

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
CATÓLICA DEL PERÚ**  
**Escuela de posgrado**



Análisis y determinación de las propiedades  
farmacológicas de una serie de complejos de cobre (Cu)  
con potencial para ser agentes de radiodiagnóstico del  
Alzheimer

Tesis para obtener el grado académico de Maestra en Química que  
presenta:

*Silvia Rosy Valderrama Núñez*

Asesora:

*Paloma Friedda Salas Fernández*

Lima, 2024


## Informe de Similitud

Yo, Paloma Friedda Salas Fernández, docente de la Escuela de Posgrado de la Pontificia Universidad Católica del Perú, asesor(a) de la tesis/el trabajo de investigación titulado, *Análisis y determinación de las propiedades farmacológicas de una serie de complejos de cobre (Cu) con potencial para ser agentes de radiodiagnóstico del Alzheimer* de la autora *Silvia Rosy Valderrama Núñez* dejo constancia de lo siguiente:

- El mencionado documento tiene un índice de puntuación de similitud de 17%. Así lo consigna el reporte de similitud emitido por el software *Turnitin* el 12/12/2023.
- He revisado con detalle dicho reporte y la Tesis o Trabajo de Suficiencia Profesional, y no se advierte indicios de plagio.
- Las citas a otros autores y sus respectivas referencias cumplen con las pautas académicas.

Lugar y fecha:

Lima, 12 de diciembre de 2023

Apellidos y nombres del asesor / de la asesora: <u>Salas Fernández, Paloma Friedda</u>	
DNI: 41656539	Firma 
ORCID: 0000-0002-3410-5885	



*Este trabajo va dedicado para mi querida madre*

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda mi familia, que ha estado siempre pendiente de cada paso que doy y alentarme a seguir en este camino. A mi hermano Andy y mi sobrina Valentina, por cada ocurrencia y risas que nunca están de más.

A una de las personas más importantes de mi vida, Christian, por siempre apoyarme, ayudar a levantarme y darme aliento en este camino tan importante y exigente. Además, que las grandes personas son la suma de grandes vivencias, y eso lo conseguí contigo.

A mi asesora la Dra. Paloma Salas por confiar en mí durante esta etapa. Es para mí más que una asesora, una gran amiga y consejera que valiosamente he ganado. Muchas gracias por todos sus consejos, apoyo, entusiasmo y valiosa ayuda para realizar este trabajo.

A Diego Córdova, por ser un gran compañero y amigo. Fuimos compañeros durante el pregrado y maestría, así como también fuimos parte de este proyecto de investigación. Gracias también por confiarme tus complejos para poder realizar el presente trabajo de investigación

A Deborah Gonzales y Diego Uehara por realizar la síntesis de los compuestos que analicé en el presente trabajo de investigación.

A David Grados, por acompañarme en esta última etapa de elaboración de los experimentos, principalmente en la replicación de la síntesis de algunos complejos, además de ser una excelente compañía en el laboratorio. ¡Y vaya que las buenas experiencias no faltaron!

A Eliana Esparza y Esteban Ramos, quienes muy gentilmente me apoyaron en diversos experimentos a lo largo de este proyecto de investigación.

Al Dr. Yves Coello, que me proporcionó la incubadora marca ThermoFischer, que fue de gran ayuda en este presente trabajo de investigación.

Al Vicerrectorado de Investigación de la PUCP por el financiamiento otorgado al proyecto CAP 2019-745 y al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) por el financiamiento otorgado al proyecto PROCENCIA No.421-2019 bajo los cuales se completó este trabajo de tesis.

## **RESUMEN**

El diagnóstico definitivo del Alzheimer se realiza mediante estudios *post mortem* de cerebros de pacientes, no obstante, en los últimos años ha sido posible aplicar técnicas como la tomografía de emisión de positrones (PET) para realizar imágenes de radiodiagnóstico de esta enfermedad. Esta técnica en particular emplea radioisótopos como el carbono-11 y flúor-18; sin embargo, el corto tiempo de vida media de estos limita en gran medida su uso. Debido a ello, se propone usar cobre-64 como radioisótopo emisor de positrones, pues posee un tiempo de vida media más prolongado, además de que es un metal amigable con las funciones biológicas del cuerpo humano.

El objetivo del presente trabajo de investigación ha sido analizar y determinar las propiedades farmacológicas de una serie de complejos de cobre (II) con potencial para ser agentes de radiodiagnóstico del Alzheimer por PET. Se propuso analizar cualitativamente el perfil de estabilidad cinética y termodinámica de complejos de cobre previamente sintetizados en nuestro grupo de investigación, como etapa previa a su radiomarcado y posible uso como agente de imagen PET. Para estos análisis se utilizaron técnicas rutinarias y de relativo alcance como la espectroscopía UV – Vis, que permite, entre otros análisis, el uso de ligandos de competencia presentes en mayor medida en el cuerpo, en comparación con los complejos estudiados.

Así, se estudió la estabilidad termodinámica y cinética de una serie de complejos de cobre (II) derivatizados con grupos afines a las placas amiloides, dentro de los cuales destacan los complejos derivados de resveratrol y algunos complejos funcionalizados a partir de benzotiazoles, pues son los que demostraron ser los más estables dentro de los análisis realizados. Los complejos restantes o bien no pudieron ser analizados debido a que presentaban problemas de solubilidad en el medio o demostraron tener reducida estabilidad al disociarse en metal y ligando durante los análisis realizados.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN .....</b>	<b>I</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. DEFINICIÓN E INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. INICIOS Y NEURODEGENERACIÓN CRÓNICA POSTERIOR.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. PRIMEROS HALLAZGOS Y FISIOPATOLOGÍA DEL ALZHEIMER.....</b>	<b>5</b>
2.3.1. <i>Fisiopatología de la enfermedad.....</i>	<i>6</i>
2.3.2. <i>Hipótesis de la cascada amiloide.....</i>	<i>8</i>
<b>2.4. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO .....</b>	<b>9</b>
2.4.1. <i>Diagnóstico por PET usando radiofármacos .....</i>	<i>10</i>
2.4.2. <i>Diseño y características de un radiofármaco.....</i>	<i>11</i>
2.4.3. <i>Evaluación y propiedades farmacológicas de un radiofármaco .....</i>	<i>14</i>
2.4.4. <i>Complejos de cobre (II) como pro-radiofármacos para la detección del Alzheimer 16</i>	
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>21</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>22</b>
<b>4.1. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS .....</b>	<b>22</b>
4.1.1. <i>EQUIPOS Y MATERIALES .....</i>	<i>22</i>
4.1.2. <i>SOLVENTES Y REACTIVOS.....</i>	<i>22</i>
<b>4.2. METODOLOGÍA .....</b>	<b>23</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>5.1. ESTABILIDAD TERMODINÁMICA .....</b>	<b>28</b>
5.1.1. <i>Estabilidad a pH fisiológico .....</i>	<i>28</i>
5.1.2. <i>Estabilidad dentro de un rango de pH .....</i>	<i>37</i>

5.2.	<i>ESTABILIDAD CINÉTICA</i> .....	43
6.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	58
7.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	59
8.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	60
9.	<b>ANEXOS</b> .....	65



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> IMÁGENES DE RESONANCIA MAGNÉTICA DE UN CEREBRO DE UN PACIENTE SANO (A-C) Y DE UN CEREBRO DE UN PACIENTE CON LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER EN ESTADO AVANZADO (D-F).....	5
<b>FIGURA 2.</b> CARACTERÍSTICAS FISIOPATOLÓGICAS DEL ALZHEIMER DESCRITAS ORIGINALMENTE POR (A) ALOIS ALZHEIMER. ESTE DESCUBRIÓ (B) PLACAS EXTRACELULARES, A LAS QUE LLAMÓ PLACAS SENILES Y (C) OVILLOS NEUROFIBRILARES EN LA PARTE EXTERNA DE LAS NEURONAS. ....	6
<b>FIGURA 3.</b> PROCESAMIENTO PROTEOLÍTICO DE RUPTURA DE LA PROTEÍNA APP MEDIANTE LAS SECRETASAS $\alpha$ , $\beta$ Y $\gamma$ .....	7
<b>FIGURA 4.</b> ESQUEMA DE LA CASCADA AMILOIDE .....	8
<b>FIGURA 5.</b> ESQUEMA DE PROCESAMIENTO Y OBTENCIÓN DE IMÁGENES POR PET USANDO UN RADIOMARCADOR.....	11
<b>FIGURA 6.</b> REPRESENTACIÓN DEL DISEÑO DE UN RADIOFÁRMACO PARA ANÁLISIS POR PET Y SU INTERACCIÓN CON LA MOLÉCULA OBJETIVO .....	12
<b>FIGURA 7.</b> ESTRUCTURAS DE LOS RADIOFÁRMACOS REPRESENTATIVOS EN LA DETECCIÓN DE ALZHEIMER.....	14
<b>FIGURA 8.</b> RUTA DEL DESARROLLO DE UN RADIOFÁRMACO .....	16
<b>FIGURA 9.</b> COMPLEJO DE COBRE DERIVATIZADO DE CU(II)-ATSM FUNCIONALIZADO CON EL GRUPO ESTILBENO, DISEÑADO PARA LA VISUALIZACIÓN DE FIBRILLAS $A\beta$ <sup>31</sup> .....	17
<b>FIGURA 10.</b> IMÁGENES POR MICROSCOPIA FLUORESCENTE DEL CEREBRO CON AD. (IZQUIERDA) TEJIDO CEREBRAL TRATADO CON EL ANTICUERPO 1E8; (DERECHA) TEJIDO CEREBRAL TRATADO CON EL COMPLEJO CU-ATSM FUNCIONALIZADO .	18
<b>FIGURA 11.</b> ESQUEMA DE LAS ESTRUCTURAS SINTETIZADAS CON LA FINALIDAD DE SER AGENTES DE RADIODIAGNÓSTICO DE ALZHEIMER .....	18
<b>FIGURA 12.</b> A) ESQUEMATIZACIÓN DE LA ESTRUCTURA CUATERNARIA DE LAS FIBRILLAS $A\beta_{1-42}$ . B) MODELO ATÓMICO Y DE DENSIDAD ELECTRÓNICA OBTENIDO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA SECCIÓN TRANSVERSAL DE LAS FIBRILLAS $A\beta$ . ....	19
<b>FIGURA 13.</b> ESQUEMATIZACIÓN DE LA UNIÓN DE COBRE (II) CON LOS RESTOS DE AMINOÁCIDOS DE LAS FIBRILLAS $A\beta$ <sup>1</sup> .....	20



<b>FIGURA 14.</b> COMPLEJOS DE COBRE (II) ESTUDIADOS EN EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN .....	25
<b>FIGURA 15.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>1</sub> – A A PH FISIOLÓGICO .....	29
<b>FIGURA 16.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>2</sub> – A A PH FISIOLÓGICO .....	30
<b>FIGURA 17.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>8</sub> – C A PH FISIOLÓGICO.....	33
<b>FIGURA 18.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>10</sub> – C A PH FISIOLÓGICO.....	33
<b>FIGURA 19.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>12</sub> – D A PH FISIOLÓGICO.....	36
<b>FIGURA 20.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>13</sub> – D A PH FISIOLÓGICO.....	37
<b>FIGURA 21.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>1</sub> - A EN UN RANGO DE PH DESDE 2.96 HASTA 12.....	38
<b>FIGURA 22.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>1</sub> – A A PH 2.96 Y EL LIGANDO L1 – A LIBRE .....	39
<b>FIGURA 23.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>2</sub> - A EN UN RANGO DE PH DESDE 2.10 HASTA 12.....	40
<b>FIGURA 24.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>6</sub> – C EN UN RANGO DE PH ENTRE 2.18 Y 11.98 .....	41
<b>FIGURA 25.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>12</sub> - D EN UN RANGO DE PH DE 1.92 A 11.98 .....	42
<b>FIGURA 26.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>1</sub> – A EN PRESENCIA DE CISTEÍNA DURANTE LAS PRIMERAS 24 H DE ANÁLISIS.....	46
<b>FIGURA 27.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>2</sub> - A EN PRESENCIA DE CISTEÍNA EN UNA VENTANA DE 24 HORAS .....	47
<b>FIGURA 28.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>6</sub> – C EN PRESENCIA DE CISTEÍNA DURANTE LAS PRIMERAS 24 H DE ANÁLISIS.....	48
<b>FIGURA 29.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>8</sub> – C EN PRESENCIA DE CISTEÍNA DURANTE LAS PRIMERAS 24 H DE ANÁLISIS.....	48
<b>FIGURA 30.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>12</sub> – D EN PRESENCIA DE CISTEÍNA DURANTE LAS PRIMERAS 24 H DE ANÁLISIS.....	50
<b>FIGURA 31.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>13</sub> – D EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A CISTEÍNA .....	50
<b>FIGURA 32.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>2</sub> - A EN PRESENCIA DE HISTIDINA EN UNA VENTANA DE 24 HORAS .....	52

<b>FIGURA 33.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>6</sub> - C EN PRESENCIA DE HISTIDINA EN UNA VENTANA DE 24 HORAS .....	53
<b>FIGURA 34.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>13</sub> – D EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	54
<b>FIGURA 35.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>13</sub> – D EN PRESENCIA DE CISTEÍNA E HISTIDINA EN CONDICIONES INICIALES (0 HORAS) Y AL LÍMITE DE ESTABILIDAD (5 HORAS PARA HISTIDINA Y 6 HORAS PARA CISTEÍNA) .....	55



## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>TABLA 1.</b> PRINCIPALES RADIOFÁRMACOS USADOS EN LA DETECCIÓN DE DISTINTAS ALTERACIONES PARA EL DIAGNÓSTICO TEMPRANO DE ALZHEIMER.....	13
<b>TABLA 2.</b> SOLUBILIDAD EN DMSO DE LOS COMPLEJOS DEL GRUPO C Y D.....	32
<b>TABLA 3.</b> RESUMEN DE LOS COLORES DE LOS COMPLEJOS Y LAS BANDAS DE ABSORCIÓN A LA QUE SE LE ATRIBUYE DICHO COLOR .....	35
<b>TABLA 4.</b> RANGO DE PH DONDE LOS COMPLEJOS SE MANTIENEN ESTABLES EN SOLUCIÓN ACUOSA.....	43
<b>TABLA 5.</b> INFORMACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD CINÉTICA .....	44
<b>TABLA 6.</b> CONDICIONES DE ANÁLISIS DE LOS COMPLEJOS ESTUDIADOS .....	45
<b>TABLA 7.</b> RESUMEN DE EL INTERVALO EN EL QUE LOS COMPLEJOS ESTUDIADOS SE MANTIENEN ESTABLES EN PRESENCIA DE CISTEÍNA .....	51
<b>TABLA 8.</b> RESUMEN DE EL INTERVALO EN EL QUE LOS COMPLEJOS ESTUDIADOS SE MANTIENEN ESTABLES EN PRESENCIA DE HISTIDINA.....	54
<b>TABLA 9.</b> RESUMEN GENERAL DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LOS COMPLEJOS .	56

## ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>6</sub> – C A PH FISIOLÓGICO .....	65
<b>ANEXO 2.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>9</sub> – C A PH FISIOLÓGICO .....	65
<b>ANEXO 3.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>11</sub> – C A PH FISIOLÓGICO.....	66
<b>ANEXO 4.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>8</sub> – C EN UN RANGO DE PH DESDE 2 HASTA 12 .....	66
<b>ANEXO 5.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>9</sub> – C EN UN RANGO DE PH DESDE 2 HASTA 12.....	67
<b>ANEXO 6.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>11</sub> – C EN UN RANGO DE PH DESDE 2 HASTA 12 .....	67
<b>ANEXO 7.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>13</sub> – C EN UN RANGO DE PH DESDE 2 HASTA 12 .....	68
<b>ANEXO 8.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>9</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A CISTEÍNA .....	68
<b>ANEXO 9.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>10</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A CISTEÍNA .....	69
<b>ANEXO 10.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>11</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A CISTEÍNA .....	69
<b>ANEXO 11.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>1</sub> - A EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	70
<b>ANEXO 12.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>8</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	70
<b>ANEXO 13.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>9</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	71
<b>ANEXO 14.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>10</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	71
<b>ANEXO 15.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>11</sub> – C EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	72
<b>ANEXO 16.</b> ESPECTROS UV – VIS DEL COMPLEJO CUL <sub>12</sub> – D EN UNA VENTANA DE 24 HORAS FRENTE A HISTIDINA .....	72

## ABREVIATURAS

A $\beta$	Péptido amiloide beta
A $\beta$ <sub>1-40</sub>	Péptido amiloide de longitud de 40 aminoácidos
A $\beta$ <sub>1-42</sub>	Péptido amiloide de longitud de 42 aminoácidos
AD	Enfermedad de Alzheimer
AICD	Dominio amiloide intracelular
APP	Proteína precursora de amiloides
$\beta^+$	Positrones
C-11	Radioisótopo de carbono con masa atómica 11 uma
CaMII	Quinasa Ca/calmodulina dependiente
CTF99	Fragmento C terminal 99
Cu-64	Radioisótopo de cobre con masa atómica 64 uma
Cys	Cisteína
Da	Dalton, unidad de medida del peso molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
e <sup>-</sup>	electrón
F-18	Radioisótopo de flúor con masa atómica 18 uma
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica
FDG	Fluorodesoxiglucosa
GSK3	Proteasa quinasa glucógeno sintasa

His	Histidina
$\nu$	Neutrino, partícula subatómica sin masa ni carga
KeV	Kilo electronvoltio
$\Delta$	Término de polaridad
LMCT	Transferencia de carga ligando – metal
$\log D$	Logaritmo del coeficiente de distribución
$\log P$	Logaritmo del coeficiente de partición
MLCT	Transferencia de carga metal – ligando
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Buffer fosfato de sodio
PET	Tomografía por Emisión de Positrones
pH	Potencial de hidrógeno
PiB	Compuesto de Pittsburgh
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
V	Volumen molecular

## 1. Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de enfermedades crónicas cuyo avance en el cuerpo humano es progresivo. Este tipo de desórdenes tienen en común el causar una serie de daños cognitivos dependiendo del mal que se padezca, como daños en la comunicación entre neuronas, acumulación de agregados de proteínas, demencia en cualquiera de sus fases, hasta llegar a desencadenar en la muerte neuronal en partes específicas del cerebro.<sup>1</sup>

Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra el Alzheimer (conocido en inglés por sus siglas AD), el cual, debido a los avances en la ciencia y tecnología, se ha podido diferenciar de otras enfermedades neurodegenerativas. Se sabe que esta enfermedad tiene mayor incidencia durante la edad adulta mayor; específicamente, a partir de los 65 años, por lo que la expectativa de vida es una variable importante en el desarrollo de este mal. Esto significa que, a mayor expectativa de vida, más probabilidades hay de desarrollar esta enfermedad, debido a la etapa de mayor incidencia.<sup>2</sup> En la actualidad, se sabe que el Alzheimer es clasificado como una proteinopatía<sup>1</sup> que causa degeneración irreversible en las células cerebrales (característica principal de las enfermedades neurodegenerativas). En consecuencia, esta enfermedad ataca principalmente a los lóbulos frontal y temporal, que por definición son responsables del lenguaje, comunicación, memoria, entre otros, causando daños irreversibles.<sup>3</sup>

Hasta hace algunos años el diagnóstico definitivo de esta enfermedad era la examinación del cerebro del paciente *post mortem*.<sup>4</sup> Alois Alzheimer, médico neuropatólogo debido al cual la enfermedad lleva ese nombre, examinó microscópicamente el cerebro de un paciente usando la tinción de plata y los resultados fueron reveladores. Se observó que dicho cerebro contenía placas neuríticas y ovillos neurofibrilares que más tarde se establecieron como los biomarcadores de esta enfermedad.<sup>4</sup> Estos hallazgos han sido de vital importancia para el avance de las técnicas que puedan generar un diagnóstico más temprano de esta enfermedad.

Lamentablemente, a pesar de estos significativos hallazgos en la década de 1910, hasta el día de hoy no se cuenta con una cura para esta enfermedad, solo terapias paliativas. Por otra parte, el diagnóstico, a pesar de tener biomarcadores establecidos sigue siendo aún cualitativo, realizándose pruebas físicas para determinar el estado de la enfermedad. El principal problema con este tipo de diagnóstico es que solo reconoce ciertos signos cognitivos, por lo que otros tipos de enfermedades neurodegenerativas

pueden encajar en el mismo diagnóstico.<sup>5</sup> Además de esto, la confirmación de esta enfermedad suele ocurrir cuando esta se encuentra en un cuadro bastante avanzado, evitando que los tratamientos logren tener un impacto significativo en la calidad de vida del paciente.

Dado pues que existen biomarcadores para la detección del Alzheimer, la pregunta evidente hasta el momento es cómo analizar este tipo de agregados proteicos de manera que se pueda cuantificar y detectar el desarrollo de esta enfermedad de manera temprana y no invasiva. A la fecha, se tiene un método de detección no invasivo que cuantifica estos polipéptidos: la Tomografía de Emisión de Positrones (PET por sus siglas en inglés).<sup>6</sup> Esta técnica se basa en la administración de un radioisótopo que emite positrones ( $\beta^+$ ), los cuales pueden ser trazados en zonas específicas del cuerpo, según ocurran las reacciones que involucren estos elementos. Diversos grupos de investigación vienen estudiando una serie de compuestos químicos que cumplan con las características necesarias, tanto en la eficiencia para llegar a ser agentes de radiodiagnóstico, como en la detección de estos biomarcadores. Sin embargo, existen ciertos aspectos por mejorar en las características que estos deben poseer para ser buenos candidatos en la detección de la enfermedad.

Este trabajo se enmarca en un proyecto de investigación que utiliza complejos de coordinación de cobre (II) funcionalizados con estilbena y benzotiazol, de tal manera que sirvan como potenciales agentes de imágenes. Dentro de ese estudio se busca determinar la estabilidad de estos compuestos en condiciones fisiológicas, para luego determinar la pureza de estos, de modo que se pueda llevar a cabo su posterior marcado con el radioisótopo Cu-64 y evaluación *in vitro* e *in vivo*.

El cobre es un metal biocompatible en el cuerpo humano, pues cumple funciones vitales en diversas biomoléculas.<sup>7</sup> Como elemento *per se*, el cobre se encuentra en el cuerpo humano en forma de elemento traza esencial, teniendo una abundancia de aproximadamente 70 mg (en un cuerpo humano adulto), y concentrándose un 34% en el músculo.<sup>8</sup> Debido a ello, su química de coordinación en el cuerpo es bastante conocida.

Los primeros agentes de imágenes PET aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (FDA por sus siglas en inglés) usaban radioisótopos de C-11 y F-18 cuya principal limitación es el corto tiempo de vida que poseen (de 20 a 110 minutos), lo cual restringe en gran medida su uso.<sup>9</sup> Por el



contrario, el Cu-64, al igual que otros radionúclidos metálicos, posee propiedades que pueden mejorar el proceso de toma de imágenes por PET en comparación con los radionúclidos tradicionales. Dentro de estas propiedades destacan que los fármacos que utilizan metales poseen pasos de marcaje en las últimas etapas, pues el metal debe entrar a un sitio de coordinación establecido. En particular, el Cu-64, en comparación con el C-11 y el F-18, posee un tiempo de vida media prolongado ( $t_{1/2} = 12.7 \text{ h}$ ).<sup>9</sup> Esto contribuye a que no se necesiten equipos sofisticados para la síntesis de estos compuestos *in situ*, pues puede ser fácilmente transportable desde un laboratorio especializado hacia los centros de médicos y de diagnóstico en un tiempo razonable y con poco decaimiento.

El entorno de coordinación del metal también cumple un papel sumamente importante, y se deben cumplir ciertos requerimientos para ser considerados agentes de radioimagen. En la investigación en la que está enmarcada esta tesis se han sintetizado ligandos funcionalizados con estilbeno y benzotiazol, que tienen la característica de ser polidentados, lo cual le brinda al complejo cierta estabilidad cinética y termodinámica. Sin embargo, es de gran interés evaluar la farmacocinética y farmacodinámica de estos posibles agentes de radioimagen. Estos ensayos de estabilidad suelen involucrar el uso de técnicas espectroscópicas combinadas, ya que la medición de un solo parámetro no es suficiente para indicar la viabilidad de un agente de imagen.<sup>10</sup>

En consecuencia, se ha propuesto analizar ciertas propiedades que brindan primeros alcances de la estabilidad de esta serie de complejos. Adicionalmente, el estudio de las características cinéticas y termodinámicas ayudan a brindar un mejor panorama en la viabilidad de estos complejos con miras en considerados fármacos para la generación de imágenes PET para el diagnóstico temprano de Alzheimer.

Debido a la naturaleza polidentada de los ligandos que acomplejan el ion Cu (II) en los compuestos preparados en el marco de esta investigación, se tiene la hipótesis de que estos sí se mantendrán estables tanto cinética como termodinámicamente

## **2. Marco teórico**

### **2.1. Definición e incidencia de la enfermedad de Alzheimer**

En el marco de la globalización desde la industrialización hasta la actualidad, se ha tenido un evidente incremento en la demografía. Ello, sumado a los avances en la medicina, ha tenido como consecuencia que la expectativa de vida de las personas haya aumentado en gran medida.<sup>11</sup> Sin embargo, esto implica que la población geriátrica también ha ido en aumento, y con ella, han ido evolucionando ciertos males y trastornos que antes no se tenían en consideración. Uno de estos es la demencia, la cual no es una enfermedad en sí, sino más bien la consecuencia de cierta enfermedad o trastorno. La demencia describe un patrón intraindividual que consiste en la pérdida de la memoria y el deterioro del pensamiento que afecta al menos dos dominios de la cognición.<sup>2</sup>

La enfermedad de Alzheimer (AD) es una de las principales causas de demencia, responsable por el 50 – 75 % de los casos.<sup>1</sup> Esta enfermedad se encuentra dentro del grupo de enfermedades neurodegenerativas, que en la actualidad afecta a casi 50 millones de personas alrededor del mundo. Esta cifra es bastante alarmante, y va en aumento, con una proyección de alcanzar más del doble de casos para el año 2050.<sup>12</sup>

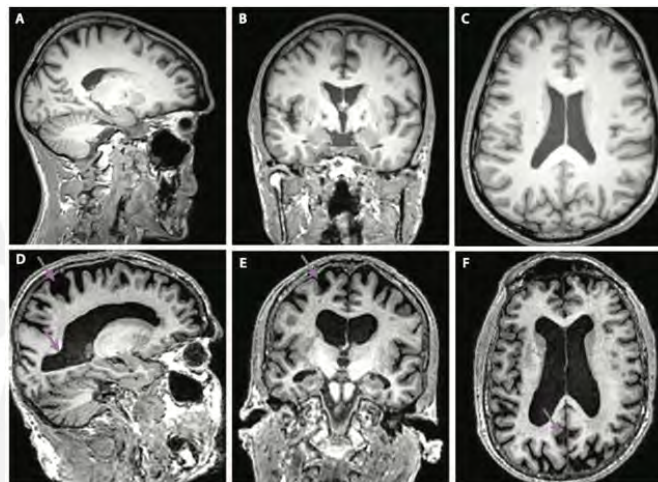
La Organización Mundial de la Salud (OMS), enumeró el Alzheimer como la séptima causa de muerte más común en los países desarrollados. Sin embargo, debido al aumento tan significativo de estos casos estimados para el año 2050, se cree que los casos mortales puedan aumentar en sobremanera.<sup>3</sup>

### **2.2. Inicios y neurodegeneración crónica posterior**

Los síntomas iniciales de esta enfermedad suelen presentarse en la población de adultos mayores de 65 años, involucrando así pequeños lapsos de pérdida de memoria o dificultad para encontrar las palabras correctas al comunicarse. Con la progresión de este mal, se suelen perder las capacidades de comunicación, raciocinio, toma de decisiones, así como pérdida de la función visual espacial, la atención y la orientación; tornándose en un cuadro cada vez más severo.<sup>13</sup>

Estos síntomas son la consecuencia de la degeneración irreversible ocurrida en las

células del cerebro. Más específicamente, los lóbulos frontal y temporal son los que se ven severamente reducidos (Figura 1), causando daños degenerativos irreparables y mostrando la sintomatología ya mencionada.<sup>3</sup> Esto no es de extrañarse, pues estos lóbulos son los que principalmente dominan el lenguaje, la comunicación y las habilidades cognitivas.



