



# UNIVERSIDAD DE GRANADA

COMPLEJOS METÁLICOS DE DERIVADOS  
TRIAZOLOPIRIMIDÍNICOS Y 7-DEAZAPURINAS:  
CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL, ACTIVIDAD  
ANTIPARASITARIA Y METALIZACIÓN DE  
OLIGONUCLEÓTIDOS

TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN EUROPEA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA

José Manuel Méndez Arriaga

24 de Noviembre de 2017

Editor: Universidad de Granada, Tesis Doctorales  
Autor: José Manuel Méndez Arriaga  
ISBN: 978-84-9163-725-7  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48941>

El doctorando / The *doctoral candidate* **D. José Manuel Méndez Arriaga** y los directores de la tesis / and the thesis supervisor/s: **Dr. Miguel Ángel Galindo Cuesta y Dr. Joaquín Isac García**

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

*Guarantee, by signing this doctoral thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisor/s and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.*

Lugar y fecha / Place and date:

Granada, a 24 de noviembre de 2017

Director/es de la Tesis /  
*Thesis supervisor/s:*

Doctorando /  
*Doctoral candidate:*

Firma / Signed

Firma / Signed



# Índice



<b>Abreviaturas y Acrónimos</b>	<b>1</b>
<b>Resumen / Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>9</b>
1.1. Estructura general de ligandos biomiméticos a las purinas	13
1.2. Derivados 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidínicos	16
1.2.1. Reactividad como ligandos	16
1.2.2. Actividad farmacológica	18
1.3. Derivados 7-deazapurínicos	20
1.3.1. Reactividad como ligandos	21
1.4. ADN como nanomaterial tecnológico	22
1.5. Funcionalización del ADN	27
1.5.1. Formación de pares de bases mediados por metal	29
1.5.2. Derivados 7-deazapurínicos en la formación de pares de bases mediados por iones metálicos	36
1.6. Aplicaciones tecnológicas de los pares de bases mediados por metal	40
1.7. Justificación y objetivos	40
1.8. Bibliografía	42
<b>2. Derivados triazolopirimidínicos. Síntesis y caracterización.</b>	<b>47</b>
2.1. Ligandos previos	51
2.1.1. 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (tp)	51
2.1.2. 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (dmtp)	52
2.1.3. 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (7-atp)	53
2.1.4. 5-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (5HtpO) y 7-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (7HtpO)	54

2.1.5. 7-hidroxi-5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (HmtpO)	55
2.1.6. 5,7-dioxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (H <sub>2</sub> tpO <sub>2</sub> )	57
2.2. 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (HftpO)	58
2.2.1. Síntesis	59
2.2.2. Estructura	59
2.2.3. Espectroscopía IR y UV-Vis	63
2.2.4. Resonancia Magnética Nuclear ( <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C-RMN)	64
2.2.5. Espectrometría de masas	66
2.2.6. Análisis térmico (TG y DSC)	67
2.3. Derivados triazolopirimidínicos clorados	67
2.3.1. Síntesis	67
2.3.2. Estructura	68
2.3.3. Caracterización espectroscópica	70
2.4. Bibliografía	72
<b>3. Complejos metálicos con 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina</b>	<b>73</b>
3.1. Complejos con metales divalentes	75
3.1.1. Síntesis	75
3.1.1.1. M(ftpO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub>	75
3.1.1.2. Cu[(ftpO) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]·H <sub>2</sub> O	76
3.1.2. Descripción estructural	78
3.1.3. Caracterización espectroscópica y térmica	83
3.1.3.1. IR	83
3.1.3.2. Análisis térmico	85
3.2. Complejos de iones lantánidos trivalentes Ln(III)	88
3.2.1. Síntesis	88
3.2.2. Descripción estructural	90
3.2.3. Caracterización espectroscópica y térmica	90
3.2.3.1. IR	90
3.2.3.2. Análisis térmico	90
3.3. Bibliografía	94



<b>4. Nuevos complejos metálicos con 7atp</b>	<b>95</b>
4.1. Complejos con 7atp	97
4.1.1. Síntesis	98
4.1.1.1. $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	98
4.1.1.2. $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	98
4.1.2. Descripción estructural	99
4.1.3. Caracterización espectroscópica y térmica	103
4.1.3.1. IR	103
4.1.3.2. Análisis térmico	106
4.2. Bibliografía	108
<b>5. Estudios de actividad antiparasitaria</b>	<b>109</b>
5.1. Leishmaniasis	112
5.2. Enfermedad de Chagas	114
5.3. Estudios <i>in vitro</i>	116
5.3.1. Actividad antiproliferativa	117
5.3.2. Citotoxicidad	118
5.3.3. Índice de selectividad	120
5.4. Bibliografía	123
<b>6. Ag(I) interaction between double stranded DNA</b>	<b>125</b>
6.1. Ag(I) complexes	128
6.1.1. Synthesis	129
6.1.2. Crystallographic data	129
6.2. Interaction studies of Ag(I) ions towards oligonucleotides $^{7\text{C}}$ A-T base pairs. Previous studies (poly( $^{7\text{C}}$ A-T) <sub>9</sub> )	138
6.3. Interaction studies of Ag(I) ions towards oligonucleotides containing $^{7\text{C}}$ G-C base pairs	143
6.3.1. Thermal stability studies	144
6.3.2. Circular dichroism studies	147
6.3.3. UV studies	151
6.4. Ag: poly15( $^{7\text{C}}$ A)+poly15(T) interaction studies	153
6.4.1. Thermal stability studies	154

6.4.2. UV studies	154
6.4.3. Circular dichroism studies	156
6.4.4. Fluorescence studies	157
6.5. Bibliography	163
<b>7. Additional work and future perspectives</b>	<b>165</b>
7.1. Additional work with 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives	167
7.1.1. Ln(HtpO <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> series	167
7.1.2. 7atp, dmtp and HmtpO complexes	168
7.1.3. Antitumoural activity	170
7.1.4. Magnetic properties	170
7.2. Additional work with novel systems metallo-DNA	171
7.2.1. Ag:poly( <sup>7</sup> C-G-C) interaction studies	171
7.2.2. Hg(II) interactions	171
7.2.3. NMR duplex studies	172
7.3. Scientific publications	172
7.4. Contributions in national and International conferences	173
7.5. Bibliography	176
<b>8. Conclusiones</b>	<b>177</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>185</b>
<b>ANEXO I: Triazolopyrimidine complexes with antiparasitic activity</b>	<b>187</b>
<b>ANEXO II: Characterization</b>	<b>193</b>
<b>ANEXO III: Crystallographic data</b>	<b>211</b>
<b>ANEXO IV: Methodology</b>	<b>217</b>

## Abreviaturas y Acrónimos

<sup>7c</sup> A	7-deazaadenina
A	Adenina
AE	Análisis elemental
ATA	3-amino-1,2,4-triazol
atm	Atmósfera (unidad de presión)
7atp	7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina
BAE	Bencilacetato de etilo
BP	Tampón fosfato
C	Citosina
CD	Dicroísmo circular ( <i>Circular Dichroism</i> )
DCM	Diclorometano
dmtp	5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina
DRX	Difracción de Rayos X
DSC	Calorimetría diferencial de barrido ( <i>Differential Scanning Calorimetry</i> )
EM	Espectrometría de masas
equiv.	Equivalente
EtOH	Etanol
<sup>7c</sup> G	7-deazaguanina
G	Guanina
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución ( <i>High Resolution Mass Spectrometry</i> )
HftpO	7-hidroxi-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina ó 5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidin-7(4H)-ona
HmtpO	7-hidroxi-5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina ó 5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidin-7(4H)-ona
H <sub>2</sub> tpO <sub>2</sub>	4,5,6,7-tetrahidro-5,7-dioxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina
5HtpO	5-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina ó 4,5-dihidro-5-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición 50%
IR	Espectroscopía de infrarrojo
IS	Índice de selectividad
IUPAC	<i>International union of pure and applied chemistry</i>
MeOH	Metanol
MOPS	3-(N-Morfolino) propano sulfonato

<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>P<sub>m</sub></b>	Peso molecular
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>T</b>	Timina
<b>T<sup>a</sup></b>	Temperatura
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de desnaturalización ( <i>Melting Temperature</i> )
<b>TG</b>	Termogravimetría ( <i>Thermogravimetry</i> )
<b>tp</b>	1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina
<b>ua</b>	Unidades arbitrarias
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopía ultravioleta-visible

RESUMEN  
ABSTRACT



Tanto los derivados triazolopirimidínicos como los ligandos deazapurinicos son modelos de las nucleobases constituyentes de ácidos nucleicos que modifican los patrones de coordinación clásicos de las nucleobases naturales. Así mismo, estos compuestos pueden actuar como ligando en procesos de coordinación con metales, dando lugar a una amplia variedad de complejos metálicos. Es por ello que se han seleccionado este tipo de moléculas y los compuestos metálicos derivados de ellas para evaluar su potencial actividad biológica, concretamente su efectividad como fármaco antiparasitario, así como su importancia en la formación de sistemas metal-ADN, que nos permiten funcionalizar pares de bases en dobles hélices de ADN dando lugar a hilos molecular es con novedosas propiedades.

En primer lugar, se sintetizan una serie derivados triazolopirimidínicos que una vez caracterizados espectroscópicamente, se procede a estudiar su comportamiento como ligandos frente a diversos iones metálicos de transición. Para ello, se utilizan métodos de síntesis convencionales y no convencionales. Una vez analizados los complejos y establecida su pureza se procede a la caracterización espectroscópica utilizando para ello las técnicas de IR, UV y RMN. Se estudia también la estabilidad térmica de los complejos aislados, utilizando las técnicas de termogravimetría y calorimetría diferencial de barrido. En el caso de monocristales aislados de algunos de los complejos, se procede a determinar sus estructuras mediante la técnica de difracción de Rayos X.

La *leishmaniasis* y la enfermedad de Chagas son enfermedades que afectan sustancialmente en las regiones tropicales y subtropicales a un elevado número de personas causando mortalidad y problemas económicos. Los principales fármacos utilizados actualmente para combatir la *leishmaniasis* son derivados antimoniales que producen diversos efectos secundarios. Por otra parte, la administración del fármaco es difícil ya que bajas dosis favorecen la resistencia en el parásito y elevadas dosis son tóxicas. En el caso de la enfermedad de Chagas, los principales fármacos que se utilizan en la actualidad son heterociclos nitroaromáticos, compuestos que tienen también serios efectos secundarios. El diseño de nuevos fármacos activos frente a las diversas formas de estas enfermedades parasitarias es una necesidad urgente.

Por otra parte, el estudio de la interacción de los derivados triazolopirimidínicos con iones de plata(I) nos ha permitido aislar una serie de complejos de coordinación en los que se observó, mediante difracción de

Rayos X, que estas moléculas se coordinan a los iones plata(I) de forma lineal. Este hecho nos hizo pensar que podríamos utilizar nuevos ligandos de tipo 7-deazaAdenina ( ${}^7\text{C}\text{A}$ ) y 7-deazaGuanina ( ${}^7\text{C}\text{G}$ ), análogos a las triazolopirimidinas, para interactuar con dichos iones plata(I) originando pares de bases mediadas por metales que podrían tener importantes aplicaciones biotecnológicas. Las nucleobases artificiales  ${}^7\text{C}\text{A}$  y  ${}^7\text{C}\text{G}$  se diferencian de sus homólogas canónicas (Adenina y Guanina) en que un grupo CH sustituye el átomo N7, sin perder las propiedades de reconocimiento naturales. Debido a ello, se favorece la interacción de iones metálicos al átomo N1, localizado en la cara Watson Crick. Por tanto, es posible formar pares de bases de tipo  ${}^7\text{C}\text{A-T}$  y  ${}^7\text{C}\text{G-C}$  mediante la formación de enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick, y posteriormente sustituir un enlace de hidrógeno por un enlace de coordinación, dando lugar a pares de bases mediadas por iones metálicos. Esta estrategia puede dar lugar a un importante desarrollo nano-tecnológico basado en sistemas metal-ADN, ya que los iones metálicos confieren un conjunto de propiedades físicas y químicas únicas. La caracterización de dichas propiedades se realiza en disolución por diversas técnicas, tales como dicroísmo circular, espectroscopia UV-visible, infrarroja, de fluorescencia, de masas con ionización por electrospray y por desorción/ionización láser asistida por matriz, resonancia magnética nuclear, microscopía de fuerzas atómicas, cromatografía de HPLC y electroforesis.



Both triazolopyrimidine and deazapurine derivatives are nucleobase models which modify the classical coordination patterns of natural nucleobases. Likewise, these compounds can act as ligand in coordination processes with metals, giving rise to a wide variety of metal complexes. For this reason, this type of molecules and their metal complexes have been selected to evaluate their potential biological activity, namely their effectiveness as antiparasitic drug, as well as their importance in the formation of metal-DNA systems, which allow to functionalize base pairs in DNA duplex giving rise to molecular wires is with novel properties.

First, a series of new triazolopyrimidine derivatives were synthesized characterized and their behaviour as ligands was studied against various transition metal ions. For this, conventional and non-conventional synthesis methods were used. Once the complexes were analysed and established their purity, the spectroscopic characterization was carried out using IR, UV and NMR spectroscopy techniques. Thermal stability was also studied, using thermogravimetry and differential scanning calorimetry. The structure of single crystals was determined by the X-ray diffraction technique, which gives a view of the structural characteristics of these compounds.

Leishmaniasis and Chagas disease are illnesses that affect a large number of people in tropical and subtropical regions, causing mortality and economic problems. The main drugs currently used to fight leishmaniasis are antimonial derivatives that produce various side effects. On the other hand, administration of the drug is difficult, low doses favour the parasite resistance and high doses are toxic. For Chagas disease, the main drugs used today are nitroaromatic heterocycles, compounds that also have serious side effects. The design of new drugs active against various forms of these parasitic diseases is an urgent need.

On the other hand, the study of the interaction of the triazolopyrimidine derivatives with silver (I) ions allowed isolate a series of coordination complexes, where the X-ray diffraction shows that these molecules coordinate with ions silver (I) in a linear fashion. This fact made us think that we could use new 7-deazaAdenine ( ${}^7\text{C}\text{A}$ ) and 7-deazaGuanine ( ${}^7\text{C}\text{G}$ ) ligands, analogous to triazolopyrimidines, to interact with silver (I) ions to give metal-mediated base pairs that could have important biotechnological applications. Artificial nucleobases  ${}^7\text{C}\text{A}$  and  ${}^7\text{C}\text{G}$  differ from their canonical homologous (Adenine and Guanine) in one CH group which replaces the N7 atom, keeping the natural recognition properties. Because

of this, the interaction of metal ions to the N1 atom, located in the Watson Crick face, is favoured. It is also possible to form <sup>7C</sup>A-T and <sup>7C</sup>G-C type base pairs by the formation of hydrogen bonds Watson-Crick type, and substitute a hydrogen bond for a coordination bond, resulting in base pairs mediated by metal ions. This strategy can lead to important nanotechnological development based on metal-DNA systems, since the metallic ions confer a set of unique physical and chemical properties. The characterization of these properties is performed in solution by various techniques, such as circular dichroism, UV-visible, IR, fluorescence, mass spectroscopy, nuclear magnetic resonance, atomic forces, HPLC chromatography and electrophoresis.

# CAPÍTULO 1

## Introducción



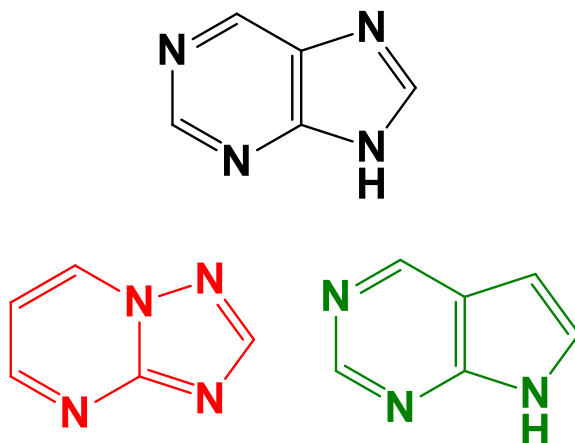
Los iones metálicos han jugado desde siempre un importante papel en los sistemas biológicos; no solo desde un punto de vista inorgánico, como pueden ser por ejemplo las sales minerales esenciales para la vida por su empleo en la formación de tejidos del cuerpo humano, la elaboración de hormonas, el rol fundamental en procesos neuromusculares o acciones reguladoras de funciones biológicas; si no que también se producen asociaciones entre iones metálicos y sistemas biológicos, cuyo estudio ha dado lugar a lo que se conoce como Química Bioinorgánica.

La evolución de la Química Bioinorgánica se ha visto influida por múltiples factores en los últimos años, ya que se trata de una disciplina relativamente joven y en continua evolución. Entre dichos factores se puede citar el estudio de la interacción entre iones metálicos y péptidos, nucleótidos, hormonas o vitaminas; estudios enfocados en el intento de comprensión de procesos fundamentales para la vida como pueden ser la acumulación, transporte, metabolismo y toxicidad de los iones metálicos en sistemas biológicos; la síntesis biomimética de sistemas con el objeto de entender los procesos biológicos naturales y crear sistemas catalíticos más eficientes; la determinación estructural eficiente de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas; o el empleo de la ingeniería macromolecular para desarrollar a voluntad nuevos sistemas biológicamente relevantes.

Centrándonos en el desarrollo de modelos biomiméticos para intentar comprender mejor cómo interactúan los iones metálicos con los sistemas orgánicos en los que se integran, uno de los ejemplos más comunes es el uso de derivados análogos a las moléculas presentes de forma natural en el organismo, tales como ácidos nucleicos, hormonas o proteínas.

Los derivados triazolopirimidínicos (**Figura 1.1**, rojo) y deazapurínicos (**Figura 1.1**, verde) son considerados modelos biomiméticos de las nucleobases púricas naturales o también llamadas canónicas (**Figura 1.1**, negro). Estas bases nitrogenadas son la unidad estructural de los ácidos nucleicos, tienen carácter aromático y una configuración plana, que facilita el apareamiento entre bases. Los modelos biomiméticos citados se utilizan para estudiar la reactividad de las nucleobases, ya que modifican los patrones de coordinación clásicos con la variación de la posición o sustitución de los átomos de nitrógeno, así como la inclusión de diferentes grupos sustituyentes en las posiciones libres. Debido a esto, al actuar como ligandos en procesos de coordinación, estas moléculas modelo generan una amplia variedad de complejos metálicos. Es por ello que se ha seleccionado

este tipo de ligandos y los complejos derivados de ellos para evaluar tanto su potencial actividad biológica, concretamente su efectividad como fármacos antiparasitarios; así como estudiar su importancia en la formación de sistemas metal-ADN.

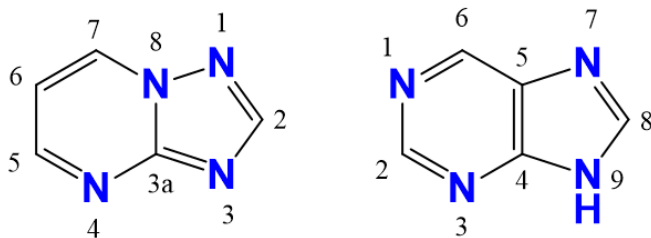


**Figura 1.1.** Comparación entre los esqueletos básicos de nucleobases púricas (negro), triazolopirimidinas (rojo) y deazapurinas (verde).

En este capítulo introductorio se habla sobre la estructura general de los ligandos biomiméticos seleccionados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, centrándose posteriormente en los antecedentes bibliográficos tanto de triazolopirimidinas como de deazaguaninas y finalizando con una visión general del empleo de estos derivados tanto en farmacología como en el desarrollo de nano-materiales basados en ADN.

## 1.1. Estructura general de ligandos biomiméticos a las purinas

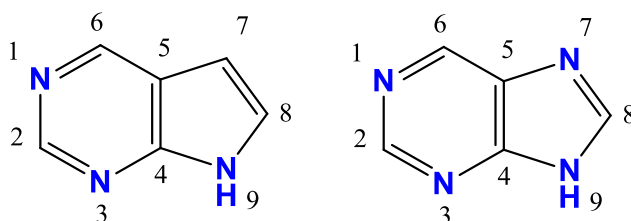
Las 1,2,4-triazolopirimidinas son heterociclos bicíclicos nitrogenados que se forman a partir de la condensación de un anillo de 1,2,4-triazol y un anillo de pirimidina. Dependiendo de la orientación relativa de ambos anillos, pueden surgir cuatro familias isoméricas diferentes: 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidinas, 1,2,4-triazolo[1,5-c]pirimidinas, 1,2,4-triazolo[4,3-a]pirimidinas y 1,2,4-triazolo[4,3-c]pirimidinas. El isómero [1,5-a] es el más estable termodinámicamente y por lo tanto, el más estudiado de las cuatro conformaciones. Como puede observarse en la **Figura 1.2**, las 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidinas poseen una gran similitud estructural con las purinas; sólo se diferencian por la presencia de un átomo de nitrógeno en una posición de cabeza de puente entre heterociclos, unido a la desaparición del protón H ácido del anillo de cinco miembros.



**Figura 1.2.** Estructura básica de las 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidinas (izquierda) y purinas (derecha) numerada con los sistemas de la IUPAC y bioquímico, respectivamente.

Esta similitud estructural hizo pensar que las triazolopirimidinas podrían ser unas excelentes candidatas para realizar ensayos de actividad biológica, junto con los complejos metálicos obtenidos a partir de ellas, ya que no deberían presentar problemas de toxicidad. Además, el hecho de disponer de 3 átomos de nitrógeno libres para coordinarse, así como la posibilidad de introducir distintos tipos de sustituyentes en las posiciones 2, 5, 6 y 7, ha permitido el desarrollo de una gran familia de ligandos basados en la 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina con un amplio abanico de vías de coordinación y reactividad.

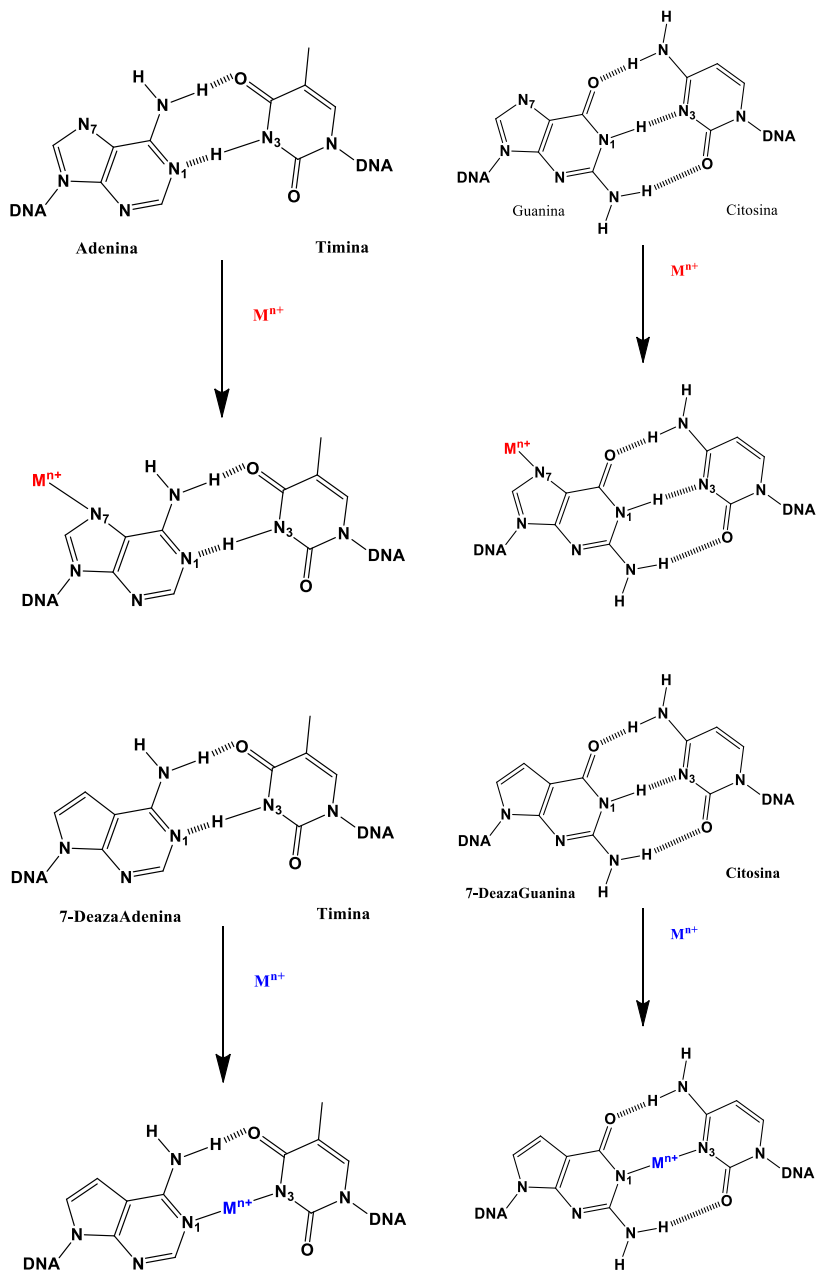
Respecto a las 7-deazapurinas, se pueden considerar como modificaciones sencillas de las purinas canónicas en las cuales se ha sustituido el átomo de nitrógeno en posición 7 por un grupo CH (**Figura 1.3**). Este cambio permite evitar la complejación vía N7, que es la preferente en las purinas a pH neutro y básico, manteniendo su reactividad como ligando en la formación de complejos metálicos por las posiciones N1 y N3, disponibles para coordinarse con centros metálicos preferentemente.



**Figura 1.3.** Estructura básica de las 7-deazapurinas (izquierda) y purinas canónicas (derecha) numerada con el sistema bioquímico.

Además, a pesar de la modificación en posición 7, los derivados 7-deazaadenina ( ${}^7\text{C}A$ ) y 7-deazaguanina ( ${}^7\text{C}G$ ) pueden formar enlaces de hidrógeno tipo Watson-Crick (W-C) con las bases pirimidínicas naturales Timina (T) y Citosina (C) respectivamente, comportándose de igual forma que si fueran nucleobases canónicas. De hecho, esta posibilidad de enlace W-C se ve incluso favorecida en detrimento del apareamiento por las caras externas del par de bases (cara Hoogsten) por la ausencia del átomo de nitrógeno en N7. Dichos enlaces de hidrógeno W-C pueden ser sustituidos fácilmente por enlaces de coordinación sin afectar a la organización final de una doble hebra de ADN y no viéndose atraídos por la posición N7 más favorable (**Figura 1.4**), lo que facilitará el desarrollo de nanohilos moleculares con pares de bases mediados por un metal (concretamente Ag(I) en el presente trabajo) que introducen propiedades no inherentes al ADN en este tipo de sistemas.





**Figura 1.4.** Esquema de la interacción de iones metálicos ( $M^{n+}$ ) en pares de bases presentes en moléculas de ADN natural, A-T y G-C (arriba, rojo), y en moléculas de ADN modificado con las nucleobases 7-deazapurina que se emplean en esta tesis doctoral,  ${}^7C$ A-T y  ${}^7C$ G-C (abajo, azul).

Dada la gran importancia de este tipo de ligandos como modelos de nucleobases, unido a la versatilidad de potenciales aplicaciones tanto de los ligandos aislados como de sus complejos metálicos, a continuación se revisarán los antecedentes bibliográficos de los dos tipos de familias biomiméticas a tratar en la presente Tesis Doctoral. Así mismo, se discutirán los más recientes usos de triazolopirimidinas en el campo de la Bioinorgánica y de las deazapurinas en el de la nanotecnología de ADN, ya que ambos son los objetivos finales del estudio de las interacciones de estos compuestos con centros metálicos.

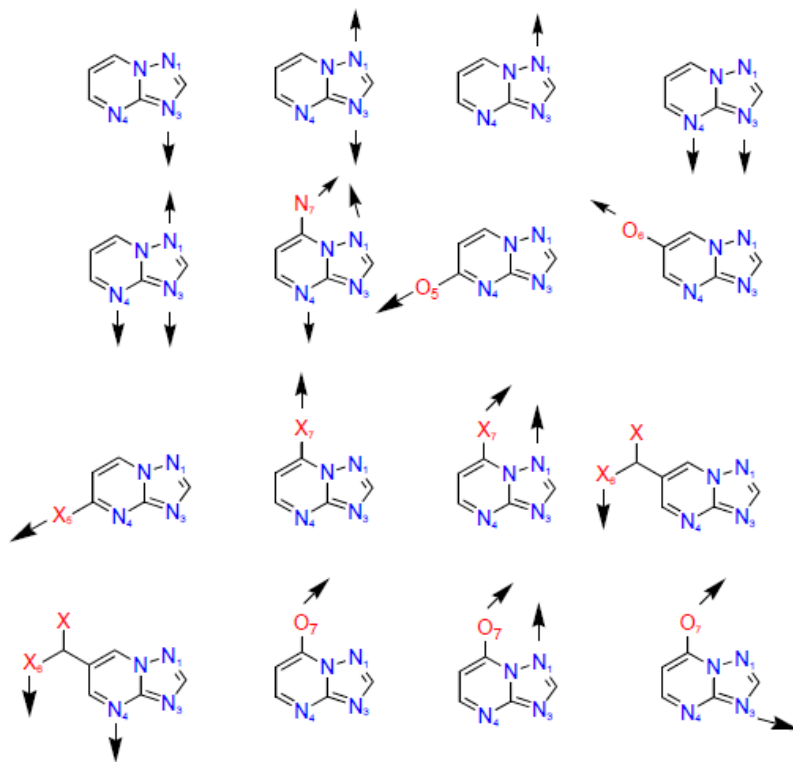
## 1.2. Derivados 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidínicos

Esta familia de ligandos se conoce desde 1909, cuando Bulow y Haas publicaron la síntesis de algunos derivados basados en triazolopirimidinas [1]. Su capacidad complejante fue estudiada por primera vez por Birr [2], quien utilizó la 5-metil-7-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina para estabilizar emulsiones fotográficas de plata. A partir de entonces, el estudio de los derivados triazolopirimidínicos experimenta un gran auge encontrándose interesantes aplicaciones de estas moléculas en áreas como la medicina y la agricultura [3].

### 1.2.1. Reactividad como ligandos

Los derivados triazolopirimidínicos han demostrado ser excelentes y versátiles ligandos, considerándose a sus complejos de coordinación como modelos de las interacciones metal-ligando en sistemas biológicos [4-6]. Las 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidinas poseen en su estructura básica tres potenciales posiciones de coordinación (N1, N3 y N4), que junto a la existencia de heteroátomos tales como nitrógeno, oxígeno o halógenos en las posiciones sustituyentes del anillo, aumenta tanto el número como la variedad de vías de coordinación. Además, dichos modos de coordinación pueden verse afectados por la presencia de ligandos auxiliares que pueden interactuar, mediante efectos electrónicos o estéricos tanto con los propios ligandos como con los centros metálicos [7-9]. Sin embargo, la coordinación a través de la posición N3 de forma monodentada y a través de N3,N4 en forma de puente prevalecen sobre el resto como modos de coordinación preferentes en este tipo de derivados triazolopirimidínicos

frente a la mayoría de los iones metálicos de transición. Los modos de coordinación descritos hasta el momento que los derivados triazolopirimidínicos presentan en los complejos metálicos pueden observarse en la **Figura 1.5**.



**Figura 1.5.** Modos de coordinación de ligandos triazolopirimidínicos.

Tanto la 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**tp**) [10], que es el derivado triazolopirimidínico más simple, como su derivado 5,7-dimetilado (**dmtp**) [11] poseen las tres posiciones potenciales de coordinación (N1, N3 y N4) libres, posibilitando a priori diferentes modos de coordinación: tres monodentados, tres bidentados y uno tridentado. La presencia de átomos donores exocíclicos en este tipo de compuestos puede aumentar el número de posiciones de coordinación, como sucede en el caso de la 5-metil-7-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina **HmtpO** [12] y de la 5,7-dioxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**H<sub>2</sub>tpO<sub>2</sub>**) [13], que contienen átomos de oxígeno como posiciones de coordinación adicionales. Otro tipo de

oxoderivados son la 5-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**5HtpO**) y la 7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**7HtpO**) [14], ambos isómeros de la base púrica hipoxantina. Pero no solo la introducción del oxígeno como heteroátomo está presente en los derivados triazolopirimidínicos más empleados, existe también la 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**7atp**) [15], que posee un grupo amino en posición 7. La estructura y características de todos estos ligandos se estudiarán en profundidad en el Capítulo 2, así como la necesaria discusión de antecedentes para situar en contexto la síntesis y caracterización de un nuevo ligando triazolopirimidínico, la 5-fenil-7-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**HftpO**)

Los ligandos citados han dado lugar a una multitud de complejos metálicos, ya sea con metales de la primera serie de transición como Cu(II), Co(II), Ni(II) o Zn(II) [16-19], otros metales de transición como Ag(I), Pt(II), Pt(IV), Pd(II) [20-26] o iones lantánidos [27]. La gran variedad de modos de coordinación de estos compuestos hace que hoy en día se sigan analizando las interesantes propiedades de este tipo de ligandos, especialmente desde el punto de vista estructural, magnético y biológico [28-32], previamente estudiadas en ligandos púricos [33-34].

Debido a la enorme cantidad de complejos triazolopirimidínicos que se describen en bibliografía, a modo de ejemplo se recoge en el **ANEXO I** una lista de los compuestos derivados de la 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina cuya actividad antiparasitaria ha sido estudiada hasta la fecha. En los Capítulos 3 y 4 de la presente Tesis Doctoral se estudian en profundidad los nuevos complejos triazolopirimidínicos obtenidos a partir del nuevo ligando **HftpO** y del ya caracterizado **7atp**.

### 1.2.2. Actividad farmacológica

Una de las estrategias más extendidas para desarrollar nuevos fármacos que sean potencialmente mejores que los ya existentes, consiste en utilizar una molécula orgánica que se esté empleando como droga comercial e introducir un centro metálico, con el fin de potenciar tanto la bioactividad y las propiedades farmacológicas como evitar los mecanismos de resistencia desarrollados [35-40]. Fue en 1969 cuando Rosenberg empleó por primera vez el *cis*-diaminodichloruro platino (II) (más conocido como *cis-platino*) para evaluar su actividad antitumoral [41], comenzando así una nueva disciplina dentro de la Química Inorgánica en la que se empleaban complejos

metálicos en Medicina, ya fuera en terapia o en diagnóstico. Partiendo de este concepto, el uso de complejos metálicos en la búsqueda de propiedades biológicas ha ido ampliando su rango de aplicaciones, tanto en el tratamiento de enfermedades, ya que además del cáncer los complejos triazolopirimidínicos pueden englobar usos como antiinflamatorios, antipiréticos, antifúngicos, bactericidas, etc..., como otros usos de interés industrial y/o social como pueden ser pesticidas, plaguicidas, fungicidas, etc [42,43].

Basándose en esta idea, en los últimos años se ha aplicado la química de la coordinación de los derivados triazolopirimidínicos en la lucha contra enfermedades parasitarias, principalmente frente a la leishmaniasis [44] y la enfermedad de Chagas [45]. Ambas son enfermedades que afectan a un gran número de individuos en regiones tropicales y subtropicales mayormente, causando altos ratios de mortalidad y serios problemas económicos. Los principales fármacos utilizados actualmente para combatir la leishmaniasis son el Pentostam (estibogluconato de sodio) y el Glucantime (meglumineantimoniato). Sin embargo, los compuestos antimoniales causan diversos efectos secundarios como náuseas, diarrea, erupciones de piel, mareo, arritmia cardíaca, hipotensión, hepatitis y pancreatitis. Por otra parte, la administración del fármaco es difícil, ya que bajas dosis favorecen la resistencia en el parásito y elevadas proporciones son tóxicas. Recientemente otros fármacos han sido ensayados destacando las Pentamidinas, que sólo son efectivas frente a la leishmaniasis cutánea y, aunque mejor toleradas, causan diabetes mellitus cuando se emplean en altas dosis. Fluconazol, Anfotericina B y Miltefosina se utilizan contra la leishmaniasis visceral y, a pesar de presentar menor toxicidad que los fármacos anteriores, su eficacia es limitada frente a otras formas de la enfermedad. En el caso de la enfermedad de Chagas, los principales fármacos que se utilizan en la actualidad son dos heterociclos nitroaromáticos: el Nifurtimox (derivado de furano) y el Benznidazol (derivado de imidazol). Ambos fármacos son efectivos en la fase aguda de la enfermedad, aunque el Benznidazol presenta un mayor perfil de eficacia y seguridad, pero su efectividad, al igual que la del Nifurtimox, es muy baja en la fase crónica. Además, estos compuestos tienen serios efectos secundarios como pérdida de peso, náuseas y dermatopatía alérgica. Los problemas que presentan los fármacos antes mencionados hacen que se requieran urgentemente nuevos compuestos menos tóxicos y más selectivos. El diseño de nuevos fármacos activos frente a las diversas formas de estas enfermedades parasitarias es una necesidad urgente, y el empleo de los derivados triazolopirimidínicos y sus complejos metálicos es una vía

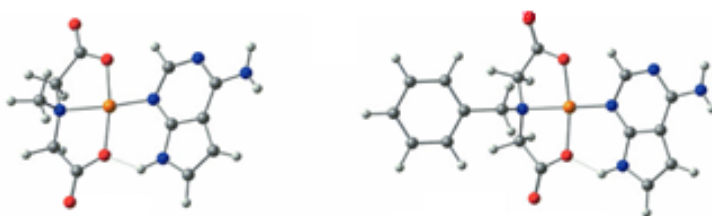
económica que está demostrando ser eficaz. Un estudio en profundidad de las formas en que pueden manifestarse estas enfermedades y los ciclos de vida y morfología de los parásitos, así como una descripción de la metodología y tipos de ensayos biológicos llevados a cabo se discutirán en el Capítulo 5.

### 1.3. Derivados 7-deazapurinicos

Las 7-deazapurinas han sido objeto de estudio desde el descubrimiento de la toyocamicina en 1956 [46]. Entre sus posibles aplicaciones se pueden destacar una potencial actividad antibiótica, antifúngica, antiviral y antineoplásica, lo cual resulta coherente dado su biomimetismo con las nucleobases púricas, al igual que ocurre en el caso de las triazolopirimidinas. Concretamente, los ligandos 7-deazaadenina o 7-deazaguanina, aportan las mismas propiedades de reconocimiento que poseen las nucleobases púricas, siendo capaces de participar en procesos de autoensamblaje a través de interacciones de hidrógeno, de tipo Watson-Crick, e interacciones de apilamiento. Estas características han permitido que, en los últimos años, estos ligandos 7-deazapurina se hayan empleado en el desarrollo de nanomateriales basados en el ADN [47], y que se suma al auge que ha experimentado la introducción de nucleobases modificadas en secuencias de ADN en la búsqueda de introducir nuevas propiedades a los ácidos nucleicos [48-50]. En este sentido, los iones metálicos constituyen una atractiva alternativa para ser incorporados de manera ordenada y organizada en moléculas de ADN, ya que pueden aportar propiedades únicas como fluorescencia, magnetismo, conductividad o actividad catalítica. Estas propiedades no inherentes al ADN pueden organizarse de manera racional mediante el posicionamiento de los iones metálicos entre los pares de bases, usando 7-deazapurinas, ya que así se puede aprovechar por una parte las cualidades de autorreconocimiento características de las nucleobases en el ADN, y por otro se guía el posicionamiento de los iones metálicos hacia las caras Watson-Crick de las nucleobases (en el eje central de la doble hebra). Esta organización facilitará la formación de interacciones específicas metal-metal y metal-ligando que puedan dar lugar a fluorescencia, conductividad, magnetismo, etc. De esta forma, se pueden diseñar estructuras tridimensionales en las que se manifiesten propiedades físicas y químicas con potenciales aplicaciones tecnológicas.

### 1.3.1. Reactividad como ligandos

En la actualidad existen pocas publicaciones que utilicen las 7-deazapurinas, tales como 7-deazaadenina o 7-deazaguanina, como ligando en compuestos de coordinación [51] (**Figura 1.6**), si bien son numerosos los ejemplos que utilizan otra serie de derivados de la familia de las deazapurinas en este tipo de reacciones [52-54].



**Figura 1.6.** Complejos de Cu(II) con 7-deazaadenina [51]. En ambos casos puede observarse una coordinación monodentada en la que el N3 se enlaza directamente al centro metálico como era de esperar, mientras que se produce una coordinación secundaria vía el hidrógeno de N9

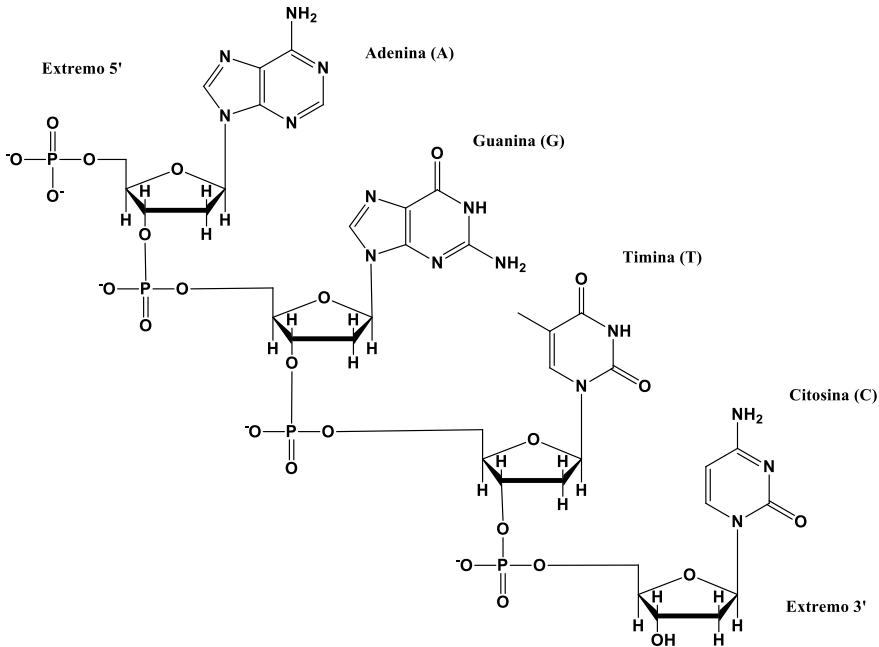
En general, los complejos sintetizados empleando derivados deazapurínicos como ligando, muestran unas vías de coordinación preferenciales por N3 cuando actúan de forma monodentada, y vía N3,N9 cuando lo hacen de forma bidentada. Es importante remarcar que para los ligandos deazapurínicos la nomenclatura que se sigue es la del sistema bioquímico, pero a efectos de reactividad la posición N3,N9 de deazapurinas es análoga a la N3,N4 de triazolopirimidinas, por lo que se puede afirmar que ambos modelos comparten tipos de reactividad y modos de coordinación preferenciales. Algunos de los ejemplos más representativos de este tipo de complejos han sido reportados por Niclós-Gutiérrez y col. [51, 55], quedando patente la preferencia por las posiciones citadas.

## 1.4. ADN como nanomaterial tecnológico

Ya que el objetivo final de la introducción de 7-deazapurinas en dobles hebras de ADN es la búsqueda de propiedades tecnológicas en este tipo de materiales híbridos, es imprescindible hacer una descripción de la molécula natural de ADN con objeto de entender su estructura y propiedades antes de estudiar cómo se verán afectadas estas por la inclusión de iones metálicos.

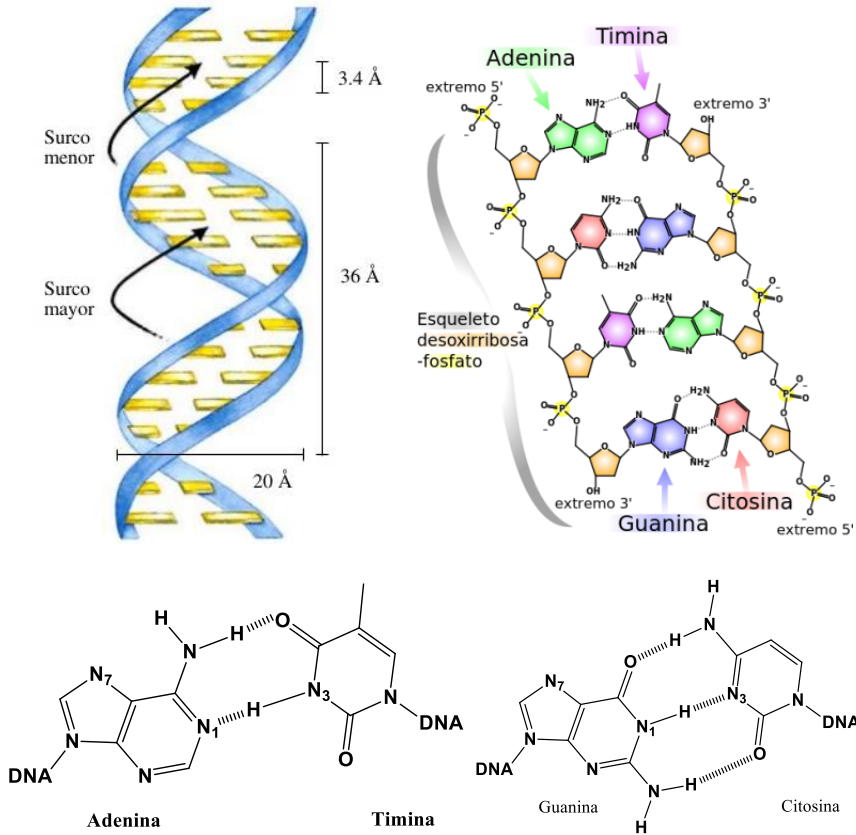
Los polímeros de nucleótidos formados por la asociación de monómeros mediante enlaces del grupo fosfato entre las posiciones 3' y 5' de unidades de ribosa vecinas, es lo que se conoce como ácidos nucleicos. Los nucleótidos son las unidades estructurales de estas cadenas, formados por una base nitrogenada, un azúcar y un grupo fosfato. La unión entre nucleótidos individuales se conoce como enlace fosfodiéster, mediante el cual se da lugar a la formación de dímeros, trímeros, tetrameros, etc., para obtener oligómeros de distinto tamaño, que presentarán diferentes propiedades físicas (**Figura 1.7**)





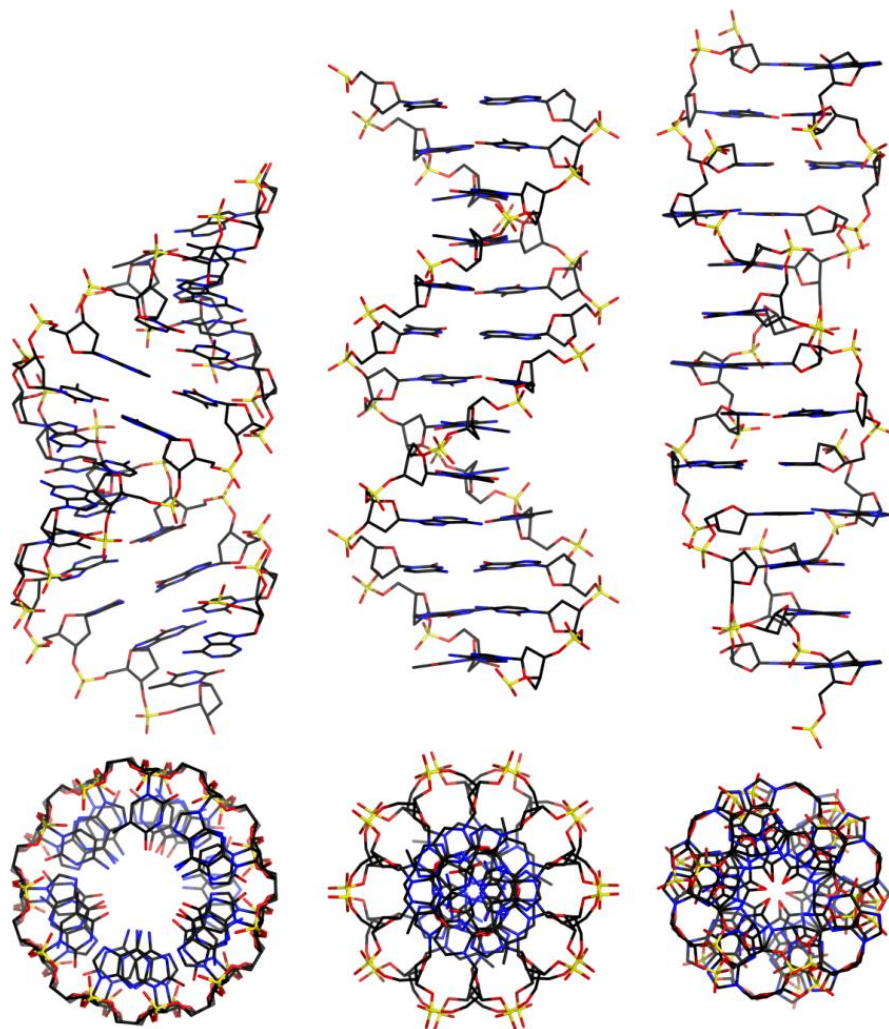
**Figura 1.7.** Ejemplo de la estructura química de un ácido nucleico, incluyendo los cuatro tipos de nucleobases, A, T, G y C. Por convención internacional, las secuencias siempre se escriben de 5' a 3'. Respecto a la nomenclatura, este ejemplo se denominaría d(pAGTC), indicando la “p” que hay un grupo fosforilo en posición 5' de la cadena, y la “d” que se trata de desoxiribonucleótidos (ausencia de grupo 2'-OH en el azúcar)

De esta forma, el ADN está formado por dos hebras entrelazadas de un polímero de desoxirribonucleótidos unidos por enlaces diéster, o lo que es lo mismo, una doble hélice en la cual cada base está unida por enlaces de hidrógeno a su opuesta para formar un par de bases plano. Estos enlaces de hidrógeno que mantienen la integridad de la estructura se conocen como apareamiento entre bases complementarias (siendo siempre A-T y G-C dichos pares en la molécula de ADN natural), dando como resultado la asociación específica entre las dos cadenas de la doble hélice. Pese a la relativa rigidez de la molécula de ADN, pueden apreciarse dos surcos en su estructura apareada, el surco mayor y el surco menor (**Figura 1.8**). Estas zonas serán las superficies en las que las proteínas interactuarán de forma tanto específica (puentes de hidrógeno) como inespecífica (interacciones electrostáticas) con el ADN.



**Figura 1.8.** Arriba a la izquierda puede observarse la estructura tridimensional general del ADN, con los dos tipos de surcos que se generan al enrollarse ambas hebras. El esquema de arriba a la derecha muestra el apareamiento entre nucleobases naturales A-T y C-G. Abajo se muestra la formación de puentes de hidrógeno entre los pares de bases (2 y 3 para los pares A-T y C-G respectivamente)

El ADN puede presentar distintas conformaciones según el tamaño de los surcos que se forman y el sentido del giro en el apareamiento. La forma más común y estable de la doble hebra se conoce como forma B, en la que las dos hebras de polinucleótidos antiparalelas se enrollan hacia la derecha originando un giro por cada 10 pares de bases. No obstante, el duplex de ADN también puede presentar las configuraciones A y Z, cuyas características se encuentran recogidas en la **Figura 1.9** y la **Tabla 1.1** [56].



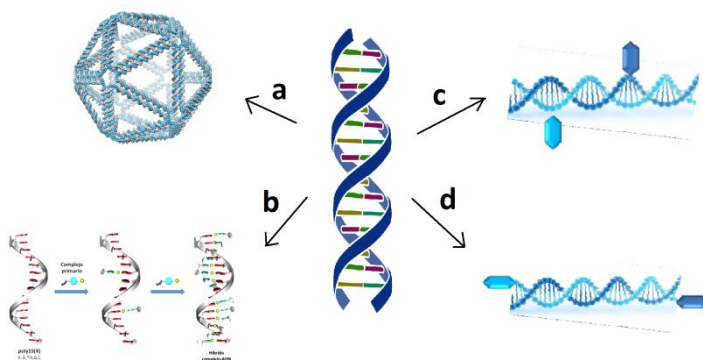
**Figura 1.9.** Arriba, y de izquierda a derecha, conformación A, B y Z de una doble hélice de ADN, siendo la más común de ellas la B. Abajo puede verse una perspectiva desde el extremo de la doble hebra para cada caso.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>Z</b>
<b>Sentido de la hélice</b>	Hacia la derecha	Hacia la derecha	Hacia la izquierda
<b>Diámetro</b>	26Å	20Å	18Å
<b>Pares de bases por vuelta de hélice</b>	11.6	10	12
<b>Longitud de la hélice por par de bases</b>	2.9Å	3.4Å	7.4Å
<b>Longitud de una vuelta de hélice</b>	34Å	34Å	44Å
<b>Conformación del enlace glucósido</b>	Anti	Anti	Anti para las pirimidinas, syn para las purinas

**Tabla 1.1.** Características de las formas A, B y Z del ADN

Las características estructurales comentadas, unidas al desarrollo de la nanotecnología, han permitido que el ADN se convierta en un material deseable para el desarrollo de nuevas estructuras con diferentes propiedades [57-62]. Sin embargo, la molécula de ADN por sí misma no permite el desarrollo de aplicaciones tecnológicas, ya que carece de propiedades físicas y químicas tales como la conductividad eléctrica, magnetismo o fluorescencia que supongan un potencial uso industrial.

Es por ello que numerosos equipos de investigación vienen empleando moléculas de ADN modificadas sintéticamente en sus estudios, ya sea mediante enlaces de marcadores fluorescentes o anclajes superficiales en los extremos 3' o 5' de la doble hebra [63-67]; reemplazo de pares de bases naturales por otros artificiales [68,69]; o el desarrollo de “origamis de ADN” [70-75], en los cuales se pueden diseñar estructuras bi y tridimensionales gracias al autoensamblaje de pares de bases (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10.** Ejemplos de aplicaciones nanotecnológicas del ADN. a) Origami de ADN; b) incorporación de moléculas que actúen como ligandos para metales; c) ADN con moléculas enlazadas covalentemente a algunas de sus nucleobases centrales; d) ADN con moléculas enlazadas covalentemente a sus extremos 3' y 5'.

