraction. CrysAlis CCD and CrysAlis RED. Oxford Diffraction Ltd, Abingdon, **2007** England.
- [36] R. C. Clark, J. S. Reid, *Acta Crystallogr.* **1995**, *A51*, 887–897.
- [37] a) G. M. Sheldrick, SHELXS97 and SHELXL97, **2008**, University of Göttingen, Germany; b) L. J. Farrugia, *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 565–566.
- [38] *Electron Spin Resonance: Elementary Theory and Practical Applications*, (Eds.: J. A. Weil, J. R. Bolton, J. E. Wertz), Wiley, New York, **1994**.
- [39] Y. Zhao, N. E. Schultz, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2006**, *2*, 364–382.
- [40] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Menonucci, 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, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. 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, Inc., Wallingford CT, **2009**.
- [41] Y. Zhao, D. G. Truhlar, *J. Chem. Theory Comput.* **2007**, *3*, 289–300.
- [42] Y. Jeanvoine, R. Spezia, *J. Mol. Struct.* **2010**, *954*, 7–15.
- [43] AIMAll (Version 10.03.25), Todd A. Keith, **2010** (aim.tkgristmill.com).
- [44] Codessa 3, (Version 3.2.5), Semicem Inc., Shawnee KS, USA **2013** (www.semicem.com).
- [45] E. Craven, C. Zhang, C. Janiak, G. Rheinwald, H. Lang, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2003**, *629*, 2282–2290.
- [46] M. Charton, *J. Org. Chem.* **1966**, *31*, 3739–3745.

Received: March 25, 2014

Published online on September 4, 2014

# Intercalation processes of copper complexes in DNA

Rodrigo Galindo-Murillo<sup>1</sup>, Juan Carlos García-Ramos<sup>2</sup>, Lena Ruiz-Azuara<sup>2</sup>, Thomas E. Cheatham, III<sup>1,\*</sup> and Fernando Cortés-Guzmán<sup>3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Skaggs Hall 201, University of Utah, Salt Lake City, UT 84112, USA, <sup>2</sup>Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 3000, 04510 México City, Mexico, <sup>3</sup>Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, DF 04510, Mexico and <sup>4</sup>Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable UAEMex-UNAM, carretera Toluca-Atzacmulco km 14.5, Toluca, México 50200, Mexico

Received March 25, 2015; Revised April 28, 2015; Accepted April 28, 2015

## ABSTRACT

The family of anticancer complexes that include the transition metal copper known as Casiopeínas® shows promising results. Two of these complexes are currently in clinical trials. The interaction of these compounds with DNA has been observed experimentally and several hypotheses regarding the mechanism of action have been developed, and these include the generation of reactive oxygen species, phosphate hydrolysis and/or base-pair intercalation. To advance in the understanding on how these ligands interact with DNA, we present a molecular dynamics study of 21 Casiopeínas with a DNA dodecamer using 10  $\mu$ s of simulation time for each compound. All the complexes were manually inserted into the minor groove as the starting point of the simulations. The binding energy of each complex and the observed representative type of interaction between the ligand and the DNA is reported. With this extended sampling time, we found that four of the compounds spontaneously flipped open a base pair and moved inside the resulting cavity and four compounds formed stacking interactions with the terminal base pairs. The complexes that formed the intercalation pocket led to more stable interactions.

## INTRODUCTION

Metal complexes that interact with DNA have gained considerable interest as diagnostic agents and chemotherapeutic drugs (1,2). These include complexes of transition metals from groups 8–12 with dozens of combinations of ligands and oxidation states (3–6). Among the transition metals, copper has also been extensively studied and proven as a promising candidate for drug development (7–9). Copper toxicity has been hypothesized to come from its ability to

produce reactive oxygen species (10), to displace other metal ions, to induce lipid peroxidation (11) and/or to directly cleave nucleic acids (12–14). Experimental data suggest that these compounds interact directly with DNA, however, the specific molecular interactions and modes of binding are not clearly established (15).

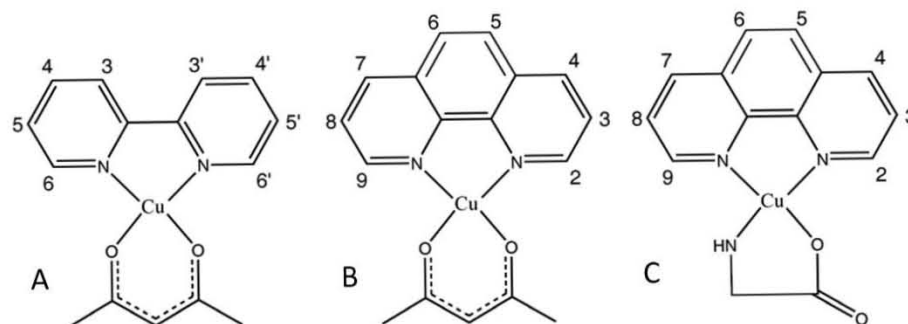
The Casiopeínas® family of copper compounds (CCs) have been in active research since 1980s (16–18). These complexes have shown promising biological activity to a myriad of tumors both *in vitro* and *in vivo* (19–23); because of this, phase I clinical trials are currently underway for two of the compounds. The general formula is [Cu(NN)(NO)]NO<sub>3</sub> and [Cu(NN)(OO)]NO<sub>3</sub> where the NN ligand denotes either 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline (the aromatic ligand) NO represent an essential amino acid or peptides and the OO represents a non-aromatic ligand either acetylacetonate or salicylaldehyde (Figure 1). *In vitro*, assays have been conducted for multiple cell lines (22,24,25) having a ~10-fold enhanced effect when in comparison with the de facto transition-metal anticancer drug cis-platin (19,26,27). Experimental observations using Casiopeínas (28) and similar copper complexes showed nuclease activity when in contact with DNA (29–31) similar to the activity detected in other metal complexes that include Co, Ni, Ru, Zn and Rh (32–35). The intent of studies of the specific interactions between the Casiopeínas family of complexes and DNA is to facilitate the development of drugs with increased specificity and reduced toxic side effects. Querying the protein data bank (PDB) for drug-DNA structures that contain copper complexes shows structures where copper ions form complexes with the nucleobases in a Z-DNA configuration (36). Schultz and co-workers report a modified B-DNA chain with modified residues that forms a complex with added copper ions (37). Neidle and co-workers report a very interesting copper (II) salphen complex stacked between two anti-parallel G-quadruplex chains (38). Electron paramagnetic resonance (EPR) techniques have been used to study the interactions between DNA chains and

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +52 55 56224472; Email: fercor@unam.mx

Correspondence may also be addressed to Thomas E. Cheatham, III. Tel: +8015879652; Fax: +8015859119; Email: tec3@utah.edu

© The Author(s) 2015. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)



**Figure 1.** Representative 2D structures from the Casiopeinas<sup>®</sup> family of compounds. (A)  $\text{Cu}[(2,2'\text{-bipyridine})(\text{acetylacetonate})]^+$ , (B)  $\text{Cu}[(1,10\text{-phenanthroline})(\text{acetylacetonate})]^+$  and (C)  $\text{Cu}[(1,10\text{-phenanthroline})(\text{glycinate})]^+$ .

(1,10-phenanthroline)-copper(II)-(amino acids) complexes (29,39). Species aligning to the EPR measured  $g_{\parallel}$  axis are almost parallel to the phenanthroline moiety in proximity to DNA, however, it is not clear how deep the phenanthroline ring inserts into the DNA double helix. Further computational studies modeling the drug-DNA interactions have suggested the atomic mechanism by which complexes can interact with either the grooves of the DNA or via intercalation between base pairs, and these studies have suggested information about the thermodynamic and energetic properties (2,40). Several groups have applied molecular dynamics (MD), quantum mechanics (QM) and hybrid methodologies (QM/MM) to models of copper complexes binding with DNA (41–45). The complex  $\text{Cu}[1,10\text{-phenanthroline}]^{2+}$  with multiple functional groups and a serinol link between the ligands have been studied by Magistrato and co-workers using MD and QM and the simulations and energetic analyses suggest that these complexes bind to the DNA in the minor groove with a partial intercalation between base pairs (43) with related calculations using QM methodologies yielding similar results (42). In 2012, we reported a MD-DFT-QTAIM study to determine the specific site of recognition between a copper complex (CC) and DNA (46). The formation of the CC–desoxyribose-phosphate adduct in the minor groove proves to be a good candidate as initial step toward the cleaving of DNA chains. The copper atom within the complex links to an oxygen atom of a phosphate group, whereas the aromatic ligand interacts with the desoxyribose by means of  $\text{C}-\text{H}\cdots\pi$ ,  $\text{O}\cdots\pi(\text{C})$  and  $\text{O}\cdots\pi(\text{N})$  contacts. Here we expand on the previous work to more directly understand the intercalation process of a family of 21 Casiopeinas and to also determine the preference of the CC to remain within the minor groove versus undergo intercalation by a MD study. Thanks to recent advances in biomolecular simulation methods applied to DNA and access to large-scale computational resources, it is now possible to reproducibly converge the structure of DNA (47,48) and also, as shown in this work, to spontaneously observe intercalation processes of CC's in MD simulations.

