



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**

**POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
CENTRO DE QUÍMICA-INSTITUTO DE CIENCIAS  
LABORATORIO DE BIOINORGÁNICA APLICADA**

**“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS MIXTOS DE  
COBRE (II)-CITRULINA CON 2,2'-BIPYRIDINA Y 1,10-FENANTROLINA  
CON CAPACIDAD FARMACOLÓGICA Y SU ENCAPSULACIÓN EN  
NANOPLATAFORMAS”**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

**ING. DIEGO RAMÍREZ CONTRERAS**

DIRECTOR DE TESIS

**DRA. BRENDA LEONOR SÁNCHEZ GAITÁN**

CO-DIRECTOR DE TESIS

**DR. ENRIQUE GONZÁLEZ VERGARA**

DICIEMBRE 2023



La presente tesis titulada: **“SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS MIXTOS DE COBRE (II)-CITRULINA CON 2,2´-BIPIRIDINA Y 1,10-FENANTROLINA CON CAPACIDAD FARMACOLÓGICA Y SU ENCAPSULACIÓN EN NANOPLATAFORMAS”**, realizada por el Ing. Diego Ramírez Contreras, ha sido revisada y aprobada por el siguiente consejo particular, para obtener el Título de:

#### MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

- Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas, Profesor-Investigador, Departamento de Ciencias Químico-Biológicas, UDLAP
- Dra. María Eugenia Castro Sánchez, Profesora-Investigadora, Centro de Química, ICUAP
- Dr. Francisco Meléndez Bustamante, Profesor-Investigador, Facultad de Ciencias Químicas, BUAP
- Dr. Julián Alejandro Yunes Rojas, Profesor-Investigador, ITESM, Puebla

Directora de tesis: Dra. Brenda Leonor Sánchez Gaitán

Co-Director de tesis: Dr. Enrique González Vergara

## Contribuciones

### Artículos publicados

- **Ramírez-Contreras, D.**, García-García, A., Sánchez-Gaytán, B. L., Serrano-de la Rosa, L. E., Melendez, F. J., Choquesillo-Lazarte, D., ... & González-Vergara, E. (2022). Bis-citrullinato copper (II) complex: Synthesis, crystal structure, and non-covalent interactions. *Crystals*, 12(10), 1386.
- **Ramírez-Contreras, D.**, García-García, A., Mendoza, A., Serrano-de la Rosa, L. E., Sánchez-Gaytán, B. L., Melendez, F. J., ... & González-Vergara, E. (2023). D, L-Citrullinato-bipyridine Copper Complex: Experimental and Theoretical Characterization. *Crystals*, 13(9), 1391.

### Co-autoría

- Vazquez-Rodriguez, S., Ramírez-Contreras, D., Noriega, L., García-García, A., Sánchez-Gaytán, B. L., Melendez, F. J., ... & González-Vergara, E. (2023). Interaction of copper potential metallodrugs with TMPRSS2: A comparative study of docking tools and its implications on COVID-19. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1128859.

### Participación en congresos

- **Ramírez-Contreras D.**, Cárdenas-García M., Mendoza A., Meléndez-Bustamante Francisco J., Castro María E., González-Vergara E. Complejos mixtos de cobre L-citrulinato-bipiridina y L-citrulinato-fenantrolina: síntesis, caracterización experimental-teórica y potencial actividad anticancerígena. XI Encuentro de Química Inorgánica (EQI), Agosto 13-2023, Querétaro, México.

## AGRADECIMIENTOS

- Al CONAHCYT por los apoyos económicos concedidos
- Al Dr. Eduardo Torres Ramírez, miembro del Laboratorio de Bioinorgánica Aplicada y del Posgrado en Ciencias Ambientales de la BUAP, por las facilidades brindadas para el desarrollo experimental
- A la Doctora Maura Cárdenas García, responsable del Laboratorio de Fisiología Celular de la BUAP, por el apoyo con las pruebas biológicas
- Al Dr. Ángel Mendoza, responsable del Laboratorio de Difracción de Rayos-X de la BUAP, por el apoyo con los experimentos de XRD y el refinamiento de las estructuras
- A la Dra. Amalia García García y al Dr. Duane Choquesillo Lazarte, del departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, por el apoyo con los experimentos de XRD y el refinamiento de las estructuras
- Al Dr. Francisco Meléndez Bustamante y la Dra. María Eugenia Castro, miembros del laboratorio de Química Teórica de la BUAP, por el apoyo en el área teórica
- Al Dr. Miguel Ángel Méndez Rojas, Investigador del departamento de Ciencias Químico-Biológicas de la UDLAP, por el apoyo con la caracterización por DLS
- Al Dr. Vladimir Carranza Téllez, responsable del Laboratorio de Espectrometría de Masas de la BUAP, por el apoyo con los análisis por Espectrometría de masas
- A la Dra. Laura Serrano de la Rosa, miembro del Instituto de Física "Luis Rivera Terrazas", por el apoyo con los análisis espectrofotométricos por Espectroscopia Raman
- A la Q. Patricia Ruiz Gutiérrez, del Laboratorio de Coordinación y Organometálica de la BUAP, por el apoyo con los análisis espectrofotométricos por FT-IR
- Al Laboratorio de Cromatografía de la BUAP, por el apoyo con los análisis espectrofotométricos por FT-IR
- ***A AMIGOS, FAMILIARES Y COLABORADORES...***

# ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
1. INTRODUCCIÓN .....	3
2. JUSTIFICACIÓN .....	5
3. OBJETIVOS .....	5
3.1. Objetivo general.....	5
3.2. Objetivos particulares.....	5
4. MARCO TEÓRICO .....	6
4.1. Cáncer.....	6
4.2. El surgimiento de la quimioterapia.....	10
4.3. Metalofarmacos.....	15
4.4. Limitaciones.....	18
4.5. Nuevas alternativas.....	20
4.6. Citrulina.....	22
5. ANTECEDENTES.....	25
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	27
6.1. Materiales .....	27
6.2. Síntesis de los complejos .....	27
6.2.1. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr) <sub>2</sub> ].....	27
6.2.2. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ).....	28
6.2.3. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ).....	29
6.2.4. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> ).....	29
6.3. Caracterización del Bis-citrulinato de cobre (II).....	30
6.3.1. Caracterizaciones espectrofotométricas del [Cu(L-Citr) <sub>2</sub> ].....	30
6.3.2. Difracción de Rayos X de monocristal del [Cu(L-Citr) <sub>2</sub> ].....	31
6.4. Caracterización de los complejos mixtos.....	32
6.4.1. Caracterizaciones espectrofotométricas de los complejos mixtos.....	32
6.4.2. Difracción de Rayos X de monocristal de los complejos mixtos.....	32
6.5. Ensayos <i>in-vitro</i> .....	33
6.5.1. Selección de los complejos a estudiar.....	33
6.5.2. Interacción con CT-DNA.....	33
6.5.3. Ensayos de Fluorescencia .....	35

6.5.4.	Interacción con plásmido pUC19 .....	36
6.5.5.	Ensayos de citotoxicidad .....	38
6.6.	Diseño, síntesis y evaluación de las Liposomas .....	41
6.6.1.	Factores a estudiar .....	41
6.6.2.	Diseño experimental .....	42
6.6.3.	Síntesis de liposomas .....	44
1.1.1.	Caracterización de nanoplataformas .....	46
2.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
2.1.	Estructura de los complejos.....	47
2.1.1.	Estructura del $[\text{Cu}(\text{D-Citr})_2]_n$ .....	47
2.1.2.	Estructura de los complejos $[\text{Cu}(\text{D,L-Citr})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)$ y $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{bipy})](\text{NO}_3)$ .....	49
2.1.3.	Estructura del complejo $[\text{Cu}(\text{D,L-Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$ .....	56
2.2.	Análisis espectroscópicos .....	60
2.2.1.	Espectroscopia FT-IR .....	60
2.2.2.	Espectroscopia UV-Vis.....	64
2.2.3.	Espectroscopia Raman.....	67
2.2.4.	Espectroscopia por resonancia magnética nuclear (NMR) del $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$ .....	71
2.2.5.	Espectrometría de masas .....	73
2.3.	Ensayos <i>in-vitro</i> .....	75
2.3.1.	Interacción con Calf Thymus .....	75
2.3.2.	Ensayos de Fluorescencia .....	78
2.3.3.	Interacción con plásmido pUC19 .....	80
2.3.4.	Ensayos de citotoxicidad .....	82
2.4.	Caracterización de nanoplataformas.....	83
2.4.1.	Tamaño y numero por DLS.....	83
2.4.2.	Experimentos de citotoxicidad de las nanoplataformas .....	87
3.	CONCLUSIONES.....	89
4.	REFERENCIAS.....	91
5.	ANEXOS.....	106
	Anexo I. Datos cristalográficos de los complejos .....	106
	Anexo II. Artículos Publicados .....	109

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación artística del siglo XVI de los cuatro humores constituyentes del cuerpo humano .....	6
Figura 2. El ave Plymouth Barred Rock original del trabajo de Peyton Rous (1910) mostrando los síntomas de la infección con el RSV. Tomado de Weiss y Vogt (2011) .....	8
Figura 3. Fotografía tomada durante la primera guerra mundial que muestra las quemaduras provocadas por la mostaza sulfurada. Archivo perteneciente a la US National Archives And Records Administration .....	12
Figura 4. Estructuras del ácido fólico (estructura superior) y del metotrexato (estructura inferior) .....	13
Figura 5. Micrografías de <i>E. Coli</i> antes y después de ser tratadas con cisplatino. Tomado de Hoeschele (2012).....	16
Figura 6. De izquierda a derecha, estructura general de las casiopeinas del tipo aminoacido y estructura de la casiopeina III ia. ....	22
Figura 7. De izquierda a derecha, estructuras de la citrulina y arginina. ....	23
Figura 8. Fotografía tomada por Wada (1930) donde muestra la sal de cobre con el aminoácido que descubrió .....	25
Figura 9. Estructura elucidada por Mascaliovas (2015) del complejo Bis-citrulinato de paladio (II) .....	26
Figura 10. Representación del ensamble del equipo de extrusión minitruder® .....	46
Figura 11. Ensamble del Equipo Mini-Extruder® .....	46
Figura 12. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> representado a un 50% de probabilidad	47
Figura 13. Estructura cristalina del compuesto [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> a lo largo de los ejes cristalográficos a y b (de izquierda a derecha) .....	48
Figura 14. Vista en perspectiva de los enlaces de hidrógeno intramoleculares N-H-O y N-H-O (línea de puntos azul claro) .....	49
Figura 15. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(D-Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> representado a un 50% de probabilidad .....	50
Figura 16. La celda unitaria del complejo [Cu(D,L-Citr)(bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O). El punto naranja del centro corresponde al centroide de la estructura, así como a su centro de inversión ....	51
Figura 17. Cada entidad está unida a otra por dos enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua coordinadas y los grupos carboxilo de la Citrulina, y a un tercer monómero gracias a la molécula de agua de cristalización y al grupo ureido.....	51
Figura 18. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(L-Citr)(bipy)](NO <sub>3</sub> ) representado a un 50% de probabilidad .....	52
Figura 19. . Estructura cristalina del compuesto [Cu(L-Citr)(bipy)](NO <sub>3</sub> ) a lo largo de los ejes cristalográficos a y b (de izquierda a derecha) .....	53
Figura 20. Vista en perspectiva de los enlaces de hidrógeno intramoleculares N-H-O (línea de puntos azul claro).....	53
Figura 21. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) representado a un 50% de probabilidad .....	54
Figura 22. Estructura cristalina del compuesto [Cu(L-Citr)(bipy)](NO <sub>3</sub> ) a lo largo de los ejes cristalográficos a y c (de izquierda a derecha).....	55

Figura 23. Vista en perspectiva de los enlaces de hidrógeno intramoleculares N-H--O (línea de puntos azul claro).....	55
Figura 24. Diagrama ORTEP de las parejas de complejos del [Cu(D,L-Citr)(phen)](ClO <sub>4</sub> ) representado a un 50% de probabilidad .....	57
Figura 25. Estructura cristalina del compuesto [Cu(D,L-Citr)(phen)](ClO <sub>4</sub> ) a lo largo de los ejes cristalográficos a y b (de izquierda a derecha) .....	59
Figura 26. Espectros FT-IR de los complejos en la región de 400 a 450 cm <sup>-1</sup> . De arriba abajo, espectros de los complejos [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> , [Cu(Citr)(Bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> ), [Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ), [Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> ).....	62
Figura 27. Espectro de absorción electrónica del complejo [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> obtenido por reflectancia atenuada .....	65
Figura 28. Espectros de absorción electrónica (500-800 nm) de los complejos [Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ) en solución a 15 mg/mL.....	66
Figura 29. Espectros de absorción electrónica (250-340 nm) de los complejos [Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ) en solución a 0.01 mg/mL.....	66
Figura 30. Espectro Raman (3500-250 cm <sup>-1</sup> ) del complejo [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> .....	68
Figura 31. De arriba a abajo, espectros Raman (3500-250 cm <sup>-1</sup> ) de los complejos [Cu(Citr)(Bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O), [Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> ) .....	70
Figura 32. Espectro <sup>13</sup> C por Resonancia magnética nuclear (NMR) del complejo [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> en solución acida a 1 mg/mL .....	71
Figura 33. Espectro <sup>1</sup> H por Resonancia magnética nuclear (NMR) del complejo [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> en solución acida a 1 mg/mL .....	72
Figura 34. Nomenclatura para la asignación de los desplazamientos químicos <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C del compuesto [Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub> .....	72
Figura 35. Espectro de masas del complejo [Cu(Citr)(Bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O).....	74
Figura 36. Espectro de masas del complejo [Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) .....	75
Figura 37. Espectro de masas del complejo [Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> ) .....	75
Figura 38. De izquierda a derecha, espectros de absorción electrónica de los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ) con la presencia de CT-DNA.....	76
Figura 39. Diagrama de la ecuación de Benesi-Hildebrand linealizada para los datos de unión de los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ).....	77
Figura 40. Espectros de emisión fluorescente del complejo EB-DNA titulados con los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ) .....	79
Figura 41. Diagramas de Stern-Volmer para los datos de fluorescencia de los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ).....	80
Figura 42. De izquierda a derecha, bandas de electroforesis del plásmido pUC19 tratado con los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> ). La concentración del complejo es 0, 5, 10, 15, 30, 50 y 100 μM de izquierda a derecha en ambos experimentos .....	81
Figura 43. Micrografías (10x) de las células HeLa y MDA tratadas con el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> ). Las micrografías A y C corresponden a los controles de HeLa y MDA-MB-231 respectivamente, mientras que las micrografías B y D corresponden a los tratamientos.....	83
Figura 44. Diagramas de distribución por número de las liposomas de DMPC (diagrama superior izquierdo), DPPC (diagrama superior derecho) y DOPC (diagrama inferior) .....	86
Figura 45. Diagramas de distribución por volumen de las liposomas de DMPC (diagrama superior izquierdo), DPPC (diagrama superior derecho) y DOPC (diagrama inferior) .....	86

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1. Composición de las soluciones buffer del experimento .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 2. Diseño en cuadro latino del experimento de citotoxicidad .....</b>	<b>42</b>
<b>Tabla 3. Liposomas sintetizados para el experimento de citotoxicidad .....</b>	<b>43</b>
<b>Tabla 4. Asignamientos principales de los complejos sintetizados .....</b>	<b>63</b>
<b>Tabla 5. Asignamientos de los espectros Raman de los complejos .....</b>	<b>68</b>
<b>Tabla 6. Valores de la constante de afinidad (Kb) de complejos de cobre.....</b>	<b>78</b>
<b>Tabla 7. Parámetros de la ecuación de Stern-Volmer de varios complejos de cobre.....</b>	<b>80</b>
<b>Tabla 8. Valores de IC50 (<math>\mu\text{M}</math>) de los complejos contra las líneas celulares .....</b>	<b>83</b>
<b>Tabla 9. . Parámetros de distribución de tamaño medidos por DLS .....</b>	<b>85</b>
<b>Tabla 10. Resumen del experimento de citotoxicidad de liposomas.....</b>	<b>87</b>

## ABREVIATURAS

<b>Citr</b>	Citrulina
<b>Phen</b>	1,10-Fenantrolina
<b>Bipy</b>	2,2' Bipyridina
<b>DMPC</b>	1,2-dimyristoil-sn-glicero-3-fosfocolina
<b>DOPC</b>	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina
<b>DPPC</b>	1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
<b>PC-PEG-2000</b>	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(poliethilen-glicol)-2000]
<b>XTT</b>	2,3-Bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (sal sódica)
<b>ROS</b>	Especie Reactiva de Oxigeno
<b>NOS</b>	Oxido Nítrico Sintasa
<b>RSV</b>	Virus del Sarcoma de Rous
<b>scr</b>	Abreviatura de "Sarcoma" para el protooncogén Tirosin-quinasa del RSV
<b>FT-IR</b>	Espectro Infrarrojo por Transformada de Fourier
<b>NMR</b>	Resonancia Magnética nuclear
<b>XRD</b>	Difracción de Rayos-X
<b>UV-Vis</b>	Espectro Ultravioleta-Visible
<b>DLS</b>	Dispersión de luz dinámica
<b>CT-DNA</b>	ADN de timo de ternera
<b>pUC19</b>	plásmido " <i>University of California</i> " 19
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza

## RESUMEN

Como parte de la búsqueda de nuevos medicamentos antineoplásicos y del estudio de los complejos de cobre con actividad anticancerígena, el presente trabajo describe la síntesis, caracterización y evaluación *in-Vitro* y encapsulación en liposomas de fosfatidilcolinas, de nuevos complejos mixtos 2-2'Bipiridina y 1-10 Fenantrolina con el aminoácido no esencial citrulina. Como resultado fue posible la síntesis de cuatro nuevos complejos;  $\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$ ,  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ ,  $[\text{Cu}(\text{DL-Citr})(\text{Bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$  y  $[\text{Cu}(\text{DL-Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$ ; los cuales fueron caracterizados por cristalografía de rayos X y técnicas espectrofotométricas. Dos de los complejos,  $\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ , presentan buena solubilidad para realizar ensayos *in-vitro* con el fin de evaluar su unión al ADN y su actividad citotóxica. Los resultados obtenidos muestran que los dos complejos presentan una tendencia por intercalar el ADN e inducir apoptosis en líneas celulares de cáncer, siendo el complejo  $\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$  el que mejor actividad ofrece. La encapsulación se efectuó con el complejo  $\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$ , y se estableció un diseño experimental para evaluar el uso de diferentes fosfatidilcolinas y diferentes iones utilizados en la síntesis de las nanoplataformas, encontrando que este último factor genera un efecto importante sobre la citotoxicidad del ensamble final, y que el uso de cloruros afecta negativamente la citotoxicidad del ensamble.

**Palabras clave:** Citrulina, caracterización, actividad biológica, ADN, citotoxicidad, encapsulamiento, liposomas, fosfatidilcolina, buffer, diseño experimental.

## ABSTRACT

As part of the search for new antineoplastic drugs and the study of copper complexes with anticancer activity, the present work describes the synthesis, characterization, *in-vitro* evaluation of new mixed complexes 2-2'-bipyridine and 1-10 phenanthroline with the non-essential amino acid citrulline. As well as their encapsulation inside liposomes of phosphatidylcholines. It was possible to synthesize four new complexes; [Cu(L-Citr)(phen)](NO<sub>3</sub>), [Cu(L-Citr)(bipy)](NO<sub>3</sub>), [Cu(DL-Citr)(Bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)(H<sub>2</sub>O) and [Cu(DL-Citr)(Phen)](ClO<sub>4</sub>), which were characterized by X-ray crystallography and spectrophotometric techniques. Two of the complexes, Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) and [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>), present good solubility to perform *in-vitro* assays to evaluate the binding to DNA and their cytotoxic activity. Results show that the two complexes present a tendency to intercalate DNA and induce apoptosis in cancer cell lines, being the Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) complex the one that offers the best activity. The encapsulation was performed on the Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) complex, establishing an experimental design to evaluate the pharmacological impact of using different phosphatidylcholines and different ions in the synthesis of the nanoplateforms, finding that the latter factor greatly affects the cytotoxicity of the final assembly, and that the use of chlorides negatively affects the cytotoxicity of the assembly.

Keywords: Citrulline, characterization, biological activity, DNA, cytotoxicity, encapsulation, liposomes, phosphatidylcholine, buffer, experimental design.

# 1. INTRODUCCIÓN

El estatus actual de todos los tipos de cáncer muestra tendencias en aumento tanto en incidencia, prevalencia y mortalidad que colocan a la enfermedad como una de las principales amenazas a la salud mundial. Prueba de ello se muestra en el censo del 2020 realizado por el GLOBOCAN, con más de 19 millones de casos activos en todo el mundo [1], siendo las regiones más urbanizadas e industrializadas como Europa, Norteamérica y Asia del este las más afectadas.

Existe una gran variedad de causas que originan la incidencia de esta enfermedad, como lo son adicciones como el tabaquismo y el alcoholismo, factores ambientales como la contaminación proveniente del aire o el agua, hábitos alimenticios, factores genéticos entre otros [2]. A pesar que los esfuerzos por disminuir el impacto de estos factores han sido grande, la realidad muestra que estas causas también siguen una tendencia alcista, por ejemplo, el consumo de tabaco ha aumentado considerablemente en los últimos años [3].

Al comparar la tendencia en aumento de los factores que favorecen la incidencia del cáncer, se puede inferir que las cifras de la enfermedad estarán de la mano con estas tendencias, lo que supone que la seguridad social mundial estará más comprometida si no se tienen líneas de tratamiento más efectivas.

Las líneas de tratamiento clásicos incluyen varios agentes quimioterapéuticos como lo son medicamentos como el cisplatino, el carboplatino, el taxol, la doxorubicina, la gemcitabina, entre otros, pero en las últimas décadas el número de casos de cáncer con tumores resistentes a uno o más fármacos ha crecido considerablemente, lo que reduce las opciones de tratamiento [4]. Aunque han surgido nuevos fármacos alternos como lo son bloqueadores hormonales o terapia monoclonal,

su precio es demasiado elevado para el ingreso de muchos pacientes, lo que limita las opciones que se pueden ofrecer aún más [5].

Sin embargo, no solamente el precio de un medicamento y su efectividad se tienen que tener en cuenta en cualquier línea de investigación sobre cáncer, puesto que el desgaste que genera una terapia quimioterapéutica en el organismo del paciente puede conllevar a un estado postratamiento indeseable, donde hay que recordar que ciertos medicamentos como el cisplatino pueden tener efectos colaterales como lo es el daño nefrológico y/o neurológico. Nuevas alternativas de costo reducido, alta biocompatibilidad y alta eficacia se han investigado con gran esfuerzo, investigación que ha dado frutos con gran potencial.

## 2. JUSTIFICACIÓN

La tendencia en aumento de incidencias de cáncer, los costos de los tratamientos actuales, los efectos adversos de los tratamientos y los recientes casos de resistencia a fármacos han generado la necesidad de nuevas alternativas con mayor eficacia y menor costo para seguir tratando la enfermedad.

## 3. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

- Sintetizar nuevos análogos de casiopeinas cobre-citrulina con potencial antineoplásico y su posterior encapsulación en nanoplateformas que permitan una biodistribución controlable

### 3.2. Objetivos particulares

- Elucidar mediante cristalografía de rayos X la estructura de los nuevos complejos y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas los nuevos complejos sintetizados
- Evaluar mediante ensayos *in-vitro* la actividad biológica de los nuevos complejos sintetizados
- Diseñar y evaluar plataformas de entrega (Liposomas) para los complejos con los mejores resultados mostrados en los ensayos *in-vitro*

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Cáncer

El cáncer, según la definición del Instituto Nacional del Cáncer, es una enfermedad descrita como el crecimiento anormal y sin control de las células en cualquier tejido del cuerpo, que, dependiendo de las circunstancias, tiene la capacidad de superar en número a las células sanas de ese mismo tejido y diseminarse hacia otras partes del cuerpo[5]. Esta enfermedad no es reciente, ya que se tiene conocimiento de ella desde tiempos anteriores a la antigua Grecia, y a pesar de que muchos tipos de tumores fueron descritos en el mundo antiguo, su estudio consistía más en explicaciones sobrenaturales y supersticiones.



**Figura 1. Representación artística del siglo XVI de los cuatro humores constituyentes del cuerpo humano**

Fue precisamente en la antigua Grecia donde se intentó racionalizar su origen debido a causas completamente naturales. La etimología de la palabra tiene origen en el griego Karkinos, que significa “cangrejo” en alusión a las observaciones de Hipócrates sobre cangrejos con grandes deformidades [6]. Con la escuela de Hipócrates, se atribuyó esta enfermedad a un desequilibrio

de los humores en el cuerpo (figura 1), idea que por siglos dominó por completo la noción de lo que la enfermedad significaba [7], [8].

A medida que las sociedades empezaron a desarrollar conocimiento de una manera metódica y sistemática, el estudio del cáncer abandonó las antiguas creencias sobre su causalidad. Uno de los primeros estudios que lograron demostrar una causalidad con éxito se remonta al siglo XVIII. El médico inglés Sir Percivall Potts realizó un estudio detallado de las verrugas de hollín, un tipo de tejido canceroso que surgía en la región del escroto. Este afectaba principalmente a los deshollinadores ingleses, y su estudio logró relacionar de manera inequívoca el oficio de los deshollinadores con este tipo de carcinoma y, por lo tanto, demostrar que la exposición al hollín provocaba este tipo de cáncer [9]–[11]. La relevancia de este trabajo, además de ayudar a promulgar leyes de protección laboral para trabajadores domésticos [12], también fue uno de los primeros trabajos que reconoció a una sustancia como carcinógena y demostró que esta enfermedad puede ser provocada por factores ambientales por lo que sirvió como base para el estudio moderno del cáncer. Con el tiempo fueron identificados cada vez más agentes capaces de provocar tumores, pero los mecanismos que originan la formación de un tumor aún no quedaban claros, por lo que por mucho tiempo se atribuyó esta enfermedad a factores meramente ambientales.

Después de que se descubriera la existencia del virus y su papel como agente causante de enfermedades, un hallazgo llamó la atención de la comunidad científica. En 1911 Peyton Rous descubrió que el extracto libre de células de los sarcomas extirpados de pollos enfermos tenía la capacidad de inducir el sarcoma en pollos sanos [8], [13]–[15], y puesto que el cáncer para estas épocas no era reconocido como una enfermedad infecciosa, este descubrimiento quebrantaba la causalidad ambiental de la enfermedad. Más tarde se aisló un agente viral de este extracto y fue bautizado como el virus del sarcoma de Rous (RSV por sus siglas en inglés). Este virus, terminaría

por convertirse en un estándar de estudio en laboratorios de todo el mundo. Ya que siendo un agente infeccioso que solo infectaba a pollos de raza Plymouth Rock (figura 2), y después de varios pases, investigadores pudieron infectar a pollos de otras razas de pollos, extendiéndose este experimento hasta llegar a infectar otras especies como patos, gorriones e incluso mamíferos como ratas y ratones.



**Figura 2. El ave Plymouth Barred Rock original del trabajo de Peyton Rous (1910) mostrando los síntomas de la infección con el RSV. Tomado de Weiss y Vogt (2011)**

Como lo menciona Martin en su revisión [13], en años posteriores, para poder entender el mecanismo en el que un virus provocaba la aparición de características cancerígenas en una población de células sanas. Un primer reto fue el establecimiento de métodos que permitieran medir la cantidad de virus necesario para poder infectar una población de células sanas y transformarlas en células cancerígenas.

De estos trabajos surgieron el ensayo de pústulas (o focus assay en inglés). El cual consistía en inocular huevos embrionarios sobre la membrana corioalantoidea, donde los virus, al infectar una célula de la membrana, generan pústulas en forma de puntos discretos, y al diluir una muestra de virus e inocular sobre la membrana del embrión, aparecen pústulas en un número proporcional al

número de virus de la dilución [16]. El ensayo fue diseñado a partir de las observaciones que hizo el mismo Peyton Rous sobre las pústulas en embriones.

Sin embargo, hubo un fenómeno que no fue capaz de aclarar, y fue el hecho de que algunos tumores, al transformarse en células cancerosas, no eran capaces de crear cantidades de virus detectables, este hecho, generaba cierta incertidumbre acerca del mecanismo de acción de un virus sobre la transformación de células [17].

Este problema esperó hasta la década de 1950 para ser atendido por Ray Bryan, cuando se descubrió que los tumores no productores de virus a menudo eran producto de infectar y transformar células con diluciones bajas de virus. Mientras que diluciones altas de virus producían tumores que liberan cantidades sustanciales de virus, el fenómeno posteriormente fue explicado al descubrir que existía la interferencia de virus contaminantes como el virus de leucosis aviar, presente de manera casi habitual en la especie. Lo que permite a esta interferencia bloquear los receptores para la entrada del RSV que solo al aumentar la dosis era capaz de infectar la célula, pero producto de esta interferencia surgieron cepas que no eran capaces de infectar nuevas células, denominadas variantes replicativas-defectuosas [13], [15], [17]–[22]. Tiempo después, al tratar el virus con tratamientos físicos como la irradiación  $\gamma$  o UV, también surgieron cepas que podían infectar fibroblastos en cultivo, pero no eran capaces de inducir las características cancerígenas, denominadas variantes transformantes-defectuosas. La diferencia entre las cepas del RSV replicativas-defectuosas y transformantes-defectuosas en contra de aquellas cepas que podían infectar y transformar células al mismo tiempo, era la responsable del poder tumorigénico del virus, pronto esta diferencia fue identificada como un gen y nombrado como *src* [13], [15], [17], cuando la proteína que era codificada por este gen fue aislada, purificada y elucidada, se descubrió

que se trataba de un receptor de estrógeno mutante, con un dominio defectuoso que no reconoce los sistemas de regulación.

El descubrimiento de este hecho causó confusión y rechazo dentro de la comunidad científica en un inicio. Pero con el posterior descubrimiento de la proteína retrotranscriptasa que permite a ciertos virus poder introducir secuencias ajenas al hospedero dentro de su genoma, las dudas acerca de este gen quedaron resueltas junto con el mecanismo de acción del RSV. Este hecho sugirió que es la introducción de secuencias defectuosas en el genoma del hospedero lo que provocan un fallo en la regulación del crecimiento del tejido y, por lo tanto, inducen un crecimiento anormal de este [8], [13], [15], [17].

Las experiencias anteriores sirvieron para terminar de acuñar la palabra “oncogén” describiéndose como aquellos genes que su mutación puede provocar el crecimiento anormal de un tejido. Además, este descubrimiento también reveló que el cáncer es una enfermedad que tiene un origen genético y que todos los factores que causan el crecimiento anormal de células deben su mecanismo a la interacción con el DNA de la célula, promoviendo mutaciones o daños en la cadena que altera los sistemas de regulación celular.

## **4.2. El surgimiento de la quimioterapia**

Si bien la consecuencia lógica ante el conocimiento de una enfermedad tan antigua y con una alta incidencia y mortalidad es la búsqueda de tratamientos efectivos (o una cura). La historia no ha sido sencilla, en gran parte debido al poco conocimiento real que se había tenido de la enfermedad, lo que hizo que muchos tratamientos estuvieran basados en las nociones que se tenían del mismo

cáncer. Por ejemplo, en la antigua Roma, donde la escuela de Galeno tiene origen, los tratamientos consistían más en supersticiones que apuntaban a equilibrar los humores del cuerpo [23].

Con los avances graduales en medicina y en prácticas quirúrgicas, los primeros tratamientos que mostraron efectividad reservada fueron justamente aquellas cirugías destinadas a la extirpación de tumores [23], [24]. Sin embargo, las condiciones en que se realizaba una cirugía involucraban un riesgo muy alto para el paciente, por lo que la probabilidad de éxito era muy baja. Solo a medida que nuevos procedimientos como la anestesia, la asepsia en quirófano y el descubrimiento y uso generalizado de antibióticos como la penicilina entraron en escena, es que la cirugía alcanzó niveles de éxito más grandes. Desafortunadamente, incluso en los casos donde una cirugía podría efectuarse con éxito, la remisión no se lograba en todos los casos [23]–[26].

Después de los eventos de la primera y segunda guerra mundial (figura 3), el mundo científico heredó un gran acervo de compuestos químicos que, a pesar de que su principal uso fue para la guerra, sirvieron de base para muchos productos de bien común, tales como: fertilizantes, pesticidas y medicamentos. De hecho, el primer agente químico que fue estudiado como antineoplásico fue la mostaza sulfurada, debido a que se había observado durante la primera y segunda guerra mundial que este agente causaba una disminución de glóbulos rojos en los pacientes que estuvieron expuestos a derrames o ataques militares con esta arma. Racionalizando el principio de la disminución de células de rápido crecimiento, se llegó a la hipótesis de que la mostaza sulfurada también podría tener un efecto en células cancerosas. Con esta idea, Louis Goodman y Alfred Gilman administraron mostaza sulfurada en un paciente con linfosarcoma, siendo la sorpresa, que el tumor logró reducirse en tamaño, y aunque a remisión no fue lograda, este descubrimiento marcó el inicio de la quimioterapia dirigida contra el cáncer [27]–[31].

