

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
ESCUELA DE POSGRADO



**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE COMPLEJOS DE COBRE(II)
CON LIGANDOS DEL TIPO BASE DE SCHIFF DERIVADOS DE LA
8-FORMIL7-HIDROXICUMARINA COMO UNA ALTERNATIVA DE
INTERÉS EN EL DESARROLLO DE AGENTES ANTITUMORALES**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAGISTER EN QUÍMICA

AUTOR

CARLOS ALBERTO SERNAQUE AMAYA

ASESOR:

CARLA GALLI RIGO-RIGHI

Septiembre, 2016

RESUMEN

El interés por desarrollar complejos de Cu(II) y otros metales esenciales como el cinc(II) con fines terapéuticos, se fundamenta en la menor toxicidad de estos metales hacia las células normales, con la consiguiente reducción de los efectos secundarios comunes en las drogas quimioterapéuticas para el tratamiento del cáncer. De esta manera, en el siguiente trabajo se sintetizan y caracterizan dos nuevos complejos de coordinación de cobre(II) con los ligandos tridentados tipo base de Schiff N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina (LIG-Gly) y N-(7-hidroxi-8-cumarinil-metileno)alanina (LIG-Ala) como una alternativa de interés a los del grupo del platino en el desarrollo de agentes antitumorales. Adicionalmente, dadas ciertas limitaciones en la caracterización de los complejos de cobre(II) derivadas del carácter paramagnético de este ion metálico y la posibilidad de que la semejanza en comportamiento químico entre el Cu^{2+} y Zn^{2+} conduzca a que ambos metales formen complejos estructuralmente similares, se sintetizan dos nuevos complejos de cinc(II) de formulación análoga a los de cobre con el fin de facilitar la dilucidación estructural de estos últimos. Sin embargo, el empleo de los ligandos LIG-Gly y LIG-Ala podría dar lugar a la formación de complejos de cobre(II) con distintas geometrías y modos de coordinación; por lo tanto, en el siguiente trabajo se cuestiona qué estructura particular adoptaría el complejo de Cu(II) con los dos ligandos seleccionados. Tomando en cuenta diversas consideraciones teóricas se postula que los complejos de Cu(II) presenten una estructura tetracoordinada con una relación ligando/metal 1:1 y una molécula del solvente H_2O u otro solvente neutro en la cuarta posición de coordinación. Los complejos de cobre(II) y cinc(II) se sintetizan por métodos basados en una aplicación del efecto *template* y son caracterizados por diversas técnicas analíticas y espectroscópicas. Los resultados muestran que los compuestos sintetizados presentan una fórmula general $\text{M}(\text{LIG})(\text{H}_2\text{O})$ y concuerdan razonablemente con las composiciones $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Zn}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$. De esta manera, se concluye que efectivamente los complejos presentan una estructura tetracoordinada con agua de coordinación en la cuarta posición.



DEDICATORIA

A mi hermano Aldo, que todas las noches me acompañaba mientras yo estudiaba.

Ayer estuviste a mi lado, hoy estás en el cielo, mañana estaremos juntos.

Te quiero mucho hermano.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi familia, en especial a mis padres, María y Ronal, por haberme dado todo su apoyo durante esta etapa de mi vida y por haberme brindado toda su comprensión y amor incondicional a pesar del poco tiempo que he compartido con ustedes en estos años de maestría. A mis hermanos, Ronald, Marlene y Rosa, porque me brindaron valiosos consejos y se sacrificaron en muchos aspectos de su vida para que yo pueda progresar en mi carrera profesional. Sinceramente, agradezco todo lo que han hecho por mí.

En segundo lugar, agradezco a mi asesora, Mg. Carla Galli, porque me aceptó generosamente en su grupo de investigación y me transmitió todos sus conocimientos teóricos y experimentales para ser un mejor profesional. Asimismo, a pesar de los contratiempos, fue muy paciente conmigo y pudo motivarme para sacar adelante la tesis. Muchas gracias.

A la Dra. Patricia Morales por su apoyo en la pasantía realizada en la UNAM y en el Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica (CIDETEQ).

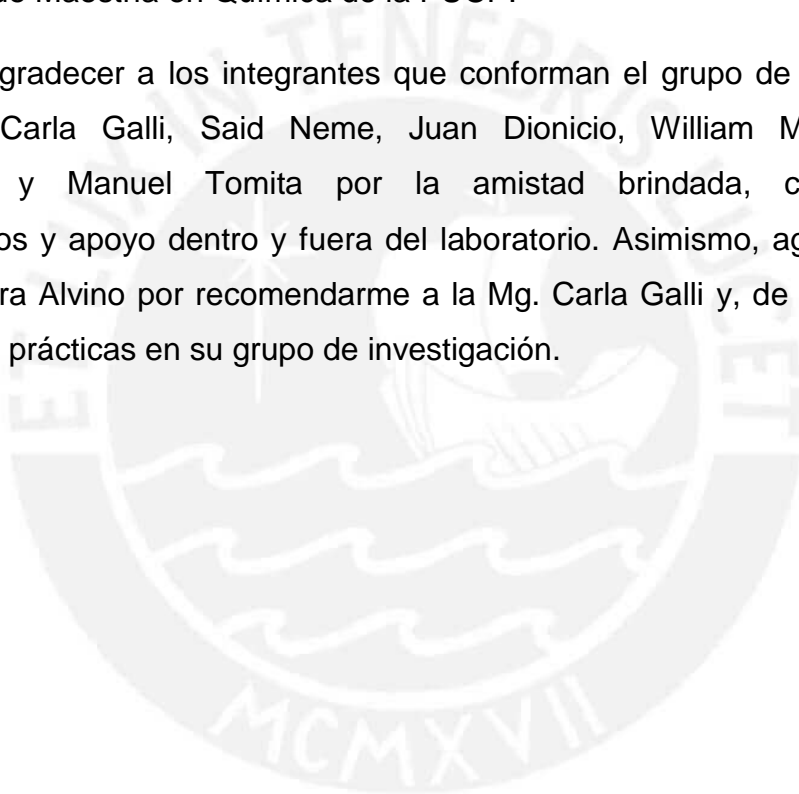
Al Dr. José Ugaz y al Ing. Miguel Pinto por la medición de los espectros RMN y al Dr. Juan Lopez por su valiosa ayuda en la interpretación de los mismos. Al Dr. Yves Coello por su apoyo en la medición de los espectros de fluorescencia y a la Dra. Rosario Sun por la ayuda en la medición conductimétrica de los complejos. Un agradecimiento especial a Milka por los consejos y ayuda brindada para el uso del IR, UV-Vis y AAS.

A la Dra. Lenna Ruiz por la guía brindada en mi estadía en la UNAM y por toda la confianza que depositó en mi persona para realizar la pasantía. Además, agradezco a todo el grupo que conforma el grupo de investigación de la Dra. Lenna por el grato ambiente de trabajo y por los consejos que me brindaron para mejorar mi tesis. A la M. en C. Virginia Gómez del Instituto de Química de la UNAM por la ayuda en la recolección e interpretación de datos de los espectros EPR. Muchas gracias por toda la información brindada.

A la Mg. Marisela Cruz por su grato apoyo durante los experimentos de electroquímica en CIDETEQ. Asimismo, un agradecimiento muy especial al Dr. Luis Ortiz Frade por ayudarme en la interpretación de los resultados electroquímicos y por el trato muy amable recibido durante mi estadía en Querétaro. Gracias por su recibimiento y por aceptarme desde hace mucho tiempo para la pasantía.

A CIENCIA ACTIVA DE CONCYTEC. Programas de Maestría en Universidades Peruanas. Convenio 035-2015 FONDECYT, por haber financiado mis estudios en el programa de Maestría en Química de la PUCP.

Por último, agradecer a los integrantes que conforman el grupo de investigación de la Mg. Carla Galli, Said Neme, Juan Dionicio, William Medroa, José Curihuaman y Manuel Tomita por la amistad brindada, conocimientos intercambiados y apoyo dentro y fuera del laboratorio. Asimismo, agradezco a la profesora Nora Alvino por recomendarme a la Mg. Carla Galli y, de esta manera, iniciarme con prácticas en su grupo de investigación.



ÍNDICE GENERAL

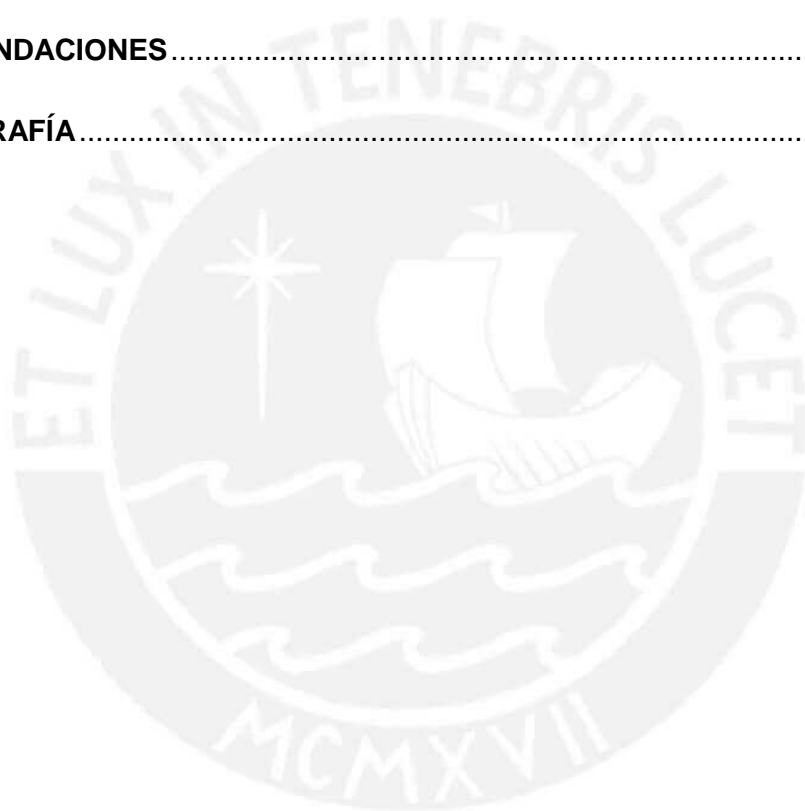
1. INTRODUCCIÓN	1
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	4
3. OBJETIVOS	5
3.1. Objetivo general	5
3.2. Objetivos específicos	5
4. MARCO TEÓRICO	6
4.1. Cáncer.....	6
4.2. Metalofármacos en el tratamiento del cáncer	10
4.2.1. Agentes anticancerígenos análogos del cisplatino	13
4.2.2. Agentes anticancerígenos diferentes al cisplatino	15
4.2.2.1. Complejos de Rutenio	15
4.2.2.2. Complejos de Titanoceno.....	15
4.2.2.3. Complejos de Galio.....	16
4.2.2.4. Compuestos de Osmio.....	17
4.2.2.5. Compuestos de Oro	17
4.2.2.6. Complejos de Vanadio	17
4.2.3. Agentes anticancerígenos basados en metales esenciales	18
4.2.3.1. Complejos de Cobalto.....	18
4.2.3.2. Complejos de Hierro	18
4.2.3.3. Complejos de Cinc	19
4.2.3.4. Complejos de Cobre	20
4.3. Características químicas y bioquímicas del cobre	21
4.4. Homeostasis del cobre	22

4.5. Cobre y su relación con el cáncer.....	22
4.6. Complejos de cobre como agentes antitumorales	24
4.7. Complejos de cobre y su probable mecanismo de acción como agentes antitumorales.....	28
4.8. Formilación de anillos aromáticos según la reacción de Duff.....	29
5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN	30
6. METODOLOGÍA.....	32
6.1. Reactivos	32
6.2. Solventes	32
6.3. Síntesis y caracterización.....	33
6.3.1. Síntesis y caracterización del precursor 8-formil-7-hidroxycumarina	33
6.3.1.1. Procedimiento optimizado de síntesis del precursor 8-formil-7-hidroxycumarina	33
6.3.2. Síntesis y caracterización de los ligandos del tipo base de Schiff.....	34
6.3.2.1. Procedimiento optimizado de síntesis del ligando tipo base de Schiff N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina, LIG-Gly.....	35
6.3.2.2. Procedimiento optimizado de síntesis de la sal carboxilato de potasio del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina, LIG-Gly.....	35
6.3.3. Síntesis y caracterización de los complejos de Zn(II) y Cu(II).....	35
6.3.3.1. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acuoso [N-(7-óxido-8- cumarinilmetileno)glicinato]cinc(II), Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)	37
6.3.3.2. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acuoso [N-(7-óxido-8- cumarinilmetileno)glicinato]cobre(II), Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	38
6.3.3.3. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acuoso [N-(7-óxido-8- cumarinilmetileno)alaninato]cinc(II), Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	38

6.3.3.4. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cobre(II), Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	39
6.4. Tratamiento de muestra para la determinación del contenido de metal por absorción atómica.....	39
6.5. Técnicas empleadas para la caracterización	38
6.6. Ensayos de cristalización	43
6.6.1. Método de evaporación lenta	43
6.6.2. Método de difusión a vapor	43
6.6.3. Método de obtención de cristales a partir del licor madre	43
7. RESULTADOS	44
7.1. Síntesis de ligandos	44
7.1.1. Precursor 8-formil-7-hidroxicumarina, 8-CHO-7-OH-CA	44
7.1.2. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina, LIG-GLY	44
7.1.3. Sal carboxilato de potasio del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina	45
7.2. Síntesis de los complejos	45
7.2.1. Complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cinc(II) Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)	45
7.2.2. Complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cobre(II) Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	45
7.2.3. Complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cinc(II) Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	46
7.2.4. Complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cobre(II) Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	46
7.3. Ensayos de cristalización	47

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
8.1. Procesos de síntesis	48
8.1.1. Síntesis de ligandos	48
8.1.1.1. Precursor 8-formil-7-hidroxycumarina, 8-CHO-7-OH-CA.....	48
8.1.1.2. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina, LIG-GLY.....	51
8.1.1.3. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)alanina, LIG-Ala	52
8.1.2. Síntesis de los complejos	53
8.1.2.1. Complejos de de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilen]glicina y N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilen]alanina	53
8.2. Caracterización	56
8.2.1. Precursor 8-formil-7-hidroxycumarina, 8-CHO-7-OH-CA	56
8.2.2. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina, LIG-GLY	63
8.2.2.1. Espectroscopia Infrarroja	63
8.2.2.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.....	65
8.2.3. Síntesis de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilen]glicina y N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilen]alanina	67
8.2.3.1. Espectroscopía Infrarroja	67
8.2.3.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	75
8.2.3.3. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica	78
8.2.3.4. Espectroscopía Ultravioleta – Visible	80
8.2.3.5. Fluorescencia.....	83
8.2.3.6. Análisis Termogravimétrico	87
8.2.3.7. Absorción Atómica y Análisis Elemental.....	88

8.2.3.8. Conductimetría.....	90
8.2.3.9. Estudios Electroquímicos	91
8.2.3.9.1. Voltamperometría cíclica de Zn(LIG-Gly)(H ₂ O) y Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)..	91
8.2.3.9.2. Voltamperometría cíclica de Zn(LIG-Ala)(H ₂ O) y Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)..	95
8.2.3.9.3. Potencial Redox y su relación con la superóxido dismutasa (SOD) ..	97
8.3. Propuesta estructural	98
9. CONCLUSIONES	102
10. RECOMENDACIONES	104
11. BIBLIOGRAFÍA	105
12. ANEXOS	



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Etapas involucradas en el proceso de carcinogénesis. (a) Iniciación: Se produce una alteración genética que es irreversible. (b) Promoción: Se producen cambios en la expresión del genoma mediadas por interacciones promotor-receptor, en las que hormonas y algunas drogas actúan como promotores. (c) Progresión: Etapa caracterizada por la inestabilidad cariotípica y el crecimiento del tumor maligno.....	7
Figura 2	Algunos metalofármacos de uso clínico y sus sitios de acción	11
Figura 3	Mecanismo de acción del cisplatino	13
Figura 4	Complejos de Ru(III) actualmente en ensayos clínicos	15
Figura 5	Complejos de Titanio sometidos a ensayos clínicos	16
Figura 6	Complejos de Galio en ensayos clínicos.....	16
Figura 7	Fundamento para el tratamiento con complejos de cobre u otros metales redox activos que puedan generar un incremento de ROS	23
Figura 8	Algunos complejos de cobre representativos que se encuentran en ensayos pre-clínicos <i>in vivo</i>	24
Figura 9	Complejos de cobre activos hacia el carcinoma de Ehrlich en ensayos pre-clínico <i>in vivo</i>	26
Figura 10	Complejo de cobre Cas III-ia de reciente ensayo clínico	26
Figura 11	Probables mecanismos de acción que un complejo de cobre ejerce en el interior de la célula	28
Figura 12	Mecanismo propuesto para la formilación del fenol	29
Figura 13	Síntesis propuesta del precursor 8-formil-7-hidroxicumarina	33
Figura 14	Síntesis propuesta de los ligandos del tipo base de Schiff derivados de la 8-formil-7-hidroxicumarina	34
Figura 15	Síntesis propuestas para los complejos de cinc(II) y cobre(II) con ligandos tipo base de Schiff a partir de una reacción de metátesis (a) o por efecto <i>template</i> (b)	36

Figura 16	Algunos métodos de obtención de monocristales (S: solvente donde el complejo presenta apreciable solubilidad; S': solvente en el que es insoluble; ambos miscibles entre sí)	37
Figura 17	Diluciones realizadas para obtener las soluciones problema de cinc(II).	40
Figura 18	Diluciones realizadas para obtener las soluciones problema de cobre(II).....	40
Figura 19	Espectro ¹ H-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina	56
Figura 20	Espectro ¹³ C-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina	57
Figura 21	Espectro HSQC-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina	57
Figura 22	Espectro HMBC-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina	59
Figura 23	Espectros IR del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina	62
Figura 24	Espectro Infrarrojo del ligando LIG-Gly (a) y su respectiva sal de potasio (b)	64
Figura 25	Espectros ¹ H-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina (a) y de la base de Schiff formado por la condensación con glicina (b)	66
Figura 26	Espectro IR del ligando LIG-Gly (a) , de su sal carboxilato de potasio (b) y de su respectivo complejo de Zn ²⁺ (c)	70
Figura 27	Espectro IR del complejo Zn(LIG-Gly)(H ₂ O) (a) y del complejo Cu(LIG-Gly)(H ₂ O) (b)	71
Figura 28	Espectro IR del complejo Zn(LIG-Ala)(H ₂ O) (a) y del complejo Cu(LIG-Ala)(H ₂ O) (b)	72
Figura 29	Espectros ¹ H-RMN del ligando LIG-Gly (a) , del complejo Zn(LIG-Gly)(H ₂ O) (b) y del complejo Zn(LIG-Ala)(H ₂ O) (c)	77
Figura 30	Espectro EPR del complejo Cu(LIG-Gly)(H ₂ O) en estado sólido a 298°K (a) , registrado a una baja intensidad de campo magnético con una alta ganancia para una mejor apreciación (b) y en solución de DMSO a 77°K (c)	78

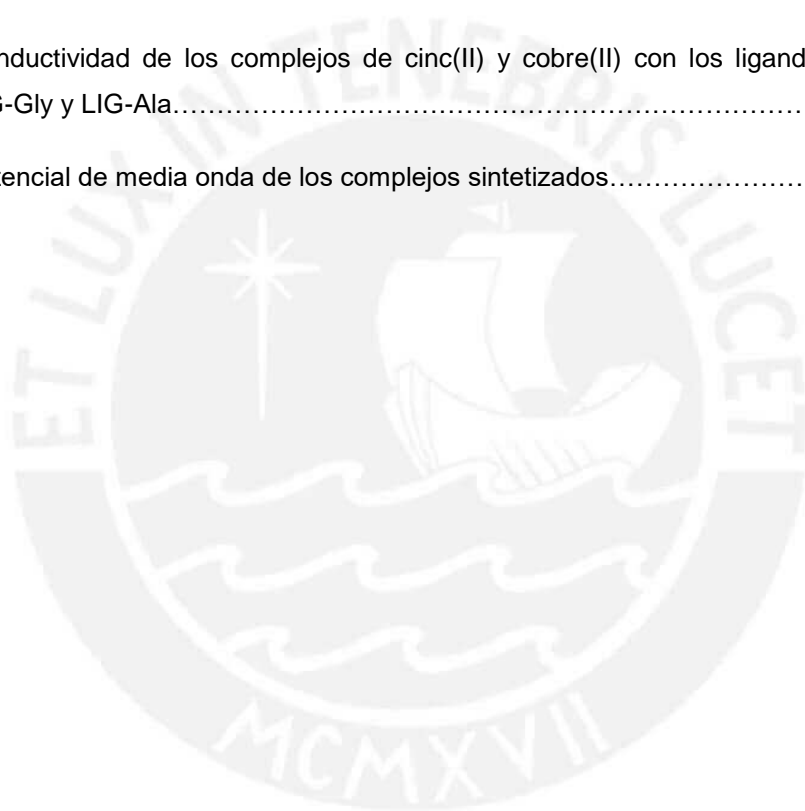
Figura 31	Espectro EPR del complejo Cu(LIG-Gly)(H ₂ O) en estado sólido a 298°K (a) , registrado a una baja intensidad de campo magnético con una alta ganancia para una mejor apreciación (b) y en solución de DMSO a 77°K (c)	79
Figura 32	Espectros UV-Vis del N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen]glicina y sus respectivos complejos de cinc y cobre	81
Figura 33	Espectros UV-Vis de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos tipo base de Schiff LIG-Gly y LIG-Ala	82
Figura 34	Comparación de los espectros de emisión del ligando LIG-Gly y sus respectivos complejos de cobre(II) y cinc(II) medidos en DMF y a temperatura ambiente	83
Figura 35	Desplazamiento de Stokes del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cinc(II)	85
Figura 36	Mecanismos de los procesos CHEF, PET y eT que tienen lugar en el complejo de cinc(II), en el ligando libre LIG-Gly y en el complejo de cobre(II)	86
Figura 37	Gráfica de Job del complejo Zn(LIG-Gly)(H ₂ O), donde la intensidad de fluorescencia se gráfica en función de la relación molar [metal] / ([ligando]+[metal]) manteniendo una concentración total de 20uM en DMF	87
Figura 38	TG/DSC del complejo acua[N-(7-oxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cinc(II)	88
Figura 39	Voltamperograma cíclico de 1 x 10 ⁻³ M de Zn(LIG-Gly)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ . El barrido de potencial se inició desde potencial de circuito abierto (E _{ocp}) en sentido catódico (a) y en sentido anódico (b) . Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.	91
Figura 40	Mecanismo propuesto para la reducción electroquímica del compuesto Zn(LIG-Gly)(H ₂ O). La estructura cíclica B representa la parte de complejación que no está involucrada en el proceso redox.....	92

Figura 41	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Gly)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ . El barrido de potencial se inició desde E _{ocp} en sentido catódico (a) y en sentido anódico (b) . Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	93
Figura 42	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Gly)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ utilizando inversión de E _λ en sentido catódico a una velocidad de barrido de 100mV/s. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	94
Figura 43	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Gly)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ a diferentes velocidades de barrido. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	94
Figura 44	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Zn(LIG-Ala)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ . El barrido de potencial se inició desde E _{ocp} en sentido catódico. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	95
Figura 45	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Ala)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ . El barrido de potencial se inició desde E _{ocp} en sentido catódico (a) y en sentido anódico (b) . Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	95
Figura 46	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Ala)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ utilizando inversión E _λ en sentido catódico a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	96
Figura 47	Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Ala)(H ₂ O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF ₄ a diferentes velocidades de barrido. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.....	96
Figura 48	Estructura tetracoordinada de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con el ligando tipo bases de Schiff N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina y N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)alanina	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación general de tipos de drogas usadas en quimioterapia.....	9
Tabla 2	Metalofármacos que han desempeñado un papel trascendental en el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico	10
Tabla 3	Complejos de platino de uso clínico	14
Tabla 4	Ensayos de síntesis de la 8-CHO-7-OH-CA basados en la reacción de Duff	48
Tabla 5	Variaciones en parámetros de síntesis del ligando 8-CHO-7-OH-CA	50
Tabla 6	Variaciones en parámetros de síntesis del ligando LIG-Gly	51
Tabla 7	Variaciones en parámetros de síntesis del ligando LIG-Ala	52
Tabla 8	Ensayos de síntesis del complejo $\text{Cu}[\text{N}-(7\text{-óximo-8-cumarinilmetileno)glicinato}]\text{Zn}(\text{II})$ por reacción de metátesis	53
Tabla 9	Ensayos de síntesis de los complejos de $\text{Zn}(\text{II})$ y $\text{Cu}(\text{II})$ con el ligando $\text{N}-(7\text{-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina}$ empleando el efecto <i>template</i>	54
Tabla 10	Complejos de $\text{Zn}(\text{II})$ y $\text{Cu}(\text{II})$ con los ligandos $\text{N}-(7\text{-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina}$ y $\text{N}-(7\text{-hidroxi-8-cumarinilmetileno)alanina}$	55
Tabla 11	Asignaciones de las señales de los espectros $^1\text{H-RMN}$ y $^{13}\text{C-RMN}$ en d_6 -DMSO realizadas para el compuesto 8-formil-7-hidroxycumarina	61
Tabla 12	Asignaciones de las principales bandas de absorción de la 8-formil-7-hidroxycumarina	62
Tabla 13	Principales frecuencia de vibración en los espectros IR del $\text{N}-(7\text{-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina}$ y su sal de potasio	63
Tabla 14	Principales frecuencias de vibración en los espectros IR del ligando LIG-Gly, su sal de potasio, sus complejos de Zn^{2+} y Cu^{2+} y los complejos de Zn^{2+} y Cu^{2+} del ligando análogo LIG-Ala	74
Tabla 15	Parámetros EPR para el complejo $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ en DMSO a 77°K	79
Tabla 16	Parámetros EPR para el complejo $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O})$ en DMSO a 77°K ...	79

Tabla 17	Máximos de absorbancia y coeficientes de absortividad molar del ligando LIG-Gly, sus respectivos complejos de cobre y cinc, y los complejos de cobre y cinc del ligando LIG-Ala	80
Tabla 18	Determinación de la composición estequiométrica del complejo Zn(LIG-Gly)(H ₂ O). La mezcla final fue diluida con DMF en una celda de 3 mL de capacidad.....	86
Tabla 19	Contenido de C, H y N y de metal para una composición M(LIG)(H ₂ O)	89
Tabla 20	Contenido de C, H y N y de metal para una composición M(LIG)(H ₂ O).XH ₂ O	89
Tabla 21	Conductividad de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos LIG-Gly y LIG-Ala.....	90
Tabla 22	Potencial de media onda de los complejos sintetizados.....	97



ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 10.1	Espectros Infrarrojos de ligandos cumarínicos	115
Anexo 10.2	Espectros Infrarrojos de los complejos de Cu(II) y Zn(II)	117
Anexo 10.3	Espectros UV-Vis del ligando LIG-Gly y de los complejos Zn(LIG-Gly)(H ₂ O), Cu(LIG-Gly)(H ₂ O), Zn(LIG-Ala)(H ₂ O), Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	121
Anexo 10.4	Cálculo del coeficiente de absortividad molar (ϵ)	124
Anexo 10.5	Porcentaje de carbono, nitrógeno e hidrógeno obtenido por análisis elemental	126
Anexo 10.6	Contenido de metal obtenido por absorción atómica	128



SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

7-AcO-CA	7-acetoxicumarina
AcOH	Ácido acético glacial
Ac4Npypipe	2-acetilpiridina-N(4)-1-(2-piridil)-piperazinil tiosemicarbazona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Atox1	Chaperona de cobre considerada como un antioxidante
ATP7A y ATP7B	Enzimas ATPasas para la homeostasis del cobre
B16-F10	Línea celular de melanoma
BCL2	Familia de proteínas que regulan la apoptosis
Cas III-ia	casiopeina III-ia, Nitratro de (4,4-dimethyl-2,2-bipyridine) (acetylacetonate)cuprato(II)
CCS	Chaperona de cobre para superóxido dismutasa
CHEF	Aumento de fluorescencia por quelación
8-CHO-7-OH-CA	8-formil-7-hidroxicumarina
Cox17	Chaperona de cobre para citocromo c oxidasa
¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono-13
CTR1	Proteína transportadora de alta afinidad al cobre
CTR2	Proteína transportadora de baja afinidad al cobre
Cu(LIG-Gly)(H₂O)	Acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cobre(II)
Cu(LIG-Ala)(H₂O)	acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cobre(II)
DBH	Biosíntesis de neurotransmisores
DMT1	Transportador de iones metálicos divalentes

DpC	4-ciclohexil-4-metil-3-tiosemicarbazona
EECC	Energía de estabilización del campo cristalino
EPR	Resonancia Paramagnética Nuclear
ET	Decaimiento no radiante por transferencia de energía
eT	Decaimiento no radiante por transferencia electrónica
EtOH	Etanol
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU
FT-IR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GHS	Glutatión
HepG2	Línea celular de cáncer de hígado
HL60	Línea celular de leucemia
¹H-¹³C HMBC	Resonancia magnética nuclear de correlación enlaces múltiples heteronucleares
HMTA	Hexametilentetramina o hexamina
HPMA	N-(2-hidroxipropil)metacrilamida
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de protón
¹H-¹³C HSQC	Resonancia magnética nuclear de correlación heteronuclear de cuanto sencillo
IGF-1	factor de crecimiento insulínico tipo 1
KBV1	Línea celular de carcinoma
KP-1019	Trans-[tetraclorobis(1H-indazol)rutenato(III)] de indazolio
LIG-Ala	N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)alanina
LIG-Gly	N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina

MeOH	Metanol
MCF-7	Línea celular de cáncer de mama
MNU	N-metil-N-nitrosoúrea
MTN	Matalotionina
Mutación en p53	Asociado a cáncer de páncreas
NAMI-A	trans-[tetracloro(dimetilsulfóxido)imidazolrutenato(III)] de imidazolio
Nf-kB	Factor nuclear kappa B, proteína que controla la transcripción del ADN
7-OH-CA	7-hidroxycumarina
OMS	Organismo Mundial de la Salud
P388	Línea celular de leucemia
PET	Transferencia electrónica fotoinducida
Pt(NH₃)₂Cl₂	Cis-diaminodicloroplatino(II) o Cisplatino
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RR	Ribonucleótido reductasa
SCO1 y SCO2	Chaperonas de cobre involucradas en la síntesis del citocromo c oxidasa
SW1990	Línea celular de cáncer de páncreas
^{99m}Tc	Isómero metaestable de ⁹⁹ Tc
THP-1	Línea celular de leucemia
TG/DSC	termogravimetría/calorimetría diferencial de barrido
Zn(LIG-Gly)(H₂O)	Acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cinc(II)
Zn(LIG-Ala)(H₂O)	Acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cinc(II)

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer, según lo reportado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), constituye una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo¹. En la actualidad existen diversos tratamientos para combatir esta enfermedad; entre los principales se encuentra la quimioterapia, que resulta particularmente útil cuando se produce la propagación de células cancerígenas².

Uno de los agentes quimioterapéuticos más exitosos es el complejo diaminodicloroplatino(II), conocido como cisplatino. Este presenta una alta eficacia y puede ser utilizado en un amplio rango de tumores; sin embargo, el tratamiento con cisplatino presenta efectos secundarios que limitan la dosis a emplear y, además una medicación prolongada induce a una resistencia intrínseca y/o adquirida al mismo³. Estas desventajas propiciaron nuevas investigaciones orientadas a desarrollar complejos de coordinación basados en centros metálicos activos diferentes al platino, siendo una de las áreas de reciente interés los complejos de Cu(II) de potencial actividad citotóxica⁴.

El interés por desarrollar complejos de Cu(II) y otros metales esenciales con fines terapéuticos, se fundamenta en la menor toxicidad de estos metales hacia las células normales, lo que conduciría a una reducción de los efectos secundarios comunes en las drogas quimioterapéuticas⁵. Además, se ha encontrado que los complejos de Cu(II), presentan otras potenciales ventajas respecto al cisplatino y sus análogos, las que incluyen un nuevo mecanismo de acción, distinto espectro de actividad y una posible disminución de la resistencia al cisplatino en un tratamiento combinado con este⁶. Respecto al mecanismo de acción, estudios recientes indican que un posible modo de acción antitumoral de los complejos de Cu(II) involucraría la producción exógena de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales inducen una muerte selectiva de células cancerígenas sin mostrar una toxicidad significativa hacia las normales^{7, 8, 9}.

De acuerdo con la información hasta la fecha disponible sobre complejos de cobre que han exhibido actividad antitumoral, Santini y colaboradores⁴ han propuesto ciertos criterios a tener en cuenta en el diseño de nuevos complejos de este metal que sean potencialmente activos. Un número de coordinación 4 o 5, así como la presencia de uno o más grupos lábiles (solvente o contraion), favorecen la formación de un complejo capaz de permitir la toma celular del metal activo y, al mismo tiempo, suficientemente estable para enfrentar una posible interacción irreversible con diversas biomoléculas afines a este

metal. Por otra parte, ligandos que presentan una estructura aromática extendida muestran afinidad por el ADN, lo que favorece su unión al mismo y permite que operen mecanismos de acción antitumoral complementarios al relacionado con la producción de ROS antes mencionado.

El presente trabajo de investigación plantea la síntesis de complejos de cobre con un diseño racional que toma en cuenta los criterios básicos propuestos por Santini y colaboradores, así como otras consideraciones estructurales asociadas a la actividad antitumoral.

En este sentido, se propone la síntesis de complejos de Cu(II) con ligandos derivados de la 8-formil-7-hidroxycumarina, unidos vía el grupo $-CHO$ a moléculas pequeñas capaces de formar bases de Schiff. Se han seleccionado como tales a la glicina y alanina, puesto que contienen átomos donadores afines al cobre y esqueletos flexibles que permiten una coordinación tetraédrica o cuadrado plana. La esfera de coordinación sería completada por un grupo lábil como una molécula de solvente o un contraion de la sal de cobre. Por otra parte, el componente cumarínico del ligando, aromático y rígido, ofrece la ventaja de propiciar una intercalación con el ADN que reforzaría la actividad antitumoral del cobre.

Sin embargo, el uso de estos ligandos tipo base de Schiff multidentados da lugar a varias posibles geometrías y modos de coordinación para los complejos de Cu(II) formados. De esta manera, al existir varias posibilidades estructurales, en el presente trabajo investigación se cuestiona qué estructura particular adoptaría el complejo de Cu(II) con los dos ligandos seleccionados.

En este sentido, un problema que limita la caracterización espectroscópica de los complejos de cobre(II) es el carácter paramagnético del centro metálico, lo que no permite el uso de la resonancia magnética nuclear, una técnica útil en la determinación de la esfera de coordinación del metal, particularmente en caso de no resultar posible un estudio cristalográfico. Por esta razón, dada la posibilidad de que la semejanza en comportamiento químico entre el Cu^{2+} y Zn^{2+} conduzca a que ambos metales formen complejos estructuralmente similares, se ha considerado la síntesis en paralelo de los complejos de cinc(II) con los dos ligandos seleccionados. Asimismo, el hecho que el Zn(II) al igual que el Cu(II) pertenezca al grupo de los metales esenciales y que, además, sea considerado como un potencial agente antitumoral hace que la síntesis de estos complejos constituya un aporte no solo a la caracterización de los complejos de cobre a

sinterizar, sino que también resulten por sí mismos de interés para una posterior evaluación de su actividad terapéutica.

En términos generales, cabe enfatizar que se requiere información estructural precisa de complejos con posible actividad farmacológica, incluida la antitumoral, que permitan establecer comparaciones con otros complejos relacionados y conduzcan a descubrir una posible relación estructura-actividad. En este sentido, una caracterización completa de los complejos de Cu(II) y Zn(II) a sintetizar constituiría un aporte significativo en el desarrollo de otros complejos estrechamente relacionados y harían posible introducir mejoras en su diseño que aumenten su potencial como posibles agentes antineoplásicos. Adicionalmente, la síntesis y caracterización de estos complejos constituye un aporte a la química de coordinación de estos metales.



2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación plantea la síntesis y caracterización estructural de complejos de cobre (II) con un diseño racional que los convierte en sujetos de interés para su posterior estudio como posibles agentes antitumorales. Este diseño toma en cuenta ciertos criterios básicos propuestos por Santini y colaboradores (sección 4.6), así como otras consideraciones estructurales asociadas a la actividad antitumoral *in vivo*.

En este sentido, se propone la síntesis de complejos de Cu(II) con ligandos derivados de la 8-formil-7-hidroxycumarina, unidos vía el grupo -CHO a diversas moléculas pequeñas provistas de grupos funcionales apropiados. Se han seleccionado a los aminoácidos glicina y alanina, puesto que además de contener el grupo -NH₂ capaz de formar bases de Schiff con el aldehído, estas últimas contienen átomos donadores N y O afines al cobre(II) y, por otro lado, al ser cadenas cortas y flexibles, ofrecen la posibilidad de formar complejos con diversos números de coordinación que incluirían los tetracoordinados. Asimismo, de comportarse como ligandos tridentados y favorecer la formación de un complejo con relación ligando/metal 1:1, la esfera de coordinación tetraédrica sería completada por un ligando lábil, por ejemplo, una molécula del solvente o el contraion de la sal precursora de cobre(II).

Otro aspecto a considerar es que el componente cumarínico del ligando, aromático y rígido, ofrece la ventaja de propiciar una intercalación con el ADN que reforzaría la actividad antitumoral del cobre. Finalmente, la derivatización con estas moléculas pequeñas bastante polares contribuiría a una disminución del carácter hidrofóbico del complejo resultante y propiciaría un adecuado balance lipofílico/hidrofílico, factor clave para una efectiva toma celular por difusión pasiva.

Por otro lado, si bien el empleo de los ligandos tipo base de Schiff seleccionados conduce a complejos que cumplen con un diseño apropiado para fungir como potenciales agentes antitumorales, estos ligandos podrían, en principio al menos, dar lugar a varias posibles estructuras para los complejos de Cu(II) formados.

De esta manera, al ser posible la formación de complejos con distintas geometrías y modos de coordinación y teniendo en cuenta que el cobre(II) suele presentar números de coordinación del 4 al 6, en el presente proyecto de investigación se cuestiona qué estructura particular adoptaría el complejo de Cu(II) con los dos ligandos seleccionados.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Diseñar, sintetizar y caracterizar complejos de Cu(II) con ligandos tipo base de Schiff derivados de la 8-formil-7-hidroxicumarina de interés como posibles agentes antitumorales.

3.2. Objetivos específicos

- Optimizar un procedimiento de síntesis reportado para el compuesto precursor 8-formil-7-hidroxicumarina.
- Desarrollar y optimizar procedimientos de síntesis para las bases de Schiff no reportadas derivadas de la 8-formil-7-hidroxicumarina a utilizar como ligandos, la N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina y la N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)-alanina.
- Caracterizar el compuesto precursor por IR, $^1\text{H-RMN}$, $^{13}\text{C-RMN}$ y técnicas de RMN bidimensionales (HSQC, HMBC).
- Caracterizar los ligandos bases de Schiff por IR y $^1\text{H-RMN}$
- Desarrollar métodos de síntesis para los nuevos complejos de Cu(II) y Zn(II) con los dos ligandos tipo base de Schiff.
- Hallar la relación estequiométrica ligando/metal en caso de los complejos de cinc(II) por el método de Job por fluorescencia.
- Determinar la composición de los cuatro nuevos complejos por las técnicas de análisis elemental, de absorción atómica y termogravimetría/calorimetría diferencial de barrido.
- Determinar el modo de coordinación de los ligandos base de Schiff al cinc(II) y al cobre(II) por las técnicas espectroscópicas IR y UV-Vis; en el caso de los complejos de cinc(II) utilizar además la espectroscopía $^1\text{H-RMN}$ y en caso de los complejos de cobre(II), la resonancia paramagnética electrónica (EPR).
- Aplicar diversas técnicas de cristalización a los complejos sintetizados para su estudio por difracción de rayos X.
- Determinar el potencial redox de los complejos de cobre(II) por voltamperometría cíclica con el fin de evaluar su potencial para actuar como agentes que mimetizan la acción de la superóxido dismutasa (SOD).

4. MARCO TEÓRICO

4.1. CÁNCER

El cáncer puede ser definido como una enfermedad por la cual un grupo de células anormales se divide incontrolablemente y se propaga a otros tejidos¹⁰.

Las células que conforman un tejido están sujetas a un mecanismo de control del crecimiento y proliferación, el cual está mediado por un balance entre la estimulación y la función inhibitoria que realizan los genes. Sin embargo, cuando un gen sufre una mutación en el ciclo celular se produce una alteración en este balance y la célula empieza a crecer y proliferarse incontroladamente formando un tumor^{11, 12}.

Un tumor puede ser situado dentro de estas tres categorías^{11, 12}:

- (a) **Tumor benigno.** Causan daño por presión local u obstrucción; sin embargo, no se propagan a otros tejidos y crecen lentamente.
- (b) **Tumor *in situ*.** Generalmente se desarrollan en el tejido epitelial y son pequeños. Presentan la apariencia morfológica de las células cancerígenas, pero no se propagan y permanecen en el tejido epitelial.
- (c) **Tumor maligno.** Son células que crecen más rápido que los tumores benignos y poseen la capacidad de invadir y destruir el tejido mesenquimal; este proceso es conocido como invasión local. Además, estos tipos de células pueden propagarse a otras partes del cuerpo mediante los sistemas circulatorios o linfático ocasionando un tumor secundario.

El proceso de desarrollo de un cáncer puede estar enmarcado en los pasos mostrados en la **figura 1**^{12, 13}.

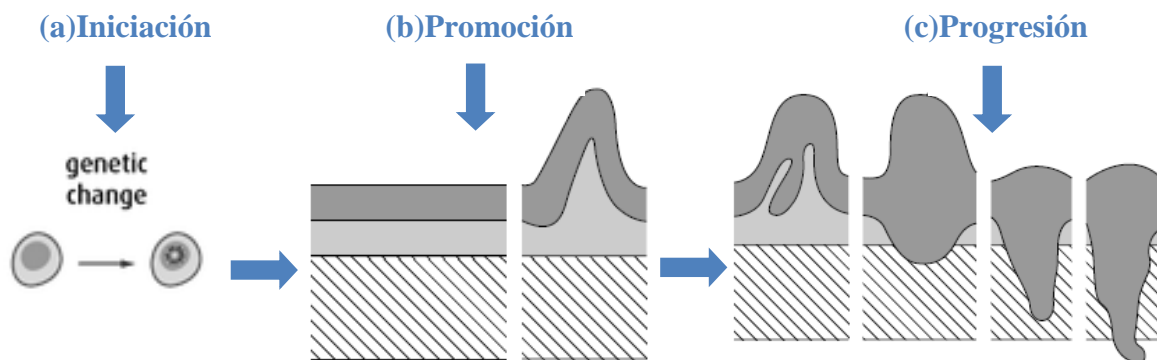


Figura 1. Etapas involucradas en el proceso de carcinogénesis¹⁴. (a) Iniciación: Se produce una alteración genética que es irreversible. (b) Promoción: Se producen cambios en la expresión del genoma mediados por interacciones promotor-receptor, en las que hormonas y algunas drogas actúan como promotores. (c) Progresión: Etapa caracterizada por la inestabilidad cariotípica y el crecimiento del tumor maligno. (*Adaptado de ref. 11 y 12*)

Las diversas variedades de cáncer se clasifican, de acuerdo al tipo de célula donde se origina, en^{10, 11}:

- (a) **Carcinoma:** Cáncer que empieza en la piel o en el tejido que recubre los órganos internos
- (b) **Sarcoma:** Cáncer que surge del tejido conectivo, entre los cuales se encuentra el cartílago, hueso, grasa, músculo, vasos sanguíneos entre otros.
- (c) **Leucemia:** Cáncer que se inicia en los tejidos que están involucrados en la formación de la sangre tales como la médula ósea.
- (d) **Linfoma y mieloma:** Son aquellos que empiezan en las células del sistema inmune.
- (e) **Cáncer del sistema nervioso central:** Son aquellos que se originan en el tejido cerebral o en la médula espinal.

La posibilidad de padecer estos tipos de cáncer puede ser aminorado modificando o evitando los principales factores de riesgo¹⁵:

- El consumo de tabaco
- El exceso de peso o la obesidad
- Las dietas malsanas con un consumo insuficiente de frutas y hortalizas
- Inactividad física
- Consumo de bebidas alcohólicas
- Infecciones por virus del papiloma humano y por el virus de la hepatitis
- Radiaciones ionizantes y no ionizantes
- Contaminación del aire de las ciudades
- Humo generado por la quema de combustibles sólidos

Los tratamientos para los distintos tipos de cáncer dependen, entre otros, del grado del tumor, la edad de la persona y el estado del mismo. Los más comunes son:

(a) Cirugía: Es uno de los principales tratamientos contra el cáncer y es comúnmente usado para confirmar el diagnóstico, determinar la severidad del caso (estado y grado del cáncer) y, en algunos casos, extirpar la mayor cantidad del tumor (“tumor debulking”)¹⁰.

(b) Radioterapia: Es el uso de radiación ionizante para inducir la necrosis de las células cancerígenas o conseguir un control local del tumor al disminuir su crecimiento y proliferación^{12, 16}. Puede ser administrado mediante una radiación externa de Rayos X o gamma, o administrado oralmente. De acuerdo a la situación clínica particular, se utiliza la *radioterapia radical* para curar el tumor, la *radioterapia auxiliar* con el objetivo de erradicar la enfermedad microscópica residual, que se aplica a dosis más bajas, y la *radioterapia paliativa* que es aplicada para reducir la masa total del tumor o para aliviar síntomas tales como el sangrado¹⁶.

(c) Quimioterapia: Es el uso de drogas o sustancias químicas para aniquilar las células cancerígenas o disminuir su crecimiento y proliferación. Este tratamiento es muy útil cuando se produce la propagación de células cancerígenas y existe la posibilidad del desarrollo de un cáncer secundario. Sin embargo, luego de una

respuesta satisfactoria a la quimioterapia, el tumor podría reaparecer con la característica de ser resistente a los agentes quimioterapéuticos usados inicialmente¹². Esto constituye un problema relativamente usual en este tipo de tratamiento.

En la **tabla 1** se presenta una clasificación general de las drogas usadas en quimioterapia^{12, 17}.

Tabla 1. Clasificación general de tipos de drogas usadas en quimioterapia.

Clasificación	Modo de acción	Tipos
Agentes alquilantes	Se forma un enlace covalente entre el agente terapéutico y el ADN con la consiguiente alteración de su estructura (formación de un aducto).	Compuestos de Platino Mostazas de nitrógeno Nitrosoureas Etileniminas Alquil sulfonato Tetrazina
Antimetabolitos	Inhiben la síntesis de ADN y/o ARN mediante la sustitución de las bases púricas o pirimídicas por estructuras análogas.	Análogos a la pirimidina Análogos a la purina Otros metabolitos
Antibióticos	Estos compuestos pueden intercalarse entre las bases del ADN impidiendo su replicación.	Antraciclinas
Inhibidores de topoisomerasas	Inhiben la función de las enzimas topoisomerasas encargadas de la topología del enrollado de la doble hélice del ADN.	Inhibidores de Topoisomerasa I Inhibidores de Topoisomerasa II
Inhibidores de la mitosis	Interactúan con la proteína tubulina y, en consecuencia, afectan la formación de microtúbulos en la mitosis.	Taxanos Alcaloides de la Vinca

Además existen otros medicamentos anticancerígenos cuyo modo de acción es diferente a las descritas y se encuentran agrupados como **misceláneos**. Esta categoría adicional

incluye agentes de diferenciación, interferones y citoquinas relacionadas, y por último hormonas¹⁷.