## MATERIALS AND METHODS

The 21 compounds investigated in this work are listed in Table 1 with representative structures shown in Figure 1. The starting structure was based on the X-ray crystallography structures of the free CC when available. All structures were fully optimized using density functional theory with the M05-2X (49–51) meta-GGA hybrid functional and the 6-311+G(2d,2p) basis set. Starting with the optimized geometry, the molecular mechanics parameterization for each copper compound was facilitated using the antechamber program included in the AmberTools 14 software and the General Amber Force Field (GAFF)(52) for small organic molecules. Atomic charges were generated using the RESP methodology at the HF/6-31G\* level of theory with the aid of the R.E.D server (53). Non-bonded Lennard-Jones parameters for the copper atom ( $\epsilon = 0.0427$  kcal/mol,  $R_{\text{min}}/2 = 1.0330$  Å) were taken as reported by Babu and co-workers (54), and previous work using these sets of parameters have yielded results that match experimental structures (46). To validate and assess the model parameters for each compound, 10 ns of MD simulation was performed on each compound (TIP3P (55) water model, 1000 steps of minimization and 5000 steps of heating, 300 K final temperature) to ensure proper sampling of representative structures. Comparison between the available X-ray crystals, DFT-optimized calculations and the average structures from the MD simulations is shown in Supplementary Table 2S of the supporting material.

As a model for understanding the binding of these 21 copper compounds to DNA we used the Dickerson-Drew dodecamer (DDD) with the sequence  $d(\text{CGCGAATTCGCG})_2$  as a model system. The high-resolution structure of the free DNA was obtained from the PDB database (PDB code: 1BNA) and MD simulations were performed with the parmbsc0 (62) modifications of the Cornell ff99 force field (63). Crystallization waters and ions were removed and hydrogen atoms were added according to canonical templates included in the force field using tLEaP. Each copper compound was manually oriented in the minor groove of the DDD using the Accelrys DS Visualizer (64). Previous work suggested that the preferred binding site for these type of compounds is in the minor groove of DNA (46). The starting position

**Table 1.** List of compounds used in this study

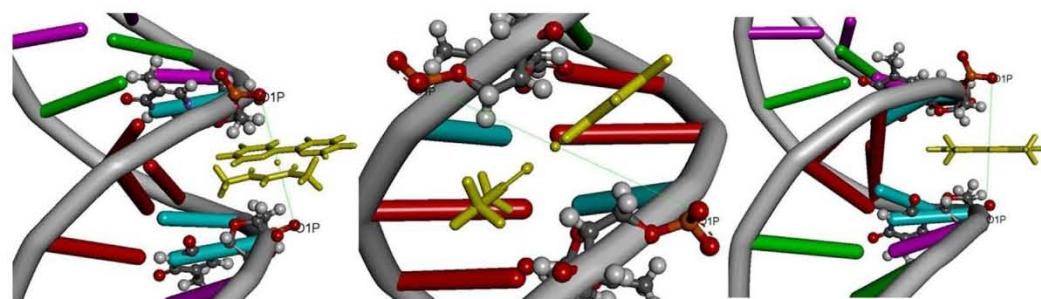
Compound number	X	Aromatic ligand	Secondary ligand	X-ray
01	H	Bipyridine	acac	(56)
02	4,4'-diMe	Bipyridine	acac	(57)
03	H	Phenanthroline	acac	(56)
04	4-Me	Phenanthroline	acac	-
05	5-Me	Phenanthroline	acac	-
06	4,7-diMe	Phenanthroline	acac	(19)
07	5,6-diMe	Phenanthroline	acac	-
08	3,4,7,8-tetra Me	Phenanthroline	acac	-
09	5-phenyl	Phenanthroline	acac	-
10	4,7-diphenyl	Phenanthroline	acac	-
11	5-Cl	Phenanthroline	acac	-
12	5-NO <sub>2</sub>	Phenanthroline	acac	-
13	H	Phenanthroline	gly	(58)
14	4-Me	Phenanthroline	gly	-
15	5-Me	Phenanthroline	gly	(59)
16	4,7-diMe	Phenanthroline	gly	(60)
17	5,6-diMe	Phenanthroline	gly	(59)
18	3,4,7,8-tetra Me	Phenanthroline	gly	(61)
19	4,7-diphenyl	Phenanthroline	gly	(60)
20	5-Cl	Phenanthroline	gly	-
21	5-NO <sub>2</sub>	Phenanthroline	gly	-

acac – acetylacetonate; diMe – dimethyl group; Me – methyl group; tetraMe – tetra methyl group; gly – glycinate. The X substituent is located in the aromatic ligand (either bipyridine or phenanthroline in all the cases).

for the copper was the same for all the systems and was placed between the atoms DT20:O1P and DT8:O1P. The distance between these two atoms is 11.6 Å so that the copper atom was placed 5.8 Å from both the oxygen atoms and parallel to the direction of the minor groove and models were built both with the aromatic and non-aromatic ligands inside the minor groove (Figure 2). With these configurations, the compounds starting structures are next to the central A6-T7 step. For compounds 04, 05, 09 and 11–21, all of which are non-symmetric, the starting position was in either an  $\alpha$  or a  $\beta$  position: for the compounds Cu[(4-Me-phen)(acac)]<sup>+</sup>, Cu[(5-Me-phen)(acac)]<sup>+</sup>, Cu[(5-phenyl-phen)(acac)]<sup>+</sup>, Cu[(5-Cl-phen)(acac)]<sup>+</sup> and Cu[(5-NO<sub>2</sub>-phen)(acac)]<sup>+</sup>, the  $\alpha$  position corresponds to the substituent of the aromatic ligand placed within the minor groove and  $\beta$  position with the substituent placed away from the minor groove (the molecule is flipped 180° in the Z axis). For the compounds with the glycinate ligand (13–21), the  $\alpha$  position is with the carboxylate group within the minor groove and  $\beta$  position with the carboxylate group placed away from the minor groove.

Joung–Cheatham Na<sup>+</sup> cations (65) were added to neutralize the system and the system was solvated within a truncated octahedral periodic box of ~71 Å per side size with the TIP3P water model using a 10 Å distance from any solute atom. Excess Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> (~55 ions for each system) were added to reach a concentration of ~150 mM to simulate the intracellular ionic conditions. To avoid any biasing created by the initial placement of the ions, the **randomizeions** command of CPPTRAJ was used in which a randomly chosen water molecule is swapped for an ion and a new set of coordinates is generated for every simulation. Electrostatic interactions were calculated using the particle mesh Ewald method (66,67) with a cutoff value of 9 Å and default parameters, a 2 fs integration time step and the SHAKE (68) algorithm to constrain all bonds with hydro-

gen atoms (tolerance set to 0.00001 Å). Initial minimization was done using 500 steps of steepest descent and 500 steps of conjugate gradient minimization with a 25 kcal/mol force restraint applied to the DNA and copper-compound atoms. Afterward, heating of the system was carried out in a two-step method using the same restraint force constant on the complex, first step raising the temperature to 300 K over 5000 steps and then a 50 000-step equilibration at constant temperature. Next we gradually decreased the harmonic restraints to the complex with 1000 steps of minimization and 25000 steps of MD equilibration using 5, 4, 3, 2, 1 and 0.5 kcal/mol restraint values. The solvent environment reached expected density values of ~1.0 g/l and the ions relaxed from the initial coordinates. The equilibration procedure was followed by 10  $\mu$ s of production simulation using constant temperature at 300 K (Berendsen thermostat, coupling value of 5.0)(68). A total of 35 simulations were carried out, trajectory information was saved every 1 ps of MD simulation time. Clustering analysis was performed using the **dbscan** algorithm implemented in CPPTRAJ on the Casiopeina (CAS residue) after a root mean square (RMS) fit to the first frame of simulation using the DNA residues. The fit created a common reference for the DNA so the clustering algorithm, which was performed based on the binding molecule, was able to detect root mean square deviation (RMSD) differences, which generated the different binding positions. Additional values used were a value of no more than 2 Å between clusters and a sieve value of 100 frames. Energy interactions between the DNA 12-mer and the copper complex were estimated using the MMPBSA.py script (69). Ionic strength was set to 150 mM with a solute dielectric constant of  $\epsilon = 1.0$  and a solvent dielectric constant of  $\epsilon = 80$ . Five thousand frames from the most populated cluster were used for the MMPBSA binding energy calculations. Selected exemplar CPPTRAJ inputs used for the analysis are included in the supporting material, Supple-



**Figure 2.** Representative starting position for the 21 copper complexes in the minor groove of the DNA, oriented between the A6T7 and T18A19 base-pair steps. The copper atom of the complex is at a distance of 5.8 Å from each oxygen of the phosphate group. The DNA chain and the copper complex are in licorice representation, thymine 8 and 20 are in the ball and stick representation.

