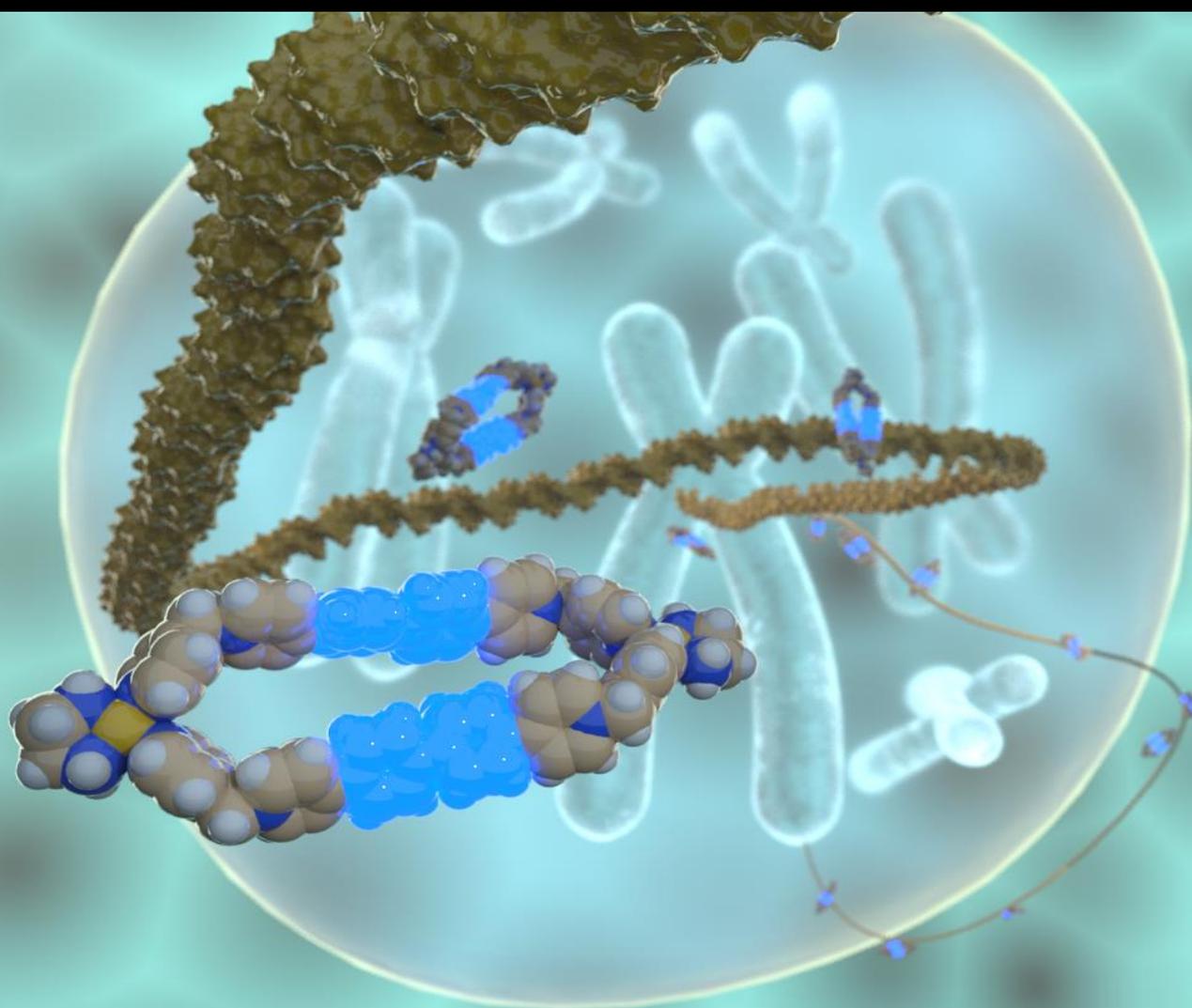


TESIS DOCTORAL

# Metallociclos autoensamblados de Pt(II) como potenciales metalofármacos antitumorales



OLAYA DOMARCO ÁLVAREZ

A CORUÑA, 2018



UNIVERSIDADE DA CORUÑA



# METALOCICLOS AUTOENSAMBLADOS DE Pt(II) COMO POTENCIALES METALOFÁRMACOS ANTITUMORALES

Autora: Olaya Domarco Álvarez

---

Tesis Doctoral UDC /2018

Directores: Carlos Peinador Veira

Marcos Daniel García Romero

Programa de doutoramento en Química Ambiental e Fundamental



UNIVERSIDADE DA CORUÑA





## Programa de doutoramento en Química Ambiental e Fundamental

Los Dres. D. CARLOS PEINADOR VEIRA, Profesor Titular de Universidad y D. MARCOS DANIEL GARCÍA ROMERO, Profesor Titular de Universidad, pertenecientes al Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña,

### INFORMAN

Que el trabajo titulado “*Metalociclos autoensamblados de Pt(II) como potenciales metalofármacos antitumorales*”, presentado por Dña. Olaya Domarco Álvarez para optar al Grado de Doctora en Química con Mención Internacional, ha sido realizado bajo su dirección en los laboratorios del Departamento de Química Fundamental y en el Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) de la Universidade de A Coruña y

### AUTORIZAN

Su presentación.

Y para que así conste, firman la presente en A Coruña, a            de            de 2018.

Fdo. D. Carlos Peinador Veira

Fdo. D. Marcos D. García Romero





UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Programa de doutoramento en Química Ambiental e Fundamental

Acta de tesis

El tribunal, nombrado por el Excmo. Sr. Rector de la Universidade de A Coruña para calificar la tesis doctoral titulada “*Metalociclos autoensamblados de Pt(II) como potenciales metalofármacos antitumorales*”, dirigida por los Dres. D. Carlos Peinador Veira y D. Marcos Daniel García Romero, y presentada por Dña. Olaya Domarco Álvarez y constituido en el día de la fecha por los miembros que suscriben la presente Acta, una vez efectuada la defensa por el doctorando y contestadas las objeciones y/o sugerencias que le han formulado, ha otorgado por..... la calificación de:

En A Coruña a                      de                      de 2018

El presidente,

El secretario,

El vocal.

Fdo.....

Fdo.....

Fdo.....



**A Manuela**



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera expresar mi más sentido agradecimiento a mis directores de tesis, Carlos Peinador Veira y Marcos Daniel García Romero, por haberme permitido realizar la tesis en su grupo de investigación, por su confianza y por haberme ayudado en todo momento. Asimismo, quisiera agradecer al profesor José María Quintela López por permitirme realizar la tesis en su grupo y por sus buenos consejos.

Al doctor Alessio Terenzi, por haberme permitido realizar la estancia doctoral en la Universidad de Viena, por haberme acogido maravillosamente bien y por su ayuda. Además quisiera agradecerle la realización de experimentos espectroscópicos y experimentos biológicos.

A la profesora Lourdes Gude por haberme permitido realizar una breve estancia en su laboratorio y a la doctora Katerina Duskova por la ayuda brindada.

Al doctor Víctor Blanco por la realización de cálculos computacionales.

Al SAI por su ayuda en la realización de los experimentos de espectroscopía de masas y de resonancia magnética nuclear.

Al Ministerio de Educación, a la Fundación Segundo Gil Dávila y a las becas de estancia Inditex por haberme proporcionado la financiación recibida a lo largo del período predoctoral.

A mis compañeras de tesis, Eva y Cristina, por sus consejos y por haberme ayudado siempre. A Tamara, por su paciencia, por su permanente sonrisa, por su ayuda y por ser una inmejorable compañera. A Arturo por los buenos momentos pasados en el laboratorio y por su ayuda. A Iago por las risas en los momentos de concept-concept, por ser siempre un gran apoyo, porque sin él la etapa predoctoral no habría sido lo mismo y porque espero que aunque ahora dejamos de ser los compañeros zipy y zape sigamos siendo siempre amigos. A Jorge por ser tan detallista y buen amigo y sobre todo por el sulfato de quinina.

Al resto de compañeros del CICA por los buenos momentos vividos durante estos años, por los consejos y por las palabras de ánimo.

A las compañeras de carrera que me ha tocado y hoy grandes amigas. Por todos los cumpleaños, karaokes, cenas, etc. en los que no desconectar era imposible. En especial a Ana, por todos esos cafés que se pasan volando.

A mis amigas de toda la vida por saber cómo sacarme siempre una sonrisa, por estar siempre ahí y porque a su lado siempre ha sido sencillo ser feliz. En especial, a mi amiga de toda la vida, a Natalia, con la que he crecido y con la que he compartido grandes momentos y confidencias.

A mi familia, a los que están y a los que perdí en el camino, porque sin ellos nada de esto habría sido posible. A mis padres, que han luchado incansablemente, día y noche, para que consiguiese alcanzar mis sueños y para que nunca me faltase nada.

Y por último, a Mauro, por quererme, por aceptarme tal y como soy, por confiar en mí y por ser mi luz en los días más oscuros

## RESUMEN

La presente tesis doctoral se divide en tres partes diferenciadas, comenzando por el diseño y desarrollo de una nueva metodología que ha permitido obtener de manera más eficiente ligandos previamente publicados por el grupo de investigación, y cuyo ensamblaje a bajas concentraciones con centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) conduce a especies mononucleares  $M_1L_1$ . La nueva estrategia permite además obtener nuevos ligandos análogos de diferente tamaño y funcionalización. Se ha estudiado el proceso de autoensamblaje dirigido por Pd(II)/Pt(II) de los nuevos ligandos, observándose además de las especies mononucleares, dímeros  $M_2L_2$  a altas concentraciones. Se ha logrado controlar el equilibrio entre la especie monomérica y dimérica mediante la aplicación de estímulos externos (concentración y adición de sustratos).

La segunda parte del trabajo se centró en el estudio de la interacción de metalociclos de Pt(II) con el ADN de doble hélice y de estructura cuádruple. Se comenzó por el estudio de la interacción de tres metalociclos cuadrangulares de tipo  $M_2L_2$ , previamente publicados por el grupo de investigación, y que diferían entre sí en el tamaño de la cavidad. Se trató con este trabajo de determinar la posible influencia del tamaño de los metalociclos en su interacción con ADN. Los resultados mostraron que, a mayor tamaño de cavidad, mayor es la interacción con el ADN pero menor es la selectividad con el ADN cuádruple frente al de doble hélice. Los resultados obtenidos mediante técnicas espectroscópicas, se vieron reforzados mediante la realización de ensayos celulares.

Por último, se evaluó la interacción de una librería de metalociclos  $M_1L_1$  y  $M_2L_2$  con mayor variedad estructural con ADN de doble hélice y cuádruple. Los metalociclos que ofrecieron un mejor perfil de interacción y selectividad con el ADN cuádruple, fueron sometidos a un estudio espectroscópico más completo. De los metalociclos analizados más en profundidad, el que presentó mejor perfil en sus propiedades de absorción y emisión, fue sometido a posteriores estudios biológicos. Estos estudios revelaron que el metalociclo era capaz de internalizarse en diversas células cancerígenas, para alcanzar el núcleo y unirse posteriormente al ADN de estructura cuádruple presente en el nucléolo, constituyendo el primer ejemplo de metalociclo de Pt(II) fluorescente capaz de exhibir dicho comportamiento.



## RESUMO

A presente tese doutoral divídese en tres partes diferenciadas, comezando polo deseño e desenrolo dunha nova metodoloxía que permitiu obter de xeito máis eficiente ligandos previamente publicados polo grupo de investigación, cuxo ensamblaxe a baixas concentracións con centros metálicos de Pd(II) e Pt(II) conduce a formación de metalociclos mononucleares  $M_1L_1$ . Ademais, a través desta nova estratexia logrouse obter novos ligandos análogos con diferente tamaño e funcionalización. Estudiouse o proceso de autoensamblaxe dirixido por Pd(II)/Pt(II) dos novos ligandos, observando ademais das especies mononucleares, a aparición de especies dinucleares  $M_2L_2$  a altas concentracións. Logrouse controlar o equilibrio entre a especie monomérica e dimérica mediante a aplicación de estímulos externos (concentración e adición de substratos).

A segunda parte do traballo centrouse no estudo da interacción de metalociclos de Pt(II) co ADN de dobre hélice e cuádruple. Comezouse polo estudo da interacción de tres metalociclos cuadrangulares de tipo  $M_2L_2$ , previamente publicados polo grupo de investigación e que diferían entre eles no tamaño da súa cavidade. Tratouse con este traballo de determinar a posíbel influencia do tamaño na interacción dos metalociclos co ADN. Os resultados amosaron que a maior tamaño da cavidade, maior é a interacción co ADN pero menor é a selectividade co ADN cuádruple fronte ao de dobre hélice. Os resultados obtidos mediante técnicas espectroscópicas, reforzáronse mediante a realización de ensaios celulares.

Por último, avalíouse a interacción de metalociclos  $M_1L_1$  e  $M_2L_2$  con maior variedade estrutural co ADN de dobre hélice e cuádruple. Os metalociclos que ofreceron un mellor perfil de interacción e selectividade foron sometidos a un estudo espectroscópico máis completo. De tódolos metalociclos analizados o que presentou un mellor perfil de absorción e emisión foi sometido a posteriores estudos biolóxicos. O estudo revelou que o metalociclo analizado era capaz de internalizarse en diversas células canceríxenas, para alcanzar o núcleo e unirse posteriormente ao ADN cuádruple presente no nucléolo, constituíndo o primeiro exemplo de metalociclo de Pt(II) fluorescente capaz de exhibir dito comportamento.



# ABSTRACT

The present dissertation is divided in three sections. On the first part, we have designed and developed a new synthetic methodology that has enabled the preparation of ligands previously published by the research group in a more efficient manner. The assembly of these ligands with metallic centers of Pd(II) and Pt(II) at low concentrations leads to the formation of mononuclear metallacycles  $\mathbf{M}_1\mathbf{L}_1$ . In addition, through this strategy new analogue ligands with different size and functionalization were obtained. The process of Pd(II)/Pt(II)-directed self-assembly of the new metallacycles has been explored, observing that apart from the expected mononuclear metallacycles, dinuclear species  $\mathbf{M}_2\mathbf{L}_2$  appear at high concentrations. We have found that the speciation can be controlled by the application of external stimuli (concentration and/or addition of a substrate).

The second part of this work is focused on the study of the interaction of Pt(II) metallacycles with duplex and G-quadruplex DNA structures. We began by studying the interaction of three differently-sized quadrangular metallacycles of type  $\mathbf{M}_2\mathbf{L}_2$ , previously published by this research group. The purpose of this work was to determine the possible influence of size of the metallacycles on the interaction with DNA. The results showed that the smallest Pt-box display less activity but greater selectivity for a quadruplex formed in *c-Kit* gene. The results obtained by means of spectroscopic techniques were reinforced by carrying out cell tests.

Finally, we have studied the interaction of a more diverse family of  $\mathbf{M}_1\mathbf{L}_1$  and  $\mathbf{M}_2\mathbf{L}_2$  metallacycles with double-helix and G-quadruplex DNA. The metallacycle showing a better interaction profile and selectivity, were subjected to further spectroscopic studies. Of all the metallacycles analyzed, the one with the best absorption/emission profile was subjected to further biological studies. Those revealed that the analyzed metallacycle was able to enter cancer cells, to reach the nucleus and subsequently bind G-quadruplex structures present in the nucleolus, being the first example of a fluorescent Pt(II) metallacycle capable of exhibiting this behaviour.



# Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<i>Introducción I. Química Supramolecular</i> .....	1
<b>1.1 Química supramolecular</b> .....	1
<b>1.2 Reconocimiento molecular</b> .....	1
<b>1.3 Autoensamblaje supramolecular</b> .....	3
<b>1.4 Autoensamblaje dirigido por centros metálicos</b> .....	4
<b>1.5 Autoensamblaje supramolecular dirigido por centros metálicos de Pd(II) y Pt (II) con ligandos piridínicos</b> .....	6
<b>1.6 Moléculas mecánicamente entrelazadas: Catenanos</b> .....	10
<b>1.7 Aplicaciones de los compuestos obtenidos mediante autoensamblaje dirigido por centros metálicos</b> .....	13
<b>1.8 Antecedentes</b> .....	16
1.8.1 Ensamblaje de ligandos derivados de N-monoalquil-4,4'-bipiridinio y 2,7-diazapireno con centros metálicos planocuadrados de Pd(II) y Pt(II).....	16
1.8.2 Formación de complejos de inclusión y de moléculas mecánicamente entrelazadas	17
1.8.3 Sistemas constitucionalmente dinámicos .....	18
1.8.4 Estudios de interacción con el ADN.....	19
<i>Introducción II. Interacción de moléculas de pequeño tamaño con el ADN</i> .....	21
<b>1.9 El Ácido desoxirribonucleico</b> .....	21
<b>1.10 La doble hélice del ADN</b> .....	21
<b>1.11 Modos de unión intermolecular al ADN de doble hélice</b> .....	23
1.11.1 Intercalación .....	23
1.11.2 Unión al surco .....	25
<b>1.12 ADN cuádruple-G</b> .....	25
1.12.1 La tétrada-G.....	25
1.12.2 ADN cuádruple.....	26
1.12.3 Papel del ión metálico.....	27
<b>1.13 Relación entre el ADN cuádruple-G y la telomerasa</b> .....	27
1.13.1 Los telómeros .....	27
1.13.2 La telomerasa.....	28
1.13.3 Oligonucleótidos de ADN cuádruple-G .....	29
<b>1.14 Ligandos de unión al ADN cuádruple-G</b> .....	32
<b>1.15 Estudios de interacción de metalociclos autoensamblados de Pt(II) con el ADN</b> ...	34

<b>2. OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:</b> .....	43
<i>Capítulo I. Metalociclos</i> .....	44
<b>3.1 Metalociclos seleccionados para el estudio de su interacción con ADN</b> .....	44
3.1.1 <i>Introducción</i> .....	44
<b>3.2 Metalociclos mononucleares</b> .....	44
3.2.1 <i>Antecedentes</i> .....	44
3.2.2 <i>Desarrollo de una nueva estrategia sintética para los ligandos L1-L3</i> .....	46
3.2.3 <i>Síntesis de nuevos ligandos empleando la estrategia sintética desarrollada</i> .....	48
3.2.4 <i>Ensamblaje de los metalociclos mononucleares de Pd/Pt(II) derivados de los ligandos L4-L7 en medio acuoso.</i> .....	50
3.2.5 <i>Estudio en medio acuoso de los complejos de inclusión entre los metalociclos M4a-M7a y 1,5-DHN.</i> .....	54
3.2.6 <i>Ensamblaje de los metalociclos mononucleares de Pd y Pt (II) en medio acuoso derivados de los ligandos L4-L7. Formación de dímeros.</i> .....	61
3.2.7 <i>Reorganización de la especie dinuclear a la especie mononuclear mediante la adición de una plantilla</i> .....	68
3.2.8 <i>Autoensamblaje de [2]-Catenanos</i> .....	74
3.2.8.1 <i>Catenano de DN38C10 con M6a·5NO<sub>3</sub> y M6ad·10NO<sub>3</sub></i> .....	75
3.2.8.2 <i>Catenano de DN38C10 con M4a·5NO<sub>3</sub></i> .....	78
<i>Capítulo II. Estudios de interacción con ADN</i> .....	81
<b>3.3 Influencia del tamaño de metalociclos Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> cuadrangulares en la interacción y selectividad con el ADN.</b> .....	81
3.3.1 <i>Introducción</i> .....	81
3.3.2 <i>Metalociclos M<sub>2</sub>L<sub>2</sub> cuadrangulares seleccionados</i> .....	81
3.3.3 <i>Estudios preliminares</i> .....	83
3.3.4 <i>Estudio de la interacción por medida de la desnaturalización térmica</i> .....	84
3.3.4.1 <i>Estudios de desnaturalización térmica del ADN observados por FRET</i> .....	87
3.3.5 <i>Estudio de la interacción mediante espectroscopía UV-Vis y dicroísmo circular</i> 89	
3.3.5.1 <i>Dicroísmo circular (CD)</i> .....	89
3.3.5.2 <i>Espectroscopia UV-vis</i> .....	90
3.3.5.3 <i>Valoraciones de Dicroísmo Circular y de espectroscopía Ultravioleta Visible</i> 90	
3.3.5.4 <i>Estudios de Docking molecular</i> .....	93

<b>3.4</b>	<b><i>Estudio de la interacción con ADN de una librería estructuralmente heterogénea de metalociclos</i></b> .....	95
3.4.1	<i>Metalociclos seleccionados</i> .....	95
3.4.2	<i>Estudios preliminares</i> .....	97
3.4.3	<i>Estudios de interacción</i> .....	98
3.4.3.1	Experimentos de FRET .....	98
3.4.3.2	Valoraciones mediante Dicroísmo Circular .....	101
3.4.3.3	Valoraciones mediante espectroscopía Ultravioleta Visible .....	103
3.4.3.4	Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo .....	105
3.4.3.5	Espectroscopía de Fluorescencia .....	109
3.4.3.6	Análisis de la fluorescencia de los metalociclos .....	109
3.4.3.7	Valoración de fluorescencia con c-Kit2 .....	110
3.4.3.8	Análisis del tiempo de vida media de fluorescencia del ligando <b>L13</b> y de su metalociclo derivado <b>M13</b> .....	111
3.4.3.9	Rendimiento cuántico de fluorescencia del ligando <b>L13</b> y del metalociclo <b>M13</b>	112
	<b>Capítulo III. Estudios biológicos</b> .....	115
3.4.4	<i>Ensayos celulares con los metalociclos de Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> cuadrangulares M8-M10</i> .....	115
3.4.5	<i>Ensayos celulares con el ligando L13 y el metalociclo M13</i> .....	116
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	127
	<b>CONCLUSIONS</b> .....	129
4.1	<i>Publicaciones</i> .....	131
4.2	<i>Estancias de investigación</i> .....	131
4.3	<i>Comunicaciones a Congresos</i> .....	132
<b>5.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	133
	<i>Parte Experimental I. Síntesis</i> .....	133
5.1	<i>General</i> .....	133
5.2	<i>Procedimientos sintéticos</i> .....	134
5.2.1	<i>Procedimiento experimental para la síntesis de los precursores 6-13</i> .....	134
5.2.2	<i>Procedimiento experimental para la síntesis ligandos</i> .....	138
5.2.3	<i>Procedimiento experimental para el ensamblaje de los metalociclos M4a-M7a</i>	143
5.2.4	<i>Procedimiento experimental para el ensamblaje de los metalociclos M4ad-M6ad</i>	145
5.2.5	<i>Procedimiento general para el ensamblaje de los metalociclos de Pt(II) mononucleares</i> .....	147

5.2.6	<i>Procedimiento general para el ensamblaje de los metalociclos de Pt(II) dinucleares</i> .....	149
5.2.7	<i>Procedimiento experimental para la síntesis de los complejos de inclusión</i> ....	151
5.2.8	<i>Ensamblaje de los catenanos (M6a·DN38C10)·5NO<sub>3</sub> y (M4a·DN38C10)·5NO<sub>3</sub></i> 154	
5.2.9	<i>Ensamblaje de los catenanos (M6b·DN38C10)·5NO<sub>3</sub> y (M4b·DN38C10)·5NO<sub>3</sub></i> 156	
<i>Parte Experimental II. Estudios de interacción</i> .....		158
<b>5.3</b>	<b><i>Oligonucleótidos</i></b> .....	158
<b>5.4</b>	<b><i>Estudios de interacción por desnaturalización térmica</i></b> .....	158
5.4.1	<i>Desnaturalización térmica del ADN por FRET</i> .....	158
<b>5.5</b>	<b><i>Estudios de la interacción mediante técnicas espectroscópicas</i></b> .....	159
5.5.1	<i>Espectroscopia Ultravioleta-Visible.</i> .....	159
5.5.2	<i>Dicroísmo circular</i> .....	160
5.5.3	<i>Espectroscopia de fluorescencia</i> .....	160
5.5.4	<i>Tiempo de vida media</i> .....	160
5.5.5	<i>Rendimiento cuántico</i> .....	161

# Índice de Figuras

<b>Figura 1:</b> Representación esquemática de los receptores moleculares: a) ciclodextrinas, b) cucurbiturilos y c) calixarenos. ....	2
<b>Figura 2:</b> Ensamblaje de polígonos 2D a partir de precursores dadores y aceptores empleando la estrategia del enlace direccional.....	5
<b>Figura 3:</b> Ensamblaje de polígonos 3D a partir de la combinación de precursores ditópicos y tritópicos empleando la estrategia del enlace direccional. ....	6
<b>Figura 4:</b> Autoensamblaje de 4,4'-bipiridina y un complejo planocuadrado de Pd(II) para formar el primer metalociclo cuadrangular obtenido por Fujita. ....	7
<b>Figura 5:</b> Representación esquemática de la estrategia “Molecular Lock”.....	8
<b>Figura 6:</b> Tetraedro truncado documentado por Fujita y colaboradores. ....	9
<b>Figura 7:</b> Formación de complejos de inclusión entre receptores en forma de caja, autoensamblados por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) y substratos aromáticos.....	9
<b>Figura 8:</b> Primer [2]-catenano reportado por Stoddart, formado gracias al establecimiento de interacciones $\pi$ -dadoras/ $\pi$ -aceptoras. ....	11
<b>Figura 9:</b> Síntesis de un [2]-catenano “Magic ring” de Fujita. La coordinación reversible del ligando <b>A5</b> con Pd(II) genera una mezcla interconvertible del macrociclo <b>A6</b> -Pd(II) y el [2]-catenano <b>A7</b> -Pd(II), con el [2]-catenano favorecido termodinámicamente a altas concentraciones a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno. ....	12
<b>Figura 10:</b> Síntesis de un [2]-catenano con topología de estrella de David. ....	13
<b>Figura 11:</b> Contenedor descrito por Sallé con seis centros redox (uno por cada ligando y uno por cada centro metálico) capaz de encapsular una molécula de perileno. ....	14
<b>Figura 12:</b> Autoensamblaje de un prisma tetragonal. ....	15
<b>Figura 13:</b> Síntesis de una esfera $M_{12}L_{24}$ acomodando una molécula de la proteína ubiquitina. ....	16
<b>Figura 14:</b> Ejemplos de metalociclos desarrollados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo.....	16
<b>Figura 15:</b> Estrategia sintética para la obtención de pseudo[1]rotaxanos. ....	17
<b>Figura 16:</b> Formación de un complejo de inclusión 1:1.....	17
<b>Figura 17:</b> Formación de un [2]-catenano.....	18
<b>Figura 18:</b> Sistema constitucionalmente dinámico desarrollado por el grupo de investigación. Estructura del metalociclo, el catenano y el complejo de inclusión formados.....	19
<b>Figura 19:</b> Apareamiento de las bases nucleotídicas de la secuencia del ADN.....	22
<b>Figura 20:</b> Surcos mayor y menor de la estructura en doble hélice del ADN.....	23
<b>Figura 21:</b> Representación de la estructura química de agentes intercalantes. ....	24
<b>Figura 22:</b> Estructura cristalina del metalointercalante $\Delta$ - $\alpha$ -[Rh {(R, R)-Me <sub>2</sub> trien} ( $\phi$ )] <sup>3+</sup> unido a la secuencia 5'-TGCA-3'.....	24
<b>Figura 23:</b> A) Representación de la estructura química del agente de unión DAPI y B) Imagen de la DAPI (rosa) unida al surco menor del ADN. ....	25
<b>Figura 24:</b> Estructura de la tétrada-G.....	26

<b>Figura 25:</b> Estructura de A) tétrada-G y B) Ejemplos esquemáticos de estructuras de ADN cuádruple-G.....	26
<b>Figura 26:</b> Representación de las proteínas del complejo “shelterin”: TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POTF1 y Rap1.....	28
<b>Figura 27:</b> La telomerasa añade desoxirribonucleótidos al final del extremo 3'- del ADN telomérico.....	29
<b>Figura 28:</b> Estructura plegada de oligonucleótidos de ADN o ARN cuádruple. ....	31
<b>Figura 29:</b> Estructura del tetracloruro de tetra-N-metilporfirina (TMPyP4). ....	32
<b>Figura 30:</b> Características estructurales del ADN cuádruple que pueden actuar como dianas de unión con moléculas diseñadas para tal fin. ....	34
<b>Figura 31:</b> Representación esquemática del potencial modo de interacción del metalociclo Pt <sub>4</sub> L <sub>4</sub> de Sleiman y colaboradores con el ADN cuádruple, obtenida mediante docking molecular. <sup>86</sup> ..	35
<b>Figura 32:</b> Estructura de los metalociclos de Pt(II) <b>A35a</b> y <b>A35b</b> .....	36
<b>Figura 33:</b> Modo de unión del metalociclo de Mao y colaboradores al ADN cuádruple. ....	36
<b>Figura 34:</b> Estructura del metalociclo de Pt(II) <b>A36</b> .....	37
<b>Figura 35:</b> Estudio de la interacción de un metalociclo de Pt(II) reportado por el grupo de investigación con ADN de doble hélice y de su efecto in vitro. ....	37
<b>Figura 36:</b> Metalociclos de tipo Pt <sub>2</sub> L <sub>2</sub> previamente reportados.....	40
<b>Figura 37:</b> Metalociclos de tipo Pt <sub>1</sub> L <sub>1</sub> reportados ( <b>M1-M3</b> ), y nuevos metalociclos ( <b>M4-M7</b> ) Pt <sub>1</sub> L <sub>1</sub> . ....	40
<b>Figura 38:</b> Espectros parciales de <sup>1</sup> H-RMN (500 MHz, D <sub>2</sub> O): arriba, <b>L7</b> ·3NO <sub>3</sub> (2.5 mM) y, abajo, <b>M7a</b> ·5NO <sub>3</sub> [ <b>L7</b> ·3NO <sub>3</sub> (2.5 mM) + (en)Pd(ONO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> (2.5 mM)]. ....	53
<b>Figura 39:</b> Distribución isotópica (ESI-MS, m/z) calculada para [ <b>M7b</b> -3PF <sub>6</sub> ] <sup>+3</sup> (izquierda) y [ <b>M7b</b> -PF <sub>6</sub> ] <sup>+</sup> (derecha) (arriba) y encontrada (abajo). ....	54
<b>Figura 40:</b> Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (500 MHz, D <sub>2</sub> O) parciales para: a) metalociclo <b>M7a</b> ·5NO <sub>3</sub> , b) el complejo de inclusión <b>M7a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> y c) 1,5-DHN. ....	56
<b>Figura 41:</b> Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (500 MHz, D <sub>2</sub> O) parciales para a) el complejo de inclusión <b>M7a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> con estequiometría 1:1 de los dos componentes, b) el complejo de inclusión <b>M7a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> con estequiometría 2:1 y c) el sustrato 1,5-DHN.....	57
<b>Figura 42:</b> Espectros de absorción (H <sub>2</sub> O) de <b>M5a</b> y de la mezcla de <b>M5a</b> con 1,5-DHN, en la que se aprecia la banda de transferencia de carga entre λ = 417-700 nm. ....	58
<b>Figura 43:</b> Espectros de <sup>1</sup> H-RMN (500 MHz, D <sub>2</sub> O) parciales para a) metalociclo <b>M5a</b> ·3NO <sub>3</sub> , b) complejo de inclusión <b>M5a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> a 343K y c) 1,5-DHN. ....	59
<b>Figura 44:</b> A la izquierda, el metalociclo <b>M4a</b> ·5NO <sub>3</sub> y a la derecha, el complejo de inclusión <b>M4a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> . ....	60
<b>Figura 45:</b> Espectros parciales de <sup>1</sup> H-RMN (500 MHz, D <sub>2</sub> O) para: a) metalociclo <b>M4a</b> ·5NO <sub>3</sub> , b) complejo de inclusión <b>M4a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> , c) complejo de inclusión <b>M4a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> con exceso de 1,5-DHN (2 equivalentes) y d) 1,5-DHN. Leyenda: los rectángulos azules hacen referencia a núcleos correspondientes a la subunidad del diazapireno. ....	61