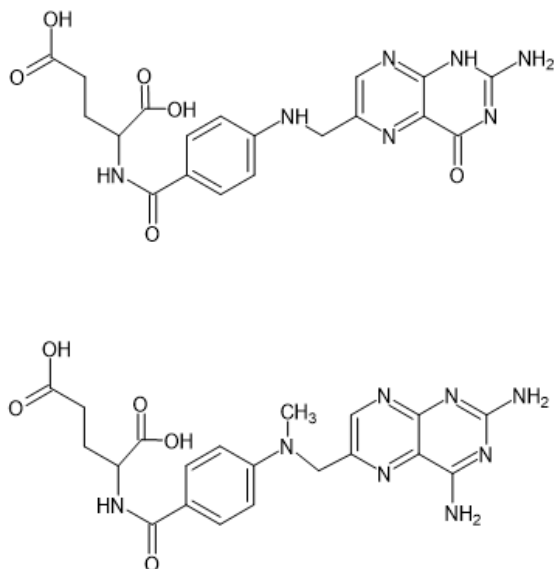


**Figura 3. Fotografía tomada durante la primera guerra mundial que muestra las quemaduras provocadas por la mostaza sulfurada. Archivo perteneciente a la US National Archives And Records Administration**

De la experiencia de la mostaza sulfurada siguieron los estudios en la década de 1940 por el ácido fólico, una molécula de reciente descubrimiento en la época. Teniendo la observación de ser un compuesto deficiente en pacientes con anemia megaloblástica y causar un estímulo en la proliferación de la leucemia linfoblástica aguda, se estableció que era un factor importante para el desarrollo de esta enfermedad. Como resultado de esto, y como una manera de racionalizar la función del ácido fólico sobre el crecimiento celular, se empezó a estudiar a los análogos, a los folatos y su efecto en el crecimiento de células malignas, de este estudio, Sídney Farber introdujo el metotrexato, un análogo metilado del ácido fólico (Figura 4). En los estudios contra la leucemia linfoblástica aguda (ALL) en niños, este mostró que posee actividad inhibitoria sobre la enfermedad, y sorpresivamente la nueva molécula lograba la remisión completa de la enfermedad, convirtiéndose en el primer medicamento efectivo contra el cáncer [31]–[33].

El mecanismo de acción del metotrexato radica en la inhibición irreversible de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), la cual es crucial para la síntesis *de-novo* de nucleótidos en la célula, y al ser bloqueada irreversiblemente induce la apoptosis en la célula [32], [34], [35]. Aunque tuvieron que pasar más de 30 años después de los experimentos de Farber para elucidar

este mecanismo, una idea quedó clara, y es que pequeñas modificaciones en los metabolitos de vías sintéticas fundamentales para el crecimiento, pueden provocar la inhibición del crecimiento, bajo esta idea surge el principio de los antimetabolitos.



**Figura 4. Estructuras del ácido fólico (estructura superior) y del metotrexato (estructura inferior)**

Con el descubrimiento de la penicilina y la fascinación por los increíbles resultados que ofrecía el nuevo medicamento contra enfermedades infecciosas, se planteó la pregunta de si existiría un efecto contra células malignas por parte del antibiótico. Aunque la respuesta fue rotundamente negativa, la posibilidad de encontrar una molécula con propiedades bactericidas (o bacteriostáticas) y al mismo tiempo propiedades antineoplásicas, se siguió estudiando. De la búsqueda por nuevos antibióticos, el grupo de investigación de Selman A. Waksman descubrió un nuevo antibiótico, el cual fue aislado de cepas del género *Streptomyces* y bautizado como Actinomicina D. Aunque fue descartado para su uso en infecciones debido a la toxicidad, la investigación contra células cancerosas dio resultados positivos, siendo el primer antibiótico

descubierto con propiedades antineoplásicas y uno de los primeros agentes de origen natural [31], [36]–[40].

El interés de las moléculas de origen natural también abrió camino en la investigación de la quimioterapia contra el cáncer. En 1956, la división de tratamientos del Instituto Nacional del Cáncer (NCI) en Estados Unidos, encargó en C. Gordon Zubrod (médico que previamente trabajó con agentes antipalúdicos para el ejército estadounidense), una línea de investigación para la búsqueda de fármacos con actividad antineoplásica. Con un profundo interés en productos de origen natural provenientes de plantas y fuentes marinas, Zubrod encaminó la línea de investigación hacia estas fuentes, lo que conllevó el descubrimiento de los taxanos con el aislamiento de dos compuestos activos: el paclitaxel y la camptotecina en 1964 y 1966 respectivamente, por Monroe E. Wall y M. C. Wani. Ambos compuestos fueron aislados de la corteza de dos árboles, el tejo del pacífico (*Taxus brevifolia*) y del árbol chino de la vida (*Camptotheca acuminata*). De estos, el paclitaxel terminaría convirtiéndose en un medicamento aprobado por la FDA, siendo recetado como primera línea de tratamiento de tumores sólidos, mientras que la camptotecina debido sus efectos adversos no logró la aprobación, pero sirvió como modelo para la creación de otros medicamentos como el irinotecan [31], [41]–[45].

Las investigaciones descritas, además de entregar los primeros agentes quimioterapéuticos efectivos, abrieron las puertas al descubrimiento de nuevas clases de medicamentos, por ejemplo:

- La mostaza sulfurada abrió la investigación a moléculas capaces de alquilar el ADN donde surgieron medicamentos como la ciclofosfamida, la ifosfamida, el busulfano, el clorambucilo o el melfalan [46]–[48]

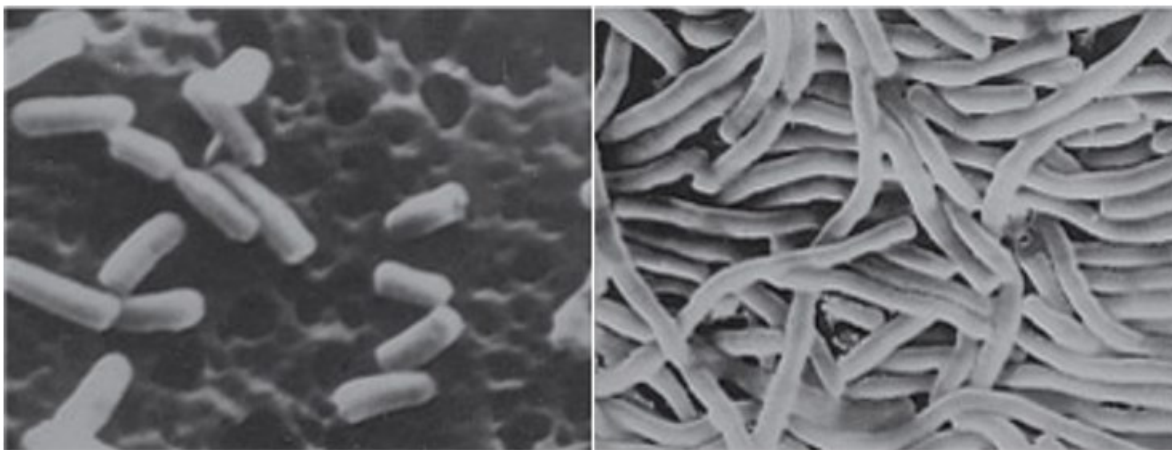
- De la investigación de los antifolatos surgió las antimetabolitos que pronto se extendieron más allá de análogos del ácido fólico con los análogos de nucleósidos como la mercaptopurina, la gemcitabina o el 5-fluorouracilo [49]–[51]
- De la investigación de productos naturales también trajo consigo alcaloides extraídos de la vinca como la vincristina o la vinorelbina[52]–[54]
- De la investigación de antibióticos surgieron también medicamentos como la epirubicina y la doxorubicina [31]

La lista se extiende a una gran cantidad de moléculas, pero la mayor parte de ellas, aunque distantes en cuanto a estructura y mecanismo de acción, presentan una similitud, en todas las moléculas predominan los enlaces covalentes.

### **4.3. Metalofarmacos**

Un hecho que marcó la quimioterapia contra el cáncer fue un descubrimiento accidental. En 1960\*. Barnett Rosenberg, investigador de la Universidad Estatal de Michigan, investigaba los posibles efectos del campo eléctrico sobre el crecimiento bacteriano. Descubriéndose que al aplicar una corriente eléctrica con dos electrodos de platino sobre un cultivo de *E. coli* se podía inhibir la división de las bacterias, pero se mantenían creciendo, provocando la formación de filamentos bacterianos de varias veces el largo de una bacteria normal (figura 5). Aunque en un principio el fenómeno fue adjudicado al campo eléctrico, pronto se descubriría que el efecto era causado por subproductos de la degradación electroquímica del electrodo de platino de la celda. Aunque desalentador al principio, el fenómeno seguía siendo interesante, por lo que pronto se siguió investigando al respecto, encontrando que el compuesto principal que causaba el alargamiento

anómalo era un complejo de coordinación de platino, el cis-diamino dicloroplatino (II)  $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$  conocido como cisplatino. El cisplatino tenía la capacidad de crear entrecruzamientos en el ADN de la célula y provocar daños en la expresión de procesos vitales [55]–[61].



**Figura 5. Micrografías de *E. Coli* antes y después de ser tratadas con cisplatino. Tomado de Hoeschele (2012)**

El efecto citotóxico del cisplatino pronto se siguió estudiando con más detenimiento, encontrando en la década de los 60 por parte del equipo de investigación del NCI, que este compuesto era activo contra xenoinjertos de tumores de cáncer testicular. El compuesto logró la remisión en modelos animales y después en pacientes en ensayos clínicos, recibiendo el cisplatino en 1972 la aprobación de la FDA para su uso contra el cáncer testicular [56], [58]–[60]. Un caso de serendipia y de juego en el laboratorio terminó convirtiéndose, no solamente en uno de los primeros medicamentos útiles contra tumores sólidos, sino también el primer metalofármaco aprobado para la enfermedad.

El éxito que produjo el cisplatino, en especial contra el cáncer testicular, ha conducido desde la década de 1970 a numerosos grupos de investigación a la búsqueda de nuevos análogos de platino,

esperando ampliar la lista de metalofármacos antineoplásicos, de donde se han sintetizado una gran cantidad de nuevas moléculas. Lamentablemente, solamente unas cuantas moléculas han logrado ingresar a ensayos clínicos y una cantidad aún más pequeña ha logrado demostrar tener una mejor efectividad y reunir los requisitos necesarios para ser aprobado su uso, donde solamente el carboplatino y el oxaliplatino han sido aprobados por la FDA. Ejemplos de complejos de platino, son el lobaplatino, el nedaplatino, el hepaplatino y el satraplatino que solo han recibido aprobación por solo unos países o aún se encuentran en fases clínicas esperando aprobación [57], [62]–[64].

Los metalofármacos por definición se describen como todos aquellos medicamentos que incorporan en su molécula uno o más átomos metálicos. Este tipo de compuestos han sido utilizados en medicina desde siglos atrás a la actualidad, un ejemplo de ello es la arsfenamina, una un compuesto orgánico de arsénico sintetizado por Paul Ehrlich en 1906. Este compuesto fue el primer medicamento eficaz contra la sífilis y la primera línea de tratamiento antes de la aparición de la penicilina, y fue justamente este compuesto el que Ehrlich empleó como base para acuñar el término “bala mágica”. En la actualidad, el empleo de metales en medicina incluye aplicaciones variadas, como agentes antidiarreicos (compuestos de bismuto), agentes bactericidas (compuestos de plata), antirreumáticos (compuestos de oro), eutimizantes (sales de litio), su uso en imagenología (compuestos de gadolinio y otros), entre otras aplicaciones [63]–[66].

A diferencia de los medicamentos basados únicamente en moléculas orgánicas, los metalofármacos al estar constituidos en su mayoría por enlaces de coordinación, presentan características completamente únicas, pues al interactuar con el medio fisiológico tienden a someterse a reacciones redox e intercambio de ligantes, generando varias especies que tienen la capacidad de unirse a diversas dianas macromoleculares, por esta razón muchos metalofármacos tienden a ser categorizados como profármacos y el hecho de muchos complejos sean ligantes con

actividad biológica unidos por un centro metálico provoca que al disociarse ataquen diversas dianas con un efecto distinto, por lo que muchos metalofármacos exhiben un comportamiento multiobjetivo (multitarget drugs en inglés) [62]–[64].

#### **4.4. Limitaciones**

La investigación en el campo de la quimioterapia contra el cáncer, a pesar de sus logros, no ha estado exenta de una gran cantidad de obstáculos antes de poder colocar un medicamento nuevo en el esquema de tratamiento de un paciente. Ya que el camino hacia el uso generalizado de una molécula aprobada es un camino aún más largo. Por ejemplo, las fases clínicas del paclitaxel conllevaron un enorme reto del que muchos investigadores no estaban seguros si se debía completar. Esto fue ocasionado por la enorme dificultad que conllevó reunir la cantidad de paclitaxel necesaria para poder llevar a cabo los estudios. Ya que en ese momento no se conocía una vía para sintetizar la compleja molécula y la única fuente era la corteza del árbol de donde se identificó, el tejo del pacífico, un árbol endémico de la costa oeste de Estados Unidos y Canadá, del cual solo para poder extraer 1 g eran necesarios cerca de 10 Kg de corteza del árbol. La demanda que se produjo por el medicamento llevó a poner en riesgo la población nativa del tejo del pacífico, además de que los enormes costos que involucró la extracción orillaron al gobierno americano a conceder la patente a la Bristol Myers Squibb para abaratar precios. Este hecho desató aún más polémicas, pues el costo que adquirió el medicamento una vez comercializado puso sobre la mesa la discusión sobre nuevas regulaciones a la industria farmacéutica [67]. Lamentablemente, casi todos los medicamentos antineoplásicos utilizados hoy en día han estado relacionados con problemas asociados a su precio.

No solamente los costos de un medicamento son el único problema en la quimioterapia, los efectos colaterales son uno de los problemas más grandes a afrontar. Ejemplo de esto, cuando Sídney Farber se encontraba experimentando con las antimetabolitos, su investigación varias veces estuvo a punto de ser cancelada. Debido a que en los años cuarenta, un diagnóstico de leucemia infantil se traducía en una muy dolorosa condena de muerte. Los experimentos de Farber eran vistos por sus colegas como una forma cruel de alargar la agonía de sus pacientes, y los efectos colaterales que los antifolatos ocasionaron, hicieron que su trabajo se viera con aún más pesimismo. Sin embargo, cuando los resultados fueron publicados y corroborados, la imagen de Farber se restableció como la del padre de la quimioterapia y el hombre que salvó a miles de enfermos [33].

Casi todos los medicamentos tienen efectos colaterales indeseables y el daño al organismo que generan es un factor que no se puede ignorar. Tomando como ejemplo al cisplatino, tanto la nefrotoxicidad, la neurotoxicidad, la cardiotoxicidad y la ototoxicidad han sido ampliamente reportadas [68]–[71], lo que se traduce a que el medicamento genera un cuadro clínico doloroso en los pacientes. Los agentes usados en quimioterapia han mostrado causar mielosupresión, esterilidad permanente en pacientes sin ningún tipo de afección reproductiva, entre otros efectos colaterales [72]–[74]. La pérdida de cabello, los vómitos incontrolables, diarreas intensas, neuropatías, hemorragias y demás padecimientos son a menudo relacionados con la quimioterapia y en gran parte contribuyen al deterioro mental del paciente [75], [76].

Aun cuando los costos de la quimioterapia pueden ser costeados y los efectos colaterales pueden ser tolerados por el paciente, la lista de inconvenientes sigue ampliándose, lamentablemente la posibilidad de que un tumor presente resistencia a uno o más fármacos es bastante alta, ocasionando que la carga económica y física sobre el paciente sea un esfuerzo en vano. En el campo de la investigación se han teorizado el mecanismo de resistencia hacia muchos

medicamentos, como la resistencia al cisplatino y derivados de platino, la resistencia a los antifolatos, la resistencia a los alcaloides de la vinca, entre muchos otros [77]–[81]. Por ello, la búsqueda de nuevos medicamentos cada día se vuelve una necesidad de salud pública.

#### **4.5. Nuevas alternativas**

La búsqueda de medicamentos siempre ha obedecido a las necesidades temporales a las que se enfrenta la medicina. Por ello, al ser la resistencia a los fármacos y los efectos colaterales los principales problemas actuales de la terapia contra el cáncer, no es de extrañar que las principales cualidades buscadas en la mayoría de las investigaciones de metalofármacos sean referentes a una mayor citotoxicidad y una mayor selectividad por parte de los nuevos candidatos propuestos.

La investigación de complejos de platino siempre ha estado respaldada por los antecedentes que el platino tiene en la medicina, además de ser de esta familia el primer metalofármaco efectivo contra el cáncer. También esta familia posee los únicos metalofármacos aprobados para el tratamiento de tumores, pero la falta de selectividad del complejo hace que los efectos secundarios sean persistentes en todos los candidatos, específicamente el problema radica en la poca biocompatibilidad que el platino ofrece. La química del platino por lo general involucra la preferencia del metal por formar complejos con geometrías planas, y siempre los miembros de la familia se ajustan a la fórmula  $[\text{Pt}(A)_n(L)_n]$ , donde  $A$  representa ligantes de tipo amino y  $L$  representa un grupo saliente, y modificaciones a los grupos amino/salientes, la inclusión de moléculas bioactivas, el uso de grupos más voluminosos o el uso de más centros metálicos de platino (complejos polinucleares de platino), se han realizado para reducir los efectos colaterales sin disminuir la citotoxicidad sobre células cancerosas[82]–[84].

La búsqueda de nuevas alternativas también ha explorado otros elementos distintos al platino, en virtud de reducir los efectos colaterales, siendo uno de los más prominentes el rutenio, donde los complejos de este elemento han mostrado tener una gran actividad antitumoral. En comparación con el platino, los complejos de rutenio presentan características que los hacen únicos. Ya que pueden activarse mediante distintos mecanismos dentro de la célula, sean por reacciones redox efectuadas por moléculas del medio fisiológico o por fotoactivación y, eligiendo bien los ligantes, se puede modular la actividad de la molécula, con lo cual, en teoría, se pueden reducir los efectos colaterales. Ante este panorama se puede mencionar que algunos complejos de rutenio han entrado y aprobado las fases clínicas con éxito, siendo los complejos nombrados como NAMI-A, 62 KP1019, 63 NKP1339 , 64 y TLD1443 [84]–[87].

La poca biocompatibilidad que ofrece el platino ha llevado a la investigación con elementos con una mayor biocompatibilidad, oligoelementos como el hierro han probado tener compuestos efectivos como es el caso de las sales de ferrocenio picrato y tricloroacetato [88], igualmente varios autores han reportado casos prometedores con metales como zinc y cobalto [89], [90]. En los últimos años, el oligoelemento que más atención ha recibido es el cobre, un elemento relacionado con una gran cantidad procesos vitales, y su química permite la formación de una gran variedad de complejos en coordinación octaédrica. Esto último ha permitido generar una gran cantidad de complejos con ligantes tan variados como tiocarbonas, bases de Schiff, fosfinas, compuestos heteroaromáticos, entre otros ligantes generando moléculas con capacidad para inhibir topoisomerasas, generar especies reactivas de oxígeno (ROS), unirse al ADN y generar cortes en la cadena, entre otros mecanismos que les permiten ser biológicamente activos [91]–[95].

Dentro de la familia de complejos de cobre, las casiopeinas desarrollados por Ruiz-Azuara surgen como una subfamilia con propiedades interesantes. Químicamente definidas como complejos

mixtos de cobre (II) con la fórmula general  $[Cu(N-N)(N-O)]$  o  $[Cu(N-N)(O-O)]$  donde N-N representa un ligante tipo diimina (típicamente 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina o derivados de estos) mientras que N-N y N-O representan ligantes bidentados siendo los más comunes, acetoacetato y  $\alpha$ -aminoácidos (Figura 6). La fórmula general ha permitido crear una gran variedad de complejos dentro de esta familia, donde la casiopeina IIIia ( $[Cu(4-7$  dimetil 1-10 Phen)(acac)](NO<sub>3</sub>)) ha logrado ingresar a estudios de fase I con éxito [91], [93], [96]

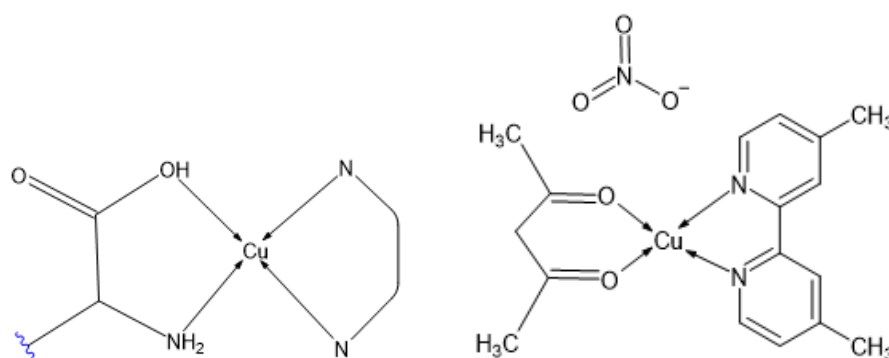


Figura 6. De izquierda a derecha, estructura general de las casiopeinas del tipo aminoacido y estructura de la casiopeina III ia.

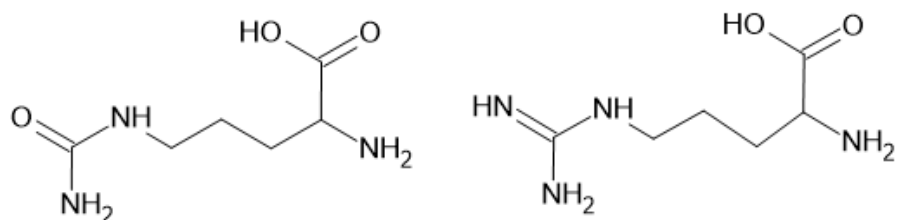
#### 4.6. Citrulina

La L-Citrulina (figura 7) es un aminoácido no esencial presente alimentos como pepinos, calabazas, melones, calabacines y calabazas [97], fue descubierto por Mitsunori Wada en 1930, quien lo identificó en el zumo de sandía (*Citrullus vulgaris*) y fue aislado independientemente por primera vez en 1914 por Yotaro Koga y Ryo Ohtake [98], [99].

La naturaleza no esencial de la citrulina ha sido la responsable de que el interés por la molécula sea relativamente bajo, sin embargo, en la última década, este compuesto ha cobrado cada vez más importancia debido al metabolismo intrínseco en él se encuentra involucrado [100]. Al ser un

aminoácido no esencial, no interviene en la síntesis de proteínas, pero es generado en el cuerpo de forma endógena, principalmente en el intestino [100]–[102]. La citrulina es un metabolito de dos vías importantes, la primera es el ciclo de la urea, donde la glutamina, al ser transformada en ornitina, sufre modificaciones de varias enzimas que condensan el aminoácido con carbamoil fosfato en la mitocondria, dando lugar a la citrulina; la segunda vía utiliza la arginina como precursor y produce citrulina y óxido nítrico en una reacción catalizada por el óxido nítrico sintasa (NOS) [103].

Las rutas mencionadas pueden desembocar en diversas patologías cuando las enzimas necesarias para los procesos se encuentren comprometidas por mutaciones en los genes que las codifican. Para la detección de estas patologías, la citrulina puede actuar como biomarcador o suplemento en el tratamiento de las mismas. Argumentando lo anterior con base en la implicación directa o indirecta de este aminoácido con las enzimas constituyentes de dichas vías, y al estar comprometidas por mutaciones no letales, la producción de citrulina estaría igualmente comprometida causando que ni el ciclo de la urea ni tampoco la regulación del NO fueran los adecuados [104], [105].



**Figura 7. De izquierda a derecha, estructuras de la citrulina y arginina.**

Debido a que el ciclo del NO regula la presión arterial, las investigaciones actuales sugieren que la implementación con citrulina podría ser un tratamiento para la hipertensión. La citrulina se

puede tomar para aliviar la falta de arginina, prevenir daños hepáticos o proteger contra la malaria cerebral [106]–[108]. Además, el consumo de citrulina podría ayudar en el tratamiento y la prevención de varios trastornos, como la disfunción eréctil, la anemia falciforme, la quimioterapia del cáncer y las enfermedades cardiovasculares; mejorar el contenido proteico en pacientes desnutridos y ancianos; y tratar la enfermedad de Alzheimer y la demencia multiinfarto, entre otros [109], [110].

La citrulina juega un papel como anticuerpo en los péptidos citrulinados, según otros estudios. La citrulinación de proteínas puede generar autoanticuerpos, que pueden servir como biomarcadores para una variedad de condiciones, como la artritis reumatoide, la patología intestinal y el síndrome del intestino corto [111]. Aunque la citrulina juega un papel crucial en la salud humana, se necesita mucha más investigación antes de que se utilice con confianza para tratar todos los trastornos mencionados [112].

## 5. ANTECEDENTES

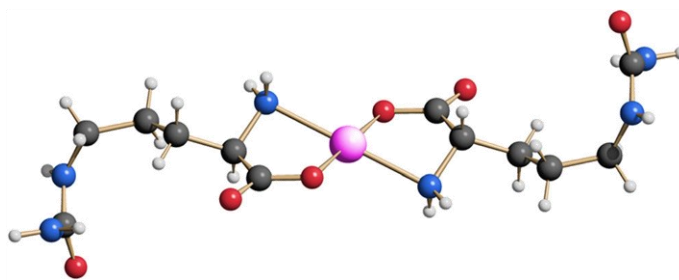
El primer complejo de citrulina fue descubierto hace más de 100 años por Wada [99], el mismo descubridor del aminoácido en cuestión, al describir la formación de un quelato de color azul al hacer reaccionar el concentrado de zumo de sandía con sales de cobre (II), realizando un gran énfasis en su gran insolubilidad del complejo (figura 8). Posteriormente, Kurtz en 1938 [113] describió a más detalle este complejo como parte de una nueva metodología sintética para obtener citrulina. De este trabajo, Kurtz infirió correctamente que dos moléculas de citrulina atacaban al átomo de cobre en un arreglo Cis mediante el nitrógeno del grupo amino y el oxígeno con doble enlace del grupo carboxílico, de lo cual se tomó ventaja para proteger el aminoácido de reacciones colaterales durante la síntesis.



**Figura 8. Fotografía tomada por Wada (1930) donde muestra la sal de cobre con el aminoácido que descubrió**

Desde el descubrimiento del complejo de cobre-citrulina hasta la actualidad, se han realizado varios trabajos donde se han formado complejos mixtos terciarios con citrulina-cobre y varias mediciones de parámetros fisicoquímicos, por ejemplo, Thrika en 1968 [114] así como Clarke y Martell en 1970 [115] por separado midieron constantes de formación del complejo de citrulina y cobre en relaciones molares 2:1 y 1:1 en solución. La síntesis de complejos mixtos de citrulina

también ha sido reportada, como es el caso del estudio de Yamaguchi en 1979 [116] en el cual se midieron constantes de formación para el complejo de cobre (II)-citrulina-histidina ([Cu(L-His)(L-Cit)]) y el trabajo reportado por Ganadu en 1991 [117] para el complejo de citrulina-paladio (II) caracterizado mediante resonancia magnética nuclear (RMN). En años recientes, constantes de equilibrio han sido medidas para compuestos cuaternarios de cobre, zinc, cobalto y níquel con el complejo mercurio-citrulina [118].



**Figura 9. Estructura elucidada por Mascaliovas (2015) del complejo Bis-citrulinato de paladio (II)**

La mayoría de los autores coinciden en que la aparente insolubilidad de los complejos de citrulina dificulta la elucidación de la estructura de los complejos, aunque no ha sido un impedimento para conseguir datos estructurales. Mascaliovas en 2015 [119] reportó la estructura del complejo de paladio (II) con citrulina en una relación molar 2:1 mediante difracción de rayos X en polvo, mostrando un arreglo Cis de 2 moléculas de citrulina, coordinando el átomo de paladio mediante el nitrógeno del grupo amino y el oxígeno con doble enlace del grupo carboxílico (figura 2), de una manera similar a la estructura inferida por Kurtz en 1938. La caracterización del complejo cobre citrulina aún sigue siendo un tema de investigación abierto, y toma mayor interés cuando se toma en cuenta que aminoácidos de cobre con glutamina, lisina y ornitina han mostrado potencial farmacológico en proyecciones *in-silico* [120]–[122], lo que abre la puerta a investigar análogos de casiopeinas con citrulina dentro de los esfuerzos hechos por buscar nuevos medicamentos antineoplásicos y/o con otras propiedades farmacéuticas.

## **6. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

### **6.1. Materiales**

La L-citrulina utilizada fue adquirida en grado comercial (>95%) de la compañía Beyond Raw Chemistry Labs, Pittsburgh PA, USA y en grado A.C.S (Merck) (>98%). El resto de los reactivos y solventes utilizados fueron comprados de Merck en grado A.C.S. o superior. Los lípidos utilizados fueron adquiridos de Avanti Polar Lipids. Las líneas celulares fueron provistas por el laboratorio de Fisiología celular de la Facultad de Medicina de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, proviniendo las líneas de la colección de la American Type Culture Collection (ATCC).

### **6.2. Síntesis de los complejos**

#### **6.2.1. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)<sub>2</sub>]**

Como fue mencionado en secciones anteriores, existe poca información acerca de la química de coordinación de la citrulina, por ello el bis-citrulinato de cobre representa un modelo de estudio adecuado para entender la naturaleza de la coordinación de la citrulina. A pesar de que la síntesis de este compuesto ya está reportada, la estructura cristalina no había sido reportada, por ello se realizó la electrosíntesis del complejo para obtener monocristales de calidad suficiente para realizar estudios de difracción (XRD).

Se construyó una celda electrolítica [123] utilizando un electrodo de cobre metálico (99.9%) como ánodo, un electrodo de grafito como cátodo y una solución de citrulina (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) (M.W.= 175.19 g/mol) en concentración 1 M fue utilizada como electrolito. Las condiciones de operación como la diferencia de potencial, la intensidad y el tiempo se fijaron en 12 V, 3 mA y 24 h,

respectivamente. Después del tiempo de trabajo establecido, en el ánodo de cobre se observó la formación de pequeños cristales azules insolubles en agua, los cuales fueron lavados con agua destilada, secados al aire y caracterizados con técnicas espectroscópicas y difracción de rayos-X de monocristal.

### **6.2.2. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>)**

La síntesis del complejo mixto se realizó mediante síntesis tradicional, basándose en la descrita por Su (1999) [124]. Para ello, 1 mmol de L-citrulina (0.175g) se suspendió en 30 mL (volumen final) de metanol bajo un ligero calentamiento (50 °C) y en constante agitación (aprox. 360 rpm) hasta conseguir una mezcla lo mejor distribuida posible. Posteriormente, se añadió a la mezcla 1 mL de una solución metanólica 1 M de nitrato de cobre (II) trihidratado (Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>\*3H<sub>2</sub>O) (M.W.=241.60 g/mol) y una vez observada la completa disolución de la citrulina y la formación de una solución azul homogénea, se añadió 1 mL de solución metanólica 1 M de 1,10-fenantrolina (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>) (M.W.= 180.21 g/mol). En este punto, se observó un cambio de tonalidad en el color azul de la solución. Las condiciones de agitación y temperatura se mantuvieron durante la adición de los ligantes y por 15 minutos más después del cambio de color observado.

Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y el pH de la solución se ajustó a un valor de 7-8 con la adición de una solución de hidróxido de potasio (KOH) (M.W.= 56.105 g/mol) en agua (≈5 M). Finalmente, el producto fue filtrado con papel Whatman No.1, dejando cristalizar lentamente el sobrenadante a temperatura ambiente durante toda una noche. Transcurridas 12 horas, en el fondo del recipiente se separaron cúmulos cristalinos de color azul intenso solubles en agua y metanol. El compuesto fue recristalizado en agua.

### 6.2.3. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>)

La síntesis del complejo mixto se realizó de manera similar a la síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>), variando solamente la adición de 1 mL de solución metanólica 1M de 2,2-bipiridina (C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>) (M.W.=156.19 g/mol) en lugar de fenantrolina.

Del complejo resultante fueron obtenidos dos tipos de cristales, el primero fue producto de una lenta evaporación por 2 días del sobrenadante neutralizado y filtrado, rescatando agujas cristalinas de color azul intenso altamente solubles en agua y metanol

El segundo tipo de cristal fue resultado de una recrystalización en agua. El residuo seco de evaporación, el cual fue filtrado una segunda vez con un filtro de jeringa (0.2µm) y recrystalizado rápidamente al aire a temperatura ambiente, dando como resultado láminas cristalinas del mismo color que el primer tipo cristalino y teniendo el mismo comportamiento en cuanto a solubilidad en agua y metanol.

### 6.2.4. Síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](ClO<sub>4</sub>)

La síntesis del complejo mixto se realizó de manera similar a la síntesis del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>). Variando la adición de 1 mL de solución metanólica 1 M de perclorato de cobre (II) hexahidratado (Cu(ClO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O) (M.W.=370.52g/mol) en lugar de nitrato de cobre, además de que la adición de ligantes fue realizada con la mayor rapidez posible, debido a que el complejo bis-citrulinato de cobre (II) se forma con rapidez antes de ser añadido el segundo ligante, en este caso. El sobrenadante resultante se dejó cristalizar a temperatura ambiente, dando como resultado cristales azules romboédricos de color azul intenso, poco solubles en agua.