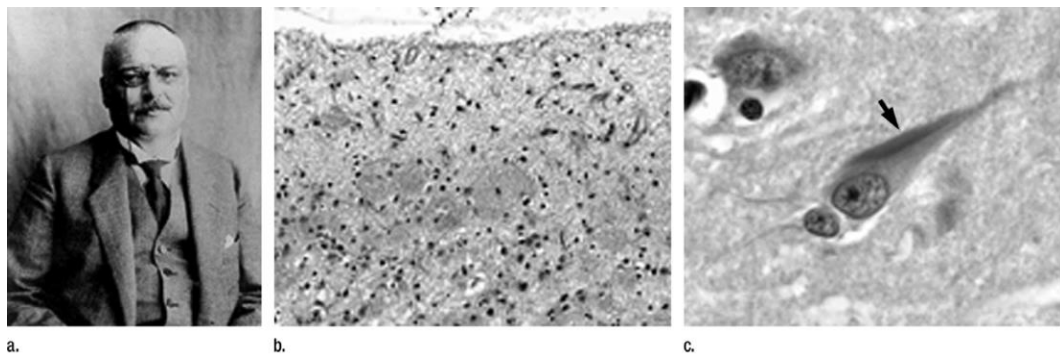
**Figura 1.** Imágenes de Resonancia Magnética de un cerebro de un paciente sano (A-C) y de un cerebro de un paciente con la enfermedad de Alzheimer en estado avanzado (D-F)<sup>14</sup>

Lamentablemente, el desenlace de esta enfermedad es un declive en todos los dominios de la cognición, desde la pérdida de la capacidad de comunicarse, pérdida de la memoria de largo plazo, entre otros; hasta llegar a la demencia severa.<sup>5</sup>

### **2.3. Primeros hallazgos y fisiopatología del Alzheimer**

El diagnóstico definitivo de esta enfermedad solo es posible en un estudio *post mortem* del cerebro del paciente afectado; y el primero en realizarlo fue Alois Alzheimer, un médico psiquiátrico y neuropatólogo alemán, en 1907 (Figura 2a). Este estudió el caso de una paciente de 55 años con antecedentes de 4 años de demencia. Los resultados de la autopsia mostraron dos hallazgos sumamente relevantes. El primero fue “placas seniles neuríticas” que son formadas debido a una angiopatía amiloide en la zona extracelular, como se puede observar en la Figura 2b. El segundo hallazgo fue “ovillos microscópicos fibrilares” en el interior de las

neuronas, los cuales hoy en día se conocen como los ovillos neurofibrilares (Figura 2c). Ambos hallazgos son considerados los biomarcadores de lo que hoy se conoce como enfermedad de Alzheimer.<sup>3,4</sup>



**Figura 2.** Características fisiopatológicas del Alzheimer descritas originalmente por (a) Alois Alzheimer. Este descubrió (b) placas extracelulares, a las que llamó placas seniles y (c) ovillos neurofibrilares en la parte externa de las neuronas.<sup>6</sup>

Posteriormente, en los años 1980, se aislaron y caracterizaron los hallazgos de las placas neuríticas y ovillos fibrilares. Se encontró que las placas neuríticas consistían en una deposición extracelular de péptidos amiloides  $\beta$  ( $A\beta$ ) y se detectó que los ovillos neurofibrilares eran una agregación intracelular de proteínas Tau hiperfosforiladas.<sup>6,15</sup>

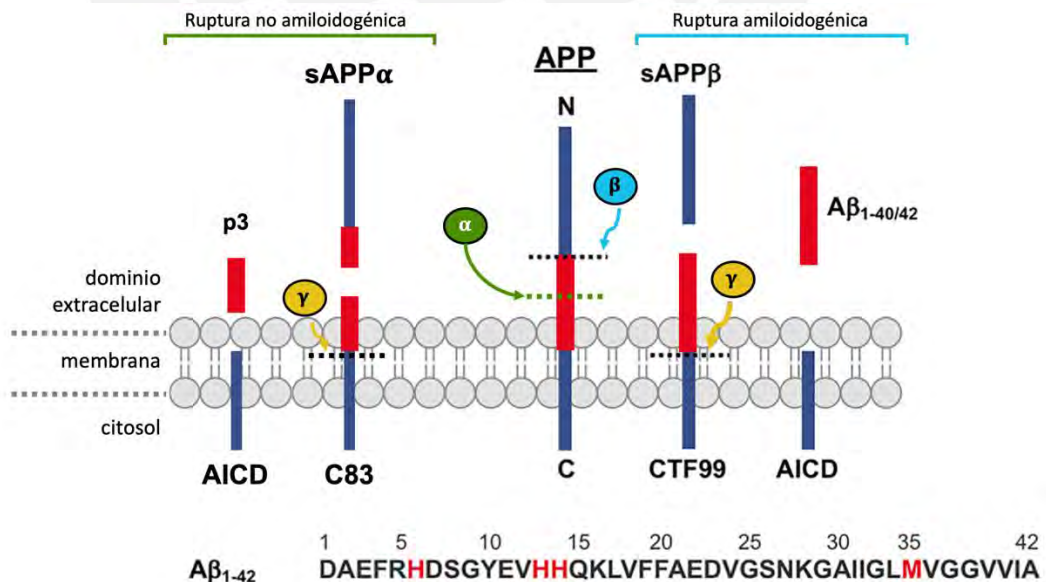
### 2.3.1. Fisiopatología de la enfermedad

Desde el descubrimiento y caracterización de los biomarcadores, el principal paradigma durante los últimos treinta años ha sido la explicación acerca de la conexión entre los agregados proteicos ya mencionados y la sintomatología de la enfermedad. En la actualidad hay más de una hipótesis que pretende dar una explicación congruente a este hecho, pero la más aceptada es la hipótesis de la cascada amiloide.<sup>3</sup>

Esta hipótesis presume que el causante del desencadenamiento de la enfermedad es la acumulación del péptido amiloide  $\beta$ . Este compuesto es producido mediante la ruptura de una proteína de mucho mayor tamaño llamada “proteína precursora de amiloides” (APP por sus siglas en inglés).

Se sabe hasta el momento que existen dos mecanismos de ruptura de esta gran proteína transmembrana de 770 aminoácidos, los cuales se muestran en la Figura 3. El primero es una ruptura no amiloidogénica que utiliza las enzimas secretasas  $\alpha$  y  $\gamma$ . Como resultado de la acción de estas enzimas se obtienen un polipéptido (p3) y el dominio intracelular de la proteína APP (AICD). Además de no formar el péptido amiloide  $\beta$  asociado al Alzheimer, se cree que estos productos de la ruptura mediante estas enzimas podrían tener roles importantes en el desarrollo cerebral, plasticidad sináptica y protección neurodegenerativa.<sup>1,12,16</sup>

Por otro lado, se tiene la ruptura amiloidogénica, en la cual se obtiene el péptido amiloide  $\beta$ , que es el precursor de la hipótesis en mención. En este caso se tiene otro tipo de enzimas que generan la ruptura de la APP, las secretasas  $\beta$  y  $\gamma$ . La secretasa  $\beta$  se encarga del primer corte, en el dominio extracelular; seguido de la secretasa  $\gamma$ , que corta el fragmento C terminal 99 (CTF99). Esto genera el péptido  $A\beta$ , cuya secuencia va desde los 38 a 43 aminoácidos. Se presume que se forma el péptido  $A\beta_{1-40}$  en un 90% aproximadamente, seguido del péptido  $A\beta_{1-42}$  en un 9%.<sup>1,12,16</sup>



**Figura 3.** Procesamiento proteolítico de ruptura de la proteína APP mediante las secretasas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (modificado y adaptado de la referencia 1)

### 2.3.2. Hipótesis de la cascada amiloide

Los péptidos amiloides  $\beta$  *per se* son péptidos que se presentan tanto en el cerebro de un paciente sano, como en un paciente con Alzheimer. Incluso, estos cumplen funciones fisiológicas importantes y beneficiosas, como proteger al cuerpo de infecciones, reparar pequeños orificios en la barrera hematoencefálica, entre otros.<sup>12,15</sup> Sin embargo, se estima que la sobreacumulación y la sobreexpresión de este péptido desencadenaría una serie de daños neuronales, y por tanto se convertiría en la principal causa del desarrollo del Alzheimer según esta hipótesis.

En la Figura 4 se muestra una representación de la llamada cascada amiloide, desde la formación de los péptidos  $A\beta$  hasta el desencadenamiento de la enfermedad de Alzheimer. En el dominio extracelular, estos péptidos pueden encontrarse de tres formas: asociados a la membrana (como poros oligoméricos), oligómeros solubles y agregados insolubles (placas amiloides).<sup>1</sup> Se presume que el menos tóxico de estos son las placas amiloides insolubles, pues se ha encontrado este tipo de placas en cerebros de personas totalmente sanas;<sup>12</sup> por otra parte, se tiene mayor correlación entre las dos primeras formas y la progresión del mal de Alzheimer.<sup>1</sup>

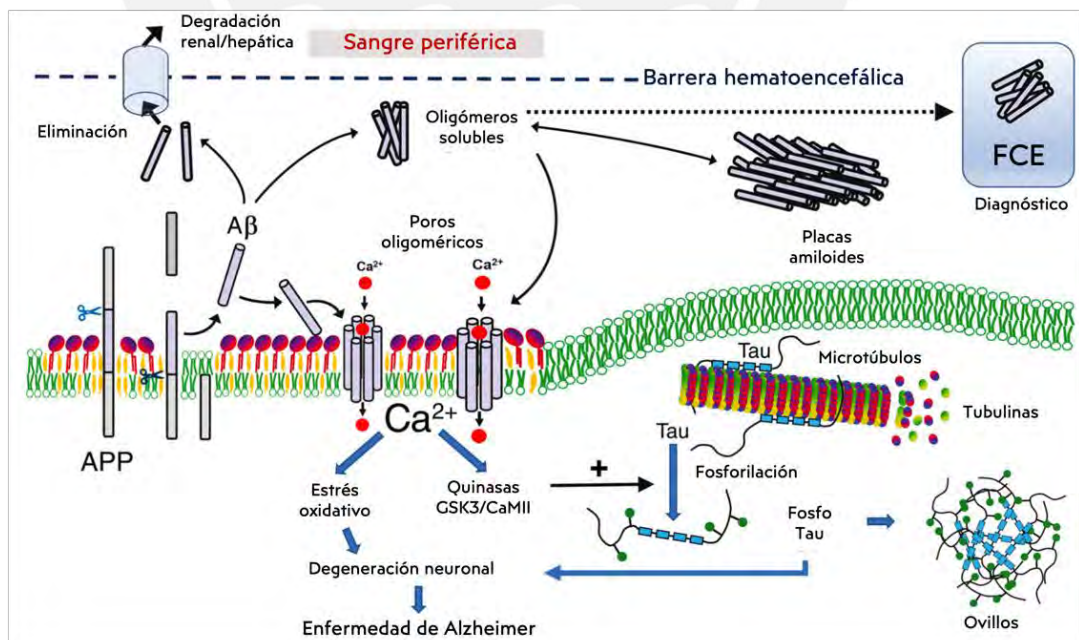


Figura 4. Esquema de la cascada amiloide (modificado de la referencia 12)

Se conjetura que la más tóxica de las tres formas de agregados son los oligómeros asociados a la membrana. Estos forman canales con los cuales los iones metálicos pueden interactuar y atravesar dicha membrana, de manera que se forma una especie de canal hidrofílico. Estos iones metálicos, como el calcio según la Figura 4, son esenciales para el funcionamiento del cerebro, por lo que están minuciosamente regulados en el cerebro de un individuo sano; sin embargo, en el cerebro de un paciente con Alzheimer, esa homeostasis se desproporciona y genera un desequilibrio.<sup>12</sup>

La presencia de estos iones metálicos en el citosol genera estrés oxidativo y degeneración neuronal, como se muestra en la misma figura, pero también activa las proteasas quinasa glucógeno sintasa (GSK3) y quinasa Ca/calmodulina dependiente (CaMII), las cuales catalizan la fosforilación de las proteínas microtubulares tau. Por ello, debido a que hay un exceso de iones fosfato, se degenera la estructura terciaria de la proteína, lo cual origina que los microtúbulos se rompan y formen ovillos neurofibrilares.<sup>12</sup> Estos últimos también son partícipes en la degeneración neuronal y en el deterioro cognitivo del mal de Alzheimer.

#### **2.4. Métodos de diagnóstico**

El descubrimiento y posterior estudio de los biomarcadores de una enfermedad son de suma importancia para el desarrollo de una técnica de diagnóstico confiable. Debido a ello, la investigación en el diagnóstico de esta enfermedad ha migrado de pruebas físicas o “test” psicológicos, al desarrollo de nuevas técnicas basadas en la evidencia del daño neuronal que presenta una persona con la enfermedad de Alzheimer.<sup>3,17</sup> Dentro de estas técnicas se puede diferenciar entre invasivas y no invasivas, donde estas últimas son más estudiadas, pues tendrían menor riesgo de complicaciones para el paciente.

En la actualidad, el diagnóstico que se realiza para determinar la ocurrencia de esta enfermedad consiste en una serie de pruebas que identifican los síntomas claros en el mal de Alzheimer, como la pérdida progresiva de la memoria en distintos niveles o la pérdida de ciertos dominios del lenguaje o la comunicación.<sup>5</sup> Sin embargo, para que estos síntomas aparezcan, la enfermedad ya debe estar en un estado avanzado, por lo cual las posibles terapias o tratamientos no causan efectos significativos.

Por otro lado, se puede diagnosticar también esta enfermedad con el uso de fluido

cerebroespinal; sin embargo, la obtención de este involucra la realización de una punción lumbar o en el peor de los casos, realizando una biopsia de las fibras cerebrales.<sup>17</sup> Ambos métodos son bastante invasivos y no brindan un panorama preciso, pues se utilizan ensayos que no son fácilmente comparables para obtener resultados fiables y robustos.<sup>18</sup>

#### 2.4.1. Diagnóstico por PET usando radiofármacos

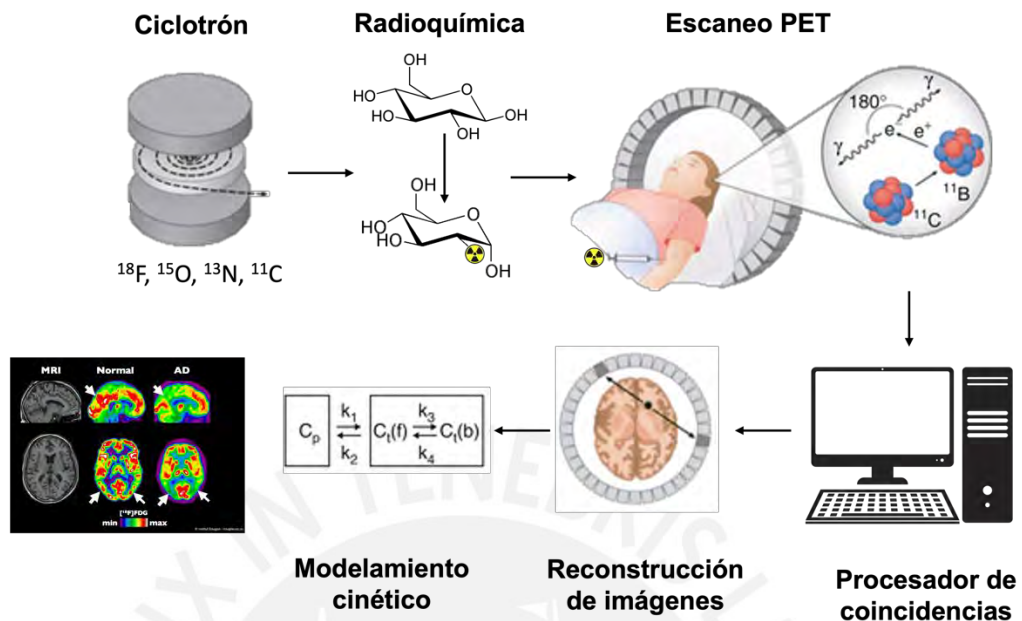
Debido a estos problemas que se tenían desde hace ya varios años, el diagnóstico se ha decantado hacia técnicas no invasivas y de imágenes para obtener un panorama más completo del cerebro de un paciente. Técnicas como la Tomografía de Emisión de Positrones (PET por sus siglas en inglés) han cobrado especial énfasis debido a que pueden detectar los biomarcadores de AD y obtener resultados fiables, tempranos y de manera segura.<sup>18,19</sup>

PET es una técnica de imagen que utiliza un radiofármaco que funciona como radiomarcador. Este posee la característica de emitir positrones que son detectados por el equipo y permite el mapeo de la distribución de estas partículas en el cuerpo. Debido al uso de radiofármacos con alto grado de especificidad hacia ciertos objetivos, esta técnica permite monitorear de manera segura y no invasiva a los diversos procesos del cuerpo, como procesos metabólicos normales o fisiopatologías de una enfermedad.<sup>20,21</sup>

Esta técnica se basa en la interacción del positrón ( $\beta^+$ ), producto de la descomposición del radionúclido (Ec. 1), con su antipartícula, el electrón ( $e^-$ ) (ambos poseen la misma masa, pero signos opuestos), que se encuentra presente de forma abundante en el medio. Dicha colisión, como puede observarse en la Figura 5, resulta en una aniquilación, la cual libera rayos  $\gamma$  con una energía de 511 KeV y en un ángulo de  $180^\circ$ . Esta energía es a su vez detectada por el anillo detector, que puede llegar a tener hasta un metro de diámetro. Luego, este pasa por un transductor de señales que convierte las coincidencias en un mapeo del organismo del paciente.<sup>21</sup>



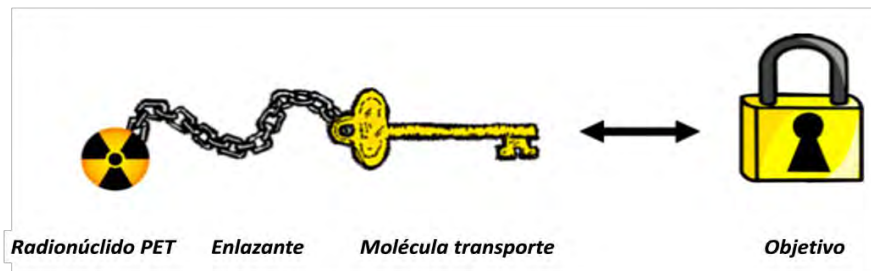




**Figura 5.** Esquema de procesamiento y obtención de imágenes por PET usando un radiomarcador. El radionúcleo se produce en un ciclotrón médico, después de lo cual es introducido en una molécula que se convierte en el radiofármaco que es administrado al paciente. Seguidamente, los positrones liberados del radionúcleo se aniquilan con los electrones del medio para liberar la radiación gamma que es detectada y procesada para construir una imagen del órgano del paciente (esquema elaborado por el autor).

#### 2.4.2. Diseño y características de un radiofármaco

Es necesario precisar que el diseño del radiofármaco es de vital importancia para realizar un diagnóstico mediante PET. Este suele consistir en dos partes (Figura 6): la estructura del fármaco que determina la interacción y su destino; y el radioisótopo emisor de positrones, que debe cumplir con ciertas características. La estructura del fármaco consiste en una sección que permite el transporte y una sección que permite el enlace con el radionúclido. La sección de transporte es vital para el diseño de un fármaco, pues debe ser altamente específica para interactuar con el objetivo o diana biológica (que puede ser desde una enzima, receptor o antígeno, hasta un cambio metabólico).<sup>20</sup> La elección del radionúclido también es fundamental, pues es quien brindará la señal para poder ser detectada por el equipo.



**Figura 6.** Representación del diseño de un radiofármaco para análisis por PET y su interacción con la molécula objetivo (modificado de la referencia 20)

En la detección de Alzheimer, el uso de agentes de imágenes por PET se ha desarrollado en gran medida gracias a que el conocimiento de la fisiopatología de esta enfermedad ha permitido el desarrollo de una serie de radiofármacos que pueden detectar las distintas etapas del declive cognitivo de este mal. En este sentido, se han desarrollado radiofármacos que tienen como objetivo los biomarcadores de AD, las placas amiloides  $\beta$  y los ovillos neurofibrilares hiperfosforilados tau.<sup>22</sup> Para ello, los pro-fármacos en desarrollo para este fin de diagnóstico deben cumplir con ciertos requerimientos, entre los cuales se contemplan:<sup>23</sup>

- Alta afinidad de unión hacia el tejido objetivo
- Alta especificidad hacia el tejido objetivo
- Alta sensibilidad
- Alta relación de contraste
- Alta estabilidad *in vivo*
- Baja inmunogenicidad y toxicidad
- Bajo costo
- Factibilidad en la producción

En la Tabla 1 se enlistan los principales radiofármacos aprobados por la FDA para la detección de las distintas alteraciones en el mal de Alzheimer. En ella se observa que los radionúclidos utilizados son principalmente el flúor-18 (F-18) y carbono-11 (C-11), los cuales poseen un tiempo de vida media bastante reducido, en comparación con sus isótopos más estables, lo cual conlleva a la necesidad de una producción *in situ* del radiofármaco.<sup>20</sup> Ambos radioisótopos se obtienen en un

ciclotrón, como se observa esquematizado en la Figura 5. Este radionúclido debe ser lo suficientemente estable para poder movilizarse hasta su objetivo sin que se genere una descomposición considerable en otra parte del cuerpo, de forma que, cuando se llegue al sitio de detección se descomponga de tal manera que emita señales fácilmente detectables.<sup>20</sup>

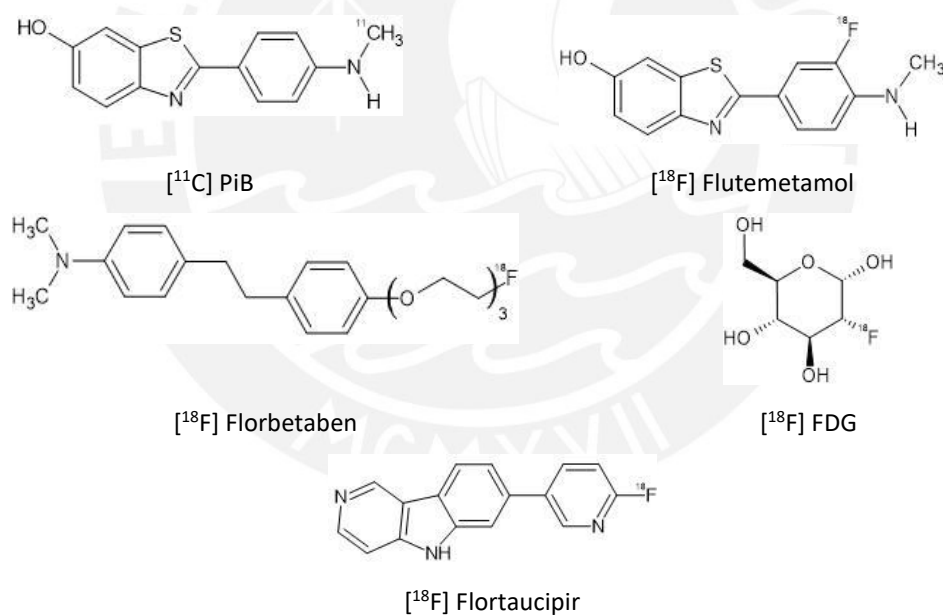
De todos los radiofármacos enumerados en la Tabla 1, el [<sup>18</sup>F] FDG es el más usado en la técnica PET para la detección de Alzheimer. Este fármaco posee la estructura de la glucosa con un flúor radiomarcado que sustituye un grupo OH (Figura 7) y es empleado para monitorear el consumo de glucosa (o en este caso de FDG) por el cerebro, por lo cual puede ayudar a identificar cambios relacionados con AD antes que ocurra un daño neurológico.<sup>24</sup> Sin embargo, es sabido que la glucosa viaja por todo el cuerpo, por lo que este radiofármaco sirve no solo para la detección de Alzheimer, sino también para monitorear distintos procesos. Esta característica hace que el FDG no sea del todo específico, por lo que su uso para el diagnóstico de Alzheimer no es definitivo.<sup>25</sup>

**Tabla 1.** Principales radiofármacos usados en la detección de distintas alteraciones para el diagnóstico temprano de Alzheimer.