- Figura 46:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla de  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  (10 mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (10 mM); b)  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  (5mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (5 mM) (los círculos verdes representan señales que se corresponden con el dímero **M6ad** y los círculos azules representan señales que se corresponden con el monómero **M6a**); c) el metalociclo **M6a** $\cdot 5\text{NO}_3$  a concentración 0.5 mM y d) el ligando  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$ . ..... 63
- Figura 47:** DOSY (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para la mezcla de  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$ . Los códigos de colores de los círculos son los mismos que los empleados en la **Figura 46**. ..... 64
- Figura 48:** ESI-MS (m/z), distribución isotópica calculada para  $[\text{M6b-2PF}_6]^{+2}$  y  $[\text{M6bd-3PF}_6]^{+7}$  (arriba) y encontrada (abajo). Leyenda: color rosa para la distribución teórica, azul para el pico encontrado correspondiente al monómero y verde para el correspondiente al dímero. .... 64
- Figura 49:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) mezcla del ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$  (15 mM) y el complejo de  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (15 mM); b) mezcla del ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$  (10 mM) y el complejo de  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (10 mM) (se sigue el mismo código de colores que en la **Figura 46**); c) el metalociclo **M5a** $\cdot 5\text{NO}_3$  a concentración 2.5 mM y d) el ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$ . ..... 66
- Figura 50:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) mezcla del ligando  $\text{L4}\cdot 3\text{NO}_3$  (15 mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (15 mM); b) mezcla del ligando  $\text{L4}\cdot 3\text{NO}_3$  (5 mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (5 mM) (se usó el mismo código de colores que en la **Figura 46**); c) el metalociclo **M4a** $\cdot 5\text{NO}_3$  a concentración 0.5 mM y d) el ligando  $\text{L4}\cdot 3\text{NO}_3$ . ..... 67
- Figura 51:** Estructuras optimizadas más estables obtenidas mediante cálculos DFT para los dímeros usando la base de cálculo M06: A) **dímero 1** y B) **dímero 2**. ..... 68
- Figura 52:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) mezcla  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  a concentración 5mM, b) complejo de inclusión **M6a** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  y c) 1,5-DHN. .... 69
- Figura 53:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla de los metalociclos **M5a** y **M5ad**, b) complejo de inclusión **M5a** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  y **M5ad** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 10\text{NO}_3$  a 343 K y c) 1,5-DHN. Mismo código de colores que el empleado en la **Figura 46**. ..... 71
- Figura 54:** Experimento DOSY (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para la mezcla de los complejos de inclusión **M5a** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  y **M5ad** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 10\text{NO}_3$ . Leyenda: en las formas puntiagudos en azul cian aparecen las señales ampliadas correspondientes al complejo de inclusión **M5ad** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 10\text{NO}_3$ . Se sigue el mismo código de colores para los círculos que el empleado en la **Figura 46**. ..... 72
- Figura 55:** Estructuras obtenidas mediante cálculos DFT para los complejos de inclusión A) **M1a** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  y B) **M1ad** $\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 10\text{NO}_3$ . ..... 73
- Figura 56:** a) ciclofano **DN38C10**, b) metalociclo **M6a** $\cdot 5\text{NO}_3$  y **M6ad** $\cdot 10\text{NO}_3$  y c) metalociclo **M4a** $\cdot 5\text{NO}_3$  y **M4ad** $\cdot 10\text{NO}_3$ . ..... 74
- Figura 57:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla del metalociclo **M6a** $\cdot 5\text{NO}_3$  y del metalociclo **M6ad** $\cdot 10\text{NO}_3$  y b) catenano **M6a** $\cdot 5\text{NO}_3\subset \text{DN38C10}$ . ..... 76
- Figura 58:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) catenano **M6a** $\cdot 5\text{NO}_3\subset \text{DN38C10}$  y b) ciclofano **DN38C10**. Leyenda: los círculos de color azul cian se corresponden con los protios situados en las cadenas del ciclofano. .... 77
- Figura 59:** Esquema de las velocidades en la escala de tiempos de RMN de los posibles movimientos de los distintos componentes del [2]-catenano. .... 77

<b>Figura 60:</b> ESI-MS (m/z) calculada para: a) $[\text{M6a}\cdot 3\text{PF}_6\subset\text{DN38C10}]^{+2}$ (arriba) y encontrada (debajo) y b) $[\text{M6a}\cdot 2\text{PF}_6\subset\text{DN38C10}]^{+3}$ (arriba) y encontrada (debajo). Los códigos de colores representan: el color rosa a los picos de masa teórica y el violeta a los picos de masa (m/z) encontrados. ....	78
<b>Figura 61:</b> Espectros parciales de $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz, $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla del metalociclo $\text{M4a}\cdot 5\text{NO}_3$ y del metalociclo $\text{M4ad}\cdot 10\text{NO}_3$ , b) catenano $\text{M4a}\cdot 5\text{NO}_3\subset\text{DN38C10}$ (0.5 mM) y c) ciclofano $\text{DN38C10}$ . Leyenda: los círculos de color rojo se corresponden con los núcleos del ciclofano. ....	79
<b>Figura 62:</b> ESI-MS (m/z) calculada para: a) $[\text{M4a}\cdot 3\text{PF}_6\subset\text{DN38C10}]^{+2}$ (arriba) y encontrada (debajo) y b) $[\text{M4a}\cdot 2\text{PF}_6\subset\text{DN38C10}]^{+3}$ (arriba) y encontrada (debajo). Se sigue el mismo código de colores que en la <b>Figura 60</b> . ....	80
<b>Figura 63:</b> Representación esquemática de las estructuras de los ligandos <b>L8-L10</b> , y de sus correspondientes metalociclos de Pt(II) <b>M8-M10</b> . ....	82
<b>Figura 64:</b> Espectros de UV-VIS y cálculo del coeficiente de $\epsilon$ en el tampón Tris-KCl (Ajuste de Lambert-Beer) de: A) <b>L8</b> $\cdot 2\text{NO}_3$ , $\lambda_{\text{max}} = 263$ nm y, B) <b>M8</b> $\cdot 8\text{NO}_3$ , $\lambda_{\text{max}} = 274$ nm. ....	84
<b>Figura 65:</b> Esquema de la desnaturalización térmica del ADN cuádruple marcado en un extremo con el fluoróforo FAM y en el otro extremo con el fluoróforo TAMRA. ....	86
<b>Figura 66:</b> Ejemplo de curva de desnaturalización térmica de una estructura de ADN cuádruple (h-Telo) en tampón cacodilato potásico sin (curva negra) y con compuesto (curva roja) ....	86
<b>Figura 67:</b> Representación de los perfiles de FRET de ds-DNA (A) y de c-Kit1 (B) al interactuar con los compuestos <b>L8-L10</b> , <b>M8-M10</b> y TMPyP4 (control). El tampón utilizado: 60 mM cacodilato potásico, pH = 7.4. Los perfiles de desnaturalización con el resto de los oligonucleótidos se pueden consultar en el anexo (AII4). ....	87
<b>Figura 68:</b> Espectros de dicroísmo circular de la interacción de A) metalociclo <b>M8</b> con ds-DNA; B) metalociclo <b>M8</b> con c-Kit1; C) metalociclo <b>M9</b> con ds-DNA; D) metalociclo <b>M9</b> con c-Kit1; E) metalociclo <b>M10</b> con ds-DNA y F) metalociclo <b>M10</b> con c-Kit1. ....	91
<b>Figura 69:</b> Espectros de dicroísmo circular de la interacción de c-Kit1 a 25°C y 95°C con a) metalociclo <b>M8</b> y b) metalociclo <b>M10</b> . ....	92
<b>Figura 70:</b> Espectros Ultravioleta-Visible de la interacción de A) metalociclo <b>M9</b> con ds-DNA, B) <b>M10</b> con ds-DNA, C) metalociclo <b>M9</b> con c-Kit1 y D) metalociclo <b>M10</b> con c-Kit1. ....	93
<b>Figura 71:</b> Docking molecular: dibujo mostrando los posibles sitios de unión de los metalociclos <b>M8</b> , <b>M9</b> y <b>M10</b> con c-Kit1 y h-Telo. ....	94
<b>Figura 72:</b> Metalociclos de Pt(II) seleccionados. ....	96
<b>Figura 73:</b> Espectros de absorción y cálculo del coeficiente de extinción molar en el tampón Tris-KCl (Ajuste de Lambert Beer) de A) el ligando <b>L13</b> $\cdot 2\text{NO}_3$ ( $\lambda = 352$ nm) y B) metalociclo <b>M13</b> $\cdot 8\text{NO}_3$ . ....	98
<b>Figura 74:</b> Representación de los perfiles de FRET de ds-DNA (A) y de ADN G-cuádruple, h-Telo (B) al interactuar con los compuestos <b>L5</b> , <b>L6</b> , <b>L11-L15</b> y con el compuesto TMPyP4. El buffer utilizado: 60 mM de cacodilato potásico, pH=7.4. ....	99
<b>Figura 75:</b> Variación de la temperatura media de desnaturalización de ct-ADN y h-Telo al añadir concentraciones crecientes del metalociclo <b>M6b</b> (A y B) y <b>M13</b> (C y D). ....	100

<b>Figura 76:</b> Espectros de dicroísmo circular de la interacción de ct-DNA con A) <b>M11</b> y B) <b>M13</b> ; de c-Kit2 con C) <b>M11</b> y D) <b>M13</b> y de h-TERT-s con E) <b>M11</b> y F) <b>M13</b> .....	102
<b>Figura 77:</b> Espectros de UV-Vis para las valoraciones de interacción de ct-ADN con A) <b>M11</b> y B) <b>M13</b> ; c-Kit-2 con C) <b>M11</b> y D) <b>M13</b> ; y h-TERT-s con E) <b>M11</b> y F) <b>M13</b> .....	104
<b>Figura 78:</b> Representación de la variación de $\Delta T_{1/2}$ de h-Telo a concentración 0.2 $\mu$ M en presencia de cantidades crecientes del competidor ct-DNA (0 $\mu$ M, 0.4 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M) en el tampón 5K (95mM de LiCl+10mM cacodilato potásico).....	106
<b>Figura 79:</b> Representación de la variación de $\Delta T_{1/2}$ de c-Kit2 a concentración 0.2 $\mu$ M en presencia de cantidades crecientes del competidor ct-DNA (0 $\mu$ M, 0.4 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M) en el tampón 5K.....	107
<b>Figura 80:</b> Representación de la variación de $\Delta T_{1/2}$ de c-kit-2 a concentración 0.2 $\mu$ M en presencia de cantidades crecientes del competidor ADN G4-nl (0 $\mu$ M, 0.4 $\mu$ M, 2 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M) en el tampón 5K.....	108
<b>Figura 81:</b> Experimento 3D de fluorescencia del metalociclo <b>M13</b> en el tampón Tris-KCl. ..	110
<b>Figura 82:</b> Espectros de UV-Vis para las valoraciones de interacción de <b>M13</b> con A) c-Kit2 y B) ds-DNA. ....	111
<b>Figura 83:</b> a) Espectros de absorción y emisión de <b>M13</b> y <b>L13</b> en Tris-HCl 5 mM, KCl 50 mM, pH= 7.8 y b) Decaimiento del tiempo de vida del estado excitado para <b>M13</b> y <b>L13</b> en Tris-HCl 5 mM, KCl 50 mM, pH= 7.8. Ambos compuestos exhiben un decaimiento mono-exponencial IRF (puntos en gris) = respuesta del equipo (Prompt).....	112
<b>Figura 84:</b> Gráfico de la emisión frente a la absorción en agua de <b>L13</b> y <b>M13</b> y sulfato de quinina (QS) para la evaluación del rendimiento cuántico. ....	113
<b>Figura 85:</b> a) Análisis por ensayos de MTT de la viabilidad celular en diversas líneas durante su exposición (72 horas) a concentraciones crecientes de <b>M13</b> (50 $\mu$ M). Los datos se normalizan con los controles no tratados. La línea punteada se refiere al 50% de la viabilidad celular e indica el IC <sub>50</sub> . Cada punto de datos representa la media $\pm$ SD de las tres repeticiones realizadas para cada experimento representativo, b) Comparación entre el espectro de emisión de <b>M13</b> en células MCF-7 obtenido con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 tras excitar con un láser de 405 nm (área en azul), y el espectro de <b>M13</b> empleando un tampón sin células adquirido en un espectrofluorómetro normal tras la excitación a 350 nm. Los valores de la intensidad de la señal se normalizaron antes del trazado frente a las longitudes de onda de emisión correspondientes, c) Análisis de citometría de flujo de células de U2OS tratadas con el tiempo con 10 o 50 $\mu$ M de <b>L13</b> (gris) y <b>M13</b> (azul) utilizando el láser de 405 nm y el filtro 450/50 (Horizon V450), d) Microscopía en células vivas que muestra la acumulación intracelular con el tiempo de <b>M13</b> dentro de las células U2OS ( $\lambda = 395/25$ nm, $\lambda_{em} = 460/50$ nm) y e) Células MCF-7 fijadas con PFA incubadas durante 30 minutos con 50 $\mu$ M de <b>M13</b> y analizadas con microscopía confocal usando el láser de 405 nm y un objetivo de 63x con aceite de inmersión.....	118
<b>Figura 86:</b> Intensidad de fluorescencia en células U2SO tras la exposición durante 1 hora a <b>M13</b> (azul) y su ligando <b>L13</b> (gris), ambos a concentración 50 $\mu$ M. Las señales de emisión se detectaron después de la excitación con el láser de 355 nm en el canal del DAPI y después de la excitación con el láser de 405 nm en los canales del Horizon V450, Qdot 605 y Qdot 655. ....	119
<b>Figura 87:</b> Imágenes confocales representativas de tinción de inmunofluorescencia con BG4 (rojo) en células U2OS fijadas MeAc, contratintadas con el metalociclo <b>M13</b> (azul).....	122

**Figura 88:** a) Espectro de absorción UV-VIS de **M13** a 10 $\mu$ M y de **M13** con el oligonucleótido c-Kit2; b) Espectros de fluorescencia resultantes de la adición al metalociclo **M13** de cantidades crecientes del oligonucleótido c-Kit2 y por último imágenes de campo brillante de células MCF-7 fijadas con MeOH incubadas con **M13** adquiridas usando el modo DIC de luz transmitida con el láser c) 405 nm y d) 488 nm. .... 124

# Índice de Esquemas

<b>Esquema 1:</b> Diversas formas redox de los viológenos.....	45
<b>Esquema 2:</b> Autoensamblaje de los metalociclos <b>M1-M3</b> previamente reportados por el grupo de investigación que contienen un viológeno en su estructura.....	46
<b>Esquema 3:</b> Rutas sintéticas A y B para la obtención de los ligandos <b>L1-L3</b> previamente reportados (DNP = 2,4-dinitrofenilo, MePy = metilpiridina, MeQ =metilquinolina).....	47
<b>Esquema 4:</b> Resultado de la reacción entre <b>6</b> y 4,4'-bipiridina en función de las condiciones de reacción. ....	48
<b>Esquema 5:</b> Preparación de los ligandos <b>L4-L7</b> usando la ruta sintética B. ....	50
<b>Esquema 6:</b> Formación del complejo de inclusión <b>M7a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> .....	56
<b>Esquema 7:</b> Síntesis del complejo de inclusión <b>M5a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> . ....	57
<b>Esquema 8:</b> Formación del complejo de inclusión <b>M4a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub> .....	59
<b>Esquema 9:</b> Representación de la interconversión entre el metalociclo mononuclear <b>M6a</b> y dinuclear <b>M6ad</b> .....	62
<b>Esquema 10:</b> Representación esquemática de la interconversión entre el metalociclo mononuclear <b>M5a</b> y dinuclear <b>M5ad</b> . ....	65
<b>Esquema 11:</b> Representación esquemática de la interconversión entre el metalociclo mononuclear <b>M4a</b> y dinuclear <b>M4ad</b> ....	67
<b>Esquema 12:</b> Reordenamiento del sistema monómero-dímero mediante la adición de la plantilla 1,5-DHN.....	69
<b>Esquema 13:</b> Reordenamiento del sistema monómero/dímero al adicionar la plantilla de 1,5-DHN. ....	70
<b>Esquema 14:</b> Representación esquemática del reordenamiento del sistema monómero-dímero mediante la adición del ciclofano <b>DN38C10</b> . ....	75
<b>Esquema 15:</b> Representación esquemática del reordenamiento del sistema monómero-dímero mediante la adición del ciclofano <b>DN38C10</b> . ....	78
<b>Esquema 16:</b> Ruta sintética para la preparación de los ligandos <b>L1-L7</b> ·3Cl a partir de sus correspondientes precursores .....	138



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1:</b> Variaciones en los desplazamientos químicos de RMN de $^1\text{H}$ en protones representativos de cada metalociclo <b>M4a,b-M7a,b</b> , comparándolos con los de su correspondiente ligando libre <b>L4-L7</b> en $\text{D}_2\text{O}$ . .....	52
<b>Tabla 2:</b> Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ inducidos por el ensamblaje de los complejos de inclusión entre los metalociclos <b>M4a-M7a</b> y 1,5-DHN en solución acuosa. ....	55
<b>Tabla 3:</b> secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados. En negrita se muestran las guaninas responsables de la formación de la estructura cuádruple. ....	83
<b>Tabla 4:</b> valores de $\Delta T_{1/2}$ de ds-DNA y cuádruple-G a concentración $0.2 \mu\text{M}$ al interactuar con los compuestos <b>L8-L10</b> y <b>M8-M10</b> a concentración $1 \mu\text{M}$ (*compuesto <b>M10</b> a concentración $0.25 \mu\text{M}$ ). .....	88
<b>Tabla 5:</b> secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados.....	97
<b>Tabla 6:</b> valores de $\Delta T_{1/2}$ de ds-ADN y distintas secuencias de ADN-cuádruple a concentración $0.2 \mu\text{M}$ al interactuar con los compuestos <b>M11, M13-M15</b> a concentración $0.4 \mu\text{M}$ . .....	101
<b>Tabla 7:</b> Valores de la selectividad $^{\text{FRET}}\text{S}$ para los metalociclos <b>M6b, M11</b> y <b>M13</b> en el tampón 5K. ....	108
<b>Tabla 8:</b> valores de $\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) de los compuestos <b>L8-L10</b> y <b>M8-M10</b> tras 72h de incubación. ....	115
<b>Tabla 9:</b> Condiciones sintéticas para la obtención de los ligandos <b>L1-L7</b> ·3Cl.....	139



# Índice de Ecuaciones

<b>Ecuación 1:</b> Cálculo de la selectividad <sup>FRET</sup> S.....	108
--	-----



## Abreviaturas, símbolos y acrónimos

**1D** Unidimensional

**2D** Bidimensional

**3D** Tridimensional

**A** Absorbancia

**Å** Ångström ( $10^{-10}$  m)

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**Anal.** Análisis elemental

**ANRORC** Addition of the Nucleophile Ring Opening and Ring Closure

**ARN** Ácido ribonucleico

**°C** Grado centígrado

**calc.** Calculado

**CD** Dicroísmo circular

**COSY** Correlation Spectroscopy

**ct-DNA:** Calf thymus DNA (ADN dúplex)

**d** Doblete

**DFT** Density Functional Theory (teoría del funcional de densidad)

**DEPT** Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

**DHN** Dihidroxi-naftaleno

**DMSO** Dimetilsulfóxido

**DNP** Dinitrofenilo

**ds26** Oligonucleótido de ADN de doble hélice (26 pares de bases)

**$\delta$**  Desplazamiento químico (RMN)

**$\Delta$**  Ebullición

**$\Delta\delta$**  Variación en el desplazamiento químico (RMN)

**$\epsilon$**  Coeficiente de extinción molar ( $L \cdot Mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )

**$\Delta T_{1/2}$**  Incremento de la temperatura media de desnaturalización

**en** Etilendiamina

**enc.** Encontrado

**equiv.** Equivalentes

**ESI** Electro Spray Ionization (ionización por electrospray)

**FAM** 6-Carboxifluoresceína

**FRET** Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia

**HMBC** Heteronuclear Multiple Bond Correlation

**HR-MS** High resolution Mass Spectrometry (espectrometría de masas de alta resolución)

**HSQC** Heteronuclear Single Quantum Correlation

**hTERT** Human Telomerase Reverse Transcriptase (Transcriptasa inversa)

**Hz** Hercio

**IC<sub>50</sub>** Concentraciones de compuesto necesarias para la inhibición del 50% del crecimiento de células

**J** Constante de acoplamiento

**$\lambda$**  Longitud de onda

<b>K<sub>a</sub></b> Constante de asociación	<b>Φ</b> Rendimiento cuántico
<b>L</b> Ligando	<b>qRT-PCR</b> Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>m</b> Multiplete	<b>RMN</b> Resonancia Magnética Nuclear
<b>M</b> Molar	<b>s</b> singulete
<b>MCF7</b> Línea celular del carcinoma de pecho	<b>t</b> triplete
<b>MePy</b> metilpiridina	<b>T</b> temperatura
<b>MeQ</b> metilquinolina	<b>T<sub>1/2</sub></b> Temperatura media de desnaturalización del ADN/ARN
<b>mg</b> Miligramo	<b>t. a.</b> temperatura ambiente
<b>mL</b> mililitro	<b>TAMRA</b> 6-Carboxitetrametilrodamina
<b>mmol</b> milimol	<b>TCSPC</b> Time correlated single photon counting
<b>mM</b> milimolar	<b>TMPyP4</b> tetra-N-metilporfirina
<b>MOFs</b> Metal Organic Framework (estructuras metalorgánicas)	<b>TNT</b> Trinitrotolueno
<b>MTT</b> bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio	<b>Trap</b> Telomere Repeat Amplification Protocol
<b>MW</b> microondas	<b>Tris</b> Tris(hidroximetil)aminometano
<b>m/z</b> relación masa/carga	<b>TTF</b> Tetratiofulvaleno
<b>nm</b> nanómetro (10 <sup>-9</sup> m)	<b>UV-Vis</b> ultravioleta-visible
<b>p.f.</b> punto de fusión	<b>u.m.a.</b> unidades de masa atómica
<b>PDB</b> Protein Data Bank (Banco de Datos de Proteínas)	<b>vol.</b> Volumen
<b>ppm</b> partes por millón (RMN)	<b>μM</b> Micromolar

# 1. INTRODUCCIÓN

## *Introducción I. Química Supramolecular*

### *1.1 Química supramolecular*

La química supramolecular ha experimentado un importante auge en las últimas tres décadas, constituyendo un área de la ciencia altamente interdisciplinar, que abarca aspectos de diversos campos como la química, la física y la biología.<sup>1</sup>

Uno de sus principales propulsores, el ganador del premio nobel Jean Marie Lehn, la definió por primera vez en 1978 como la “*química más allá de la molécula*”.<sup>2</sup> Lehn se refiere así a que el campo de la química supramolecular va más allá de las moléculas individuales formadas a través de la formación de enlaces covalentes, estudiando por lo tanto la forma en la que las moléculas se agrupan mediante interacciones intermoleculares.<sup>3</sup> Estas fuerzas débiles permiten la unión de moléculas de pequeño tamaño para dar lugar a agregados supramoleculares mayores, mediante procesos de asociación bajo estricto control termodinámico denominados procesos de autoensamblaje supramolecular.

### *1.2 Reconocimiento molecular*

En 1894 Emil Fisher afirmaba que una enzima y su sustrato tenían que encajar el uno en el otro como una llave encaja en su cerradura.<sup>4</sup> De esta forma, aunque el químico alemán en aquel entonces no lo generalizó, la idea de moléculas comportándose como llaves y cerraduras está en la base de lo que Lehn llamaría posteriormente reconocimiento molecular.<sup>5</sup>

La química del reconocimiento molecular implica la asociación entre al menos dos entidades moleculares. En dicha unión, una de las moléculas actúa como sustrato o huésped, y es reconocida por la otra que actúa como receptor, dando lugar a un complejo receptor-sustrato. El reconocimiento selectivo del sustrato por parte del receptor se basa en la información molecular almacenada en los agentes que interactúan. Por lo tanto, en lo referido al diseño de receptores moleculares artificiales, éste requiere que dicho

---

<sup>1</sup> Lehn, J. –M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1990**, 29, 1304.

<sup>2</sup> Lehn, J. –M. *Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89.

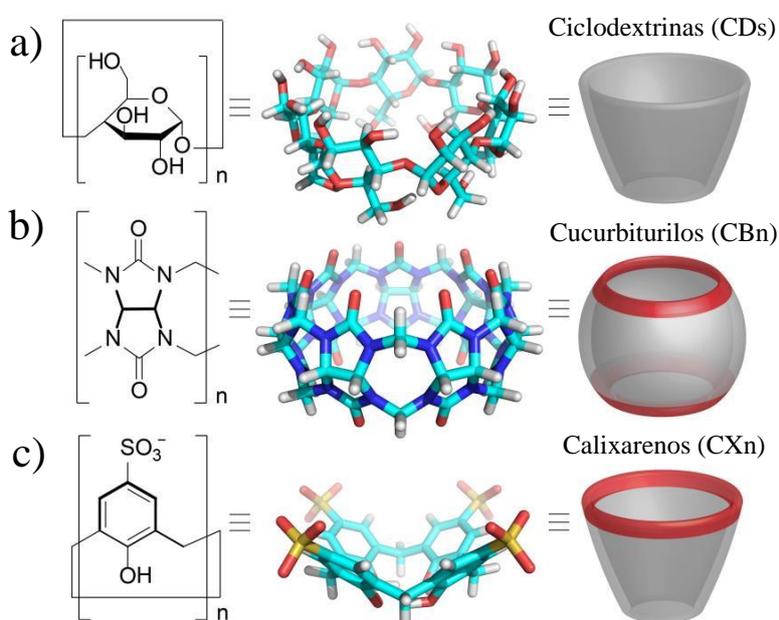
<sup>3</sup> Lehn, J. –M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 4763.

<sup>4</sup> Fisher, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.

<sup>5</sup> Lehn, J. –M. *Struct. Bonding*, **1973**, 16, 1.

receptor posea características estéricas y electrónicas complementarias a las del sustrato, así como un adecuado equilibrio entre flexibilidad y rigidez para que se produzca la asociación.<sup>5</sup>

Actualmente, los procesos de complejación huésped-receptor se han convertido en una estrategia efectiva para conseguir agregados autoensamblados de tamaños nanométricos en agua o disolventes orgánicos, los cuales pueden ser controlados mediante estímulos externos como la luz, el calor, el pH o la presencia de aditivos.<sup>6</sup> Algunos macrociclos como las ciclodextrinas, los calixarenos y más recientemente los cucurbiturilos (**Figura 1**), se han empleado exitosamente para construir nanoarquitecturas multifuncionales como hidrogeles, nanopartículas o estructuras poliméricas, a través de la formación de complejos huésped-receptor estables en disolución acuosa.<sup>7,8</sup>



**Figura 1:** Representación esquemática de los receptores moleculares: a) ciclodextrinas, b) cucurbiturilos y c) calixarenos.

<sup>6</sup> a) Ma, X.; Tian, H. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1971; b) Dong, S.; Zheng, B.; Wang, F.; Huang, F. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1982; c) Wei, P.; Yan, X.; Huang, F. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 815; d) Guo, D-S.; Liu, Y.; *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5907.

<sup>7</sup> Assaf, K. L.; Alnajjar, M. A.; Nau, W. M. *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 1734.

<sup>8</sup> a) Barrow, S. J.; Kaser, S.; Rowland, M. J.; del Barrio, J.; Scherman, O. A. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320; b) Zhang, J.; Ma, P. X. *Nano Today*, **2010**, *5*, 337; c) Kang, Y.; Guo, K.; Li, B. J.; Zhang, S. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 11083; d) Harada, A.; Takashima, Y.; Nakahata, M. *Acc. Chem. Res.*, **2014**, *47*, 2128; e) Xing, P.; Chen, H.; Ma, M.; Xu, X.; Hao, A.; Zhao, Y. *Nanoscale*, **2016**, *8*, 1892; f) Mondal, J. H.; Ghosh, T.; Ahmed, S.; Das, D. *Langmuir*, **2014**, *30*, 11528.

### ***1.3 Autoensamblaje supramolecular***

En la naturaleza podemos encontrar ejemplos de moléculas de gran tamaño y con un gran grado de autoorganización, como la doble hélice del ADN,<sup>9</sup> formados gracias al establecimiento de un gran número de interacciones débiles. De la observación e intento de los científicos de obtener estas estructuras complejas, surge a mediados del siglo XX el concepto del autoensamblaje supramolecular. Jean M. Lehn lo define como “*la evolución hacia el confinamiento espacial a través de la interconexión espontánea de unos pocos o varios componentes, resultando en la formación de entidades discretas o extensas a nivel molecular (covalente) o supramolecular (no covalente)*”.<sup>10</sup> Lehn introduce de este modo la diferenciación entre autoensamblaje molecular y supramolecular, implicando este último el establecimiento de interacciones no covalentes.

La estrategia del autoensamblaje supramolecular se caracteriza por la eficiencia y economía de la información, y ha permitido la síntesis de (supra)moléculas complejas de masas superiores a 1000 u.m.a, inalcanzables por la tradicional química covalente a partir de una o unas pocas subunidades (“building blocks”). Así, se puede decir que el autoensamblaje es la respuesta humana a la estrategia sintética desarrollada por la naturaleza a lo largo de millones de años, y que le permite la obtención eficiente de moléculas de elevada masa y funcionalidad compleja.

Otro aspecto fundamental del autoensamblaje supramolecular es que se caracteriza por la reversibilidad, permitiendo así la autocorrección en el proceso sintético. Dicha reversibilidad se debe al uso de enlaces intermoleculares relativamente débiles, que pueden romperse fácilmente, permitiendo así corregir imperfecciones. De esta forma, se logra formar el producto más estable en las condiciones empleadas. Al variar dichas condiciones el sistema puede verse afectado, evolucionando hacia el producto termodinámicamente más favorable en las nuevas condiciones. En consecuencia, a través de la química supramolecular se puede lograr una amplia variedad estructural, simplemente modificando los componentes estructurales de partida o las condiciones de reacción (pH, concentración, temperatura, etc.).

---

<sup>9</sup> Watson, J. D.; Crick, F. H. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1953**, *18*, 123.

<sup>10</sup> Lehn, J.-M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, *29*, 1304.

En los primeros estudios llevados a cabo de procesos de autoensamblaje en sistemas no biológicos, fundamentalmente en medio orgánico, el enlace de hidrógeno fue el tipo de interacción más empleada, a semejanza de lo que ocurre en la naturaleza.<sup>11</sup> Sin embargo, el uso de otras interacciones débiles como las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , interacciones iónicas o el efecto hidrofóbico, ha proporcionado una mayor robustez a los procesos de autoensamblaje abiótico en medio acuoso. De especial relevancia en el presente trabajo son las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , interacciones débiles que se establecen entre sistemas aromáticos, y cuyo modelo simplificado fue propuesto por Hunter y Sanders en 1990.<sup>12</sup> De la misma forma, el denominado efecto hidrofóbico, que surge del desplazamiento de las moléculas de disolvente en el seno de una disolución acuosa, debe ser tenido siempre en cuenta en el desarrollo de procesos de autoensamblaje en este medio.<sup>13</sup>

### ***1.4 Autoensamblaje dirigido por centros metálicos***

La incorporación hace tres décadas del uso de enlaces de coordinación con centros metálicos, ha expandido enormemente el campo de posibilidades de la química supramolecular,<sup>14</sup> en especial a través del desarrollo de metalomacrociclos capaces de comportarse como receptores moleculares que son especies autoensambladas de forma eficiente mediante la utilización de ácidos y bases de Lewis como bloques de construcción adecuados.

Durante la década de los años 70 se prepararon diferentes ejemplos seminales de metalomacrociclos empleando centros metálicos de Pt(II), Pd(II), Rh(I) y Ir(I), siendo uno de los primeros el metalociclo de Cu(II) diseñado por Maverick como receptor de diaminas cíclicas. Dicho complejo se ensambló a partir de iones de Cu(II) y ligandos con dos bis ( $\beta$ -dicetonas) como puntos de coordinación.<sup>15</sup>

Desde entonces, se han obtenido una amplia variedad de estructuras metalocíclicas con propiedades interesantes como receptores moleculares, empleando diferentes metales como Os(II), Re(II), Au(I), Pd(II) y Pt(II). Así, en los años 90 destacan

---

<sup>11</sup> a) Hamilton, A. D. *Comprehensive supramolecular chemistry*; Lehn, J.-M., Ed.; Pergamon: New York, **1996**; vol. 9; cap. 18; b) Prins, L. J.; Reinhoudt, D. N.; Timmerman, P. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2382.

<sup>12</sup> Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5525.

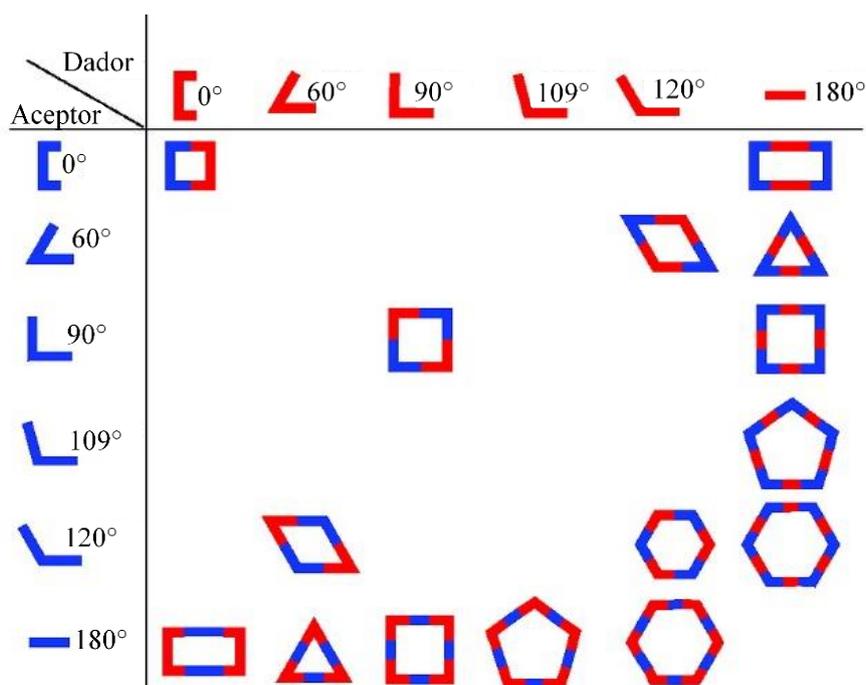
<sup>13</sup> Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. *J. Phys. Chem.* **2002**, *106*, 521.