4.2. METALOFÁRMACOS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Un metalofármaco se define como un agente terapéutico que posee un centro metálico activo. El desarrollo de metalofármacos constituye un campo de investigación muy activo en el área de la química inorgánica medicinal, la cual ofrece una alternativa atractiva en la terapia o diagnóstico de enfermedades^{18, 19}. Esta área se ocupa además de investigar la farmacocinética del metalofármaco en el organismo y su mecanismo de acción. En la actualidad ya se dispone de una creciente farmacopea de agentes terapéuticos y de diagnóstico basado en un centro metálico.

La aplicación de un metal para el tratamiento de diversas enfermedades data desde la antigüedad²⁰ y su relativamente reciente desarrollo en el ámbito de la química inorgánica medicinal ha producido importantes contribuciones en esta área. En la **tabla 2** se muestra una selección de los más importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico basados en metales, que marcaron un hito en la química inorgánica medicinal²¹:

Tabla 2: Metalofármacos que han desempeñado un papel trascendental en el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico. (*Adaptado de ref. 21*)

Año	Metalofármaco	Uso clínico	Utilizado actualmente
1780	Subsalicilato de bismuto	Dispepsia	Sí
1890	Dicianoaurato(I) de potasio	Antibacterial	No
1910	Arsfenamina	Sífilis	No
1949	Carbonato de litio	Enfermedad bipolar	Sí
1961	^{99m} Tc pertecnetato	Diagnóstico de cáncer tiroideo	Sí
1971	Cisplatino	Cáncer testicular	Sí
1980	Auranofina	Artritis reumatoide	Sí
1988	Gadopentetato de dimeglumina (Magnevist)	Agente de contraste en MRI	Sí
1997	¹⁵³ Sm-EDTMP	Alivio del dolor del cáncer de hueso	Sí
2004	Carbonato de Lantano	Enfermedad renal en etapa terminal	Sí

La **figura 2** ilustra los órganos donde ejercen su acción los principales metalofármacos usados clínicamente en diagnóstico y terapia de una amplia variedad de patologías humanas.

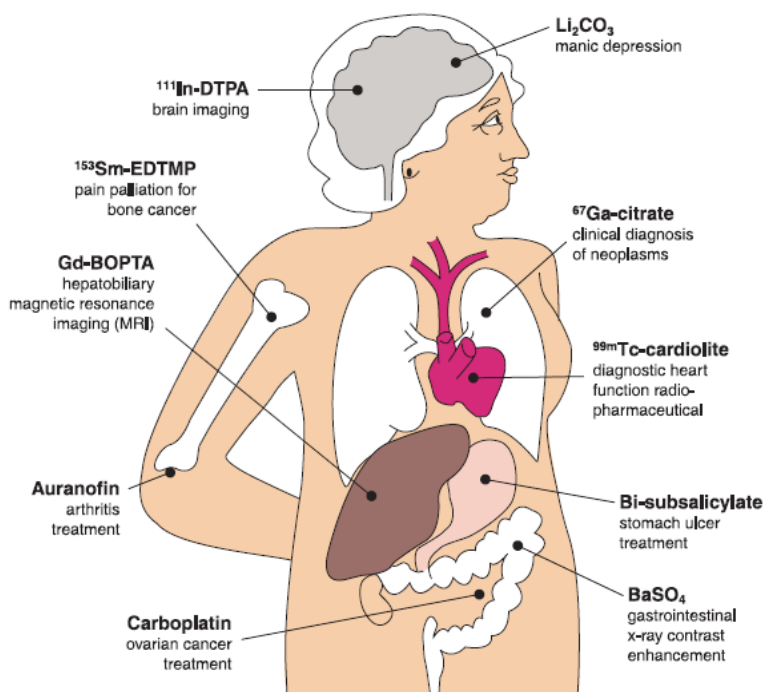


Figura 2. Algunos metalofármacos de uso clínico y sus sitios de acción.

(Adaptado de ref. 22)

De lo anteriormente expuesto resulta evidente que las sales y, en especial, los complejos metálicos ofrecen una alternativa de gran interés en el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diferentes tipos de enfermedades. La coordinación de los centros metálicos activos por moléculas orgánicas que actúan como ligandos ofrece la posibilidad de mejorar la efectividad terapéutica del metal mediante una mejora en su bioabsorción por difusión pasiva, entre otros. Las características geométricas y átomos donadores presentes en el ligando determinan el número y modo de coordinación, así como la estructura particular del complejo metálico. Asimismo, la selección apropiada del ligando permite regular los posibles procesos redox que experimenta el metal bajo condiciones fisiológicas, así como la fuerza del enlace metal-ligando y la velocidad de intercambio de ligandos; estas últimas influyen en la estabilidad del complejo frente a reacciones competitivas por biomoléculas capaces de secuestrar al metal. Todos estos factores influyen en la biodisponibilidad, biodistribución, farmacocinética y por consiguiente la

efectividad terapéutica del complejo; además de ofrecer potenciales ventajas respecto a los fármacos basados en moléculas orgánicas^{5, 9, 23}.

El complejo $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$, conocido como cisplatino, fue el primer metalofármaco anticancerígeno aprobado por la FDA para su uso clínico y constituye, aún en la actualidad, uno de los agentes quimioterapéuticos más exitosos en el tratamiento de un amplio rango de tumores. Barnett Rosenberg y colaboradores descubrieron casualmente en 1965 la actividad de este complejo; mientras estudiaban los efectos de la corriente eléctrica sobre las células, notaron que aquellas de *Escherichia coli* formaban largos filamentos sin sufrir un proceso de división celular. Estudios posteriores demostraron que la inhibición celular era producida por cisplatino, el cual se generaba de los electrodos de platino y del electrolito de cloruro de amonio²⁴.

El cisplatino es un complejo cuadrado plano con dos ligandos NH_3 (inertes) y dos aniones Cl^- (lábil) en configuración *cis*. El mecanismo de acción de este complejo de coordinación se esquematiza en la **figura 3**. Cuando este compuesto ingresa a la célula sufre una reacción de sustitución con el agua, por la baja concentración de cloruro en su interior, lo que genera especies catiónicas altamente reactivas. Estas especies son capaces de entrar al núcleo y ser atraídas electrostáticamente por el ADN. Esta interacción es seguida por la formación de enlaces covalentes dativos con los átomos de nitrógeno (principalmente N-7) de las bases púricas, los que sustituyen a las moléculas de agua y generan un entrecruzamiento del tipo intra-hebra o inter-hebra del ADN. Esta reacción altera la conformación terciaria del ADN y evita la replicación del mismo, proceso clave en la división celular. Sin embargo, existen reacciones secundarias en el citoplasma y plasma con los grupos sulfhidrilos (bases blandas) del glutatión y de la cisteína respectivamente, capaces de desactivar al cisplatino²⁴.

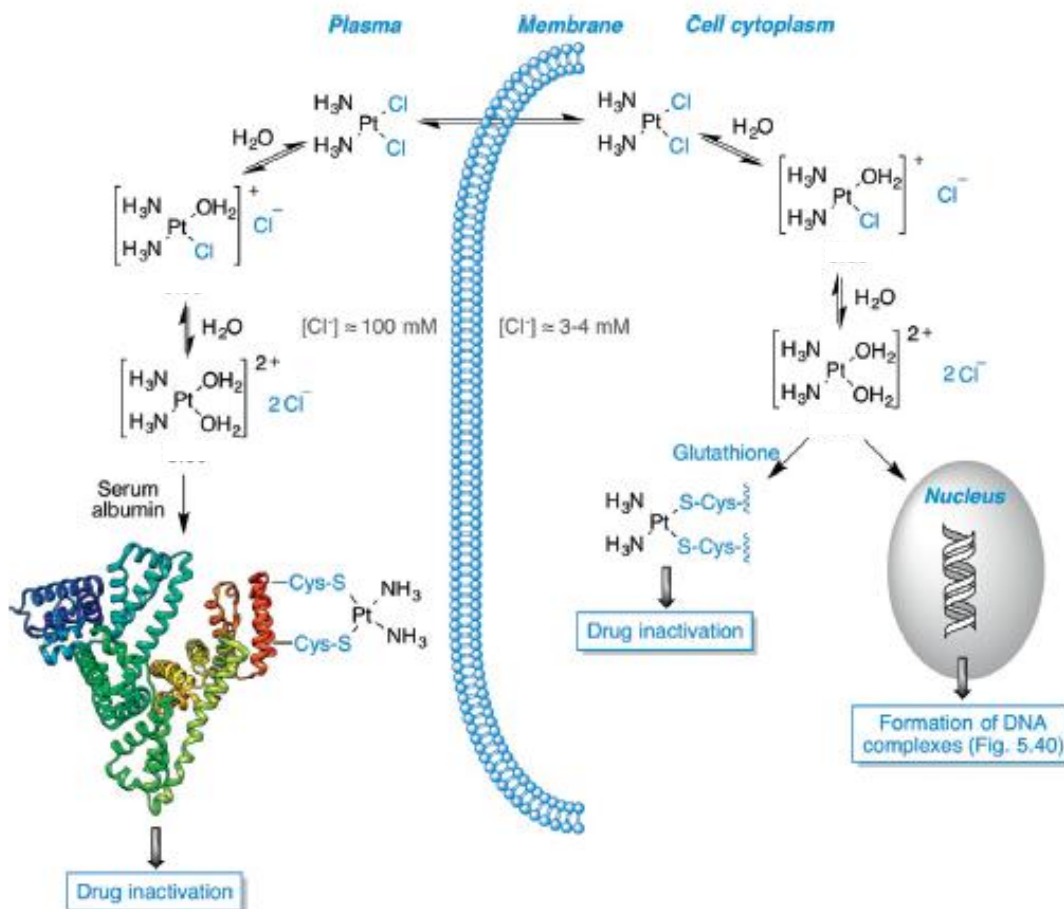


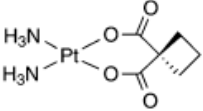
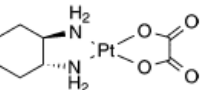
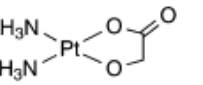
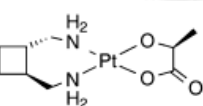
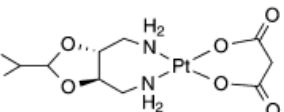
Figura 3. Mecanismo de acción del cisplatino. (Ref.24)

A pesar de su alta efectividad, el tratamiento con cisplatino suele presentar una serie de efectos secundarios (nefrotoxicidad, neurotoxicidad, ototoxicidad, mielosupresión) que limitan la dosis a emplear y, además los tratamientos prolongados inducen a una resistencia intrínseca o adquirida al mismo^{3, 25}. Estas desventajas propiciaron nuevas investigaciones orientadas a desarrollar tanto complejos análogos del cisplatino con propiedades optimizadas como agentes anticancerígenos basados en metales esenciales y con otros metales activos⁵.

4.2.1. Agentes anticancerígenos análogos del cisplatino

Se han sintetizado diferentes análogos basados en una modificación del ligando con la intención de mejorar su selectividad y su índice terapéutico²⁴. En la **tabla 3** se muestran los análogos del cisplatino cuyo uso clínico ha sido autorizado por la FDA, así como otros que se encuentran aún en ensayos clínicos en U.S.A., pero ya han sido aprobados en algunos países:

Tabla 3: Complejos de platino de uso clínico ^{3, 19, 24, 26}

Compuesto	Aprobado	Ventaja frente al cisplatino
 <p>carboplatin</p>	FDA en 1989	El efecto quelato del anillo de seis miembros reduce su reactividad química y efectos secundarios tales como ototoxicidad y nefrotoxicidad.
 <p>oxaliplatin</p>	FDA en 2002	Presenta un espectro de actividad diferente al cisplatino y carboplatino; además, no genera una resistencia cruzada en un tratamiento combinado con los anteriores.
 <p>nedaplatin</p>	Japón	Presenta una menor toxicidad que el cisplatino y es capaz de disminuir parcialmente la resistencia del cisplatino.
 <p>lobaplatin</p>	China	Es más estable, menos tóxico, presenta un mejor índice terapéutico y puede resultar efectivo en superar la resistencia que conlleva su tratamiento.
 <p>heptaplatin</p>	Corea del Sur	Presenta una alta estabilidad en solución, sin una notable toxicidad y con una alta actividad anticancerígena respecto a las células resistentes al cisplatino.

Además, se han estudiado otros metalofármacos de platino, entre ellos algunos complejos octaédricos de Pt(IV) tales como el sartraplatin, que podría ser administrado oralmente, así como el recientemente desarrollado ProLindacTM, que incluye un ligando bidentado unido vía un espaciador a una cadena polimérica hidrofílica (HPMA)³.

4.2.2. Agentes anticancerígenos diferentes al cisplatino

Esta clase comprende complejos con otros metales no esenciales para el organismo. Su objetivo es enfrentar los problemas asociados a la resistencia adquirida o inherente al cisplatino, así como el tratamiento de tumores que no responden a este fármaco.

4.2.2.1. Complejos de Rutenio

Dos compuestos representativos que se encuentran en la etapa de ensayos clínicos son NAMI-A y KP-1019 (**figura 4**). El reciente interés por estos compuestos radica en que la cinética de sustitución de sus ligandos Cl^- es muy similar a aquella de los de Pt(II) ²³. Asimismo, presentan un comportamiento similar a los de Pt(IV) , en el sentido que son reducidos por agentes reductores biológicos tales como ascorbato, glutatión o NADPH en un ambiente hipóxico como es el usualmente encontrado dentro de los tumores sólidos. De esta manera, el Ru(III) , considerado como una prodroga, ingresa a la célula transportado por la proteína transferrina²⁷ y sufre una reducción en su interior a Ru(II) , especie propuesta como el agente activo de su efecto anticancerígeno.

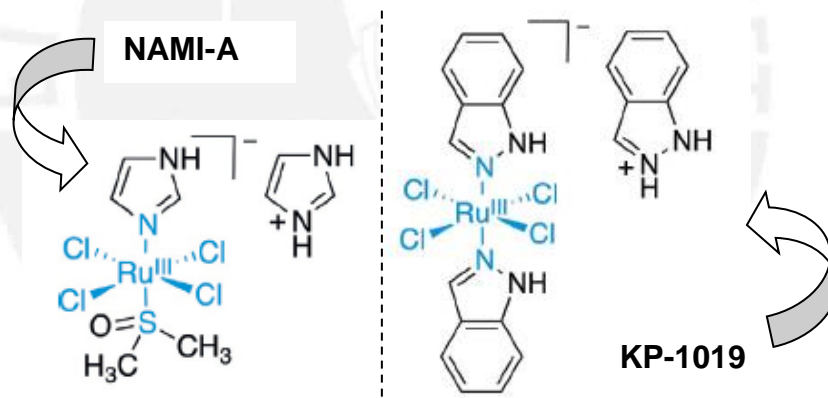


Figura 4: Complejos de Ru(III) actualmente en ensayos clínicos. (Adaptado de ref. 24)

4.2.2.2. Complejos de Titanoceno

El dicloruro de titanoceno fue uno de los primeros compuestos organometálicos que ingresaron a la fase clínica para ser estudiado como un posible agente antitumoral. Sin embargo, se presentaron diversos problemas que condujeron a que solamente alcance la fase clínica II. En primer lugar, se encontró en la fase clínica I que la mayor parte del complejo era secuestrado por las proteínas plasmáticas, lo que limitaba su biodisponibilidad a un 20-30%. Este hecho unido a su pobre solubilidad en medios

acuosos y su inestabilidad hidrolítica bajo condiciones fisiológicas condujeron a su pobre actividad citotóxica en la fase clínica II²⁸. Su mecanismo de acción no es conocido. Similarmente, otro complejo de titanio, el budotitano, aunque mostró cierta actividad *in vitro* no mostró resultados alentadores en los ensayos clínicos²⁴.

Los estudios posteriores se han centrado más bien en titanoceno modificados, pero ninguno ha alcanzado aún la fase clínica.

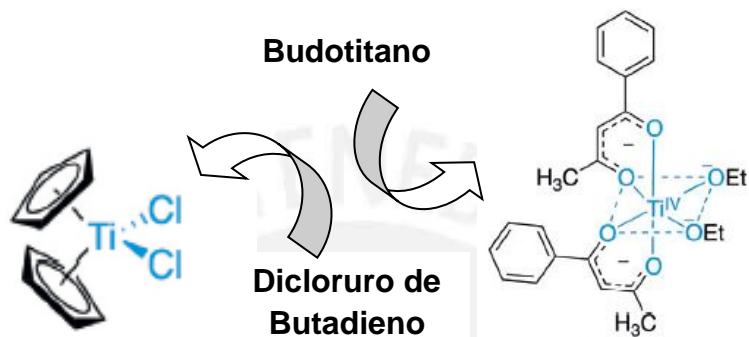
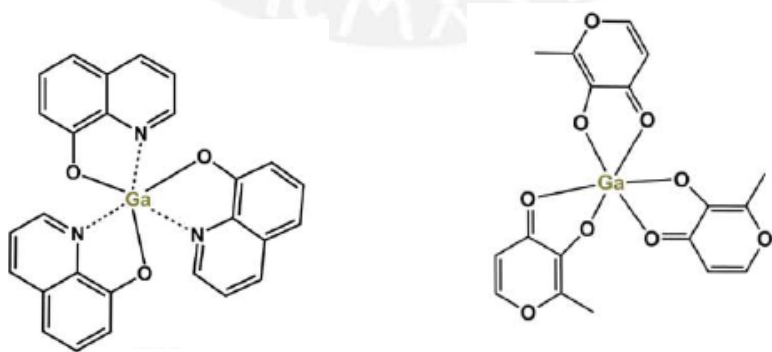


Figura 5: Complejos de Titanio sometidos a ensayos clínicos. (Adaptado de ref. 24)

4.2.2.3. Complejos de Galio

El comportamiento químico del Ga(III) es similar al del Fe(III); sin embargo, el Ga(III) no sufre procesos de reducción bajo condiciones fisiológicas, lo que propició el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en este centro activo. Dos complejos de Ga(III) se encuentran en la actualidad en ensayos clínicos (**figura 6**); su mecanismo de acción se ha asociado con la inhibición de la enzima ribonucleótido reductasa (RR) implicada en la replicación del ADN²³.



Tris-8-quinolato de Galio

Tris-maltolato de Galio

Figura 6: Complejos de Galio en ensayos clínicos

Además de los complejos metálicos antes mencionados (Ru, Ti, Ga), que han alcanzado ya la fase de ensayos clínicos, existen otros complejos de coordinación diferentes al platino que se encuentran en la etapa de investigaciones preclínicas. Estos serán discutidos a continuación.

4.2.2.4. Compuestos de Osmio

Diversos complejos Os(II)-areno desarrollados por Sadler y colaboradores²⁹ presentan una citotoxicidad comparable al carboplatino y cisplatino. Además, estos complejos, que presentan un mecanismo de acción diferente al cisplatino, no dan lugar a resistencia cruzada en tratamientos combinados. Se ha postulado un mecanismo de acción similar al del rutenio²³.

4.2.2.5. Compuestos de Oro

Los complejos de Au(III) están siendo investigados debido a que este ion es isoelectrónico con el Pt(II) y, dada su configuración d^8 , suelen presentar la misma geometría (cuadrado-plano). Una dificultad inicial fue su inestabilidad bajo condiciones fisiológicas por su fácil reducción a oro metálico^{5, 23}; sin embargo, el reciente desarrollo de ligandos que incrementan la estabilidad del metal, tales como la porfirina y ditiocarbamatos, han permitido que estos compuestos puedan ser sometidos a pruebas *in vitro* e *in vivo* con resultados satisfactorios²³. Su modo de acción está relacionada con la inhibición en las funciones de la mitocondria y proteosoma.

4.2.2.6. Complejos de Vanadio

Diferentes compuestos de vanadio han sido sometidos a pruebas *in vivo* como agentes antitumorales³⁰. Los resultados demostraron que su actividad estaba relacionada con la inhibición de la proteína tirosina fosfatasa y/o con la activación de la proteína tirosina fosforilasa. Además, durante la reducción intracelular de V(V) a V(IV) se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) en reacciones tipo Fenton. Otro aspecto positivo del vanadio es su menor toxicidad respecto al cisplatino.

4.2.3. Agentes anticancerígenos basados en metales esenciales

Este es un campo que está avanzando rápidamente en el estudio de metalofármacos anticancerígenos y parte principalmente de la premisa de que los metales endógenos o esenciales para la vida son menos tóxicos para las células normales respecto a las cancerígenas⁵.

La mayoría de estas moléculas se encuentran en fase preclínica; las más importantes se discuten a continuación.

4.2.3.1. Complejos de Cobalto

En el grupo de pro-fármacos susceptibles a procesos redox, se ha sintetizado una serie de complejos de cobalto(III) que contienen ligandos acetilacetato y otros relacionados con las denominadas mostazas de nitrógeno. Estos compuestos serían activados por biorreducción bajo las condiciones hipóxicas que existen dentro del tumor³¹.

Los complejos de Co(III) adoptan geometrías octaédricas de bajo espín en campo fuerte y, además, son relativamente inertes. Sin embargo, el proceso de reducción genera complejos de Co(II) inestables con estos tipos de ligandos, lo que favorece reacciones de sustitución y conduce a la liberación del principio activo perteneciente a la clase “mostaza de nitrógeno”. El efecto terapéutico de estos compuestos se basa en la alquilación de la base púrica del ADN. Si bien presentan una actividad limitada³¹; posteriores modificaciones y optimizaciones podrían generar mejores agentes anticancerígenos.

4.2.3.2. Complejos de Hierro

Los primeros complejos de hierro que presentaron actividad anticancerígena fueron las sales picrato y tricloroacetato de ferroceno, cuya actividad está relacionada con la habilidad de este metal de formar especies reactivas de oxígeno que conducen a un daño oxidativo del ADN³². Se han sintetizado un gran número de complejos ferroceno derivatizados en los anillos ciclopentadienilo que han resultado activos; su desarrollo se ha enfocado en lograr una alta lipofiliidad²⁸.

Por otro lado, también se han investigado complejos de coordinación clásicos de hierro con ligandos piridínicos pentadentados, tiosemicarbazonas, bases de Schiff, entre otros. Muchos de ellos mostraron interesantes propiedades anticancerígenas hacia diferentes

líneas celulares, mostrando un mecanismo de acción diferente a los del grupo del platino, lo que resulta de interés para tratar tumores resistentes a estos últimos³².

4.2.3.3. Complejos de Cinc

El cinc cumple un rol importante en muchos procesos celulares, tales como la proliferación y diferenciación celular, así como defensa contra radicales libres. La alteración de la concentración de cinc ha sido relacionada al desarrollo del cáncer y es un proceso dependiente del tipo de tumor. En ese sentido, se han encontrado niveles bajos de cinc en pacientes con cáncer de hígado, vesícula biliar, tracto digestivo y próstata³³, mientras que altos niveles de cinc se diagnosticaron en pacientes con cáncer de mama³⁴. Estas concentraciones antagónicas del cinc se encuentran actualmente bajo investigación ya que el empleo de agentes exógenos de cinc puede producir alteraciones en las células normales; por ejemplo, se ha encontrado que una exposición a bajos niveles de cinc induce la apoptosis en células normales, mientras que una alta exposición inhibe la apoptosis³³. A pesar de no encontrarse aún bien esclarecido su modo de acción, este metal es considerado un potencial agente antitumoral.

En la última década, se han sintetizado y evaluado una variedad de complejos de cinc(II) con prometedora actividad anticancerígena. Así, el complejo de cinc(II) con el ligando 2-acetilpiridina-N(4)-1-(2-piridil)-piperaziniltiosemicarbazona (Ac4Npypipe) presentó una alta actividad antitumoral inhibitoria sobre líneas celulares de leucemia P388 en ratones y su mecanismo de acción se relacionó a una interacción con el ADN y/o proteínas³⁵. Asimismo, el complejo de cinc(II) con el ligando 4-ciclohexil-4-metil-3-tiosemicarbazona (DpC), próximo a ser ensayado clínicamente, presentó actividad citotóxica sobre líneas celulares de carcinoma KBV1; se presume que su acción está asociada a una transmetalación con cobre presente al interior del lisosoma e inducción de ROS³⁶.

Otros investigadores, basándose en el proceso de intercalación que presentan algunos complejos de platino al interaccionar con el ADN, sintetizaron varios complejos de cinc(II) con derivados del bis-benzimidazol, alguno de los cuales demostró actividad citotóxica a bajas concentraciones contra líneas celulares de cáncer de mama MCF-7³⁷.

Milacic y colaboradores han sintetizado complejos de cinc(II) y cobre(II) con el ligando ditiocarbamato de pirrolidina. El complejo de cinc(II) mostró actividad citotóxica hacia líneas celulares de cáncer de mama y próstata con un mecanismo de acción asociado a la

apoptosis por inhibición de la actividad del proteosoma³⁸. Un dato interesante es que un tratamiento combinado con $ZnSO_4$ y ditiocarbamato de pirrolidina generó actividad antiproliferativa hacia una línea de cáncer páncreas (mutación en p53) también por apoptosis, pero dependiente en este caso de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)³⁹.

De esta manera, los complejos de cinc(II) representan una alternativa de interés en el desarrollo de nuevos agentes antineoplásicos con diferentes modos de acción y que podrían resultar efectivos para el tratamiento de una variedad de tipos de cáncer.

4.2.3.4. Complejos de Cobre

El interés por el cobre como agente antineoplásico deriva de su actividad redox en condiciones hipóxicas, lo que da lugar a una actividad citotóxica selectiva hacia células cancerígenas. De esta manera, una ventaja de los complejos de cobre(II) a ser desarrollados como agentes antitumorales sería la reducción de los efectos secundarios y la alteración del metabolismo de las células cancerígenas⁴.

Se han sintetizado y evaluado numerosos complejos de Cu(II) con diferentes tipos de ligandos, tales como tiosemicarbazonas, tiosemicarbazidas, 8-hidroxiquinolinas, carboxilatos, imidazoles, bases de Schiff, sistemas macrocíclicos y polidentados, entre otros⁴. Estos complejos, a diferencia de los agentes antineoplásicos análogos al cisplatino, han mostrado una variedad de mecanismos, las que incluyen una interacción con el ADN, inhibición del proteosoma, inhibición de la topoisomerasa, parapotosis, apoptosis y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS)⁶. En consecuencia, los complejos de cobre podrían ser usados en el tratamiento de tipos de tumores para los que no resulte efectivo el cisplatino y, además, usados en tratamientos combinados, permitirían enfrentar la resistencia adquirida o inherente al cisplatino.

De lo anteriormente mencionado se concluye que los complejos de cobre podrían convertirse en uno de los agentes antineoplásicos basados en metales esenciales más prometedores y, por ello, representan el eje principal de esta investigación.

4.3. CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS DEL COBRE

La química del cobre está dominada por dos estados de oxidación estables, el Cu(II) y Cu(I). El ion cuproso posee la configuración d^{10} , sus compuestos son diamagnéticos y se oxidan con facilidad; asimismo es susceptible a reacciones de dismutación en solución. En lo que respecta a su química de coordinación, forma principalmente complejos con números de coordinación bajos, 2, 3 o 4. Por otro lado, ion cúprico es d^9 , sus compuestos son paramagnéticos y estables tanto al estado sólido como en solución. Forma complejos con números de coordinación más altos, 4, 5 o 6⁴⁰.

El cobre es un elemento traza esencial para el crecimiento, desarrollo y función equilibrada del organismo. El cobre participa en muchos procesos biológicos, principalmente como una parte integral de diversas enzimas, en funciones tales como respiración celular (citocromo c oxidasa), defensa antioxidante (superóxido dismutasa, proteína que contiene Cu y Zn), formación del tejido conectivo (lisil oxidasa y proteínas relacionadas), biosíntesis de neurotransmisores (DBH), entre otras. Además, el cobre está implicado en otros procesos como angiogénesis, conversión oxidativa de aminas a aldehídos (VAP-1) y oxidación de Fe^{2+} a Fe^{+3} (ceruloplasmina), entre otros^{6, 41}.

Las principales proteínas encargadas del transporte del cobre son el CTR1 (alta afinidad al cobre), el CTR2 (baja afinidad al cobre) y DMT1, las cuales son responsables de la entrada de cobre a la célula. Una vez dentro de la célula, las chaperonas de cobre (CCS, Atox1, Cox17, SCO1 y SCO2) son las encargadas de transportarlo a compartimientos intracelulares específicos ubicados en la mitocondria y el aparato de Golgi. Adicionalmente, la metalotionina (MTN) y el Glutatión (GHS), dos antioxidantes celulares, ayudan a prevenir que el cobre libre catalice la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Por último, si el nivel de cobre es alto, las proteínas ATP7A y ATP7B son las responsables de expulsar el exceso de cobre fuera de la célula^{6, 42}.

Las propiedades redox del cobre desempeñan una función esencial en diversas reacciones enzimáticas; sin embargo, esta característica también la convierte en potencialmente tóxica para la célula. Por ejemplo, el cobre puede catalizar la producción de radicales libres y, en consecuencia, dañar a lípidos, proteínas, ADN y otras biomoléculas. Asimismo, el cobre puede interferir con las proteínas que contienen hierro-azufre y puede desplazar otros metales tales como el cinc de las metaloproteínas inhibiendo su actividad⁶.

4.4. HOMEOSTASIS DEL COBRE

El exceso o acumulación del cobre en el organismo puede conducir a una serie de alteraciones biológicas; de ahí la importancia del mecanismo homeostático que regula su absorción, distribución y excreción. El cobre es absorbido principalmente en el duodeno mediante los enterocitos de la mucosa intestinal; este proceso es promovido por su complejación a citrato, fosfato y glutamato⁴³. Luego, el cobre es transportado por las proteínas plasmáticas ceruloplasmina, albúmina y transcupreína hacia la proteína CTR1, CTR2 y DMT1 localizadas en la membrana celular⁶. Una vez dentro de la célula, el cobre forma complejos con las chaperonas de cobre, metioneína y/o glutatona; de esta manera el cobre libre se mantiene en un nivel adecuado para cumplir con un conjunto de actividades biológicas⁴¹. Dos proteínas, la ATP7A y la ATP7B, localizadas principalmente en la red del trans-Golgi, son responsables de remover el exceso de cobre fuera de la célula, siendo la excreción biliar la vía principal de eliminación de cobre^{6, 44}.

Una alteración en la homeostasis del cobre conduce a dos enfermedades, la de Menkes asociada a una deficiencia de cobre y la Wilson asociada a un exceso del mismo⁴.

4.5. COBRE Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER

Diversos reportes han demostrado un nivel elevado de cobre en suero en diferentes tipos de cáncer, en contraste a lo que ocurre con cinc, hierro y selenio⁴⁵. Además, se ha comprobado que este metal está relacionado con el crecimiento, angiogénesis y metástasis del cáncer⁶. Por otro lado, las especies reactivas de oxígeno (ROS) generadas por metales redox activos, pueden actuar de dos maneras antagónicas entre sí. Así, en células cancerígenas se observa un incremento moderado de ROS, causado por anormalidades metabólicas y señalización oncogénica, que al no superar el umbral tóxico permite su supervivencia y promueve su proliferación. Sin embargo, si el nivel de ROS supera este umbral, es capaz de vencer el mecanismo de defensa antioxidante de la célula afectada y producir su muerte⁴⁶.

De lo anteriormente discutido, surgen dos enfoques respecto al papel del cobre en el tratamiento del cáncer. Uno de ellos está dirigido al diseño de agentes quelantes de cobre con el objetivo de inhibir el crecimiento del tumor; entre ellos destacan el tetratiomolibdato (actualmente en ensayos clínicos), la trientina y la D-penicilamina. Sin embargo, existe vasta evidencia de que el tratamiento basado únicamente en agentes quelantes resulta

insuficiente para matar las células cancerígenas⁶; por lo que la tendencia actual es a aplicarlos en un tratamiento combinado con otros agentes quimioterapéuticos o con radioterapia.

Por otra parte, un segundo enfoque de interés más reciente⁹, se orienta al diseño de complejos de coordinación de cobre como agentes anticancerígenos; esto con el objetivo de incrementar la cantidad de ROS al interior del tumor de manera exógena y, de esta manera, sobrepasar el umbral tóxico que conduce a la muerte de las células cancerígenas. En la **figura 7** se compara el efecto que ejerce un agente exógeno productor de ROS sobre una célula normal y sobre una cancerígena. En el primer caso, el aumento en ROS no resulta tóxico, mientras que en el segundo causa la muerte celular. Esto proporcionaría una base bioquímica al diseño de agentes terapéuticos que causen una muerte selectiva de células cancerígenas mediante un mecanismo de producción de ROS⁴⁶.

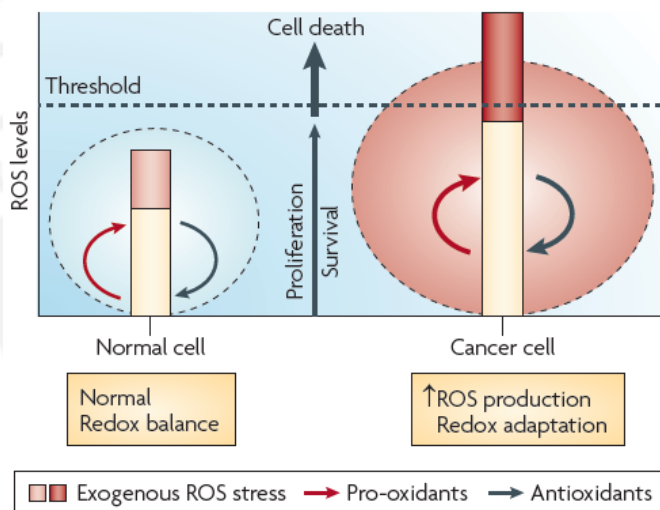


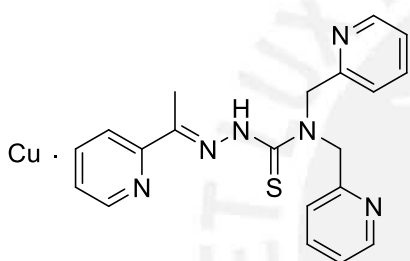
Figura 7: Fundamento para el tratamiento con complejos de cobre u otros metales redox activos que puedan generar un incremento de ROS (*Adaptado de ref. 46*)

4.6. COMPLEJOS DE COBRE COMO AGENTES ANTITUMORALES

Tisato y colaboradores⁴⁷ han propuesto una clasificación de los complejos de cobre que han mostrado actividad citotóxica según el tipo de ligando base.

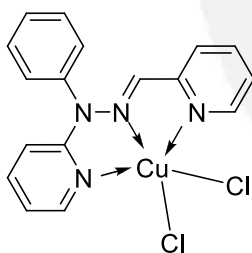
- Complejos de cobre con ligandos tiosemicarbazonas y bases de Schiff.
- Complejos de cobre con ligandos imidazoles y relacionados.
- Complejos de cobre con ligandos N-aromáticos aceptores π .
- Complejos de cobre con ligandos fosfina.

La mayoría de los complejos que integran estos grupos han sido investigados en ensayos pre-clínicos *in vitro*⁴ y, hasta la fecha, muy pocos han sido estudiados *in vivo*. Algunos de estos últimos se muestran en las **figuras 8 y 9**.



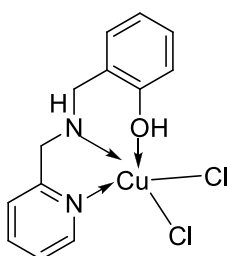
Tipo de tumor: Xenoinjerto HL60 (Leucemia).

Mecanismo propuesto: Su actividad antitumoral está relacionada con la producción de ROS, disminución de GSH y reducción de proteínas que contienen grupos tioles.



Tipo de tumor: Cáncer de mama inducido por N-metil-N-nitrosoúrea (MNU).

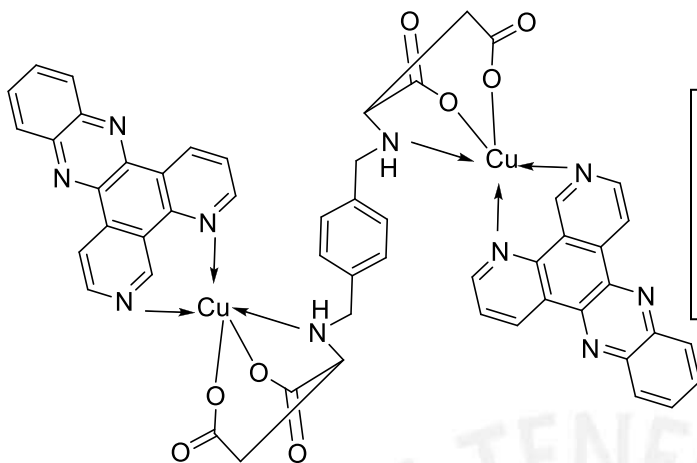
Mecanismo propuesto: Induce apoptosis mediante caspasas, supresión de la catalasa y GSH (determinado por PCR y electrotransferencia).



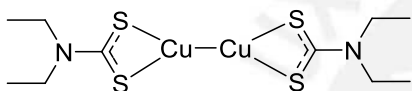
Tipo de tumor: Xenoinjerto THP-1 (Leucemia) y Xenoinjerto B16-F10 (Melanoma).

Mecanismo propuesto: Induce muerte celular por apoptosis (vía intrínseca y extrínseca).

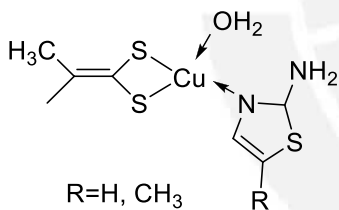
Figura 8. Algunos complejos de cobre representativos que se encuentran en ensayos pre-clínicos *in vivo*^{48, 49, 50}.



Tipo de tumor: Xenoinjerto HepG2 (Cáncer de hígado).
Mecanismo propuesto: induce muerte celular por apoptosis.



Tipo de tumor: Xenoinjerto SW1990 (Cáncer de páncreas).
Mecanismo propuesto: induce muerte celular por inhibición de la actividad del proteosoma.



Tipo de tumor: Leucemia P388.
Mecanismo propuesto: Su actividad antitumoral se ha correlacionado con la alta polaridad de los complejos y con posibles interacciones electrostáticas. No existe correlación con su lipofilidad.

Figura 8: Algunos complejos de cobre representativos que se encuentran en ensayos pre-clínicos *in vivo*. (Continuación) ^{51, 52, 53}

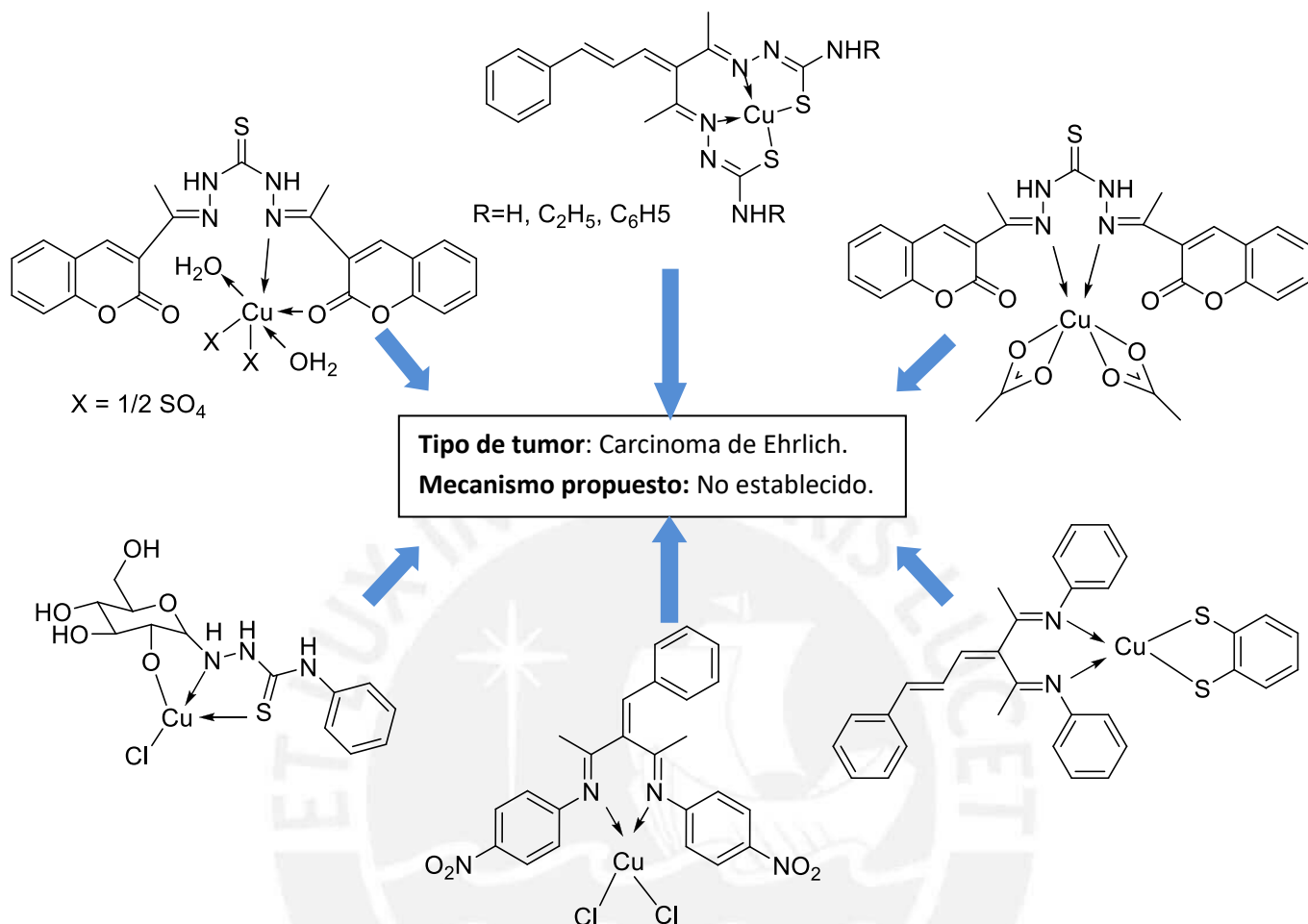


Figura 9: Complejos de cobre activos hacia el carcinoma de Ehrlich en ensayos pre-clínico *in vivo*^{54, 55, 56, 57, 58}.

Además, existe un complejo de cobre que se encuentra en fase clínica 1 denominado Cas III-ia⁵⁹; su estructura se muestra en la **figura 10**.

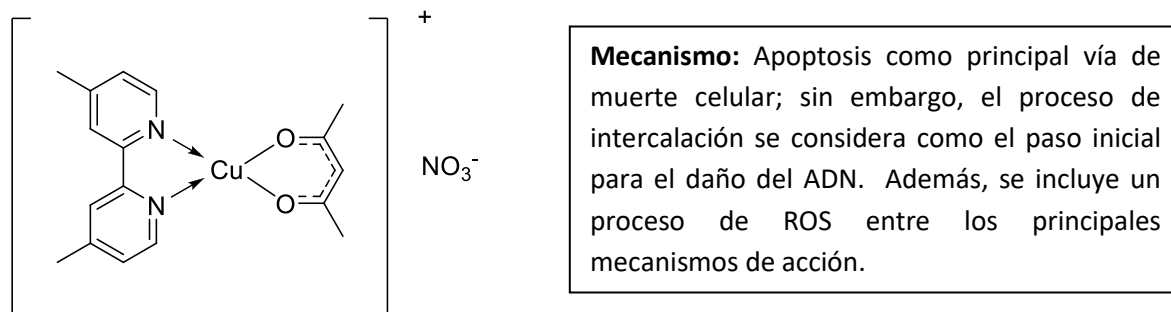


Figura 10: Complejo de cobre Cas III-ia de reciente ensayo clínico

Santini y colaboradores⁴, considerando algunos de los compuestos *in vivo* descritos anteriormente y aquellos complejos de cobre que presentan alta actividad citotóxica en ensayos *in vitro*, propusieron algunos criterios que podrían ser tomados en cuenta para el diseño de complejos de cobre que sean potencialmente activos; estos se describen a continuación:

- a) Complejos de cobre tetra o pentacoordinados presentarían una mejor actividad citotóxica comparados con los hexacoordinados.
- b) La presencia de uno o más grupos lábiles aumentarían la actividad frente a células cancerígenas. Por ejemplo: agua, halógenos, solventes o contraiones.

Asimismo, los mismos autores analizaron diversos complejos de cobre cuyo mecanismo de acción está relacionada con la afinidad de unirse al ADN. En los estudios tomados en cuenta se observó que la planaridad del ligando desempeñó un papel esencial en la formación de un enlace con el ADN. De esta manera, se podría considerar un tercer criterio que se basa en una interacción DNA-metal que es típica del cisplatino,

- c) Complejos que incluyen ligandos con una estructura aromática extendida podrían presentar un mecanismo de acción asociado a una interacción con el ADN vía intercalación que a menudo induce citotoxicidad a un nivel de concentración de escala nanomolar⁴.

Por otro lado, basado en los ensayos *in vivo* mostrados en este apartado, se considera que el nitrógeno del grupo imino es uno de los principales átomos donadores para formar un complejo que podría presentar actividad citotóxica. De esta manera, se puede considerar un cuarto criterio,

- d) Complejos que presenten al átomo de nitrógeno como átomo donador podría ser beneficioso para obtener un complejo de cobre(II) con posible actividad citotóxica.

4.7. COMPLEJOS DE COBRE Y SU PROBABLE MECANISMO DE ACCIÓN COMO AGENTES ANTITUMORALES

La **figura 11** resume los principales mecanismos de acción, en base a los datos obtenidos en ensayos *in vitro* e *in vivo*, que un complejo de cobre podría presentar.

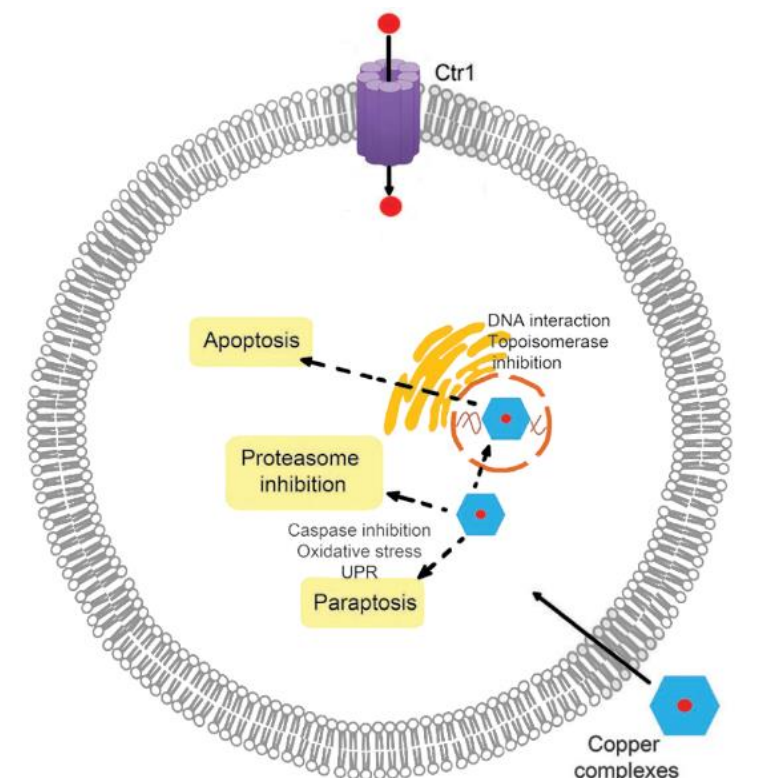


Figura 11: Probables mecanismos de acción que un complejo de cobre ejerce en el interior de la célula. (Adaptado de ref. 6)

Apoptosis: Es un tipo de muerte celular programada caracterizado por el redondeo de la célula, retracción de pseudópodos celulares, reducción del volumen celular, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, pequeñas o ninguna modificación de las organelas citoplasmáticas, formación de protuberancias en la membrana plasmática y finalmente la absorción de los remanentes de la célula por fagocitos residentes⁶⁰.