## 1.5. Funcionalización de ADN

El estudio y desarrollo de nanomateriales funcionales ha experimentado en los últimos años un crecimiento exponencial como respuesta a la alta demanda de nuevas tecnologías que sean más rápidas, eficientes, baratas y respetuosas con el medio ambiente. De hecho, dichos materiales presentan aplicaciones en áreas tan diversas como la preparación de nuevos medicamentos, catalizadores, membranas selectivas y dispositivos nanoelectrónicos, cuya explotación tendría gran impacto social, tecnológico y económico.

Una de las principales áreas de investigación para el desarrollo de este tipo de nanomateriales es la funcionalización del ADN con iones metálicos que le confieran propiedades no intrínsecas de una doble hebra. Como ya se ha dicho, el ADN es una molécula formada por nucleobases distribuidas en dos hebras capaces de autorreconocerse y ensamblarse, haciendo posible el diseño de secuencias que adopten la conformación tridimensional deseada mediante el control de bases. De esta forma, la correcta programación de secuencias de polinucleótidos específicas ha permitido el diseño y creación de nanoestructuras y nano-máquinas en los últimos años, tal y como recogen diversos reviews sobre el tema recientemente publicados [76,77]. Sin embargo, la ausencia de propiedades opto-electrónicas en estas

moléculas limita su empleo en determinadas aplicaciones como la nanoingeniería electrónica. Por este motivo, en las próximas décadas, será necesario llevar a cabo un esfuerzo científico-tecnológico extra con el fin de dotar a estas bioestructuras de nuevas propiedades que están a priori ausentes en los ácidos nucleicos de origen natural. Este objetivo puede alcanzarse gracias a la introducción de iones metálicos en las estructuras de ADN.

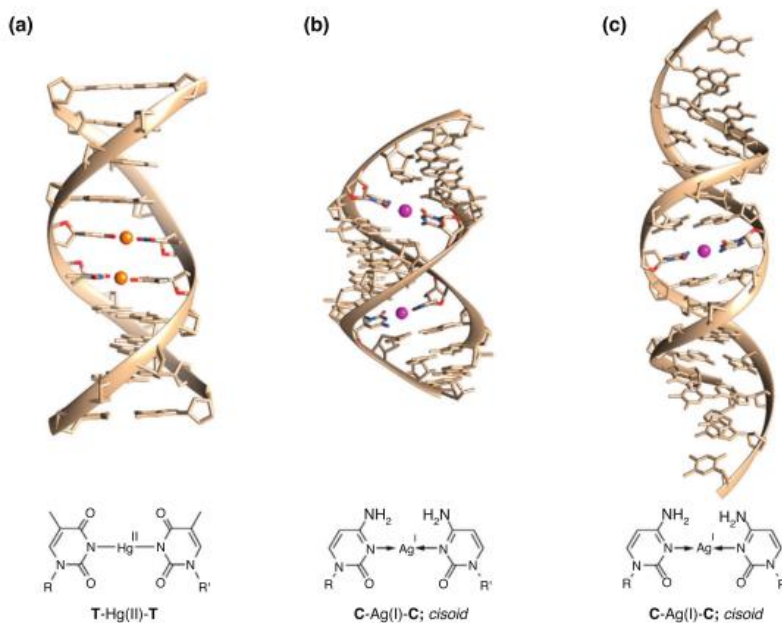
Entre las estrategias sintéticas exploradas hasta el momento, destacan la incorporación a la estructura del ADN de metales, semiconductores orgánicos o cromóforos. John N. Harb y col. [78] examinaron la metalación de ADN empleando como moldes estructuras tipo “origami de ADN”, en las que primero sembraron iones de plata y posteriormente depositaron oro, sentando las bases de este tipo de híbridos metal-ADN. Gary B. Schuster y Wen Chen [79] introdujeron anilina y 2,5-bis-(2-tienil)propirrol en secuencias ADN complementarias, que una vez apareadas dejaban a estos monómeros en los surcos mayores de la doble hebra, permitiendo así una rápida polimerización tras una oxidación con  $H_2O_2$  y generando así superestructuras semiconductoras. Para el caso de la introducción de cromóforos a las moléculas de ADN, Stulz y col. [80] cambiaron varias timinas en secuencias canónicas de ADN por dos derivados diferentes de desoxiuridinas con porfirinas como sustituyentes, estudiando el cambio en la estabilidad de las moléculas de ADN según la posición y número de sustituyentes.

El hecho de que los iones metálicos presenten propiedades tan interesantes en industria y sociedad como son la conductividad eléctrica, magnetismo, fluorescencia, etc., los convierte en excelentes candidatos para intervenir de lleno en el desarrollo de nanomateriales basados en sistemas híbridos ADN-agente funcionalizador. Hasta la fecha se han seguido tres aproximaciones para incorporar estas unidades funcionales a las moléculas de ADN: (a) aprovechamiento de la naturaleza aniónica de los ácidos nucleicos para la deposición de entidades catiónicas, tales como polímeros  $\pi$ -conjugados e iones metálicos, a lo largo de su estructura [81], (b) uso de la síntesis molecular para llevar a cabo una modificación química de las nucleobases, introduciendo los grupos funcionales deseados [82], y (c) empleo de ligandos que reemplacen a ciertas nucleobases y formen pares de bases mediadas por enlaces de coordinación [83].

En el presente trabajo la introducción de iones metálicos está centrada solo en el último método, ya que el primero carece de control sobre la estequiometría final del sistema y la posición precisa de los grupos funcionales, y el segundo, aunque permite la preparación de oligonucleótidos funcionales de cadena corta (decenas de nucleótidos), exige el empleo de métodos de síntesis complicados y costosos. Dentro de la gran variedad de ligandos que pueden utilizarse para introducir pares de bases mediados por metales, en este trabajo tan solo se hablará en profundidad de los basados en modificaciones de purinas, concretamente en las 7-deazapurinas.

### 1.5.1. Formación de pares de bases mediados por iones metálicos

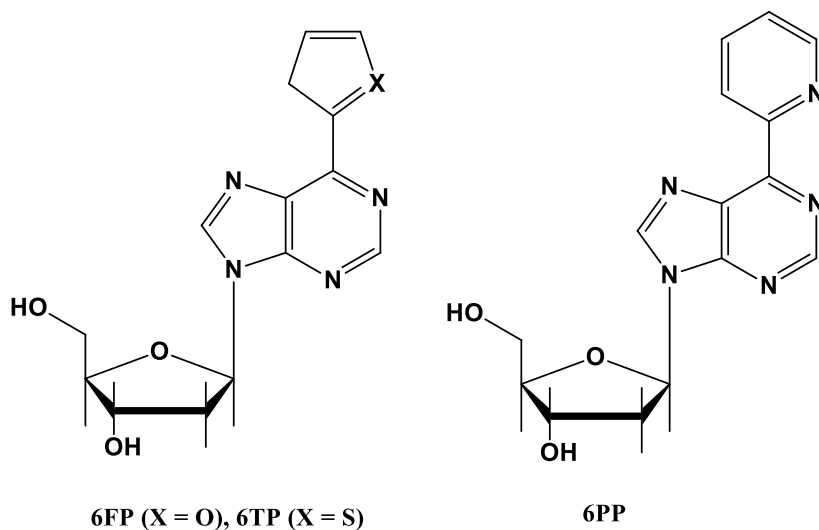
La formación de pares de bases mediados por iones metálicos empleando nucleobases canónicas ha sido estudiada ampliamente en los últimos años, gracias a la disponibilidad comercial de estos compuestos y a la alta reactividad que presentan [48]. Los casos más estudiados son el T-Hg-T [84] y el C-Ag-C [85,86], que involucran respectivamente a iones Hg(II) y Ag(I) como mediadores en el apareamiento de las homobases respectivamente.



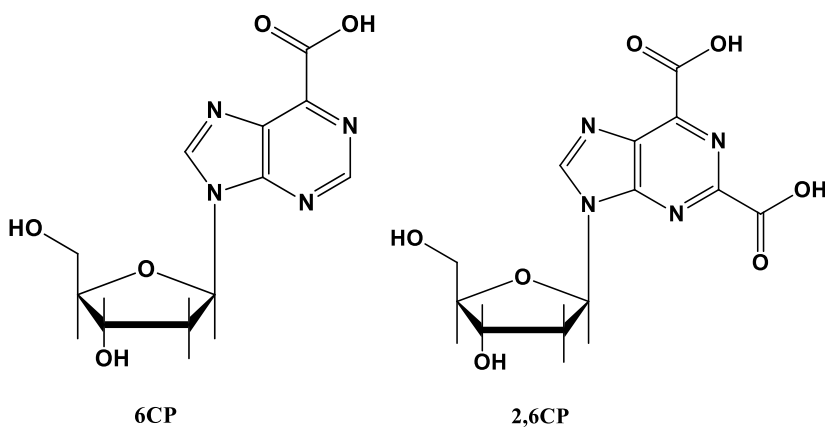
**Figura 1.11.** a) Estructura de un dúplex B-ADN que contiene dos pares consecutivos T-Hg(II)-T; b) Estructura molecular de un dúplex A-ARN que posee dos pares C-Ag(I)-C; c) Estructura de una doble hebra B-ADN con un par de bases C-Ag(I)-C en el centro de la doble hebra. J. Müller y col. [48]

No obstante, también se han empleado nucleobases artificiales para estudiar la formación de pares de bases mediados por metales. Algunos de esos otros derivados son la 6-furilpurina (6FP), 6-tienilpurina (6TP) y 6-piridilpurina (6PP) empleadas por J. Müller y col. [87,88] para estudiar el incremento en la estabilización térmica de secuencias de ADN que incluyan una de estas nucleobases al combinarse con iones metálicos, apareándose por la cara Hoogsteen de la doble hebra; 6-carboxipurina (6CP) y purina-2,6- dicarboxilato (2,6CP) empleadas por E.K. Kim y C. Switzer [89,90]; y diversas purinas con sustituyentes pirazolilo [91-94]. Estas estructuras se encuentran representadas en la **Figura 1.12** y **1.13**. Así mismo, una amplia variedad de ejemplos de este tipo de derivados puede encontrarse en el trabajo recopilatorio de M. Shionoya y Y. Takezawa [50].





**Figura 1.12.** Estructura de algunas de las primeras nucleobases modificadas empleadas por J. Müller y col. [87,88].

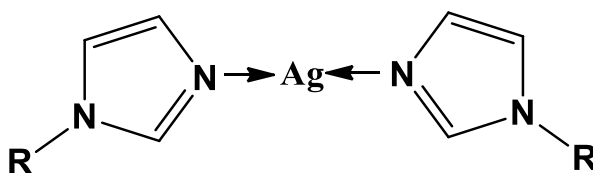


**Figura 1.13.** Estructura de las nucleobases empleadas por E.K. Kim y C. Switzer [89,90]

A continuación se describirán algunos ejemplos de los resultados más destacados en el estudio de la formación de pares de bases mediados por metal, de acuerdo a la siguiente organización:

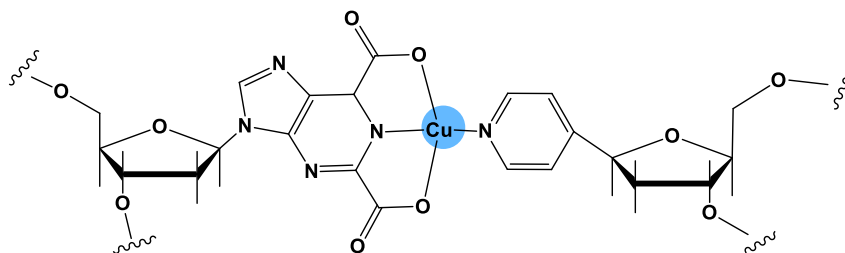
- a) Pares de homobases mononucleares
- b) Pares de heterobases mononucleares
- c) Pares de bases dinucleares
- d) Cadenas heterometálicas
- e) Estructura de cadena larga

Uno de los primeros ejemplos de estructura conteniendo un apareamiento entre bases no canónicas mediadas por metal fue descrito por Müller y col en 2010 [95], empleando para dicho estudio imidazol como nucleobase alterada. Se obtuvo de esta forma el par Im-Ag(I)-Im, que fue caracterizado espectroscópicamente por RMN (**Figura 1.14**)



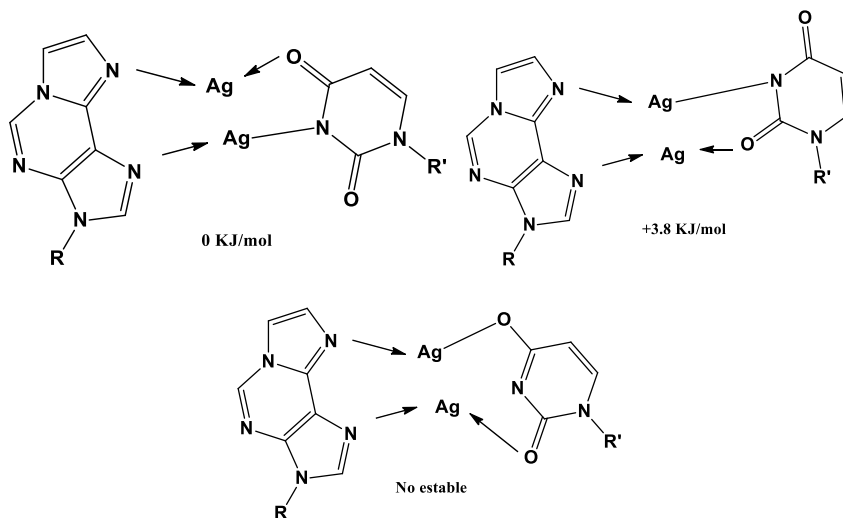
**Figura 1.14.** Esquema de la formación del par de bases no canónicas Im-Ag(I)-Im

El uso de nucleobases artificiales como ligandos ha permitido estudiar la reactividad de las mismas al interactuar con un par canónico en la búsqueda de un apareamiento de bases mediadas por metal, como puede ser el caso de la citada 2,6CP con piridina [89] (**Figura 1.15**). En este ejemplo de heterobases mediadas por metal, se observa la formación de enlaces entre ambas bases con un centro de Cu(II) en el que los dos grupos carboxílicos introducidos como sustituyentes en el anillo piridínico hacen que estos enlaces sean vía oxígeno por las posiciones 2 y 6. Si bien estos estudios aportan información relevante sobre la reactividad de nucleobases frente a metales, no es una forma fidedigna de reproducir el comportamiento esperado en la naturaleza.



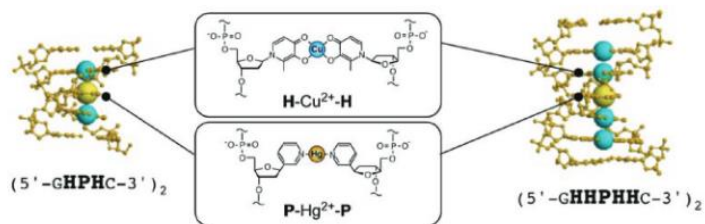
**Figura 1.15.** Ejemplo de complejo aislado con nucleobases modificadas, en este caso 2,6CP-Cu(II)-Py (siendo Py:piridina) [89]

También existen casos en los que los pares de bases son mediados por dos centros metálicos, no por uno como se ha descrito hasta ahora. Por citar uno de los ejemplos más recientes de Müller y col [96], se emplea como nucleobase modificada la 1,N<sup>6</sup>-etenoadenina (<sup>ε</sup>A), siendo introducida como único sustituyente modificado en secuencias no palindrómicas. En dichas cadenas, se obtiene un par de bases mediado por dos iones Ag(I), siendo posibles solo dos de las tres estructuras que teóricamente podrían formarse en este caso como se muestra en la **Figura 1.16**. Numerosos ejemplos de mediación por dos centros metálicos por par de bases pueden encontrarse en bibliografía, empleando diferentes tipos de nucleobases modificadas que incluyen también a las deazapurinas (1-deazaadenina y 1,3-dideazaadenina por ejemplo, que se describen más adelante).



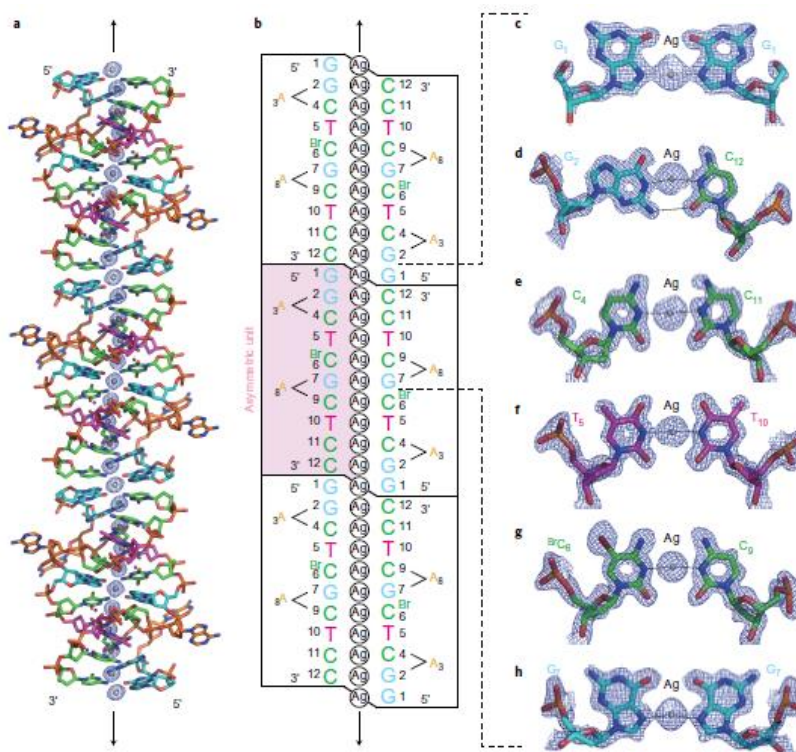
**Figura 1.16.** Esquema de las tres posibles estructuras dinucleares para el par de bases mediado por metal  ${}^{\epsilon}\text{A-Ag(I)}_2\text{-T}$ . Arriba, la más estable termodinámicamente a la izquierda. Abajo, la estructura descartada. [96]

Por otra parte, el siguiente paso lógico tras la obtención de pares de bases mediados por un tipo de ion metálico es la inclusión de diferentes especies en una misma doble hebra, como en el caso descrito por Takezawa y Shionoya en 2012 [50], en el que empleando ligandos tipo hidroxipiridona y piridina, se consiguió aislar una secuencia de tres pares de bases mediadas por metal. En dicha secuencia, aparecían  $\text{Cu}^{2+} - \text{Hg}^{2+} - \text{Cu}^{2+}$  como iones metálicos que unían los pares de bases de forma consecutiva. Más adelante, se pudieron obtener secuencias más largas y complejas con este tipo de alternancia en la naturaleza de los iones metálicos (5, 10, etc. pares de bases mediados por metal). La **Figura 1.17** muestra el ejemplo comentado de este tipo de apareamiento, en el que se pueden observar cadenas largas que contienen dos tipos de iones metálicos entre los pares de bases, manteniéndose la estructura de doble hebra.



**Figura 1.17.** Secuencias de 3 y 5 pares de bases mediadas por diferentes iones metálicos alternativamente, Takezawa y Shionoya [50]. **H:** derivado tipo hidroxipiridona, **P:** derivado tipo piridina.

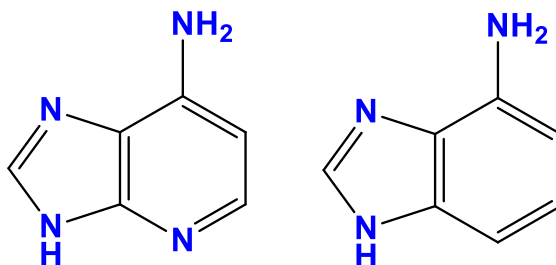
Sin embargo, en las últimas publicaciones sobre la materia no solo se han aislado este tipo complejos de pares de bases mediados por metal, sino que se han llegado a obtener recientemente cristales de dobles hebras de ADN mediado por  $\text{Ag(I)}$ , como el ejemplo de J. Kondo et al. en Nature Chemistry [97] (**Figura 1.18**). En él, se sustituyen los enlaces de H de un dodecámero palindrómico en el que se ha introducido la base modificada bromocitosina ( $^{\text{Br}}\text{C}$ ) por enlaces de Ag entre pares de bases. La estructura pudo ser resuelta por difracción de rayos X, observándose que pese a la introducción de los iones metálicos, se mantenía la integridad del material y se conservaba una forma B en la doble hélice, lo cual supone un punto de inflexión a la hora de desarrollar y caracterizar este tipo de híbridos.



**Figura 1.18.** Estructura cristalina de un hilo molecular híbrido Ag-ADN, en el que los átomos de Ag sustituyen a los enlaces de hidrógeno naturales. J. Kondo y col. [97]

### 1.5.2. Derivados 7-deazapurinicos en la formación de pares de bases mediados por iones metálicos

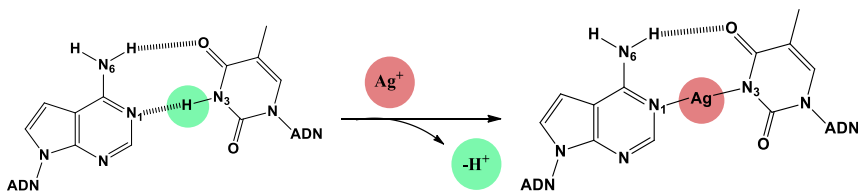
Centrándonos en los derivados deazapurinicos que se estudiarán en este trabajo de Tesis Doctoral, las 7-deazapurinas son aquellas en las que se sustituye un nitrógeno presente en el heterociclo de la purina por un grupo CH, concretamente en la posición 7, dando lugar a 7-deazadenina y 7-deazaguanina. No obstante, dentro de esta familia de ligandos destacan también la 1-deazaadenina [98] y la 1,3-dideazadenina [99,100] empleadas por Müller y col. (**Figura 1.19**), dando lugar nuevamente a un apareamiento vía Hoogsteen al metalizar la doble hebra de ADN.



**Figura 1.19.** Esquema de la 1-deazaadenina (izquierda) y 1,3-dideazaadenina (derecha).

Los derivados de purina se han empleado tradicionalmente como sustituyentes de uno o pocos pares de bases en dobles hélices de ADN, estudiándose únicamente su efecto en zonas puntuales de la estructura. Además, todos los estudios llevados a cabo hasta la fecha no mantienen la integridad natural del dúplex de ADN, ya que se produce el apareamiento por la cara Hoogsteen en lugar de por la Watson-Crick como se ha comentado en los ejemplos anteriormente expuestos. Por este motivo, el uso de las 7-deazapurinas supone un avance extraordinario respecto a lo que se venía empleando en estudios previos, ya que la ausencia de nitrógeno en la posición 7 favorece el comportamiento natural del par de bases, produciéndose la interacción natural por puentes de hidrógeno entre ellas. De esta forma se conserva una conformación tridimensional natural, al ser sustituidos los enlaces de hidrógeno posteriormente por los iones metálicos que se desean introducir para funcionalizar el material. Además, si se sintetizan las secuencias diseñadas cambiando todas las purinas naturales por las 7-deazapurinas, se obtiene una doble hélice de ADN que puede funcionalizarse al completo al añadir los equivalentes necesarios de ión metálico.

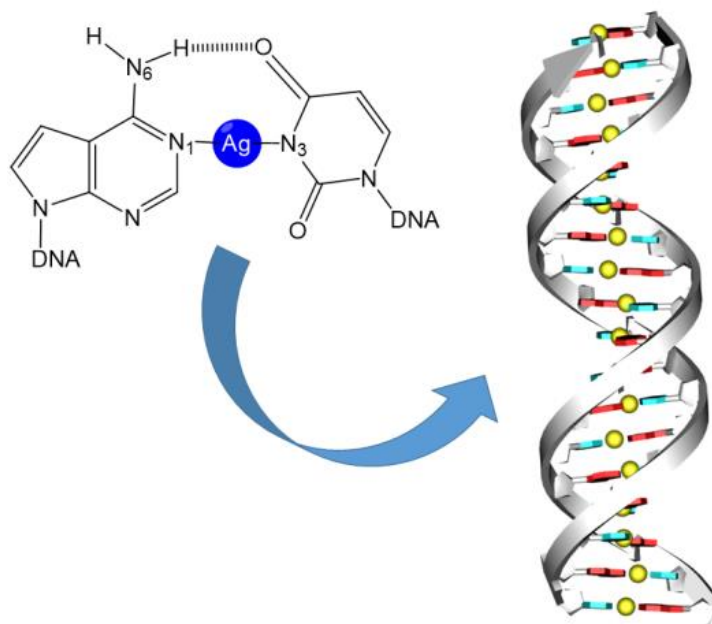
El primer ejemplo de este hecho se encuentra recogido en M. A. Galindo y col. [101], investigación llevada a cabo en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, empleando 7-deazaadenina ( ${}^7\text{C}\text{A}$ ) en secuencias palindrómicas heterogéneas poly9( ${}^7\text{C}\text{A-T}$ ) (**Figura 1.20**).



**Figura 1.20.** Sustitución de enlaces de hidrógeno por enlaces covalentes a un centro metálico, dando lugar a pares de bases mediados por plata tipo  ${}^7\text{C A}-(\text{Ag}^{\text{I}})\text{-T}$ .

Para llevar a cabo este estudio, el oligonucleótido poly9( ${}^7\text{C A-T}$ ), que consiste en un octadecámero formado por timinas canónicas (T) y 7-deazaadeninas no canónicas ( ${}^7\text{C A}$ ), se sintetizó y se hibridizó en una doble hebra de ADN a través de la formación de enlaces de hidrógeno entre pares de bases en la cara Watson-Crick como si se tratase de una secuencia natural. Para obtener el nuevo hilo molecular metalizado, se reemplazaron selectivamente los enlaces de hidrógeno W-C por enlaces de coordinación a iones  $\text{Ag(I)}$  en el duplex, estudiando los cambios en la estabilidad, conformación y propiedades del sistema metal-ADN mediante valoraciones espectroscópicas. Las técnicas utilizadas (dicroísmo circular, UV en función de tiempo y temperatura y fluorescencia) permitieron confirmar la formación selectiva de pares de bases mediados por plata, hasta la completa metalación de la doble hebra, manteniéndose el apareamiento natural por la cara W-C (**Figura 1.21**). Todos estos estudios, así como los que se han llevado a cabo con nuevas secuencias y pares de bases, se discutirán en profundidad en el Capítulo 6.





**Figura 1.21.** Esquema del proceso de formación de una molécula de ADN mediada por metal [101].

Estos estudios con 7-deazaadenina son un punto crucial y necesario para el desarrollo de moléculas tipo deaza-ADN, donde todas las bases púricas canónicas son sustituidas por 7-deazapurinas, manteniéndose la conformación original del ADN y forzando a que los iones metálicos que se introducen en la estructura solo puedan ocupar la cara W-C, sustituyendo los puentes de H entre pares de bases por enlaces de coordinación.

## 1.6. Aplicaciones tecnológicas de los pares de bases mediados por metal

El principal interés del uso de pares de bases mediados por metal en la doble hélice del ADN es la introducción de propiedades no inherentes a este tipo de nanomateriales. Existen multitud de potenciales propiedades a analizar, siendo quizás la más estudiada el uso de estos materiales como sensores de iones metálicos [102], si bien también pueden aplicarse a sensores redox [103] o para otro tipo de detecciones [104,105]. El uso como sensores suele ser una aplicación común, especialmente en pares T-Hg-T ya que se produce una fuerte interacción sin necesidad de emplear pares de bases artificiales, y además, la elevada toxicidad del ión  $\text{Hg}^{2+}$  hace necesario el desarrollo de métodos fiables para su detección y eliminación. La transferencia de electrones a través de dúplex de ADN con  $\text{Hg}^{2+}$  está experimentando grandes avances en los últimos años [106], aunque el estudio de propiedades que se lleva a cabo en esta Tesis Doctoral se centra en la aparición de fluorescencia en dobles hebras de ADN propiciada por interacciones argentofílicas. Hasta la fecha, se han conseguido nanopartículas de plata que presenten fluorescencia, utilizando el ADN como un molde para depositar los iones metálicos y que, tras una reducción con  $\text{NaBH}_4$ , el molde se plegaba sobre sí mismo dando lugar a la nanopartícula fluorescente. En el caso de la fluorescencia descrita en este trabajo, por primera vez corresponde a un nanohilo molecular, en el que los iones  $\text{Ag(I)}$  están alineados, no superpuestos, y la fluorescencia se debe a interacciones entre iones vecinos. Los resultados obtenidos se discutirán en el Capítulo 6.

## 1.7. Justificación y objetivos

El grupo de investigación al que pertenezco, liderado por el Prof. Salas, viene trabajando desde hace más de dos décadas en el estudio y caracterización de los derivados 1,2,4-triazolopirimidínicos y su química de coordinación frente a una gran variedad de metales de transición. La experiencia adquirida durante todo este tiempo, junto con la guía de expertos en el área, permite profundizar en el conocimiento de las interacciones de dichas moléculas y buscar nuevos horizontes en sus aplicaciones, como es el caso de su potencial actividad antiparasitaria.

Por otra parte, el desarrollo de nuevos materiales basados en ADN con pares de bases mediadas por metales constituye una de las más novedosas y excitantes líneas de investigación del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel Galindo Cuesta, por lo que el desarrollo de nanohilos moleculares de ADN con nuevas aplicaciones introducidas en ellos, supone un gran avance en el campo, con importantes repercusiones a nivel social e industrial.

En la presente Tesis Doctoral se proponen los siguientes objetivos principales:

1. Síntesis y caracterización estructural del nuevo ligando triazolopirimidínico **HftpO**, derivado sobre el cual no existían estudios anteriores de ningún tipo.
2. Síntesis y caracterización estructural de complejos metálicos derivados del **HftpO**, con el fin de estudiar la interacción de este derivado frente a un amplio rango de iones metálicos de transición y lantánidos.
3. Estudio de la actividad antiparasitaria de los complejos triazolopirimidínicos frente a distintas cepas de *Leishmania spp* y *Trypanosoma cruzi*.
4. Síntesis y caracterización de complejos de Ag(I) con 7-deazapurinas para evaluar los diferentes modos y vías de interacción de este ion metálico con las nucleobases modificadas.
5. Diseño y síntesis de oligonucleótidos homo y heterogéneos de cadena corta (decenas de nucleobases), en los que se incluyan iones Ag(I) que sustituyan los enlaces de hidrógeno naturales, para su posterior estudio espectroscópico.

## 1.8. Bibliografía

- [1] Bulow C., Haas K., *Chem. Ber.*, **1909**, *42*, 4638–4644
- [2] E.J. Birr, *Z. Wiss. Phot.*, **1952**, *47*, 2–27
- [3] Fischer, G. *Adv. Heterocycl. Chem.*, **2008**, *95*, 143-219
- [4] Łakomska, I.; Fandzloch, M. *Coord. Chem. Rev.*, **2016**, *327-328*, 221-241.
- [5] Salas, J.M.; Romero, M.A.; Sanchez, M.P.; Quiros, M., *Coord. Chem. Rev.*, **1999**, *193-195*, 1119-1142
- [6] Salas, J.M., Caballero A.B., Esteban-Parra G.M., Méndez-Arriaga J.M. *Curr Med Chem.*, **2017**; *24(25)*, 2796-2806
- [7] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Lezama, L.; Salas, J. M. *Cryst. Growth Des.*, **2012**, *12(7)*, 3583-3593
- [8] Caballero, A. B.; Rodríguez-Dieguez, A.; Barea, E.; Quirós, M.; Salas, J. M. *CrystEngComm.*, **2010**, *12*, 3038-3045
- [9] Caballero, A. B.; Rodríguez-Dieguez, A.; Quirós, M.; Lezama, L.; Salas, J. M. *Inorg. Chim. Acta*, **2011**, *378*, 194-201
- [10] Maldonado, C. R., Quirós, M., Salas, J. M., *Acta Cryst. Sect. E Structure Reports Online*, **2007**, *63(3)*, 1509–1510
- [11] Odabasoglu, M., Büyükgüngör, O. *Acta Cryst.*, **2006**, *62*, 1310-1311
- [12] Navarro, J.A.R., Romero, M.A., Salas, J.M., Faure, R., Solans, X., *J. Chem Soc. Dalton Trans.*, **1997**, 2321-2326
- [13] Orihuela, S., Sánchez, M. P., Quirós, M., Martín, D., Faure, R., *Polyhedron*, **1998**, *17(15)*, 2477-2481
- [14] Abul Haj, M.; Salas, J.M.; Quirós, M.; Molina, J.; Faure, R. *J. Mol. Struct.*, **2000**, *519*, 165-172
- [15] Caballero, A.B., Tesis Doctoral: *Nuevos materiales metalorgánicos basados en triazolopirimidinas*. Universidad de Granada. **2010**
- [16] Günay, E., Mutikainen, I., Turpeinen, U., Van Albada, G.A., Haasnoot, J.G., Reedijk, J., *J. Chem. Cryst.*, **2010**, *40(11)*, 1006-1010
- [17] Caballero, A.B., Castillo, Ó., Rodríguez-Diéguez, A., Salas, J.M. *Acta Cryst. Sect. E: Structure*, **2011**, *67 (11)*, m1531-m1532
- [18] Huub Adriaanse, J., Askes, S.H.C., van Bree, Y., van Oudheusden, S., van den Bos, E.D., Günay, E., Mutikainen, I., Turpeinen, U., van Albada, G.A., Haasnoot, J.G., Reedijk, J. *Polyhedron*, **2009**, *28(14)*, 3143-3149
- [19] Olar, R., Calu, L., Badea, M., Chifiriuc, M.C., Bleotu, C., Velescu, B., Stoica, O., Ionita, G., Stanica, N., Silvestro, L., Dulea, C., Uivarosi, V. *J. Thermal Anal. and Calorimetry*, **2017**, *127 (1)*, 685-696
- [20] Bavelaar, K., Khalil, R., Mutikainen, I., Turpeinen, U., Marquès-Gallego, P., Kraaijkamp, M., Van Albada, G.A., Haasnoot, J.G., Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta*, **2011**, *366(1)*, 81-84
- [21] Szlyk, E.; Lakomska, I.; Surdykowski, A.; Glowiak, T.; Pazderski, L.; Sitkowski, J.; Kozerski, L. *Inorg. Chim. Acta*, **2002**, *333*, 93-99
- [22] Lakomska, I.; Wojtczak, A.; Sitkowski, J.; Kozerski, L.; Szlyk, E. *Polyhedron*, **2007**, *26(4)*, 803-810
- [23] Velders, A.H.; Bergamo, A.; Alessio, E.; Zangrando, E.; Haasnoot, J.G.; Casarsa, C.; Cocchietto, M.; Zorzet, S.; Sava, G. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 1110-1121
- [24] Fandzloch, M., Wojtczak, A., Wiśniewska, J., Stefańczak, K., Salas, J.M., Łakomska, I. *Inorg. Chim. Acta*, **2016**, *446*, 170-178

- [25] M. Fandzloch, J.M. Méndez-Arriaga, M. Sánchez-Moreno, A. Wojtczak, J. Jezierska, J. Sitkowski, J.M. Salas, I. Łakomska, *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *176*, 144-155
- [26] E. Szlyk, L. Pazderski, I. Lakomska, A. Surdykowski, T. Glowiak, J. Sitkowski y L. Kozerski, *Polyhedron*, **2002**, *21*, 343-348
- [27] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, A., Salas, J. M., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., Ramírez-Macias, I., Gutiérrez-Sánchez, R. *J. Inorg. Biochem.*, **2014**, *138*, 39–46
- [28] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Lezama, L.; Barea, E.; Salas, J. M. *Dalton Trans.*, **2011**, *40(9)*, 5180-5189
- [29] Łakomska, I.; Fandzloch, M.; Muziol, T.; Lis, T.; Jezierska, J. *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 6219-6226
- [30] Łakomska, I.; Golankiewicz, B.; Wietrzyk, J.; Pełczyńska, M.; Nasulewicz, A.; Opoliski, A.; Sitkowski, J.; Kozerski, L.; Szlyk, E. *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, *358*, 1911-1917
- [31] Caballero, A. B.; Maclaren, J. K.; Rodríguez-Diéguez, A.; Vidal, I.; Dobado, J. A.; Salas, J. M.; Janiak, C. *Dalton Trans.*, **2011**, *40*, 11845-11855
- [32] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Quiros, M.; Salas, J. M.; Huertas, O.; Ramirez-Macias, I.; Olmo, F.; Marin, C.; Chaves-Lemaur, G.; Gutierrez-Sanchez, R.; Sanchez-Moreno, M. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, *85*, 526-534
- [33] Cepeda J., Castillo O., García-Terán J.P., Luque A., Pérez-Yáñez S., Román P., *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2009**, *16*, 2344-2353
- [34] Sonnenfroh D., Kreilick R. W., *Inorg. Chem.*, **1980**, *19*, 1259-1262
- [35] Demoro, B., Sarniguet, C., Sánchez-Delgado, R., Rossi, M., Liebowitz D., Caruso F., Olea-Azar, C., Moreno, V., Medeiros, A., Comini, M. A., Otero, L., Gambino, D., *Dalton Trans.*, **2012**, *41(5)*, 1534–1543
- [36] Barbosa, M.I.F., Corrêa, R.S., de Oliveira, K. M., Rodrigues, C., Ellena, J., Nascimento, O. R., Rocha V.P.C., Nonatoc, F. R. Nonatoc, T. Macedoc, S., *J. Inorg. Biochem.*, **2014**, *136*, 33-39
- [37] Rodríguez-Arcea, E., Machado, I., Rodríguez, B., Lapier, M., Zúñiga, M.C., Maya, J.D., Olea-Azar, C., Otero, L., Gambino, D., *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *170*, 125-133
- [38] Fernández, M., Rodríguez-Arce, E., Sarniguet, C., Morais, T.S., Tomaz, A.I., Olea-Azar, C., Figueroa, R., Maya, J.D., Medeiros, A., Comini, M., García, M.H., Otero, L., Gambino, D., *J. Inorg. Biochem.*, **2015**, *153*, 306-314
- [39] Guiset-Miserachs, H., Cipriani, M., Grau, J., Vilaseca, M., Lorenzo, J., Medeiros, A., Comini, M., Gambino, D., Otero, L., Moreno, V., *J. Inorg. Biochem.*, **2015** *153*, 38-47
- [40] Méndez-Arriaga, J.M., Esteban-Parra, G.M., Juárez, M.J., Rodríguez-Diéguez, A., Sánchez-Moreno, M., Isac-García, J., Salas, J.M., *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *175*, 217-224
- [41] Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J.E., Mansour, V.H., *Nature*, **1969**, *22*, 385-386
- [42] Chen, C.N., Chen, Q., Liu, Y.C., Zhu, C.W., Niu, C.W., Xi, Z., Yang, G.F., *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, *18(14)*, 4897-4904
- [43] Liu, Y.C., Qu, R.Y., Chen, Q., Yanq, J.F., Cong-Wei, N., Zhen, X, Yang, G.F., *J. Agric. Food Chem.*, **2016**, *64(24)*, 4845-57
- [44] Control of the Leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010, WHO technical report series, 949, (2010)
- [45] D. Gambino, L. Otero, *Inorg. Chim. Acta*, **2012**, *393*,103–114
- [46] Nishimura H, Katagiri K, Sato K, Mayama M, Shimaoka N. *J. Antibiot.*, **1956**, *9*, 60–62
- [47] Cahová, H., Panattoni, A., Kielkowski, P., Fanfrlík, J., Hocek, M., *ACS Chem. Biol.*, **2016**, *11*, 3165–3171

- [48] Mandal, S., Müller, J. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2017**, *37*, 71–79
- [49] Scharf, P., Müller, J. *ChemPlusChem*, **2013**, *78(1)*, 20–34.
- [50] Takezawa, Y., Shionoya, M. *Acc. Chem. Res.*, **2012**, *45(12)*, 2066–2076
- [51] Domínguez-Martín, A., Choquesillo-Lazarte, D., Dobado, J. A., Vidal, I., Lezama, L., González-Pérez, J.M., Castiñeiras, A., Niclós-Gutiérrez, J., *Dalton Transactions*, **2013**, *42(17)*, 6119-6130,
- [52] Müller, J., Polonius, F.A., Roitzsch, M., *Inorg. Chim. Acta*, **2005**, *358(4)*, 1225-1230
- [53] Ji, L., Corfù, N.A., Sigel, H., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1991**, *0*, 1367-1375
- [54] Jalilov, A.S., Patwardhan, S., Singh, A., Tomekia, S., Sarjeant, A.A., Schatz, G.C., Lewis, F.D., *J. Phys. Chem B*. **2014**; *118(1)*, 125-133
- [55] Choquesillo-Lazarte, D., Domínguez-Martín, A., Matilla-Hernández, A., Sánchez de Medina-Revilla, C., González-Pérez, J.M., Castiñeiras, A., Niclós-Gutiérrez, J., *Polyhedron*, **2010**, *29(1)*, 170-177
- [56] Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C.W., *Fundamentos de Bioquímica. La Vida a Nivel Molecular*, Editorial Medica Panamericana S.A., Buenos Aires, **2007**
- [57] Aldaye, F.A., Palmer, A.L., Sleiman, H.F., *Science*, **2008**, *321*, 1795–1799
- [58] Feldkamp, U., Niemeyer, C.M., *Angew. Chemie, Int. Ed.*, **2006**, *45*, 1856–1876
- [59] Endo, M., Sugiyama, H., *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2420–2443
- [60] Simmel, F.C., *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2008**, *47*, 5884–5887
- [61] Aldaye, F.A., Lo, P.K., Karam, P., McLaughlin, C.K., Cosa, G., Sleiman H.F., *Nat. Nanotechnol.*, **2009**, *4*, 349–352
- [62] Heckel, A., Famulok, M., *Biochimie*, **2008**, *90*, 1096–1107
- [63] Niemeyer, C.M., *Angew. Chemie, Int. Ed.*, **2001**, *40*, 4128–4158
- [64] Gothelf, K.V., LaBean, T.H., *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023–4037
- [65] Wengel, J., *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 277–280
- [66] Storhoff, J.J., Mirkin, C.A., *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 1849–1862
- [67] Sorensen, M.D., Petersen, M., Wengel, J., *Chem. Commun.*, **2003**, 2130–2131
- [68] Seela, F., He, Y., *J. Org. Chem.*, **2003**, *68*, 367–377
- [69] Benner, S.A., *Acc. Chem. Res.*, **2004**, *37*, 784–797
- [70] Seeman, N.C., *Nature*, **2003**, *421*, 427–431
- [71] Seeman, N.C., *Int. J. Nanotechnol.*, **2005**, *2*, 348–370
- [72] Maune, H.T., Han, S., Barish, R.D., Bockrath, M., Goddard III, W.A., Rothmund, P.W.K., Winfree, E., *Nat. Nanotechnol.*, **2010**, *5*, 61–66
- [73] Rothmund, P.W.K., *Nature*, **2006**, *440*, 297–302
- [74] Andersen, E.S., Dong, M., Nielsen, M.M., Jahn, K., Subramani, R., Mamdouh, W., Golas, M.M., Sander, B., Stark, H., Oliveira, C.L.P., *Nature*, **2009**, *459*, 73–76
- [75] Matthies, M., Agarwal, N.P., Schmidt T.L., *Nano Lett.*, **2016**, *16*, 2108–13
- [76] Chen, Y.J., Groves, B., Muscat, R.A. Seelig, G., *Nature Nanotech.*, **2015**, *10*, 748-760
- [77] Zhang, F., Nangreave, J., Liu, Y., Yan, H., *J. Am. Chem. Soc.*, **2014**, *136(32)*, 11198-11211
- [78] Liu, J., Geng, Y., Pound, E., Gyawali, S., Ashton, J.R., Hickey, J., Woolley, A.T., Harb, J.N., *ACS Nano*, **2011**, *5*, 2240-2247
- [79] Chen, W., Schuster, G. B. *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135(11)*, 4438-4449
- [80] Nguyen, T., Brewer, A., Stulz, E., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, *48*, 1974-1977
- [81] Pruneanu, S., Farha Al-Said, S.A., Dong, L., Hollis, T.A., Galindo, M.A., Wright N.G., Houlton, A., Horrocks, B. R., *Adv. Funct. Mater.*, **2008**, *18*, 2444-2454
- [82] Stulz, E., *Acc. Chem. Res.*, **2017**, *50(4)*, 823-831
- [83] Clever, G.H., Kaul, C., Carell, T., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 6226-6236

- [84] Yamaguchi, H., Ebera, J., Kondo, J., Oda, S., Komuro, T., Kawamura, T., Dairaku, T., Kondo, Y., Okamoto, I., Ono, A., *Nucleic Acids Res.*, **2014**, *42*, 4094-4099
- [85] Kondo, J., Tada, Y., Dairaku, T., Saneyoshi, H., Okamoto, I., Tanaka, Y., Ono, A., *Angew Chem Int Ed.*, **2015**, *54*, 13323-13326
- [86] Dairaku, T., Furuita, K., Sato, H., Ebera, J., Nakashima, K., Kondo, J., Yamanaka, D., Kondo, Y., Okamoto, I., Ono, A., *Chem Eur J.*, **2016**, *22*, 13028-13031
- [87] Sinha, I., Kösters, J., Hepp, A., Müller, J., *Dalton Trans*, **2013**, *42*, 16080-16089
- [88] Sinha, I., Fonseca-Guerra, C., Müller, J., *Angew Chem Int Ed*, **2015**, *54*, 3603-3606
- [89] Kim, E.K., Switzer, C., *Org Lett*, **2014**, *16*, 4059-4061
- [90] Kim, E.K., Switzer, C., *ChemBioChem*, **2013**, *14*, 2403-2407
- [91] Taherpour, S., Lonnberg, H., Lonnberg, T., *Org Biomol Chem*, **2013**, *11*, 991-1000
- [92] Taherpour, S., Golubev, O., Lonnberg, T., *Org Chem*, **2014**, *79*, 8990-8999
- [93] Sinha, I., Hepp, A., Koster, J., Müller, J. *J Inorg Biochem*, **2015**, *153*, 355-360
- [94] León, J.C., Sinha, I., Müller, J., *Int J Mol Sci*, **2016**, *17*, 554
- [95] Johannsen, S., Megger, N., Böhme, D., Sigel, R.K.O., Müller, J., *Nat Chem*, **2010**, *2*, 229-234
- [96] Mandal, S., Hebenbrock, M., Müller, J., *Inorg. Chim. Acta*, **2017**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.05.072>
- [97] Kondo, J., Tada, Y., Dairaku, T., Hattori, Y., Saneyoshi, H., Ono, A., Tanaka, Y. *Nature Chemistry*, **2017**, *9*, 956–960
- [98] Polonius, F.A., Muller, J., *Angew Chem Int Ed*, **2007**, *46*, 5602-5604
- [99] Megger, D.A., Fonseca-Guerra, C., Hoffmann, J., Brutschy, B., Bickelhaupt, F.M., Müller, J., *Chem Eur J.*, **2011**, *17*, 6533-6544
- [100] Litau, S., Muller, J., *Z Anorg Allg Chem.*, **2015**, *641*, 2169-2173
- [101] Santamaría Díaz, N., Méndez-Arriaga, J.M., Salas, J.M., Galindo M.A., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55(21)*, 6170-6174
- [102] Zhang, X.B., Kong, R.M., Lu, Y., *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **2011**, *4*, 105– 128
- [103] Miyake, Y., Ono, A., *Tetrahedron Lett.*, **2005**, *46*, 2441–2443
- [104] Zhu, X., Xu, H., Gao, X., Li, X., Liu, Q., Lin, Z., Qiu, B., Chen, G., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 9080–9082
- [105] Feng, D.Q., Liu, G., Zheng, W., Liu, J., Chen, T., Li, D., *Chem. Commun.*, **2011**, *47*, 8557–8559
- [106] Hensel, S., Eckey, K., Scharf, P., Megger, N., Karst, U., Müller, J., *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 10244-10248





## CAPÍTULO 2

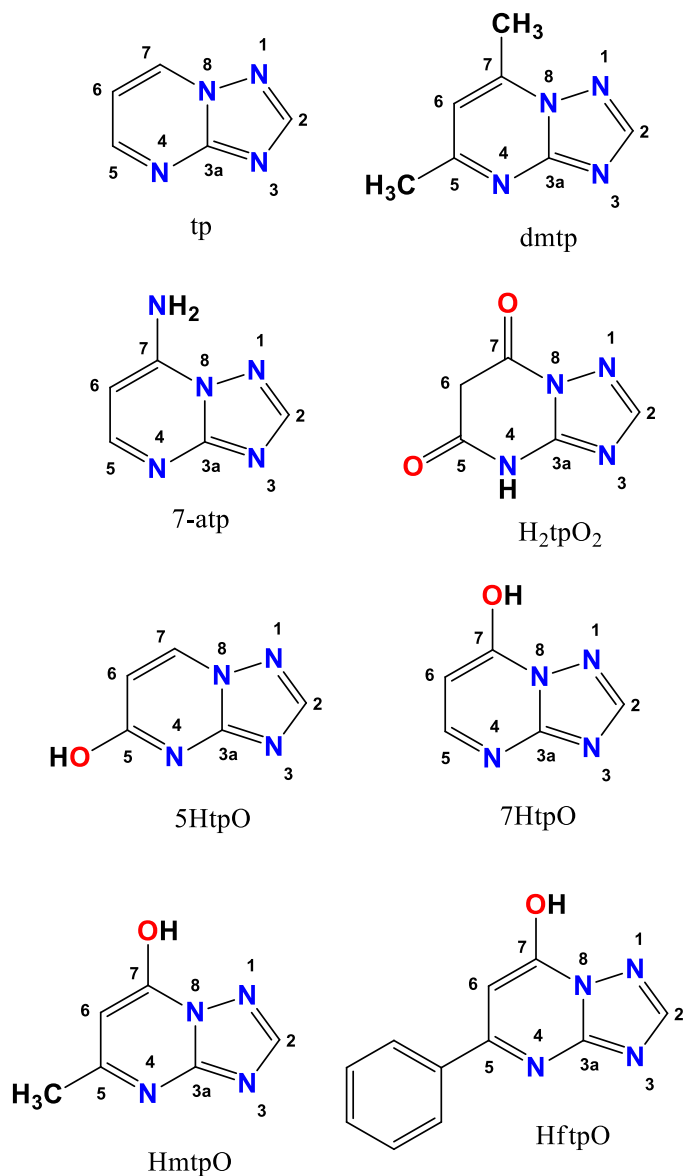
Derivados triazolopirimidínicos:

Síntesis y caracterización



En el presente capítulo se describen brevemente los diferentes derivados triazolopirimidinicos que han sido utilizados por nuestro grupo de investigación, para posteriormente centrarnos en un estudio completo del ligando 7-hidroxi-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**HftpO**), el cual ha sido sintetizado, caracterizado estructuralmente y estudiado su actividad antiparasitaria y capacidad complejante por primera vez en esta Tesis Doctoral (**Figura 2.1**).

Los derivados seleccionados y sus abreviaturas correspondientes son los siguientes:



**Figura 2.1.** Estructura de los principales ligandos 1,2,4-triazolo[1,5-a] pirimidínicos

A continuación se describen las estructuras y características principales de los citados compuestos, centrándonos de manera más amplia en el último de ellos.

## 2.1. Ligandos previos

### 2.1.1. 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (tp)

La 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**tp**), es el esqueleto básico de los derivados triazolopirimidinicos. El método de obtención de este ligando se basa en una ciclocondensación de un reactivo 1,2,4-triazólico y un sintón 1,3-bifuncional que completa la formación del segundo heterociclo. Si bien las primeras síntesis publicadas para este tipo de ligandos se atribuyen a Bülow y Haas [1], una revisión detallada acerca de otras variantes sintéticas y otros aspectos relacionados con los métodos de obtención de esta familia de ligandos puede encontrarse en el trabajo publicado por Fischer en 1993 [2].

El ligando **tp** puede adquirirse comercialmente y la estructura de su clorhidrato fue resuelta en 2007 por nuestro grupo de investigación [3]. Esta estructura puede observarse en la **Figura 2.2.**, en la que se distinguen tres posiciones potenciales de coordinación correspondientes a tres de los cuatro átomos de nitrógeno que contiene el **tp** (N1, N3 y N4), actuando el cuarto átomo de nitrógeno (N8) como cabeza de puente con una basicidad reducida, lo que le impedirá su coordinación a un ión metálico.

Se han descrito seis modos de coordinación diferentes para este ligando: tres monodentados, dos bidentados y uno tridentado que involucra a todos los nitrógenos dadores. El modo de coordinación más habitual es el N3-monodentado con una prevalencia muy significativa frente al resto de posibilidades, seguido de los modos bidentados N1,N3-puente para el caso de estructuras poliméricas y N3,N4-puente en la formación de complejos metálicos dinucleares con distancias entre ambos centros relativamente cortas. Estas afinidades son congruentes con las densidades electrónicas calculadas para cada una de las posiciones de coordinación del **tp**, que siguen la secuencia  $N3 > N1 \geq N4$  [4].

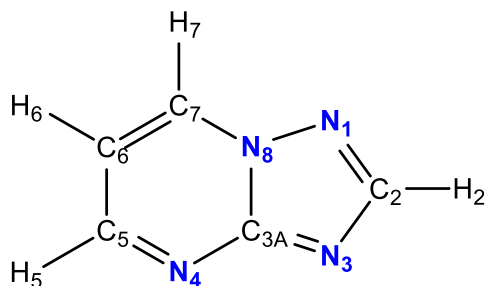
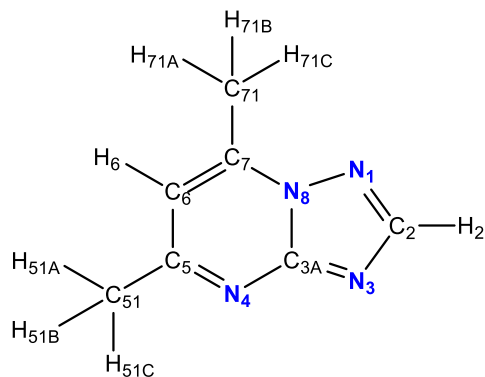


Figura 2.2. Estructura del **tp** y numeración de los átomos.