<sup>14</sup> Lehn, J.-M.; Rigault, A.; Siegel, J.; Harrowfield, J.; Chevrier, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1987**, *84*, 2565.

<sup>15</sup> Maverick, A. W.; Klavetter, F. E. *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 4129.

los trabajos de Fujita y Stang, que iniciaron el desarrollo de la metodología del enlace direccional para el ensamblaje de sus metalomacrociclos de Pt(II).

La estrategia del enlace direccional implica la utilización de precursores moleculares rígidos, con una direccionalidad fijada, y el empleo de una estequiometría de los componentes apropiada. Esta metodología ha permitido la construcción de macrociclos con la forma del polígono deseado, mediante el diseño racional de los ligandos orgánicos (dadores, bases de Lewis), y de los precursores metálicos que ocuparán los bordes y vértices de la estructura (aceptores, ácidos de Lewis). Los polígonos regulares fueron los primeros objetivos a conseguir con la estrategia del enlace direccional, empleando la tradicional síntesis orgánica y organometálica.<sup>16</sup> Los polígonos regulares convexos requieren ángulos internos idénticos de menos de  $180^\circ$  y lados de la misma longitud. Al romper dicho polígono, cada componente consiste en un fragmento con no más de dos ejes de simetría (**Figura 2**).<sup>17,18</sup>



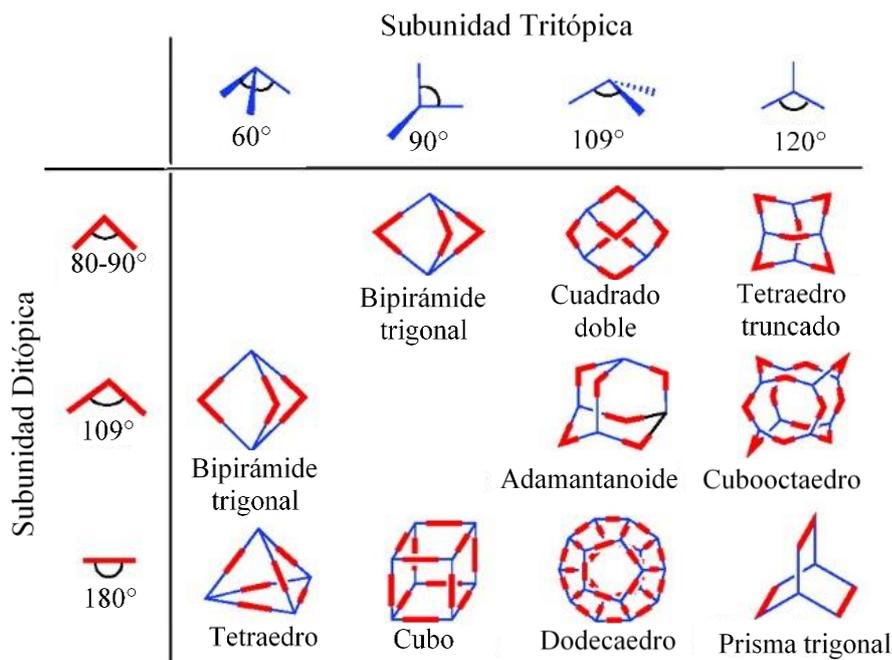
**Figura 2:** Ensamblaje de polígonos 2D a partir de precursores dadores y aceptores empleando la estrategia del enlace direccional.

Siguiendo esta misma estrategia, pero introduciendo ahora componentes tritópicos como dadores, se pueden sintetizar fácilmente estructuras 3D (**Figura 3**).

<sup>16</sup> Cook, T. R.; Zheng, Y.-R.; Stang, P. J. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 734.

<sup>17</sup> Chakrabarty, R.; Mukherjee, P. S.; Stang, P. J. *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6810.

<sup>18</sup> Stricklen, P.; Verkade, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2494.



**Figura 3:** Ensamblaje de polígonos 3D a partir de la combinación de precursores ditópicos y tritópicos empleando la estrategia del enlace direccional.

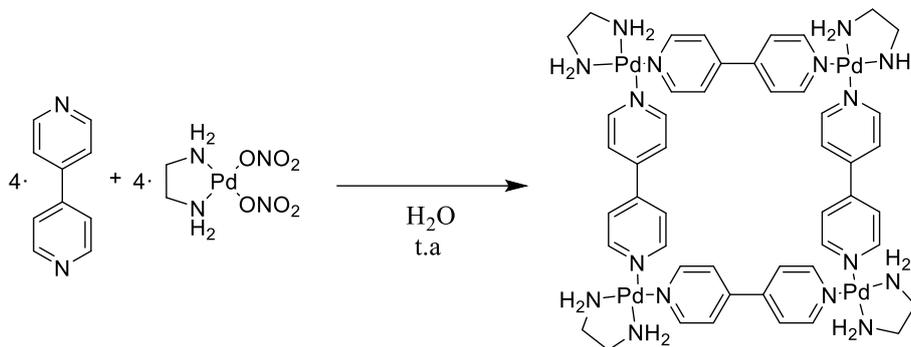
### 1.5 Autoensamblaje supramolecular dirigido por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) con ligandos piridínicos

El uso de centros metálicos de Pd(II) y Pt(II), en combinación con ligandos nitrogenados, ha resultado ser una excelente estrategia para la preparación de estructuras metalocíclicas. En particular, el uso de estos centros metálicos en combinación con la 4,4'-bipiridina y ligandos similares, ha sido especialmente útil en la síntesis de estructuras moleculares 2D y 3D. El éxito de esta aproximación se basa en la diversidad estructural de los ligandos basados en la piridina, la geometría de los centros metálicos y la labilidad modulable del enlace de coordinación, permitiendo la formación de las especies bajo control termodinámico en diversas condiciones de reacción.<sup>16-19</sup>

En 1990 y 1991, Fujita y colaboradores presentan el primer ejemplo de este tipo de compuestos a través de dos publicaciones, trabajos en los que se documentan la formación de tetrámeros cíclicos a partir de un ligando puente no quelatante y un complejo planocuadrado de Pd(II) con dos ligandos lábiles, fácilmente desplazables, y en las otras dos posiciones *cis* un ligando quelatante (etilendiamina, **Figura 4**). El metalociclo obtenido por Fujita presenta una cavidad hidrofóbica, que permite en

<sup>19</sup> García, M. D.; Alvarino, C.; López-Vidal, E. M.; Rama, T.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Inorg. Chim. Acta.* **2014**, *417*, 27.

disolución acuosa albergar compuestos orgánicos aromáticos como el 1,3,5-trimetoxibenceno.<sup>20</sup>



**Figura 4:** Autoensamblaje de 4,4'-bipiridina y un complejo planocuadrado de Pd(II) para formar el primer metalociclo cuadrangular obtenido por Fujita.

Posteriormente, en 1995, Stang y colaboradores llevaron a cabo la síntesis del mismo metalociclo en medio orgánico ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), empleando complejos de Pd(II) y Pt(II) con las posiciones *cis*-bloqueadas con fosfinas, y ligandos triflatos fácilmente desplazables, lo que confiere a la estructura una elevada solubilidad en disolventes orgánicos. Estos trabajos demuestran la versatilidad que ofrecen el ensamblaje de los ligandos piridínicos y los centros metálicos de Pd(II) y Pt(II), no limitándose al medio acuoso.<sup>21</sup>

Debido a la labilidad del enlace Pd-N a temperatura ambiente, en el proceso de ensamblaje con los ligandos piridínicos, se establece instantánea y espontáneamente un equilibrio entre todas las especies posibles, que conduce a la estructura más estable termodinámicamente mediante procesos de autocorrección. Además, dicha labilidad proporciona al sistema la capacidad de adaptarse inmediatamente a cambios que se puedan producir en el medio y que cambien el equilibrio. De este modo, las especies obtenidas por el autoensamblaje de los ligandos con los centros metálicos de Pd(II) pueden reordenarse a temperatura ambiente, como consecuencia de la aplicación de un factor externo (adición de plantilla, cambio de pH, variación en la concentración o variación de la fuerza iónica).<sup>22</sup> Sin embargo, la labilidad del enlace de Pd-N supone una desventaja a la hora de tratar de llevar a cabo la caracterización de las especies obtenidas,

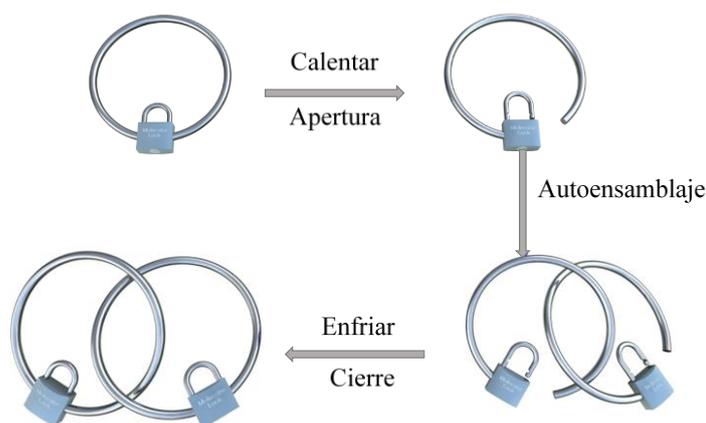
<sup>20</sup> a) Fujita, M.; Yazaki, J.; Ogura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5645; b) Fujita, M.; Yazaki, J.; Ogura, K. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 5589.

<sup>21</sup> a) Stang, P. J.; Cao, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 4981; b) Stang, P. J.; Cao, D. H.; Saito, S.; Arif, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 6273.

<sup>22</sup> Kubota, Y.; Sakamoto, S.; Yamaguchi, K.; Fujita, M. *Proc. Natl. Ac. Sci. U.S.A.* **2002**, *99*, 4854.

debido a la baja estabilidad de las supramoléculas formadas cuya identidad sólo existe en disolución.

Con esta limitación en mente, Fujita amplió el campo de estudio del autoensamblaje dirigido por centros metálicos de Pd(II) a análogos de Pt(II). El enlace de coordinación Pt(II)-N es más inerte que el de Pd(II)-N, lo que implica la necesidad de calentar el sistema, o labilizar los enlaces de alguna otra forma, para que tenga lugar el autoensamblaje de los componentes bajo control termodinámico. Fujita desarrollo así la estrategia sintética conocida como “*Molecular Lock*” (**Figura 5**).<sup>23</sup> Las estructuras autoensambladas resultantes de la combinación de los centros metálicos de Pt(II) y los ligandos piridínicos, se encuentran en equilibrio termodinámico a altas temperaturas, pero son estables cinéticamente a temperatura ambiente, lo que permite aislarlas y facilita su caracterización respecto a sus análogos de Pd(II).

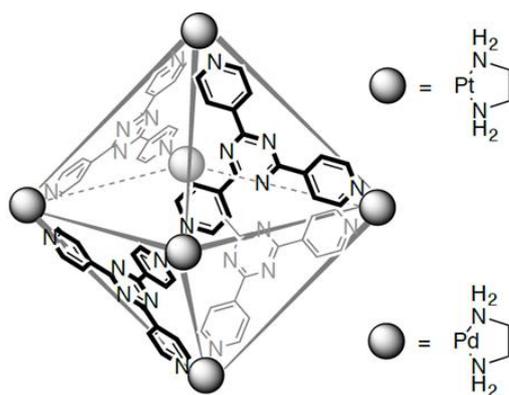


**Figura 5:** Representación esquemática de la estrategia “*Molecular Lock*”.

A partir de la obtención de estas primeras estructuras supramoleculares, el campo del ensamblaje con centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) experimentó un importante auge, lo que permitió la formación de otras especies bidimensionales como triángulos, cuadrados, pentágonos, etc. Así, en años posteriores, Fujita y colaboradores documentan el primer ejemplo de una estructura 3D (un tetraedro truncado), mediante la estrategia conocida como “*molecular panelling*”.<sup>24</sup>

<sup>23</sup> a) Fujita, M. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 53; b) Yu, S. Y.; Huang, H.; Liu, H. B.; Chen, Z. N.; Zhang, R. B.; Fujita, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2003**, *42*, 686.

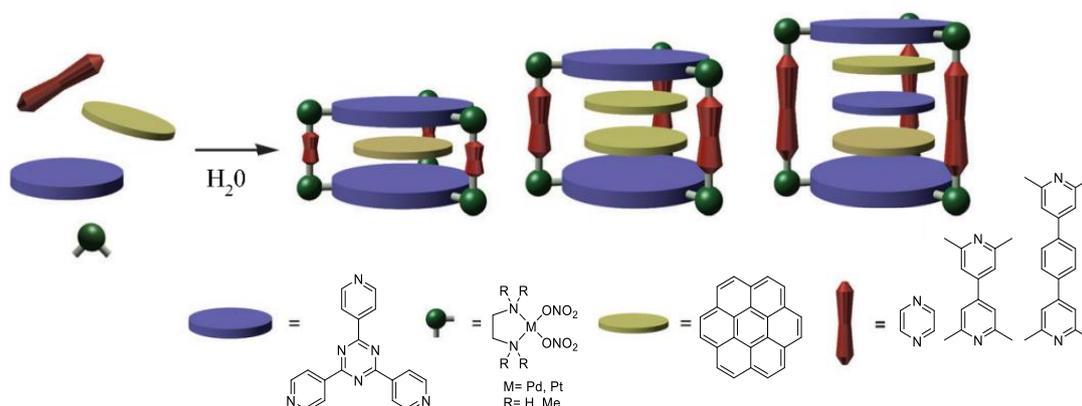
<sup>24</sup> Kusukawa, T.; Fujita, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 13576.



**Figura 6:** Tetraedro truncado documentado por Fujita y colaboradores.

La importancia de estas especies no sólo radica en su inherente complejidad estructural, en ocasiones incluso a partir de un elevado número de componentes, sino en su potencial capacidad de actuar como receptores de moléculas de interés.

En este contexto, destacan los trabajos de Fujita en los que documenta la formación de una caja autoensamblada a partir de un ligando piridínico con una unidad de triazina, un centro metálico de Pd(II) o Pt(II) y un tercer componente (**Figura 7**). En función del tamaño del tercer componente y de la metalocaja resultante se obtienen complejos que contienen 1, 2 o 3 sustratos. Así, si el tercer componente es la pirazina, se forma un complejo 1:1 en medio acuoso, si es la tetrametil-4,4'-bipiridina se forma un complejo 2:1 y, por último, si el tercer componente es un derivado más largo de la tetrametil-4,4'-bipiridina se obtiene un complejo 3:1. Las fuerzas que provocan la inclusión de los sustratos en el interior de la cavidad son el efecto hidrofóbico y las interacciones  $\pi$ - $\pi$ .<sup>25</sup>



**Figura 7:** Formación de complejos de inclusión entre receptores en forma de caja, autoensamblados por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) y sustratos aromáticos.

<sup>25</sup> Klosterman, J. K.; Yamauchi, Y.; Fujita, M. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, 38, 1714.

## 1.6 Moléculas mecánicamente entrelazadas: Catenanos.

Se puede decir que, en general, una molécula mecánicamente entrelazada es una arquitectura molecular en la cual sus componentes se encuentran unidos por causa de su topología, y no por el efecto de enlaces químicos.<sup>26</sup> Así, un [2]-catenano es quizás el ejemplo más sencillo de este tipo de agregados, al estar formado por 2 anillos entrelazados físicamente en forma de eslabones de una cadena, sin que exista ninguna unión química (enlace) entre ellos. Si generalizamos esta definición, un [*n*]-catenano sería una entidad molecular formada por *n* anillos que se encuentran entrelazados mecánicamente. El estudio de los catenanos ha conducido a importantes avances, no sólo en el campo de la química supramolecular, sino también en el desarrollo de otras disciplinas como la biología o la física.<sup>27</sup>

En 1989 Stoddart y colaboradores documentan por primera vez la formación de un [2]-catenano debido al establecimiento de interacciones  $\pi$ - $\pi$ . La formación del catenano se lleva a cabo en acetonitrilo combinando el compuesto **A1** con el macrociclo **A2** y 1,4-bis(bromometilbenceno) **A3** (**Figura 8**). El mecanismo propuesto establece que en primer lugar se produciría la interacción entre el compuesto **A1** y el 1,4-bis(bromometilbenceno) **A3**, para dar lugar a una especie tricatiónica con una bipyridina cargada altamente  $\pi$ -deficiente, lo que provocaría el establecimiento de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  con el macrociclo  $\pi$ -excedente, **A2**, para a continuación producirse el cierre de anillo que conduciría a la formación del [2]-catenano.<sup>28</sup>

Desde entonces, se obtuvieron diversos ejemplos de moléculas entrelazadas gracias al establecimiento de este tipo de interacciones.<sup>29</sup> Así, además de las interacciones  $\pi$ - $\pi$ , el efecto hidrofóbico también puede ser empleado para favorecer termodinámicamente la formación de macrociclos en disolución acuosa.

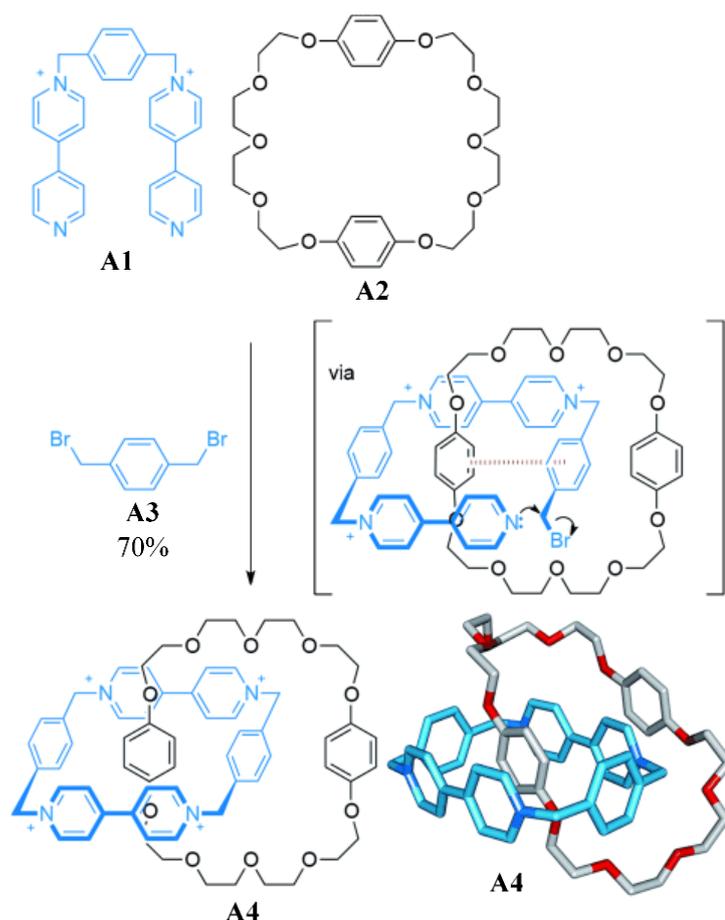
---

<sup>26</sup> Stoddart, J. F.; Carson J. B. *The Nature of the Mechanical Bond: From Molecules to Machines*. Wiley, **2016**.

<sup>27</sup> Gil-Ramírez, G.; Leigh, D. A.; Stephens, A. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 6110.

<sup>28</sup> Brown, C. L.; Philp, D.; Stoddart, J. F. *Synlett* **1991**, *7*, 459.

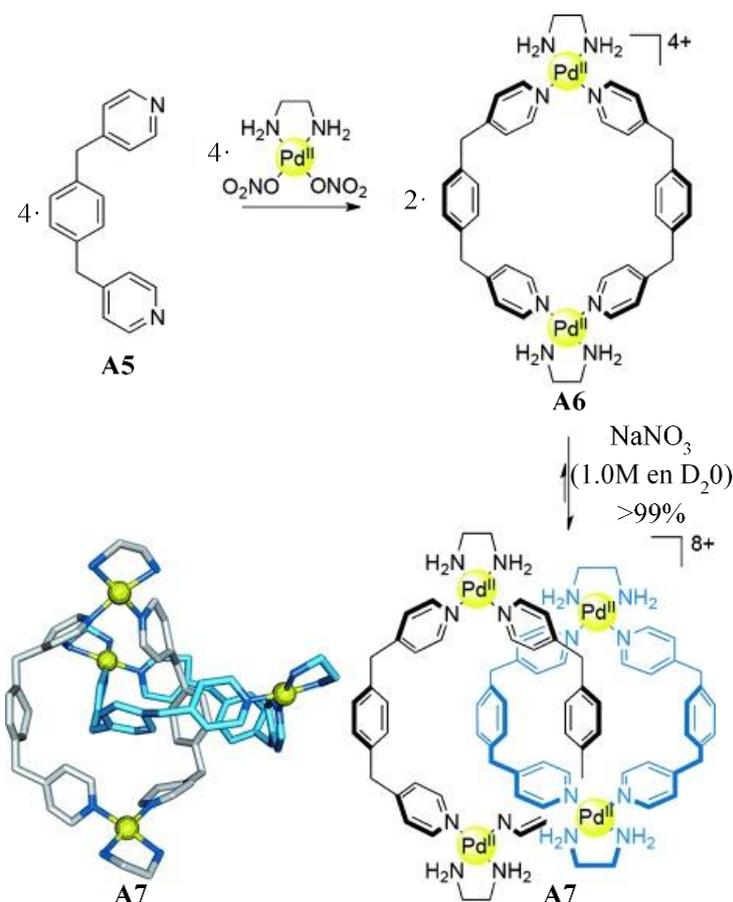
<sup>29</sup> Barin, G.; Coskun, A.; Fouda, M. M. G.; Stoddart, J. F. *ChemPlusChem*. **2012**, *77*, 159.



**Figura 8:** Primer [2]-catenano reportado por Stoddart, formado gracias al establecimiento de interacciones  $\pi$ -dadoras/ $\pi$ -aceptoras.

Este fenómeno de catenación por efecto hidrofóbico en especies autoensambladas fue descubierto por casualidad, en los conocidos como “*magic rings*” de Fujita (**Figura 9**). Así, en disolución acuosa, el macrociclo **A6-Pd(II)** se interconvierte espontáneamente en el [2]-catenano **A7-Pd(II)**, gracias a la labilidad a temperatura ambiente del enlace Pd(II)-N. A concentraciones bajas, el equilibrio se desplaza hacia la formación del macrociclo **A6-Pd(II)** y, por lo contrario, a concentraciones altas o en presencia de sales que incrementen el efecto hidrofóbico, se forma cuantitativamente el correspondiente [2]-catenano (**Figura 9**).<sup>30</sup>

<sup>30</sup> Fujita, M.; Ibukuro, F.; Hagihara, H.; Ogura, K. *Nature*, **1994**, 367, 720.



**Figura 9:** Síntesis de un [2]-catenano “Magic ring” de Fujita. La coordinación reversible del ligando **A5** con Pd(II) genera una mezcla interconvertible del macrociclo **A6**-Pd(II) y el [2]-catenano **A7**-Pd(II), con el [2]-catenano favorecido termodinámicamente a altas concentraciones a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno.

Además de [2]-catenanos, en la literatura encontramos la formación de catenanos lineales con un mayor número de anillos entrelazados, como el [3]-catenano de Sauvage y Weiss,<sup>31</sup> o el [5]-catenano de Stoddart,<sup>32</sup> entre otros muchos ejemplos.

Posteriormente a los trabajos comentados, se documentó la formación de [*n*]-catenanos con más puntos de entrecruzamiento, dando lugar a diversas topologías complejas, como nudos de Salomón,<sup>33</sup> anillos de Borromeo,<sup>34</sup> o estrellas de David.<sup>35</sup> Por ejemplo, la estrella de David, descrita por David Leigh y colaboradores, consiste en un [2]-catenano con un triple entrecruzamiento, obtenido a partir de la metátesis de alquenos preorganizados espacialmente de forma adecuada (**Figura 10**).<sup>35</sup>

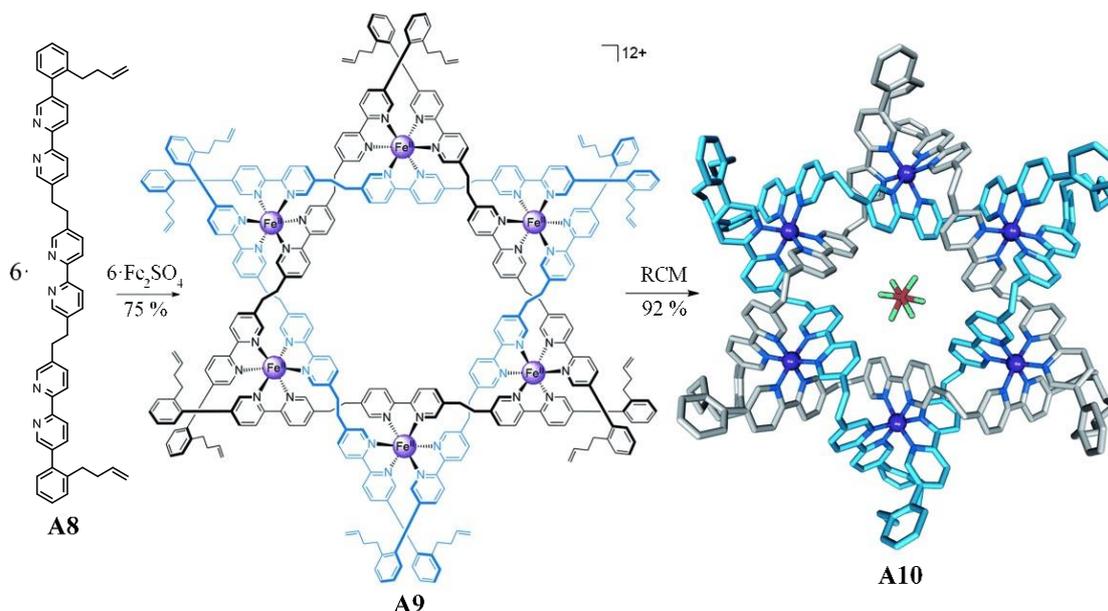
<sup>31</sup> Sauvage, J.-P.; Weiss, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 6108.

<sup>32</sup> Amabilino, D. B.; Ashton, P. R.; Reder, A. S.; Spencer, N.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 433.

<sup>33</sup> Peinador, C.; Blanco, V.; Quintela, J. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 620.

<sup>34</sup> Huang, S.-L.; Lin, Y.-J.; Hor, T. S. A.; Jin, G.-X. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8125.

<sup>35</sup> Leigh, D. A.; Pritchard, R. G.; Stephens, A. J. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 978.



**Figura 10:** Síntesis de un [2]-catenano con topología de estrella de David.

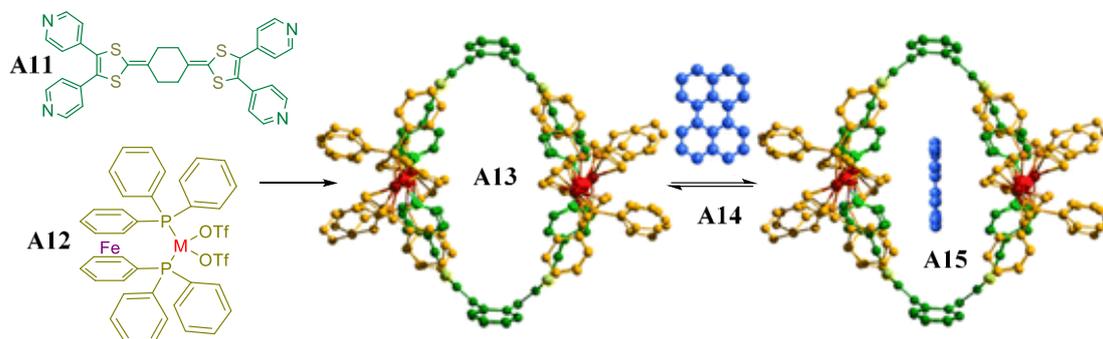
### 1.7 Aplicaciones de los compuestos obtenidos mediante autoensamblaje dirigido por centros metálicos

Los metalociclos con metales de transición presentan, debido a sus propiedades, aplicaciones en diversos campos. Muchas de estas propiedades, como veremos, están asociadas al hecho de que muchos metalomacrociclos presentan cavidades de dimensiones y características adecuadas para su comportamiento como receptores moleculares. Además, una adecuada elección de ligandos y centros metálicos puede modular las propiedades de la estructura autoensamblada, dando lugar a interesantes comportamientos redox, fotofísicos, etc.

Por ejemplo, el interés actual en el desarrollo de los MOFs,<sup>36</sup> ha aumentado la búsqueda de ligandos con propiedades redox. En este contexto, se han documentado diversos metalociclos con propiedades redox, como los contenedores descritos por Sallé con seis centros redox y con capacidad para albergar una molécula de perileno (**Figura 11**). Dichos contenedores se forman por el ensamblaje de un ligando derivado del tiafulvaleno tetratópico (posee cuatro piridinas en los extremos que se pueden coordinar a centros metálicos), con centros metálicos de paladio y platino. Los estudios de voltametría cíclica del contenedor resultante muestran dos procesos oxidativos, tanto para

<sup>36</sup> Yin, Z.; Zhou, Y.-L.; Zeng, M.-H.; Kurmoo, M. *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 5258.

el contenedor de paladio como el de platino, atribuibles a TTF y a las unidades de ferroceno, con cuatro electrones intercambiados en cada caso.<sup>37</sup>



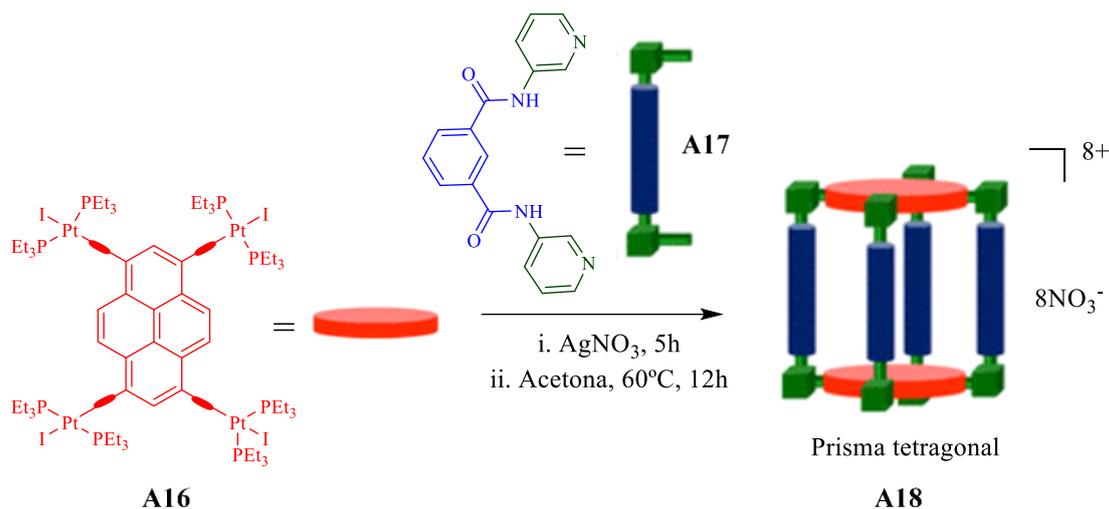
**Figura 11:** Contenedor descrito por Sallé con seis centros redox (uno por cada ligando y uno por cada centro metálico) capaz de encapsular una molécula de perileno.

También se han mostrado ejemplos de metalociclos con interesantes propiedades fotofísicas, debido principalmente a las características de sus componentes de partida. Además, en los contenedores supramoleculares con centros metálicos de platino, se comprobó que las propiedades emisivas de los constituyentes disminuyen en presencia del platino con respecto al ligando libre.<sup>38</sup>

Además, los contenedores supramoleculares pueden actuar como sensores, interaccionando con un determinado sustrato y generando una respuesta óptica. En este contexto, Mukherjee y colaboradores han presentado recientemente un prisma tetragonal (**Figura 12**), que presenta propiedades emisivas debido a la presencia en su estructura de dos unidades de pireno.

<sup>37</sup> Bivaud, S.; Goeb, S.; Croué, V.; Dron, P. I.; Allain, M.; Sallé, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10018.

<sup>38</sup> a) Chen, J. S.; Zhao, G. J.; Cook, T. R.; Sun, X. F.; Yang, S. Q.; Zhang, M. X.; Han, K. L.; Stang, P. J. *J. Phys. Chem. A* **2012**, *116*, 9911; b) Chen, J. S.; Zhao, G. J.; Cook, T. R.; Han, K. L.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6694.