Núclido	Tiempo de vida media	Radiofármaco	Alteración detectada
<b>F-18</b>	~ 110 min	[ <sup>18</sup> F] Flutemetamol	Placas amiloides β
		[ <sup>18</sup> F] Florbetapir	
		[ <sup>18</sup> F] Florbetaben	
		[ <sup>18</sup> F] Flortaucipir	Ovillos tau
		[ <sup>18</sup> F] FDG	Metabolismo de la glucosa
<b>C-11</b>	~ 20 min	[ <sup>11</sup> C] PiB	Placas amiloides β

En la búsqueda de otros radiofármacos más específicos para esta enfermedad se estudió el PiB (Pittsburg compound B: 2-4'-[<sup>11</sup>C]-(metilaminofenil-6-hidroxibenzotiazol) – PiB), que se une a las placas amiloides β (la estructura de este compuesto se puede observar en la Figura 7). Este fue el primer radiofármaco para

la detección de Alzheimer en aprobarse por la FDA, y es hasta ahora el más usado a pesar de sus limitantes de tiempo de vida media.<sup>22</sup> Desafortunadamente, existe un error tanto de falsos positivos (aproximadamente del 10 – 13% en individuos sanos), que incluye la interpretación de otras enfermedades neurodegenerativas como diagnóstico de AD;<sup>26</sup> como de falsos negativos, que involucra la reducida afinidad de placas con dicho compuesto,<sup>26</sup> por lo que esta no podría ser una prueba definitiva en la detección de Alzheimer.<sup>25</sup> En consecuencia, otros grupos de investigación decidieron utilizar el F-18 como radionúclido. La FDA en la actualidad ha aprobado una serie de radiofármacos que también se detallan en la Tabla 1, y sus estructuras se muestran en la Figura 7. Estos brindan una mayor especificidad, pero se sigue teniendo como principal problema el tiempo de vida media bastante reducido del radionúclido (~110 min).<sup>22</sup>



**Figura 7.** Estructuras de los radiofármacos representativos en la detección de Alzheimer

#### 2.4.3. Evaluación y propiedades farmacológicas de un radiofármaco

Junto con el diseño y desarrollo de estos nuevos radiofármacos se necesita una exhaustiva evaluación de su idoneidad para poder ser utilizados en el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad en pacientes. Ello involucra que dichos pro-fármacos se analicen mediante una serie de estudios para determinar su viabilidad en distintas

fases de estudios preclínicos.<sup>27</sup> Una estrategia que se suele usar en el laboratorio es empezar con las pruebas más sencillas y que involucran un menor costo de aplicación para dicha evaluación. Debido a ello, se empieza con ensayos analíticos como la determinación de su estabilidad, y con ensayos *in vitro* como la determinación de su citotoxicidad y la afinidad de unión con el objetivo terapéutico.<sup>27</sup>

En el uso de radiofármacos para la detección de la enfermedad de Alzheimer es preciso tener en consideración las características biológicas y de localización de los biomarcadores que se están estudiando. Por ejemplo, se debe considerar que el agente de imagen debe cruzar la barrera hematoencefálica para poder llegar a las placas amiloides  $\beta$ . Así, se debe realizar una serie de estudios que permitan el análisis y viabilidad utilizando estos determinantes.

Por lo general, una de las primeras variables que se suele estudiar es la lipofilicidad, parámetro que mide la interacción del compuesto con un lípido. La capacidad de un compuesto de combinarse con una fase lipídica o una fase gaseosa se mide como coeficiente de partición ( $P$ ) o coeficiente de distribución ( $D$ ), que suele expresarse como  $\log(P)$  o  $\log(D)$  respectivamente.<sup>28</sup> Como se muestra en la Ec. 2, el valor de  $\log P$  está influenciado por la polaridad (combinación de enlaces de hidrógeno y momento dipolar o polarizabilidad), así como el volumen molecular e hidrofobicidad (interacción de un compuesto con el agua).<sup>28</sup>

$$\log P = a V + \Lambda$$

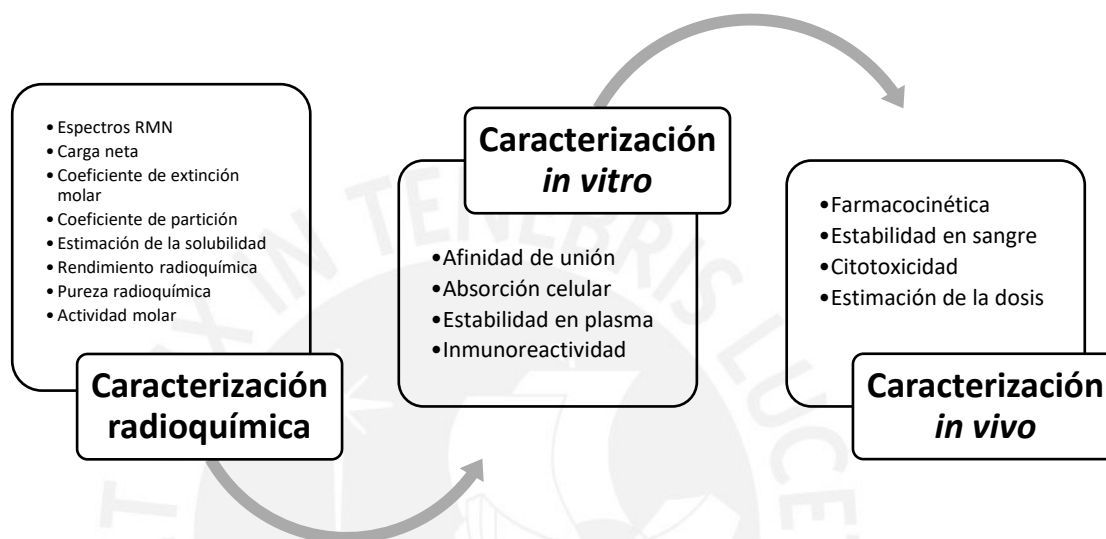
Ec. 2

siendo  $V$ : volumen molecular y  $\Lambda$ : término de polaridad.

La importancia de este parámetro radica en que afecta la potencia, distribución y eliminación de un fármaco o sustancia en el cuerpo. Por otro lado, el incrementar la lipofilicidad puede generar una mayor permeabilidad a la barrera hematoencefálica.<sup>29</sup> En este sentido, se sabe que, idealmente, el fármaco debe mantenerse en forma neutra a pH fisiológico, tener un  $\log D$  de 2 o 3 y peso molecular debajo de los 500 Da para poder cruzar la barrera hematoencefálica mediante difusión pasiva.<sup>30</sup>

Otros parámetros que se estudian en el desarrollo es estos nuevos radiofármacos son la pureza química, estabilidad y citotoxicidad (Figura 8). Todos estos parámetros

son también sumamente importantes en el control de calidad del radiofármaco. Adicionalmente, en la farmacología, los estudios de afinidad hacia las placas amiloides, estudios de biodistribución y cálculos de las dosis indicadas suelen ser los principales estudios de caracterización.<sup>27</sup>



**Figura 8.** Ruta del desarrollo de un radiofármaco (modificado de la referencia 27).

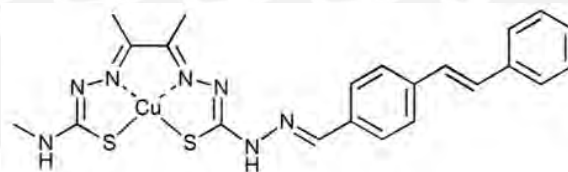
#### 2.4.4. Complejos de cobre (II) como pro-radiofármacos para la detección del Alzheimer

En el contexto del desarrollo de nuevos radiofármacos, la utilización de metales como agentes de radiodiagnóstico se ha convertido en una alternativa, puesto que sus radioisótopos poseen tiempos de vida media más prolongados que los de muchos no metales. En este marco, se vienen estudiando algunos isótopos emisores de positrones como el Ga-68, ya que posee propiedades atractivas para su implementación en la técnica PET.<sup>31,32</sup> Asimismo, se tienen los isótopos de cobre, que también poseen la característica de ser emisores de positrones como los son el Cu-60, Cu-61, Cu-62 y Cu-64. Estos poseen un rango amplio de  $t_{1/2}$ , que va desde los 9.74 minutos para el Cu-62 hasta 12.7 horas para el Cu-64.<sup>31</sup> Este último permitiría que el radiofármaco diseñado con este isótopo se genere de manera remota usando un ciclotrón, debido a su prolongado tiempo de vida media.

Adicionalmente, la química de coordinación del cobre es bastante conocida. Dentro

de la familia de coordinación del cobre, se tiene Cu (I), cuya configuración es  $d^{10}$ ; Cu (II), con configuración  $d^9$  y Cu (III), con una configuración  $d^8$ . El último posee un estado de oxidación alto, por lo que es bastante atípico encontrar complejos con este ion. El primero posee un estado de oxidación inestable, dado que se desproporciona en Cu (0) y Cu (II). Ello conlleva que el ion más estable resulte ser  $Cu^{2+}$ . Este ion puede coordinarse a 4 o 6 ligandos, por lo que las geometrías de coordinación más estables son octaédrica, tetraédrica y cuadrado plano. Asimismo, al ser un ion cuya configuración es  $d^9$  presenta el efecto de distorsión Jahn Teller, lo cual brinda estabilidad adicional.<sup>31</sup> Como se sabe, el cobre es un metal de naturaleza intermedia, según la posición en la Tabla Periódica, por lo cual se puede comportar como un ácido de Lewis duro y blando, por lo que es posible unirse fuertemente a los átomos como el S, N y O.

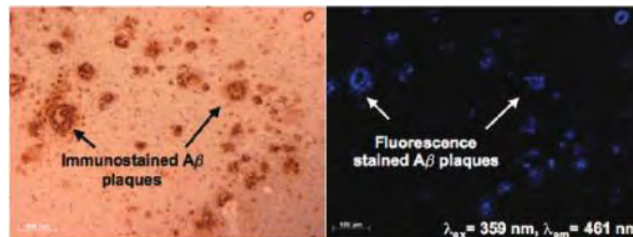
Dentro de los grupos de investigación más resaltantes en términos del desarrollo de complejos de cobre afines a placas amiloides se tiene a aquellos liderados por Liviu Mirica<sup>33</sup> y Paul Donnelly<sup>34</sup>. El último desarrolló complejos de coordinación con ligandos funcionalizados con el grupo estilbeno (Figura 9). Como resultado se observó que dicho compuesto se unió selectivamente a las placas  $A\beta$  (Figura 10).



**Figura 9.** Complejo de cobre derivatizado de  $Cu(II)$ -ATSM funcionalizado con el grupo estilbeno, diseñado para la visualización de fibrillas  $A\beta$ <sup>31</sup>

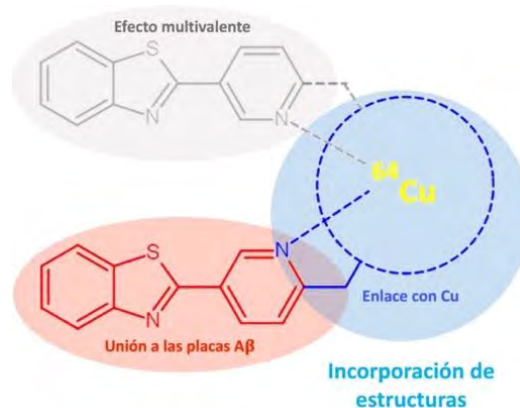
Dicho análisis se realizó tiñendo el tejido cerebral de ratones genéticamente modificados con la enfermedad de Alzheimer. En la Figura 10 se puede observar que el cuadro izquierdo corresponde al tejido cerebral inmunoteñido con el anticuerpo 1E8, que se une selectivamente a las placas  $A\beta$ . Por otro lado, se tiene el cuadro derecho, en este, las placas amiloides del tejido cerebral se encuentran unidas al complejo mostrado en la Figura 9. Las imágenes por fluorescencia muestran que este complejo se une selectivamente a dichas placas, por lo que

resulta factible el estudio de este complejo como pro fármaco en la detección de placas amiloides  $\beta$ .<sup>31</sup>



**Figura 10.** Imágenes por microscopía fluorescente del cerebro con AD. (Izquierda) tejido cerebral tratado con el anticuerpo 1E8; (derecha) tejido cerebral tratado con el complejo Cu-ATSM funcionalizado<sup>31</sup>

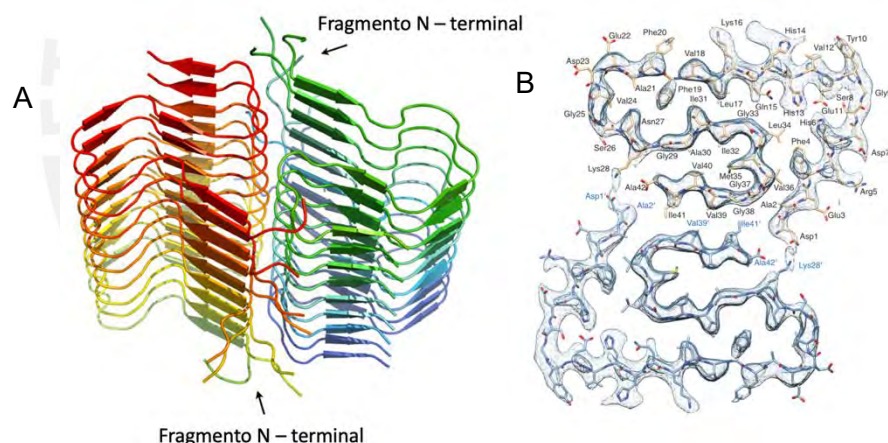
Así como este complejo, se ha venido estudiando muchos otros que tienen potencial para ser agentes de radiodiagnóstico de Alzheimer mediante la detección de placas A $\beta$ . La estrategia de diseño de estos complejos se puede observar esquematizada en la Figura 11. Se puede observar que, por un lado, se incorpora un fragmento de unión selectiva a las placas A $\beta$  (sección roja). Asimismo, se puede reforzar esta unión con la ayuda de un segundo fragmento de anclaje (sección gris). Esta característica de doble unión del ligando hacia la entidad objetivo o diana biológica se le llama efecto multivalente. Por otro lado, se tiene una sección de unión al metal (círculo azul). En esta última se tiende preferentemente a la elección de uniones múltiples o ligandos polidentados.<sup>35</sup>



**Figura 11.** Esquema de las estructuras sintetizadas con la finalidad de ser agentes de radiodiagnóstico de Alzheimer (modificado de la referencia 35).



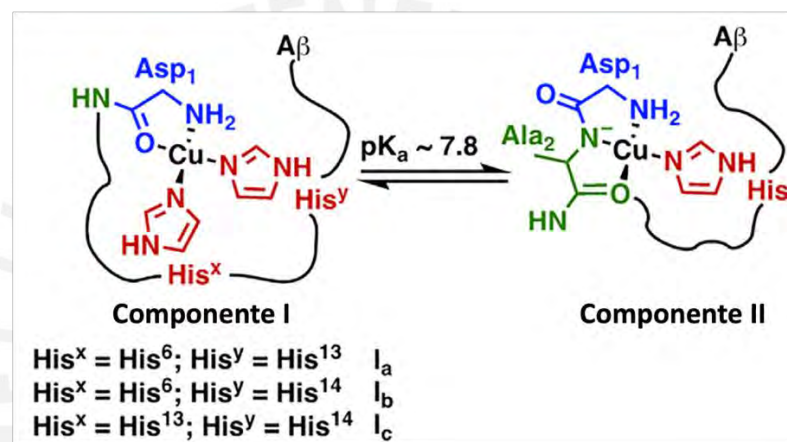
En este sentido, se han sintetizado una variedad de complejos con este mismo esquema, cuyos principales fragmentos de unión selectiva a las placas A $\beta$  son grupos estilbeno, benzotiazol, benzofurano, entre otros.<sup>32</sup> Dos de estos fragmentos son estudiados en el presente trabajo de investigación, el benzotiazol y el estilbeno. Estos, además de poseer gran afinidad a las placas A $\beta$ , poseen gran similitud en sus estructuras. Ambos fragmentos de unión poseen sistemas aromáticos rígidos altamente conjugados y son donadores de electrones. Se tiene la conjetura de que tanto los fragmentos funcionalizados con benzotiazol como con estilbeno ingresan al bolsillo hidrofóbico que se genera como consecuencia del empaquetamiento estructural de las placas A $\beta$  (láminas  $\beta$ , cuya esquematización se puede observar en la Figura 12A y la visualización transversal se puede observar en la Figura 12B) generando interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre ellos.<sup>36</sup>



**Figura 12.** A) Esquemización de la estructura cuaternaria de las fibrillas A $\beta$ <sub>1-42</sub>. B) Modelo atómico y de densidad electrónica obtenido por microscopía electrónica de la sección transversal de las fibrillas A $\beta$ . (Modificado de las referencias 1,37)

Una característica adicional de la estructura cuaternaria de las fibrillas A $\beta$  es que dentro de dicha conformación del bolsillo hidrofóbico se encuentra mayormente aminoácidos como cisteína, histidina, valina, entre otras (Figura 12B). Estos poseen la característica de tener en su estructura átomos de S, N y O; que a su vez pueden competir con el ligando del pro-fármaco diseñado. En la literatura se reporta que el cobre (II) tiene alta afinidad hacia estos residuos, como se muestra en la Figura 13.<sup>1</sup>

En dicho esquema se muestra como la histidina de las hojas beta de las fibrillas A $\beta$ , se une al cobre acompañado de otro resto de histidina contigua, además de otros residuos como ácido aspártico o alanina. Esta acomplejación del cobre con la cadena lateral de los aminoácidos que conforman la sección hidrofóbica de las fibrillas A $\beta$  es un desafío adicional que deben superar los pro-fármacos diseñados, pues los aminoácidos se suelen encontrar en mayor proporción, lo cual genera una competencia en términos de afinidad.<sup>1</sup>



**Figura 13.** Esquemización de la unión de cobre (II) con los restos de aminoácidos de las fibrillas A $\beta$ <sup>1</sup>

Donnelly y colaboradores han desarrollado diversos complejos funcionalizados con ligandos que incorporan los grupos estilbeno y benzotiazol. Cada uno de ellos ha supuesto una mejora en cuanto a la absorción de estos en los tejidos cerebrales, especificidad y selectividad. Sin embargo, este tipo de complejos desarrollados aún se encuentran en exploración, por lo que aún se necesita desarrollar y analizar nuevos complejos que puedan subsanar los inconvenientes mostrados en los compuestos mencionados.<sup>34,36,38,39</sup>

En este contexto, el grupo de investigación en el que se enmarca esta tesis ha logrado sintetizar diversos complejos de cobre (II) diseñados como posibles agentes para el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer, incorporando a los grupos estilbeno y benzotiazol. De tal forma es necesario analizar las primeras propiedades farmacológicas como estabilidad cinética y termodinámica de dichos complejos el cual es el objetivo principal de esta tesis.

### **3. Marco teórico**

#### **3.1. *Objetivo general***

Analizar y determinar ciertas propiedades farmacológicas de una serie de complejos de cobre (Cu) con potencial para ser agentes de radiodiagnóstico del Alzheimer.

#### **3.2. *Objetivos específicos***

- Determinar la estabilidad termodinámica de una serie de complejos de Cu (II) con ligandos orgánicos que incorporan el grupo benzotiazol y estilbena.
- Determinar la estabilidad cinética de una serie de complejos de Cu (II) con ligandos orgánicos que incorporan el grupo benzotiazol y estilbena frente a aminoácidos de competencia como cisteína (Cys) e histidina (His).
- Determinar la viabilidad hacia las siguientes fases de análisis de los complejos que incorporan los grupos estilbena y benzotiazol a partir de los resultados de los estudios de solubilidad, estabilidad termodinámica y cinética.

## 4. Parte experimental

### 4.1. *Equipos, materiales y reactivos*

#### 4.1.1. Equipos y materiales

Los espectros UV fueron medidos en el espectrómetro Agilent UV-Vis 8453 en un intervalo de 250 a 600 nm. Estos espectros fueron visualizados y trabajados en el software UV-visible ChemStation versión B.04.02. Este equipo se encuentra en el Laboratorio de Análisis Instrumental ubicado en la Sección Química.

El agua ultrapura fue obtenida mediante el equipo Thermo Scientific Branstead Nanopure que se encuentra en la Sección Química de la PUCP.

La incubación para las pruebas cinéticas fue realizada en una incubadora Thermo Scientific modelo IGS 60.

Las mediciones de potencial de hidrógeno fueron realizadas en el conductímetro 913 Metrohm con un electrodo medidor de pH.

#### 4.1.2. Solventes y reactivos

Los solventes utilizados fueron de grado p.a. y HPLC adquiridos en JT Baker y Merck, y agua ultrapura. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y para síntesis. Los complejos utilizados fueron sintetizados en el Laboratorio de Investigación de Química Inorgánica Medicinal de la PUCP, con distinto grado de pureza.

##### J.T. Baker:

Ácido clorhídrico concentrado (36%)

Acetona p.a.

Cloroformo p.a.

Merck:

Buffer fosfato pH 7.4

Dimetilsulfóxido DMSO p.a.

Hidróxido de sodio p.a.

Metrohm:

Cloruro de potasio 3M para mantenimiento del electrodo de pH

Solución de calibración amortiguadora de pH 4.00, 7.00 y 9.00.

Sigma Aldrich:

Cloruro de sodio (99,0%)

Cisteína p.a.

Histidina p.a.

## **4.2. Metodología**

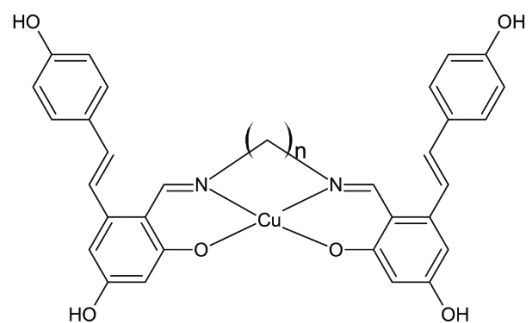
### **4.2.1. Determinación de la estabilidad de los complejos de cobre funcionalizados con los grupos estilbeno y benzotiazol**

El potencial uso de radiofármacos en la detección de una enfermedad debe determinarse mediante una serie de estudios, pues un solo parámetro no es suficiente para determinar la viabilidad de un potencial agente de imágenes o de cualquier fármaco en general.<sup>10</sup> Estos se sitúan dentro de distintas fases tanto *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo* para evaluarlos y posteriormente utilizarlos en fases clínicas en pacientes. Esta investigación desarrolló los estudios de estabilidad preliminares a las fases clínicas, los cuales son un pre-requisito para continuar con la evaluación de los pro-fármacos. En esta tesis se estudió la estabilidad de los complejos de cobre mostrados en la Figura 14, donde se separó los complejos en 4 grupos (A, B, C y D).

Los complejos del grupo A corresponden a aquellos derivados de resveratrol (que contiene un grupo estilbeno), que poseen 4 grupos OH en su estructura. Estos se encuentran ligados al cobre mediante átomos N y O; además, entre ambos átomos de nitrógeno se encuentra una cadena alifática de 3 o 2 carbonos proveniente de una diamina (Figura 14, grupo A).<sup>40</sup>

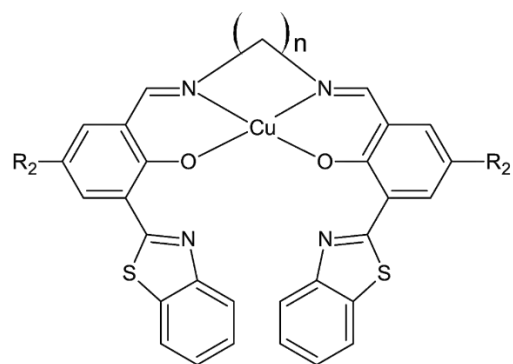
Los complejos del grupo B corresponden a aquellos derivados del estilbeno. A diferencia del grupo anterior, este grupo de complejos posee un ambiente más hidrofóbico, pues no posee grupos OH, en cambio posee de dos a cuatro grupos metoxi. Asimismo, el cobre está unido al ligando mediante átomos N y O, y los átomos de nitrógeno también están unidos mediante una cadena alifática de 2 o 3 carbonos (Figura 14, grupo B).<sup>41</sup>

Los complejos del grupo C y D son aquellos derivados de benzotiazoles. Además de los anillos benzotiazoles, ambos poseen grupos como el CH<sub>3</sub>, -Br o *tert* - butilo como sustituyentes en los anillos aromáticos. Asimismo, además de poseer puntos de coordinación al cobre mediante los átomos N y O, la cadena alifática que une a los nitrógenos coordinantes del cobre posee 2 o 3 carbonos. La diferencia entre los grupos de compuestos C y D radica en la posición relativa de los anillos benzotiazoles, como puede ser apreciado en la Figura 14. En el anillo heterociclo del grupo benzotiazol se encuentra en posición *orto* con respecto del oxígeno para el grupo C, mientras que el grupo R<sub>2</sub> se encuentra en posición *para* al oxígeno (Figura 14, grupo C). Por otro lado, en el grupo D, la configuración es opuesta, pues el anillo benzotiazol se encuentra en posición *para* con respecto del oxígeno, mientras que el grupo R<sub>3</sub> se encuentra en posición *orto* del mismo oxígeno (Figura 14, grupo D).<sup>42</sup>



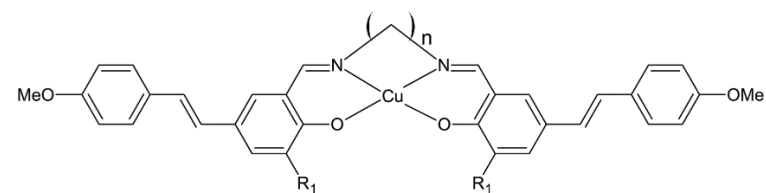
CuL<sub>1</sub>-A: n=3  
CuL<sub>2</sub>-A: n=2

[Grupo A]



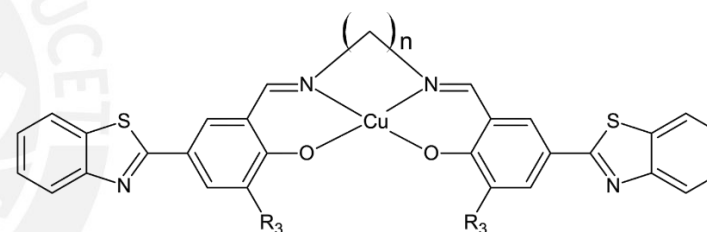
CuL<sub>6</sub>-C: n=2, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>  
CuL<sub>7</sub>-C: n=3, R<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>  
CuL<sub>8</sub>-C: n=2, R<sub>2</sub>=Br  
CuL<sub>9</sub>-C: n=3, R<sub>2</sub>=Br  
CuL<sub>10</sub>-C: n=2, R<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>  
CuL<sub>11</sub>-C: n=3, R<sub>2</sub>=C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>

[Grupo C]



CuL<sub>3</sub>-B: n=2, R<sub>1</sub>=H  
CuL<sub>4</sub>-B: n=3, R<sub>1</sub>=H  
CuL<sub>5</sub>-B: n=3, R<sub>1</sub>=OMe

[Grupo B]



CuL<sub>12</sub>-D: n=2, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
CuL<sub>13</sub>-D: n=3, R<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>  
CuL<sub>14</sub>-D: n=2, R<sub>3</sub>=Br  
CuL<sub>15</sub>-D: n=3, R<sub>3</sub>=Br

[Grupo D]

Figura 14. Complejos de cobre (II) estudiados en el presente trabajo de investigación

#### 4.2.1.1. Determinación de la estabilidad termodinámica

Este es el primer paso en la serie de estudios que se realizaron a los complejos de cobre, pues es lo que determina la estabilidad termodinámica o permanencia del complejo sin disociación significativa al ser expuesto a diversas condiciones. Para ello, se utilizaron una serie de ensayos con la finalidad de exponer los complejos sintetizados a diferentes condiciones, como el medio acuoso o cambios de pH.<sup>10</sup>

##### 4.2.1.1.1. *Estabilidad a pH fisiológico*

En este método se utilizó la espectroscopía UV – Vis para determinar la estabilidad de los complejos en solución en un determinado periodo de tiempo. Para ello los complejos de cobre fueron disueltos en una solución acuosa con una concentración del 5% de DMSO. Estos debieron llegar a una concentración base de 10  $\mu\text{M}$  del complejo y pH 7.4. Para los complejos menos solubles en medio acuoso, se utilizó una solución base del complejo de 10  $\mu\text{M}$  disuelto en un 10% v/v de DMSO para CuL<sub>10</sub> - C y CuL<sub>11</sub> - C o un 30% v/v de DMSO para CuL<sub>3</sub> – B, CuL<sub>4</sub> – B y CuL<sub>5</sub> – B. Cabe mencionar que la disolución se inicia con la adición de DMSO, para luego agregarle el componente acuoso a la solución.