Parapoptosis: Es una forma de muerte celular programada pero bioquímica y morfológicamente distinta a la apoptosis. Este tipo de muerte celular, cuya activación está relacionada con la proteína IGF-1, está asociada con una vacuolización citoplasmática e hinchazón mitocondrial⁶⁰.

Inhibición del Proteosoma: El proteosoma es un complejo multienzimático que proporciona la principal vía de degradación y elaboración de proteínas intracelulares, tales como las ciclinas, caspasas, BCL2 y NF- κ B, manteniendo una homeostasis celular⁶¹. Por lo tanto, una inhibición en la actividad de esta molécula produce un estrés celular debido a que existe un exceso de proteínas tóxicas y conduce a la muerte celular por apoptosis⁶². Tanto las células normales como las cancerígenas dependen de la función del proteosoma para controlar la expresión de proteínas relacionadas a la supervivencia y proliferación celular; sin embargo, se ha demostrado que las células cancerígenas son más susceptibles a la inhibición del proteosoma respecto a las células normales; de esta manera existe un creciente desarrollo de compuestos capaces de inhibir la actividad del proteosoma como una nueva estrategia para combatir el cáncer⁴.

4.8. Formilación de anillos aromático según la reacción de Duff

Esta reacción, propuesta inicialmente por Duff y Billis⁶³, permite la introducción de un grupo aldehído en la posición orto de un fenol mediante el uso de hexametilentetramina (HMTA). El mecanismo propuesto implica la aminometilación del sustrato, seguido por la deshidrogenación de la amina al correspondiente grupo imino, el cual finalmente es hidrolizado para formar el grupo formilo⁶⁴. Este mecanismo propuesto es mostrado en la **figura 12** utilizando el fenol como sustrato

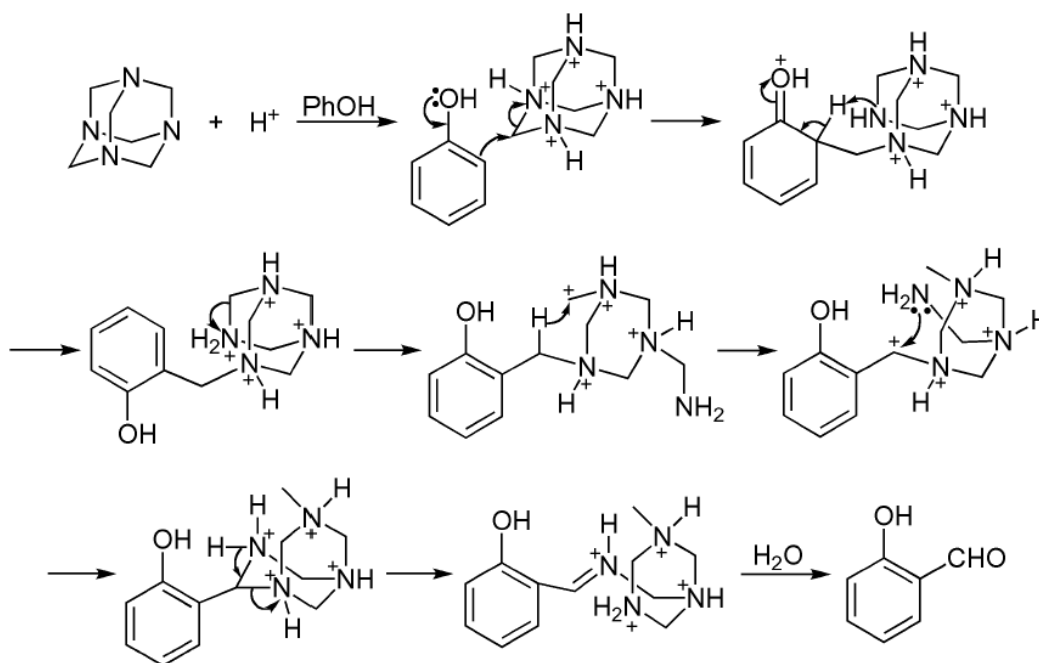


Figura 12. Mecanismo propuesto para la formilación del fenol (Ref. 64)

5. HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

A partir de lo discutido en el problema de investigación, se propone como estructura más probable para los complejos de Cu(II) a sintetizar un arreglo tetracoordinado, tetraédrico o cuadrado plano, con una relación ligando/metal 1:1 y una molécula del solvente H₂O u otro solvente neutro en la cuarta posición de coordinación.

Esta hipótesis se fundamenta en varias consideraciones teóricas: (1) una coordinación tridentada del ligando se ve favorecida por el pronunciado efecto quelato que esta genera; (2) los tres posibles átomos donadores de cada ligando (O, N, O) son buenos agentes coordinantes y afines al Cu(II); (3) el cobre(II) de configuración d⁹ en combinación con estos átomos donadores que orientan a campo débil - moderado daría lugar a un complejo de campo débil con una muy baja EECC en cualquier geometría y sin una orientación marcada hacia geometrías con mayor número de coordinación; (4) la geometría particular del ligando permite una estructura tetraédrica o cuadrada plana; (5) la coordinación tridentada del ligando genera la formación de anillos quelato particularmente estables, de 5 y 6 miembros; (6) un complejo ligando/metal 2:1 se vería desfavorecido por un efecto estérico.

Sin embargo, se debe tener en cuenta que la comprobación de esta hipótesis presenta algunas dificultades. En primer lugar, si bien lo ideal sería una determinación de la estructura de los complejos de Cu(II) sintetizados por difracción de rayos-X, la obtención de monocristales dependerá de que tan solubles resulten estos complejos en diversos solventes como para permitir la aplicación de diversos métodos de cristalización y, además, que alguno de ellos dé buenos resultados en un tiempo razonable. En lo que respecta a la caracterización espectroscópica, esta se ve limitada por el carácter paramagnético del cobre(II), lo que no permite el uso de la resonancia magnética nuclear, técnica particularmente útil en la determinación de la esfera de coordinación del metal, y más aún en caso de no resultar posible un estudio cristalográfico.

Por esta razón, dado que el cinc(II) suele presentar un comportamiento químico similar al del cobre(II), centro metálico de los complejos a formar en la presente investigación, surge la posibilidad de que ambos metales formen complejos estructuralmente similares. De esta manera, la síntesis en paralelo de complejos de cinc(II) con las bases de Schiff cumarínicas a utilizar como ligandos resultaría de especial interés, puesto que, de formar ambos metales complejos análogos como se presume podría ocurrir, esto permitiría el

uso de la técnica de RMN en la caracterización de aquellos de cinc(II). Y, de comprobarse mediante otras técnicas instrumentales la esperada similitud estructural, la información obtenida por RMN para los complejos de cinc(II) sería de validez para los correspondientes de Cu(II). Además, dado que los ligandos base de Schiff cumarínicos reúnen características estructurales que permiten esperar que estos exhiban una considerable fluorescencia, la cual podría ser aumentada o, en su defecto, disminuida por la coordinación, la obtención de los complejos de cinc(II) permitiría determinar la relación ligando/metal en solución por el método de Job aplicando la técnica de fluorescencia. Esta última no resulta útil para los complejos de cobre(II) dado el carácter paramagnético de los mismos.



6. METODOLOGÍA

6.1. Reactivos

Nombre	Proveedor
7-hidroxycumarina para síntesis $\geq 98\%$	Merck
Hexametilentetramina para síntesis $\geq 99\%$	Merck
Hidróxido de sodio p.a.	Sigma-Aldrich
Hidróxido de potasio	Sigma-Aldrich
Glicina	Merck
Alanina	Merck
Acetato de cinc(II)	Merck
Acetato de cobre(II)	Merck
Cloruro de cinc(II)	Sigma-Aldrich
Cloruro de cobre(II)	Sigma-Aldrich
Nitrato de cinc(II)	Sigma-Aldrich
Solución estándar de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0.5 M	Merck
Solución estándar de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 0.5 M	Merck

6.2. Solventes

Nombre	Proveedor
Ácido acético glacial	Merck
Ácido Clorhídrico	Merck
Ácido Nítrico al 65%	Merck
Diclorometano	J.T. Baker
Éter etílico	J.T. Baker
Tolueno	J.T. Baker
Cloroformo	J.T. Baker
Etanol p.a.	J.T. Baker
Metanol p.a.	J.T. Baker
Dimetilsulfóxido p.a.	J.T. Baker
Dimetilformamida p.a.	J.T. Baker
Acetona p.a.	J.T. Baker

6.3. Síntesis y caracterización

6.3.1. Síntesis y caracterización del precursor 8-formil-7-hidroxicumarina

La síntesis empleada proviene de la reacción original de Duff⁶³, el cual fue explicado en el *acápite 4.8*. En este caso, la 7-hidroxicumarina (reactivo comercial) reaccionó con HMTA en ácido acético glacial a 90 - 100°C para formar progresivamente el intermediario imino en el transcurso de las 6 horas de reacción; luego, este intermediario se hidrolizó con HCl 20% para formar el producto 8-formil-7-hidroxicumarina soluble en el medio de reacción⁶⁵. Esta reacción se esquematiza en la siguiente **figura 13**.

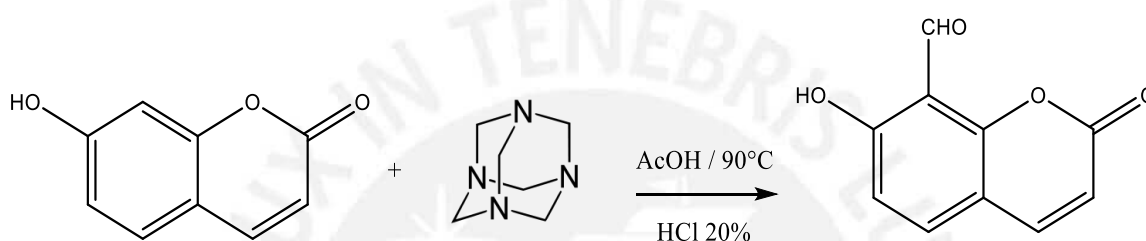


Figura 13. Síntesis propuesta del precursor 8-formil-7-hidroxicumarina

La mezcla de reacción se extrajo con éter dietílico/diclorometano, la fase orgánica se concentró y finalmente se precipitó el producto mediante enfriamiento brusco.

El problema de esta síntesis, es que en general se reporta un rendimiento muy bajo. Por esta razón, se intentó la optimización del procedimiento mediante la modificación sucesiva de un solo parámetro a la vez: relación molar, tipo de solvente, concentración de reactivos, tiempo de reacción, condiciones de hidrólisis y solvente de extracción.

La caracterización de la 8-formil-7-hidroxicumarina se realizó mediante ¹H-RMN y FT-IR. Para un análisis más detallado, que permitió una asignación completa de las señales, se completó la caracterización con ¹³C-RMN y RMN bidimensional (HSQC y HMBC).

6.3.1.1. Procedimiento optimizado de síntesis del precursor 8-formil-7-hidroxicumarina

La síntesis se basó en el método reportado por Patil y colaboradores con ligeras modificaciones⁶⁵. A una mezcla de 1,30 gramos de 7-hidroxicumarina (8 mmol) y 2,24 gramos de hexametilentetramina (16 mmol) se le agregó 9 mL de ácido acético glacial y la

suspensión de color crema resultante se calentó a 90°C bajo agitación constante. A dicha temperatura, se observó un cambio progresivo de coloración, primero a un amarillo-mostaza y, finalmente se obtuvo una solución roja. Esta solución se mantuvo bajo calentamiento y agitación por 6 horas, durante las cuales se observó una intensificación del color rojo inicial hasta un tono final rojo vino. A continuación se adicionaron, en un lapso de 25 minutos, 27 mL de HCl 20% y se dejó reaccionar por una hora. Al término de este paso de hidrólisis ácida la solución, que adquirió un color anaranjado amarillento, se enfrió a temperatura ambiente y se extrajo seis veces con porciones de 7 mL de CH₂Cl₂. La fase orgánica se concentró a presión reducida hasta obtener un líquido viscoso que contenía el producto deseado disuelto en ácido acético glacial; este se vertió en hielo (aprox. 15 mL) y se observó la precipitación inmediata del producto amarillo pálido. Se filtró al vacío y se lavó con abundante agua y EtOH helado.

6.3.2. Síntesis y caracterización de los ligandos del tipo base de Schiff

Los ligandos del tipo base de Schiff se sintetizaron mediante una reacción de condensación del precursor 8-formil-7-hidroxycumarina y moléculas pequeñas que posean el grupo funcional -NH₂ requerido y otros grupos funcionales con capacidad coordinante. La reacción se realizó en una proporción equimolar entre ambos reactivos en un medio metanólico/agua a reflujo durante un tiempo adecuado. La reacción se esquematiza en la **figura 14**.

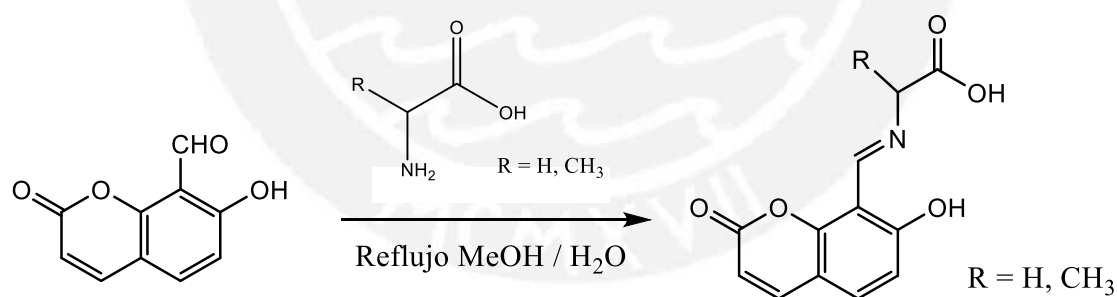


Figura 14. Síntesis propuesta de los ligandos del tipo base de Schiff derivados de la 8-formil-7-hidroxycumarina.

Asimismo, de acuerdo a los resultados iniciales obtenidos, se realizaron varias modificaciones en el procedimiento básico general mediante la variación de algunos parámetros de interés tales como relación molar y tiempo de reacción con la finalidad de lograr un producto puro y con un buen rendimiento.

La caracterización de las bases de Schiff se efectuó por espectroscopía FT-IR y ¹H-RMN. La asignación completa de las señales se logró tomando como referencia la asignación realizada para el compuesto precursor 8-formil-7-hidroxycumarina.

6.3.2.1. Procedimiento optimizado de síntesis del ligando tipo base de Schiff N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina, LIG-GLY

Se disolvieron 152 mg (0.8 mmol) de la 8-formil-7-hidroxycumarina en 10 mL de metanol mediante calentamiento a reflujo y bajo agitación. A la solución amarilla obtenida (pH 4) se le agregó lentamente 90 mg (1,2 mmol) de glicina disuelta en 1,2 mL de agua. Al final de la adición se observó la formación incipiente de un precipitado anaranjado, el cual va en aumento durante la reacción. Al cabo de 3 horas, la mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se dejó durante un día en la refrigeradora. El precipitado policristalino formado se filtró al vacío y se lavó con agua, metanol y acetona.

6.3.2.2. Procedimiento optimizado de síntesis de la sal carboxilato de potasio del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina

La síntesis se basó en el método reportado por Yang y colaboradores⁶⁷ para la sal 6-hidroxicromona-3-metilideniminoacetato de sodio con algunas variaciones. A una mezcla de 15 mg de glicina (0,2 mmol) y 11 mg de KOH (0.2 mmol) en un vaso de precipitados se le agregaron 500 uL de agua con el fin de obtener una solución acuosa de la sal carboxilato del aminoácido. Esta última se adicionó lentamente a una solución de 38 mg del ligando 8-formil-7-hidroxycumarina (0.2 mmol) en 30 mL de etanol obtenida por calentamiento a reflujo. Al término de la adición, la solución amarilla inicial cambió a una tonalidad anaranjada y presentó un pH 6. Luego de 2 horas de reacción, la solución se concentró a presión reducida hasta la mitad de su volumen y el precipitado formado se filtró al vacío y se lavó con abundante etanol

6.3.3. Síntesis y caracterización de los complejos de Zn(II) y Cu(II)

Para la síntesis de los complejos de cinc(II) y cobre(II) se consideraron dos posibles métodos. El primero se basó en una reacción de metátesis entre el ligando mencionado y una sal de cinc, mientras que para el segundo se aprovechó de un efecto *template* o “plantilla” por parte del metal que condujo a la formación de la base de Schiff *in situ*, a partir del precursor cumarínico y la glicina, la cual finalmente coordina al centro metálico. Los dos métodos de síntesis se esquematizan en la **figura 15**.

Los métodos de síntesis fueron adaptados a los requerimientos del caso particular. En lo que respecta al medio de reacción se buscó un solvente o mezcla de solventes capaz de disolver suficientemente al ligando y que a la vez favorezca la precipitación del complejo producto. Otro parámetro de interés es el pH, este se varió en el rango 4 - 7 con el fin de ver su influencia sobre la desprotonación de uno o más grupos funcionales. Por último, se utilizaron dos o más sales de cobre (II) para evaluar el efecto del contraion en la naturaleza de la esfera de coordinación del producto.

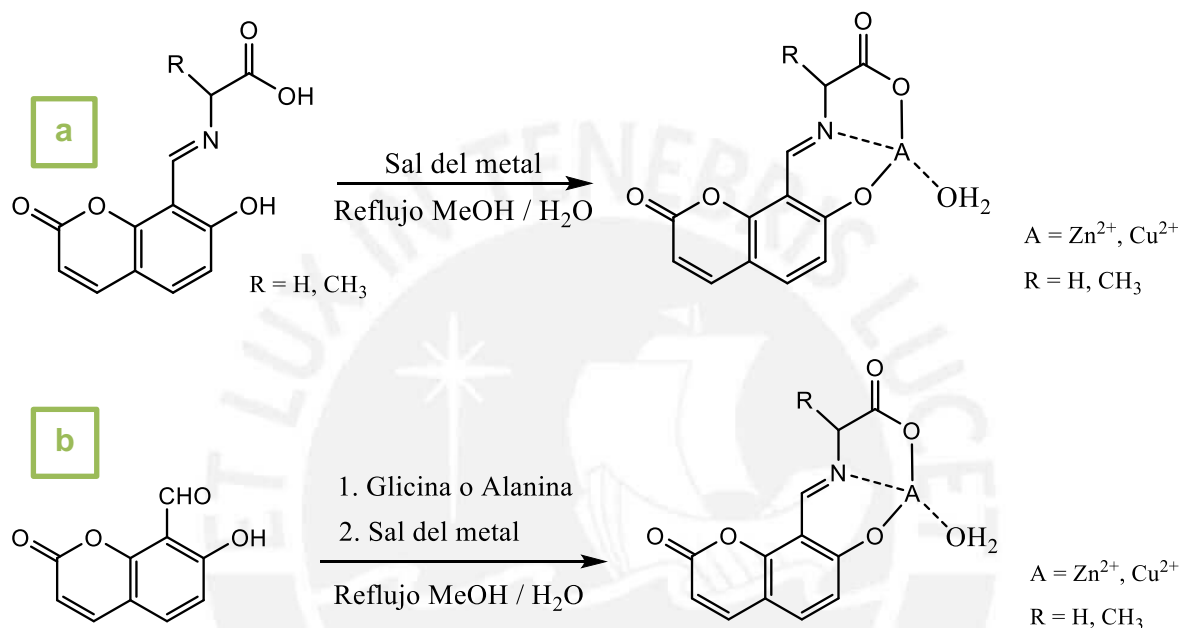


Figura 15. Síntesis propuestas para los complejos de cinc(II) y cobre(II) con ligandos tipo base de Schiff a partir de una reacción de metátesis **(a)** o por efecto *template* **(b)**

Los complejos fueron caracterizados mediante espectroscopía FT-IR, la cual permitió determinar desplazamientos en las bandas de absorción de los posibles grupos funcionales coordinantes que evidenciaron su complejación al centro metálico. Asimismo, los complejos de Zn(II) fueron analizados por RMN, mientras que para los complejos análogos de Cu(II) se utilizó EPR.

La caracterización por termogravimetría/calorimetría diferencial de barrido permitió determinar la presencia de agua coordinada o de hidratación en el complejo formado. Por otro lado, el contenido de cobre o cinc se determinó por Absorción Atómica (AAS) y el porcentaje de carbono, nitrógeno e hidrógeno se obtuvo por análisis elemental.

Los complejos también fueron caracterizados por UV-Vis para obtener más información sobre el posible modo de coordinación en el complejo en solución. Se utilizó el método de Job por fluorescencia en el caso de los complejos de cinc(II) para encontrar la relación ligando/metal que se obtiene en solución; esto no fue posible en el caso de los complejos análogos de cobre(II) dado el carácter paramagnético de los mismos que inhibe la fluorescencia.

Por último, se intentó obtener monocristales de los complejos a sintetizar aplicando diversas técnicas reportadas, como las mostradas en la **figura 16**. De esta manera, de lograrse este objetivo, se podría realizar un análisis de Difracción de Rayos X (DRX) de monocristal y lograr una caracterización concluyente de los complejos de Cu(II) obtenidos.

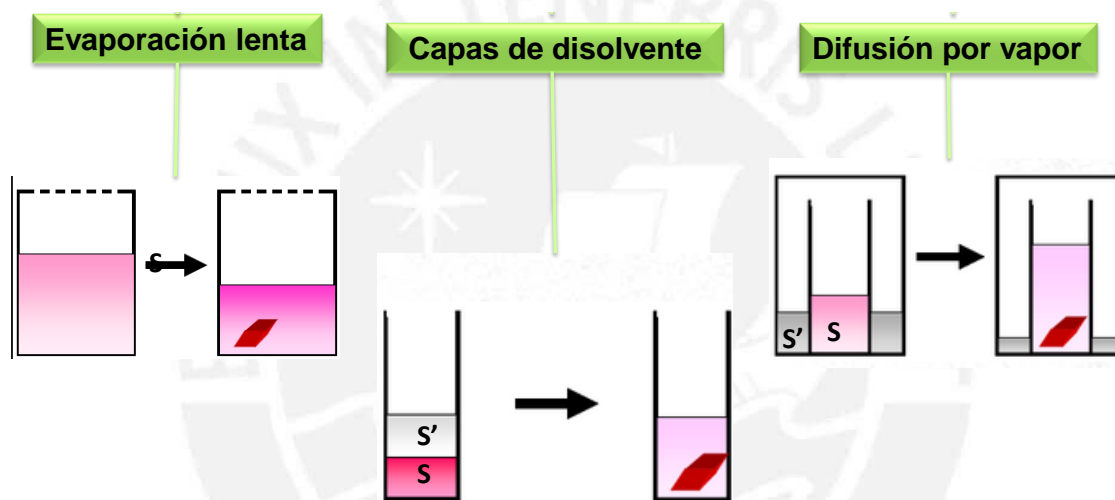


Figura 16. Algunos métodos de obtención de monocristales (S: solvente donde el complejo presenta apreciable solubilidad; S': solvente en el que es insoluble; ambos miscibles entre sí). (Adaptado de ref. 66).

6.3.3.1. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-óxido-8-cumarinilmetileno})\text{glicinato}]\text{cinc(II)}$, $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$

A 190 mg de la 8-formil-7-hidroxycumarina (1 mmol) se le añadió 15 mL de metanol y se llevó a reflujo bajo agitación, obteniéndose una solución del ligando color amarillo pálido. Luego, se agregó lentamente, gota a gota, 1 mL de solución acuosa de glicina (75 mg, 1 mmol) y se dejó reaccionando por 30 minutos. A continuación, se adicionó a la mezcla de reacción, de manera particularmente lenta y en el transcurso de una hora, una solución de 219.6 mg (1 mmol) de acetato de cinc(II) dihidratado disuelta en una mínima cantidad

de agua (1 mL). La mezcla de reacción, que presentó un pH 4 - 5, se mantuvo a reflujo por dos horas adicionales.

Luego, el balón de reacción se enfrió hasta temperatura ambiente y se aisló el sólido por filtración al vacío. El producto amarillo obtenido se lavó con abundante agua, metanol, DMF/H₂O (1.25:1), agua y acetona.

6.3.3.2. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilén)glicinato]cobre(II), Cu(LIG-Gly)(H₂O)

Se siguió el procedimiento descrito para la síntesis del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O). A una solución a reflujo de 190 mg de 8-formil-7-hidroxycumarina (1mmol) se le añadió 1 mL de solución acuosa de glicina (75 mg, 1mmol). Después de 30 minutos de reacción, se agregó lentamente, en el transcurso de una hora, 200 mg (1mmol) de acetato de cobre(II) monohidratado disuelto en 4 mL de agua ligeramente caliente. La mezcla de reacción, que presenta un pH entre 4 y 5, se mantuvo a reflujo por dos horas adicionales.

Luego, el balón se dejó enfriar a temperatura ambiente y el precipitado formado se aisló por filtración al vacío. El sólido verde se lavó con abundante agua, metanol, DMF/H₂O (1.25:1), agua y acetona.

6.3.3.3. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilén)alaninato]cinc(II), Zn(LIG-Ala)(H₂O)

Se siguió el método de síntesis descrito para el complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O). Se disolvió, a temperatura de reflujo, 190 mg de 8-formil-7-hidroxycumarina (1 mmol) y se agregó gota a gota 2.5 mL de una solución acuosa de alanina (89 mg, 1mmol). Después de 30 minutos de reacción, a la solución anaranjada - amarilla formada se le adicionó en el transcurso de una hora, una solución de 219.6 mg (1 mmol) de acetato de cinc(II) dihidratado disuelta en una mínima cantidad de agua (1 mL). La mezcla de reacción, que presentó un pH 4 - 5, se mantuvo a reflujo por dos horas adicionales.

Por último, el balón se enfrió hasta temperatura ambiente y el precipitado se filtró a vacío, lavándose con agua, metanol y acetona.

6.3.3.4. Procedimiento optimizado de síntesis del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetileno)alaninato]cobre(II), Cu(LIG-Ala)(H₂O)

La síntesis de este complejo se realizó siguiendo un procedimiento análogo a aquel utilizado para el complejo Zn(LIG-Ala)(H₂O). A una solución de la 8-formil-7-hidroxicumarina (190 mg, 1mmol) en 15 mL de metanol, se agregó lentamente una solución de 89 mg (1 mmol) de alanina disuelta en 2.5 mL de agua. Al cabo de 30 minutos de reacción, a la solución amarillo - anaranjada formada se le añadió gota a gota en el transcurso de una hora, 200 mg (1mmol) de acetato de cobre(II) monohidratado disuelta en 4 mL de agua ligeramente caliente. La mezcla de reacción, que presentó un pH 4, se mantuvo a reflujo por dos horas adicionales.

Luego el balón se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y el sólido formado se aisló por filtración al vacío. El precipitado se lavó con agua, metanol y acetona.

6.4. TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE METAL POR ABSORCIÓN ATÓMICA

Se pesó aproximadamente 15 mg de complejo de cinc(II) o 22 mg de complejo de cobre(II) en un crisol de porcelana. Luego, se adicionó 1 mL de ácido nítrico al 65% y se procedió a calentar lentamente hasta 300°C en una plancha eléctrica hasta sequedad. Luego, los residuos obtenidos se llevaron a la mufla y se incrementó la temperatura lentamente hasta 700°C. Después de dos horas, el crisol se dejó enfriar a temperatura ambiente y se obtuvo un polvo blanco de ZnO o un polvo negro en el caso de CuO. Posteriormente, el sólido se disolvió en HNO₃ 5% y se realizaron las diluciones respectivas para cada metal como se muestra en la **figura 17** y **figura 18**. Por último, el contenido de metal en las fioas correspondientes a las soluciones problemas de cinc(II) y cobre(II) fue determinado por espectroscopía de absorción atómica utilizando la curva de calibrado. Este procedimiento se realizó por triplicado y con un blanco de muestra.

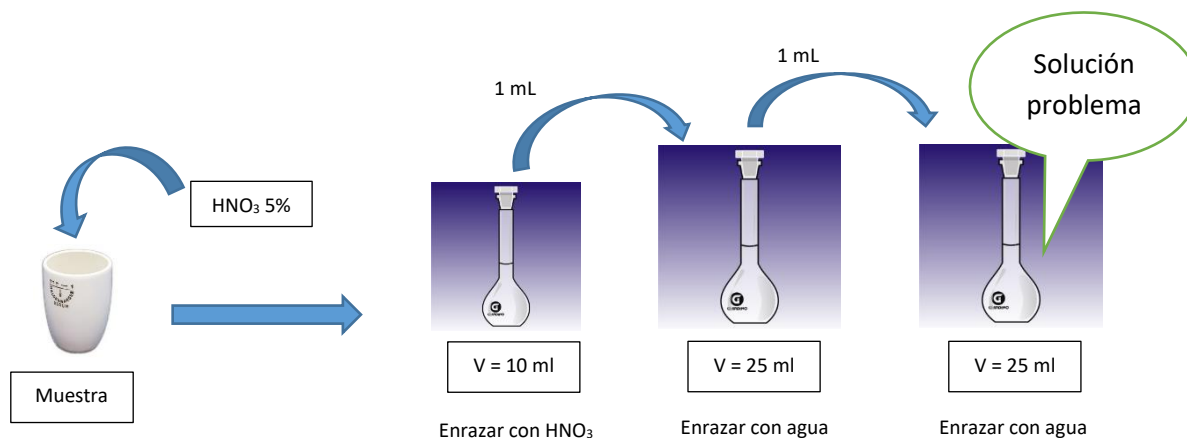


Figura 17. Diluciones realizadas para obtener las soluciones problema de zinc(II)

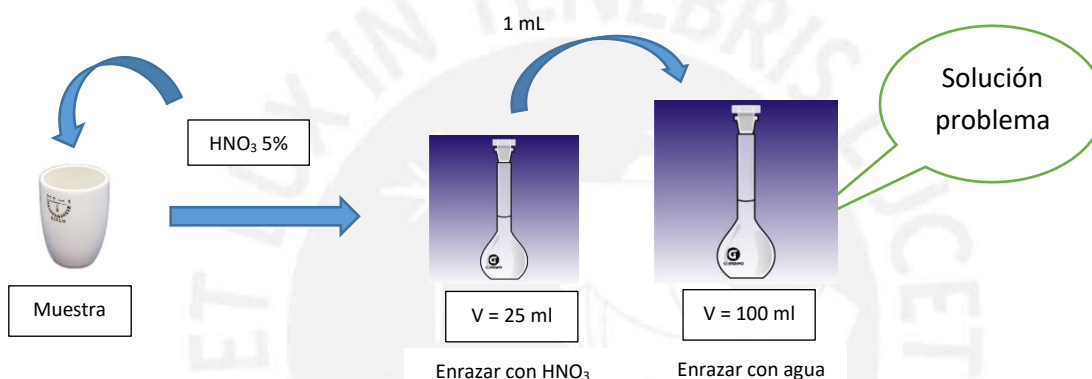


Figura 18. Diluciones realizadas para obtener las soluciones problema de cobre(II)

6.5. TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN

Espectroscopía Infrarroja: Los espectros fueron medidos en el espectrofotómetro FT-IR Perkin Elmer modelo Spectrum 100 de la Sección Química - PUCP en un intervalo de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr.

Resonancia Magnética Nuclear: Se utilizó el espectrómetro Bruker Avance III-HD Ascend 500 NMR de la Sección Química - PUCP. Las muestras se disolvieron en DMSO deuterado y se empleó tetrametilsilano (TMS) como estándar interno.

Resonancia Paramagnética Nuclear: Las mediciones se realizaron en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) bajo la supervisión de la M. en C. Virginia Gómez Vidales. Se utilizó el espectrómetro RPE Jeol JES-TE300, en banda X a 100 KHz de frecuencia de modulación con una cavidad cilíndrica del modo

TE₀₁₁. La medición de las muestras se realizó en estado sólido a temperatura ambiente y en solución de DMSO a 77°K.

Espectroscopía Ultravioleta-Visible: Los datos se registraron empleando el Espectrofotómetro UV-Visible Agilent modelo 8453 de la Sección Química - PUCP en un rango de 190 a 1000 nm. Las muestras se disolvieron en DMSO p.a. para su respectiva medición.

Fluorescencia: La fluorescencia fue realizada en un espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo LS – 55 de la Sección Química - PUCP que se encontraba acoplada al programa FL WinLab™ para la recolección de datos. Se aplicó una radiación de excitación de 369 nm utilizando una lámpara de xenón y la fluorescencia fue medida en un rango de 350 - 700 nm a temperatura ambiente con una velocidad de barrido de 800 nm/min y con un ancho de rendija entrada/salida de 15/20. Se utilizaron soluciones stock de 100 uM de acetato de cinc(II) y 100 uM del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina (LIG-GLY) en DMF para la preparación del complejo *in situ*. Las mediciones del método de Job se llevaron a cabo mezclando una solución del ligando y el metal, en los cuales se varió la relación molar de la mezcla pero la suma de la concentración molar permaneció constante a 20 uM en un volumen de 3 mL.

Análisis Termogravimétrico: Los termogramas TG/DSC se midieron en el equipo de análisis térmico simultáneo Netzsch Jupiter STA 449 F3 DSC - TGA de la Sección de Ingeniería Mecánica – PUCP. La medición se llevó a cabo a una velocidad de 10°K/min en el rango de 25 – 750°C utilizando crisol de alúmina.

Conductimetría: Las mediciones de conductividad se realizaron en un conductímetro portátil HANNA modelo HI 8733 equipado con una sonda HI 76302W ATC a 25°C con una compensación de temperatura (coeficiente de temperatura) de 2% por grado centígrado. Las muestras se disolvieron en DMSO a una concentración de 1 mM para su respectiva medición. En la medición, se aseguró que la sonda quede completamente sumergida en la solución y no existan burbujas de aire atrapadas en el interior de la sonda. Después de cada registro de conductividad, la sonda fue enjuagada con agua destilada y DMSO, y finalmente es limpiada con papel tissue.

Absorción Atómica: La determinación del contenido de metal se llevó a cabo en un espectrómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer modelo 3100 de la Sección Química - PUCP provisto de un atomizador de llama. Esta llama se generó empleando un flujo de 2,5 L/min de acetileno como combustible y un flujo de 10 L/min de aire como oxidante. Soluciones de cobre (0,9 a 1,6 ppm) y cinc (0.2 a 0.7 ppm) fueron preparados por dilución con HNO₃ 5% de la solución patrón de cobre (solución estándar de Cu(NO₃)₂ en HNO₃ 0.5 M) y de cinc (solución estándar de Zn(NO₃)₂ en HNO₃ 0.5 M), respectivamente. Estas soluciones se utilizaron para construir la curva de calibrado. Las mediciones del contenido de Cu(II) y Zn(II) fueron realizadas a 324.75 y 213.86 nm, respectivamente y en ambos casos se empleó una lámpara de cátodo hueco.

Análisis Elemental: Los porcentajes de carbono, hidrógeno y nitrógeno se obtuvieron del analizador elemental EAGER 200 (chns/method) de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAI) de la Facultad de Química - UNAM.

Voltamperometría cíclica: Para las mediciones voltamperométricas se utilizó un Potenciostato/Galvanostato BioLogic SP-300 que se encontraba acoplado a una PC para el tratamiento de datos con el programa EC-Lab[®]. Se empleó un arreglo de tres electrodos, un electrodo de trabajo constituido por un disco de carbón vítreo, un alambre de Pt como contraelectrodo y un electrodo de referencia de Ag/AgCl. Para las mediciones, se preparon soluciones 1mM de los compuestos en DMSO (99.7% Extra Dry over molecular sieve Acros Organics) y en presencia 0.1 M de tetrafluoroborato de tetrabutilamonio (TBABF₄) como electrolito soporte. Las soluciones preparadas son burbujeadas con nitrógeno antes de cada experimento. La limpieza del electrodo de trabajo, después de cada medición, se realizó mediante un pulido con polvo de diamante, luego es enjuagado con agua destilada y por último es sonificado por 120 segundos. Para cada medición se realizó una compensación de caída óhmica mediante el método de corrección de corriente ($R_u = 100 \Omega$). Por último, los potenciales obtenidos fueron referenciados con ferroceno/ferricinio (Fc/Fc⁺) como sugiere IUPAC⁶⁸.

6.6. ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN

6.6.1. Método de evaporación lenta

Procedimiento 1: Se disolvió 2 mg del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) en 100 uL de DMSO y se dejó evaporar la solución a temperatura ambiente.

Procedimiento 2: Se disolvió 2 mg del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) en 500 uL de DMSO en caliente y se dejó evaporar la solución a temperatura ambiente.

6.6.2. Método difusión a vapor

Se introdujo un vial de 1 mL con una solución del compuesto de interés dentro de un segundo vial de mayor capacidad (10 mL). En este último vial se agregó un solvente en el cual el compuesto era insoluble (antisolvente). Se utilizó las cantidades recomendadas por Spingler y colaboradores⁶⁹ que dependen de la solubilidad particular del compuesto.

Procedimiento 1: Se disolvió 2 mg del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) en 500 uL de DMSO en caliente y se colocó en el vial de 1 mL de capacidad. Luego, se agregó como antisolvente 2.5 mL de éter etílico, etanol o etilenglicol.

Procedimiento 2: Se disolvió 4 mg del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) en 500 uL de DMSO y se colocó en el vial de 1 mL de capacidad. Luego, se agregó como antisolvente 2.5 mL de éter etílico o etilenglicol.

6.6.3. Método de obtención de cristales a partir del licor madre

Procedimiento 1: Se utilizó el método reportado por Leong y colaboradores⁷⁰. A 24.7 mg del ligando LIG-Gly (0.1 mmol) se agregó 4.8 mg de LiOH (0.2 mmol) disuelto en 10 mL de metanol. A la solución del ligando obtenida, se le añadió 22 mg de acetato de cinc(II) dihidratado (0.1 mmol) o 20 mg de acetato de cobre(II) monohidratado (0.1 mmol) disuelto en 10 mL de DMF. Después de 30 minutos, la mezcla de reacción se filtró y el licor madre se colocó en un vaso de precipitados para su evaporación lenta.

Procedimiento 2: Se utilizó el método reportado por Hindo y colaboradores⁷¹. Se disolvió 24,8 mg del ligando LIG-Gly (0,10 mmol) en 1.37 mL de DMSO. Luego se agrega lentamente, en un lapso de tiempo de 18 minutos, 17 mg de cloruro de cobre(II) dihidratado (0.11 mmol) disuelto en 1.37 mL de DMSO. Después de un tiempo de 45 minutos de reacción, la solución verde formada se vierte en un vaso de precipitados que contenía 1.37 mL de etanol helado para la evaporación lenta del solvente.

7. RESULTADOS

7.1. SÍNTESIS DE LIGANDOS

7.1.1. Síntesis del precursor 8-formil-7-hidroxycumarina, 8-CHO-7-OH-CA

Rendimiento: 15%

Solubilidad: Soluble en acetona, DMSO, DMF y ligeramente soluble en metanol a temperatura ambiente.

IR (KBr, cm^{-1}): 3433 ($\nu_{\text{O-H}}$); 3077 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ aldehídico); 1731 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactónico); 1659 ($\nu_{\text{C=O}}$ aldehídico); 1601 - 1439 ($\nu_{\text{C=C}}$ cumarina); 1408 ($\delta_{\text{C-O-H}}$).

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , TMS, ppm): 11,91 (s, ancho, OH); 10,44 (s, 1H, CHO); 8,03 (d, 1H, H4); 7,88 (d, 1H, H5); 6,97 (d, 1H, H6); 6,38 (d, 1H, H3).

$^{13}\text{C-RMN}$ (DMSO- d_6 , TMS, ppm): 191,27 ($\text{C=O}_{\text{aldehídico}}$); 164,33 (C7); 156,49 ($\text{C=O}_{\text{lactónico}}$); 156,10 (C9); 144,88 (C4); 136,68 (C5), 114,35 (C6), 113,00 (C3); 111,57 (C10), 109,56 (C8).

7.1.2. Síntesis del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina, LIG-GLY

Rendimiento: 66%

Solubilidad: Soluble en DMF/H₂O (1,25:1), DMSO, muy poco soluble en metanol e insoluble en acetona a temperatura ambiente.

IR (KBr, cm^{-1}): 3439 ($\nu_{\text{O-H}}$); 3078 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 1712 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactónico + carboxílico alifático); 1651 ($\nu_{\text{C=N}}$); 1620 - 1524 ($\nu_{\text{C=C}}$ cumarina); 1419 ($\delta_{\text{C-O-H}}$).

$^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6 , TMS, ppm): 14,27 (s, ancho, OH); 8,92 (s, 1H, -CH=N-); 7,87 (d, 1H, H4); 7,54 (d, 1H, H5); 6,54 (d, 1H, H6); 6,10 (d, 1H, H3); 4,58 (s, 2H, CH₂- glicina).

UV-Vis [DMSO, λ_{max} , nm, (ϵ , $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 291 (114443), 349 (12805), 364 (10674), 421 (3899).

7.1.3. Síntesis de la sal carboxilato de potasio del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina

Rendimiento: 45%

Solubilidad: Soluble en H₂O y muy poco soluble en DMSO.

IR (KBr, cm⁻¹): 3424 ($\nu_{\text{O-H}}$); 3079 ($\nu_{\text{C-H}}$ aromático); 1730 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactónico); 1656 ($\nu_{\text{C=N}}$); 1621 (ν_{asCOO^-}); 1592 - 1522 ($\nu_{\text{C=C}}$ cumarina); 1405 (ν_{sCOO^-}).

7.2. SÍNTESIS DE COMPLEJOS

7.2.1. Síntesis del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cinc(II), Zn(LIG-Gly)(H₂O)

Rendimiento: 73%

Solubilidad: Soluble en DMSO bajo calentamiento e insoluble en otros solventes.

IR (KBr, cm⁻¹): 3378 ($\nu_{\text{O-H}}$ agua de coordinación); 1700 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactónico); 1636 ($\nu_{\text{C=N}}$); 1610 (ν_{asCOO^-}); 1591 - 1445 ($\nu_{\text{C=C}}$ cumarina); 1396 (ν_{sCOO^-}).

¹H-RMN (DMSO-d₆, TMS, ppm): 8,94 (s, 1H, -CH=N-); 7,83 (d, 1H, H4); 7,41 (d, 1H, H5); 6,52 (d, 1H, H6); 6,00 (d, 1H, H3); 4,03 (s, 2H, CH₂ - glicina).

UV-Vis [DMSO, λ_{max} (nm), ϵ (L mol⁻¹ cm⁻¹): 272 (16775), 355 (32984), 369 (32590)

Análisis Elemental. Análisis calculado (encontrado) [%] para C₁₂O₆NH₉Zn.0,5H₂O (PM = 337.593 g/mol): C, 42.69 (43.54); N, 4.15 (4.51); H, 2.99 (1.84).

7.2.2. Síntesis del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cobre(II), Cu(LIG-Gly)(H₂O)

Rendimiento: 69%

Solubilidad: Soluble en DMSO e insoluble en otros solventes.

IR (KBr, cm⁻¹): 3429 ($\nu_{\text{O-H}}$ agua de coordinación); 1719 ($\nu_{\text{C=O}}$ lactónico); 1637 ($\nu_{\text{C=N}}$ + ν_{asCOO^-}); 1615 - 1434 ($\nu_{\text{C=C}}$ cumarina); 1372 (ν_{sCOO^-}).

UV-Vis [DMSO, λ_{max} (nm), ϵ (L mol⁻¹ cm⁻¹): 267 (24688), 351 (33248), 369 (28939), 682 (114)

Análisis Elemental: Análisis calculado (encontrado) [%] para $C_{12}O_6NH_9Cu.0,5H_2O$ (PM = 335.760 g/mol): C, 42.93 (44.08); N, 4.17 (4.56); H, 3.00 (2.01).

7.2.3. Síntesis del complejo $acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cinc(II)$, $Zn(LIG-Ala)(H_2O)$

Rendimiento: 41%

Solubilidad: Soluble en DMSO e insoluble en otros solventes.

IR (KBr, cm^{-1}): 3404 (ν_{O-H} agua de coordinación); 1709 ($\nu_{C=O}$ lactónico); 1631 ($\nu_{C=N}$ + ν_{as,coo^-}); 1588 - 1478 ($\nu_{C=C}$ cumarina); 1413 (ν_{s,coo^-}).

1H -RMN (DMSO- d_6 , TMS, ppm): 8,89 (s, 1H, $-CH=N-$); 7,83 (d, 1H, H4); 7,42 (d, 1H, H5); 6,52 (d, 1H, H6); 6,01 (d, 1H, H3); 3,87 (q, 1H, CH - alanina); 1,35 (d, 3H, CH_3 - alanina).

UV-Vis [DMSO, λ_{max} (nm), ϵ ($L mol^{-1} cm^{-1}$): 272 (10000), 355 (18914), 369 (18553)

Análisis Elemental: Análisis calculado (encontrado) [%] para $C_{13}O_6NH_{11}Zn.1.5H_2O$ (PM = 369.634 g/mol): C, 42.24 (42.12); N, 3.79 (4.14); H, 3.82 (2.85).

7.2.4. Síntesis del complejo $acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cobre(II)$, $Cu(LIG-Ala)(H_2O)$

Rendimiento: 53%

Solubilidad: Soluble en metanol, DMSO y DMF e insoluble en agua y acetona.

IR (KBr, cm^{-1}): 3424 (ν_{O-H} agua de coordinación); 1720 ($\nu_{C=O}$ lactónico); 1631 ($\nu_{C=N}$ + ν_{as,coo^-}); 1590 - 1478 ($\nu_{C=C}$ cumarina); 1411 (ν_{s,coo^-}).

UV-Vis [DMSO, λ_{max} (nm), ϵ ($L mol^{-1} cm^{-1}$): 266 (12594), 351 (16653), 369 (14357), 678 (106).

Análisis Elemental: Análisis calculado (encontrado) [%] para $C_{13}O_6NH_{11}Cu.0.5H_2O$ (PM = 349.786 g/mol): C, 44.64 (43.97); N, 4.00 (4.47); H, 3.46 (2.04).

7.3. ENSAYOS DE CRISTALIZACIÓN

7.3.1. Método de evaporación lenta

Después de un mes se observó la precipitación de un polvo policristalino en DMSO en ambos procedimientos.

7.3.2. Método difusión a vapor

En caso de usar éter etílico o etanol como antisolvente al cabo de tres a cuatro semanas se obtuvo un polvo policristalino, mientras que con etilenglicol tardó meses.

7.3.3. Método de obtención de cristales a partir del licor madre

Procedimiento 1: En el caso del complejo $Zn(LIG-Gly)(H_2O)$, luego de la evaporación total del solvente al cabo de cuatro meses se obtuvo un producto viscoso adherido a las paredes del vaso de precipitados. Por otro lado, en el caso del complejo $Cu(LIG-Gly)(H_2O)$, se llegó a obtener cristales rectangulares que están por ser evaluados.

Procedimiento 1: Después de la evaporación parcial de la mezcla de solventes, se obtuvieron algunos cristales aislados, de tamaño considerable, que se encuentran a la espera de ser evaluados por estereoscopio o microscopio.

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1. PROCESOS DE SÍNTESIS

8.1.1. Síntesis de Ligandos

8.1.1.1. Precursor 8-formil-7-hidroxicumarina, 8-CHO-7-OH-CA

Para la síntesis de este compuesto se ensayaron cuatro procedimientos reportados, todos ellos basados en una reacción de Duff con ciertas variaciones^{72, 73, 65, 74, 75}. Las condiciones de síntesis, así como del procesamiento del producto y el rendimiento obtenido en los ensayos exploratorios con dichos procedimientos se muestran en la **tabla 4**.

Tabla 4. Ensayos de síntesis de la 8-CHO-7-OH-CA basados en la reacción de Duff.