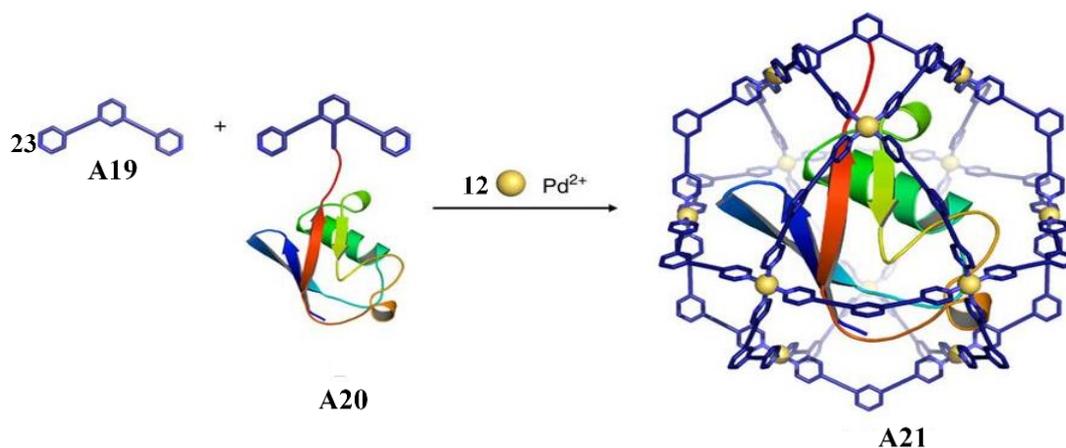
**Figura 12:** Autoensamblaje de un prisma tetragonal.

El prisma tetragonal diseñado tiene la capacidad de actuar como sensor de compuestos nitroaromáticos (2,4-dinitrotolueno, 1,3,5-trinitrotolueno, y ácido pícrico). Así, al ir adicionando cantidades crecientes de TNT, las propiedades emisivas del contenedor supramolecular van disminuyendo.<sup>39</sup>

Ciertas propiedades de los contenedores supramoleculares los hacen especialmente interesantes en el campo de la biología. Actualmente, los avances en el autoensamblaje dirigido por centros metálicos, han permitido la obtención de metalocajas de tamaño comparable al de las biomoléculas permitiendo su encapsulación, pudiendo actuar así como chaperonas moleculares. Así, por ejemplo, se ha preparado un complejo Pd<sub>12</sub>L<sub>24</sub> con forma esférica para la encapsulación de una proteína reguladora, la ubiquitina. El procedimiento consiste en adicionar un ligando bidentado unido a una ubiquitina a una disolución de Pd(II) y de un ligando adicional (**Figura 13**). La obtención de la esfera correspondiente encapsulando una ubiquitina fue corroborada por RMN, ultracentrifugación y cristalografía de Rayos X.<sup>40</sup>

<sup>39</sup> Shanmugaraju, S.; Jadhav, H.; Patil, Y. P.; Mukherjee, P. S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 13072.

<sup>40</sup> a) Ueno, T.; Watanabe, Y.; *Coordination Chemistry in Protein Cages: Principles, Design, and Applications*. Wiley-VHC, Weinheim, **2013**; b) Fujita, D.; Suzuki, K.; Sato, S.; Yagi-Utsumi, M.; Yamaguchi, Y.; Mizuno, N.; Kumasaka, T.; Takata, M.; Uchiyama, S.; Kato, K.; Fujita, M. *Nature Commun.* **2012**, *3*, 1093.

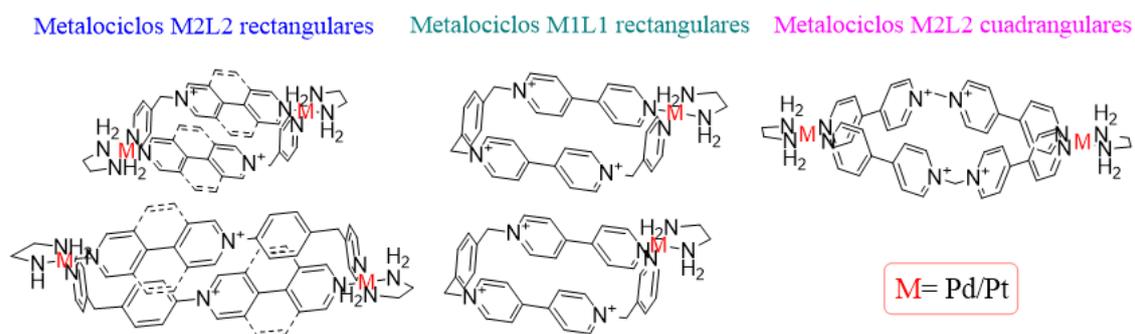


**Figura 13:** Síntesis de una esfera  $M_{12}L_{24}$  acomodando una molécula de la proteína ubiquitina.

## 1.8 Antecedentes

### 1.8.1 Ensamblaje de ligandos derivados de *N*-monoalquil-4,4'-bipiridinio y 2,7-diazapireno con centros metálicos planocuatros de Pd(II) y Pt(II)

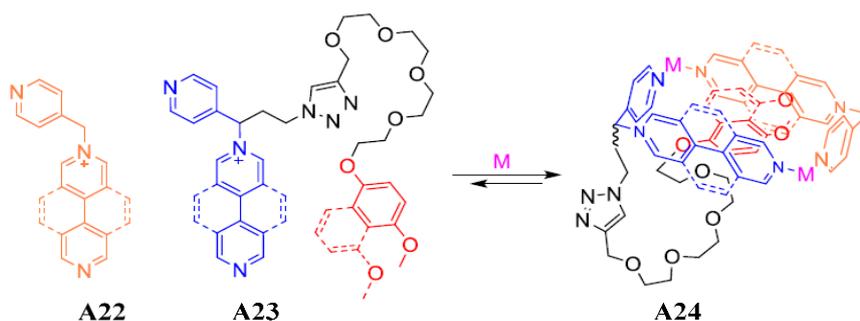
En el contexto del autoensamblaje dirigido por centros metálicos, el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo la presente tesis, ha desarrollado durante la última década una estrategia de ensamblaje de ligandos derivados de *N*-monoalquil-4,4'-bipiridina/2,7-diazapireno con centros metálicos de Pd(II) y Pt(II), que ha permitido la obtención de metalociclos con diversos tamaños, formas, número de cargas, etc. Algunos ejemplos representativos de dichos metalociclos se presentan en la **Figura 14**.



**Figura 14:** Ejemplos de metalociclos desarrollados por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo.

Recientemente, el grupo ha expandido el estudio hacia la formación de metalociclos funcionalizados que han permitido, por ejemplo, la obtención de pseudo[1]rotaxanos empleando la estrategia del autoensamblaje dirigido por centros metálicos y los procesos de autoclasificación social integrativos (**Figura 15**).<sup>41</sup>

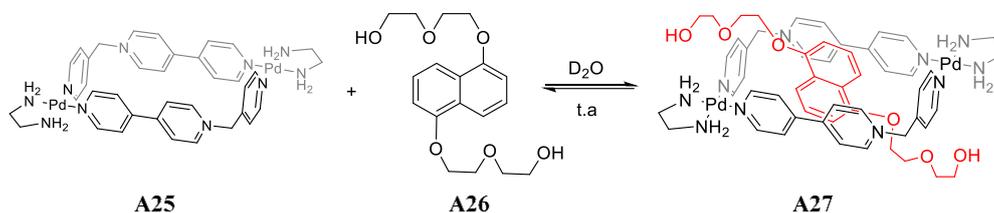
<sup>41</sup> Rama, T.; Blanco-Gómez, A.; Neira, I.; Domarco, O.; García, M. D.; Quintela, J. M.; Peinador, C. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 16743.



**Figura 15:** Estrategia sintética para la obtención de pseudo[1]rotaxanos.

### 1.8.2 Formación de complejos de inclusión y de moléculas mecánicamente entrelazadas

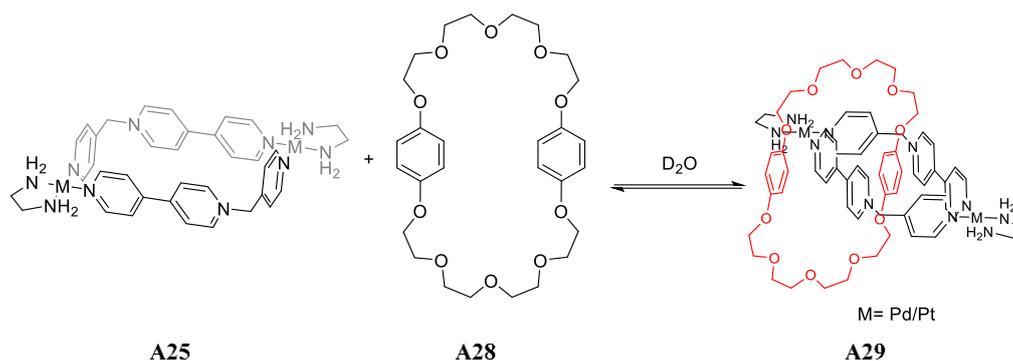
Debido a la cavidad  $\pi$ -deficiente que presentan los metalociclos diseñados en el grupo de investigación, se ha estudiado con éxito su potencial para actuar como receptores de sustratos de interés ambiental  $\pi$ -excedentes. A modo de ejemplo, se ha estudiado la formación del complejo de inclusión de la **Figura 16** con un sustrato derivado del 1,5-dioxinaftaleno. Los cambios observados en el espectro de RMN correspondiente y el establecimiento de una banda de transferencia de carga seguida por UV-VIS permitieron confirmar la formación del complejo de inclusión 1:1.<sup>42</sup>



**Figura 16:** Formación de un complejo de inclusión 1:1.

Una vez verificada la capacidad de los metalociclos para albergar sustratos en su cavidad, se estudió la posibilidad de formar moléculas mecánicamente entrelazadas haciendo uso del establecimiento de interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el metalociclo  $\pi$ -deficiente y un sustrato ciclofánico  $\pi$ -excedente. Así, a modo de ilustración y siguiendo con el metalociclo del ejemplo anterior, se llevó a cabo la formación del [2]-catenano de la **Figura 17** empleando como sustrato un ciclofano derivado de la hidroquinona. La formación del [2]-catenano fue confirmada por RMN 1D y 2D, y en el caso del metalociclo de Pt(II) también por espectrometría de masas.

<sup>42</sup> Chas, M.; Abella, D.; Blanco, V.; Pía, E.; Blanco, G.; Fernández, A.; Platas-Iglesias, C.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 8572.



**Figura 17:** Formación de un [2]-catenano

### 1.8.3 *Sistemas constitucionalmente dinámicos*

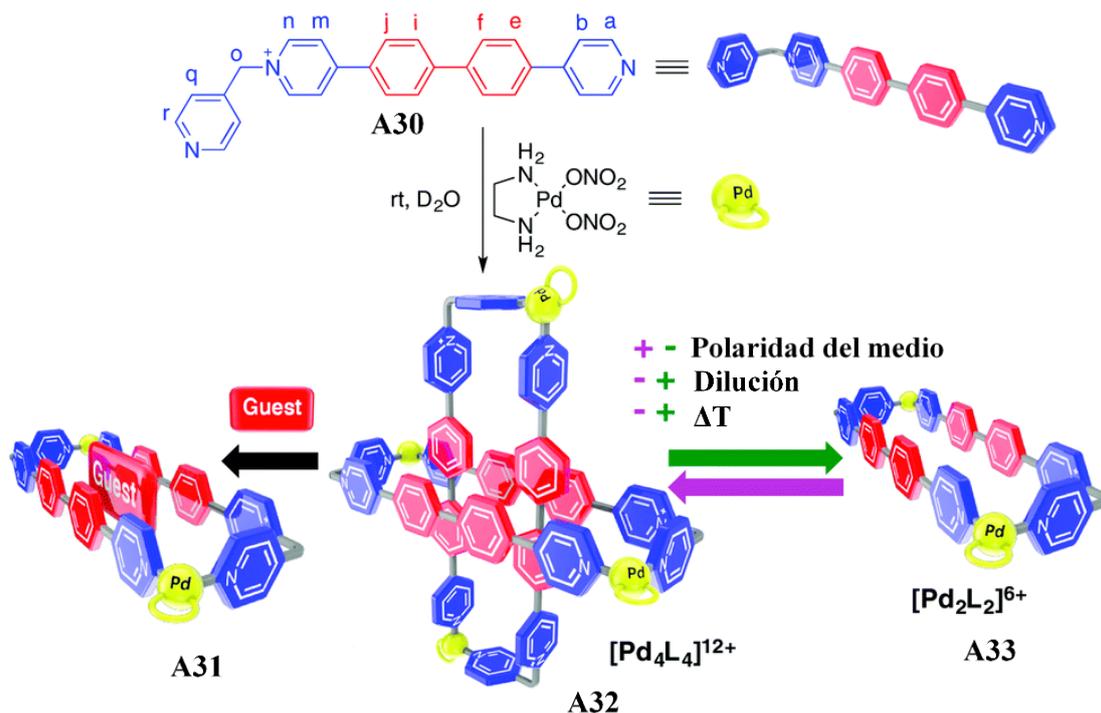
Uno de los objetivos fundamentales de la química supramolecular es la obtención de sistemas autoensamblados constitucionalmente dinámicos en los que se pueda controlar la composición del sistema en función de estímulos.<sup>43</sup> La naturaleza es, sin lugar a dudas, experta en crear arquitecturas complejas funcionales a través de la regulación espacial y temporal del ensamblaje de constituyentes simples.<sup>44</sup>

Siguiendo con esta línea de investigación, el grupo ha documentado varios ejemplos de este tipo de sistemas constitucionalmente dinámicos, como por ejemplo la formación de un sistema en el que el ensamblaje dirigido por Pd(II) de un ligando en “forma de L” puede conducir hacia la formación del correspondiente metalociclo  $[\text{Pd}_2\text{L}_2]^{+6}$  y/o el complejo anillo dentro de anillo  $[\text{Pd}_4\text{L}_4]^{+12}$ . La especiación de este sistema se consiguió controlar por medio de variaciones en la polaridad del disolvente, en la dilución, en la temperatura y mediante la adición de plantillas (**Figura 18**).<sup>45</sup>

<sup>43</sup> Lehn, J.-M. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2015**, *54*, 3276.

<sup>44</sup> De, S.; Mahata, K.; Schmittel, M. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 1555.

<sup>45</sup> Alvariño, C.; Platas-Iglesias, C.; Blanco, V.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Dalton Trans.* **2016**, *45*, 11611.



**Figura 18:** Sistema constitucionalmente dinámico desarrollado por el grupo de investigación. Estructura del metalociclo, el catenano y el complejo de inclusión formados.

#### 1.8.4 Estudios de interacción con el ADN

La información genética de la mayoría de los organismos se encuentra almacenada en el ADN, razón por la cual, esta biomolécula es la principal diana farmacológica de muchos compuestos anticancerígenos. Por ejemplo, los metalofármacos más empleados en quimioterapia son el cisplatino y sus análogos,<sup>46</sup> los cuales se unen coordinativamente al ADN. En este contexto, la mayoría de las investigaciones se han centrado en la búsqueda de agentes alquilantes del ADN, pero también se ha explorado la interacción de moléculas pequeñas con la biomolécula de ADN, compuestos que podrían atravesar fácilmente la membrana, con particular énfasis en la intercalación entre pares de bases o unión al surco. Ambos tipos de unión han dado lugar al desarrollo de fármacos clínicos.<sup>47</sup>

En contraposición con la química sintética covalente, el autoensamblaje dirigido por centros metálicos permite crear supramoléculas de dimensiones nanométricas adecuadas para unirse eficientemente al ADN.<sup>24a,48</sup> En este contexto, los ligandos y

<sup>46</sup> a) Hannon, M. J.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280; b) Lippert, B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug*, Wiley-VHC, Weinheim, **1999**; c) Harper, B. W.; KrauseHeuer, A. M.; Grant, M.P.; Manohar, M.; Garbutchcon-Singh, K. B.; Aldrich-Wright, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 7064.

<sup>47</sup> Terenzi, A.; Ducani, C.; Blanco, V.; Zerzankova, L.; Westendorf, A. F.; Peinador, C.; Quintela, J. M.; Bednarski, P. J.; Barone, G.; Hannon, M. J. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 10983.

<sup>48</sup> Mendoza, O.; Bourdoncle, A.; Boulé, J.-B.; Brosh, R. M.; Mergny, J. L. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 1989.

metalociclos preparados en el grupo de investigación podrían constituir excelentes agentes de unión al ADN. Además, dichos compuestos contienen cargas positivas que podrían interaccionar con los grupos fosfato ionizados de la diana.

Por ello, dentro del siguiente capítulo de esta introducción, se discutirá brevemente el papel de las distintas formas de ADN como dianas farmacológicas, así como las principales consideraciones respecto al diseño de agentes de unión para dichas biomacromoléculas.

## *Introducción II. Interacción de moléculas de pequeño tamaño con el ADN*

### **1.9 *El Ácido desoxirribonucleico***

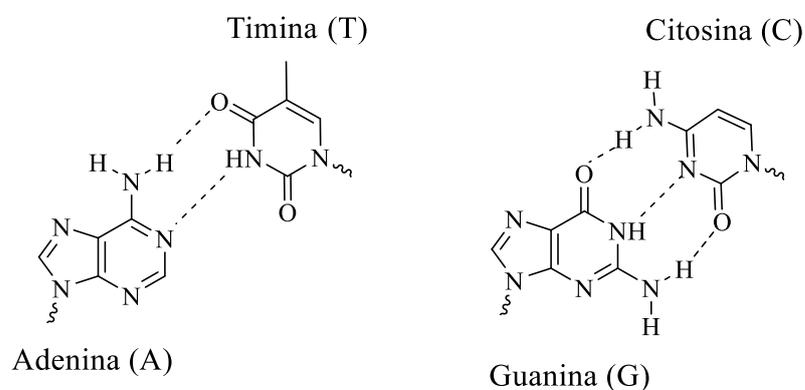
El ácido desoxirribonucleico (ADN) es una biomolécula en la cual se encuentra codificada la información genética de la mayoría de organismos. La secuencia de esta biomolécula define muchas características de los organismos, desde los rasgos físicos, hasta la susceptibilidad a ciertas enfermedades. La información codificada en la secuencia del ADN se pone en práctica con la acción de las proteínas. La secuencia de ADN se copia en moléculas de ARN, las cuales luego son usadas para codificar una secuencia específica de proteínas. Inherente a este proceso es la dramática amplificación de la información genética: a partir de una única copia de ADN se crean múltiples copias de ARN, que a continuación se usan para crear múltiples proteínas. El hecho de que la información del ADN sea regulada por proteínas, las cuales se unen al ADN, permite la expresión de información en respuesta al medioambiente. La unión de las proteínas al ADN es normalmente reversible y no-covalente en la naturaleza. Con la secuencia de muchos organismos dilucidada la atención se centra en el modo de establecer interacciones que permitan controlar la expresión génica. Este objetivo se puede alcanzar diseñando ligandos capaces de unirse selectivamente a ciertas regiones del ADN que resulten de interés.<sup>46a</sup>

### **1.10 *La doble hélice del ADN***

El ADN es una molécula relativamente sencilla desde el punto de vista de su composición y estructura. La unidad fundamental de la que se compone son los nucleótidos, constituidos por la unión de una molécula de azúcar (2'-desoxirribosa), una base nitrogenada y un grupo fosfato. En el ADN se pueden encontrar cuatro tipos de bases heterocíclicas diferentes: adenina (A) y guanina (G), con esqueletos de purina y; citosina (C) y timina (T), con esqueletos de pirimidina. Los nucleótidos se unen unos con otros a través de los grupos fosfato que enlazan la posición 3'-OH del anillo de desoxirribosa con la posición 5'-OH del siguiente dando lugar así a una cadena polinucleótida que transcurre por convenio en sentido 5'-3'.

En 1953 Watson y Crick descubren la estructura tridimensional de la doble hélice del ADN, lo que supuso una revolución en la comprensión de la biología a nivel

molecular.<sup>49</sup> Esta estructura, denominada B-ADN, se forma por la unión de la cadena polinucleótida en sentido 5'-3', con otra paralela que se dispone en sentido contrario a través del establecimiento de enlaces de hidrógeno entre las bases A-T y C-G (**Figura 19**) y por el establecimiento de interacciones de apilamiento  $\pi$  entre pares de bases consecutivos. La estructura B-ADN propuesta por Watson y Crick es la forma más frecuente en condiciones fisiológicas, aunque se ha conseguido observar cristalográficamente otras estructuras secundarias con forma de doble hélice que podrían tener relevancia biológica como son la forma Z-ADN (la doble hélice gira hacia la izquierda a diferencia de la B-ADN) y la forma A-ADN (la doble hélice gira a la derecha al igual que la B-ADN pero es más corta).<sup>46a,50</sup>

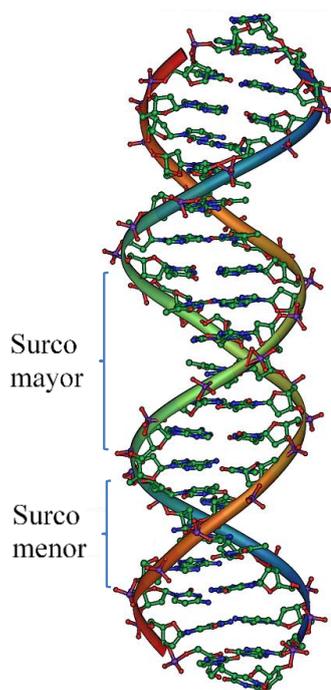


**Figura 19:** Apareamiento de las bases nucleotídicas de la secuencia del ADN.

En la doble hélice del ADN, las bases se disponen hacia el interior de la estructura, mientras que el esqueleto fosfato se dispone hacia el exterior, describiendo la forma de la doble hélice, y definiendo los surcos característicos de la estructura: surco mayor y surco menor (**Figura 20**).

<sup>49</sup> Watson, J. D., Crick, F. H. C. A. *Nature* **1953**, *171*, 737.

<sup>50</sup> Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell*, 5<sup>th</sup> edition, Wiley-VHC, Weinheim, **2008**.



**Figura 20:** Surcos mayor y menor de la estructura en doble hélice del ADN.

### ***1.11 Modos de unión intermolecular al ADN de doble hélice***

La unión de moléculas de pequeño tamaño al B-ADN puede tener lugar de cinco maneras distintas: a través del reconocimiento del surco mayor, reconocimiento del surco menor, unión a la cadena principal de azúcar fosfato, intercalación entre los pares de bases, unión covalente o coordinación de metales a las bases. Estos modos de interacción se estipularon en los años 60, y son reconocidos ampliamente desde entonces como los más comunes.<sup>46a</sup>

A continuación, se analiza más en profundidad los modos más frecuentes para las moléculas de bajo peso molecular: intercalación y unión a los surcos.

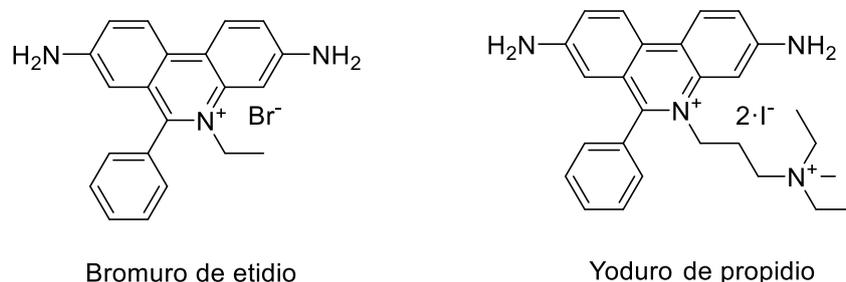
#### ***1.11.1 Intercalación***

Una de las formas más comunes de unión de las moléculas pequeñas al ADN es a través del fenómeno de la intercalación. Este modelo de unión propuesto por primera vez por Lerman en 1961,<sup>51</sup> supone la inserción del intercalante entre dos pares de bases adyacentes a través de interacciones  $\pi$ .<sup>46a</sup>

---

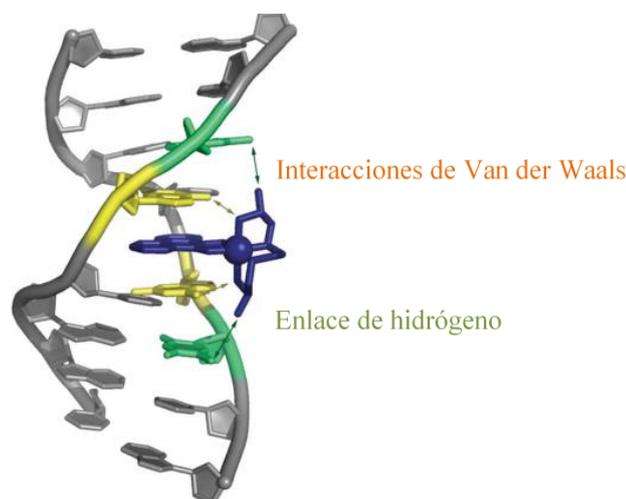
<sup>51</sup> Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18.

Los intercalantes del ADN de doble hélice clásicos suelen ser moléculas con anillos aromáticos fusionados y con cargas positivas, siendo ejemplos típicos el bromuro de etidio y el yoduro de propidio (**Figura 21**).<sup>52</sup>



**Figura 21:** Representación de la estructura química de agentes intercalantes.

En los últimos años ha crecido el interés en agentes intercalantes que incorporan metales de transición en su estructura (**Figura 22**).<sup>53</sup> Los complejos metálicos presentan dos ventajas esenciales que los convierten en potenciales agentes de unión al ADN. Por un lado, el centro metálico actúa en esencia como un ancla, sosteniendo el andamiaje de ligandos, los cuales, pueden incorporar elementos de reconocimiento. En segundo lugar, las ricas propiedades fotofísicas y electroquímicas de los centros metálicos de transición han permitido su empleo más allá de su mero uso pasivo como agentes de reconocimiento molecular. Además, estas características han permitido el uso de los complejos metálicos en otros ámbitos, desde marcadores fluorescentes de ADN a pruebas electroquímicas.<sup>54,55</sup>



**Figura 22:** Estructura cristalina del metalintercalante  $\Delta\text{-}\alpha\text{-}[\text{Rh}\{(\text{R}, \text{R})\text{-Me}_2\text{trien}\}(\text{phi})]^{3+}$  unido a la secuencia 5'-TGCA-3'.

<sup>52</sup> Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutat. Res.* **2007**, *623*, 3.

<sup>53</sup> Kielkopf, C. L.; Erkkila, K. E.; Hudson, B. P.; Barton, J. K.; Rees, D. C. *Nat. Struct. Biol.*, **2000**, *7*, 117.

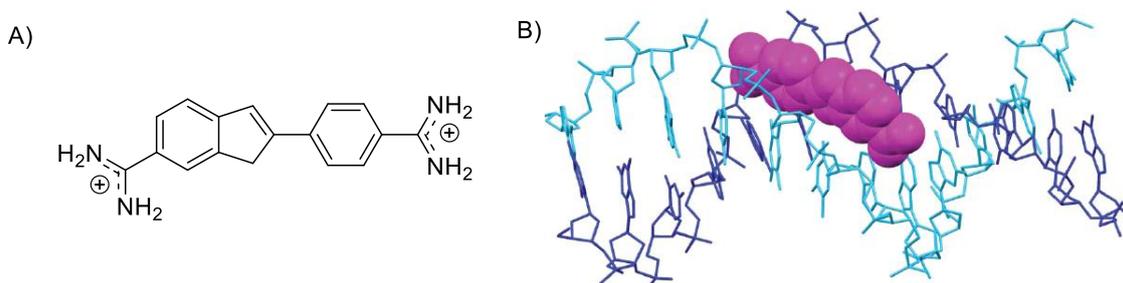
<sup>54</sup> Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K.; *Chem. Commun.*, **2007**, 4565.

<sup>55</sup> Erkkila, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K. *Chem. Rev.*, **1999**, *99*, 2777.

### 1.11.2 Unión al surco

Otro de los modos de unión, que presentan las moléculas de bajo peso molecular que se asocian al ADN, es la unión a los surcos a través del establecimiento fundamentalmente de interacciones hidrofóbicas con la pared del surco, enlace de hidrógeno con los sustituyentes de las bases e interacciones de Van der Waals.

Un ejemplo clásico es el del 2-(4-aminofenil)-1*H*-indol-6-carboxamida (DAPI) que contiene anillos aromáticos no fusionados unidos a través de enlaces que permiten a la molécula adquirir la conformación necesaria para unirse al surco menor del ADN de doble hélice (**Figura 23**).<sup>46a</sup>



**Figura 23:** A) Representación de la estructura química del agente de unión DAPI y B) Imagen de la DAPI (rosa) unida al surco menor del ADN.

## 1.12 ADN cuádruple-G

Además de la estructura canónica de la doble hélice (fundamentalmente de tipo B), el ADN puede adoptar otros tipos de estructuras secundarias no canónicas entre las cuales se encuentra el ADN cuádruple-G.<sup>56</sup>

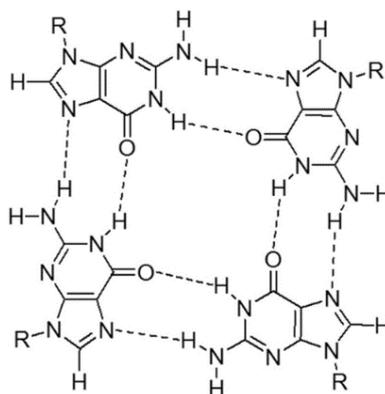
### 1.12.1 La tétrada-G

Las secuencias de ADN ricas en guaninas pueden ensamblar en tétradas conocidas como tétradas-G. Esta capacidad de las guaninas para ensamblar en cuadrados moleculares planares ha sido descubierta hace aproximadamente 40 años.<sup>57</sup> En estos agregados cuatro residuos de guaninas se unen a través de ocho puentes de hidrógeno de tipo Hoogsteen (**Figura 24**).<sup>58</sup>

<sup>56</sup> Wang, G.; Vasquez, K. M. *DNA Repair*, **2014**, *19*, 143.

<sup>57</sup> Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Daves, D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1962**, *48*, 2013.

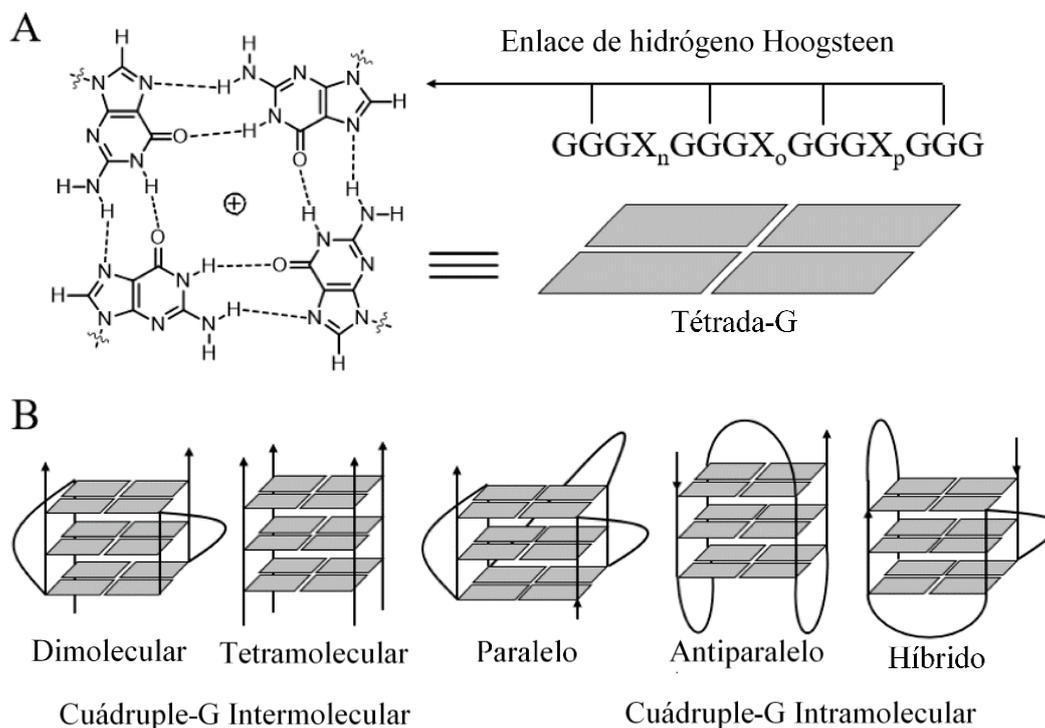
<sup>58</sup> Collie, G. W.; Parkinson, G. N. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 5867.



**Figura 24:** Estructura de la tétrada-G.

### 1.12.2 ADN cuádruple

La formación de G-tétradas en regiones ricas en guaninas da lugar a hebras de tétradas helicoidales denominadas cuádruples-G. Los cuádruples-G se pueden formar intramolecularmente a partir de una única secuencia de ácido nucleico, o intermolecularmente uniéndose dos o más hebras. Las estructuras resultantes pueden formar una amplia variedad de topologías dependiendo de la orientación relativa de las hebras, así como el tipo de vueltas que unen las unidades de las regiones ricas en guaninas (**Figura 25**).



**Figura 25:** Estructura de A) tétrada-G y B) Ejemplos esquemáticos de estructuras de ADN cuádruple-G.

Se ha sugerido que estas estructuras secundarias de ADN podrían estar involucradas en la regulación de algunos procesos biológicos clave. Por ejemplo, en el

genoma humano las secuencias ricas en guaninas con potencial para formar el ADN cuádruple se encuentran en los telómeros y en las regiones promotoras de ciertos oncogenes. La identificación de estas secuencias supone un nuevo mecanismo para el desarrollo de potenciales antifármacos capaces de interactuar con el ADN cuádruple.<sup>59</sup>

### 1.12.3 *Papel del ión metálico*

La formación de la estructura de ADN cuádruple-G en las regiones ricas en guaninas es cinéticamente rápida y termodinámicamente estable bajo condiciones fisiológicas, particularmente en presencia de iones  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , que interactúan electrostáticamente con los grupos carbonilo de las guaninas.<sup>60</sup> Particularmente, la capacidad para estabilizar el canal central de la estructura cuádruple-G es mayor para el ión  $\text{K}^+$  que para el ión  $\text{Na}^+$ .