mentary Table S2. To study the free energy of the copper compound bound to the intercalation site of the DNA, we used the representative structure of the most populated cluster from the clustering analysis as a starting point, which has the ligand bound in the intercalation pocket as the initiation point for umbrella sampling analysis. The reaction coordinate was the distance between the copper atom and the four atoms around it (N–N for the aromatic ligand and O–O for the acetylacetonate) and the center of mass of the binding pocket formed by the four nucleotides. We used a distance reaction coordinate from 0.2 to 20 Å using 0.2 increment for a total of 100 windows with a 15.0 kcal/mol Å<sup>2</sup> harmonic restraint constant. Each step of the reaction coordinate was 5 ns long after an equilibration step of 1 ns. Each window was run with five independent copies to obtain better estimates. The potential of mean force profile was obtained using the WHAM methodology (70,71). All the quantum calculations were performed using the G09-D.01 revision of Gaussian (72). MD simulations were run using the AMBER12(73) software and trajectory analysis was made using the development version of CPPTRAJ v14 (74). DNA structural parameters were obtained using the Curves+ and Canal software (75).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Interaction of the copper complexes with DNA

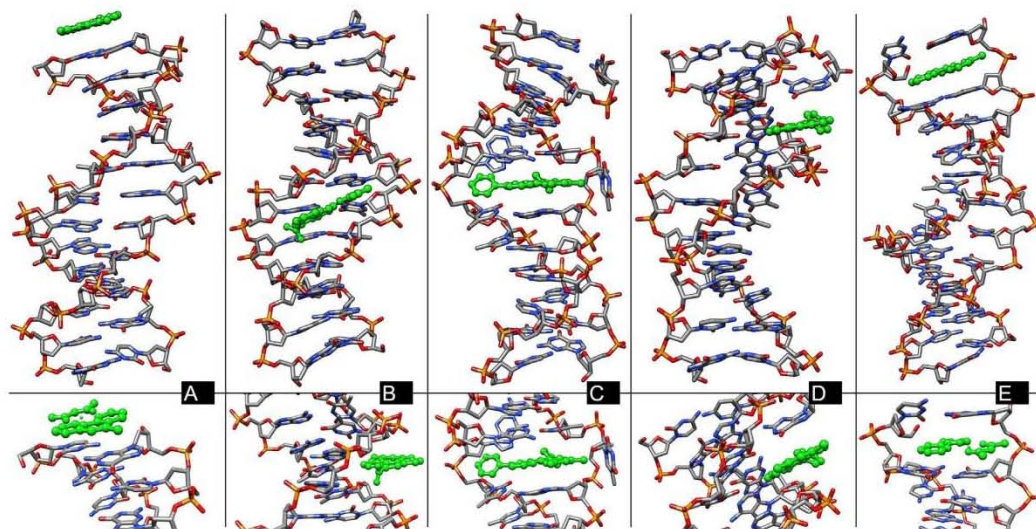
The RMSD with respect to the experimental structure of the free DNA is presented in Supplementary Figure 1S of the supporting material. The RMSD values do not include base pairs at the edges of the DNA to avoid higher RMSD values caused by terminal base-pair fraying events which has been observed in nucleic acids simulations using the AMBER force fields (47,48). In Figure 3, we show five representations of the interactions found in the 35 simulations studied in this work obtained from the representative structure from the most populated cluster using clustering analysis described in the methodology section. Each final configuration (from A–E, as defined in Figure 3 and Table 2) aids with the analysis of the observed results. The most populated cluster represents the binding conformation that is populated for the majority of time during the 10 μs of MD simulation. The representative binding conformations found for each of the simulations are described in Table 2.

From the full data set, 23 of the systems generated an interaction of type A where the copper compound detaches from the minor groove and diffuses along the backbone of the DNA until reaching one of the chain edges where the compound stacks on the terminal base pairs. The DNA RMSD values do not increase above 0.2 Å with respect to the starting structure suggesting that the binding interaction does not produce any significant change in the DNA chain for this type of interaction (Table 2). All of these systems explored multiple conformations and detached completely from the DNA, although the prevalent structure as found by the clustering analysis was the stacking interaction at the end of the chain. As shown in Table 2, the type A binding mode is not as energetically favored as the others. The type B interactions tend to be more favorable than the terminal base-pair-stacked binding mode.

The type B configuration is characterized by binding of the ligands within the minor groove of the DNA duplex with configurations very similar to the starting point for all the MD simulations. Complexes 17α, 19α and 19β presented this interaction. The compound 19β remained with both the aromatic and non-aromatic ligand facing the groove while the compound 19α shifted the aromatic ligand toward the groove, exposing the glycinate toward the solvent. Compound 17α remained with the non-aromatic ligand toward the minor groove. After ~125 ns, the complex turned 185° on the Z axis until the aromatic moiety and the carboxylic side of the glycinate again faced the inside of minor groove and remained in that configuration for the rest of the simulation (refer to the structures in the supporting material).

The RMSD plot for molecule 03 shows a difference of 1.5 Å starting after 400 ns and lasted for the rest of the simulation. The interaction of this molecule with DNA resulted in a base-pair eversion/opening toward the major groove followed by intercalation of the copper complex in the resulting pocket (configuration type C). This configuration type is also present for compounds 02, 05β and 10. This interaction, which tends to display the most favorable binding affinity, will be discussed in the next section of the article.

Type D configuration consists of the ligand bound to the minor groove but close to one of the ends of the chain where the compound forms a stacking interaction with one of the frayed terminal nucleotides (residues 1, 24, 12 or 13



**Figure 3.** Representative types of resulting interactions found from the 35 simulations. The bottom panel highlights close-up detail of the structure depicted in the top panel. Each letter represents one of the dominant binding configurations found from the clustering analysis. A: stacking on the terminal base pairs of the DNA chain, B: minor-groove binding, C: intercalation with base-pair displacement/opening, D: minor-groove binding with stacking of one of the terminal frayed bases, and E: intercalation near the end of the DNA chain. The copper complex is colored in green. Water molecules, counter ions and hydrogen atoms are hidden to facilitate visualization. Structures shown are a single-structure snapshot at 10  $\mu$ s simulation time from complexes 05, 12b, 10, 09 $\alpha$  and 01.

in the DDD). For 09 $\alpha$ , the compound diffuses inside the minor groove throughout the simulation until it reaches the G10C15 position. In this site, G12 frays toward the minor groove and forms a stacking interaction with the ligand. The interaction lives for  $\sim$ 80 ns and then the G12 base flips back to pair again with C13. The compounds remain in the minor groove for the rest of the simulation time.

Compound 01 presents low RMSD fluctuations with respect to the reference frame, although the clustering analysis showed an intercalating structure near the terminal base pairs (configuration type E). The process of this intercalation is summarized in Figure 4. The top plot presents the distance measures between the complex and residues 12 and 13 at the edge of the DNA chain. At the start of the simulation, the compound is located in the minor groove, close to residue 6, which gives a distance of  $\sim$ 22–24 Å. After only 80 ns, the compound detaches from the minor groove and diffuses close to the DNA backbone until it finds the edge of the DNA and stacks above residues G12 and C13 (similar to type A configuration in Figure 3). After  $\sim$ 1800 ns of a type A configuration, base opening (fraying) of residue G12 toward the minor groove causes an increase in the distance between residue and complex (marked as B in Figure 4). This causes the complex to reposition toward residue C13, increasing the stacking interaction and lowering the distance between both molecules. After  $\sim$ 100 ns, the complex slides away from residue C13 and stacks with the base pairs C11 and G14. Residue 13 flips back to stack again with the complex, but now from the opposite side (marked as C). Residue 13 reforms the Watson–Crick (WC) pairing with residue 12 and the intercalation is complete. The spike marked as D in Figure 4 corresponds to a fraying event of both residues 12

and 13 that lasts for  $\sim$ 95 ns before both residues move back into position. The average structure for the most populated cluster is shown in Supplementary Figure S2 of SI for each ligand molecule. For compound 11 $\alpha$ , the copper complex detached from the minor groove and shifted toward the end of the DNA interacting with the fraying base pairs for  $\sim$ 3.1  $\mu$ s until the intercalation formed which then remained for the rest of the simulation.

The effect of the copper complexes and the five different types of binding to DNA observed in the simulations can be summarized comparing the structure from the clustering analysis with the crystal experimental structure of the free DNA (Table 2). As already observed in the plots of RMSD versus time available in the supporting material, the systems that have the highest deviation from the experimental structure are the ones in type C configuration (3.3–4.3 Å), where 2 nucleotides are flipped toward the major groove. The type D configuration also presents high divergence in RMSD due to the distortion of the nucleotides present at the end of the DNA chain, flipping toward the minor groove. The rest of the simulations have values between 1.7 and 2.7 Å, which are expected values, consistent with previous MD simulation work, since we are including the terminal base pairs at each end of the DNA that have multiple terminal base-pair fraying events. The lowest RMSD values are present in the type A configuration. This is also expected because the copper complex detaches from the DNA and forms a stacking interaction with a base pair at the end of the DNA, this actually lowers the frequency of fraying, stabilizing the DNA and hence lowering the RMSD difference from the crystal structure.