N°	Sustrato	Hexamina	Solvente	T°C y t _{rx}	Hidrólisis	Extracción	Paso Adicional	Rend.
1	7-OH-CA* 1 mmol	3 mmol	2 mL Ac. Acético	90°C 1 h	-	Éter etílico	Fase orgánica concentrada vertida en EtOH frío	5%
2	7-AcO-CA** 1 mmol	1.5 mmol	2 mL TFA	80°C 10 h	H ₂ O = 6 mL Tiempo = 30 min T° = 60°C	-	-	9%
3	7-OH-CA* 1 mmol	2.5 mmol	5 mL Ac. Acético	90°C 6 h	HCl 20% = 7.5 mL Tiempo = 1 h T° = 90°C	Éter etílico	Fase orgánica concentrada vertida en hielo	14%

*7-hidroxicumarina, **7-Acetoxicumarina

En el *ensayo 1* se utilizó la variante de la reacción de Duff reportada por Darla et al.⁷² que parte del mismo sustrato cumarínico que el del presente trabajo. Sin embargo, pese a que se siguió exactamente el procedimiento indicado, se obtuvo un rendimiento bajísimo respecto al reportado de 44%. Para el *ensayo 2*, se siguió la variante de Sen et al.⁷³, para lo cual fue necesario realizar una acilación previa de la 7-hidroxicumarina. A diferencia del caso anterior, en este caso se utilizó ácido trifluoroacético como solvente, un tiempo de

reacción mucho mayor y un paso adicional de hidrólisis al término de la reacción. Si bien el rendimiento fue algo mayor que el obtenido en el *ensayo 1*, tampoco correspondió al reportado de 60%. Finalmente, se optó por aplicar en el *ensayo 3* el procedimiento reportado por Kulkarni et al.⁶⁵ y Dong et al.⁷⁴ para la formilación de un sustrato relacionado, la 7-hidroxi-4-metilcumarina. Esta reacción se llevó a cabo en ácido acético glacial como en el *ensayo 1*, pero se usó un mayor tiempo de reacción y se realizó una hidrólisis ácida al término de la reacción. El rendimiento obtenido, trabajando a una escala mucho menor (1 vs 60 mmol de sustrato) resultó muy cercano al reportado de 15%; además, el espectro ¹H-RMN indicó un buen grado de pureza.

Otro método de formilación ensayado fue aquel reportado por Feng y Griffiths⁷⁵ que se basa en la reacción de Reimer-Tiemann. Se obtuvo un producto rojo vino con un rendimiento aparente del 10%, muy diferente a aquel de color amarillo pálido obtenido en el *ensayo 3* de la **tabla 4**, cuyo espectro ¹H-RMN no permitía identificar al producto deseado como componente mayoritario.

Por lo tanto, se optó por seleccionar el procedimiento usado en el *ensayo 3* que conduce directamente a un producto puro aunque con un rendimiento relativamente bajo que, sin embargo, concuerda con el reportado por los autores y otros investigadores que lo han aplicado^{76, 77, 78}. Se decidió realizar algunas variaciones en los parámetros de síntesis con el fin de explorar la posibilidad de elevar dicho rendimiento, las cuales se presentan en la **tabla 5**.

Se realizaron 6 ensayos a pequeña escala, en los cuales se mantuvo constante la relación molar de la hexametilentetramina (agente formilante) al sustrato cumarínico. Tomando como referencia el *ensayo 3* de la **tabla 4**, se introdujeron variaciones en la concentración de los reactivos, tiempo de reacción y solvente usado para la extracción. Se encontró que una reducción en el volumen del solvente prácticamente no afecta el rendimiento de la reacción (*ensayos 1 y 2*); sin embargo, este se ve reducido drásticamente con un aumento en el tiempo de reacción (*ensayos 5 y 6*). En cuanto al solvente usado para la extracción, el rendimiento se mantiene en 15% al reemplazar el éter etílico por cloroformo o diclorometano (*ensayo 2, 4 y 5*), mientras que el tolueno sí lo disminuye considerablemente (*ensayo 3*).

En los ensayos siguientes, partiendo de 8 mmol del sustrato cumarínico, se redujo aún más la cantidad de solvente como es usual al escalar una reacción. Además, se varió la

cantidad del agente formilante usado en exceso y se encontró que tanto un aumento como una disminución en la relación molar hexamina/7-OH-CA no influyó sobre el rendimiento de la reacción (*ensayos 8 y 9*). Por último, el *ensayo 10* se realizó en atmósfera inerte, lo cual tampoco produjo mejora alguna.

En conclusión, no fue posible, a pesar de todas las variaciones introducidas, lograr un aumento en el rendimiento de la reacción. Por esta razón, se decidió utilizar en síntesis posteriores las condiciones del *ensayo 9*, donde se trabaja con una menor relación molar hexamina/7-OH-CA y menor volumen de solvente que en el procedimiento reportado^{65, 74}.

Tabla 5. Variaciones en parámetros de síntesis del ligando 8-CHO-7-OH-CA

Ensayo	7-OH-CA	Hexamina	Solvente	Tiempo	Hidrólisis	Extracción	Rend.
1	1 mmol	2.5 mmol	5 mL Ac. Acético	6 horas	HCl 20% = 7.5 mL Tiempo = 1 Hora T° = 90°C	Éter etílico	14%
2			2.5 mL Ac. Acético			Éter etílico	15%
3						Tolueno	9%
4						CHCl ₃	15%
5						CH ₂ Cl ₂	15%
6							20 horas
7	8 mmol	20 mmol	9 mL Ac. Acético	6 horas	HCl 20% = 27 mL Tiempo = 1 Hora T° = 90°C	CH ₂ Cl ₂	15%
8		24 mmol					15%
9		16 mmol					15%
10							15%*

*Síntesis llevada a cabo bajo atmósfera de nitrógeno

8.1.1.2. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina, LIG-GLY

La síntesis del ligando base de Schiff formado por la condensación de la 8-formil-7-hidroxicumarina con glicina, el cual no ha sido reportado, fue realizada en un medio metanólico utilizando la mínima cantidad de agua. Este medio de reacción proporcionó un pH cercano a 5, el cual es el óptimo para obtener la máxima velocidad de reacción para la formación del enlace imino. La **tabla 6** muestra los diversos ensayos de síntesis llevados a cabo con el fin de encontrar las mejores condiciones de reacción.

Tabla 6. Variaciones en parámetros de síntesis del ligando LIG-Gly

Ensayo	8-CHO-7-OH-CA	Glicina	Tiempo de reacción	Rendimiento
1	0.2 mmol 3 mL de MeOH	0.2 mmol 300uL H ₂ O	6 horas	49%
2	0.4 mmol 6 mL de MeOH	0.4 mmol 600uL H ₂ O	6 horas	49%
3	0.4 mmol 6 mL de MeOH	0.6 mmol 600uL H ₂ O	6 horas	64%
4	0.4 mmol 6 mL de MeOH	0.6 mmol 600uL H ₂ O	3 horas	58%
5	0.8 mmol 10 mL de MeOH	1.2 mmol 1.2 mL H ₂ O	3 horas	66%

En el *primer ensayo* se trabajó a una relación molar 1:1 sustrato cumarínico/glicina y se obtuvo el producto, un polvo anaranjado policristalino, con un rendimiento relativamente bueno. Al aumentar la escala en el *segundo ensayo*, este rendimiento se mantuvo.

En el caso del *ensayo 3* se realizó un aumento del 50% en la concentración del reactivo glicina, con el objetivo de explorar un posible aumento del rendimiento y el resultado fue positivo. Para el *ensayo 4*, se mantuvo el exceso de glicina y se redujo considerablemente el tiempo de reacción; sin embargo, esto no afectó mayormente el rendimiento de la reacción. Por esta razón, en el último ensayo realizado a mayor escala, se mantuvieron las mismas condiciones del anterior, lo cual condujo a un rendimiento comparable al *ensayo 3* que se consideró satisfactorio.

Asimismo, se realizó la síntesis de la sal carboxilato de potasio del ligando. Esta sal resultó de utilidad en la interpretación del espectro IR de los complejos de cinc(II) y cobre(II) derivados de este ligando.

8.1.1.3. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetil)alanina, **LIG-Ala**

Para la obtención de este ligando no reportado, se utilizó el procedimiento optimizado para el ligando base de Schiff análogo derivado de la glicina, **LIG-GLY**. La **tabla 7** muestra las condiciones de reacción para este primer ensayo, así como un ensayo adicional variando el solvente.

En el primer ensayo se trabajó con un exceso del 50% en la concentración de alanina y con 3 horas de reacción a reflujo en metanol. Durante este tiempo, la solución amarillo pálido inicial adquirió un color anaranjado tenue, pero no ocurrió precipitación del producto esperado. Se concentró hasta sequedad la solución y el producto obtenido se filtró a vacío, lavándose solo con abundante agua y metanol helado, ya que no se disponía de información adicional sobre la solubilidad del ligando. El rendimiento aparente fue de 33% ya que el espectro IR y ¹H-RMN demostró la presencia del reactivo de partida, la 8-formil-7-hidroxicumarina. No se pudo eliminar esta última puesto que la mezcla obtenida como producto resultaba totalmente soluble en los tres solventes en que es soluble el precursor (acetona, DMF y DMSO).

En el segundo ensayo se usó etanol en lugar de metanol como medio de reacción. Este cambio produjo una disminución del rendimiento aparente y, al igual que el caso anterior, se observó la mezcla de productos en el espectro ¹H-RMN.

Debido a estos inconvenientes, se decidió no continuar con la síntesis de este ligando y sintetizar directamente el complejo por efecto *template*, como se describirá más adelante.

Tabla 7. Variaciones en parámetros de síntesis del ligando **LIG-Ala**

Ensayo	8-CHO-7-OH-CA	Alanina	Tiempo de reacción	Lavado	Rend. Aparente
1	0.2 mmol 3 mL de MeOH	0.3 mmol 750uL H ₂ O	3 horas	H ₂ O, MeOH helado	33%
2	0.2 mmol 3 mL de EtOH	0.3 mmol 750uL H ₂ O	3 horas	H ₂ O, EtOH helado	14%

8.1.2. Síntesis de Complejos

8.1.2.1. Complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina y N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)alanina

Para la síntesis de los nuevos complejos de cinc(II) y cobre(II) con el ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina se ensayaron básicamente dos métodos. El primero se basó en una reacción de metátesis entre el ligando mencionado y una sal de cinc, mientras que para el segundo se aprovechó de un efecto *template* o “plantilla” por parte del metal que condujo a la formación de la base de Schiff *in situ*, a partir del precursor cumarínico y la glicina, la cual finalmente coordina al centro metálico. En la **tabla 8** se presentan los diversos ensayos realizados para la síntesis del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) mediante el primer método, mientras que en la **tabla 9** se muestran los que se llevaron a cabo para los complejos de Zn(LIG-Gly)(H₂O) y Cu(LIG-Gly)(H₂O) utilizando el efecto *template*.

Tabla 8. Ensayos de síntesis del complejo

Acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetileno)glicinato]cinc(II) por reacción de metátesis

Ensayo	LIG-Gly	Sal de cinc(II)	Base	pH final	Rendimiento
1	0.1 mmol 2.5 mL DMF/H ₂ O 1:1	0.1 mmol Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 200 uL H ₂ O	-	4 – 5	49%
2		0.1 mmol Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 200 uL H ₂ O	NaOH 0.5M	7	52%
3		0.1 mmol ZnCl ₂ 200 uL H ₂ O	NaOH 0.5M	4 – 5	5%
4		0.1 mmol Zn(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O 200 uL H ₂ O	NaOH 0.5M	4 – 5	9%
5		0.1 mmol ZnCl ₂ 200 uL H ₂ O	NaOH 0.5M	7	58%

En todas las síntesis se utilizó como solvente una mezcla DMF/H₂O 1:1, puesto que el ligando es soluble bajo calentamiento en este medio y en cambio el complejo precipita.

Los ensayos 1 y 2 en que se utilizó como fuente del metal acetato de cinc(II) mostraron que a un pH 4 - 5 se forma el mismo complejo que a pH 7 y con un rendimiento similar. En los ensayos restantes llevados a cabo con cloruro y nitrato de cinc(II) en lugar del acetato, se encontró que el cambio del contraíón no afectaba la naturaleza del complejo producto. Sin embargo, en estos casos, a diferencia del caso de la sal de acetato, el pH ejerció un papel decisivo en los rendimientos obtenidos como se observa al comparar los ensayos 3 y 5.

Tabla 9. Ensayos de síntesis de los complejos de Zn(II) y Cu(II) con el ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina empleando el efecto *template*

Ensayo	8-CHO-7-OH-cumarina	Glicina	Sal de cinc(II) Sal de cobre(II)	Base	pH final	Rendimiento
6	0.2 mmol 4mL MeOH	0.2 mmol 400 µL H ₂ O	0.2 mmol Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 400 µL H ₂ O	NaOH 0.5M	7	66%
			0.2 mmol Cu(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O 800 µL H ₂ O			80%
7			0.2 mmol Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 400 µL H ₂ O	-	4 - 5	64%
			0.2 mmol Cu(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O 800 µL H ₂ O			70%

El procedimiento seguido en la síntesis de los complejos de cinc(II) y cobre(II) utilizando el efecto *template* está basado en una adaptación de aquel usado por Boghaei y Gharagozlou⁷⁹ para la síntesis de complejos de cinc(II) usando como sustrato un derivado del salicilaldehído. La ventaja de este método es que se logra obtener el complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) en un solo paso sin necesidad de una síntesis previa de la base de Schiff utilizada como ligando. Además, el rendimiento global del complejo de cinc(II), el cual al ser obtenido mediante síntesis inicial de la base de Schiff y su posterior complejación con cinc(II) es de alrededor del 33%, prácticamente se duplica al aplicar el efecto *template*. Por esta razón, se decidió utilizar solo este método para el complejo de cobre(II), con resultados aún mejores.

Si bien en el procedimiento de referencia se trabaja a pH 7, se introdujo una variante en que emulando la síntesis realizada en el *ensayo 1*, se aprovecha el carácter básico del contraión acetato en relación molar 1:1 con el ligando LIG-Gly para realizar la síntesis sin adición de base. El hecho de que se obtenga el mismo producto y con rendimientos comparables, indica que basta la relativamente baja concentración de la sal carboxilato del ligando presente a pH 4 - 5 para iniciar la formación del complejo, la cual se ve muy favorecida por el efecto quelato y la insolubilidad del complejo en el medio de reacción, ambos factores que desplazan el equilibrio en la dirección deseada.

Dado que la pureza y el rendimiento de los complejos de cinc(II) y cobre(II) resultan comparables, tanto a pH 7 como 4 - 5, se optó por realizar la síntesis a mayor escala a este último pH, lo que minimizaría un eventual riesgo de contaminación de los complejos obtenidos con hidróxido de cinc(II) o cobre(II). Este mismo pH se utilizó para la síntesis de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con el ligando base de Schiff formado por la condensación con alanina en vez de glicina. En la **tabla 10** se presentan las síntesis por efecto *template* escaladas a 1 mmol de Zn(II) y Cu(II) con ambos ligandos.

Tabla 10. Complejos de Zn(II) y Cu(II) con los ligandos N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina y N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)alanina

Síntesis	8-CHO-7-OH-cumarina	Aminoácido	Sal del metal	pH final	Rendimiento
8	1 mmol 15 mL MeOH	Glicina	1 mmol Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 1 mL H ₂ O	4 - 5	73%
9			1 mmol Cu(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O 4 mL H ₂ O		69%
10		Alanina	1 mmol Zn(CH ₃ COO) ₂ ·2H ₂ O 1 mL H ₂ O		41%
11			1 mmol Cu(CH ₃ COO) ₂ ·H ₂ O 4 mL H ₂ O		53%

8.2. CARACTERIZACIÓN

8.2.1. Precursor 8-formil-7-hidroxycumarina, 8-CHO-7-OH-CA

En el espectro ^1H -RMN del compuesto precursor 8-formil-7-hidroxycumarina (8-CHO-7-OH-CA) mostrado en la **figura 19** se observan en el rango de 6 a 8 ppm las señales de los cuatro hidrógenos aromáticos como dupletes con una constante de acoplamiento característica para hidrógenos en posición relativa orto. A partir de los valores de las constantes de acoplamiento, se concluye que los protones a 8.03 y 6.38 ppm se encuentran acoplados entre sí ($J = 9.75 - 9.45$); lo mismo ocurre con aquellos a 7.88 y 6.97 ppm ($J = 8.85$). Asimismo, a 10.44 ppm se aprecia claramente la señal característica del protón aldehídico, mientras que a 11.91 ppm aparece la señal del hidrógeno fenólico, ancha y de baja intensidad debido al intercambio con el agua del solvente deuterado d_6 -DMSO.

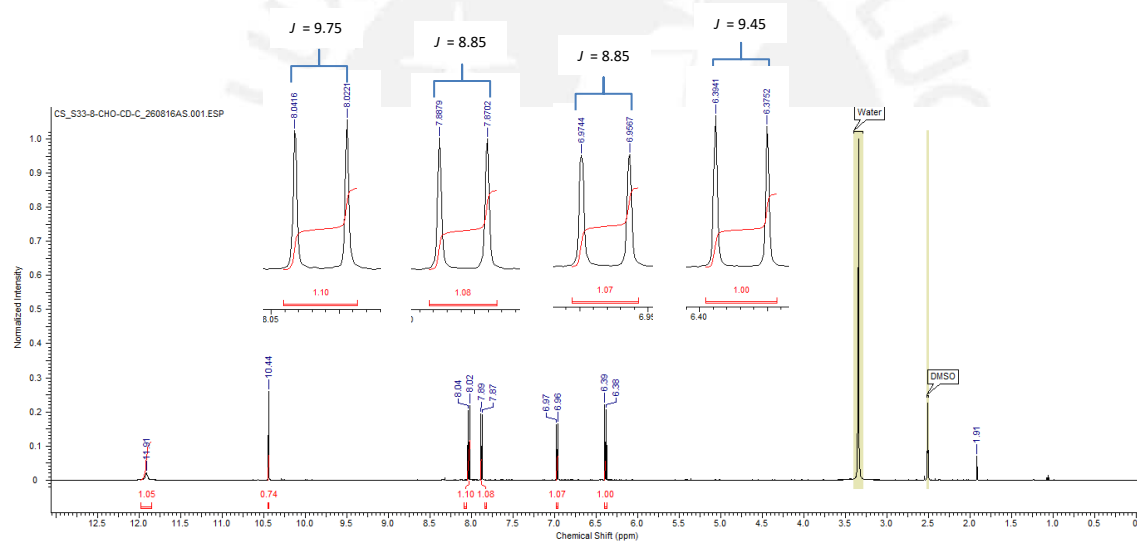


Figura 19. Espectro ^1H -RMN del ligando 8-formil-7-hidroxycumarina.

En lo que concierne al espectro de ^{13}C -RMN (**figura 20**) se pueden distinguir las diez señales de los carbonos que conforman el esqueleto de este compuesto. El pico a 191 ppm se asigna al carbono aldehídico puesto que se encuentra en el rango de desplazamiento químico típico para este tipo de carbono. Una de las tres señales en el rango de 168 a 152 ppm debe corresponder al C=O lactónico, mientras que las otras dos corresponderían probablemente al C7 y C9 que se encuentran enlazados a átomos de oxígeno. Las señales restantes son características de carbonos asociados a anillos

aromáticos y no es posible asignarlas haciendo uso solamente de este espectro. No obstante, el reconocimiento del carbono aldehídico por ^{13}C -RMN y el protón aldehídico por ^1H -RMN pueden ser usados como punto de partida en las técnicas HSQC y HMBC-RMN para una completa asignación de las señales restantes.

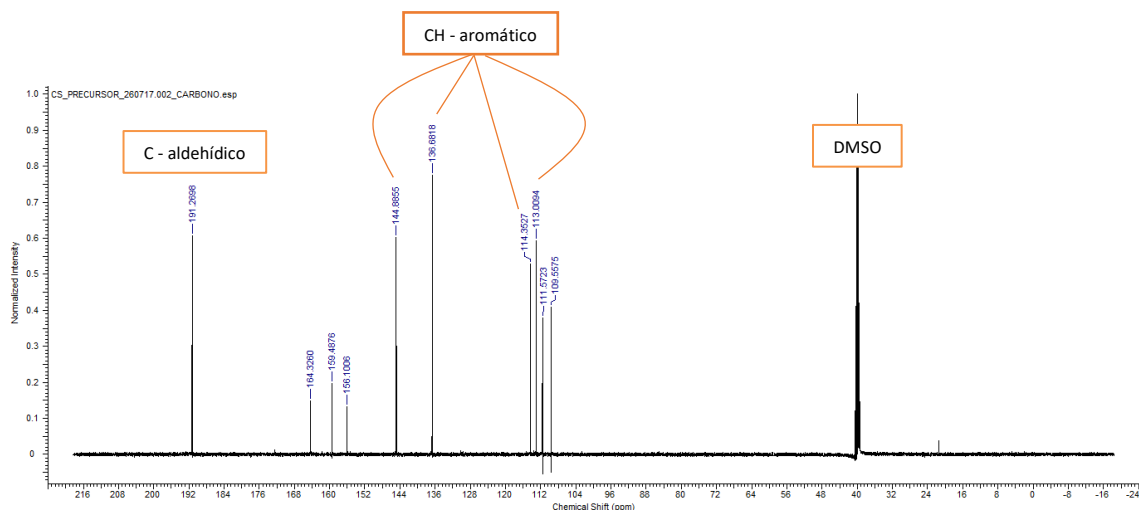


Figura 20. Espectro ^{13}C -RMN del ligando 8-formil-7-hidroxycumarina

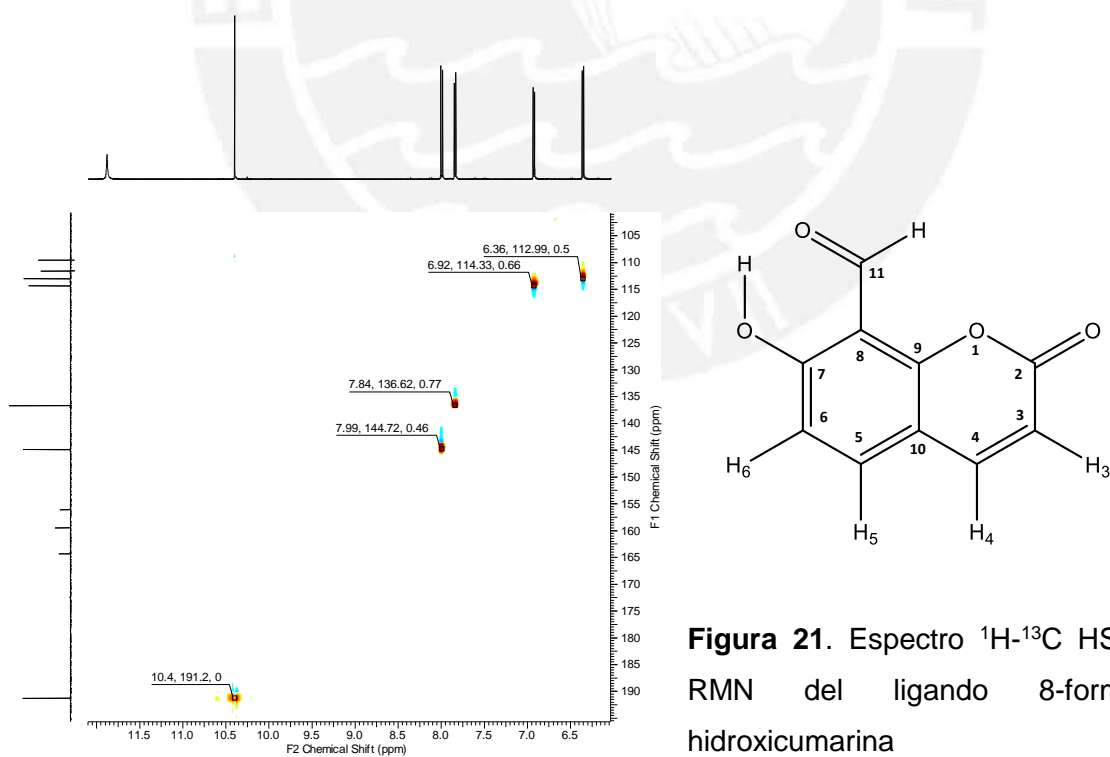


Figura 21. Espectro ^1H - ^{13}C HSQC-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxycumarina

La **figura 21** muestra el espectro ^1H - ^{13}C HSQC del ligando 8-CHO-7-OH-CA, el cual nos permite identificar los protones que se encuentran directamente enlazados a sus respectivos carbonos. Así es posible confirmar que el carbono aldehídico (191 ppm) se encuentra enlazado al protón aldehídico (10.44 ppm), mientras que los carbonos que presentan un desplazamiento químico a 144, 136, 114 y 113 ppm son los que están acoplado con los protones de la región aromática y el resto de señales corresponden a los cinco carbonos cuaternarios.

Esta información resulta útil para la interpretación del espectro ^1H - ^{13}C HMBC. Además, el espectro ^1H - ^{13}C HSQC también permite confirmar que el protón con un desplazamiento químico de 11.91 ppm en el espectro ^1H -RMN, el cual no correlaciona con ningún carbono del compuesto en estudio corresponde al protón del grupo hidroxilo.

La **figura 22** muestra el espectro ^1H - ^{13}C HMBC, el cual correlaciona el desplazamiento químico de un protón con carbonos que se encuentran separados por dos o más enlaces. Su interpretación se realizó como se explica a continuación.

En primer lugar, se observa que el carbono aldehídico (191 ppm) acopla con un protón de la zona aromática. Este protón sería el H6 (6.97 ppm), el cual presenta un acoplamiento carbono-protón a través de cuatro enlaces y pudo ser detectado porque existe un alineamiento geométrico favorable mediante una cadena C-C-C-C-H, lo que permite un acoplamiento del tipo "W" ⁸⁰. Por tanto, se concluye que la señal a 114 ppm en el espectro ^1H - ^{13}C HSQC, corresponde al carbono unido al H6. Asimismo, como este hidrógeno está acoplado al protón que resuena a 7.88 ppm según el ^1H -RMN, necesariamente debe corresponder al H5. En consecuencia, haciendo uso del espectro HSQC se observa que el H5 acopla con el carbono a 136 ppm. De esta manera, se logró asignar los carbonos C5 y C6 y sus correspondientes hidrógenos.

A continuación conviene analizar los acoplamientos del H5 y H6 en el espectro HMBC con los diversos carbonos. Se observan claramente los acoplamientos del H6 con los picos a 109, 111, 156, 164, y 191 ppm, así como aquellos del H5 con los carbonos a 109, 111, 144, 156 y 164 ppm. Por otro lado, resulta sorprendente en una primera aproximación el acoplamiento casi nulo de los H5 y H6 con los carbonos C6 (114 ppm) y C5 (136) respectivamente dado que son acoplamientos hidrógeno-carbono en posición relativa orto

($^2J_{CH}$) que se esperaría que fueran fuertes. Sin embargo, al revisar literatura pertinente se encuentra que este fenómeno es relativamente usual en anillos bencénicos⁸⁰ y en otras cumarinas estudiadas⁸¹.

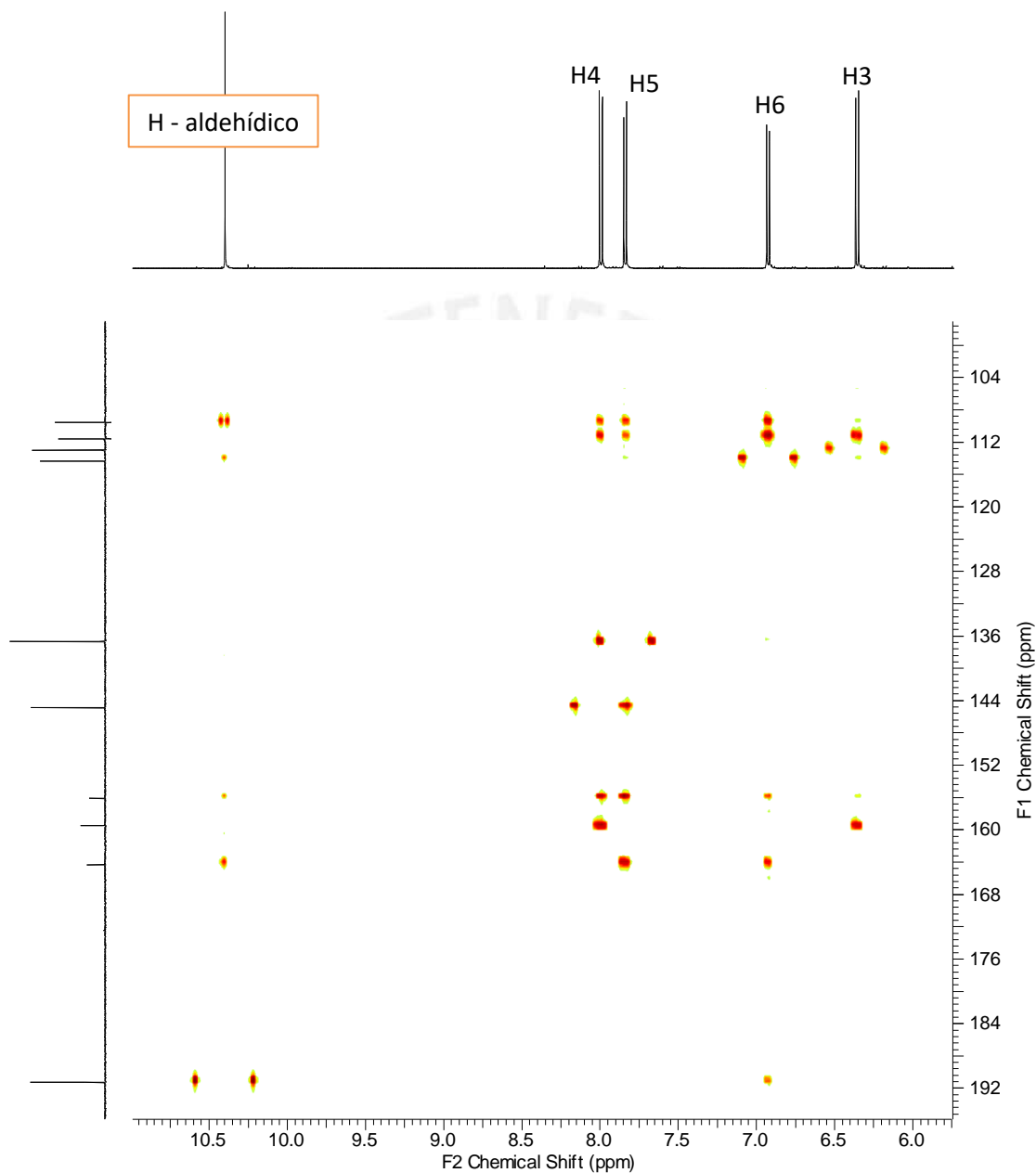


Figura 22. Espectro ^1H - ^{13}C HMBC-RMN del ligando 8-formil-7-hidroxycumarina

El siguiente paso es considerar los acoplamientos que presenta el protón aldehídico. Estos acoplamientos se producen con carbonos que presentan un desplazamiento químico a 109, 114 (**C6**), 156 y 164 ppm. Ahora bien, como se mencionó anteriormente en

el análisis preliminar del espectro ^{13}C -RMN, se espera que el C=O lactónico se ubique en el rango 152-168 ppm y no es posible que este carbono acople con el protón aldehídico. De esta manera, la única posibilidad es que de las tres señales ubicadas en dicho rango sea aquella a 159 ppm la asignada al carbonilo lactónico. Por tanto, la premisa de que las señales a 156 y 164 ppm corresponderían a los carbonos cuaternarios C7 y C9, que se encuentran unidos a átomos de oxígeno, se ve reforzada por los acoplamientos observados entre estas señales y el protón aldehídico.

Luego se consideró conveniente analizar los acoplamientos que presenta el C5 (136 ppm). Se observa que existen dos picos en el espectro HMBC, uno con el H6 (6.97 ppm) muy débil, tal como como se analizó anteriormente, y otro más intenso con el protón ubicado a 8.03 ppm. Por otro lado, de acuerdo con la ecuación de Karplus, se espera que el protón H4 ubicado a una distancia de tres enlaces ($^3J_{\text{CH}}$) del C5 y con un ángulo diedro de 0° respecto a este, presente un acoplamiento relativamente intenso como efectivamente se observa en el espectro ^1H - ^{13}C HMBC con dicho carbono. De esta manera, es posible asignar la señal a 8.03 ppm al protón H4 en el ^1H -RMN y la señal a 145 ppm al C4 en ^{13}C -RMN. Asimismo, dado el acoplamiento ya mencionado que existe entre los protones H4 y H3, la asignación del primero permite la identificación directa de la señal del H3, que se ubica entonces a 6.38 ppm y por ende, según el HSQC, la del C3 a 113 ppm.

El acoplamiento C-H trans en un anillo aromático, aún más intenso según Karplus que el cis antes mencionado, resulta útil para la asignación de carbonos ubicados a una distancia de tres enlaces de un protón. Por esta razón, se espera un acoplamiento muy intenso del protón H3 con el carbono C10 que se encuentra en posición relativa trans. Al analizar los acoplamientos del H3, se observan solo dos acoplamientos fuertes, uno con el carbono a 112 ppm y otro con el carbono a 159 ppm; pero como este último ya ha sido asignado al carbono del C=O lactónico, se concluye que el carbono a 112 ppm sería el C10. Esta asignación se ve reforzada por el acoplamiento fuerte que se observa en el espectro ^1H - ^{13}C HMBC entre este carbono y el segundo protón en posición trans al mismo, el H6. La asignación del C10 facilita a su vez aquella pendiente del carbono C8, que se ubica entonces a 110 ppm puesto que las únicas señales restantes ubicadas a 156 y 164 pertenecen necesariamente a los carbonos C7 y C9 unidos a átomos de oxígeno.

Aplicando nuevamente la relación de Karplus y por un razonamiento similar, es posible asignar los carbonos C7 y C9 aún pendientes en el espectro HMBC. En este sentido,

resulta conveniente ubicar en el espectro ^1H - ^{13}C HMBC los acoplamientos del H4 con el C7 y el C9. Se espera que el primero sea débil o no observable dada la lejanía de ambos átomos (5 enlaces), mientras que el segundo, que es del tipo C-H trans, debe ser muy fuerte según Karplus. Al observar el espectro ^1H - ^{13}C HMBC, se aprecia un acoplamiento intenso con la señal a 156 ppm, la cual en consecuencia resulta asignable al C9. De esta manera la señal restante a 164 ppm corresponde al C7.

En la **tabla 11** se presentan las asignaciones definitivas de los hidrógenos y carbonos del compuesto 8-formil-7-hidroxicumarina. Esta asignación resultaría igualmente válida para la base de Schiff con glicina derivada del mismo, puesto que el único cambio que se da en el esqueleto cumarínico sería el reemplazo del grupo aldehído en la posición 8 por el grupo aceptor análogo imino.

Tabla 11. Asignaciones de las señales de los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN en d_6 -DMSO realizadas para el compuesto 8-formil-7-hidroxicumarina.

Posición	δ_{H} , mult (J en Hz)	δ_{C} , tipo
2	-	159.4876, C=O lactónico
3	6.3846, d (9.45)	113.0094, CH
4	8.0318, d (9.75)	144.8855, CH
5	7.8790, d (8.85)	136.6818, CH
6	6.9656, d (8.85)	114.3527, CH
7	-	164.3260, C enlazado a OH
8	-	109.5575, C enlazado a CHO
9	-	156.1006, C
10	-	111.5723, C
11	10.4403, s	191.2698, CHO
OH	11.9084, s	-

En la **figura 23** se presenta el espectro IR del precursor 8-formil-7-hidroxicumarina, mientras que en la **tabla 12** se reportan las asignaciones de las principales bandas de absorción.

En el espectro IR se observa la vibración de estiramiento del OH fenólico a 3433 cm^{-1} como una banda ancha y relativamente débil. Asimismo, la banda intensa a 1731 cm^{-1} es asignada a la vibración de estiramiento del carbonilo lactónico. Por otro lado, aparecen dos bandas, una muy pequeña a 2921 cm^{-1} y otra intensa a 1659 cm^{-1} , características de las vibraciones de estiramiento $\nu_{\text{C-H}}$ y $\nu_{\text{C=O}}$ del grupo aldehído. Finalmente, se observa un conjunto de bandas de intensidad variable en el rango de aproximadamente 1630 cm^{-1} a 1420 cm^{-1} asignables a vibraciones $\nu_{\text{C=C}}$ del anillo cumarínico.

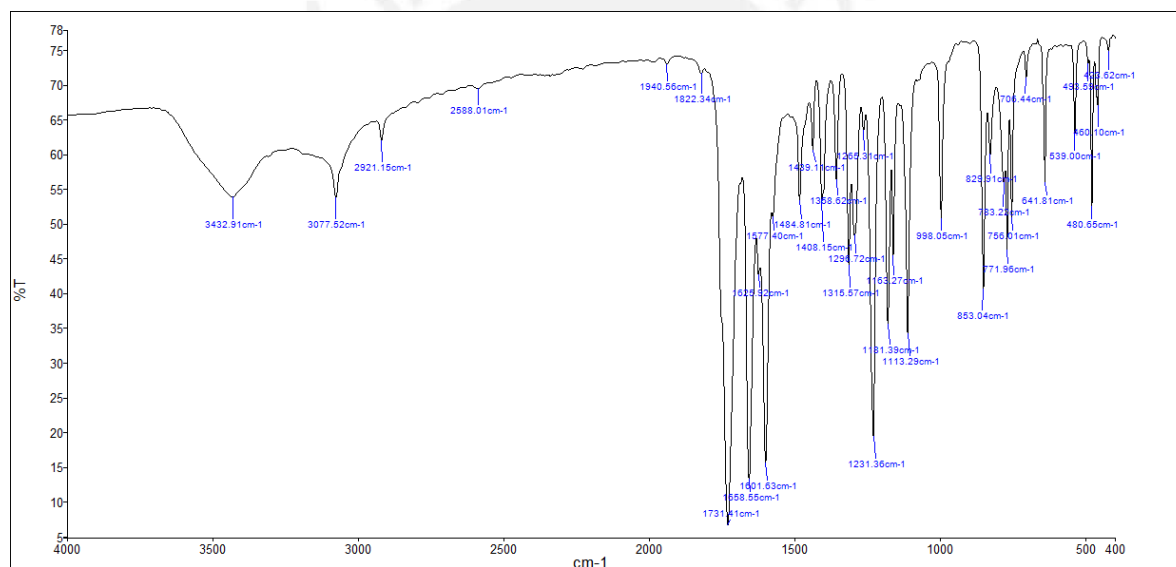


Figura 23. Espectro IR del ligando 8-formil-7-hidroxicumarina

Tabla 12. Asignaciones de las principales bandas de absorción de la 8-formil-7-hidroxicumarina

	$\nu_{\text{O-H}^*}$	$\nu_{\text{C=O}}$ lactónico	$\nu_{\text{C=O}}$ aldehído	$\nu_{\text{C=C}}$ aromático	$\delta_{\text{C-O-H}}$	$\nu_{\text{C-O}}$
8-CHO-7-OH-CA	3433	1731	1659	1602, 1485, 1439	1408	1231, 1181, 1163

8.2.2. Ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina, LIG-GLY

8.2.2.1. Espectroscopía Infrarroja

En la **figura 24** se muestran los espectros infrarrojos del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina (**a**) y su sal carboxilato de potasio (**b**). Este último resulta de utilidad para la posterior interpretación de los espectros IR de los complejos de cinc(II) y cobre(II) tanto de este ligando como de la base de Schiff análoga que resulta de la condensación de la 8-formil-7-hidroxycumarina con alanina en lugar de glicina. Los espectros IR del ligando y su respectiva sal se presentan de forma ampliada en el rango de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} en el *anexo 10.1*.

En la **tabla 13** se presentan las asignaciones de las bandas de absorción de los espectros IR del ligando LIG-Gly y su sal de potasio que resultan de interés para una posterior interpretación y análisis de los espectros IR de sus respectivos complejos, así como aquellos con la base de Schiff análoga.

Tabla 13. Principales frecuencia de vibración en los espectros IR del N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina y su sal de potasio

	$\nu_{\text{O-H}}$	$\nu_{\text{C=O}}$ lactónico	$\nu_{\text{C=N}}$ imino	ν_{asCOO^-}	$\nu_{\text{C=C}}$ aromático	$\delta(\text{C-O-H})$ carboxílico	ν_{sCOO^-}	$\nu_{\text{C-O}}$
Ligando LIG-Gly	3439	1712*	1651	-	1620 1586 1524	1419	-	1258 1233 1186 1156
Sal de K+ (carboxilato)	3424	1730	1656	1621	1592, 1522	-	1404	1256, 1231, 1185, 1154

* Superpuesta con $\nu(\text{C=O})$ carboxílico alifático

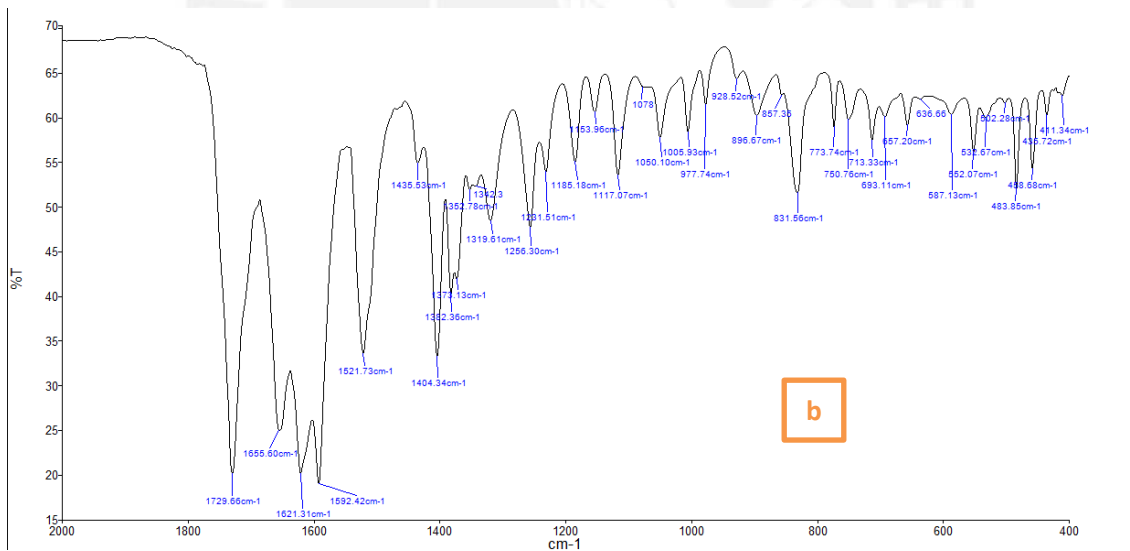
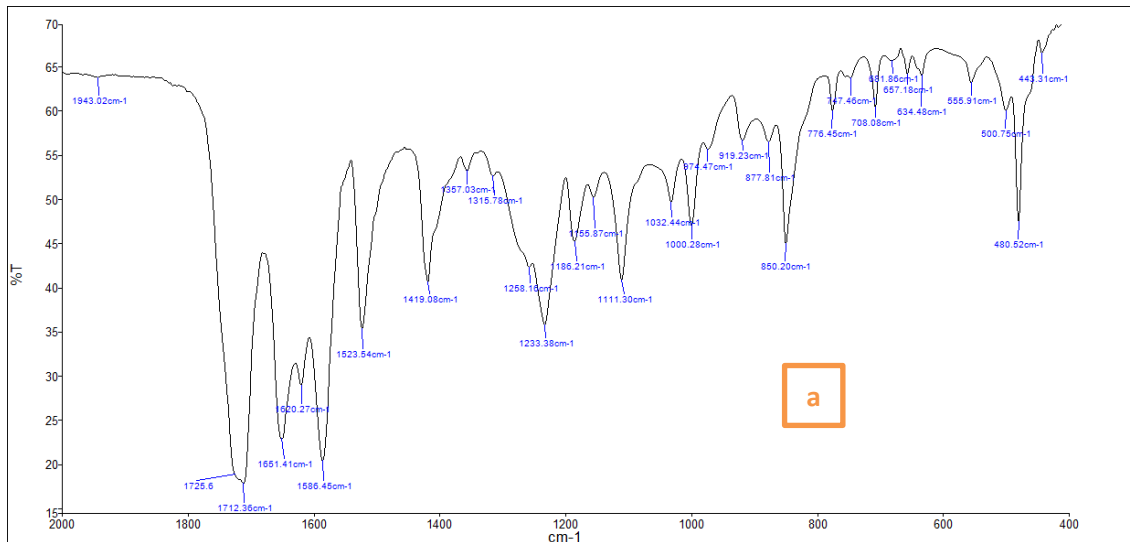


Figura 24. Espectro Infrarrojo del ligando LIG-Gly (a) y su respectiva sal de potasio (b).

En el espectro IR del ligando, mostrado en el *anexo 10.1.1*, se observa una banda ancha e intensa a 3439 cm^{-1} , la cual por su posición similar a aquella presente en la correspondiente sal carboxilato de potasio tomada como referencia se puede asignar a la vibración de estiramiento del OH fenólico; esto resulta consistente con el hecho que al pH 6 en que fue sintetizada la sal no ocurre la desprotonación de dicho grupo. Esta banda, encubriría en caso del ligando, a la banda de la vibración $\nu_{\text{O-H}}$ del grupo carboxílico.

Al comparar las bandas asignadas al $\nu_{\text{C=O}}$ lactónico en los espectros IR del ligando y la sal de referencia se observa que en el ligando esta banda aparece considerablemente más ancha y algo más intensa que en la sal, lo cual se atribuye a su superposición con la banda $\nu_{\text{C=O}}$ COOH, que en general se ubica alrededor de 1720 cm^{-1} en grupos carboxílicos alifáticos. En lo que respecta a las bandas correspondientes a la vibración de estiramiento del grupo imino, estas se encuentran en posiciones similares en ambos espectros.

El aspecto más relevante en la presente comparación concierne a la aparición en la sal del ligando de dos bandas, una muy intensa a 1621 cm^{-1} y otra relativamente intensa a 1404 cm^{-1} , las que por sus posiciones e intensidades resultan características para las vibraciones de estiramiento asimétrica y simétrica del grupo carboxilato. Esto es consistente con la desprotonación del grupo carboxílico y la consiguiente desaparición de la $\nu_{\text{C=O}}$ COOH del ligando en el espectro de la sal. Asimismo, se observa que la banda asignada a la flexión C-O-H del grupo carboxílico está ausente en la sal.

8.2.2.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

En la **figura 25** se presenta el espectro $^1\text{H-RMN}$ de la 8-formil-7-hidroxicumarina, así como del ligando base de Schiff formado por la condensación de este compuesto con glicina.

En el espectro $^1\text{H-RMN}$ del compuesto precursor 8-formil-7-hidroxicumarina se observan en el rango de 6 a 8 ppm, como se discutió en el *acápite 8.2.1*, las señales de los cuatro hidrógenos aromáticos como dupletes, Asimismo, a 10.44 ppm se aprecia claramente la señal característica del protón aldehídico, mientras que a 11.91 ppm aparece una señal ancha y de baja intensidad asignada al hidrógeno fenólico. La formación de la base de Schiff con glicina, conduce a la desaparición de la señal del hidrógeno aldehídico y la aparición en su lugar de la señal del hidrógeno del grupo imino a 8.92 ppm. Por otro lado,

la señal del OH fenólico se ve desplazada considerablemente hacia campo bajo y se ubica a 14.27 ppm en la base de Schiff. En cambio, todas las señales en el rango aromático sufren un notable desplazamiento a campo alto ($\Delta = 0.16 - 0.42$) como consecuencia del efecto desapantallante introducido por la disminución del poder aceptor del grupo imino respecto al grupo aldehídico. Estas señales han sido asignadas teniendo en cuenta que el reemplazo del grupo aldehídico en el precursor por el grupo imino en la base de Schiff no debe afectar el orden en que aparecen dichos protones en el espectro $^1\text{H-RMN}$. Por último, se observa la aparición de una señal adicional a 4.58 ppm que corresponde a los hidrógenos metileno de la base de Schiff.