### 2.1.2. 5,7-dimetil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (dmtp)

Si se sustituyen los átomos de hidrógeno de las posiciones 5 y 7 del **tp** por grupos metilo se obtiene como resultado el derivado **dmtp**, cuya estructura se puede ver en la **Figura 2.3**. Los modos de coordinación de este derivado son bastante similares al de su equivalente no sustituido, quedando más favorecida si cabe la posición N3 en detrimento de la N4, ya que los grupos metilo ejercen un efecto estérico sobre el átomo de nitrógeno más cercano. No obstante, se han observado varios ejemplos en los que el **dmtp** actúa de forma bidentada a través de un puente N1,N3 o N3,N4. Las densidades electrónicas en este caso siguen la siguiente correlación:  $N3 > N4 \geq N1$  [4].

La inclusión de los dos grupos metilo también afecta a las propiedades físicas del ligando, observándose un aumento de la solubilidad del mismo respecto al **tp**. Esto hace que sea más fácil obtener monocristales de este compuesto, habiéndose resuelto su estructura cristalina por Odabasoglu y col. en 2006 [5]. Al igual que el **tp**, este derivado triazolopirimidínico se encuentra disponible de forma comercial, y su síntesis y caracterización estructural fue recogida en la Tesis Doctoral de A. Rahmani [6] realizada en nuestro grupo de investigación.

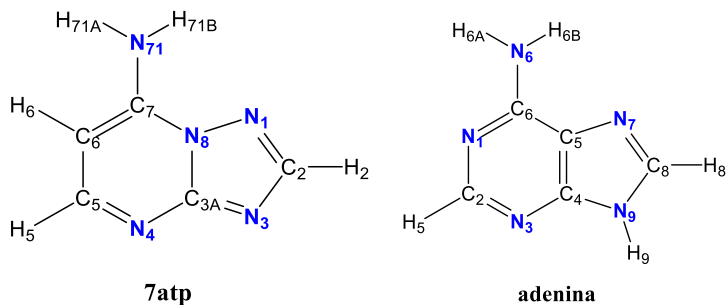


**Figura 2.3.** Estructura del **dmtp** y numeración de los átomos.

### 2.1.3. 7-amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (7-atp)

Cuando se introduce en la posición 7 del anillo triazolopirimidínico un grupo amino, se obtiene el derivado denominado **7-atp**. La presencia de un grupo amino crea una nueva posición potencial de coordinación, lo que hace a este ligando más reactivo que los dos citados anteriormente. Asimismo, este derivado presenta una gran similitud con la base púrica adenina, lo que nos permite utilizar el **7-atp** como un sistema modelo para estudiar las interacciones de iones metálicos con dicha nucleobase (**Figura 2.4**).

La estructura cristalina de esta molécula fue resuelta por nuestro grupo de investigación, describiendo las interacciones que se producen entre las propias moléculas debido a los enlaces de hidrógeno en los que intervienen los átomos de nitrógeno N1 y N3, al igual que los del grupo amino, que dan lugar a capas supramoleculares [7]. Todos estos datos, junto a una exhaustiva caracterización estructural de este ligando y de algunos de sus complejos metálicos se encuentran compilados en la Tesis Doctoral de A.B. Caballero. [8].



**Figura 2.4.** Comparación entre la estructura del **7atp** (izquierda) y la adenina (derecha). La numeración de los átomos sigue las normas de la IUPAC para el **7atp**, y las reglas bioquímicas para la adenina.

#### 2.1.4. 5-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (5HtpO) y 7-hidroxi-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (7HtpO)

Estos dos derivados triazolopirimidínicos incluyen un grupo hidroxilo en su estructura, en posición 5 para el **5HtpO** y 7 para el **7HtpO**. Ambos ligandos son isómeros de la base púrica hipoxantina, habiendo sido resueltas sus estructuras por difracción de Rayos X.

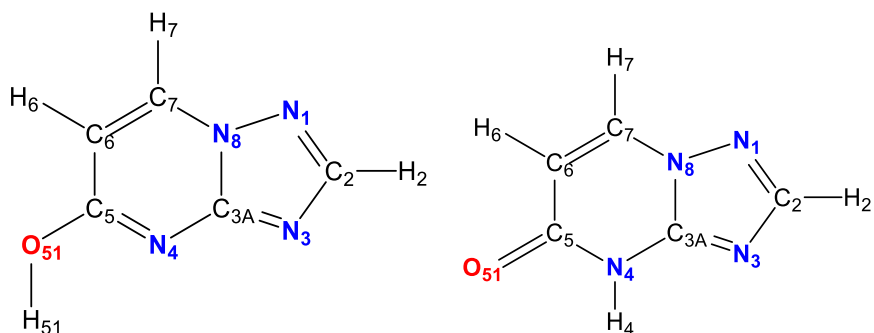
Por otra parte, la versatilidad coordinante de estos ligandos se ve aumentada con respecto a la de muchos de los derivados triazolopirimidínicos estudiados hasta la fecha, debido a la posición extra de coordinación del O5/O7, por lo que el número de vías de coordinación potenciales aumenta sensiblemente. Asimismo, la presencia de un oxígeno con capacidad dadora fomenta ese aumento de reactividad, ya que se amplía el rango de centros metálicos con los que pueden interaccionar estos dos derivados, como es el caso de los iones lantánidos.

La no disponibilidad comercial de estos ligandos hace que sea imprescindible su síntesis, que presenta el inconveniente de tener rendimientos inferiores al 40%, por lo que el uso de estos ligandos no está muy extendido.

Las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha con estos ligandos se han realizado en su totalidad por nuestro grupo de investigación y concluyen que nuevamente la forma de coordinación preferente de ambos



compuestos es la N3-monodentada, junto con la opción N3,N4-puente para la forma bidentada. No obstante, el citado oxígeno presente en estos compuestos permite nuevas vías de coordinación que han sido estudiadas, como por ejemplo la N3,O5-puente para el **5HtpO** [9]. Una descripción más detallada de la síntesis y caracterización de estos ligandos, se encuentra recogida en la Tesis Doctoral de M.A. Abul-Haj, en la que también se incluyen detalles sobre algunos de los complejos metálicos obtenidos con estos ligandos (**Figura 2.5**) [10].



**Figura 2.5.** Estructura de las formas tautoméricas del ligando **5HtpO** que suelen aparecer en sus complejos metálicos (lactima a la izquierda y lactama a la derecha) y numeración de los átomos.

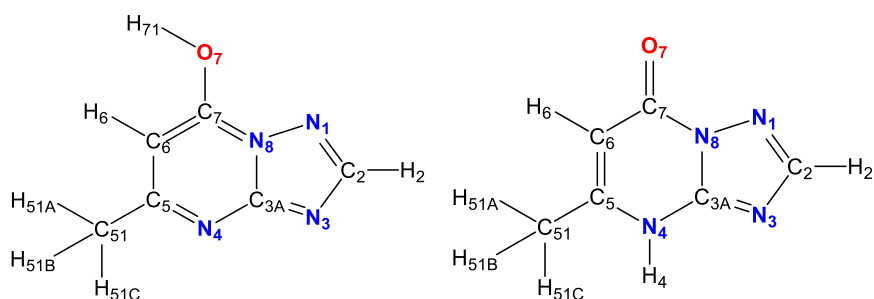
### 2.1.5. 7-hidroxi-5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (HmtpO)

El derivado **HmtpO** fue uno de los primeros derivados 1,2,4-triazolo[1,5-a] pirimidínicos en estudiarse [1]. No obstante, no fue hasta 1935 cuando Birr demostró la efectiva capacidad complejante de este ligando al descubrir el efecto estabilizador que producía sobre emulsiones fotográficas de plata [11].

El anillo triazolopirimidínico del **HmtpO** se encuentra sustituido en las posiciones 5 por un grupo metilo y 7 por un hidroxilo. La existencia de un átomo de hidrógeno ácido en la molécula permite que se formen cuatro tautómeros (una forma lactima y tres formas lactámicas) dependiendo de dónde se sitúe dicho hidrógeno (O7, N4, N3 o N1). Las dos únicas formas

detectadas hasta la fecha se encuentran representadas en la **Figura 2.6**. El **HmtpO** puede adquirirse comercialmente en forma anhidra, obteniéndose el compuesto monohidratado al recrystalizar el compuesto anhidro en H<sub>2</sub>O. Su estructura fue resuelta a partir de monocristales obtenidos al llevar a cabo un proceso de recrystalización del compuesto anhidro en metanol. Los resultados estructurales indicaron que la especie aislada era la forma tautomérica protonada en N4, que da lugar a cadenas unidas por fuertes enlaces de hidrógeno N4-H---O7 [12]. Al igual que en el caso del **5HtpO/7HtpO**, el grupo hidroxilo amplía el número de modos de coordinación respecto a los análogos sin oxígeno, así como su reactividad frente a iones lantánidos, constatada en un trabajo de A.B. Caballero y col. [13].

Este ligando puede actuar tanto en forma molecular (**HmtpO**) como en forma aniónica (**mtpO<sup>-</sup>**). Los estudios de orbitales moleculares muestran un cambio en la preferencia de este compuesto para coordinarse a un ión metálico según actúe en forma neutra (N3>N1>O7) o en forma aniónica (N4>N3>N1>O7). No obstante, la posición N3 se ve favorecida frente a la N4 experimentalmente debido a los impedimentos estéricos que presenta esta última, causados por el sustituyente metilo en posición 5. La memoria de Tesis Doctoral de J.A.R. Navarro, llevada a cabo en nuestro departamento, recoge un estudio en profundidad del ligando **HmtpO** y de algunos de sus complejos metálicos [14].



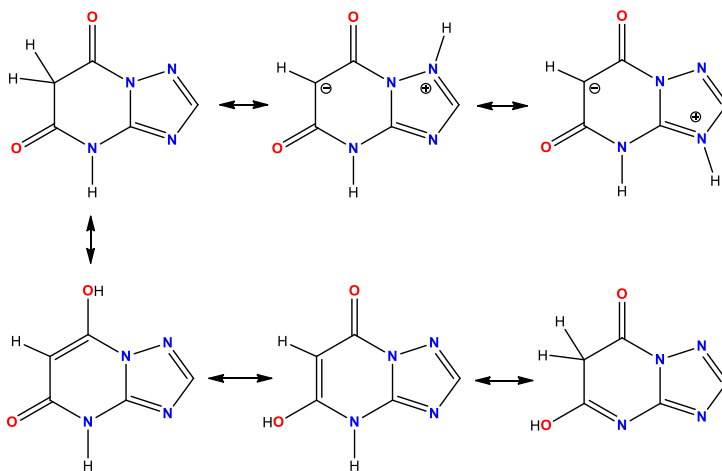
**Figura 2.6.** Estructura de las formas tautoméricas del ligando **HmtpO** que suelen presentarse en sus complejos metálicos (lactima a la izquierda y lactama a la derecha), con numeración de los átomos.

### 2.1.6. 5,7-dioxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (H<sub>2</sub>tpO<sub>2</sub>)

El **H<sub>2</sub>tpO<sub>2</sub>**, presenta dos átomos de oxígeno en las posiciones 5 y 7 del anillo triazolopirimidínico. Esto lo convierte en un excelente candidato para la síntesis de complejos metálicos de transición, como pusieron de manifiesto Orihuela y col. [15] en 1997.

Para estudiar la estructura de este ligando, se realizaron cálculos semiempíricos de orbitales moleculares para las diferentes formas tautoméricas (**Figura 2.7**) que puede presentar este así como para su forma aniónica **HtpO<sub>2</sub><sup>-</sup>**, habiendo sido determinada la estructura cristalina de su sal monosódica dihidratada Na(HtpO<sub>2</sub>)·2H<sub>2</sub>O [16].

Dado que el grupo metileno de **H<sub>2</sub>tpO<sub>2</sub>** es fuertemente ácido, existe la posibilidad de que uno de los átomos de hidrógeno de este grupo migre a una posición básica de la molécula, ya sea a un átomo de nitrógeno generando una forma zwitteriónica o a un átomo de oxígeno dando lugar a una forma enólica.



**Figura 2.7.** Estructuras de las formas tautoméricas probables del ligando **H<sub>2</sub>tpO<sub>2</sub>**.

Nuevamente este es un ligando que no se encuentra disponible comercialmente, por lo que se hace necesaria su síntesis y debido a esto no existen muchos trabajos relacionados con la actuación de este compuesto como ligando.

Además de los 6 ligandos comentados, existe un gran número de derivados 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidínicos en el mercado que han sido caracterizados por diversos grupos de investigación. Se han seleccionado los anteriores por ser los más estudiados y de los que más referencias bibliográficas existen, pero cabe destacar también la existencia de un derivado difenílico en posiciones 5 y 7 [17], no muy estudiado pero que guarda cierto parecido estructural con el siguiente derivado a comentar, el **HftpO**.

## 2.2. 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (HftpO)

Si en el anillo básico de la 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina se sustituye el átomo de hidrógeno de la posición 5 por un grupo fenilo, y en posición 7 hay un grupo hidroxilo se obtiene el 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina al que hemos denominado **HftpO**. La presencia de un anillo aromático adicional confiere diferentes características a este nuevo ligando triazolopirimidínico, las cuales influirán en su manera de interaccionar con los metales a la hora de formar complejos [18].

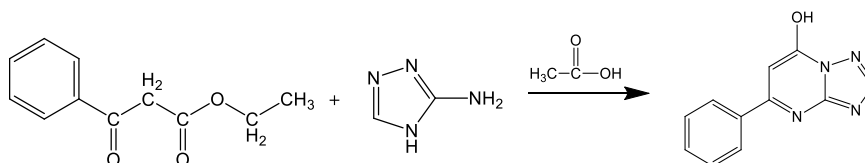
Para una completa comprensión de las propiedades y estructura de este nuevo ligando, se ha llevado a cabo un exhaustivo proceso de caracterización estructural mediante diversas técnicas instrumentales como IR, UV-Vis, análisis térmico por TG y DSC, espectrometría de masas, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y DRX en monocristal.

### 2.2.1. Síntesis

**Materiales:** Matraz de 25mL, sistema de reflujo, imán, placa calefactora y agitadora, equipo de filtración a vacío y desecador a vacío.

**Reactivos:** 3.840g de benzoilacetato de etilo (BAE), 1.640g de 3-amino-1,2,4-triazol (ATA), 10mL de ácido acético glacial.

Se hace reaccionar el BAE con el ATA, utilizando ácido acético glacial como disolvente. Se calienta a reflujo durante 10-12 horas a una temperatura de 120°C manteniendo agitación constante, para que el disolvente esté en constante ebullición. El sólido blanco obtenido de la reacción se lava varias veces con H<sub>2</sub>O y DCM con objeto de eliminar tanto impurezas como restos de disolvente que pudieran quedar, retirando posteriormente todo el líquido de limpieza en un desecador a vacío con ácido sulfúrico. Finalmente, se obtiene un sólido blanco estable a temperatura ambiente. En el siguiente esquema se indica la reacción que tiene lugar:

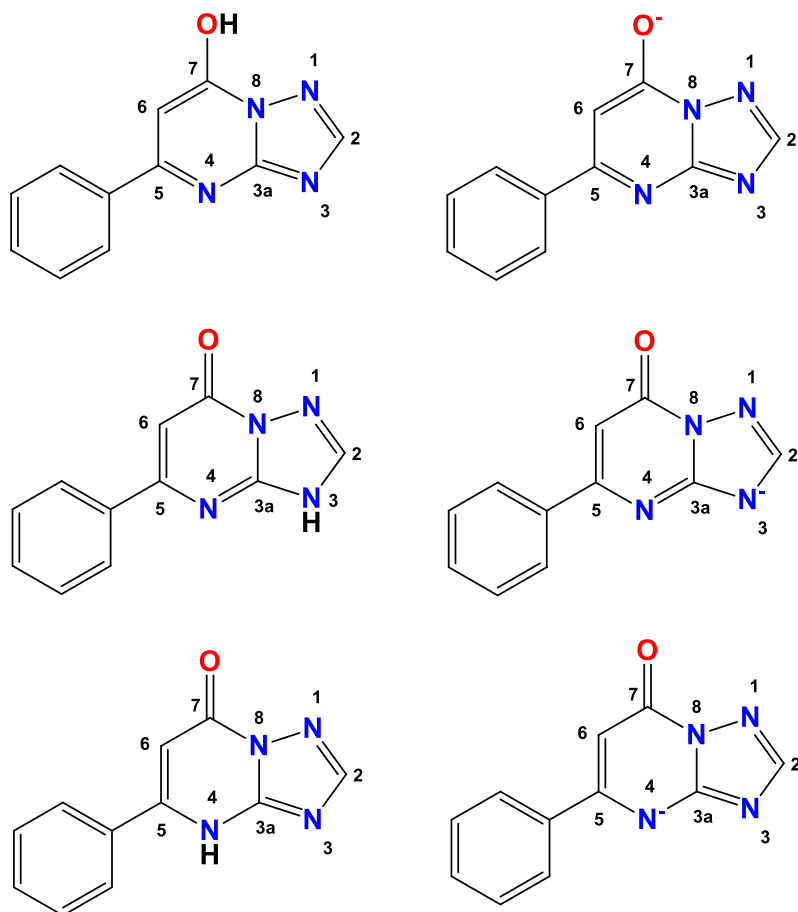


**Esquema 2.1.:** Síntesis de la 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**HftpO**)

El análisis elemental para C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O teórico es de C, 61.40; H, 4.09; N, 26.58. mientras que el encontrado experimentalmente es C, 61.24; H, 3.80; N, 26.40%.

### 2.2.2. Estructura

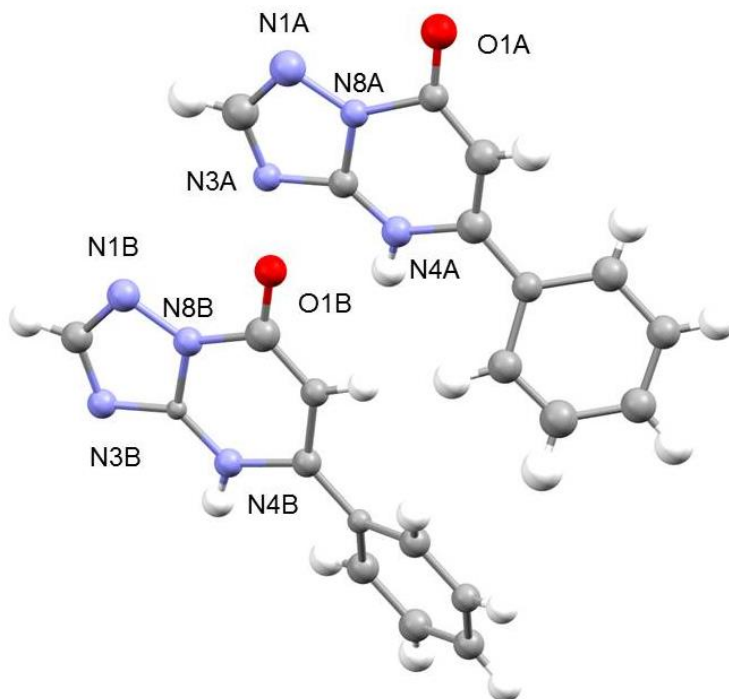
El derivado **HftpO** puede presentar diversas formas tanto moleculares como aniónicas (**Figura 2.8**), debido a la posibilidad de movimiento de carga que permite el oxígeno en posición 7.



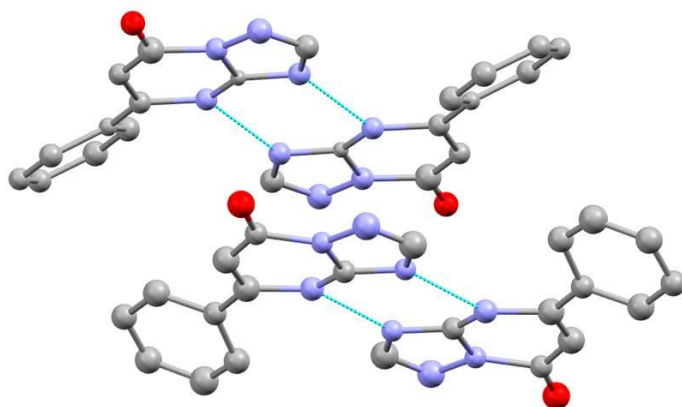
**Figura 2.8.** Estructuras posibles del **HftpO** en su forma molecular (izquierda) y en forma aniónica (derecha).

El ligando cristaliza en el grupo espacial *P-1* del sistema triclinico. La estructura del **HftpO** se representa en la **Figura 2.9**, en la que se observa que el átomo de hidrógeno está unido a N4. El esqueleto triazolopirimidínico presenta las distancias y ángulos de enlace esperados, pero en este caso se introduce un benceno con libre giro a través del enlace C5-C51 (1.37Å) en la posición 5. En la unidad asimétrica hay dos ligandos diferentes cuyos ángulos diedros entre unidades triazolopirimidínicas y el anillo bencénico son 25.14 y 30.48° respectivamente. Existen enlaces de hidrógeno entre los átomos N3 y N4 opuestos de los dos ligandos **HftpO**, con valores de 2.877 y 2.907Å respectivamente, produciéndose además un apilamiento  $\pi$ -stacking que contribuye a la estabilización de la estructura

(Figura 2.10). Todas estas interacciones afectan a la solubilidad del ligando que presenta serios problemas para disolverse en agua y en los disolventes normalmente empleados para llevar a cabo ensayos biológicos, al contrario de lo que ocurre en otros derivados triazolopirimidínicos. Los datos cristalográficos de este ligando aparecen resumidos en la **Tabla 2.1**, mientras que las distancias y ángulos de enlace se encuentran recogidos en el **ANEXO II**.



**Figura 2.9.** Estructura del ligando 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina, en la que se observa la unidad asimétrica que contiene dos moléculas de **HftpO** diferentes cristalográficamente.



**Figura 2.10.** Interacciones por enlace de hidrógeno entre átomos N3 y N4 opuestos en el ligando **HftpO**.

Compuesto	<b>HftpO</b>
Fórmula química	$C_{11}H_8ON_4$
M/g mol <sup>-1</sup>	212.21
T/K	100
Sistema cristalino	Triclínico
Grupo espacial	$P_{-1}$
$a$ (Å)	9.153 (3)
$b$ (Å)	9.820 (3)
$c$ (Å)	11.083 (3)
$\alpha$ (°)	72.151 (6)
$\beta$ (°)	80.221 (6)
$\gamma$ (°)	82.547 (6)
$V$ / Å <sup>3</sup>	931.2 (5)
$Z$	4
$\rho$ /g cm <sup>-3</sup>	1.514
$\mu$ /mm <sup>-1</sup>	0.104
$R[1 > 2\sigma(I)]^a$	0.1308
$wR^2 [1 > 2\sigma(I)]^b$	0.2874

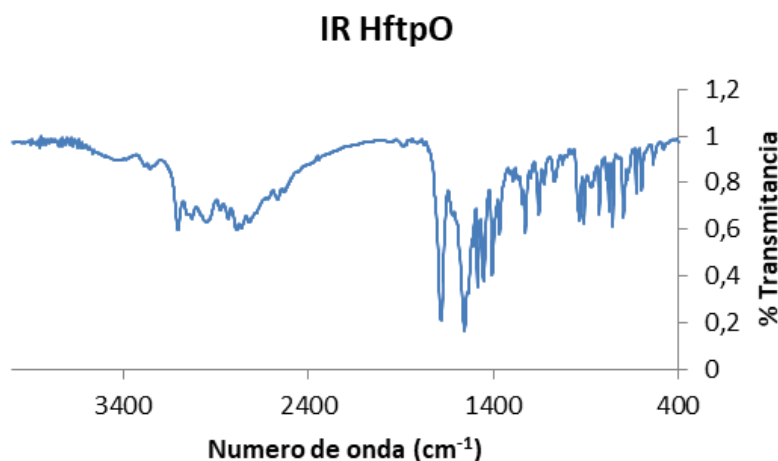
**Tabla 2.1.** Datos cristalográficos del **HftpO**



### 2.2.3. Espectroscopía IR y UV-Vis

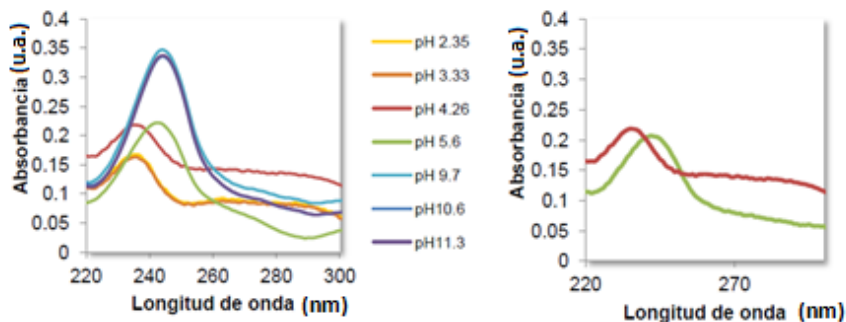
Con objeto de obtener información acerca de los modos de vibración y de las transiciones electrónicas  $\pi-\pi^*$  del ligando **HftpO**, éste se ha caracterizado espectroscópicamente mediante IR y UV-VIS.

El espectro IR se ha obtenido diluyendo una pequeña muestra de **HftpO** en KBr. Dicho espectro aparece recogido en la **Figura 2.11** en el que se aprecia la presencia de las dos bandas características del anillo triazolopirimidínico a  $1680$  y  $1560\text{cm}^{-1}$  respectivamente. La ausencia de bandas significativas en la zona superior a  $3000\text{cm}^{-1}$  indica que no hay presencia de moléculas de agua de cristalización o de hidratación, lo que nos indica que el compuesto sintetizado es anhidro.



**Figura 2.11.** Espectro IR del **HftpO**.

Por otra parte, en el espectro UV del ligando **HftpO** puede observarse que para valores inferiores al  $\text{pK}_a$  del compuesto ( $\text{pK}_a \approx 5,5$ ), donde el ligando se encuentra en forma molecular, aparece una banda a  $235\text{nm}$  que es asignable a una transición  $\pi-\pi^*$ . Si se analiza el comportamiento a  $\text{pH}$  superiores al  $\text{pK}_a$ , se produce la desprotonación del **HftpO**, lo que origina un desplazamiento de dicha banda hacia longitudes de onda más altas ( $244\text{nm}$ ). Una vez producida la desprotonación del ligando esta banda mantiene su posición e intensidad, lo que sugiere que el ligando es estable a valores de  $\text{pH}$  altos. Estas diferencias pueden observarse en la **Figura 2.12**.



**Figura 2.12.** Espectro UV del **HftpO** a diferentes valores de pH (izquierda). A la derecha se muestra el desplazamiento del máximo de absorción en el cambio de pH 4.3 a 5.6.

#### 2.2.4. Resonancia Magnética Nuclear ( $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ -RMN)

Se registraron los espectros RMN monodimensionales de  $^1\text{H}$  (300.20MHz) y  $^{13}\text{C}$  (75.49MHz) para tener más datos que aportar a la completa caracterización del ligando **HftpO**. Los correspondientes espectros junto con las asignaciones aparecen recogidos en las **Figuras 2.13** y **2.14**.

$^1\text{H}$ -RMN (300.20MHz, DMSO- $d_6$ ): 8.40ppm (s, 1H), 7.90ppm (m, 2H), 7.50ppm (m, 3H), 6.40ppm (s, 1H)

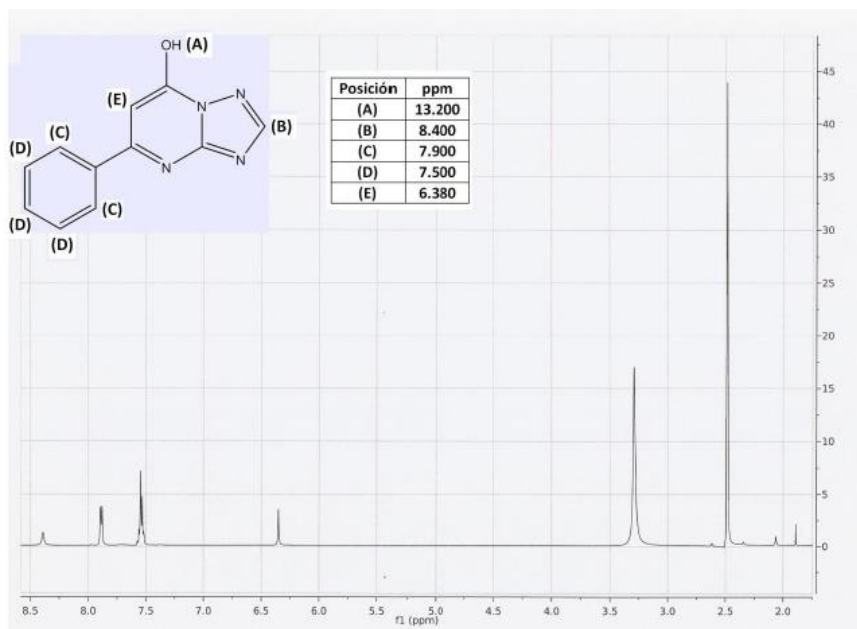


Figura 2.13. Espectro  $^1\text{H}$ -RMN del HftpO.

$^{13}\text{C}$ -RMN (75.49MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ): 156.1ppm, 151.4ppm, 133.5ppm, 131.4ppm, 129.3ppm, 129.2ppm, 127.6ppm, 98.0ppm

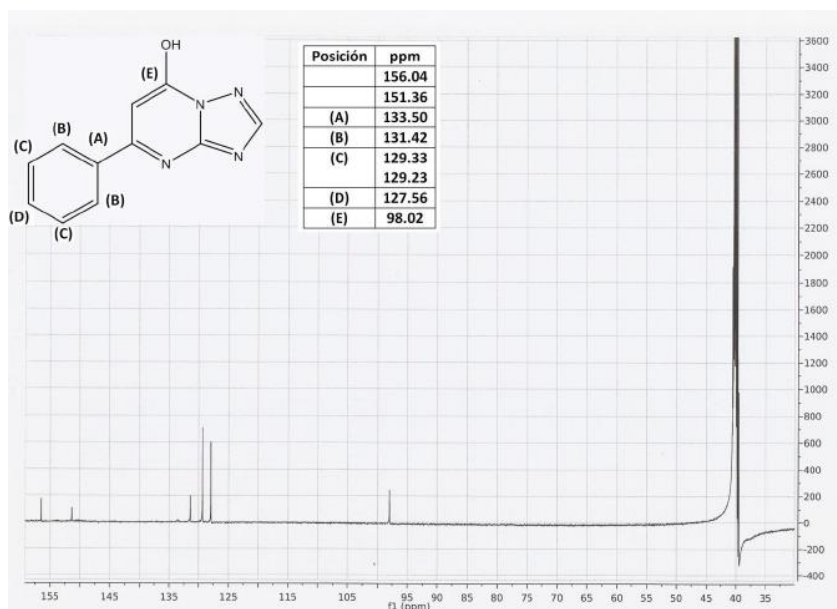


Figura 2.14. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del HftpO.

### 2.2.5. Espectrometría de masas

Para confirmar la pureza y el peso molecular del ligando **HftpO** sintetizado, así como para evaluar los posibles modos de fragmentación del mismo, se obtuvo un espectro TOF MS ES+ (**Figura 2.15**), ionizando la muestra por electrospray y registrando el espectro en un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo. La masa obtenida de 213.08 m/z corresponde a  $[M+1]$ , lo que nos confirma el peso molecular de 212g/mol para el **HftpO**. También se aprecian señales para  $[2M+1]$  por valor de 425.15 m/z. No se observan señales que correspondan al anillo aromático de la posición 5 ni al grupo oxo de la posición 7, por lo que su unión al esqueleto triazolopirimidínico, o más concretamente al anillo bencílico, es más fuerte que otras zonas por las que sí se produce rotura para dar lugar a los fragmentos que se recogen.

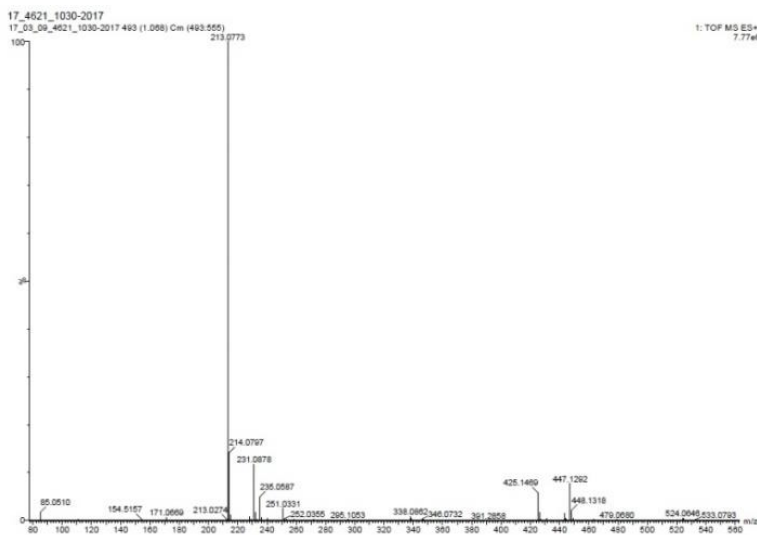


Figura 2.15. Espectro de masas TOF MS ES+ de **HftpO**

### 2.2.6. Análisis térmico (TG y DSC)

La curva DSC del **HftpO** (**ANEXO II**) muestra como hecho más significativo la presencia de un fuerte efecto endotérmico 298.4°C, que corresponde a la fusión del compuesto. La descomposición térmica de este compuesto transcurre en cuatro etapas, no quedando ningún residuo en el crisol portamuestras por encima de los 650°C.

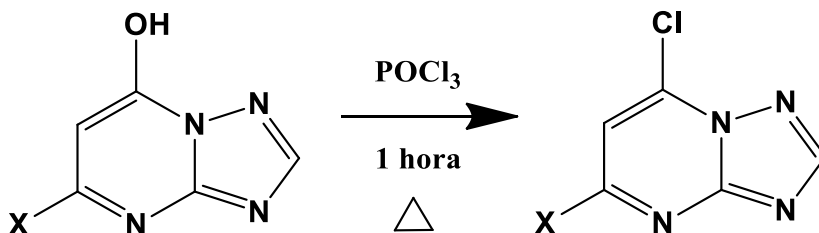
Todos los datos recogidos en el apartado 2.2 abarcan la completa caracterización de este nuevo ligando 1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidínico (**HftpO**), lo que nos permite avanzar hasta el siguiente punto objeto de estudio, la síntesis de complejos metálicos utilizando este y otros derivados triazolopirimidínicos, que se describe en el capítulo 3.

## 2.3. Derivados triazolopirimidínicos clorados

Partiendo de los ligandos **HftpO** y **HmtpO**, se han conseguido aislar dos nuevos derivados triazolopirimidínicos clorados: 7-cloro-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**ftpCl**) y 7-cloro-5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**mtpCl**). Sus métodos de síntesis y una breve caracterización espectroscópica y térmica se muestran a continuación.

### 2.3.1. Síntesis

La síntesis para ambos ligandos es muy parecida. Se mezclan 4 mmol del derivado triazolopirimidínico correspondiente (**HftpO**, 0.848g; **HmtpO**, 0.600g) con un exceso de POCl<sub>3</sub> y se mantiene la mezcla a reflujo a 105°C durante una hora, produciéndose un cambio del color blanquecino original de la disolución a tonos rojizos. Para obtener los productos, el sólido se aísla tras una extracción líquido-líquido con H<sub>2</sub>O y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, quedando retenido en la fase orgánica que se retira en rotavapor. El **Esquema 2.2.** muestra la síntesis general para estos compuestos.



**Esquema 2.2.:** Síntesis de los derivados triazolopirimidínicos **ftpCl** y **mtpCl**, siendo X un grupo fenilo o metilo según corresponda.

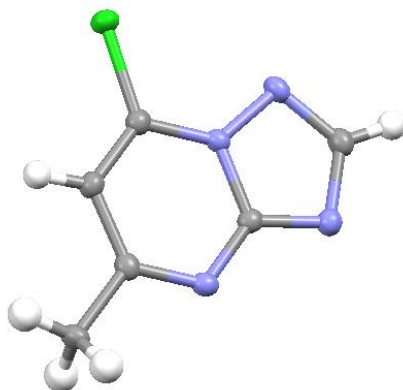
Los resultados de Análisis Elemental para ambos compuestos se encuentran en la **Tabla 2.2**.

Compuesto	Fórmula	% Teórico	% Experimental
<b>ftpCl</b>	$C_{11}H_7N_4Cl$	C: 57.27 N: 24.29 H: 3.06	C: 57.59 N: 24.63 H: 3.60
<b>mtpCl</b>	$C_6H_5N_4Cl$	C: 42.74 N: 33.23 H: 2.99	C: 42.27 N: 32.74 H: 3.69

**Tabla 2.2.** Resultados de análisis elemental para los ligandos clorados triazolopirimidínicos.

### 2.3.2. Estructura

El ligando **mtpCl** cristaliza en el grupo espacial  $P2_1/c$  del sistema monoclínico. Su estructura se representa en la **Figura 2.16**, en la que se observa una única molécula de ligando en la unidad asimétrica. El esqueleto triazolopirimidínico presenta distancias y ángulos de enlace similares a los de otros derivados de la misma familia, como cabría esperar (ver **ANEXO III**). Los datos cristalográficos de este ligando se recogen en la **Tabla 2.3**.



**Figura 2.16.** Estructura de rayos X del ligando 7-cloro-5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**mtpCl**). La unidad asimétrica solo contiene una molécula de ligando.

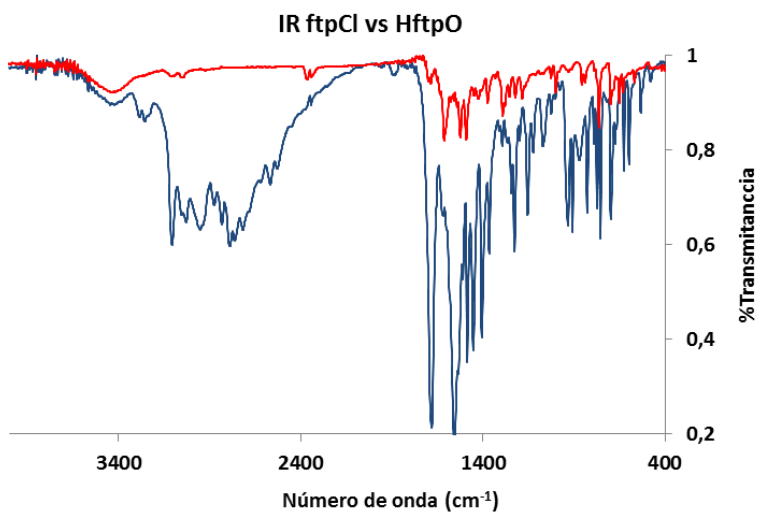
En cuanto al ligando **ftpO**, no se han conseguido aislar monocristales adecuados para su resolución por difracción de R-X, pero se continúa trabajando en la actualidad en ello.

Compuesto	<b>mtpCl</b>
Fórmula química	$C_6H_7N_4Cl$
M/g mol <sup>-1</sup>	168.5
T/K	100
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	<i>P</i> 21/ <i>c</i>
<i>a</i> (Å)	8.3768 (5)
<i>b</i> (Å)	12.0691 (8)
<i>c</i> (Å)	6.8173 (4)
$\alpha$ (°)	90.00
$\beta$ (°)	91.318 (3)
$\gamma$ (°)	90.00
<i>V</i> / Å <sup>3</sup>	689.05 (7)
<i>Z</i>	4
$\rho$ /g cm <sup>-3</sup>	1.625
$\mu$ /mm <sup>-1</sup>	4.339
$R[1 > 2\sigma(I)]^a$	0.0364
$wR^2 [1 > 2\sigma(I)]^b$	0.0921

**Tabla 2.3.** Datos cristalográficos del **mtpCl**

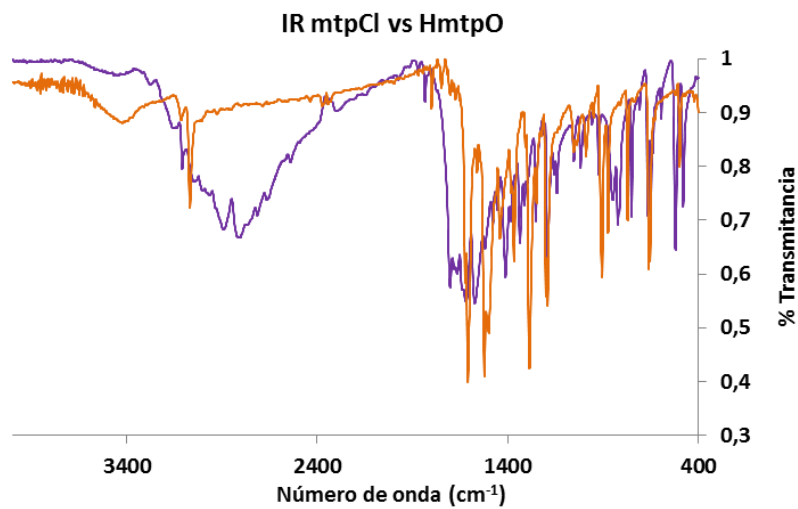
### 2.3.3. Caracterización espectroscópica

Los espectros IR de ambos ligandos clorados muestran un ligero cambio en la posición de las bandas características de las triazolopirimidinas en la zona de  $1700\text{-}1500\text{cm}^{-1}$  con respecto a las de los reactivos de partida (ver **Figuras 2.17** y **2.18** para la comparativa), observándose también una disminución del número de señales en la zona de  $3100\text{-}2800\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 2.19.** Comparación entre FT-IR de **HftpO** (azul) y su análogo clorado **ftpCl** (rojo), en la que se observa un desplazamiento de las bandas características del anillo triazolopirimidínico, así como la desaparición de las señales debidas a las vibraciones de tensión O-H.





**Figura 2.18.** Comparación entre FT-IR de **HmtpO** (morado) y su análogo clorado **mtpCl** (naranja), en la que se observa el mismo comportamiento que en la imagen anterior.

## 2.4. Bibliografía

- [1] Bülow, C., *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **1909**, *42*, 4429–4438
- [2] Fischer, G., *Advances in Heterocyclic Chemistry*, **1993**, *57*, 81–138
- [3] Maldonado, C. R., Quirós, M., Salas, J. M., 1,2,4-Triazolol[1,5-*a*]pyrimidin-3-ium chloride. *Acta Crystallographica Section E Structure Reports Online*, **2007**, *63*(3), o1509–o1510
- [4] Salas, J. M., Enrique, C., Romero, M. A., Takagi K., Aoki K., Miyashita Y., Suh, I., *Polyhedron*, **1992**, *11*(22), 2903-2912
- [5] Odabasoglu, M., Büyükgüngör, O. 5,7-dimethyl-1,2,4-triazolol[1,5-*a*]pyrimidine. *Acta Crystallographica*, **2006**, *62*, o1310-o1311
- [6] Rahmani, A., Tesis Doctoral: *Complejos metálicos de derivados triazolopirimidínicos*. Universidad de Granada. **1994**
- [7] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, A., Vidal, I., Dobado, J. A., Castillo, Ó., Lezama, L., Salas, J. M., *Dalton Transactions*, **2012**, *41*(6), 1755–64
- [8] Caballero, A.B., Tesis Doctoral: *Nuevos materiales metalorgánicos basados en triazolopirimidinas*. Universidad de Granada. **2010**
- [9] Abul Haj, M., Salas, J.M., Quirós, M., Molina, J., Faure, R., *5J. Mol. Struct.* **2000**, *519*, 165-172
- [10] Abul-Haj, M.A., Tesis Doctoral: *Complejos metálicos de los derivados 5-oxo y 7-oxo de la 1,2,4-triazolol[1,5-*a*]pirimidina*. Universidad de Granada. **2000**
- [11] Birr, E., *Z. Wiss. Phot.*, **1952**, *47*, 2-58
- [12] Navarro, J.A.R., Romero, M.A., Salas, J.M., Faure, R., Solans, X., *J. Chem Soc. Dalton Trans.* **1997**, 2321-2326
- [13] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, A., Salas, J. M., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., Ramírez-Macías, I., Santamaría-Díaz, N., Gutiérrez-Sánchez, R. *Journal of Inorganic Biochemistry*, **2014**, *138*, 39–46
- [14] Navarro, J.A.R., Tesis Doctoral: *Estudio estructural y actividad biológica de complejos ternarios mono- y dinucleares de la 7-hidroxi-5-metil[1,2,4]triazolol[1,5-*a*]pirimidina*. Universidad de Granada, **1996**
- [15] Orihuela, S., Sánchez, M. P., Quirós, M., Martín, D., Faure, R. *Polyhedron*, **1998**, *17*(15), 2477-2481
- [16] Orihuela, S., Sánchez, M. P., Quirós, M., Molina, J., Faure, R. *Journal of Molecular Structure*, **1997**, *415*, 285–292
- [17] Szlyk, E., Pazderski, L., Łakomska, I., Kozerski, L., Sitkowski, J. *Magn. Reson. Chem.* **2002**, *40*, 529–532
- [18] Méndez-Arriaga, J.M., Esteban-Parra, G.M., Juárez, M.J., Rodríguez-Diéguez, A., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M., *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *175*, 217-224

# CAPÍTULO 3

Complejos metálicos con  
5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina



En este capítulo se describe la síntesis, estructura y una completa caracterización espectroscópica y térmica de los nuevos complejos metálicos obtenidos a partir del ligando 7-hidroxi-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**HftpO**). Estos compuestos se han clasificado según el tipo de centro metálico que poseen, pudiendo así distinguirse complejos con metales divalentes (Co, Ni, Cu, Zn) y complejos con metales trivalentes, concretamente cationes lantánidos (La, Nd, Eu, Gd, Tb, Dy, Er, Yb), ya que el ligando empleado posee átomos de oxígeno dadores en su estructura y se ha demostrado la gran afinidad de este tipo de derivados por los lantánidos.

### 3.1. Complejos con metales divalentes

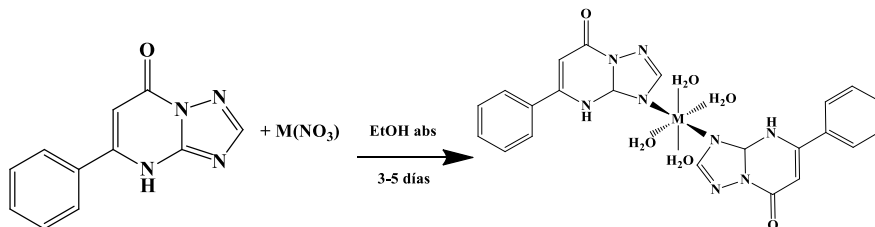
En este primer apartado se describen los complejos obtenidos al reaccionar el ligando **HftpO** con metales de transición divalentes (Co, Ni, Cu, Zn), agrupados por familias con la misma fórmula molecular. Existen diversos ejemplos de derivados triazolopirimidínicos con este tipo de metales [1-4], en los que se observa una tendencia a reaccionar siempre el ligando vía N3,N4 con el centro metálico.

#### 3.1.1. Síntesis

##### 3.1.1.1. $[M(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$

Para la síntesis de los complejos de fórmula general  $[M(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  el método seguido ha sido el que se describe a continuación. Se vierte una disolución caliente de **HftpO** (1mmol, 0.212g) en 20mL de etanol sobre otra disolución también caliente de 5mL de etanol que contiene 1mmol del nitrato metálico correspondiente en cada caso ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 0.241g;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.291g;  $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.290g;  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0.297g). En los casos de los complejos de Co y Ni, fue necesario añadir 2-3 gotas de NaOH 0.1M para ajustar el pH del medio y facilitar la formación del nuevo complejo metálico. El primer precipitado casi instantáneo se retira de la disolución mediante filtrado, y tras dejar la disolución 3-5 días a temperatura ambiente se obtiene en todos los casos un sólido microcristalino, excepto para el  $[\text{Cu}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ , en el que se formaron cristales de gran calidad aptos para difracción de Rayos X en

monocristal. En el **Esquema 3.1** se indica de forma resumida la síntesis de estos complejos.

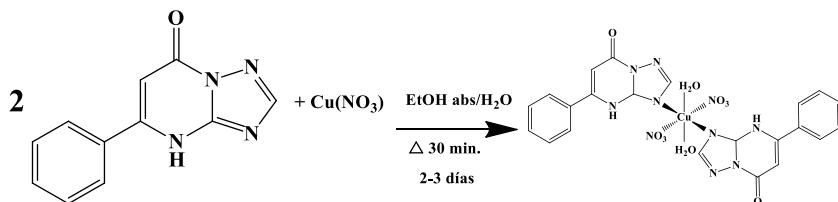


**Esquema 3.1.** Resumen del proceso de síntesis de la familia de complejos de fórmula general  $[M(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$

Los datos de análisis elemental de los cuatro complejos aislados se indican en la **Tabla 3.1**. Los rendimientos de reacción están en torno al 20% en los cuatro casos.

### 3.1.1.2. $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Variando ligeramente las condiciones y disolventes empleados en la reacción descrita en el anterior apartado se consiguió un complejo de Cu y **HftpO** de fórmula  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Para ello, una disolución acuosa de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (1mmol, 0.241g, 20mL) fue añadida a otra de **HftpO** (2mmol, 0.424g) del mismo volumen, pero en este caso de etanol. Una vez que ambas disoluciones se mezclan, aparece una turbidez verde inmediata. La disolución se calentó y agitó durante 30 min a 85 °C hasta que el líquido se vuelve transparente. Dos días después aparecen cristales prismáticos de color azul en las paredes del vaso, de una calidad suficiente para su resolución por Difracción de Rayos X en monocristal. Un esquema de la obtención de este complejo aparece recogido a continuación (**Esquema 3.2**). Los datos de Análisis Elemental para este complejo aparecen en la **Tabla 3.1**. El rendimiento de reacción es del 22%.



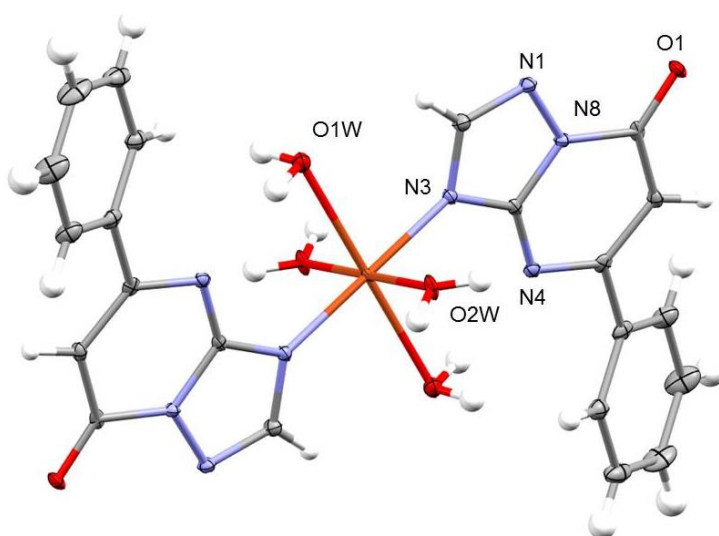
Esquema 3.2. Esquema del proceso de síntesis de  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Complejo	Fórmula	% Teórico	% Experimental
$[\text{Cu}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6\text{Cu}$	C: 47.38 N: 20.11 H: 3.98	C: 46.92 N: 19.62 H: 4.21
$[\text{Co}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6\text{Co}$	C: 47.73 N: 19.62 H: 4.01	C: 47.47 N: 19.45 H: 4.19
$[\text{Ni}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6\text{Ni}$	C: 47.30 N: 20.07 H: 3.97	C: 46.79 N: 19.84 H: 4.21
$[\text{Zn}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_6\text{Zn}$	C: 47.81 N: 20.29 H: 4.02	C: 47.49 N: 20.04 H: 4.24
$[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_{10}\text{O}_{11}\text{Cu}$	C: 38.63 N: 21.62 H: 3.08	C: 38.19 N: 21.42 H: 3.94

Tabla 3.1. Resultados de análisis elemental para los complejos divalentes de **HftpO**

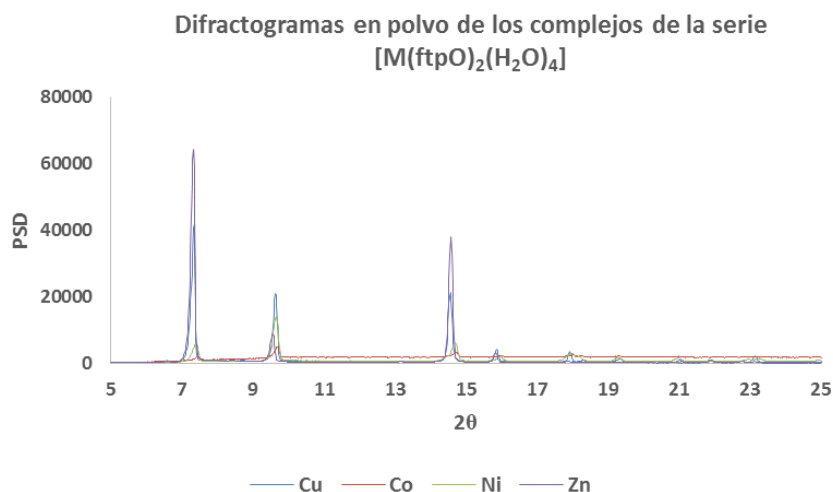
### 3.1.2. Descripción estructural

Los complejos de la serie de fórmula general  $[M(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  cristalizan en el sistema monoclinico, en el grupo espacial  $P2_1/c$ . Una vista en perspectiva de la estructura puede observarse en la **Figura 3.1** para el caso del complejo de cobre  $[\text{Cu}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$ , compuesto del cual lograron aislarse monocristales de calidad suficiente para su medida por DRX. La isoestructuralidad del resto de la serie se comprobó por difracción de Rayos X en polvo (**Figura 3.2**)



**Figura 3.1.** Estructura de  $[\text{Cu}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  en la que se observan 2 moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  apicales y otras dos equatoriales. La coordinación de los ligandos **HftpO** al centro metálico de Cu se establece vía N3.