Se registró el espectro UV – Vis de las soluciones de los complejos durante cada hora durante las primeras 8 horas (estas mediciones se realizaron por triplicado), teniéndose como blanco una solución buffer fosfato (PBS) a pH 7.4 con el porcentaje indicado de DMSO. La solución del complejo se mantuvo a una temperatura promedio de 22 °C durante el estudio (temperatura de ambiente). El rango de medición de longitud de onda registrado tanto para este análisis como en los posteriores fue entre 250 y 600 nm puesto que los complejos poseen bandas de absorción a dicha longitud, mientras que el DMSO posee una longitud de onda mínima de medida de 265 nm.

##### 4.2.1.1.2. *Determinación de la estabilidad en un rango de pH*

En este estudio se buscó obtener una curva de titulación espectroscópica UV – Vis a un rango amplio de pH. Para ello se realizó una titulación del



complejo a una concentración base de 50  $\mu\text{M}$ , 0.1 M de NaCl, pH neutro y se tituló hacia los límites de pH establecidos (de 2 a 12). Para acidificar se utilizó HCl 0.1 M y 0.01 M gota a gota; mientras que para basificar se utilizó NaOH 0.1 M y 0.01 M previamente estandarizado. Se registró el espectro UV – Vis de cada intervalo de pH de 0.2 en un rango de 2 a 12. Al realizar la titulación se dejó estabilizar el pH y se registró el espectro UV – Vis en el momento. El rango de medición de longitud de onda registrado fue entre 250 y 600 nm.

#### 4.2.1.2. Determinación de la estabilidad cinética

En este estudio se utilizó también espectroscopía UV – Vis para determinar la estabilidad de los complejos sometidos a la presencia de aminoácidos que se encuentran en alta proporción. Para esto se utilizó una concentración base del complejo a 10  $\mu\text{M}$  y un 5% de DMSO, usando como solvente buffer fosfato (PBS) pH 7.4. Por otro lado, se preparó la solución del aminoácido cisteína e histidina a 0.1 M utilizando agua ultrapura.

Se dejó incubar una mezcla de 5000:1 de aminoácido: complejo (10 mL de la solución del complejo y 5 mL de la solución del aminoácido) a 37 °C por un periodo de 24 h. Se realizó mediciones a las 0, 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas de la mezcla por triplicado y se analizó el comportamiento de estas. El blanco se midió utilizando el aminoácido 0.1 M en una solución de PBS pH 7.4 y 5% DMSO.

Cabe mencionar que para todas las mediciones se extrajo una alícuota de 2 mL de la solución stock y al término de la medición dicha alícuota se desechó. Al igual que en los demás estudios, el rango de medición de longitud de onda registrado fue entre 250 y 600 nm.

## 5. Resultados y discusión

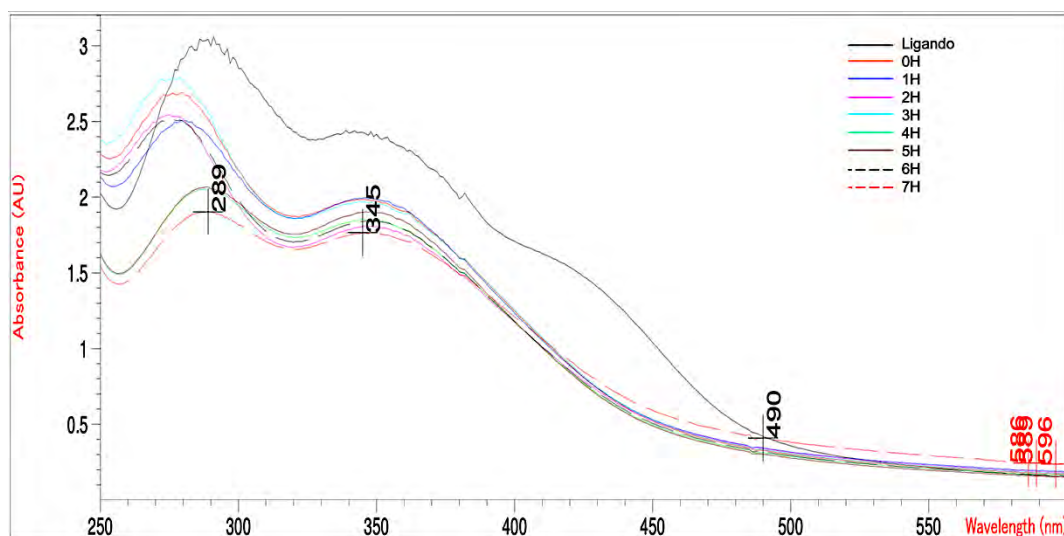
### 5.1. *Estabilidad termodinámica*

#### 5.1.1. Estabilidad a pH fisiológico

Se realizó una variedad de pruebas para determinar la estabilidad de los complejos de cobre (II) en solución acuosa a pH fisiológico. Para ello, primero se estudió la solubilidad de los complejos en agua. Dentro de las primeras pruebas se encontró que la gran mayoría de complejos estudiados fueron altamente insolubles, por lo que fue necesario el empleo de un solvente orgánico aprótico, como el dimetilsulóxido (DMSO) para ayudar a promover su disolución en medio acuoso. Se utilizó este solvente pues es de amplio uso en las evaluaciones farmacológicas de compuestos poco solubles en agua.<sup>43</sup> Además, este solvente es de particular interés, puesto que puede disolver complejos de gran peso molecular, como los complejos estudiados en este proyecto, debido a su gran constante dieléctrica y polaridad.<sup>43</sup>

Se iniciará esta sección con los complejos funcionalizados a partir de resveratrol mostrados en la Figura 14, grupo A. Para estos compuestos se utilizó un valor inicial de 5% de medio orgánico, de acuerdo a los análisis reportados en la literatura para complejos de estructura similar,<sup>39</sup> lo que significa que no requieren gran cantidad de DMSO para permanecer en solución acuosa. El 95% remanente de la solución se completó con buffer fosfato salino (PBS) 10 mM, pH 7.4 (pH fisiológico). Este medio también es ampliamente usado en el ensayos biológicos como generador de ambiente acuoso, con la finalidad de mantener al compuesto a un pH neutro y controlado.<sup>44</sup>

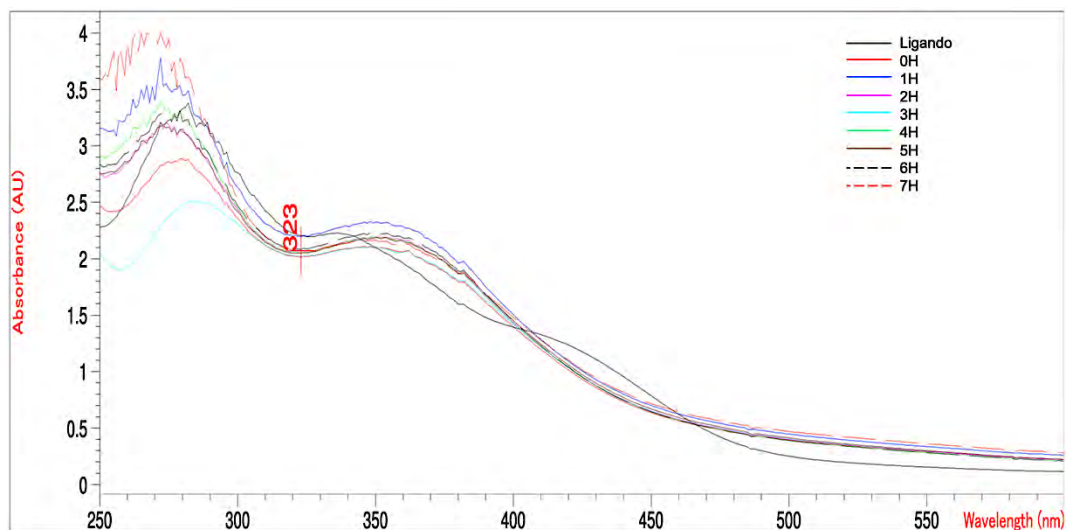
Para la determinación de la estabilidad a pH fisiológico se estudiaron los complejos en una ventana de análisis de 8 horas. El resultado del estudio de estabilidad en solución acuosa a pH fisiológico del complejo CuL<sub>1</sub> – A se muestra en la Figura 15, donde se observa el comportamiento de los espectros UV – Vis de la solución del complejo a diferentes tiempos dentro de la ventana de estudio. También se incluye el espectro UV – Vis del ligando libre del complejo, para efectos de comparación.



**Figura 15.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  a pH fisiológico

En la Figura 15 se puede observar que la primera banda de absorción (289 nm) presenta mayor oscilación en absorbancia durante el tiempo de análisis. Esto probablemente se debe a que se utiliza DMSO al 5% para solubilizar el complejo, y este presenta una absorbancia hasta 265 nm, además que la banda se propaga hasta el rango de análisis. Debido a ello, la banda más representativa de absorción es aquella que se encuentra en 345 nm, que brinda un mejor panorama de la estabilidad del complejo. La variación de absorbancia a esta longitud de onda es mínima durante todo el periodo de tiempo analizado. Debido a ello, se llega a la conclusión de que el complejo permanece prácticamente inalterable durante las 8 horas de análisis. Este periodo de análisis es suficiente para poder conjeturar que dicho complejo es estable a temperatura de ambiente en un medio acuoso de pH fisiológico.

De manera análoga, se realizó el análisis del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$ , cuya diferencia con el complejo anterior es únicamente la longitud de la cadena alifática de dos carbonos en su estructura. Los espectros UV-Vis registrados durante las 8 primeras horas de este estudio se muestran en la Figura 16.



**Figura 16.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  a pH fisiológico

Se puede observar que la tendencia de este complejo es muy similar a la del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$ , ya que ambos poseen dos bandas de absorción principales en la zona UV. Además, en el espectro del ligando se observa una banda de menor intensidad a 415 – 430 nm en el rango visible, debido a que su estructura y naturaleza son bastante similares en comparación con los espectros del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  y su correspondiente ligando. Adicionalmente, este complejo, a diferencia del anterior, posee un coeficiente de absortividad molar mayor que el complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$ , puesto que la absorbancia máxima de este complejo es de casi 3.5 UA.

El espectro tanto del complejo (espectro de color rojo, a 0 horas), como del ligando (espectro de color negro) poseen gran similitud a los reportados originalmente por Gonzales.<sup>40</sup> En el primer espectro se pueden observar dos bandas de absorción características de los complejos; la primera corresponde a la banda que se encuentra en aproximadamente 270 – 290 nm; mientras que la segunda banda se encuentra a 345 nm. Por otro lado, la banda en 415 nm que pertenece al ligando desaparece en el complejo. Esto resulta en que el ligando presente un color amarillo y el complejo un color marrón verdoso.

Finalmente, a lo largo de este análisis, luego de las 8 horas de ventana, se observó que las soluciones de los complejos en buffer PBS se mantenían estables. Esto se ve plasmado en las curvas presentadas en la Figura 15 y Figura 16, cuya variación de absorbancia varía de manera muy poco significativa en el tiempo.

Debido a lo mencionado en líneas superiores, se puede conjeturar que tanto el complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$ , como el complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  son estables en solución acuosa a pH fisiológico. Por tanto, estos complejos pudieron pasar al siguiente estudio para determinar la estabilidad en un marco más amplio de análisis.

En segundo lugar, se realizó el análisis de los complejos del grupo B, mostrados en la Figura 14. En ella se observa que estos complejos poseen una naturaleza diferente a los complejos funcionalizados a partir de resveratrol. La primera diferencia evidente es que estos complejos poseen una estructura relativamente lineal, con ausencia de hidrógenos ácidos, los cuales hacen que estos complejos tiendan a ser más insolubles en solución acuosa. Esto se comprueba con las primeras pruebas de solubilidad de estos complejos, pues a pesar de aumentar el porcentaje de medio orgánico (DMSO) hasta en un 30%, que es el límite que se reporta en la literatura para el estudio de complejos de estructura similar,<sup>36</sup> el complejo no se disolvía por completo.

La segunda diferencia que se puede observar en estas estructuras es que se ha derivatizado los estilbenos con grupos *-metoxi*, los cuales reducen la polaridad que poseían los complejos derivados de resveratrol (Figura 14, grupo A). Debido a ello, estos complejos se disuelven mejor en un ambiente altamente apolar, como el hexano, por lo que el DMSO no es el solvente adecuado para este análisis. Sin embargo, para la continuación de las pruebas analíticas, no es factible usar solventes altamente apolares como ambiente orgánico para la disolución inicial del complejo, pues estos no son miscibles con un medio acuoso. Debido a ello se puede determinar con esta primera prueba que estos complejos ( $\text{CuL}_3 - \text{B}$ ,  $\text{CuL}_4 - \text{B}$ ,  $\text{CuL}_5 - \text{B}$ ) no continúan a una siguiente etapa de análisis, pues es de poca utilidad realizar análisis posteriores con tan reducida solubilidad.

Finalmente se realizó el análisis de los complejos mostrados en la Figura 14, grupo C y D. Estos complejos, a diferencia de los anteriores, poseen grupos benzotiazoles, un heterociclo aromático, en su estructura. Estos complejos son menos solubles que los funcionalizados a partir de resveratrol, puesto que no se encuentran grupos OH presentes en su estructura. Los datos de solubilidad en DMSO obtenidos para estos complejos se muestran en la Tabla 2. En ella se observa que los complejos menos solubles (disolución en 10% DMSO) corresponden a aquellos que poseen un grupo *tert*-butilo en su estructura ( $\text{CuL}_{10} - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_{11} - \text{C}$ ); además del complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$ . Estos dos primeros complejos, al poseer el grupo diferenciador como el *tert*-butilo

son más insolubles, pues este grupo es alifático y altamente apolar. Por otro lado, está el complejo CuL<sub>13</sub> – D, que pertenece al Grupo D, y posee como grupo diferenciador a un metilo. En este complejo el grupo benzotiazol se encuentra en posición *para* al oxígeno que coordina al cobre, y el grupo metilo se encuentra en posición *orto* al enlace Cu-O. Como consecuencia, se obtiene una estructura más alargada; esto sumado a que posee una cadena alifática derivada de una diamina de tres carbonos, hace que el complejo posea mayor componente apolar y por ende sea menos soluble que los complejos CuL<sub>6</sub> – C, CuL<sub>8</sub> – C, CuL<sub>9</sub> – C y CuL<sub>12</sub> – D en este medio mayormente acuoso.

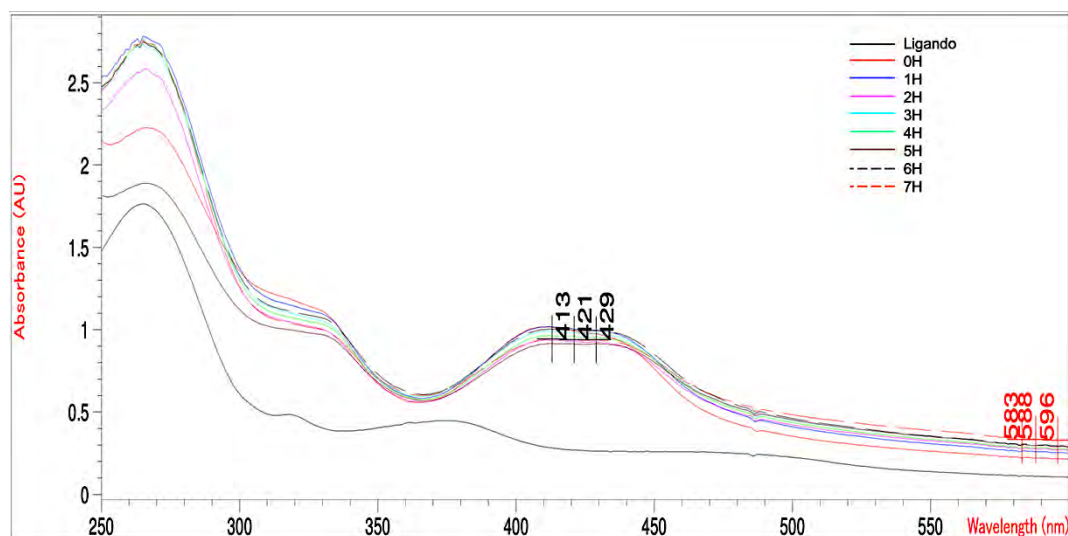
Finalmente, los complejos CuL<sub>14</sub> – D y CuL<sub>15</sub> – D resultaron ser insolubles en el medio del estudio, inclusive con el máximo porcentaje de DMSO permitido. Debido a esto, los complejos CuL<sub>14</sub> – D y CuL<sub>15</sub> – D fueron excluidos de este estudio de estabilidad en medio acuoso a pH fisiológico. El complejo CuL<sub>7</sub> – C, a pesar de pertenecer al grupo de compuestos a analizar, no pudo estar disponible a tiempo para completar los análisis en el momento de este estudio.

**Tabla 2. Solubilidad en DMSO de los complejos del grupo C y D**

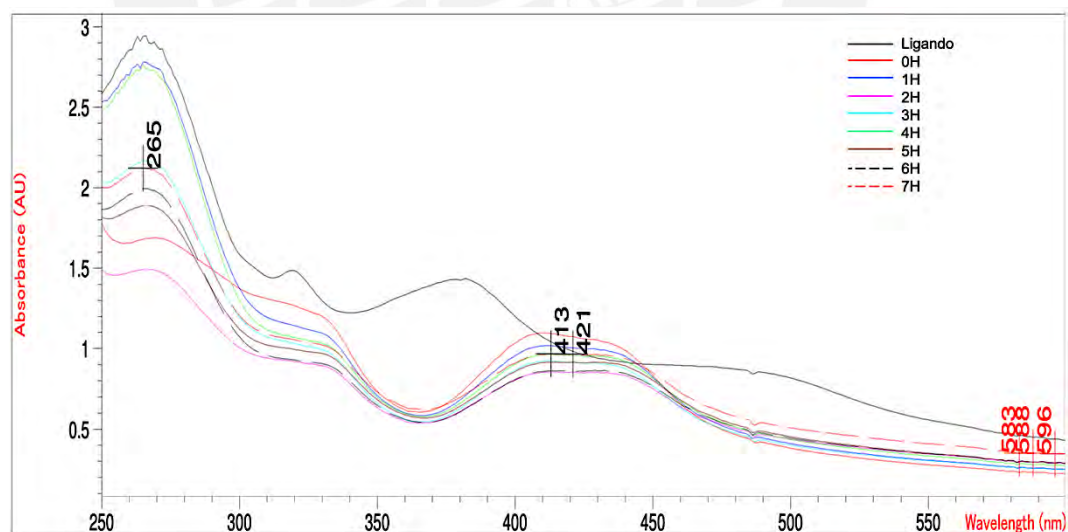
Grupo	Nombre	Estructura	Concentración de DMSO utilizada
Grupo C	CuL <sub>6</sub> - C	R=CH <sub>3</sub> , n=2	5%
	CuL <sub>8</sub> - C	R=Br, n=2	5%
	CuL <sub>9</sub> - C	R=Br, n=3	5%
	CuL <sub>10</sub> - C	R=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , n=2	10%
	CuL <sub>11</sub> - C	R=C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , n=3	10%
Grupo D	CuL <sub>12</sub> - D	R=CH <sub>3</sub> , n=2	5%
	CuL <sub>13</sub> - D	R=CH <sub>3</sub> , n=3	10%
	CuL <sub>14</sub> - D	R=Br, n=2	Insoluble
	CuL <sub>15</sub> - D	R=Br, n=3	Insoluble

Luego de completar el análisis de solubilidad, se realizó el análisis de estabilidad a pH fisiológico. En la Figura 17 y Figura 18 se muestran los espectros del complejo CuL<sub>8</sub> – C y CuL<sub>10</sub> – C respectivamente, cuyos resultados son representativos del

resto de complejos del grupo C ( $\text{CuL}_6 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_9 - \text{C}$ , y  $\text{CuL}_{11} - \text{C}$ ) y cuyos correspondientes espectros se encuentran en el Anexo 1 al Anexo 3.



**Figura 17.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_8 - \text{C}$  a pH fisiológico



**Figura 18.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  a pH fisiológico

En estos dos conjuntos de espectros se observa que hay una banda de absorción conservada entre 420 y 440 nm para ambos casos. Por ejemplo, en la Figura 17 se observa que la banda de absorción característica del complejo  $\text{CuL}_8 - \text{C}$  corresponde a 421 nm, donde al parecer hay una superposición de dos picos de

absorción, mientras que en el espectro de la Figura 18 se observa que dicha banda de absorción se encuentra en los 413 nm. Esta banda característica en todos los complejos del grupo C se puede atribuir a una transferencia de carga metal ligando (MLCT). El ligando posee átomos donadores de densidad electrónica mediante enlaces  $\sigma$  como el N y O; estos a su vez tienen orbitales  $\pi^*$  antienlazantes que poseen relativamente baja energía, y; por lo tanto, se encuentran cerca de los orbitales d del metal. Debido a ello, al excitarse se genera un salto electrónico desde los orbitales del metal hacia los orbitales antienlazantes del ligando, lo cual genera esa banda característica que en la mayoría de los complejos reportados en la bibliografía se encuentran en el rango visible.<sup>45</sup>

Asimismo, en la zona UV (250 – 350 nm), se observa que a las cero horas hay una banda de mayor intensidad que aquella situada entre 400 – 450 nm para los espectros de los complejos del grupo C ( $\text{CuL}_6 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_8 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_9 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  y  $\text{CuL}_{11} - \text{C}$ ). Esta banda intensa en la región UV posiblemente corresponda a la transferencia de carga ligando metal (LMCT). Estas bandas, según la bibliografía, poseen mayor intensidad que aquellas correspondientes a MLCT, lo cual puede corresponder al salto electrónico desde los orbitales de alta energía del ligando (que en este caso sería del oxígeno o nitrógeno) hacia los orbitales del metal. Por lo general esta transferencia electrónica se da en metales de alto estado de oxidación, pero también se pueden observar en otros, aunque con menor frecuencia.<sup>45</sup>

Asimismo, se observa que tanto los espectros de las Figura 17 y Figura 18 poseen bandas de similar longitud de onda. Se observa que la primera banda (en el rango de 200 a 250 nm), al igual que en los complejos del grupo A, presenta mayor oscilación que la segunda banda (400 – 450 nm). Esta segunda banda de absorción durante el tiempo transcurrido de análisis (8 horas) se encuentra bastante conservada, pues casi no hay oscilación entre mediciones. Este comportamiento se puede observar en los complejos de este grupo C ( $\text{CuL}_6 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_8 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_9 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  y  $\text{CuL}_{11} - \text{C}$ ). Esta banda cae en el rango visible, por lo que le brinda el color al complejo. Así pues, debido a la longitud de onda a la que absorbe tanto el complejo  $\text{CuL}_8 - \text{C}$ , como el  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  son verdes al disolverse en DMSO. Es de esperarse que los demás complejos del grupo C, al tener bandas de absorción similares, también posean colores similares. Los colores de los complejos se muestran en la Tabla 3. Finalmente, con este análisis realizado se puede determinar que los complejos representativos  $\text{CuL}_8 - \text{C}$  y  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$ , así como los complejos



CuL<sub>6</sub> – C, CuL<sub>9</sub> – C, y CuL<sub>11</sub> – C se mantienen estables en la ventana de análisis de 8 horas en las condiciones dadas.

**Tabla 3.** Colores de los complejos y las bandas de absorción a la que se le atribuye dicho color

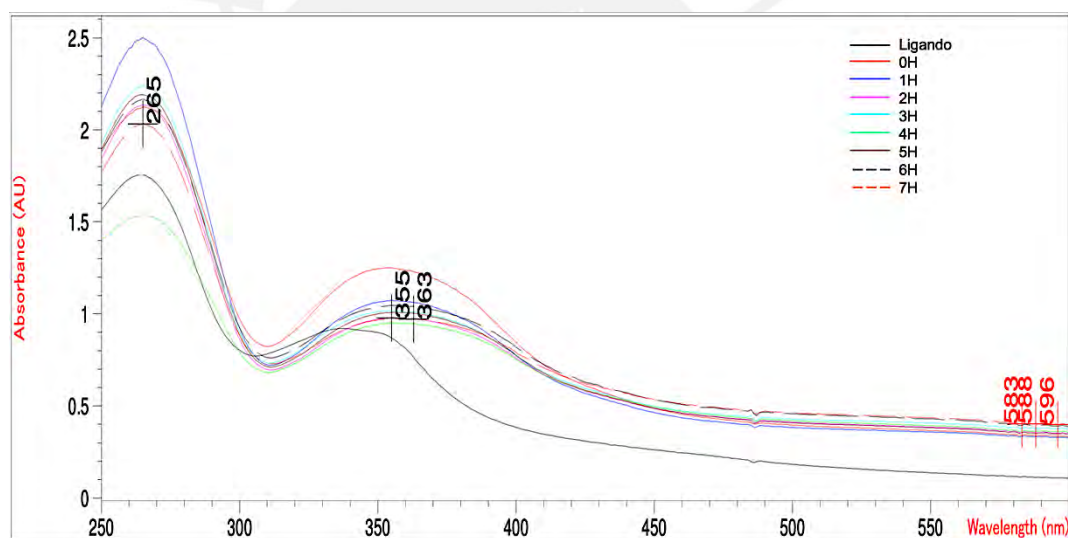
Complejo	Aspecto del complejo	Banda a la que se le atribuye el color
CuL <sub>6</sub> – C	Verde oscuro	421 – 429 nm
CuL <sub>8</sub> – C	Verde limón	421 nm
CuL <sub>9</sub> – C	Marrón verdoso	440 nm
CuL <sub>10</sub> – C	Verde claro	413 – 421 nm
CuL <sub>11</sub> – C	Verde claro	429 – 433 nm
CuL <sub>12</sub> – D	Gris claro	355 – 363 nm
CuL <sub>13</sub> – D	Gris oscuro	370 nm

Para términos de comparación, se analizó el espectro del ligando correspondiente a algunos complejos del grupo C (L<sub>8</sub> – C, mostrado en la Figura 17; y L<sub>10</sub> – C, mostrado en la Figura 18). Se observó que varias de las bandas de absorción que correspondían al ligando, en presencia del metal, cambiaron su naturaleza. Por ejemplo, las bandas que se encuentran en 320, 385 y 450 nm desaparecen del ligando L<sub>8</sub> – C al complejo CuL<sub>8</sub> – C. Del mismo modo, se observa un comportamiento similar para el resto de los complejos del grupo. Estas observaciones tienen como finalidad mostrar la diferencia entre el espectro del ligando y el espectro del complejo, por lo cual se puede determinar que el complejo se mantiene inalterable, puesto que el espectro del complejo durante las 8 horas, en comparación con el espectro de ligando, poseen bandas de absorción distintas.