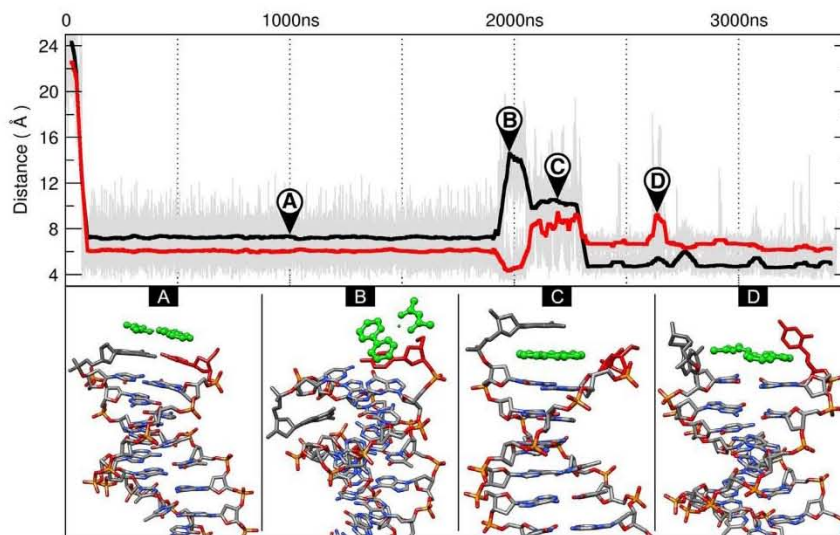
**Table 2.** Types of interaction observed for each MD simulation run (refer to Figure 3) as represented by the most populated cluster

Complex name	Type of interaction (Fraction)	RMSD versus experimental structure (Å)	$\Delta G$ (kcal/mol)
01	E (73%)	2.4	-27.0
02	C (90%)	2.3	-38.6
03	C (96%)	3.2	-40.2
04 $\alpha$	A (96%)	2.1	-18.9
04 $\beta$	A (96%)	1.8	-19.1
05 $\alpha$	A (36%)	2.1	-18.9
05 $\beta$	C (97%)	4.5	-40.0
06	A (70%)	2.2	-19.9
07	E (68%)	2.3	-29.5
08	A (93%)	1.7	-20.9
09 $\alpha$	D (74%)	3.1	-29.4
09 $\beta$	A (83%)	1.7	-21.0
10	C (93%)	3.3	-44.6
11 $\alpha$	E (47%)	2.1	-28.8
11 $\beta$	A (49%)	1.8	-19.8
12 $\alpha$	A (75%)	2.6	-20.5
12 $\beta$	A (75%)	2.8	-20.8
13 $\alpha$	A (49%)	2.0	-17.0
13 $\beta$	A (43%)	2.2	-16.7
14 $\alpha$	A (27%)	1.7	-16.3
14 $\beta$	A (54%)	1.8	-17.0
15 $\alpha$	A (25%)	2.7	-17.1
15 $\beta$	A (23%)	2.6	-19.1
16 $\alpha$	A (32%)	2.2	-24.6
16 $\beta$	A (22%)	2.1	-17.9
17 $\alpha$	B (43%)	2.1	-19.6
17 $\beta$	A (16%)	1.9	-17.1
18 $\alpha$	A (58%)	2.4	-17.8
18 $\beta$	A (51%)	1.7	-17.0
19 $\alpha$	B (44%)	2.2	-25.7
19 $\beta$	B (95%)	1.8	-34.1
20 $\alpha$	D (34%)	2.8	-22.9
20 $\beta$	A (34%)	2.3	-18.8
21 $\alpha$	A (27%)	2.9	-18.2
21 $\beta$	A (21%)	2.5	-15.3

The percentage denotes the amount of time spent in that particular conformation with respect to the total simulation time. RMSD values of the highest populated structure from the clustering analysis versus the experimental structure (PDB entry 1BNA) using all residues.  $\Delta G$  values obtained from 5000 frames using the most populated cluster trajectory.

Overall, from the 35 simulations performed, the majority (~66%) are type A with similar populations observed for the type B (~9%), type C (~11%), type D (~6%) and type E (~9%) interactions. Since the simulations were performed without any type of biasing or restraint on the DNA or the ligand, the interaction where the copper complex is stacking at the end of the DNA is the most common one. This does not mean that the terminal stacking interaction is energetically favored, in fact, the calculated energy-binding values presented in this work (Table 2) show that type A binding has overall lower values compared to the other types of binding. The process for type A of interaction has been previously discussed and observed in similar unbiased, unrestrained drug-DNA simulations (76,77). We can attribute this interaction as being predominant in our results mainly to three observations: (i) a lack of proper binding of the ligand with the minor-groove environment that causes the ligand to shift through the cavity until there is no more DNA; (ii) complete detachment of the ligand from the minor groove toward the solvent; and (iii) steric hindrance caused by the substituent present in the aromatic ligand that causes the whole complex molecule to either shift inside the groove or loose the binding completely. The majority of

the complexes that interact in the type A configuration do not have any substituents in the 4, 4' position (in the case of the bipyridine aromatic ligand) nor in the 4, 7 position (for the phenanthroline ligand). Exceptions are compounds 02, 10 and 19. None of the complexes with the acetylacetonate ligand (complexes 01 to 12) were found in the minor groove (type B), whereas three of the complexes with the glycinate ligand formed stable minor-groove binding: system 17 $\alpha$  that has 5,6-dimethyl substituent and both systems using complex 19 which have 4,7-diphenyl substituents in the aromatic ligand. The 17 $\alpha$  system remains bound for the whole simulation, fluctuating between the A5T20 and A6T19 base pairs and forming hydrogen-bonding interactions of the methyl group in position 5 of the phenanthroline ligand with the backbone residues and hydrogen bonding of the aromatic ligand with N3 of adenine. The presence of the extra phenyl ring in compound 19 stabilizes the binding as the ring goes inside the minor groove, supplying the complex with extra binding sites and hydrogen-bond interactions with the DNA backbone. The system 19 $\alpha$ , which started with the carboxylate group of the glycinate toward the minor groove made a 180° turn in the Z-axis from 120 to 200 ns time so that the carboxylate group now is facing



**Figure 4.** The process of intercalation at the terminal base pairs as observed in MD simulation. Top: running average (500 frames) of the distance between G12 and copper complex 01 (black) and the distance between C13 and the same compound 01 (red). The original data are shown in the background in gray. Bottom: snapshots at different positions during the MD simulation. Compound 01 is shown in green. Residue 12 is in gray and residue 13 is in red. Hydrogen atoms are hidden for clarity.

toward the solvent and the amino part toward the minor groove in the same orientation as the 19 $\beta$  system. This orientation is present for the remaining of the simulation. The 19 $\beta$  system fluctuated between T7A18 and T8A17 and only minor readjustments of the ligand within the groove were observed.

#### Base-pair eversion and intercalative interactions

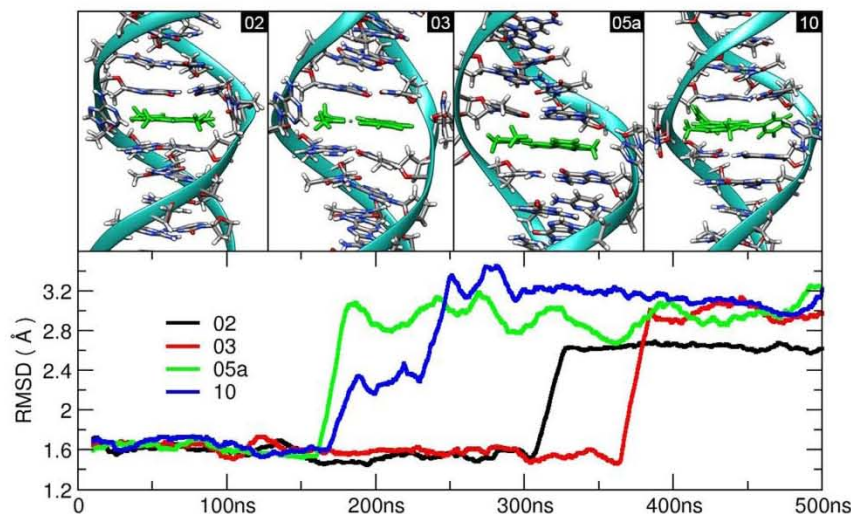
Insertion and base-pair eversion have been observed experimentally by the Barton group (78–81). They synthesized the octahedral complex  $\Delta$ -Rh(bpy)<sub>2</sub>chrysi<sup>3+</sup> bound to a DNA 9-mer (81). The DNA sequence included a mismatched cytosine–cytosine base pair in the central position and both residues are ejected toward the major groove as the bulky metal complex inserts in the resulting cavity. Another experimental example was observed by Lo *et al.* (82). Using the anticancer drug actinomycin D, they discovered multiple conformational changes in a 9-mer DNA, including the eversion of two guanine residues toward the major groove. An example found using computational chemistry was reported by Lei *et al.* (76) using the anticancer drug doxorubicin and a small 6-mer DNA. They observed after 300 ns of MD simulations the same modes of binding as reported in this work (end binding, minor-groove binding and intercalation, Figure 3). They also found in their clustering analysis structures with a single base flipping. This is due to the shape of the doxorubicin ligand, which aligned with the top- and bottom-matched base pairs in a perpendicular orientation, allowing one of the flipped bases to flip back into position.