**Figura 3.2.** Difractogramas en polvo de los complejos de la serie [M(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] en los que se aprecia la isoestructuralidad de todos ellos.

El complejo presenta una estereoquímica octaédrica CuN<sub>2</sub>O<sub>4</sub> formada por cuatro átomos de oxígeno pertenecientes a otras tantas moléculas de H<sub>2</sub>O coordinadas y dos átomos de nitrógeno N3 pertenecientes a dos ligandos 7-hidroxi-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina diferentes, en su forma aniónica **ftpO<sup>-</sup>**. La distancia de enlace Cu–N<sub>ftpO</sub> tiene un valor de 2.0013(18)Å, mientras que las Cu–O<sub>w</sub> son 1.9915 y 2.3944Å para las ecuatoriales y apicales respectivamente. Los ángulos cis y trans tienen valores de 88.24°, 91.76° y 180° respectivamente e impuestos por simetría.

Este compuesto muestra una compleja red de enlaces de hidrógeno, en la cual están involucrados los átomos N1, N3, N4 de los ligandos y los átomos de oxígeno de las moléculas de H<sub>2</sub>O coordinadas tanto apicales como ecuatoriales, O<sub>1w</sub> y O<sub>2w</sub> respectivamente (**Figura 3.3**). Dichos enlaces de hidrógeno generan una ordenación en zigzag en 2D con distancias en el rango de 2.671–2.835Å. Es interesante remarcar que el enlace de hidrógeno entre N4 y el oxígeno del agua apical es especialmente fuerte. Dicho enlace de hidrógeno es el responsable de la casi coplanaridad de los dos ligandos **ftpO<sup>-</sup>** que forman parte del complejo. Por último, el ángulo diedro entre los planos que contienen la triazolopirimidina y el anillo fenílico en ambos ligandos es 32.59°. Los datos cristalográficos correspondientes al [Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] pueden observarse en la **Tabla**

3.2. Las distintas distancias de enlace y ángulos se encuentran recogidas en el ANEXO III.

Compuesto	<b>[Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]</b>
Fórmula química	CuC <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
CCDC	1536813
M/g mol <sup>-1</sup>	558.01
T/K	100
Sistema cristalino	Ortorrombico
Grupo espacial	<i>P2<sub>1</sub>/c</i>
<i>a</i> (Å)	14.066 (18)
<i>b</i> (Å)	6.918 (12)
<i>c</i> (Å)	24.300 (2)
<i>α</i> (°)	90.000
<i>β</i> (°)	90.000
<i>γ</i> (°)	90.000
<i>V</i> / Å <sup>3</sup>	2364.7 (6)
<i>Z</i>	4
<i>ρ</i> /g cm <sup>-3</sup>	1.567
<i>μ</i> /mm <sup>-1</sup>	0.981
<i>R</i> [1>2σ( <i>I</i> )] <sup>a</sup>	0.0335
<i>wR</i> <sup>2</sup> [1>2σ( <i>I</i> )] <sup>b</sup>	0.0725

Tabla 3.2. Datos cristalográficos del [Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

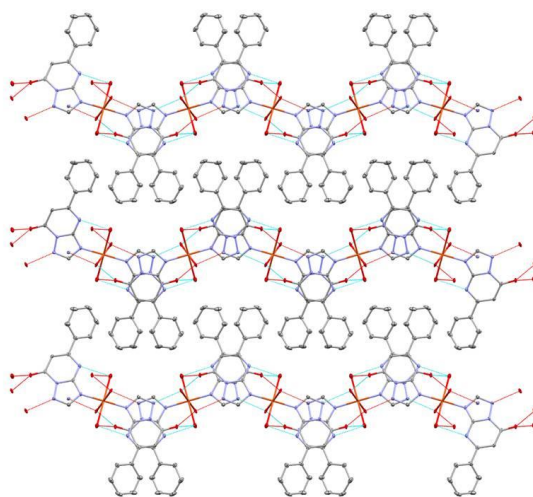
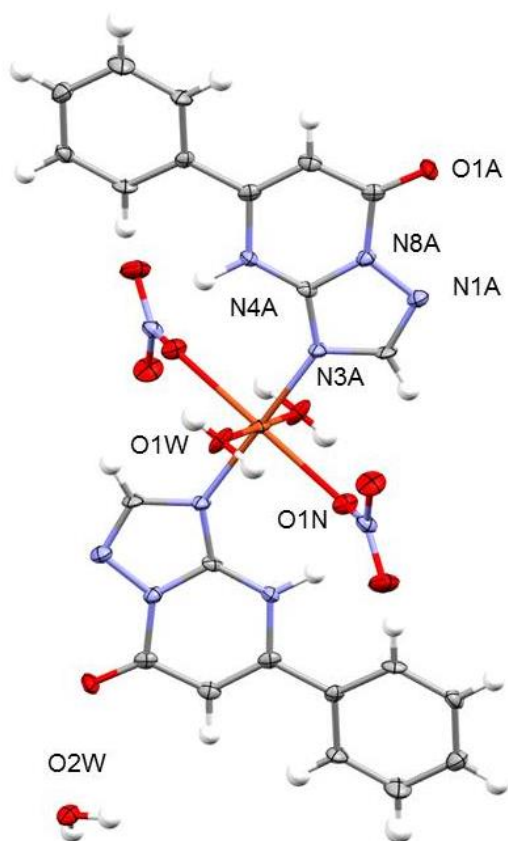


Figura 3.3. Red de enlaces de hidrógeno del complejo [Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

El complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$  cristaliza en el grupo espacial P-1. El ion Cu(II) presenta un entorno de coordinación octaédrico  $\text{CuN}_2\text{O}_4$  (**Figura 3.4**), en el que participan los átomos de nitrógeno N3 de cada uno de los dos ligandos **HftpO** y cuatro átomos de oxígeno, dos pertenecientes a dos iones nitrato y los otros dos a sendas moléculas de agua. La distancia Cu-N<sub>HftpO</sub> tiene un valor de 2.016Å mientras que las distancias Cu-O<sub>N</sub> y Cu-O<sub>w</sub> son de 2.137 y 1.980Å respectivamente. Los ángulos cis y trans para los centros de cobre N<sub>HftpO</sub>-Cu-O<sub>w</sub> tienen valores de 86.73° y 93.27° respectivamente; para el caso de N<sub>HftpO</sub>-Cu-O<sub>N</sub> los valores son 87.29° y 92.71° y entre O<sub>N1</sub>-Cu-O<sub>N2</sub> el valor es 180°. Los datos cristalográficos correspondientes a esta estructura se recogen en la **Tabla 3.3** mientras que las diferentes distancias de enlace y ángulos de este complejo se encuentran recogidos en el **ANEXO III**.

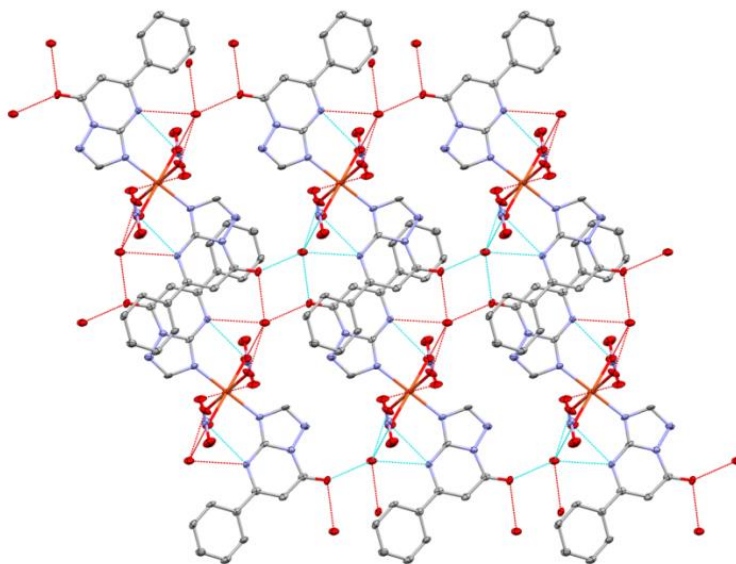
Compuesto	$\text{Cu}[(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$
Fórmula química	$\text{CuC}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_{10}\text{O}_{12}$
CCDC	1536812
M/g mol <sup>-1</sup>	684.05
T/K	100
Sistema cristalino	Triclinico
Grupo espacial	P-1
<i>a</i> (Å)	7.429 (14)
<i>b</i> (Å)	8.915 (17)
<i>c</i> (Å)	10.918 (2)
$\alpha$ (°)	70.268 (6)
$\beta$ (°)	76.204 (6)
$\gamma$ (°)	81.371 (5)
<i>V</i> / Å <sup>3</sup>	659.2 (2)
<i>Z</i>	1
$\rho$ /g cm <sup>-3</sup>	1.723
$\mu$ /mm <sup>-1</sup>	0.915
$R[1 > 2\sigma(I)]^a$	0.0466
$wR^2 [1 > 2\sigma(I)]^b$	0.1137

**Tabla 3.3.** Datos cristalográficos del  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$



**Figura 3.4** Vista en perspectiva del complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Los enlaces de hidrógeno han sido omitidos por claridad.

Este compuesto muestra una red de enlaces de hidrógeno compleja en la que se ven envueltos los átomos N4, O<sub>1N</sub>, O<sub>1W</sub> y O<sub>2W</sub> (**Figura 3.5**). Dichos enlaces de hidrógeno generan una red tridimensional con distancias de enlace en el rango que va de 2.633 a 2.982 Å. Existe además una fuerte interacción entre O<sub>1N</sub> y N4. Estos enlaces de hidrógeno son los responsables de la coplanaridad de los dos ligandos **HftpO** coordinados. Finalmente, hay que destacar que el ángulo diedro entre los planos que contienen los anillos triazolopirimidínico y fenilo es de 12°.



**Figura 3.5.** Red de enlaces de hidrógeno en el complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

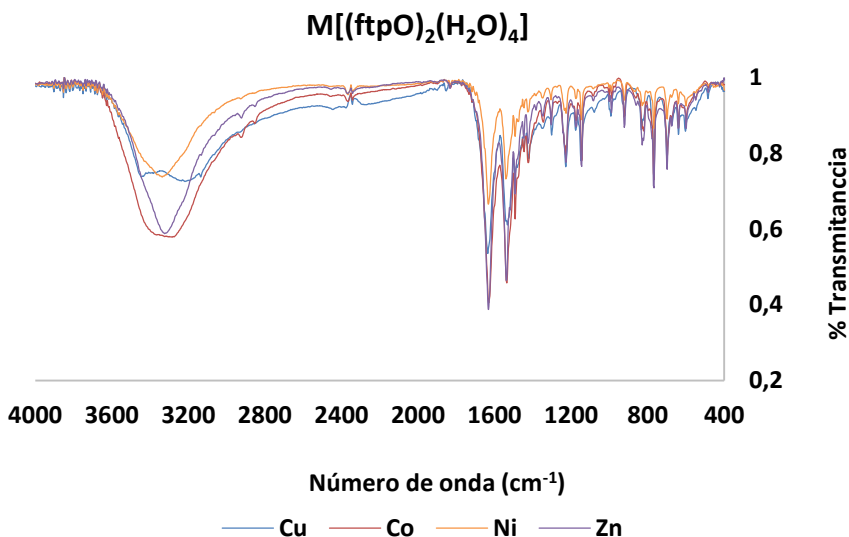
### 3.1.3. Caracterización espectroscópica y térmica

#### 3.1.3.1. IR

El espectro infrarrojo del ligando **HftpO** muestra dos bandas características en la región de  $1700\text{--}1500\text{cm}^{-1}$  que se ven apreciablemente afectadas cuando este se coordina a un metal.

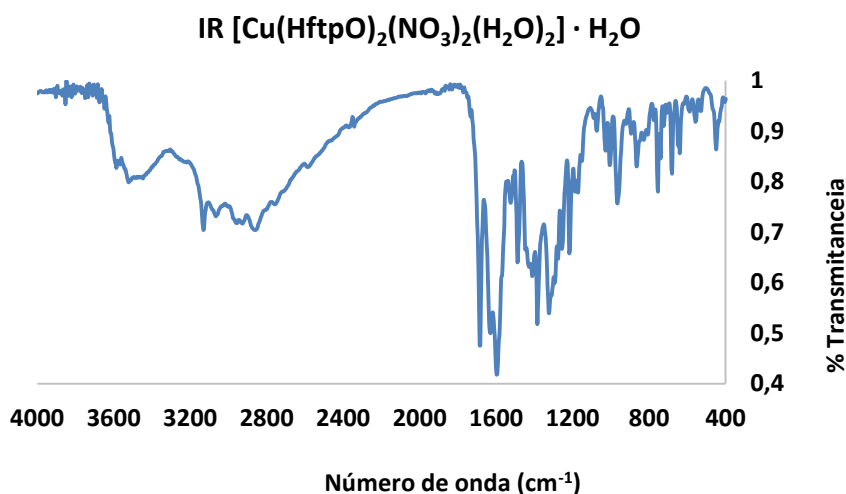
Para la serie isomorfa  $[\text{M}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  los espectros infrarrojos presentan una banda ancha en la zona de  $3500\text{--}3000\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a la vibración de tensión  $\nu(\text{O-H})$  de las moléculas de agua coordinadas. Si comparamos esos espectros con el del ligando libre, el hecho más destacable es el desplazamiento hacia zonas de menor frecuencia de las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos  $\text{C=O}$  y del anillo pirimidínico. Los cuatro espectros son prácticamente superponibles (ver **Figura 3.6**), lo que supone otra prueba de

isoestructuralidad. Los espectros FT-IR de estos cuatro complejos se encuentran recogidos en el ANEXO II.



**Figura 3.6.** Comparación de espectros IR de los complejos de la serie  $[M(ftpO)_2(H_2O)_4]$

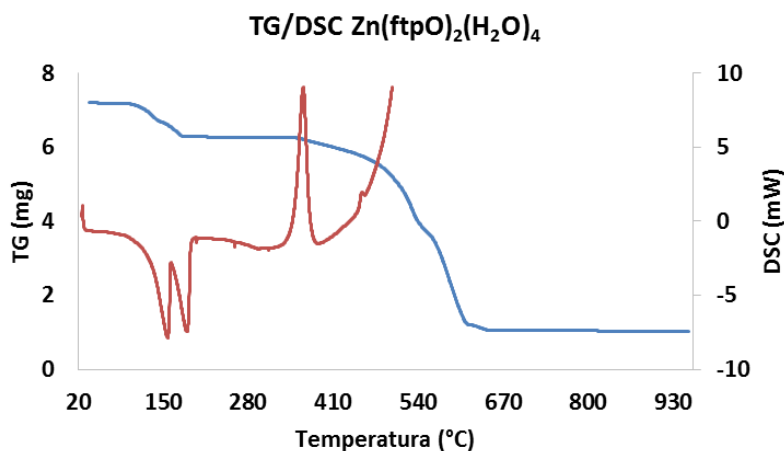
El espectro infrarrojo del complejo  $[Cu(HftpO)_2(H_2O)_2(NO_3)_2] \cdot H_2O$  presenta un comportamiento similar al de la serie anterior en cuanto al desplazamiento de las bandas significativas situadas entre  $1700-1500\text{cm}^{-1}$ , con una banda menos intensa en la zona de  $3500-3000\text{cm}^{-1}$  debido a la menor presencia de moléculas de agua en la estructura. Aparece también una banda muy intensa a  $1385\text{cm}^{-1}$  característica de los aniones  $NO_3^-$  directamente coordinados al centro metálico Cu(II) en este complejo (**Figura 3.7**).



**Figura 3.7.** Espectro IR del complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

### 3.1.3.2. Análisis Térmico

Los complejos de la serie  $[\text{M}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  muestran un comportamiento idéntico en los estudios termoanalíticos llevados a cabo, mostrando un proceso de deshidratación en dos etapas en las que se eliminan dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  en cada una de ellas (**Figura 3.8, ANEXO II**). Esta pérdida de agua es responsable de los efectos endotérmicos que aparecen en la curva DSC. El hecho de que la deshidratación se produzca en dos pasos claramente diferenciados pone de manifiesto la diferencia estructural y de fortaleza de unión al centro metálico entre las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  que se encuentran unidas en el plano apical (primeras en perderse, enlace más débil) y las del ecuatorial (mayor fortaleza de enlace, pérdida en la segunda etapa). Tras el proceso de deshidratación, los compuestos anhidros son estables durante un estrecho rango de temperatura y se descomponen exotérmicamente dejando un residuo sólido en el crisol, constituido por el correspondiente óxido metálico en cada caso. Los datos experimentales y teóricos para los diferentes procesos de deshidratación y generación de residuo se han recogido en la **Tabla 3.1**.



**Figura 3.8.** Curvas TG (azul) y DSC (rojo) del complejo  $[\text{Zn}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  a modo de ejemplo del comportamiento térmico de la serie  $[\text{M}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$

Para el caso del complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ , su curva termogravimétrica revela un primer proceso de deshidratación en el que se pierde la molécula de agua de cristalización. El segundo efecto endotérmico se corresponde con la pérdida de las dos moléculas de agua coordinadas al centro metálico. La entalpía de deshidratación de este proceso es 51.6 KJ/mol. Tras esto, los aniones  $\text{NO}_3^-$  se descomponen originando un fuerte efecto exotérmico a 190°C. La descomposición pirolítica del resto del complejo finaliza alrededor de los 600°C, dejando finalmente un residuo de CuO (**Figura 3.9**). Los porcentajes de deshidratación y residuo teóricos y experimentales para la descomposición térmica de este complejo están recogidos en la **Tabla 3.4**.



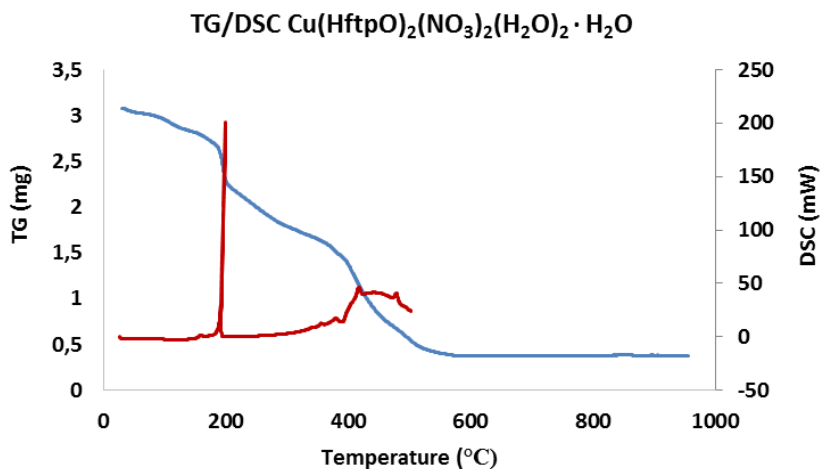


Figura 3.9. Curvas TG (azul) y DSC (rojo) del complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$

Complejo	% Deshidratación		% Residuo (MO siendo M = Cu, Co, Ni, Zn)	
	Teórico:	Experimental:	Teórico:	Experimental:
$[\text{Cu}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	12.88%	12.82%	14,2%	14,4%
$[\text{Co}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	13.01%	12.58%	13,4%	13,0%
$[\text{Ni}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	13.04%	12.52%	13,3%	12,9%
$[\text{Zn}(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$	12.90%	13.06%	14,5%	14,2%
$[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	8.11%	8.08%	12,4%	12,3%

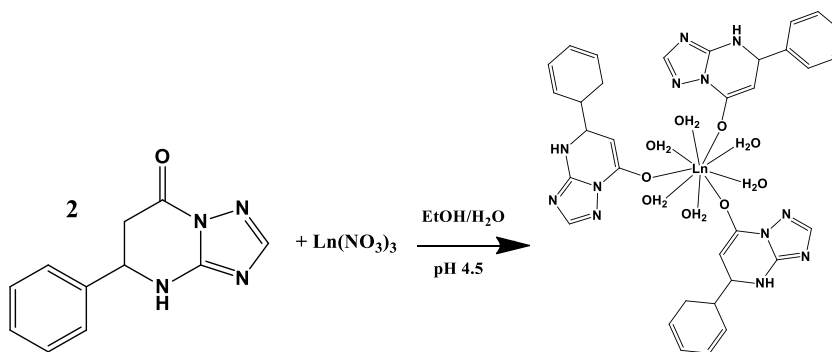
Tabla 3.4. Porcentaje teórico/ experimental para los procesos de deshidratación y residuo en los complejos de **HftpO**.

### 3.2. Complejos con iones lantánidos trivalentes Ln(III)

Dada la gran tendencia que tienen los iones lantánidos a unirse a ligandos con átomos de oxígeno dadores y la actividad antiparasitaria que presentan algunos complejos de otros derivados triazolopirimidínicos con este tipo de iones [5], se procedió a estudiar la interacción del **HftpO** con los iones trivalentes La, Nd, Eu, Gd, Tb, Dy, Er y Yb).

#### 3.2.1. Síntesis

Para la síntesis de los 8 complejos de la serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$  (siendo Ln = La, Nd, Eu, Gd, Tb, Dy, Er y Yb) se preparan dos disoluciones, una de **HftpO** en EtOH caliente (2mmol, 0.424g), y otra disolución acuosa del correspondiente nitrato de lantánido (1mmol). Se pone un exceso de sal metálica para evitar la precipitación de ligando. Se mezclan ambas disoluciones y se deja enfriar un poco antes de modificar el pH con NaOH 0.1M y subirlo hasta 4.5 con objeto de facilitar la reactividad del ligando **HftpO**. Al alcanzar dicho pH, comienza a precipitar de inmediato pero lentamente un fino polvo blanco o con tonos rosáceos o violetas según el tipo del ión lantánido del que se trate, que se recoge pasados dos días. Este proceso de síntesis se encuentra representado en el **Esquema 3.3** y los resultados de Análisis Elemental para los ocho complejos de la serie están recogidos en la **Tabla 3.5**.



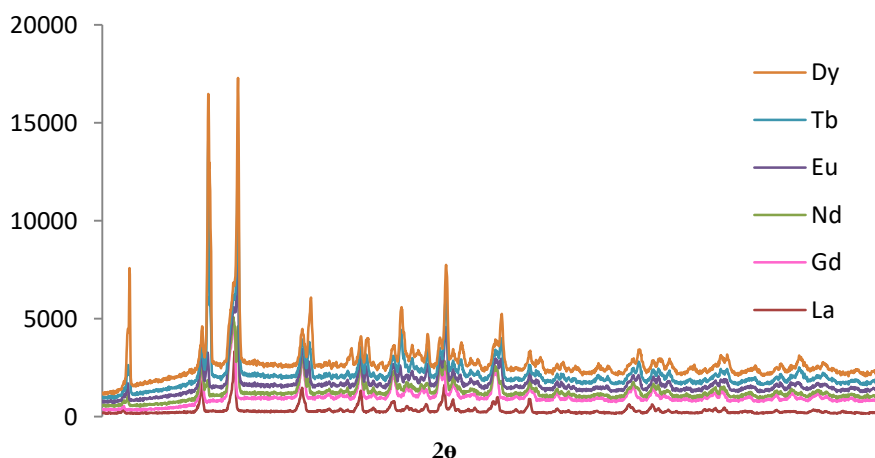
**Esquema 3.3.** Esquema del proceso de síntesis de la serie de complejos de fórmula  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$

Complejo	Fórmula	% Teórico	% Experimental
[La(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> La	C: 45.01 N: 19.09 H: 3.78	C: 44.29 N: 18.33 H: 3.74
[Nd(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Nd	C: 44.74 N: 18.97 H: 3.75	C: 44.09 N: 19.40 H: 4.00
[Eu(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Eu	C: 44.35 N: 18.81 H: 3.72	C: 43.85 N: 18.59 H: 3.97
[Gd(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Gd	C: 44.09 N: 18.70 H: 3.70	C: 44.39 N: 18.74 H: 3.80
[Tb(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Tb	C: 44.01 N: 18.66 H: 3.69	C: 43.51 N: 18.82 H: 4.04
[Dy(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Dy	C: 43.84 N: 18.59 H: 3.68	C: 43.40 N: 18.70 H: 4.04
[Er(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Er	C: 43.61 N: 18.49 H: 3.66	C: 42.81 N: 18.75 H: 3.90
[Yb(ftpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	C <sub>33</sub> H <sub>33</sub> N <sub>12</sub> O <sub>9</sub> Yb	C: 43.33 N: 18.37 H: 3.64	C: 42.65 N: 18.28 H: 3.76

**Tabla 3.5.** Resultados de Análisis Elemental para los complejos de **HftpO** con lantánidos

### 3.2.2. Descripción estructural

Pese a múltiples intentos de obtener monocristales aptos para difracción de Rayos X en monocristal, empleando distintas técnicas de cristalización, disolventes y condiciones de reacción, no se consiguieron aislar cristales de calidad suficiente para poder resolver su estructura. No obstante, se comprobó la isoestructuralidad de la serie mediante difracción de Rayos X en polvo (**Figura 3.10**).



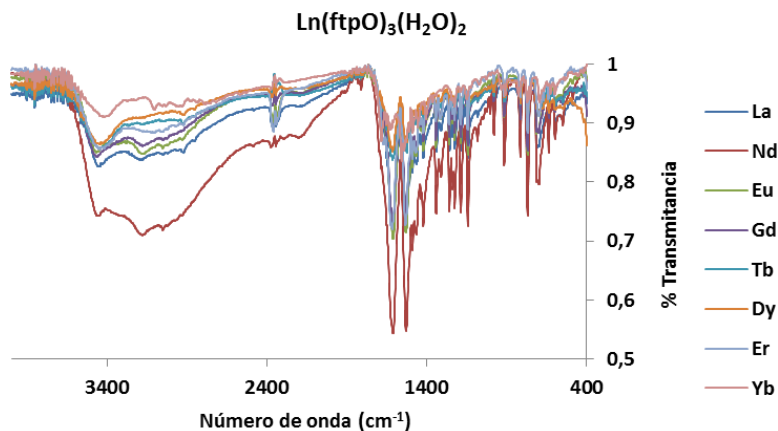
**Figura 3.10.** Difractogramas en polvo de los complejos de la serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$  en los que se aprecia la isoestructuralidad de todos ellos.

### 3.2.3. Caracterización espectroscópica y térmica

#### 3.2.3.1. IR

En todos los espectros IR de la serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$  se aprecian las dos bandas más características de los ligandos triazolopirimidínicos, en este caso a  $1614$  y  $1531\text{cm}^{-1}$ . También aparece una banda ancha en la zona de  $3500\text{-}3000\text{cm}^{-1}$  debida a la gran presencia de moléculas de agua que hay en estos complejos. Esta banda es considerablemente más ancha para el caso del complejo con Nd, ya que es el único con tres moléculas de agua de hidratación aparte de las seis coordinadas que posee esta serie en su estructura. Una comparativa entre los espectros infrarrojos de los ocho complejos aislados, es una prueba más de la isoestructuralidad de los

mismos (**Figura 3.11**). Los espectros de cada complejo por separado están recogidos en el **ANEXO II**.



**Figura 3.11.** Comparativa de los espectros IR de la serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$

### 3.2.3.2. Análisis Térmico

Los complejos de la serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$  presentan idéntico comportamiento térmico, como puede observarse en las **Figuras 3.12** y **3.13**. Existe una primera etapa en la que se produce un proceso de deshidratación en el que se pierden las seis moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ , tras la cual, los complejos se descomponen en el intervalo de  $335\text{-}345^\circ\text{C}$  en una segunda etapa exotérmica. La **Figura 3.14** muestra las curvas TG y DSC del complejo  $[\text{Dy}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$  superpuestas. El resto de datos individuales de los complejos lantánidos de esta serie se encuentran en el **ANEXO II**.

Los valores porcentuales de deshidratación y residuo sólido  $\text{Ln}_2\text{O}_3$  para estos complejos se resumen en la **Tabla 3.6**.

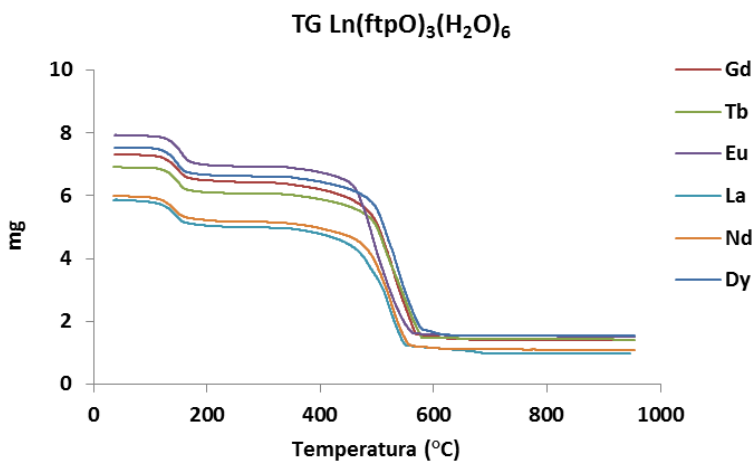


Figura 3.12. Comparativa de las curvas termogravimétricas (TG) de la serie [Ln(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

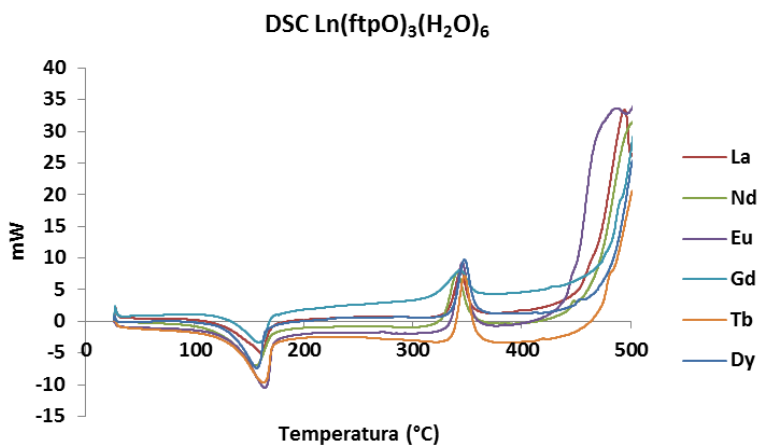
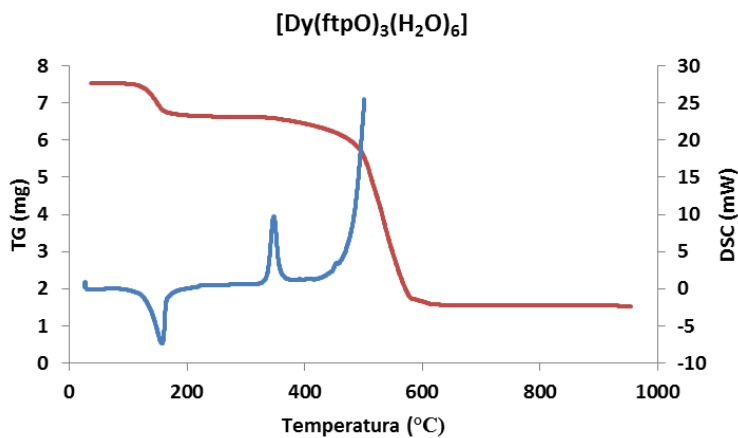


Figura 3.13. Comparativa de las curvas de calorimetría diferencial de barrido (DSC) de la serie [Ln(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]



**Figura 3.14.** Curvas de TG y DSC del complejo  $[\text{Dy}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$ . La primera etapa de deshidratación coincide con el efecto endotérmico en torno a  $150^\circ\text{C}$ , mientras que la descomposición exotérmica comienza a los  $340^\circ\text{C}$ .

Complejo	Deshidratación		Residuo $\text{Ln}_2\text{O}_3$	
	% Teórico	% Experimental	% Teórico	% Experimental
$[\text{La}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$	12.23	14.69	19.65	20.61
$[\text{Nd}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$	12.15	13,92	20.38	19.32
$[\text{Eu}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$	12.06	12.63	20.61	19.16
$[\text{Gd}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$	11,98	11.74	20.86	21.82
$[\text{Tb}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$	11.91	12.29	21.00	21.46
$[\text{Dy}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$	11.96	12.18	21.13	21.26

**Tabla 3.6.** Porcentajes de deshidratación teórico/ experimental y de residuo para los complejos de  $\text{HftpO}$  y residuo.

### 3.3. Bibliografía

- [1] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Lezama, L.; Salas, J. M. *Cryst. Growth Des.* **2012**, *12*, 3583
- [2] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Barea, E.; Quirós, M.; Salas, J. M. *CrystEngComm.* **2010**, *12*, 3038
- [3] Caballero, A. B., Castillo, Ó., Lezama, L., Rodríguez-Diéguez, A., & Salas, J. M. *Inorganic Chemistry Communications*, **2012**, *19*, 36–38.
- [4] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, A., Lezama, L., Barea, E., Salas, J. M. *Dalton Transactions*, **2011**, *40(19)*, 5180–5187
- [5] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, A., Salas, J. M., Sánchez-Moreno, M., Marín, C., Ramírez-Macías, I., Gutiérrez-Sánchez, R. *J. Inorg. Biochem.*, **2014**, *138*, 39–46



# CAPÍTULO 4

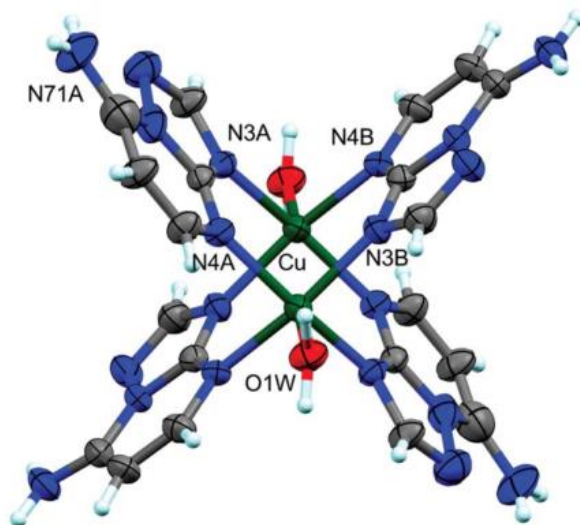
Nuevos complejos metálicos con 7atp



Tras el estudio de los complejos obtenidos empleando el **HftpO** como ligando, en este capítulo se describe otra serie de nuevos compuestos basados en el derivado **7atp**, para los cuales se ha ensayado su actividad antiparasitaria (ver Capítulo 5). Este ligando es uno de los derivados triazolopirimidínicos más comunes y su estructura fue comentada en el Capítulo 2. Su disponibilidad comercial y excelente solubilidad en disolventes biocompatibles lo convierte en un excelente candidato para la síntesis de complejos cuya potencial bioactividad se quiera estudiar.

### 4.1. Complejos con 7atp

Se han sintetizado dos nuevos complejos dinucleares de Cu(II) análogos al compuesto ya descrito por Caballero y col. [1],  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{ClO}_4)_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , en el que cuatro ligandos 7atp y dos moléculas de agua se unen a dos centros de cobre (ver **Figura 4.1**).

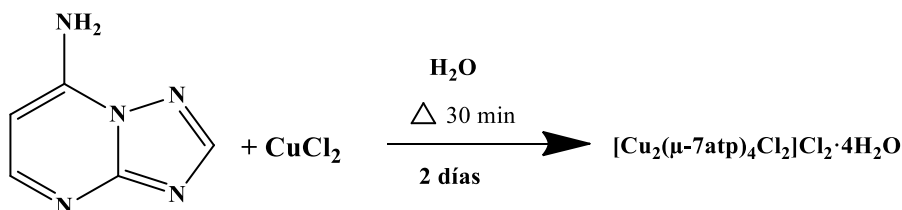


**Figura 4.1.** Perspectiva de la estructura del catión  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$ . Los aniones perclorato y las moléculas de agua de cristalización del complejo se han omitido por claridad [1].

## 4.1.1. Síntesis

4.1.1.1.  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 

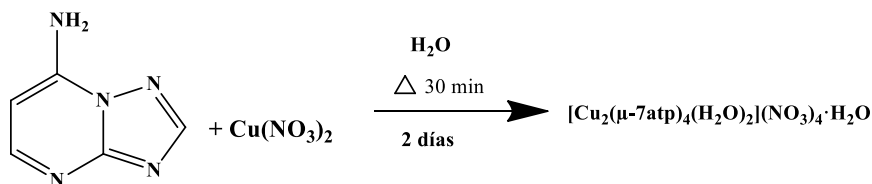
Se mezcla una disolución acuosa de 7atp (0,1mmol, 0,148g) con otra de  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,1mmol, 0,170g) utilizando el mínimo volumen de agua, agitando y calentando a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Tras dejar evaporar el disolvente durante dos días, aparecen cristales prismáticos de color verde aptos para difracción de Rayos X que fueron recogidos tras filtración a vacío. En el **Esquema 4.1** se indica de forma resumida la síntesis del complejo mientras que los datos de análisis elemental aparecen en la **Tabla 4.1**.



**Esquema 4.1.** Resumen del proceso de síntesis del  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

4.1.1.2.  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4\cdot \text{H}_2\text{O}$ 

El proceso de síntesis fue idéntico al del complejo anterior, cambiando la sal de cloruro de cobre por nitrato de cobre. El 7atp (0,1mmol, 0,148g) y el  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,1mmol, 0,242g) se disolvieron en la mínima cantidad de agua en vasos separados, calentando a  $80^\circ\text{C}$  hasta la completa disolución de ambos, para posteriormente mezclar las dos disoluciones y agitar a esa temperatura durante 30 min. Tras evaporación a temperatura ambiente durante dos días, aparecieron unos cristales prismáticos de color verde oscuro, que tras filtración a vacío, se comprobó que tenían calidad suficiente para su estudio por difracción de Rayos X en monocristal. El **Esquema 4.2** muestra de forma resumida la síntesis del complejo mientras que los datos de análisis elemental se recogen en **Tabla 4.1**.



Esquema 4.2. Esquema del proceso de síntesis del complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

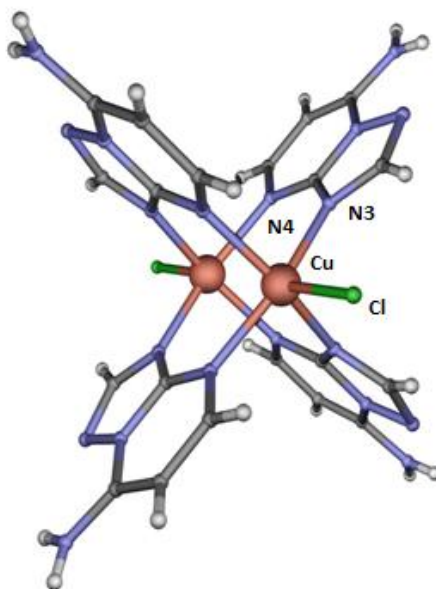
Complejo	Fórmula	% Teórico	% Experimental
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{N}_{20}\text{O}_4\text{Cl}_4\text{Cu}_2$	C: 27.25 N: 31.78 H: 3.20	C: 26.91 N: 31.75 H: 3.33
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_{24}\text{O}_{15}\text{Cu}_2$	C: 24.77 N: 34.67 H: 2.91	C: 24.55 N: 34.30 H: 2.91

Tabla 4.1. Resultados de análisis elemental para los complejos de Cu con 7atp

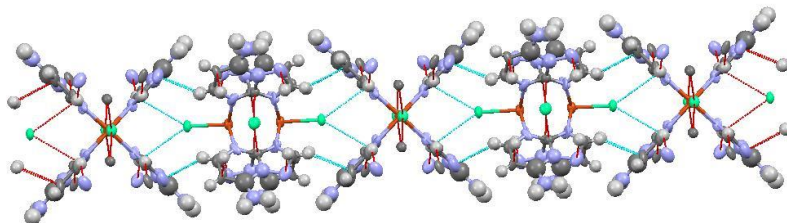
#### 4.1.2. Descripción estructural

El complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  cristaliza en el grupo especial ortorrómbico *Cmca*. La estructura cristalina de este compuesto se muestra en la **Figura 4.2**. Las distancias y ángulos de enlace del compuesto se encuentran recogidas en el **ANEXO III**, mientras que los datos cristalográficos aparecen en la **Tabla 4.2**. La estructura consiste en un complejo catiónico  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]^{2+}$ , moléculas de agua de cristalización y aniones cloruro que estabilizan la estructura cristalina. Cada centro metálico de cobre adopta una geometría de pirámide cuadrada ligeramente distorsionada, con ángulos de enlace que se desvían ligeramente de las posiciones ideales a  $90^\circ$  y  $180^\circ$ . Ambos átomos de Cu(II) están unidos al ligando 7atp vía N3 y N4, la coordinación tipo puente más común para los derivados triazolopirimidínicos. Varios ejemplos de complejos dinucleares

con 1,2,4,-triazolo[1,5-a]pirimidina, además del ya citado con percloratos [1], han sido descritos en bibliografía con Ag(I), Pt(II), Pd(II) y como en este caso, Cu(II) [2-4]. Cada centro simétrico de Cu(II) tiene una esfera de coordinación de pirámide cuadrada con una esteoquímica  $\text{CuN}_4\text{Cl}$ , formada por cuatro átomos de nitrógeno pertenecientes a cuatro moléculas de 7atp diferentes, (dos N3 y dos N4 en cada centro) y un anión Cl<sup>-</sup>. La distancia entre los dos centros metálicos es de 3.052 Å. La distancia de enlace Cu-N tiene un valor de 2.103(18) Å cuando el enlace es vía N4 y 2.016(14) Å cuando lo es vía N3, mientras que la distancia de enlace Cu-Cl es de 2.416(7) Å. Respecto a los ángulos de enlace, no hay diferencias significativas entre el caso de N3-Cu1-N4 con un valor de 88.8(5)°, y los pares homólogos N3-Cu1-N3 y N4-Cu1-N4 de 88.1(8)° y 88.2(9)° respectivamente. El alineamiento de ambos cobres con el cloro es casi lineal (179.4°), mientras que el rango de ángulos de enlace entre Cl, Cu(II) y N4 o N3 está sobre 100° (100.2° and 98.6° respectivamente). La red tridimensional de interacciones de hidrógeno puede observarse en la **Figura 4.3.**, en la que se muestran solo los enlaces de hidrógeno entre unidades mononucleares para formar cadenas.

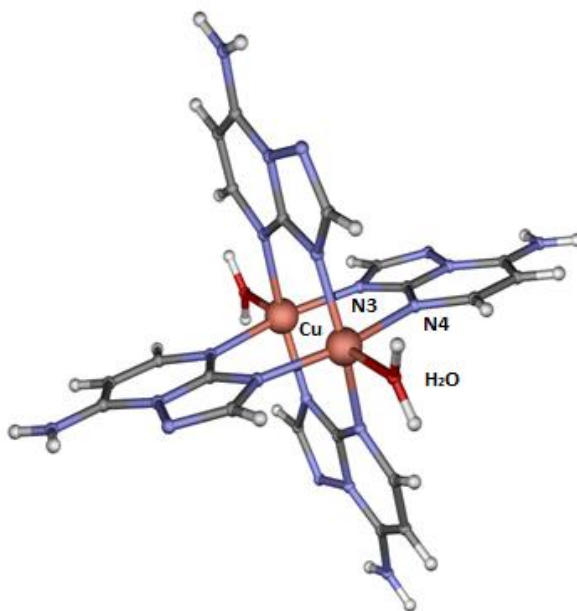


**Figura 4.2.** Vista en perspectiva del complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ . Las moléculas de agua y aniones cloruro no coordinados se han omitido por claridad.

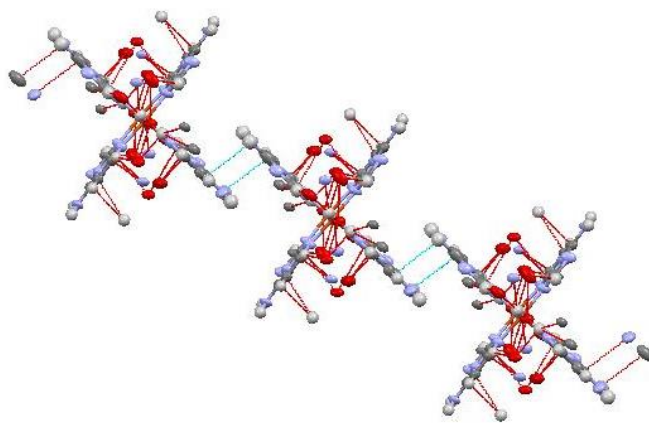


**Figura 4.3.** Red tridimensional de enlaces de hidrógeno del complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .

El complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  cristaliza en el grupo espacial monoclinico  $C 2/c$ . La **Figura 4.4.** muestra la estructura de dicho complejo. Las distancias y ángulos de enlace se encuentran nuevamente recogidas en el **ANEXO III**, mientras que los datos cristalográficos aparecen en la **Tabla 4.2**. La estructura consiste en una especie catiónica  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2]^{4+}$ , cuatro aniones nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) que compensan la carga y una molécula de agua de cristalización. Las moléculas de 7atp actúan también en este caso como ligandos puente entre ambos centros de cobre. Cada ion  $\text{Cu}(\text{II})$  presenta una coordinación de pirámide cuadrada,  $\text{CuN}_4\text{O}$ , formada por cuatro nitrógenos de los cuatro ligandos 7atp y un oxígeno perteneciente a una de las dos moléculas de agua de coordinación. En este complejo, la distancia entre los dos átomos de  $\text{Cu}(\text{II})$  es de  $2.9470\text{Å}$ , ligeramente más corta que en el compuesto anterior. La asociación lineal entre ambos centros metálicos y las moléculas de agua vuelve a variar muy poco de la situación ideal de  $180^\circ$ , con un ángulo de  $177^\circ$ . El rango de ángulos de enlace para el  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{II})$  y los nitrógenos N3/N4 oscila en este caso entre  $97.5\text{-}97.8^\circ$ . La red tridimensional de apilamientos  $\pi$ -stacking de este complejo se puede observar en la **Figura 4.5**.



**Figura 4.4.** Estructura del complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , en la que se han eliminado los aniones nitrato y el agua de cristalización por claridad.



**Figura 4.5.** Red de apilamiento  $\pi$ -stacking del complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$



El complejo con percloratos [1] en el que se han basado las síntesis de estos dos nuevos complejos cristaliza en el grupo espacial monoclinico C2/c como el segundo de los complejos descritos. Los cuatro ligandos 7atp adoptan en ese complejo de nuevo la conformación de molino cuando actúan como puente entre ambos centros de cobre.

Compuesto	[Cu <sub>2</sub> (μ-7atp) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ]4H <sub>2</sub> O·2Cl	[Cu <sub>2</sub> (μ-7atp) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]4(NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O
Fórmula	C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>20</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>4</sub> Cu <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>24</sub> O <sub>15</sub> Cu <sub>2</sub>
CCDC	1563432	1563431
M/g mol <sup>-1</sup>	881.47	969.73
T/K	273(2)	100(2)
Sist. Crist.	Ortorrónico	Monoclinico
Grupo espacial	<i>Cmca</i>	<i>C2/c</i>
a (Å)	24.675(12)	21.918(6)
b(Å)	12.133(6)	9.694(3)
c(Å)	12.081(6)	17.434(5)
β (°)	90	108.761 (3)
V/ Å <sup>3</sup>	3617(3)	3507.3(16)
Z	4	4
ρ/g cm <sup>-3</sup>	1.619	1.836
μ/mm <sup>-1</sup>	1.531	1.319
GOF <sup>a</sup>	1.057	0.969
R <sub>int</sub>	0.0563	0.0972
R1 <sup>b</sup> / wR2 <sup>c</sup> [I>2σ(I)]	0.1064/0.2506	0.0735/0.1633
R1 <sup>b</sup> / wR2 <sup>c</sup> (all data)	0.1283/0.2700	0.1645/0.2052
$[a] S = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / (N_{obs} - N_{param})]^{1/2} [b] R_1 = \sum   F_o  -  F_c   / \sum  F_o  [c] wR_2 = [\sum w(F_o^2 - F_c^2)^2 / \sum wF_o^2]^{1/2}; w = 1/[\sigma^2(F_o^2) + (aP)^2 + bP] \text{ where } P = (\max(F_o^2, 0) + 2F_c^2)/3$		

**Tabla 4.2.** Datos cristalográficos y detalles del refinamiento de los complejos de 7atp

### 4.1.3. Caracterización espectroscópica y térmica

#### 4.1.3.1. IR

El ligando **7atp** presenta varias bandas distintivas en la región correspondiente a las vibraciones de tensión del grupo amino, situadas entre 3500-3100cm<sup>-1</sup>. Las vibraciones de flexión se encuentran localizadas en la zona de 1640-1550cm<sup>-1</sup>, quedando enmascaradas en este ligando por la presencia de dos bandas intensas características de los ligandos triazolopirimidínicos a 1654 y 1571cm<sup>-1</sup>, que corresponden a las vibraciones de tensión del esqueleto triazolopirimidínico la primera y del anillo pirimidínico la segunda. (**Figura 4.6**).

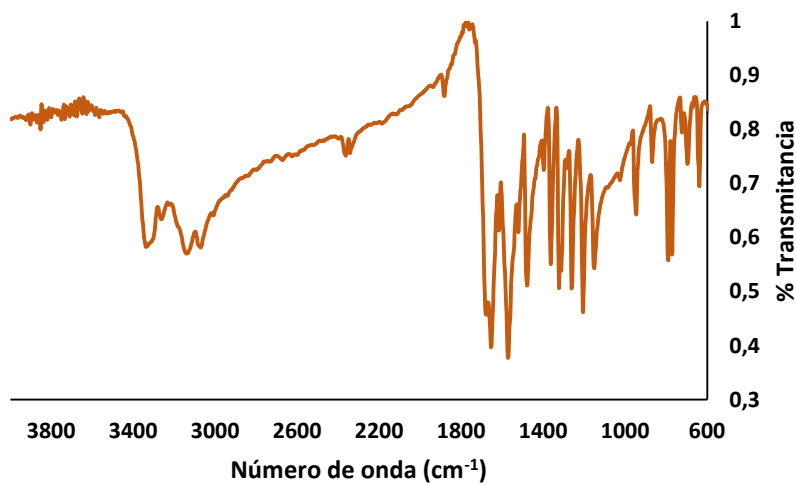


Figura 4.6. Espectro IR del ligando 7atp

El complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  presenta desplazamientos a mayores longitudes de onda respecto a los valores característicos de las bandas asignadas al ligando 7atp en la región comprendida entre  $1640$  y  $1550\text{cm}^{-1}$  mientras que el compuesto  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  presenta un efecto hipocrómico. Las bandas de tensión del grupo amino se mueven a menores números de onda en ambos complejos de Cu(II). Aparece una banda ancha sobre  $1370\text{cm}^{-1}$  en el segundo complejo con múltiples picos, lo que indica la presencia de iones nitrato en la estructura. Además, en ambos complejos las bandas pertenecientes a las vibraciones de tensión del grupo amino están solapadas con las análogas de las moléculas de agua  $\nu(\text{O-H})$ . Ambos espectros aparecen en las Figuras 4.7 y 4.8.

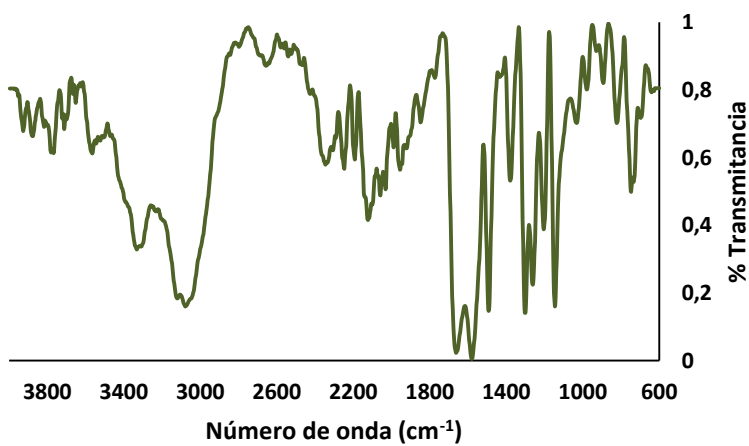


Figura 4.7. Espectro IR del complejo  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

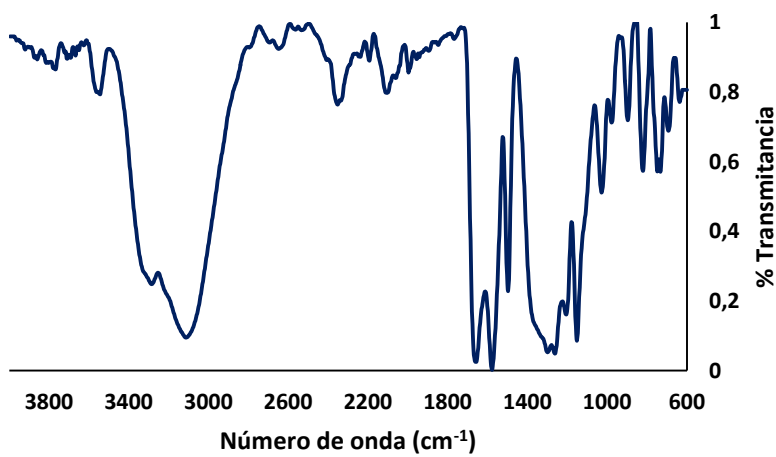
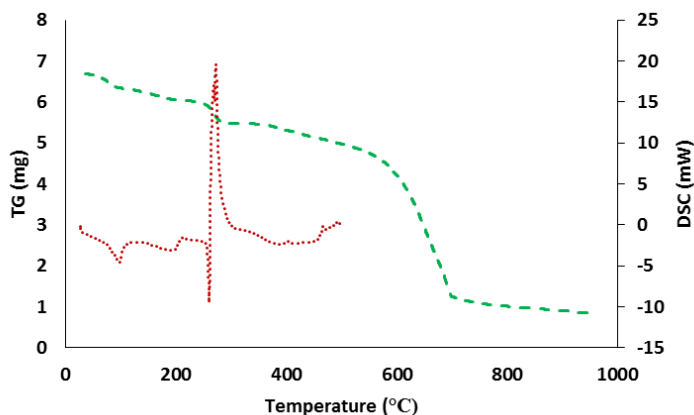


Figura 4.8. Espectro IR del complejo  $\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2 \cdot (\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

#### 4.1.3.2. Análisis Térmico

La primera etapa de la descomposición térmica para el complejo que contiene cloruros es una deshidratación en dos fases, que empiezan a 85°C y 170°C respectivamente. Esto sugiere la existencia de dos tipos diferentes de moléculas de agua en el complejo; dos de ellas interaccionando débilmente que se eliminan a 97°C de acuerdo con los datos de la curva DSC; y otras dos con uniones más fuertes al complejo al que se mantienen unidas hasta 190°C. El proceso de deshalogenación empieza a los 270°C y es seguido por una descomposición pirolítica de los ligandos 7atp, dejando CuO como residuo final en el crisol portamuestras (**Figura 4.9**).