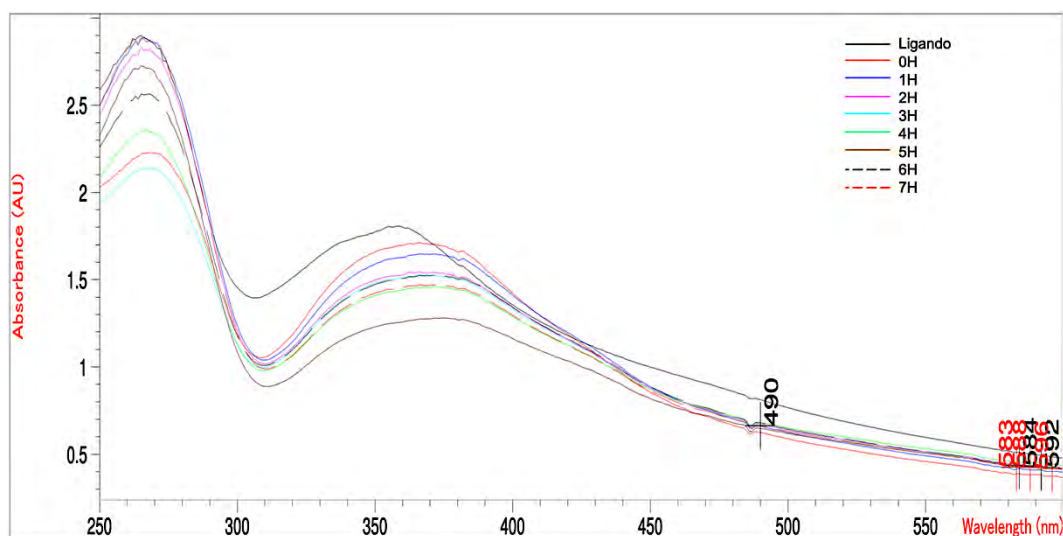
Los complejos analizados del grupo D (CuL<sub>12</sub> – D y CuL<sub>13</sub> - D) poseen tendencias relativamente parecidas a aquellas mencionadas para el grupo C, aunque con ciertas particularidades, como se muestra en los espectros de la Figura 19 y Figura 20, respectivamente. De manera general, se puede observar que la banda de absorción de menor intensidad de los complejos CuL<sub>12</sub> – D y CuL<sub>13</sub> - D a las 0 horas aparece a una menor longitud de onda (355 – 360 nm) en comparación de aquellos pertenecientes al grupo C. Se puede observar que también estos espectros

conservan sus señales durante las 8 horas de análisis. Asimismo, el espectro del ligando posee diferencias significativas con el espectro del complejo; de este modo, se puede conjeturar que los complejos  $\text{CuL}_{12}$  - D y  $\text{CuL}_{13}$  - D también son estables a pH fisiológico.

En suma, los complejos estudiados  $\text{CuL}_1$  - A,  $\text{CuL}_2$  - A,  $\text{CuL}_6$  - C,  $\text{CuL}_8$  - C,  $\text{CuL}_9$  - C,  $\text{CuL}_{10}$  - C,  $\text{CuL}_{11}$  - C,  $\text{CuL}_{12}$  - D y  $\text{CuL}_{13}$  - D comparten rasgos de estabilidad a pH fisiológico (7.4), puesto que los espectros medidos durante este análisis, en comparación con el espectro a 0 horas posee una fluctuación mínima, por lo que se concluye que dichos complejos son estables, ya que se mantienen inalterables en estas condiciones.



**Figura 19.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_{12}$  – D a pH fisiológico



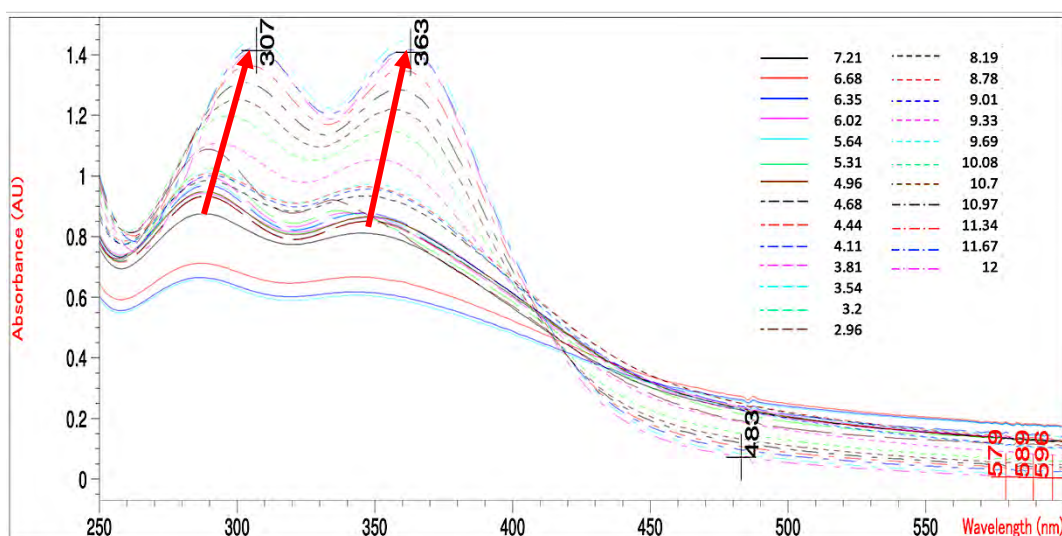
**Figura 20.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$  a pH fisiológico

### 5.1.2. Estabilidad dentro de un rango de pH

Se realizó un segundo ensayo de estabilidad con la finalidad de poder determinar el rango de pH donde el complejo formado es estable y no se disocia o descompone. Para esto se utilizó una solución del complejo en KCl 0.1 M y cierto porcentaje de DMSO (5% para los complejos del grupo A, y de 5 a 10% para los complejos del grupo C y D, según la Tabla 2). La finalidad de la sal utilizada es incrementar la fuerza iónica de la solución. Luego de ello, se tituló espectroscópicamente hasta un pH ácido y básico (usando HCl 0.01 M y NaOH 0.01 M respectivamente y normalizados). El rango de pH de estudio en esta prueba fue de 2 a 12 aproximadamente.

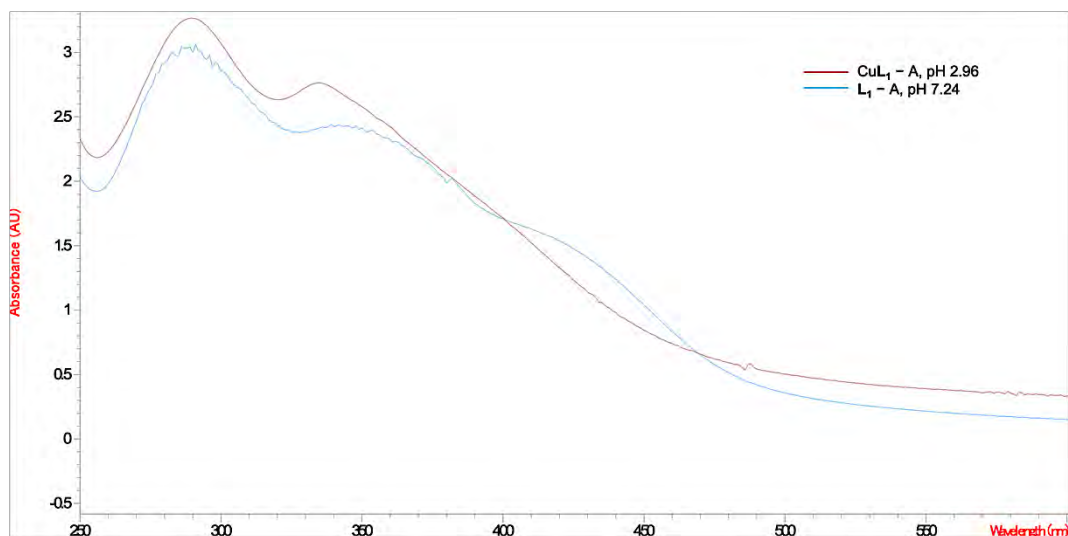
En la Figura 21 se muestran los espectros UV medidos en la titulación del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$ . En dicha figura, el primer espectro mostrado (línea negra continua) corresponde al inicio de la titulación, donde el complejo se encuentra a un pH de 7.21. Al aumentar el pH del medio, las bandas de absorbancia máxima del primer espectro (línea negra continua), que se encontraban a 288 y 345 nm, se desplazaron ligeramente a la derecha, hasta llegar a las longitudes de onda de 307 y 363 nm respectivamente a un pH de 12.0 (línea celeste discontinua), lo cual corresponde a un desplazamiento batocrómico (también llamado desplazamiento hacia el color rojo), o hacia mayores longitudes de onda. Además, se observa que los espectros poseen valles más profundos, lo cual genera que los picos posean mayor definición.

Este cambio de tendencia del espectro, al ir formándose valles más profundos y picos más pronunciados se observa a partir de un pH de 10 (línea verde discontinua). Esto se debe probablemente a la desprotonación de los grupos -OH que presenta la estructura, lo cual genera que el compuesto se estabilice y genere especies de resonancia. Esto genera que haya un desplazamiento hipercrómico de la longitud de onda de máxima absorbancia.



**Figura 21.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_1 - A$  en un rango de pH desde 2.96 hasta 12. Las flechas rojas corresponden al desplazamiento de las señales de pH neutro a pH básico.

Por otra parte, en un medio más ácido (migrando hacia pH 2.96) se observa que las bandas pertenecientes a 280 y 340 nm, sufren cambios en su absorbancia; la primera banda aumenta su absorbancia y la segunda prácticamente desaparece (este comportamiento se observa desde un pH de 3.81). Ello puede significar que a partir de ese pH (3.81) puede haber un cambio en la estructura, como lo es la disociación del metal, dando pie a la liberación del ligando. Comparando el espectro del complejo  $\text{CuL}_1 - A$  a un pH de 2.96 con el espectro del ligando (Figura 22), ambos espectros poseen grandes similitudes en la longitud de onda de máxima absorción y la forma del espectro, lo cual confirmaría esta hipótesis de disociación del complejo a ese pH.



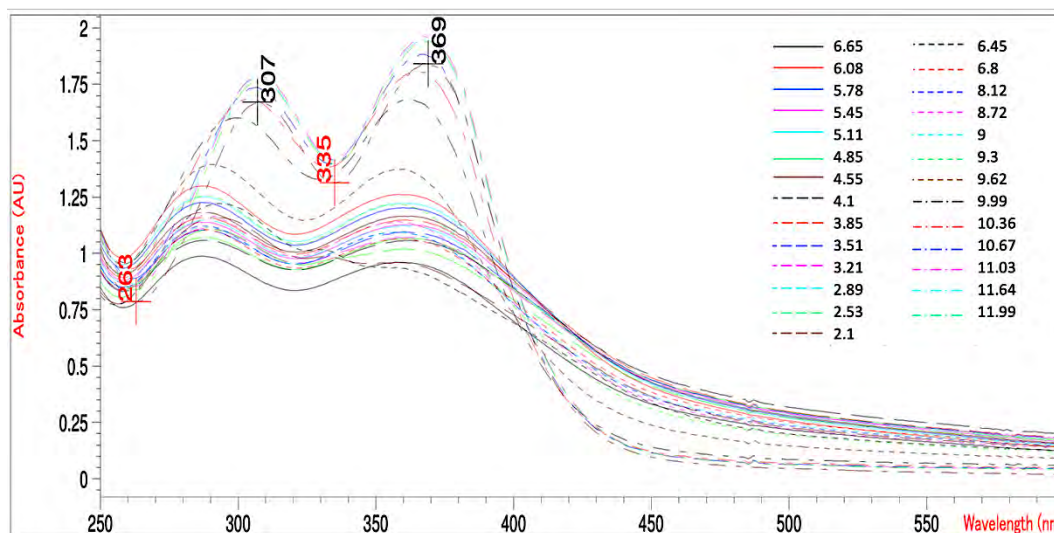
**Figura 22.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  a pH 2.96 y el ligando  $\text{L}_1 - \text{A}$  libre

Debido a lo mencionado, se puede inferir a partir de estos espectros que el rango de estabilidad de este complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  es de 4 a 12. Este es un rango bastante amplio de estabilidad, pues simulando escenarios del ingreso de un complejo en el cuerpo, este rango implica que no se perdería la estructura aún atravesando por una serie de tejidos, pues el pH del torrente sanguíneo y la mayoría de los sistemas biológicos del organismo oscila entre 6 y 8 (con excepción de los jugos gástricos).

Finalmente, con referencia a la apariencia física de los complejos en solución acuosa, se observa que este complejo precipita totalmente a pH muy ácidos, y se observa una película de color marrón verdoso en el fondo del recipiente. Esto puede deberse a que se ha disociado el metal del ligando, dando pie a la sedimentación del metal o de un compuesto desconocido de este.

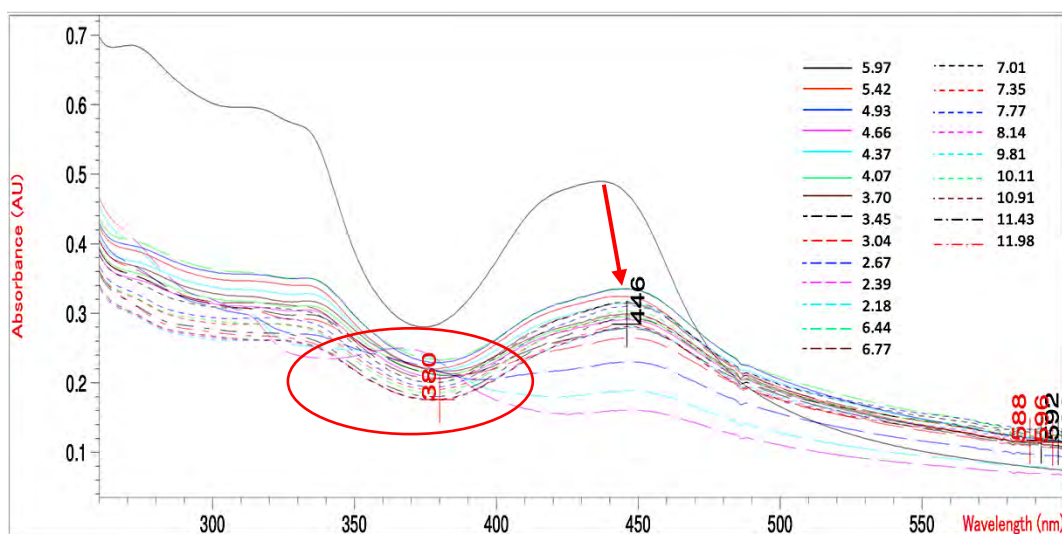
En la Figura 23 se muestran los espectros de la titulación espectrofotométrica del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$ . Se observa un comportamiento similar, con la forma de espectros y tendencia parecidas con respecto del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$ . Incluso también a un pH bastante ácido (alrededor de pH 3) se observa que la forma del espectro cambia siguiendo la misma tendencia. Asimismo, se analizó este espectro a pH ácido con el espectro del ligando y guardan la forma de la curva, por lo que también se puede concluir que, a pH ácido, el metal se disocia del ligando y se observa el espectro de este. Análogamente, a pH sumamente básico hay un desplazamiento de la señal hacia absorbancias mayores, por lo que se puede inferir

que también hay estabilización del complejo. Debido a lo mencionado, se puede concluir que este complejo es estable en un rango de pH entre 3 y 12.



**Figura 23.** Espectros UV – Vis del complejo  $CuL_2 - A$  en un rango de pH desde 2.10 hasta 12

En segundo lugar, se analizarán los espectros de los compuestos de los grupos C y D. En la Figura 24 se muestran los espectros colectados correspondientes al complejo  $CuL_6 - C$  en un rango de pH de 2 a 12. Un aspecto singular en el estudio de este complejo fue el pH obtenido al disolver en un medio de KCl, que fue de 5.97, lo cual significa que se encuentra en un ambiente levemente ácido. Así, al agregarle la primera gota del titulante ácido, se observa que la absorbancia máxima disminuye significativamente (ver flecha roja en la Figura 24). Esto ocurre por la relativa precipitación del complejo, con lo cual el cromóforo posee una menor concentración en la solución. Bajo esta misma línea, al reducir el pH de manera controlada (cada 0.4 unidades) hasta un pH de 2.18; es decir, un entorno mucho más ácido, aparece una banda de absorción a 370 nm (ver círculo rojo de la Figura 24). El espectro que se obtiene a este pH guarda una gran similitud con el espectro del ligando  $L_6 - C$  (mostrado en el Anexo 1), por lo que podría concluirse que a este pH el ligando se ha protonado y se ha separado del metal. Esto a su vez puede generar que el metal se disocie completamente de los demás sitios de coordinación y quedar como metal y ligando libre.

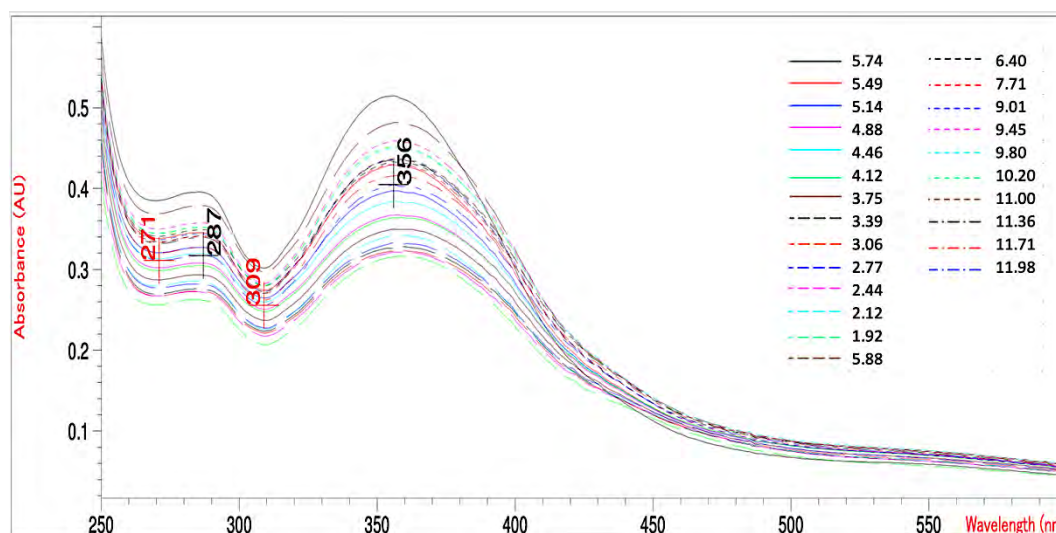


**Figura 24.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_6 - \text{C}$  en un rango de pH entre 2.18 y 11.98

Asimismo, al migrar hacia pH más básico; es decir, al agregarle gradualmente NaOH, se observa que en las primeras mediciones se obtiene un espectro muy similar que en entornos ácidos. Esto concuerda con la leve precipitación también observada al agregarle cierta cantidad de gotas de base. Sin embargo, este sedimento desaparece al seguir basificando la solución; esto probablemente se deba a que el ligando libre ha sido desprotonado por la base, debido a la presencia de hidrógenos ácidos, lo cual incrementa su polaridad, y por ende su solubilidad. La diferencia de este complejo y los complejos  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  y  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  es que en el primero no hay presencia de OH en su estructura, por lo que no se puede pensar que a pH básico el complejo se estabiliza. Esto pues, debido a que no hay una carga negativa del complejo que se ve estabilizada por algún fenómeno de resonancia.

Seguidamente, se tiene el análisis del complejo  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$ . Como se puede observar en la Figura 25, los espectros UV – Vis colectados para dicho compuesto se mantienen prácticamente inalterados en todo el rango de pH trabajado, confirmando la gran estabilidad de este compuesto en medio acuoso a pesar de los cambios pronunciados de pH (2 – 12). Cabe resaltar que este rango de pH es bastante útil para determinar si son estables en medios ácidos y básicos, puesto que el cuerpo

posee entornos de acidez o basicidad en un rango de pH de 6 a 8 en la mayoría de los sistemas.



**Figura 25.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$  en un rango de pH de 1.92 a 11.98

Asimismo, esta tendencia de estabilidad mostrada para el complejo  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$  se presenta en otros complejos, como  $\text{CuL}_8 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_9 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_{11} - \text{C}$ , y  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$ , cuyos correspondientes espectros se encuentran en el Anexo 4 al Anexo 7. En ellos se puede notar que no hay una tendencia pronunciada de pérdida de absorbancia al agregar las primeras gotas de ácido o base. Esto significa que dichos complejos no precipitan de manera abrupta, como le ocurre al complejo  $\text{CuL}_6 - \text{C}$ , mostrado en la Figura 24.

Finalmente, el complejo  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  tuvo menor solubilidad en comparación con todos los demás compuestos estudiados del grupo C y D. Empíricamente, este complejo precipitó al agregarle unas gotas de ácido y base, por lo que no fue posible determinar el rango de estabilidad en este caso. Este complejo posee como grupo diferenciador un *tert* – butilo y la amina precursora de este ligando posee dos carbonos. Debido a ello, el ambiente es relativamente más apolar que los otros compuestos estudiados, por lo que precipitaría en el medio con ligeros cambios de pH.

En la Tabla 4 se muestra los rangos de pH donde este estudio ha determinado que los complejos son estables en solución acuosa. Se observa, que, si bien el valor



mínimo difiere, los valores máximos se mantienen constante hasta un pH de 12. En los complejos  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  y  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  se observa que hay una tendencia a la disociación del complejo y formación del ligando, así como en el complejo  $\text{CuL}_6 - \text{C}$ , a pH bastante ácidos. Sin embargo, el rango de estabilidad se mantiene cuando el complejo no se expone a entornos sumamente ácidos; debido a ello, la ventana de análisis es un poco más corta que en los demás complejos, pero es suficiente para poder determinar que todos los complejos estudiados poseen gran estabilidad al someterlos a entornos fisiológicos de acidez o basicidad.

**Tabla 4.** Rango de pH donde los complejos se mantienen estables en solución acuosa

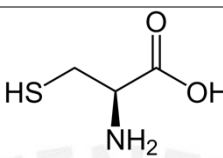
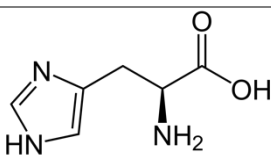
Complejo	Rango de pH donde el complejo se mantiene estable en solución acuosa
$\text{CuL}_1 - \text{A}$	4 – 12
$\text{CuL}_2 - \text{A}$	3 – 12
$\text{CuL}_6 - \text{C}$	3 – 12
$\text{CuL}_8 - \text{C}$	3 – 12
$\text{CuL}_9 - \text{C}$	3 – 12
$\text{CuL}_{11} - \text{C}$	3 – 12
$\text{CuL}_{12} - \text{D}$	2 – 12
$\text{CuL}_{13} - \text{D}$	3 – 10

## 5.2. Estabilidad cinética

El tercer análisis realizado para determinar la estabilidad de los complejos mostrados en la Figura 14 es el estudio de la estabilidad cinética. En este estudio se utilizarán dos aminoácidos que se comportan como posibles ligandos de competencia en sistemas biológicos, la cisteína (Cys) e histidina (His). La estructura de los compuestos y demás propiedades importantes se muestran en la Tabla 5. Como características generales se puede observar que la cisteína es un aminoácido esencial que posee un grupo tiol como resto. El carboxilo es el grupo más ácido (pKa de 1.71). Esto significa que a pH 7 el compuesto se encuentra desprotonado y cargado. Por otro lado, se tiene la histidina, que es un aminoácido de gran abundancia en el cuerpo y posee un peso molecular casi similar a la cisteína, pero

a diferencia de ella, posee un anillo imidazol unido al carbono que se encuentra en la cadena central del compuesto.

**Tabla 5.** Información de los aminoácidos utilizados en el estudio de la estabilidad cinética

Compuesto	Cisteína (Cys)	Histidina (His)
Estructura		
Peso molecular	121.15 g/mol	155.15 g/mol
Solubilidad	0.27 g/mL	0.045 g/mL
pKa1 (COOH)	1.71	1.78
pKa2 (NH2)	8.33	8.97
pKa (cadena lateral)	10.78	5.97

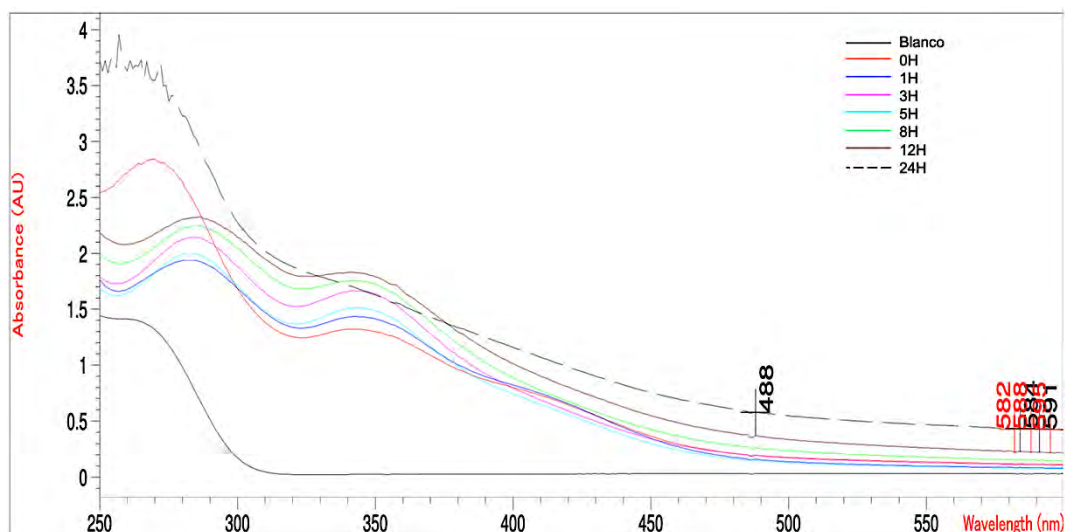
Se utilizó estos compuestos debido a que en sus restos poseen grupos tiolato y anillo imidazol, ricos en átomos de S y N. Adicionalmente, estos compuestos se encuentran en gran proporción dentro de las proteínas del cuerpo, por lo que, al ser tan afines al cobre, podrían desplazar a los ligandos de los complejos estudiados y generar una coordinación con el metal, lo que significaría una descomposición del pro-fármaco.