In our simulations, compounds 02, 03, 05 $\beta$  and 10 started in the minor groove and caused an AT pairing to flip or base pair open toward the major groove. The molecules 02, 03

and 10 pushed open the A5T20 pair and complex 05 $\beta$  the T8A17 pair. The copper compound moved inside the resulting pocket (shown in Figure 5), which corresponds to the average structure of the highest populated cluster for each simulation using the full 10  $\mu$ s trajectory. In Figure 5, we present the first 500 ns of simulation for each of the simulations that generated the flipped nucleotides. It is interesting to observe that the intercalation process starts early in the simulation; the 05 $\beta$  and 10 systems start almost at similar time ( $\sim$ 160 ns), followed by 02 ( $\sim$ 308 ns) and finally the 03 system ( $\sim$ 360 ns), and the intercalation process takes no longer than  $\sim$ 20 ns except for the 10 system which lasts for more than 100 ns. This system takes longer time to reach the final intercalated position due to the rearrangement of the two bulky phenyl groups in the minor groove.

The process of intercalation follows the general sequence: (1) ligand binding in the minor groove, (2) ligand positioning, (3) partial opening of base pairs and partial insertion of the ligand, (4) flipping out of both the bases and full ligand insertion in the cavity, followed by (5) reorientation of the ligand inside the cavity. All four systems that were found to produce this type of intercalation follow this same basic process or model, with variation only on how much time a certain system spent in each of the 1–5 steps. The main observed difference is with step 3 where the copper complex partially pushes the base pair until the WC hydrogen bonds break and the compound pushes the nucleobases toward the major groove. This step happens almost instantaneously in systems 03 and 05 $\beta$ , where the AT base pair is pushed with atoms 2, 3 and 4 of the phenanthroline ring. Molecules 02 and 10 push the AT base pairs with the acetylacetonate ligand. Regardless of this observation, the process of intercalation is similar in each of the four systems. In previous DNA–ligand intercalation studies, the rise, roll and twist





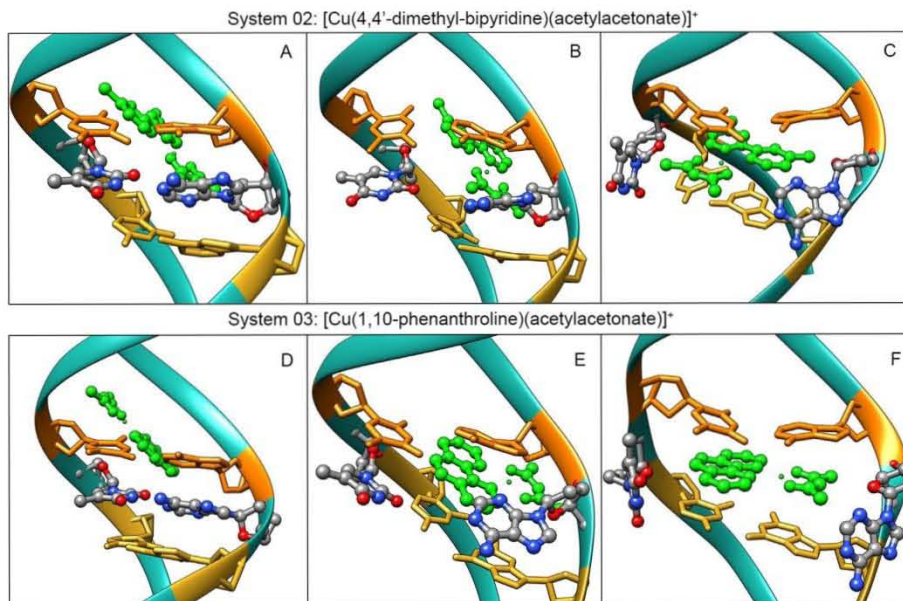
**Figure 5.** Top: average structure extracted from the most populated cluster using all the simulation frames for systems 02, 03, 05a and 10. The copper complex is shown in green. Bottom: running average (200 frames window) of the RMSD values of the systems in the configuration type C. RMSD values calculated using the crystal structure as reference and central residues 2 to 11 and 14 to 23. The cyan ribbon represents the backbone.

helical parameters provide a good description of the intercalation process (83,84). In these simulations where a base pair is structurally separated and pushed toward the minor groove, there is a coordinated global change in the flipping nucleotides, affecting both inter- and intra-base-pair geometries. Structural parameters of the flipped nucleotide for each case mentioned above and the distance of the copper atom of the ligand (used as the center of the molecule) to the O4 and O2 atoms of the thymine base in the intercalation pocket are presented in Supplementary Figure 3S of the supporting material.

The first step of the intercalation process was the presence of the bound ligand in the minor groove, which in this set of simulations was also the starting position. The distance between the ligand and the O4 and O2 atoms used as a set of reference points in the intercalation cavity is  $>9$  Å in each case (Supplementary Figure S3). In step 2, the ligand reorients multiple times in the minor groove (A and D in Figure 6). In Figure 5, we can see the amount of time the ligand explored the space inside the minor groove until moving to step 3. Until this step, the structural parameters in Supplementary Figure 3S fluctuate close to the canonical values. During step 3, the opening angle and the stretch distance increase, in addition to the propeller angle, and this indicates that one of the bases is being pushed (B and E in Figure 6). Step 4 is the flip of both nucleotides toward the major groove and partial insertion of the ligand inside the resulting cavity. In this step, the rise of the previous and next base pairs that form the intercalation pocket goes down, which puts the four nucleotides closer together hence reducing the volume of the intercalation pocket. Step 5 presents the deep insertion of the ligand inside the pocket (C and F in Figure 6). Once inside, the ligand shows rotation on the Z-axis, reorienting itself multiple times during the simulation. In Supplementary Figure S4 shows the dihedral angle of the ligand

and the bases that form the pocket. The orientation of the ligand inside the cavity formed a  $83^\circ$  angle with respect to the bases shifting  $\sim 11\%$  of the total simulation time. For the 03 system, the orientation was  $120^\circ$  shifting 29%. System 05 shifted continuously between angles of  $200^\circ$  and  $90^\circ$ . Finally, system 10 shifted conformation upon entering the cavity, forming a  $290^\circ$  and shifting conformation in a small interval of  $\sim 20^\circ$  for the rest of the simulation. This stability inside the pocket for this compound is due because of the steric hindrance caused by both phenyl groups in the aromatic ligand of the complex.

To test if the intercalation–base-flipping events are truly an effect of the binding of the Casiopeinas complexes, simulations were performed using the ligands with no metal center, thus, only the two aromatic ligands and the two non-aromatic ligands: acetylacetonate, glycinate, bipyridine and phenanthroline. Each molecule was parameterized using the same methodology described and manually placed in the same position inside the minor groove of the DNA 12-mer in the same manner as the Casiopeinas compounds. Each of the four systems was run with three independent copies using the same equilibration and production protocol and randomizing the position of the counter ions for each copy. Each copy was run for at least 4  $\mu$ s. Supplementary Figure 5S in the supporting material shows the RMSD values for each of the copies. No intercalation or minor-groove binding was detected in any of the simulations. Visual inspection of the trajectories showed transient and short-lived ( $< 50$  ns) interactions with the terminal base pairs of the DNA with the aromatic ligands. The non-aromatic ligands detach from the minor groove early in the simulation ( $\sim 25$  ns) and only short-lived interactions with the DNA's backbone are detected. Considering the prolonged sampling time used, these results indicate that intercalation between two base pairs and intercalation with the



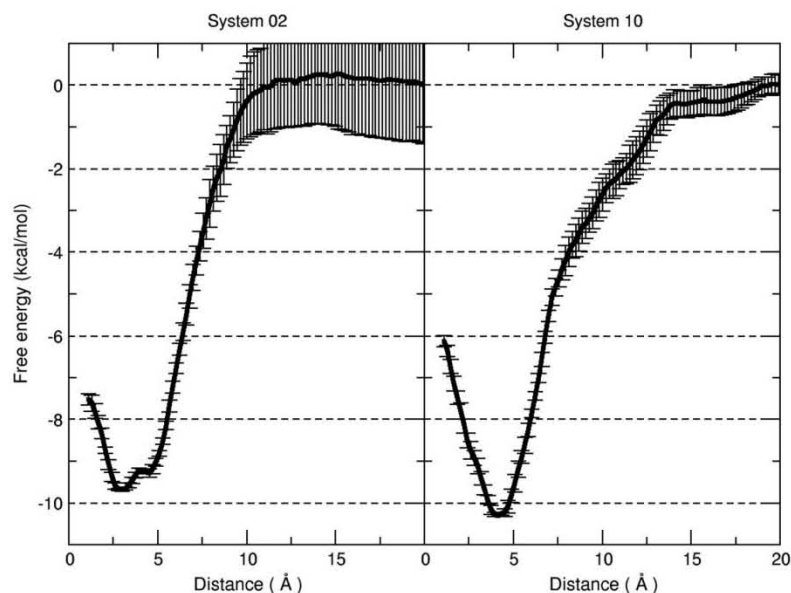
**Figure 6.** Representative frames showing three steps of the base flipping and intercalation process. Top is system 02 and bottom is system 03. The copper compound is in green. In orange and yellow are the top and bottom base pairs forming the intercalation cavity after base flipping. The everted base pair is represented in ball and stick. Hydrogen atoms are hidden for clarity.

opening of internal base pairs are unlikely to be detected using the ligands by themselves.