### **6.3. Caracterización del Bis-citrulinato de cobre (II)**

#### **6.3.1. Caracterizaciones espectrofotométricas del [Cu(L-Citr)<sub>2</sub>]**

Debido a la insolubilidad del Bis-citrulinato de cobre en agua, el experimento UV-VIS se realizó en fase sólida con el uso de un espectrofotómetro UV-Vis-NIR Cary 5000-Agilent. Se utilizó un soporte de polvo para compensar la cantidad tan pequeña y una pastilla de teflón con una cavidad para depositar el material. Se obtuvo la línea de base, se colocó el polvo y se obtuvo el espectro. El barrido se realizó de 200 a 800 nm, a una velocidad de barrido de 600 nm por minuto, con pasos de 1 nm en el modo de reflectancia. El accesorio utilizado es el DRA-2500 con un detector interno de PbS.

El espectro infrarrojo del Bis-citrulinato de cobre se registró con el uso de espectrofotómetro Nicolet 6700 FTIR acoplado al accesorio iTR con punta de diamante, en la región de 4000 a 650 cm<sup>-1</sup>.

El espectro Raman se obtuvo con espectrómetro LabRAM HR-Olympus Micro Raman, a temperatura ambiente, en una configuración de retrodispersión utilizando la línea láser de 633 nm (He-Ne) como fuente de excitación.

El espectro <sup>1</sup>H-RMN se obtuvo en un espectrómetro Bruker AVANCE III 500 MHz, en la región de 0 a 13 ppm. Para lograr realizar este estudio en fase acuosa, 10 mg del polvo azul fueron disueltos en 500 μL de agua deuterada (D<sub>2</sub>O) acidificando la mezcla con 50 de ácido clorhídrico (HCl) μL 1M, posteriormente el sobrenadante fue recuperado y medido en un tubo adecuado de RMN.

### 6.3.2. Difracción de Rayos X de monocristal del [Cu(L-Citr)<sub>2</sub>]

Los cristales de buena calidad del Bis-citrulinato de cobre (II) se sometieron a estudios de difracción de rayos X. Los datos se recogieron con un difractómetro Bruker D8 Venture con detector de fotones equipado con radiación CuK monocromática de grafito ( $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$ ).

Los datos se procesaron con la suite APEX3 y se utilizó SADABS-2016/2 para la corrección de la absorción [125]. La estructura se resolvió por métodos directos utilizando el programa ShelXT y se refinó por mínimos cuadrados de matriz completa en F2 con SHELXL-2019 [126]. Los parámetros de desplazamiento atómico posicionales y anisotrópicos se refinaron para todos los átomos que no eran de hidrógeno. Los átomos de hidrógeno fueron localizados en diferentes mapas de Fourier e incluidos como contribuciones fijas montando sus átomos padres con factores térmicos isotrópicos elegidos como 1.2 veces sus átomos portadores. Se utilizó el software OLEX2 como interfaz gráfica [127].

Los detalles de las determinaciones de las estructuras y del refinamiento se resumen en los Anexos 1 y 2. Los datos cristalográficos (excluyendo los factores de estructura) de las estructuras descritas en esta tesis se han depositado en el Cambridge Crystallographic Data Center con los números 2172421 y 2287583. En este artículo se han depositado en el Cambridge Crystallographic Data Center como publicación suplementaria nº 2172421.

## **6.4. Caracterización de los complejos mixtos**

### **6.4.1. Caracterizaciones espectrofotométricas de los complejos mixtos**

El espectro UV-Vis para los complejos se midió en fase acuosa con el uso de un espectrofotómetro UV-Vis Varian Cary utilizando una cubeta de cuarzo con un paso de 1 cm. En la región de 200 a 500 nm se utilizaron soluciones en agua destilada de los complejos en concentración de 0.001 a 0.01 mg/mL, mientras que en la región de 500 a 800 nm se utilizaron soluciones en agua destilada en concentración de 0.5 a 3 mg/mL.

El espectro FT-IR se obtuvo en fase sólida mediante el uso de espectrómetro Bruker ALPHA II Platinum de reflectancia total atenuada (ATR) en el rango de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

La espectroscopia Raman se realizó con el mismo equipo que en el Bis-citrulinato de cobre (II).

La espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro JEOL MStation JMS-700 con la fuente de iones configurada para bombardeo atómico rápido (FAB-MS).

### **6.4.2. Difracción de Rayos X de monocristal de los complejos mixtos**

Los estudios de difracción de rayos X de monocristal se llevaron a cabo en cristales de alta calidad. La radiación monocromática de grafito Mo-K $\alpha$  ( $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ ) y un detector de área de dispositivo de carga acoplada se utilizaron para recopilar los datos. Se utilizaron los paquetes de software CrysAlis PRO y CrysAlis RED para recopilar datos y corregir la absorción [128]. Las estructuras se resolvieron directamente con el programa ShelXT y se refinó con SHELXL2019 [129] para obtener los cuadrados de matriz completa más pequeños en F2. Para todos los átomos no hidrógeno, se mejoraron los parámetros de desplazamiento atómico anisotrópico y de posición.

Los átomos de hidrógeno se incluyeron como contribuciones fijas montando sus átomos padres en varios mapas de Fourier. Los factores térmicos isotrópicos se seleccionaron como 1,2 veces sus átomos portadores. El programa Olex2 se utilizó como interfaz gráfica [130].

## **6.5. Ensayos *in-vitro***

### **6.5.1. Selección de los complejos a estudiar**

Para realizar los estudios *in-vitro*, la solubilidad juega un papel muy importante, por ello solo los complejos más solubles fueron elegidos para realizar estos estudios. De los 5 complejos cristalizados, 2 cristales corresponden al complejo con formula  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ , mientras que la formula  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{X})$  engloba a 2 complejos,  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{ClO}_4)$ , donde el complejo con contraión perclorato presenta una solubilidad baja en agua, por ello, sólo fueron seleccionados los complejos  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ . Para la sección de encapsulación se seleccionará el complejo que mejor actividad *in-vitro* presente.

### **6.5.2. Interacción con CT-DNA**

La fuerza de interacción con el ADN se determinó mediante valoraciones espectrofotométricas con ADN de timo de ternera (Calf-Thymus ADN o CT-ADN).

Al ser el CT-ADN un reactivo no homogéneo, la concentración se tiene que estimar antes de realizar el estudio, para ello se procedió a medir, por titulación espectrofotométrica, la absorbancia a 260 nm del CT-ADN en dilución con buffer TBS (Tris-Buffered Saline) y considerando el

coeficiente de absorptividad como  $\epsilon = 6600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [129], se calculó la concentración mediante correlación lineal. La pureza del CT-ADN se midió mediante el cociente entre las absorbancias a 260 y 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) y el cociente entre las absorbancias a 260 y 230 nm ( $A_{260}/A_{230}$ ), y solamente se utilizaron soluciones de CT-ADN con relaciones iguales o superiores a 1.8, con lo cual se puede asegurar muestras libres de proteínas y compuestos interferentes.

El experimento se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL con una concentración fija del complejo de cobre ( $\text{CuLL}'$ ) de 10  $\mu\text{M}$ , en Buffer TBS (pH= 7.4). Las soluciones se valoraron con diferentes concentraciones de CT-ADN, desde 10 hasta 100  $\mu\text{M}$  y se registró el espectro de absorción en cada punto de la curva de titulación en el rango de 250 a 400 nm, tomando como referencia la banda del complejo con mayor absorptividad ( $\epsilon_{\text{max}}$ ), las siguientes ecuaciones (Ec. 1 y Ec. 2), derivadas de la ley de Beer-Lambert, se utilizaron para calcular la absorbancia molar libre y aparente de los complejos ( $\epsilon_f$  y  $\epsilon_a$ , respectivamente).

$$\epsilon_f = \frac{ABS_0}{[CuLL]} \quad \text{Ec.1} \quad \epsilon_a = \frac{ABS_i}{[CuLL]} \quad \text{Ec.2}$$

$ABS_0$  y  $ABS_i$  corresponden a los valores de absorbancia del complejo libre y el complejo valorado en el i-ésimo punto de la curva, respectivamente. La ecuación de Wolfe-Schimer (Ec. 3)[131] se utilizó para calcular la constante de asociación ( $K_b$ ) mediante regresión lineal.

$$\frac{[DNA]}{\Delta\epsilon_{a-f}} = \frac{[DNA]}{\Delta\epsilon_{b-f}} + \frac{1}{k_b(\Delta\epsilon_{a-f})} \quad \text{Ec.3}$$

Donde [DNA] es la concentración molar de CT-ADN,  $\epsilon_{(a-f)}$  y  $\epsilon_{(b-f)}$  son las diferencias entre los coeficientes de absorción molar de forma aparente ( $\epsilon_a$ ) y completamente ligado ( $\epsilon_b$ ) respecto al coeficiente del complejo libre ( $\epsilon_f$ ), respectivamente, y  $K_b$  es la constante de asociación. Se obtiene una correlación lineal trazando [ADN] frente a  $[ADN]/\epsilon_{(a-f)}$ , a partir de la cual se puede calcular  $K_b$  despejando la pendiente y el intercepto de la curva.

### 6.5.3. Ensayos de Fluorescencia

La fluorescencia del bromuro de etidio (EB) aumenta cerca de 25 veces cuando se une con ADN para formar el complejo ADN-EB, pero si el bromuro de etidio es desplazado del complejo por otra molécula intercaladora, ocurre un fenómeno de desactivación fluorescente (o quenching) reduciendo la intensidad de la fluorescencia [132], [133] La producción de desactivación por parte de una molécula sobre el sistema ADN-EB sirve como prueba para mostrar la intercalación como forma de interacción entre esa molécula con el ADN [134].

Con el fin de evaluar la intercalación como modo de interacción de los complejos de cobre con el ADN, se realizaron titulaciones de fluorescencia de los complejos de cobre sobre el complejo ADN-EB. Para ello sobre 1 mL de buffer TBS (pH= 7.4) fueron agregados bromuro de etidio y CT-ADN hasta una concentración de 0.37  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  respectivamente para formar el complejo EB-ADN, la solución se dejó equilibrar a temperatura ambiente por 5 minutos y posteriormente se agregó el complejo de cobre en solución con el mismo buffer, titulando la solución con el complejo de cobre en el rango de 2 hasta 20  $\mu\text{M}$  en cada punto de la curva de titulación. Los espectros de emisión del complejo EB-ADN antes y después de la adición del complejo se midieron en el rango

de 550 a 700 nm con una longitud de onda de excitación de 525 nm con el uso de un espectrómetro de fluorescencia Varian Cary Eclipse, configurando el equipo con una apertura de 5 nm.

La ecuación Stern-Volmer (Ec.4) [135] se utilizó para calcular la capacidad de desplazamiento del EB de cada complejo, considerando el complejo de cobre (CuLL') como el agente desactivador (o quencher) y el EB-DNA como el sistema emisor.

$$\frac{I_0}{I} = 1 + k_q \tau_0 [CuLL'] = 1 + K_{sv} [CuLL'] \quad \text{Ec.4}$$

Siendo  $I_0$  e  $I$  la intensidad de fluorescencia del sistema emisor antes y después de la adición del agente desactivador,  $k_q$  es la constante de desactivación,  $\tau_0$  es el tiempo de vida del sistema emisor y la constante de Stern-Volmer es  $K_{sv}$ , que es el producto de  $k_q$  y  $\tau_0$ .

La relación de diferencia entre los estados emisivos y la concentración del complejo se correlaciona linealmente en esta ecuación, y el  $K_{sv}$  se puede encontrar como la pendiente de un gráfico ( $I_0/I$ ) frente a ( $[CuLL']$ ) mediante regresión lineal. De la misma manera, el parámetro  $k_q$  se puede calcular mediante regresión lineal si el valor de  $\tau_0$  para el sistema EB-ADN se considera 23 ns, según lo reportado por otros autores [136].

#### **6.5.4. Interacción con plásmido pUC19**

La conformación del ADN bicatenario (double-stranded DNA o dsDNA) brinda información sobre cómo interactúa una molécula frente al ADN, esto se debe a que ciertos estados de enrollamiento aparecen cuando la doble hebra se ve comprometida por cortes, muescas o la reducción de tensión por la acción un agente externo [137]. La conformación del ADN se puede visualizar fácilmente

con técnicas rutinarias como lo son la electroforesis en gel. En esta técnica, el ADN migra en función, no solamente de su tamaño, sino de la forma que presente la hebra, y al existir una interacción frente al ADN, la técnica permite ver la aparición de bandas adicionales a las que se observaría de una muestra normal de ADN. El ADN plasmídico circular permite estudiar perfectamente lo anterior, siendo las bandas asociadas a los estados correspondientes a las formas I superenrollada (súper-coiled o SC) y la II forma circular relajada (circular relaxed o CR) los observados en muestras de ADN plasmídico normales. La aparición de bandas de la intermedias entre estos dos estados se asocia a cortes en la estructura que producen la forma III de ADN lineal (L) [138].

Experimentalmente, se utilizó el plásmido pUC19 para evaluar la interacción con los complejos, teniendo como primer paso la amplificación del plásmido y su purificación, para ello se procedió con la expresión del plásmido en la cepa HB 101 de *E. coli*, siguiendo la metodología descrita por Sambrook (2006) [139] para la transfección de células por la técnica del fosfato de calcio. Las bacterias transfectadas fueron cultivadas en medio LB suplementado con ampicilina en concentración de 0.1 mg/mL por 24 h a 37 °C. Posteriormente el cultivo fue centrifugado a 3300 xg por 5 minutos para rescatar el pellet de bacterias. El ADN plasmídico fue separado y purificado de las células mediante la técnica de lisis alcalina y purificado por adsorción en columna con el Kit de purificación GenElute (Merck®). Finalmente, el producto aislado fue precipitado en etanol absoluto frío, centrifugado a 9000 xg y vuelto a resuspender en agua libre de nucleasas. La pureza y concentración fueron medidas mediante titulación espectrofotométrica, como se describió en la sección de interacción con CT-ADN, considerando para este caso el coeficiente de absorptividad como  $\epsilon = 3.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . [140]

La interacción con los complejos se realizó incubando 30  $\mu\text{L}$  de solución de plásmido en agua libre de nucleasas, en concentración de 15  $\text{ng}/\mu\text{L}$ , con diferentes concentraciones del complejo de cobre, desde 5 hasta 100  $\mu\text{M}$ , fijando las condiciones a 37 °C por toda una noche (24 h aproximadamente). Transcurrido el periodo, las muestras fueron depositadas en gel de agarosa al 1% (m/v), teñido con bromuro de etidio (EB) (10  $\text{mg}/\text{mL}$ ) en relación 5  $\mu\text{L}/100$  mL sobre solución buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) (pH= 8.0) y corridas en una cámara de electroforesis Biorad© Mini-Sub Cell GT Cell con una fuente de poder Daigger© Biotech 300. Las condiciones de trabajo se fijaron en 100 V y 100 mA por 1 h. El gel fue revelado en un transiluminador Benchtop© 3UV© con fuente de luz a 260 nm y registrando los cambios producidos en las bandas del gel.

#### **6.5.5. Ensayos de citotoxicidad**

La citotoxicidad de los complejos se realizó *in-vitro* sobre 4 líneas celulares derivadas de distintos tipos de tejidos tumorales, HeLa (derivada de adenocarcinoma cervical), HCT-15 (derivada de adenocarcinoma colorrectal), MDA MB 231 y MCF (derivadas de adenocarcinoma mamario). Las células, sin sobrepasar los 4 pases, después de descongelarse y retirar el medio de preservación, se mantuvieron en medio mínimo suplementado al 5% v/v con suero fetal bovino (FBS) y al 1% v/v con penicilina/estreptomicina (10000 U / 10  $\text{mg}/\text{mL}$ ) sobre placas de Roux (25  $\text{cm}^2$ ). Las condiciones de incubación se fijaron a 37 °C sobre atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% por 4-5 días hasta llegar a niveles de confluencia cercanos al 80 o un 90%. El medio mínimo utilizado para cada línea fue el recomendado por el proveedor, siendo medio mínimo de Eagle (EMEM) para la línea HeLa, medio mínimo de Eagle mod. Dulbecco (DMEM) para línea MDA, medio mínimo de Eagle mod. F12 (MEM/F12) para la línea MCF-7 y medio RMPI 1640 para la línea HCT-15.

Para inducir la muerte de las células con los complejos, se siguió el protocolo descrito por [141]. Para lo cual las células fueron desprendidas de las placas con tripsina/EDTA, centrifugadas a 5000 xg, lavadas con buffer PBS (pH= 7.4) y sembradas en placas de microtitulación de 96 pozos a una densidad de  $3 \times 10^4$  células/mL. Sembrando por triplicado por fila, 100  $\mu$ L en cada pocillo, para dar un número total de 3000 células por pocillo, posteriormente se dejó la placa incubar en las mismas condiciones en el mismo medio suplementado descrito por 24 h para lograr la adhesión. Transcurrido el tiempo, el medio fue aspirado y se agregó a los pozos de prueba medio fresco suplementado con el complejo en un rango de concentración de 1-10  $\mu$ M, cada fila asignada a un valor de concentración, dejando 2 filas de pocillos con medio sin complejo como controles positivos y negativos. Las placas fueron incubadas por 24 h más en las mismas condiciones.

Al día siguiente, se verificó visualmente los pocillos tratados, observando la presencia de células desprendidas y/o dañadas. De ser positivo y gradual con la concentración el resultado, se procedió con la medición de la viabilidad celular mediante el ensayo colorimétrico por XTT, según lo descrito por [142] . Para realizar la medición, el medio suplementado con complejo fue aspirado y reemplazado, por pocillo, con 50  $\mu$ L de medio fresco sin indicador de pH, 24.5  $\mu$ L de XTT en solución en concentración de 15 mg/mL y 0.5  $\mu$ L de solución de PMS en concentración a 15 mg/mL. Posteriormente, la placa fue incubada en las mismas condiciones por 4 h más y la absorbancia a 450 nm fue leída con el uso de un lector de placas Multiskan FC (Thermo© Scientific). La fila destinada como control negativo fue previamente tratada con etanol absoluto por 15 minutos para generar apoptosis temprana en las células, con lo cual el color de estos pocillos se mantiene sin cambios. Al ser el XTT, de color amarillo, reducido por células viables a su producto formazan, de color rojo, la concentración de formazan en el medio se vuelve proporcional

al número de células viables, por ende, la absorbancia a 450 nm (donde se localiza el pico máximo de absorbancia) se vuelve directamente proporcional al número de células viables.

La respuesta producida, definida como la relación entre células viables y apoptóticas, se puede estimar a partir de los datos de absorbancia. Considerando que la absorbancia promedio de los controles positivos es proporcional a la máxima absorbancia producida por una población 100% viable, la absorbancia promedio de los controles negativos es proporcional a la máxima absorbancia producida por una población 100% apoptótica y la diferencia entre ambos promedios resulta en el cambio de absorbancia producida por una población completamente viable. Al comparar este valor contra la diferencia producida por el complejo en la i-esima concentración se puede estimar el índice de respuesta en la i-esima concentración ( $R_i$ ), matemáticamente, lo anterior se reordena en la ecuación 5

$$R_i = 1 - \frac{ABS_i - ABS_{nc}}{ABS_{pc} - ABS_{nc}} \quad (\text{Ec. 5})$$

Siendo  $ABS_i$ ,  $ABS_{nc}$  y  $ABS_{pc}$  las absorbancias promedio de la i-esima concentración probada, del control positivo y del control negativo respectivamente. Con la expresión anterior se puede crear una curva Dosis-Respuesta, con la cual se pueden calcular el valor  $IC_{50}$  (la concentración que produce la mitad de la respuesta en una población) modelando la curva obtenida con la ecuación de Hill, la cual, adaptada a nuestro caso de estudio, toma la forma que se muestra en la ecuación 6

$$R_i = \frac{R_{max}[CuLL]^n}{IC_{50}^n + [CuLL]^n} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde  $n$  representa el coeficiente de Hill y  $R_{max}$  representa el valor de respuesta máximo producido por el complejo. A pesar de que la linealización se puede utilizar para resolver por regresión lineal los parámetros de la ecuación, algunos puntos, en especial los valores que tienden a  $R_{max}$ , producen indeterminaciones que dificultan la estimación de parámetros. Por ello, los parámetros de la ecuación fueron calculados con el uso del paquete de software STATISTICA (v12.0) con la herramienta de ajuste dinámico, que permite modelar datos con ecuaciones no lineales.

## **6.6. Diseño, síntesis y evaluación de las Liposomas**

### **6.6.1. Factores a estudiar**

Para realizar el estudio de encapsulación, se seleccionaron las fosfatidilcolinas DMPC, DPPC y DOPC debido a la asociación con de las fosfatidilcolinas con membranas celulares y surfactantes [143]–[146]. La citotoxicidad de las plataformas es el factor de estudio, y al presumirse que el tipo fosfatidilcolina utilizada como fosfolípido principal y el contraión presente en los liposomas puede tener un efecto sobre la citotoxicidad, se debe medir la citotoxicidad en función del valor  $IC_{50}$  de cada liposoma sintetizada para los tres fosfolípidos seleccionados y los tres contraiones seleccionados. Suponiendo que el efecto de la interacción entre el tipo de fosfatidilcolina con el tipo de contraión es despreciable, los experimentos de citotoxicidad de los liposomas fueron diseñados en arreglo de cuadro latino de tamaño  $3 \times 3$ , asignando como factor de bloque el tipo de línea celular, eligiendo las líneas MDA, HeLa y HCT-15 para este experimento y asignando el tipo de fosfolípido y el tipo de contraión como variables de bloque, con lo cual el cuadro latino adquiere la forma mostrada en la tabla 1

**Tabla 1. Composición de las soluciones buffer del experimento**

Solución	Agente amortiguador	Sal del contraión (NaX)
A	MOPS	NaNO <sub>3</sub>
B		NaCl
C		NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub>

Nota: la elección de MOPS para realizar las soluciones obedece a la poca afinidad que presenta por iones metálicos ( $M^{n+}$ ), y a pesar de que se reporta la presencia de citotoxicidad en cultivos, la concentración en que es utilizado no supone ningún riesgo al estudio pues es inferior a los valores reportados de 20mM

### 6.6.2. Diseño experimental

La citotoxicidad de las plataformas es el factor de estudio, y al presumirse que el tipo de fosfolípido y el contraión presente en los liposomas puede tener un efecto sobre la citotoxicidad, se debe medir la citotoxicidad en función del valor  $IC_{50}$  de cada liposoma sintetizada para los tres fosfolípidos seleccionados y los tres contraiones seleccionados. Suponiendo que el efecto de la interacción entre el tipo de fosfolípido con el tipo de contraión es despreciable, los experimentos de citotoxicidad de los liposomas fueron diseñados en arreglo de cuadro latino de tamaño 3x3. Asignando como factor de bloque el tipo de línea celular, eligiendo las líneas MDA, HeLa y HCT-15 para este experimento y asignando el tipo de fosfolípido y el tipo de contraión como variables de bloque. Con lo cual el cuadro latino adquiere la forma mostrada en la tabla 2

**Tabla 2. Diseño en cuadro latino del experimento de citotoxicidad**

	DMPC	DPPC	DOCP
MDA	A	B	C
HeLa	C	A	B
HCT-15	B	C	A

**Tabla 3. Liposomas sintetizados para el experimento de citotoxicidad**

Liposoma	Fosfolípido principal	Solución buffer
1	DMPC	A
2	DPPC	B
3	DOPC	C
4	DMPC	C
5	DPPC	A
6	DOPC	B
7	DMPC	B
8	DPPC	C
9	DOPC	A

Donde A, B y C representan las soluciones buffer descritas en la tabla \*. Interpretando que cada unidad experimental se debe probar con un liposoma sintetizado con el i-esimo fosfolípido, con la i-esima solución buffer sobre la i-esima línea celular, resulta en la creación de 9 liposomas distintos, las cuales se resumen en la tabla 3.

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con la misma metodología descrita en la sección de ensayos de citotoxicidad. Para asegurar una reducción en los valores, se utilizaron soluciones concentradas de liposomas, añadiendo los mismos volúmenes utilizados con el complejo sin encapsular, con el objetivo de observar una reducción de viabilidad amplia y poder comparar de una mejor manera. Con el objetivo de poder comparar valores entre distintas líneas celulares que tienen valores de IC50 completamente distintos, la variable respuesta para el diseño es la diferencia, porcentual, del valor de concentración (RIC50) del complejo encapsulado respecto al complejo sin encapsular, como se muestra en la ecuación 7

$$R_{IC_{50}} = \left(1 - \frac{IC_{50\ lp}}{IC_{50\ fc}}\right) * 100 \text{ (Ec. 7)}$$

Donde  $IC_{50lp}$   $IC_{50fc}$  representan la mitad de la concentración máxima inhibitoria de los complejos encapsulados y libres respectivamente. Al utilizar soluciones de concentraciones de liposomas concentradas y utilizar los mismos volúmenes que las utilizadas con el complejo sin encapsular, la concentración final se puede considerar como la concentración del complejo sin encapsular multiplicada por un factor al que denominaremos “x”. Este último factor es proporcional a las veces que el complejo se encuentra concentrado respecto a la solución del complejo sin encapsular. Por lo que se puede decir que la siguiente expresión (ecuación 8) tiene sentido, si y solo si para realizar las diluciones en el experimento se ocupan exactamente los mismos volúmenes y las plataformas son encapsuladas con la misma concentración que el complejo libre

$$R_{IC_{50lp}} = R_{IC_{50fc}} * X \text{ (Ec. 8)}$$

Al ser el objetivo demostrar o rechazar el efecto que tiene la solución buffer y el tipo de fosfolípido sobre la citotoxicidad resultante, además de la dificultad de establecer un protocolo para medir la concentración de una nueva molécula en un nuevo liposoma, el factor X no fue estimado. En su lugar se trabajó con las mismas concentraciones y proporciones en los 9 liposomas a evaluar y la diferencia producida por diferentes factores fue sujeta a análisis estadísticos.

El análisis estadístico, para un diseño en cuadrado latino, consistió en un análisis de varianza (ANOVA) a un nivel de significancia al 95% ( $\alpha=0.05$ ) para un diseño categórico unifactorial, el cual fue realizado con el uso de la paquetería de software Statgraphics v18.

### **6.6.3. Síntesis de liposomas**

Los liposomas se sintetizaron mediante la técnica de extrusión, para lo cual fue utilizado el equipo de extrusión miniextruder© (Avanti© Polar Lipids) (Figura 10 y 11), utilizando filtros de membrana PE y soportes de membrana PE. El ensamble del equipo se muestra en el Anexo\*.

Para proceder experimentalmente fue utilizada una metodología basada en el protocolo de Jimah (2017) [147] para el ensamble de liposomas, para ello el fosfolípido principal, colesterol vegetal y PC-PEG200, todos en solución etanólica de 25 mg/mL, fueron mezclados en volumen suficiente para conseguir una relación molar 7 : 2.5 : 0.5 para un volumen final de 1 mL en etanol y posteriormente la solución de lípidos fue secada por evaporación para formar una capa de lípidos sobre el fondo del recipiente, la cual fue secada al vacío y resguardadas bajo atmósfera de nitrógeno para evitar la degradación por el aire. La capa de fosfolípidos se rehidrató con 1 mL del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) en solución 1 mg/mL con la solución buffer seleccionada y la mezcla resultante fue agitada en vortex por 5 minutos o hasta conseguir una suspensión lo más homogeneizada posible. Posteriormente, el contenido fue transferido a una de las jeringas del equipo y colocado en el ensamble previamente calentado a la temperatura de transición del fosfolípido y humedecido con el mismo buffer (ver Anexo \*). El contenido fue extruído al pasarlo hacia la otra jeringa y regresarlo a la primera jeringa, repitiendo el proceso 5 veces para asegurar que el tamaño alcance un valor igual a 100 nm. Finalmente, los residuos de complejo y lípidos sin encapsular fueron retirados de la solución mediante el uso de concentradores de 10 KD (Corning©), centrifugando 350 µL solución sobre el concentrador a 12000xg por una hora aproximadamente hasta conseguir reducir la solución hasta 50 µL. Las soluciones de liposomas concentradas fueron conservadas bajo atmósfera de nitrógeno en oscuridad a una temperatura de 5 °C.

### 1.1.1. Caracterización de nanoplataformas

La distribución del tamaño de las liposomas fue estimado por la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS), para ello cada suspensión concentrada de liposomas fue diluida en el mismo buffer usado en la síntesis, en un factor 1:35 y medidas con el uso del analizador de tamaño de nanopartículas NANOTRAC<sup>®</sup> WAVE II (Montgomeryville, PA, USA).

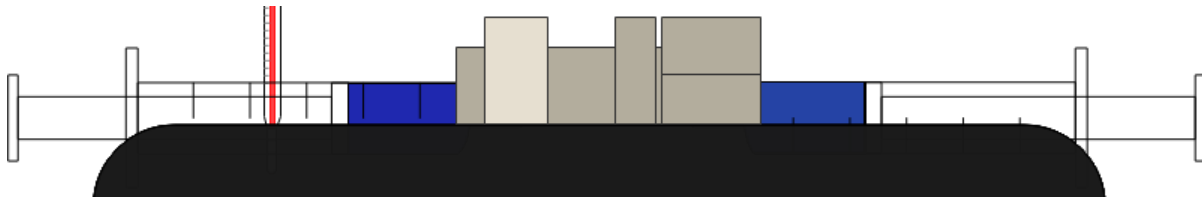


Figura 10. Representación del ensamble del equipo de extrusión miniextruder<sup>®</sup>

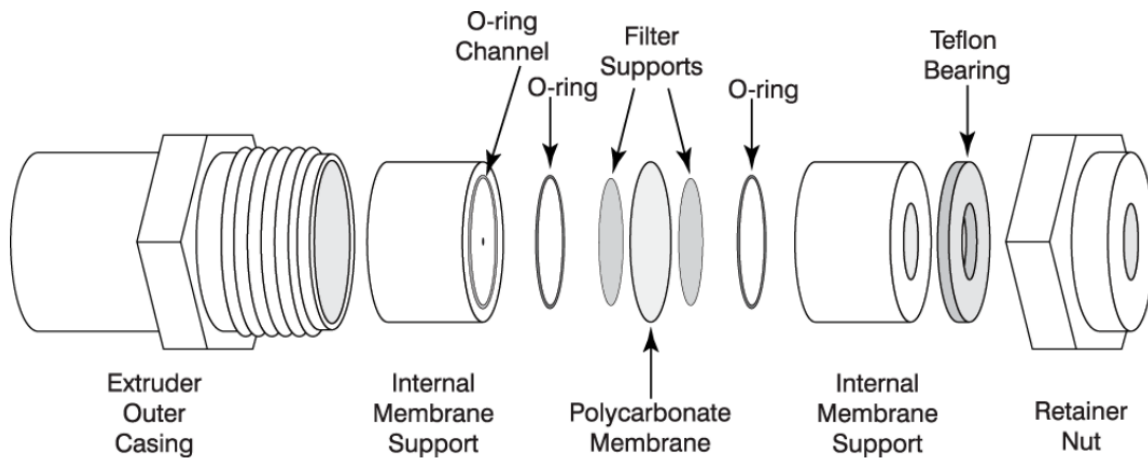


Figura 11. Ensamble del Equipo Mini-Extruder<sup>®</sup>

## 2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.1. Estructura de los complejos

#### 2.1.1. Estructura del [Cu(D-Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>

El *bis*-citrulinato de cobre (II) [Cu(Citr)<sub>2</sub>] cristalizó como polímero de coordinación bidimensional con grupo espacial monoclinico  $P2_1$  (Figura 12 y 13), con un ion metálico de Cu(II) en el centro y dos moléculas coordinadas de citrulina como ligantes bidentados conformando la unidad asimétrica. El compuesto tiene una fórmula empírica correspondiente a [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>. El centro metálico de cobre, como la mayor parte de los complejos de coordinación de este metal, presenta una geometría de coordinación octaédrica, mostrando una deformación alargada en las posiciones axiales. El centro metálico se encuentra coordinado por los átomos de oxígeno del grupo funcional carboxilo de otras dos moléculas de citrulina adyacentes, con lo cual la esfera de coordinación adquiere la forma CuO<sub>4</sub>N<sub>2</sub>. La cual está formada por dos átomos de oxígeno de los grupos carboxilato de dos moléculas de ligante, dos átomos de nitrógeno pertenecientes a grupos amino de los mismos ligantes, y dos átomos de oxígeno de grupos amida de dos ligantes diferentes.