La ubicación precisa de un ión metálico depende de su radio iónico. Por ejemplo, los cationes de potasio son demasiado grandes para ser acomodados en el plano de una tétrada, pero pueden residir a una distancia equidistante entre dos tétradas sucesivas, mientras que el catión sodio es lo suficiente pequeño para situarse en el plano de una tétrada, aunque no siempre se sitúa en esta disposición.<sup>61,62</sup>

## 1.13 *Relación entre el ADN cuádruple-G y la telomerasa*

### 1.13.1 *Los telómeros*

Los extremos finales de los cromosomas, conocidos como telómeros, son regiones de ADN no codificante, esenciales en la estabilidad de los cromosomas ya que los protegen de la degradación y los reparan.<sup>63</sup> El extremo terminal 3' del ADN telomérico se encuentra en la forma de una única hebra sencilla rica en guaninas. Por ello, tal y como se ha demostrado experimentalmente, esta secuencia puede dar lugar a estructuras secundarias de ADN cuádruple-G.<sup>60</sup> En una célula viva, los telómeros se encuentran rodeados de una gran variedad de proteínas que forman un complejo denominado como complejo de “shelterin” que protege los telómeros frente a la replicación inapropiada del ADN (**Figura 26**).<sup>64</sup>

---

<sup>59</sup> Lam, E. Y. N.; Beraldi, D.; Tannahill, D.; Balasubramanian. *Nature Comm.* **2013**, *4*, 1796.

<sup>60</sup> Chambers, V. S.; Marsico, G.; Boutell, J. M.; Di Antonio, M.; Smith, G. P.; Balasubramanian, S. *Nature Biotechnol.* **2015**, *33*, 877.

<sup>61</sup> Campbell, N. H.; Smith, D. L.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; O' Hagan, D. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1328.

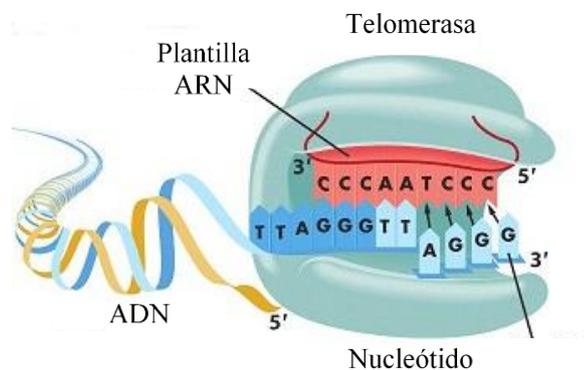
<sup>62</sup> Phillips, K.; Dauter, Z.; Murchie, A. I.; Lilley, D. M.; Luisi, B. *J. Mol. Biol.* **1997**, *273*, 171.

<sup>63</sup> Sullivan, R. J.; Karlseder, J. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2010**, *11*, 171.

<sup>64</sup> De Lange, T.; *Genes Develop.* **2005**, *19*, 2100.



desoxirribonucleótidos al extremo 3' del ADN telomérico y un componente de ARN (hTR) que proporciona el molde para la síntesis de la secuencia telomérica (**Figura 27**).<sup>69</sup>



**Figura 27:** La telomerasa añade desoxirribonucleótidos al final del extremo 3'- del ADN telomérico.

La enzima telomerasa se encuentra sobreexpresada en torno al 85-90% de las células cancerosas impidiendo que estas alcancen la etapa de senescencia o experimenten apoptosis.<sup>70</sup>

El descubrimiento de la telomerasa junto con la identificación de las secuencias repetitivas de guaninas en los telómeros situados al final de los cromosomas generó un importante interés en el estudio de la estructura del ADN cuádruple-G.

Las moléculas pequeñas que se unen y estabilizan el ADN de estructura cuádruple-G han demostrado inhibir la enzima telomerasa. Además, se ha demostrado recientemente que la estabilización del ADN cuádruple, por moléculas pequeñas, inactiva la actividad transcripcional de algunos oncogenes. Por ello, el ADN cuádruple se ha convertido en una prometedora diana para el diseño selectivo de terapias anticancer.<sup>71</sup>

### 1.13.3 Oligonucleótidos de ADN cuádruple-G

Las secuencias repetitivas de guaninas con potencial para formar estructura cuádruple se han localizado, además de en la región telomérica, en las regiones promotoras de ciertos oncogenes y en el ARN. En los últimos años se han realizado estudios en profundidad de la estructura y topología del ADN/ARN cuádruple-G.<sup>72</sup> A

<sup>69</sup> Cong, Y.-S.; Wright, W. E.; Shay, J. W. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2002**, *66*, 407.

<sup>70</sup> Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. C.; Coviello, G. M.; Wright, W. E.; Weinrich, S. L.; Shay, J. W. *Science*. **1994**, *266*, 2011.

<sup>71</sup> Sun, D.; Guo, K.; Rusche, J. J.; Hurley, L. H. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, 6070.

<sup>72</sup> a) Neidle, S.; Parkinson, G. N. *Biochimie*. **2008**, *90*, 1184; b) S. Neidle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2009**, *19*, 239; c) Tong, C.; Wang, Y. Q.; Huang, Z. L.; Tan, J. H.; Huang, Z. S.; Chen, S. B. *Molecules*, **2008**, *23*, 493.

continuación se analizan las características de los principales oligonucleótidos que se van a emplear en esta memoria:

**h-Telo:** es la sección de ADN telomérico humano rico en guaninas. La secuencia telomérica rica en guaninas puede plegarse formando una estructura cuádruple, y en esta conformación la telomerasa no es capaz de alargar su secuencia.<sup>73</sup>

**hTERT:** es un gen que codifica una subunidad catalítica de la enzima telomerasa. Presenta diversas regiones con potencial para formar estructuras G4. La investigación de la secuencia rica en guaninas en el gen hTERT de longitud completa reveló la formación de una estructura de cuádruple-G apilada de extremo a extremo. Esta estructura consiste en un cuádruple-G paralelo, formado por cuatro tractos de tétradas de guaninas consecutivos, vinculado a otro, cuádruple-G atípico, formado por dos pares de tractos de tétradas de guaninas consecutivos separados por un bucle de 26 bases. Este bucle de 26 bases probablemente forma una estructura de horquilla estable, lo que explicaría la inesperada estabilidad de este cuádruple-G.<sup>74</sup>

**Bel2:** es una región de ADN rica en guaninas capaz de formar ADN-cuádruple. Dicha región codifica una proteína de membrana mitocondrial que desempeña un papel esencial en la apoptosis celular. Se ha encontrado que dicha proteína se encuentra sobreexpresada en una amplia gama de tumores humanos, incluidos linfomas de células B y T, y carcinomas de pulmón, de mama, de próstata, de cuello uterino y colorrectal.<sup>75</sup>

**c-Kit:** es un oncogén que codifica una proteína receptora de la tirosina quinasa. Las mutaciones asociadas a éste se encuentran en varios cánceres humanos malignos, siendo los tumores de estroma gastrointestinal los más comunes. En el oncogén c-Kit se localizan dos regiones ricas en guaninas con potencial para formar estructuras cuádruple-G (c-Kit1 y c-Kit2).<sup>76</sup>

**c-Myc:** es un oncogén cuya expresión está relacionada con la proliferación celular y la inhibición de la diferenciación, lo que lleva a su relación con una serie de tumores

---

<sup>73</sup> a) Dai, J.; Carver, M.; Punchihewa, C.; Jones, R. A.; Yang, D. *Nucleic Acid Res.* **2007**, *35*, 4927; b) Dai, J.; Punchihewa, C.; Ambrus, A.; Chen, D.; Jones, R. A.; Yang, D. *Nucleic Acid Res.* **2007**, *35*, 2440.

<sup>74</sup> Lim, K. W.; Lacroix, L.; Yue, D. J. E.; Lim, J. K. C.; Lim, J. M. W.; Phan, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12331.

<sup>75</sup> a) Dai, J.; Chen, D.; Jones, R. A.; Hurley, L. H.; Yang, D. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 5133; b) Agrawal, P.; Lin, C.; Mathad, R. I.; Carver, M.; Yang, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 1750.

<sup>76</sup> Phan, A. T.; Kuryavyyi, V.; Burge, S.; Neidle, S.; Patel, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4386.

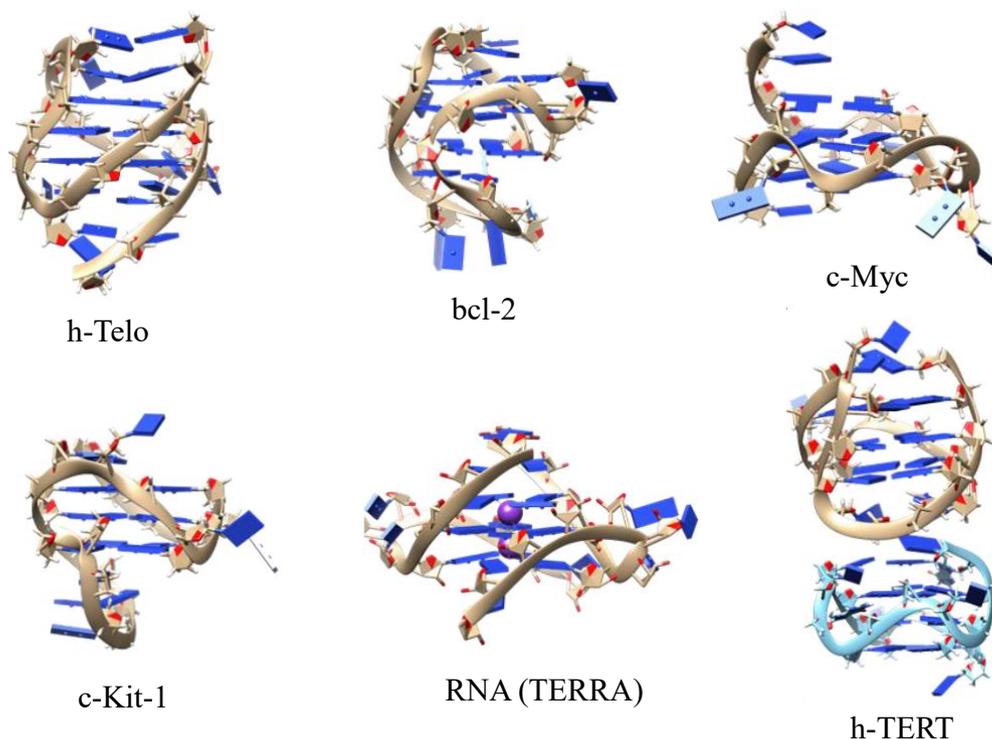
humanos y animales, como son el cáncer de mama, colon y cuello uterino, cáncer de pulmón celular, osteosarcomas, glioblastomas y leucemias mieloides.<sup>77</sup>

**ARN cuádruple:** Se ha demostrado que las secuencias de ARN ricas en guaninas (TERRA/ telRNA) también forman, al igual que el ADN, estructuras cuádruple-G estables en solución.<sup>78</sup>

**ADN nl:** Es una secuencia de ADN rica en guaninas que en disolución forma estructuras cuádruples paralelas sin surcos.<sup>79</sup>

**VEGF:** Es un gen que codifica una proteína señalizadora implicada en la angiogénesis y juega un papel importante en la supervivencia y crecimiento de tumores. Dicho gen contiene una región rica en guaninas que es esencial para la expresión del gen VEGF y que forma en solución estructura cuádruple.<sup>80</sup>

Las estructuras plegadas de algunos de los diferentes oligonucleótidos analizados, de acuerdo con el banco de proteínas RCSB, se muestran en la **Figura 28:**



**Figura 28:** Estructura plegada de oligonucleótidos de ADN o ARN cuádruple.

<sup>77</sup> Siddiqui-Jain, A.; Grand, C. L.; Bearss, D. J.; Hurley, L. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 11593.

<sup>78</sup> Collie, G. W.; Haider, S. M.; Neidle, S.; Parkinson, G. N. A. *Nucleic Acid Res.* **2010**, *38*, 5569.

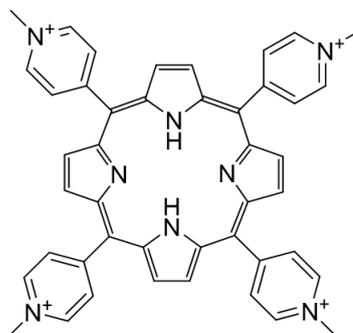
<sup>79</sup> Nicoludis, J. M.; Barrett, S. P.; Mergny, J. L.; Yatsunyk, L. A. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5432.

<sup>80</sup> Agrawal, P.; Hatzakis, E.; Guo, K.; Carver, M.; Yang, D. *Nucleic Acid Res.* **2013**, *41*, 10584.

### 1.14 Ligandos de unión al ADN cuádruple-G

Desde que se descubrió la capacidad de pequeñas moléculas con afinidad por el ADN cuádruple-G para inhibir la acción de la enzima telomerasa, se han descrito en la bibliografía un gran número de nuevos ligandos. Las interacciones entre los ligandos y el ADN cuádruple se producen en la mayoría de los casos por establecimiento de interacciones  $\pi$ - $\pi$  y electrostáticas. La unión se puede producir a través de la interacción con las tétradas externas del cuádruple-G, la unión a los surcos, bucles o una combinación de los distintos modos de interacción. En el caso del ADN cuádruple, la intercalación de los ligandos entre las bases no se considera viable debido a la presencia de cationes monovalentes en el canal central.<sup>81</sup>

Un ejemplo representativo de ligandos con capacidad para unirse al ADN cuádruple-G son las porfirinas. Su estructura contiene un sistema de dobles enlaces conjugados ideal para el establecimiento de interacciones  $\pi$  con las tétradas de guaninas. En 1998 se publica el primer estudio de la interacción de un derivado de porfirina (**Figura 29**) con el ADN cuádruple-G.<sup>82</sup> Los resultados de la interacción de TMPyP4 con el ADN cuádruple-G indicaron una baja selectividad del derivado de porfirina por el ADN cuádruple frente al ADN de doble hélice, por lo que el TMPyP4 se suele utilizar como referencia en el estudio de agentes de unión a ADN cuádruple-G.



**Figura 29:** Estructura del tetracloruro de tetra-*N*-metilporfirina (TMPyP4).

Los agentes de unión ideales deberían no sólo ser capaces de unirse fuertemente al ADN cuádruple, como la porfirina analizada, sino que también deberían exhibir una elevada selectividad por el ADN de estructura cuádruple-G frente al ADN de doble hélice. La mayoría de los compuestos que son capaces de unirse al ADN publicados hasta la fecha se basan en sistemas orgánicos con heteroátomos y estructura planar que son

<sup>81</sup> Olsen, C. M.; Gmeiner, W. H.; Marky, L. A. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, *110*, 6962.

<sup>82</sup> Anantha, N. V.; Azam, M.; Sheardy, R. D.; *Biochemistry*, **1998**, *37*, 2709.

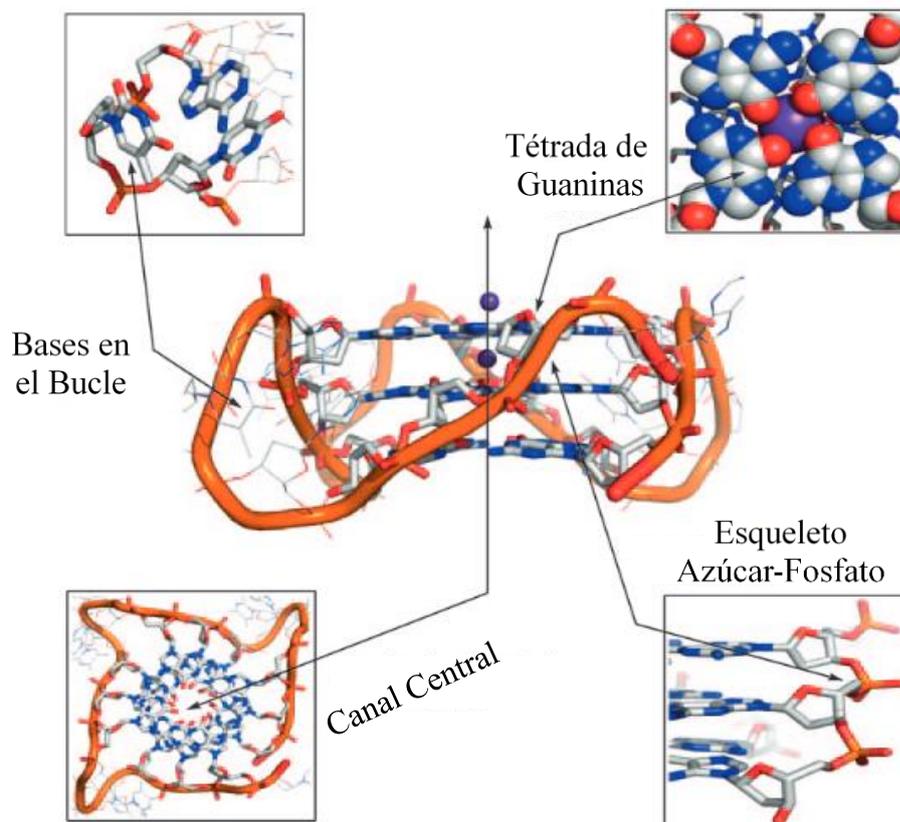
capaces de interactuar a través de interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los cuartetos-G situados al final de la estructura del ADN cuádruple.<sup>83</sup> Sin embargo, se podrían tener en cuenta otras características estructurales de la biomolécula diana a la hora de diseñar compuestos con capacidad de unión a ésta (**Figura 30**).

Así, la estructura de ADN cuádruple contiene distintos bucles y surcos con los cuales podrían interaccionar los ligandos diseñados, o incluso se podrían establecer interacciones con el esqueleto fosfato y bases de ADN. Además, el ADN cuádruple presenta un canal central cuya estructura puede albergar metales alcalinos, lo cual podría tenerse en cuenta a la hora de diseñar los posibles ligandos.<sup>84</sup> En base a las características estructurales del ADN cuádruple, los ligandos que se han preparado poseen extensas superficies  $\pi$  aromáticas y cargas positivas cerca del centro de las moléculas o en los lados de los brazos para incrementar la afinidad por los surcos del ADN. Estas características han sido diseñadas considerando la estructura del ADN cuádruple y atendiendo a su viabilidad sintética empleando las multietapas tradicionales de la síntesis covalente.<sup>83</sup>

---

<sup>83</sup> a) Arola, A.; Vilar, R. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8*, 1405; b) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 627; c) Ou, T. M.; Lu, Y. J.; Tan, J. H.; Huang, Z. S.; Wong, K. Y.; Gu, L. Q. *ChemMedChem.* **2008**, *3*, 690.

<sup>84</sup> Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2010**, *49*, 4020.



**Figura 30:** Características estructurales del ADN cuádruple que pueden actuar como dianas de unión con moléculas diseñadas para tal fin.

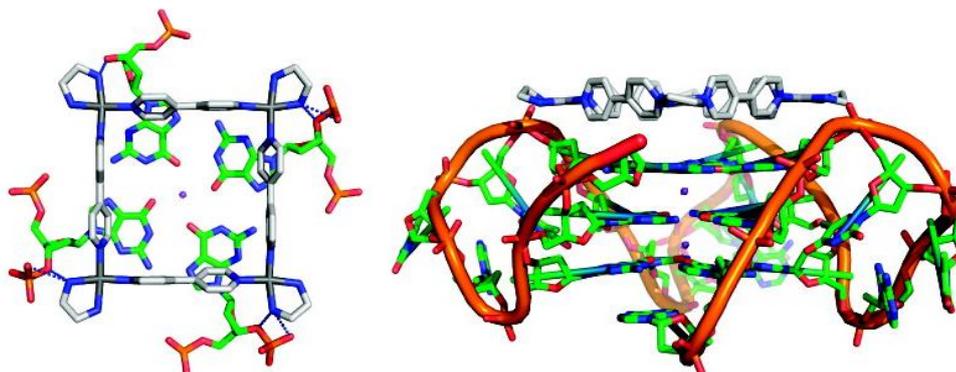
### ***1.15 Estudios de interacción de metalociclos autoensamblados de Pt(II) con el ADN***

Una estrategia particularmente atractiva para la construcción eficiente y modular de agentes de unión al ADN cuádruple sería el uso de procesos de autoensamblaje supramolecular en lugar de la síntesis covalente. Esta estrategia permite sintetizar complejas estructuras desde simples bloques de construcción, en una única operación y a menudo cuantitativamente, permitiendo la construcción de una amplia librería de potenciales agentes de unión. Este método resultaría en moléculas de dimensiones nanométricas con distintas propiedades estructurales, que serían inalcanzables usando la convencional síntesis química covalente.<sup>85</sup> En este contexto, y como se ha discutido anteriormente en este trabajo, el autoensamblaje dirigido por centros metálicos permite además un adecuado control sobre la topología de los agentes de unión diseñados, lo que la convierte en una estrategia sintética altamente atractiva.

<sup>85</sup> Oleksi, A.; Blanco, A. G.; Boer, R.; Uson, I.; Aymami, J.; Rodger, A.; Hannon, M. J.; Coll, M. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 1227.

En este contexto, en el año 2008, Sleiman y colaboradores documentan la capacidad del metalociclo  $Pt_4L_4$  de Fujita **A34** para unirse al ADN cuádruple y para inhibir la acción de la telomerasa a través de ensayos de desnaturalización térmica por resonancia de fluorescencia y ensayos enzimáticos.<sup>86</sup>

Los estudios de modelaje molecular combinando Docking con simulaciones dinámicas (MD), muestran que el modo de unión más favorable es aquel en el que el metalociclo de platino se coloca paralelo a la tétroda de guaninas terminal (**Figura 31**). En esta disposición las distancias Pt-P son consistentes con el establecimiento de interacciones electrostáticas entre los átomos de platino del metalociclo y el esqueleto fosfato del ADN cuádruple. Además, se observó que los grupos  $NH_2$  de los ligandos de etilendiamina establecerían enlaces de hidrógeno con los hidrógenos enlazados a los oxígenos de los grupos fosfato. Todo contribuiría a una fuerte afinidad del metalociclo de Pt por el ADN cuádruple.



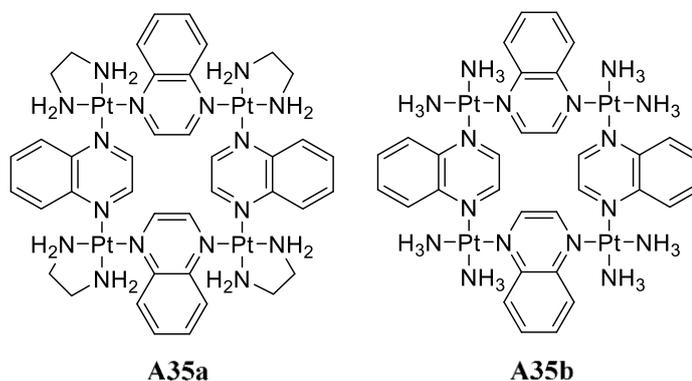
**Figura 31:** Representación esquemática del potencial modo de interacción del metalociclo  $Pt_4L_4$  de Sleiman y colaboradores con el ADN cuádruple, obtenida mediante docking molecular.<sup>86</sup>

A través de ensayos FRET y TRAP, los autores demostraron que el metalociclo mostraba una elevada afinidad por el ADN cuádruple y que era capaz de inhibir eficientemente la actividad de la telomerasa, confirmando así las predicciones de los estudios de modelaje molecular.

Posteriormente, en el año 2012, Mao y colaboradores presentan dos nuevos metalociclos (**Figura 32**) con ligandos puentes de quinoxalina que estabilizan selectivamente el ADN cuádruple de la zona telomérica humana con altas constantes de

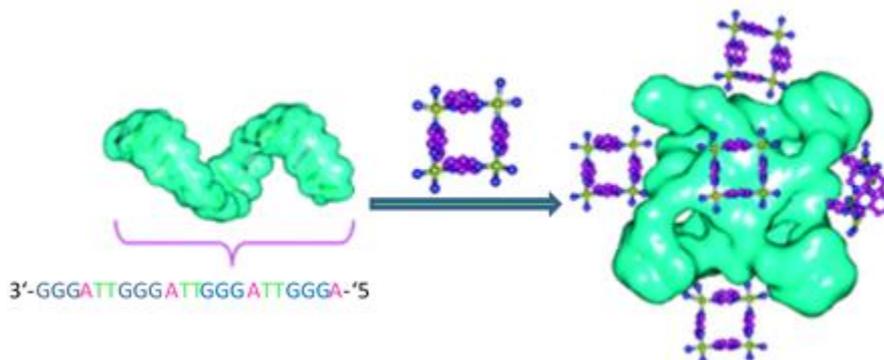
<sup>86</sup> Kiełtyka, R.; Englebienne, P.; Fakhoury, J.; Autexier, C.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F. *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10040.

afinidad ( $10^7$ - $10^9$ ). Ambos metalociclos (**A35a** y **A35b**) muestran una significativa inhibición de la telomerasa y eficacia anticancerígena.<sup>87</sup>



**Figura 32:** Estructura de los metalociclos de Pt(II) **A35a** y **A35b**.

La estequiometría del sistema se evaluó mediante un Job Plot, que dio como resultado que la inserción de los metalociclos **A35a** y **A35b** con el ADN cuádruple es aproximadamente 0.14. Este resultado se corresponde con un radio estequiométrico complejo/ cuádruple 6:1 (**Figura 33**).

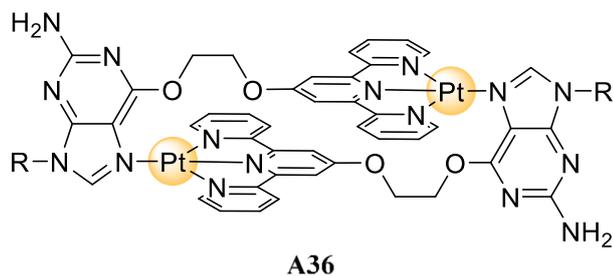


**Figura 33:** Modo de unión del metalociclo de Mao y colaboradores al ADN cuádruple.

Recientemente, se han documentado dos nuevos metalociclos  $M_2L_2$  basados en un ligando de terpiridina con una unidad de guanósina coordinados a centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) (**Figura 34**). Se analizó su capacidad de interactuar con el ADN de doble hélice y cuádruple, mediante ensayos de desplazamiento de intercalante por fluorescencia (FID), por energía de transferencia de resonancia de fluorescencia (FRET), y por espectrometría de masas electroespray (ESI-MS). Los estudios mostraron que los complejos dinucleares presentados son capaces de interactuar selectivamente con la secuencia de ADN cuádruple (h-Telo y c-Myc), frente a la secuencia de ADN de doble

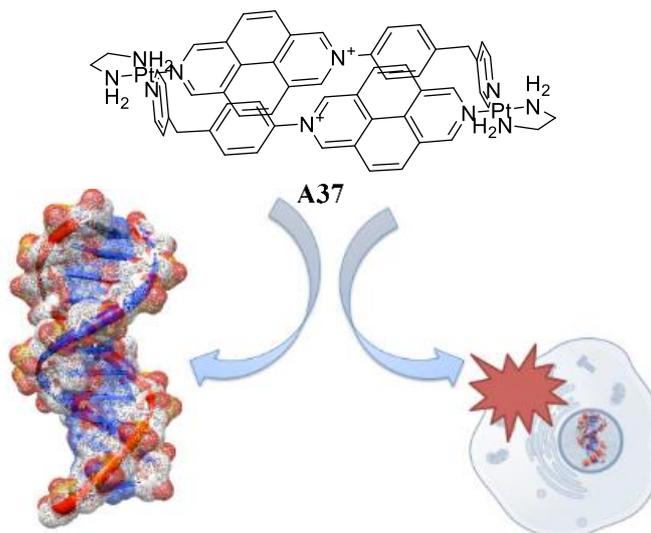
<sup>87</sup> Zheng, X. H.; Chen, H. Y.; Tong, M. L.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. *Chem. Commun.*, **2012**, 48, 7607.

hélice, y que además con capaces de inducir la dimerización de las estructuras paralelas de ADN cuádruple.<sup>88</sup>



**Figura 34:** Estructura del metalociclo de Pt(II) **A36**.

En este contexto, en el año 2002, el grupo de investigación, documentó la capacidad de un metalociclo de Pt(II) rectangular basado en el 2,7-diazapireno para unirse al ADN de doble hélice con una constante en el rango micromolar (**Figura 35**), interfiriendo en la transacción del ADN *in vitro*, y resultando en un compuesto que muestra niveles de eficacia similares a los del cisplatino, pero diferente espectro de actividad.<sup>47</sup>



**Figura 35:** Estudio de la interacción de un metalociclo de Pt(II) reportado por el grupo de investigación con ADN de doble hélice y de su efecto *in vitro*.

<sup>88</sup> Ghosh, S.; Mendoza, O.; Cubo, L.; Rosu, F.; Gabelica, V.; White, A. J. P.; Vilar, R. *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 4772.



## 2. OBJETIVOS

En los últimos años, en el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo la presente tesis doctoral, se ha desarrollado una estrategia de autoensamblaje que permite la síntesis de metalociclos basados en ligandos de 4-4'-bipiridinio/2,7-diazapireno y centros metálicos de Pd(II) y Pt(II). Recientemente, tal y como se ha comentado en la introducción, se ha explorado con éxito la capacidad de uno de los metalociclos de Pt(II) diseñado a partir de un ligando basado en el 2,7-diazapireno para interaccionar con el ADN de doble hélice.<sup>47</sup>

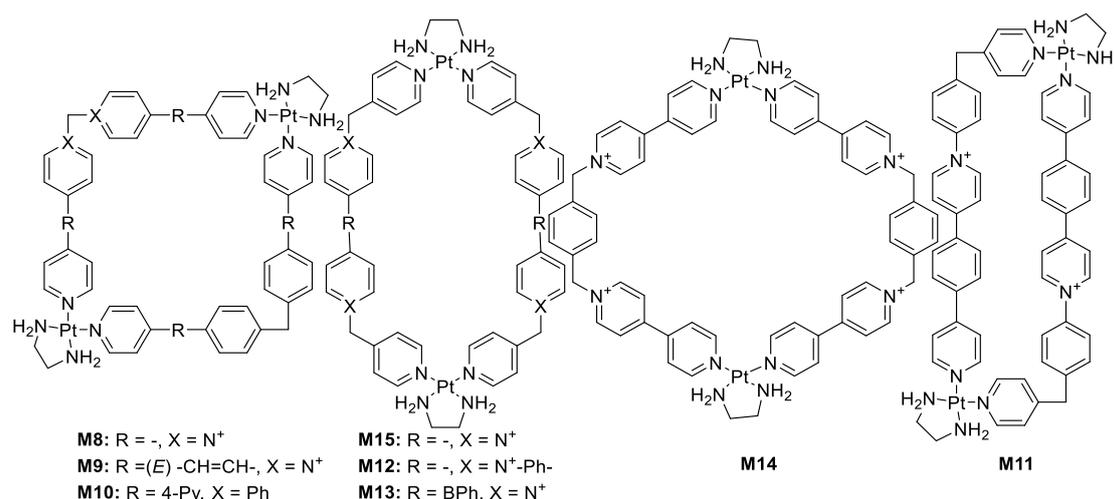
En este contexto, el objetivo del presente trabajo se centra en el diseño y síntesis eficiente mediante autoensamblaje de metalociclos de Pt(II), los cuales serán utilizados para el posterior estudio de su potencial agentes de unión al ADN. Se propone así el estudio de compuestos de tipo **Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub>** y **Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** de distinta topología y funcionalización autoensamblados a partir de sales de mono/dialquil-4-4'-bipiridinio/2,7-diazapireno como ligandos bidentados, y complejos plano-cuadrados de Pt(II) como centros metálicos con dos posiciones lábiles. En base a dicho objetivo general, el trabajo se estructura en tres partes:

### 1. Autoensamblaje mediante síntesis asistida por microondas de metalociclos de tipo **Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** y **Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub>**.

Se propone la síntesis de metalociclos **Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub>** y **Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** con diversa topología (**Figuras 36 y 37**). Para llevar a cabo la síntesis de los metalociclos de tipo **Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** (**Figura 36**), se emplearían rutas sintéticas ya reportadas con anterioridad por el grupo de investigación, tanto para la síntesis de los ligandos como para el autoensamblaje dirigido por centros de Pt(II) de éstos en los correspondientes metalociclos.<sup>45,89</sup>

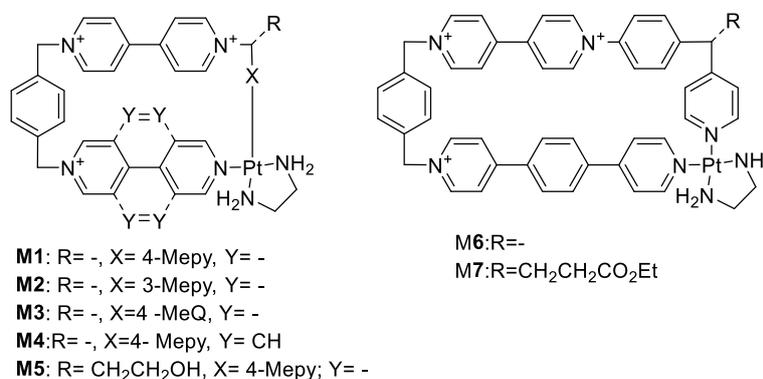
---

<sup>89</sup> Blanco, V.; Chas, M.; Abella, D.; Pía, E.; Platas-Iglesias, C.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 409; b) Blanco, V.; Gutiérrez, A.; Platas-Iglesias, C.; Peinador, C.; Quintela, J.M. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 6577; c) López-Vidal, E. M.; Blanco, V.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 580; d) *Autoensamblaje de nuevos metalociclos, complejos de inclusión y moléculas mecánicamente entrelazadas*. Tesis doctoral presentada por Cristina Alvariño, Universidade de A Coruña, **2015**; e) Chas, M.; Blanco, V.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 675.