**Figura 4.9.** Curvas TG (verde) y DSC (rojo) de  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$

El segundo complejo muestra como hecho más representativo una pérdida de peso muy pronunciada debida a la descomposición térmica de los iones nitrato y pirolisis parcial de los ligandos, originando un intenso efecto exotérmico a 250°C. (**Figura 4.10**). Previo a este proceso se produce la deshidratación del complejo.

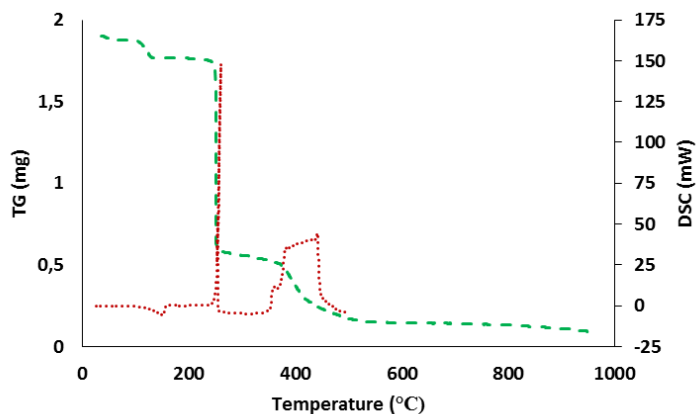


Figura 4.10. Curvas TG (verde) y DSC (rojo) de  $\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4\cdot\text{H}_2\text{O}$

La **Tabla 4.3** muestra los datos de deshidratación y residuo teóricos y experimentales para ambos complejos de Cu(II).

Complejo	% Deshidratación		% Residuo CuO	
	Teórico:	Experimental:	Teórico:	Experimental:
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	8.1%	9.5%	18.0%	18.6%
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4\cdot\text{H}_2\text{O}$	5.6%	7.2%	16.4%	* %

**Tabla 4.3.** Porcentaje teórico/ experimental para los procesos de deshidratación y residuo en los complejos de **HftpO**. (\* el residuo experimental del complejo con nitratos no es representativo, debido a que la fuerte descomposición exotérmica del grupo nitrato puede eliminar muestra del crisol)

## 4.2. Bibliografía

- [1] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, A., Vidal, I., Dobado, J.A., Castillo, Ó., Lezama, L., Salas, J.M., *Dalton Trans.* **2012**, *41(6)*, 1755–1764
- [2] Caballero, A. B., Rodríguez-Diéguez, Lezama, L., Barea, E., Salas, J.M., *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 5180-5187
- [3] Caballero, A. B., Maclaren, J.K., Rodríguez-Diéguez, A., Vidal, I., Dobado, J.A., Salas, J.M., Janiak., C., *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 11845-11855
- [4] Romero, M.A., Salas, J.M., Quirós, M., Sánchez, M.P., Romero, J., Martín, D., *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5417

## CAPÍTULO 5

### Estudios de actividad antiparasitaria





Como se indicó en el capítulo introductorio de la presente Tesis Doctoral, la selección de las triazolopirimidinas como uno de los ejes centrales del trabajo desarrollado durante estos años responde al hecho de la gran similitud que éstas guardan con las bases púricas del ADN tanto en estructura como en reactividad y comportamiento químico. Es por ello que a estos compuestos se les considera biomiméticos de las purinas. Estas características hacen que los derivados triazolopirimidínicos y los complejos metálicos obtenidos a partir de ellos presenten una serie de propiedades muy interesantes en cuanto a actividad biológica se refiere, ya sean ventajas en el campo de la agricultura por su potencial efecto herbicida o fungicida o características farmacológicas como actividad anticancerígena o efectividad como agentes terapéuticos, por ejemplo.

Una de las aplicaciones más destacadas en los últimos años es el uso de derivados triazolopirimidínicos y sus complejos metálicos como agentes antiparasitarios frente a enfermedades tropicales causadas por protozoos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae* (*Leishmania spp* y *Trypanosoma spp* concretamente). Los resultados obtenidos hasta la fecha mejoran en algunos casos los de los fármacos utilizados comercialmente hoy en día, viéndose incluso potenciados por un efecto sinérgico al combinar un centro metálico con los ligandos triazolopirimidínicos y mejorando los valores de dichas moléculas orgánicas en su forma aislada.

Con objeto de comprobar la actividad antiparasitaria que presentan los nuevos ligandos y complejos metálicos triazolopirimidínicos aislados y caracterizados en el transcurso del presente trabajo, se han llevado a cabo estudios de actividad antiproliferativa de las formas extracelulares de distintas cepas de *Leishmania spp.* (*L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*) así como frente a una especie de *Trypanosoma spp* (*T. cruzi*). Por otra parte, se ha comprobado la citotoxicidad de estos nuevos compuestos con ensayos frente a las células hospedadoras de la enfermedad, macrófagos para el caso de infección por *Leishmania spp.*, y células Vero para *Trypanosoma spp.*

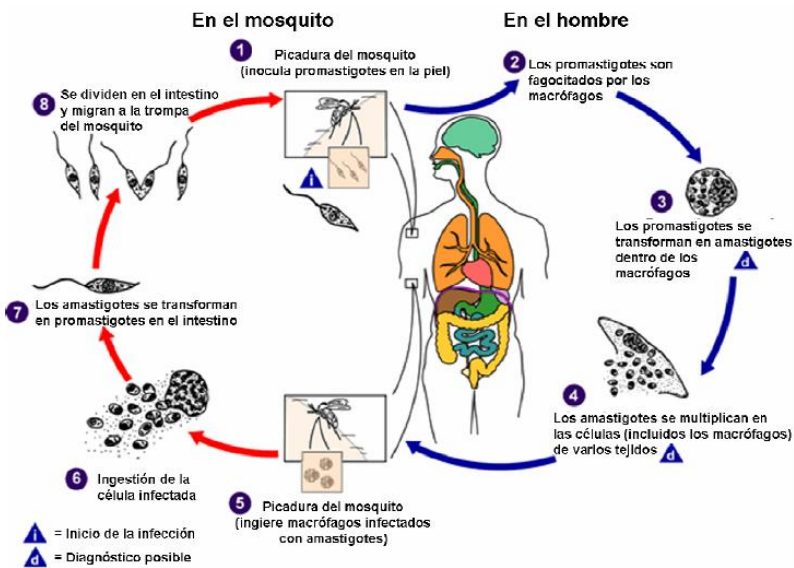
### 5.1. Leishmaniasis

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria tropical, causada por diferentes especies de protozoos del género *Leishmania* y que afecta a mamíferos tanto animales como seres humanos. Existen diferentes formas clínicas de manifestación de la leishmaniasis en humanos, que van desde la llamada leishmaniasis cutánea, que puede ser localizada o difusa; leishmaniasis mucocutánea y leishmaniasis visceral. Los efectos visibles de la enfermedad suelen ser úlceras cutáneas, que pueden tanto cicatrizar espontáneamente como permanecer durante largos periodos de tiempo de forma crónica, así como inflamaciones severas de órganos como el hígado o el bazo, acompañadas de diarreas que causan desnutrición y anemia severas, llegando incluso a la muerte en los casos más graves.

Los movimientos migratorios de grandes poblaciones en los últimos años, debidos a conflictos bélicos o desastres naturales, unido a cambios climáticos que afectan a los entornos naturales, han hecho que el área de efecto de estas especies de parásitos se vea afectada, pudiendo darse casos de contagios históricamente asociados a áreas tropicales del Viejo Mundo en zonas del Nuevo Mundo de climas más templados. Por lo general este tipo de enfermedades afectan a los núcleos de población más deprimidos y con menos recursos para prevenir y tratar estas enfermedades, que unido a que no existe ningún tipo de vacuna que inmunice contra el contagio, convierten a la leishmaniasis en un problema de salud a nivel mundial, reconocido por la OMS [1], que estima que cada año se producen entre 900,000 y 1,3 millones de nuevos casos, causando entre 200,000 y 300,000 defunciones anuales (datos de septiembre de 2016). No obstante, solo una pequeña parte de las personas infectadas por *Leishmania spp* acaba padeciendo la enfermedad, pero el número de portadores es muy alto, lo que aumenta la cantidad de contagios exponencialmente. A pesar de estas cifras, a día de hoy la leishmaniasis está considerada como una de las enfermedades tropicales olvidadas, ya que no hay gran inversión en investigación de nuevos fármacos ni estudios de su tratamiento, a pesar de que las drogas distribuidas comercialmente presentan serios efectos secundarios, como toxicidad y aparición de resistencia. Las terapias comúnmente empleadas en primera línea incluyen derivados antimoniales pentavalentes, como el estibogluconato sódico (Pentostam®) o antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime®), mientras que existen fármacos de segunda generación como la anfotericina B (AmB®) o diamidinas aromáticas (Pentamidina®), que si bien consiguen mejoras clínicas temporales, tienen una efectividad muy variable y limitada. Por todo ello,

se hace urgente la necesidad de encontrar nuevos productos que sean bioactivos frente a esta enfermedad y puedan reemplazar o complementar a los tratamientos existentes.

El vector de transmisión de la leishmaniasis son las hembras de mosquito de la familia *Psychodidae*, del género *Lutzomyia* en regiones de Sudamérica y *Phlebotomus* en Europa, África y Asia. El ciclo de vida de *Leishmania spp* se presenta en la **Figura 5.1**. Otra vía de contagio posible es la vía parenteral o congénita (por transfusiones de sangre, por ejemplo).



**Figura 5.1.** Ciclo de vida de *Leishmania spp*. El ciclo comienza cuando un mosquito infectado pica al huésped humano, inoculando en el proceso las formas extracelulares o promastigotes del parásito en el torrente sanguíneo. Los promastigotes son fagocitados por los macrófagos, transformándose en amastigotes (forma intracelular). Dichos amastigotes se multiplican dentro de las células hospedadores en diferentes tejidos, rompiendo finalmente las membranas celulares y saliendo al torrente sanguíneo de nuevo. De esta forma, cuando un mosquito sano pica a un huésped humano infectado, se ingieren los macrófagos infectados que pasan al sistema del vector, cambiando de nuevo de amastigote a promastigote en el intestino del mosquito y viajando a la trompa del mismo para infectar a nuevos huéspedes con las siguientes picaduras.

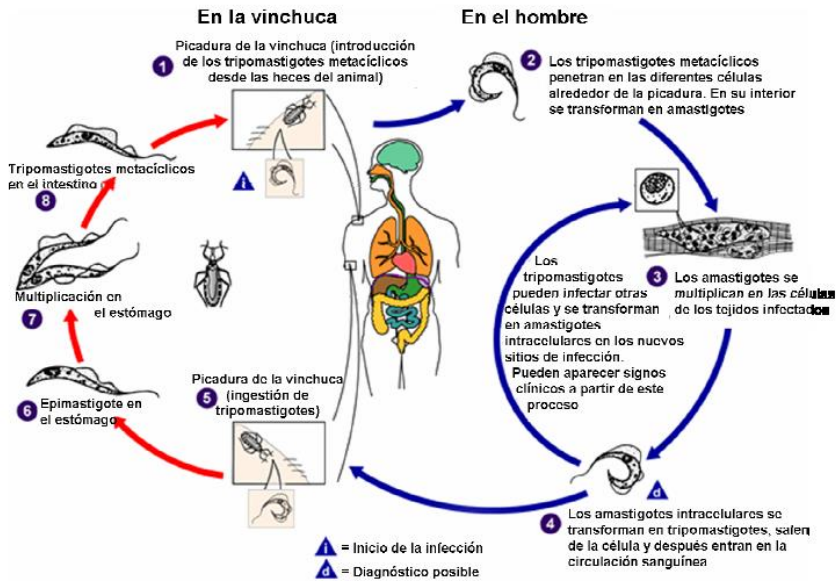
En el presente trabajo se han seleccionado tres cepas de *Leishmania spp* para llevar a cabo los estudios antiparasitarios:

- I. *Leishmania infantum*: Esta cepa toma su nombre del primer paciente en el que fue aislada, un niño en Túnez. Su principal área de efecto es la cuenca del Mediterráneo incluida la península Ibérica, aunque también se da en zonas de África central. Esta especie se encuentra estrechamente relacionada con *L. donovani* por lo que muchos autores consideran ambas como dos subespecies de una especie común. Produce lesiones tanto cutáneas como viscerales.
- II. *Leishmania braziliensis*: Su nombre viene de la principal zona en la que se encuentra. No obstante, se pueden distinguir tres grupos de especies de *L. brazi*: *braziliensis braziliensis*, la propia de Brasil y algunas zonas de los Andes; *braziliensis guyanensis* en las Guayanas, Brasil, Surinam y Venezuela; y *braziliensis panamensis* en Panamá. Está asociada a la Leishmaniasis de tipo cutáneo.
- III. *Leishmania donovani*: Se presenta principalmente en zonas de la India, Nepal y Bangladesh. Los primeros datos que se tienen de su existencia se remontan a la Rebelión India de 1857. Su nombre se debe a su descubridor, el médico irlandés Charles Donovan del Servicio Médico Indio, en 1903. Esta especie es responsable de casos severos de Leishmaniasis visceral.

## 5.2. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (nombre que recibe por su descubridor, el médico e infectólogo brasileño Carlos Chagas) o tripanosomiasis americana, es una enfermedad tropical parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Suele ser una enfermedad crónica que se manifiesta con síntomas clínicos como fiebre, aumento del tamaño de órganos como el hígado o bazo y miocarditis durante la etapa aguda de la enfermedad, unos dos meses después de la infección, mientras que en la etapa crónica se pueden dar cardiomiopatías y dilataciones patológicas de esófago y colon (megaesófago y megacolon).

El vector de transmisión en este caso es un insecto del género *Triatoma infestans* conocido como vinchuca o chinche, en cuyas heces se encuentra la forma tripomastigote (extracelular) del parásito. Una vez se produce la picadura del insecto, los tripomastigotes penetran en el huésped humano a través de la herida. El ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* se indica en la **Figura 5.2**. La enfermedad también puede transmitirse por vía transfusional o transplacentaria como en el caso de la leishmaniasis.



**Figura 5.2.** Ciclo de vida de *Trypanosoma spp.* El ciclo comienza cuando el vector (vinchuca) pica al huésped humano y, a través de la herida producida, los tripomastigotes extracelulares entran al torrente sanguíneo provenientes de las heces del insecto. Los tripomastigotes se transforman en amastigotes intracelulares al penetrar en las células circundantes a la herida, multiplicándose en el interior. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes, rompiendo las células hospedadoras y volviendo a la circulación sanguínea, pudiendo infectar otras células de nuevo. Cuando un nuevo insecto pica al huésped infectado incorpora los tripomastigotes, que pasan a epimastigotes en el estómago del vector donde se multiplican. Finalmente, viajan al intestino donde cambian a tripomastigotes y pueden ser excretados para una nueva infección.

Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *Trypanosoma cruzi*, según datos de la OMS de marzo de 2017 [2], pudiendo curarse si el tratamiento se administra al poco tiempo de

producirse la infección. En la fase crónica, un tratamiento antiparasitario puede frenar o prevenir la progresión de la enfermedad. Sin embargo, los dos únicos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox y el Benznidazol, sin ser ninguno de ellos totalmente efectivo. Además, su producción es limitada y no hay un gran desarrollo de los mismos, por lo que su disponibilidad a largo plazo no está garantizada. Es por ello que es necesario buscar también nuevos fármacos que mejoren a los ya existentes.

### 5.3. Estudios *in vitro*

Los ensayos *in vitro* de la actividad antiparasitaria de los ligandos triazolopirimidínicos y la de sus complejos metálicos se han dirigido al estudio de la actividad antiproliferativa de las formas extracelulares de tres especies de *Leishmania spp* (promastigote) y de *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). También se determinó la citotoxicidad de los compuestos frente a las células hospedadoras, macrófagos J774.2 (European Collection of Cell Culture – ECACC – number 91051511) para los ensayos frente a *Leishmania spp*, y células Vero en los ensayos frente a *T. cruzi*.

Para evaluar estos dos estudios se utilizan dos parámetros:

- (1) Concentración de inhibición al 50% o **IC<sub>50</sub>**: Concentración necesaria de un compuesto para producir una inhibición del 50% en el crecimiento del parásito, o lo que es lo mismo, que se reduzca a la mitad la población con respecto al control al final del experimento.
- (2) Índice de selectividad o **SI**: Cociente entre la IC<sub>50</sub> del compuesto frente a las células y la IC<sub>50</sub> del mismo frente a la forma extracelular del parásito.

Para poder decir que un compuesto presenta una buena actividad antiparasitaria, interesa que tenga una IC<sub>50</sub> baja para la inhibición del crecimiento de los parásitos, lo que significa que poca cantidad de compuesto es capaz de reducir la población de parásitos con facilidad, pero que la IC<sub>50</sub> frente a células hospedadoras sea muy alta, lo que se traduce en que el compuesto es muy poco tóxico y se necesitan grandes dosis del mismo para dañar a las células humanas. Esto se traduce en que se buscan valores altos de SI (SI>20 para *Leishmania spp* y SI>50 para *T. cruzi*) para

poder promocionar un compuesto a la fase de ensayos intracelulares *in vitro*, y posteriormente *in vivo*.

A continuación se muestran las condiciones de cultivo y los resultados de los ensayos llevados a cabo con los ligandos triazolopirimidínicos y los complejos metálicos estudiados.

### 5.3.1. Actividad antiproliferativa

Se cultivaron formas promastigotes de *L. infantum* (MHOM/BR/1975/M2904), *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2904), *L. donovani* (LCRL133LRC) y *T. cruzi* (IRHOD/CO/2008/SN3) *in vitro* en medio líquido tripanosómico (MTL) [Hank's Balanced Salt Solution-HBSS (Gibco), NaHCO<sub>3</sub>, lactoalbúmina, extracto de levadura, hemoglobina bovina y antibióticos] con suero bovino fetal inactivo al 10% y se mantuvieron en una atmósfera de aire a 28° C, en frascos Roux (Corning, EE.UU.) con una superficie de 75 cm<sup>2</sup>, de acuerdo con la metodología descrita por Gonzalez y col. [3].

Los experimentos se llevaron a cabo añadiendo medio de cultivo MTL, cantidades crecientes del producto a ensayar (1, 10, 25 y 50 μM) y 50000 parásitos por pocillo en placas de 24 pocillos, manteniendo siempre varios compartimentos solo con medio y parásitos a modo de control. Una vez configurada la placa, se lleva a incubación a 28°C durante 72 horas y se realiza posteriormente un conteo de los parásitos. Los resultados se expresan en IC<sub>50</sub> de inhibición (Tablas 5.1 y 5.2)

Se comenzó estudiando la actividad antiproliferativa de los ligandos triazolopirimidínicos [4], para hacer posteriormente una comparativa con los complejos derivados de **HftpO**. Sin embargo, tras diversos estudios de solubilidad se certificó la imposibilidad de llevar a cabo estos experimentos con los complejos de **HftpO**, ya que debido a interacciones  $\pi$ -stacking resultaban altamente insolubles en disolventes y medios biológicamente compatibles. Es por ello que se ensayó la actividad de nuevos complejos triazolopirimidínicos de **7-atp** (ver Capítulo 4), así como de las sales inorgánicas con las que fueron sintetizados, para poder aportar datos nuevos en este campo.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) ± SD			
	L. inf.	L. brazi.	L. dono.	T. cruzi
Glucantime	18.0±3.1	25.6±1.7	26.6±5.4	-
Benznidazole	-	-	-	24.2±1.9
HftpO	*	37.5±2.9	46.9±3.8	11.9±1.0
HmtpO	41.3±3.4	39.8±3.2	79.4±6.4	28.0±2.2
dmtp	36.7±2.2	72±54	-	48.0±2.9
7atp	56.4±6.0	61.8±3.3	66.1±5.3	36.4±1.8
tp	42.4±3.5	65.4±7.3	-	40.6±3.5
ftpCl	< 1	< 1	< 1	< 1
mtpCl	< 1	< 1	< 1	< 1

**Tabla 5.1.** IC<sub>50</sub> (μM) de ligandos triazolopirimidínicos. \*sin actividad.

Compuesto	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup> ± SD			
	L. inf.	L. brazi.	L. dono.	T. cruzi
[Cu <sub>2</sub> (μ-7atp) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ]·Cl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	40.9±3.2	83.7±6.7	30.1±2.4	54.6±4.4
[Cu <sub>2</sub> (μ-7atp) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]·(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	46.0±3.7	100.2±8.1	139.5±11.1	48.6±3.9
CuCl <sub>2</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	*	*	*	*
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·3 H <sub>2</sub> O	*	*	*	*

**Tabla 5.2.** IC<sub>50</sub> (μM) de sales y complejos de Cu con 7-atp. \*sin actividad

### 5.3.2. Citotoxicidad

Los macrófagos J774.2 (European Collection of Cell Culture o ECACC número 91051511), que se obtuvieron originalmente de un tumor en una rata hembra BALB/c en 1968, se cultivaron en el mínimo medio esencial (MEM) más glutamina (2 mM) suplementado con un 20% de suero fetal bovino inactivado. Las células Vero se cultivaron en RPMI, que se suplementó con suero bovino fetal inactivado al 10%. Ambas células se incubaron en una atmósfera humidificada al 95% de aire, 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante varios días.

Las pruebas de citotoxicidad para macrófagos y células Vero se realizaron de acuerdo con la siguiente metodología. El experimento se llevó a cabo en placas de 96 pocillos aptas para medir en el lector ELISA. Se estudió la inhibición del crecimiento de células de mamíferos (macrófagos para las tres cepas de *Leishmania spp.* y células Vero para *T. cruzi*). Los productos se ensayaron a concentraciones de 50, 100, 200 y 400 μM. En primer lugar, se sembraron las células en una placa de 96 pocillos (2500 células / pocillo para macrófagos y 3500 células / pocillo para células Vero)



hasta un volumen de 100 µl/pocillo y luego se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 24 horas para fijarlas. Las soluciones de complejos se prepararon al doble de la concentración más alta a ensayar en el medio correspondiente (RPMI 10% SBF para células Vero y MEM + Glut 20% SBF para macrófagos). Las diluciones oportunas se realizaron en bañeras estériles con diferentes canales, mediante la adición de 100µl de disolución o medio complejo (sólo adición de medio en los pocillos de control) al pocillo correspondiente. Después de eso, la placa se incubó a 37°C con atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% durante 48 h. Dos días después, se añadieron 20µl de colorante Alamar Blue (10% del volumen del pocillo) a cada pocillo y se incubaron de nuevo a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante un día más. Finalmente, se leyó la placa con el lector ELISA detectando las diferencias en la coloración según se haya metabolizado o no el Alamar Blue según el número de células vivas que quedasen. Los resultados se expresaron en IC<sub>50</sub> de citotoxicidad.

Tras lo expuesto en el apartado de actividad antiproliferativa, se ensayó la citotoxicidad para los mismos ligandos y complejos (**Tabla 5.3**)

Compuesto	IC <sub>50</sub> (µM) ± SD	
	J774.2 macro.	Vero cells
Glucantime	15.2±1.0	-
Benznidazole	-	13.6±0.9
HftpO	958.5±74.2	573.0±43.8
HmtpO	312.4±21.9	232.8±18.7
dmtp	98.7±9.2	101.2±8.1
7atp	73.2±7.0	66.6±4.4
tp	66.0±5.5	73.2±6.6
ftpCl	< 1	< 1
mtpCl	< 1	< 1
[Cu <sub>2</sub> (µ-7atp) <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	377.9±30.2	230.7±18.4
[Cu <sub>2</sub> (µ-7atp) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1454.2±101.8	446.0±35.5
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	-	-
Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 3 H <sub>2</sub> O	-	-

**Tabla 5.3.** IC<sub>50</sub> (µM) de ligandos y complejos de Cu con 7-atp.

## 5.3.3. Índice de selectividad

En la **Tabla 5.4** se recogen los índices de selectividad (SI) calculados con las  $IC_{50}$  obtenidas tras los experimentos de actividad antiproliferativa y citotoxicidad.

Compuesto	SI			
	L. inf.	L. brazi.	L. dono.	T. cruzi
Glucantime	0.8	0.6	0.6	-
Benznidazole	-	-	-	0.9
HftpO	*	25.6 (42)	20.4 (34)	48.1 (53)
HmtpO	7.6(10)	7.8(13)	6.5 (11)	8.3(10)
dmtp	2.7(3)	1.4(2)	-	2.1(2)
7atp	1.3(1)	1.2(2)	1.8 (2)	1.8(2)
tp	1.6(2)	1.0(1)	-	1.8(2)
ftpCl	-	-	-	-
mtpCl	-	-	-	-
$[Cu_2(\mu-7atp)_4Cl_2]Cl_2 \cdot 4H_2O$	9.2(11)	4.5(8)	12.4(21)	4.2(5)
$[Cu_2(\mu-7atp)_4(H_2O)_2](NO_3)_4 \cdot H_2O$	31.6(40)	14.5(24)	10.4(17)	9.2(10)
$CuCl_2 \cdot 2 H_2O$	-	-	-	-
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3 H_2O$	-	-	-	-

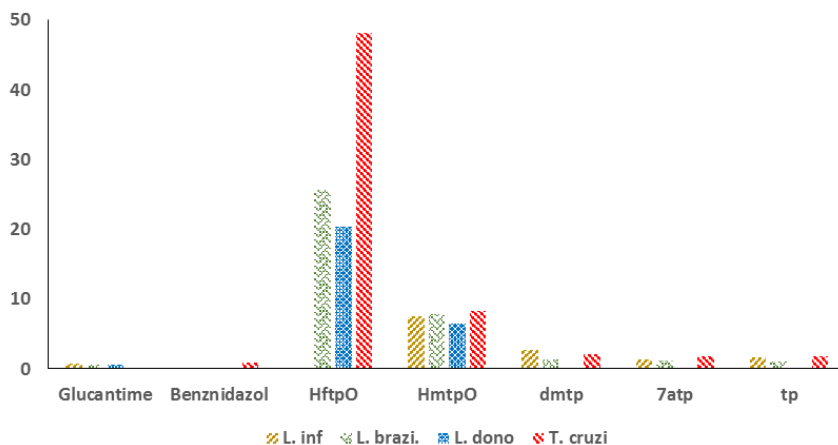
**Tabla 5.4.** SI ( $\mu M$ ) de ligandos y complejos de Cu con **7-atp**. (\*sin efecto)

Al comparar los datos obtenidos para el nuevo ligando **HftpO** con el resto de ligandos triazolopirimidínicos, queda patente que este nuevo derivado presenta una actividad superior al resto en todas las cepas ensayadas salvo *L. inf.*, en la que no produce ningún efecto (**Figura 4.3**). Respecto a los ligandos clorados **ftpCl** y **mtpCl**, son muy eficaces contra los parásitos, pero son igualmente tóxicos para las células del huésped, lo que imposibilita su uso como fármaco antiparasitario.

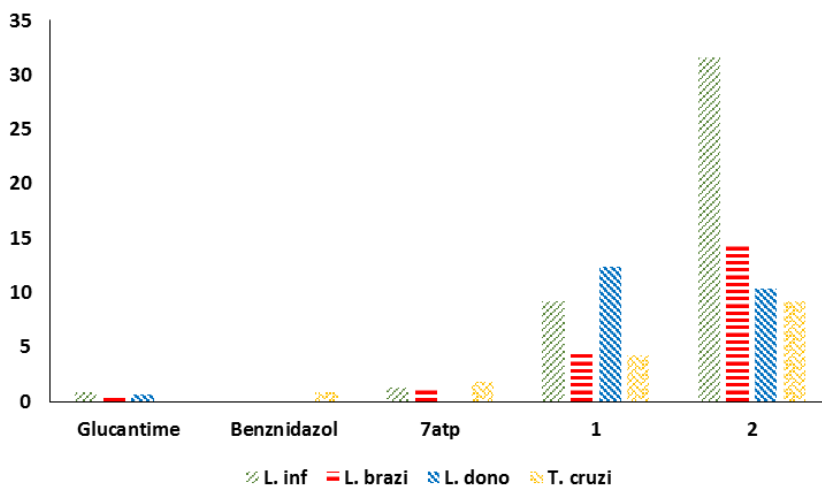
Como se esperaba, no se observó efecto alguno para las sales inorgánicas de Cu, mientras que si se observa el índice de selectividad obtenido para los complejos de **7 atp**, queda claro que ambos compuestos mejoran significativamente el efecto inhibitorio de los fármacos comunes o del ligando aislado **7atp** para cada una de las cepas sometidas a prueba.

El complejo clorado presenta una mejor capacidad inhibitoria de la proliferación de los parásitos mejor que el segundo, pero su elevado efecto citotóxico da lugar a valores de SI más bajos, aun siendo mejores que los de las drogas de referencia. No obstante, el complejo  $[Cu_2(\mu-7atp)_4(H_2O)_2](NO_3)_4 \cdot H_2O$  muestra una efectividad cuarenta veces mejor que el Glucantime para *L. infantum*, lo que hace que sea un excelente

candidato que promocionar a fases avanzadas de ensayos preclínicos (**Figura 5.4**). Los extraordinarios valores de  $IC_{50}$  para células Vero y especialmente para macrófagos, aportan a este compuesto el potencial de ser un tratamiento sin efectos secundarios.



**Figura 5.3.** Comparativa de los valores de SI entre las drogas de referencia, los ligandos triazolopirimidínicos previos y el ligando puro **HftpO**.



**Figura 5.4.** Comparativa de los valores de SI entre las drogas de referencia, el ligando puro **7-atp** y los dos complejos derivados de él.

En el **ANEXO I** pueden encontrarse una serie de tablas que recogen la actividad antiparasitaria de complejos con triazolopirimidinas ensayados en trabajos previos. Si se compara la actividad de estos compuestos de 7-atp con el previamente estudiado  $[\text{Zn}_2(7\text{atp})_4(\mu\text{-bpym})(\text{H}_2\text{O})_4](\text{ClO}_4)_4 \cdot 2(7\text{atp})$  [5], resulta evidente que los índices de selectividad son claramente superiores a los valores de 2.9(4), 3.1(5) y 1.0(1) para *L. Inf*, *L. Brazi* y *T. Cruzi* respectivamente, lo que supone una mejora significativa en la utilización de derivados de 7-atp como agentes antiparasitarios.

Si además se comparan las actividades antiparasitarias obtenidas para estos nuevos compuestos con los estudios previos realizados con complejos de otros ligandos triazolopirimidínicos [5-10], los complejos de **7-atp** resultan ser el segundo mejor tipo de agentes antiparasitarios contra cepas de *Leishmania* spp., solo superándose su actividad por los complejos de **HmtpO** tanto con metales de transición como con lantánidos.

Con estos resultados se demuestra que el estudio de la actividad antiparasitaria de los derivados y complejos triazolopirimidínicos sigue siendo una relevante línea de investigación para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios.

## 5.4. Bibliografía

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>
- [2] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>
- [3] González, P., Marín, C., Rodríguez-González, I., Hitos, A.B., Rosales, M.J., Reina, M., Díaz, J.G., González-Coloma, A., Sánchez-Moreno, M., *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, (2005), 136–141
- [4] Salas J.M., Caballero A.B., Esteban-Parra G.M., Méndez-Arriaga J.M., *Curr Med Chem.* **2017**, *24*(25), 2796-2806
- [5] Caballero, A. B., Marín, C., Ramírez-Macias, I., Rodríguez-Diéguez, A., Quirós, M., Salas, J. M., Sánchez-Moreno, M., *Polyhedron* **2012**, *33*, 137
- [6] Boutaleb-Charki, S., Marín C., Maldonado C. R., Rosales M. J., Urbano J., Gutierrez-Sanchez R., Quirós M., Salas J.M., Sanchez-Moreno, M. *Drug Metab. Lett.* **2009**, *3*, 35
- [7] Caballero, A. B., Rodriguez-Dieguez, A., Quiros, M., Salas, J. M., Huertas, O., Ramirez-Macias, I., Olmo, F., Marin, C., Chaves-Lemaur, G., Gutierrez-Sanchez, R., Sanchez-Moreno, M., *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 526
- [8] Méndez-Arriaga, J.M., Esteban-Parra, G.M., Juárez, M.J., Rodríguez-Diéguez, A., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M., *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *175*, 217-224
- [9] Ramirez-Macias, I., Marin, C., Salas, J. M., Caballero, A., Rosales, M. J., Villegas, N., Rodriguez-Dieguez, A., Barea, E., Sanchez-Moreno, M., *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 813
- [10] Caballero, A. B., Marín, C., Rodríguez-Diéguez, A., Ramírez-Macias, I., Barea, E., Sánchez-Moreno, M., Salas, J. M., *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 770
- [11] Caballero, A. B., Rodriguez-Dieguez, A., Salas, J. M., Sanchez-Moreno, M., Marin, C., Ramirez-Macias, I., Santamaria-Diaz, N., Gutierrez-Sanchez, R., *J Inorg Biochem.* **2014**, *138*, 39



# CAPÍTULO 6

Ag(I) interaction between  
double stranded DNA

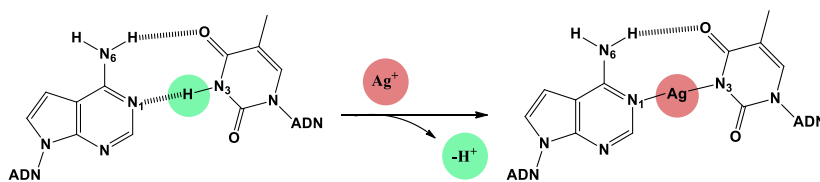




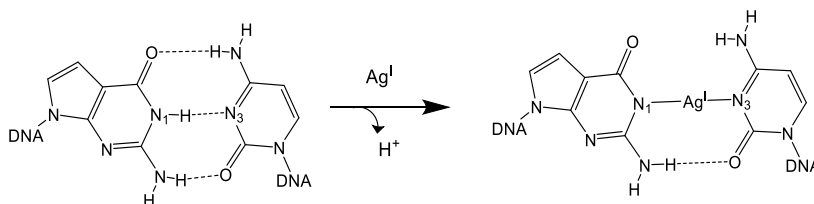
As already discussed in the introduction, this chapter focuses on the interaction between Ag(I) ions and oligonucleotides containing modified base pairs. The oligonucleotides employed in this study consists in palindromic and non-palindromic sequences comprising canonical (A, G, T, C) and modified ( $^7\text{C}$ A and  $^7\text{C}$ G) nucleobases.

The modified nucleobases  $^7\text{C}$ A and  $^7\text{C}$ G and Ag(I) metal ions have been chosen to facilitate the formation of coordination bond inside the DNA double stand by replacing Watson-Crick hydrogen bonds. For this purpose, we have taken advantage of the linear coordination geometry and borderline nature of silver(I) metal ions to yield stable coordination bonds with N-donor atoms. On the other hand, in 7-deazapurine ligands the N7 atom is replaced by a CH group, which avoid the interaction of metal ions towards this position and promotes the metal ion binding at N1 position, allowing the formation of coordination bonds inside DNA double strand.

This strategy can be employed to form silver(I)-mediated base pairs in DNA molecules (**Figure 6.1** and **6.2**) and moreover it allows to control the binding of Ag(I) towards specific locations inside the double stand, as well as controlling the stoichiometry of the resulting Ag-DNA systems.



**Figure 6.1.** Proposed arrangement for silver-mediated base pairs  $^7\text{C}$ A-(Ag<sup>I</sup>)-T.



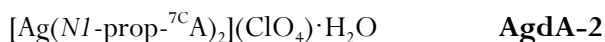
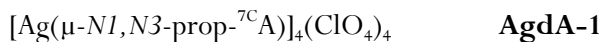
**Figure 6.2.** Proposed arrangement for silver-mediated base pairs  $^7\text{C}$ G-(Ag<sup>I</sup>)-C.

The incorporation of non-inherent properties into nucleic acids through the introduction of metal-mediated base pairs (MBP) can lead to the development of highly innovative materials that could have a great positive impact on the society. It is worth mentioning that the structure of DNA molecules can be customized by sequence programmability, allowing the design of desired DNA architectures at the nanoscale [1]. The strategy reported in this thesis will allow the introduction of metal ions at precise locations in organized DNA molecules providing them with unique properties that could lead to new nanomaterials with exclusive properties. One of these properties is fluorescence, which will be studied in this work.

During this chapter, the formation of 7-deazapurine silver(I) complexes will be exposed firstly, to study the coordination modes of this type of ligand and test out the viability of the proposed metallized base pairs. After that, the previously reported by our group [2],  $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$  base pair is described as antecedent of the new studies with  $^{7\text{C}}\text{G-C}$ , concluding with the fluorescence results obtained for  $^{7\text{C}}\text{A}$  homogeneous sequences comprises by homogeneous sequences of  $^{7\text{C}}\text{A}$  and T, respectively.

## 6.1. Ag(I) complexes

We have initially study the coordination binding mode of 7-deazaadenine nuclebase. Therefore, we have prepare the ligand N9-propyl-7-deazaadenine (prop- $^{7\text{C}}\text{A}$ ) where the N9 position is blocked (as occur in DNA molecules) with an alkyl chain. Three new silver(I) complexes have been obtained and their formulas and abbreviations are listed below:



Due to the low amount of product, it was not possible to carry out a complete characterization of the complexes using characterization techniques as E.A., IR or NMR spectroscopy. However, in view that the quality of the monocrystals was suitable for XRD, they were characterized and studied using this technique.

### 6.1.1. Synthesis

A water solution containing N9-propil-7-deazaadenine (0,25mmol, 0,044g) was mixed dropwise with another aqueous solution of  $\text{AgClO}_4$  (0,1mmol, 0,052g), stirring and heating at  $80^\circ\text{C}$  during 30 minutes. The solution changed immediately to a white emulsion, out of which a white compound was obtained. After recrystallization in EtOH, two type of white monocrystals suitable for XRD were isolated, the first one, **AgdA-1**, consists in prismatic small crystals in a subproduct proportion; and the second one, obtained in a major proportion in form of white needles, corresponds to **AgdA-2**. In addition, pure **AgdA-2** can be obtained by mixing both solutions but adding  $\text{AgClO}_4$  over N9-propil-7-deazaadenine and following the same procedure.

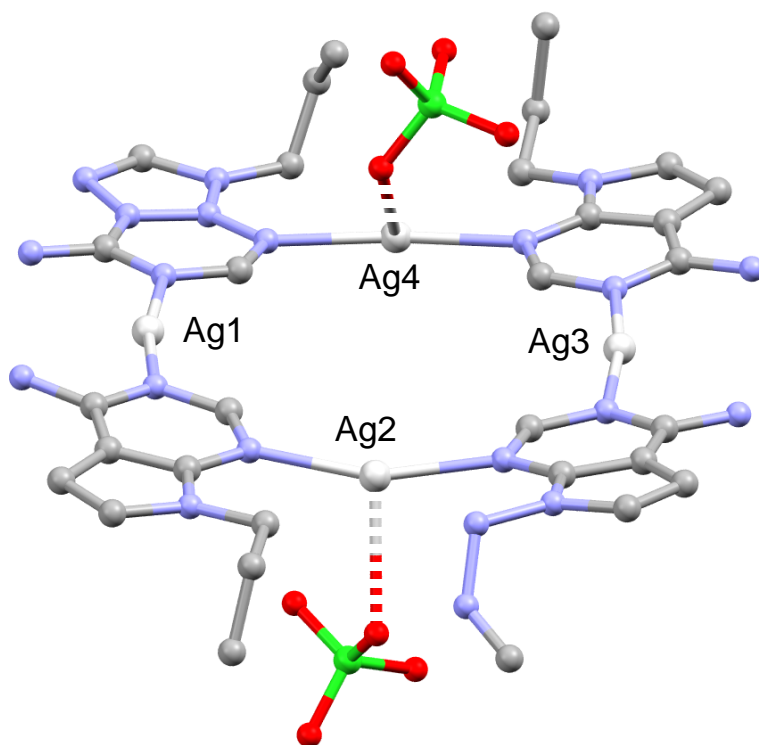
For the synthesis of **AgdA-3**, N9-propil-7-deazaadenine (44 mg, 0.25 mmol) was dissolved in warm water (50 mL) and to this was added an aqueous solution of  $\text{AgNO}_3$  (26 mg, 0.125 mmol). The solution was stirred and filtered off through a cellulose filter. The solution was left to crystallize affording crystals suitable for X-Ray crystallography. The formation of a complex containing chloride in its structure must be due to the presence of some  $\text{Cl}^-$  impurities in the reactants.

### 6.1.2. Crystallographic data

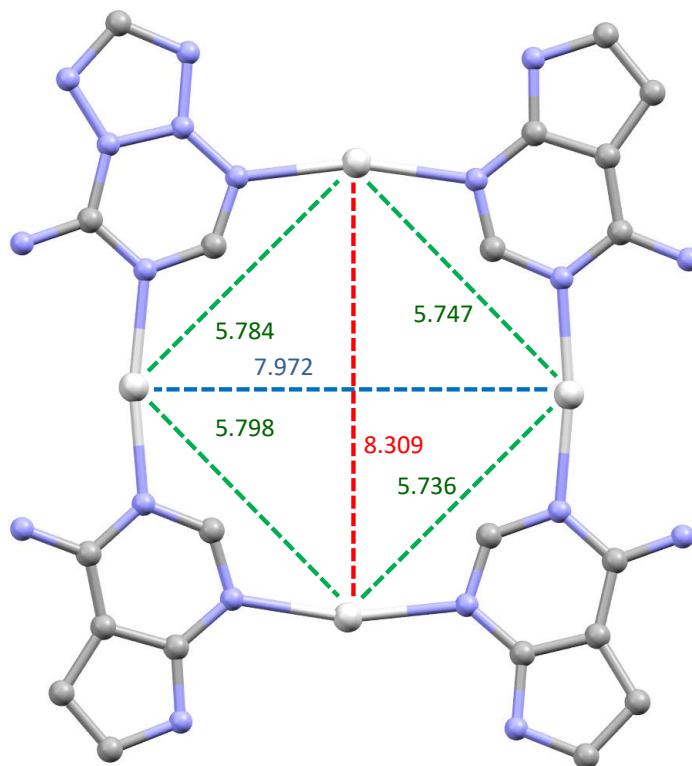
The crystallographic data of the three novel 7-deazaadenine silver (I) complexes, **AgdA-1**, **AgdA-2** and **AgdA-3**, are compiled in **Table 6.1**.

Complex **AgdA-1** crystallizes in the triclinic *P*-1 space group and a perspective of the compound is shown in **Figure 6.3**. The crystalline structure consists in tetranuclear units of  $[\text{Ag}_4(\text{prop-}^{7\text{C}}\text{A})_4]^{4+}$  and four crystallization  $\text{ClO}_4^-$  anions balancing the total charge. In the cationic unit, there are four crystallographically different  $\text{Ag}^+$  ions that exhibit  $\text{AgN}_2$  coordination geometries. The Ag(I) atoms are linked to the 7-deazaadenine

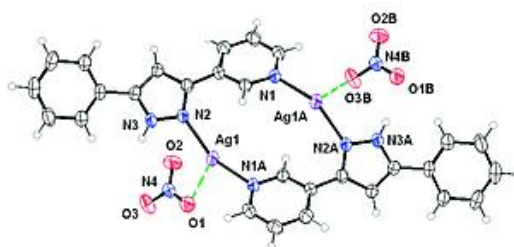
via N1 or N3 atoms alternatively to complete the square arrangement. In Ag2 and Ag4 atoms, the N–Ag–N bond is attracted by the neighbouring  $\text{ClO}_4^-$  counteranion and bent towards one of its O atoms. The shortest Ag–O distances are 2.673(5) and 2.699(6) Å, for Ag2 and Ag4, respectively, and are slightly longer than normal Ag–O coordination bonds. The N–Ag–N bond angles of ca.  $163^\circ$  deviate significantly from the linear mode. Intramolecular Ag $\cdots$ Ag interactions pertaining to the edges of the cationic square have values of ca. 5.71 Å (**Figure 6.4**), while diagonal interactions are of 7.972 and 8.309 Å. Similar deviations from linearity in  $\text{AgN}_2$  coordination geometry have been previously published [3] (**Figure 6.5**).



**Figure 6.3.** Structural unit of **AgdA-1** complex, showing the binding of Ag(I) via N1 and N3 alternatively. Hydrogen atoms and crystallization  $\text{ClO}_4^-$  molecules have been omitted for clarity.



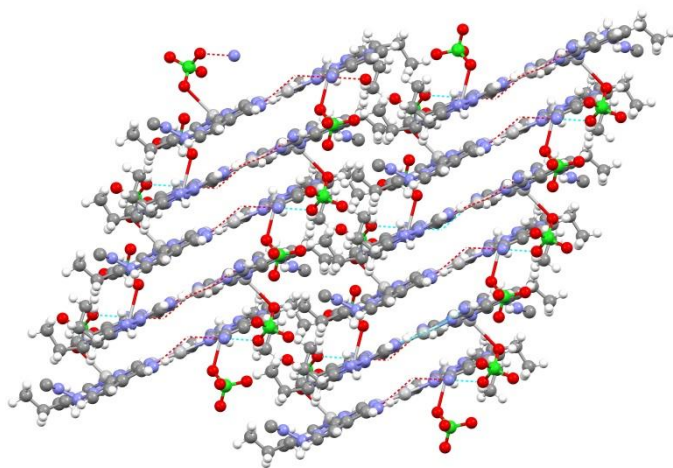
**Figure 6.4.** Molecular square with intramolecular Ag...Ag interactions. Hydrogen atoms, propyl groups and crystallization  $\text{ClO}_4^-$  molecules have been omitted for clarity.



**Figure 6.5.** Structure reported by Zhan et al. [3]

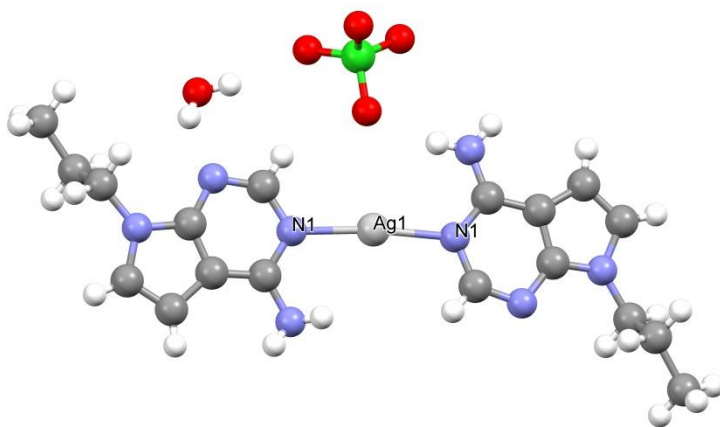
The tetrameric unit is placed in an almost perfect plane formed by the four Ag(I) ions, with a maximum distortion of 0,753Å. The distances between silver ions and ligands vary depending of the type of nitrogen involved in the bond. The Ag(I)-N3 distances are in the range 2.132(5)-2.136(5)Å with the exception of one bond distance of 2.151(5)Å, whilst the Ag(I)-N1 distances are between 2.182(5)-2.186(5)Å for Ag2 and 2.208(5)-2.200(5)Å for Ag4. The angles N-Ag-N vary among 159.90(2)-171.56(19)°, showing a tendency to plane binding. Focusing in the plane formed by the four Ag(I) ions, the distances between contiguous metal centres are between 5.798(6)Å (maximum) and 5.736 (6)Å (minimum), while the distances between opposite Ag(I) ions are of 8.309 and 7.972Å. The distance between the Ag(I) ions and the oxygen atoms belonging to  $\text{ClO}_4^-$  are 2.673(5) and 2.699(6)Å respectively, which cannot be considered as coordination bonds.

The three-dimensional network of **AgdA-1** compound is shown in **Figure 6.6**, displaying orderly  $\pi$ -stacking interactions among the tetranuclear units (values of ca. 3,493Å) and hydrogen bonds involving perchlorate anions and  $\text{NH}_2$  groups pertaining to 7-deazaadenine ligand with distances in the range 2.841-2,997Å.



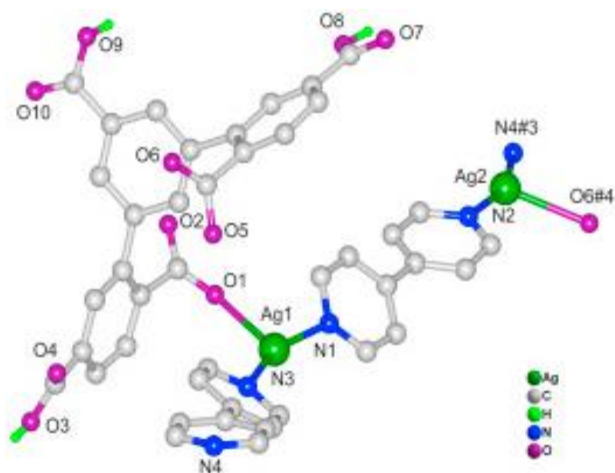
**Figure 6.6.** Supramolecular layers formed by hydrogen bonds and  $\pi$ -stacking interactions in compound **AgdA-1**. Hydrogen atoms have been omitted for clarity.

Compound **AgdA-2** crystallizes in the monoclinic  $P 2_1/c$  space group. The X-ray crystal structure is shown in **Figure 6.7**. The metallic centre of Ag(I) possess similar  $\text{AgN}_2$  coordination environment as seen in **AgdA-1**. The two N1 atoms belong to two different 7-deazaadenine molecules, while the  $\text{ClO}_4^-$  balances again the charge of the cationic 7-deazaadenine complex  $[\text{Ag}(\text{prop-}^7\text{C}\text{A})_2]^+$ . Finally, crystallization water molecules are presents in the structure generating a complex hydrogen network. The distances between silver ions and the N1 of the 7-deazaadenine ligands are 2.105(12) and 2.111(12)Å, like it was expected. The angle N1-Ag-N1 is close to a linear interaction, with a value of  $173.66(5)^\circ$ . The distance between silver (I) centre and the closest oxygen atom belonging to the  $\text{ClO}_4^-$  anion is 3.018(12)Å, which leaves no doubt that there is no coordination interactions between the Ag(I) and the perchlorate.



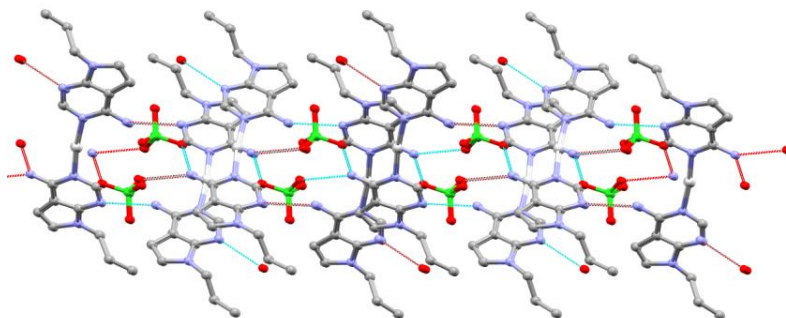
**Figure 6.7.** Structural unit of **AgdA-2** complex.

A similar structure with almost linear N-Ag-N bonds was reported by Dong-Shen Li et al. [4] in 2016 (**Figure 6.8**), in which the Ag(I) atom was between two nitrogen atoms belonging to an aromatic heterocycle and coordinated to a close oxygen atom to form a  $\text{AgN}_2\text{O}$  environment. The distance between Ag1 and O1 is 2.4638(39)Å in this case, and the distances between Ag1 and both N1 and N3 are 2.2167(49) and 2.1833(49)Å respectively, which is in good agreement with the distances of **AgdA-2**.



**Figure 6.8.** Structure reported by Dong-Shen Li et al. [4]

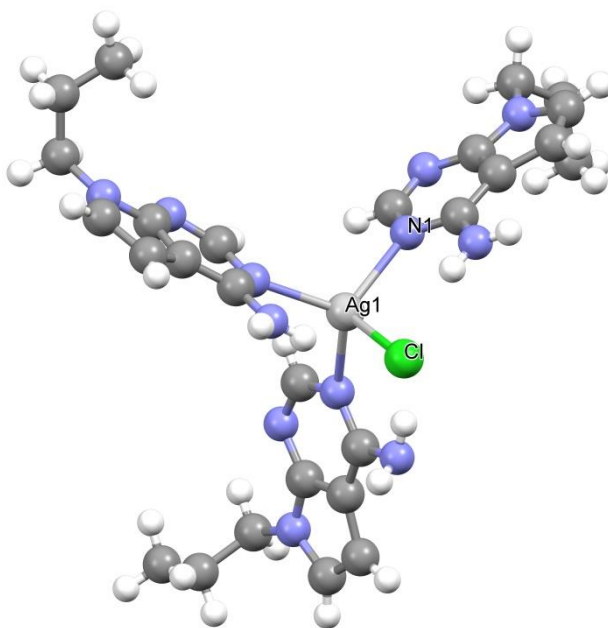
Cationic complexes, perchlorate anions and crystallization water molecules generate a complex interpenetrated supramolecular 2D-network formed by hydrogen bonds and  $\pi$ -stacking interactions (values of ca. 3,606Å) among 7-deazaadenine ligands. The hydrogen networks involve N3 atoms and NH<sub>2</sub> groups pertaining to deazaadenine, perchlorate anions and crystallization water molecules with distances that are in the range 2.995-3.005Å (**Figure 6.9**).