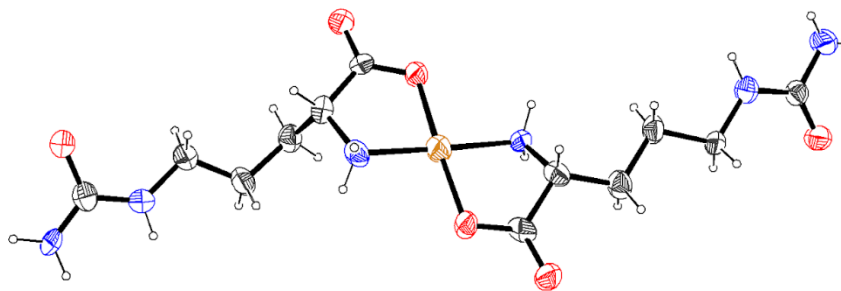
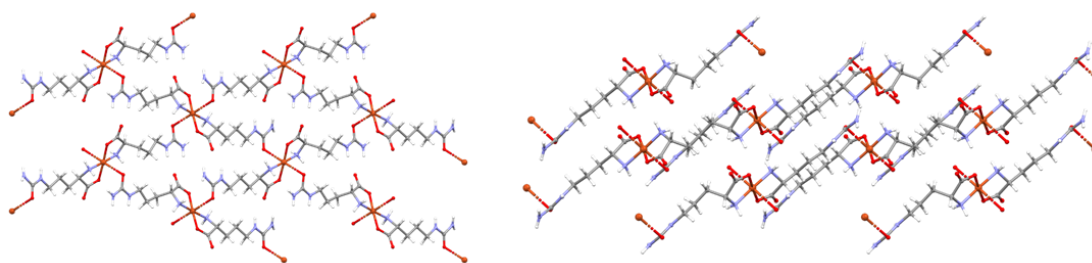


Figura 12. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> representado a un 50% de probabilidad

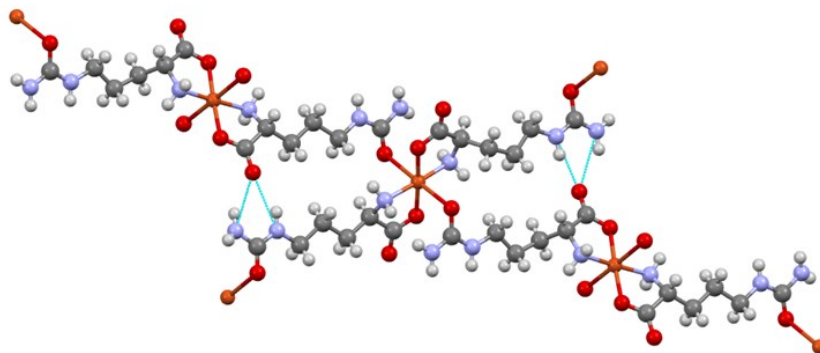
Como consecuencia de un pronunciado efecto Jahn-Teller, la esfera de coordinación presenta una deformación alrededor de los orbitales  $d$  del Cu(II) con geometría octaédrica con una tendencia a dividir los niveles de energía degenerados [148], las posiciones basales están ocupadas por dos enlaces Cu-N y dos enlaces Cu-O con distancias en el rango de 1.952(8)-1.978(8) Å y 1.951(8)-1.961(7) Å, respectivamente. Otros autores reportan distancias de los enlaces Cu-O en las posiciones apicales en valores entre 2.4 y 2.8 Å, siendo dominantes las interacciones electrostáticas (), comparando con los valores de este trabajo en 2.622(9) y 2.724(9) Å. [149].



**Figura 13. Estructura cristalina del compuesto  $[Cu(Citr)_2]_n$  a lo largo de los ejes cristalográficos a y b (de izquierda a derecha)**

Debido a que los grupos carboxilato, amino y amida de la citrulina interactúan con dos iones metálicos de cobre, se considera que la citrulina en este caso actúa como enlazador ditópico. Así como ha sido reportado por otros autores para los casos de los quelatos con Co(II), Cu(II), Pd(II), y Zn(II). [150]–[152], También el modo de coordinación corresponde al de un ligante bidentado mediante el átomo de oxígeno del carboxilato y átomo de nitrógeno de la amina primaria unidos al centro de cobre (II). Sin embargo, por primera vez, en esta estructura, el oxígeno del grupo amida también está coordinado a un ion metálico y forma el enlace axial del octaedro distorsionado. La estructura supramolecular, como se muestra en la figura 14, se estabiliza por

enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares de tipo N-H---O dentro de las capas, y se forman dos enlaces de hidrógeno desde la amina primaria y secundaria hasta el oxígeno del grupo carboxilato en diferentes ligantes, dando lugar a un arreglo de anillo  $R_1^2(6)$ .



**Figura 14. Vista en perspectiva de los enlaces de hidrógeno intramoleculares N-H--O y N-H-O (línea de puntos azul claro)**

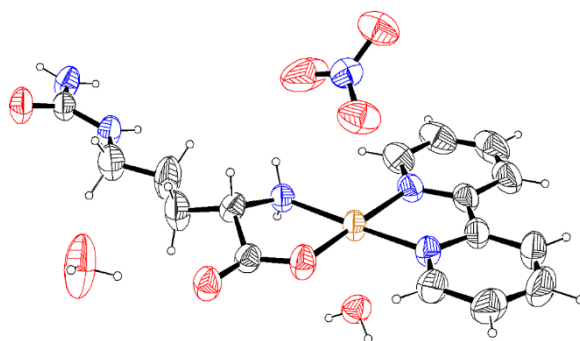
Sorpresivamente, el complejo obtenido da lugar a los enantiómeros D-Citrulina debido a la coordinación con Cu(II), generando una disposición de los ligantes en capas paralelas al plano, lo cual contrasta con el reactivo utilizado en la síntesis, que presentaba una pureza enantiomérica (L) de más del 90%.

### **2.1.2. Estructura de los complejos [Cu(D,L-Citr)(bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(L-Citr)(bipy)](NO<sub>3</sub>)**

El análisis del complejo Cu(Citr)(bipy)(H<sub>2</sub>O)](H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>) por difracción de rayos X de monocristal muestra que el sistema cristaliza en el grupo espacial triclínico P-1, donde la celda unitaria se conforma por dos unidades mononucleares de [Cu(bipy)(Citr)(H<sub>2</sub>O)](H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>) (figura 15) con dos moléculas de agua de cristalización en el centro de la celda.

La esfera de coordinación, con una geometría octaédrica distorsionada con deformación alargada, se conforma con la fórmula  $\text{CuO}_3\text{N}_3$  con un átomo de oxígeno de la molécula de agua coordinada y un átomo de oxígeno del anión nitrato ocupando las posiciones apicales, mientras que las posiciones ecuatoriales se encuentran ocupadas por un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno pertenecientes a los grupos carboxilo y amino, respectivamente, del ligante Citrulina y otros dos átomos de nitrógeno pertenecientes a la molécula de 2,2'-bipiridina.

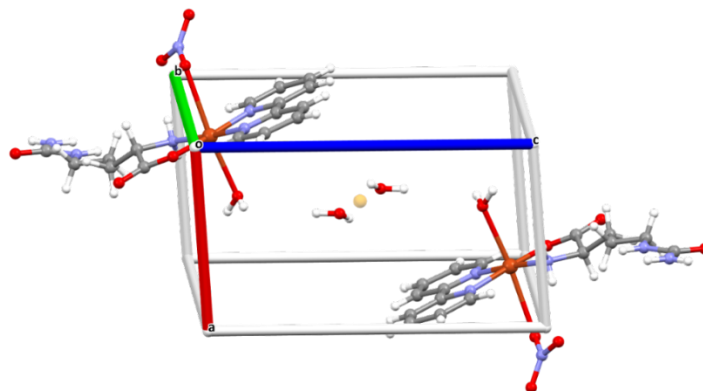
De igual manera que el caso del bis-citrulinato de cobre (II), la deformación alargada en la esfera de coordinación es el resultado del efecto Jahn-Teller. En donde los orbitales d tienden a desdoblarse para eliminar los niveles de energía degenerados y disminuir así la energía del sistema [148]. Es por ello, que mientras las posiciones basales se encuentran ocupadas por tres enlaces Cu-N (bipy y Citr) y un enlace Cu-O (Citr) con distancias de 1.983(2)-2.010(2) Å y 1.9287(17) Å, respectivamente, las posiciones apicales están definidas por un enlace Cu-O (H<sub>2</sub>O) de 2.485 Å y un enlace Cu-O (NO<sub>3</sub>) de 2.763 Å, correspondientes a interacciones electrostáticas [149].



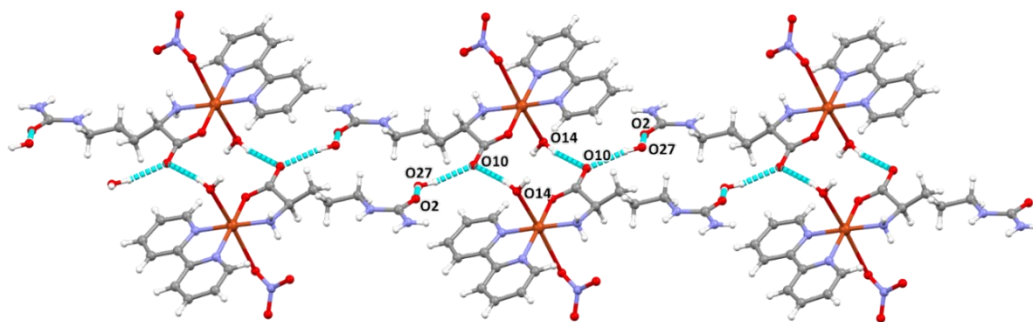
**Figura 15. Diagrama ORTEP del complejo  $[\text{Cu}(\text{D-Citr})_2]_n$  representado a un 50% de probabilidad**

Como se muestra en la Figura 16, la celda unitaria presenta ambos enantiómeros, consecuencia de la presencia de un carbono quiral en el ligante citrulina; el enantiómero (D) está presente en un 51.2%, mientras que el enantiómero (L) aparece en un 48.8%. La estructura intramolecular muestra

que los compuestos mononucleares se encuentran unidos mediante enlaces de hidrógeno intermoleculares entre la molécula de agua coordinada y el grupo carboxilato de otra molécula de citrulina adyacente, además de que cada compuesto interactúa con una molécula de agua de cristalización, que une el grupo carboxilo con un grupo ureido (Figura 17).



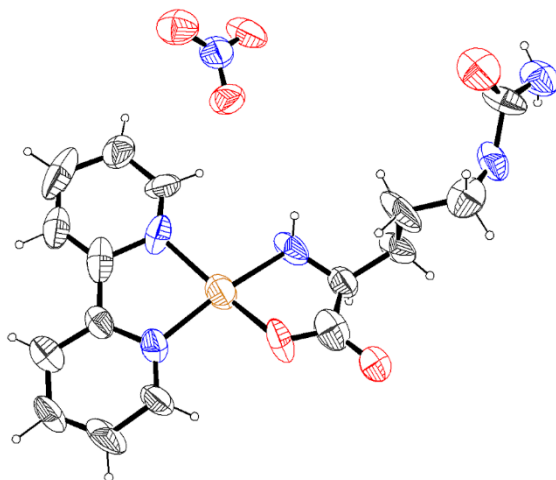
**Figura 16.** La celda unitaria del complejo  $[\text{Cu}(\text{D,L-Citr})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$ . El punto naranja del centro corresponde al centroide de la estructura, así como a su centro de inversión



**Figura 17.** Cada entidad está unida a otra por dos enlaces de hidrógeno entre las moléculas de agua coordinadas y los grupos carboxilo de la Citrulina, y a un tercer monómero gracias a la molécula de agua de cristalización y al grupo ureido

Por el otro lado, el complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})](\text{NO}_3)$  (figura 18), en comparación con el complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$ , cristalizó en el sistema monoclinico P21. De igual manera, el complejo exhibe una coordinación octaédrica distorsionada donde las posiciones ecuatoriales se

encuentran ocupadas por los ligantes citrulina y bipyridina. Sin embargo, en este caso las posiciones axiales se encuentran ocupadas por un ion nitrato y por una molécula del complejo adyacente mediante la unión del grupo ureido hacia el centro metálico, lo que provoca que el complejo adquiera una estructura polimérica.

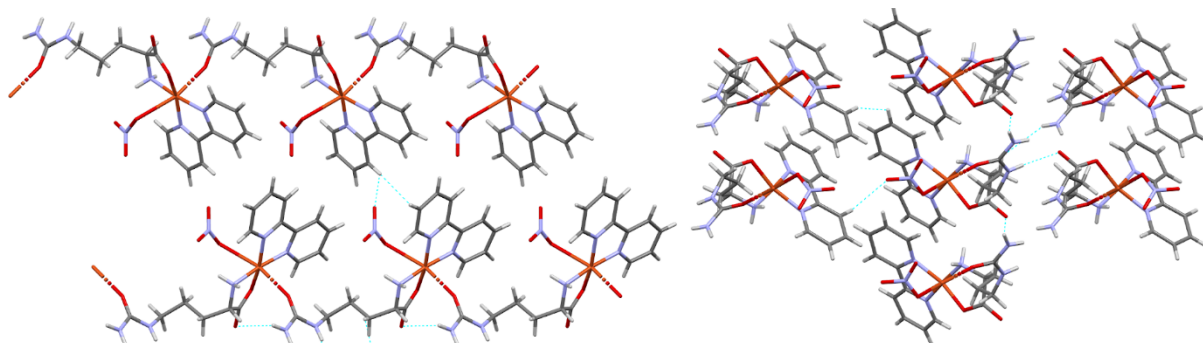


**Figura 18. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(L-Citr)(bipy)](NO<sub>3</sub>) representado a un 50% de probabilidad**

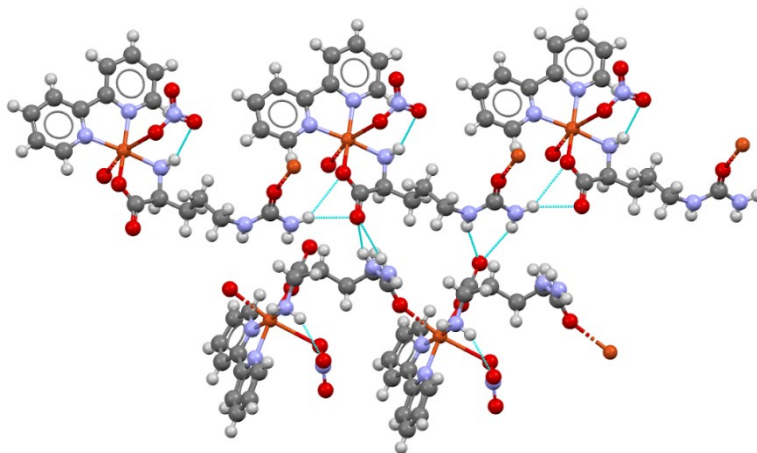
La esfera de coordinación de igual manera presenta la fórmula CuN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>, siendo equivalente a la esfera de coordinación del complejo [Cu(Citr)(Bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)(H<sub>2</sub>O). Conteniendo la misma disposición de átomos de nitrógeno y oxígeno provenientes de los ligantes citrulina y bipyridina, pero difiriendo en la posición axial del oxígeno, que en el complejo polimérico proviene del grupo carbonilo de la parte terminal de una molécula de citrulina adyacente.

La estructura también se encuentra deformada en virtud del efecto Jahn-Teller para reducir la energía de los orbitales d degenerados. Aunque en este caso, las distancias en comparación con el complejo hidratado son ligeramente menores, con tres valores de enlace de Cu-N (Bipy y Citr) y un valor de enlace Cu-O (Citr) de 1.984-2.000-1.994 Å y 1.951 Å, respectivamente para las posiciones ecuatoriales, y valores de Cu-O (ureido) y Cu-O (NO<sub>3</sub>) de 2.444 Å y 2.670 Å,

respectivamente para las dos posiciones apicales. En relación con el carbono quiral de la molécula de citrulina, cabe resaltar que en la estructura cristalina solo se presenta el enantiómero L, en contraste con la mezcla enantiomérica del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$ .



**Figura 19. . Estructura cristalina del compuesto  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{bipy})](\text{NO}_3)$  a lo largo de los ejes cristalográficos a y b (de izquierda a derecha)**



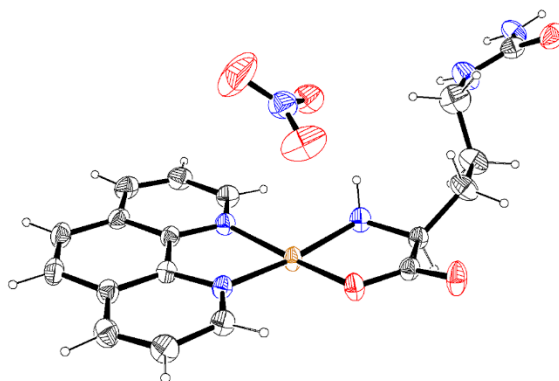
**Figura 20. Vista en perspectiva de los enlaces de hidrógeno intramoleculares N-H—O (línea de puntos azul claro)**

La estructura intermolecular e intramolecular (figura 20) se estabiliza por medio de enlaces de hidrógeno del tipo N-H—O, entre la amina secundaria y terciaria terminales. El átomo de oxígeno del grupo  $\alpha$ -carboxilo de una molécula adyacente estabiliza las interacciones entre las cadenas a lo largo del eje b. De igual manera, un enlace entre el  $\alpha$ -amino y el  $\alpha$ -carboxilo de una molécula

adyacente estabiliza las cadenas frontalmente sobre el eje a. Un enlace intramolecular entre el  $\alpha$ -amino y el ion nitrato se presenta estabilizando la estructura intramolecular.

### Estructura del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>)

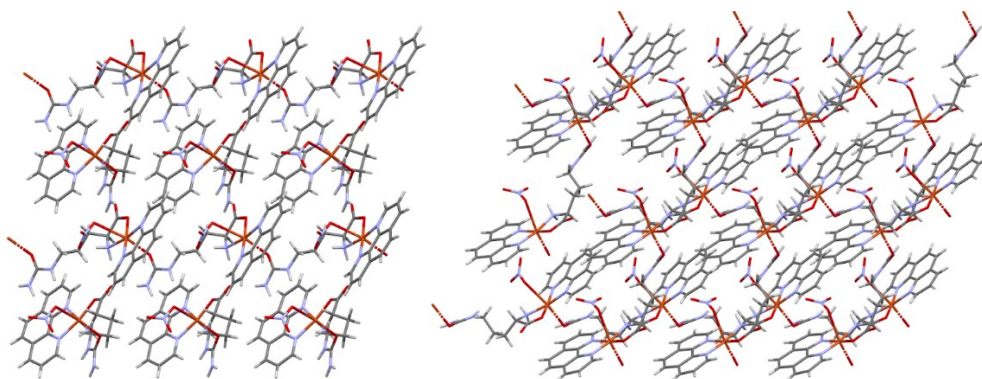
La estructura del complejo [Cu(L-Citr)(phen)](NO<sub>3</sub>) (figura 21) muestra ciertas similitudes con los complejos [Cu(L-Citr)(bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)(H<sub>2</sub>O), [Cu(L-Citr)(bipy)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(L-Citr)(phen)](NO<sub>3</sub>). Teniendo de igual manera la disposición de los 2 ligantes en las posiciones ecuatoriales junto al ion nitrato en una posición ecuatorial, y, del mismo modo que los complejos [Cu(D-Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> y [Cu(L-Citr)(phen)](NO<sub>3</sub>), el grupo ureido de una molécula de citrulina adyacente coordinada en la posición axial restante, provocando que la molécula adquiera una estructura polimérica. Sin embargo, a pesar de las similitudes con los otros compuestos, en este caso la estructura cristaliza bajo el sistema triclinico P1, careciendo de cualquier elemento de simetría.



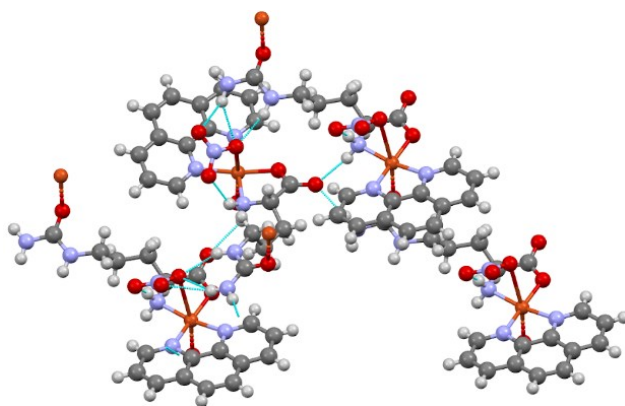
**Figura 21. Diagrama ORTEP del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) representado a un 50% de probabilidad**

De manera similar, la esfera de coordinación tiene la fórmula equivalente CuN<sub>3</sub>O<sub>3</sub> con los átomos de oxígeno ( $\alpha$ -carboxilato) y nitrógeno ( $\alpha$ -amino) pertenecientes a la citrulina y los átomos de nitrógeno de la fenantrolina ocupando las posiciones ecuatoriales, y oxígenos del NO<sub>3</sub> y del ureido en las posiciones axiales. La estructura octaédrica, también presenta deformación en virtud del

efecto Jahn-Teller para reducir la energía alrededor de los orbitales d degenerados, con valores en las cuatro posiciones ecuatoriales consistentes con tres enlaces Cu-N (phen y Citr) y un enlace Cu-O (Citr) que adquieren valores de 1.997-2.040-1.987 Å y 1.933 Å, respectivamente. Para las posiciones axiales, los dos valores de distancia Cu-O (ureido) y Cu-O (NO<sub>3</sub>) son de 2.336 Å y 2.662 Å respectivamente, siendo valores muy cercanos a los valores de distancia del resto de complejos presentados en este trabajo.



**Figura 22. Estructura cristalina del compuesto [Cu(L-Citr)(bipy)](NO<sub>3</sub>) a lo largo de los ejes cristalográficos a y c (de izquierda a derecha)**



**Figura 23. Vista en perspectiva de los enlaces de hidrógeno intramoleculares N-H...O (línea de puntos azul claro)**

La estructura intermolecular e intramolecular del complejo  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$  (figura 22 y 23) se estabiliza principalmente por enlaces tipo N-H—O. En este caso el principal aceptor corresponde al ion nitrato, el cual presenta enlaces intramoleculares con el  $\alpha$ -amino de la citrulina y enlaces intermoleculares con las amidas secundarias y terciarias terminales de una molécula de citrulina adyacente. Lo que permite anclar estos grupos funcionales a dos cadenas de polímeros. La estructura también es estabilizada por el átomo de oxígeno, el cual actúa como aceptor intermolecular con los grupos  $\alpha$ -amino y amida terminal de una molécula de citrulina adyacente.

### 2.1.3. Estructura del complejo $[\text{Cu}(\text{D,L-Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$

El complejo  $[\text{Cu}(\text{D,L-Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$ , (figura 24) a diferencia del resto de los demás complejos, en especial del complejo nitrato equivalente, presenta una estructura completamente diferente. La primera característica a resaltar es que a pesar de que los ligantes citrulina y fenantrolina siguen ocupando las posiciones ecuatoriales alrededor del centro metálico, las posiciones axiales son ocupadas por dos tipos de distribución de ligantes; por un lado, en la mitad de las moléculas, dos iones perclorato ocupan dichas posiciones en la geometría de coordinación octaédrica, resultando en una molécula con carga negativa. Mientras que la otra mitad de moléculas, en geometría de coordinación de pirámide de base cuadrada, solo una posición axial es ocupada por el grupo funcional amina del ureido terminal de una mitad citrulina de otra molécula. En este caso solamente esta coordinación se presenta entre dos moléculas adyacentes, provocando que se forme una estructura de anillo con carga positiva. La distribución de ligantes axiales en dos conformaciones provoca que el cristal se conforme por especies de compuestos de coordinación, un anión monovalente con la fórmula  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$  y un catión divalente con fórmula

$[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2^{+2}$ . Esto da como resultado la fórmula desarrollada  $([\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2)$   $([\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2])_2$ , siendo esta fórmula solo asignable al estado sólido del complejo.

La distribución descrita provoca también que en el mismo cristal se encuentren dos esferas de coordinación distintas. La primera de ellas, la esfera de coordinación del arreglo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$ , con fórmula  $\text{CuN}_3\text{O}_3$ , se conforma en posiciones ecuatoriales por un átomo de oxígeno ( $\alpha$ -carboxilo) y un átomo de nitrógeno ( $\alpha$ -amino) provenientes del ligante citrulina. Por otra parte, los dos átomos de nitrógeno provenientes del ligante fenantrolina completan la zona ecuatorial. Ambas posiciones axiales se encuentran ocupadas por dos átomos de oxígeno provenientes de dos iones perclorato. Por otro lado, la esfera de coordinación de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2^{+2}$  que adquiere la fórmula  $\text{CuN}_4\text{O}$  se encuentra conformada por los mismos átomos en las posiciones ecuatoriales, mientras que la posición axial se encuentra ocupada por el átomo de nitrógeno del amino terminal ( $\text{NH}_2$ ) del ligante citrulina.

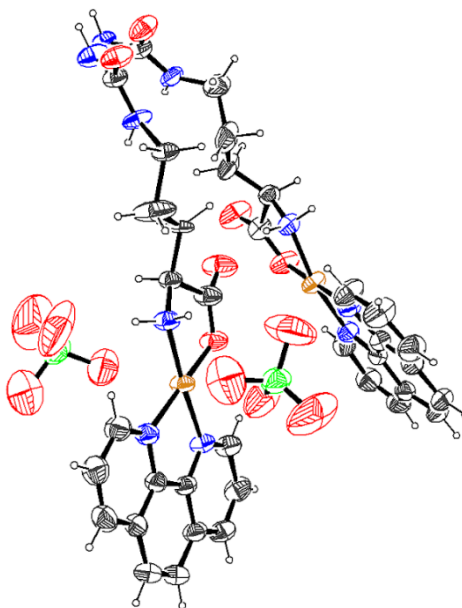


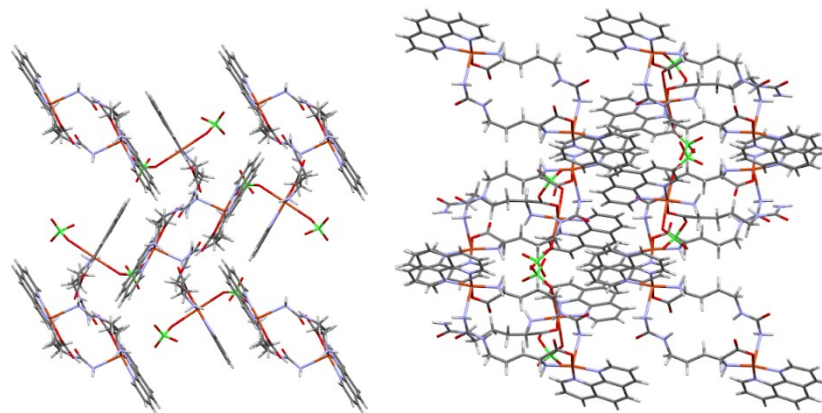
Figura 24. Diagrama ORTEP de las parejas de complejos del  $[\text{Cu}(\text{D,L-Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$  representado a un 50% de probabilidad

En ambos casos, el efecto Jahn-Teller, provoca que las distancias entre enlaces difieran, deformando tanto el octaedro de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$  como la pirámide de base cuadrada de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2^{+2}$ . Las distancias para los cuatro enlaces ecuatoriales de la primera especie, consistentes en tres enlaces Cu-N (Phen y Citr) y un enlace Cu-O (Citr) son 2.009-2.005-1.994 Å y 1.922 Å, respectivamente. Para las dos posiciones axiales, los valores de distancia Cu-O ( $\text{ClO}_4$ ) son de 2.612-2.589 Å para ambos iones. En el caso de la segunda especie, los cuatro enlaces ecuatoriales consisten en 3 enlaces Cu-N (phen y Citr) y un enlace Cu-O (Citr), que adquieren valores de 2.011-2.000-1.988 Å y 1.926 Å respectivamente. La posición axial con un enlace Cu-N (Citr) adquiere un valor de 2.598 Å.

Las especies  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2^{+2}$  están unidas por medio de interacciones intermoleculares de origen electrostático y enlaces de tipo N-H—O. Los grupos  $\alpha$ -carboxilo de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$  se enlaza a 3 donadores pertenecientes a los grupos amida terminales y  $\alpha$ -amino de la primera mitad del anillo de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2^{+2}$ . Por su parte, los grupos carbonilos (C=O) aceptores situados del otro lado del anillo se enlazan con los grupos amida terminales de la cadena de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$ . Dentro de la especie  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$  también se forman interacciones intramoleculares entre los dos iones perclorato ( $\text{ClO}_4$ ) y el grupo  $\alpha$ -amino.

Sorpresivamente, la estructura intermolecular (figura 25) se encuentra unida entre dos especies  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})]_2^{+2}$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})(\text{ClO}_4)_2]^-$  adyacentes principalmente por la formación de enlaces tipo N-H—O entre los grupos ureido terminal de las dos especies. Se forma un apareamiento entre el oxígeno del grupo carbonilo de una especie con la amida secundaria terminal de la otra especie y viceversa. Formando un arreglo en anillo, algo inusual hablando de propiedades

conformacionales, pues la tendencia del grupo ureido es de coordinar el centro metálico a través del oxígeno, y formar cadenas poliméricas en especies anhidras, lo cual no sucede en este complejo.



**Figura 25. Estructura cristalina del compuesto [Cu(D,L-Citr)(phen)](ClO<sub>4</sub>) a lo largo de los ejes cristalográficos a y b (de izquierda a derecha)**

## 2.2. Análisis espectroscópicos

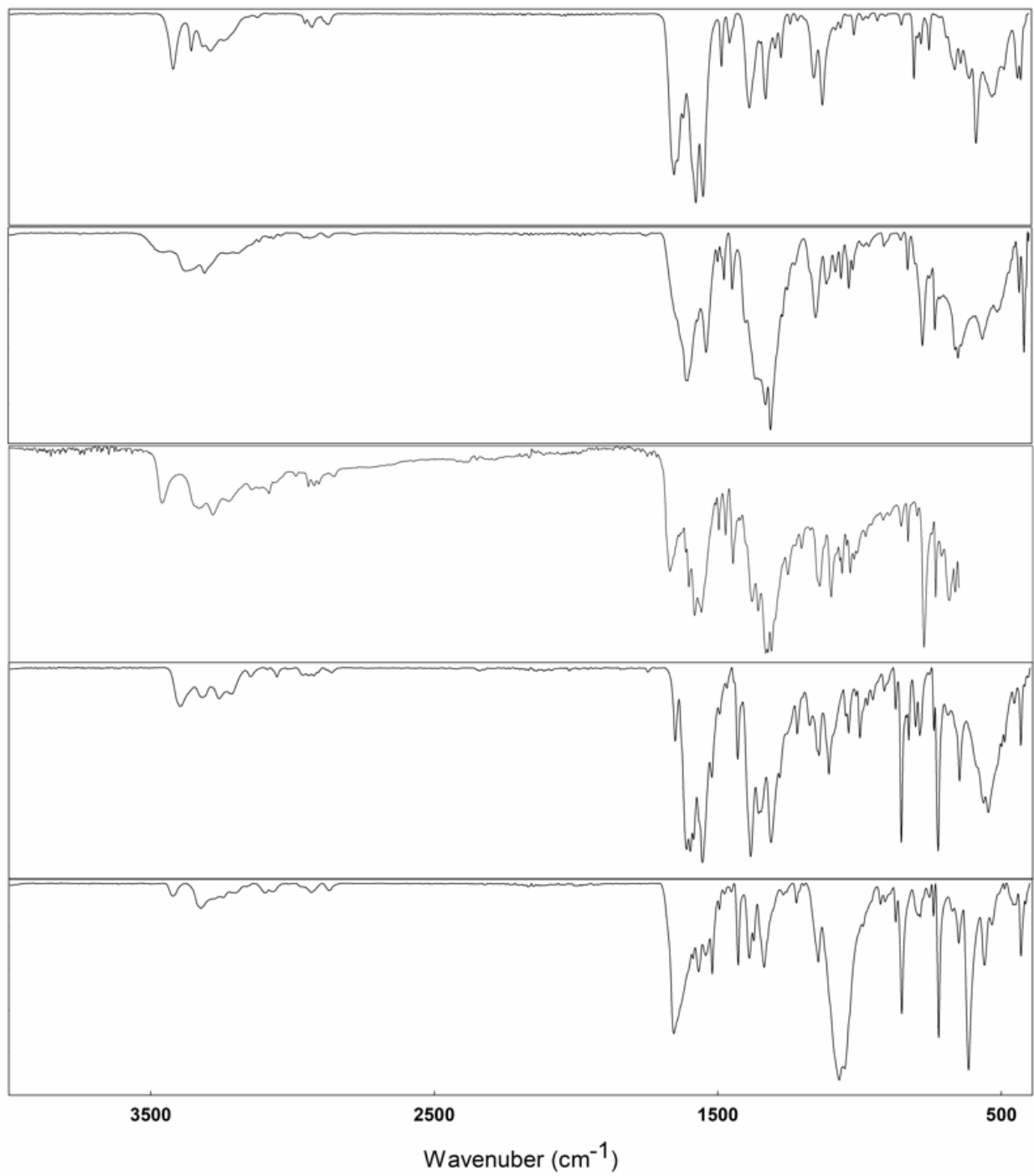
### 2.2.1. Espectroscopia FT-IR

El espectro infrarrojo del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  se presenta en la Figura 26 y sus asignamientos en la tabla 4, donde se puede resaltar tres asignaciones de bandas importantes; la primera se refiere a los picos en la región de  $3450\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ , atribuidos principalmente al estiramiento asimétrico y simétrico de la amida ( $\text{NH}_2$ ), al estiramiento de la amida ( $\text{NH}$ ) y a las vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas del grupo amino; el segundo asignamiento corresponde a dos picos débiles cercanos en la región  $2900\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , que corresponden a vibraciones asimétricas y simétricas de los grupos metileno de la cadena de hidrocarburos; el tercer asignamiento corresponde a la región de  $1700\text{-}1350\text{ cm}^{-1}$ , con los picos a  $1652$  y  $1636\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a vibraciones de estiramiento ( $\text{CO}$ ) de los grupos carbonilo y carboxilo, respectivamente. Las bandas tensas a  $1575$  y  $1549\text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones de escisión de los grupos ( $\text{NH}_2$ ) amino y amida, respectivamente, y el pico a  $1385\text{ cm}^{-1}$  se atribuye al estiramiento simétrico carboxilato. Las tres asignaciones concuerdan con una estructura aminoacidato coordinada [150], [153], [154].