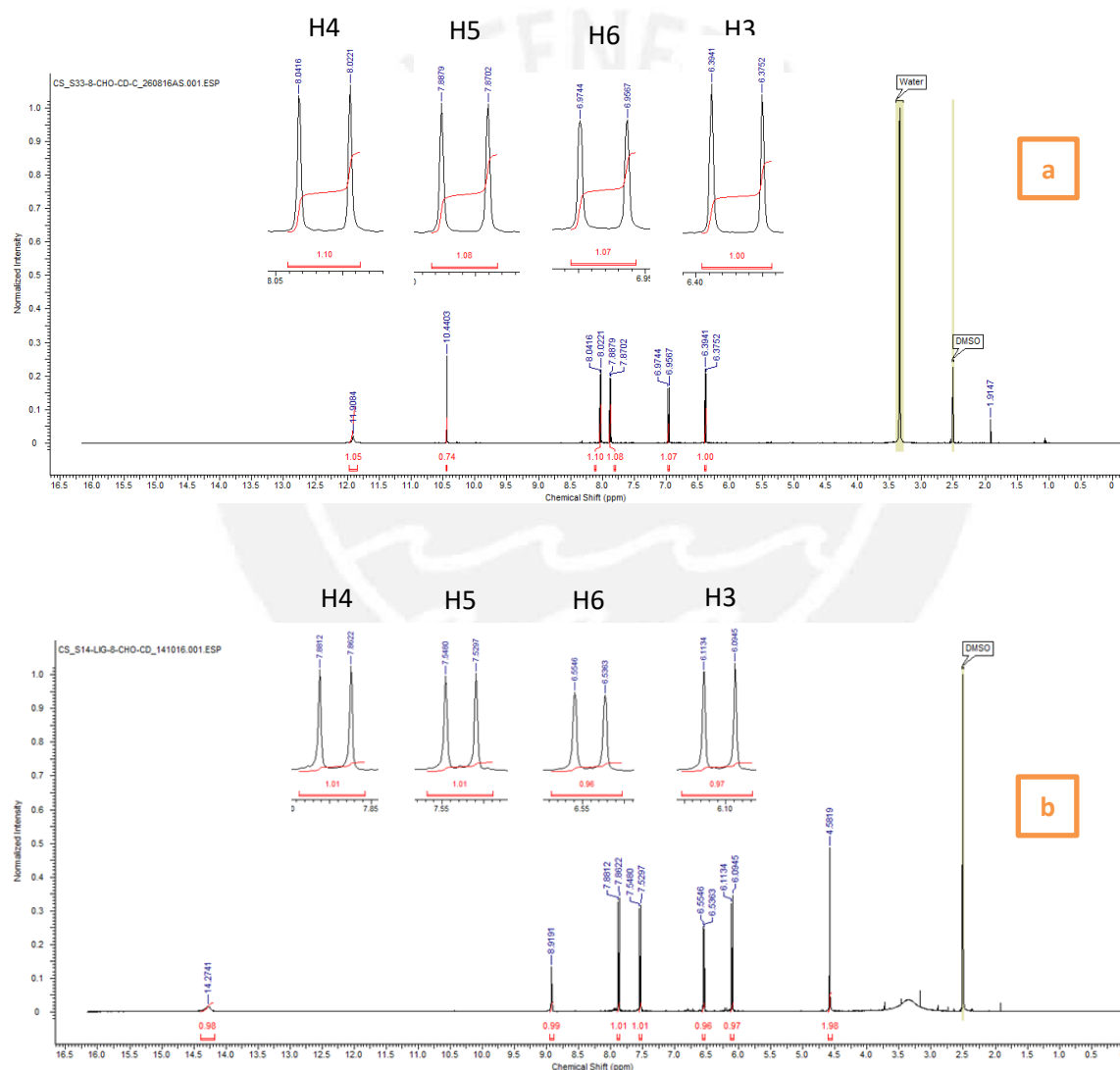


Figura 25. Espectros $^1\text{H-RMN}$ del ligando 8-formil-7-hidroxycumarina (a) y de la base de Schiff formado por la condensación con glicina (b)

8.2.3. Complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilen]glicina y N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilen]alanina

8.2.3.1. Espectroscopía Infrarroja

En la **figura 26**, se presentan de modo comparativo los espectros IR del N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina, su correspondiente sal carboxilato de potasio y del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cinc(II), mientras que en la **figura 27** se compara el espectro IR de este último con aquel del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cobre(II). Asimismo, en la **figura 28** se muestran los espectros IR de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con el ligando base de Schiff análogo resultante de la condensación de la 8-formil-7-hidroxycumarina con alanina en vez de glicina. Todos los espectros IR mencionados se presentan en este acápite ampliados en la zona de mayor interés entre 2000 y 400 cm^{-1} ; los correspondientes espectros completos se muestran en las figuras mostradas en el *anexo 10.2*. Las asignaciones de bandas de absorción seleccionadas de estos espectros IR que resultan de interés para analizar el posible modo de coordinación de las bases de Schiff al cinc y al cobre son presentadas en la **tabla 14**.

En el *acápite 8.2.2.1* se analizaron en detalle los cambios producidos por la desprotonación del grupo COOH del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina en el espectro IR de la sal. Lo más relevante resultó la desaparición de la banda de estiramiento $\nu_{\text{C=O}}$ carboxílico del ligando y la aparición en su reemplazo de las bandas características de las vibraciones de estiramiento asimétrico y simétrico del grupo carboxilato de la sal. Asimismo, se comentó que la banda de absorción del grupo imino no se vio afectada significativamente al formarse la sal. Esta información resulta de especial interés en el análisis del espectro infrarrojo de los complejos Zn(LIG-Gly)(H₂O) y Cu(LIG-Gly)(H₂O).

En el espectro IR del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O), comparado en la **figura 26** con aquellos del ligando y su correspondiente sal de potasio, se observa, a semejanza de lo que ocurre en la sal, la desaparición de la banda $\nu_{\text{C=O}}$ COOH. Esto resulta consistente con la aparición en dicho espectro de una banda muy intensa a 1610 cm^{-1} y una banda relativamente intensa a 1417 cm^{-1} , las que pueden ser correlacionadas con aquellas asignadas a las vibraciones de estiramiento asimétrico a 1621 cm^{-1} y simétrico a 1404 cm^{-1} en la sal de potasio. No obstante, en caso de este complejo, la asignación de la

$\nu_{\text{S}}\text{COO}^-$ se dificulta, pues a diferencia de la sal, hay tres bandas de similar intensidad en dicha zona del espectro y surge la posibilidad de que alguna de las dos restantes pudiera corresponder a dicha vibración. La existencia de estas vibraciones características del grupo carboxilato en el $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ demuestra la presencia de este grupo en el complejo y su probable coordinación al cinc(II).

Por otro lado, la coordinación de la base de Schiff al cinc en el complejo $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ produce un desplazamiento de la banda de absorción $\nu_{\text{C=N}}$ del grupo imino de aproximadamente 1651 cm^{-1} en el ligando a 1636 cm^{-1} , cambio que no se observa al formarse la sal. Este desplazamiento en la absorción $\nu_{\text{C=N}}$ hacia menor frecuencia sería consistente con la coordinación de dicho grupo al metal como consecuencia del debilitamiento del enlace C=N por donación del par libre del nitrógeno al cinc(II). Cabe mencionar en este contexto que la banda $\nu_{\text{C=O}}$ lactónico también sufre un desplazamiento significativo a pesar que por la posición de este grupo en el anillo cumarínico no sería posible su coordinación al centro metálico. Sin embargo, al revisar la literatura de otros complejos cumarínicos en que por DRX se ha establecido que no coordina el C=O lactónico, se encuentra que este tipo de desplazamiento no es inusual^{78, 82, 83}.

En lo que respecta a la posible coordinación del grupo fenolato del ligando al cinc(II), el espectro IR no permite obtener mayor información, salvo la desaparición de una banda media y ancha a 1419 cm^{-1} que fue asignada a la vibración de flexión $\delta(\text{C-O-H})$, cuya ausencia indicaría la desprotonación de este grupo en el complejo.

Por otro lado, al establecer una comparación entre el espectro IR del complejo de cinc(II) con el correspondiente complejo de cobre(II), $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ (**figura 27**), se observa una cierta similitud en el patrón de bandas de absorción. Esta similitud es particularmente notoria en lo que respecta a las bandas asignadas en la **tabla 14** a las vibraciones de estiramiento de los grupos C=O lactónico, C=N del grupo imino y las C=C del anillo cumarínico. Una diferencia notable en la zona de grupos funcionales radica en que la fuerte y bien definida banda de absorción en el espectro IR del complejo de cinc(II) a 1610 cm^{-1} asignada a la $\nu_{\text{AS}}\text{COO}^-$ no resulta observable en este caso. En cambio, se aprecia claramente una banda de intensidad media a 1372 cm^{-1} que podría asignarse a la $\nu_{\text{S}}\text{COO}^-$. Esto podría indicar que ha ocurrido cierto desplazamiento hipsocrómico de la banda $\nu_{\text{AS}}\text{COO}^-$ en el complejo de cobre(II), la cual en este caso se encontraría superpuesta con la

$\nu_{C=N}$ a 1637 cm^{-1} . Esta última, se encuentra en posición casi idéntica a la correspondiente en el complejo $Zn(LIG-Gly)(H_2O)$.

En referencia a los espectros infrarrojo de los complejos $Zn(LIG-Ala)(H_2O)$ y $Cu(LIG-Ala)(H_2O)$, mostrados en la **figura 28**, resulta evidente la gran similitud entre ellos; esta se da no solo en el patrón de bandas de absorción sino incluso en la posición de la mayoría de ellas, la cual se extiende hasta parte de la huella digital. En ambos espectros se observa un notable ensanchamiento de la banda asignada $\nu_{C=N}$ a 1631 cm^{-1} , lo que constituye evidencia razonable de que esta se encuentra superpuesta con la $\nu_{as\text{COO}^-}$ del grupo carboxilato coordinado al metal y a su vez refuerza la asunción en este sentido planteada para el complejo $Cu(LIG-Gly)(H_2O)$. Asimismo, en ambos complejos la vibración de estiramiento $\nu_{s\text{COO}^-}$ se ubica alrededor de 1412 cm^{-1} , posición similar a aquella en los complejos de cinc(II) y cobre(II) con la base de Schiff análoga de glicina.



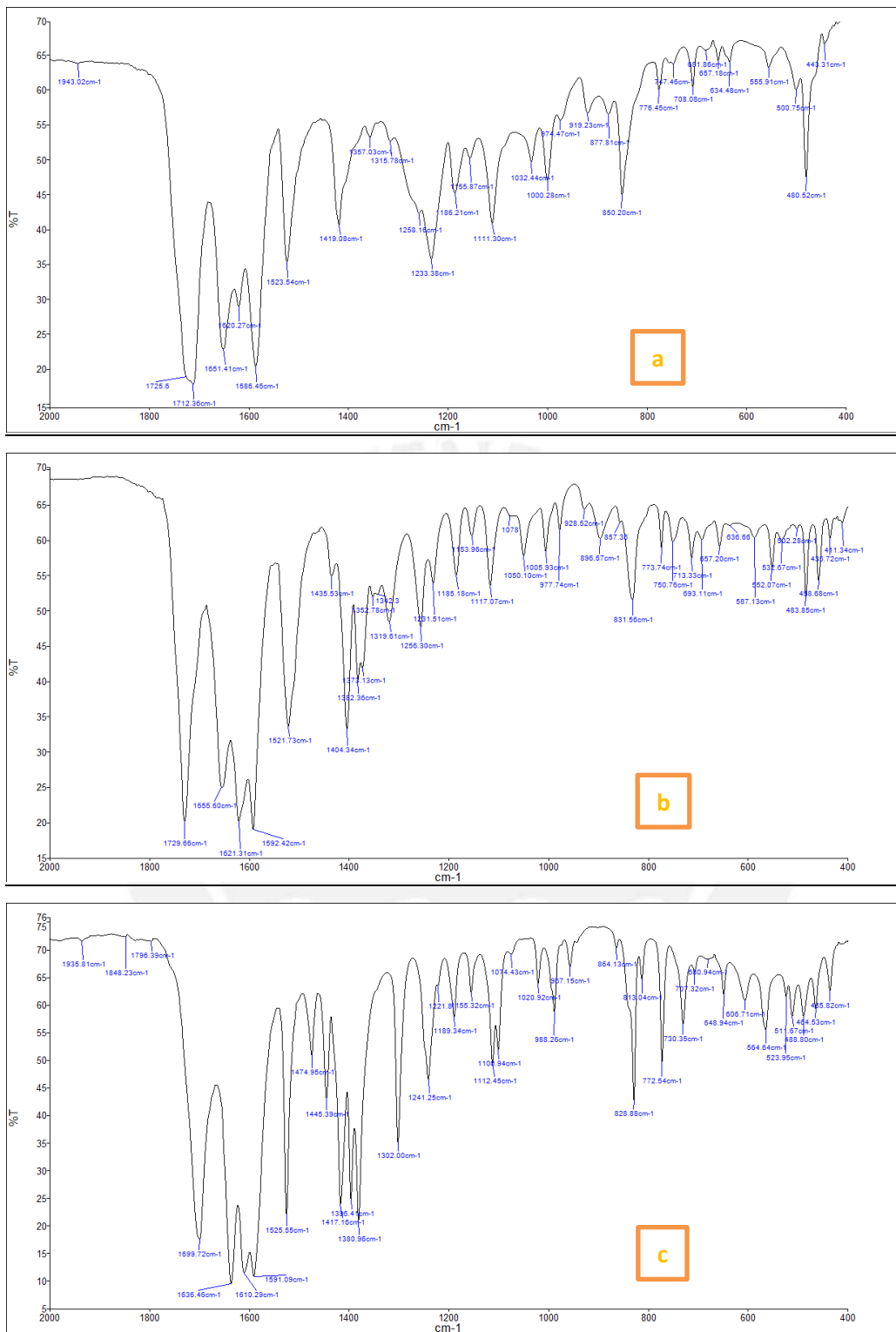


Figura 26. Espectro IR del ligando LIG-Gly (a), de su sal carboxilato de potasio (b) y de su respectivo complejo de Zn²⁺ (c)

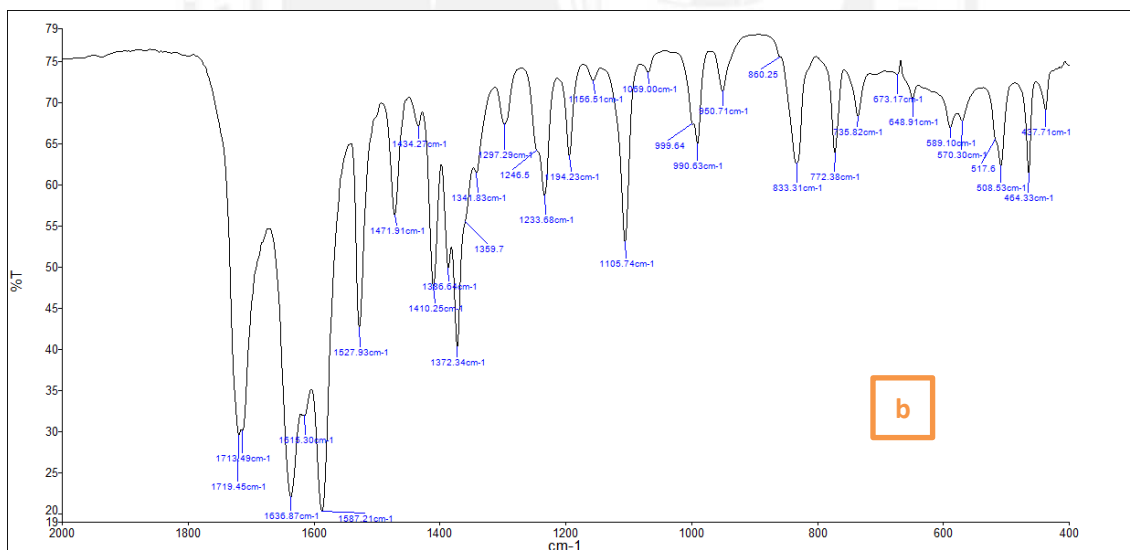
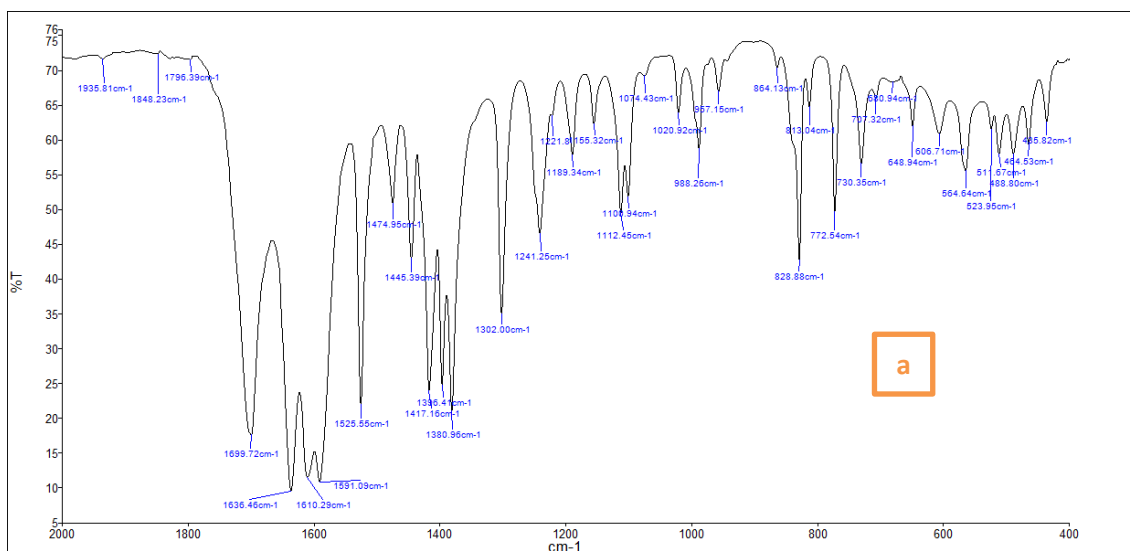


Figura 27. Espectro IR del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) (a) y del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) (b)

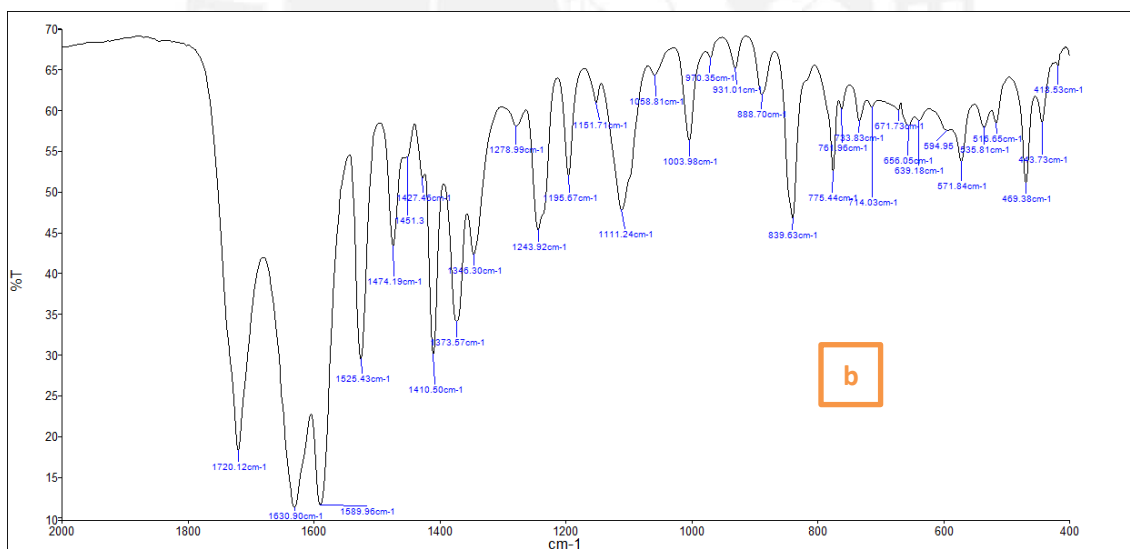
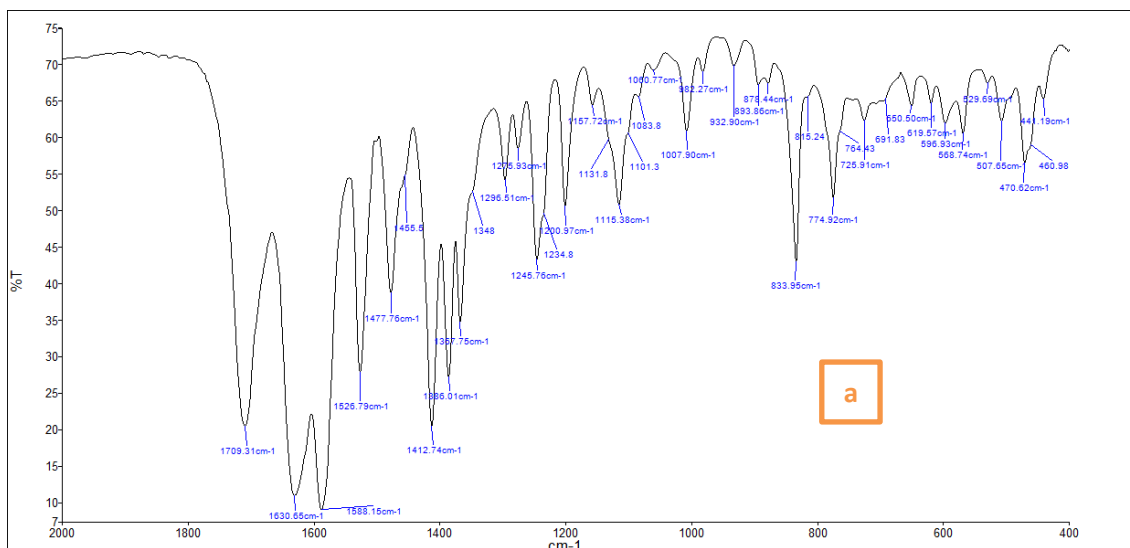


Figura 28. Espectro IR del complejo Zn(LIG-Ala)(H₂O) (a) y del complejo Cu(LIG-Ala)(H₂O) (b)

Finalmente, al comparar las bandas de absorción asignadas a las vibraciones de estiramiento del grupo imino y aquellas de estiramiento simétrico y asimétrico del grupo carboxilato presentadas en la **tabla 14** para los cuatro complejos se observa un patrón de comportamiento espectroscópico común. Se observa que las bandas de absorción asignadas a los grupos imino y carboxilato en los cuatro complejos aparecen en un rango similar, lo que indicaría la coordinación de estos grupos al centro metálico en todos ellos.

Por otro lado, el hecho que, como ya se comentó en el *acápite 8.1.2.1*, los complejos $Zn(LIG-Gly)(H_2O)$ y $Cu(LIG-Gly)(H_2O)$ no dependan de la naturaleza de la sal utilizada como fuente del metal, permite concluir que este último no forma parte de la composición de dichos complejos.

De acuerdo a lo discutido sobre los espectros IR de estos cuatro complejos se podrían plantear dos posibilidades estructurales. Una de ellas sería que el ligando se comporte como bidentado vía el grupo imino y el grupo carboxilato y presente una relación ligando/metal 2:1 o bien se comporte como tridentado y el grupo fenolato forme también parte de la esfera de coordinación, en cuyo caso se tendría una relación ligando/metal 1:1.

Tabla 14. Principales frecuencias de vibración en los espectros IR del ligando LIG-Gly, su sal de potasio, sus complejos de Zn²⁺ y Cu²⁺ y los complejos de Zn²⁺ y Cu²⁺ del ligando análogo LIG-Ala

	$\nu_{\text{O-H}^*}$	$\nu_{\text{C=O}}$ (s) lactónico	$\nu_{\text{C=N}}$ (s) imino	ν_{asCOO^-} (s)	$\nu_{\text{C=C}}$ aromático	$\delta(\text{C-O-H})$ (m) carboxílico	ν_{sCOO^-} (m)	$\nu_{\text{C-O}}$
Ligando LIG-Gly	3439	1712**	1651	-	1620 (m), 1586, 1524	1419	-	1258, 1233, 1186, 1156
Sal de K ⁺ (carboxilato)	3424	1730	1656	1621	1592, 1522	-	1404	1256, 1231, 1185, 1154
Complejo Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)	3378	1700	1636	1610	1591, 1526, 1475, 1445	-	1396	1241, 1189, 1155,
Complejo Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	3429	1719	1637***	1637***	1615 (m), 1587, 1528, 1472, 1434	-	1372	1234, 1194, 1157
Complejo Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	3404	1709	1631***	1631***	1588, 1527, 1478	-	1413	1246, 1201
Complejo Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	3424	1720	1631***	1631***	1590, 1525, 1478,	-	1411	1244, 1196

*Grupos OH y COOH del ligando, grupo OH de la sal carboxilato y agua de coordinación en complejos.

**Superpuesta con $\nu(\text{C=O})$ carboxílico alifático

*** Superposición de bandas $\nu_{\text{C=N}}$ y ν_{asCOO^-}

8.2.3.2. Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

En la **figura 29** se presentan de modo comparativo los espectros ^1H -RMN del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina (LIG-Gly), de su correspondiente complejo de cinc(II), así como del complejo de cinc(II) con el ligando análogo N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)alanina (LIG-Ala).

Al observar el espectro ^1H -RMN del complejo de Zn(II) con el ligando LIG-Gly se aprecia en la región aromática un ligero desplazamiento de los cuatro protones del anillo cumarínico hacia campo alto ($\Delta = 0.04 - 0.13$) respecto a la base de Schiff correspondiente. Esto se atribuye a la desprotonación del grupo hidroxilo en posición 7, lo cual aumenta su capacidad donadora y por consiguiente causa un enriquecimiento en densidad electrónica del anillo cumarínico. La desaparición de la señal del mencionado grupo OH que aparece a 14.27 ppm en el espectro ^1H -RMN del ligando resulta consistente con la mencionada desprotonación.

El aspecto más relevante en el espectro ^1H -RMN del complejo consiste en el fuerte desplazamiento hacia campo alto ($\Delta = 0.53$) de la señal de los protones metilénicos respecto a aquella en el correspondiente ligando LIG-Gly. Este corrimiento se encontraría relacionado con la desprotonación de los grupos COOH y OH del ligando y su consiguiente coordinación al metal. La parcial ionicidad del enlace cinc-carboxilato así como aquella del enlace cinc-fenolato generan una disminución del poder aceptor del grupo carboxílico y un aumento del poder donador del OH-fenólico del ligando; esto a su vez conduce a una disminución del poder desapantallante del grupo COOH y del N-imino del ligando sobre los protones metilénicos en el complejo formado.

Por otro lado, mientras que en el espectro infrarrojo del complejo $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$, como se discutió en el *acápite 8.2.3.1*, se observa un notable desplazamiento de la banda $\nu_{\text{C=N}}$ hacia menor frecuencia, lo cual comúnmente se asocia a una coordinación del grupo imino al metal, en el espectro ^1H -RMN no se aprecia un cambio significativo ($\Delta = +0.02$ ppm) en la posición de la señal del protón imino respecto al ligando. Se esperaría que una complejación del N-imino al cinc(II) ejerza un efecto desapantallante sobre el protón imino y, por tanto, un notable desplazamiento hacia campo bajo. Sin embargo, si bien en la bibliografía consultada se menciona esta tendencia general^{65, 84}, la magnitud del desplazamiento químico puede ser relativamente pequeña e incluso presentar irregularidades en el sentido del mismo⁸⁵. En el caso particular del complejo $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ el hecho que la variación sea tan pequeña, aunque en el sentido esperado, se podría atribuir a que el desapantallamiento introducido por la

coordinación del N-imino al metal sería mayormente compensado por el efecto mesomérico del O-fenolato en posición orto a dicho grupo.

En lo que respecta al complejo análogo de cinc(II) con el ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)alanina, este fue sintetizado directamente por efecto plantilla a partir de los componentes de la base de Schiff y la sal de cinc, por tanto en este caso no es posible comparar su espectro $^1\text{H-RMN}$ con el correspondiente ligando. Por esta razón, se recurrirá a una comparación del mismo con el espectro $^1\text{H-RMN}$ del complejo análogo antes discutido $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-óxido-8-cumarinilmetileno})\text{glicinato}]\text{cinc(II)}$. Al comparar ambos espectros se observa que las cuatro señales duplete del anillo cumarínico aparecen en posiciones prácticamente idénticas ($\Delta = 0.002 - 0.007$) y la señal del protón imino en posición muy similar ($\Delta = 0.05$). La única diferencia significativa consiste en la aparición de las señales del grupo metino y metilo propias de la alanina en lugar de aquella del metileno de la glicina del ligando base de Schiff coordinado al cinc(II). Esto permite concluir que el complejo en cuestión presenta el mismo modo de coordinación que su análogo con el ligando base de Schiff derivado de la glicina.



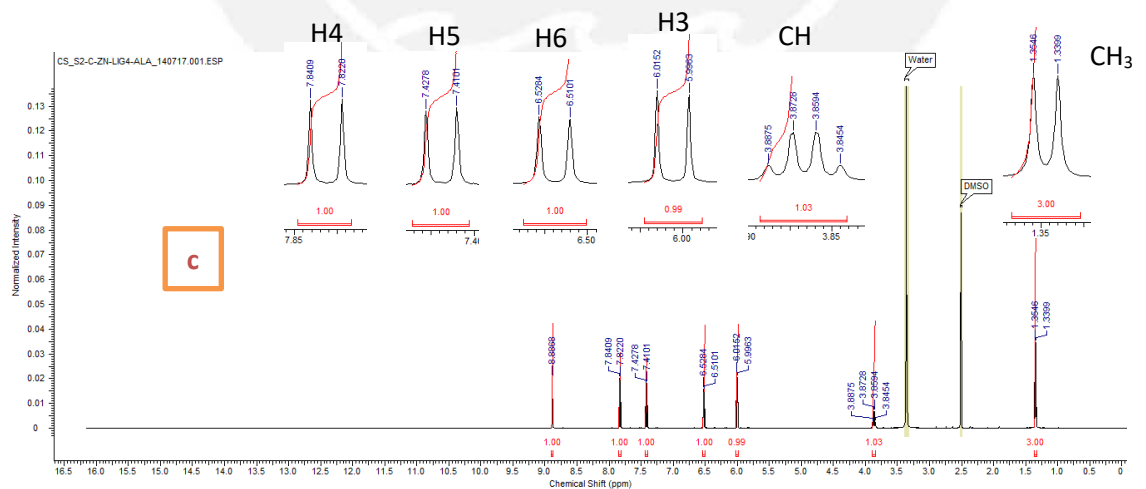
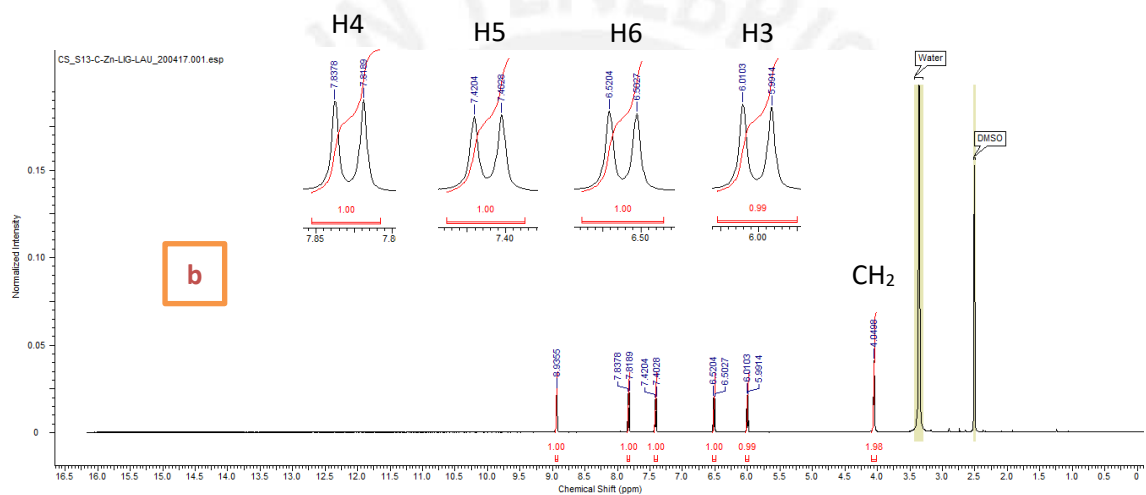
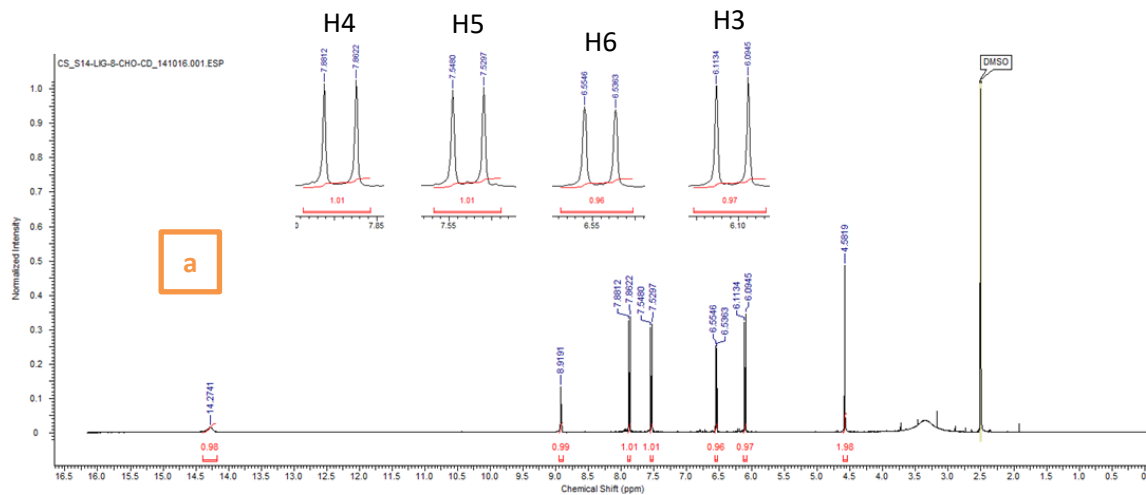


Figura 29. Espectros ^1H -RMN del ligando LIG-Gly (a), del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) (b) y del complejo Zn(LIG-Ala)(H₂O) (c)

8.2.3.3. Espectroscopía de Resonancia Paramagnética Electrónica

El espectro EPR obtenido para el complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetileno)glicinato]cobre(II) en estado sólido y en solución es mostrado en la **figura 30**. El obtenido en estado sólido (**figura 30.a**) indica una geometría axial y la ausencia de una transición prohibida $\Delta M = \pm 2$ (**figura 30.b**) es consistente con un compuesto mononuclear o un dinuclear donde los centros paramagnéticos se encuentren lo suficientemente alejados como para no permitir una interacción entre ellos. Al disolver el complejo en un solvente coordinante como el DMSO (**figura 30.c**) se observan las cuatro líneas hiperfinas (marcadas con asterisco) debido al acoplamiento del electrón desapareado del Cu^{2+} ($S=1/2$) con el espín nuclear del mismo ($I = 3/2$). Las constantes giromagnéticas g , mostradas en la **tabla 15**, siguen la tendencia $g_{//} (g_x = g_y) > g_{\perp} > g_e$ (2.002) característica de un estado basal ψ con una mayor contribución del orbital $d_{x^2-y^2}$ y, en consecuencia, el complejo puede presentar una geometría octaédrica elongada, pirámide de base cuadrada o cuadrado plana⁸⁶.

A pesar de que el complejo presenta un nitrógeno como átomo donador ($l=1$), no se aprecian las tres señales superhiperfinas ($m=2nI+1$) correspondientes al acoplamiento del electrón desapareado del Cu^{2+} con los átomos de nitrógeno. Sin embargo, estas señales no necesariamente son observables en solución^{87, 88}.

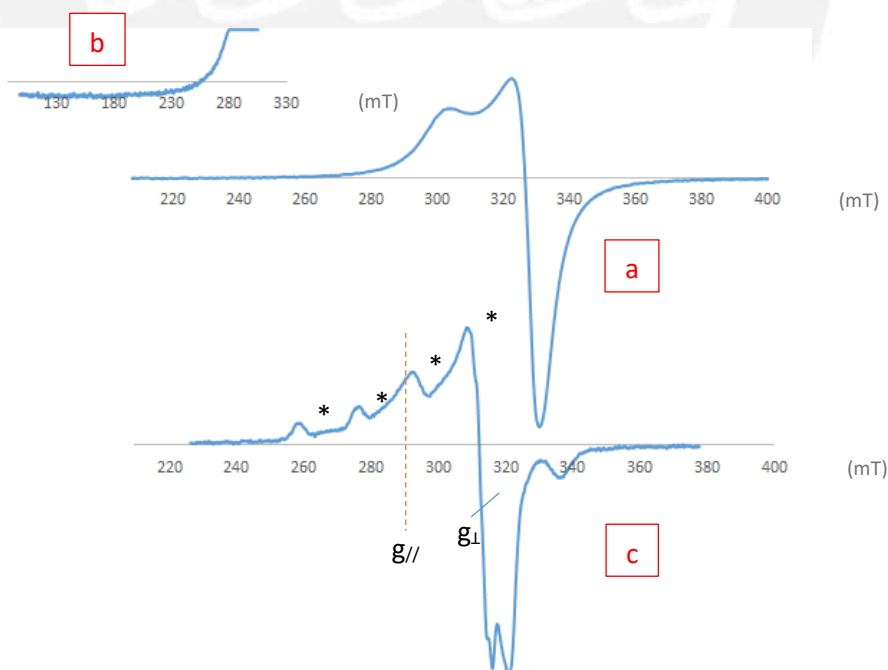


Figura 30. Espectro EPR del complejo $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ en estado sólido a 298°K (**a**), registrado a una baja intensidad de campo magnético con una alta ganancia para una mejor apreciación (**b**) y en solución de DMSO a 77°K (**c**).

Tabla 15: Parámetros EPR para el complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO a 77°K

	$g_{//}$	g_{\perp}	$A_{//}$	A_{\perp}	g_{iso}	A_{iso}
Sol. en DMSO a 77°K ⁽¹⁾	2.264	2.066	17.379mT (183.6x10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	0.1mT (1x10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	2.132	61.9x10 ⁻⁴ cm ⁻¹

(1) Los parámetros fueron colectados mediante simulación anisotrópica con el programa WINEPR – Bruker.

El espectro EPR obtenido para el complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilén)-alainato]cobre(II) en estado sólido y en solución es mostrado en la **figura 31**.

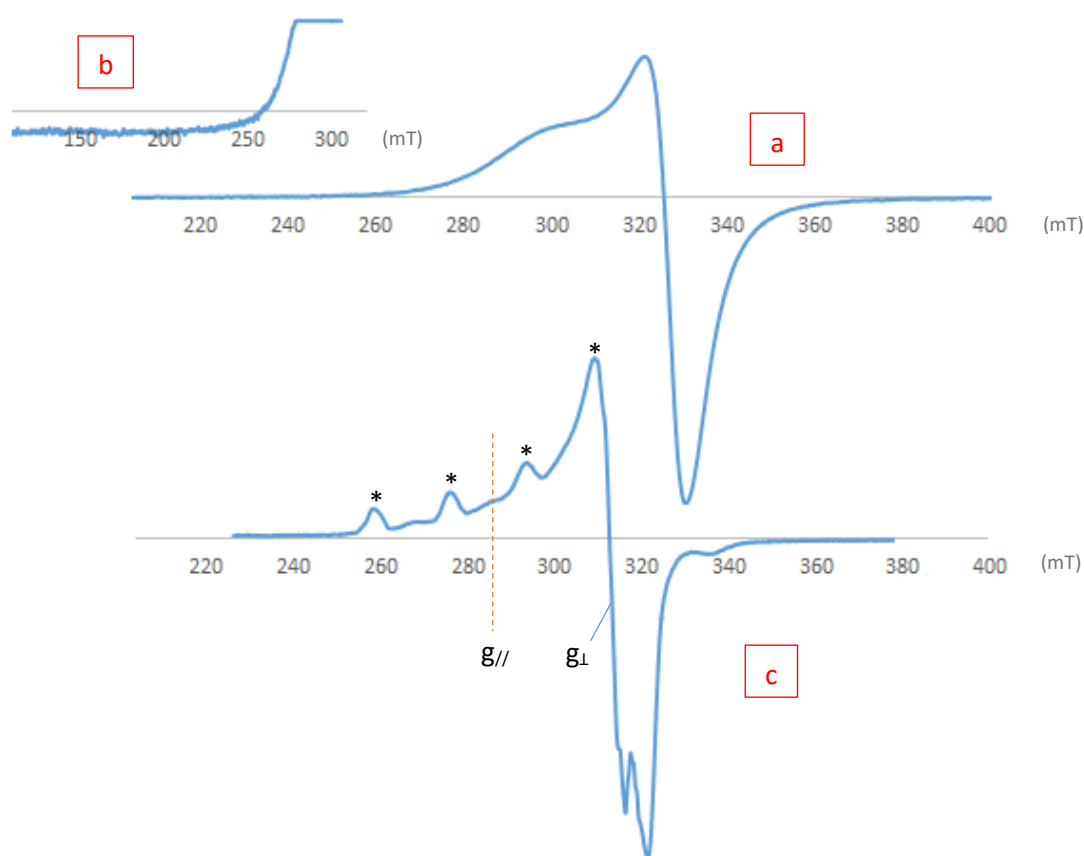


Figura 31. Espectro EPR del complejo Cu(LIG-Ala)(H₂O) en estado sólido a 298°K **(a)**, registrado a una baja intensidad de campo magnético con una alta ganancia para una mejor apreciación **(b)** y en solución de DMSO a 77°K **(c)**.

Tabla 16: Parámetros EPR para el complejo Cu(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO a 77°K

	$g_{//}$	g_{\perp}	$A_{//}$	A_{\perp}	g_{iso}	A_{iso}
Sol. en DMSO a 77°K ⁽¹⁾	2.266	2.064	17.379mT (183.7x10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	0.0001mT (0.0001x10 ⁻⁴ cm ⁻¹)	2.131	61.2x10 ⁻⁴ cm ⁻¹

(1) Los parámetros fueron colectados mediante simulación anisotrópica con el programa WINEPR – Bruker.

A semejanza del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O), el compuesto Cu(LIG-Ala)(H₂O) presenta un espectro EPR de anisotropía axial tanto en estado sólido como en solución. En solución, se observan las cuatro líneas hiperfinas (marcadas con asterisco) con valores de constante giromagnética *g*, mostradas en la **tabla 16**, que siguen la misma tendencia observada en el complejo de Cu-LIG-Gly. Por tanto, se concluye que el cobre(II) presenta el mismo entorno en ambos complejos, el cual es consistente con las tres posibles geometrías antes mencionadas.

8.2.3.4. Espectroscopía Ultravioleta – Visible

Se midieron los espectros UV-Vis en DMSO del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina (LIG-Gly), y sus respectivos complejos de Zn(II) y Cu(II) para analizar el efecto de la complejación sobre las bandas de absorción. Con el objetivo de determinar el coeficiente de absorptividad molar de las diferentes bandas presentes en cada uno de estos espectros, fue necesario realizar una serie de mediciones a diferentes concentraciones en un rango apropiado. En *anexo 10.3* se muestran los espectros UV-Vis medidos a diferentes concentraciones del ligando y sus respectivos complejos, mientras que en el *anexo 10.4* se muestra un ejemplo de cálculo del valor de absorptividad molar (ϵ) para el complejo acuá[N-(7-óxido-8-cumarinilmetileno)glicinato]cobre(II).

Los espectros ultravioleta-visible del ligando LIG-Gly y sus complejos de cobre y cinc se muestran, de modo comparativo, en la **figura 32**. En la **tabla 17** se presentan las longitudes de onda de los máximos de absorción en cada uno de ellos con sus respectivos valores de absorptividad molar.

Tabla 17. Máximos de absorbancia y coeficientes de absorptividad molar del ligando LIG-Gly, sus respectivos complejos de cobre y cinc, y los complejos de cobre y cinc con el ligando LIG-Ala

Compuesto	λ (ϵ , L mol ⁻¹ cm ⁻¹)				
LIG-Gly	291 nm (11443)	349 nm (12805)	364 nm (10674)	421 nm (3899)	-
Zn-LIG-Gly	272 nm (16775)	355 nm (32984)	369 nm (32590)	-	-
Cu-LIG-Gly	267 nm (24688)	351 nm (33248)	369 nm (28939)	-	682 nm (114)
Zn-LIG-Ala	272 nm (10000)	355 nm (18914)	369 nm (18553)	-	-
Cu-LIG-Ala	266 nm (12594)	351 nm (16653)	369 nm (14357)	-	678 nm (106)

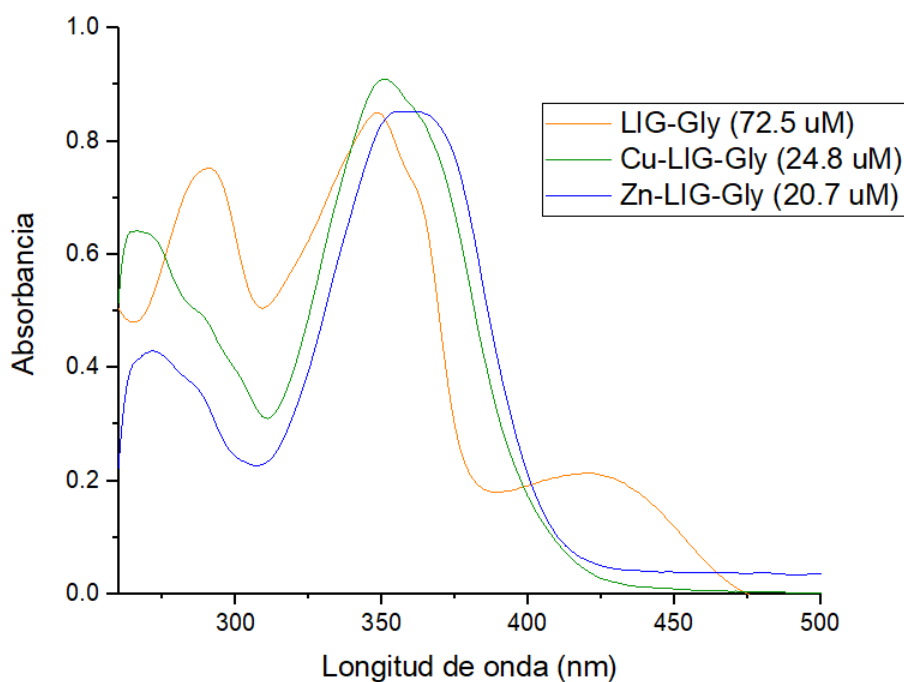


Fig 32: Espectros UV-Vis del N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetil)glicina y sus respectivos complejos de cinc y cobre

En el caso del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetil)glicina se observan tres bandas de absorción a 291, 349 y 364 nm en DMSO, las cuales de acuerdo a sus altos valores de absorptividad molar, pueden ser relacionadas a transiciones $\pi - \pi^*$ de la cumarina⁸⁹. Se observa, además, una cuarta banda de absorción a 421 nm cuyo valor relativamente alto de coeficiente de absorptividad molar permite asignarla a una transición $\pi - \pi^*$ que involucra al grupo imino y al anillo cumarínico por un efecto de resonancia^{90, 91}.