Se analizaron los complejos usando las condiciones mostradas en la Tabla 6, además de la concentración de DMSO mostrada en la Tabla 2. Se incubaron los complejos en presencia de aminoácido en proporción cercana a 5000:1 aminoácido: complejo con la finalidad de generar un entorno abundante en el aminoácido, y así simular el entorno que el compuesto tendrá al ingresar al torrente sanguíneo. También, se utilizó un ambiente controlado en temperatura y humedad, pues 37 °C es la principal temperatura de cultivo de sistemas biológicos. Se midieron los espectros de los complejos durante las 0, 1, 3, 5, 8, 12 y 24 horas, completando así 24 horas de análisis. Adicionalmente, el espectro del aminoácido libre se midió como referencia (el blanco se representa con una línea continua negra en todos los grupos de espectros que se mostrarán a continuación).

**Tabla 6.** *Condiciones de análisis de los complejos estudiados*

<b>Condiciones</b>	
<b>Tiempo de análisis</b>	24 horas
<b>Temperatura de la incubadora</b>	37 °C
<b>Humedad relativa</b>	80 %
<b>Concentración del complejo</b>	10 $\mu$ M
<b>Ventana de medición</b>	250 – 600 nm
<b>Concentración del aminoácido</b>	0.1 M

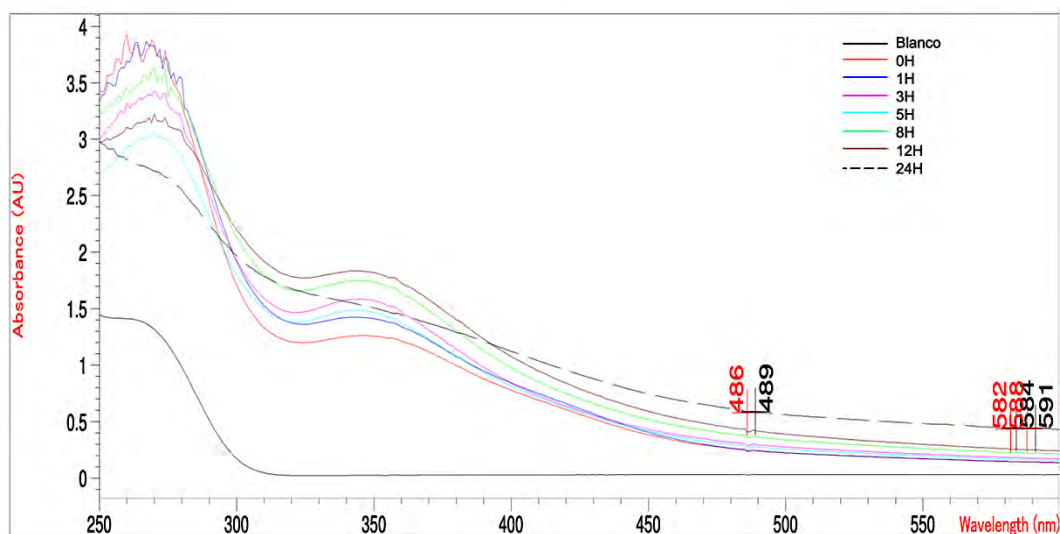
Los espectros obtenidos en el estudio de estabilidad cinética del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  se observan en la Figura 26. En los espectros obtenidos a las 1, 3, 5, 8 y 12 horas del estudio se observa que el compuesto  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  se mantiene presente en el medio, debido a la presencia de las bandas de máxima absorción del complejo a 280 y 340 nm. Sin embargo, a las 24 horas es notable el cambio drástico sufrido en el espectro de la muestra; en este las bandas de absorción características del complejo desaparecen definitivamente, quedando así solo una banda de absorción a 260 nm. Este espectro muestra mucha mayor absorbancia que los demás, además de tener una forma totalmente diferente. Una observación particular fue el espectro obtenido al inicio del estudio, que muestra picos de absorción a 280, 340 y 420 nm, muy similares a los del ligando  $\text{L}_1 - \text{A}$  libre, mostrado en la Figura 15, línea negra. Debido a ello se puede concluir que hay evidencia de la presencia del complejo durante todo el análisis, además de la aparición y crecimiento de la banda a 340 nm, que puede indicar la aparición de una especie de naturaleza desconocida a las 24 horas con un pico de absorción máximo a 260 nm.



**Figura 26.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  en presencia de cisteína durante las primeras 24 h de análisis

En la Figura 27 se muestran los espectros obtenidos del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  incubado en cisteína durante 24 horas. Se puede observar que los espectros del complejo entre 0 y 12 horas guardan similitud entre sí. Tomando como referencia el espectro del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$ , a pH fisiológico mostrado en la Figura 16, se observa que guarda concordancia tanto en longitud de onda como en amplitud de la señal (la absorbancia mostrada en la Figura 27, a 275 nm, se ve incrementada debido a que se tiene que adicionar la absorbancia del aminoácido libre). Finalmente, a las 24 horas, se observa que hay un cambio en la tendencia de absorbancia del complejo, por lo que se puede conjeturar que se ha disociado y generado otro compuesto de estructura no conocida (no se observó formación de precipitado).

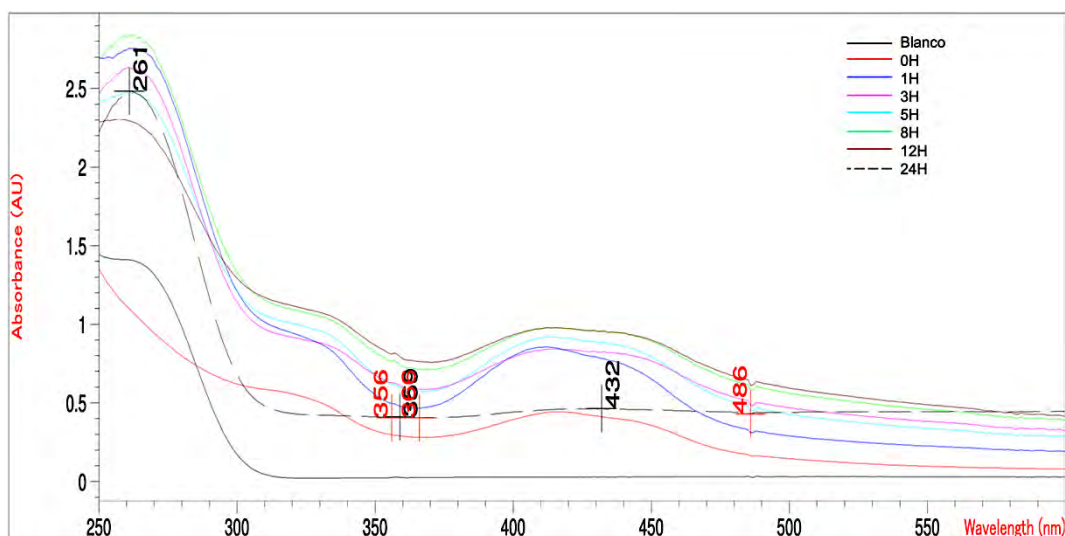
La diferencia entre el complejo  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  y  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  radica en que el primero posee una diamina precursora de tres carbonos en su estructura, mientras que, en el segundo, la amina posee dos carbonos. En el primer caso, los dos N y el Cu forman un anillo de seis miembros con la cadena alifática, mientras que en el segundo caso estos mismos átomos forman un anillo de cinco miembros. Este último entonces debería formar un anillo de coordinación más rígido con el Cu, y por ende ser menos susceptible a la descoordinación del átomo central. Sin embargo, no se observa una diferencia significativa en el comportamiento de estos dos complejos dentro de las 12 primeras horas del estudio.



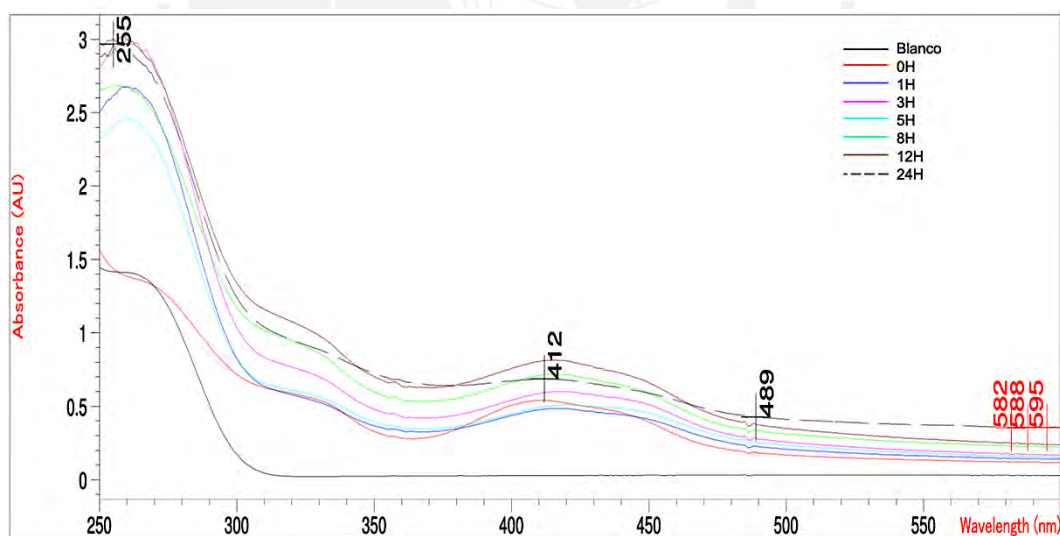
**Figura 27.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_2 - A$  en presencia de cisteína en una ventana de 24 horas

Los espectros UV – Vis mostrados en las Figura 28 y Figura 29 corresponden al estudio de los complejos  $\text{CuL}_6 - C$  y  $\text{CuL}_8 - C$ , respectivamente, en presencia de cisteína; estos conjuntos de espectros son representativos a aquellos complejos del grupo C. Para el complejo  $\text{CuL}_6 - C$  se puede observar que el espectro de línea continua roja, correspondiente al tiempo de 0 horas, es congruente con el espectro del complejo a pH fisiológico (ver Anexo 1). Los espectros a 1, 3, 5, 8 y 12 horas guardan características similares, pues siguen la misma tendencia y picos de máxima absorbancia, que a su vez guardan congruencia con el espectro del complejo medido a pH fisiológico. Finalmente, a las 24 horas se observa una caída abrupta de absorbancia en todo el rango de análisis, con excepción de la banda a 261 nm, además de un aumento de la línea base. Este proceso puede deberse a la precipitación del complejo, y esta banda puede pertenecer al aminoácido cisteína.

Del mismo modo, los espectros del estudio del complejo  $\text{CuL}_8 - C$  son mostrados en la Figura 29. Este complejo, en las primeras 12 horas de análisis conserva la tendencia en sus señales, que a su vez es similar a la tendencia del complejo a pH fisiológico (ver Figura 17, línea roja). De manera similar que el anterior complejo se observa que a las 24 horas de estudio parte de las bandas que se presentaban en las anteriores curvas desaparecen, lo cual se puede atribuir nuevamente a la precipitación del complejo o a su descomposición.



**Figura 28.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_6 - \text{C}$  en presencia de cisteína durante las primeras 24 h de análisis



**Figura 29.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_8 - \text{C}$  en presencia de cisteína durante las primeras 24 h de análisis

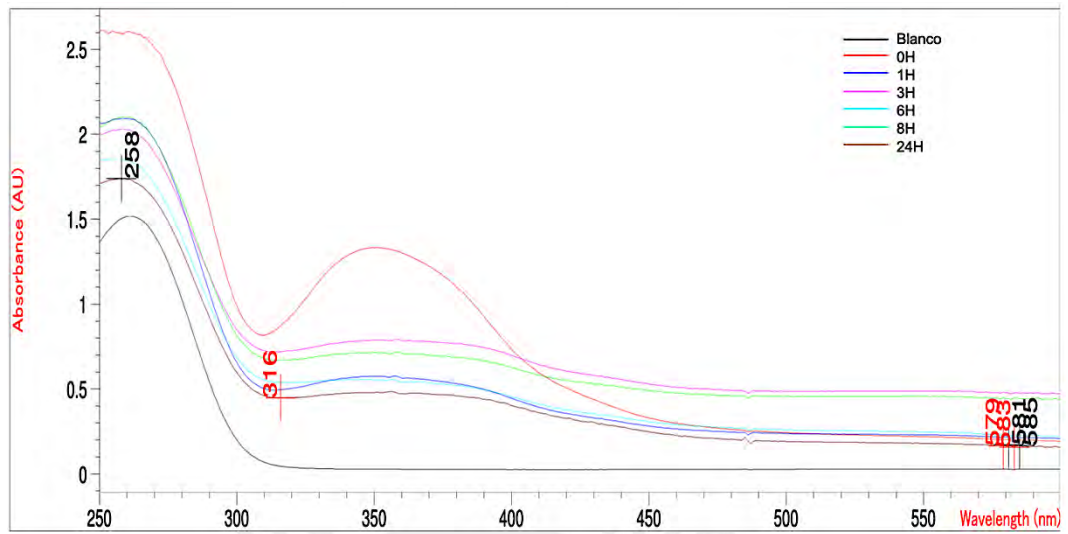
Para una comparación de tendencias en los complejos estudiados, se muestran los espectros obtenidos del estudio del complejo  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$  en la Figura 30. De acuerdo con lo observado y discutido se puede concluir que el tiempo que los complejos  $\text{CuL}_6 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_8 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_9 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  y  $\text{CuL}_{11} - \text{C}$  (cuyos espectros se muestran

en los Anexo 8 al Anexo 10) se mantienen estables debido a que la tendencia de las curvas en los tiempos analizados varía de manera que los dos primeros permanecen estables durante al menos 12 horas y los tres últimos disminuyen el tiempo en el cual se mantienen inalterados.

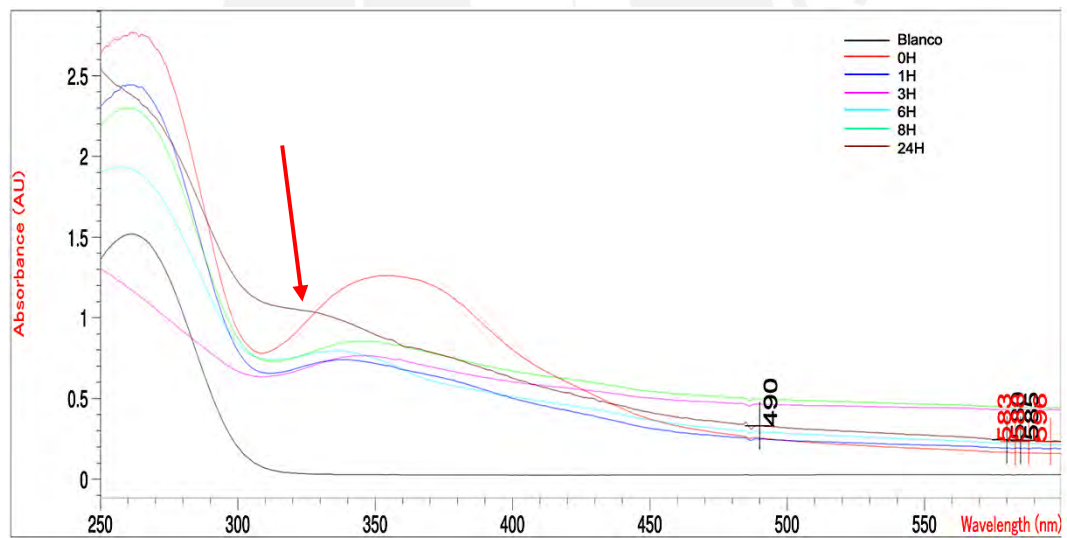
Una observación importante que cabe mencionar en este estudio es el fenómeno de precipitación de las mezclas estudiadas de los complejos incubados en cisteína. Se observa que al término del análisis (24 horas) los complejos del grupo C presentaban turbidez y sedimentación en el fondo del recipiente, por lo que se puede inferir que posiblemente la caída de absorción de las bandas características de estos grupos de complejos se deba a la precipitación de estos. Esto fue aún más evidente en los complejos estudiados del grupo D, como se discute a continuación.

Los espectros UV – Vis mostrados en las Figura 29 y Figura 30 corresponden al estudio de los complejos  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$  y  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$ , respectivamente, incubados en presencia de cisteína durante 24 horas de análisis. En el caso del complejo  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$  se observa una marcada caída de la absorbancia en la banda a 350 nm en la primera hora del análisis, lo cual se explicaría por la marcada precipitación del complejo observada después de este tiempo. Sin embargo, el compuesto que queda disuelto parecería mantenerse constante incluso hasta las 24 horas del ensayo.

En el caso del estudio del complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$  (Figura 31), a pesar de observarse también una caída en la absorbancia después de la primera hora debido a la precipitación, se observa que lo que queda en solución se mantiene constante por las 8 primeras horas del ensayo. Sin embargo, en la curva mostrada a 24 horas se observa la formación de una nueva señal (indicada con la flecha roja) a una longitud de onda de 320 nm. Esta aparición puede deberse a la formación de un compuesto nuevo, lo cual significaría que el ligando pudo haberse dissociado del metal y haber formado un complejo con cisteína, cuya longitud de onda se encuentra en dicha zona. Cabe mencionar que la banda señalada a las 24 horas no guarda relación con el ligando, por lo que no podría ser asignada al ligando libre. Finalmente, en la Tabla 7 se enlista el rango de estabilidad de los complejos estudiados.



**Figura 30.** Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>12</sub> – D en presencia de cisteína durante las primeras 24 h de análisis



**Figura 31.** Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>13</sub> – D en una ventana de 24 horas frente a cisteína

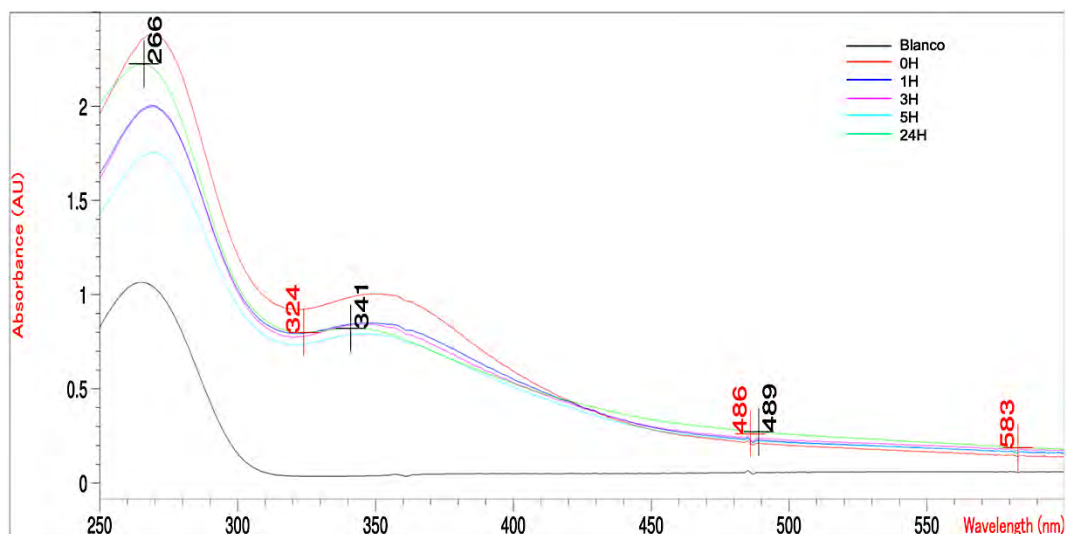


**Tabla 7.** Resumen de el intervalo en el que los complejos estudiados se mantienen estables en presencia de cisteína

Complejo	Rango de estabilidad
<b>CuL<sub>1</sub> – A</b>	12 h
<b>Cu L<sub>2</sub> – A</b>	12 h
<b>CuL<sub>6</sub> – C</b>	12 h
<b>CuL<sub>8</sub> – C</b>	12 h
<b>CuL<sub>9</sub> – C</b>	6 h
<b>CuL<sub>10</sub> – C</b>	6 h
<b>CuL<sub>12</sub> – D</b>	Precipita de manera considerable
<b>CuL<sub>13</sub> – D</b>	Precipita de manera considerable

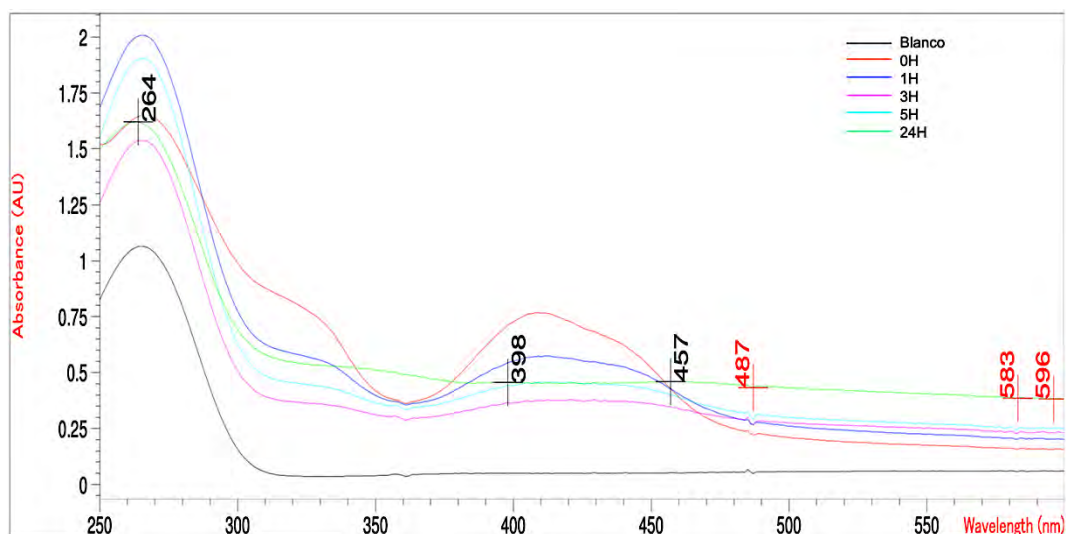
Otro aminoácido empleado en las pruebas de estabilidad cinética de los complejos de cobre (II) fue la histidina (His). De la misma forma que con la Cys, se incubó cada complejo del grupo A, C y D en una proporción de 5000:1 complejo: histidina y se realizó mediciones por triplicado.

La Figura 32 muestra el comportamiento del complejo CuL<sub>2</sub> – A en presencia de histidina durante las 24 horas de análisis. Se puede observar que este complejo posee muy poca variabilidad en sus señales, por lo que los espectros están bastante conservados entre sí durante este rango de análisis. Este comportamiento es representativo de los complejos del grupo A (los correspondientes espectros del estudio de CuL<sub>2</sub> – A se encuentran en el Anexo 11), por lo que se puede inferir que tanto el complejo CuL<sub>1</sub> – A como el complejo CuL<sub>2</sub> – A se mantienen estables en un entorno rico en histidina durante las 24 horas de análisis.



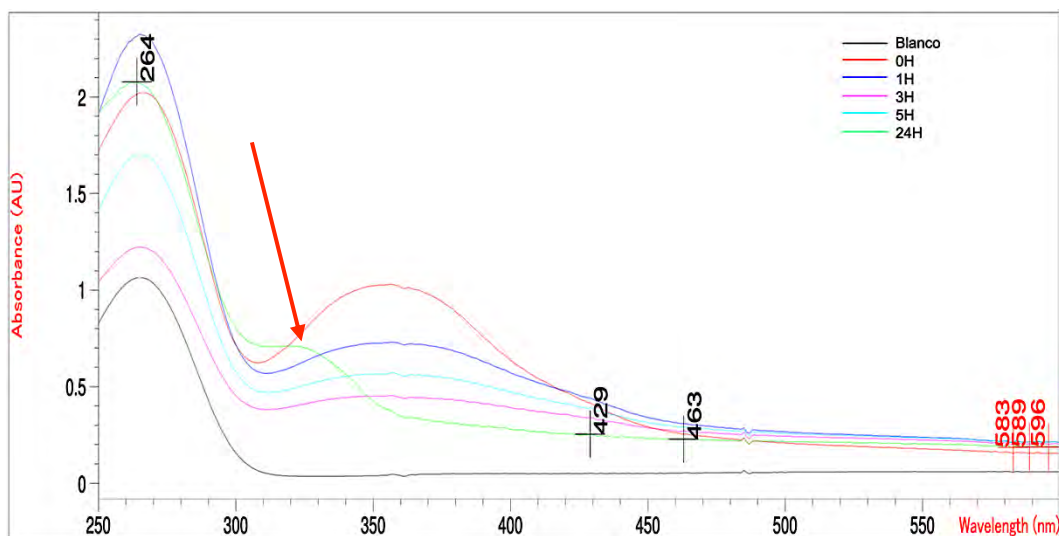
**Figura 32.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  en presencia de histidina en una ventana de 24 horas

En la Figura 33 se muestran los resultados del análisis realizado del complejo  $\text{CuL}_6 - \text{C}$  en presencia de histidina. A diferencia del complejo  $\text{CuL}_2 - \text{A}$ , en este caso se observa que las señales y sus absorbancias van cambiando progresivamente con el tiempo, y que a las 24 horas el espectro ha cambiado por completo. La tendencia es congruente con los espectros de los complejos mostrados anteriormente en el estudio con Cys, donde se observa una reducción significativa de la absorbancia máxima. Estos espectros demuestran que la estabilidad del complejo en presencia de histidina es constante durante un periodo de 5 horas. Esta tendencia de estabilidad cinética es representativa para los complejos  $\text{CuL}_8 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_9 - \text{C}$ ,  $\text{CuL}_{10} - \text{C}$  y  $\text{CuL}_{12} - \text{C}$ , cuyos correspondientes espectros se encuentran en los Anexo 12 al Anexo 16.