El resto de los 4 complejos mixtos también se presenta en la figura 25 y las asignaciones se presentan en la tabla 4. Los espectros infrarrojos muestran una gran similitud al espectro infrarrojo del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  en cuanto a la forma y recurrencia de varias señales. Aplicando el mismo razonamiento usado para asignar las señales en el complejo, se puede afirmar que en el resto de complejos también son válidas las mismas asignaciones. Lo que es una consecuencia lógica al ser la citrulina un componente en común para los 5 complejos descritos. Siendo precisos, en la primera región situada en  $3500\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ , se presentan el mismo patrón y forma de bandas atribuidos a las señales de absorción asimétrica y simétrica de amida ( $\text{NH}_2$ ), las vibraciones de estiramiento de

amida (NH) y las vibraciones asimétrica y simétrica de la cadena alifática (CH) de la citrulina. Aunque ligeros desdoblamientos se hacen presentes, los cuales pueden ser asociados a las interacciones electrostáticas en las que se ven involucrados los grupos mencionados si se toma en cuenta lo visto en la sección de difracción de rayos X. Debido a la presencia de más ligantes en los complejos mixtos se presentan también diferencias marcadas, por ejemplo, el patrón de bandas en el complejo hidratado se encuentra ensanchado, lo que tiene sentido si se considera la presencia de agua en la esfera de coordinación. Además, en los complejos aparece un nuevo grupo de bandas en valores cercanos a  $3000\text{ cm}^{-1}$ , que es atribuido a estiramientos aromáticos (CH), consecuencia de la presencia de ligantes bipyridina y fenantrolina. [155]–[160].

De igual manera, en el rango comprendido en la región de  $1700\text{--}1350\text{ cm}^{-1}$  en todos los complejos mixtos se presentan los mismos patrones de bandas que son atribuidas a las vibraciones de estiramiento del grupo carbonilo (CO), los modos de tijereteo de los grupos ( $\text{NH}_2$ ) y al estiramiento simétrico del carboxilato (COO). Esto indica, por lo tanto, la presencia de un ligante de tipo aminoácido en las moléculas, donde un fenómeno a resaltar es el desdoblamiento presente en las bandas asociadas a los grupos  $\text{NH}_2$  y NH en los cuatro complejos poliméricos. Recordando que las estructuras de rayos X muestran que estos grupos son los principales donadores de los múltiples enlaces de hidrógeno que estabilizan las estructuras cristalinas, no es ilógico razonar que estas interacciones electrostáticas provocan diferentes modos vibracionales y estos se vean reflejados en los desdoblamientos mencionados. Todo en contraste con el complejo hidratado, el cual presenta pocos desdoblamientos y señales ensanchadas, en este caso el fenómeno es atribuido a la naturaleza predominantemente iónica del complejo.



**Figura 26.** Espectros FT-IR de los complejos en la región de 400 a 450 cm<sup>-1</sup>. De arriba abajo, espectros de los complejos [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>, [Cu(Citr)(Bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>), [Cu(Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>), [Cu(Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(Citr)(Phen)](ClO<sub>4</sub>)

	NH <sub>2</sub> sim	NH <sub>2</sub> asim	NH	CH (ar)	CH sim	CH asim
--	---------------------	----------------------	----	---------	--------	---------

Biscitrulinato	3419	3355	3287	.-	2927	2877
a61321	3444	3367	3228; 3193	3064	2935	2875
a61322	3460	3329; 3281	3226	3083	2944; 2923	2853
a51322	3393	3319	3256; 3218	3148; 3055	2925	2866
a51222	3421	3323	3250	3094; 3065	2935	2866

**Tabla 4. Asignamientos principales de los complejos sintetizados**

Complejo	Asignamiento (cm <sup>-1</sup> )					
	v(NH <sub>2</sub> ) (amida)	v(NH) (amida)	v(NH <sub>2</sub> ) (amino)	v(CH) (ar)	v <sub>as</sub> (CH)	v <sub>as</sub> (CH)
[Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	3419	3355	3287	-	2927	2877
[Cu(Citr)(Bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )	3444	3367	3228; 3193	3064	2935	2875
[Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> )	3460	3329; 3281	3226	3083	2944; 2923	2853
[Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> )	3393	3319	3256; 3218	3148; 3055	2925	2866
[Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> )	3421	3323	3250	3094; 3065	2935	2866

**Continuación tabla 4**

	CO asim	NH	CO sim	CH	otras
[Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	1655	1575; 1549	1385	.-	.-
[Cu(Citr)(Bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )	1603	1538; 1475	1396	775	1305 (NO)
[Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> )	1669	1582; 1558	1379; 1358	773	1323, 1311 (NO)
[Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> )	1644	1597; 1554	1385	852; 724	1355; 1315 (NO)
[Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> )	1655	1567; 1540; 1516	1385	850; 719	1076 (ClO)

Complejo	Asignamiento (cm <sup>-1</sup> )				
	v <sub>as</sub> (CO)	δ(NH <sub>2</sub> )	v <sub>s</sub> (CO)	δ(CH)	otras
[Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	1655	1575; 1549	1385	-	-
[Cu(Citr)(Bipy)(H <sub>2</sub> O)](NO <sub>3</sub> )	1603	1538; 1475	1396	775	1305 v(NO)
[Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> )	1669	1582; 1558	1379; 1358	773	1323, 1311 v(NO)
[Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> )	1644	1597; 1554	1385	852; 724	1355; 1315 v(NO)
[Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> )	1655	1567; 1540; 1516	1385	850; 719	1076 v <sub>as</sub> (ClO)

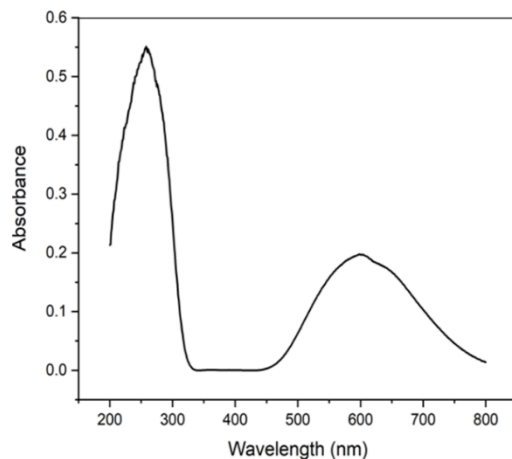
Los contraiones presentes en las moléculas generan señales que se encuentran en la región de 1360-1000 cm<sup>-1</sup>, en el caso de los complejos donde el ion nitrato (NO<sub>3</sub>) compone parte de la

estructura, aparece una banda amplia en valores cercanos a 1300-1350  $\text{cm}^{-1}$ . La cual es asignada principalmente a este grupo funcional. En estos casos, los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$  muestran un pico con dos o más desdoblamientos, que aunado al valor en el que aparecen indican que el grupo nitrato se encuentra coordinado (). Por otro lado, el complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})](\text{NO}_3)$  presenta una banda ancha en valores más bajos respecto a los otros dos complejos con nitrato, y aunque la tendencia indicaría que en este caso el grupo estaría unido como ion sin coordinar a la molécula, la estructura de rayos X muestra que el grupo se encuentra coordinado. Para explicar esto se pueden revisar las distancias Cu-O ( $\text{NO}_3$ ) en los 3 complejos, donde son más largas en el complejo hidratado que en los complejos poliméricos en valores aproximados de 0.1 Å, interpretándose que existe una cierta tendencia al comportamiento iónico. En el caso del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$ , se presentan una banda amplia y fuerte cerca de 1076  $\text{cm}^{-1}$  con un desdoblamiento ligero en valores más bajos, lo que indica un modo de coordinación monodentada del perclorato ([161]. Finalmente, en la región por debajo de 1000  $\text{cm}^{-1}$  el pico característico corresponde a los modos de flexión fuera del plano de la bipyridina y la fenantrolina.[157]–[159].

### 2.2.2. Espectroscopia UV-Vis

El espectro del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  (Figura 27) fue obtenido por reflectancia difusa debido a la insolubilidad del complejo. En él se observa una banda asimétrica típica a 600 nm, la cual es asignada principalmente a una transición *d-d*, atribuida al entorno octaédrico tetragonalmente distorsionado del complejo, conformado por dos ligantes aminoacido y dos oxígenos de carbonilo de los grupos ureido. Esto es consistente con lo observado en los espectros visibles de los complejos de cobre con aminoacido, donde se muestra una transición *d-d* en forma de banda

ancha con un máximo entre 650-550 nm y dos bandas de menor intensidad a 540 y 720 nm, atribuido al cromóforo  $\text{CuO}_2\text{N}_2$  de forma cuadrangular



**Figura 27. Espectro de absorción electrónica del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  obtenido por reflectancia atenuada**

Para una geometría octaédrica distorsionada del ion cobre(II), en la transición d-d mencionada existen tres transiciones de espín permitido que dan lugar a tres transiciones electrónicas dipolares superpuestas;  $2A_{1g}(dz^2) \rightarrow 2B_{1g}(dx^2-y^2)$ ,  $2E_g(dyz \approx dxz) \rightarrow 2B_{1g}(dx^2-y^2)$  y  $2B_{2g}(dxy) \rightarrow 2B_{1g}(dx^2-y^2)$ , respectivamente. La banda característica  $n \rightarrow \pi^*$  en los espectros UV a 267 nm se asigna a la transición intraligante del enlace amida  $\text{C}=\text{O}$  [162]–[166].

En el caso de los complejos mixtos, los espectros UV-Visibles (figura 28 y 29) fueron obtenidos en solución acuosa, donde los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{bipy})](\text{NO}_3)$  presentan el mismo espectro en agua, mientras que los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})](\text{ClO}_4)$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{phen})](\text{NO}_3)$  presentan espectros casi idénticos, solo variando ligeramente en valores de magnitud de absorbancia. En la región de 500 a 800 nm los espectros de los complejos exhiben la misma simetría, pero muestran diferencias cuando se refiere al segundo ligante.

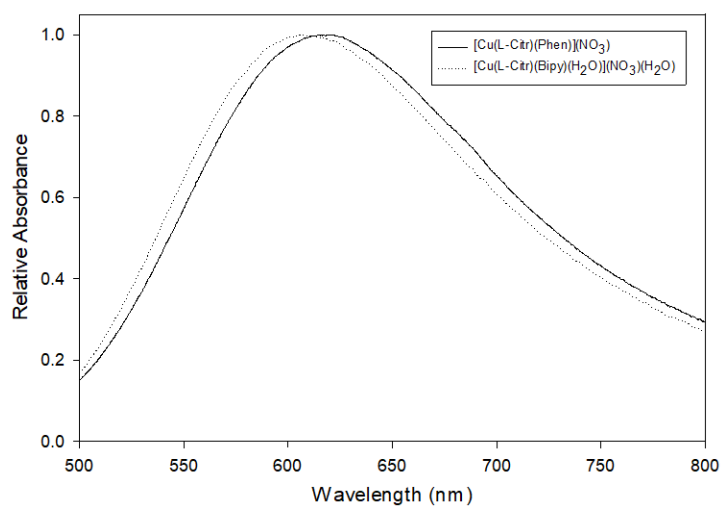


Figura 28. Espectros de absorción electrónica (500-800 nm) de los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$  en solución a 15 mg/mL

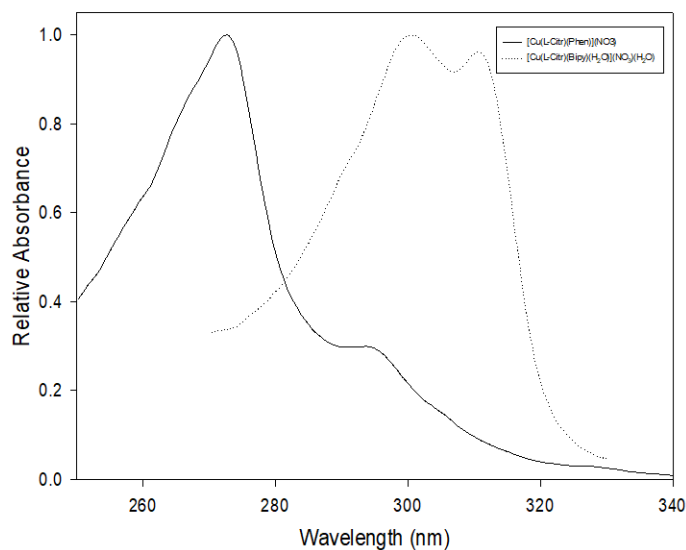


Figura 29. Espectros de absorción electrónica (250-340 nm) de los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$  en solución a 0.01 mg/mL

Los complejos mixtos de fenantrolina exhiben una absorbancia máxima aproximada a 615 nm con un valor de absorptividad de  $\epsilon = 52 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , mientras que los complejos de bipyridina tienen una absorbancia máxima aproximada a 605 nm con un valor de absorptividad de  $\epsilon = 60 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , es decir,

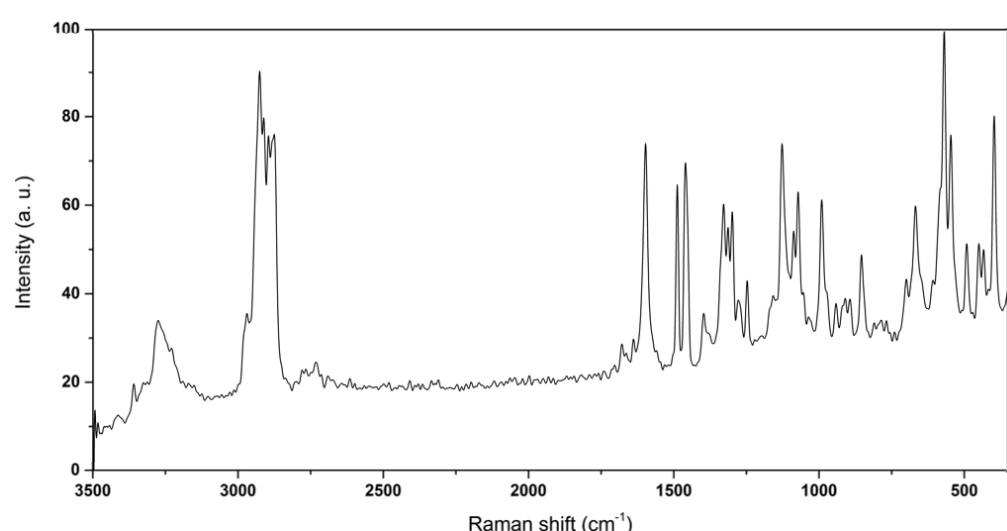
un desplazamiento batocrómico de 10 nm cuando el ligante cambia de bipyridina a fenantrolina. Al igual que el caso del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$ , las bandas mostradas son producto de una transición  $d-d$ , donde las mismas transiciones de espín permitidas aplican para asignar las transiciones. En la Figura 28, el espectro UV corresponde a transiciones intraligando  $P-P^*$  de la Bipyridina (300 nm) y un MLCT con intensidad robada (312 nm) ( $\epsilon(300)=1,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ;  $\epsilon(312)=1,35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )

### 2.2.3. Espectroscopia Raman

El espectro Raman del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  se presenta en la figura 30. De la gran cantidad de señales mostradas, las asignaciones más importantes se realizan con base en cuatro modos vibracionales. El primero de ellos comprende a frecuencias de estiramiento NH de los nitrógenos amida y amino asignados a la banda amplia de  $3276 \text{ cm}^{-1}$  donde la contribución más intensa se asigna la vibración simétrica de la amina secundaria terminal de la citrulina ( $\text{NH}_2$ ).

El segundo modo vibracional corresponde al estiramiento asimétrico carbono-hidrógeno del grupo metileno ( $\nu_{\text{as}}(\text{CH})$ ) siendo asignado al grupo de bandas comprendido en el rango  $2924\text{-}2874 \text{ cm}^{-1}$ , siendo congruentes con los enlaces de los átomos de carbono beta, gamma y delta de la cadena de citrulina al comparar los valores de las señales con lo reportado por otros autores para L-Citrulina. Destacando que solo los valores de  $2895$  y  $2874 \text{ cm}^{-1}$  corresponden a vibraciones atribuibles a la citrulina libre, mientras que el resto de bandas presentan un desplazamiento con respecto a las

bandas equivalentes en el espectro y podrían estar asociados a el desplazamiento influenciado por centro metálico de cobre.



**Figura 30. Espectro Raman (3500-250 cm<sup>-1</sup>) del complejo [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>**

Con respecto al mismo grupo metilo en la molécula, las bandas en valores de 1463-1297 cm<sup>-1</sup> coinciden con la asignación del movimiento en tijera del grupo metileno ( $\delta(\text{CH}_2)$ ). Así mismo las bandas a 1127 y 990 cm<sup>-1</sup> coinciden con el torcimiento de los grupos metileno ( $\tau(\text{CH}_2)$ ) y las bandas de 1453 y 1312 cm<sup>-1</sup> se asocian con los modos vibracionales de flexión ( $\tau(\text{CH}_2)$ ) y contoneo ( $\tau(\text{CH}_2)$ ) del mismo grupo respectivamente. Finalmente, los últimos modos vibracionales descritos en este trabajo para el complejo [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> son descritos sobre el grupo funcional carbonilo (CO) provenientes tanto del grupo ureido como del  $\alpha$ -carboxilo. La banda a 1684 cm<sup>-1</sup> corresponde al estiramiento del carbonilo ( $\nu(\text{CO})$ ) del  $\alpha$ -carboxilato, la banda de 682 cm<sup>-1</sup> se asocia con la flexión del grupo ( $\delta(\text{CO})$ ) y la banda de 567 cm<sup>-1</sup> se asocia con el balanceo del enlace en el plano ( $\rho(\text{CO})$ ) [167]–[171].

**Tabla 5. Asignamientos de los espectros Raman de los complejos**

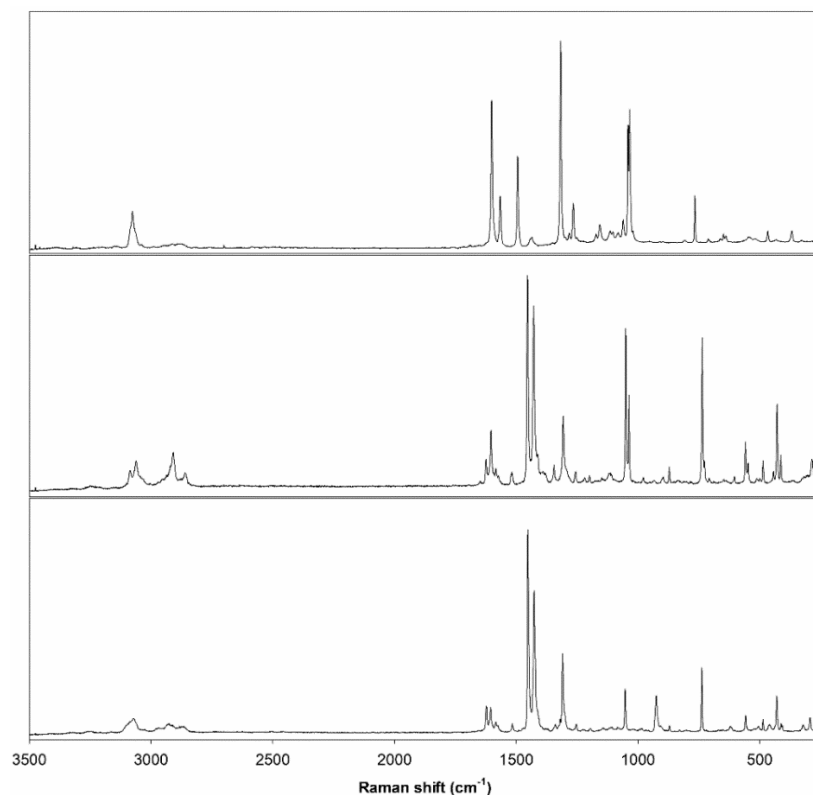
Complejo	Asignamiento (cm <sup>-1</sup> )				
	$\nu_s(\text{NH}_2)$ amino	$\nu_s(\text{CH}_2)$	$\nu_s(\text{CH})$	$\nu(\text{CO})$ ureido	$\nu(\text{CO})$

[Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	3276	2924; 2910	2895; 2881; 2874	1684	1463; 1460
[Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> )	3166	2955	2850	-	-
[Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> )	-	2908	2861	-	-
[Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> )	-	2926	2872	-	-

Continuación Tabla 5

Complejo	Asignamiento (cm <sup>-1</sup> )				
	$\nu(\text{CO})_{\text{carboxilo}}$	$\nu_s(\text{CH})$	$\omega(\text{CH})$	$\nu(\text{NO})$	$\nu_s(\text{ClO})$
[Cu(Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	1327; 1297	-	-	-	-
[Cu(Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> )	1318	3077	766	1037; 1050	-
[Cu(Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> )	-	3062	736	1033; 1041	-
[Cu(Citr)(Phen)](ClO <sub>4</sub> )	-	3070	738	-	925

En la Tabla 5 y la figura 31 se muestra las frecuencias vibracionales Raman y los espectros Raman, respectivamente, de los complejos [Cu(Citr)(Bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)(H<sub>2</sub>O), [Cu(Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(Citr)(Phen)](ClO<sub>4</sub>), en este caso, las bandas que son presumibles de modos vibracionales del esqueleto de la citrulina muestran una tendencia a solaparse con el resto de señales. Esto provoca que sea difícil la asignación de modos vibracionales de grupos pertenecientes al resto de ligantes, pero aun así es posible realizar asignaciones importantes en estas moléculas. Esto es debido a que los valores de las bandas coinciden con los valores previamente reportados por otros autores sobre complejos de Cu(II) con diferentes aminoácidos [154], [170].



**Figura 31. De arriba a abajo, espectros Raman (3500-250  $\text{cm}^{-1}$ ) de los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$ ,  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{ClO}_4)$**

De tal manera que los modos de estiramiento simétricos puros de los enlaces carbono-hidrogeno ( $\nu_s(\text{CH}_2)$  y  $\nu_s(\text{CH})$ ) de la cadena de citrulina están asignados por las pequeñas bandas observadas en la Figura 30 en el rango de  $3000\text{-}2850 \text{ cm}^{-1}$  (ver tabla 5) para los 3 complejos. El contraión presente en los complejos también es asignado a modos vibracionales observables en los espectros. En las moléculas donde el ion nitrato está presente, es decir, en los complejos  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$  y  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  este ion es asignado a las bandas en el rango de  $1000\text{-}1050 \text{ cm}^{-1}$  provenientes del estiramiento del enlace nitrógeno-oxígeno ( $\nu(\text{NO})$ ), mientras que para el complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{ClO}_4)$ , el ion perclorato es asignado a la banda de  $923 \text{ cm}^{-1}$  proveniente del estiramiento cloro-oxígeno ( $\nu(\text{ClO}_4)$ ) del ion coordinado, todo lo anterior basándose en lo descrito por otros autores [161], [172].

Los complejos mixtos a la vez presentan modos de vibración para el estiramiento asimétrico del enlace carbono-hidrogeno ( $\nu_s(\text{CH})$ ) y al modo de flexión fuera del plano ( $\omega(\text{CH})$ ). Los cuales son asignados en las bandas que se muestran en los rangos de 3050-3080  $\text{cm}^{-1}$  para el primer modo vibracional y 730-770  $\text{cm}^{-1}$  para el segundo modo vibracional, ambos modos son atribuibles a los enlaces carbono-hidrogeno provenientes de los ligantes citrulina y bipyridina [157]–[159], [173].

#### 2.2.4. Espectroscopia por resonancia magnética nuclear (NMR) del $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$

En las figuras 32 y 33 se presentan los espectros de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$ , y  $^1\text{H}$  respectivamente, del complejo paramagnético  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$ . La muestra fue medida a temperatura ambiente (25 °C) utilizando tetrametilsilano (TMS) ( $\text{C}_4\text{H}_{12}\text{Si}$ ) como referencia de medición para ambos espectros. Las cuatro señales mostradas en el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , centradas en una dimensión (1D), fueron asignadas de la siguiente manera; la primera señal, que corresponde al pico localizado a 161,52 ppm el cual es asignado al carbono de la fracción del carbonilo del grupo ureido, nombrado como C3 (figura 33), la segunda señal situada a 57.40/48.83 ppm se asigna al par de átomos de carbono  $\text{C}_d/\text{C}_d$  procedente de ambos ligantes, y la tercer y cuarta señal situadas a 38.94/26.99 y 24.78/16.74 ppm, respectivamente, son asignados a los pares  $\text{C}_b/\text{C}_b'$  y  $\text{C}_g/\text{C}_g'$ , respectivamente

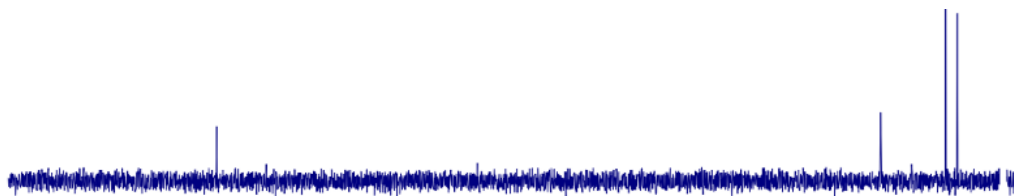
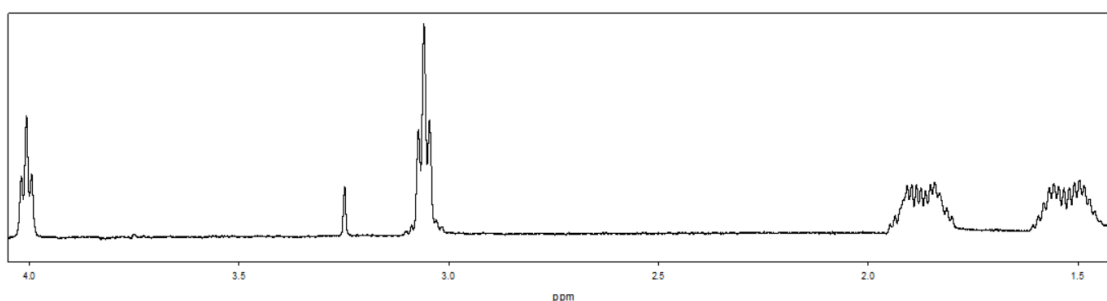
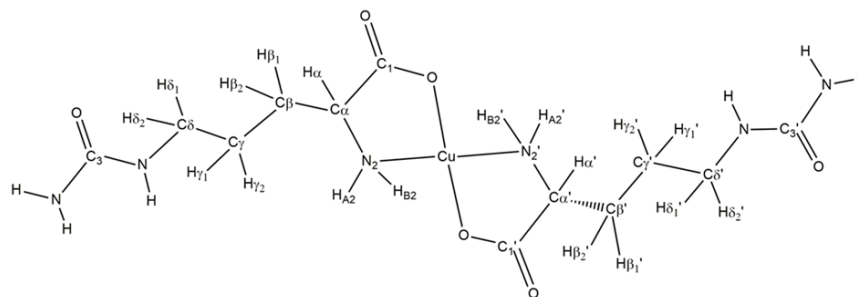


Figura 32. Espectro  $^{13}\text{C}$  por Resonancia magnética nuclear (NMR) del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  en solución acida a 1 mg/mL

Por otra parte, el espectro de RMN  $^1\text{H}$  muestra cuatro señales, las cuales son asignadas de la siguiente manera; la primera señal aparece a 1.51 ppm y es asignada a los pares de protones  $\text{H}_{g1}/\text{H}_{g1'}$  y  $\text{H}_{g2}/\text{H}_{g2'}$ , respectivamente; la segunda señal a 1.87 ppm es asignada a los protones  $\text{H}_{b1}/\text{H}_{b1'}$  y  $\text{H}_{b2}/\text{H}_{b2'}$ , respectivamente; la tercera señal a 3.05 ppm es asignada a los pares de protones  $\text{H}_{d1}/\text{H}_{d1'}$ , and  $\text{H}_{d2}/\text{H}_{d2'}$ ; la cuarta y última señal a 3,96 ppm se asigna al único  $\alpha$ -protón ( $\text{H}_a$ ) que se encuentra unido al átomo de Cu(II) (figura 33), lo que sugiere una interacción entre los grupos carboxilo y amino con el ion cobre [174], [175]. La bibliografía reportada indica que el electrón no apareado muestra una tendencia a provocar una fuerte influencia en los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en complejos de Cu(II) así como en varios complejos con metales paramagnéticos, lo que dificulta la asignación de las señales del espectro de RMN convencional [175], [176]



**Figura 33. Espectro  $^1\text{H}$  por Resonancia magnética nuclear (NMR) del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$  en solución acida a 1 mg/mL**



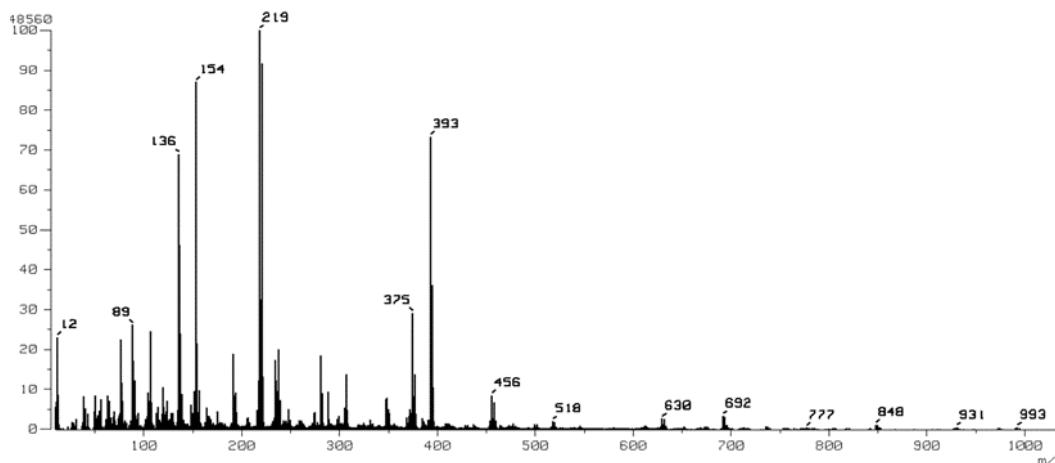
**Figura 34. Nomenclatura para la asignación de los desplazamientos químicos  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto  $[\text{Cu}(\text{Citr})_2]_n$**

### 2.2.5. Espectrometría de masas

El espectro de masas del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$  (figura 35) muestra varios picos, como se muestra la figura \*, donde en este espectro las asignaciones más importantes se realizan sobre tres grupos de picos. El primer grupo corresponde a los picos 456 y 393 que están próximos al peso molecular de las especies del complejo neutro  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})(\text{NO}_3)]$  y la especie iónica  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Bipy})]^+$ . Lo que apoya la formación del complejo; el segundo grupo se asigna los picos 375, 219 y 154 como productos de descomposición del complejo, pues el valor de la señal es cercana a pesos moleculares de las especies  $[\text{Cu}(\text{Bipy})_2]^+$ ,  $[\text{Cu}(\text{Bipy})]^+$  y  $(\text{Bipy})$ , respectivamente. Finalmente, la tercera asignación recae sobre los picos a 136 y 89, siendo los posibles productos de degradación de citrulina y biperidina, correspondientes a restos moleculares resultantes de la degradación de ligantes en la molécula.

De igual manera, en el espectro del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  (figura 36) se muestra una gran cantidad de señales. Las asignaciones más importantes se realizan sobre los picos a 480 y 417 m/z, los cuales son cercanos a los pesos moleculares de las especies del complejo principal y la especie iónica del complejo principal  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})]^-$  y su aparición son indicativos de la formación del complejo. Por otro lado, los picos a 307 y 243 m/z son cercanos a los pesos moleculares de los productos de descomposición del complejo, por lo que son asignados a las especies iónicas  $[\text{Cu}(\text{Phen})](\text{NO}_3)^+$  y  $(\text{Cu}(\text{Phen}))^+$ . El resto de picos con valores menores a 200 m/z son asignados principalmente a productos de descomposición de todos los ligantes de la molécula principal. Cabe destacar que se repite un patrón con los picos de 137 y 154 m/z, en este caso se puede atribuir a la degradación de la molécula de fenantrolina, donde la pérdida de los dos átomos de carbono que forman el anillo intermedio origina la formación de una molécula

equivalente a la estructura de bipyridina la cual es similar en peso. Posteriormente, la ruptura de esta estructura originaría la formación de dos moléculas equivalentes a la estructura de la piridina, cuyo peso molecular empata con los picos cercanos a 79 m/z.



**Figura 35. Espectro de masas del complejo [Cu(Citr)(Bipy)(H<sub>2</sub>O)](NO<sub>3</sub>)(H<sub>2</sub>O)**

El espectro de masas del complejo [Cu(Citr)(Phen)](ClO<sub>4</sub>) (figura 37) muestra similitudes con el resto de los espectros mostrados, al igual que con el espectro del complejo [Cu(Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>). Se presenta un pico a 417 m/z siendo atribuido nuevamente a la especie iónica de la molécula principal y es el principal indicativo de la formación del complejo. A pesar de que el peso del complejo principal no empata directamente con un pico de magnitud significativa, los picos difusos observados en el rango de 500 a 550 m/z son presumibles de corresponder con la especie principal. Al igual que con los demás espectros mostrados, se presentan los mismos patrones de picos, lo que sostiene la asignación de estos a los productos de descomposición de los ligantes de la molécula.