Additional analysis was done to understand the base-pair eversion event of systems 03 and 10 where the copper complex was removed from the opening of the everted nucleotides to examine if a canonical B-DNA structure could be reformed. The starting structure was obtained using only the trajectory frames where the complex was inserted in the DNA and clustered the frames using the same methodology as described previously. A representative structure of the top populated cluster was then extracted, the copper complex was deleted and three independent simulations were run, using the same equilibration and production protocol, randomizing the counter ion positions for each copy. Each of the three copies was run for at least 5  $\mu$ s. Supplementary Figure 6S in the supporting material shows the RMSD value of the DNA and distance from the center of mass for each flipped nucleotide of each copy. System 03 reforms the WC pairing in residues A5T21 in 18–20 ns of simulation time as can be observed in the distance top plot in Supplementary Figure 6S. In two of the simulations of the 10 system, both nucleotides switch to 'syn' conformation of the  $\chi$  dihedral. The flipping back of the nucleotide into the main body of the DNA is observed, but in the wrong position which causes mismatching between the bases, which in turn causes major DNA structure deviations as can be seen in both the RMSD and distance plots of Supplementary Figure 6S.

#### Energy analysis between Casiopeínas and DNA

The CC insertion and base-pair eversion mode of interaction yielded the most stable binding energies (Table 2). A trend is detected in the binding-energy values that follows the type of interaction each molecule produces in the simulation. Molecules that produced the base-pair flipping have the most stable binding energy as already mentioned that ranges from -44.6 to -38.6 kcal/mol. The molecules that remained in the minor groove or formed a stacking interaction inside the minor groove with fraying nucleotides (type A and type D configuration) presented a binding-energy range from -34 to -27 kcal/mol. Molecules that intercalated in the terminal base pairs have a range of binding energy from -25 to -19 kcal/mol. The remaining molecules that stacked in the terminal base pairs are grouped together ranging from -21 to -15 kcal/mol. The potential of mean force calculation for system 02 and system 10 is shown in Figure 7. A 20 Å distance between the ligand and the DNA is where both are separated and is considered as the reference value. In both the systems studied, the copper compound entered the intercalation cavity from the minor-groove side. The system 02 has two minimums, one at a distance of 2.9 Å (with an interaction value of -9.4 kcal/mol) and the other at 4.5 Å (-9.2 kcal/mol). The first minimum is presented where the ligands are inside the intercalation cavity with the non-aromatic ligand toward the major groove and the copper atom interacting with the oxygen atoms DT19:O4 and DG4:O6. The second minimum has the ligand shifted toward the minor groove, forming a stacking interaction with the copper complex aromatic ligand and the base pair A6T19. For system 10, a single minimum of



**Figure 7.** Potential of mean force profiles for system 02 and 10. The distance is between the center of mass of the intercalation cavity and the central atoms of the copper compound (see 'Materials and Methods' section). Each point is the average from five independent simulations, error bars show standard deviation between the five copies.

-10.2 kcal/mol was observed that corresponds to the same conformation obtained from the clustering analysis. As the separation between the DNA and the copper compound increases, the 02 system shows a smooth linear free energy increase, whereas system 10 shows a decrease of the linear profile caused by the rearrangement of the bulky phenyl groups present in the aromatic ligand.

What started as a research project to measure binding energies of the Casiopeinas® complexes to DNA in the hope of a deeper understanding of the effects of the different substituents on each molecule has opened a new mindset of interaction mode between planar aromatic complexes similar to the ones studied and DNA. It is important to remember that even most of the systems yielded a binding mode type A in the terminal base pairs, this was slightly favored by the complexes with the glycinate systems versus the acetylacetonate systems (14 versus 9). None of the compounds with acac was found in the minor groove whereas three systems were found with the glycinate; none of the glycinate systems produced base-pair flipping whereas four of the acac systems did; also for acac, three systems generated terminal base-pair intercalation. This suggests that the glycinate favors minor groove binding and acac facilitates intercalation. Base-pair eversion caused by systems 03 and 05 $\beta$ , which initiated from the aromatic ligands, suggests that molecules with similar aromatic structures that are considered classic intercalators can also interact in this manner, for example, the common dye ethidium bromide which contains a phenanthridine moiety which is similar to the phenanthroline ligand used in this study. The highlights of our findings include:

- The possibility to study the intercalation pathway of a tertiary coordination complex with DNA starting from the minor groove.
- The intercalation was due to the loss of the WC pairing between a base pair and the flipping event toward the major groove.
- The complex moves inside the cavity resulting from the flipping of the nucleobases.
- Intercalation was observed at the terminal base pairs.

The compounds that have methyl groups in the aromatic rings (mono, di-methyl or tetra-methyl) with either acac or gly do not show a lasting interaction with the DNA. This agrees with the observations made by Chikira and co-workers. They suggest that the presence of methyl groups or substituents in the positions 4 and 7 of the phenanthroline ring makes more difficult the process of intercalation due to steric hindrance (85). Compounds 10 and 19 that have the bulky phenyl groups show a stabilizing interaction with the minor groove, although, the non-aromatic ligands also have an important role. Compound 10 that has the acac ligand is interacting with the DNA (with a 93% population). When the non-aromatic ligand is switched to glycinate, the carboxylate side has to be exposed to the solvent to achieve a stable interaction (with a population of 95%). If the carboxylate side of the glycinate ligand is toward the minor groove, the complex is destabilized (population of 44% for 19 $\alpha$ ). We also hypothesize that with longer DNA chains, as it is actually found in the cell, the type A interaction will be considerably lower. Longer DNA chains will allow the ligands to sample through the grooves for more time before reaching the terminal base pairs and form the stacking

interaction. This extended time could allow the ligand to find an energetically favored binding configuration, which in turn can promote groove binding and possibly also generate the base-pair eversion. It is clear that extended MD simulations, as presented in this study, explored more sampling space than earlier work, provided detailed insight into the spontaneous intercalation processes and created a new set of possible interaction modes to consider when binding molecules to DNA.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online.

## FUNDING

NIH grant R01 GM081411, Blue Waters Sustained-Petascale Computing Project [NSF OCI 07-25070, PRAC OCI-1440031]; NSF Extreme Science and Engineering Discovery Environment [OCI-1053575, MCA01S027P]; Center for High Performance Computing at the University of Utah, Miztli supercomputer at DGTIC-UNAM (2014-1-56) and PAPIIT-UNAM [IN208113].