Al formarse el complejo de coordinación, tanto con cinc(II) como con cobre(II), se observan desplazamientos en las bandas asociadas a las transiciones $\pi - \pi^*$ de la cumarina respecto a aquellas presentes en el ligando, lo cual indica un cambio en los niveles relativos de energía de los orbitales moleculares π y π^* como consecuencia de la complejación al metal. Asimismo, se aprecia un aumento considerable de la absorptividad molar de las bandas de absorción ubicadas entre 345 y 375 nm que podría deberse a un solapamiento de las transiciones $\pi - \pi^*$ intramoleculares del ligando con fuertes bandas de transferencia de carga del ligando hacia el metal.

Asimismo, la banda a 421 nm en el ligando, que fue asignada a una transición $\pi - \pi^*$ que involucra al grupo imino y al anillo cumarínico, no es observable en sus correspondientes complejos. Esto se podría atribuir al aumento de energía en la

transición $\pi - \pi^*$ por estabilización del OM enlazante del grupo imino como consecuencia de su coordinación al metal, lo que causaría un desplazamiento hipsocrómico de dicha banda, la que ahora se encontraría encubierta por las absorciones que aparecen alrededor 355 y 369 nm en los complejos.

En lo que respecta a los complejos de cobre(II) y cinc(II) con el ligando tipo base de Schiff análogo, que resulta de la condensación de 8-formil-7-hidroxicumarina con alanina en lugar de glicina, la **figura 33** muestra una comparación de los espectros UV-Vis de dichos complejos con aquellos del ligando LIG-Gly.

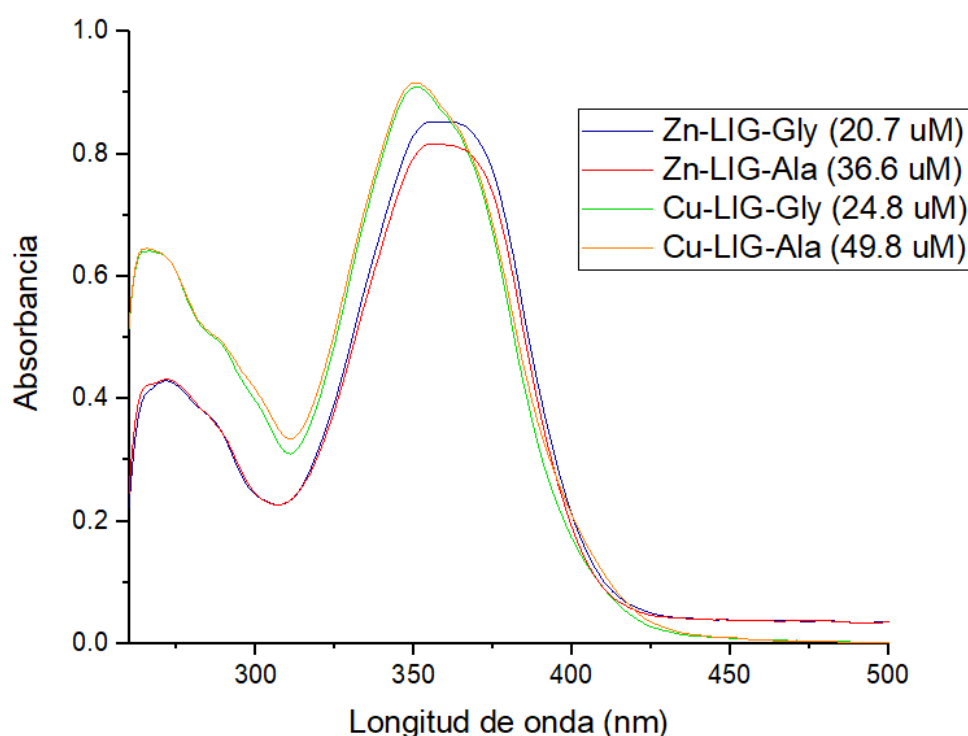


Figura 33. Espectros UV-Vis de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos tipo base de Schiff LIG-Gly y LIG-Ala

Se puede apreciar la gran similitud tanto en el patrón como posición de las bandas de absorción de los complejos $\text{Zn}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O})$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O})$ con aquellos $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$, lo que sugiere que podrían mostrar una estructura similar en solución de DMSO.

Una característica particular de los complejos de cobre(II), es la presencia de una banda de absorción en la región del rojo del espectro visible, entre 675 y 685 nm, la que les confiere una tonalidad verdosa. Esta banda posee un coeficiente de absorptividad molar muy bajo, lo que es propio para una transición $d - d$ del centro metálico prohibida por la regla de Laporte.

8.2.3.5. Fluorescencia

Los complejos $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-óxido-8-cumarinilmetileno)glicinato}]\text{cinc(II)}$ y $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-óxido-8-cumarinilmetileno)glicinato}]\text{cobre(II)}$ fueron preparados *in situ* para la medición de sus espectros de emisión fluorescente mezclando soluciones del ligando y el metal en DMF, en una relación molar 1:1 y a temperatura ambiente. A partir de la información obtenida de los espectros de absorción UV-Vis de los complejos de cinc y cobre se seleccionó una longitud de onda de excitación de 369 nm, la cual condujo a un máximo de emisión para el complejo de cinc(II).

En el espectro mostrado en la **figura 34** se aprecia que la complejación al cinc(II) aumenta considerablemente la intensidad de la emisión fluorescente respecto a aquella del ligando libre (aproximadamente 6 veces), mientras que, por el contrario, la unión al cobre(II) la inhibe drásticamente.

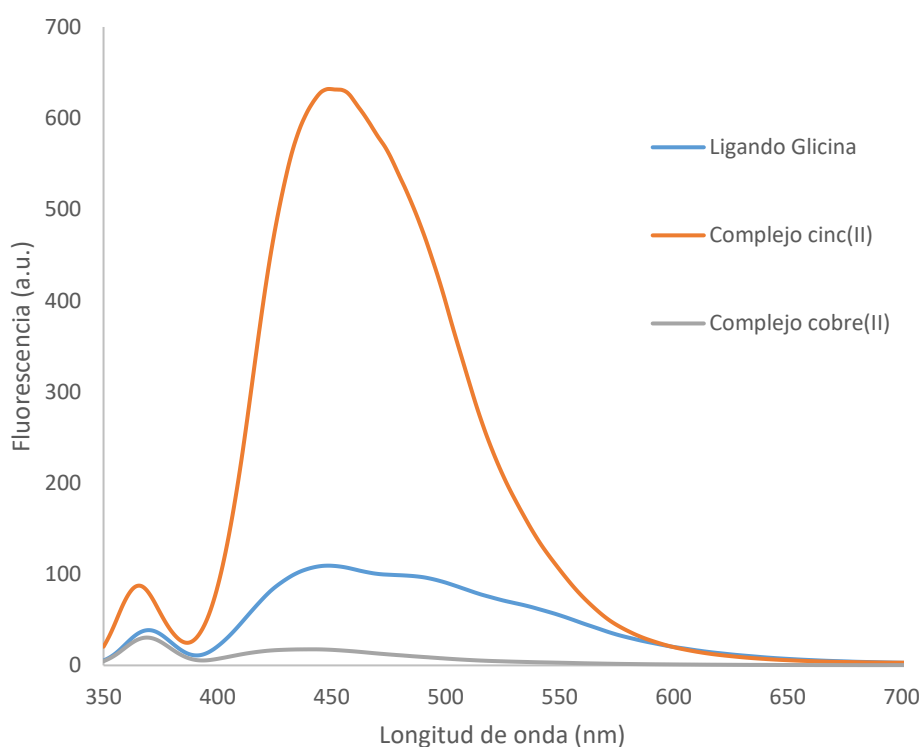


Figura 34. Comparación de los espectros de emisión del ligando LIG-Gly y sus respectivos complejos de cobre(II) y cinc(II) medidos a una concentración de 10 μM en DMF y a temperatura ambiente.

El aumento en la intensidad de la fluorescencia del complejo de cinc(II) puede ser explicado por la inhibición del mecanismo PET (Photoinduced Electron Transfer) presente en el ligando y la consiguiente generación del mecanismo CHEF (Chelation-enhanced fluorescence) al formarse el complejo de cinc⁹².

Cuando el fluoróforo cumarínico es excitado, los electrones del par libre del nitrógeno imino se encuentran en un orbital ubicado entre el HOMO y el LUMO del fluoróforo. De esta manera, en lugar de que los electrones excitados regresen al estado fundamental emitiendo radiación fluorescente, un electrón del nitrógeno ingresa al HOMO semilleno y genera una drástica disminución de la fluorescencia de la cumarina. Este proceso de desactivación no radiante es conocido como mecanismo PET (**figura 35.b**) y está asociado a la presencia del par libre del nitrógeno imino en la base de Schiff derivada del fluoróforo cumarínico. Al coordinar dicho par libre al Zn²⁺, el orbital del par libre del nitrógeno se estabiliza por efecto de la coordinación al metal y, de esta manera, la fluorescencia es restablecida por inhibición del mecanismo PET. Este proceso de aumento de fluorescencia del complejo de cinc(II) respecto al ligando libre es conocido como mecanismo CHEF (**figura 35.c**)⁹³.

Por otro lado, la complejación de un ion paramagnético, en este caso el Cu²⁺, a un fluoróforo suprime la emisión fluorescente. La presencia del electrón no apareado en un orbital *d* del ion metálico genera un rápido decaimiento no radiante por transferencia electrónica (eT) o transferencia de energía (ET). Este último mecanismo, mostrado en la **figura 35.a**, tiene lugar cuando el fluoróforo excitado transfiere el electrón que ha sido promovido al LUMO hacia el orbital *d* semilleno del metal y este, a su vez, transfiere uno de los electrones de su nivel completo a menor energía hacia el HOMO del fluoróforo. Por último, ocurre una estabilización del metal excitado. Este proceso de transferencia de energía es uno de los mecanismos responsables de la ausencia de emisión fluorescente por metales de transición con orbitales *d* parcialmente llenos^{92, 94}.

El desplazamiento de Stokes obtenido para el complejo de cinc(II) fue de 80nm (**figura 36**); este valor, aunque moderado, resulta suficiente para que no exista un solapamiento significativo entre la banda de excitación y emisión. De esta manera, es posible utilizar el método de Job para determinar la estequiometría del complejo de cinc(II) en solución.

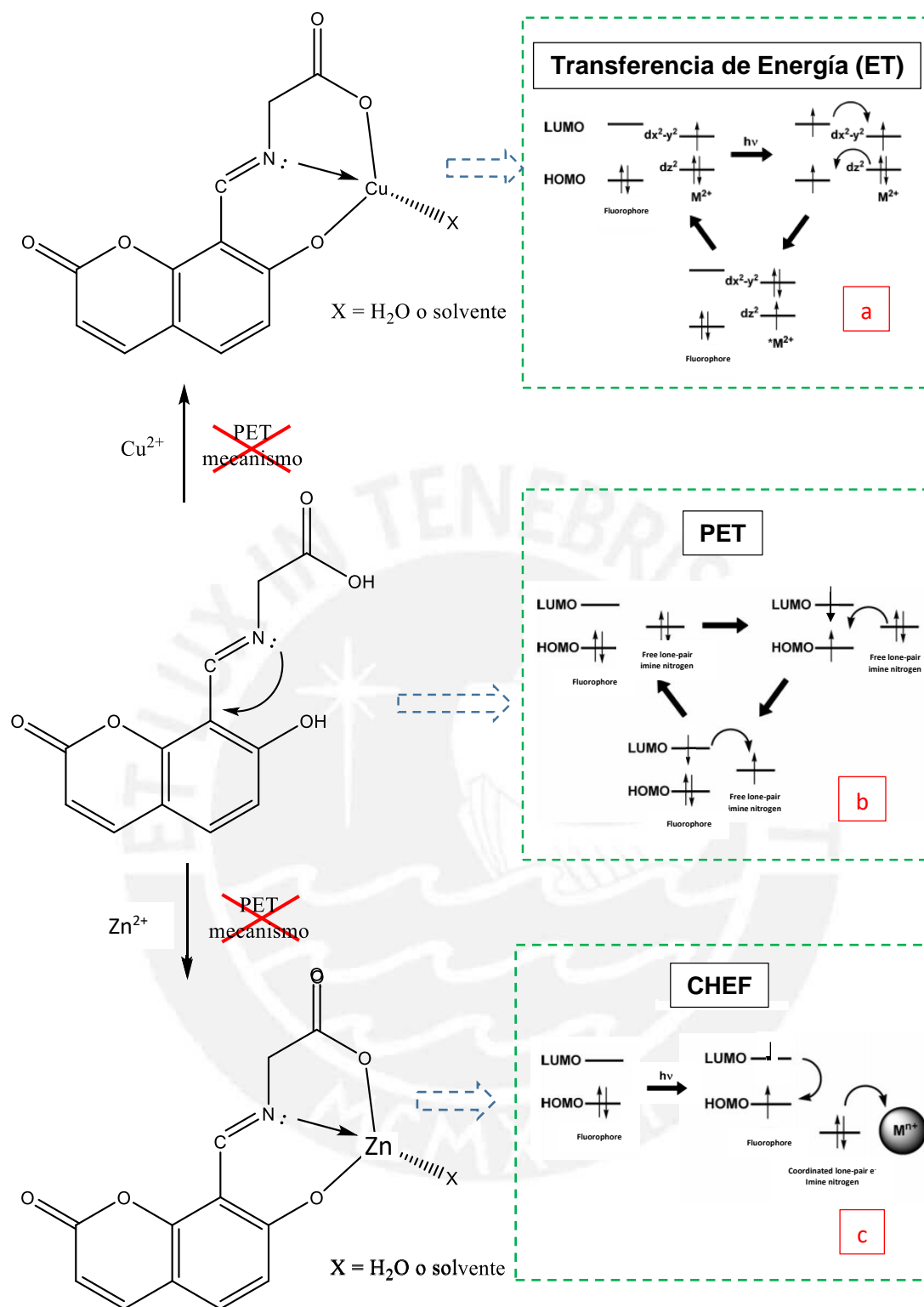


Figura 35. Mecanismos de los procesos CHEF, PET y eT que tienen lugar en el complejo de Zn(LIG-Gly)(H₂O), en el ligando libre LIG-Gly y en el complejo de Cu(LI-Gly)(H₂O) respectivamente. (Adaptado de ref. 92)

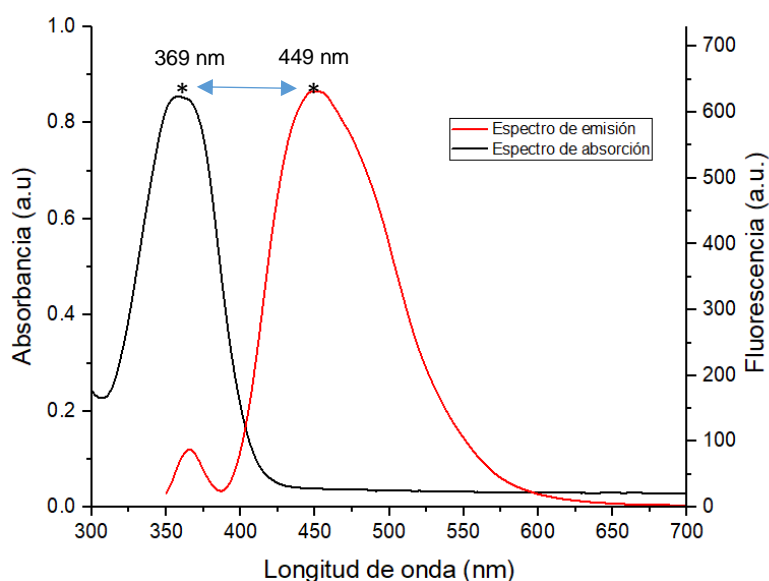


Figura 36. Desplazamiento de Stokes del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O)

El método de Job se basa en la medición de fluorescencia de una serie de soluciones donde la relación molar de los dos reactantes (ligando y metal) varían, pero la suma de sus concentraciones molares permanece constante⁹⁵. Este método, conocido también como método de variación continua, permite hallar la estequiometría de un complejo obtenido *in situ* en solución. La **tabla 18** muestra los datos empleados para la construcción de la gráfica de Job a una longitud de onda de emisión de 449 nm.

Tabla 18. Determinación de la composición estequiométrica del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O). La mezcla final fue diluida con DMF en una celda de 3 mL de capacidad.

Relación*	Alícuota de solución stock	Concentración al diluir en la celda de 3mL	Int. Fluores. λ_{449}
0	600 uL LIG-Gly	20uM LIG-Gly	197.2466
0.1	540 uL LIG-Gly + 60 uL Zn ²⁺	18 uM LIG-Gly + 2 uM Zn ²⁺	254.7227
0.2	480 uL LIG-Gly + 120 uL Zn ²⁺	16 uM LIG-Gly + 4 uM Zn ²⁺	330.6635
0.3	420 uL LIG-Gly + 180 uL Zn ²⁺	14 uM LIG-Gly + 6 uM Zn ²⁺	400.2909
0.4	360 uL LIG-Gly + 240 uL Zn ²⁺	12 uM LIG-Gly + 8 uM Zn ²⁺	449.0741
0.5	300 uL LIG-Gly + 300 uL Zn ²⁺	10 uM LIG-Gly + 10 uM Zn ²⁺	443.9968
0.6	240 uL LIG-Gly + 360 uL Zn ²⁺	8 uM LIG-Gly + 12 uM Zn ²⁺	393.0223
0.7	180 uL LIG-Gly + 420 uL Zn ²⁺	6 uM LIG-Gly + 12 uM Zn ²⁺	324.8388
0.8	120 uL LIG-Gly + 480 uL Zn ²⁺	4 uM LIG-Gly + 16 uM Zn ²⁺	234.5304
0.9	60 uL LIG-Gly + 540 uL Zn ²⁺	2 uM LIG-Gly + 18 uM Zn ²⁺	132.7973
1	600 uL Zn ²⁺	20uM Zn ²⁺	2.6825

*Relación = $[Zn^{2+}] / ([LIG-Gly] + [Zn^{2+}])$

La gráfica obtenida a partir de los datos obtenidos en la **tabla 18** es mostrada en la **figura 37**. Manteniendo una concentración total de 20 uM y cambiando la relación metal/(ligando+metal) de 0 a 0,9, se observa que el máximo de fluorescencia es obtenido a una relación molar igual a 0.47 muy cercana al valor teórico 0.5 esperado para un complejo con una estequiometría 1:1 ligando/metal.

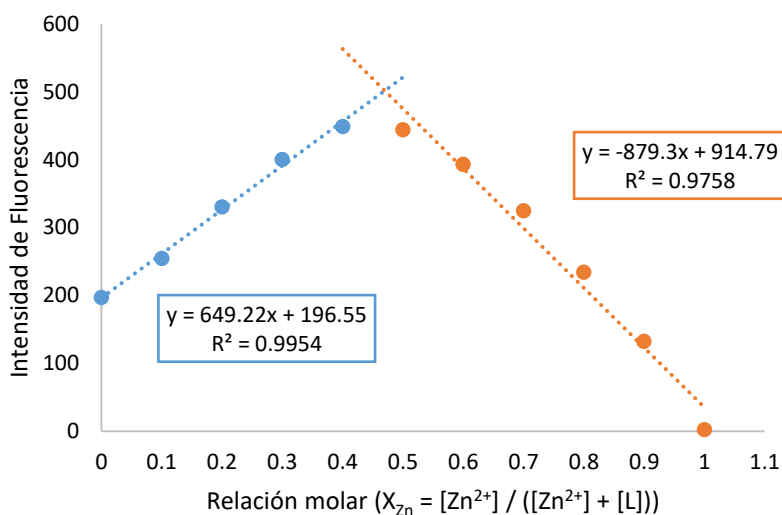


Figura 37. Gráfica de Job del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O), donde la intensidad de fluorescencia se gráfica en función de la relación molar [metal] / ([ligando]+[metal]) manteniendo una concentración total de 20uM en DMF.

8.2.3.6. Análisis Termogravimétrico

El análisis por termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido (TG/DSC) se realizó solamente para el complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilén)glicinato]cinc(II) debido a que el equipo utilizado del Laboratorio de Materiales de la Sección de Ingeniería Mecánica presentó fallas técnicas no resueltas hasta la fecha de presentación de esta tesis. La medición se llevó a cabo en el rango de 25 a 750°C en atmósfera de aire a una velocidad de 10K/min utilizando crisol de alúmina. En la **figura 38** se presenta el termograma del complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O).

En el termograma mostrado se observa una primera pérdida de masa de 2.90% que se encuentra asociada a un pico endotérmico en el DSC a 73.1°C; dicha temperatura indica eliminación de agua de cristalización. Un segundo pico endotérmico que aparece a 263.8°C se asocia a una pérdida de peso de 5.22%, valor cercano al que correspondería la liberación de una molécula de agua de coordinación en el complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O) considerando una relación 1:1 ligando/metal (5.48%).

La última etapa de la descomposición térmica del complejo que corresponde a la combustión del ligando se da entre aproximadamente 300 y 480°C y se halla vinculada a una intensa señal exotérmica en la curva de calorimetría diferencial de barrido. El porcentaje de pérdida asociado es de 66.26%, valor inferior al teóricamente calculado (74.62%). Sin embargo, la masa residual observada de 25.68% que corresponde al ZnO resulta muy cercana al valor teórico esperado (24.77%).

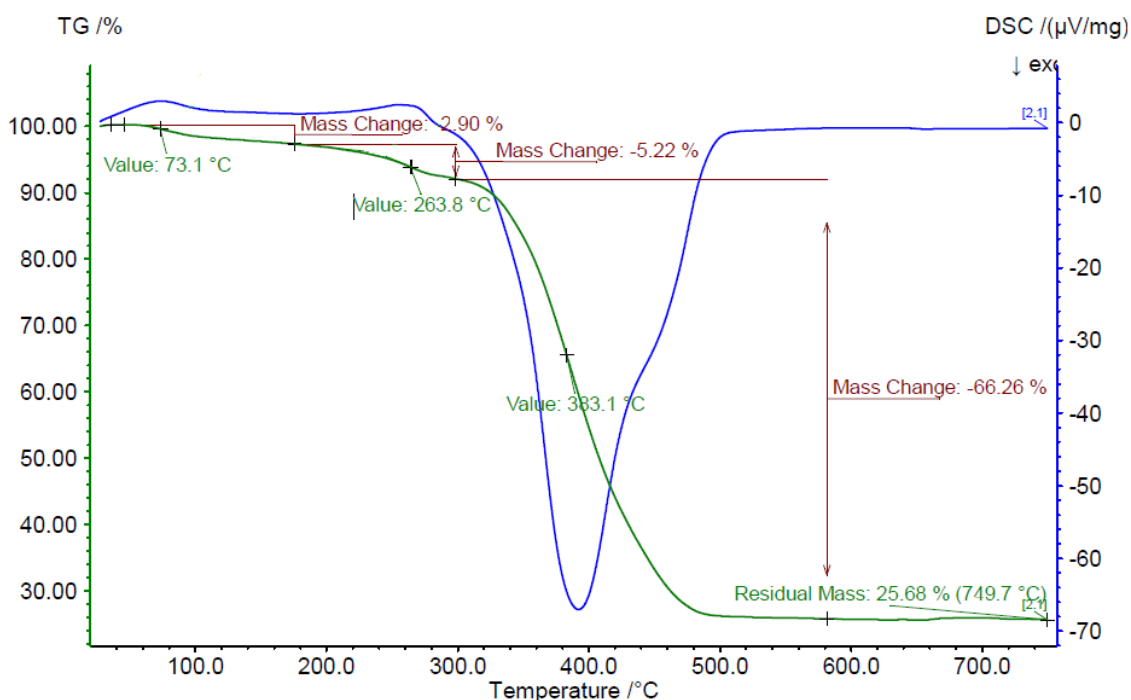


Figura 38. TG/DSC del complejo $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-}\acute{\text{o}}\text{xido-8-cumarinilmetileno)glicinato}]\text{cinc(II)}$

8.2.3.7. Absorción Atómica y Análisis Elemental

Para la determinación del porcentaje de cinc(II) y cobre(II) se utilizó la espectroscopía de absorción atómica, mientras que el análisis elemental permitió hallar el contenido de carbono, nitrógeno e hidrógeno en los complejos sintetizados. En la **tabla 19** se presentan los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno así como el contenido de metal obtenidos por la técnica de análisis elemental y absorción atómica respectivamente. En el *anexo 10.5* y *10.6* se muestran los valores obtenidos por triplicado o duplicado de las técnicas empleadas en este acápite.

Al observar los porcentajes determinados por análisis elemental reportados en la **tabla 19**, tomando en cuenta los dos valores más cercanos, se aprecia que la mejor concordancia entre los valores experimentales y los calculados teóricamente para una composición ligando/metal/agua 1:1:1 se da en todos los casos para el contenido de nitrógeno. El porcentaje de carbono concuerda bien con el teórico en caso de los complejos $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$, mientras que en caso del $\text{Zn}(\text{LIG-}$

Ala)(H₂O) y Cu(LIG-Ala)(H₂O), se observa una considerable desviación. Asimismo, los porcentajes de hidrógeno con excepción del Zn(LIG-Ala)(H₂O) y Cu(LIG-Ala)(H₂O) tienden a ser notoriamente más altos que lo calculado para dicha composición. En lo que respecta al contenido de metal determinado por AAS, se encuentra esta misma tendencia.

Tabla 19. Contenido de C, H y N y de metal para una composición M(LIG)(H₂O)

Compuesto	Fórmula Molecular	%C teórico %C exp.	%N teórico %N exp.	%H teórico %H exp.	%Metal teórico %Metal exp.
Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)	C ₁₂ O ₆ NH ₉ Zn 328.585 g/mol	43.86%	4.26%	2.76%	19.90%
		43.54%	4.51%	1.84%	18.71%
		Δ = 0.32	Δ = 0.25	Δ = 0.92	Δ = 1.19
Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	C ₁₂ O ₆ NH ₉ Cu 326.751 g/mol	44.11%	4.29%	2.78%	19.45%
		44.08%	4.56%	2.01%	18.28%
		Δ = 0.03	Δ = 0.27	Δ = 0.77	Δ = 1.17
Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	C ₁₃ O ₆ NH ₁₁ Zn 342.612 g/mol	45.57%	4.09%	3.24%	19.08%
		42.12%	4.14%	2.85%	18.04%
		Δ = 3.45	Δ = 0.05	Δ = 0.39	Δ = 1.04
Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	C ₁₃ O ₆ NH ₁₁ Cu 340.778 g/mol	45.81%	4.11%	3.25%	18.64%
		43.97%	4.10%	3.07%	17.60%
		Δ = 1.84	Δ = 0.01	Δ = 0.18	Δ = 1.04

Por otro lado, teniendo en cuenta el análisis termogravimétrico realizado para el complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O), el cual muestra la presencia de agua de cristalización, se han recalculado los valores teóricos considerando esta posibilidad en todos los complejos (**tabla 20**). En caso del complejo antes mencionado, el porcentaje de pérdida de masa de agua de cristalización en el respectivo termograma indicaría un contenido de agua de cristalización que corresponde a aproximadamente la mitad del agua de coordinación, de donde resulta la composición C₁₂O₆NH₉Zn.0.5H₂O.

Tabla 20. Contenido de C, H y N y de metal para una composición M(LIG)(H₂O).XH₂O

Compuesto	Fórmula Molecular	%C teórico %C exp.	%N teórico %N exp.	%H teórico %H exp.	%Metal teórico %Metal exp.
Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)	C ₁₂ O ₆ NH ₉ Zn.0.5H ₂ O 337.593 g/mol	42.69%	4.15%	2.99%	19.37%
		43.54%	4.51%	1.84%	18.71%
		Δ = 0.85	Δ = 0.36	Δ = 1.15	Δ = 0.66
Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	C ₁₂ O ₆ NH ₉ Cu.0.5H ₂ O 335.760 g/mol	42.93%	4.17%	3.00%	18.93%
		44.08%	4.56%	2.01%	18.28%
		Δ = 1.15	Δ = 0.39	Δ = 0.99	Δ = 0.65
Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	C ₁₃ O ₆ NH ₁₁ Zn.1.5H ₂ O 369.634 g/mol	42.24%	3.79%	3.82%	17.69%
		42.12%	4.14%	2.85%	18.04%
		Δ = 0.12	Δ = 0.35	Δ = 0.97	Δ = 0.35
Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	C ₁₃ O ₆ NH ₁₁ Cu.0.5H ₂ O 349.786 g/mol	44.64%	4.00%	3.46%	18.17%
		43.97%	4.10%	3.07%	17.60%
		Δ = 0.67	Δ = 0.10	Δ = 0.39	Δ = 0.57

En la **tabla 20**, al incluir agua de cristalización, se observa una disminución en los valores recalculados del porcentaje de metal que lo aproximan al experimental. Asimismo, la disminución en el %C en el caso de los complejos Zn(LIG-Ala)(H₂O) y Cu(LIG-Ala)(H₂O) también resulta favorable, mientras que como era de esperar los %H se incrementan. Finalmente, se observa que los %N, aunque se incrementan, no sufren una mayor variación.

8.2.3.8. Conductimetría

La aplicación de esta técnica electroanalítica proporciona información importante sobre la naturaleza iónica o neutra de los complejos de coordinación en solución. En la **tabla 21** se reportan los resultados obtenidos para los complejos de cobre(II) y cinc(II) sintetizados a una concentración 1 mM en DMSO.

Tabla 21. Conductividad de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con los ligandos
LIG-Gly y LIG-Ala

Compuesto	Conductividad ($\mu\text{S cm}^{-1}$)
H ₂ O desionizada	3.80
DMSO	0.40
Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)	1.00
Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	0.40
Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	0.80
Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	0.70

Como se observa en la **tabla 21**, las medidas conductimétricas de los cuatro complejos en solución en DMSO no indican un cambio significativo de conductividad respecto al solvente puro; por lo tanto, se puede concluir que los compuestos son neutros. Estos datos son congruentes con la fórmula asignada a partir de las técnicas analíticas descritas anteriormente.

8.2.3.9. Estudios Electroquímicos

Los estudios de voltamperometría cíclica fueron realizados con el propósito de encontrar el potencial redox de los complejos de cobre(II) sintetizados. Estos valores pueden ser relacionados con una posible actividad antitumoral de los complejos sintetizados mediante un mecanismo de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

8.2.3.9.1. Voltamperometría cíclica de Zn(LIG-Gly)(H₂O) y Cu(LIG-Gly)(H₂O)

La **figura 39.a** muestra la respuesta voltamperométrica del compuesto Zn(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO utilizando TBABF₄ como electrolito soporte. En la gráfica se aprecia que solo existe un proceso de reducción (pico catódico **I_c**) con un $E_{pc(I)} = -2.3413$ V vs Fc-Fc⁺, el cual se puede asociar al ligando ya que es la especie electroactiva en el complejo de cinc(II). Al realizar el mismo estudio en dirección anódica (**figura 39.b**) se obtienen las mismas señales; por lo tanto, la ausencia de un pico de redisolución de cinc metálico Zn → Zn(II) + 2e⁻ sugiere que los procesos redox están asociados al ligante.

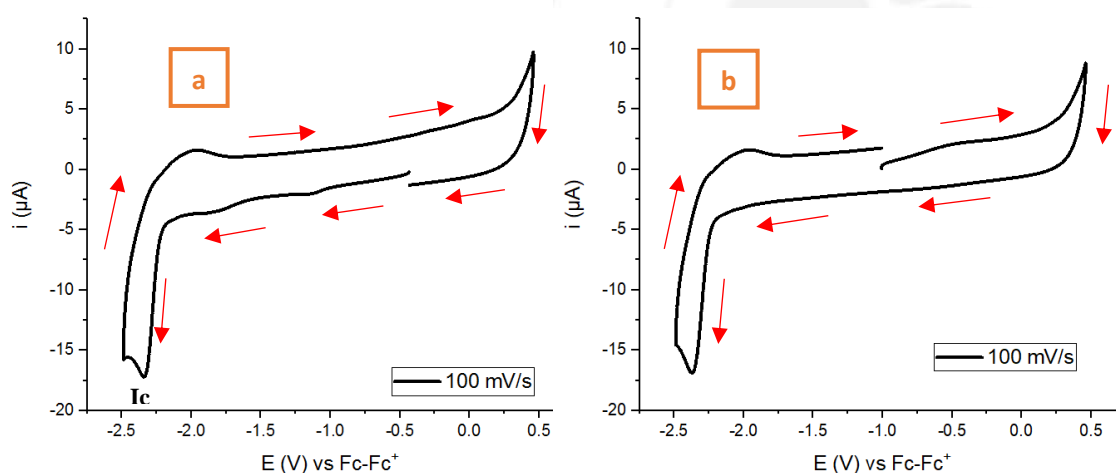


Figura 39. Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Zn(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF₄. El barrido de potencial se inició desde potencial de circuito abierto (E_{ocp}) en sentido catódico (**a**) y en sentido anódico (**b**). Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

El mecanismo propuesto para el proceso de reducción relacionado al ligando cumarínico es mostrado en la **figura 40**. Como se observa en la figura, la adición de un electrón conduce a la formación de un radical anión **2**, el cual sufre una posterior protonación por moléculas de agua que se encuentran como impurezas en el solvente DMSO y se llega a formar el radical **3**. Luego, este radical sufre un autoacoplamiento para dar el hidrodímero **4**, cuya formación ha sido confirmada mediante la

determinación de su estructura cristalina por Pasciak y colaboradores⁹⁶. Sin embargo, se debe señalar que en solución existe la posibilidad que el compuesto **5** también pueda formarse.

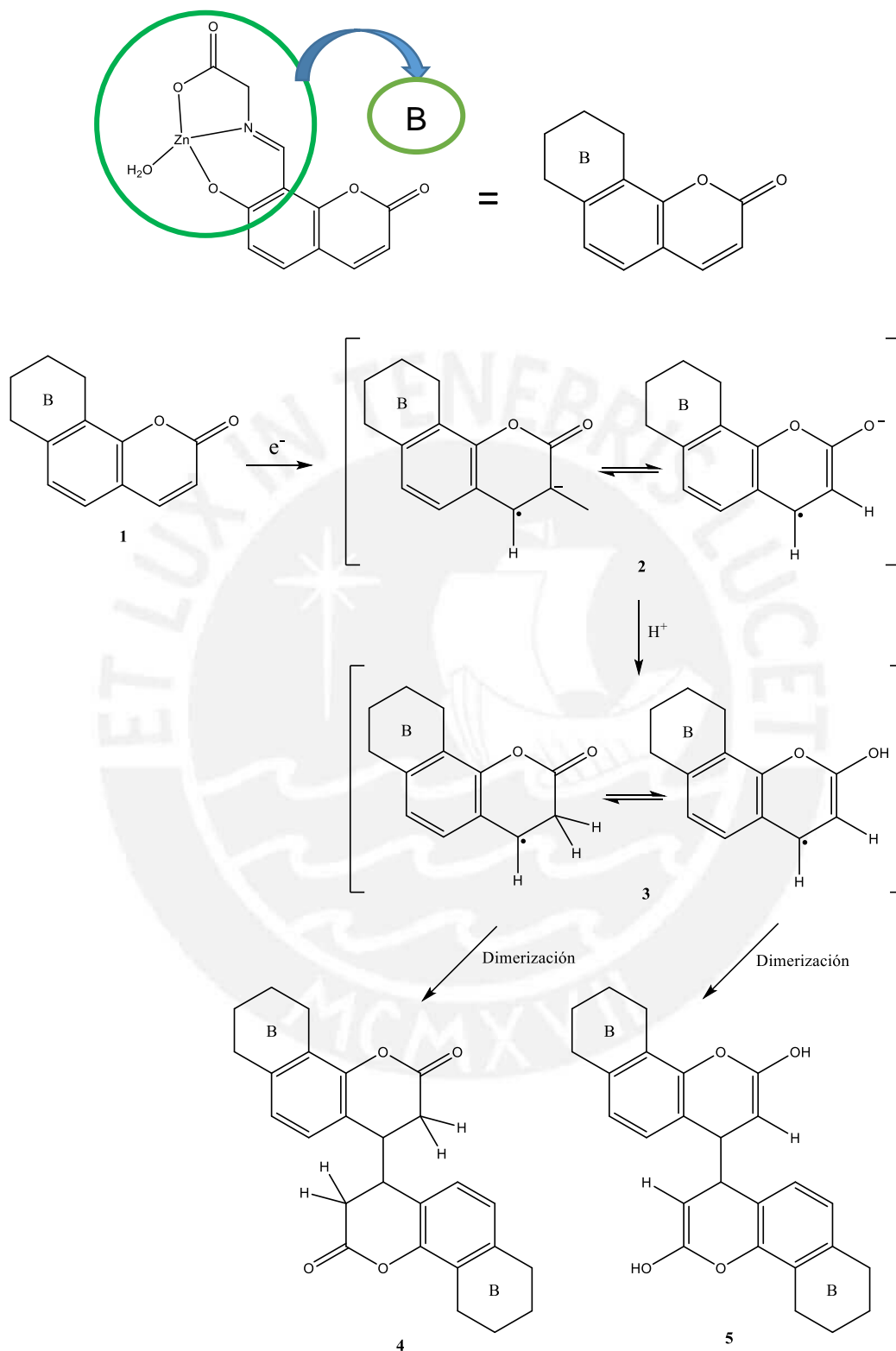


Figura 40. Mecanismo propuesto para la reducción electroquímica del compuesto Zn(LIG-Gly)(H₂O). La estructura cíclica B representa la parte de complejación que no está involucrada en el proceso redox. (Adaptado de ref. 96).

La respuesta voltamperométrica del complejo de cinc(II), metal que en este estudio ha mostrado un comportamiento redox inerte, será utilizado como referente del comportamiento del ligando libre y ayudará a esclarecer los procesos redox relacionados únicamente al metal en los correspondientes complejos de cobre.

El voltamperograma del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) mostrado en la **figura 41.a**, presenta un proceso de reducción **Ic** con un valor de $E_{pc}(I) = -1.2258$ V vs Fc-Fc⁺ y cuatro señales de oxidación **Ia**, **IIa**, **IIIa** y **IVa** con valores de $E_{pa}(I) = -1.1143$ V vs Fc-Fc⁺, $E_{pa}(II) = -1.5446$ V vs Fc-Fc⁺, $E_{pa}(III) = -0.6928$ V vs Fc-Fc⁺ y $E_{pa}(IV) = -0.2994$ V vs Fc-Fc⁺. Realizando una comparación entre el voltamperograma cíclico en sentido catódico (**figura 3.a**) y anódico (**figura 3.b**) se observa que el pico anódico **IVa** no se encuentra presente en ambas gráficas; por lo tanto, se podría inferir que este pico probablemente sea originado por la oxidación de un producto secundario formado en el proceso de reducción.

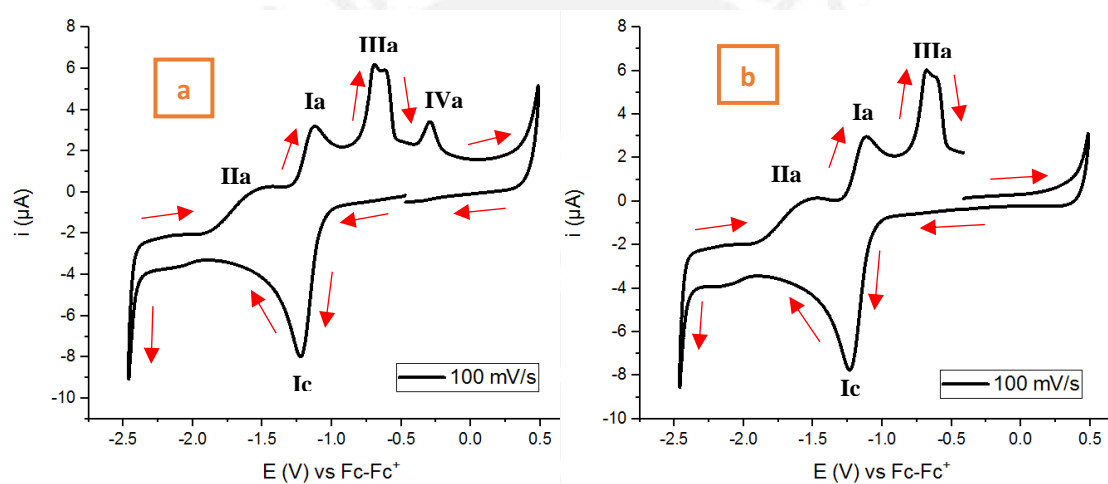
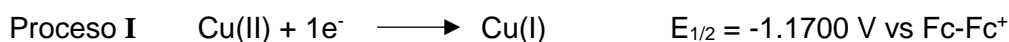


Figura 41. Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF₄. El barrido de potencial se inició desde E_{ocp} en sentido catódico (**a**) y en sentido anódico (**b**). Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Con la finalidad de profundizar sobre la dependencia del metal de los procesos redox en este complejo, se obtuvieron diferentes voltamperogramas con inversiones de potenciales E_{λ} en sentido catódico, los cuales son mostrados en la **figura 42**. En dicha figura se observa la dependencia del proceso **Ic** con el **Ia**, los que se encuentran asociados a la reducción del Cu(II) y oxidación del Cu(I) respectivamente. El comportamiento redox de este metal constituye justamente el objetivo de este estudio electroquímico.



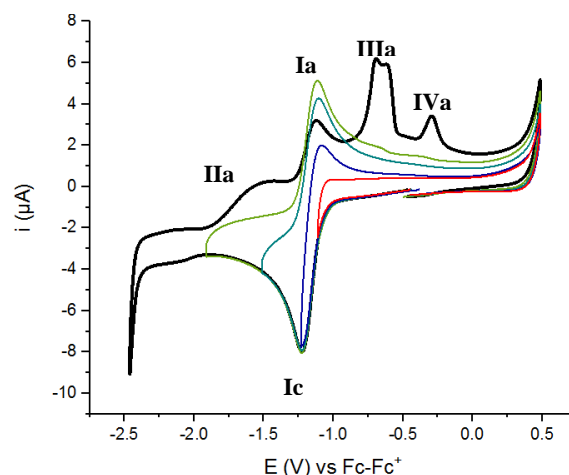


Figura 42. Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de $\text{Cu(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$ en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF_4 utilizando inversión de E_{λ} en sentido catódico a una velocidad de barrido de 100mV/s. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Este estudio de inversión permite apreciar también que los procesos **IIa** y **IIIa** y **IVa** no se encuentran asociados al pico catódico **Ic** asociado a la reducción del cobre(II). En cambio, estos procesos podrían estar asociados más bien a una redisolución del $[\text{Cu-LIG-Gly}]^+$ adsorbido en el electrodo o a productos de la reducción del ligante; no obstante, estos estudios no serán profundizados, dado que no responden al enfoque de este trabajo.

Por último, se estudió la respuesta voltamperométrica del proceso **I** a diferentes velocidades de barrido como se muestra en la **figura 43**. Esta gráfica puede ser relacionada a una respuesta de un sistema cuasi-reversible para el complejo de $\text{Cu(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$.

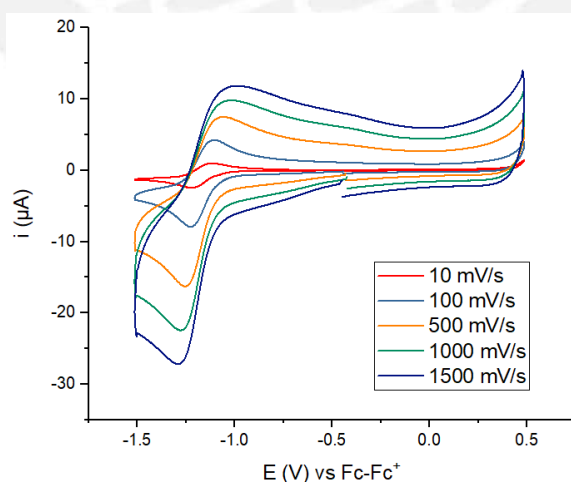


Figura 43. Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de $\text{Cu(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$ en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF_4 a diferentes velocidades de barrido. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

8.2.3.9.2. Voltamperometría cíclica de Zn(LIG-Ala)(H₂O) y Cu(LIG-Ala)(H₂O)

La **figura 44** muestra la respuesta voltamperométrica del compuesto Zn(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO utilizando TBABF₄ como electrolito soporte. La gráfica es muy similar al obtenido con el compuesto Zn(LIG-Gly)(H₂O); por lo tanto, conlleva a la misma interpretación. El pico catódico **Ic** presenta un $E_{pc(I)} = -2.3522$ V vs Fc-Fc⁺.

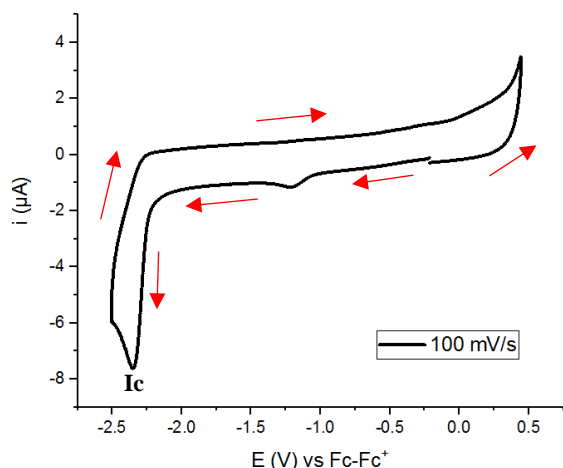


Figura 44. Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Zn(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF₄. El barrido de potencial se inició desde E_{ocp} en sentido catódico. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Por otro lado, la **figura 45** muestra la respuesta voltamperométrica del compuesto Cu(LIG-Ala)(H₂O) utilizando un barrido de potencial en sentido catódico y anódico. Estas dos gráficas presentan las mismas señales de oxidación y reducción. El único pico de reducción **Ic** presenta un $E_{pc(I)} = -1.2473$ V vs Fc-Fc⁺, mientras que los picos de oxidación **Ia**, **IIa**, **IIIa** y **IVa** presentan $E_{pa(I)} = -1.0922$ V vs Fc-Fc⁺, $E_{pa(II)} = -1.6745$ V vs Fc-Fc⁺, $E_{pa(III)} = -0.6242$ V vs Fc-Fc⁺ y $E_{pa(IV)} = -0.3082$ V vs Fc-Fc⁺.

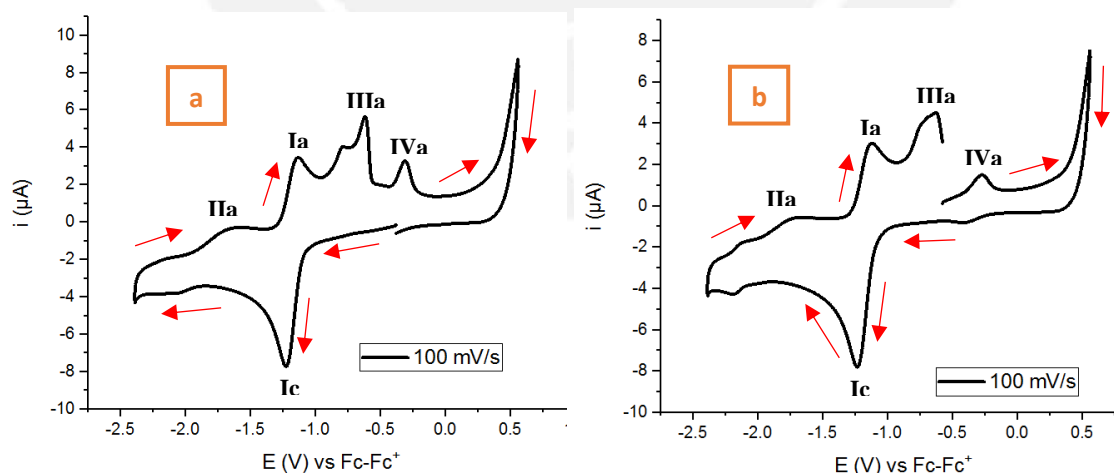


Figura 45. Voltamperograma cíclico de 1×10^{-3} M de Cu(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF₄. El barrido de potencial se inició desde E_{ocp} en sentido catódico (**a**) y en sentido anódico (**b**). Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

Se realizaron también mediciones de voltamperometría cíclica con inversiones de potencial para el complejo Cu(LIG-Ala)(H₂O) (**figura 46**), determinando así la dependencia del proceso **Ic** con el **Ia**, los que, por tanto, pueden ser asociados al proceso de reducción y oxidación del metal respectivamente

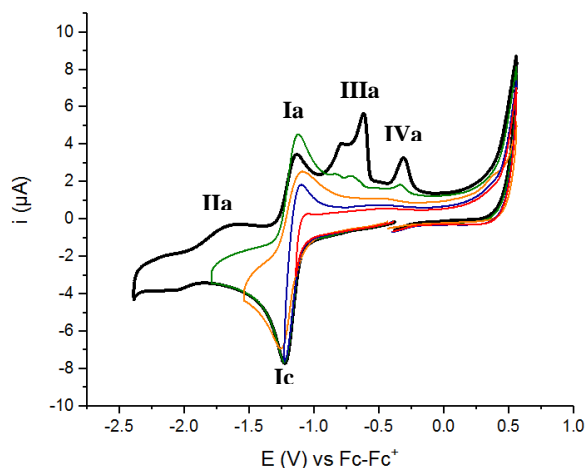
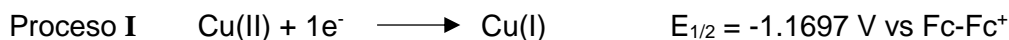


Figura 46. Voltamperograma cíclico de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de Cu(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF₄ utilizando inversión E_{-} en sentido catódico a una velocidad de barrido de 100 mV/s. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

A semejanza de lo que se encontró para el complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O), los picos **IIa**, **IIIa** y **IVa** no se encuentran asociados al único proceso de reducción y, como en dicho caso, podrían relacionarse a una redisolución del [Cu-LIG-Gly]⁺ adsorbido en el electrodo o a productos de la reducción del ligante.