**Figure 6.9.** Three-dimensional arrangement of **AgdA-2** complex. The water molecule have been omitted for clarity.

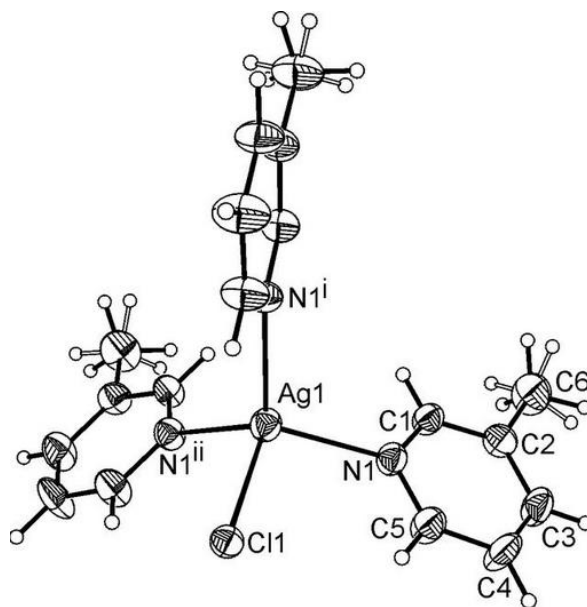


Compound **AgdA-3** crystallizes in the hexagonal  $P6_3$  space group and consists in cationic complexes  $[\text{Ag}(\text{prop-}^7\text{C}\text{A})_3]^+$  formed by three prop-dA ligands coordinated to Ag(I) ions and a coordinated Cl<sup>-</sup> balancing the charge. Therefore, the coordination environment of Ag(I) is  $\text{AgN}_3\text{Cl}$ . The nitrogen atoms that are bound to the silver (I) centre belong to the 7-deazaadenine ligand (N1), which proves that the blocking of position 7 favours the coordination via N1. The distances between Ag(I) and N1 are of 2.335(7) Å for the three ligands, while the Ag-Cl bond distance has a value of 2.657(2) Å. The N1-Ag(I)-N1 angles display a value of 113.98(2)°. The X-ray crystal structure is displayed in **Figure 6.10**.



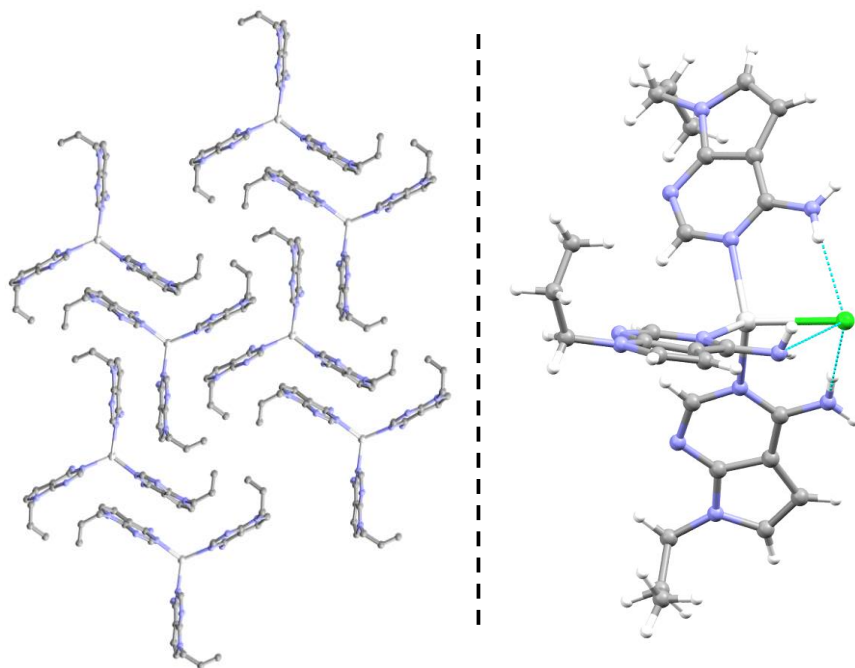
**Figure 6.10.** Structural unit of **AgdA-3** complex.

The structure of chlorotris(3-methylpyridine)silver(I), reported by Näther and Beck in 2004 [5], exhibits the same coordination environment like **AgdA-3**, with three nitrogen atoms bonded to the silver centre and one chloride ion also coordinated balancing the charge (**Figure 6.11**)



**Figure 6.11.** Structure of chlorotris(3-methylpyridine)silver(I) [5]

The three-dimensional network of the **AgdA-3** complex is shown in **Figure 6.12** (left), in which a spiral ordination of six units of complex can be noticed, clearly favoured by the  $\pi$ -stacking among the aromatic rings with values of ca. 3,8Å. Moreover, it can be observed a triple intramolecular hydrogen bond between the chloride atom and the amino groups pertaining to the three 7-deazaadenine ligands coordinated to the Ag(I) ion. These three hydrogen bonds exhibits distances of 3.190Å (**Figure 6.12**, right).



**Figure 6.11.** Left: Spiral three-dimensional network of **AgdA-3** complex. The propyl residues have been omitted for clarity. Right: Triple intramolecular hydrogen bond between the chloride atom and the amino groups.

It is clear that by varying the proportion of ligand different structures can be obtained, but always involving a binding via N1 due to the blocking of position 7. The three silver(I) 7-deazaadenine complexes demonstrate the viability to coordinate silver ions at the Watson-Crick face of DNA double helix, as a result of the substitution of the preferential binding site N7 atom by a CH group.

Compound	<b>AgdA-1</b>	<b>AgdA-2</b>	<b>AgdA-3</b>
Chemical formula	C <sub>62</sub> H <sub>84</sub> Ag <sub>8</sub> Cl <sub>8</sub> N <sub>42</sub> O <sub>32</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> AgClN <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>27</sub> H <sub>36</sub> AgClN <sub>12</sub>
M/g mol <sup>-1</sup>	3076.28	577.79	671.97
T/K	100	100	100
Cryst. Syst.	Triclinic	Monoclinic	Hexagonal
Space Group	<i>P</i> -1	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> / <i>c</i>	<i>P</i> 6 <sub>3</sub>
<i>a</i> (Å)	9.226(4)	16.181(5)	15.4163(13)
<i>b</i> (Å)	15.833(8)	9.623(5)	15.4163(13)
<i>c</i> (Å)	18.346(9)	16.927(4)	7.1248(7)
$\alpha$ (°)	68.714(2)	90	90
$\beta$ (°)	79.691(2)	119.28(2)	90
$\gamma$ (°)	77.351(2)	90	120
<i>V</i> / Å <sup>3</sup>	2421.9(2)	2299.0(2)	1466.4(3)
<i>Z</i>	1	4	2
$\rho$ /g cm <sup>-3</sup>	2.109	1.939	1.522
$\mu$ /mm <sup>-1</sup>	1.905	1.710	0.819
GOF	1.6237	1.127	1.040
<i>R</i> [1>2 $\sigma$ ( <i>I</i> )] <sup>a</sup>	0.0479	0.0976	0.0536
<i>wR</i> <sup>2</sup> [1>2 $\sigma$ ( <i>I</i> )] <sup>b</sup>	0.1532	0.1938	0.1137

**Table 6.1.** Crystallographic data of 7-deazaadenine complexes

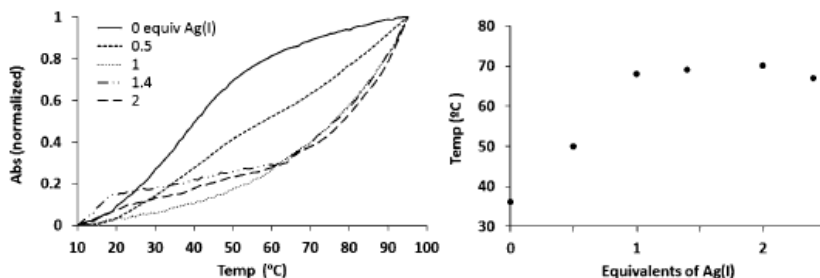
## 6.2. Interaction studies of Ag(I) ions towards oligonucleotides <sup>7</sup>C-A-T base pairs. Previous studies (poly(<sup>7</sup>C-A-T)<sub>9</sub>)

Initial studies towards the metalation of a whole DNA sequence with one Ag(I) ion mediating between each base pair, were performed in our research group, and they are compiled in the Doctoral Thesis of Dr. Santamaría Díaz [6].

The oligonucleotide poly(<sup>7</sup>C-A-T)<sub>9</sub>, which consists of an octadecamer sequence with alternating non-canonical 7-deazaadenine (<sup>7</sup>C-A) and canonical thymine (T) as the nucleobases, was synthesized and shown to hybridize into double-stranded DNA through the formation of hydrogen-bonded Watson-Crick base pairs. dsDNA with metal-mediated base pairs was then obtained by selectively replacing W-C hydrogen bonds by coordination bonds to central silver ions. The oligonucleotide adopts a duplex structure in the absence of Ag<sup>+</sup> ions, and its stability is significantly enhanced in the presence of Ag<sup>+</sup> ions while its double-helix structure is retained.

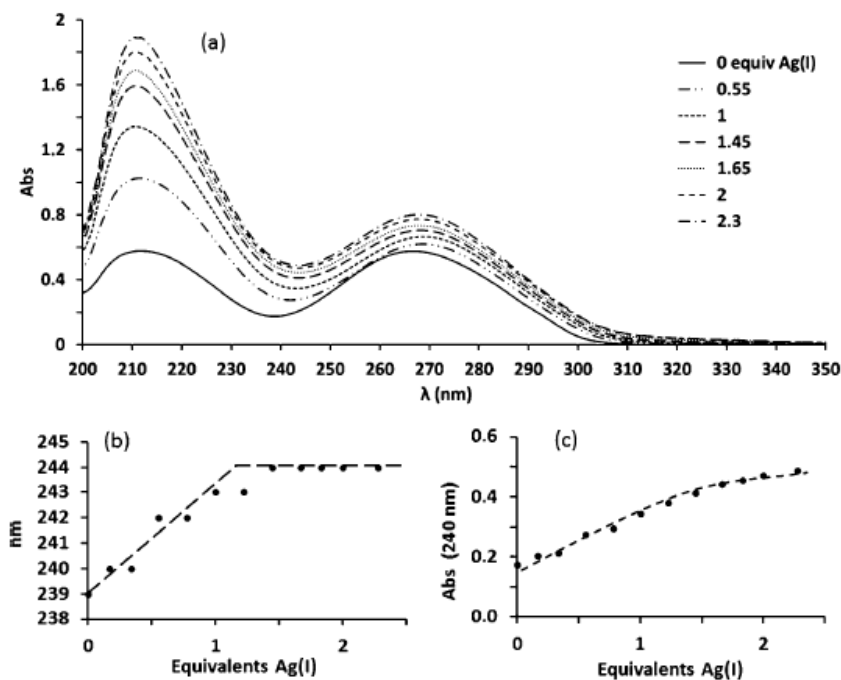
Temperature melting and UV and circular dichroism spectroscopy were used to confirm the selective formation of the silver-mediated base pairs. This work comprises the first time characterized  ${}^7\text{C}$ A-T DNA-Ag(I) full sequence, carried out by our research group and reported by Galindo et al. [2].

In the absence of  $\text{Ag}^+$  ions, oligonucleotide poly( ${}^7\text{C}$ A-T), shows cooperative melting curves, indicating the formation of a duplex structure with a melting temperature ( $T_m$ ) of  $35^\circ\text{C}$ . Upon addition of increasing amounts of  $\text{Ag}^+$  ions, the melting curves were shifted to higher temperatures, which is indicative of double-stranded oligonucleotide poly( ${}^7\text{C}$ A-T), being significantly thermally stabilized. This trend is observed until one equivalent of  $\text{Ag}^+$  is present in the solution (**Figure 6.12**), and the addition of more  $\text{Ag}^+$  ions ( $>1$  equiv) did not lead to further significant stabilization (one equivalent of  $\text{Ag}^+$  means one  $\text{Ag}^+$  ion per each  ${}^7\text{C}$ A-T base pair). The increase in  $T_m$  that was observed upon addition of one or more equivalents of  $\text{Ag}^+$  ions corresponded to  $\Delta T_m = 33^\circ\text{C}$ . These results suggest that  ${}^7\text{C}$ A-T base pairs can coordinate to one  $\text{Ag}^+$  ion, leading to the formation of metal-mediated base pairs of the type  ${}^7\text{C}\text{A}-\text{Ag}^+-\text{T}$ .



**Figure 6.12.** Left: Comparison of the melting curves recorded for oligonucleotide poly( ${}^7\text{C}$ A-T), in absence and presence of various amounts of  $\text{AgNO}_3$ . Right: Changes in the  $T_m$  observed upon addition of different amounts of  $\text{Ag}^+$  ions. The sample contained  $2\mu\text{M}$  of double-stranded oligonucleotide,  $100\text{mM}$   $\text{NaClO}_4$  and  $5\text{mM}$  MOPS buffer at pH 6.8. Santamaría-Díaz et al. [2]

To gain further insight into the formation of the metal-mediated base pairs, the addition of increasing amounts of  $\text{Ag}^+$  ions was monitored by UV spectroscopy in a titration with different stages (**Figure 6.13**).

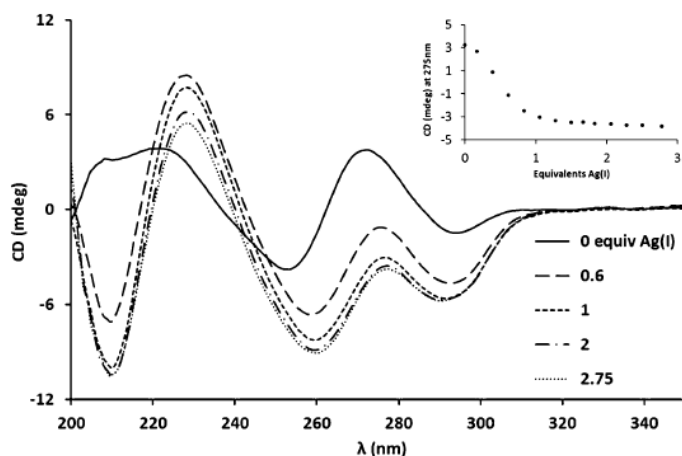


**Figure 6.12.** a) UV spectra in presence of various amounts of  $\text{Ag}^+$  ions. b) Bathochromic shift of the minimum at approximately 240nm. c) Absorption changes in the 240nm region upon addition of  $\text{Ag}^+$  ions. The sample contained 2uM of double-stranded oligonucleotide, 100mM  $\text{NaClO}_4$ , and 5mM MOPS buffer at pH 6.8. Santamaria-Díaz et al. [2]

The UV spectra displays significant changes in the region from 230 to 300nm, which is where the nucleobases absorb. A hyperchromic effect was observed during the titration experiment, confirming the binding of  $\text{Ag}^+$  to the nucleobases (**Figure 6.13.a**). It is noteworthy that while the absorbance of the maximum at 270nm increased progressively during the whole titration experiment, the intensities of the absorption minimum at 240nm and the maximum at 212nm increased significantly up to the presence of approximately one equivalent of  $\text{Ag}^+$ , and the addition of more  $\text{Ag}^+$  ions led to a slightly less steep increase in the absorption (**Figure 6.13.c**). Moreover, a bathochromic shift of the absorption at 240nm (4nm) was observed during the addition of the first equivalent, whereas no significant changes were observed afterwards (**Figure 6.13.b**). These

results are in good agreement with the formation of the expected silver-mediated base pairs. When the same experiment was performed with the analogous oligonucleotide poly9(A-T), containing canonical adenine and thymidine nucleobases, the hyperchromic effect as well as the bathochromic shift were also observed upon the addition of  $\text{Ag}^+$  ions, but these variations followed a progressive trend with no stabilization during the experiment. These observations can be explained by the binding of  $\text{Ag}^+$  ions by oligonucleotide poly( $^{7\text{C}}\text{A-T}$ ), via the endocyclic nitrogen atoms  $^{7\text{C}}\text{A-N1}$  and T-N3, leading to the formation of metal-mediated  $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+-\text{T}$  base pairs. This binding will necessarily deprotonate the thymidine imine and therefore induce changes in the absorption bands of the nucleobases that are different to those observed for canonical oligonucleotide, where  $\text{Ag}^+$  will favourably coordinate to the Ag-N7 atoms.

The formation of the silver(I)-mediated base pairs and their significance for the conformation of oligonucleotide poly( $^{7\text{C}}\text{A-T}$ ), was investigated by CD spectroscopy titration experiments. In the absence of  $\text{Ag}^+$  ions, the CD spectrum is characterized by two negative bands at 295 and 250nm, together with two positive bands at 270 and 220nm (**Figure 6.14**).



**Figure 6.14.** CD spectra upon addition of different amounts of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: Plot of the positive CD maximum at 27nm against the number of equivalents of  $\text{Ag}^+$  ions. The sample contained 2uM of double-stranded oligonucleotide, 100mM  $\text{NaClO}_4$ , and 5mM MOPS buffer at pH 6.8. Santamaría-Díaz et al. [2]

The shape of the curve indicates that oligonucleotide poly( $^{7C}$ A-T)<sub>9</sub> has a B-form conformation that is closely related to the conformation of poly[d(AT)] and poly[d(IC)] [7]. Upon addition of Ag<sup>+</sup> ions, the CD spectra retain their overall profile, but substantial changes in the intensity of the various bands are observed. The intensity of the positive band at 222nm increases significantly while a decrease in intensity was observed for the positive band at 275nm and the negative bands at 295 and 253nm. This decrease in intensity has also been reported for the B-form of poly[d(IC)] at low salt concentrations and for G<sub>6</sub> homobase strands upon addition of Ag<sup>+</sup> ions [8]. In all cases, a bathochromic shift is observed except for the negative band at 295nm, which moves to shorter wavelengths. Interestingly, the larger changes for all bands are completed upon addition of 1 equivalent of Ag<sup>+</sup> ions, and no significant changes are observed later. These results concur with the binding of Ag<sup>+</sup> ions to the DNA and with the concomitant formation of silver(I)-mediated base pairs, replacing one of the original W-C hydrogen bonds at the  $^{7C}$ A-T base pair by a silver–nitrogen coordination bond. The observation that the intensities of the bands change during the addition of the first equivalent, and that no significant changes were observed afterwards, is in good agreement with the fact that the substitution of a hydrogen bond (N1···H-N3) by a coordination bond (N1–Ag<sup>+</sup>–N3) will have a certain influence on the conformation of the oligonucleotide.

All of these experiments demonstrated that the binding of Ag<sup>+</sup> ions by  $^{7C}$ A-T base pairs within the oligonucleotide poly( $^{7C}$ A-T)<sub>9</sub> leads to the formation of a metallo-DNA system with  $^{7C}$ A–Ag<sup>+</sup>–T coordination with concomitant thermal stabilization. Importantly, this strategy offers the possibility to program the structure of DNA molecules by making use of their canonical Watson–Crick self-assembly properties, and the number of metal ions that can be introduced at specific locations inside the double helix depends on the number of  $^{7C}$ A-T base pairs in the duplex, which can be tuned during the enzymatic DNA synthesis.



### 6.3. Interaction studies of Ag(I) ions towards oligonucleotides containing $^{7\text{C}}$ G-C base pairs

Based on our previous finding [2], we foreseen that distinctive W-C metallated G-Ag<sup>+</sup>-C base pairs analogues could be generated by using 7-deazaguanine/cytosine ( $^{7\text{C}}$ G-C) base pairs, where the favoured binding G-N7 position is excluded and some preliminary studies have been done in this direction [9,10]. With this aim, in this thesis we have explored the generation of contiguous silver(I)-mediated W-C base pairs on sequences comprising  $^{7\text{C}}$ G-C base pairs, where Ag(I) ions replace W-C hydrogen bonds. To perform our studies, two DNA duplexes containing consecutive  $^{7\text{C}}$ G-C base pairs (duplexes I, II) as well as their corresponding canonical duplexes as control (Ic, IIc) were investigated. Complete sequences and nomenclatures employed in the study are recorded in **Table 6.2**.

**Table 6.2.** Oligonucleotides employed in Ag:poly( $^{7\text{C}}$ G-C) interaction studies.

Duplex	Sequence	Code
<b>I</b>	5'- d(YYC YCC) -3' 3'- d(CCY CY) - 5'	<b>ODN1</b>
<b>II</b>	5'- d(YC YC YC YC YC YC YC) -3' 3'- d(CY CY CY CY CY CY CY) -5'	<b>ODN-2</b>
<b>Ic</b>	5'- d(GGC GCC) -3' 3'- d(CCG CGG) -5'	<b>ODN-1c</b>
<b>IIc</b>	5'- d(CG CG CG CG CG CG CG) -3' 3'- d(GC GC GC GC GC GC GC) -5'	<b>ODN-2c</b>

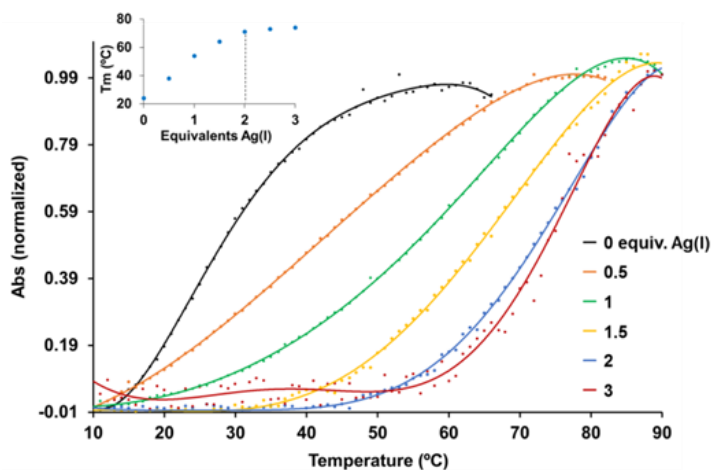
Y = 7-deazaGuanine, G = Guanine, C = Cytosine.

As seen for 7-deazaadenine, in the absence of Ag(I) ions the substitution of the N7 atom by a CH group does not impede 7-deazaguanine to pair with cytosine via formation of native W-C hydrogen bonds and can allow the formation of  $^{7\text{C}}$ G-Ag<sup>I</sup>-C base pairs through substitution of WC hydrogen bonds by coordination bonds. When Ag(I) ions are present, two hydrogen bonds of each base pair are replaced by coordination bonds, forming a double strand structure with silver(I)-mediated base pairs.

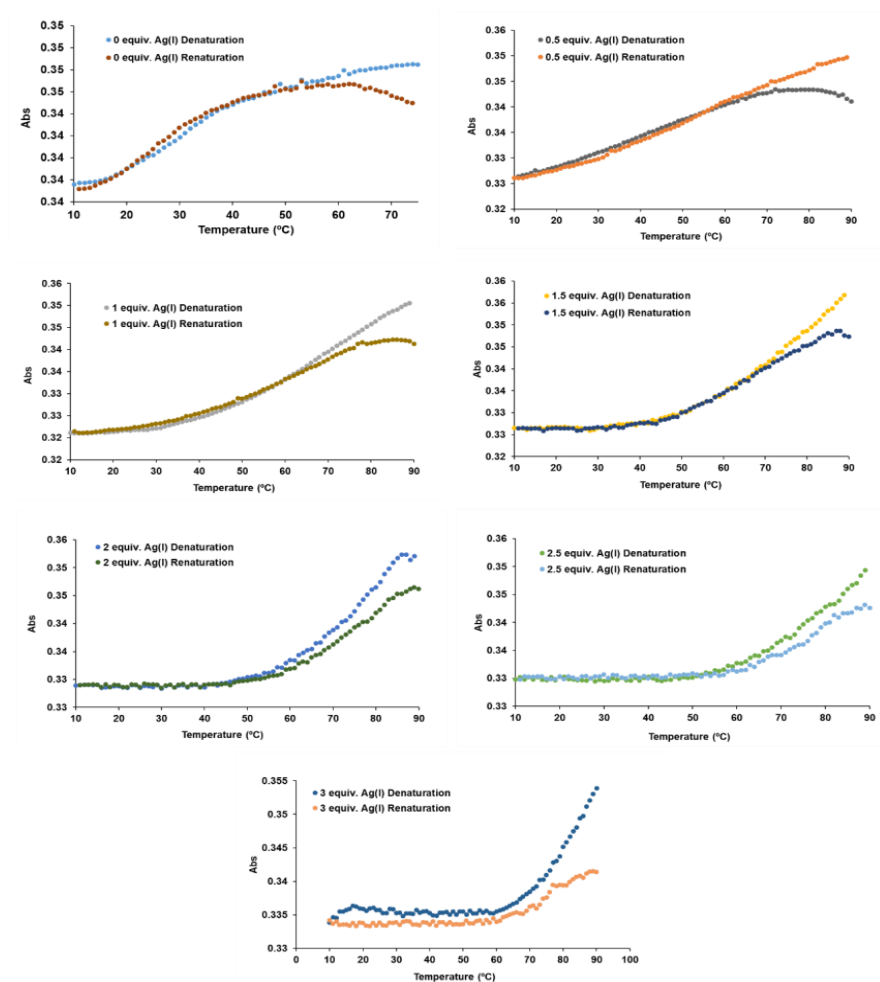
Characterization studies were carried out following the procedure described in ANEXO IV. Measurements were registered for 2 $\mu$ M ds-oligonucleotide in 100mM NaClO<sub>4</sub> and 5mM phosphate buffer (pH=8.5), if not stated otherwise, adding increasing amounts of AgNO<sub>3</sub> solution, keeping constant oligonucleotide concentration. The change in the buffer was based in the different pKa values of the nucleobases used in these experiments (<sup>7</sup>C, G, C).

### 6.3.1. Thermal stability studies

Initially, we evaluated the melting temperature ( $T_m$ ) of the hexamer duplex **I** using variable-temperature UV measurements. In the absence of Ag<sup>+</sup>, duplex **I** has a  $T_m$  of 25 °C, and the addition of Ag<sup>+</sup> results in the shifting of melting curves to higher temperatures until two equivalents of Ag<sup>+</sup> are present in solution (**Figure 6.15**), with a  $\Delta T_m$  of 46 °C ( $\sim 7.5$  °C per base pair). The denaturation melting curves displayed an intrinsic rising tendency at high temperature (**Figure 6.16**), whereas the renaturation curves showed a sigmoidal profile until c.a. 2.5 equivalents of Ag<sup>+</sup> are present (**Figure 6.15**). These results support the formation of silver-mediated base pairs with the involvement of more than one Ag<sup>+</sup> ion, which may suggest the generation of dinuclear metallated base pairs.

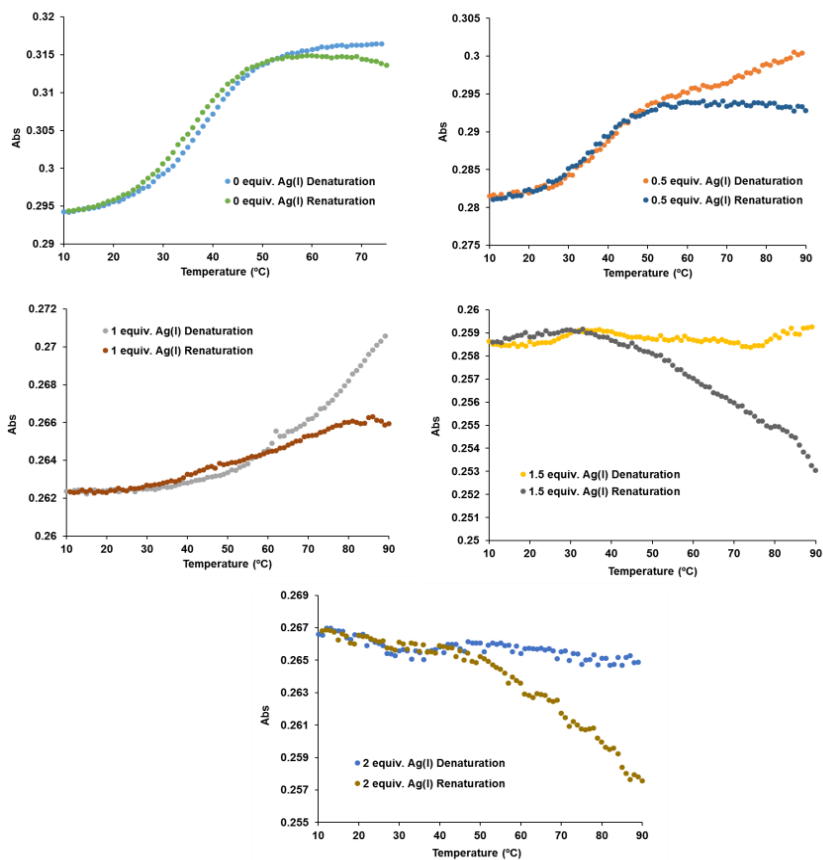


**Figure 6.15.** Renaturation curves of duplex **I** in absence and presence of controlled amounts of Ag<sup>+</sup> ions. Changes in the  $T_m$  value were observed upon addition of Ag<sup>+</sup> ions.

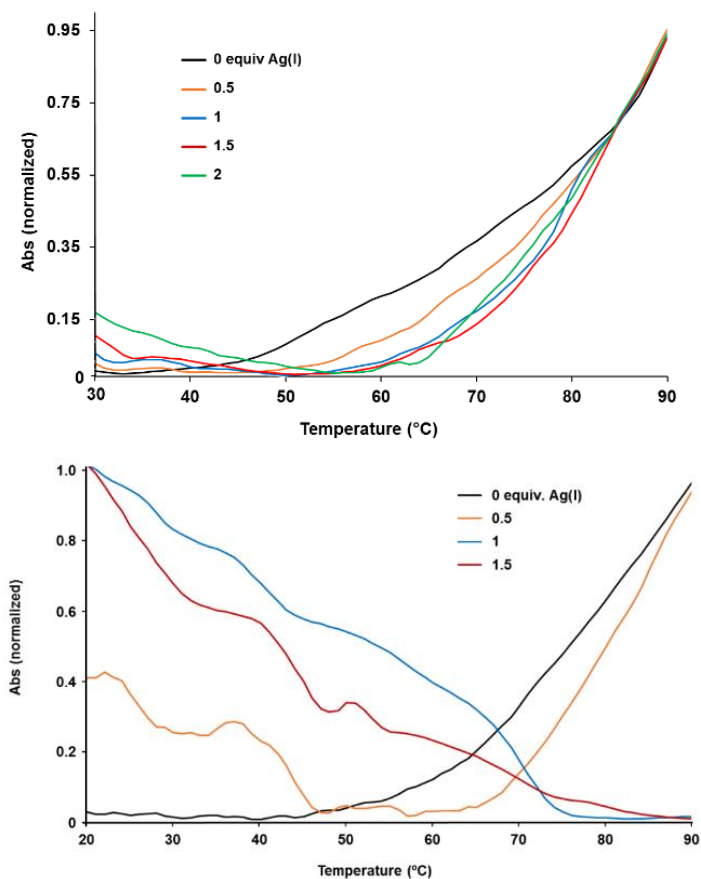


**Figure 6.16.** Melting curves (denaturation and renaturation) for duplex **I** in absence and presence of controlled amounts of  $\text{Ag}^+$  ions.

It is worth mentioning that the melting temperature experiments registered for control **Ic** did not show any cooperative melting process after 0.5 equivalent  $\text{Ag}^+$  (**Figure 6.17**). Likewise, melting experiments were performed on larger duplex **II** showing a shift of the melting curves to higher temperatures upon addition of  $\text{Ag}^+$ . However no conclusion could be drawn from these data due to the absence of high temperature plateau in presence of  $\text{Ag}^+$  (**Figure 6.17**, left top). Nevertheless, in the case of control duplex **IIC**, the addition of  $\text{Ag}^+$  led to a different outcome (**Figure 6.18**) which can be expected due to the formation of different species for **II** and **IIC** in presence of  $\text{Ag}^+$ .



**Figure 6.17.** Melting curves (denaturation and renaturation) for duplex **Ic** in absence and presence of controlled amounts of  $\text{Ag}^+$  ions.

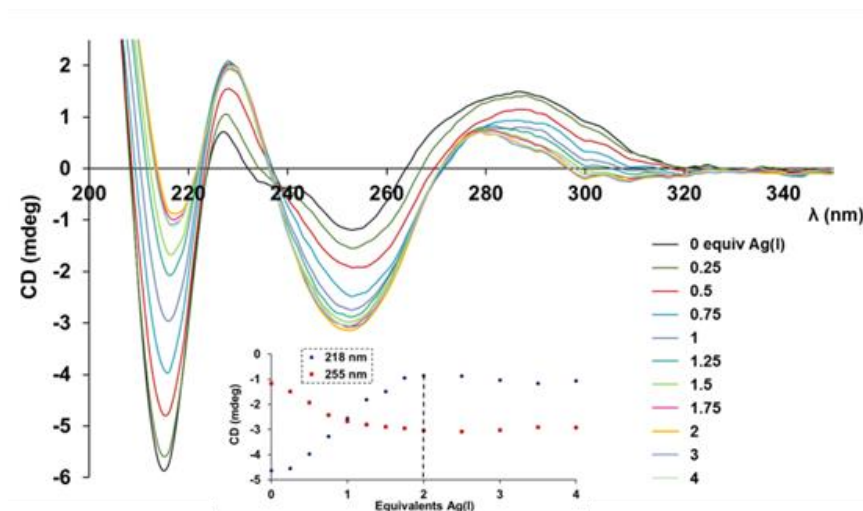


**Figure 6.18.** Melting curves for duplex **II** (top, a) and **IIc** (bottom, b) in absence and presence of controlled amounts of  $\text{Ag}^+$  ions. In the case of duplex **II**, the melting curves shift to higher temperature upon addition of  $\text{Ag}^+$ . For duplex **IIc**, the melting curves vanish after 0.5 equivalents of  $\text{Ag}^+$  are present in solution.

### 6.3.2. Circular dichroism studies

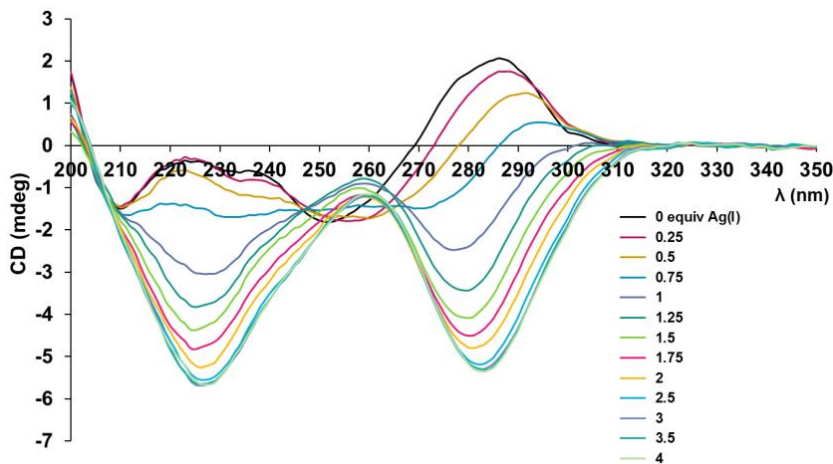
Additional experiments were performed using CD spectroscopy in order to get more insight about the formation of the silver(I)-base pairs. In absence of  $\text{Ag}^+$ , the CD spectrum of duplex **I** exhibited a profile very similar to the B-form conformation reported for poly(CG) [8,9], with two positive bands centred at 225 and 285nm and two negative bands at 218 and 255nm. In presence of  $\text{Ag}^+$ , the CD band at 218nm steadily changed during the addition of the first two equivalents, and no substantial alteration were displayed subsequently (**Figure 6.19**). Similarly, the negative CD

band at 255nm decreased during the addition of two equivalents but, in this case, an asymptotic tendency was displayed which saturated at two equivalents, suggesting a lower  $\text{Ag}^+$  binding affinity.



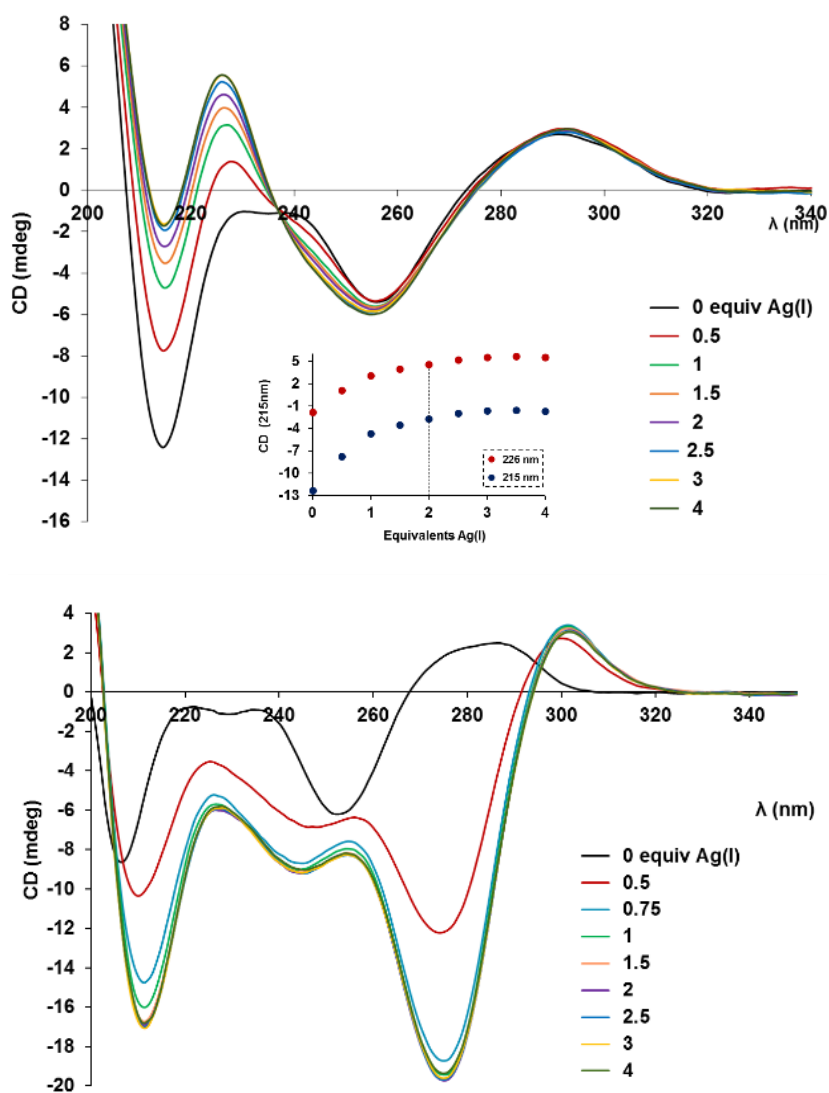
**Figure 6.19.** CD spectra of duplex **II** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: Changes in the CD minimum at 215nm and maximum at 226nm. Conditions: 2 $\mu\text{M}$  of duplex **II**, 100mM  $\text{NaClO}_4$  and 5mM phosphate buffer at pH 8.5-9, at 10°C.

These results agree with the presence of two metal ions binding at each base pair, as perceived in the UV-melting experiments. Importantly, the CD spectra maintained their profile and an isodichroic point was observed at 238nm as a consequence of a transition between two conformations, from an unbound to a bound form, and related to the B-form conformation. The control experiment performed using duplex **Ic** did not lead to the same results (**Figure 6.20**), and the changes observed upon addition of  $\text{Ag}^+$  resembled to those reported for the formation of more complex structures containing  $\text{Ag}^+$ -cytosine or  $\text{Ag}^+$ -guanine homobase pairs [12,13]. Hence, the formation of metal-mediated homobase pairs can be initially excluded for duplex **I** in presence of  $\text{Ag}^+$ , suggesting the formation silver(I)-mediated heterobase pairs of type  ${}^7\text{C-Ag-C}$ .



**Figure 6.20.** CD spectra for duplex **Ic** in absence and presence of controlled amounts of  $\text{Ag}^+$  ions.

In the case of duplex **II**, the CD spectrum also showed a B-form conformation (**Figure 6.21**, top), as seen for **I**. The intensity of the CD bands centred at 215 and 226nm abruptly changed during the addition of the first equivalent and less prominent alterations were exhibited afterwards until it saturates at c.a. 2-3 equivalents. In this case, an asymptotic variation for the ellipticity of both bands was observed and therefore the binding stoichiometry could not be estimate accurately. However, based on the previous experimental results obtained for duplex **I**, it is appealing to speculate with the binding of two  $\text{Ag}^+$  per base pair which may occur in a weak equilibrium. The different tendency seen in the CD band at 218 and 215nm for **I** (steady change) and **II** (asymptotic) respectively, could be due a sequence dependency for the binding of two  $\text{Ag}^+$  ions. Contrarily, the changes observed in the CD spectra registered for the control duplex **Ic** in presence of  $\text{Ag}^+$  ions were substantially different (**Figure 6.21**, bottom). In this case, and as seen for duplex **Ic**, the changes observed agree with the formation of more complex structures that may include  $\text{Ag}^+$ -cytosine or  $\text{Ag}^+$ -guanine homobase pairs [12,13].

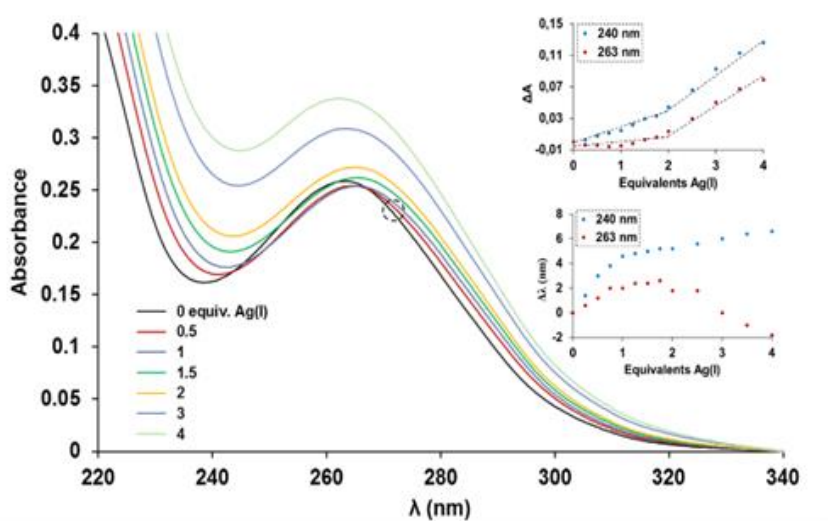


**Figure 6.21.** CD spectra for duplex **II** (top) and **IIc** (bottom) in absence and presence of controlled amounts of  $\text{Ag}^+$  ions. CD spectra of **II** changes during the addition of two equivalents of  $\text{Ag}^+$  and minor changes are displayed afterwards. In the case of **IIc**, changes are only observed until 0.75 equivalents of  $\text{Ag}^+$  are present in solution.

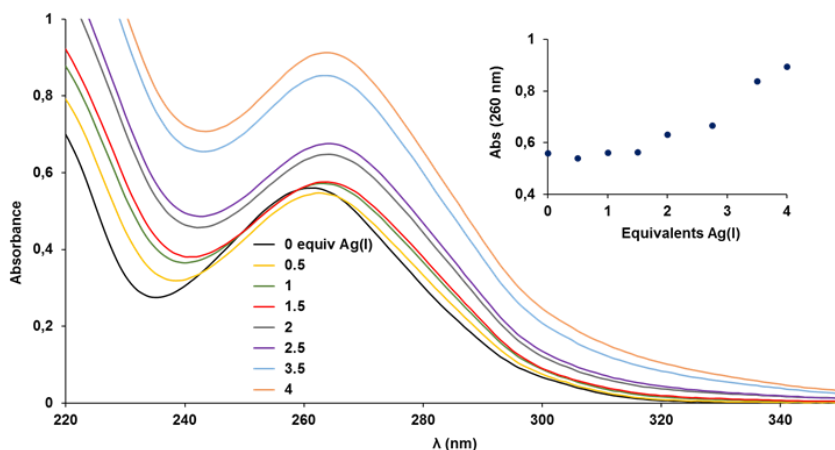


### 6.3.3. UV studies

UV spectroscopy titrations were performed to further evaluate the generation of these silver(I)-mediated base pairs. The addition of  $\text{Ag}^{\text{I}}$  to duplex **I** gave rise to changes for the UV absorption in the 255-275nm region, where the nucleobases absorb (**Figure 6.22**). Specifically, the absorption at 240 and 263nm slightly increased during the addition of two equivalents of  $\text{Ag}^+$  and experienced a prominent increase upon addition of further amount. Moreover, a bathochromic shift was observed for these bands during the addition of the first equivalent, followed by a hypsochromic shift at 263nm upon addition of more than two equivalents. The experimental data also agree with the interaction of more than one  $\text{Ag}^+$  ion per base pair and suggested the presence of secondary interactions, which agrees with the results obtained from the UV-thermal and CD studies (*vide supra*). Similar observations were displayed for duplex **II** (**Figure 6.23**). The absorption at 260nm slightly varied during the addition of the first two equivalents and markedly changed upon addition of further amount of  $\text{Ag}^+$ .



**Figure 6.22.** UV spectra of duplex **I** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: Changes in the UV maximum at 263nm. Circle: isobestic point at 266nm.



**Figure 6.23.** UV spectra of duplex **II** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: Changes in the UV maximum at 260nm.

The overall results obtained indicate that contiguous silver(I)-mediated bases are generated in duplex **I** and **II**, affecting the thermal stability of the duplexes whilst retaining their B-form conformation. The results point toward the formation of  $^{7\text{C}}\text{G-Ag-C}$  base pairs in a Watson-Crick pattern, but other homobase pairs could be considered if strand displacements events take place. It should be noted that whilst the formation of C-Ag-C is well-known [14], the generation of G-Ag-G homobase pairs in Watson-Crick pairing fashion has not been reported to date. However, the formation of canonical G-Ag-C heterobase pair has been recently demonstrated to occur via metal coordination at G-N1 and C-N3 positions [15], which further supports the herein proposed  $^{7\text{C}}\text{G-Ag-C}$  base pair.

Diverse interplanar metal-binding should be taken into account for oligonucleotide structures, and these secondary interactions could also be sequence-dependent. We are currently performing DFT calculations considering larger oligonucleotides and different functionals in order to evaluate the influence of both the DNA structure and the presence of different  $\text{Ag}^+$  ions environments.

### 6.4. Ag:poly15(<sup>7C</sup>A) + poly15(T) interaction studies

Once the interactions between palindromic sequences involving <sup>7C</sup>A-T and <sup>7C</sup>G-C pairs were studied, the behaviour of a double helix constituted by two non-palindromic sequences of homobases was analysed.

Oligonucleotide poly15(T)·poly15(<sup>7C</sup>A), consisting of two homogeneous complementary sequences comprising thymidine (T) and 7-deazaadenine (<sup>7C</sup>A), permits the formation of contiguous 7-deazaadenina-Ag<sup>I</sup>-thymine base pairs upon addition of Ag<sup>+</sup>. Remarkably, this duplex conformation enables silver(I) ions to be stacked inside the double helix, giving rise to argentophilic interactions with fluorescence emission. In order to demonstrate this, variable-temperature UV measurements and UV-Vis and CD titrations were registered for duplex **III** in the absence and presence of controlled amount of Ag<sup>+</sup> ions. Finally, fluorescence studies were carried out, comparing the results with the behaviour of poly(T-<sup>7C</sup>A)<sub>9</sub> (duplex **IV**). The sequences employed in the study are collected in **Table 6.3**.

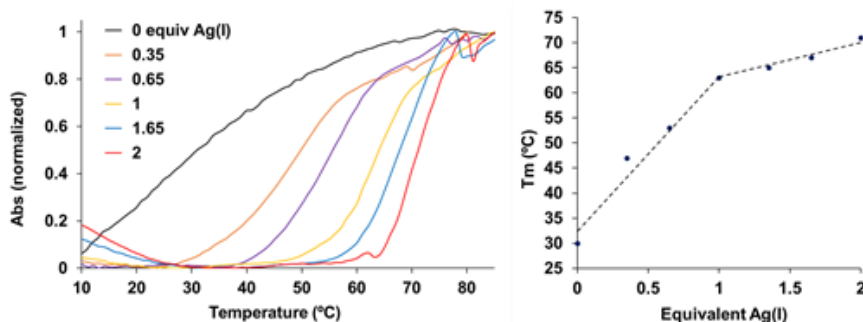
**Table 6.3.** Oligonucleotides employed in this study.

Duplex	Sequence <sup>[a]</sup>	Seq. Number
<b>III</b>	5' - d(XXX XXX XXX XXX XXX) - 3'	<b>ODN-3</b>
	3' - d(TTT TTT TTT TTT TTT) - 5'	<b>ODN-4</b>
<b>IV</b>	5' - d(XTX TXT XTX TXT XTX) - 3'	<b>ODN-5</b>
	3' - d(TXT XTX TXT XTX TXT) - 5'	
<b>IIIc</b>	3' - d(AAA AAA AAA AAA AAA) - 5'	<b>ODN-3c</b>
	5' - d(TTT TTT TTT TTT TTT) - 3'	<b>ODN-4</b>
<b>IVc</b>	5' - d(ATA TAT ATA TAT ATA) - 3'	<b>ODN-5c</b>
	3' - d(TAT ATA TAT ATA TAT) - 5'	

<sup>[a]</sup> X = 7-deazaadenine, A = Adenine, T = Thymine.

### 6.4.1. Thermal stability studies

Primarily, the melting temperature was evaluated for duplex **III** using UV measurements. Duplex **III** displays a cooperative melting profile above 10 °C, with a melting temperature  $T_m$  of 30 °C (**Figure 6.24**). The addition of  $Ag^+$  ions shifts the melting curves to higher temperatures, until 1 equivalent of  $Ag^+$  is added, with a concomitant rise of the  $T_m$ . The presence of further amount of  $Ag^+$  only causes less prominent changes in the  $T_m$ . Thus, this thermal stabilization is associated to the mediation of  $Ag^+$  ions between the base pairs and supports the formation of  ${}^7C A-Ag^+-T$  base pairs.

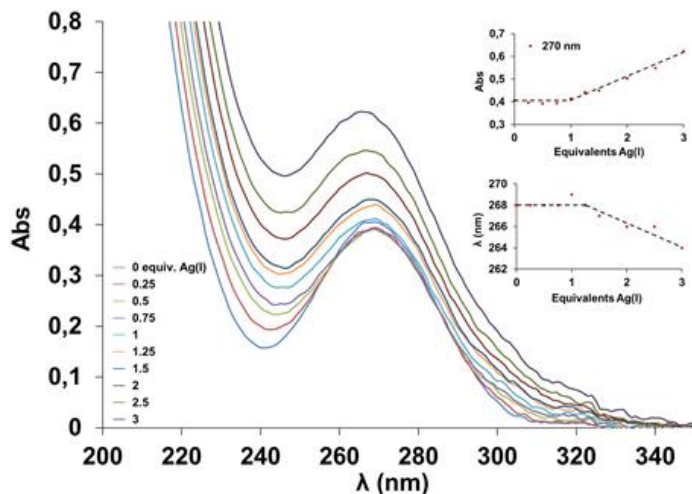


**Figure 6.24.** Thermal melting curves (left) and melting temperature  $T_m$  (right) of duplex **III** in absence and presence of controlled amounts of  $Ag^+$  ions. Experimental conditions: 2 $\mu$ M of duplex, 100mM  $NaClO_4$  and 5mM MOPS buffer pH 6.8.

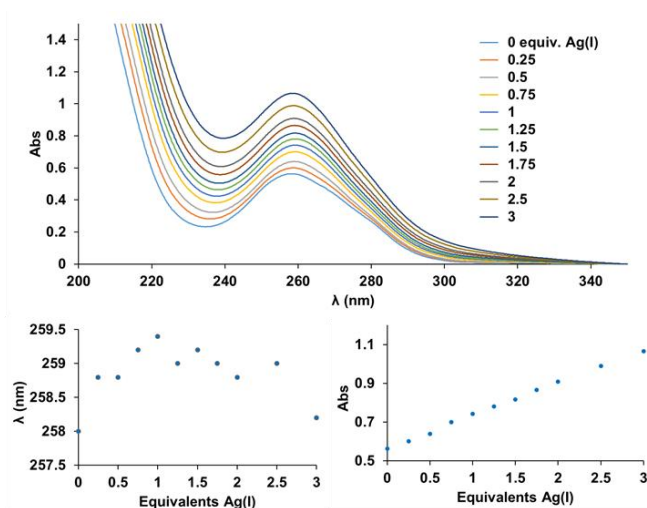
### 6.4.2. UV studies

UV titration performed on duplex **III** in presence of  $Ag^+$  further indicates the binding of one  $Ag^+$  per base pair (**Figure 6.25**). The UV spectra for duplex **III** show minor changes in the maximum centered at 268 nm upon addition of the first equivalent of  $Ag^+$ . However, a significant increase in absorption band and a bathochromic shift are displayed afterwards. On the other hand, duplex **IIIc** exhibits very different UV

spectra in presence of  $\text{Ag}^+$  ions, which agrees with the existence of a different binding pattern in the canonical A-T base pairs (**Figure 6.26**).