**Figura 36:** Metalociclos de tipo Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> previamente reportados.

Por otra parte, en el caso de los metalociclos de tipo Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, se propone el desarrollo de una nueva metodología para la síntesis de los ligandos constituyentes, que permita obtener por lo tanto los consiguientes metalociclos de una forma más eficientemente. La nueva ruta deberá resultar versátil para poder preparar, además de los metalociclos reportados con anterioridad,<sup>42,90</sup> nuevos metalociclos mononucleares con diversa topología y funcionalización (**Figura 37**). En este contexto, los nuevos metalociclos reportados en el presente trabajo se caracterizarán mediante técnicas de RMN mono/bidimensional, así como mediante espectrometría de masas.



**Figura 37:** Metalociclos de tipo Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub> reportados (M1-M3), y nuevos metalociclos (M4-M7) Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub>.

## 2. Estudio de la interacción de los compuestos preparados con diversas formas de ADN como diana farmacológica.

Se pretende evaluar aquí la interacción y selectividad de los metalociclos tanto con el ADN de estructura de doble hélice como cuádruple. Complementariamente, se estudiaría tanto la interacción de los metalociclos como la de los ligandos componentes

<sup>90</sup> Blanco, V.; Abella, D.; Rama, T.; Alvaríño, C.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 80181.

de los mismos (al presentar potencial como agentes intercalantes del ADN). Se trata de establecer tanto la fortaleza y tipología de la interacción, como su selectividad frente a diversos tipos de polinucleótidos (ARN, ADN de cadena simple o doble, cuadruplexes, etc.).

Así, en este apartado se propone en primer lugar el estudio de tres metalociclos de tipo  $Pt_2L_2$  cuadrangulares,<sup>90</sup> que difieren entre sí en el tamaño de la cavidad y que son similares en forma al desarrollado por Fujita (ver introducción, sección 1.16). Se trataría con este trabajo de evaluar la influencia del tamaño de la cavidad en la interacción con el ADN. En segundo lugar, se propone el estudio de la interacción con diversas formas de ADN de una librería de metalociclos estructuralmente más amplia, que incluye diferencias en el tamaño, nuclearidad, funcionalización, etc.

En ambos casos, los estudios de interacción se llevarían a cabo mediante la utilización de técnicas espectroscópicas (CD, UV-Vis, Fluorescencia), así como mediante ensayos de desnaturalización térmica por FRET.

### **3. Estudios biológicos.**

Aquellos compuestos con un mejor perfil de interacción, serían sujetos a estudios posteriores para determinar su citotoxicidad y capacidad para traspasar membranas biológicas. Para llevar a cabo los estudios de internalización celular se propone seleccionar un metalociclo que además de ofrecer un buen perfil de interacción resulte fluorescente.



### 3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS:

A lo largo de la presente memoria, dividida en tres capítulos, se estudiará como objetivo principal la capacidad de diversos metalociclos de tipo  $Pt_2L_2$  y  $Pt_1L_1$  para interactuar con el ADN de doble hélice y cuádruple. Así, ha de especificarse que, mientras que todos los metalociclos de tipo  $Pt_2L_2$  ya habían sido publicados por el grupo de investigación, aquellos de tipo  $Pt_1L_1$ , nuevos o ya conocidos, presentaban deficiencias en los métodos conocidos de síntesis.<sup>42,90</sup> Por ello, en el primer capítulo se discute una nueva estrategia sintética que mejora la obtención de dichos metalociclos de tipo  $Pt_1L_1$ , desarrollándose así un protocolo de preparación mejorado para ligandos ditópicos derivados de viológenos (sales de *N,N'*-dialquil-4,4'-bipiridina y análogos), y sus correspondientes metalociclos mononucleares. Se estudiará dentro de este contexto el autoensamblaje de los nuevos ligandos en torno a centros metálicos de Pd(II) y Pt(II), además de analizar su potencial como receptores de sustratos aromáticos.

En el segundo capítulo, se aborda el estudio espectroscópico de la interacción de los ligandos y metalociclos con ADN de doble hélice y cuádruple. Este capítulo se divide en dos secciones, donde la primera se centra en el estudio de la interacción con las biomoléculas diana de metalociclos  $Pt_2L_2$  cuadrangulares de distintos tamaños. En la segunda sección se aborda el mismo tipo de estudio, esta vez para una amplia familia de metalociclos mono y dinucleares con una mayor variedad estructural (en tamaño, forma, carga y distribución de la misma).

En el tercer y último capítulo, y a modo de ejemplificación del potencial de los compuestos preparados en el campo de la biomedicina, se discutirá brevemente la actividad biológica de algunos de los metalociclos preparados. Al igual que en el capítulo anterior, éste se estructura en dos secciones. En la primera se estudia la actividad biológica de los metalociclos  $M_2L_2$  cuadrangulares frente a diversas células cancerígenas, y su influencia en la expresión de genes con estructuras de ADN-cuádruple en sus regiones promotoras. Por último, los metalociclos estudiados en la segunda sección del capítulo anterior que ofrecen un mejor perfil de interacción con ADN cuádruple, son sometidos a ensayos biológicos de distribución celular.

## Capítulo I. Metalociclos

### 3.1 Metalociclos seleccionados para el estudio de su interacción con ADN

#### 3.1.1 Introducción

Como se ha discutido en el apartado de introducción, en contraposición con la química sintética covalente, el ensamblaje dirigido por centros metálicos ha permitido crear supramoléculas con dimensiones adecuadas para unirse eficientemente al ADN.<sup>48</sup> En este contexto, la estrategia de autoensamblaje dirigido por centros metálicos de Pt(II) de ligandos derivados de *N*-monoalquil y *N,N*-dialquil-4,4'-bipiridinio desarrollada por el grupo de investigación, constituye una metodología versátil para la preparación de especies policationicas de diversas formas y dimensiones nanométricas, características muy interesantes para su estudio como potenciales agentes de unión al ADN.

Como se ha comentado en el apartado de antecedentes, los prometedores resultados de interacción con el ADN del metalociclo **A37** de tipo Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> preparado previamente por el grupo de investigación,<sup>47</sup> llevaron a plantearse en la presente tesis doctoral el ensamblaje de diversos ligandos y de sus metalociclos de tipo Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub> y Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> para el estudio de su interacción con diversas formas de ADN. Los metalociclos Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> seleccionados ya habían sido preparados eficientemente con anterioridad en el grupo de investigación.<sup>89</sup>

Sin embargo, en el caso de los metalociclos Pt<sub>1</sub>L<sub>1</sub>, se encontraron deficiencias con respecto a su síntesis, por lo que se decidió diseñar una nueva estrategia más versátil que permitiese tanto aumentar los rendimientos en los metalociclos ya conocidos como preparar eficientemente nuevos análogos de éstos.

### 3.2 Metalociclos mononucleares

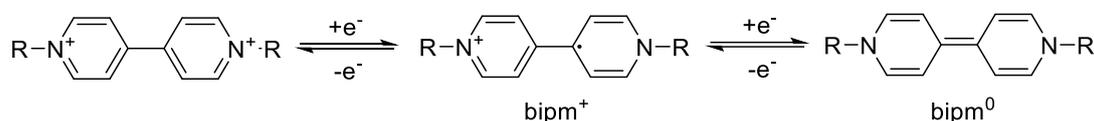
#### 3.2.1 Antecedentes

Los viológenos son sales disustituídas de 4,4'-bipiridinio que se forman por la dialquilación o diarilación de la 4,4'-bipiridina. El nombre común de viológeno deriva de Michaelis, que observó la aparición del color violeta al reducirse el paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinio) para formar su catión radical.<sup>91</sup>

---

<sup>91</sup> a) Monk, P. M. S. *The Viologens: Physicochemical Properties, Synthesis, and Applications of the Salts of 4,4'-bipyridine*; John Wiley & Sons: Chichester, **1998**; b) Monk, P. M. S.; Fairweather, R. D.; Duffy, J. A.; Ingram, M. D. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II*, **1992**, 2039.

Los viológenos exhiben una rica electroquímica (**Esquema 1**), que ha permitido el desarrollo de dispositivos de impresión y pantallas.<sup>92</sup> Así, estos compuestos pueden encontrarse en tres formas redox siendo la más estable de ellas la del dicatión de bipyridinio ( $\text{bipm}^{+2}$ ). En esta forma redox normalmente son incoloros en estado puro, a no ser, que exista una transferencia de carga con el contraión. El segundo estado redox de los compuestos de bipyridinio es el del catión radical ( $\text{bipm}^+$ ) formado por la ganancia de un electrón del dicatión. Éstos suelen ser compuestos estables al aire e intensamente coloreados debido al establecimiento de una banda de transferencia de carga. La tercera forma redox, el direducido viológeno ( $\text{bipm}^0$ ), se forma por la ganancia de un electrón del respectivo catión radical o por la ganancia de dos electrones del correspondiente dicatión.<sup>91,92</sup>



**Esquema 1:** Diversas formas redox de los viológenos

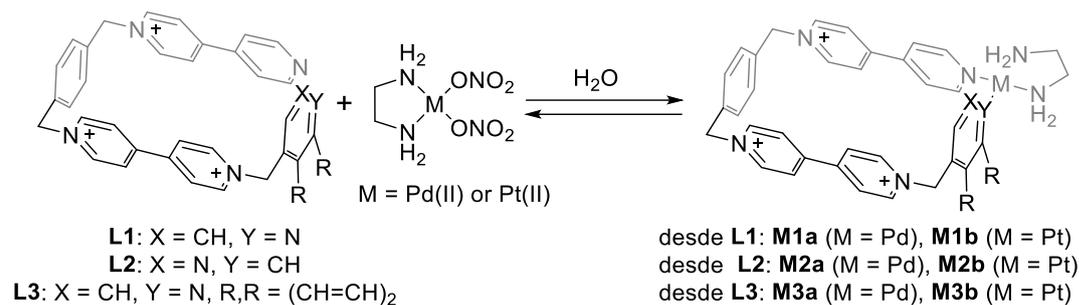
Además de por sus propiedades redox, los viológenos destacan también debido a su deficiencia electrónica, siendo ampliamente utilizados en química supramolecular como componentes  $\pi$ -aceptores.<sup>93</sup>

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha sido pionero en el desarrollo de una estrategia de autoensamblaje dirigida por centros metálicos de Pd y Pt(II), que emplea viológenos y derivados como componentes de ligandos ditópicos. En concreto, en la última década se ha publicado la obtención de los ligandos ditópicos **L1-L3** (**Esquema 2**) que contienen viológenos en su estructura, y que se obtuvieron mediante reacciones de sustitución nucleófila. Como cabría esperar, su ensamblaje en torno a centros metálicos de Pd(II)/Pt(II) conduce a la formación de los metalociclos **M1-M3**, con utilidad como receptores moleculares o en la construcción de supramoléculas

<sup>92</sup> a) Monk, P.; Mortimer, R.; Rosseinsky, D. *Electrochromism and Electrochromic Devices*, Cambridge University Press, Cambridge, **2007**; b) Bird, C. L.; Kuhn, A. T.; *Chem. Soc. Rev.*, **1981**, *10*, 49.

<sup>93</sup> a) Yoon, K. B. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 321; b) Nishikiori, S. I.; Yoshikawa, H.; Sano, Y.; Iwamoto, T. *Acc. Chem. Res.* **2005**, *38*, 227; c) Balzani, V.; Credi, A.; Mattersteig, G.; Matthews, O. A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F.; Venturi, M.; White, A. J. P.; Williams, D. J. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1924; d) Deska, M.; Kozłowska, J.; Sliwa, W. *ARKIVOC*, **2013**, 66.

entrelazadas.<sup>42,90</sup>



**Esquema 2:** Autoensamblaje de los metalociclos **M1-M3** previamente reportados por el grupo de investigación que contienen un viológeno en su estructura.

A pesar de que el proceso de ensamblaje ocurre bajo estrictas condiciones de control termodinámico, pudiéndose ensamblar los metalociclos con rendimientos cuantitativos, la preparación de estas especies ha estado limitada por la viabilidad sintética de la formación de los ligandos **L1-L3**, que se obtenían con bajos rendimientos mediante reacciones sucesivas de sustitución nucleófila sobre la 4,4'-bipiridina.<sup>42,90</sup>

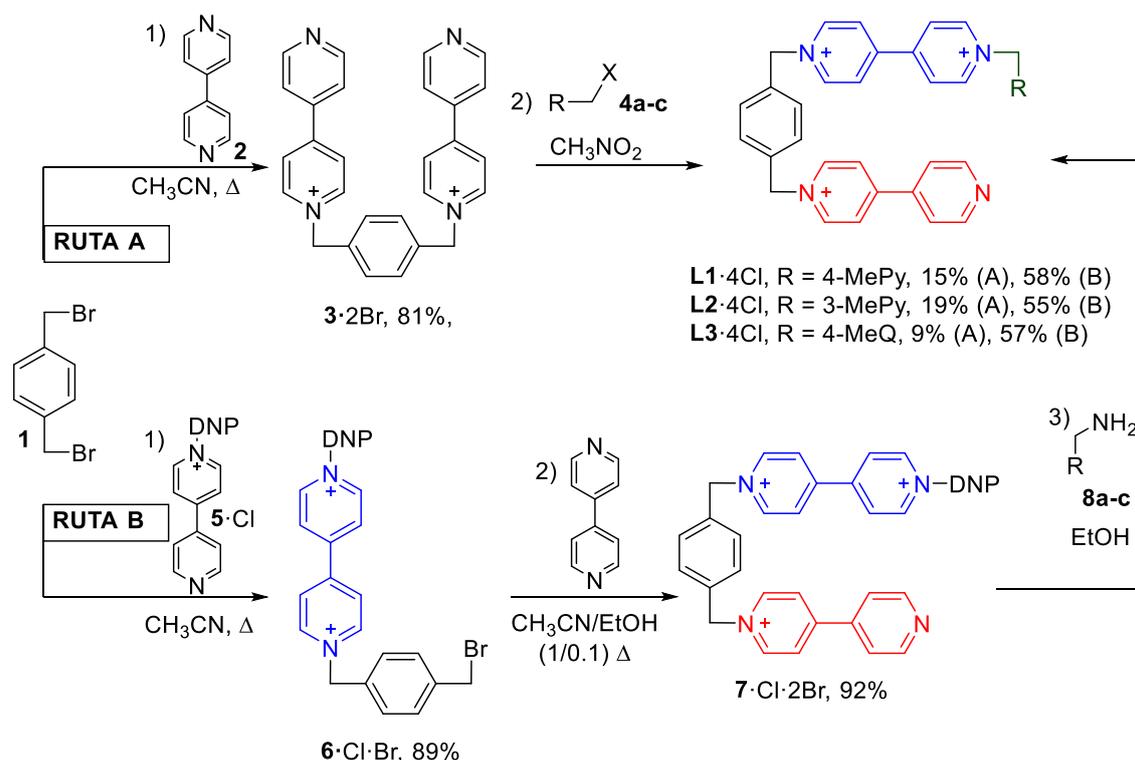
### 3.2.2 Desarrollo de una nueva estrategia sintética para los ligandos **L1-L3**.

Con el objetivo de preparar de manera más eficiente este tipo de ligandos, se ha desarrollado en el presente trabajo una nueva metodología sintética, a través de la cual, se consigue mejorar y simplificar su preparación.

Como se ha mencionado previamente, la síntesis publicada de ligandos basados en viológenos asimétricamente sustituidos resulta bastante problemática (ruta A, **Esquema 3**). Dicha ruta, se basaba en la alquilación secuencial de la 4,4'-bipiridina (**2**), primero con 1,4-bis(bromometil)benzoceno (**1**), seguida de la reacción con derivados halogenados de metilpiridina/metilquinolina. Aunque, en la primera etapa, se puede obtener el precursor simétrico **3** con buen rendimiento, en escala de gramos, empleando un gran exceso de 4,4'-bipiridina; es en la segunda etapa en la que baja considerablemente el rendimiento. Esto se debe, a la formación de productos polialquilados resultantes de la presencia de diferentes puntos con una nucleofilia similar en el precursor **3** y en los productos de reacción. La polialquilación no sólo reduce significativamente el rendimiento del producto deseado, sino que también dificulta considerablemente el aislamiento y purificación del mismo por cromatografía en columna.<sup>42,90</sup>

En la nueva ruta diseñada (ruta B, **Esquema 3**) se evita la etapa crítica de la alquilación final. Como se muestra en el **Esquema 3**, la reacción entre el cloruro de 1-(2,4-dinitrofenil-[4,4'-bipiridin]-1-ilo (**5·Cl**) y un gran exceso de 1,4-bis (bromometil)

benceno conduce a la monosustitución nucleófila del dibromuro (**1**). La introducción del grupo dinitrofenil (DNP), tiene dos objetivos: en primer lugar, proteger el compuesto frente a la polialquilación en la siguiente reacción con la 4,4'-bipiridina; y, en segundo lugar, permitir la introducción en la siguiente etapa de la subunidad de metilpiridina y metilquinolina empleando para ello la reacción quimioselectiva de Zincke que tiene lugar entre la bipiridina activada (**7**) y la correspondiente amina **8a-c**.

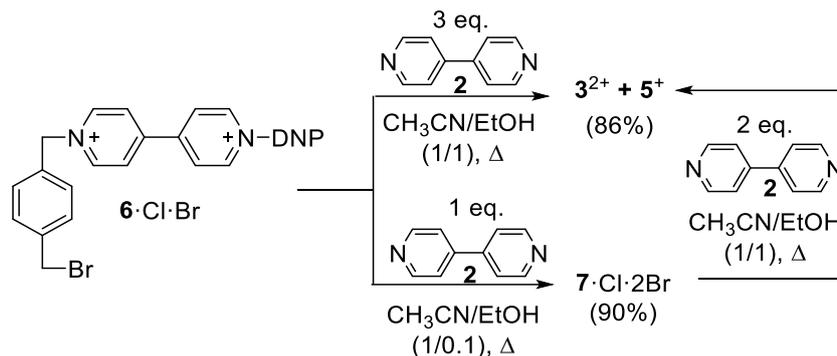


**Esquema 3:** Rutas sintéticas A y B para la obtención de los ligandos **L1-L3** previamente reportados (DNP = 2,4-dinitrofenilo, MePy = metilpiridina, MeQ = metilquinolina).

Como se esperaba, la ruta B proporciona los ligandos **L1-L3** con mejores rendimientos. Como resultado de que la solubilidad en las sales de  $6^{+2}$  y  $7^{+2}$  esté condicionada por el anión, estos precursores pueden ser fácilmente aislados por filtración, ya que precipitan una vez que se forman en el medio de reacción. Además, y de forma crucial, el método diseñado evita los problemas de aislamiento y purificación de los ligandos **L1-L3** entre los diversos productos polialquilados resultantes de la ruta A. Así, el único subproducto de la reacción de Zincke de la ruta B es la 2,4-dinitroanilina. Por ello la purificación mediante columna cromatográfica ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NaCl}$  (aq., 0.6 M)/  $\text{MeOH}$  4:1:1) de los productos finales es más sencilla y da lugar a dichos ligandos como sales de tricloruro en mejores rendimientos.

Hay que tener en cuenta que, en la ruta B, el resultado de la reacción entre el intermedio activado **6** y la bipiridina **2** está condicionado por las condiciones de reacción.

Así, si el proceso se lleva a cabo con una estequiometría 1:1 de los componentes en una mezcla CH<sub>3</sub>CN/EtOH 1:0.1, se obtiene exclusivamente el compuesto deseado **7**, que precipita en el medio de reacción. Por el contrario, si la reacción se lleva a cabo con un exceso de bipyridina a reflujo, y una mezcla de disolventes que prevenga la precipitación de **7** (CH<sub>3</sub>CN/EtOH 1:1), el exceso de bipyridina ataca la posición bencílica altamente activada que contiene la subunidad del viológeno, produciendo como resultado la descomposición de **7** en **3** y **5** (**Esquema 4**).



**Esquema 4:** Resultado de la reacción entre **6** y 4,4'-bipyridina en función de las condiciones de reacción.

Una de las claves de la eficiencia de la nueva metodología ha sido la utilización en la última etapa de síntesis de la reacción de Zincke,<sup>94</sup> que ya había sido ampliamente utilizada con éxito en nuestro grupo de investigación.<sup>19</sup> Esta reacción se basa en la alta susceptibilidad de las sales de Zincke (sales de piridinio activadas con grupos aromáticos deficientes en densidad electrónica) a ataques nucleófilos de, por ejemplo, aminas bencílicas o las derivadas de 4-fenilpiridina. El mecanismo de esta reacción es conocido como ANRORC (*Addition of the Nucleophile Ring Opening, and Ring Closure*), ya que transcurre a través de la apertura y cierre del anillo de piridina, produciendo dinitroanilina como subproducto.<sup>94</sup>

### 3.2.3 Síntesis de nuevos ligandos empleando la estrategia sintética desarrollada

Con el fin de analizar la versatilidad de la ruta sintética para la preparación de nuevos ligandos ditópicos basados en viológenos, que conducirían a nuevos receptores moleculares tras el ensamblaje con centros metálicos, se propuso la síntesis de los compuestos **L4-L7** (**Esquema 5**). Estructuralmente, los **L4-L5** son muy similares en términos de dimensiones a **L1-L3**, por lo que el ensamblaje de este tipo de ligandos con

<sup>94</sup> a) Zincke, Th.; Heuser, G.; Möller, W., *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1904**, 330, 361; b) Becher, J. *Synthesis*. **1980**, 589; c) Cheng, W.-C.; Kurth, M. J. *Org. Prep. Proced. Int.* **2002**, 34, 587.

centros metálicos de Pd(II)/Pt(II) conduciría a metalociclos con tamaños de cavidad parecidos. Sin embargo, la introducción de una pared de dialquil-2,7-diazapireno en **L4**, en lugar de 4,4'-bipiridina, resultaría en un metalociclo con dos paredes diferentes y un carácter  $\pi$ -deficiente mejorado en su cavidad. Por otro lado, el ensamblaje de los ligandos **L6-L7** conduciría a metalociclos de mayores dimensiones que **L1-L4**, como resultado de la introducción de un anillo aromático extra de seis miembros en el lado largo de su estructura. Por último, los ligandos **L5** y **L7** presentarían un sustituyente hidroxietilo y etoxicarboniletil respectivamente como *exo*-funcionalización, pudiendo incrementar la aplicabilidad de sus metalociclos resultantes. Diversos ejemplos de metalociclos funcionalizados han sido recientemente publicados,<sup>95</sup> mostrando su potencial en el desarrollo de sistemas funcionales tales como metalohidrogeles,<sup>96</sup> polímeros supramoleculares,<sup>97</sup> o sensores de vapor.<sup>98</sup>

Como se muestra en el **Esquema 5**, la estrategia concebida facilita la síntesis de los ligandos **L4-L7** en rendimientos globales aceptables (48%, 69%, 51% y 54%), confirmando la viabilidad de la reacción de Zincke para la introducción de la unidad de piridina coordinante en los ligandos ditópicos.

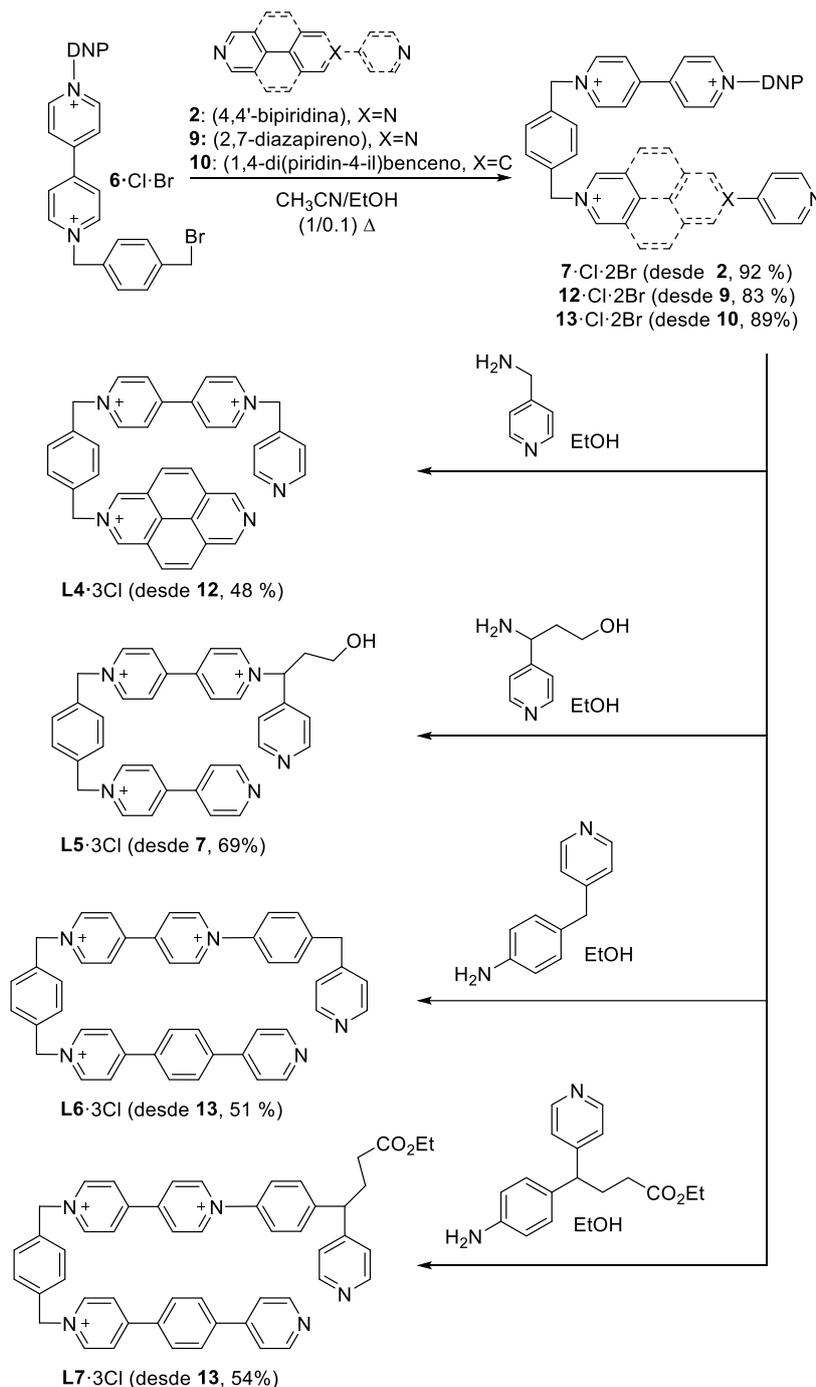
---

<sup>95</sup> a) Yang, H.-B.; Hawkrige, A. M.; Huang, S. D.; Das, N.; Bunge, S. D.; Muddiman, D. C.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 2120; b) Yang, H.-B.; Ghosh, K.; Zhao, Y.; Northrop, B. H.; Lyndon, M. M.; Muddiman, D. C.; White, H. S.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 839; c) Chakrabarty, R.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14738; d) Pollock, J. B.; Schneider, G. L.; Cook, T. R.; Davies, A. S.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 13676.

<sup>96</sup> Yan, X.; Li, S.; Cook, T. R.; Ji, X.; Yao, Y.; Pollock, J. B.; Shi, Y.; Yu, G.; Li, J.; Huang, F.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 14036.

<sup>97</sup> a) Yan, X.; Li, S.; Pollock, J. B.; Cook, T. R.; Chen, J.; Zhang, Y.; Ji, X.; Yu, Y.; Huang, F.; Stang, P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, *110*, 15585; b) Zhou, Z.; Yan, X.; Cook, T. R.; Saha, M. L.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 806.

<sup>98</sup> Jiang, B.; Zhang, J.; Ma, J.-Q.; Zheng, W.; Chen, L.-J.; Sun, B.; Li, C.; Hu, B.-W.; Tan, H.; Li, X.; Yang, H.-B. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 738.



**Esquema 5:** Preparación de los ligandos **L4-L7** usando la ruta sintética B.

### 3.2.4 Ensamblaje de los metalociclos mononucleares de Pd/Pt(II) derivados de los ligandos **L4-L7** en medio acuoso.

Con el fin de evaluar la capacidad de los nuevos ligandos sintetizados para producir receptores mononucleares metalocíclicos, se explora el autoensamblaje dirigido por Pd(II) en medio acuoso. Para conseguir formar rectángulos moleculares se necesita que el complejo de Pd(II) a utilizar sea planocuadrado y con dos posiciones *cis*-lábil, empleando por ello el compuesto (en)Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. Con la intención de mejorar la

solubilidad de los ligandos **L4-L7** en medio acuoso, así como la de evitar la interferencia de contraiones coordinantes en el ensamblaje, los ligandos son convertidos en sus correspondientes sales de nitrato mediante cambios de contraión.<sup>19</sup>

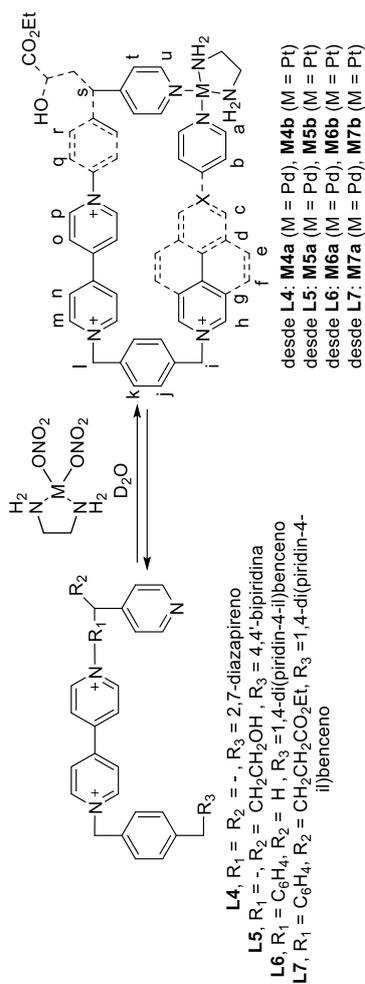
Siguiendo la metodología anteriormente publicada,<sup>99</sup> el proceso de ensamblaje se monitorizó por RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C a t.a., tras mezclar disoluciones stock en D<sub>2</sub>O del correspondiente ligando **L4-L7** con una cantidad equimolar de (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> a bajas concentraciones (0.5 mM en el caso de **L4-L6** y 2.5 mM en el caso de **L7**). En estas condiciones, se observan cambios en las señales de RMN que confirman la formación de los correspondientes metalociclos mononucleares **M4a-M7a**·5NO<sub>3</sub> (**Tabla 1**).

Aunque la labilidad a temperatura ambiente del enlace coordinativo piridina-Pd(II) permite el ensamblaje instantáneo de la supramolécula, este proceso es dependiente de la concentración, impidiendo aislar los metalociclos y limitando la caracterización de estos compuestos a técnicas en las que la muestra se encuentre en disolución. Con la intención de producir estructuras más estables, se pueden emplear los complejos planocuadrados de Pt(II) análogos a los de Pd(II), los cuales ofrecen enlaces mucho más inertes a temperatura ambiente. El enlace cinéticamente inerte Pt(II)-N se labiliza al aumentar la temperatura, permitiendo el aislamiento y la caracterización más exhaustiva de los metalociclos.<sup>100</sup> En este caso, los análogos de Pt(II) **M5b-M7b** se ensamblaron en agua, empleando el protocolo previamente publicado por el grupo de investigación, calentando una disolución equimolar acuosa de los componentes a 150°C durante 3 horas en un reactor de microondas.<sup>89c</sup>

---

<sup>99</sup> Peinador, C.; Blanco, V.; García, M. D.; Quintela, J. M. *PdII and PtII Metal-Directed Self-Assembly of Supramolecular Structures Based on N-Monoalkyl-4,4-Bipyridinium Derivatives*. In *Molecular Self-Assembly: Advances and Applications*; Li, A. D. Q., Ed.; Pan Stanford Publishing: Singapore, **2012**, 351.