Por último, se estudió la respuesta voltamperométrica del proceso **I** a diferentes velocidades de barrido. El resultado mostrado en la **figura 47** puede ser asociado a un sistema cuasi-reversible para el complejo Cu(LIG-Ala)(H₂O).

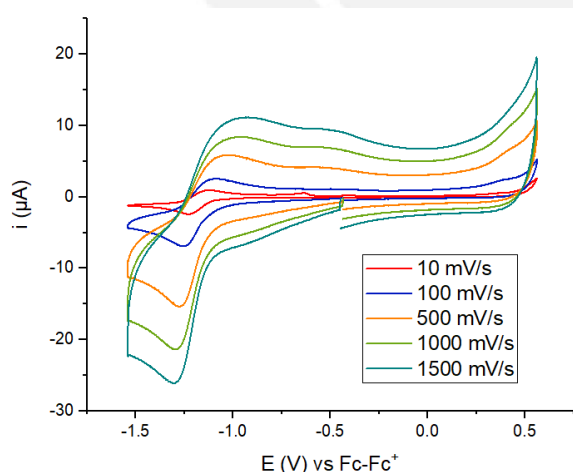


Figura 47. Voltamperograma cíclico de $1 \times 10^{-3} \text{ M}$ de Cu(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO y en presencia de 0.1 M de TBABF₄ a diferentes velocidades de barrido. Se utilizó carbón vítreo como electrodo de trabajo.

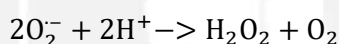
Un aspecto interesante en el estudio del comportamiento electroquímico de los complejos de cobre con los ligandos base de Schiff cumarínicas análogos derivados de la glicina y alanina, es el hallazgo de que el potencial redox Cu(II)/Cu(I) en ambos casos resulta prácticamente idéntico. Esto último, permite reforzar la propuesta

realizada a partir de la información espectroscópica y analítica antes discutida, respecto a que ambos complejos presentan una misma esfera de coordinación.

8.2.3.9.3. Potencial Redox y su relación con la superóxido dismutasa (SOD)

El cobre(II) en un ambiente hipóxico como el que se encuentra en las células cancerígenas puede generar especies reactivas de oxígeno; sin embargo, también existe la posibilidad de que los complejos de cobre(II) sintetizados puedan imitar la función de la superóxido dismutasa (SOD) y actuar como agentes antioxidantes⁹⁷.

Ortiz-Frade y colaboradores⁹⁸ han desarrollado un nuevo método electroquímico para determinar si un complejo de cobre(II) puede actuar o no como antioxidante por un mecanismo similar a la superóxido dismutasa y, en caso favorable, resulte de interés para una posterior evaluación biológica relacionada a dicha actividad. En el estudio se demostró que complejos con valores de potencial de media onda muy negativos para el proceso Cu(II)/Cu(I) muestran un incremento de la corriente para la reducción del oxígeno y favorecen el mecanismo de dismutación electroquímica (DISP) del ion superóxido mostrado en la siguiente ecuación:



Esta reacción es promovida por especies electrogeneradas de Cu(I) en dimetilsulfóxido, de ahí la importancia de evaluar el potencial redox de los complejos de cobre sintetizados en dicho medio.

Los valores de potencial redox Cu(II)/Cu(I) obtenidos por volamperometría cíclica para ambos complejos de cobre(II) sintetizados son mostrados en la **tabla 22**.

Tabla 22. Potencial de media onda de los complejos sintetizados

	Proceso	E _{1/2} (V) vs Fc-Fc ⁺
Cu(LIG-Gly)(H₂O)	Cu(II) + 1 e ⁻ -> Cu(I)	-1.1700
Cu(LIG-Ala)(H₂O)	Cu(II) + 1 e ⁻ -> Cu(I)	-1.1679

Se observa que los complejos de Cu(II) con los ligandos LIG-Gly y LIG-Ala presentan un muy bajo potencial de media onda en solución de DMSO respecto a otros complejos de cobre y, por tanto, resultan ser buenos candidatos para ser evaluados como agentes que mimetizan la acción de la superóxido dismutasa⁹⁸. Esto, a su vez, aumenta el interés para una posterior evaluación de estos compuestos como potenciales agentes antitumorales.

8.3. PROPUESTA ESTRUCTURAL

En primer lugar, se hará una revisión de los resultados obtenidos por las técnicas de fluorescencia, termogravimetría, absorción atómica y análisis elemental, los cuales permitirán proponer la composición de los complejos de cinc(II) y cobre(II) sintetizados.

El hecho que la coordinación al cinc(II) aumente considerablemente la intensidad de la emisión fluorescente en el complejo $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-óxido-8-cumarinilmetileno})\text{-glicinato}]\text{cinc(II)}$ respecto a aquella en el ligando libre, permitió aplicar el método de Job por fluorescencia para determinar la relación molar ligando/metal en dicho complejo. El valor 0.47 obtenido de la gráfica de intensidad de fluorescencia vs $[\text{metal}]/([\text{ligando}]+[\text{metal}])$ resultó muy próximo al teórico de 0.5 esperado para una relación molar 1:1 ligando/metal en solución. Este método no se pudo aplicar en el caso del complejo de cinc(II) análogo con la base de Schiff derivada de la alanina, dado que no se contaba con el ligando libre. Por otra parte, en ambos complejos de cobre(II) tampoco se pudo aplicar este método, puesto que la configuración d^9 del cobre(II) genera un rápido decaimiento no radiante que suprime la fluorescencia.

La relación molar ligando/metal 1:1 hallada en solución para el complejo $\text{acua}[\text{N}-(7\text{-óxido-8-cumarinilmetileno})\text{-glicinato}]\text{cinc(II)}$ concuerda con el resultado del análisis termogravimétrico que evidencia la presencia de un único ligando orgánico en este complejo en estado sólido. Además, dicho análisis indica que la esfera de coordinación se completa con una molécula de agua y que la composición del complejo en estado sólido incluiría $0,5 \text{ H}_2\text{O}$ de cristalización.

A partir de estos resultados, se propone la composición $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ para el complejo en cuestión, la cual concuerda dentro de un margen razonable con los resultados del contenido de cinc(II), carbono, nitrógeno e hidrógeno determinados por las técnicas de absorción atómica y análisis elemental respectivamente para dicha composición.

En lo que respecta a la composición de los tres complejos restantes, los resultados del análisis elemental y absorción atómica muestran una concordancia razonable con la composición $\text{Zn}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ para el complejo de cinc(II) con la base de Schiff análoga de la alanina y con las composiciones $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ para ambos complejos de cobre.

A continuación, se debe establecer el modo de coordinación más probable de ambas bases de Schiff utilizadas como ligandos. Con este fin se revisará la información

obtenida por las técnicas espectroscópicas ultravioleta-visible e infrarroja para los complejos de ambos metales, así como la de resonancia magnética nuclear para los complejos de cinc(II) y la de resonancia paramagnética electrónica para los complejos de cobre(II).

En los espectros UV-Vis de los complejos de Zn(LIG-Gly)(H₂O) y Cu(LIG-Gly)(H₂O) se observan desplazamientos en las bandas asignadas a las transiciones $\pi - \pi^*$ del anillo cumarínico, respecto al correspondiente ligando. Estos cambios en la posición de las bandas así como un notorio aumento en su intensidad, son consistentes con la coordinación de esta base de Schiff al metal. Asimismo, fue posible relacionar el desplazamiento hipsocrómico de la transición $\pi - \pi^*$ que involucra al grupo imino con una coordinación del grupo C=N al metal.

Por otra parte, la gran similitud, tanto en el patrón como en la posición de las bandas de absorción, de los espectros UV-Vis en solución en DMSO de los complejos antes mencionados con los correspondientes complejos de Zn(II) y Cu(II) coordinados a la base de Schiff análoga con alanina en vez de glicina, indicarían una misma estructura para aquellos con el mismo centro metálico. Cabe mencionar además que con excepción de un leve corrimiento hipsocrómico de las bandas de absorción en los complejos de cobre(II) respecto a los de cinc(II), los cuatro complejos comparten un mismo perfil en el UV-Vis.

En lo que concierne a la espectroscopía infrarroja, esta aporta información relevante respecto a la participación de los grupos imino y carboxilato en la coordinación. En los complejos Zn(LIG-Gly)(H₂O) y Cu(LIG-Gly)(H₂O) se observa, en primer lugar, un corrimiento considerable de la banda $\nu_{C=N}$ hacia menores frecuencias respecto al ligando, lo que evidencia su coordinación al centro metálico. Esto concuerda con la coordinación de este grupo al metal propuesta a partir del UV-Vis. Asimismo, en ambos casos se observa la desaparición de la banda $\nu_{C=O}$ del grupo carboxílico del ligando y la aparición en su lugar de las bandas características de las vibraciones de estiramiento asimétrica y simétrica del grupo carboxilato, lo que a su vez constituye evidencia de la coordinación de este último al metal. Por otra parte, al comparar estos complejos con los complejos formados por la base de Schiff análoga con alanina en vez de glicina, es posible apreciar un patrón espectroscópico común. Las bandas de absorción asignadas a los grupos imino y carboxilato en los cuatro complejos aparecen en un rango similar, lo que indicaría la coordinación de estos grupos al centro metálico en todos ellos.

Por otro lado, el hecho que los complejos $\text{Zn(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$ y $\text{Cu(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$ no dependan de la naturaleza del contraion de la sal utilizada como fuente del metal, permite concluir que este último no forma parte de la composición de dichos complejos y resulta consistente con la información del TG/DSC y las otras técnicas analíticas, en el sentido que la cuarta posición de coordinación es ocupada por una molécula de agua. Asimismo, esta propuesta resulta consistente con los datos analíticos obtenidos para los complejos $\text{Zn(LIG-Ala)(H}_2\text{O)}$ y $\text{Cu(LIG-Ala)(H}_2\text{O)}$.

En caso del complejo $\text{Zn(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$ el espectro $^1\text{H-RMN}$ muestra la desaparición de la señal OH-fenólico que aparece en aquel del ligando, lo que es consistente con la desprotonación de dicho grupo y su consiguiente coordinación al metal. Esta desprotonación enriquece al anillo cumarínico en densidad electrónica respecto al ligando y explica el desplazamiento hacia campo alto de los protones aromáticos. Asimismo, se observa un fuerte desplazamiento hacia campo alto del CH_2 -glicina como consecuencia del aumento del poder donador del grupo fenolato y la disminución del poder aceptor del grupo carboxilato respecto a aquellos fenólico y carboxílico del ligando. En lo que respecta al complejo de cinc(II) con el ligando análogo derivado de la alanina, su espectro $^1\text{H-RMN}$ resulta prácticamente idéntico a aquel $\text{Zn(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$, salvo por la desaparición esperada de la señal del grupo CH_2 -glicina y la aparición en su lugar de las señales CH-alanina y CH_3 -alanina, lo cual se puede considerar evidencia de que ambos complejos comparten una misma estructura.

Finalmente, los espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) de los complejos $\text{Cu(LIG-Gly)(H}_2\text{O)}$ y $\text{Cu(LIG-Ala)(H}_2\text{O)}$ concuerdan con una estructura mononuclear y una probable geometría cuadrado plana para estos complejos.

Tomando en cuenta la composición determinada por las técnicas analíticas y la información recabada por las técnicas espectroscópicas sobre el modo de coordinación del ligando tipo base de Schiff, se propone una estructura tetracoordinada para los cuatro complejos en que el ligando actúa de forma tridentada y la cuarta posición es ocupada por una molécula de agua. En la **figura 48** se muestra la coordinación tetradentada para estos complejos.

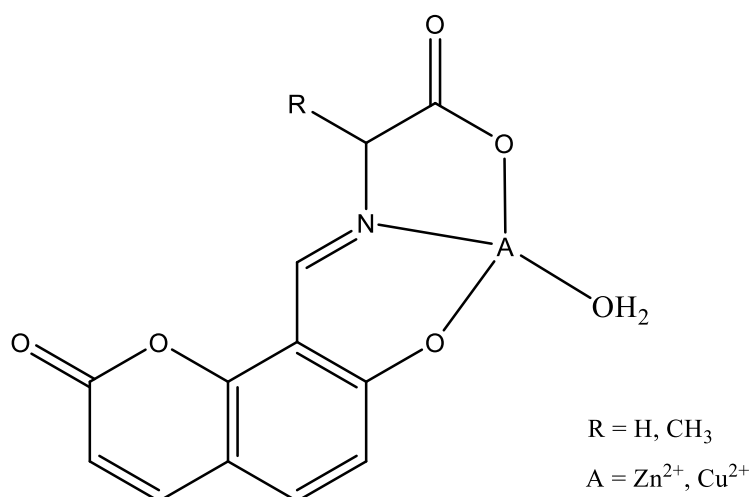


Figura 48. Estructura tetracoordinada de los complejos de cinc(II) y cobre(II) con el ligando tipo bases de Schiff N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)glicina y N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetileno)alanina

En cuanto a la geometría de los complejos, para aquellos de cinc(II) se propone una estructura tetraédrica o tetraédrica distorsionada, puesto que la geometría cuadrado plana se presenta muy raramente para este metal y cuando esto sucede se trata de un arreglo impuesto por las características estructurales del ligando, lo cual no resulta aplicable a este caso. Por otro lado, si bien el espectro EPR sugiere una estructura cuadrado plana para ambos complejos de cobre(II), las similitudes espectroscópicas en el IR y UV-Vis con aquellos de cinc(II), especialmente en el caso del Cu(LIG-Ala)(H₂O) con el Zn(LIG-Ala)(H₂O), no permiten establecer de manera conclusiva dicha geometría. Considerando que los complejos de cobre(II) están sujetos a un efecto Jahn-Teller podría tratarse de una tetraédrica distorsionada con tendencia a cuadrada plana.

Con el fin de determinar exactamente la estructura de los complejos de Cu(LIG-Gly)(H₂O) y Zn(LIG-Gly)(H₂O) se ensayaron diferentes métodos de cristalización utilizando en la mayoría de los casos DMSO como solvente de partida debido a la insolubilidad que presentaron dichos complejos en otros solventes. De las técnicas empleadas, el método de obtención de cristales a partir del licor madre generó la formación de pequeños cristales de Cu(LIG-Gly)(H₂O) que podrían resultar de utilidad para una posterior caracterización concluyente por la técnica de Difracción de Rayos X (DRX).

9. CONCLUSIONES

- 9.1** Se han obtenido dos nuevos complejos de cobre(II) y dos nuevos complejos de cinc(II) de fórmula general $M(\text{LIG})(\text{H}_2\text{O})$ con los ligandos tipo base de Schiff N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)glicina (LIG-Gly) y N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilen)alanina (LIG-Ala).
- 9.2** Se desarrolló un método de síntesis general para los cuatro complejos basado en la aplicación de un efecto *template* o “plantilla” por parte del metal que conduce a la formación de la base de Schiff *in situ*, a partir del precursor cumarínico y el aminoácido correspondiente, el cual finalmente coordina al centro metálico. Se trabajó en un medio metanólico usando una sal acetato como fuente del metal y a un pH final 4 - 5.
- 9.3** Los cuatro complejos fueron obtenidos puros y con rendimientos entre 53 y 73%.
- 9.4** Se determinó una relación estequiométrica 1:1 ligando/metal por el método de Job por fluorescencia para el complejo de cinc(II) con el ligando LIG-Gly.
- 9.5** El análisis termogravimétrico del complejo de cinc(II) con el ligando LIG-Gly permitió confirmar la presencia de un solo ligando en dicho complejo así como de una molécula de agua de coordinación. La pérdida inicial de agua de cristalización permitió establecer la composición $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$. Esta concuerda, dentro de un margen razonable, con los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno obtenidos por análisis elemental y el contenido de cinc(II) determinado por absorción atómica.
- 9.6** En caso de los otros tres complejos, los resultados del análisis elemental y la absorción atómica concuerdan razonablemente con las composiciones $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$; $\text{Zn}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 1,5\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$.
- 9.7** El modo de coordinación tridentado del ligando tipo base de Schiff en los cuatro complejos fue establecido mediante la aplicación de las espectroscopías UV-Vis e infrarroja, complementadas en caso de los complejos de Zn(II) con la espectroscopía $^1\text{H-RMN}$. Por la espectroscopía infrarroja se comprobó la participación del grupo carboxilato y del grupo imino en la coordinación al metal, esta última se vio apoyada por espectroscopía UV-Vis. Por otra parte, la

espectroscopía ^1H -RMN confirmó la coordinación del grupo carboxilato y permitió establecer la participación adicional del oxígeno-fenolato en la esfera de coordinación.

- 9.8** Dada la relación molar metal/ligando/ H_2O 1:1:1 común a los cuatro complejos y las similitudes espectroscópicas observadas, se propone una estructura tetracoordinada para los cuatro complejos en que el ligando base de Schiff actúa de forma tridentada y la cuarta posición es ocupada por una molécula de agua.
- 9.9** Se ensayaron diversas técnicas de cristalización para los complejos $\text{Zn}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$, las cuales condujeron en la mayoría de los casos a productos de naturaleza policristalina. Estos ensayos se vieron dificultados por la escasa solubilidad de estos compuestos en la mayoría de solventes; solo muestran una apreciable solubilidad en DMSO.
- 9.10** Un descubrimiento sorpresivo fue la inesperada solubilidad del complejo $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ en metanol, dada la gran similitud entre los ligandos LIG-Ala y LIG-Gly.
- 9.11** A pesar de los numerosos ensayos variando diversos parámetros de síntesis, no se logró una optimización del método de síntesis del compuesto precursor 8-formil-7-hidroxycumarina.
- 9.12** El uso de las técnicas bidimensionales de resonancia magnética nuclear HMBC y HSQC permitió una asignación completa de todas las señales de los espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN del compuesto precursor, la cual no se encuentra reportada.
- 9.13** Se desarrolló un método de síntesis conveniente para el compuesto N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina (LIG-Gly), aún no reportado, el cual condujo a un producto de alta pureza y con un rendimiento de 66%. Este procedimiento no dio resultado en caso del ligando análogo N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)alanina (LIG-Ala).
- 9.14** La interpretación del espectro ^1H -RMN del precursor 8-formil-7-hidroxycumarina facilitó la asignación completa de todas las señales en el espectro ^1H -RMN del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina. Este ligando fue también caracterizado por espectroscopía infrarroja.

9.15 Los complejos $\text{Cu}(\text{LIG-Gly})(\text{H}_2\text{O})$ y $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O})$ presentan un potencial redox muy negativo y, por tanto, son buenos candidatos para ser evaluados como agentes que mimetizan la acción de la superóxido dismutasa.

10. RECOMENDACIONES

10.1 Se recomienda continuar con los ensayos de cristalización, en particular con el método de evaporación lenta de una mezcla de solventes DMF/Metanol o DMSO/Metanol que contiene al complejo generado *in situ* en baja concentración. Este método condujo, en un tiempo prolongado, a la formación de pequeños cristales cuya calidad aún no ha sido posible evaluar.

10.2 Realizar ensayos de cristalización con el complejo de $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}$ que resultó soluble en metanol.

10.3 Para aquellos complejos difíciles de obtener en forma de monocristales debido a la falta de solubilidad en solventes comunes, se recomienda aplicar la técnica de difracción de rayos-X en polvo.

10.4 Continuar este tema de investigación con la síntesis de complejos de cobre (II) y cinc(II) con bases de Schiff derivadas de otros aminoácidos, en particular cisteína y leucina. La cisteína por la presencia del grupo sulfhidrilo afín a ambos metales y la leucina por su cercana relación con la alanina que dio lugar a un complejo $\text{Cu}(\text{LIG-Ala})(\text{H}_2\text{O}) \cdot 0,5$ soluble en metanol. Sin embargo, se pueden explorar otras alternativas con aminoácidos con sustituyentes hidroxilo como serina y treonina.

10.5 Los dos complejos de cobre(II) sintetizados cumplen ciertos criterios básicos que los convierten en candidatos atractivos para una posterior evaluación citotóxica frente a células cancerígenas. Asimismo, los complejos de cinc(II) relacionados podrían ser evaluados conjuntamente y se podría determinar la influencia del metal en la actividad antineoplásica de estos complejos.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Cancer, Fact Sheet No. 297, <http://www.who.int/cancer/en/> (Accessed May 29, 2016).
2. American Cancer Society. What is cancer? <http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer> (Accessed Oct. 11, 2016).
3. Wheate, N. J.; Walker, S.; Craig, G. E.; Oun, R. The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Trans.* 2010, 39, 8113-8127.
4. Santini, C.; Pellei, M.; Gandin, V.; Porchia, M.; Tisato, F.; Marzano, C. Advances in Copper Complexes as Anticancer Agents. *Chem. Rev.* 2014, 114, 815-662.
5. Bravo-Gómez, M. E.; Ruiz-Azuara, L.. Metals in Cancer Treatment. In *New approaches in the Treatment of Cancer*; Mejía, M., Navarro, S., Eds; Nova Science Publishers: New York, 2010; pp 139 – 158.
6. Denoyer, D.; Masaldan, S.; La Fontaine, S.; Cater, M. A. Targeting copper in cancer therapy: 'Copper that Cancer'. *Metallomics.* 2015, 7, 1459-1476.
7. Tan, S. J.; Yan, Y. K.; Foo, P. P.; Lim, K. H. Copper, gold and silver compounds as potential new anti-tumor metallodrugs. *Future Med. Chem.* 2010, 2, 1591-1608.
8. Ruiz-Azuara L. & Bravo-Gómez M.E. Copper compounds in Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* 2010, 17, 3606-3615.
9. Romero-Canelón, I.; Sadler, P. J. Next-Generation Metal Anticancer Complexes: Multitargeting via Redox Modulation. *Inorg. Chem.* 2013, 52, 12276-12291.
10. Matsuda, Y. Cancer, Types of. In *Encyclopedia of behavioral Medicine*, Gellman, M. D., Turner, J. R., Eds.; Springer Science+Business Media: New York, 2013, pp 318.
11. Cancer Research UK. How cancer starts <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancer-starts> (Accessed Oct. 10, 2016)
Cancer Research UK. How cancers grow <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer/how-cancers-grow> (Accessed Oct. 10, 2016)

12. Knowles, M. A.; Selby, P. J. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*, 4th ed.; Oxford University Press: New York, 2005, pp 4-6, 73, 399, 414.
13. Canadian Cancer Society. Cancer Cell Development
<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-101/what-is-cancer/cancer-cell-development/?region=on> (Accessed Oct. 11, 2016)
14. Pitot, H. C. The Molecular Biology of Carcinogenesis. *Cancer*, 1993, 72, 962-970.
15. Organización Mundial de la Salud. Cáncer. Nota Descriptiva N°297.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
 (Accessed Oct. 11, 2016).
16. Stewart, D. J. Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2007, 63, 12-31.
17. Ewesuedo, R. B.; Ratain, M. J. Principles of Cancer Chemotherapy. In *Oncologic Therapies*, 2nd ed., Vokes, E. E., Golomb, H. M., Eds.; Springer – Verlag Berlin Heidelberg: New York, 2003, pp 19-55.
18. Komeda, S. & Casini, A. Next-generation anticancer metallodrugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2012, 12, 219-235.
19. Mjos, K. D.; Orvij, C. Metallodrugs in Medicinal Inorganic Chemistry. *Chem. Rev.* 2014, 114 (8), 4540-4563.
20. Orvig, C.; Abrams, M. J. Medicinal Inorganic Chemistry: Introduction. *Chem. Rev.* 1999, 99 (9), 2201-2204.
21. Thompson, K. H. Medicinal Inorganic Chemistry: An Introduction. In *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, Scott, R. A. John Wiley and Sons, 2011.
22. Thompson, K. H.; Orvig, C. Boon and Bane of Metal Ions in Medicine. *Science*, 2003, 300 (5621), 936-939.
23. van Rijt, S. H.; Sadler, P. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov. Today*. 2009, 14 (23-24), 1089-1097.
24. Avendaño, C.; Menéndez, J. C. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, 2nd ed. Elsevier, 2015, pp 197-238, 608-609.
25. Garbutcheon-Singh, K. B.; Grant, M. P.; Harper B. W.; Krause-Heuer, A. M.; Manohar, M.; Orkey, N.; Aldrich-Wright, J. R. Transition Metal Based Anticancer Drugs. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011, 11, 521-542.

26. National Cancer Institute. NCI Drug Dictionary. Lobaplatin. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug?cdrid=41669> (Accessed Nov. 15, 2016).
27. Pongratz, M.; Schluga, P.; Jakupec, M. A.; Arion, V. B.; Hartinger, C. G.; Allmaier, G.; Keppler, B. K. Transferring binding and transferring-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied by means AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.* 2014, 19, 46-51.
28. Ott, I.; Gust, R. Non Platinum Metal Complexes as Anti-cancer Drugs. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2007, 340, 117-126.
29. van Rijt, S. H.; Peacock, A. F. A.; Jonhstone, R. D. L.; Parsons, S. Sadler, P. J.. Organometallic Osmium(II) Arene Anticancer Complexes Containing Picolinate Derivates. *Inorg. Chem.* 2009, 48, 1753-1762.
30. Evangelou, A. M. Vanadio in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002, 42, 249-265.
31. Munteanu, C. R.; Suntharalingam, K. Advances in Cobalt Complexes as Anticancer Agents. *Dalton Trans.* 2015, 44, 13796-13808.
32. Wani, W. A.; Baig, U.; Shreaz, S.; Shiehk, R.; Iqbal, P. F.; Jameel, E.; Ahmad, A.; Mohd-Setapar, S. H.; Hung, L. T. Recent Advances in Iron Complexes as Potential Anticancer Agents. *New J. Chem.* 2016, 40, 1063-1090.
33. Frezza, M.; Hindo, S.; Chen, D.; Davenport, A.; Schmitt, S.; Tomco, D.; Dou, Q. P. Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2010, 16, 1813 - 1825.
34. Lerner, F.; Woodley, L. N.; Shousha, S.; Moyes, A.; Humphreys-Williams, E.; Strekopytov, S.; Halliday, A. N.; Rehkämper, M.; Coombes C. Zinc isotopic compositions of breast cancer tissue. *Metallomics.* 2015, 7, 112 - 117.
35. Kovala-Demertzi, D.; Alexandratos, A.; Papageorgiou, A.; Yadav P. N.; Dalezis, P.; Demertzis, M. A. Synthesis, characterization, crystal structures, *in vitro* and *in vivo* antitumor activity of palladium(II) and zinc(II) complexes with 2-formyl and 2-acetyl pyridine N(4)-1-(2-pyridyl)-piperazinyll thiosemicarbazone. *Polyhedron.* 2008, 27, 2731 - 2738.
36. Stacy, A. E.; Palanimuthu, D.; Bernhardt, P. V.; Kalinowski, D. S.; Jansson, P. J.; Richardson, D. R. Zinc(II)-Thiosemicarbazone Complexes Are Localized to the Lysosomal Compartment Where They Transmetallate with Copper Ions to Induce Cytotoxicity. *J. Med. Chem.* 2016, 59, 4965 - 4984.

37. Liu, S.; Cao, W.; Yu, L.; Zheng W.; Li, L.; Fan, C.; Chen, T. Zinc(II) complexes containing bis-benzimidazole derivatives as a new class of apoptosis inducers that trigger DNA damage-mediated p53 phosphorylation in cancer cells. *Dalton Trans.* 2013, 42, 5932 - 5940.
38. Milacic, V.; Chen, D.; Giovagnini, L.; Diez, A.; Fregona, D.; Dou, Q. P. Pyrrolidine dithiocarbamate-zinc(II) and -copper(II) complexes induce apoptosis in tumor cells by inhibiting the proteasomal activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 231, 24 - 33.
39. Donadelli, M.; Pozza, E. D.; Scupoli, M. T.; Costanzo, C.; Scarpa, A.; Palmieri, M. Intracellular zinc increase inhibits p53^{-/-} pancreatic adenocarcinoma cell growth by ROS/AIF-mediated apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009, 1793, 273 - 280.
40. Crichton, R. C. Copper – Coping with Dioxygen. *Biological Inorganic Chemistry*, 2nd ed., Elsevier: Oxford, 2012, 279-296.
41. Ellingsen, D. G.; Møller, L. B.; Aaseth, J. Copper. In *Handbook on the Toxicology of Metals*, 4th ed., Nordberg, F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Eds.; Academic Press: San Diego, 2015, pp 765-786.
42. Aggett, P. J. Copper. In *Encyclopedia of Human Nutrition*, 3rd ed., Caballero, B., Eds.; Academic Press: Waltham, 2013, pp 397-403.
43. Stern, B. R.; Solioz, M; Krewski, D; Aggett, P.; Aw T. C.; Baker, S.; Crump, K.; Dourson, M.; Haber, L.; Hertzberg, R.; Keen, C.; Meek, B.; Rudenko, L.; Schoeny, R.; Slob, W.; Starr, T. Copper and Human Health: Biochemistry, Genetics, and Strategies for Modeling Dose-response Relationship. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 2007, 10 (3), 157-222.
44. López de Romaña, D.; Olivares, M.; Uauy, R.; Araya, M. Risk and benefits of copper in light of new insights of copper homeostasis. *J. Trace Elem. Med. Bio.* 2011, 25 (1), 3-13.
45. Gupte, A.; Mumper, R. J. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* 2009, 35 (1), 32-46.
46. Trachootham, D.; Alexandre J.; Huang, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanism: a radical therapeutic approach?. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2009, 8, 579-591.
47. Tisato, F.; Marzano, C.; Porchia, M.; Pellei, M.; Santini, C. Copper in Diseases and Treatments, and Copper-Based Anticancer Strategies. *Med. Res. Rev.*, 2010, 30 (4), 708-749.
48. Hancock, C. N.; Stockwin, L. H.; Han, B.; Divilbiss, R. D.; Jun, J. H.; Malhotra, S. V.; Hollingshead, M. G.; Newton, D. L. A copper chelate of

thiosemicarbazone NSC 689534 induces oxidative/ER stress and inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.* 2011, 50, 110-121.

49. Chakraborty, A.; Kumar, P.; Ghosh, K.; Roy, P. Evaluation of a Schiff base copper complex compound as potent anticancer molecule with multiple targets of action. *Eur. J. Pharmacol.* 2010, 647, 1 -12.
50. Borges, L. J. H.; Bull, E. S.; Fernandes, C.; Horn, A., Jr.; Azeredo, N. F.; Resende, J. A. L. C.; Freitas, W. R.; Carvalho, E. C. Q.; Lemos, L. S.; Jerdy, H.; Kanashiro, M. M. *In vitro* and *in vivo* studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 2016, 123, 128-140.
51. Lei Jia et. al. Synthesis, characterization, and antitumor activity of three ternary dinuclear copper (II) complexes with a reduced Schiff base ligand and diimine coligands *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2016, 159, 107-119.
52. Han, J.; Liu, L.; Yue, X.; Chang, J.; Shi, W.; hua, Y. A binuclear complex constituted by diethyldithiocarbamate and copper(I) functions as a proteasome activity inhibitor in pancreatic cancer cultures and xenografts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013, 273, 477-483.
53. Bolos C. A.; Chaviara, A. T.; Mourelatos, D.; Iakovidou, Z.; Miogluo, E.; Chrysogelou, E., Papageorgiou, A. Synthesis, characterization, toxicity, cytogenetic and *in vivo* antitumor studies of 1,1-dithiolate Cu(II) complexes with di-, tri-, tetra- amines and 1,3-thiazoles. Structure-activity correlation. *Bioorg. Med. Chem.* 2009, 17, 3142 – 3151.
54. Satisha M.A.; Shetti, U. N.; Revankar, V. K.; Pai, K. S. R. Synthesis and antitumor studies on novel Co(II), Ni(II) and Cu(II) metal complexes of bis(3-acetylcoumarin)thiocarbohydrazone. *Eur. J. Med. Chem.*, 2008, 43, 2338-2346.
55. Raman, N; Jeyamurugan, R.; Raj Kapoor, B.; Magesh, V. Metal-based antitumor, cytotoxic and antimicrobial activity: pharmacological evaluation of Knoevenagel condensate B-diketones Schiff base thiosemicarbazone Cu(II) and Zn(II) complexes. *Appl. Organomet. Chem.* 2009, 23, 283 -290.
56. Raman, N.; Jeyamurugan, R.; Senthilkumar, R.; Raj Kapoor, B.; Franzblau, S. G. *In vivo* and *in vitro* evaluation of highly specific thiolate carrier group copper(II) and zinc(II) complexes on Ehrlich ascites carcinoma tumor model. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, 45, 5438-5451.
57. Raman, N.; Narayanaperumal, P. Lasing the DNAfragments through B-diketimines framed Knoevenagel condensed Cu(II) and Zn(II) complexes – An *in vitro* and *in vivo* approach. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2014, 118, 867-882.

58. Satisha, M. P.; Budagumpi, S.; Kulkarni, N. V.; Kurdekar, G. S.; Revankar, V. K.; Pai, K, S. R. Synthesis, structure, electrochemistry and spectral characterization of (D-glucopyranose)-4-phenylthiosemicarbazide metal complexes and their antitumor activity against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss albino mice. *Eur. J. Med. Chem.* 2010, *45*, 106 – 113.
59. Ruiz-Azuara, L.; Bastian, G.; Bravo-Gómez, M. E.; Cañas, R. C.; Flores-Alamo, M.; Fuentes, I.; Mejía, C.; García-Ramos, J. C., Serrano, A. Phase I study of one mixed chelates copper(II) compound, Casiopeína CasIIIa with antitumor activity and its mechanism action. *Cancer Res.* 2014, *74* (Suppl. 19).
60. Kroemer, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009, *16*, 3 - 11.
61. Adams, J. The proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer.* 2004, *4*, 349 - 360.
62. Laussmann, M.A., Passante, E.; Düssmann, H.; Rauen J.A.; Würstle M.L.; Delgado, M.E.; Devocelle, M.; Prehn J.H.M.; Rehm M. Proteasome inhibition can induce an autophagy-dependent apical activation of caspase-8. *Cell Death Differ.* 2011, *18*, 1584 - 1597.
63. Duff J. C.; Billis, E. J. Reactions between hexamethylenetetramine and phenolic compounds. Part I. A new method for the preparation of 3- and 5-aldehydosalicylic acids. *J. Chem. Soc.* 1932, 1987-1988.
64. Wang, Z. Duff Reaction. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents.* John Wiley & Sons, Inc. Vol.3, 942 - 945.
65. Kulkarni, A.; Patil, S. A.; Badami, P. Synthesis, characterization, DNA cleavage and *in vitro* antimicrobial studies of La(III), Th(IV) and VO(IV) complexes with Schiff base of coumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, *44*, 2904-2912.
66. Growing quality crystals. MIT. <http://web.mit.edu/x-ray/crystallize.html> (Accessed Oct. 15, 2016).
67. Qin, D.; Yang, Z.; Wang, B. Spectra and DNA-binding affinities of Copper(II), Nickel(II) complexes with a novel glycine Schiff base derived from chromone. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2007, *68*, 912-917.
68. Nishinaga, T. Introduction: Basic Concepts and a brief history of organic redox systems. In *Organic Redox Systems*, Nishinaga, T., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2016; 4.

69. Spingler, B.; Schnidrig, S.; Todorova, T.; Wild, F. Some thoughts about the single crystal growth of small molecules. *CrystEngComm*. 2012, 14, 751-757.
70. Leong, W. L.; Tam, A. Y.; Batabyal S. K.; Koh, L. W.; Kasapis, S.; Yam, V. W.; Vittal, J. J. Fluorescence enhancement of coordination polymeric gel. *Chem. Commun.* 2008, 0, 3628-3630.
71. Hindo, S. S.; Frezza, M.; Tomco, D.; Heeg, M. J.; Hryhorczuck, L.; McGarvey, B. R.; Dou, Q. P.; Verani, C. N. Metals in anticancer therapy: Copper(II) complexes as inhibitors of the 20S proteasome. *Eur. J. Med. Chem.* 2009, 44, 4353-4361.
72. Darla, M. M.; Krishna, B. S.; Rao, K. U.; Reddy, N. B.; Srivash, M. K.; Addepa, K.; Sundar, Ch. S.; Reddy, C. S.; Misra, K. Synthesis and bio-evaluation of novel 7-hydroxycoumarin derivatives via Knoevenagel reaction. *Res. Chem. Intermed.* 2015, 41, 1115-1133.
73. Sen, I.; Sasmal, S.; Ghorai, S. K.; Pal, S. A convenient synthesis of phebalosin: first total synthesis of murraxocin. *Tetrahedron Lett.* 2015, 56, 4590-4592.
74. Dong, Y.; Mao, X.; Jiang, X.; Hou, J.; Cheng, Y.; Zhu, C. L-Proline promoted fluorescent sensor for Mg²⁺ detection in a multicomponent sensory system. *Chem. Commun.* 2011, 47, 9450-9452.
75. Feng, K.; Griffiths, J. Thermochromic and photochromic properties of some new spiropyran systems. *Advances in Colour Science and Technology*. 2001, 4, 12-20.
76. Qin, J.; Li, T.; Wang, B.; Yang, Z.; Fan, L. Fluorescent sensor for selective detection of Al³⁺ based on quinoline – coumarin conjugate. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2014, 133, 38-43.
77. Yan, L.; Zhou Y.; Du, W.; Kong, Z.; Qi, Z. A new turn on coumarin-based fluorescence probe for Ga³⁺ detection in aqueous solution. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2016, 155, 116-124.
78. Das, K. et al. An enolato-bridge dinuclear Cu(II) complex with a coumarin-assisted precursor: a spectral, magnetic and biological study. *New J. Chem.* 2015, 39, 7309-7321.
79. Boghaei, D. M.; Gharagozlou, M. Synthesis and characterization of novel water-soluble zinc(II) Schiff-base complexes derived from amino acids and salicylaldehyde-5-sulfonates. *J. Coord. Chem.* 2007, 60, 339-346.

80. Reich Hans J. Chem 605 - Structure Determination Using Spectroscopic Methods. <https://www.chem.wisc.edu/areas/reich/chem605/index.htm>. 5-HMR-6 Long-Range (4J and higher) Proton-Proton Couplings. Two and Three Bond Carbon-Proton Couplings (Accessed August 7, 2017).
81. Li, W.; Zhang, J.; Huang, J.; Jiang, M.; Xu, Y.; Ahmed, A.; Yin, S.; Tang, G. New prenylated coumarins from the stems of *Toddalia asiatica*. *RSC Adv.* 2017, 7, 31061-31068.
82. Creaven, B. S.; Egan, D. A.; Karcs, D.; Kavanagh, K.; McCann, M.; Mahon, M.; Noble, A.; Thati, B.; Walsh, M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH₂) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MecdoaH₂): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)(phen)₂].8.8H₂O and [Cu(4-Mecdoa)(phen)₂].13H₂O (phen = 1,10-phenantroline). *J. Inorg. Biochem.* 2007, 101, 1108-1119.
83. Low, M. L.; Paulus, G.; Dorlet, P.; Guillot, R.; Rosli, R.; Delsuc, N.; Crouse, K. A.; Policar, C. Synthesis, characterization and biological activity of Cu(II), Zn(II), Re(I) complexes derived from S-benzylthiocarbamate and 3-acetylcoumarin. *Biometals.* 2015, 28, 553-566.
84. Montazerzohori, M.; Jahromi, S. M.; Masoudiasi, A.; McArdle, P. Nano structure zinc (II) Schiff base complexes of a N₃-tridentate ligand as new biological active agents: Spectral, thermal behaviors and crystal structure of zinc azide complex. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015, 138, 517-528.
85. Tan, K. W.; Seng, H. L.; Lim, F. S.; Cheah, S.; Ng, C. H.; Koo, K. S.; Mustafa, M. R.; Ng, S. W.; Maah, M. J. Toward a selective cytotoxic agent for prostate cancer: Interaction of zinc complexes of polyhydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone with topoisomerase I. *Polyhedron.* 2012, 38, 275-284.
86. Garribia, E.; Micera, G. The determination of the Geometry of Cu(II) Complexes. An EPR Spectroscopy Experiment. *J. Chem. Educ.* 2006, 83, 1229 – 1232.
87. Thakurta, S. et al. Ferromagnetic exchange coupling in a new bis(μ -chloro)-bridged copper(II) Schiff base complex: Synthesis, structure, magnetic properties and catalytic oxidation of cycloalkanes. *Polyhedron.* 2009, 28, 695-702.
88. Urquiola, C.; Gambino, D.; Cabrera, M.; Lavaggi, M. L.; Cerecetto, H.; González, M.; López de Cerain, A.; Monge, A.; Costa-Filho, A. J.; Torre, M. H. New copper-based complexes with quinoxaline *N*¹,*N*⁴-dioxide derivatives, potential antitumoral agents. *J. Inorg. Biochem.* 2008, 102, 119-126.

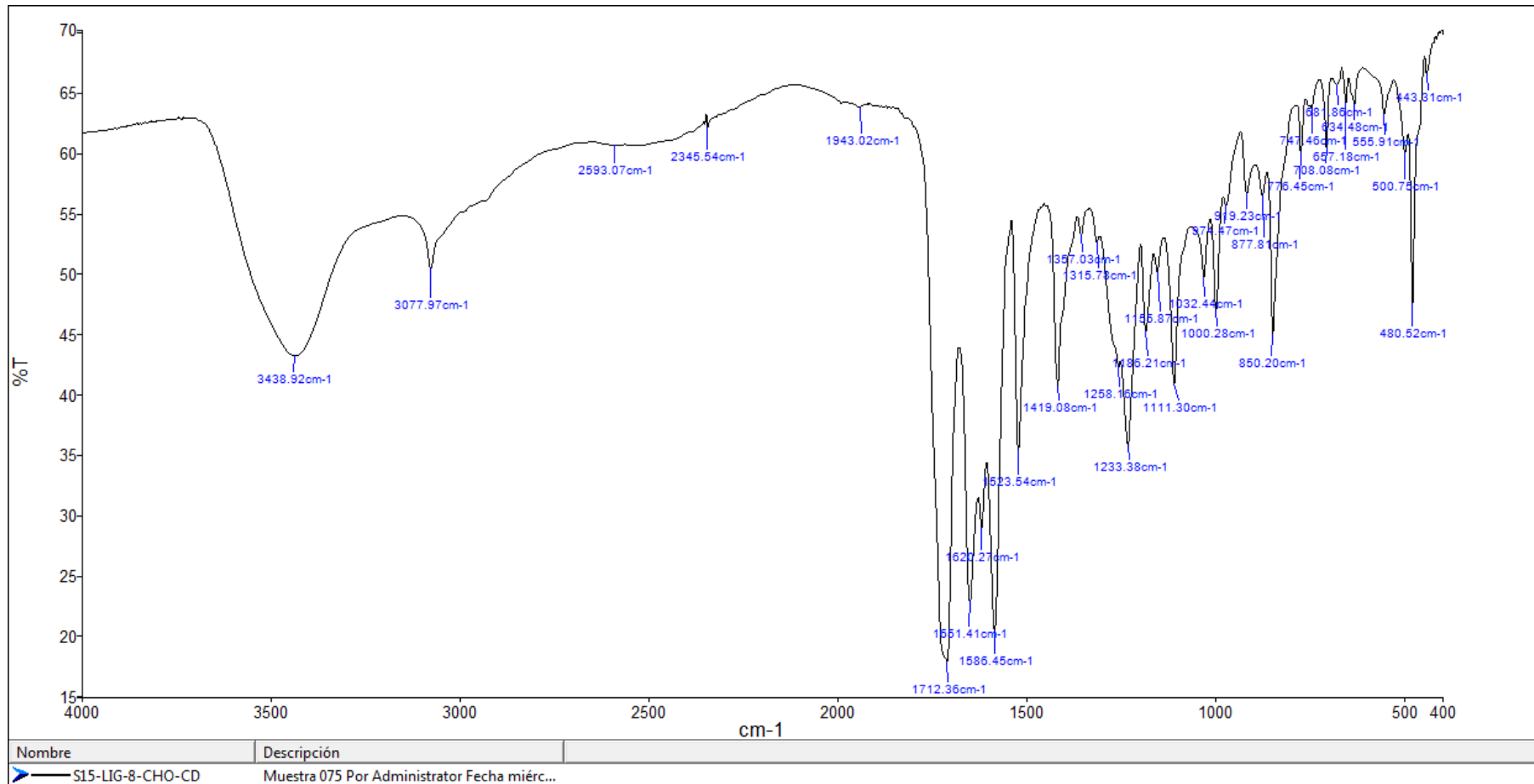
89. Abu-Eittah, R. H.; El-Tawil, B. A. The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment. *Can. J. Chem.* 1985, 63, 1173-1179.
90. Shokohi-pour, Z.; Chiniforoshan, H.; Momtazi-borojeni, A. A.; Notash, B. A novel Schiff base derived from the gabapentin drug and copper (II) complex: Synthesis, characterization, interaction, with DNA/protein and cytotoxic activity. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2016, 162, 34-44.
91. Zhang, Y.; Zhao, J.; He, L.; Zhao, D.; Zhang, S. Manganese (III) salen complex anchored onto MCM-41 as catalyst for the aerobic epoxidation of olefins. *Microporous Mesoporous Mater.* 2006, 94, 159-165.
92. Kim, J. S.; Quang, D. T. Calixarene-Derived Fluorescent Probes. *Chem. Rev.* 2007, 107, 3780-3799.
93. Lakowics, J. R. Fluorescence Sensing. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed.; Springer US: Boston, 2006; 641-643.
94. Fabbrizzi, L.; Licelli, M.; Pallavicini, P.; Perotti, A.; Tagkietti, A.; Sacchi, D. Fluorescent Sensors for Transition Metals Based on Electron-Transfer and Energy-Transfer Mechanisms. *Chem. Eur. J.* 1996, 2, 75-82.
95. Alam, R.; Mistri, T.; Bhowmick, R.; Katarkar, A.; Chaudhuri, K.; Ali, M. ESIPT blocked CHEF based differential dual sensor for Zn²⁺ and Al³⁺ in a pseudo-aqueous medium with intracellular bio-imaging applications and computational studies. *RSC. Adv.* 2016, 6, 1268-1278.
96. Pasciak, E. M. et al. Electroreductive Dimerization of Coumarin and Coumarin Analogues at Carbon Cathodes. *J. Org. Chem.* 2015, 80, 274-280.
97. Saczewski, F.; Dziemidowicz-Borys, E.; Bednarski, P. J. Gdaniec, M. Synthesis, Crystal Structure, Cytotoxic and Superoxide Dismutase Activities of Copper(II) Complexes of *N*-(4,5-Dihydroimidazol-2-yl)azoles. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 2007, 340, 333-338.
98. Manzanera-Estrada, M. E.; Cruz-Ramírez, M.; Flores-Alamo, M.; Gracia y Jiménez, J. M.; Galindo-Murillo, R.; García-Ramos, J. C.; Ruiz-Azuara, L.; Ortiz-Frade, L. Effect of tunable redox behavior of bis chelate substituted 1, 10-phenantroline Cu(II) complexes on its reaction with superoxide anion in DMSO. Toward a simple criterion to identify a SOD-like mechanism. *J. Inorg. Biochem.* 2017, 175, 118-128.