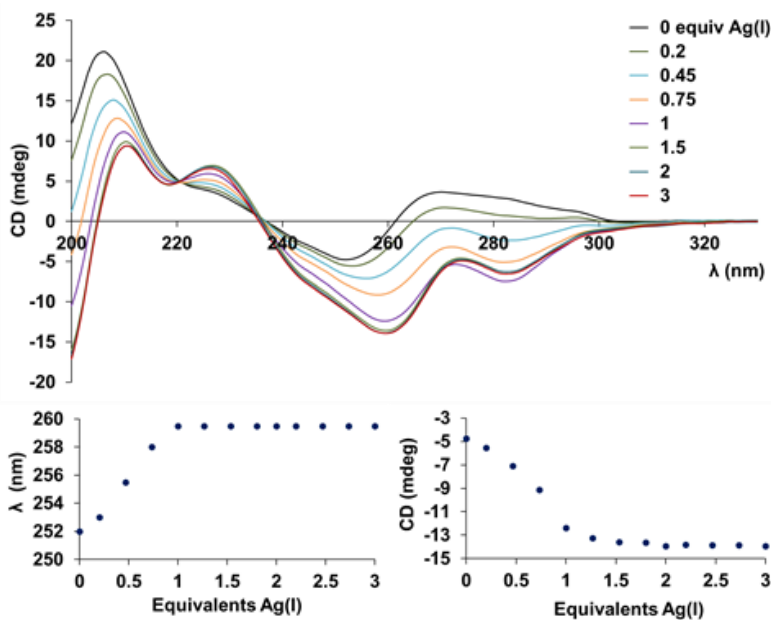
**Figure 6.25.** UV spectra of duplex **III** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: changes in the UV maximum at 268 nm Experimental conditions: 2 $\mu$ M of duplex, 100mM  $\text{NaClO}_4$  and 5mM MOPS buffer pH 6.8.



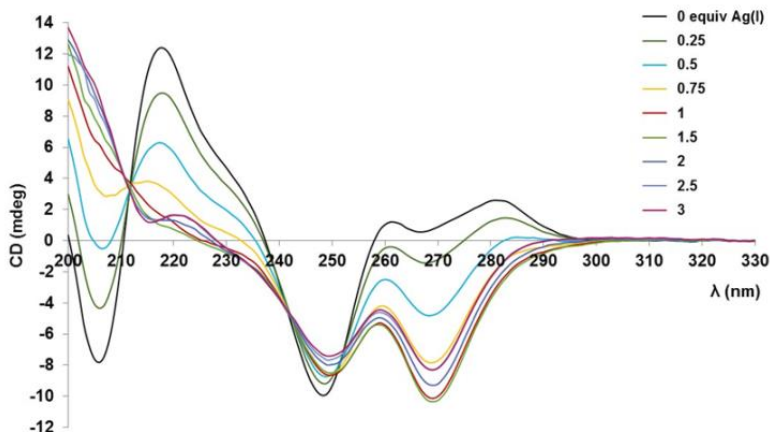
**Figure 6.26.** UV spectra of duplex **IIIc** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: changes in the UV maximum at 260nm. Experimental conditions: 2 $\mu$ M of duplex, 100mM  $\text{NaClO}_4$  and 5mM MOPS buffer pH 6.8.

### 6.4.3. Circular dichroism studies

Titration experiments registered by means of CD spectroscopy further confirm the formation of  $\text{Ag}^+$ -mediated base pair (**Figure 6.27**). In absence of  $\text{Ag}^+$ , duplex **III** displayed a CD profile characteristic for a B-form conformation as seen for related DNA p[(dT)]·p[(dA)] oligonucleotide [16]. The addition of  $\text{Ag}^+$  ions results on changes in the Cotton effects that clearly stabilize in presence of 1 equivalent of  $\text{Ag}^+$  with no substantial alteration displayed afterwards. In particular, two isodichroic points appear at 220 and 238nm. Conversely, the CD of control duplex **IIIc** shows very different outcome in the presence of  $\text{Ag}^+$ , with changes observed during the whole experiment, suggesting the formation of a different conformation (**Figure 6.28**). These results also indicate the formation of  ${}^7\text{C}$ A-Ag-T base pairs in duplex **III**.



**Figure 6.27.** CD spectra of duplex **III** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Inset: changes in the CD minimum at 252nm. Experimental conditions: 2 $\mu\text{M}$  of duplex, 100mM  $\text{NaClO}_4$  and 5mM MOPS buffer pH 6.8.



**Figure 6.28.** CD spectra of duplex **IIIc** upon addition of different amount of  $\text{Ag}^+$  ions. Experimental conditions: 2 $\mu\text{M}$  of duplex, 100mM  $\text{NaClO}_4$  and 5mM MOPS buffer pH 6.8.

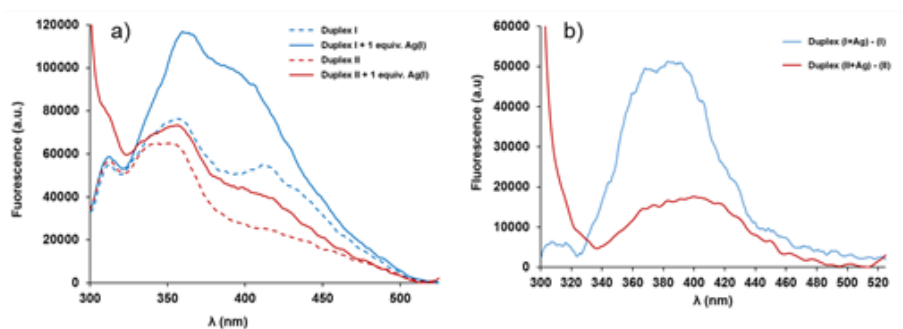
#### 6.4.4. Fluorescence studies

In order to study the properties of the Ag-DNA systems prepared in this thesis, we have performed preliminary studies about the fluorescence of such systems.

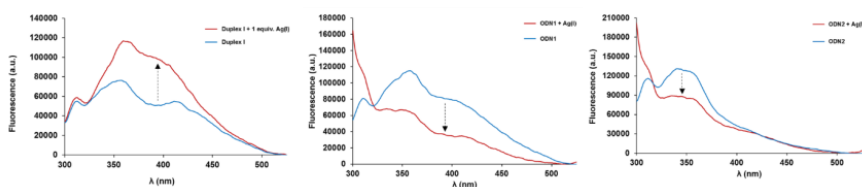
The formation of  $^7\text{C A-Ag}^+\text{-T}$  base pairs inside duplex **III** and **IV** could allow the alignment of  $\text{Ag}^+$  ions inside double helix and hence facilitate the formation of supported argentophilic interactions. In B-form conformations, the rise per base pair along the axis is *ca.* 3.3 Å, while argentophilic interactions occur below 3.4 Å and, consequently, could be generated in duplex **III** and **IV**. The formation of argentophilic interactions have been reported to be responsible for fluorescence emission that can be monitored in the emission spectra in the 350-600nm region [17]. In order to explore the existence of these interactions in duplexes **III** and **IV**, the fluorescence emission spectra were measured in presence of one equivalent of  $\text{Ag}^+$  upon excitation at 280nm.

In the absence of  $\text{Ag}^+$ , duplex **III** and **IV** show an emission band in the 350-450nm region, which can be related to the fluorescence of DNA [18]. Remarkably, when 1 equivalent of  $\text{Ag}^+$  is added to **III** and **IV** new changes are displayed in the emission spectra (**Figure 6.29**). Specifically, in

the case of duplex **III** the intensity of the emission band considerably increases, whilst a minor intensification is observed for duplex **IV**. Importantly, control experiment performed on single stranded ODN3 and ODN4 sequences showed a decrease in the fluorescence emission in presence of the same amount of  $\text{Ag}^+$  (**Figure 6.30**). In addition, control experiments carried out employing duplexes **IIIc** and **IVc** containing canonical adenine and thymine nucleobases did not display changes in fluorescence.



**Figure 6.29.** a) Fluorescence spectra of duplex **III** and duplex **IV** in presence and absence of 1 equivalent of  $\text{Ag}^+$  ions (solid and dashed line, respectively). b) Subtraction of the emission for free duplexes minus duplexes in presence of  $\text{Ag}^+$  ions. Experimental conditions: 2 $\mu\text{M}$  of duplex, 30 $\mu\text{M}$   $\text{Ag}^+$ , 100mM  $\text{NaClO}_4$ . Excitation wavelength: 280nm



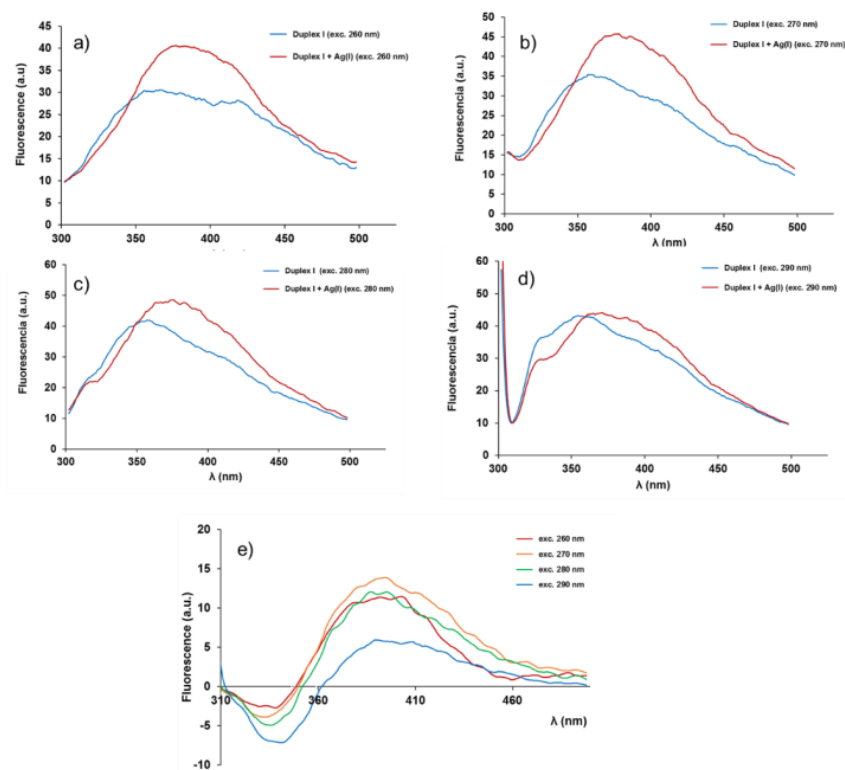
**Figure 6.30.** Fluorescence spectra of duplex **III**, and the corresponding single stranded sequences ODN3 and ODN4, in presence and absence of  $\text{Ag}^+$  ions (red and blue line, respectively). Experimental conditions: 2 $\mu\text{M}$  of duplex (or ODN), 30 $\mu\text{M}$   $\text{Ag}^+$ , 100mM  $\text{NaClO}_4$ . Excitation wavelength: 280nm.

A correlation between the changes observed in fluorescence and ligand-to-metal or metal-to-ligand charge transfers processes (LMCT and MLCT) can be excluded since the fluorescence emission decreases for single stranded sequences ODN3 and ODN4 in presence of  $\text{Ag}^+$ . Therefore, the



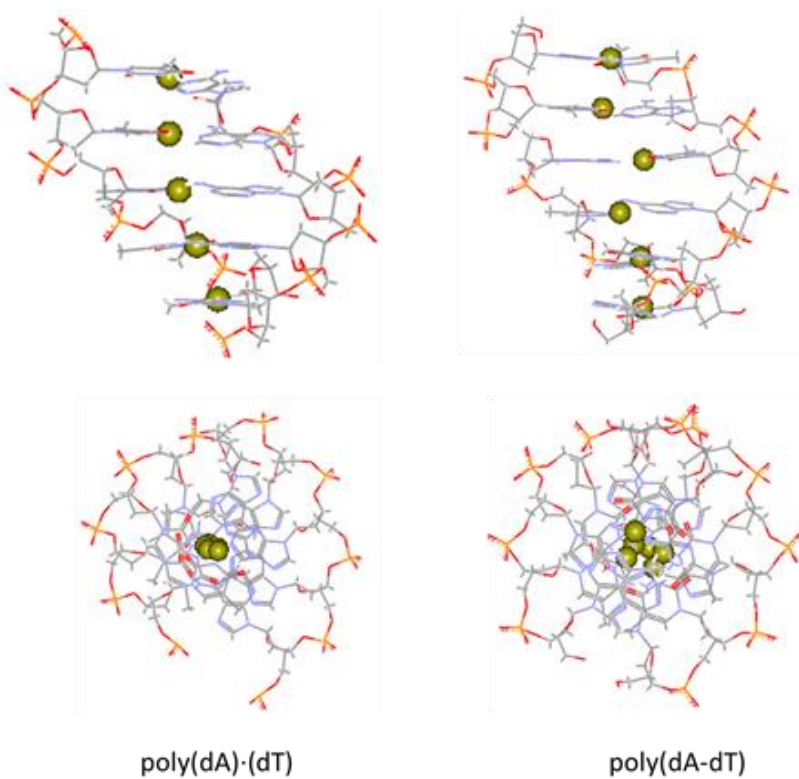
fluorescence emission can be related to the presence of argentophilic interactions. The fact that duplex **III** gives rise to more intense fluorescence emission than duplex **IV**, in presence of the same amount of  $\text{Ag}^+$  ions, can be owed to the organization of the  $\text{Ag}^+$  ions inside the duplexes.

In order to discard the presence of possible artifact or dispersions events, the fluorescence spectra for **III** and **IV**, in presence of 1 equivalent of  $\text{Ag}^+$ , were also registered upon excitation at different wavelengths 260-290nm, giving rise to the same fluorescence band in the 350-450nm region (**Figure 6.31**).

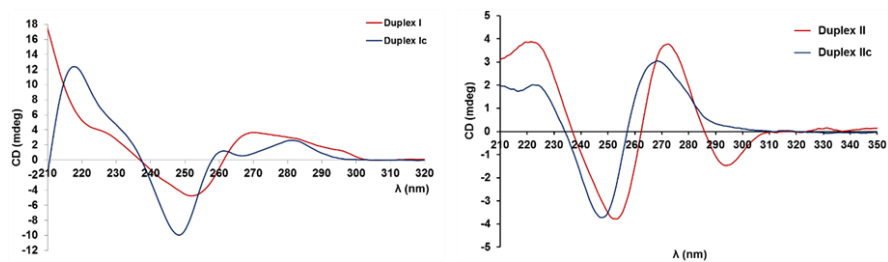


**Figure 6.31.** Fluorescence spectra of duplex **III**, upon excitation light at different wavelength a) 260nm, b) 270nm, c) 280nm, d) 290nm and e) a comparative spectra for all of them, in presence and absence of 1 equivalent of  $\text{Ag}^+$  ions (red and blue line, respectively). Experimental conditions: 2uM of duplex, 30uM  $\text{Ag}^+$ , 100mM  $\text{NaClO}_4$ .

Although our results have been obtained in solution, we have explored the X-Ray structure of natural poly(A)·(T) [19] and poly(A-T) [20] tracts, which contains similar sequence as **IIIc** and **IVc**, in an attempt to evaluate the influence of the duplexes conformation on the organization of silver(I) ions inside duplex **III** and **IV** (**Figure 6.32**). The B-form conformation of duplex **IIIc** and **IVc** are comparable to those seen for duplex **III** and **IV**, since their stacking and Watson-Crick pairing pattern are analogous. CD spectra comparison shows that in all cases, the duplexes display the same Cotton effects, which agree with a B-form conformation, despite some changes in the intensity and a hypsochromic shift observed for the CD curves of canonical duplexes **IIIc** and **IVc** (**Figure 6.33**). Therefore, the structures of poly(A)·(T) and poly(A-T) tracts can be taken as a reliable model for duplexes **III** and **IV**, respectively. A close look to these structures revealed that in poly(A)·(T) the thymine imino protons are stacked one on top of the other and form an helical axis that runs through the center of the base pairs. The interplanar H to H distances are less than 3.4 Å. Alternatively, in the case of poly(A-T) a zig-zag arrangement chain is observed for the imino protons, with larger H to H distances around 3.6 Å. Therefore, in duplex **III** the replacement of imino proton by Ag<sup>+</sup> ions may lead to a silver nanowire with Ag-Ag distances below 3.4 Å, and supported by the DNA structure. However, in duplex **IV** the distance between adjacent Ag<sup>+</sup> would be slightly larger and weaken Ag-Ag interactions.



**Fig 6.32.** X-Ray structure of poly(A):(T) and poly(A-T) tracts. In yellow balls are represented the thymidine imino protons that would be replaced by  $\text{Ag}^+$  ions [19].



**Figure 6.33.** CD spectra comparison for duplexes **III** and **IIIc**, and **IV** and **IVc**. Experimental conditions: 2 $\mu\text{M}$  of duplex, 100mM  $\text{NaClO}_4$  and 5mM MOPS buffer pH 6.8.

These structural facts completely agree with the formation of supported argentophilic interactions in **III** and **IV**, in presence of 1 equivalent of  $\text{Ag}^+$  ions, and clearly demonstrate the influence of the DNA conformation on them. Actually, the more intense fluorescence seen for **III** can be related to the difference in argentophilicity, since it affects the relative emission intensities. The results are also in agreement with the absence of fluorescence observed for control experiments, either using canonical duplexes (**IIIc**, **IVc**) or single stranded sequences (ODN3, ODN4), since the formation of contiguous Watson-Crick  $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$  base pairs are not preferred in these sequences. Thus, the overall DNA-conformation can influence the arrangement of  $\text{Ag}^+$  ions inside the duplex, and it can be modulated to facilitate or hinder metal-metal interactions.

Nevertheless, it should be noted that although the results point towards the formation of Ag-Ag interactions responsible for fluorescence, these results are preliminary and a deeper studies using with different sequences and conditions are necessary to confirm these outcome. We are currently working on testing the formation of Ag-Ag interactions in other sequences as well as performing more comprehensive fluorescence studies. Likewise, the fluorescence studies using oligonucleotides that contain  $^{7\text{C}}\text{G-Ag}^+\text{-C}$  base pairs are also being carried out at the moment.

## 6.5. Bibliography

- [1] Hong, H., Zhang, F., Liu, Y. Yan, H., *Chem. Rev.* **2017**, *117* (20), 12584–12640
- [2] Santamaría-Díaz, N., Méndez-Arriaga, J. M., Salas, J. M., Galindo, M. A., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 6170–6174
- [3] Zhan, S.Z., Song, H.Q., Guo, L.J., Sun, R.W.Y., Li, D., *Eur J. Inorg. Chem.*, **2017**, DOI:10.1002/ejic.201700662
- [4] Xue-Qian, W., Guo-Xuan, W., Ya-Pan, W., Wen-Wen, D., Jun, Z., Dong-Shen, L., *J. Solid. State Chem.* **2016**, *242*, 243-247
- [5] Näther, C., Beck, A., *Acta Crystallogr. Sect. E.* **2004**, *60*, m1678
- [6] Santamaría-Díaz, N. Tesis Doctoral: *Hilos moleculares basados en híbridos de oligonucleótidos y metales de transición*. Universidad de Granada, **2016**
- [7] Kypr, J., Kejnovská, I., Renciuik, D., Vorlícková, M., *Nucleic acids Res.*, **2009**, *37*, 1713-1715
- [8] Vorlícková, M., Sági, J., *Nucleic acids Res.* **1991**, *19*, 2343–2347
- [9] Seela, F., Yang, H., Zhao, H., Leonard, P., Guo, X., *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 5529-5540.
- [10] Yang, H., Seela, F., *Chem. Eur. J.* **2016**, *22*, 13336-13346.
- [11] Nakano, S.I., Wu, L., Oka, H., Karimata, H.T., Kirihata, T., Sato, Y., Fujii, S., Sakai, H., Kuwahara, M., Sawai, H., Sugiomo, N., *Molecular Biosystems* **2008**, *4*, 579-
- [12] Liu, H., Shen, F., Haruehanroengra, P., Yao, Q., Cheng, Y., Chen, Y., Yang, C., Zhang, J., Wu, B., Luo, Q., Cui, R., Li, J., Ma, J., Sheng, J., Gan, J., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 9430–9434
- [13] Swasey, S.M., Gwinn, E.G., *New. J. Phys.* **2016**, *18*, 045008
- [14] Ono, A., Cao, S., Togashi, H., Tashiro, M., Fujimoto, T., Machinami, T., Oda, T., Miyake, Y., Okamoto, I., Tanaka, Y., *Chem. Commun.* **2008**, 4825–4827
- [15] Kondo, J., Tada, Y., Dairaku, T., Hattori, Y., Saneyoshi, H., Ono, A., Tanaka, Y., *Nature Chemistry* **2017**, *9*, 956-960
- [16] Swasey, S. M., Leal, L.E., López-Acevedo, O., Pavlovich, J., Gwinn, E.G., *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 10163
- [17] Xiao-Chun H., Ji Z., Ya-Dong Y., Fang-Fang L., Bao-Yu L., Gang W., *Chem. Commun.*, **2014**, *50*, 9000
- [18] Vayá, I., Gustavsson, T., Miannay, F.A., Douki, T., Markovitsi, D., *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 11834
- [19] Radha, A., Chandrasekaran, R., Park, H.S., *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **1995**, *51*, 10257
- [20] Yuan, H., Quintana, J., Dickerson, R.E., *Biochemistry*, **1992**, *31*, 8009



# CAPÍTULO 7

Additional work and  
future perspectives



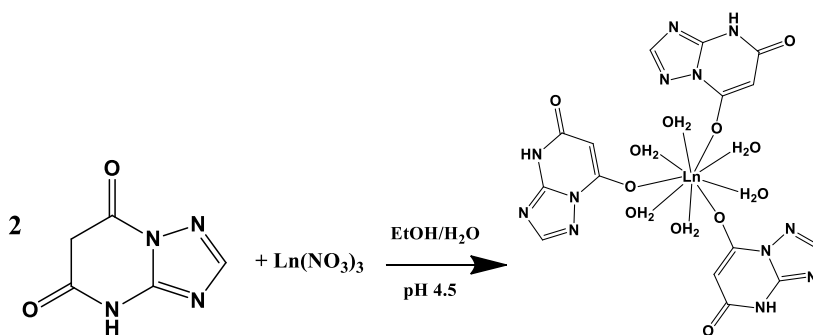


Most part of the work developed during the elaboration of this Doctoral Thesis is collected by chapters along the same. However, additional works have been carried out, not included in the main text for not overextending its content, but they are summarized below with future perspectives.

## 7.1. Additional work with 1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives

### 7.1.1. $\text{Ln}(\text{HtpO}_2)_3(\text{H}_2\text{O})_6$ series

The synthesis of these series of lanthanide complexes with general formula  $[\text{Ln}(\text{HtpO}_2)_3(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$  (being  $\text{Ln} = \text{La}, \text{Nd}, \text{Eu}, \text{Gd}, \text{Tb}, \text{Dy}, \text{Er}$  and  $\text{Yb}$ ), as in the analogous case, was carried out by mixing of two solutions, one of **HftpO** in hot EtOH (2mmol, 0.424g), and another of the corresponding lanthanide nitrate (1mmol) in water. The pH was basified to 4.5 with 0.1M NaOH to precipitate the solid product immediately (**Scheme 7.1**). These complexes have been characterized spectroscopically by IR, powder XRD and thermal techniques such as TG and DSC.



**Scheme 7.1.** Synthesis process of complex series with formula  $[\text{Ln}(\text{HtpO}_2)_3(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot n\text{H}_2\text{O}$

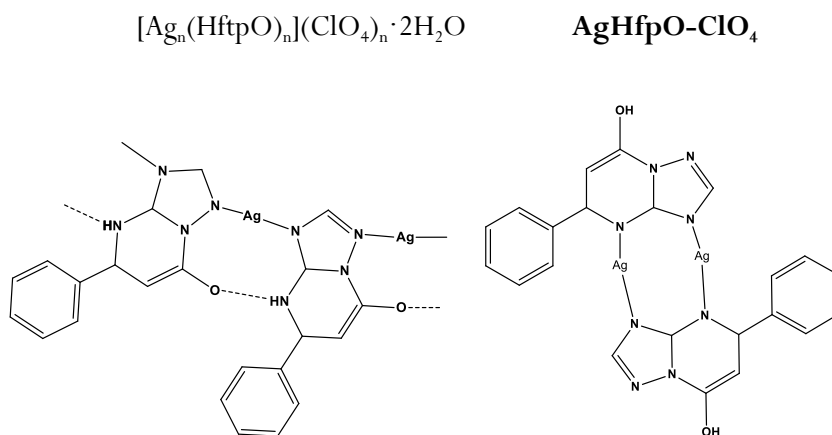
During the search for monocrystals suitable for XRD, a modification in the synthesis method was introduced by changing the solvent, using MeOH instead of EtOH. Thus, a new series of complexes with a much higher solubility were obtained, in which it seems that one of the ligands **H<sub>2</sub>tpO<sub>2</sub>** is replaced by an OH- group in the structure, giving rise to the series **[Ln(HtpO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>(OH)(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]**. These complexes are still in the process of characterization and they are good candidates to study their antiparasitic activity due to their good solubility. This synthesis method will be applied to the **HftpO** lanthanide complexes too.

### 7.1.2. 7-atp, dmtp and HmtpO complexes

Several **7atp**, **dmtp** and **HmtpO** complexes were synthesized with the aim of testing their antiparasitic activity, following up the series started with Cu(II), Co (II), Ni (II) and Zn (II). The formulas and abbreviations are listed below. All the mentioned complexes were characterized with spectroscopic and thermal techniques and its antiparasitic activity is still being carried out.

$[\text{Cu}_2\text{Cl}_4(\text{dmtp})_4](\text{H}_2\text{O})_2$	<b>Cudmtp-Cl</b>
$[\text{Cu}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_2$	<b>Cudmtp-NO<sub>3</sub></b>
$[\text{Co}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	<b>Codmtp-Cl</b>
$[\text{Co}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{NO}_3)_2$	<b>Codmtp-NO<sub>3</sub></b>
$[\text{Ni}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	<b>Nidmtp-Cl</b>
$[\text{Ni}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{NO}_3)_2$	<b>Nidmtp-NO<sub>3</sub></b>
$[\text{ZnCl}_2(\text{dmtp})_2]$	<b>Zndmtp-Cl</b>
$[\text{Zn}(\text{dmtp})_2(\text{H}_2\text{O})_4](\text{NO}_3)_2$	<b>Zndmtp-NO<sub>3</sub></b>
$\text{Cu}(\text{HmtpO})(\text{mtpO})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})_3$	<b>CuHmtpO-NO<sub>3</sub></b>
$[\text{Zn}(\text{7atp})(\text{H}_2\text{O})_5](\text{7atp})(\text{SO}_4)$	<b>Zn7atp-SO<sub>4</sub></b>

Also, novel Ag(I) complexes using **HftpO** as ligand were synthesized and characterized. Unfortunately, no crystals suitable for XRD were obtained, so the crystal structure is not described yet. But, based on the previous studies of Ag(I) complexes [1], plus the E.A. and IR results, we can predict that the most probable structures for **HftpO** silver complexes are the ones show in **Scheme 6.2.**, with the following formula:



**Scheme 7.2.** Theoretical conformations of **AgHftpO-ClO<sub>4</sub>** silver complex. Monomer (left) and dimer (right). The ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> anions which balance the charge are omitted for clarity.

Anal. Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>Ag: C, 30.19; H, 2.30; N, 12.81. Found: C, 29.82; H, 2.37; N, 13.11%. FT-IR: 1626cm<sup>-1</sup> (vs), 1563cm<sup>-1</sup> (vs), 1501cm<sup>-1</sup> (s), 1128cm<sup>-1</sup> (vs), 1030cm<sup>-1</sup> (vs). Yield 67%

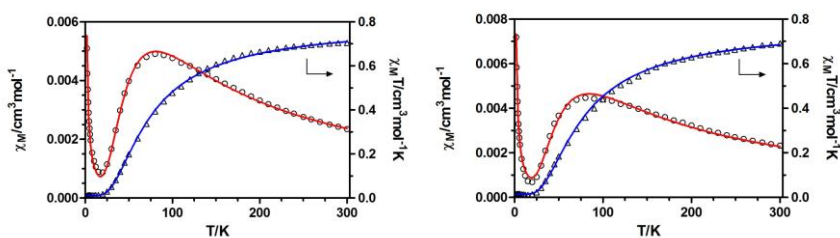
This proposed formula can belong to a monomeric unit or to a dimeric unit, because the two cases were reported with other triazolopyrimidine derivatives and the E.A. satisfies both possibilities. The binding of Ag(I) ions can be via N1-N3 of two different ligands in the monomeric option, or via N3,N4 bridge in the dimeric one. There is also the possibility of obtaining both of them, depending on the tautomeric form and conditions of the **HftpO**. The search to obtain the crystalline structure continues at the moment.

### 7.1.3. Antitumoural activity

Some of the triazolopyrimidinic ligands discussed in this paper, as well as several of their lanthanide complexes, have been tested against the HT29 (colon cancer) tumour line, bringing results that allow us to continue in that research line, analysing the potential antitumor activity of this type of ligands and their metal complexes.

### 7.1.4. Magnetic properties

Magnetic properties of triazolopyrimidine complexes were studied in bibliography to complete their characterization [2]. Especially, Ln complexes can display single molecule magnet behaviour (SMM), which can be an excellent application for these complexes after the impossibility of carrying out the biological assays due to their insolubility in biocompatible solvents. **Figure 7.1.** shows the molar magnetic susceptibility and  $\chi_m T$  of both **7atp** complexes discussed in Chapter 4, revealing the existence of moderate antiferromagnetic interactions between the copper ions, with J values of  $-91.2$  and  $-96.1$   $\text{cm}^{-1}$ . The rest of measurements are being carried out at the moment.

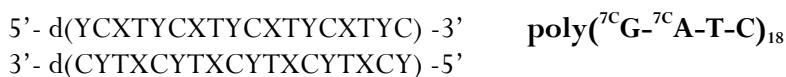


**Figure 7.1.** Plot of molar magnetic susceptibility ( $\circ$ ) and  $\chi_m T$  ( $\Delta$ ) for both Cu(II) complexes discussed in Chapter 4 as a function of temperature. The solid lines represent the best fit to the data.

## 7.2. Additional work with novel systems metallo-DNA

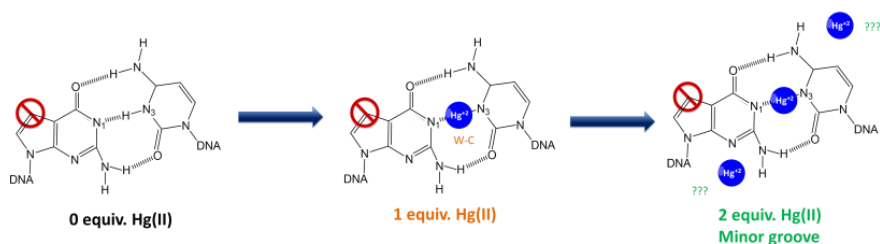
### 7.2.1. Ag:poly(<sup>7C</sup>G-<sup>7C</sup>A-T-C) interaction studies

As proof of concept and in order to demonstrate the methodology some initial experiments were performed on DNA duplex containing both <sup>7C</sup>A-T and <sup>7C</sup>G-C base pairs. Thermal denaturalization, UV titration and CD titration are being carried out at the moment, using the described methodologies [3]. The palindromic sequence that is already being studied is show below:



### 7.2.2. Hg(II) interactions

Besides the studies changing the programed sequence of duplexes, new experiments using different metal ions were carried out. Specifically, those which were performed with Hg(II) in poly(<sup>7C</sup>G-C) duplexes lead to the proposed coordination mode exposed in **Figure 6.2**. The T<sub>m</sub>, UV and CD titrations show a tendency to a first stabilization at 1 equivalent, followed by a second stage which suggests the introduction of a second Hg(II) ion.



**Figure 7.2:** Proposed linear Hg(II) coordination for the base pair.

### 7.2.3. NMR duplex studies

During the period in the Slovenian NMR Center (National Institute of Chemistry, Ljubljana), several NMR titrations of the DNA duplexes discussed in Chapter 6 were performed. This collaborative work is still being carried out between both institutions, looking for new results that brings knowledge about the binding mode of the whole DNA duplex mediated by Ag(I), but the very preliminary results that we have at the moment of the elaboration of this manuscript were insufficient to discuss.

### 7.3. Scientific publications

Some of the results compiled in the present Doctoral Thesis have been published in high impact scientific journals:

4. *Strategies for overcoming tropical disease by ruthenium complexes with purine analog: Application against Leishmania spp. and Trypanosoma cruzi*, M. Fandzloch, **J.M. Méndez-Arriaga**, M. Sánchez-Moreno, A. Wojtczak, J. Jezierska, J. Sitkowski, J.M. Salas, I. Łakomska, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *176*, 144-155

3. *Antiparasitic activity against trypanosomatid diseases and novel metal complexes derived from the first time characterized 5-phenyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidi-7(4H)-one*, **J.M. Méndez-Arriaga**, G.M. Esteban-Parra, M.J. Juárez, A. Rodríguez-Diéguez, M. Sánchez-Moreno, J. Isac-García, J.M. Salas, *J. Inorg. Biochem.* **2017**, *175*, 217-224

2. *Leishmanicidal and Trypanocidal Activity of Metal Complexes with 1,2,4-Triazolo[1,5-a]pyrimidines: Insights on their Therapeutic Potential against Leishmaniasis and Chagas Disease*, J.M. Salas, A.B. Caballero, G.M. Esteban-Parra, **J.M. Méndez-Arriaga**, *Curr. Med. Chem.* **2017**, *24(25)*, 2796-2806

1. *Highly Stable Double-Stranded DNA Containing Sequential Silver(I)-Mediated 7-Deazaadenine/Thymine Watson–Crick Base Pairs*, N. Santamaría-Díaz, **J.M. Méndez-Arriaga**, J.M. Salas, M.A. Galindo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6170-6174

#### 7.4. Contributions in national and international conferences

On the other hand, the results obtained have also been presented in different meetings and congresses both national and international, being all the original communications. They are listed in reverse chronological order below:

14. *2º Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos (II QuimBioQuim)*. Madrid (Spain), 4-5 October 2017. **Oral communication** “Complejos triazolopirimidínicos: Versatilidad de propiedades y uso como agentes antiparasitarios”

13. *X Reunión científica de Bioinorgánica (BioBilbao2017)*. Bilbo (Spain), 9-12 July 2017. Co-author of a poster “*Síntesis, caracterización estructural y actividad leishmanicida de nuevos complejos metálicos de plata con derivados triazolopirimidínicos*”

12. *14<sup>th</sup> International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC14)*. Toulouse (France), 7-10 June 2017. Poster “*7-deazapurine ligands: towards mercury-mediated Watson-Crick base pairs in double-stranded DNA*”

11. *XIII Simposio de Investigadores Jóvenes RSEQ-Sigma Aldrich (XIII SIJ)*. Logroño (Spain), 8-11 November 2016. **Oral communication** “*Sistemas metalo-ADN constituidos por pares de bases metalizados de tipo Watson–Crick*”

10. *1º Congreso de Jóvenes Químicos y Bioquímicos Terapéuticos (I QuimBioQuim)*. Granada (Spain), 3-4 October 2016. **Oral communication** “*Síntesis, caracterización estructural y actividad leishmanicida de complejos lantánidos derivados de triazolopirimidinas*”

9. *6th EuCheMS Chemistry Congress*. Sevilla (Spain), 11-15 September 2016. **Oral communication** “*7-deazapurine ligands: Towards metal-mediated Watson-Crick base pairs in double-stranded DNA*”

8. 13<sup>th</sup> *European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBic13)*. Budapest (Hungary), 28 August-1 September 2016. Two posters “*Silver(I) mediated 7-deazaadenine/thymine Watson-Crick bases pairs; Synthesis, Characterization and fluorescence*” y “*Biological evaluation of ruthenium complexes with 5,6,7-trimethyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidine as new prodrugs for tropical diseases*”

7. *International Conference on Global Challenges in Neglected Tropical Diseases*. León (Spain), 13-15 July 2016. Poster “*New advances in the fight against neglected disease. The use of triazolopyrimidine metal complexes as antiparasitic agents to leishmaniasis and Chagas disease*”

6. 17<sup>a</sup> *Reunión Científica Plenaria de Química Inorgánica y 11<sup>a</sup> Reunión Científica Plenaria de Química del Estado Sólido (QIES 2016)*. Málaga (Spain), 19-22 June 2016. **Oral communication** “*Nuevos complejos metálicos de dntp. Estudios estructurales y actividad antiparasitaria*”

5. *I Jornadas de Investigadores en Formación: Fomentando la Interdisciplinariedad (I JIFFI)*. Granada (Spain), 18-20 May 2016. **Oral communication** “*Caracterización estructural y actividad leishmanicida de complejos metálicos con derivados triazolopirimidínicos*”

4. *XII Simposio de Investigadores Jóvenes RSEQ-Sigma Aldrich (XII SIJ)*. Barcelona (Spain), 3-6 November 2015. Poster “*Síntesis y caracterización de nuevos complejos metálicos de derivados triazolopirimidínicos con potencial actividad leishmanicida*”

3. *XXXV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química*. A Coruña (Spain), 19-23 July 2015. Poster “*Complejos de Cu(II) con amino-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina con potencial actividad antiparasitaria*”.

2. *IX Reunión científica de Bioinorgánica (BioCádiz2015)*. Cádiz (Spain), 14-17 June 2015. Two posters “*Síntesis, caracterización estructural y actividad antiparasitaria de complejos de 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina con lantánidos*” and “*Caracterización estructural y actividad frente a la leishmaniasis de complejos metálicos que contienen como ligando la 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina*”.

1. 16<sup>a</sup> *Reunión Científica Plenaria de Química Inorgánica y 10<sup>a</sup> Reunión Científica Plenaria de Química del Estado Sólido (QIES 2014)*. Almería (Spain), 15-18 June 2014. Poster “*Síntesis, caracterización estructural y capacidad complejante de la 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina*”.



Besides, during the three months stay abroad necessary to obtain the European Thesis Mention, part of the results obtained were disseminated in Seminar format, held in Ljubljana on March 13, 2017 in the Slovenian NMR Center (National Institute of Chemistry); as well as a brief lecture at “Reunión de la Red de iones metálicos en sistemas biológicos”, held in Madrid on March 11, 2016 at the Universidad Complutense de Madrid.

## 7.5. Bibliography

[1] a) A. B. Caballero, A. Rodríguez-Diéguez, I. Vidal, J. A. Dobado, Ó. Castillo, L. Lezama, J. M. Salas, *Dalton Trans.* **2012**, 41(6), 1755–1764; b) A. B. Caballero, A. Rodríguez-Diéguez, M. Quirós, L. Lezama, J. M. Salas. *Inorg Chim Acta*, **2011**, 378(1), 194–201; c) G. A. van Albada, I. Mutikainen, U. Turpeinen, J. Reedijk, *Polyhedron* **2006**, 25, 3278-3284; (d) J. Cepeda, O. Castillo, J. P. García-Terán, A. Luque, S. Pérez-Yáñez, P. Román, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2344-2353; (e) D. Sonnenfroh, R. W. Kreilick, *Inorg. Chem.* **1980**, 19, 1259-1262

[2] Abul Haj, M.; Quirós, M.; Salas, J.M.; Faure R. *Dalton Trans.*, **2001**, 11, 1798-1801

[3] N. Santamaría-Díaz, J. M. Méndez-Arriaga, J. M. Salas, M. A. Galindo, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 6170 -6174

## Conclusiones



A lo largo de la presente Tesis Doctoral, se han expuesto y discutido los resultados obtenidos a partir del estudio de la interacción de iones metálicos con un nuevo ligando triazolopirimidínico, el **HftpO** o 5-fenil-7-oxo-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina. Este nuevo ligando se ha sintetizado, caracterizado estructuralmente y ensayado su actividad antiparasitaria frente a distintas cepas de *leishmania spp.* y *Trypanosoma cruzi* para evaluar su efecto biológico como agente antiparasitario. Así mismo, se han obtenido trece nuevos complejos metálicos basados en este ligando, 5 de la primera serie de transición (serie  $[M(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  y el complejo  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) y 8 con iones lantánidos (serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$ ).

El uso de ligandos triazolopirimidínicos anteriormente caracterizados ha permitido obtener otras series de nuevos complejos con potencial actividad biológica. El estudio de la mayor parte de ellos no se ha incluido en el texto principal en beneficio de la fluidez del mismo, pero se recogen a modo de ejemplo los obtenidos con el **7atp**.

Por otra parte, el estudio de la interacción de los iones  $\text{Ag(I)}$  con nucleobases modificadas, en este caso 7-deazaadenina, ha permitido obtener tres nuevos complejos (**AgdA-1**, **AgdA-2** y **AgdA-3**), así como desarrollar un exhaustivo trabajo de caracterización de diversas series de oligonucleótidos que contienen 7-deazaadenina o 7-deazaguanina en su estructura, explorando incluso de manera preliminar una de las potenciales aplicaciones de este tipo de nanomateriales basados en ADN como es la fluorescencia.

Por tanto, del trabajo de investigación recogido en esta Tesis Doctoral, se han extraído las conclusiones que se enumeran a continuación:

- 1) Se ha sintetizado por primera vez y caracterizado mediante distintas técnicas instrumentales (IR, UV-Vis, TG y DSC, DRX en monocristal, RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas) el ligando triazolopirimidínico 7-hidroxi-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**HftpO**).

- 2) Se han sintetizado y caracterizado dos ligandos clorados derivados del **HftpO** y **HmtpO**. de los que sólo se ha podido determinar la estructura de uno de ellos, la 7-cloro-5-metil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**mtpCl**) continuando en la actualidad con el proceso de caracterización de la 7-cloro-5-fenil-1,2,4-triazolo[1,5-a]pirimidina (**ftpCl**).
- 3) Se han sintetizado y caracterizado trece nuevos complejos que contienen el ligando triazolopirimidínico **HftpO**, empleando para ello metales tanto de la primera serie de transición (serie de fórmula general  $[M(\text{ftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_4]$  y el complejo de cobre  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) como iones lantánidos (serie  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$ ).
- 4) La resolución estructural de los complejos obtenidos a partir del **HftpO** demuestran que el tipo de ión metálico influye en el modo de coordinación de manera determinante. Para los complejos de la primera serie de transición se obtienen complejos en los que el ligando se coordina a través de N3; mientras que para el caso de la serie de los iones lantánidos trivalentes la interacción del ligando triazolopirimidínico **HftpO** transcurre aparentemente a través de su átomo de oxígeno. Este hecho se justifica por la gran afinidad de este tipo de iones por los átomos de oxígeno. Como consecuencia, se originan especies mononucleares isoestructurales neutras, en las cuales el ligando **HftpO** se encuentra desprotonado.
- 5) Se han sintetizado y caracterizado espectroscópicamente dos nuevos complejos dinucleares de Cu(II) basados en el ligando triazolopirimidínico **7atp**, cuyas fórmulas son  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Ambos complejos presentan un entorno coordinativo de molino y han mostrado un moderado carácter antiferromagnético, además de potencial actividad antiparasitaria.
- 6) Se han realizado estudios antiparasitarios *in vitro* de los ligandos triazolopirimidínicos de los que no se tenían datos para determinadas cepas, así como para todos los casos con el **HftpO** (*Leishmania infantum*, *Leishmania braziliensis* y *Leishmania donovani*, y *Trypanosoma cruzi*). Los resultados obtenidos muestran una extraordinaria eficacia de este nuevo ligando en comparación con los derivados triazolopirimidínicos previamente estudiados por nuestro grupo de

investigación, así como con los fármacos de referencia Glucantime y Benznidazol.

- 7) Se ha evaluado la eficacia antiparasitaria de los derivados clorados **mtpCl** y **ftpCl** que, si bien mostraban una actividad antiproliferativa muy alta frente a las formas extracelulares de los parásitos, presentan alta toxicidad frente a las células hospedadoras de la infección, por lo que no se continuó con su estudio.
- 8) Se trató de ensayar así mismo la actividad antiparasitaria de los trece complejos metálicos del **HftpO** descritos en esta Memoria, pero resultaron ser altamente insolubles en agua, por lo que fue imposible realizar los test antiparasitarios programados. No obstante, se ensayaron los dos complejos metálicos de **7atp**. Los resultados de estos ensayos muestran que ambos complejos presentan una actividad biológica superior a la de los ligandos aislados, confirmándose el efecto sinérgico que se produce por la inclusión de centros metálicos en la estructura.
- 9) Se han obtenido tres nuevos complejos derivados de la 7-deazaadenina (**AgdA-1**, **AgdA-2** y **AgdA-3**) en los que, a pesar de presentar diferente estequiometría  $\text{Ag(I)}:^{7\text{C}}\text{A}$  (1:1, 1:2 y 1:3), en todos los casos se demuestra la preferencia coordinante de este tipo de ligandos por la posición N1 al interactuar con los centros metálicos.
- 10) Se ha estudiado espectroscópicamente la formación de pares de bases contiguos  $^{7\text{C}}\text{G-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$  de tipo Watson-Crick en secuencias palindrómicas que contienen la nucleobase nativa C y la modificada 7-deazaguanina. También se han realizado controles utilizando las oligonucleótidos con secuencias análogas que contienen las nucleobases nativas G y C. Los resultados obtenidos indican que los iones  $\text{Ag(I)}$  interactúan en posiciones Watson-Crick para formar pares de bases de tipo  $^{7\text{C}}\text{G-Ag}^{\text{I}}\text{-C}$ , estabilizando térmicamente la estructura de doble hélice sin alterar la conformación de tipo B del oligonucleótido de partida. Por el contrario, los experimentos realizados con los oligonucleótidos control ponen de manifiesto que los iones  $\text{Ag(I)}$  interactúan en diferentes posiciones, presumiblemente en posición N7 de la guanina, dando lugar a estructuras más complejas.

- 11) Se realizaron estudios de interacción de iones  $\text{Ag(I)}$  frente a oligonucleótidos con secuencias homogéneas de  ${}^7\text{C A}$  y  $\text{T}$ , respectivamente. Los resultados demuestran inequívocamente la formación del par de bases mediado por plata (I) de tipo  ${}^7\text{C A-Ag-T}$ .
- 12) Se ha estudiado de forma preliminar la fluorescencia en secuencias de ADN con pares de base  ${}^7\text{C A-Ag-T}$ , tanto en oligonucleótidos con secuencias homogéneas como heterogéneas de  ${}^7\text{C A}$  y  $\text{T}$ . Los espectros de fluorescencia registrados sugieren la formación de interacciones argentofílicas entre los iones  $\text{Ag(I)}$  que se encuentran en el interior de oligonucleótidos, especialmente en aquellos con secuencias homogéneas complementarias de  ${}^7\text{C A}$  y  $\text{T}$ . Estudios complementarios están actualmente en curso para confirmar estos resultados.







ANEXOS



## ANEXO I

Triazolopyrimidine complexes with  
antiparasitic activity



**Table 1.** *In vitro* activity of reference drugs against extracellular forms of *Leishmania* spp. (promastigote) and *T. cruzi* (epimastigote) (\*).

Compound	IC <sub>50</sub> (µM)		Toxicity towards J774.2 macrophages IC <sub>50</sub> (µM)		Toxicity towards Vero cells IC <sub>50</sub> (µM)	SI			Ref.	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. peruviana</i>	<i>T. cruzi</i>		<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. peruviana</i>		<i>T. cruzi</i>
Glucantime	18.0±0.6	25.6±1.6	15.33	-	-	0.8	0.6	1	[5]	
Benznidazol	-	-	-	15.2±1.3	13.6±0.9	-	-	-	0.8	[5]

**Table 2.** *In vitro* activity of tp and its metal complexes against extracellular forms of *Leishmania* spp. (promastigote) and *T. cruzi* (epimastigote) (\*).

Compound	IC <sub>50</sub> (µM)			Toxicity towards J774.2 macrophages IC <sub>50</sub> (µM)		Toxicity towards Vero cells IC <sub>50</sub> (µM)	SI			Ref.
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruviana</i>	<i>T. cruzi</i>		<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>	
tp	42.4±3.5	65.4±7.3	20.72	40.6±3.5	66.0±5.5	73.2±6.6	1.6(2)	1.0(1)	1.8(2)	[5]
[Cu <sub>2</sub> (tp) <sub>2</sub> (bpy) <sub>2</sub> ](µ-bpy) <sub>2</sub> (ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	67.1±4.9	63.1±5.7	-	21.9±0.9	76.9±6.8	46.0±3.1	1.1(1)	1.2(2)	2.1(3)	[5]
[Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (phen)(tp) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	-	-	11.06	13.00	77.09	50.19	-	-	3.9(4)	[6]
[Cu(NO <sub>3</sub> )(H <sub>2</sub> O)(phen)(tp)](NO <sub>3</sub> )	-	-	<0.01	<1.00	1.96	<1.00	-	-	1.0(1)	[6]
[Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (tp) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	8.41	17.93	12.35	7.98	-	-	0.4(0)	[6]
[Cu <sub>2</sub> (µ-OH)(H <sub>2</sub> O) <sub>2.5</sub> (tp) <sub>3</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>1.5</sub>	-	-	12.17	10.58	186.61	154.20	-	-	14.6(16)	[6]

**Table 3.** *In vitro* activity of dtmp and its metal complexes against extracellular forms of *Leishmania* spp. (promastigote) and *T. cruzi* (epimastigote) (\*).

Compound	IC <sub>50</sub> (µM)				Toxicity towards J774.2 macrophages IC <sub>50</sub> (µM)	Toxicity towards Vero cells IC <sub>50</sub> (µM)	SI		Ref.
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. peruv</i>	<i>T. cruzi</i>			<i>L. inf.</i>	<i>T. cruzi</i>	
Dtmp	36.7±2.2	72±54	24.6	48.0±2.9	98.7±9.2	101.2±8.1	2.7(3)	1.4(2)	[5]
[Mn(dtmp) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2dtmp·2H <sub>2</sub> O	62.7±7.8	10.0±1.5	-	20.1±3.7	201.4±13.8	148.3±11.6	3.2(4)	20.1(34)	[7]
[Fe(dtmp) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2dtmp·2H <sub>2</sub> O	49.3±14.3	25.5±0.9	-	22.6±3.0	91.0±6.4	78.4±7.5	1.8(2)	3.6(6)	[7]
[Co(dtmp) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2dtmp·2H <sub>2</sub> O	42.9±9.3	43.9±4.8	-	43.2±5.6	755±31	>1000	17.6(22)	17.2(29)	[7]
[Ni(dtmp) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2dtmp·2H <sub>2</sub> O	27.7±3.8	45.1±3.5	-	38.2±9.0	904±63	>1000	32.6(41)	20.0(33)	[7]
[Zn(dtmp) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2dtmp·2H <sub>2</sub> O	36.9±4.1	10.3±1.0	-	25.4±2.3	100.2±15.1	73.7±4.8	1.0(1)	2.8(5)	[7]
[Cu(dtmp) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	97.7±15.4	35.6±3.7	-	19.2±1.1	558.6±9.8	420.3±6.5	15.1(19)	54.2(90)	[7]
[Cu(dtmp) <sub>2</sub> (bpym)(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	37.7±4.1	40.9±2.5	-	47.8±5.0	56.3±4.6	48.7±5.2	1.5(2)	1.4(2)	[5]
[Cu(H <sub>2</sub> O)(phen)(dtmp) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	7.8	11.1	14.1	9.5	-	-	[6]
[Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (en)(dtmp) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	25.3	23.3	30.7	29.0	-	-	[6]

**Table 4.** *In vitro* activity of 7atp and its metal complexes against extracellular forms of *Leishmania* spp. (promastigote) and *T. cruzi* (epimastigote) (\*).

Compound	IC <sub>50</sub> (µM)			Toxicity towards J774.2 macrophages IC <sub>50</sub> (µM)	Toxicity towards Vero cells IC <sub>50</sub> (µM)	SI		Ref.
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>T. cruzi</i>			<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	
7atp	56.4±6.0	61.8±3.3	36.4±1.8	73.2±7.0	66.6±4.4	1.3(1)	1.2(2)	[5]
[Zn <sub>2</sub> (7atp) <sub>4</sub> (µ-bpym)(H <sub>2</sub> O) <sub>4</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·2(7atp)	29.8±2.0	27.5±1.7	65.6±5.2	86.4±6.1	63.5±5.8	2.9(4)	3.1(5)	[5]



**Table 5.** *In vitro* activity of HmtpO and its metal complexes against extracellular forms of *Leishmania* spp. (promastigote) and *T. cruzi* (epimastigote) (\*).

Compound	IC <sub>50</sub> (µM)		Toxicity towards macrophages IC <sub>50</sub> (µM)	Toxicity towards Vero cells IC <sub>50</sub> (µM)	SI		Ref.	
	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>			<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>		
	<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>			<i>T. cruzi</i>	<i>T. cruzi</i>		
HmtpO	41.3±3.4	39.8±3.2	312.4±21.9	232.8±18.7	7.6(10)	7.8(13)	8.3(10)	[8]
[Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (µ-HmtpO) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	20.0	22.1	723.8	579.3	36.2(45)	32.8(55)	21(26)	[9,10]
{[Cu(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> (µ-HmtpO) <sub>2</sub> ](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2HmtpO}·n	24.4	31.5	945.5	295.3	38.8(49)	30.0(50)	12(15)	[9,10]
{[Co(H <sub>2</sub> O) <sub>3</sub> (µ-HmtpO)](ClO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O}·n	29.0	23.5	843.3	316.7	29.1(36)	35.9(60)	10(12)	[9,10]
[La(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	2.8±0.5	5.3±0.1	151.6±6.4	140.8±11.6	54.1(68)	28.6(32)	38.0(42)	[14]
[Nd(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	21.6±2.7	18.4±0.8	30.5±1.6	27.4±1.7	1.4(2)	28.6(48)	1.1(1)	[14]
[Eu(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	17.7±1.5	24.7±2.3	883±24	995±35	49.9(62)	1.7(3)	62.9(70)	[14]
[Gd(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	19.6±1.3	27.8±1.0	33.8±1.4	27.2±2.4	1.7(2)	35.7(60)	1.3(2)	[14]
[Tb(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	26.3±1.7	17.8±2.4	753.4±30.2	986±24	28.6(36)	1.2(2)	55.4(62)	[14]
[Dy(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	19.9±1.6	22.6±1.7	271.5±20.0	230.6±8.8	13.6(17)	42.3(70)	2.5(14)	[14]
[Er(mtpO) <sub>3</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]·9H <sub>2</sub> O	18.5±2.4	22.3±1.7	901.2±21.6	834.5±16.7	48.7(61)	12.0(20)	36.6(41)	[14]

(\* Notes on Tables 1-4: IC<sub>50</sub> is the concentration required to give 50% inhibition, calculated by linear regression analysis from the Kc values at the employed concentrations (1, 10, 25, 50 and 100 µM) after 72 h culture. Average of three or four separate determinations.