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- Bruijninx, P.C.A. and Sadler, P.J. (2008) New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **12**, 197–206.
- García-Ramos, J.C., Galindo-Murillo, R., Cortés-Guzmán, F. and Ruiz-Azuara, L. (2013) Metal-based drug-DNA interactions. *J. Mex. Chem. Soc.*, **57**, 245–259.
- Liu, H.-K. and Sadler, P.J. (2011) Metal complexes as DNA intercalators. *Acc. Chem. Res.*, **44**, 349–359.
- Guo, Z. and Sadler, P.J. (1999) Metals in Medicine. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **38**, 1512–1531.
- Komor, A.C. and Barton, J.K. (2013) The path for metal complexes to a DNA target. *Chem. Commun. (Camb.)*, **49**, 3617–3630.
- Boer, D.R., Canals, A. and Coll, M. (2009) DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. *Dalton Trans.*, doi:10.1039/b809873p.
- Marzano, C., Pellei, M., Tisato, F. and Santini, C. (2014) Copper complexes as anticancer agents. *Anticancer. Agents Med. Chem.*, **9**, 185–211.
- Ruiz-Azuara, L. and Bravo-Gómez, M.E. (2010) Copper compounds in cancer chemotherapy. *Curr. Med. Chem.*, **17**, 3606–3615.
- Santini, C., Pellei, M., Gandin, V., Porchia, M., Tisato, F. and Marzano, C. (2014) Advances in copper complexes as anticancer agents. *Chem. Rev.*, **114**, 815–862.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramírez, L., Howarth, J.A. and Dobrota, M. (2003) Hematotoxicity response in rats by the novel copper-based anticancer agent: casiopeina II. *Toxicology*, **194**, 103–113.
- Kuzuya, M., Yamada, K., Hayashi, T., Funaki, C., Naito, M., Asai, K. and Kuzuya, F. (1992) Role of lipoprotein-copper complex in copper catalyzed-peroxidation of low-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1123**, 334–341.
- Sagripanti, J.-L., Goering, P.L. and Lamanna, A. (1991) Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **110**, 477–485.
- Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. and Moreno-Sánchez, R. (2003) Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas®) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1979–1989.
- Qin, X., Huang, Q., Zhu, L., Xiao, H., Yao, G., Huang, W., Zhu, R., Hu, J. and Zhu, Y. (2014) Interaction with Cu<sup>2+</sup> disrupts the RNA binding affinities of RNA recognition motif containing protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **444**, 116–120.
- Arnaudeau, C., Tenorio Miranda, E., Jessen, D. and Helleday, T. (2000) Inhibition of DNA synthesis is a potent mechanism by which cytostatic drugs induce homologous recombination in mammalian cells. *Mutat. Res.*, **461**, 221–228.
- Ruiz-Azuara, L. (1996) Process to obtain new mixed copper aminoacidoate complexes from methylphenanthroline to be used as anticancerogenic agents. US Patent No.5, 576, 326.
- Ruiz-Azuara, L. (1992) Casiopeina. Mex. Pat. No. 407543.
- Ruiz-Azuara, L. (1992) Process to obtain new mixed copper aminoacidoate complexes from phenylphenanthroline to be used as anticancerogenic agents. US Patent No. 5, 107, 005.
- Gutiérrez, A.G., Vázquez-Aguirre, A., García-Ramos, J.C., Flores-Alamo, M., Hernández-Lemus, E., Ruiz-Azuara, L. and Mejía, C. (2013) Copper(II) mixed chelate compounds induce apoptosis through reactive oxygen species in neuroblastoma cell line CHP-212. *J. Inorg. Biochem.*, **126**, 17–25.
- Mejía, C. and Ruiz-Azuara, L. (2008) Casiopeinas IIgly and IIIia induce apoptosis in medulloblastoma cells. *Pathol. Oncol. Res.*, **14**, 467–472.
- Serment-Guerrero, J., Cano-Sánchez, P., Reyes-Pérez, E., Velázquez-García, F., Bravo-Gómez, M.E. and Ruiz-Azuara, L. (2011) Genotoxicity of the copper antineoplastic coordination complexes casiopeinas®. *Toxicol. In Vitro*, doi:10.1016/j.tiv.2011.05.008.
- Trejo-Solís, C., Palencia, G., Zúñiga, S., Rodríguez-Ropón, A., Osorio-Rico, L., Sánchez, T.L., Gracia-Mora, I., Márquez-Rosado, A., Moreno-García, M.E., Cruz, A. et al. (2005) Cas IIgly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. *Neoplasia*, **7**, 563–574.
- 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. (2008) Casiopeina III-ia induces apoptosis in HCT-15 cells in vitro through caspase-dependent mechanisms and has antitumor effect in vivo. *Biomaterials*, **21**, 17–28.
- De Vizcaya-Ruiz, A., Rivero-Müller, A., Ruiz-Ramírez, L., Kass, G.E., Kelland, L.R., Orr, R.M. and Dobrota, M. (2000) Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, casiopeina II, in L1210 murine leukaemia and CHI human ovarian carcinoma cells. *Toxicol. In Vitro*, **14**, 1–5.
- Marín-Hernández, A., Gracia-Mora, I., Ruiz-Ramírez, L. and Moreno-Sánchez, R. (2003) Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeinas) on mitochondrial functions. *Biochem. Pharmacol.*, **65**, 1979–1989.
- Bravo-Gómez, M.E., García-Ramos, J.C., Gracia-Mora, I. and Ruiz-Azuara, L. (2009) Antiproliferative activity and QSAR study of copper(II) mixed chelate [Cu(N-N)(acetylacetonato)]NO<sub>3</sub> and [Cu(N-N)(glycinato)]NO<sub>3</sub> complexes, (Casiopeinas). *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 299–309.
- Kachadourian, R., Brechtel, H.M., Ruiz-Azuara, L., Gracia-Mora, I. and Day, B.J. (2010) Casiopeina IIgly-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human lung cancer A549 and H157 cells. *Toxicology*, **268**, 176–183.
- Rivero-Müller, A., De Vizcaya-Ruiz, A., Plant, N., Ruiz-Azuara, L. and Dobrota, M. (2007) Mixed chelate copper complex, Casiopeina IIgly, binds and degrades nucleic acids: a mechanism of cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.*, **165**, 189–199.
- Hirohama, T., Kuranuki, Y., Ebina, E., Sugizaki, T., Arii, H., Chikira, M., Tamil Selvi, P. and Palaniandavar, M. (2005) Copper(II) complexes of 1, 10-phenanthroline-derived ligands: studies on DNA binding properties and nuclease activity. *J. Inorg. Biochem.*, **99**, 1205–1219.
- Theederahn, T.B., Kuwabara, M.D., Larsen, T.A. and Sigman, D.S. (1989) Nuclease activity of 1, 10-phenanthroline-copper: kinetic mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4941–4946.
- Sissi, C., Mancin, F., Gatos, M., Palumbo, M., Tecilla, P. and Tonellato, U. (2005) Efficient plasmid DNA cleavage by a mononuclear copper(II) complex. *Inorg. Chem.*, **44**, 2310–2317.
- Maity, B., Roy, M. and Chakravarty, A.R. (2008) Ferrocene-conjugated copper(II) dipyrrophenazine complex as a multifunctional model nuclease showing DNA cleavage in red light. *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1395–1399.
- Sigman, D.S. and Chen, C.H. (1990) Chemical nucleases: new reagents in molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 207–236.