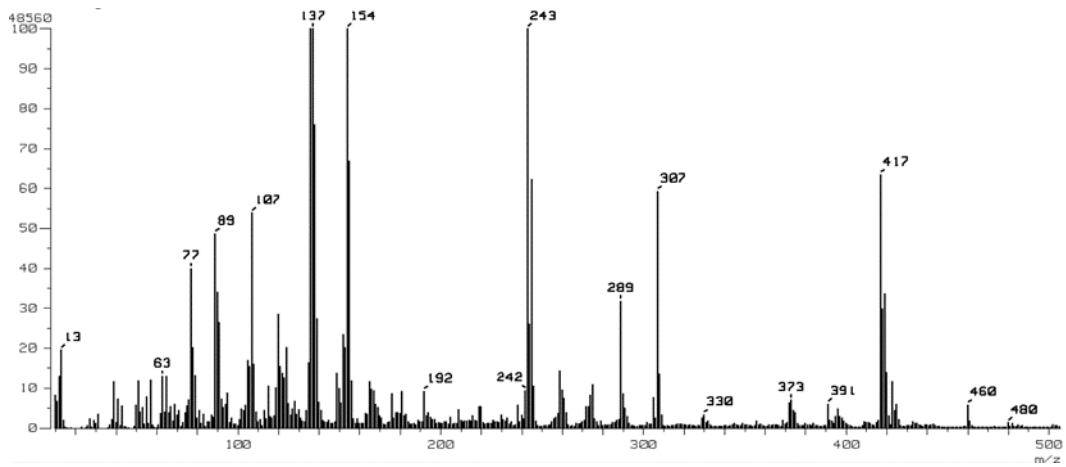


Figura 36. Espectro de masas del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$

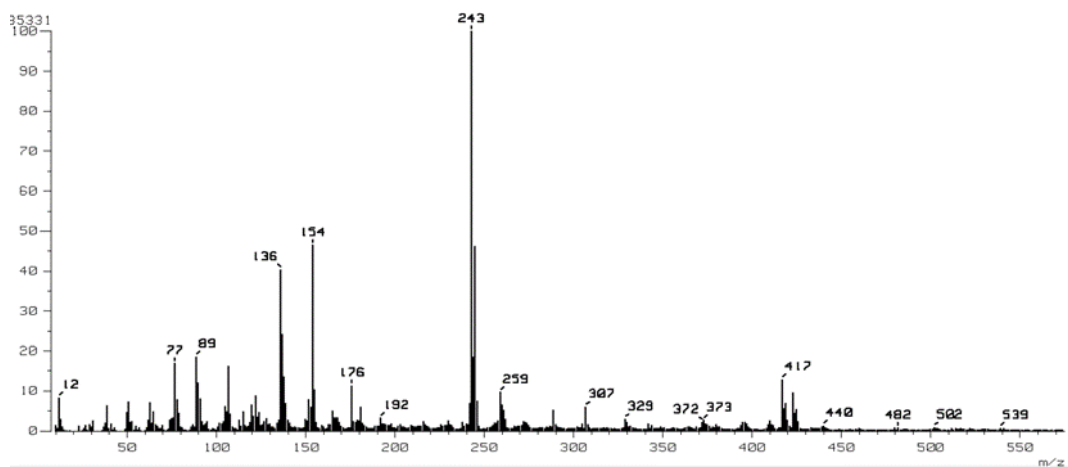
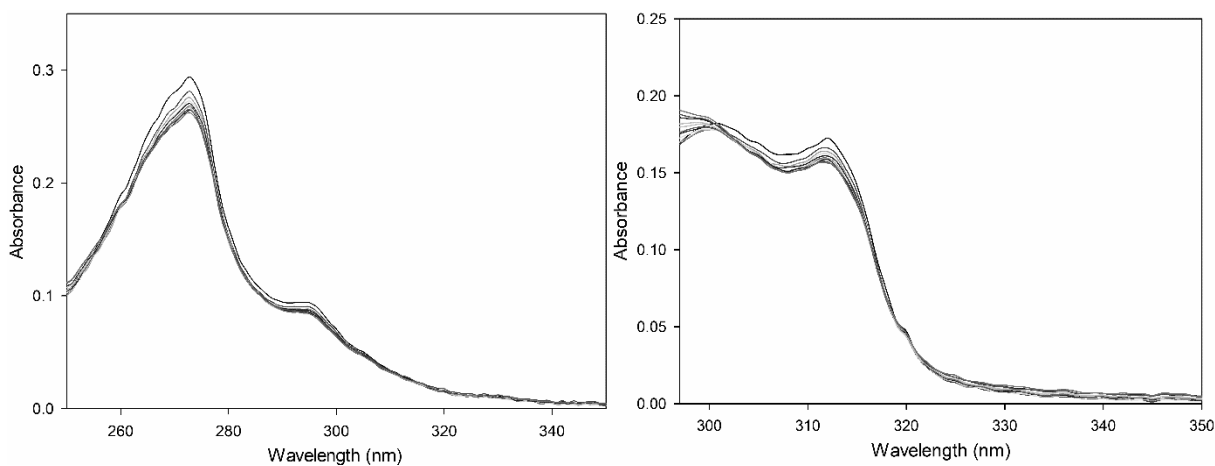


Figura 37. Espectro de masas del complejo  $[\text{Cu}(\text{Citr})(\text{Phen})](\text{ClO}_4)$

## 2.3. Ensayos *in-vitro*

### 2.3.1. Interacción con Calf Thymus

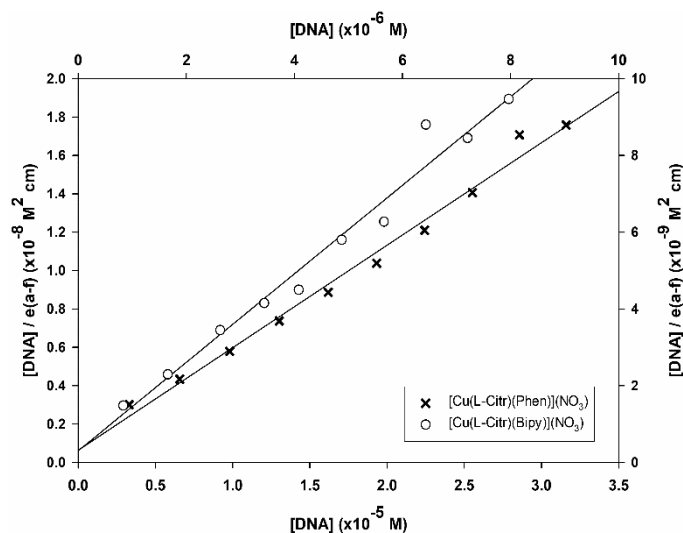
En la figura 38 se muestran los espectros de absorción electrónica, en el rango de 250-350 nm, de los complejos  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$  respectivamente, donde cada línea de color en la gráfica representa a un punto de la titulación con CT-ADN. En la titulación del primer complejo, la concentración de la solución de CT-ADN fue diluida. Esto se debe a que a medida que aumenta la concentración de ADN en el rango previamente establecido en la metodología, y debido a la cercanía de la banda del complejo (272 nm) con la banda de absorción del ADN (260 nm). Ya que al ser valores muy cercanos el traslape de bandas ocurre, lo cual enmascara cualquier efecto que se presente sobre la banda del complejo.



**Figura 38. De izquierda a derecha, espectros de absorción electrónica de los complejos  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$  con la presencia de CT-DNA**

Con la reducción de la concentración en el experimento del primer complejo, lo primero a observar es la reducción gradual de la intensidad sobre la banda a 272 nm. A medida que la concentración de CT-ADN aumenta, traduciéndose como un moderado efecto hipocrómico sobre la banda, de igual manera la banda adyacente a 290 nm también se observa el mismo fenómeno, pero en menor medida, en ambos casos no se observa ningún desplazamiento sobre las bandas. Aunque otros autores reportan el efecto hipocrómico sobre el espectro del complejo como un indicativo de unión

de la molécula hacia el ADN [131], [138], [177]–[183]. También se ha reportado simultáneamente un desplazamiento tanto al azul o al rojo, por lo que se puede asumir que el complejo tiene una tendencia a la unión con el ADN. Sin embargo, aunque la ausencia de un desplazamiento deja dudas sobre la interacción, si bien es posible racionalizar esta ausencia como un efecto de la dilución del titulante, el argumento necesita un respaldo más grande.



**Figura 39. Diagrama de la ecuación de Benesi-Hildebrand linealizada para los datos de unión de los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>)**

La adición de CT-ADN en el segundo complejo no requirió la dilución de la concentración establecida en la metodología al estar más separados los valores de las bandas. En este caso la banda a 310 nm es la que sufre el efecto hipocrómico y en este caso un ligero desplazamiento hacia el azul de 2 nm se observa al añadir el titulante a la solución. Por otro lado, la banda a 300 nm a pesar de sufrir una reducción de intensidad en las concentraciones más bajas de DNA, posteriormente se revierte la tendencia hasta que se hace notorio un aumento de la intensidad, traducido como un efecto hipercrómico acompañado de un desplazamiento de la banda y la distorsión de la misma. A pesar de que la banda de absorción del DNA se encuentra alejada en 40

nm, se puede racionalizar el efecto anterior una vez más en función del traslape de bandas, debido principalmente al amplio tamaño de la banda.

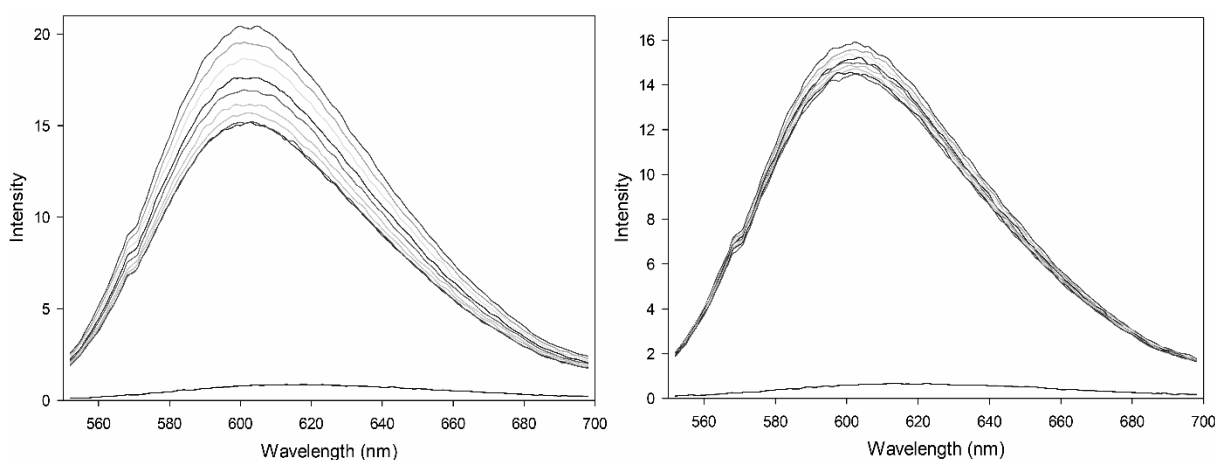
**Tabla 6. Valores de la constante de afinidad (Kb) de complejos de cobre**

Complejo	Kb (M <sup>-1</sup> )	Referencia	
[Cu(L-Citr)(1,10-Phen)](NO <sub>3</sub> )	8.32 x 10 <sup>6</sup>	Este Trabajo	
[Cu(L-Citr)(2,2'-Bipy)](NO <sub>3</sub> )	3.76 x 10 <sup>5</sup>		
[Cu(2,2'-Bipy)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>CasVII-gly</b> )	3.23 x 10 <sup>5</sup>	[178]	
[Cu(4,4-dimethyl-2,2'-Bipy)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>CasIII-ia</b> )	3.31 x 10 <sup>5</sup>		
[Cu(1,10-Phen)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>CasVII-gly</b> )	7.15 x 10 <sup>5</sup>		
[Cu(Phen)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>CasIII-Ba</b> )	7.60 x 10 <sup>5</sup>		
[Cu(4,7-dimethyl-1,10-Phen)(acac)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>CasIII-Ea</b> )	7.90 x 10 <sup>5</sup>		
[Cu(5,6-dimethyl-1,10-Phen)(gly)(H <sub>2</sub> O)]NO <sub>3</sub> ( <b>CasVI-gly</b> )	7.89 x 10 <sup>5</sup>		
(C <sub>32</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> )Cu <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	3.93x10 <sup>3</sup>		[181]
[Cu <sub>2</sub> (μ-adenine) <sub>2</sub> (Phen) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ] <sup>2+</sup>	5.09 x 10 <sup>5</sup>		[179]
C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> CuN <sub>4</sub> O <sub>10</sub>	8.56 x 10 <sup>4</sup>		[182]
[Cu((2-((quinolin-8-ylimino)methyl)pyridine)(Cl))(ClO <sub>4</sub> )	3.57 x 10 <sup>5</sup>		[180]

Utilizando el modelo linealizado de la ecuación de Wolfe-Schimer (figura 39 y tabla 6), el valor de la constante de asociación (Kb) es de 8.32x10<sup>6</sup> para el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y 3.76x10<sup>5</sup> para el complejo [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>), siendo una diferencia en de un orden de magnitud. Comparando con otros autores, el valor se encuentra en el rango esperado para la familia de aminoacidatos mixtos (tabla 6), y la información de este experimento sugiere que los complejos tienen afinidad por unirse al ADN

### 2.3.2. Ensayos de Fluorescencia

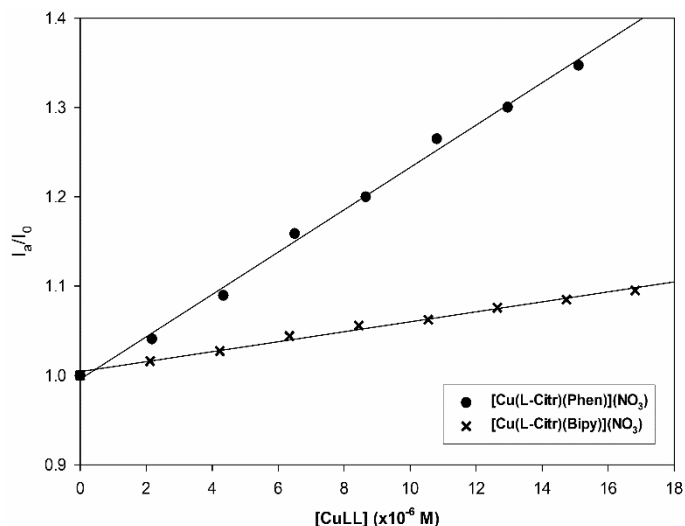
Previamente, en la sección de afinidad por CT-DNA los resultados indicaron la afinidad de unión al DNA, pero el modo en el que se asocian las dos moléculas no puede ser elucidada fácilmente con dicha información. En la figura 40 se muestran los espectros de emisión fluorescente del experimento de titulación del complejo EB-DNA con los dos complejos  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ . Como fue descrito en la metodología, si el complejo es capaz de intercalar y desplazar al EB, un decrecimiento de la intensidad debe ser observado, y como se puede ver en las gráficas, a medida que la concentración de complejo metálico aumenta, la intensidad medida va disminuyendo gradualmente. Lo anterior respalda la intercalación como forma de interacción entre los complejos sintetizados y el DNA.



**Figura 40. Espectros de emisión fluorescente del complejo EB-DNA titulados con los complejos  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$**

A pesar de que ambos complejos muestran una reducción de la intensidad (figura 41), el complejo  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  de igual manera muestra una actividad más grande que el complejo  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ , los valores de  $K_{sv}$  medidos son de  $2.37 \times 10^4$  y  $5.57 \times 10^3$  respectivamente para cada complejo, siendo una diferencia de más de un orden de magnitud una vez más (Tabla \*). La diferencia entre valores mostrados se debe en gran medida al tipo de ligante terciario en las moléculas, recordando que se teoriza entre más grande, abultado e hidrofóbico sea el grupo

funcional, la inserción en los surcos de la molécula de DNA bicatenario será más favorable, en este caso se puede sugerir que los complejos analizados no son la excepción[138].



**Figura 41. Diagramas de Stern-Volmer para los datos de fluorescencia de los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>)**

**Tabla 7. Parámetros de la ecuación de Stern-Volmer de varios complejos de cobre**

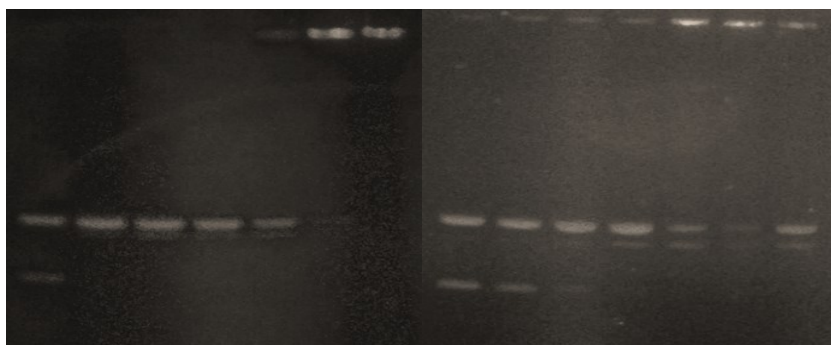
Complejo	K <sub>sv</sub> (M <sup>-1</sup> )	k <sub>q</sub>
[Cu(L-Citr)(1,10-Phen)](NO <sub>3</sub> )	2.37 x 10 <sup>4</sup>	1.03 x 10 <sup>12</sup>
[Cu(L-Citr)(2,2'-Bipy)](NO <sub>3</sub> )	5.57 x 10 <sup>3</sup>	2.42 x 10 <sup>11</sup>

### 2.3.3. Interacción con plásmido pUC19

En la figura 42 las bandas de electroforesis del plásmido pUC19 tratado con los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>) son presentadas. La primera banda corresponde al plásmido sin tratar con complejo en ambos casos. Donde son visibles la forma superenrollada (forma II) (banda superior) y relajada (forma I) (banda inferior) sin la presencia de anomalías. En el experimento con el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) la aparición de DNA lineal (forma III) se hace visible. Esto ocurre desde la banda correspondiente a 5 μM como una pequeña división

que surge de la banda de la forma II acompañado de una ligera reducción de la intensidad de la misma banda y la desaparición de la banda de la forma I.

Lo que indica que el complejo tiene la capacidad de provocar la escisión de la estructura circular del complejo. Posteriormente, en las tres bandas correspondientes a las concentraciones de 10-30  $\mu\text{M}$  se observa el mismo patrón, aumentando gradualmente la intensidad de la forma III. Sin embargo, en las últimas bandas, donde la concentración supera los 50  $\mu\text{M}$ , la intensidad de las formas II y III decae completamente, siendo observable que la mayoría de la carga de DNA no logra migrar del pozo del gel. Lo que supone que a esta concentración el DNA se condensa en virtud del cambio de movilidad electroforética provocado por la neutralización de las cargas negativas de la molécula por los cationes del complejo [184]–[186]. Considerando la naturaleza heterocíclica de los ligantes, posiblemente la unión por interacciones  $\pi\text{-}\pi^*$  es la que une al complejo con el DNA.



**Figura 42. De izquierda a derecha, bandas de electroforesis del plásmido pUC19 tratado con los complejos [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) y [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>). La concentración del complejo es 0, 5, 10, 15, 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de izquierda a derecha en ambos experimentos**

Por otro lado, el complejo [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>) provoca el mismo comportamiento en el plásmido, pero en este caso las bandas de la forma III llegan a ser visibles hasta la banda correspondiente a 15  $\mu\text{M}$ . Mientras que la forma circular es visible en todas las bandas, siendo

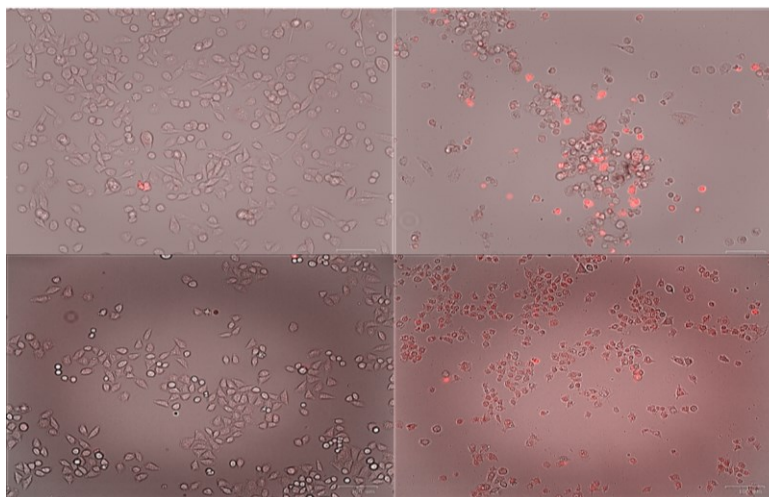
apenas distinguible en la banda de concentración más baja, de igual manera que el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>), a concentraciones iguales o superiores a 30 µM se genera la misma forma condensada incapaz de migrar en el gel. La desaparición de la banda correspondiente a la forma relajada circular ocurre en el primer complejo a 5 µM mientras que en el segundo complejo ocurre a una concentración 3 veces más grande, volviendo a respaldar el poder que tiene un ligante más abultado e hidrofóbico sobre la afinidad por el DNA.

#### **2.3.4. Ensayos de citotoxicidad**

En la tabla 8 se resumen los valores calculados de IC<sub>50</sub> \* x para los dos complejos contra las cuatro líneas estudiadas. Los valores de concentración inhibitoria coinciden con lo visto con los experimentos de afinidad por DNA, el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) muestra una mayor actividad contra las líneas de cáncer en comparación con el [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>), el cual presenta concentraciones inhibitorias que exceden el rango de 10 µM. El complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) muestra una actividad favorable contra las cuatro líneas, teniendo una mayor actividad contra las células HeLa (IC<sub>50</sub>=2.53 µM), seguido, en orden ascendente, de las líneas MCF-7, HCT-15 y MDA-MB-231. Todas las líneas estudiadas en el experimento corresponden a diferentes tejidos epiteliales (cérvico-uterino (HeLa), mama (MDA y MCF-7) y colorrectal (HCT-15)), indicando que el complejo tiene un espectro amplio de acción. Por otro lado, el complejo [Cu(L-Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>) presenta una acción bastante leve, aunque un ligero decrecimiento en la viabilidad es observado en los experimentos de viabilidad y presenta una actividad ligera contra la línea HCT-15 (IC<sub>50</sub>=11.77 µM), se puede concluir que las líneas estudiadas con este complejo presentan una resistencia considerable a la acción de la molécula.

**Tabla 8. Valores de IC50 ( $\mu\text{M}$ ) de los complejos contra las líneas celulares**

<b>Complejo</b>	<b>He-La</b>	<b>MCF-7</b>	<b>MDA MB 231</b>	<b>HCT-15</b>
[Cu(L-Citr)(Phen)](NO <sub>3</sub> )	2.53 $\pm$ 0.04	4.67 $\pm$ 0.59	6.69 $\pm$ 0.60	5.20 $\pm$ 0.09
[Cu(L-Citr)(Bipy)](NO <sub>3</sub> )		>10		11.77 $\pm$ 0.61



**Figura 43. Micrografías (10x) de las células HeLa y MDA tratadas con el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>). Las micrografías A y C corresponden a los controles de HeLa y MDA-MB-231 respectivamente, mientras que las micrografías B y D corresponden a los tratamientos**

Como se puede observar con la tinción de yoduro de propidio (figura 43), el complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) tiene la capacidad de alterar la morfología fusiforme de las células HeLa y MDA, provocando la formación de conglomerados circulares de un menor tamaño con una gran penetración del colorante, características propias de poblaciones celulares apoptóticas [187], [188], por lo que se puede indicar que la pérdida de viabilidad generada por el complejo ocurre por la inducción de apoptosis.

## **2.4. Caracterización de nanoplataformas**

### **2.4.1. Tamaño y número por DLS**

Los resultados de la caracterización por DLS de los 9 liposomas con el complejo [Cu(L-Citr)(phen)](NO<sub>3</sub>) sintetizados se resumen en la tabla 9 y en la figura 44 donde se puede observar que la distribución del tamaño por número. Todas las muestras de liposomas se distribuyen en valores cercanos 100 nm, lo que coincide con el tamaño esperado para el número indicado de pases del equipo de extrusión. Como se puede observar en las distribuciones de tamaño por número (Figura 42), a pesar de que los valores medios se encuentran homogéneos en el rango de 90-130 nm, las distribuciones se encuentran ligeramente ensanchadas. Lo que es más notorio en los grupos de liposomas de DMPC y DOPC, donde surge una tendencia a formar dos distribuciones de tamaños. Sin embargo, al no ser la diferencia en tamaños entre los picos principales y los nacientes grupos demasiado grande, se puede indicar que esta tendencia no supone un problema para los demás experimentos.

En la figura 45 se muestra la distribución de volúmenes de las muestras de liposomas sintetizadas con el complejo [Cu(L-Citr)(phen)](NO<sub>3</sub>), en este caso se pueden observar en los tres grupos que la mayoría del volumen se distribuye ampliamente sobre valores cercanos a 100 nm. Aunque una proporción considerable del volumen recae en tamaños superiores a 500 nm, considerando los datos de los parámetros de distribución (tabla 9). Estos grupos se pueden asignar a aglomeraciones de liposomas, a pesar de que se puede suponer de esta proporción de volúmenes para este grupo de partículas grandes, los datos de distribución por número muestran que son un grupo pequeño en comparación a los grupos principales distribuidos en las cercanías de 100 nm. Muy probablemente estos grupos sean el resultado de los tratamientos de ultrafiltración utilizados para separar los restos de síntesis, donde la fuerza centrífuga sea la responsable de este fenómeno al provocar la sedimentación de las partículas. A pesar de que la aglomeración no supone una fuente de variación y es probable que desaparezca diluyendo y agitando las muestras, cabe resaltar que

existe una tendencia a no observarse en las muestras sintetizadas sobre el buffer con contraíón nitrato.

Respecto a los factores presentes en la síntesis, el fosfolípido principal y el tipo de contraíón presente en el buffer, no existe una tendencia que muestre que estos factores alteran los parámetros de las nanoplateformas. Para ello, un análisis de varianza (ANOVA) con los dos factores mencionados sobre cada parámetro, encontrando que el valor de significancia p es demasiado grande como para rechazar la hipótesis nula, por lo que se puede concluir que los factores mencionados no tienen un efecto sobre el tamaño promedio final de las partículas. A pesar de que la aglomeración no supone una fuente de variación y es probable que desaparezca diluyendo y agitando las muestras, cabe resaltar que existe una tendencia a no observarse en las muestras sintetizadas sobre el buffer con contraíón nitrato.

**Tabla 9. . Parámetros de distribución de tamaño medidos por DLS**

Liposoma	Fosfolípido principal	Solución Buffer	Volumen promedio (nm)	Número promedio (nm)	Diámetro promedio (nm)	Valor z promedio	PdI
1	DMPC	A	126.8	99.0	93.3	114.5	0.0953
2	DPPC	B	429.0	79.8	74.8	115.1	0.0330
3	DOPC	C	373.0	88.0	80.2	141.6	0.0478
4	DMPC	C	839.0	98.7	84.3	749.3	0.8640
5	DPPC	A	105.6	93.4	90.8	104.8	0.0400
6	DOPC	B	116.2	91.7	86.5	112.9	0.0838
7	DMPC	B	228.4	97.6	88.3	190.7	0.1523
8	DPPC	C	162.2	56.8	50.4	90.82	0.0817
9	DOPC	A	114.9	89.8	84.4	113.9	0.0578
p (0.05) (FL)			0.5910	0.1412	0.2257	0.3377	0.3012
p (0.05) (BS)			0.3104	0.3931	0.1988	0.4313	0.4190

FL= Fosfolipido principal; BS= Solución Buffer; PdI= índice de polidispersión.

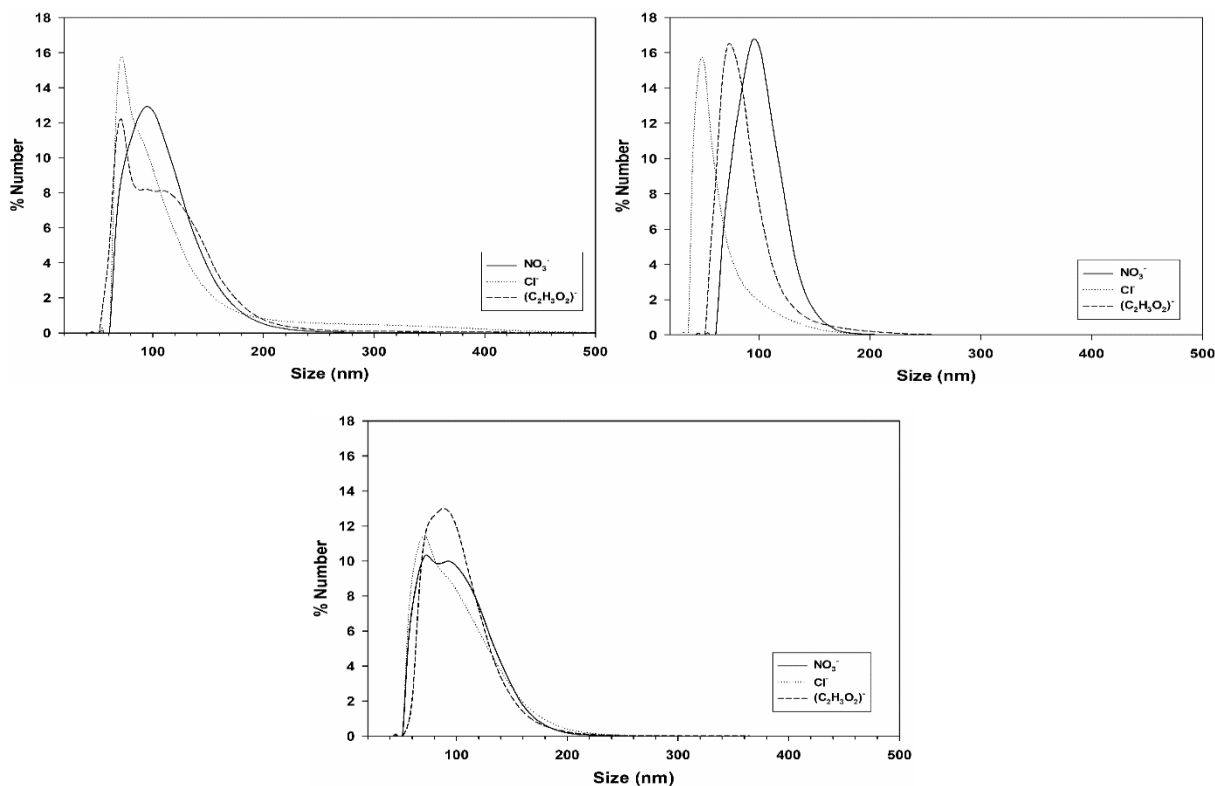


Figura 44. Diagramas de distribución por número de las liposomas de DMPC (diagrama superior izquierdo), DPPC (diagrama superior derecho) y DOPC (diagrama inferior)

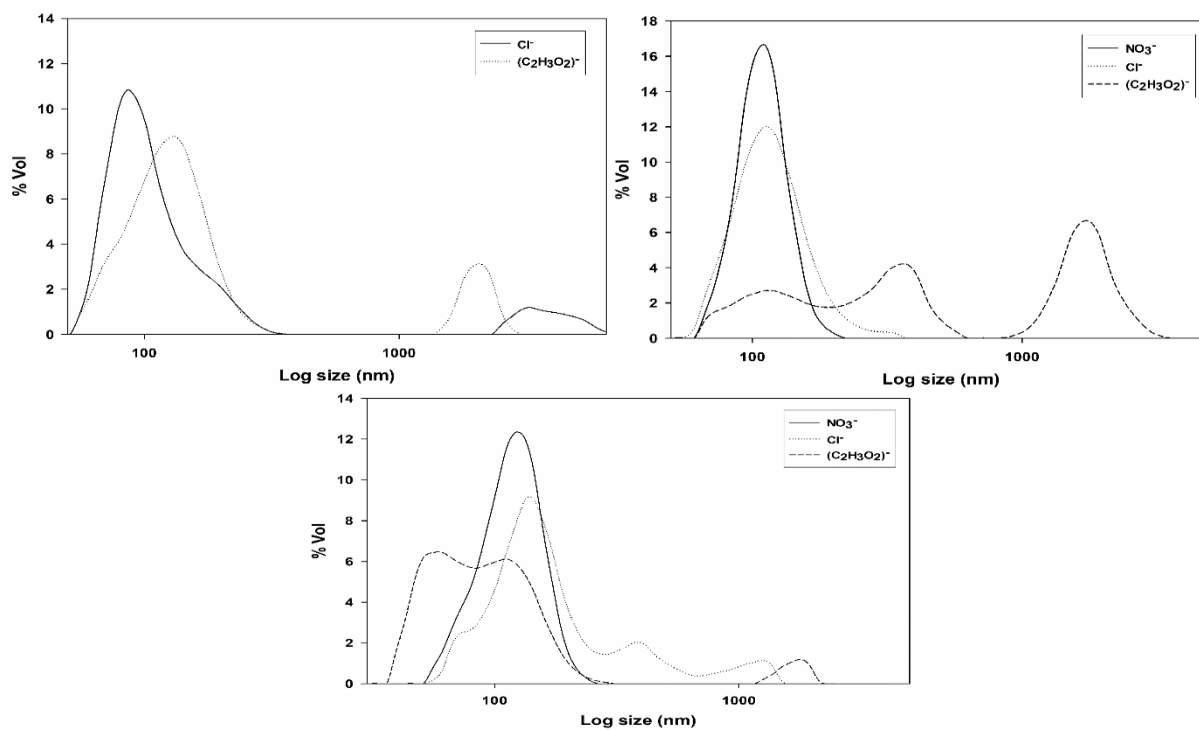


Figura 45. Diagramas de distribución por volumen de las liposomas de DMPC (diagrama superior izquierdo), DPPC (diagrama superior derecho) y DOPC (diagrama inferior)

### 2.4.2. Experimentos de citotoxicidad de las nanoplataformas

En la tabla 10 se resumen los resultados del experimento de citotoxicidad del complejo [Cu(L-Citr) (Phen)](NO<sub>3</sub>) encapsulado en los nueve diseños de liposomas. Se destacan los valores de IC<sub>50</sub> (\*x) y la relación de IC<sub>50</sub> con respecto al complejo sin encapsular. Al igual que el complejo sin encapsular, todas las muestras de liposomas fueron capaces de inducir apoptosis en las células, con los mismos patrones de pérdida de viabilidad. Como fue previsto desde la metodología, las suspensiones de liposomas del complejo generaron una mayor reducción de la viabilidad en células en comparación del complejo sin encapsular, todo ello en virtud del aumento de concentración del complejo. Una tendencia en los valores indica que este valor se encuentra fuertemente asociado al tipo de contraión usado en la solución buffer, donde los valores más bajos (incluso con una reducción negativa que se traduce en una pérdida de la efectividad) son inducidos por los liposomas sintetizados con contraión cloruro (Cl<sup>-</sup>), mientras que los liposomas encapsulados con contraión nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (el mismo contraión de la molécula del complejo) muestran los valores más altos de reducción de viabilidad.