Toxicity towards cells is expressed as IC<sub>50</sub>.

SI (Selectivity Index) = IC<sub>50</sub> J774.2 macrophages or Vero cells/IC<sub>50</sub> parasite extracellular forms. In brackets: Number of times that SI of the studied compound is higher than the SI of the reference drug (Glucantime® and Benznidazole® for *Leishmania* spp. and *T. cruzi*, respectively).

## Bibliography

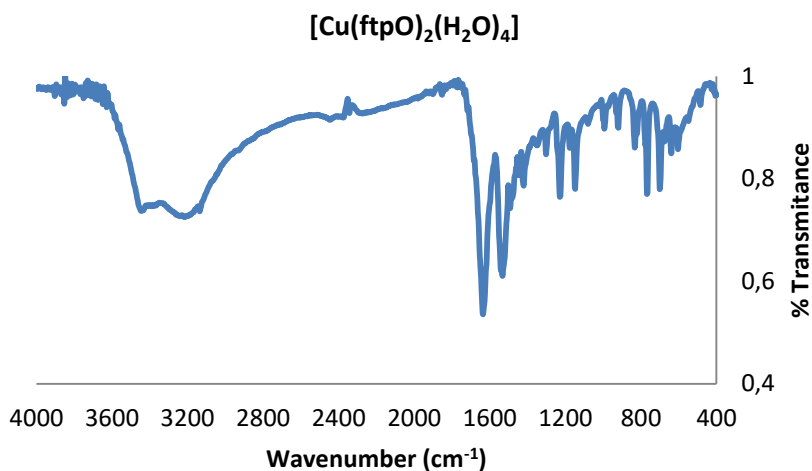
(The numbers of references follow the order proposed in Chapter 4)

- [5] Caballero, A. B.; Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Rodríguez-Diéguez, A.; Quirós, M.; Salas, J. M.; Sánchez-Moreno, M. Structural consequences of the introduction of 2,2'-bipyrimidine as auxiliary ligand in triazolopyrimidine-based transition metal complexes. In vitro antiparasitic activity. *Polyhedron* **2012**, *33*, 137
- [6] Boutaleb-Charki, S.; Marín, C.; Maldonado, C. R.; Rosales, M. J.; Urbano, J.; Gutierrez-Sanchez, R.; Quirós, M.; Salas, J. M.; Sánchez-Moreno, M. Copper (II) complexes of [1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives as potential anti-parasitic agents. *Drug Metab. Lett.* **2009**, *3*, 35
- [7] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Quiros, M.; Salas, J. M.; Huertas, O.; Ramírez-Macías, I.; Olmo, F.; Marín, C.; Chaves-Lemaur, G.; Gutierrez-Sanchez, R.; Sánchez-Moreno, M. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 526
- [8] Méndez-Arriaga, J.M., Esteban-Parra, G.M., Juárez, M.J., Rodríguez-Diéguez, A., Sánchez-Moreno, M., Salas, J.M., *J. Inorg. Biochem.*, **2017**, *175*, 217-224
- [9] Ramirez-Macias, I.; Marín, C.; Salas, J. M.; Caballero, A.; Rosales, M. J.; Villegas, N.; Rodríguez-Diéguez, A.; Barea, E.; Sánchez-Moreno, M. Biological activity of three novel complexes with the ligand 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one against *Leishmania* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* **2011**, *66*, 813
- [10] Caballero, A. B.; Marín, C.; Rodríguez-Diéguez, A.; Ramírez-Macías, I.; Barea, E.; Sánchez-Moreno, M.; Salas, J. M. In vitro and in vivo antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* of three novel 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one-based complexes. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 770
- [11] Caballero, A. B.; Rodríguez-Diéguez, A.; Salas, J. M.; Sánchez-Moreno, M.; Marín, C.; Ramirez-Macias, I.; Santamaria-Diaz, N.; Gutierrez-Sanchez, R. Lanthanide complexes containing 5-methyl-1,2,4-triazolo[1,5-a]pyrimidin-7(4H)-one and their therapeutic potential to fight leishmaniasis and Chagas disease. *J Inorg Biochem.* **2014**, *138*, 39

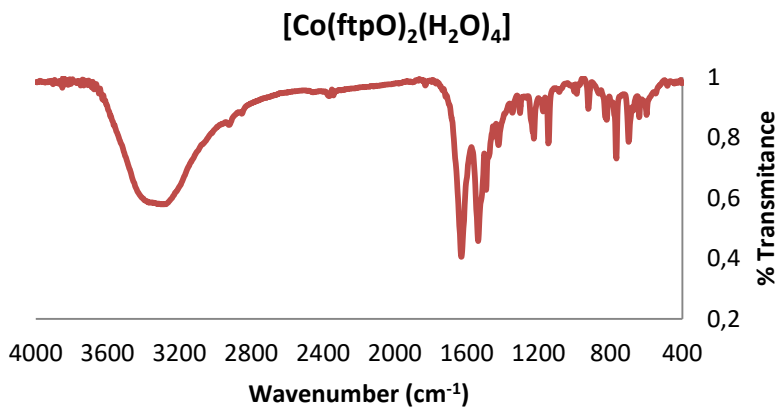
ANEXO II  
Characterization



## 1. IR spectra



**Figure 1.** IR spectra of [Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]



**Figure 2.** IR spectra of [Zn(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

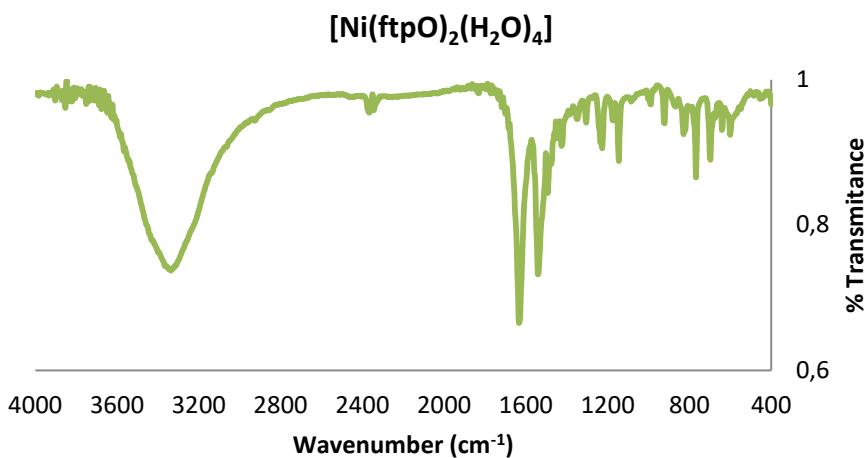


Figure 3. IR spectra of [Ni(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

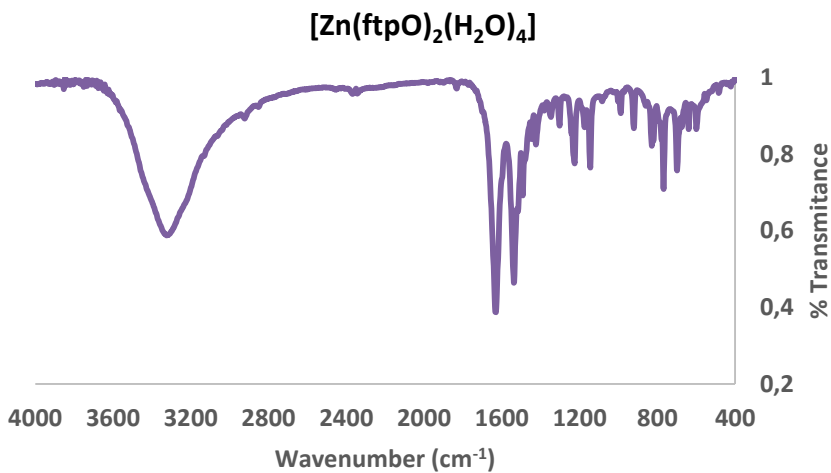


Figure 4. IR spectra of [Zn(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

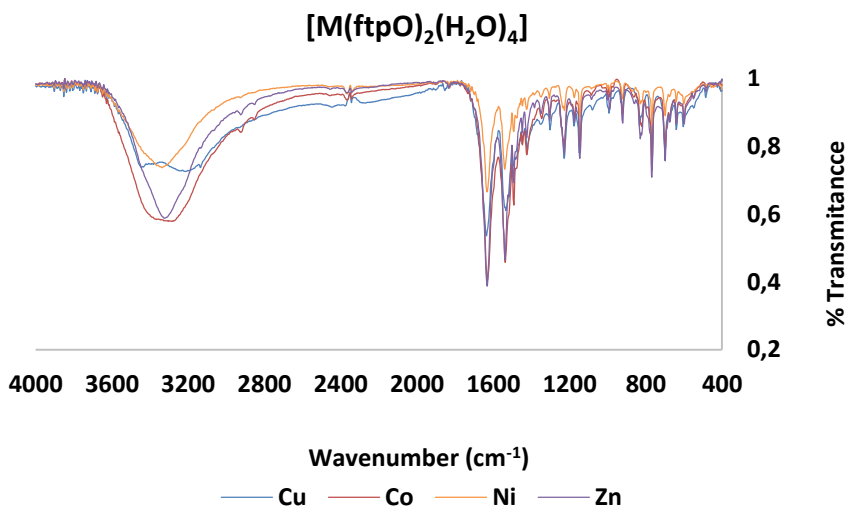


Figure 5. Combined IR spectra of [M(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] series

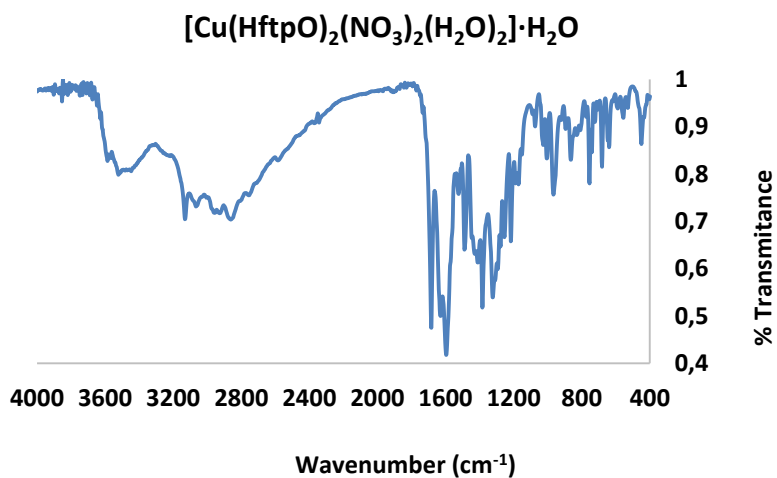


Figure 6. IR spectra of [Cu(HftpO)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]·H<sub>2</sub>O

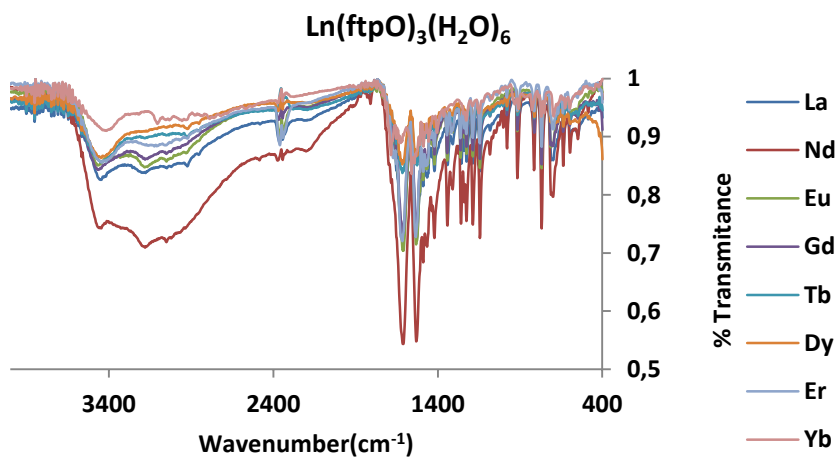


Figure 7. Comparative of IR spectra of  $[\text{Ln}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$  series

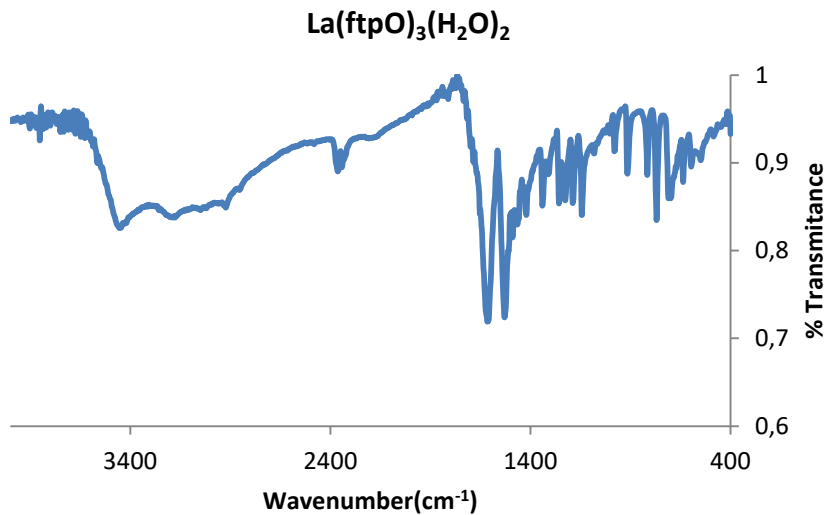
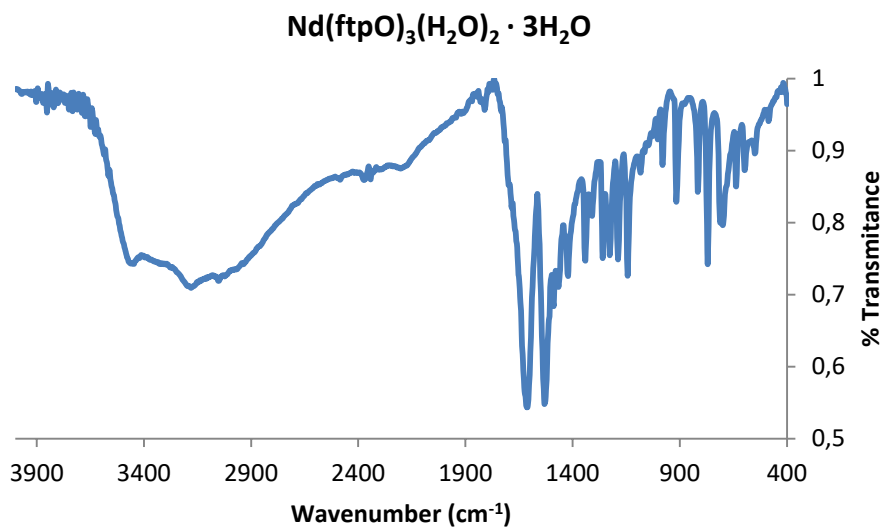
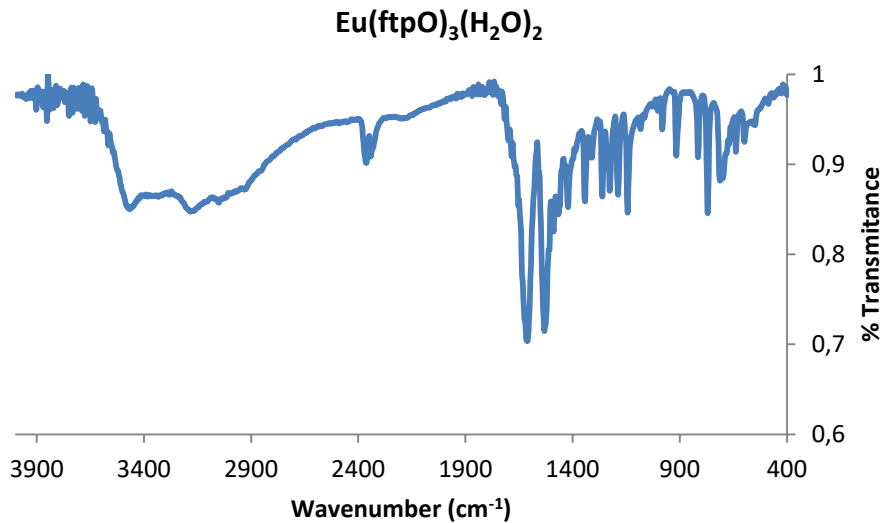


Figure 8. IR spectra of  $[\text{La}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$





**Figure 9.** IR spectra of  $[\text{Nd}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$



**Figure 10.** IR spectra of  $[\text{Eu}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$

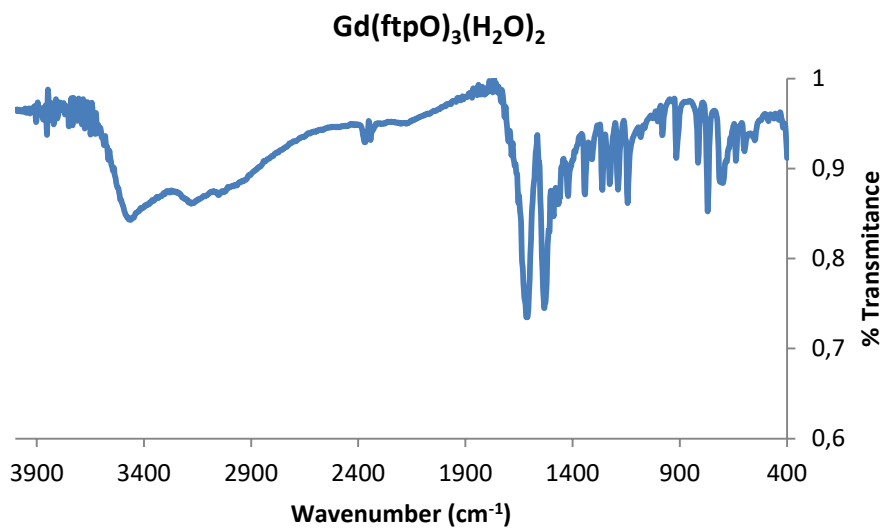


Figure 11. IR spectra of [Gd(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

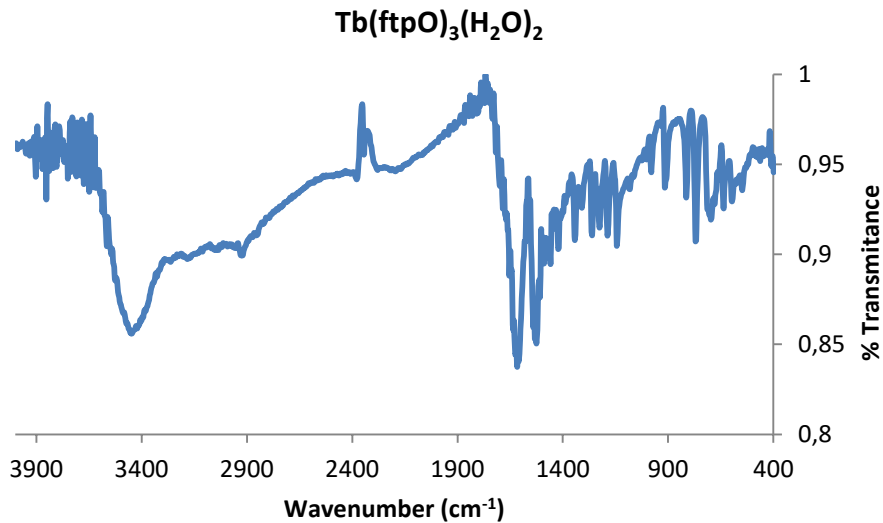
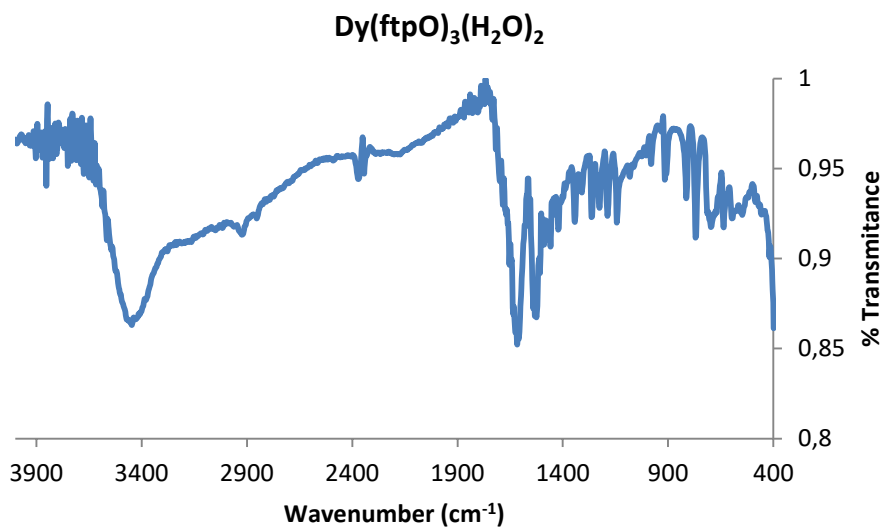
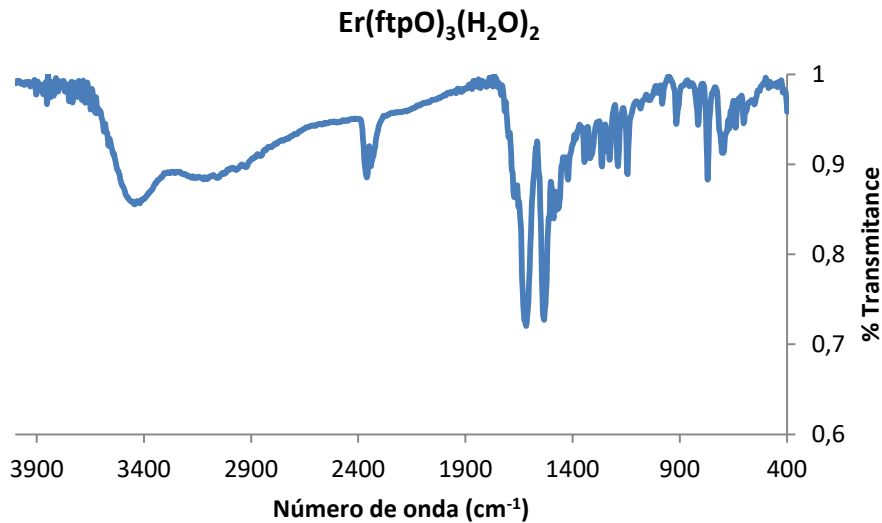
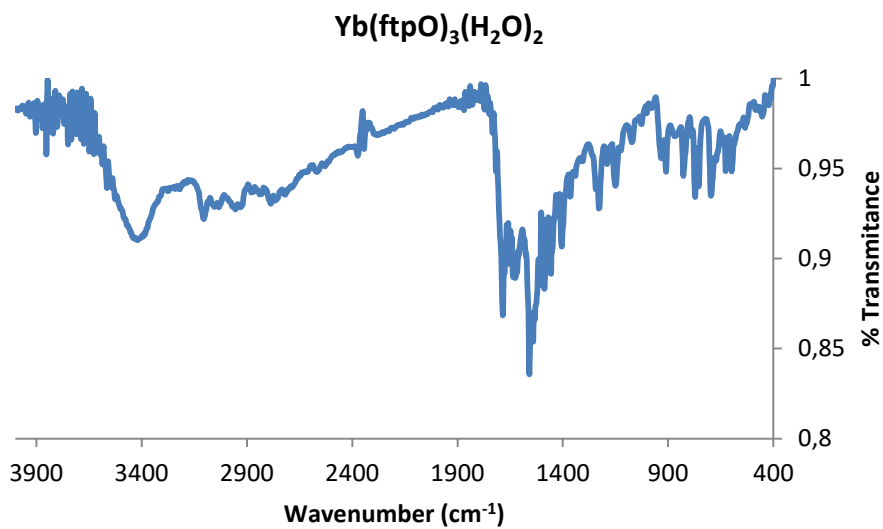


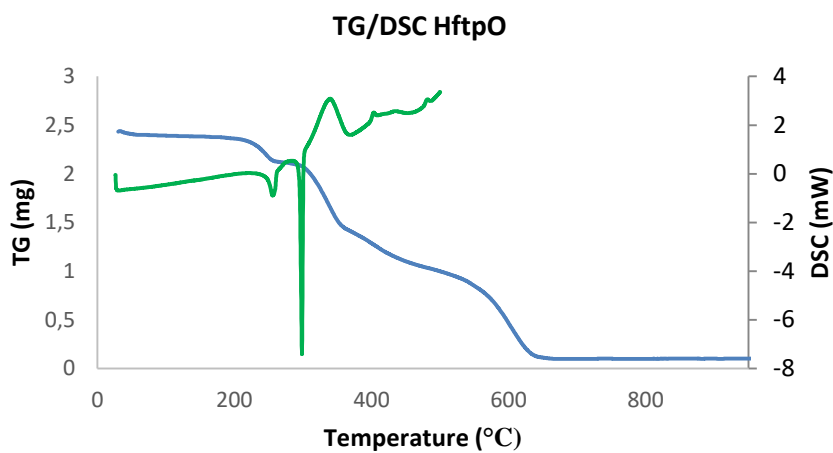
Figure 12. IR spectra of [Tb(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

Figure 13. IR spectra of [Dy(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]Figure 14. IR spectra of [Er(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

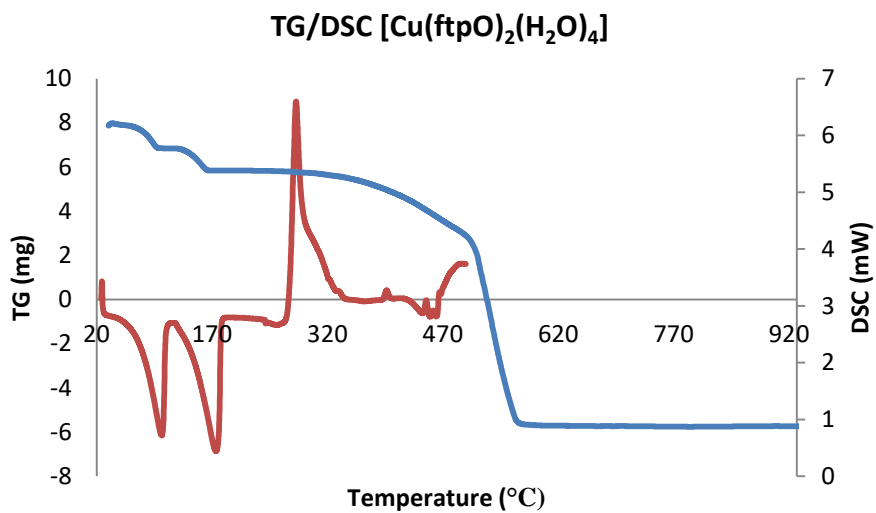


**Figure 15.** IR spectra of  $[\text{Yb}(\text{ftpO})_3(\text{H}_2\text{O})_6]$

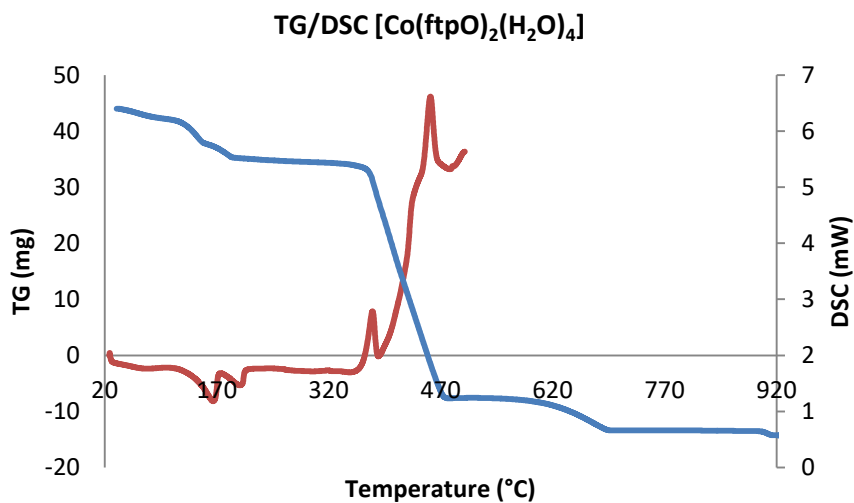
## 2. TG and DSC curves



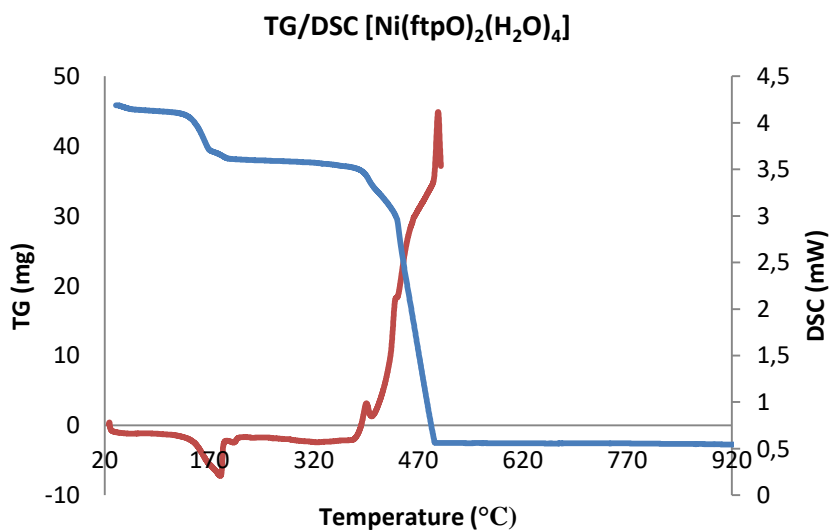
**Figure 16.** TG (blue) and DSC (green) curve of **HftpO**



**Figure 17.** TG (blue) and DSC (red) curve of **[Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]**



**Figure 18.** TG (blue) and DSC (red) curve of [Co(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]



**Figure 19.** TG (blue) and DSC (red) curve of [Ni(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

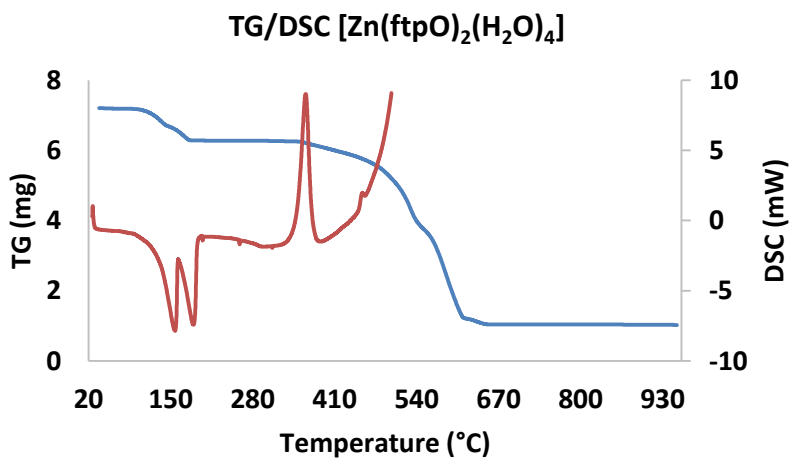


Figure 20. TG (blue) and DSC (red) curve of [Zn(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]

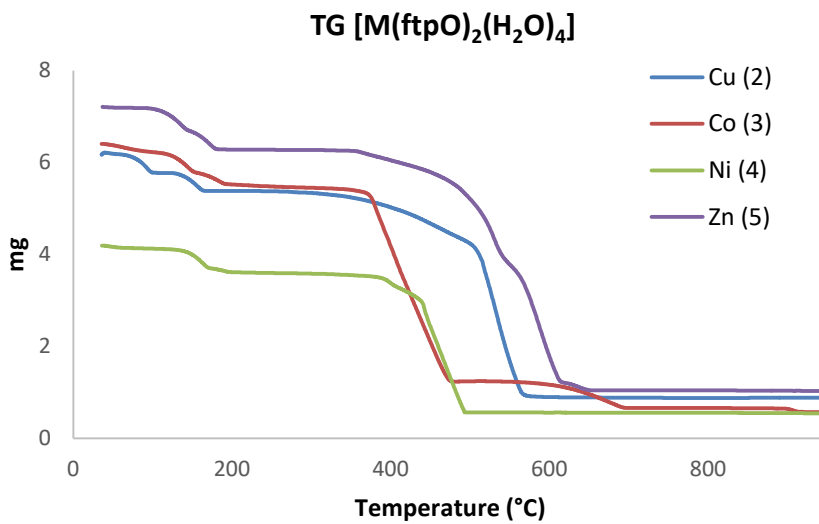


Figure 21. TG comparative of [M(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] series

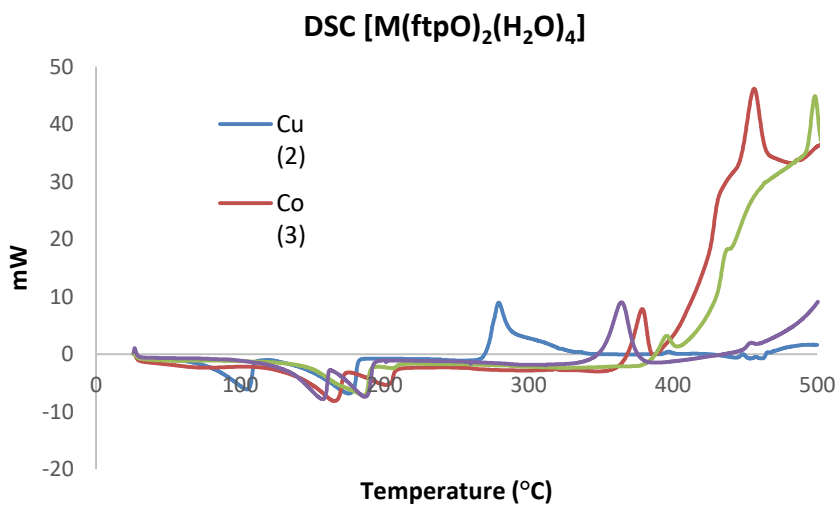


Figure 22. DSC comparative of [M(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>] series

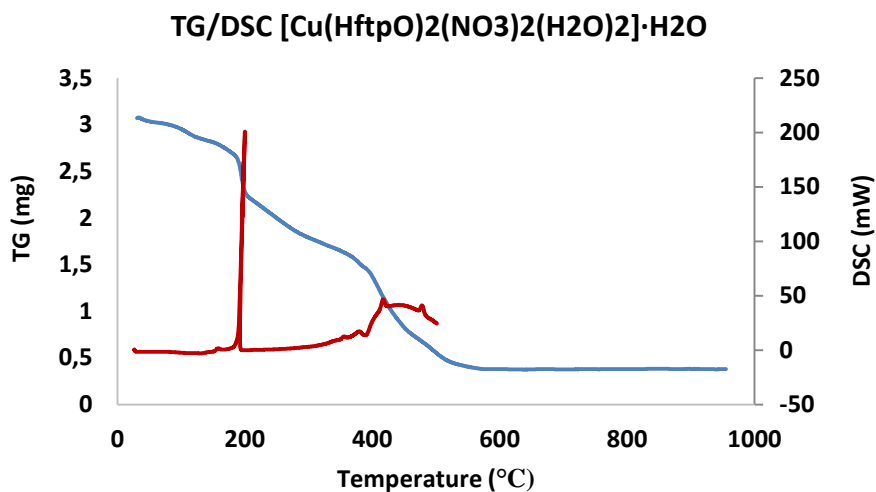


Figure 23. TG (blue) and DSC (red) curve of [Cu(HftpO)<sub>2</sub>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]-H<sub>2</sub>O



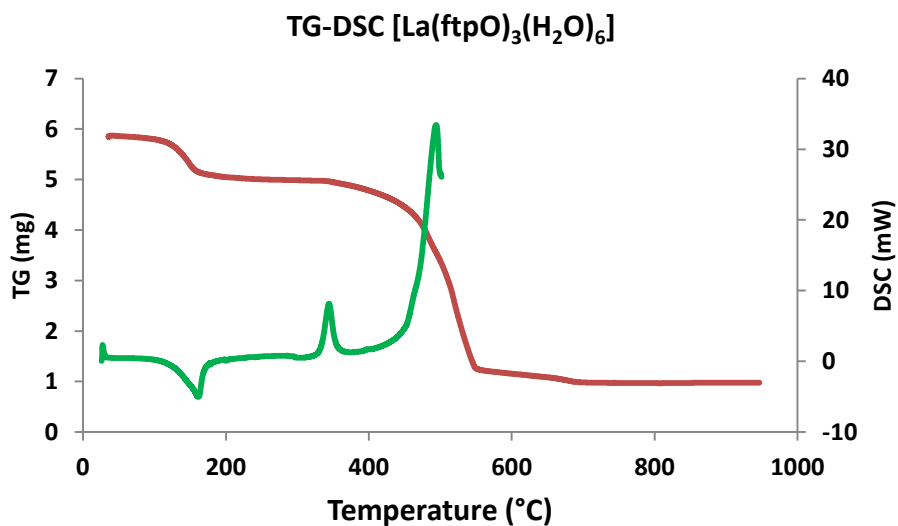


Figure 24. TG (red) and DSC (green) curve of [La(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

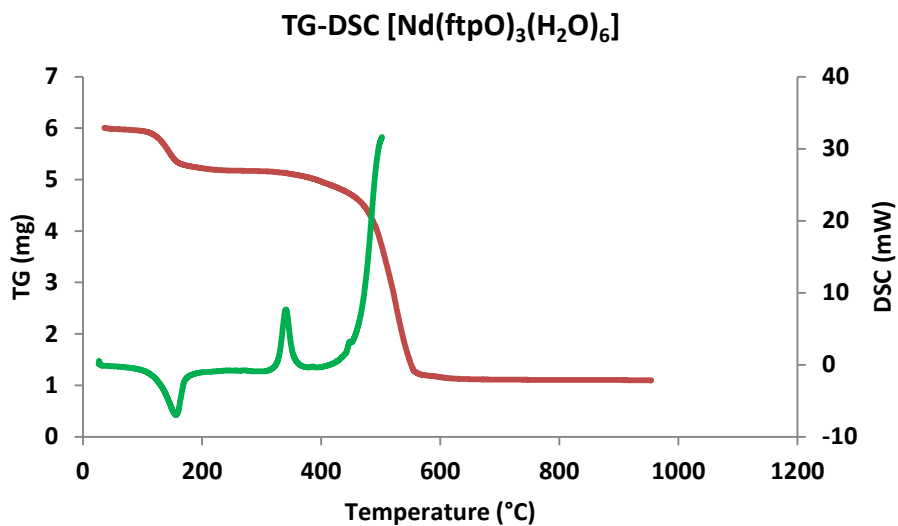


Figure 25. TG (red) and DSC (green) curve of [Nd(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

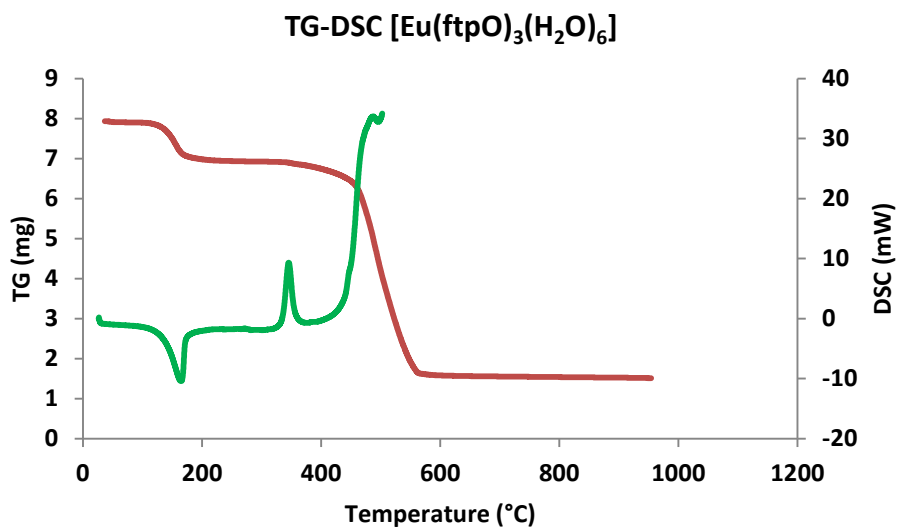


Figure 26. TG (red) and DSC (green) curve of [Eu(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

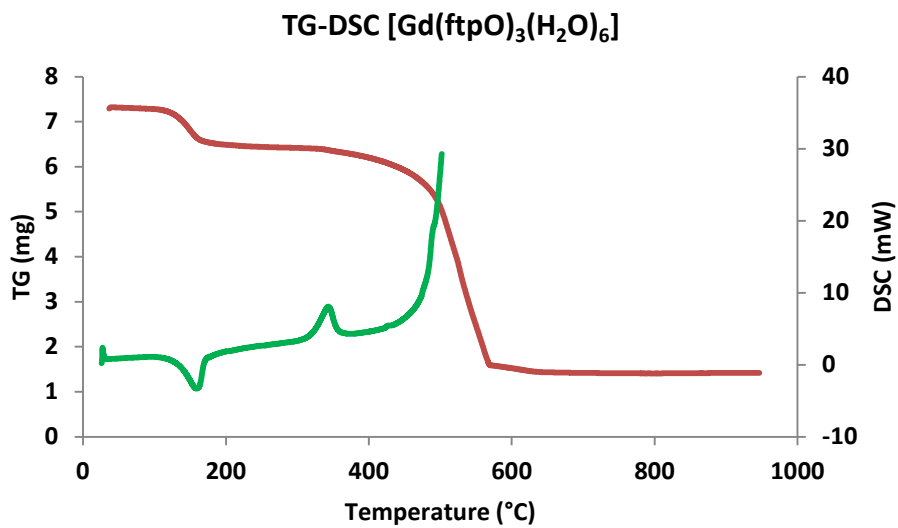


Figure 27. TG (red) and DSC (green) curve of [Gd(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

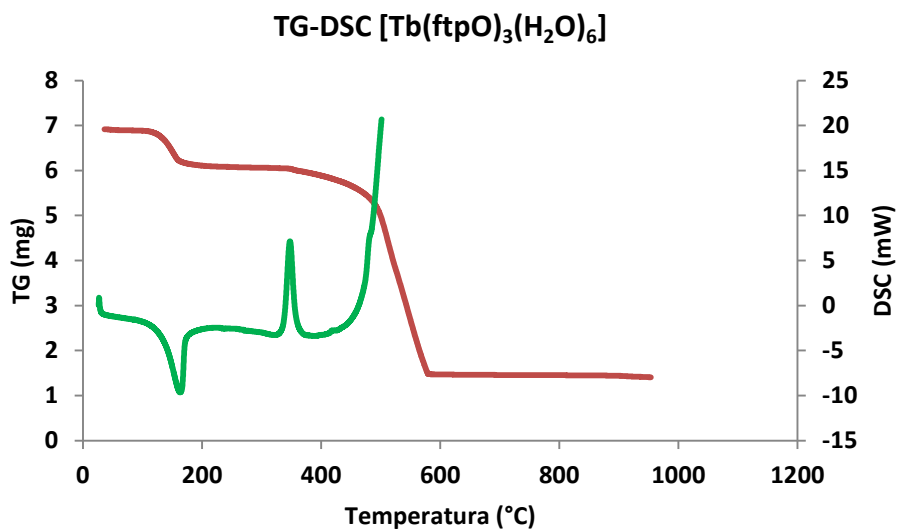


Figure 28. TG (red) and DSC (green) curve of [Tb(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

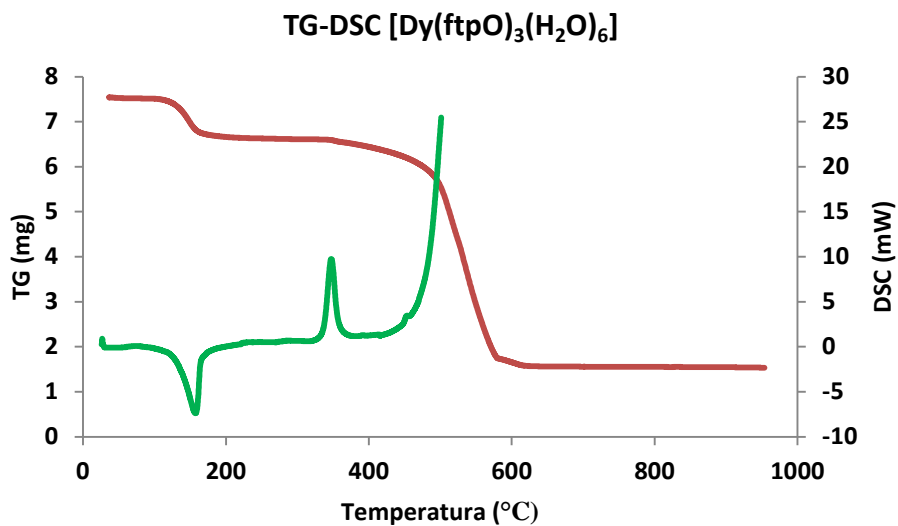


Figure 29. TG (red) and DSC (green) curve of [Dy(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>]

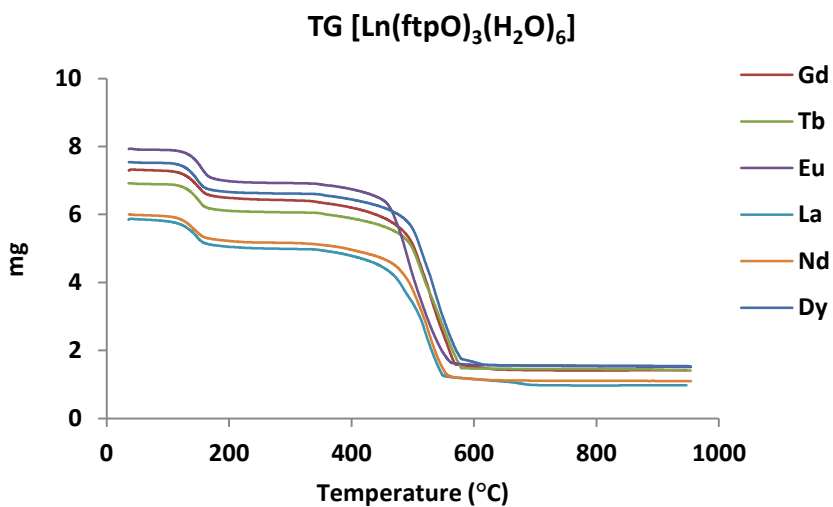


Figure 30. Comparative of TG of [Ln(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>] series

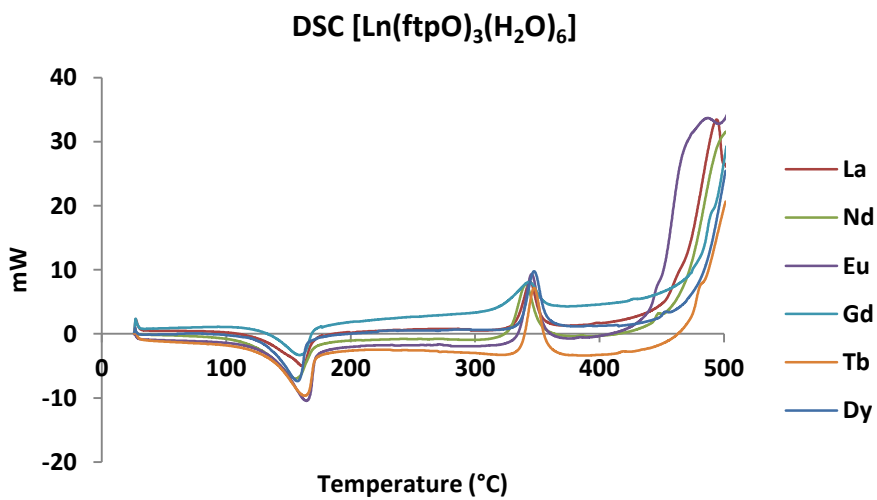


Figure 31. Comparative of TG of [Ln(ftpO)<sub>3</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub>] series

## ANEXO III

### Crystallographic data



Bond Distances	Bond Angles
C3-N3: 1.37(2)	N3-C3-N4: 132.8(19)
C3-N4: 1.25(2)	

**Table 1.** Bond distances and angles of **HftpO**

Bond Distances	Bond Angles
C3-N3: 1.35(2)	N3-C3-N4: 128.27(14)
C3-N4: 1.33(2)	

**Table 2.** Bond distances and angles of **mtpCl**

Bond Distances	Bond Angles
Cu1 O2W 1.9915(16)	N3 Cu1 O1W 86.80(6)
Cu1 O2W 1.9915(16)	O2W Cu1 N3 91.76(7)
Cu1 N3 2.0013(18)	O2W Cu1 N3 88.24(7)
Cu1 N3 2.0014(18)	N3 Cu1 O1W 93.19(6)
Cu1 O1W 2.3944(15)	O2W Cu1 O1W 92.01(6)
Cu1 O1W 2.3944(15)	O2W Cu1 O1W 87.99(6)

**Table 3.** Bond distances and angles of **[Cu(ftpO)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>4</sub>]**

Bond Distances	Bond Angles
Cu1 O1W 1.980(3)	N3 Cu1 O1W 86.73(15)
Cu1 O1W 1.980(3)	O1N Cu1 N3 87.29(16)
Cu1 N3 2.0016(4)	O1N Cu1 N3 92.71(16)
Cu1 N3 2.0016(4)	N3 Cu1 O1W 93.27(15)
Cu1 O1N 2.317(4)	O1W Cu1 O1N 84.38(14)
Cu1 O1N 2.317(4)	O1W Cu1 O1N 95.62(14)

**Table 4.** Bond distances and angles of  $[\text{Cu}(\text{HftpO})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]\cdot\text{H}_2\text{O}$

Bond Distances (Å)	Bond Angles
Cu1 Cu2 3.052(6)	N3A Cu1 N4B 88.8(8)
Cu1 N4A 2.103(18)	N3A Cu1 Cl1 98.6(4)
Cu1 N4B 2.103(8)	N4A Cu1 Cl1 100.2(7)
Cu1 N3A 2.016(14)	N3A Cu1 Cu2 80.9(4)
Cu1 N3B 2.016(14)	N4A Cu1 Cu2 80.2(7)
Cu1 Cl1 2.417(7)	Cl1 Cu1 Cu2 179.4(2)
	N4A Cu1 N4B 88.2(9)
	N3A Cu1 N3B 88.1(8)

**Table 5.** Bond distances and angles of  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4\text{Cl}_2]\text{Cl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$



Bond Distances	Bond Angles
Cu1 Cu2 2.9470(16)	N3A Cu1 N4B 90.4(2)
Cu1 N3A 2.015(5)	N3A Cu1 O1W 97.53(19)
Cu1 N4A 2.013(5)	N4A Cu1 O1W 97.89(19)
Cu1 N3B 1.999(6)	N3A Cu1 Cu2 80.03(15)
Cu1 N4B 2.026(6)	N4A Cu1 Cu2 84.59(15)
Cu1 O1W 2.151(4)	O1W Cu1 Cu1 177.03(14)
	N4A Cu1 N4B 89.3(2)
	N3A Cu1 N3B 88.4(2)

**Table 6.** Bond distances and angles of  $[\text{Cu}_2(\mu\text{-7atp})_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$



ANEXO IV  
Methodology



### Characterization of ligands and complexes

Elemental analyses were carried out at the “Centro de Instrumentación Científica” of the University of Granada on a THERMO SCIENTIFIC analyser model Flash 2000. The IR spectra on powdered samples were recorded with a BRUKER TENSOR 27 FT-IR and OPUS data collection program. Thermal behaviour (thermogravimetry – TG – and differential scanning calorimetry – DSC) was studied under an air flow in Shimadzu TGA-50 and Shimadzu DSC-50 equipments at heating rates of 20 and 10°C/min respectively. Variable temperature (2–300K) magnetic susceptibility measurements on polycrystalline samples were carried out with a Quantum Design SQUID MPMS XL-5 device.

### Synthesis and characterization of oligonucleotides

The synthesis of oligonucleotides was performed in an Applied Biosystems 3400 DNA synthesizer following standard protocols and using the appropriated phosphoramidites purchased from Glen Research, VA, USA. The cleavage and deprotection of the oligonucleotides involved treatment with ammonium hydroxide 30% for 16h at 55°C. The purification was performed by RP-HPLC using a Thermo Scientific P4000 in association with a Spectra System UV8000 and a Phenomenex Clarity 3 $\mu$  column. The solvent gradient was made up of solvent A (10% acetonitrile in water containing TEAA buffer pH 6.5) and solvent B (65% acetonitrile in water containing TEAA buffer pH 6.5), increasing from 0% B to 35% B over 25min and returning to 100% A at 30min. After purification, the oligonucleotide was desalted by gel filtration using a Shepadex G-25 column. The desalted oligonucleotides were characterized by MALDI-TOF mass spectrometry, on a Bruker Autoflex using a 3-hydroypicolinic acid/ammonium citrate matrix. Canonical oligonucleotides were purchased from Sigma Aldrich. UV-vis spectra were recorded on an Agilent Technologies Cary 100 Spectrophotometer in association with a Temperature Controller. UV melting curves were registered at 260-270nm with a heating rate of 0.5°C/min and data interval of 1°C. Melting temperatures ( $T_m$ ) were determined as the maxima of the first derivatives

of the melting curves. The melting curves graphs were prepared using normalized absorbance ( $A_{norm} = (A - A_{min}) / (A_{max} - A_{min})$ ) at 264nm. CD spectra were recorder on a JASCO J-815 spectrometer at 20°C. Fluorescence spectra were registered using an Olis DSM172 spectrophotometer with a xenon lamp of 150 W and a Cary Varian Eclipse fluorescence spectrophotometer.