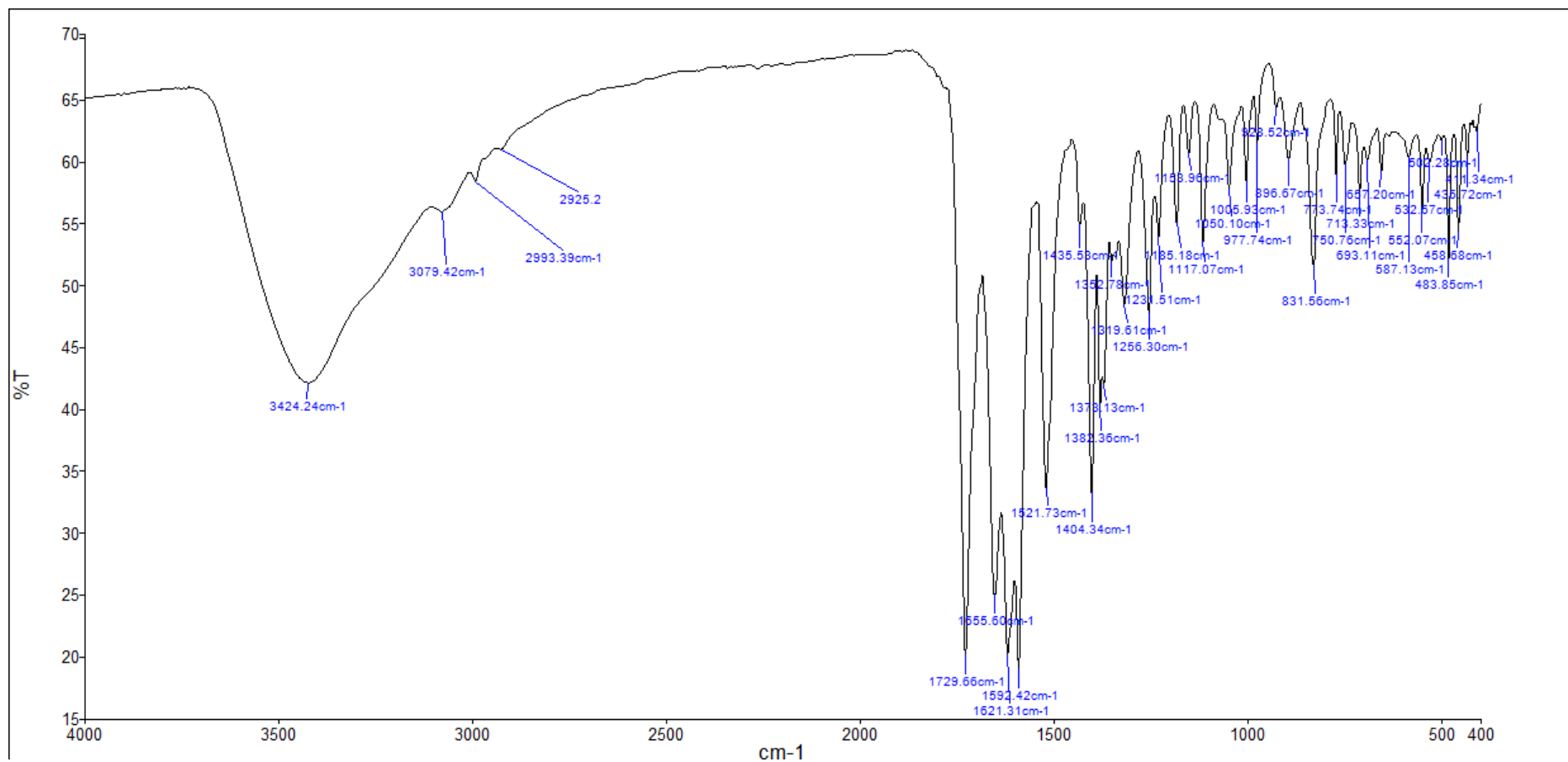
ANEXOS

ANEXO 10.1

ESPECTROS INFRARROJOS DE LIGANDOS CUMARÍNICOS



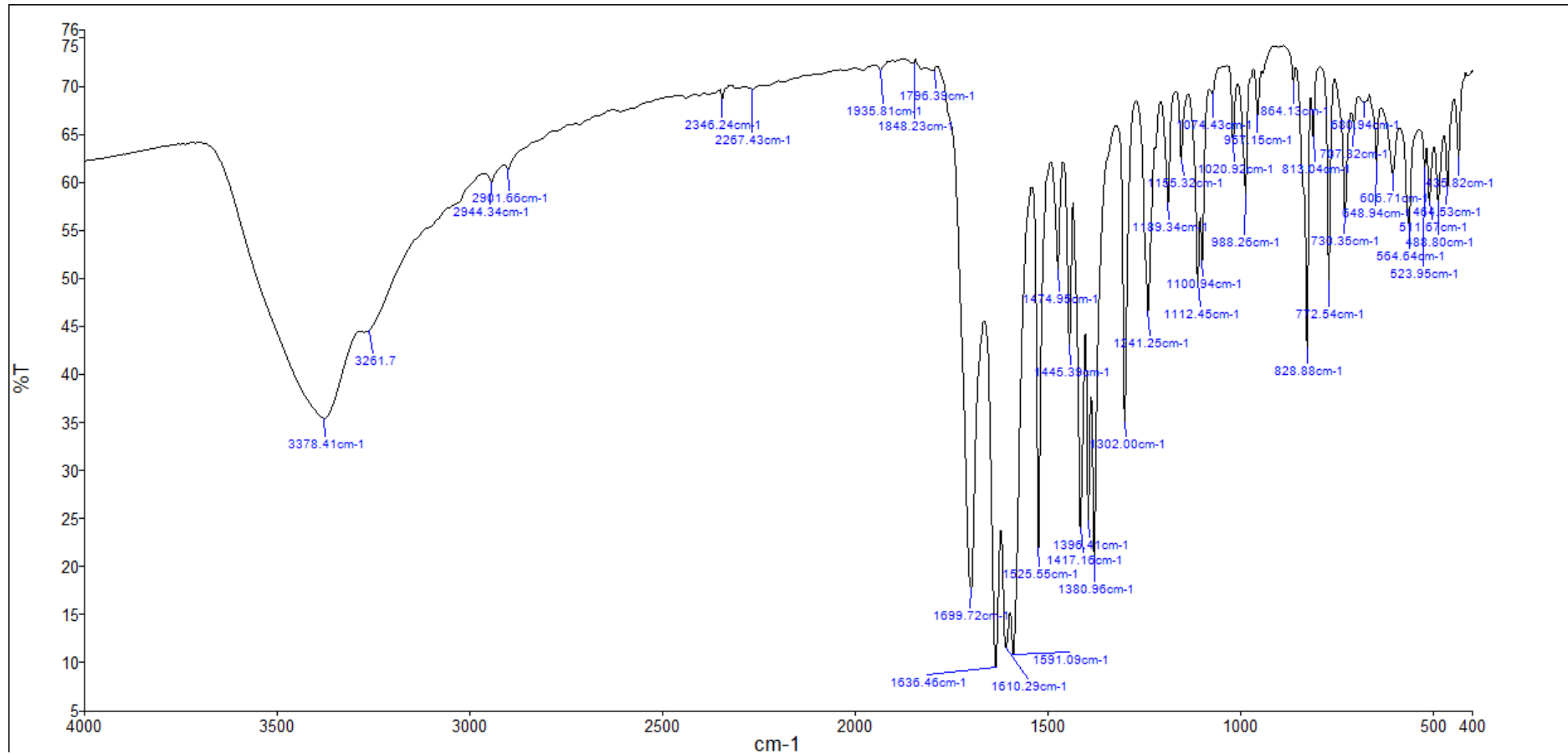
10.1.1. Espectro Infrarrojo del ligando N-[(7-hidroxi-8-cumarinil)metilén]glicina (LIG-Gly)



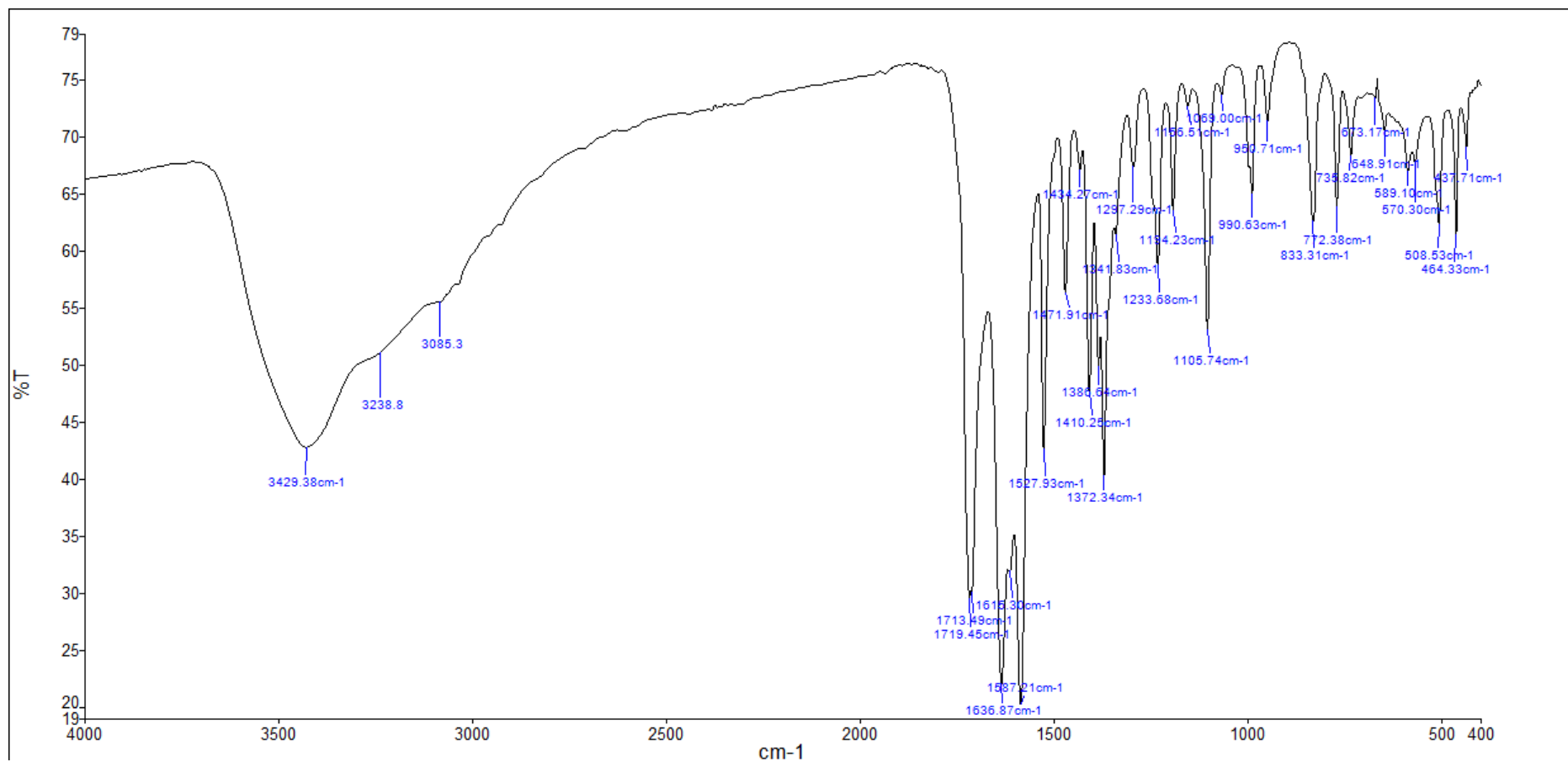
10.1.2. Espectro Infrarrojo de la sal carboxilato de potasio del ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetil)glicina, LIG-Gly

ANEXO 10.2

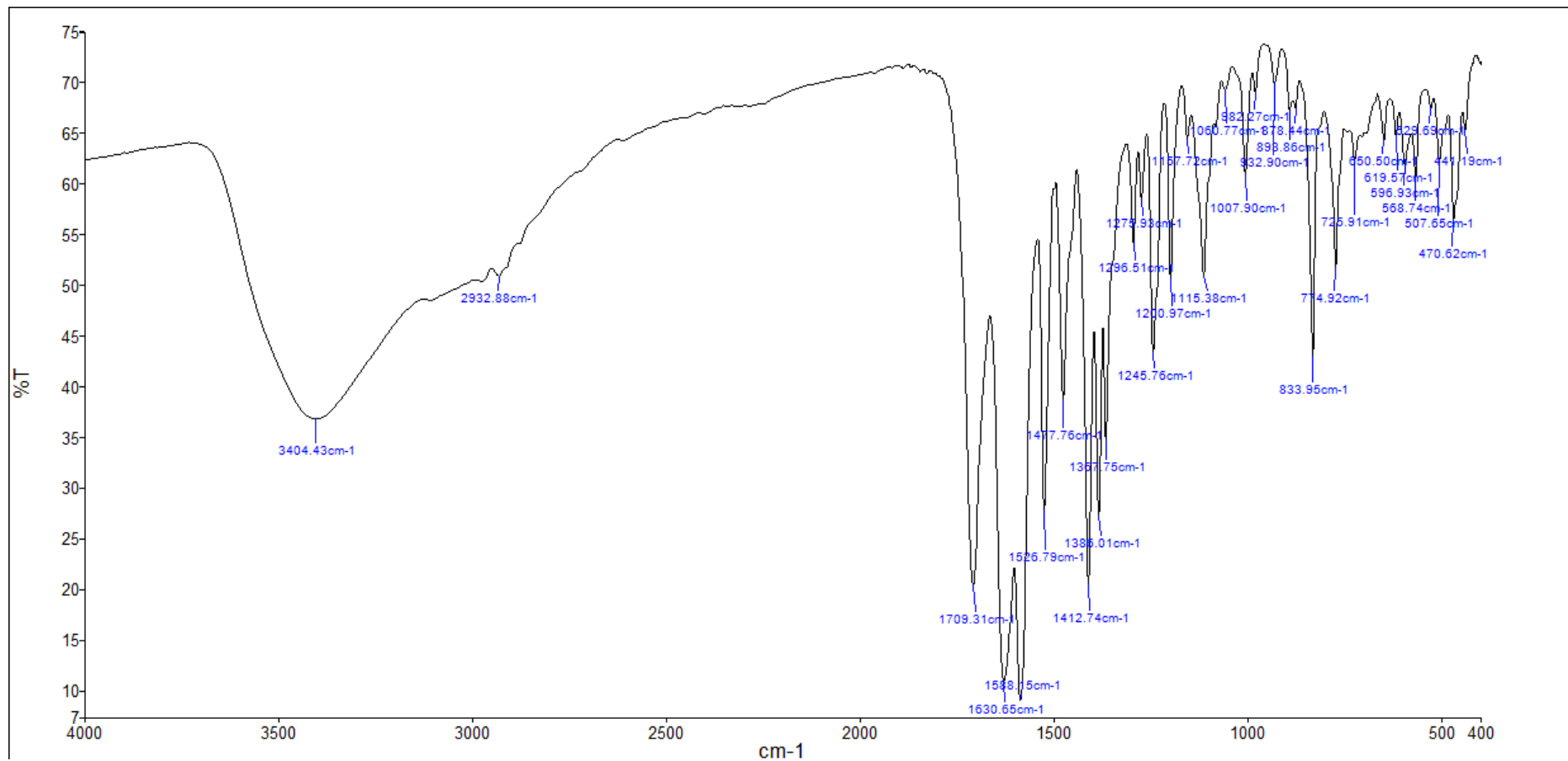
ESPECTROS INFRARROJOS DE LOS COMPLEJOS DE Cu(II) Y Zn(II)



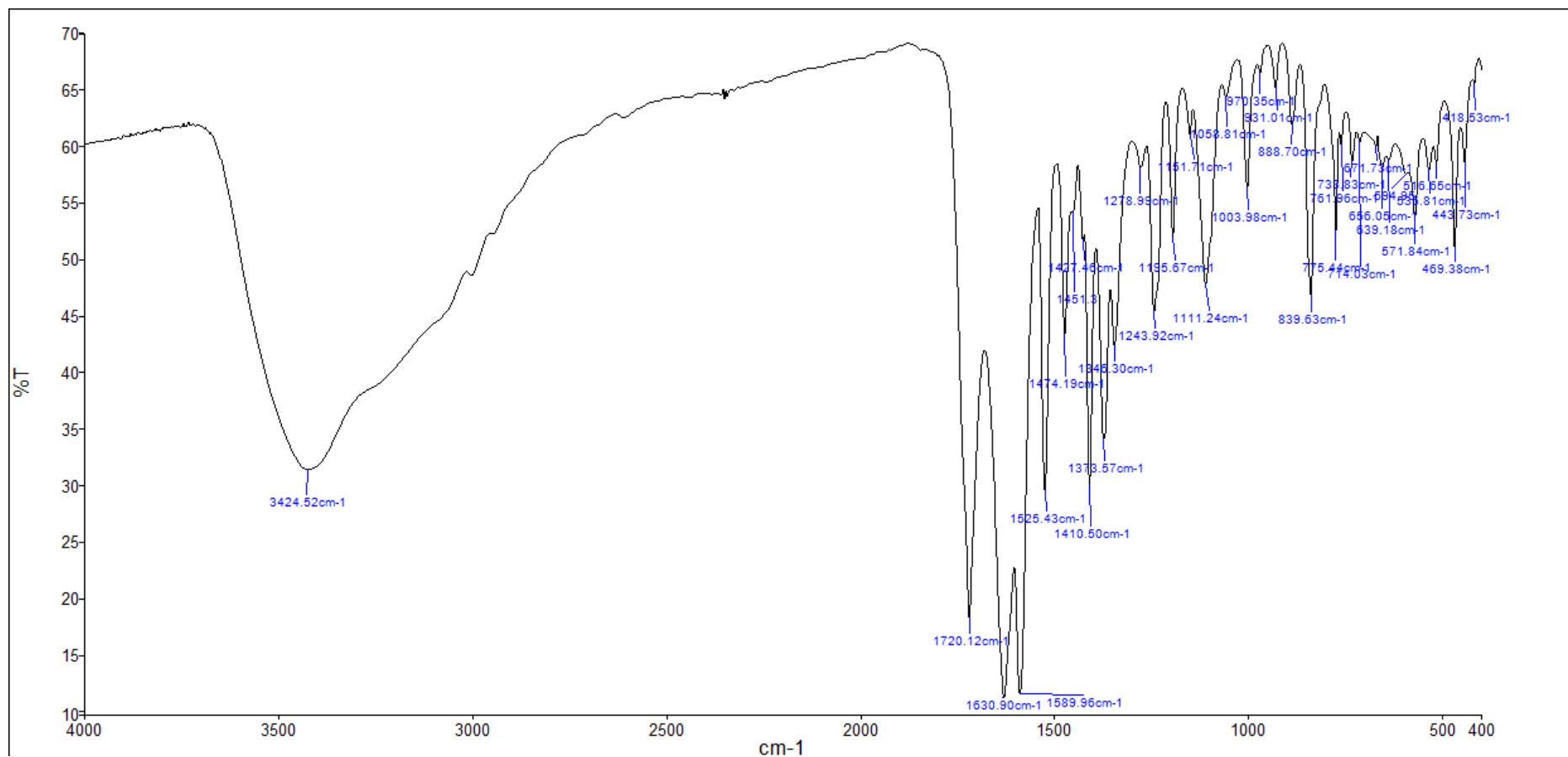
10.2.1. Espectro Infrarrojo del complejo aqua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetil)glicinato]cinc(II), Zn(LIG-Gly)(H₂O)



10.2.2. Espectro Infrarrojo del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)glicinato]cobre(II), Cu(LIG-Gly)(H₂O)



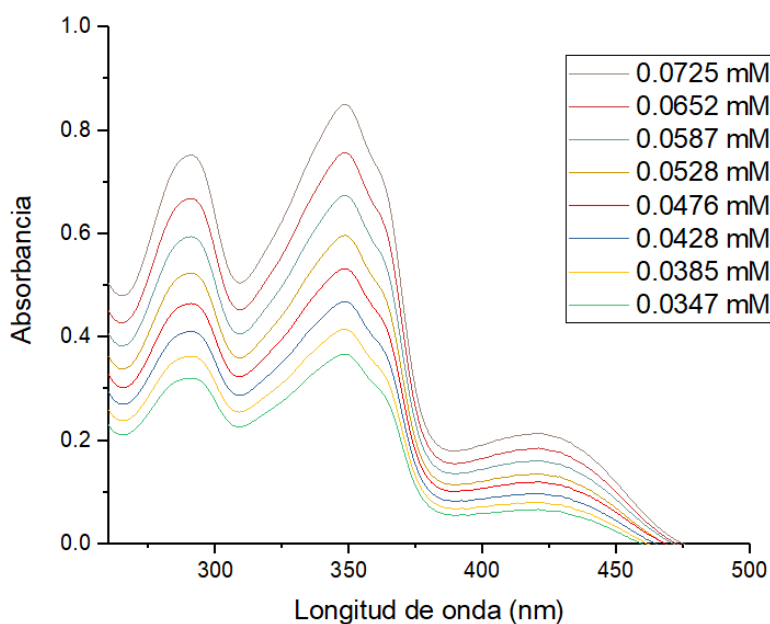
10.2.3. Espectro Infrarrojo del complejo acua[N-(7-óxido-8-cumarinilmetilen)alaninato]cinc(II), Zn(LIG-Ala)(H₂O)



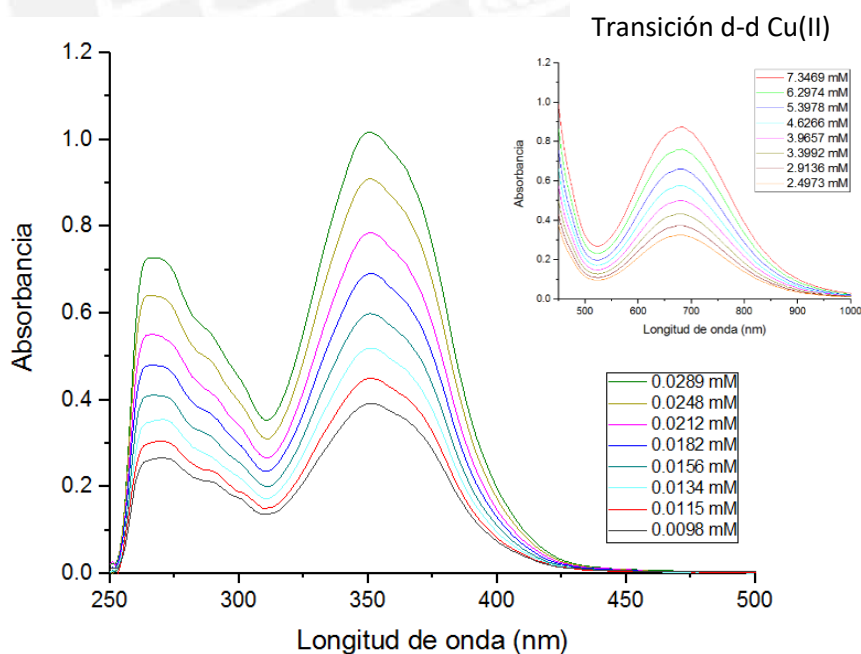
10.2.3. Espectro Infrarrojo del complejo $\text{aqua}[\text{N}-(7\text{-}\acute{\text{o}}\text{xido-8-cumarinilmetileno)alaninato}]_{\text{cobre(II)}} \text{, Cu(LIG-Ala)(H}_2\text{O)}$

ANEXO 10.3

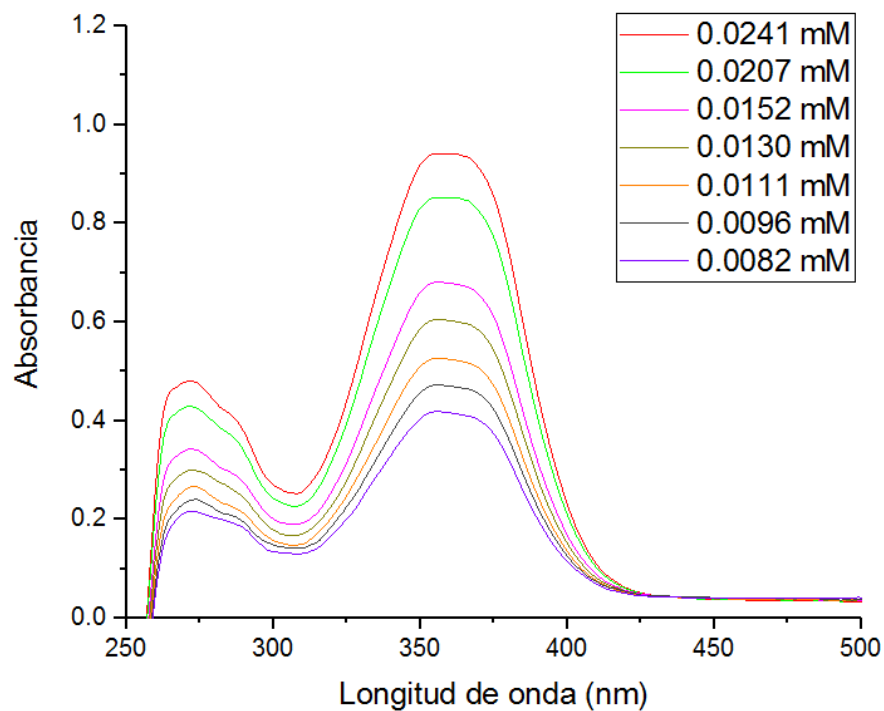
ESPECTROS UV-Vis DEL LIGANDO LIG-Gly Y DE LOS COMPLEJOS Zn(LIG-Gly)(H₂O), Cu(LIG-Gly)(H₂O), Zn(LIG-Ala)(H₂O), Cu(LIG-Ala)(H₂O)



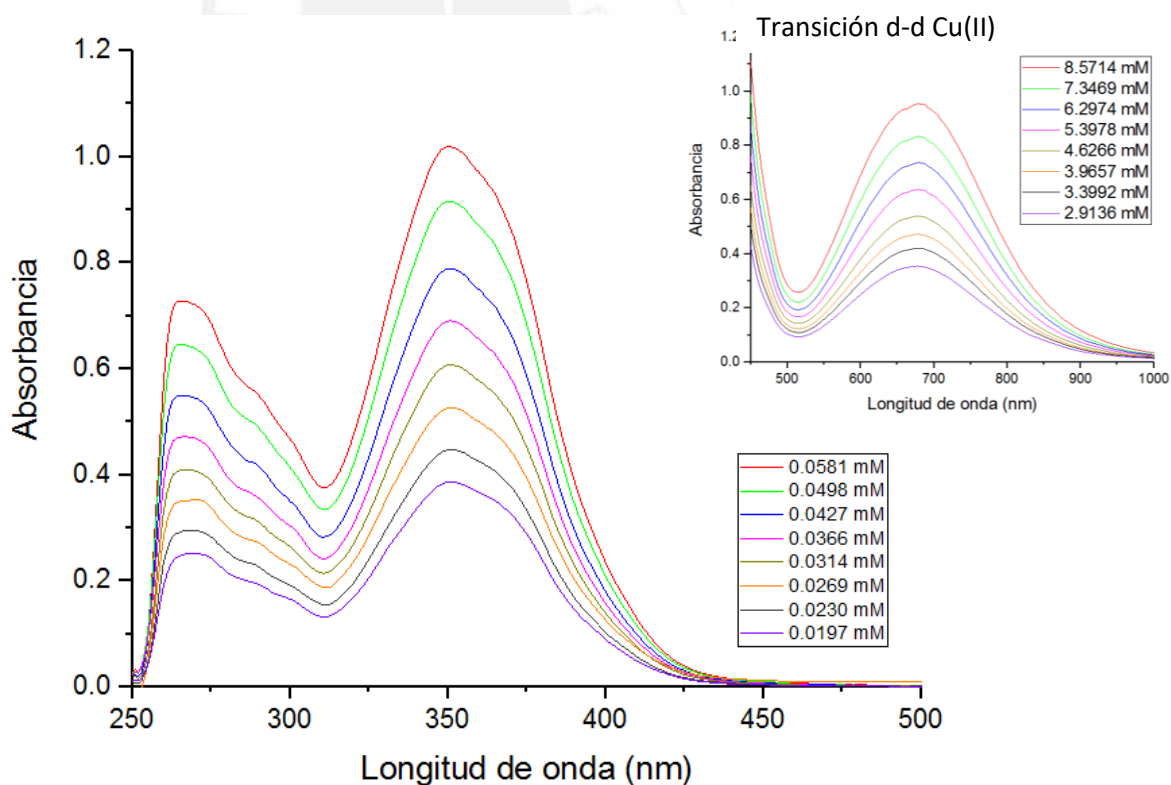
10.3.1. Espectro UV-Vis de ligando N-(7-hidroxi-8-cumarinilmetilén)glicina a diferentes concentraciones



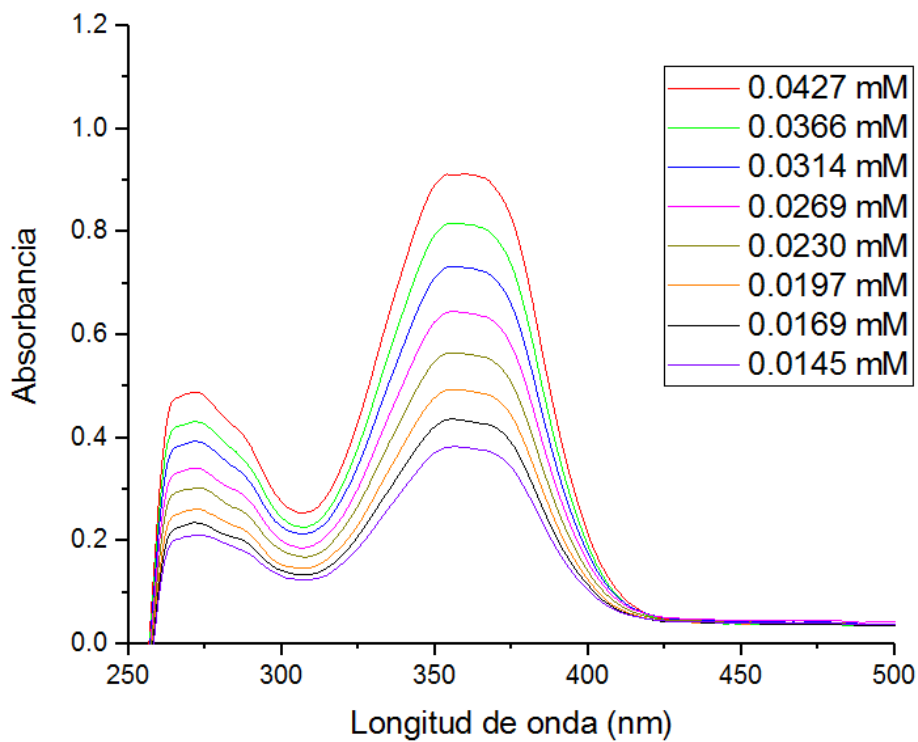
10.3.2. Espectro UV-Vis de Cu(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO a diferentes concentraciones



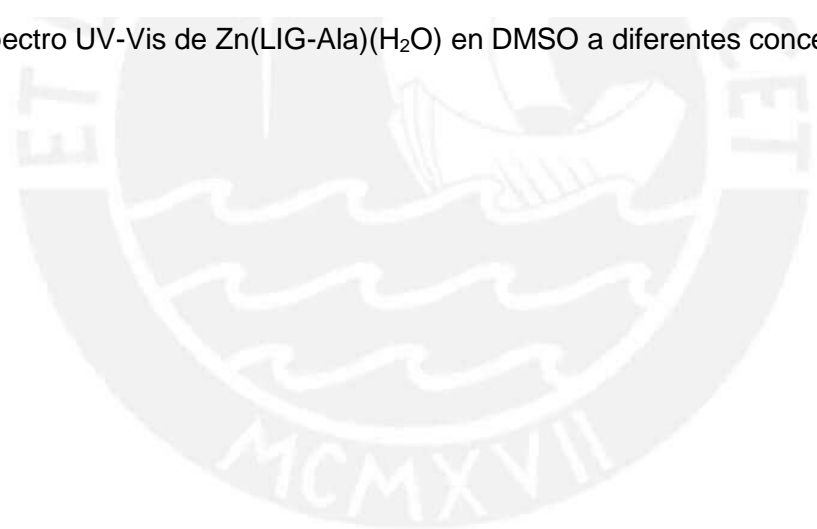
10.3.3. Espectro UV-Vis de Zn(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO a diferentes concentraciones



10.3.4. Espectro UV-Vis de Cu(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO a diferentes concentraciones



10.3.5. Espectro UV-Vis de Zn(LIG-Ala)(H₂O) en DMSO a diferentes concentraciones



ANEXO 10.4

CÁLCULO DE LA ABSORTIVIDAD MOLAR

Los valores de coeficiente de absorptividad molar para cada máximo de absorción se obtuvieron aplicando la ecuación de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bC$$

A = Absorbancia

ϵ = Coeficiente de Absortividad molar

b = Longitud del paso óptico = 1 cm

C = Concentración

El valor de la absorbancia obtenida a partir de una serie de concentraciones nos permite encontrar el valor del coeficiente de absorptividad molar para una determinada longitud de onda. Este valor puede ser obtenido como la pendiente de la gráfica de la absorbancia en función de la concentración. Un ejemplo de cálculo es mostrado en la **figura 10.3.6**, donde la pendiente de 33248 es obtenido a partir de los datos mostrados en la **tabla 10.3.6** y representa al valor del coeficiente de absorptividad molar para un máximo de absorbancia de 351 nm de una solución en DMSO del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O)

Tabla 10.3.6. Datos de absorbancia registrados para una cierta concentración molar del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO a temperatura ambiente

Compuesto	λ (nm)	Concentración (mol/L)	Absorbancia
Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)	351	0.0000289	1.0175
		0.0000248	0.9099
		0.0000212	0.7857
		0.0000182	0.6917
		0.0000156	0.5990
		0.0000134	0.5199
		0.0000115	0.4501
		0.0000098	0.3921

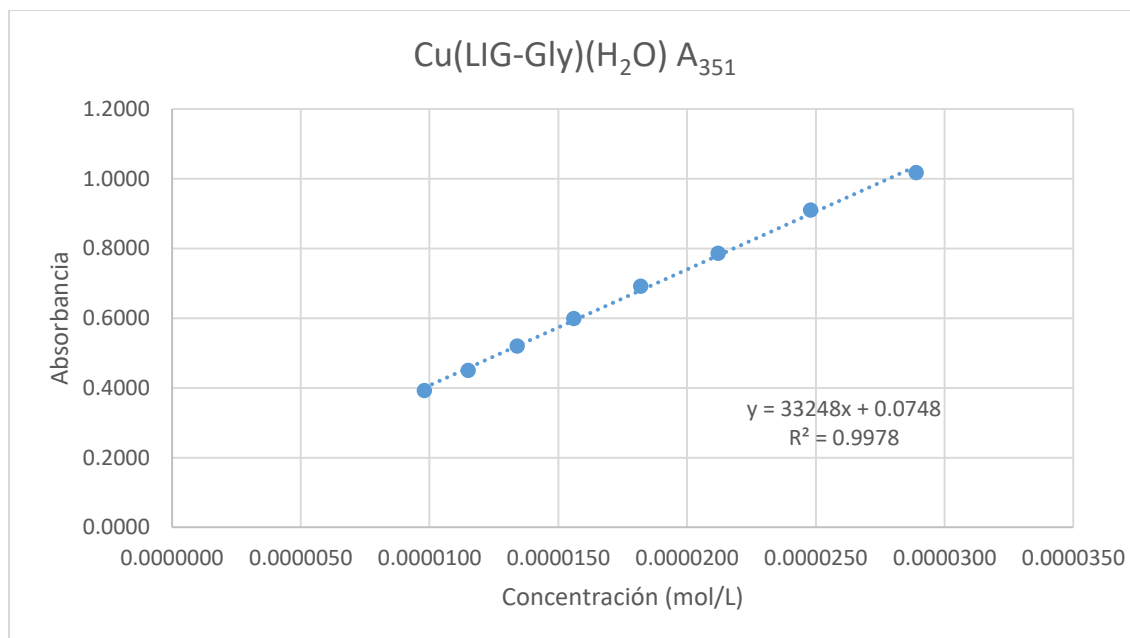
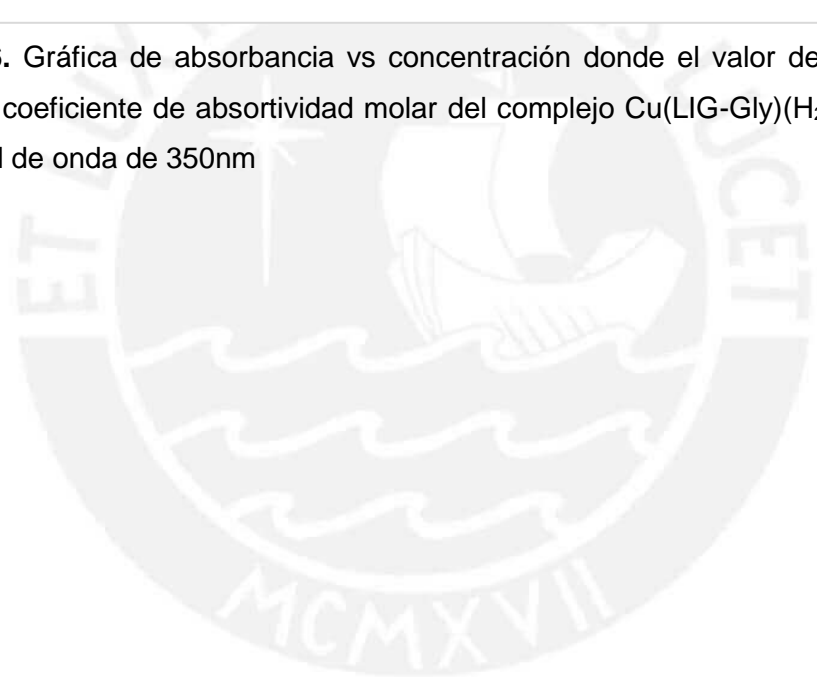


Figura 10.3.6. Gráfica de absorción vs concentración donde el valor de la pendiente representa el coeficiente de absorción molar del complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O) en DMSO a una longitud de onda de 350nm



ANEXO 10.5

PORCENTAJE DE CARBONO, NITRÓGENO E HIDRÓGENO OBTENIDO POR ANÁLISIS ELEMENTAL

UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACION Y LA INDUSTRIA (USAII)
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
EDIFICIO H "MARIO MOLINA"
AV. UNIVERSIDAD 3000, COL. COPILCO
C.P. 04510, MEXICO, D.F.
Phone: 56223899 ext 84040, 84041

Date of report	8/10/2017 11:11:19AM
User ID	M en C. Nayeli Lopez & M en I. Victor Lemus
Comments	Muestra: ZnLigGly Realizó: Victor Lemus

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
2215984112C	1.555	44.19%	1.91%	4.52%	0.02%	8/9/2017 4:18:01 PM
2215984112B	1.709	37.4%	1.78%	4.23%	-0.27%	8/2/2017 4:03:31 PM
2215984112A	1.626	42.88%	1.76%	4.5%	-0.29%	8/2/2017 3:56:38 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
Average	1.630	41.490	1.817	4.417	-0.180	
Variance	0.006	12.975	0.007	0.026	0.030	
Standard Deviation	0.077	3.602	0.081	0.162	0.173	

10.4.1. Porcentaje de carbono, nitrógeno e hidrógeno obtenidos para el complejo Zn(LIG-Gly)(H₂O)

UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACION Y LA INDUSTRIA (USAII)
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
EDIFICIO H "MARIO MOLINA"
AV. UNIVERSIDAD 3000, COL. COPILCO
C.P. 04510, MEXICO, D.F.
Phone: 56223899 ext 84040, 84041

Date of report	8/11/2017 1:42:58PM
User ID	M en C. Nayeli Lopez & M en I. Victor Lemus
Comments	Muestra: CuLigGly Realizo: Victor Lemus

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
7852984388A	2.361	41.65%	2.11%	4.29%	-0.06%	8/2/2017 3:37:00 PM
7852984388C	1.537	44.28%	2%	4.43%	0.04%	8/9/2017 4:11:15 PM
7852984388D	1.453	43.88%	2.02%	4.68%	-0.2%	8/10/2017 4:27:38 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
Average	1.784	43.270	2.043	4.467	-0.073	
Variance	0.252	2.008	0.003	0.039	0.015	
Standard Deviation	0.502	1.417	0.059	0.198	0.121	

10.4.2. Porcentaje de carbono, nitrógeno e hidrógeno obtenidos para el complejo Cu(LIG-Gly)(H₂O)

UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACION Y LA
INDUSTRIA (USAII)
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
EDIFICIO H "MARIO MOLINA"
AV. UNIVERSIDAD 3000, COL. COPILCO
C.P. 04510, MEXICO, D.F.
Phone: 56223899 ext 84040, 84041

Date of report	8/10/2017 1:42:48PM	
User ID	M en C. Nayeli Lopez & M en I. Victor Lemus	
Comments	Muestra: ZnLigAla	Realizó: Victor Lemus

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
4794986947A	1.747	41.85%	2.86%	4.27%	-0.31%	8/7/2017 1:44:56 PM
4794986947B	1.462	40.15%	2.78%	4.26%	-0.51%	8/7/2017 1:51:43 PM
4794986947C	1.544	42.38%	2.84%	4.01%	0.05%	8/9/2017 4:24:47 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
	Average	1.584	41.460	2.827	4.180	-0.257
	Variance	0.022	1.357	0.002	0.022	0.081
	Standard Deviation	0.147	1.165	0.042	0.147	0.284

10.4.3. Porcentaje de carbono, nitrógeno e hidrógeno obtenidos para el complejo Zn(LIG-Ala)(H₂O)

UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACION Y LA
INDUSTRIA (USAII)
FACULTAD DE QUIMICA, UNAM
EDIFICIO H "MARIO MOLINA"
AV. UNIVERSIDAD 3000, COL. COPILCO
C.P. 04510, MEXICO, D.F.
Phone: 56223899 ext 84040, 84041

Date of report	8/7/2017 6:20:26PM	
User ID	M en C. Nayeli Lopez & M en I. Victor Lemus	
Comments	Muestra: CuLigAla	Realizo: Victor Lemus

Run	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	Created on
4689985483B	1.548	43.99%	2.91%	4.12%	-0.4%	8/7/2017 1:38:09 PM
4689985483A	1.631	44.05%	3.23%	4.08%	-0.07%	8/7/2017 1:31:21 PM
	Weight	Carbon	Hydrogen	Nitrogen	Sulfur	
	Average	1.590	43.975	3.070	4.100	-0.235
	Variance	0.003	0.011	0.051	0.001	0.054
	Standard Deviation	0.059	0.106	0.226	0.028	0.233

10.4.4. Porcentaje de carbono, nitrógeno e hidrógeno obtenidos para el complejo Cu(LIG-Ala)(H₂O)

ANEXO 10.6

CONTENIDO DE METAL OBTENIDO POR ABSORCIÓN ATÓMICA

	Mean Signal	Conc.	Conc.	Standard	
ID	(Abs)	mg/L	mg/L	Deviation	%RSD
bk	0	0	0	0	28.69
Calib Std 1	0.1417	0.2	0.214	0	0.21
Calib Std 2	0.1745	0.3	0.264	0	1.2
Calib Std 3	0.2669	0.4	0.406	0	0.79
Calib Std 4	0.3278	0.5	0.501	0	0.53
Calib Std 5	0.3952	0.6	0.607	0	0.56
Calib Std 6	0.4561	0.7	0.704	0	0.71

Correlation Coef.: 0.995394 Slope: 0.67033 Intercept: 0.00000

Tabla 10.6.1. Datos obtenidos de la curva de calibrado para cinc(II):

	Mean Signal	Conc.	Conc.	Standard	
ID	(Abs)	mg/L	mg/L	Deviation	%RSD
BK	0	0	0	0	27.15
Calib Std 1	0.152	0.9	0.888	0	1.39
Calib Std 2	0.1717	1	1.007	0	0.54
Calib Std 3	0.1878	1.1	1.104	0	0.9
Calib Std 4	0.205	1.2	1.209	0	0.49
Calib Std 5	0.2193	1.3	1.297	0	0.82
Calib Std 6	0.2372	1.4	1.407	0	0.23
Calib Std 7	0.2524	1.5	1.501	0	0.3
Calib Std 8	0.2662	1.6	1.587	0	0.31

Correlation Coef.: 0.999370 Slope: 0.17566 Intercept: 0.00000

Tabla 10.6.2. Datos obtenidos de la curva de calibrado para cobre(II)

	Complejo Cu(LIG-Gly)(H ₂ O)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Peso de muestra (mg)	22	22	22
Concentración de cobre (mg/L) experimental	1.6	1.599	1.627
Dil. 1mL en 100mL	160	159.9	162.7
mg de Cu en 25mL de stock	4	3.9975	4.0675
Porcentaje de Cu (%) considerando Cu(LIG-Gly)(H₂O)	18.18	18.17	18.49

Tabla 10.6.3. Porcentaje de cobre obtenido para el compuesto Cu(LIG-Gly)(H₂O)

	Complejo Cu(LIG-Ala)(H ₂ O)	
	Muestra 1	Muestra 2
Peso de muestra (mg)	23	22
Concentración de cobre (mg/L) experimental	1.627	1.541
Dil. 1mL en 100mL	162.7	154.1
mg de Cu en 25mL de stock	4.0675	3.8525
Porcentaje de Cu (%) considerando Cu(LIG-Ala)(H₂O)	17.68	17.51

Tabla 10.6.4. Porcentaje de cobre obtenido para el compuesto Cu(LIG-Ala)(H₂O)

	Complejo Zn(LIG-Gly)(H ₂ O)		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Peso de muestra (mg)	15	15.2	15.2
Concentración de cinc (mg/L) experimental	0.449	0.453	0.457
Dil. 1mL en 25mL	11.225	11.325	11.425
Dil. 1mL en 25mL	280.625	283.125	285.625
mg de Zn en 10mL de stock	2.80625	2.83125	2.85625
Porcentaje de Zn (%) considerando una composición Zn(LIG-Gly)(H₂O)	18.71	18.63	18.79

Tabla 10.6.5. Porcentaje de cinc obtenido para el compuesto Zn(LIG-Gly)(H₂O)

	Complejo Zn(LIG-Ala)(H ₂ O)	
	Muestra 1	Muestra 2
Peso de muestra (mg)	15	15
Concentración de cinc (mg/L) experimental	0.432	0.435
Dil. 1mL en 25mL	10.8	10.875
Dil. 1mL en 25mL	270	271.875
mg de Zn en 10mL de stock	2.7	2.71875
Porcentaje de Zn (%) considerando una composición Zn(LIG-Ala)(H₂O)	18.00	18.125

Tabla 10.6.6. Porcentaje de cinc obtenido para el compuesto Zn(LIG-Ala)(H₂O)