**Tabla 10. Resumen del experimento de citotoxicidad de liposomas**

Liposoma	Línea celular	Fosfolípido Principal	Solución Buffer	IC <sub>50</sub> * x (μM)	R <sub>IC<sub>50</sub> tp</sub> promedio
1	MDA-MB-231	DMPC	A	3.21 ± 0.37	14.04
2	MDA-MB231	DPPC	B	4.64 ± 0.06	-24.38
3	MDA-MB-231	DOPC	C	2.63 ± 0.03	29.53
4	HeLa	DMPC	C	2.06 ± 0.25	34.32
5	HeLa	DPPC	A	1.69 ± 0.14	46.40
6	HeLa	DOPC	B	2.86 ± 0.71	8.97
7	HCT-15	DMPC	B	5.79 ± 0.36	33.85
8	HCT-15	DPPC	C	5.16 ± 0.98	41.05
9	HCT-15	DOPC	A	3.07 ± 0.50	64.90
p(0.05) = 0.0008		p(0.05) = 0.2257	p(0.05) = 0.0016		

El análisis estadístico realizado sobre el diseño experimental arroja valores  $p < 0.05$  solo a los factores correspondientes al tipo de línea celular (que es el factor de bloque) y el tipo de contracción, concluyendo que el efecto del contracción es estadísticamente significativo sobre la citotoxicidad de los liposomas, por otro lado, el efecto producido por las diferentes fosfatidilcolinas utilizadas para el experimento parece no tener un efecto significativo.

### 3. CONCLUSIONES

Se Se logró la caracterización del complejo de cobre-citrulina  $[\text{Cu}(\text{D-Citr})_2]_n$ , y su caracterización por cristalografía de rayos X de monocristal, espectrofotometría UV-Visible, espectrofotometría Infrarroja (FT-IR), espectrofotometría Raman y por Resonancia Magnética Nuclear (NMR) de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Todo lo anterior con objetivo de brindar un marco de referencia para el posterior estudio de complejos mixtos de cobre tipo aminoacidato con potencialidad anticancerígena. La caracterización de este complejo reveló que el complejo, debido a los grupos funcionales que posee, muestra tendencia a actuar como ligante ditópico, lo que le permite formar complejos de tipo polimérico.

Se logró la síntesis de los cuatro complejos mixtos tipo aminoacidato  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$ ,  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$ ,  $[\text{Cu}(\text{DL-Citr})(\text{Bipy})(\text{H}_2\text{O})](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})$  y  $[\text{Cu}(\text{DL-Citr})(\text{Phen})](\text{ClO}_4)$  y su caracterización por difracción de rayos X de monocristal, espectrofotometría UV-Visible, espectrofotometría Infrarroja (FT-IR), espectrofotometría Raman y espectrometría de masas. La caracterización mostró que los cuatro complejos muestran muchas similitudes con el complejo  $[\text{Cu}(\text{D-Citr})_2]_n$ , lo que valida su uso como modelo de estudio.

Se realizaron ensayos *in-vitro* sobre los complejos  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  y  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Bipy})](\text{NO}_3)$  por ser los complejos con mayor solubilidad. Encontrando que los dos complejos seleccionados tienen la capacidad de unión a DNA bicatenario por intercalamiento y la capacidad de generar escisiones en la misma, además los complejos tienen la capacidad de inducir apoptosis en cuatro líneas celulares (HeLa, MDA-MB-231, MCF-7 y HCT-15), donde el complejo  $[\text{Cu}(\text{L-Citr})(\text{Phen})](\text{NO}_3)$  es el que muestra una mayor actividad.

En los experimentos de encapsulación del complejo [Cu(L-Citr)(Phen)](NO<sub>3</sub>) en liposomas (100 nm) de fosfatidilcolinas, además de la caracterización por DLS, se logró establecer un diseño experimental en cuadrado latino con el objetivo de evaluar el efecto de utilizar como componentes diferentes fosfatidilcolinas (DMPC, DPPC y DOPC) y diferentes iones (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>) sobre la actividad citotóxica resultante. Encontrando que la variación respecto a los fosfolípidos utilizados no ejerce efecto sobre la citotoxicidad, pero el tipo de ion utilizado si ejerce un efecto significativo. Con lo anterior, llegando a encontrar que el ion cloruro disminuye la efectividad del ensamble mientras que el ion nitrato es el que mejores valores de citotoxicidad ofrece, es decir, cuando se utiliza el mismo contraíón de la molécula del complejo, en este caso.

## 4. REFERENCIAS

- [1] H. Sung *et al.*, “Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries,” *CA Cancer J Clin*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, May 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [2] C. B. Blackadar, “Historical review of the causes of cancer,” *World Journal of Clinical Oncology*, vol. 7, no. 1. Baishideng Publishing Group Co., Limited, pp. 54–86, Feb. 10, 2016. doi: 10.5306/wjco.v7.i1.54.
- [3] M. B. Reitsma *et al.*, “Spatial, temporal, and demographic patterns in prevalence of smoking tobacco use and attributable disease burden in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019,” *The Lancet*, vol. 397, no. 10292, pp. 2337–2360, Jun. 2021, doi: 10.1016/S0140-6736(21)01169-7.
- [4] R. A. Ward, S. Fawell, N. Floc’H, V. Flemington, D. McKerrecher, and P. D. Smith, “Challenges and Opportunities in Cancer Drug Resistance,” *Chemical Reviews*, vol. 121, no. 6. American Chemical Society, pp. 3297–3351, Mar. 24, 2021. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00383.
- [5] National Cancer Institute, “What Is Cancer?,” U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health. .
- [6] A. ; S. A. Skuse, “What Was Cancer? Definition, Diagnosis and Cause,” in *Constructions of Cancer in Early Modern England* , London: Palgrave Macmillan, 2015, pp. 20–39. doi: 10.1057/9781137487537\_2.
- [7] S. I. Hajdu, “A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1,” *Cancer*, vol. 117, no. 5, pp. 1097–1102, Mar. 2011, doi: 10.1002/cncr.25553.
- [8] R. T. Javier and J. S. Butel, “The history of tumor virology,” *Cancer Res*, vol. 68, no. 19, pp. 7693–7706, Oct. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3301.
- [9] J. R. BROWN and J. L. THORNTON, “Percivall Pott (1714-1788) and chimney sweepers’ cancer of the scrotum,” *Br J Ind Med*, vol. 14, no. 1, pp. 68–70, Jan. 1957, doi: 10.1136/oem.14.1.68.
- [10] L. Foulds, “THE NATURAL HISTORY OF CANCER,” *J Chronic Dis*, vol. 8, no. 1, pp. 2–37, 1958.
- [11] M. D. Kipling and H. A. Waldron, “Percivall Pott and cancer scroti,” *Br J Ind Med*, vol. 32, no. 3, pp. 244–246, 1975, doi: 10.1136/oem.32.3.244.
- [12] D. Palmer, K. Bailey, and S. Patel, “SIR PERCIVALL POTT AND SOOT WART: THE EFFECTS OF SCROTAL CANCER ON CHILD LABOR LAWS IN THE BRITISH EMPIRE,” *Journal of Urology*, vol. 193, no. 4S, Apr. 2015, doi: 10.1016/j.juro.2015.02.495.

- [13] G. S. Martin, “The hunting of the Src,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 2, pp. 467–475, 2001.
- [14] P. Rous, J. B. Murphy, and W. H. Tytler, “A filterable agent the cause of a second chicken-tumor, an osteochondrosarcoma.,” *J Am Med Assoc*, vol. 59, no. 20, pp. 1793–1794, 1911, [Online]. Available: <http://jama.jamanetwork.com/>
- [15] R. A. Weiss and P. K. Vogt, “100 years of rous sarcoma virus,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 208, no. 12, pp. 2351–2355, Nov. 2011, doi: 10.1084/jem.20112160.
- [16] E. V Keogh, “ECTODERMAL LESIONS PRODUCED BY THE VIRUS OF ROUS SARCOMA,” *BRITISH JOURNAL OF EXPERIMENTAL PATHOLOGY*, no. 1, 1938.
- [17] H. Rubin, “The early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 35, pp. 14389–14396, Aug. 2011, doi: 10.1073/pnas.1108655108.
- [18] H. Graham, “Rous Sarcoma and Its Helper Viruses (A Review),” *Avian Dis*, vol. 9, no. 1, pp. 127–145, 1965.
- [19] W. Ray Bryan, D. Calnan, and J. B. Moloney, “Biological Studies on the Rous Sarcoma Virus. III. The Recovery of Virus From Experimental Tumors in Relation to Initiating Dose 1,” *J Natl Cancer Inst*, vol. 16, no. 1, pp. 317–335, 1953.
- [20] W. Ray Bryan, D. Calnan, and J. B. Moloney, “Biological Studies on the Rous Sarcoma Virus. III. The Recovery of Virus From Experimental Tumors in Relation to Initiating Dose 1.”
- [21] B. Hidesaburo Hanafusa, T. Hanafusa, and H. Rubin, “Advances in Enzym,” 1958. [Online]. Available: <https://www.pnas.org>
- [22] H. M. Temin, “The interaction of Rous Sarcoma Virus and cells *in vitro*,” California Institute of Technology, Pasadena, 1960.
- [23] A. M. Cotlar, J. J. Dubose, and D. M. Rose, “History of surgery for breast cancer: Radical to the sublime,” *Curr Surg*, vol. 60, no. 3, pp. 329–337, May 2003, doi: 10.1016/S0149-7944(02)00777-8.
- [24] A. Sudhakar, “History of Cancer, Ancient and Modern Treatment Methods,” *J Cancer Sci Ther*, vol. 01, no. 02, pp. i–iv, 2009, doi: 10.4172/1948-5956.100000e2.
- [25] L. Wyld, R. A. Audisio, and G. J. Poston, “The evolution of cancer surgery and future perspectives,” *Nat Rev Clin Oncol*, vol. 12, no. 2, pp. 115–124, Feb. 2015, doi: 10.1038/nrclinonc.2014.191.
- [26] J. F. Griffin, K. E. Poruk, and C. L. Wolfgang, “Pancreatic cancer surgery: Past, present, and future,” *Chinese Journal of Cancer Research*, vol. 27, no. 4, pp. 332–348, 2015, doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2015.06.07.
- [27] V. T. DeVita and E. Chu, “A history of cancer chemotherapy,” *Cancer Res*, vol. 68, no. 21, pp. 8643–8653, Nov. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.

- [28] D. Galmarini, C. M. Galmarini, and F. C. Galmarini, "Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 84, no. 2, pp. 181–199, Nov. 2012, doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.03.002.
- [29] P. Nygren, "What is cancer chemotherapy?," *Acta Oncol (Madr)*, vol. 40, no. 2–3, pp. 166–174, 2001, doi: 10.1080/02841860151116204.
- [30] S. L. Smith, "War! What is it good for? Mustard gas medicine," *CMAJ*, vol. 189, no. 8, pp. E321–E322, Feb. 2017, doi: 10.1503/cmaj.161032.
- [31] B. A. Chabner and T. G. Roberts Jr, "Chemotherapy and the war on cancer," *NATURE REVIEWS*, vol. 5, pp. 65–72, 2005.
- [32] M. Visentin, R. Zhao, and I. D. Goldman, "The Antifolates," *Hematol Oncol Clin North Am*, vol. 26, no. 3, pp. 629–648, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.hoc.2012.02.002.
- [33] D. R. Miller, "A tribute to Sidney Farber - The father of modern chemotherapy," *Br J Haematol*, vol. 134, no. 1, pp. 20–26, Jul. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06119.x.
- [34] J. Walling, "From methotrexate to pemetrexed and beyond. A review of the pharmacodynamic and clinical properties of antifolates," *Invest New Drugs*, vol. 24, no. 1, pp. 37–77, Jan. 2006, doi: 10.1007/s10637-005-4541-1.
- [35] D. Banerjee *et al.*, "Molecular mechanisms of resistance to antifolates, a review," in *Acta Biochimica Polonica*, 1995, pp. 457–464.
- [36] S. A. Waskman, H. Robinson, H. J. Metzger, and Boyd Woodruff, "Toxicity of Actinomycin," *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 47, no. 2, pp. 261–263, 1940.
- [37] S. A. Waksman, W. B. Geiger, and D. M. Reynolds, "Strain specificity and production of antibiotic substances: VII. Production of actinomycin by different actinomycetes," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 32, no. 5, 1946, [Online]. Available: <https://www.pnas.org>
- [38] C. C. Cheng and Z.-C. Kwang-Yuen, "Some Antineoplastic Antibiotics," *J Pharm Sci*, vol. 61, no. 4, pp. 485–501, 1972.
- [39] C. E. Dalgliesh and A. R. Todd, "Actinomycin," *Nature*, vol. 164, pp. 830–830, 1949.
- [40] D. Gottlieb and P. D. Shaw, *Antibiotics II Biosynthesis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1967. doi: 10.1007/978-3-662-38441-1.
- [41] B. R. Goldspiel, "Clinical Overview of the Taxanes," *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, vol. 17, no. 5P2, Sep. 1997, doi: 10.1002/j.1875-9114.1997.tb03813.x.
- [42] D. Zhang, R. Yang, S. Wang, and Z. Dong, "Paclitaxel: New uses for an old drug," *Drug Des Devel Ther*, vol. 8, pp. 279–284, Feb. 2014, doi: 10.2147/DDDT.S56801.

- [43] C. J. Thomas, N. J. Rahier, and S. M. Hecht, "Camptothecin: Current perspectives," *Bioorg Med Chem*, vol. 12, no. 7, pp. 1585–1604, Apr. 2004, doi: 10.1016/j.bmc.2003.11.036.
- [44] T. M. Mekhail and M. Markman, "Drug Evaluation," *Expert Opin Pharmacother*, vol. 3, no. 6, pp. 755–766, 2002, [Online]. Available: [www.ashley-pub.com](http://www.ashley-pub.com)
- [45] E. K. Rowinsky and R. C. Donehower, "Paclitaxel (taxol)," *The New England Journal of Medicine*, vol. 332, no. 15, pp. 1004–1014, 1995.
- [46] R. Ralhan and J. Kaur, "Alkylating agents and cancer therapy," *Expert Opin Ther Pat*, vol. 17, no. 9, pp. 1061–1075, 2007, doi: 10.1517/13543776.17.9.1061.
- [47] R. Saffhill, G. P. Margison, and P. J. O'connor, "Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents," *Biochim Biophys Acta*, vol. 823, pp. 111–145, 1985.
- [48] G. P. Warwick, "The Mechanism of Action of Alkylating Agents," *Cancer Res*, vol. 23, pp. 1315–1333, 1963, [Online]. Available: [http://cancerres.aacrjournals.org/content/23/8\\_Part\\_1/1315](http://cancerres.aacrjournals.org/content/23/8_Part_1/1315)
- [49] C. Périgaud, G. Gosselin, and J. L. Imbach, "Nucleoside analogues as chemotherapeutic agents: A review," *Nucleosides Nucleotides*, vol. 11, no. 2–4, pp. 903–945, Feb. 1992, doi: 10.1080/07328319208021748.
- [50] C. M. Galmarini, J. R. Mackey, and C. Dumontet, "Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment," *Lancet Oncol*, vol. 3, no. 7, pp. 415–424, 2002, [Online]. Available: <http://oncology.thelancet.com416>
- [51] C. M. Galmarini, J. R. Mackey, and C. Dumontet, "REVIEW Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies," *Leukemia*, vol. 15, pp. 875–890, 2001, [Online]. Available: [www.nature.com/leu](http://www.nature.com/leu)
- [52] A. Duflos, A. Kruczynski, and J.-M. Barret, "Novel Aspects of Natural and Modified Vinca Alkaloids," *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, vol. 2, no. 1, pp. 55–70, 2002.
- [53] M. Moudi, R. Go, C. Yong, S. Yien, and M. Nazre, "Vinca Alkaloids," *Int J Prev Med*, vol. 4, no. 11, 1231, [Online]. Available: [www.ijpm.ir](http://www.ijpm.ir)
- [54] I. S. Johnson, J. G. Armstrong, M. Gorman, and J. P. Burnett, "The Vinca Alkaloids: A New Class of Oncolytic Agents," *Cancer Res*, vol. 23, no. 8 (part I), pp. 1390–1427, 1963.
- [55] D. S. Goodsell, "The Molecular Perspective: Cisplatin," *Oncologist*, vol. 11, no. 3, pp. 316–317, Mar. 2006, doi: 10.1634/theoncologist.11-3-316.
- [56] R. S. Go and A. A. Adjei, "Review of the Comparative Pharmacology and Clinical Activity of Cisplatin and Carboplatin," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 17, no. 1, pp. 409–422, 1999.
- [57] R. A. Alderden, M. D. Hall, T. W. Hambley, and G. B. Kauffman, "Chemistry for Everyone The Discovery and Development of Cisplatin Products of Chemistry," *Journal of Chemical*

- Education* •, vol. 83, no. 5, pp. 728–734, 2006, [Online]. Available: [www.JCE.DivCHED.org](http://www.JCE.DivCHED.org)
- [58] S. Dasari and P. Bernard Tchounwou, “Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action,” *Eur J Pharmacol*, vol. 740, pp. 364–378, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.
- [59] A. W. Prestayko, J. C. D’Aoust, B. F. Isseli, and S. T. Crooke, “Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum),” *Cancer Treat Rev*, vol. 6, pp. 17–39, 1979.
- [60] P. J. Loehrer and L. H. Einhorn, “Cisplatin,” *Ann Intern Med*, vol. 100, no. 5, pp. 704–713, 1984, [Online]. Available: <http://annals.org/>
- [61] F. Muggia, R. Leone, and A. Bonetti, “Platinum and Other Heavy metal Coordinating Compounds in Cancer Chemotherapy: Overview of Verona ISPCX XI,” in *PROCEEDINGS OF THE XI INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF PLATINUM COORDINATION COMPOUNDS IN CANCER CHEMOTHERAPY*, 2012, pp. 416–421.
- [62] R. G. Kenny and C. J. Marmion, “Toward Multi-Targeted Platinum and Ruthenium Drugs - A New Paradigm in Cancer Drug Treatment Regimens?,” *Chem Rev*, vol. 119, no. 2, pp. 1058–1137, Jan. 2019, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00271.
- [63] E. J. Anthony *et al.*, “Metallo-drugs are unique: Opportunities and challenges of discovery and development,” *Chem Sci*, vol. 11, no. 48, pp. 12888–12917, Dec. 2020, doi: 10.1039/d0sc04082g.
- [64] K. D. Mjos and C. Orvig, “Metallo-drugs in medicinal inorganic chemistry,” *Chem Rev*, vol. 114, no. 8, pp. 4540–4563, Apr. 2014, doi: 10.1021/cr400460s.
- [65] R. L. Lucaciu, A. C. Hangan, B. Sevastre, and L. S. Oprean, “Metallo-Drugs in Cancer Therapy: Past, Present and Future,” *Molecules*, vol. 27, no. 19, Oct. 2022, doi: 10.3390/molecules27196485.
- [66] S. Komeda and A. Casini, “Next-Generation Anticancer Metallo-drugs,” *Curr Top Med Chem*, vol. 12, no. 3, pp. 219–235, Jan. 2012, doi: 10.2174/156802612799078964.
- [67] H. Sohn and M. R. Okos, “Paclitaxel (Taxol): From Nutt to Drug,” *J Microbiol Biotechnol*, vol. 8, no. 5, pp. 427–440, 1998.
- [68] I. C. S. Kennedy, B. M. Fitzharris, B. M. Coils, and C. H. Atkinson, “Carboplatin is ototoxic,” *Cancer chemother and pharmacology*, vol. 26, pp. 232–234, 1990.
- [69] J. J. Monsuez, J. C. Charniot, N. Vignat, and J. Y. Artigou, “Cardiac side-effects of cancer chemotherapy,” *Int J Cardiol*, vol. 144, no. 1, pp. 3–15, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.ijcard.2010.03.003.
- [70] X. Yao, K. Panichpisal, N. Kurtzman, and K. Nugent, “Cisplatin Nephrotoxicity: A Review,” *The American Journal of Medical Sciences*, vol. 334, no. 2, pp. 115–124, 2007.

- [71] L. E. Ta, L. Espeset, J. Podratz, and A. J. Windebank, "Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding," *Neurotoxicology*, vol. 27, no. 6, pp. 992–1002, Dec. 2006, doi: 10.1016/j.neuro.2006.04.010.
- [72] J. Crawford, D. C. Dale, and G. H. Lyman, "Chemotherapy-Induced Neutropenia: Risks, Consequences, and New Directions for Its Management," *Cancer*, vol. 100, no. 2, pp. 228–237, Jan. 2004, doi: 10.1002/cncr.11882.
- [73] D. Daniel and J. Crawford, "Myelotoxicity from chemotherapy," *Semin Oncol*, vol. 33, no. 1, pp. 74–85, 2006, doi: 10.1053/j.seminoncol.2005.11.003.
- [74] M. L. Meistrich, "Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans," *Fertil Steril*, vol. 100, no. 5, pp. 1180–1186, 2013, doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.08.010.
- [75] R. R. Love, H. Leventhal, D. V. Easterling, and D. R. Nerenz, "Side effects and emotional distress during cancer chemotherapy," *Cancer*, vol. 63, no. 3, pp. 604–612, 1989, doi: 10.1002/1097-0142(19890201)63:3<604::AID-CNCR2820630334>3.0.CO;2-2.
- [76] C. Lindley *et al.*, "Perception of Chemotherapy Side Effects Cancer versus Noncancer Patients," *American Cancer Society*, vol. 7, no. 2, pp. 59–65, 1999.
- [77] W. T. Beck, "Cellular pharmacology of vinca alkaloid resistance and its circumvention," *Adv Enzyme Regul*, vol. 22, pp. 207–227, 1984.
- [78] Y. G. Assaraf, "Molecular basis of antifolate resistance," *Cancer and Metastasis Reviews*, vol. 26, no. 1, pp. 153–181, Mar. 2007, doi: 10.1007/s10555-007-9049-z.
- [79] M. Kavallaris *et al.*, "Multiple Microtubule Alterations Are Associated with Vinca Alkaloid Resistance in Human Leukemia Cells," *Cancer Res*, vol. 61, pp. 5803–5809, 2001.
- [80] D. J. Stewart, "Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 63, no. 1, pp. 12–31, Jul. 2007, doi: 10.1016/j.critrevonc.2007.02.001.
- [81] R. Zhao and I. D. Goldman, "Resistance to antifolates," *Oncogene*, vol. 22, no. 47 REV. ISS. 6, pp. 7431–7457, Oct. 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206946.
- [82] L. Bai *et al.*, "Research progress in modern structure of platinum complexes," *Eur J Med Chem*, vol. 140, pp. 349–382, Nov. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.09.034.
- [83] I. Kostova, "Platinum Complexes as Anticancer Agents," *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, vol. 1, pp. 1–22, 2006.
- [84] S. Komeda and A. Casini, "Next-Generation Anticancer Metallodrugs," *Curr Top Med Chem*, vol. 12, no. 3, pp. 219–235, Jan. 2012, doi: 10.2174/156802612799078964.
- [85] S. Y. Lee, C. Y. Kim, and T. G. Nam, "Ruthenium complexes as anticancer agents: A brief history and perspectives," *Drug Des Devel Ther*, vol. 14, pp. 5375–5392, 2020, doi: 10.2147/DDDT.S275007.

- [86] A. Rilak Simović, R. Masnikosa, I. Bratsos, and E. Alessio, "Chemistry and reactivity of ruthenium(II) complexes: DNA/protein binding mode and anticancer activity are related to the complex structure," *Coord Chem Rev*, vol. 398, Nov. 2019, doi: 10.1016/j.ccr.2019.07.008.
- [87] L. Zeng *et al.*, "The development of anticancer ruthenium(II) complexes: From single molecule compounds to nanomaterials," *Chem Soc Rev*, vol. 46, no. 19, pp. 5771–5804, Oct. 2017, doi: 10.1039/c7cs00195a.
- [88] W. A. Wani *et al.*, "Recent advances in iron complexes as potential anticancer agents," *New Journal of Chemistry*, vol. 40, no. 2, pp. 1063–1090, Feb. 2016, doi: 10.1039/c5nj01449b.
- [89] C. R. Munteanu and K. Suntharalingam, "Advances in cobalt complexes as anticancer agents," *Dalton Transactions*, vol. 44, no. 31, pp. 13796–13808, Jun. 2015, doi: 10.1039/c5dt02101d.
- [90] M. Porchia, M. Pellei, F. Del Bello, and C. Santini, "Zinc Complexes with Nitrogen Donor Ligands as Anticancer Agents," *Molecules*, vol. 25, no. 24, Dec. 2020, doi: 10.3390/MOLECULES25245814.
- [91] S. Masuri *et al.*, "Copper(Ii) phenanthroline-based complexes as potential anticancer drugs: A walkthrough on the mechanisms of action," *Molecules*, vol. 27, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.3390/molecules27010049.
- [92] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, and C. Marzano, "Advances in copper complexes as anticancer agents," *Chem Rev*, vol. 114, no. 1, pp. 815–862, Jan. 2014, doi: 10.1021/cr400135x.
- [93] C. Molinaro, A. Martoriati, L. Pelinski, and K. Cailliau, "Copper complexes as anticancer agents targeting topoisomerases i and ii," *Cancers (Basel)*, vol. 12, no. 10, pp. 1–26, Oct. 2020, doi: 10.3390/cancers12102863.
- [94] C. Marzano, M. Pellei, F. Tisato, and C. Santini, "Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry," *Anticancer Agents Med Chem*, vol. 9, pp. 185–211, 2009.
- [95] F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, and C. Santini, "Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies," *Med Res Rev*, vol. 30, no. 4, pp. 708–749, 2010, doi: 10.1002/med.20174.
- [96] L. Ruiz-Azuara *et al.*, "Abstract CT408: Phase I study of one mixed chelates copper (II) compound, Casiopeína CasIIIia with antitumor activity and its mechanism of action," *Cancer Res*, vol. 74, no. 19\_Supplement, pp. CT408–CT408, 2014.
- [97] A. M. Rimando and P. M. Perkins-Veazie, "Determination of citrulline in watermelon rind," *J Chromatogr A*, vol. 1078, no. 1–2, pp. 196–200, 2005, doi: 10.1016/J.CHROMA.2005.05.009.

- [98] K. C. Fragkos and A. Forbes, “Was Citrulline First a Laxative Substance?: The Truth about Modern Citrulline and Its Isolation,” *Nihon Ishigaku Zasshi*, vol. 57, no. 3, pp. 275–292, 2011.
- [99] M. Wada, “On the occurrence of a new amino acid in watermelon, *Citrullus Vulgaris*, Schrad.,” *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*, vol. 6, no. 1–5, pp. 32–34, Jan. 1930, doi: 10.1080/03758397.1930.10856930.
- [100] E. Curis, P. Crenn, and L. Cynober, “Citrulline and the gut,” *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 10, no. 5, pp. 620–626, Sep. 2007, doi: 10.1097/MCO.0B013E32829FB38D.
- [101] S. N. Kaore and N. M. Kaore, “Citrulline: Pharmacological perspectives and role as a biomarker in diseases and toxicities,” in *Biomarkers in Toxicology*, R. C. Gupta, Ed., Elsevier Inc., 2014, pp. 883–905. doi: 10.1016/B978-0-12-404630-6.00053-1.
- [102] S. N. Kaore, H. S. Amane, and N. M. Kaore, “Citrulline: pharmacological perspectives and its role as an emerging biomarker in future,” *Fundam Clin Pharmacol*, vol. 27, no. 1, pp. 35–50, Feb. 2013, doi: 10.1111/J.1472-8206.2012.01059.X.
- [103] E. Aguayo, A. Martínez-Sánchez, B. Fernández-Lobato, and F. Alacid, “L-Citrulline: A non-essential amino acid with important roles in human health,” *Applied Sciences (Switzerland)*, vol. 11, no. 3293, 2021, doi: 10.3390/app11073293.
- [104] C. Papadia, S. Osowska, L. Cynober, and A. Forbes, “Citrulline in health and disease. Review on human studies,” *Clinical Nutrition*, vol. 37, no. 6, pp. 1823–1828, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.CLNU.2017.10.009.
- [105] F. Endo, T. Matsuura, K. Yanagita, and I. Matsuda, “Clinical manifestations of inborn errors of the urea cycle and related metabolic disorders during childhood,” *J Nutr*, vol. 134, no. 6 Suppl, pp. 1605S–1609S, 2004, doi: 10.1093/JN/134.6.1605S.
- [106] D. Khalaf, M. Krüger, M. Wehland, M. Infanger, and D. Grimm, “The Effects of Oral L-Arginine and L-Citrulline Supplementation on Blood Pressure,” *Nutrients*, vol. 11, no. 1679, 2019, doi: 10.3390/nu11071679.
- [107] J. K. Collins *et al.*, “Watermelon consumption increases plasma arginine concentrations in adults,” *Nutrition*, vol. 23, no. 3, pp. 261–266, 2007, doi: 10.1016/J.NUT.2007.01.005.
- [108] I. Gramaglia *et al.*, “Citrulline protects mice from experimental cerebral malaria by ameliorating hypoargininemia, urea cycle changes and vascular leak,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, p. e0213428, Mar. 2019, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0213428.
- [109] S. Bahri *et al.*, “Citrulline: from metabolism to therapeutic use,” *Nutrition*, vol. 29, no. 3, pp. 479–484, 2013.
- [110] J. Rashid, S. S. Kumar, K. M. Job, X. Liu, C. D. Fike, and C. M. T. Sherwin, “Therapeutic Potential of Citrulline as an Arginine Supplement: A Clinical Pharmacology Review,” *Paediatr Drugs*, vol. 22, no. 3, pp. 279–293, Jun. 2020, doi: 10.1007/S40272-020-00384-5.