34. Roberts, J.D., Van Houten, B., Qu, Y. and Farrell, N.P. (1989) Interaction of novel bis(platinum) complexes with DNA. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 9719–9733.
35. Pizarro, A.M. and Sadler, P.J. (2009) Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*, **91**, 1198–1211.
36. Geierstanger, B.H., Kagawa, T.F., Chen, S.L., Quigley, G.J. and Ho, P.S. (1991) Base-specific binding of copper(II) to Z-DNA. The 1.3-Å single crystal structure of d(m5CGUAm5CG) in the presence of CuCl<sub>2</sub>. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20185–20191.
37. Atwell, S., Meggers, E., Spraggon, G. and Schultz, P.G. (2001) Structure of a copper-mediated base pair in DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12364–12367.
38. Campbell, N.H., Karim, N.H.A., Parkinson, G.N., Gunaratnam, M., Petrucci, V., Todd, A.K., Vilar, R. and Neidle, S. (2012) Molecular Basis of Structure–Activity Relationships between Salphen Metal Complexes and Human Telomeric DNA Quadruplexes. *J. Med. Chem.*, **55**, 209–222.
39. Chikira, M., Tomizawa, Y., Fukita, D., Sugizaki, T., Sugawara, N., Yamazaki, T., Sasano, A., Shindo, H., Palaniandavar, M. and Antholine, W.E. (2002) 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**, 163–173.
40. Vargiu, A. V. and Magistrato, A. (2014) Atomistic-level portrayal of drug-DNA Interplay: a history of courtships and meetings revealed by molecular simulations. *ChemMedChem*, **9**, 1966–1981.
41. Spinello, A., Terenzi, A. and Barone, G. (2013) Metal complex-DNA binding: Insights from molecular dynamics and DFT/MM calculations. *J. Inorg. Biochem.*, **124**, 63–69.
42. Robertazzi, A., Magistrato, A., de Hoog, P., Carloni, P. and Reedijk, J. (2007) Density functional theory studies on copper phenanthroline complexes. *Inorg. Chem.*, **46**, 5873–5881.
43. Robertazzi, A., Vargiu, A. V., Magistrato, A., Ruggerone, P., Carloni, P., de Hoog, P. and Reedijk, J. (2009) Copper-1, 10-phenanthroline complexes binding to DNA: structural predictions from molecular simulations. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 10881–10890.
44. Liu, C., Zhu, Y., Chen, P. and Tang, M. (2013) Theoretical simulations on interactions of mono- and dinuclear metallonucleases with DNA. *J. Phys. Chem. B*, **117**, 1197–1209.
45. Hu, W., Deng, S., Huang, J., Lu, Y., Le, X. and Zheng, W. (2013) Intercalative interaction of asymmetric copper(II) complex with DNA: experimental, molecular docking, molecular dynamics and TDDFT studies. *J. Inorg. Biochem.*, **127**, 90–98.
46. Galindo-Murillo, R., Ruiz-Azuara, L., Moreno-Esparza, R. and Cortés-Guzmán, F. (2012) Molecular recognition between DNA and a copper-based anticancer complex. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 15539–15546.
47. Galindo-Murillo, R., Roe, D.R. and Cheatham, T.E. 3rd. (2014) On the absence of intrahelical DNA dynamics on the  $\mu$ s to ms timescale. *Nat. Commun.*, **5**, 5152.
48. Galindo-Murillo, R., Roe, D.R. and Cheatham, T.E. 3rd. (2014) Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGACGC). *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 1041–1058.
49. Zhao, Y., Schultz, N.E. and Truhlar, D.G. (2006) Design of density functionals by combining the method of constraint satisfaction with parametrization for thermochemistry, thermochemical kinetics, and noncovalent interactions. *J. Chem. Theory Comput.*, **2**, 364–382.
50. Zhao, Y. and Truhlar, D.G. (2007) Density functionals for noncovalent interaction energies of biological importance. *J. Chem. Theory Comput.*, **3**, 289–300.
51. Hohenstein, E.G., Chill, S.T. and Sherrill, C.D. (2008) Assessment of the performance of the M05–2X and M06–2X exchange-correlation functionals for noncovalent interactions in biomolecules. *J. Chem. Theory Comput.*, **4**, 1996–2000.
52. Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A. and Case, D.A. (2004) Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.*, **25**, 1157–1174.
53. Vanqualef, E., Simon, S., Marquant, G., Garcia, E., Klimerek, G., Delépine, J.C., Cieplak, P. and Dupradeau, F. (2011) R.E.D. server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. *Nucleic Acids Res.*, **39**, W511–W517.
54. Babu, C.S. and Lim, C. (2006) Empirical force fields for biologically active divalent metal cations in water. *J. Phys. Chem. A*, **110**, 691–699.
55. Jorgensen, W.L., Chandrasekhar, J., Madura, J.D., Impey, R.W. and Klein, M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.*, **79**, 926.
56. Onawumi, O.O.E., Faboya, O.O.P., Odunola, O.A., Prasad, T.K. and Rajasekharan, M.V. (2008) Synthesis, structure and spectral studies on mixed ligand copper(II) complexes of diimines and acetylacetonate. *Polyhedron*, **27**, 113–117.
57. Tovar-Tovar, A., Ruiz-Ramírez, L., Campero, A., Romerosa, A., Moreno-Esparza, R. and Rosales-Hoz, M.J. (2004) Structural and reactivity studies on 4, 4'-dimethyl-2, 2'-bipyridine acetylacetonate copper(II) nitrate (CASIOPEINA III-ia<sup>®</sup>) with methionine, by UV-visible and EPR techniques. *J. Inorg. Biochem.*, **98**, 1045–1053.
58. Solans, X., Ruiz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L. and Briansó, J.L. (1988) 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*, **44**, 628–631.
59. García-Ramos, J.C., Galindo-Murillo, R., Tovar-Tovar, A., Alonso-Saenz, A.L., Gómez-Vidales, V., Flores-Alamo, M., Ortiz-Frade, L., Cortés-Guzmán, F., Moreno-Esparza, R., Campero, A. et al. (2014) The  $\pi$ -back-bonding modulation and its impact in the electronic properties of Cu(II) antineoplastic compounds: an experimental and theoretical study. *Chemistry*, **20**, 13730–13741.
60. Solans, X., Ruiz-Ramírez, L., Martínez, A., Gasque, L. and Moreno-Esparza, R. (1993) Mixed chelate complexes. II. Structures of L-alaninato(aqua)(4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline)copper(II) nitrite monohydrate and aqua(4, 7-dimethyl-1, 10-phenanthroline)(glycinato)(nitrate)copper(II) monohydrate. *Acta Crystallogr. Sect. C*, **49**, 890–893.
61. Alvarez-Larena, A., Briansó-Penalva, J.L., Piniella, J.F., Moreno-Esparza, R., Ruiz-Ramírez, L. and Ferrer-Sueta, G. (1995) Aqua(glycinato)(3, 4, 7, 8-tetramethyl-1, 10-phenanthroline)copper(II) Nitrate. *Acta Crystallogr. Sect. C*, **51**, 852–854.
62. Pérez, A., Marchán, J., Svozil, D., Šponer, J., Cheatham, T.E. 3rd, Laughton, C.A. and Orozco, M. (2007) Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: improving the description of alpha/gamma conformers. *Biophys. J.*, **92**, 3817–3829.
63. Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I., Gould, I.R., Merz, K.M., Ferguson, D.M., Spellmeyer, D.C., Fox, T., Caldwell, J.W. and Kollman, P.A. (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 5179–5197.
64. Accelrys Software Inc. (2009) Discovery Studio Visualizer.
65. Joung, I.S. and Cheatham, T.E. 3rd (2009) Molecular dynamics simulations of the dynamic and energetic properties of alkali and halide ions using water-model-specific ion parameters. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 13279–13290.
66. Konerding, D.E., Cheatham, T.E. 3rd, Kollman, P.A. and James, T.L. (1999) Restrained molecular dynamics of solvated duplex DNA using the particle mesh Ewald method. *J. Biomol. NMR*, **13**, 119–131.
67. Darden, T.A., York, D. and Pedersen, L. (1993) Particle mesh Ewald: an N-log(N) method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.*, **98**, 10089.
68. Ryckaert, J.-P.J.-P., Cicotti, G. and Berendsen, H.J.C. (1977) Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.*, **23**, 327–341.
69. Miller, B.R., McGee, T.D., Swails, J.M., Homeyer, N., Gohlke, H. and Roitberg, A.E. (2012) MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *J. Chem. Theory Comput.*, **8**, 3314–3321.
70. Kumar, S., Rosenberg, J.M., Bouzida, D., Swendsen, R.H. and Kollman, P.A. (1992) The weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.*, **13**, 1011–1021.
71. Roux, B. (1995) The calculation of the potential of mean force using computer simulations. *Comput. Phys. Commun.*, **91**, 275–282.
72. Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Montgomery, J.A., Vreven, T., Kudin, K.N., Burant, J.C. et al. (2009) *Gaussian 09, Revision D.01*. Gaussian Inc.

73. Case, D.A., Darden, T.A., Cheatham, T.E. 3rd, Simmerling, C.L., Wang, J., Duke, R.E., Luo, R., Walker, R.C., Zhang, W., Merz, K.M. et al. (2012) AMBER 12.
74. Roe, D.R. and Cheatham, T.E. 3rd (2013) PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *J. Chem. Theory Comput.*, **9**, 3084–3095.
75. Lavery, R., Moakher, M., Maddocks, J.H., Petkeviciute, D. and Zakrzewska, K. (2009) Conformational analysis of nucleic acids revisited: Curves+. *Nucleic Acids Res.*, **37**, 5917–5929.
76. Lei, H., Wang, X. and Wu, C. (2012) Early stage intercalation of doxorubicin to DNA fragments observed in molecular dynamics binding simulations. *J. Mol. Graph. Model.*, **38**, 279–289.
77. Monaco, R.R. (2010) Capture of a Transition State Using Molecular Dynamics: Creation of an Intercalation Site in dsDNA with Ethidium Cation. *J. Nucleic Acids*, doi:10.4061/2010/702317.
78. Zeglis, B.M., Pierre, V.C. and Barton, J.K. (2007) Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chem. Commun. (Camb.)*, doi:10.1039/b710949k.
79. Song, H., Kaiser, J.T. and Barton, J.K. (2012) Crystal structure of  $\Delta$ -[Ru(bpy)dppz]<sup>2+</sup> bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation. *Nat. Chem.*, **4**, 615–620.
80. Pierre, V.C., Kaiser, J.T. and Barton, J.K. (2007) Insights into finding a mismatch through the structure of a mispaired DNA bound by a rhodium intercalator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 429–434.
81. Cordier, C., Pierre, V.C. and Barton, J.K. (2007) Insertion of a bulky rhodium complex into a DNA cytosine-cytosine mismatch: an NMR solution study. *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12287–12295.
82. Lo, Y.-S., Tseng, W.-H., Chuang, C.-Y. and Hou, M.-H. (2013) The structural basis of actinomycin D-binding induces nucleotide flipping out, a sharp bend and a left-handed twist in CGG triplet repeats. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 4284–4294.
83. Wilhelm, M., Mukherjee, A., Bouvier, B., Zakrzewska, K., Hynes, J.T. and Lavery, R. (2012) Multistep drug intercalation: molecular dynamics and free energy studies of the binding of daunomycin to DNA. *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 8588–8596.
84. Mukherjee, A., Lavery, R., Bagchi, B. and Hynes, J.T. (2008) On the molecular mechanism of drug intercalation into DNA: A simulation study of the intercalation pathway, free energy, and DNA structural changes. *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 9747–9755.
85. Chikira, M., Tomizawa, Y., Fukita, D., Sugizaki, T., Sugawara, N., Yamazaki, T., Sasano, A., Shindo, H., Palaniandavar, M. and Antholine, W. (2002) 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**, 163–173.