**Figura 33.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_6 - \text{C}$  en presencia de histidina en una ventana de 24 horas

Finalmente, los espectros del complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$  medidos durante 24 horas se presentan en la Figura 34. De manera similar que en los compuestos expuestos en párrafos anteriores la estabilidad cinética se mantiene constante, en este caso, durante por lo menos 5 horas. Sin embargo, a 24 horas se observa que el complejo cambia de patrón de señales, pues se observa que aparece una banda de absorción a 330 nm. Esta banda no guarda concordancia con la banda del complejo o del ligando libre, por lo que se puede inferir que dicho complejo se disocia y forma un compuesto de naturaleza desconocida con histidina. Finalmente, en la Tabla 8 se enlista el rango de estabilidad de los complejos estudiados frente a este aminoácido.



**Figura 34.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$  en una ventana de 24 horas frente a histidina

**Tabla 8.** Resumen de el intervalo en el que los complejos estudiados se mantienen estables en presencia de histidina

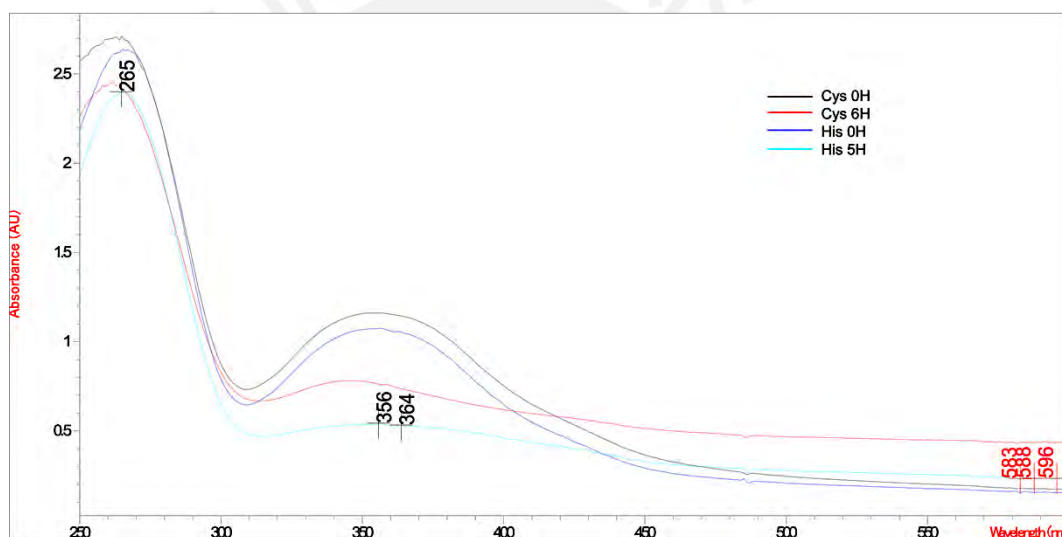
Complejo	Rango de estabilidad
$\text{CuL}_1 - \text{A}$	24 h
$\text{CuL}_2 - \text{A}$	24 h
$\text{CuL}_6 - \text{C}$	3 h
$\text{CuL}_8 - \text{C}$	1 h
$\text{CuL}_9 - \text{C}$	5 h
$\text{CuL}_{10} - \text{C}$	3 h
$\text{CuL}_{12} - \text{D}$	5 h
$\text{CuL}_{13} - \text{D}$	5 h

En comparación, las tendencias de estabilidad de los complejos analizados frente a cisteína e histidina son relativamente similares, donde los complejos que presentan estabilidad por un tiempo más prolongado son  $\text{CuL}_1 - \text{A}$  y  $\text{CuL}_2 - \text{A}$  en presencia de ambos aminoácidos. Sin embargo, se observa que en presencia de cisteína los complejos del grupo A presentan cambios antes de las 24 horas, mientras que en presencia de histidina se mantienen inalterados durante todo el análisis.

Los complejos del grupo C y el complejo  $\text{CuL}_{12} - \text{D}$  muestran un escenario contrario

al descrito en el párrafo anterior. Estos compuestos presentan mejor estabilidad cinética en presencia de cisteína en comparación con histidina.

Finalmente, el complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$  precipita levemente tanto en presencia de cisteína (6h) como histidina (5h). Posterior a ello, se observa que a las 24 horas el espectro del complejo cambia y genera una banda de absorción aproximadamente entre 320 y 330 nm. Se puede observar en la Figura 35 en el tiempo límite de estabilidad los espectros poseen gran similitud, por lo que se puede comprobar que predomina la precipitación del complejo en ambos casos frente a la formación de un compuesto desconocido.



**Figura 35.** Espectros UV – Vis del complejo  $\text{CuL}_{13} - \text{D}$  en presencia de cisteína e histidina en condiciones iniciales (0 horas) y al límite de estabilidad (5 horas para histidina y 6 horas para cisteína)

En base a estos resultados, algunos complejos mostraron ser lo suficientemente estables tanto cinética como termodinámicamente, pues se analizó varios escenarios donde estos complejos podrían disociarse para dar paso a la precipitación y el ligando libre, o la formación de nuevos complejos. En resumen, el panorama general del estudio de estabilidad se muestra en la Tabla 9.

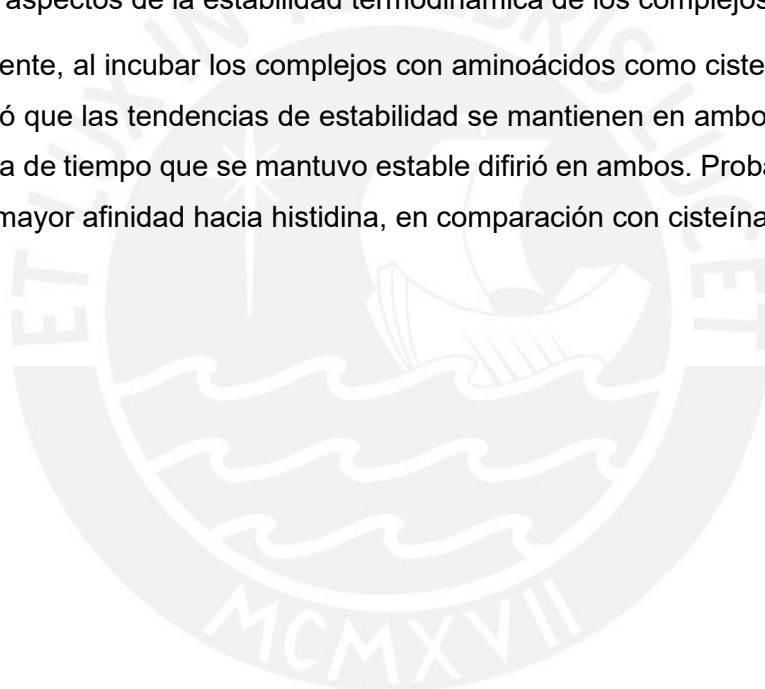
**Tabla 9.** Resumen general del estudio de estabilidad de los complejos

	Solubilidad en DMSO	Estabilidad en pH fisiológico	Estabilidad en un rango de pH	Estabilidad cinética usando cisteína	Estabilidad cinética usando histidina
<b>CuL<sub>1</sub> – A</b>	5%	Estable	3.20 – 12	12 h	24 h
<b>Cu L<sub>2</sub> – A</b>	5%	Estable	2.89 – 12	12 h	24 h
<b>CuL<sub>3</sub> – B</b>	Insoluble	-	-	-	-
<b>CuL<sub>4</sub> – B</b>	Insoluble	-	-	-	-
<b>CuL<sub>5</sub> – B</b>	Insoluble	-	-	-	-
<b>CuL<sub>6</sub> – C</b>	5%	Estable	3.04 – 12	12 h	3 h
<b>CuL<sub>8</sub> – C</b>	5%	Estable	2.35 – 12	12 h	1 h
<b>CuL<sub>9</sub> – C</b>	5%	Estable	2.14 – 12	6 h	5 h
<b>CuL<sub>10</sub> – C</b>	10%	Estable	2.38 – 12	6 h	3 h
<b>CuL<sub>11</sub> – C</b>	10%	Estable	Precipita	-	-
<b>CuL<sub>12</sub> – D</b>	5%	Estable	1.92 – 12	Precipita	5 h
<b>CuL<sub>13</sub> – D</b>	10%	Estable	2.64 – 10	Precipita	5 h
<b>CuL<sub>14</sub> – D</b>	Insoluble	-	-	-	-
<b>CuL<sub>15</sub> – D</b>	Insoluble	-	-	-	-

De toda la información detallada se puede extraer que los complejos derivados de resveratrol (Grupo A) fueron los que tuvieron mejores resultados, pues son solubles en un entorno casi totalmente acuoso, permanecen estables tanto a pH fisiológico, como en un rango bastante amplio de este. Además, son estables cinéticamente en ambientes con una alta presencia de ligandos con buena afinidad hacia el cobre.

También se tiene que algunos de los complejos derivados de benzotiazol no son solubles en ambientes acuosos, ni aún con una presencia de 30% DMSO, como lo son el  $\text{CuL}_{14} - \text{D}$  y  $\text{CuL}_{15} - \text{D}$ . Asimismo, el rango de pH en el que los complejos permanecen estables es de 4 a 12, siendo este intervalo suficiente para determinar ciertos aspectos de la estabilidad termodinámica de los complejos.

Finalmente, al incubar los complejos con aminoácidos como cisteína o histidina, se observó que las tendencias de estabilidad se mantienen en ambos análisis, pero la ventana de tiempo que se mantuvo estable difirió en ambos. Probablemente debido a una mayor afinidad hacia histidina, en comparación con cisteína.



## 6. Conclusiones

- Se logró determinar la solubilidad de los complejos funcionalizados con estilbena y benzotiazol. De estos se obtuvo que aquellos derivados de resveratrol son los más solubles, seguidos de aquellos derivados de benzotiazol. Por el contrario, los complejos derivados de estilbena, que poseen un grupo *metoxi* en su estructura fueron totalmente insolubles.
- Se logró determinar la estabilidad termodinámica a pH fisiológico de los complejos funcionalizados con resveratrol y benzotiazoles. Este análisis arrojó que, en una ventana corta de 8 horas de análisis, los complejos se mantienen estables y con escasa precipitación.
- Se logró determinar la estabilidad termodinámica en un intervalo de pH para estos compuestos. Se obtuvo que los complejos CuL<sub>1</sub> - A, CuL<sub>2</sub> - A, CuL<sub>6</sub> - C, CuL<sub>8</sub> - C, CuL<sub>9</sub> - C, CuL<sub>10</sub> - C, CuL<sub>12</sub> - D y CuL<sub>13</sub> - D se mantienen estables en un rango amplio de pH (de 4 a 12), por lo que pueden resistir entornos de cambios de pH en el torrente sanguíneo.
- De los complejos estables termodinamicamente se llegó a la determinación que en entornos altamente básicos (pH ~ 12) los complejos que poseen grupos -OH en su estructura se estabilizan en gran medida. Por el contrario, cuando se tiene un entorno altamente ácido, el complejo se disocia y promueve la liberación del ligando y seguida de la precipitación del metal.
- Se logró determinar la estabilidad de los complejos estudiados frente a ligandos de competencia como cisteína e histidina. Nuevamente, los compuestos más estables fueron el CuL<sub>1</sub> - A y el CuL<sub>2</sub> - A (de 12 a 24 horas de estabilidad). En otros casos como CuL<sub>6</sub> - C, CuL<sub>8</sub> - C y CuL<sub>9</sub> - C se observó la disociación del complejo en periodos entre las 3 y 12 horas.



## 7. Recomendaciones

- Se recomienda continuar con los estudios de estabilidad de los complejos funcionalizados a partir de resveratrol y benzotiazoles. En el primer grupo de complejos se observó que la solubilidad es bastante óptima, por lo que se pueden realizar más estudios de estabilidad en medios de cultivo o medios simulados de sangre.
- Se recomienda seguir con las pruebas de citotoxicidad, afinidad a placas amiloides y la determinación de la constante de formación de todos los complejos analizados.
- Se recomienda elaborar un método HPLC para determinar la pureza, con miras a la próxima etapa de radiomarcado. Las columnas por utilizar más convenientes para este análisis podrían ser RP – 18 o RP – 8, debido a que poseen fases estacionarias apolares y son ampliamente usadas en la bibliografía.

## 8. Bibliografía

- (1) Gomes, L. M. F.; Bataglioli, J. C.; Storr, T. Metal Complexes That Bind to the Amyloid- $\beta$  Peptide of Relevance to Alzheimer's Disease. *Coord. Chem. Rev.* **2020**, *412*, 213255. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213255>.
- (2) Long, J. M.; Holtzman, D. M. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* **2019**, *179* (2), 312–339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>.
- (3) Alzbeidi, N.; Phaterpekar, H.; Al-Sinawi, H. Alzheimer's Dementia - A Narrative Review. *World Fam. Med.* **2022**, *20* (1), 152–165. <https://doi.org/10.5742/MEWFM.2022.95221>.
- (4) Bondi, M. W.; Edmonds, E. C.; Salmon, D. P. Alzheimer's Disease: Past, Present, and Future. *J. Int. Neuropsychol. Soc.* **2017**, *23* (9–10), 818–831. <https://doi.org/10.1017/S135561771700100X>.
- (5) Apostolova, L. G. Alzheimer Disease. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* **2016**, *22* (2, Dementia), 419–434. <https://doi.org/10.1212/CON.0000000000000307>.
- (6) Petrella, J. R. Neuroimaging and the Search for a Cure for Alzheimer Disease. *Radiology* **2013**, *269* (3), 671–691. <https://doi.org/10.1148/radiol.13122503>.
- (7) Szymański, P.; Frączek, T.; Markowicz, M.; Mikiciuk-Olasik, E. Development of Copper Based Drugs, Radiopharmaceuticals and Medical Materials. *BioMetals* **2012**, *25* (6), 1089–1112. <https://doi.org/10.1007/s10534-012-9578-y>.
- (8) Schroeder, H. A.; Nason, A. P. Trace-Element Analysis in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* **1971**, *17* (6), 461–474. <https://doi.org/10.1093/clinchem/17.6.461>.
- (9) Cho, H.-J.; Huynh, T. T.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Design of a Multivalent Bifunctional Chelator for Diagnostic  $^{64}\text{Cu}$  PET Imaging in Alzheimer's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2020**, *117* (49), 30928–30933. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014058117>.
- (10) Barnard, P. J.; Bayly, S. R.; Holland, J. P.; Dilworth, J. R.; Waghorn, P. A. In Vitro Assays for Assessing the Potential for Copper Complexes to Function as Radiopharmaceutical Agents. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *52* (3), 235–244.

- (11) Vaupel, J. W.; Villavicencio, F.; Bergeron-Boucher, M. P. Demographic Perspectives on the Rise of Longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2021**, *118* (9), 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.2019536118>.
- (12) Fantini, J.; Chahinian, H.; Yahi, N. Progress toward Alzheimer's Disease Treatment: Leveraging the Achilles' Heel of A $\beta$  Oligomers? *Protein Sci.* **2020**, *29* (8), 1748–1759. <https://doi.org/10.1002/pro.3906>.
- (13) Deeksha, K.; Abhishek, N. A Review on Alzheimer Disease. *Int. J. Neurodegener. Disord.* **2019**, *2* (1). <https://doi.org/10.23937/2643-4539/1710010>.
- (14) Koran, M. E. Neuroimaging and Alzheimer's Disease. *Practical Neurology*. 2019, pp 276–283.
- (15) Duyckaerts, C.; Delatour, B.; Potier, M.-C. Classification and Basic Pathology of Alzheimer Disease. *Acta Neuropathol.* **2009**, *118* (1), 5–36. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0532-1>.
- (16) F. Lichtenthaler, S. Alpha-Secretase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein: Proteolysis Regulated by Signaling Pathways and Protein Trafficking. *Curr. Alzheimer Res.* **2012**, *9* (2), 165–177. <https://doi.org/10.2174/156720512799361655>.
- (17) Turner, R. S.; Stubbs, T.; Davies, D. A.; Albeni, B. C. Potential New Approaches for Diagnosis of Alzheimer's Disease and Related Dementias. *Front. Neurol.* **2020**, *11* (June), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fneur.2020.00496>.
- (18) Forlenza, O. V.; Diniz, B. S.; Gattaz, W. F. Diagnosis and Biomarkers of Predementia in Alzheimer's Disease. *BMC Med.* **2010**, *8* (1), 89. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-89>.
- (19) Yap, J.; Hoffman, J. What is PET? - Information for patients <https://uofuhealth.utah.edu/huntsman/cqci/clinical-patient-imaging/information-for-patients.php> (accessed May 2, 2022).
- (20) Wadsak, W.; Mitterhauser, M. Basics and Principles of Radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur. J. Radiol.* **2010**, *73* (3), 461–469. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2009.12.022>.
- (21) Basu, S.; Kwee, T. C.; Surti, S.; Akin, E. A.; Yoo, D.; Alavi, A. Fundamentals of PET and PET/CT Imaging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2011**, *1228* (1), 1–18.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06077.x>.

- (22) Bao, W.; Xie, F.; Zuo, C.; Guan, Y.; Huang, Y. H. PET Neuroimaging of Alzheimer's Disease: Radiotracers and Their Utility in Clinical Research. *Front. Aging Neurosci.* **2021**, *13* (May), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.624330>.
- (23) Chen, K.; Chen, X. Design and Development of Molecular Imaging Probes. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10* (12), 1227–1236. <https://doi.org/10.2174/156802610791384225>.
- (24) Duan, J.; Liu, Y.; Wu, H.; Wang, J.; Chen, L.; Chen, C. L. P. Broad Learning for Early Diagnosis of Alzheimer's Disease Using FDG-PET of the Brain. *Front. Neurosci.* **2023**, *17*. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1137567>.
- (25) Pietrzak, K.; Czarnecka, K.; Mikiciuk-Olasik, E.; Szymanski, P. New Perspectives of Alzheimer Disease Diagnosis – the Most Popular and Future Methods. *Med. Chem. (Los Angeles)*. **2018**, *14* (1), 34–43. <https://doi.org/10.2174/1573406413666171002120847>.
- (26) Rabinovici, G. D.; Rosen, H. J.; Alkalay, A.; Kornak, J.; Furst, A. J.; Agarwal, N.; Mormino, E. C.; O'Neil, J. P.; Janabi, M.; Karydas, A.; Growdon, M. E.; Jang, J. Y.; Huang, E. J.; DeArmond, S. J.; Trojanowski, J. Q.; Grinberg, L. T.; Gorno-Tempini, M. L.; Seeley, W. W.; Miller, B. L.; Jagust, W. J. Amyloid vs FDG-PET in the Differential Diagnosis of AD and FTLD. *Neurology* **2011**, *77* (23), 2034–2042. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31823b9c5e>.
- (27) Lau, J.; Rousseau, E.; Kwon, D.; Lin, K.-S.; Bénard, F.; Chen, X. Insight into the Development of PET Radiopharmaceuticals for Oncology. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12* (5), 1312. <https://doi.org/10.3390/cancers12051312>.
- (28) Winiwarter, S.; Ridderström, M.; Ungell, A.-L.; Andersson, T. B.; Zamora, I. Use of Molecular Descriptors for Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion Predictions. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*; John B. Taylor, D. J. T., Ed.; Elsevier, 2007; Vol. 5, pp 531–554. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00140-1>.
- (29) Stocks, M. The Small Molecule Drug Discovery Process – from Target Selection to Candidate Selection. In *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*; Robin, G., Stanley, R., Roy, J., Eds.; Elsevier, 2013;

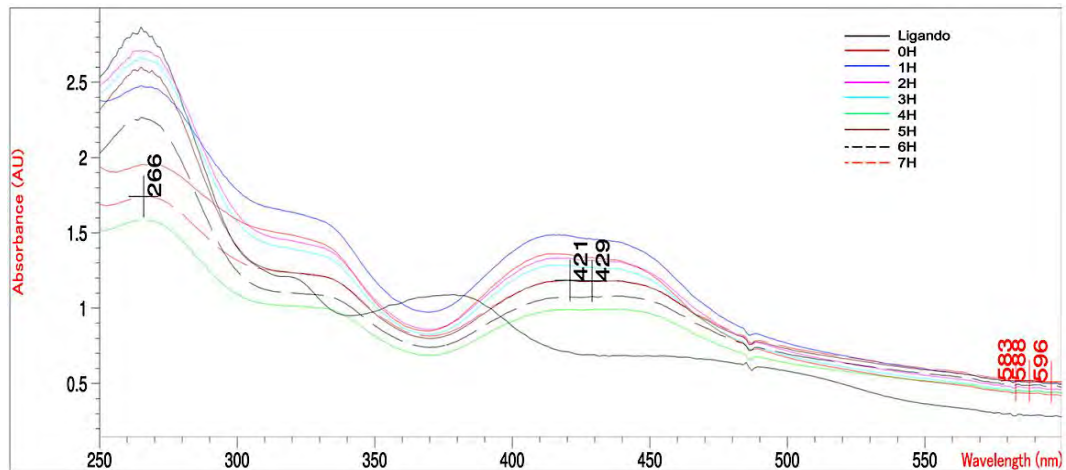
pp 81–126. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00003-0>.

- (30) Vermeulen, K.; Vandamme, M.; Bormans, G.; Cleeren, F. Design and Challenges of Radiopharmaceuticals. *Semin. Nucl. Med.* **2019**, *49* (5), 339–356. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2019.07.001>.
- (31) Donnelly, P. S. The Role of Coordination Chemistry in the Development of Copper and Rhenium Radiopharmaceuticals. *Dalt. Trans.* **2011**, *40* (5), 999. <https://doi.org/10.1039/c0dt01075h>.
- (32) Krasnovskaya, O.; Spector, D.; Zlobin, A.; Pavlov, K.; Gorelkin, P.; Erofeev, A.; Beloglazkina, E.; Majouga, A. Metals in Imaging of Alzheimer's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (23), 9190. <https://doi.org/10.3390/ijms21239190>.
- (33) Sharma, A. K.; Schultz, J. W.; Prior, J. T.; Rath, N. P.; Mirica, L. M. Coordination Chemistry of Bifunctional Chemical Agents Designed for Applications in 64 Cu PET Imaging for Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem.* **2017**, *56* (22), 13801–13814. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b01883>.
- (34) Lim, S.; Paterson, B. M.; Fodero-Tavoletti, M. T.; O'Keefe, G. J.; Cappai, R.; Barnham, K. J.; Villemagne, V. L.; Donnelly, P. S. A Copper Radiopharmaceutical for Diagnostic Imaging of Alzheimer's Disease: A Bis(Thiosemicarbazonato)Copper(II) Complex That Binds to Amyloid- $\beta$  Plaques. *Chem. Commun.* **2010**, *46* (30), 5437. <https://doi.org/10.1039/c0cc01175d>.
- (35) Huang, Y.; Huynh, T. T.; Sun, L.; Hu, C.-H.; Wang, Y.-C.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Neutral Ligands as Potential 64 Cu Chelators for Positron Emission Tomography Imaging Applications in Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem.* **2022**, *61* (11), 4778–4787. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.2c00621>.
- (36) Hickey, J. L.; Lim, S.; Hayne, D. J.; Paterson, B. M.; White, J. M.; Villemagne, V. L.; Roselt, P.; Binns, D.; Cullinane, C.; Jeffery, C. M.; Price, R. I.; Barnham, K. J.; Donnelly, P. S. Diagnostic Imaging Agents for Alzheimer's Disease: Copper Radiopharmaceuticals That Target A $\beta$  Plaques. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (43), 16120–16132. <https://doi.org/10.1021/ja4057807>.
- (37) Gremer, L.; Schölzel, D.; Schenk, C.; Reinartz, E.; Labahn, J.; Ravelli, R. B. G.; Tusche, M.; Lopez-Iglesias, C.; Hoyer, W.; Heise, H.; Willbold, D.; Schröder, G. F. Fibril Structure of Amyloid- $\beta$ (1–42) by Cryo–Electron Microscopy. *Science* (80-.). **2017**, *358* (6359), 116–119. <https://doi.org/10.1126/science.aao2825>.

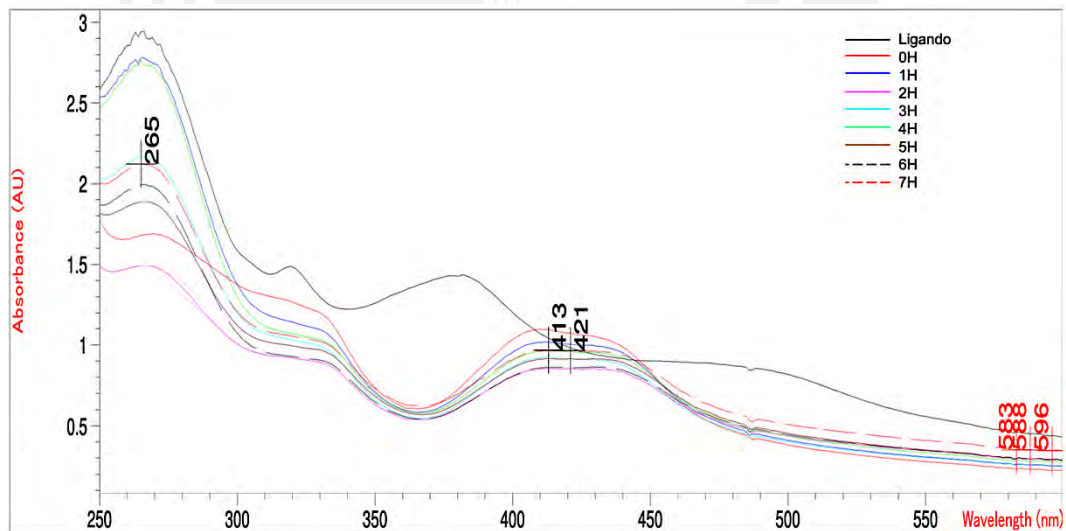
- (38) McInnes, L. E.; Noor, A.; Kysenius, K.; Cullinane, C.; Roselt, P.; McLean, C. A.; Chiu, F. C. K.; Powell, A. K.; Crouch, P. J.; White, J. M.; Donnelly, P. S. Potential Diagnostic Imaging of Alzheimer's Disease with Copper-64 Complexes That Bind to Amyloid- $\beta$  Plaques. *Inorg. Chem.* **2019**, *58* (5), 3382–3395. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b03466>.
- (39) Noor, A.; Hayne, D. J.; Lim, S.; Van Zuylekom, J. K.; Cullinane, C.; Roselt, P. D.; McLean, C. A.; White, J. M.; Donnelly, P. S. Copper Bis(Thiosemicarbazonato)-Stilbenyl Complexes That Bind to Amyloid- $\beta$  Plaques. *Inorg. Chem.* **2020**, *59* (16), 11658–11669. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c01520>.
- (40) Gonzales, D. Síntesis y Caracterización de Compuestos de Coordinación de Cobre Con Ligandos Derivados Del Resveratrol de Importancia En La Detección Temprana Del Mal de Alzheimer, Pontificia Universidad Católica del Perú, 2021.
- (41) Uehara, D. Diseño, Síntesis y Caracterización de Compuestos de Coordinación de Cobre (II) Derivados de Estilbeno, Afines a Las Placas Amiloides, Con Potencial Como Agentes de Radiodiagnóstico Del Alzheimer, Pontificia Universidad Católica del Perú, 2022.
- (42) Córdova, D. Diseño, Síntesis y Caracterización de Complejos de Cobre Con Ligandos Derivados Del Benzotiazol, Posiblemente Afines a Placas Amiloides, Pontificia Universidad Católica del Perú, 2023.
- (43) Balakin, K. V.; Ivanenkov, Y. A.; Skorenko, A. V.; Nikolsky, Y. V.; Savchuk, N. P.; Ivashchenko, A. A. In Silico Estimation of DMSO Solubility of Organic Compounds for Bioscreening. *SLAS Discov.* **2004**, *9* (1), 22–31. <https://doi.org/10.1177/1087057103260006>.
- (44) Wang, Y.; Huynh, T. T.; Cho, H.-J.; Wang, Y.-C.; Rogers, B. E.; Mirica, L. M. Amyloid  $\beta$ -Binding Bifunctional Chelators with Favorable Lipophilicity for  $^{64}\text{Cu}$  Positron Emission Tomography Imaging in Alzheimer's Disease. *Inorg. Chem.* **2021**, *60* (16), 12610–12620. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c02079>.
- (45) Shriver, D.; Weller, M.; Overton, T.; Rourke, J.; Armstrong, F. *Inorganic Chemistry*, 6ta ed.; Oxford University Press: New York, 2010.