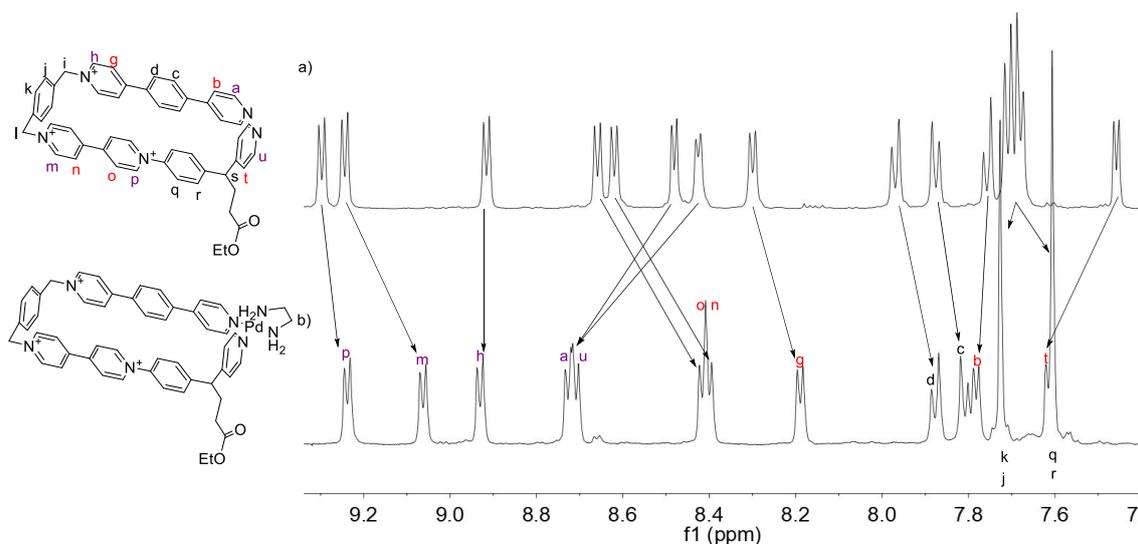
<sup>100</sup> Fujita, M.; Ibukuru, F.; Yamaguchi, K.; Ogura, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4175.



**Tabla 1:** Variaciones en los desplazamientos químicos de RMN de <sup>1</sup>H en protones representativos de cada metalociclo **M4a,b-M7a,b**, comparándolos con los de su correspondiente ligando libre **L4-L7** en D<sub>2</sub>O.

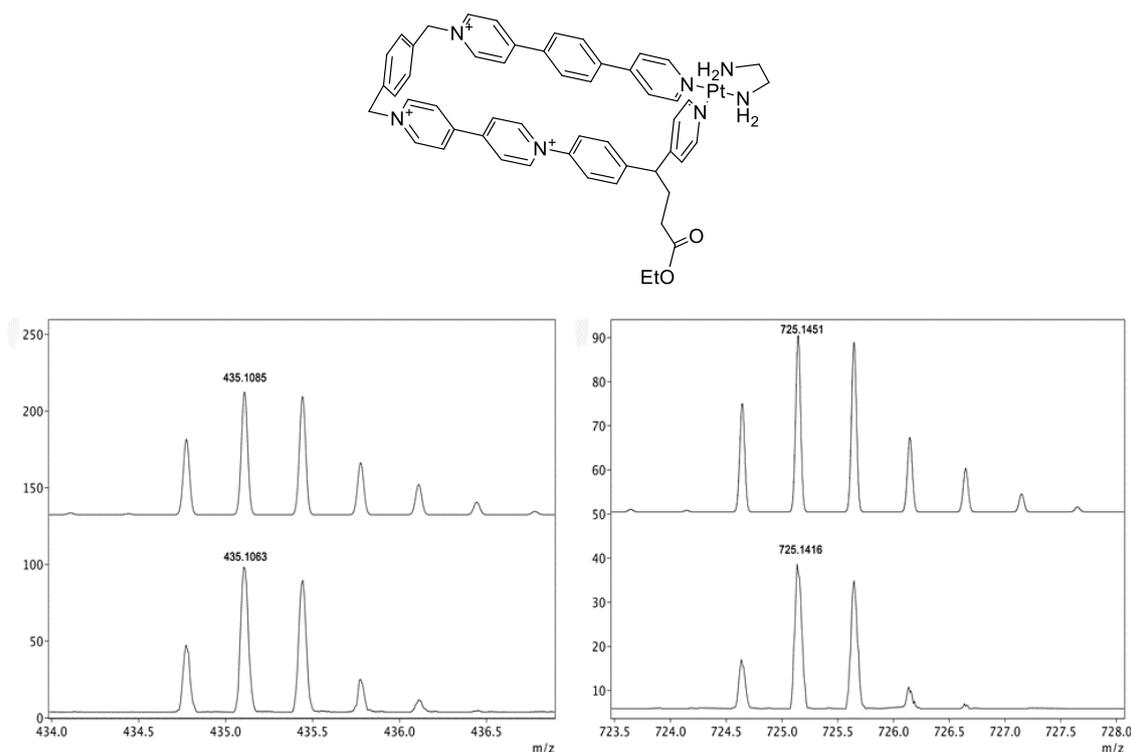
M	$\Delta\delta(\text{ppm})^a$																					
	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>	H <sub>d</sub>	H <sub>e</sub>	H <sub>f</sub>	H <sub>g</sub>	H <sub>h</sub>	H <sub>i</sub>	H <sub>j</sub>	H <sub>k</sub>	H <sub>l</sub>	H <sub>m</sub>	H <sub>n</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>p</sub>	H <sub>q</sub>	H <sub>r</sub>	H <sub>s</sub>	H <sub>t</sub>	H <sub>u</sub>	
<b>M4a</b>	--	--	0.54	--	0.21	0.12	--	0.16	-0.08	-0.08	-0.05	-0.18	-0.24	-0.69	-0.44	-0.16	--	--	--	-0.16	0.65	0.32
<b>M4b</b>	--	--	0.55	--	0.16	0.11	--	0.17	-0.08	-0.07	-0.07	-0.18	-0.24	-0.68	-0.45	-0.17	--	--	--	-0.16	0.64	0.32
<b>M5a</b>	0.08	-0.08	--	--	--	--	-0.25	-0.01	-0.05	0.07	0.07	-0.1	-0.14	-0.23	-0.24	-0.01	--	--	--	-0.07	0.25	0.2
<b>M5b</b>	0.09	0.01	--	--	--	--	-0.25	-0.03	-0.05	0.02	0.02	-0.05	-0.10	-0.24	-0.25	-0.07	--	--	--	-0.06	0.25	0.18
<b>M6a</b>	0.1	-0.11	-0.08	-0.26	--	--	-0.24	-0.04	-0.04	0.11	0.11	-0.1	-0.17	-0.27	-0.3	-0.12	-0.26	-0.26	-0.26	--	0.12	0.12
<b>M6b</b>	0.07	-0.06	-0.11	-0.27	--	--	-0.23	-0.03	0	0.1	0.1	-0.11	-0.16	-0.26	-0.29	-0.14	-0.26	-0.26	-0.26	--	0.12	0.11
<b>M7a</b>	0.3	0.01	-0.07	-0.09	--	--	-0.11	0.01	-0.08	0.01	-0.09	-0.08	-0.18	-0.21	-0.25	-0.06	-0.09	-0.08	-0.08	0.06	0.16	0.23
<b>M7b</b>	0.3	-0.02	-0.06	-0.10	--	--	-0.12	0.01	-0.09	0	-0.02	-0.09	-0.18	-0.22	-0.26	-0.07	-0.10	-0.08	0.05	0.14	0.25	0.25

Los experimentos mono y bidimensionales de RMN ofrecen información estructural en disolución sobre los metalociclos de Pd(II) **M4a-M7a** y los análogos de Pt(II) **M4b-M7b** (Tabla 1). Al analizar los datos obtenidos, recogidos en la Tabla 1, se comprueba que éstos claramente apoyan la formación de las supramoléculas **M4a,b-M7a,b**. A modo de ejemplo se analizan a continuación los cambios observados para el metalociclo **M7a**. Como se muestra en la Figura 38, la resonancia de los núcleos de protón para el metalociclo **M7a** cambia sustancialmente en comparación con el ligando libre como consecuencia del ensamblaje. En general, se observan dos efectos característicos: a) el desapantallamiento de los núcleos del ligando como consecuencia de la coordinación al centro metálico (un efecto que se ve incrementado en los hidrógenos y carbonos en las posiciones  $\alpha$  y  $\beta$  al nitrógeno de las piridinas que se coordinan al centro metálico); y b) el apantallamiento debido a la formación de la cavidad de los receptores, el cual da lugar a un desplazamiento a frecuencias menores de los núcleos en posiciones lejanas al centro metálico.



**Figura 38:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ): arriba, **L7**· $3\text{NO}_3$  (2.5 mM) y, abajo, **M7a**· $5\text{NO}_3$  [**L7**· $3\text{NO}_3$  (2.5 mM) + (en)Pd(ONO $_2$ ) $_2$  (2.5 mM)].

Como se ha mencionado anteriormente, la preparación de los análogos de Pt(II) **M5b-M7b** permite el aislamiento de las especies ensambladas y su caracterización como sales de hexafluorofosfato mediante espectrometría de masas. Consecuentemente, el experimento ESI-MS confirma las estructuras propuestas para **M4b**, **M6b** y **M7b**, mostrando valores  $m/z$  y patrones de distribución isotópica en buen acuerdo con los teóricos. A modo de ejemplo, se muestra en la Figura 39, el experimento de masas de alta resolución para los picos [**M7b**- $3\text{PF}_6$ ] $^{+3}$  y [**M7b**- $\text{PF}_6$ ] $^{+1}$  del metalociclo **M7b**.



**Figura 39:** Distribución isotópica (ESI-MS, m/z) calculada para [M7b-3PF<sub>6</sub>]<sup>+3</sup> (izquierda) y [M7b-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> (derecha) (arriba) y encontrada (abajo).

En el caso del metalociclo **M5b**·5PF<sub>6</sub>, al analizar los espectros de masas llevados a cabo, no se consiguieron detectar picos que se pudieran corresponder con el metalociclo o con pérdidas de contraiones del mismo.

### 3.2.5 Estudio en medio acuoso de los complejos de inclusión entre los metalociclos **M4a-M7a** y 1,5-DHN.

La habilidad de los nuevos metalociclos obtenidos para actuar como receptores metalocíclicos en medio acuoso fue cualitativamente estudiada para los metalociclos de Pd(II) análogos **M4a-M7a**, usando como sustrato 1,5-dihidroxinaftaleno (1,5-DHN). El 1,5-DHN presenta un importante carácter  $\pi$ -dador debido a la presencia en su estructura de dos átomos de oxígeno, de modo que al insertarse en la cavidad hidrofóbica y de carácter  $\pi$ -deficiente de los metalociclos, daría lugar a la formación de un complejo supramolecular basado en interacciones  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas. Además en el caso de los metalociclos con dimensiones óptimas, las interacciones C-H $\cdots$  $\pi$  también pueden contribuir al proceso de reconocimiento molecular, determinando el modo de inclusión del sustrato en el interior del receptor.<sup>101</sup>

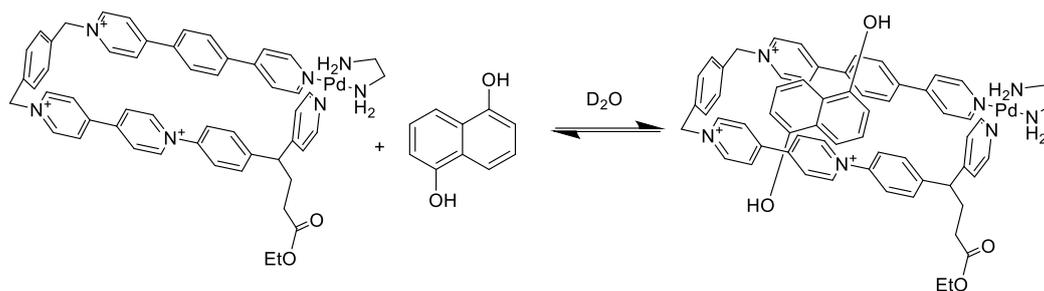
<sup>101</sup> Alvariño, C.; Pía, E.; García, M. D.; Blanco, V.; Fernández, A.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Chem. Eur. J.* **2013**, *19*, 15329.

Así, en este caso, la adición de un equivalente de 1,5-dihidroxinaftaleno a una disolución acuosa 0.5 mM de los metalociclos de Pd(II) **M4a-M6a** y 2.5 mM del metalociclo de Pd(II) **M7a**, produce cambios instantáneos en los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  que están en buen acuerdo con la formación de los complejos de inclusión. En, la mayoría de los casos, los experimentos 2D permiten elucidar los desplazamientos químicos relativos del receptor y del sustrato una vez formado el agregado huésped-receptor. En esencia, como se muestra en la **Tabla 2** para los cuatro complejos, y se ejemplifica en la **Figura 40** para el complejo de inclusión entre **M7a**·5NO<sub>3</sub> y 1,5-DHN. En este caso, los núcleos de los protones del sustrato aparecen apantallados como resultado de la complejación, debido a las interacciones  $\pi$ - $\pi$  con las paredes  $\pi$ -deficientes del metalociclo. Por otro lado, los núcleos de los receptores se apantallan como consecuencia de la complejación, aunque los que se encuentran en el lado corto del metalociclo se desapantallan debido al establecimiento de interacciones CH $\cdots\pi$ . Además, se observa en todos los casos un intenso cambio de color al producirse la inclusión debido al establecimiento de una banda de transferencia de carga, como consecuencia de las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre el receptor y el sustrato.

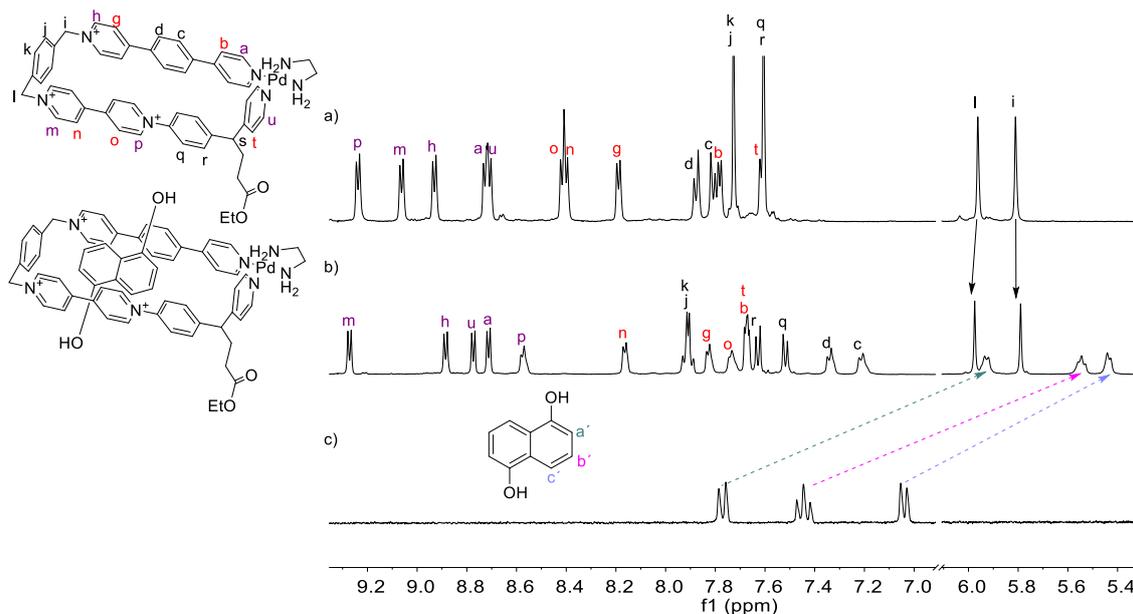
**Tabla 2:** Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  inducidos por el ensamblaje de los complejos de inclusión entre los metalociclos **M4a-M7a** y 1,5-DHN en solución acuosa.

Complejo de inclusión	$\Delta\delta$ (ppm) <sup>a</sup>		
	H <sub>a</sub>	H <sub>b</sub>	H <sub>c</sub>
<b>M4a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub>	0.78	0.34	0.35
<b>M5a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub>	1.11	0.93	0.64
<b>M6a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub>	1.14	1.13	1.01
<b>M7a</b> ⊂1,5-DHN·5NO <sub>3</sub>	1.83	1.89	1.6

En la **Figura 40** se pueden observar, a modo de ejemplo, los mencionados cambios para el complejo de inclusión formado por el metalociclo **M7a**·5NO<sub>3</sub> y el sustrato aromático 1,5-DHN.



**Esquema 6:** Formación del complejo de inclusión **M7a**⊂1,5-DHN⋅5NO<sub>3</sub>.



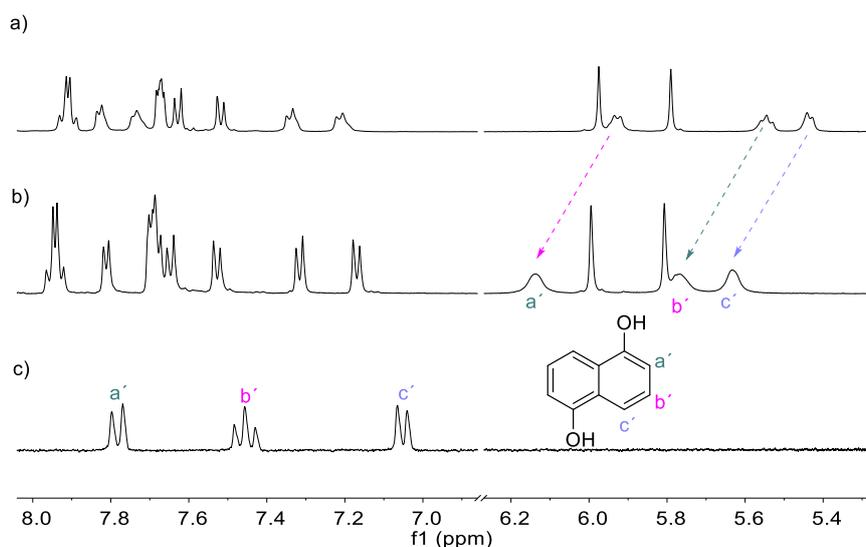
**Figura 40:** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) parciales para: a) metalociclo **M7a**⋅5NO<sub>3</sub>, b) el complejo de inclusión **M7a**⊂1,5-DHN⋅5NO<sub>3</sub> y c) 1,5-DHN.

En el caso mostrado, el desplazamiento es acusadamente mayor para los núcleos de protón del fenileno ( $\Delta\delta_{j,k} = -0.32$  ppm), que para los núcleos de protón de la piridina del lado corto ( $\Delta\delta_l = -0.05$  y  $\Delta\delta = -0.05$  ppm), lo que parece indicar que el sustrato se podrían disponer más próximo al lado del fenileno.

En cuanto a la naturaleza de los desplazamientos de los núcleos de protón, la formación de los complejos de inclusión se puede generalizar para los cuatro metalociclos estudiados. Sin embargo, la cinética del equilibrio de formación de sus respectivos complejos varía en función del metalociclo. Así, encontramos tres situaciones diferentes: situación de equilibrio rápido respecto a la escala de tiempos de RMN de los desplazamientos químicos para los metalociclos **M6a** y **M7a**, situación de coalescencia para el metalociclo **M5a** y situación de equilibrio lento para el metalociclo **M4a**.

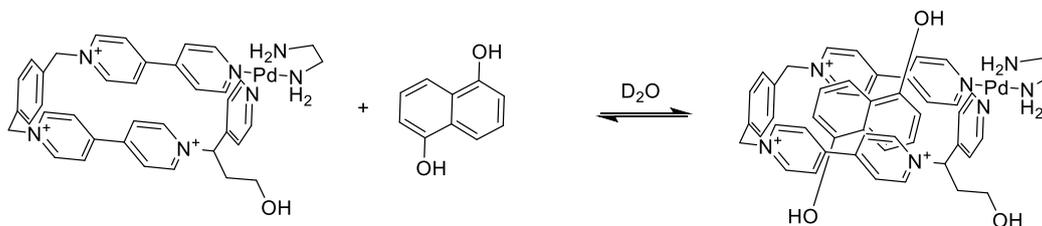
La adición de un exceso de sustrato a las disoluciones equimolares de los complejos **M6a**⊂1,5-DHN⋅5NO<sub>3</sub> y **M7a**⊂1,5-DHN⋅5NO<sub>3</sub>, conduce a un único conjunto

de señales (como se puede ver en la **Figura 41** para el complejo **M7a**·1,5-DHN·5NO<sub>3</sub>), confirmando que la inserción del sustrato en la cavidad es rápida en la escala de tiempos del RMN. Estas señales son el promedio del sustrato libre y del sustrato formando el complejo de inclusión. Así, en la **Figura 41** se puede observar como la posición de las señales del sustrato en una disolución con exceso del mismo respecto al receptor, se encuentra más próxima a las señales del sustrato libre que cuando en la mezcla se añaden los componentes en estequiometría 1:1.

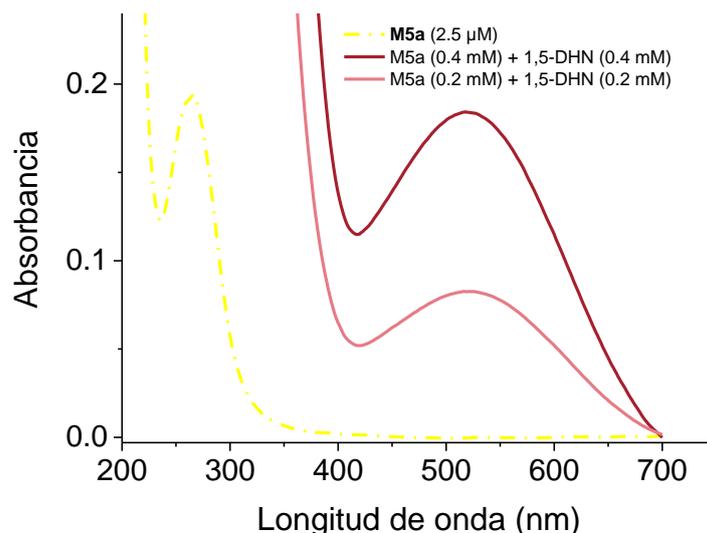


**Figura 41:** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN (500 MHz, D<sub>2</sub>O) parciales para a) el complejo de inclusión **M7a**·1,5-DHN·5NO<sub>3</sub> con estequiometría 1:1 de los dos componentes, b) el complejo de inclusión **M7a**·1,5-DHN·5NO<sub>3</sub> con estequiometría 2:1 y c) el sustrato 1,5-DHN.

Por otro lado, la adición de un equivalente de 1,5-DHN, a t.a., a una disolución acuosa de **M5a**·5NO<sub>3</sub> (**Esquema 7**) provoca un cambio en la coloración de la disolución del metalociclo desde amarillo a granate-violeta, debido al establecimiento de interacciones  $\pi$  entre la cavidad del metalociclo **M5a**·5NO<sub>3</sub> y el sustrato 1,5-DHN (**Figura 42**).



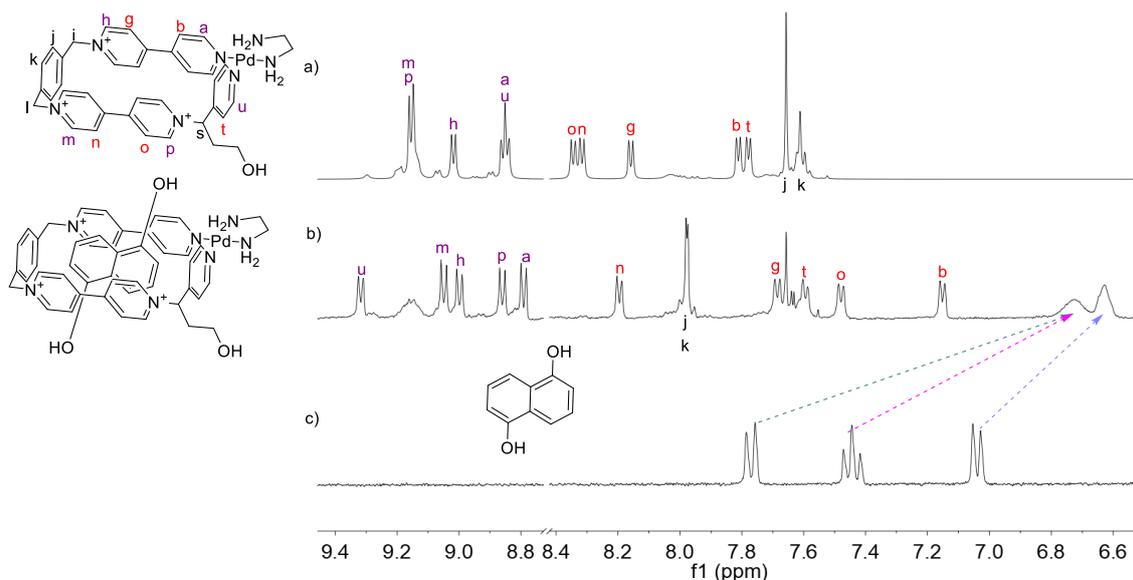
**Esquema 7:** Síntesis del complejo de inclusión **M5a**·1,5-DHN·5NO<sub>3</sub>.



**Figura 42:** Espectros de absorción ( $\text{H}_2\text{O}$ ) de **M5a** y de la mezcla de **M5a** con 1,5-DHN, en la que se aprecia la banda de transferencia de carga entre  $\lambda = 417\text{-}700$  nm.

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  resultante de la mezcla muestra señales ancheadas difíciles de asignar, indicándonos que el equilibrio de formación del complejo de inclusión se encuentra próximo a la coalescencia. Así, con el objetivo de asignar inequívocamente las señales del complejo supramolecular fue necesario calentar las muestras a 333K. Al aumentar la temperatura, las señales se definen como resultado del aumento de la velocidad del equilibrio (**Apéndice A99**).

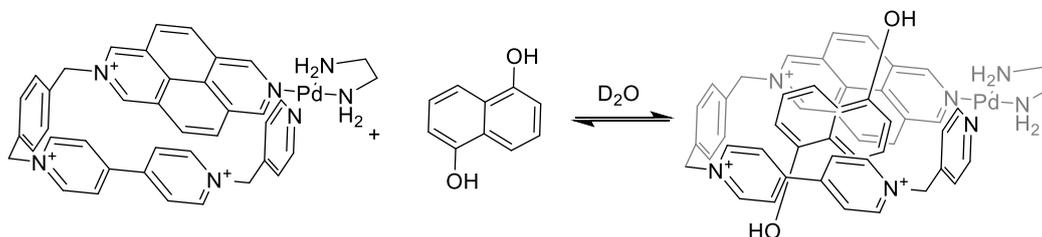
Al comparar el espectro de **M5a**·1,5-DHN·5NO<sub>3</sub> a 343 K con los del metalociclo **M5a** y el del sustrato libre 1,5-DHN, se observan cambios en buen acuerdo con la formación del complejo de inclusión: desplazamiento a campo alto de los protones del sustrato y de los protones de la pared larga del metalociclo, debido al establecimiento de interacciones  $\pi\text{-}\pi$ , y desplazamiento a campo bajo de los núcleos de los lados cortos, debido al establecimiento de interacciones  $\text{CH}\cdots\pi$  con el sustrato (**Figura 43**).



**Figura 43:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) metalociclo  $\text{M5a}\cdot 3\text{NO}_3$ , b) complejo de inclusión  $\text{M5a}\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  a 343K y c) 1,5-DHN.

Una situación especialmente particular, en cuanto a la cinética del proceso de inclusión, la encontramos en el caso del metalociclo  $\text{M4a}\cdot 5\text{NO}_3$  (**Esquema 8**). Este metalociclo rectangular tiene la particularidad de tener en uno de sus lados una subunidad de 2,7-diazapireno. La unidad de 2,7-diazapireno es ideal para el establecimiento de interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los sustratos  $\pi$ -deficientes al presentar una superficie aromática mayor que la 4,4'-bipiridina. Este tipo de sistemas con subunidades de diazapireno han sido ampliamente estudiados en el grupo de investigación como receptores.<sup>48,102</sup>

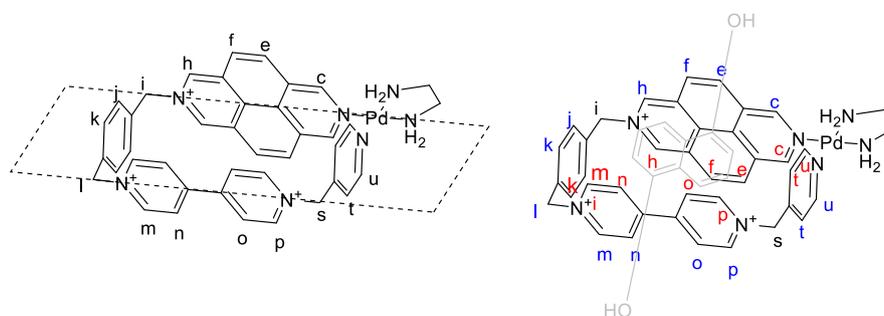
Al adicionar un equivalente de 1,5-DHN a una disolución acuosa de  $\text{M5a}\cdot 5\text{NO}_3$  se observan cambios en la coloración de la disolución que varía de naranja intenso a rojo oscuro debido al establecimiento de una banda de transferencia de carga que indica la formación del complejo de inclusión.



**Esquema 8:** Formación del complejo de inclusión  $\text{M4a}\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$ .

<sup>102</sup> Rama, T.; López-Vidal, E. M.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. *Chem. -Eur. J.* **2015**, *21*, 9482.

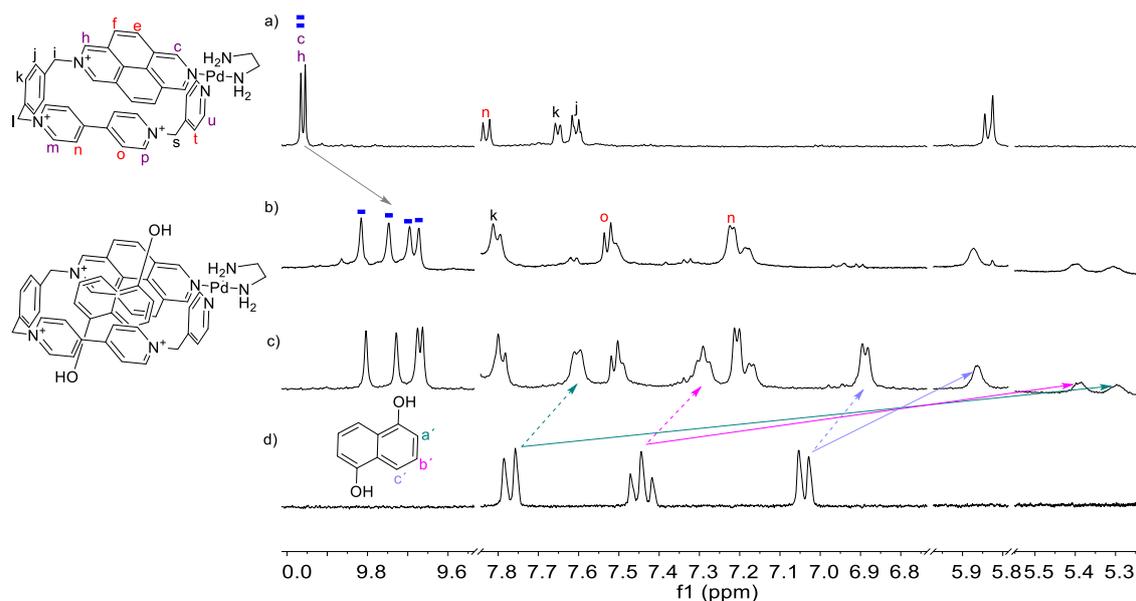
En el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para el compuesto **M4a** $\subset$ 1,5-DHN $\cdot$ 5NO $_3$  se observa que las señales correspondientes al diazapireno aparecen desdobladas (**Figura 45**). Este efecto se debe a la pérdida de simetría del metalociclo al incluirse en su cavidad el sustrato. Al insertarse el sustrato, impide la libre rotación del anillo de diazapireno a lo largo del eje Pd-CH $_2$ , de modo que, los protones H $_{e,c}$  y H $_{f,h}$  del 2,7-diazapireno dejan de ser químicamente equivalentes al presentar un entorno químico diferente y por ello aparecen desdoblados. Sin embargo, los protones de la cara de la 4,4'-bipiridina son capaces de rotar a lo largo del eje Pd-CH $_2$  al insertarse el sustrato, por lo que dichos protones no aparecen desdoblados. En la **Figura 44**, se muestra como los núcleos de la cara superior e inferior del metalociclo son equivalentes respecto a su plano horizontal, pero esa equivalencia se pierde tras el proceso de inclusión por la desaparición de dicho plano de simetría en el complejo de inclusión.<sup>102</sup>



**Figura 44:** A la izquierda, el metalociclo **M4a** $\cdot$ 5NO $_3$  y a la derecha, el complejo de inclusión **M4a** $\subset$ 1,5-DHN $\cdot$ 5NO $_3$ .

La adición de un exceso del sustrato a la mezcla estequiométrica conduce a la aparición de un nuevo set de señales para este, indicando que el equilibrio es lento en la escala de tiempos del RMN (**Figura 45**). Con respecto a los desplazamientos de las señales del metalociclo, se observa que tanto las señales de la cara del diazapireno como las de la bipiridina se desplazan a campo alto debido a interacciones  $\pi$ - $\pi$  con el sustrato. Sin embargo, las señales del anillo de piridina y del anillo de fenileno se desplazan a campo bajo, debido a interacciones CH $\cdots\pi$  con los protones del sustrato.