- [111] M. Alghamdi *et al.*, “An overview of the intrinsic role of citrullination in autoimmune disorders,” *J Immunol Res*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/7592851.
- [112] S. Maric *et al.*, “Citrulline, Biomarker of Enterocyte Functional Mass and Dietary Supplement. Metabolism, Transport, and Current Evidence for Clinical Use,” *Nutrients*, vol. 13, no. 2794, 2021.
- [113] A. C. Kurtz, “A simple synthesis of dl-citrulline,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 122, no. 2, pp. 477–484, Jan. 1938, doi: 10.1016/S0021-9258(18)74228-2.
- [114] K. C. Trikha, B. C. Nair, and R. P. Singh, “Complexation of bivalent metal ions with amino acids. I. L-citrulline complexes,” *Indian J Chem*, vol. 6, no. 9, p. 532, 1968.
- [115] E. R. Clarke and A. E. Martell, “Metal chelates of arginine and related ligands,” *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, vol. 32, no. 3, pp. 911–926, Mar. 1970, doi: 10.1016/0022-1902(70)80070-7.
- [116] O. Yamauchi, T. Sakurai, and A. Nakahara, “Histidine-Containing Ternary Amino Acid-Copper(II) Complexes. Syntheses and Properties,” *J Am Chem Soc*, vol. 101, no. 15, pp. 4164–4172, 1979, doi: 10.1021/ja00509a024.
- [117] M. L. Ganadu, V. Leoni, G. Crisponi, and V. Nurchi, “An investigation on the interaction between palladium(II) and L-citrulline by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectroscopy and potentiometry,” *Polyhedron*, vol. 10, no. 3, pp. 333–336, 1991, doi: 10.1016/S0277-5387(00)80153-9.
- [118] M. Singh, V. Shankar, D. Singh, and V. Krishna, “Chelation and Stabilization Properties of Citrulline and Uracil with Hg(II) as a Heavy Metal Ion in Solution,” *Chem Sci Trans*, vol. 6, no. 4, pp. 646–652, 2017, doi: 10.7598/cst2017.1398.
- [119] B. Z. Mascaliovas, F. R. G. Bergamini, A. Cuin, and P. P. Corbi, “Synthesis and crystal structure of a palladium(II) complex with the amino acid L-citrulline,” *Powder Diffr*, vol. 30, no. 4, pp. 357–361, 2015, doi: 10.1017/S0885715615000652.
- [120] B. Martínez-Valencia *et al.*, “Cyclo-tetranavanadate bridged copper complexes as potential double bullet pro-metallodrugs for cancer treatment,” *J Inorg Biochem*, vol. 208, no. 111081, Jul. 2020, doi: 10.1016/J.JINORGBIO.2020.111081.
- [121] B. Martínez-Valencia *et al.*, “Synthesis and Experimental-Computational Characterization of a Copper/Vanadium Compound with Potential Anticancer Activity,” *Crystals (Basel)*, vol. 10, no. 492, Jun. 2020, doi: 10.3390/CRYST10060492.
- [122] N. D. Corona-Motolinia *et al.*, “Ternary Copper Complex of L-Glutamine and Phenanthroline as Counterions of Cyclo-Tetranavanadate Anion: Experimental–Theoretical Characterization and Potential Antineoplastic Activity,” *Metals (Basel)*, vol. 11, no. 1541, Sep. 2021, doi: 10.3390/MET11101541.
- [123] A. Pérez-Benítez, M. Á. Méndez-Rojas, S. Bernès, and E. González-Vergara, “Hybrid (Electrochemical-Chemical) Single Crystal Synthesis of Copper Aspirinate Starting from

- an Aspirin Tablet: an Undergraduate Bioinorganic Experiment.," *Chemical Education Journal*, vol. 11, no. 2, pp. 1–8, 2008, [Online]. Available: <http://chem.sci.utsunomiya-u.ac.jp/cejrn1E.html>
- [124] C.-C. Su, T.-Y. Tai, S.-P. Wu, S.-L. Wang, and F.-L. Liao, "Spectroscopic and electronic properties of mixed ligand aminoacidatocopper(II) complexes: Molecular structure of [Cu(4,7-dimethyl-1,10-phenanthroline)(1-phenylalaninato)](ClO<sub>4</sub>)," *Polyhedron*, vol. 18, no. 18, pp. 2361–2368, Jul. 1999, doi: 10.1016/S0277-5387(99)00130-8.
- [125] "Bruker 2016. APEX3, SAINT, and SADABS." Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- [126] G. M. Sheldrick, "SHELXT – Integrated space-group and crystal-structure determination," *Acta Crystallogr A Found Adv*, vol. 71, pp. 3–8, 2015, doi: 10.1107/S2053273314026370.
- [127] G. M. Sheldrick, "Crystal structure refinement with SHELXL," *Acta Crystallogr C Struct Chem*, vol. 71, no. Pt 1, p. 8, Jan. 2015, doi: 10.1107/S2053229614024218.
- [128] C. C. D. CrysAlis, "CRYALIS RED in XCALIBUR PX and KUMA KM-4-CCD software." Oxford Diffraction Ltd., Yarnton, Oxfordshire, England, 2009.
- [129] M. E. Reichmann, S. A. Rice, C. A. Thomas, and P. Doty, "A Further Examination of the Molecular Weight and Size of Desoxypentose Nucleic Acid," *J Am Chem Soc*, vol. 76, no. 11, pp. 3047–3053, 1954, [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
- [130] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, and H. Puschmann, "OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program," *J Appl Crystallogr*, vol. 42, pp. 339–341, Jan. 2009, doi: 10.1107/S0021889808042726/HTTPS://JOURNALS.IUCR.ORG/SERVICES/RSS.HTM L.
- [131] A. Wolfe, G. H. Shimer, and T. Meehan, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA," *Biochemistry*, vol. 26, no. 20, pp. 6392–6369, 1987.
- [132] J.-B. Le pecq and A. C. Paoletti, "A Fluorescent Complex between Ethidium Bromide and Nucleic Acids Physical-Chemical Characterization," *J Mol Biol*, vol. 27, pp. 87–106, 1967.
- [133] J.-B. Le Pecq and C. Paoletti, "A New Fluorometric Method for RNA and DNA Determination," *Anal Biochem*, vol. 17, pp. 100–107, 1966.
- [134] A. J. Geall and I. S. Blagbrough, "Rapid and sensitive ethidium bromide fluorescence quenching assay of polyamine conjugate-DNA interactions for the analysis of lipoplex formation in gene therapy," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 22, 2000, [Online]. Available: [www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)
- [135] J. Keizer, "Nonlinear Fluorescence Quenching and the Origin of Positive Curvature in Stern-Volmer Plots," *J Am Chem Soc*, vol. 105, pp. 1494–1498, 1983, [Online]. Available: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

- [136] D. P. Heller and C. L. Greenstock, "Biophysical Chemistry Fluorescence lifetime analysis of DNA intercalated ethidium bromide and quenching by free dye," *Biophys Chem*, vol. 50, pp. 305–312, 1994.
- [137] P. Balagurumoorthy, S. J. Adelstein, and A. I. Kassis, "Method to eliminate linear DNA from mixture containing nicked circular, supercoiled, and linear plasmid DNA," *Anal Biochem*, vol. 381, no. 1, pp. 172–174, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.ab.2008.06.037.
- [138] A. M. Pyle, J. P. Rehmann, R. Meshoyrer, C. V. Kumar, N. J. Turro, and J. K. Barton, "Mixed-Ligand Complexes of Ruthenium(II): Factors Governing Binding to DNA," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 111, pp. 3051–3058, 1989.
- [139] J. Sambrook and D. W. Russell, "Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride.," *CSH Protoc*, vol. 2006, no. 1, p. pdb-prot3932, 2006.
- [140] D. Serban, J. M. Benevides, and G. J. Thomas, "DNA secondary structure and Raman markers of supercoiling in *Escherichia coli* plasmid pUC19," *Biochemistry*, vol. 41, no. 3, pp. 847–853, Jan. 2002, doi: 10.1021/bi011004z.
- [141] L. C. Crowley, B. J. Marfell, A. P. Scott, and N. J. Waterhouse, "Triggering Apoptosis in Hematopoietic Cells with Cytotoxic Drugs," *Cold Spring Harb Protoc*, vol. 2016, no. 7, 2016.
- [142] N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, and A. L. Glasebrook, "An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT," *Journal of Immunological Methods*, vol. 142, pp. 257–265, 1991.
- [143] J. E. Vance, "Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells," *Traffic*, vol. 16, no. 1. Blackwell Munksgaard, pp. 1–18, Jan. 01, 2015. doi: 10.1111/tra.12230.
- [144] L. K. Cole, J. E. Vance, and D. E. Vance, "Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1821, no. 5. pp. 754–761, May 2012. doi: 10.1016/j.bbalip.2011.09.009.
- [145] J. Li *et al.*, "A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 2. Shenyang Pharmaceutical University, pp. 81–98, Apr. 01, 2015. doi: 10.1016/j.ajps.2014.09.004.
- [146] F. Szoka and D. Papahadjopoulos, "Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes).," *Annual review of biophysics and bioengineering*, vol. 9. pp. 467–508, 1980. doi: 10.1146/annurev.bb.09.060180.002343.
- [147] J. Jimah, P. Schlesinger, and N. Tolia, "Liposome Disruption Assay to Examine Lytic Properties of Biomolecules," *Bio Protoc*, vol. 7, no. 15, p. e2433, 2017, doi: 10.21769/bioprotoc.2433.
- [148] M. A. Halcrow, "Interpreting and controlling the structures of six-coordinate copper(II) centres - When is a compression really a compression?," *Dalton Transactions*, no. 23, pp. 4375–4384, 2003, doi: 10.1039/b309242a.

- [149] M. A. Halcrow, "Jahn–Teller distortions in transition metal compounds, and their importance in functional molecular and inorganic materials," *Chem Soc Rev*, vol. 42, no. 4, pp. 1784–1795, 2013, doi: 10.1039/c2cs35253b.
- [150] B. Z. Mascaliovas, F. R. G. Bergamini, A. Cuin, and P. P. Corbi, "Synthesis and crystal structure of a palladium(II) complex with the amino acid L-citrulline," *Powder Diffr*, vol. 30, no. 4, pp. 357–361, 2015, doi: 10.1017/S0885715615000652.
- [151] B. Jezowska-Trzebiatowska, K. Gerega, and A. Vogt, "Cobalt(II) complexes reversibly uptaking nitric oxide in aqueous solution," *Inorganica Chim Acta*, vol. 31, pp. 183–185, 1978, doi: 10.1016/S0020-1693(00)94998-3.
- [152] A. H. J. Mofidabadi, A. Dehghani, and B. Ramezanzadeh, "Investigating the effectiveness of Watermelon extract-zinc ions for steel alloy corrosion mitigation in sodium chloride solution," *J Mol Liq*, vol. 346, no. 117086, 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2021.117086.
- [153] A. Cuevas, I. Viera, M. H. Torre, E. Kremer, S. B. Etcheverry, and E. J. Baran, "Infrared spectra of the copper (II) complexes of amino acids with hydrophobic residues," *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 17, no. 3, pp. 213–218, 1998.
- [154] E. J. Baran, C. C. Wagner, M. H. Torre, E. Kremer, and P. Kögerler, "Vibrational Spectra of the Cu(II) Complexes of Aspartic and Glutamic Acids," *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 19, no. 3, pp. 231–234, 2000.
- [155] M. Reiher, G. Brehm, and S. Schneider, "Assignment of vibrational spectra of 1,10-phenanthroline by comparison with frequencies and Raman intensities from density functional calculations," *Journal of Physical Chemistry A*, vol. 108, no. 5, pp. 734–742, Feb. 2004, doi: 10.1021/jp0366116.
- [156] J. R. Ferraro and W. R. Walker, "Infrared Spectra of Hydroxy-Bridged Copper(II) Compounds," *Inorg Chem*, vol. 4, no. 10, pp. 1382–1386, 1965.
- [157] E. Castellucci, L. Angeloni, and G. Sbrana, "IR and Raman Spectra of a 2,2'-Bipyridine single crystal: Internal modes," *Chem Phys*, vol. 43, pp. 365–373, 1979.
- [158] H.-H. Perkampus and W. Rother, "Die Infrarot und Ramanspektren der Phenanthroline," *Spectrochimica Acta*, vol. 3, p. 610, 1974.
- [159] D. A. Thornton and G. M. Watkins, "A full vibrational assignment (4000-50 cm<sup>-1</sup>) of 1,10-phenanthroline and its perdeuterated analogue," *Spectrochimica Acta*, vol. 47, no. 8, pp. 1085–1096, 1991.
- [160] N. P. Pook, "Supramolecular Structure of Tris(1,10-phenanthroline)zinc(II)-Cation and N,N',N"-tris(carboxymethyl)-1,3,5-benzenetricarboxamide-Anion: Synthesis, Crystal Structure, Vibrational Spectra, and Theoretical Investigations," *Crystals (Basel)*, vol. 13, no. 4, Apr. 2023, doi: 10.3390/cryst13040569.
- [161] N. M. N. Gowda, S. B. Naikar, and G. K. N. Reddy, *Perchlorate Ion Complexes*, vol. 28. Academic Press, 1984.

- [162] B. J. Hathaway, "A new look at the stereochemistry and electronic properties of complexes of the copper(II) ion," in *Complex Chemistry. Structure and Bonding*, Springer, Berlin, Heidelberg, 1984, pp. 55–118. doi: 10.1007/BFB0111454.
- [163] A. Stanila, A. Marcu, D. Rusu, M. Rusu, and L. David, "Spectroscopic studies of some copper(II) complexes with amino acids," *J Mol Struct*, vol. 834, pp. 364–368, May 2007, doi: 10.1016/J.MOLSTRUC.2006.11.048.
- [164] S. L. Reddy, T. Endo, and G. S. Reddy, "Electronic (Absorption) Spectra of 3d Transition Metal Complexes," in *Advanced Aspects of Spectroscopy*, M. A. Farrukh, Ed., London, UK: IntechOpen, 2012, pp. 3–48. doi: 10.5772/50128.
- [165] A. Wojciechowska *et al.*, "L-argininato copper(II) complexes in solution exert significant selective anticancer and antimicrobial activities," *Appl Organomet Chem*, vol. 34, no. e5698, 2020, doi: 10.1002/AOC.5698.
- [166] G. Sciortino, J.-D. Maréchal, I. Fábíán, N. Lihi, and E. Garribba, "Quantitative prediction of electronic absorption spectra of copper(II)–bioligand systems: Validation and applications," *J Inorg Biochem*, vol. 204, no. 110953, 2020, doi: 10.1016/J.JINORGBIO.2019.110953.
- [167] A. L. Jenkins, R. A. Larsen, and T. B. Williams, "Characterization of amino acids using Raman spectroscopy," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 61, no. 7, pp. 1585–1594, 2005, doi: 10.1016/J.SAA.2004.11.055.
- [168] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, Sixth Edit. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons, 2009. doi: 10.1002/9780470405840.
- [169] V. G. Sreevalsa and S. Jayalekshmi, "Investigations on the growth and characterization of L-citrulline oxalate monohydrate single crystal," *J Cryst Growth*, vol. 324, no. 1, pp. 172–176, 2011, doi: 10.1016/J.JCRYSGRO.2011.03.017.
- [170] P. T. C. Freire, F. M. Barboza, J. A. Lima, F. E. A. Melo, and J. M. Filho, "Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals," in *Raman Spectroscopy and Applications*, M. Khan, Ed., London, UK: IntechOpen, 2017, pp. 201–223. doi: 10.5772/65480.
- [171] L. E. Fernández, G. E. Delgado, L. V. Maturano, R. M. Tótaró, and E. L. Varetti, "Experimental and theoretical vibrational study of N-carbamoyl-L-proline," *J Mol Struct*, vol. 1168, pp. 84–91, 2018, doi: 10.1016/j.molstruc.2018.05.006.
- [172] F. Zapata and C. García-Ruiz, "The discrimination of 72 nitrate, chlorate and perchlorate salts using IR and Raman spectroscopy," *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 189, pp. 535–542, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.saa.2017.08.058.
- [173] R. E. Wilde and T. K. K. Srinivasan, "Far-infrared and Raman studies of mono complexes of 2, 2'-bipyridine and 1, 10-phenanthroline," *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*, vol. 36, no. 2, pp. 323–328, 1974.

- [174] D. Vusak, J. Pejic, M. Jurkovic, G. Szalontai, and J. Sabolovic, "Coordination polymers of paramagnetic bis(leucinato)copper(ii) diastereomers: Experimental and computational study of the stereoisomerism and conformations," *CrystEngComm*, vol. 22, no. 34, pp. 5587–5600, 2020, doi: 10.1039/d0ce00585a.
- [175] J. Mao, Y. Zhang, and E. Oldfield, "Nuclear magnetic resonance shifts in paramagnetic metalloporphyrins and metalloproteins," *J Am Chem Soc*, vol. 124, no. 46, pp. 13911–13920, Nov. 2002, doi: 10.1021/JA020297W/ASSET/IMAGES/LARGE/JA020297WF00010.JPEG.
- [176] B. H. Patil *et al.*, "Experimental <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Solid-State NMR Signal Assignment of Paramagnetic Copper (II) 2-Pyrazine-Carboxylate Complex using Density Functional Theory Calculations," *J Phys Conf Ser*, vol. 1819, no. 012032, 2021, doi: 10.1088/1742-6596/1819/1/012032.
- [177] S. M. G. Leite *et al.*, "Copper(II) complexes of phenanthroline and histidine containing ligands: Synthesis, characterization and evaluation of their DNA cleavage and cytotoxic activity," *Inorg Chem*, vol. 55, no. 22, pp. 11801–11814, Nov. 2016, doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b01884.
- [178] Y. Figueroa-DePaz *et al.*, "DNA, a target of mixed chelate copper(II) compounds (Casiopeinas®) studied by electrophoresis, UV–vis and circular dichroism techniques.," *J Inorg Biochem*, vol. 231, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111772.
- [179] B. J. M. L. Ferreira *et al.*, "Synthesis, structural characterization, cytotoxic properties and DNA binding of a dinuclear copper(II) complex," *J Inorg Biochem*, vol. 161, pp. 9–17, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.026.
- [180] J. Lu *et al.*, "Two water-soluble copper(II) complexes: Synthesis, characterization, DNA cleavage, protein binding activities and *in vitro* anticancer activity studies," *J Inorg Biochem*, vol. 137, pp. 46–56, 2014, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2014.03.015.
- [181] S. Mathur and S. Tabassum, "New homodi- and heterotrinnuclear metal complexes of Schiff base compartmental ligand: Interaction studies of copper complexes with calf thymus DNA," *Central European Journal of Chemistry*, vol. 4, no. 3, pp. 502–522, Sep. 2006, doi: 10.2478/s11532-006-0020-6.
- [182] P. Kumar, B. Baidya, S. K. Chaturvedi, R. H. Khan, D. Manna, and B. Mondal, "DNA binding and nuclease activity of copper(II) complexes of tridentate ligands," *Inorganica Chim Acta*, vol. 376, no. 1, pp. 264–270, Oct. 2011, doi: 10.1016/j.ica.2011.06.022.
- [183] Y. Ni, D. Lin, and S. Kokot, "Synchronous fluorescence, UV-visible spectrophotometric, and voltammetric studies of the competitive interaction of bis(1,10-phenanthroline)copper(II) complex and neutral red with DNA," *Anal Biochem*, vol. 352, no. 2, pp. 231–242, May 2006, doi: 10.1016/j.ab.2006.02.031.

- [184] G. Y. Li, R. L. Guan, L. N. Ji, and H. Chao, "DNA condensation induced by metal complexes," *Coord Chem Rev*, vol. 281, pp. 100–113, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.09.005.
- [185] S. Rajalakshmi, M. S. Kiran, and B. U. Nair, "DNA condensation by copper(II) complexes and their anti-proliferative effect on cancerous and normal fibroblast cells," *Eur J Med Chem*, vol. 80, pp. 393–406, Jun. 2014, doi: 10.1016/j.ejmech.2014.04.064.
- [186] V. A. Bloomfield, "DNA condensation," *Curr Opin Struct Biol*, vol. 6, no. 3, pp. 334–341, 1996.
- [187] T. Srdić-Rajić, M. Zec, T. Todorović, K. Anelković, and S. Radulović, "Non-substituted N-heteroaromatic selenosemicarbazone metal complexes induce apoptosis in cancer cells via activation of mitochondrial pathway," *Eur J Med Chem*, vol. 46, no. 9, pp. 3734–3747, Sep. 2011, doi: 10.1016/j.ejmech.2011.05.039.
- [188] J. L. Qin *et al.*, "Oxoaporphine Metal Complexes (CoII, NiII, ZnII) with High Antitumor Activity by Inducing Mitochondria-Mediated Apoptosis and S-phase Arrest in HepG2," *Sci Rep*, vol. 7, 2017, doi: 10.1038/srep46056.

## 5. ANEXOS

### Anexo I. Datos cristalográficos de los complejos

Datos cristalográficos del complejo [Cu(D-Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	
[Cu(D-Citr) <sub>2</sub> ] <sub>n</sub>	
Chemical formula	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>6</sub>
Formula weight (g mol <sup>-1</sup> )	411.91
CCDC	2172421
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub>
Temperature (K)	300.7
a, b, c (Å)	5.1270 (2), 9.2086 (4), 17.1099 (7)
β (°)	93.972 (2)
V (Å <sup>3</sup> )	805.86 (6)
Z	2
Radiation type	Cu Kα (1.54178 Å)
ρ <sub>calcd</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.698
μ (mm <sup>-1</sup> )	2.339
Crystal size (mm)	0.12 × 0.1 × 0.1
GoF on F <sup>2</sup>	1.147
R <sub>1</sub> [I > 2σ(I)]	0.0497
R <sub>1</sub> [all data]	0.0512
wR <sub>2</sub> [I > 2σ(I)]	0.1469
wR <sub>2</sub> [all data]	0.1520

### Datos cristalográficos del complejo [Cu(Bipy)(D,L-Citr)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)]·H<sub>2</sub>O

[Cu(Bipy)(Citr)(H <sub>2</sub> O)(NO <sub>3</sub> )]·H <sub>2</sub> O	
Chemical formula	C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>8</sub>
Formula weight (g mol <sup>-1</sup> )	491.95
CCDC	xxxxx
Crystal system	Triclinic
Space group	<i>P</i> -1
Temperature (K)	293(2)
a, b, c (Å)	7.2136(3), 12.2497(6), 14.1356(6)
β (°)	65.430(4), 77.331(3), 82.046(3)
V (Å <sup>3</sup> )	1106.75(9)
Z	2
Radiation type	Mo Kα (λ = 0.71073 Å)
ρ <sub>calcd</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.476
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.040
Crystal size (mm)	0.32 × 0.25 × 0.20
GoF on F <sup>2</sup>	1.054
R <sub>1</sub> [I > 2σ(I)]	0.0484
R <sub>1</sub> [all data]	0.0624
wR <sub>2</sub> [I > 2σ(I)]	0.1211
wR <sub>2</sub> [all data]	0.1295

**Datos cristalográficos del complejo [Cu(Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>)**

<b>[Cu(Citr)(Bipy)](NO<sub>3</sub>)</b>	
Chemical formula	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>6</sub>
Formula weight (g mol <sup>-1</sup> )	455.92
CCDC	xxxxx
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P2<sub>1</sub></i>
Temperature (K)	293(2)
a, b, c (Å)	5.5351 (2), 9.1078 (4), 18.6095 (7)
β (°)	92.878(4)
V (Å <sup>3</sup> )	936.97(7)
Z	2
Radiation type	Mo Kα (λ = 0.71073 Å)
ρ <sub>calcd</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	1.616
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.21
Crystal size (mm)	0.49 x 0.23 x 0.07
GoF on F <sup>2</sup>	1.05
R <sub>1</sub> [I > 2σ(I)]	0.037
R <sub>1</sub> [all data]	-
wR <sub>2</sub> [I > 2σ(I)]	0.075
wR <sub>2</sub> [all data]	-

**Datos cristalográficos del complejo [Cu(Phen)(Citr)](NO<sub>3</sub>)**

<b>[Cu(Phen)(Citr)](NO<sub>3</sub>)</b>	
Chemical formula	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> CuN <sub>6</sub> O <sub>6</sub>
Formula weight (g mol <sup>-1</sup> )	479.93
CCDC	xxxxx
Crystal system	Triclinic
Space group	<i>P-1</i>
Temperature (K)	293
a, b, c (Å)	9.1457 (3), 9.3332 (3), 12.2393 (4)
β (°)	93.905 (1), 94.021 (1), 110.278 (1)
V (Å <sup>3</sup> )	972.79(6)
Z	1
Radiation type	Mo Kα (λ = 0.71073 Å)
ρ <sub>calcd</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	-
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.17
Crystal size (mm)	-
GoF on F <sup>2</sup>	1.11
R <sub>1</sub> [I > 2σ(I)]	0.024
R <sub>1</sub> [all data]	-
wR <sub>2</sub> [I > 2σ(I)]	0.061
wR <sub>2</sub> [all data]	-

**Datos cristalográficos del complejo [Cu(Phen)(D,L-Citr)](ClO<sub>4</sub>)**

<b>[Cu(Phen)(D,L-Citr)](ClO<sub>4</sub>)</b>	
Chemical formula	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> CuN <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Cl
Formula weight (g mol <sup>-1</sup> )	517.37
CCDC	xxxxx
Crystal system	Monoclinic
Space group	<i>P2<sub>1</sub>/c</i>
Temperature (K)	293
a, b, c (Å)	13.43407(15), 17.2377(3), 18.0815(2)
β (°)	97.8539(11)
V (Å <sup>3</sup> )	4147.90(9)
Z	8
Radiation type	Mo Kα (λ = 0.71073 Å)
ρ <sub>calcd</sub> (g cm <sup>-3</sup> )	-
μ (mm <sup>-1</sup> )	1.24
Crystal size (mm)	0.49 × 0.30 × 0.28
GoF on F <sup>2</sup>	1.16
R <sub>1</sub> [I > 2σ(I)]	0.069
R <sub>1</sub> [all data]	-
wR <sub>2</sub> [I > 2σ(I)]	0.197
wR <sub>2</sub> [all data]	-

Article

## Bis-Citrullinato Copper(II) Complex: Synthesis, Crystal Structure, and Non-Covalent Interactions

Diego Ramírez-Contreras <sup>1</sup>, Amalia García-García <sup>1,2</sup>, Brenda L. Sánchez-Gaytán <sup>1</sup>,  
 Laura E. Serrano-de la Rosa <sup>3</sup>, Francisco J. Melendez <sup>4</sup>, Duane Choquesillo-Lazarte <sup>5</sup>,  
 Antonio Rodríguez-Diéguez <sup>2</sup>, María Eugenia Castro <sup>1,\*</sup> and Enrique González-Vergara <sup>1,\*</sup>

- <sup>1</sup> Centro de Química del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 18 sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, Mexico
- <sup>2</sup> Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Av. Fuentenueva S/N, 18071 Granada, Spain
- <sup>3</sup> Laboratorio Central del Instituto de Física "Luis Rivera Terrazas" (IFUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 18 sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, Mexico
- <sup>4</sup> Lab. de Química Teórica, Centro de Investigación, Depto. de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 22 sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, Mexico
- <sup>5</sup> Laboratorio de Estudios Cristalográficos, IACT, CSIC-UGR, Av. Las Palmeras nº4, 18100 Granada, Spain
- \* Correspondence: mareug.castro@correo.buap.mx (M.E.C.); enrique.gonzalez@correo.buap.mx (E.G.-V.); Tel: +52-222-363-0623 (E.G.-V.)



**Citation:** Ramírez-Contreras, D.; García-García, A.; Sánchez-Gaytán, B.L.; Serrano-de la Rosa, L.E.; Melendez, F.J.; Choquesillo-Lazarte, D.; Rodríguez-Diéguez, A.; Castro, M.E.; González-Vergara, E. Bis-Citrullinato Copper(II) Complex: Synthesis, Crystal Structure, and Non-Covalent Interactions. *Crystals* **2022**, *12*, 1386. <https://doi.org/10.3390/cryst12101386>

Received: 6 September 2022

Accepted: 26 September 2022

Published: 29 September 2022

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



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

**Abstract:** Citrulline (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) is a non-protein amino acid found in watermelon. In physiological conditions, it is almost entirely present as a zwitterion, so its carboxylic and amine groups can act as Lewis donors, chelating metallic cations. In addition, Citrulline possesses a terminal ureide group of the aliphatic chain, which appears to be non-innocent. Although Citrulline is similar to other classical amino acids, only one coordination complex has been reported in the Cambridge Crystallographic Database. As part of our search for Casiopeina<sup>®</sup> analogs, we synthesized and characterized the copper bis-citrullinato complex, [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub>. The compound was described using UV-Vis, Infrared, and Raman spectroscopy, together with single-crystal X-ray diffraction. Computational tools were also used. The optimized structure, MEP map, IR and Raman spectra, and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts were obtained with functional mPW1PW91 using 6-31G(d) basis set for N, O, C, and H atoms, and LANL2DZ basis set and ECP=LANL2DZ for the Cu atom. TD-mPW1PW91 calculations generated the UV-Vis spectrum. Finally, AIM and Hirshfeld surface analysis were used to examine non-covalent interactions. Previous investigations suggest Casiopeina<sup>®</sup>-like complexes can interact with DNA/RNA, creating potential anticancer chemicals. The [Cu(Citr)<sub>2</sub>]<sub>n</sub> complex's polymeric nature and insolubility make it difficult for such purposes. However, the facile synthesis of D-Citrulline could be a novel way to find new applications for this interesting amino acid.

**Keywords:** Citrulline; copper; DFT calculations; Hirshfeld surface analysis; non-covalent interactions

### 1. Introduction

The discovery of Citrulline that we know today has been traditionally attributed to Mitsunori Wada in 1930, who separated and determined its chemical formula from the watermelon juice *Citrullus vulgaris* [1]. However, it was first isolated in 1914 by Yotaro Koga and Ryo Ohtake, although they did not describe its structure, nor did they name it [2]. Today, we know that L-Citrulline is also present in other foods, such as cucumbers, pumpkins, melons, squashes, and gourds [3].

L-Citrulline (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) is not involved in protein formation since it is a non-essential amino acid. The body produces it endogenously, predominantly in the intestine [4,5], by biosynthesis from principally L-glutamine, L-arginine, and proline. During the urea cycle,

Article

# D,L-Citrullinato-bipyridine Copper Complex: Experimental and Theoretical Characterization

Diego Ramírez-Contreras <sup>1</sup>, Amalia García-García <sup>1,2</sup>, Angel Mendoza <sup>1</sup>, Laura E. Serrano-de la Rosa <sup>3</sup>, Brenda L. Sánchez-Gaytán <sup>1</sup>, Francisco J. Melendez <sup>4</sup>, María Eugenia Castro <sup>1,\*</sup> and Enrique González-Vergara <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Centro de Química del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 18 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, Mexico; angel.mendoza@correo.buap.mx (A.M.)

<sup>2</sup> Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Av. Fuente Nueva s/n, 18003 Granada, Spain

<sup>3</sup> Laboratorio Central del Instituto de Física "Luis Rivera Terrazas" (IFUAP), Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 18 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, Mexico

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, 18 Sur y Av. San Claudio, Col. San Manuel, Puebla 72570, Mexico

\* Correspondence: mareug.castro@correo.buap.mx (M.E.C.); enrique.gonzalez@correo.buap.mx (E.G.-V); Tel.: +52-222-363-0623 (E.G.-V.)



**Citation:** Ramírez-Contreras, D.; García-García, A.; Mendoza, A.; Serrano-de la Rosa, L.E.; Sánchez-Gaytán, B.L.; Melendez, F.J.; Castro, M.E.; González-Vergara, E. D,L-Citrullinato-bipyridine Copper Complex: Experimental and Theoretical Characterization. *Crystals* **2023**, *13*, 1391. <https://doi.org/10.3390/cryst13091391>

Academic Editor: Vladimir P. Fedin

Received: 31 August 2023

Revised: 15 September 2023

Accepted: 15 September 2023

Published: 19 September 2023



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Citrulline is a non-protein amino acid that acts as a metabolic intermediate in the urea cycle and arginine synthesis. It is present in some foods, although its name derives from watermelon (*Citrullus vulgaris*), from which it was first identified. Under normal conditions, Citrulline exists as a zwitterion in aqueous solutions since its carboxylic and amine groups can act as Lewis donors to chelate metal cations. In addition, Citrulline possesses in the aliphatic chain a terminal ureide group, which could also coordinate. Although Citrulline is comparable to other classical amino acids, its coordination chemistry has yet to be explored. Only two metal complexes have been reported, and the copper complex is a polymeric and insoluble material. As part of our search for active Casiopeina<sup>®</sup> analogs, we created a more soluble complex by combining 2,2'-Bipyridine into a new mixed material, resulting in the mononuclear complex [Cu(Bipy)(Citr)(H<sub>2</sub>O)(NO<sub>3</sub>)]·H<sub>2</sub>O. Single-crystal X-ray diffraction, spectroscopic methods (FT-IR, UV-Vis, Raman), and mass spectrometry characterized the material. Interestingly, both isomers of Citrulline, R(D), and S(L) are present in the same crystal. In addition, the molecular structure and electronic properties of the complex were calculated using density functional theory (DFT). Non-covalent interactions were characterized using the atoms-in-molecules (AIM) approach and Hirshfeld surface (HS) analysis. This ternary complex containing Citrulline and 2,2'-Bipyridine will be used for docking calculations and preliminary biological studies using calf thymus DNA (CT-DNA) and plasmid pUC19 as a first approximation to cytotoxic activity against cancer cell lines.

**Keywords:** citrulline; 2,2'-Bipyridine; copper complex; DFT; AIM; Hirshfeld surface

## 1. Introduction

Citrulline (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>) is a non-essential amino acid involved in the body's urea cycle and arginine synthesis [1]. It is a molecule abundant in certain foods, such as watermelon, the fruit from which its name, *Citrullus*, is derived [2]. Wada discovered it in 1914 thanks to synthesizing its complex with copper(II) [3]. This was obtained by reacting watermelon juice with a copper(II) salt, resulting in a deep blue precipitate that was insoluble in neutral to basic solutions [4]. The Citrulline complexes have been well-known for a long time, but they have generated little interest because most researchers have described them as "difficult to crystallize". However, this amino acid has recently garnered considerable interest due to its potential medicinal properties since it improves blood flow and reduces blood pressure; it is used for athletic performance, sickle cell disease, erectile dysfunction,