## 9. Anexos

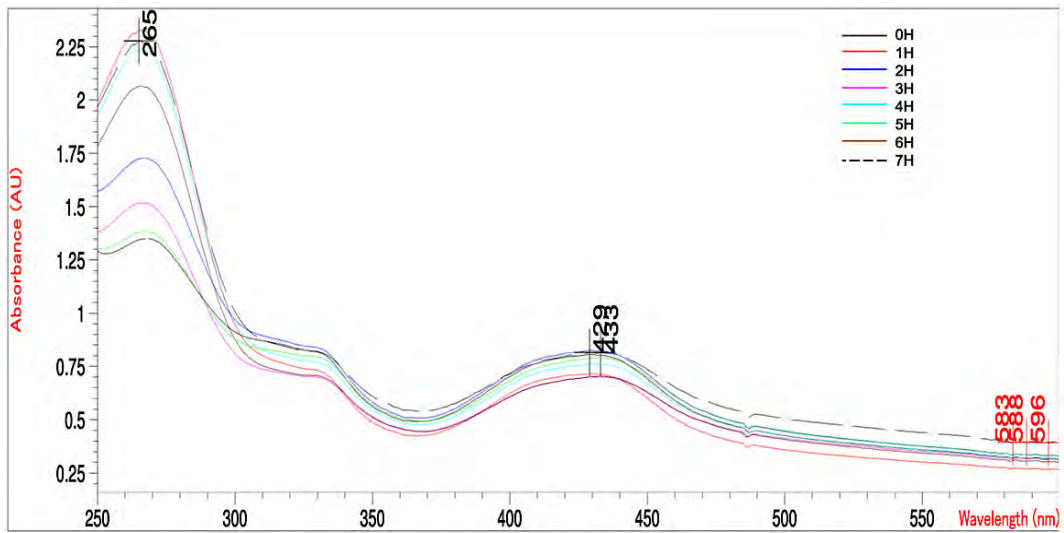
Anexo 1. Espectros UV – Vis del complejo  $CuL_6 - C$  a pH fisiológico



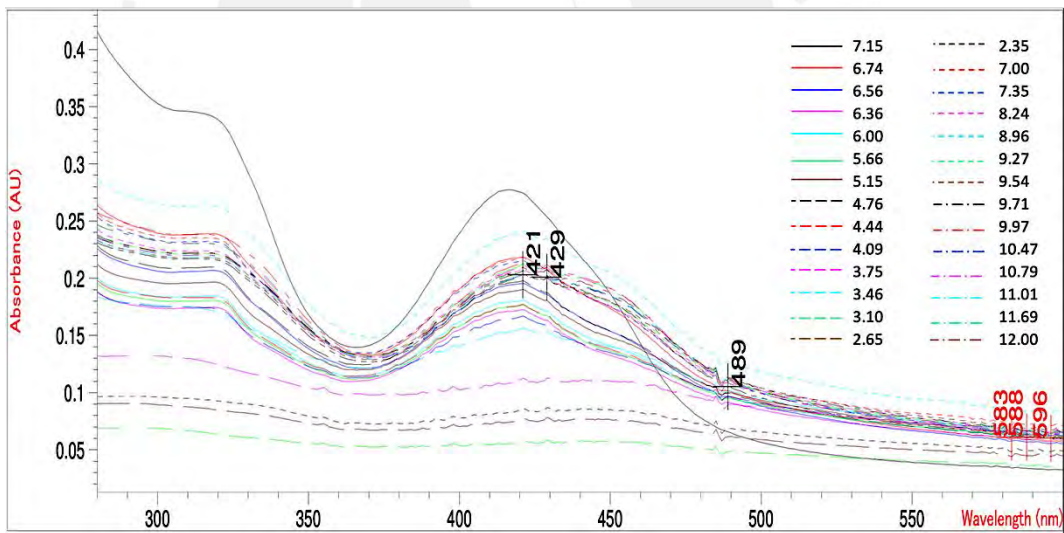
Anexo 2. Espectros UV – Vis del complejo  $CuL_9 - C$  a pH fisiológico



**Anexo 3. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>11</sub> – C a pH fisiológico**

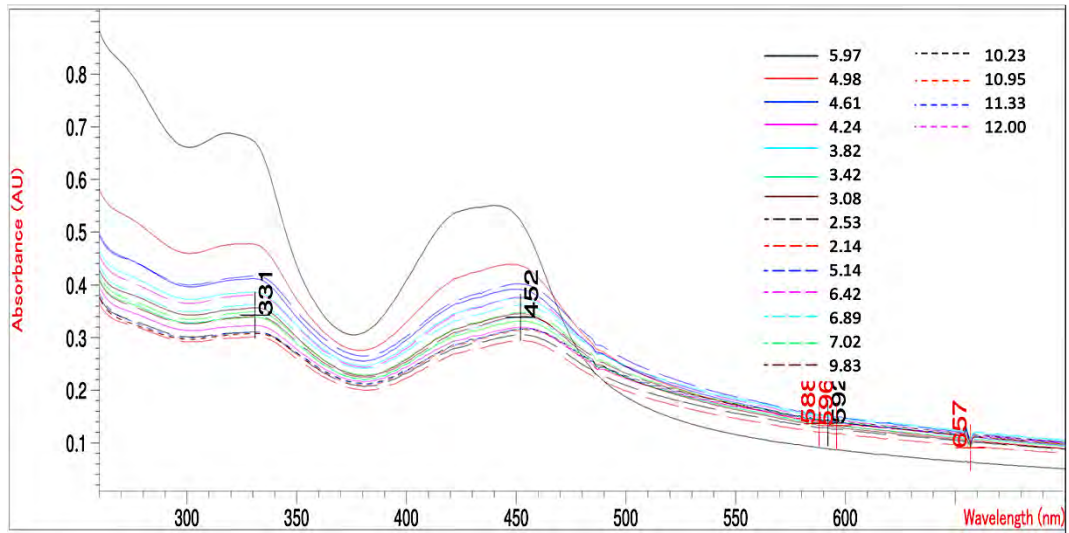


**Anexo 4. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>8</sub> – C en un rango de pH desde 2 hasta 12**

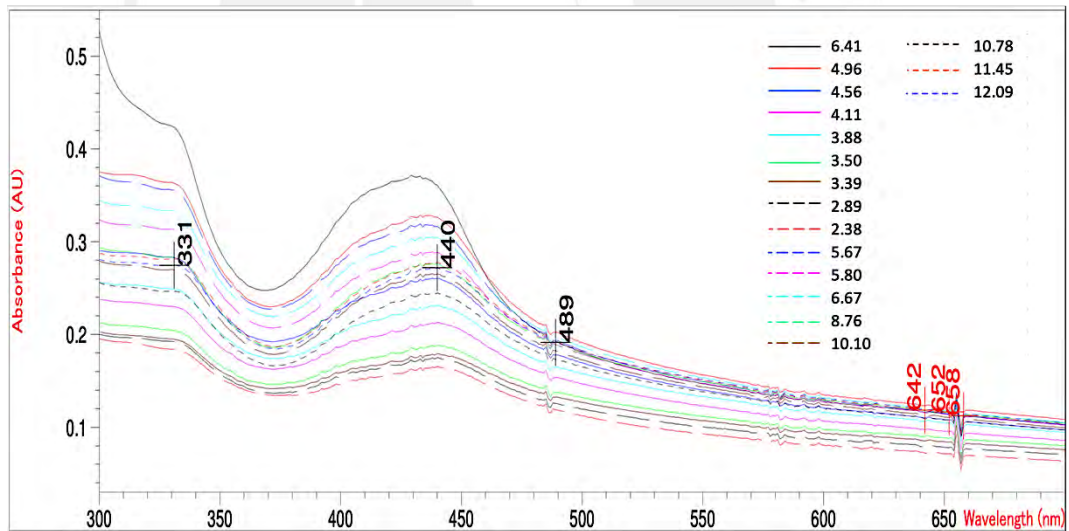




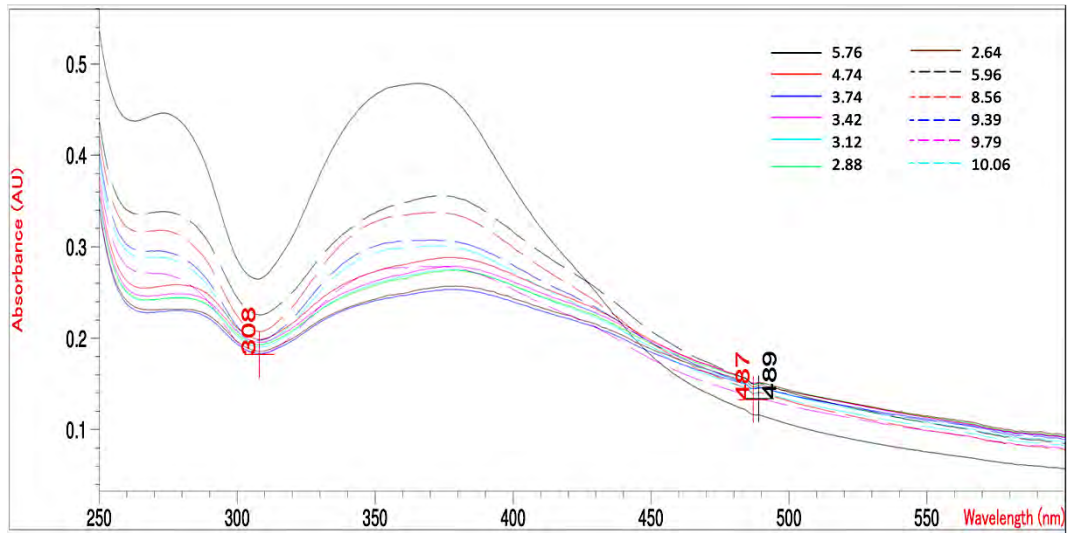
**Anexo 5. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>9</sub> – C en un rango de pH desde 2 hasta 12**



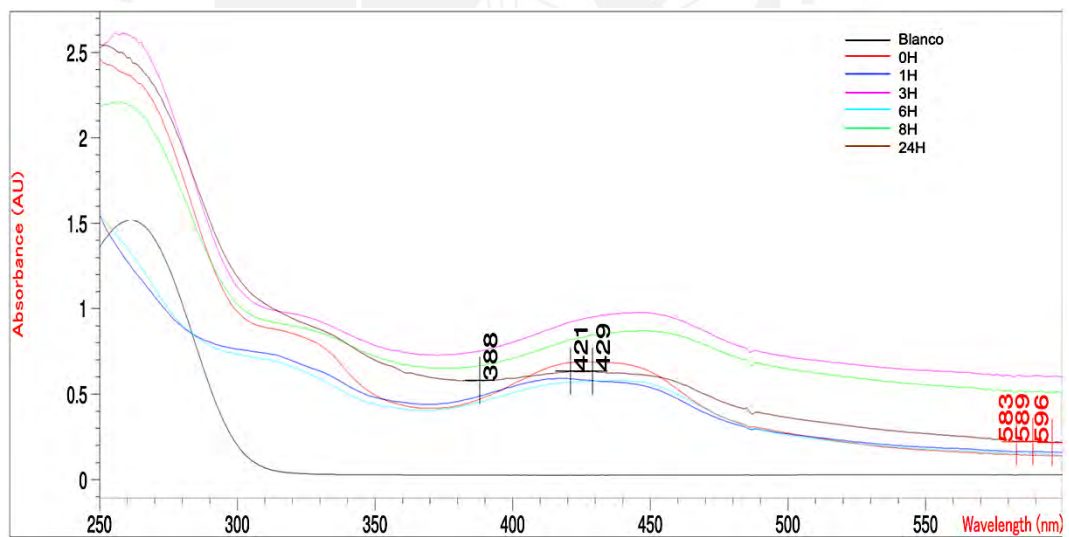
**Anexo 6. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>11</sub> – C en un rango de pH desde 2 hasta 12**



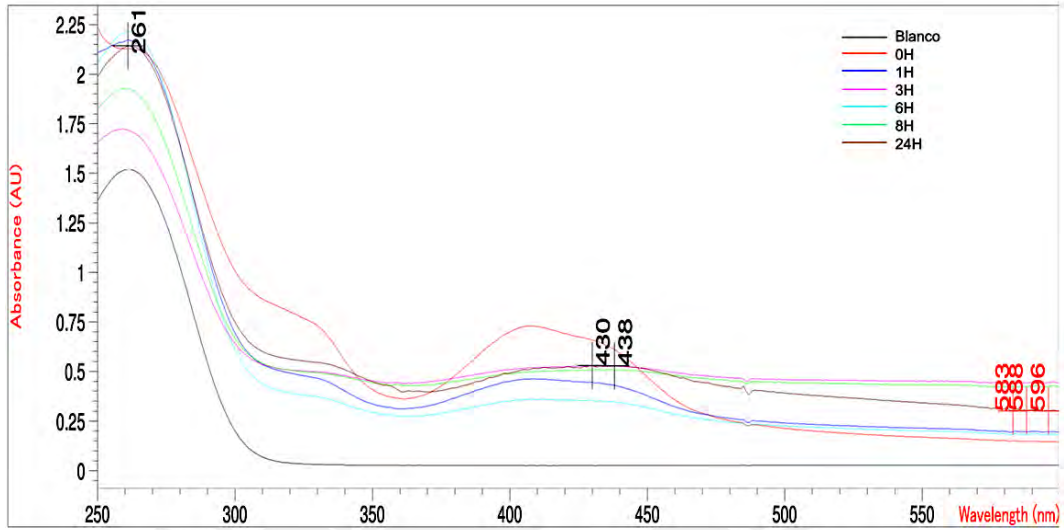
**Anexo 7. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>13</sub> – C en un rango de pH desde 2 hasta 12**



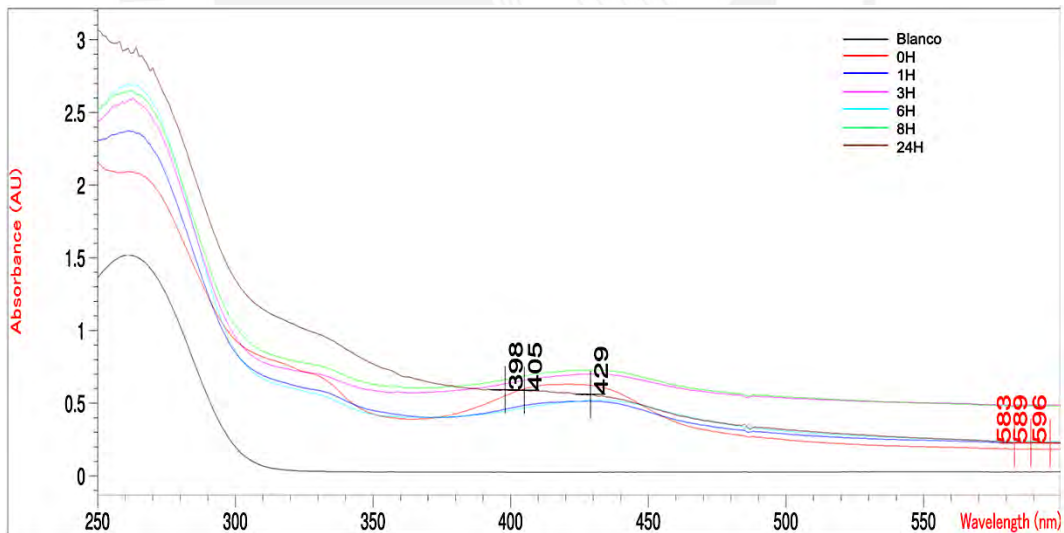
**Anexo 8. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>9</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a cisteína**



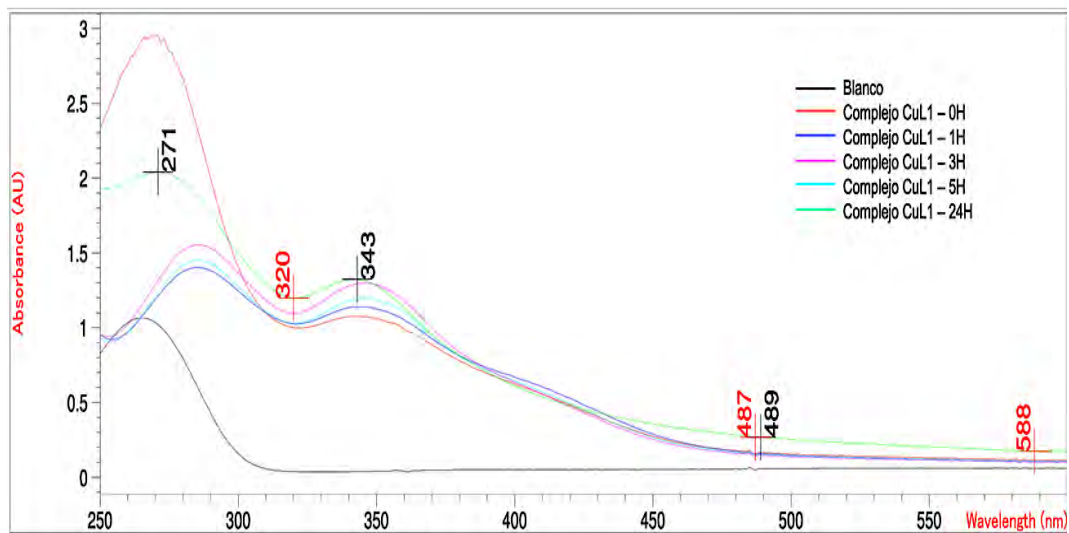
**Anexo 9. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>10</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a cisteína**



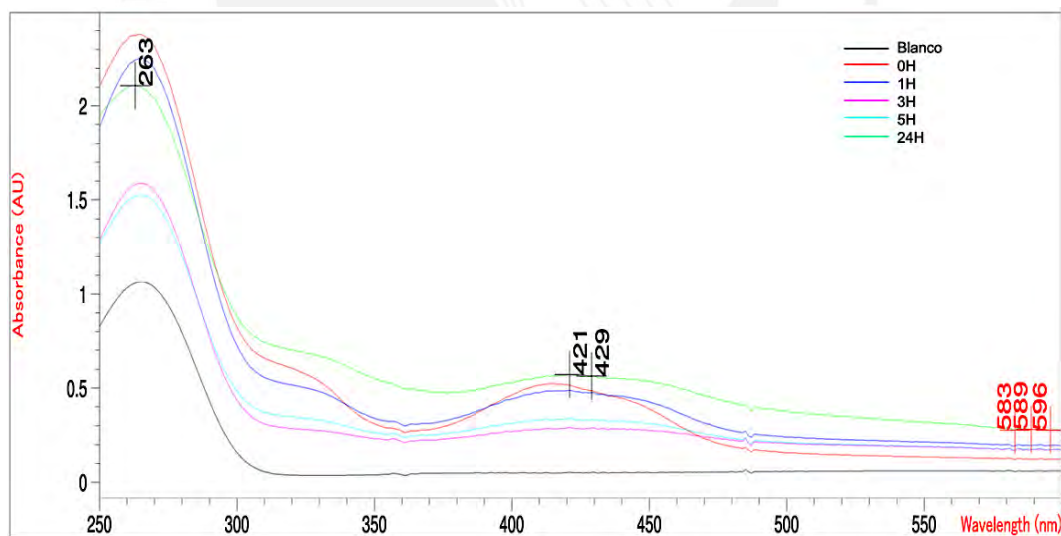
**Anexo 10. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>11</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a cisteína**



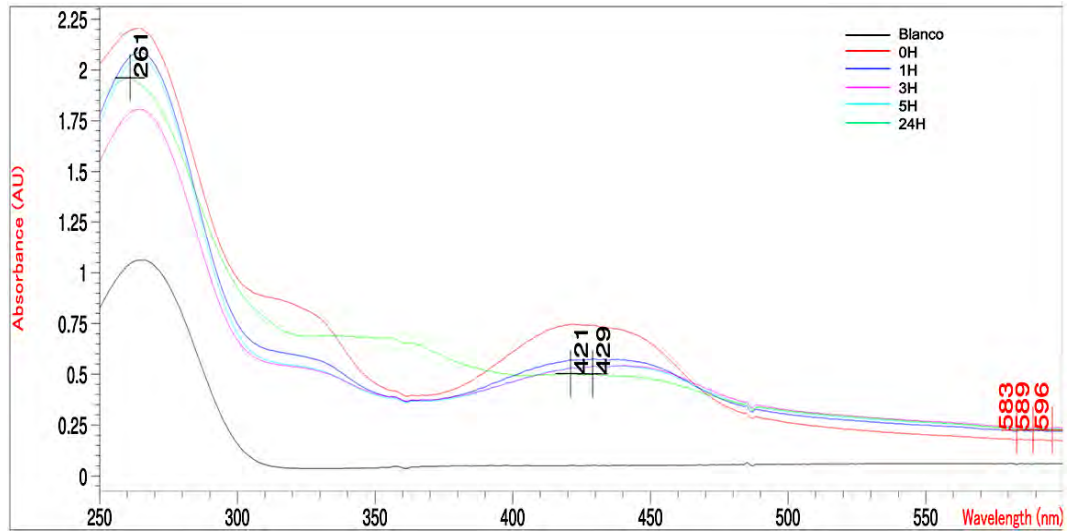
**Anexo 11. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>1</sub> - A en una ventana de 24 horas frente a histidina**



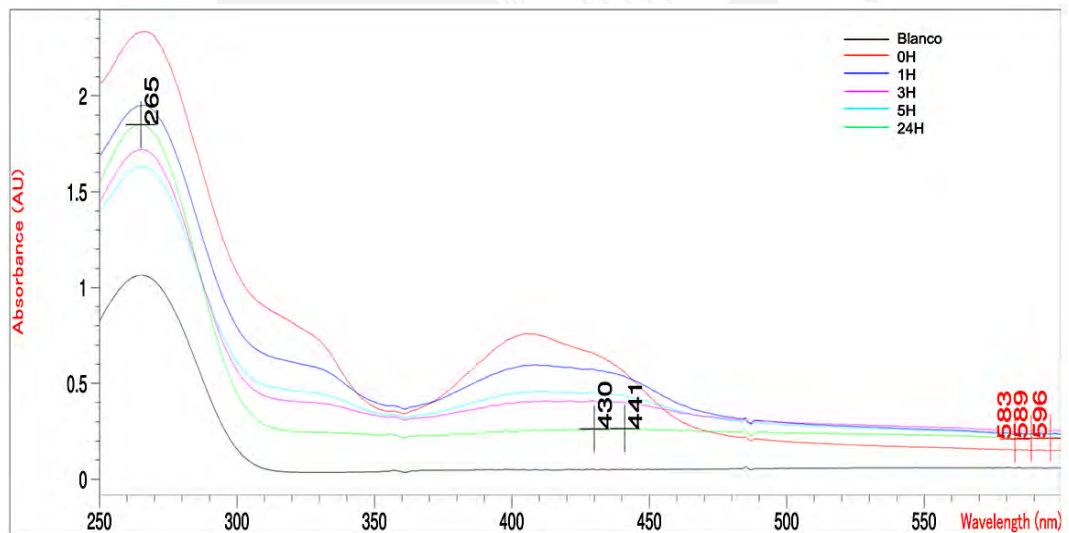
**Anexo 12. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>8</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a histidina**



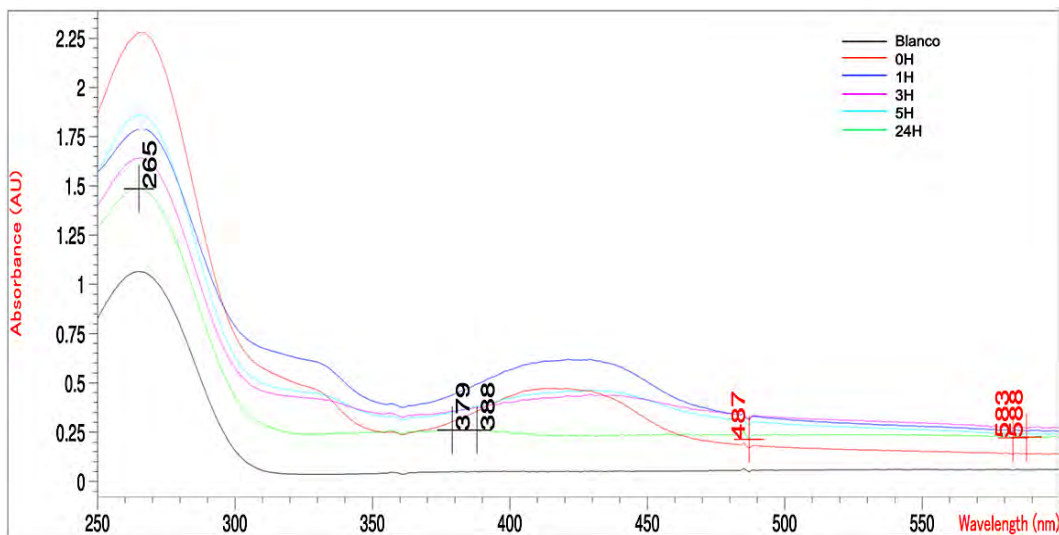
**Anexo 13. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>9</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a histidina**



**Anexo 14. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>10</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a histidina**



**Anexo 15. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>11</sub> – C en una ventana de 24 horas frente a histidina**



**Anexo 16. Espectros UV – Vis del complejo CuL<sub>12</sub> – D en una ventana de 24 horas frente a histidina**