Al tratarse de un equilibrio de inserción lento es posible obtener la estequiometría del agregado mediante la integración relativa de las señales del sustrato complejado frente a las del receptor, confirmándose que la estequiometría del proceso de inclusión es 1:1.<sup>102</sup>



**Figura 45:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) metalociclo  $\text{M4a}\cdot 5\text{NO}_3$ , b) complejo de inclusión  $\text{M4a}\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$ , c) complejo de inclusión  $\text{M4a}\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  con exceso de 1,5-DHN (2 equivalentes) y d) 1,5-DHN. Leyenda: los rectángulos azules hacen referencia a núcleos correspondientes a la subunidad del diazapireno.

Los resultados obtenidos para los complejos de inclusión discutidos en esta sección están en buen acuerdo con los previamente reportados,<sup>42</sup> convirtiéndose así, en nuevos ejemplos del potencial de los metalociclos  $\pi$ -deficientes de este tipo para actuar como receptores de sustratos aromáticos en disolución.

### 3.2.6 Ensamblaje de los metalociclos mononucleares de Pd y Pt (II) en medio acuoso derivados de los ligandos L4-L7. Formación de dímeros.

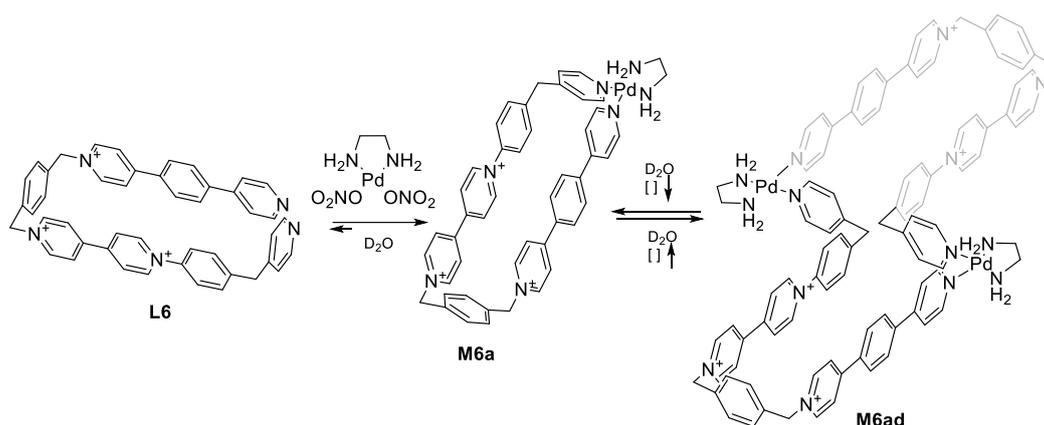
En los procesos de autoensamblaje de ligandos ditópicos dirigido por centros metálicos, el factor entálpico favorece la formación a bajas concentraciones de especies cíclicas frente a especies oligoméricas lineales, debido al mayor número de interacciones favorables por unidad autoensamblada.<sup>103</sup> Por otro lado el factor entrópico favorece también la formación de los ciclos más pequeños, debido a que el coste energético asociado a la pérdida de grados de libertad es menor en sistemas con menos subunidades.<sup>93c,93d</sup>

Por lo tanto, cabría esperar que al estudiar el proceso de dilución del ensamblaje de los ligandos ditópicos descritos con el centro metálico de Pd se observase un amplio rango de concentraciones en los que especie metalocíclica más pequeña se presentase como mayoritaria frente a los oligómeros. Así, se llevaron a cabo experimentos de

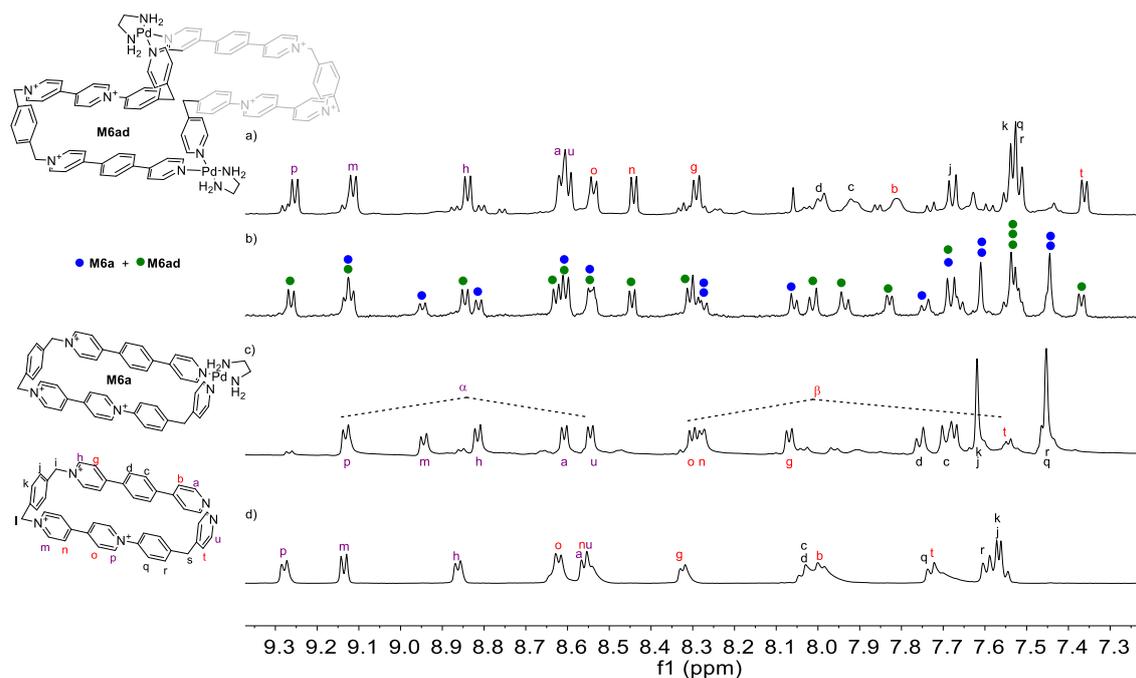
<sup>103</sup> a) Chi, X.; Guerin, A. J.; Haycock, R. A.; Hunter, C. A.; Sarson, L. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 0, 2563; b) Lawrence, D. S.; Jiang, T.; Levett, M. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2229.

dilución para los distintos sistemas autoensamblados descritos, partiendo de disoluciones equimolares de los ligandos y los centros metálicos.

De esta forma, para el metalociclo **M7b**·5NO<sub>3</sub>, el estudio de dilución por RMN de <sup>1</sup>H muestra la existencia de una única especie en un rango de concentraciones de 5 a 0.1 mM (**Apéndice A146**). Sin embargo, los resultados son diferentes al realizar el mismo experimento con el resto de los ligandos **L4-L6**. Así, por ejemplo, en el caso del metalociclo **M6a**·5NO<sub>3</sub> con las mismas dimensiones que el metalociclo **M7a**·3NO<sub>3</sub>, solamente se observa el metalociclo **M6a**·3NO<sub>3</sub> aislado en un rango de concentraciones en el intervalo de 1.25 a 0.1mM. Sorpresivamente, a medida que aumenta la concentración de componentes aparece otro conjunto de señales, totalmente definidas, lo que lleva a pensar que dichas señales no deberían corresponderse con oligómeros. Así, al llegar a concentración 10 mM se observa la nueva especie como mayoritaria (**Figura 46** para **L6**). De esta forma, se postula para el ensamblaje de **L4-L6** la aparición de especies diméricas en un rango de concentraciones de componentes alta (**Esquema 9**).



**Esquema 9:** Representación de la interconversión entre el metalociclo mononuclear **M6a** y dinuclear **M6ad**.

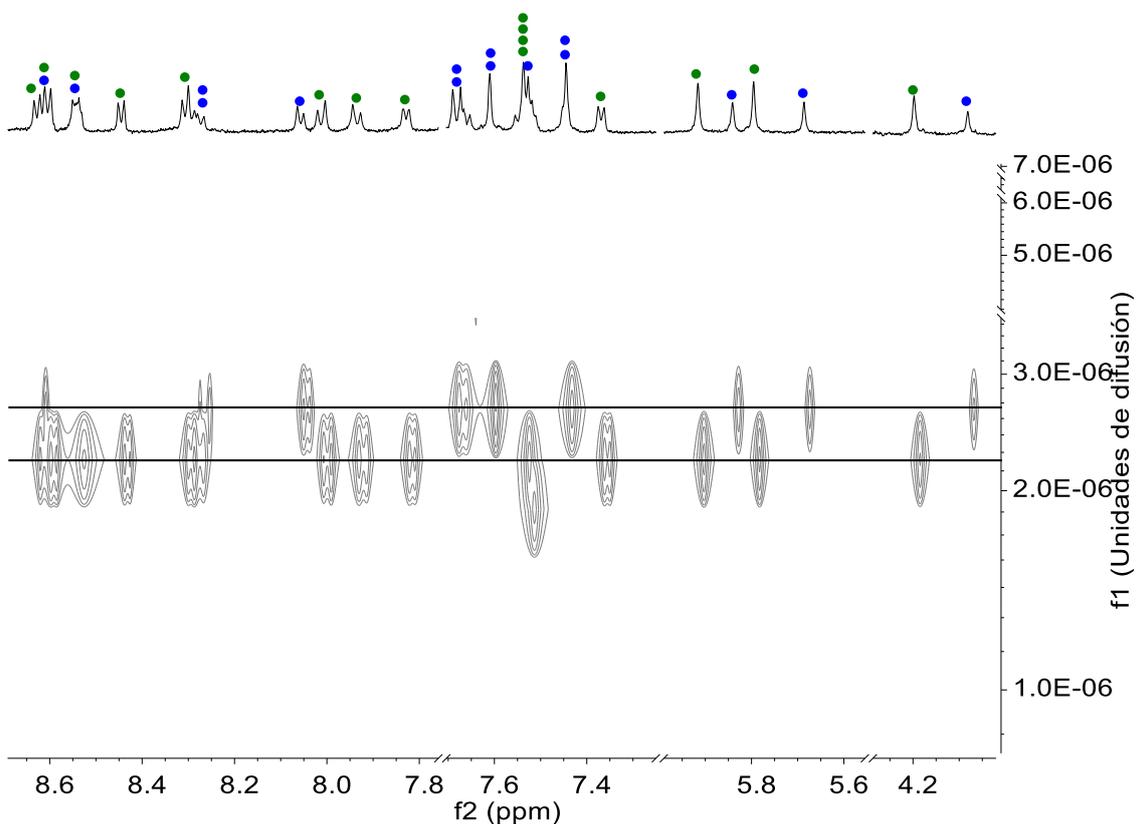


**Figura 46:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla de  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  (10 mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (10 mM); b)  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  (5mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (5 mM) (los círculos verdes representan señales que se corresponden con el dímero **M6ad** y los círculos azules representan señales que se corresponden con el monómero **M6a**); c) el metalociclo  $\text{M6a}\cdot 5\text{NO}_3$  a concentración 0.5 mM y d) el ligando  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$ .

Al analizar los desplazamientos de los núcleos de la nueva especie autoensamblada a 10 mM de componentes, con respecto a los del ligando **L6** libre, se observa que estos desplazamientos son claramente menos acusados que los movimientos típicos debidos a la formación de la cavidad para una especie mononuclear. Este hecho indica claramente que nos podríamos encontrar ante una especie cíclica pero dimérica, en la que la cavidad no estaría tan definida como en el caso del monómero.

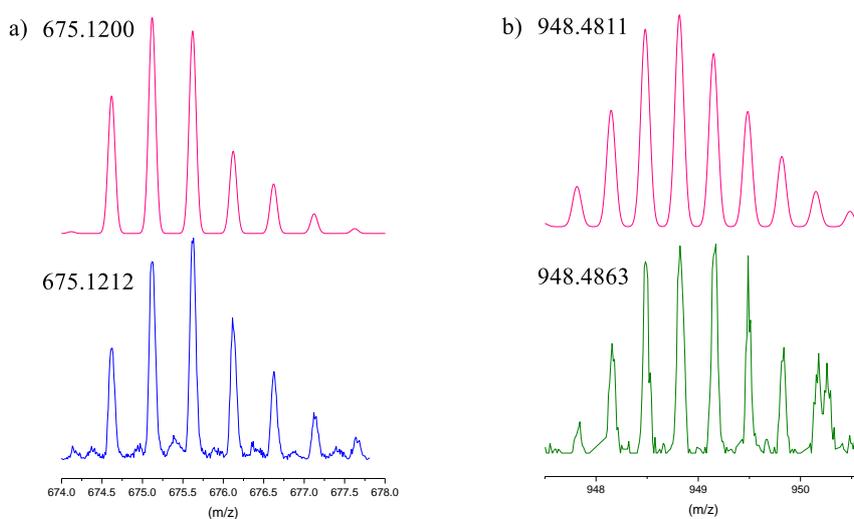
Para verificar la existencia de las dos especies propuestas en disolución se realiza un experimento DOSY de la mezcla del monómero y el posible dímero, que permite determinar el coeficiente de difusión de las especies presentes en la disolución.<sup>104</sup> Al realizar este experimento sobre una disolución equimolar de  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  (2.5mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (2.5 mM) se corrobora la formación de dos especies con diferente coeficiente de difusión molar. Se observa que las señales de RMN de  $^1\text{H}$  que se correspondería con el monómero del metalociclo difunden más rápidamente que las que se corresponderían con el dímero, en buen acuerdo con lo que cabría esperar (**Figura 47**).

<sup>104</sup> a) Johnson, C. S. *Jr. Prog. Nucl. Magn. Reson.* **1999**, *34*, 203. (b) Wu, D.; Chen, A.; Johnson, C. S. *Jr. J. Magn. Reson. A.* **1995**, *115*, 260; b) Antalek, B. *Conc. Magn. Reson.* **2002**, *14*, 225; c) Huo, R.; Wehrens, R.; van Duynhoven, J.; Buydens, L. M. C. *Anal. Chim. Acta.* **2003**, *490*, 231.



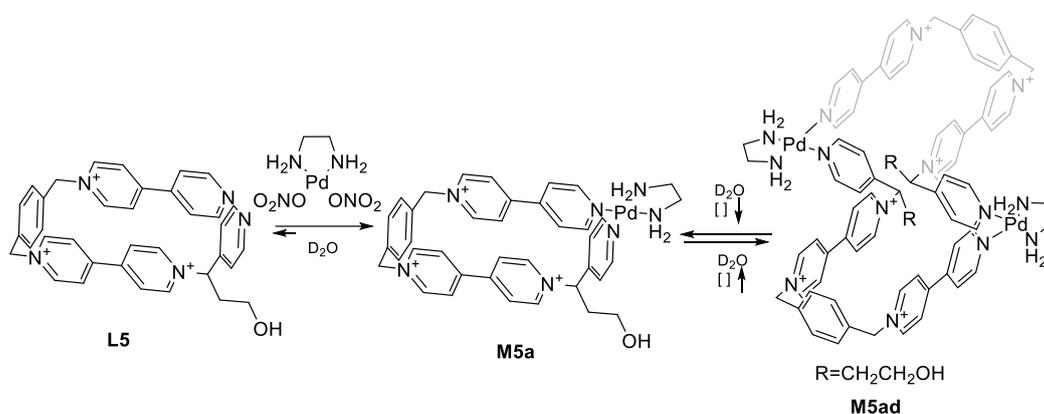
**Figura 47:** DOSY (500 MHz, D<sub>2</sub>O) para la mezcla de **L6**·3NO<sub>3</sub> y el complejo (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>. Los códigos de colores de los círculos son los mismos que los empleados en la **Figura 46**.

Adicionalmente, para confirmar la hipótesis de la presencia de la especie dinuclear, se preparó la mezcla análoga de Pt a 2.5 mM de componentes, y la mezcla obtenida se estudió por EM-ESI. El experimento confirmó la hipótesis de partida, al encontrarse picos de alta resolución que se corresponden con pérdidas de contraiones de la especie dinuclear y mononuclear (**Figura 48**).

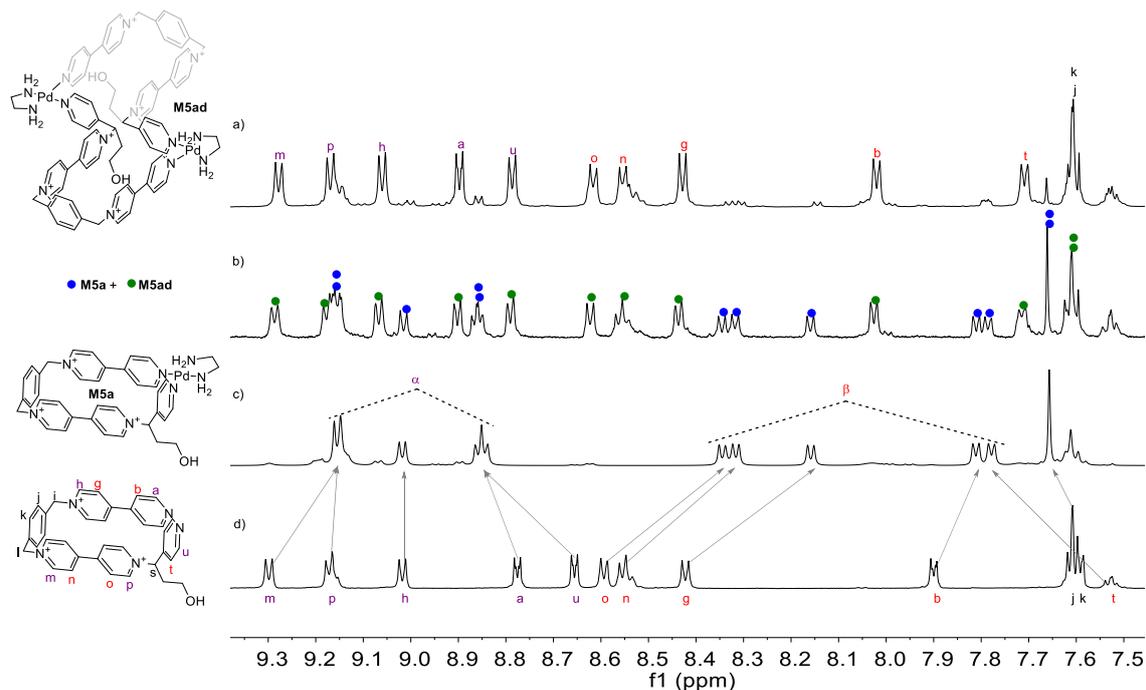


**Figura 48:** ESI-MS (m/z), distribución isotópica calculada para [M**6b**-2PF<sub>6</sub>]<sup>+2</sup> y [M**6bd**-3PF<sub>6</sub>]<sup>+7</sup> (arriba) y encontrada (abajo). Leyenda: color rosa para la distribución teórica, azul para el pico encontrado correspondiente al monómero y verde para el correspondiente al dímero.

A continuación, se reproduce el mismo experimento para los metalociclos cortos. Para **L5**, al igual que en el caso anterior, se observa que a medida que aumenta la concentración aparece un nuevo conjunto de señales totalmente definidas (**Figura 49**). Del mismo modo que en el caso anterior, se asocia la aparición de dichas señales a la formación de la especie dinuclear (**Esquema 10**). Así, en el espectro de  $^1\text{H}$  RMN se observan dos especies diferentes en función de la concentración de componentes. La especie que se correspondería con el espectro de la **Figura 49a** y que aparece a concentraciones más altas presenta un desplazamiento de las señales  $\alpha$  y  $\beta$  menos acusado con respecto al ligando libre que la especie mononuclear. Por lo que se postula, que esta especie debería corresponderse con el metalociclo dinuclear **M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** que aparece al aumentar la concentración de los componentes.



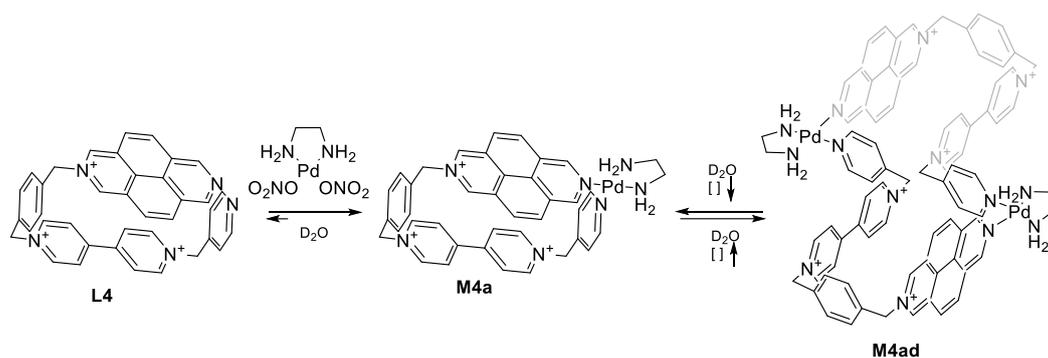
**Esquema 10:** Representación esquemática de la interconversión entre el metalociclo mononuclear **M5a** y dinuclear **M5ad**.



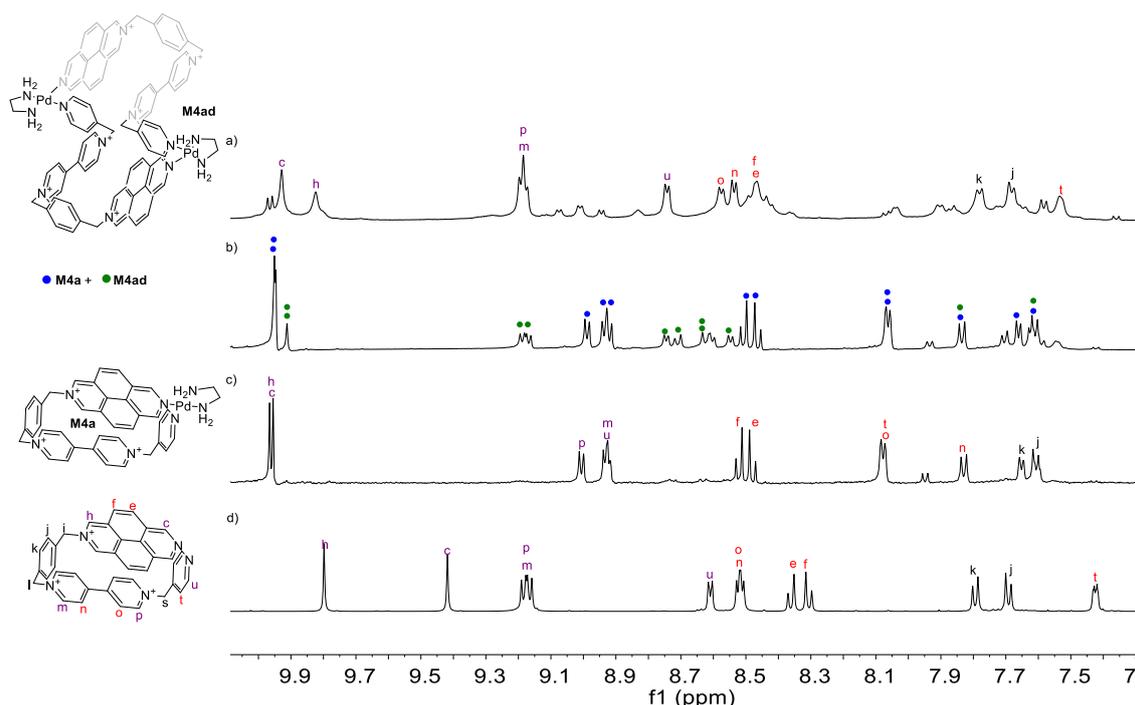
**Figura 49:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) mezcla del ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$  (15 mM) y el complejo de  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (15 mM); b) mezcla del ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$  (10 mM) y el complejo de  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (10 mM) (se sigue el mismo código de colores que en la **Figura 46**); c) el metalociclo  $\text{M5a}\cdot 5\text{NO}_3$  a concentración 2.5 mM y d) el ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$ .

El experimento DOSY de la mezcla del ligando  $\text{L5}\cdot 3\text{NO}_3$  y el complejo de  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  a concentración 10 mM también confirmó la existencia de dos especies en disolución (**Apéndice A122**). Adicionalmente, se preparó la mezcla de componentes de Pt(II) equivalente, que se precipitó con hexafluorofosfato de potasio para obtener el espectro de masas correspondiente. Desafortunadamente, en este caso no se pudieron obtener picos de masas ni del monómero ni del dímero.

Por último, se llevó a cabo el estudio del efecto de la concentración de componentes en el ensamblaje del ligando **L4**. Del mismo modo que con los metalociclos **M6a** y **M5a**, se observa una especie a baja concentración (0.1-1.25mM) que se correspondería con el monómero. A medida que aumenta la concentración aparece un nuevo conjunto de señales asociadas a la especie dimérica (**Figura 50**).



**Esquema 11:** Representación esquemática de la interconversión entre el metalociclo mononuclear **M4a** y dinuclear **M4ad**

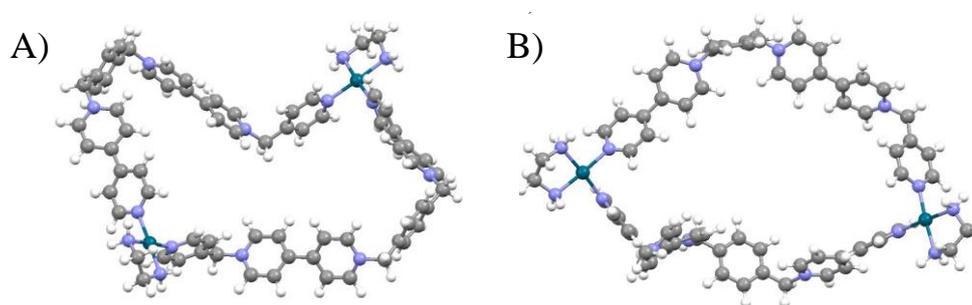


**Figura 50:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) mezcla del ligando **L4**· $3\text{NO}_3$  (15 mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (15 mM); b) mezcla del ligando **L4**· $3\text{NO}_3$  (5 mM) y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  (5 mM) (se usó el mismo código de colores que en la **Figura 46**); c) el metalociclo **M4a**· $5\text{NO}_3$  a concentración 0.5 mM y d) el ligando **L4**· $3\text{NO}_3$ .

Al igual que en los casos anteriores se lleva a cabo el DOSY de la mezcla del ligando **L4** y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  a concentración 5 mM (**Apéndice A115**). Dicho experimento nos confirma la existencia de las dos especies en disolución, con las señales de RMN  $^1\text{H}$  que se corresponderían con el dímero difundiendo más lentamente que las del monómero. Del mismo modo, la preparación del análogo de Pt de la mezcla permite obtener picos de masas de alta resolución correspondientes a pérdidas de hexafluorofosfato del monómero y del dímero (**Apéndice A116**).

Con el fin de obtener algo más de información sobre la posibilidad de formación de este tipo de estructuras diméricas propuestas, se llevaron a cabo cálculos DFT para

determinar la estructura más probable de los dímeros en disolución acuosa. Para simplificar los cálculos se utiliza como modelo el metalociclo estructuralmente más simple derivado del ligando **L1**. Se parte así de dos geometrías posibles (**dímero 1** y **dímero 2**). Los resultados muestran que el **dímero 1** (**Figura 51**), con una estructura en ZigZag es el más probable, y con una distancia entre lados de entre 10-11 Å, lo cual explicaría el menor desapantallamiento de las señales por RMN comparándolo con el desplazamiento de los núcleos del monómero. La diferencia de energías entre el **dímero 1** y el **dímero 2** es muy pequeña, por lo que ambas estructuras podrían coexistir en disolución. Usando la base de cálculo M06 la proporción resultante de **dímero 1/dímero 2** en disolución sería 95/15.

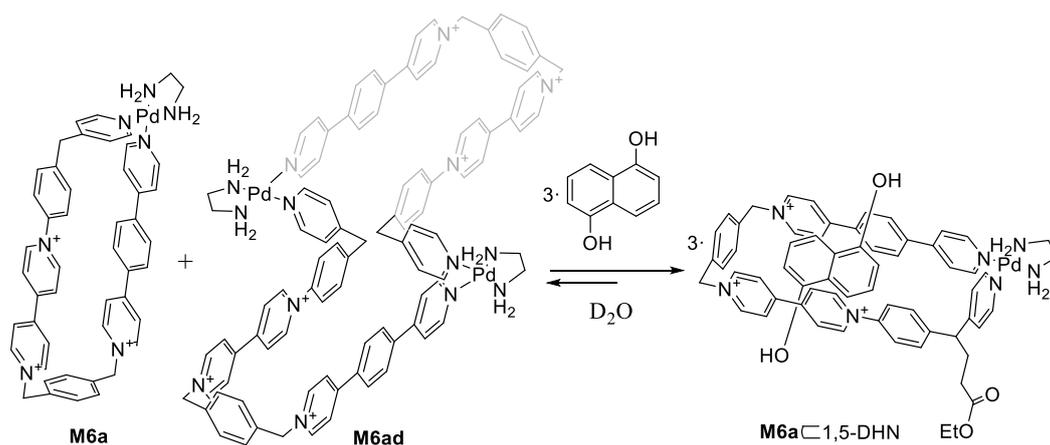


**Figura 51:** Estructuras optimizadas más estables obtenidas mediante cálculos DFT para los dímeros usando la base de cálculo M06: A) **dímero 1** y B) **dímero 2**.

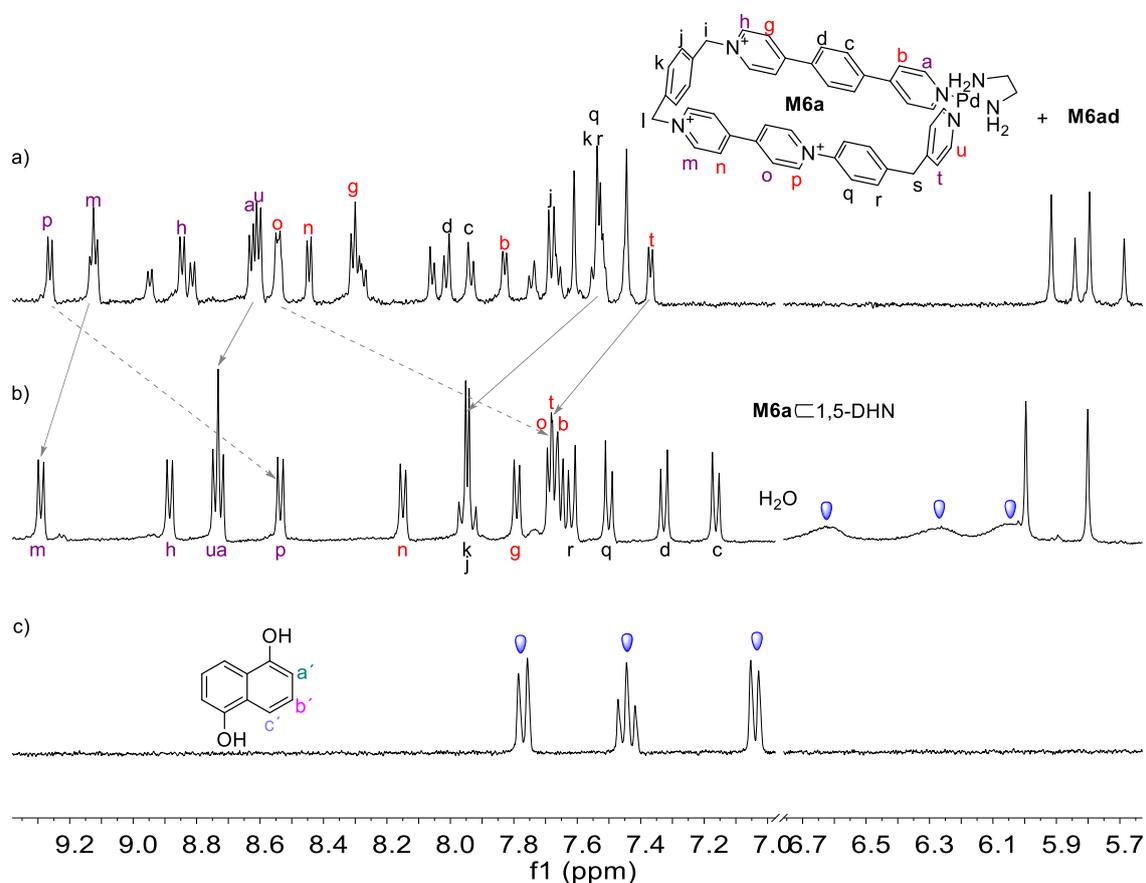
### 3.2.7 Reorganización de la especie dinuclear a la especie mononuclear mediante la adición de una plantilla

Los resultados discutidos con anterioridad muestran que la composición del sistema monómero-dímero, para los metalociclos **M4-M6**, puede controlarse mediante la dilución de la mezcla de los ligandos **L1-L4** con los complejos metálicos. En base a trabajos recientes del grupo de investigación,<sup>45,105</sup> también se analizó cual sería el efecto de la adición de una plantilla adecuada sobre la especiación del sistema.

<sup>105</sup> Blanco-Gómez, A.; Rama, T.; Domarco, O.; Neira, I.; Blanco, V.; Quintela, J. M.; García, M. D.; Peinador, C. *Dalton Trans.* **2017**, 46, 15671.



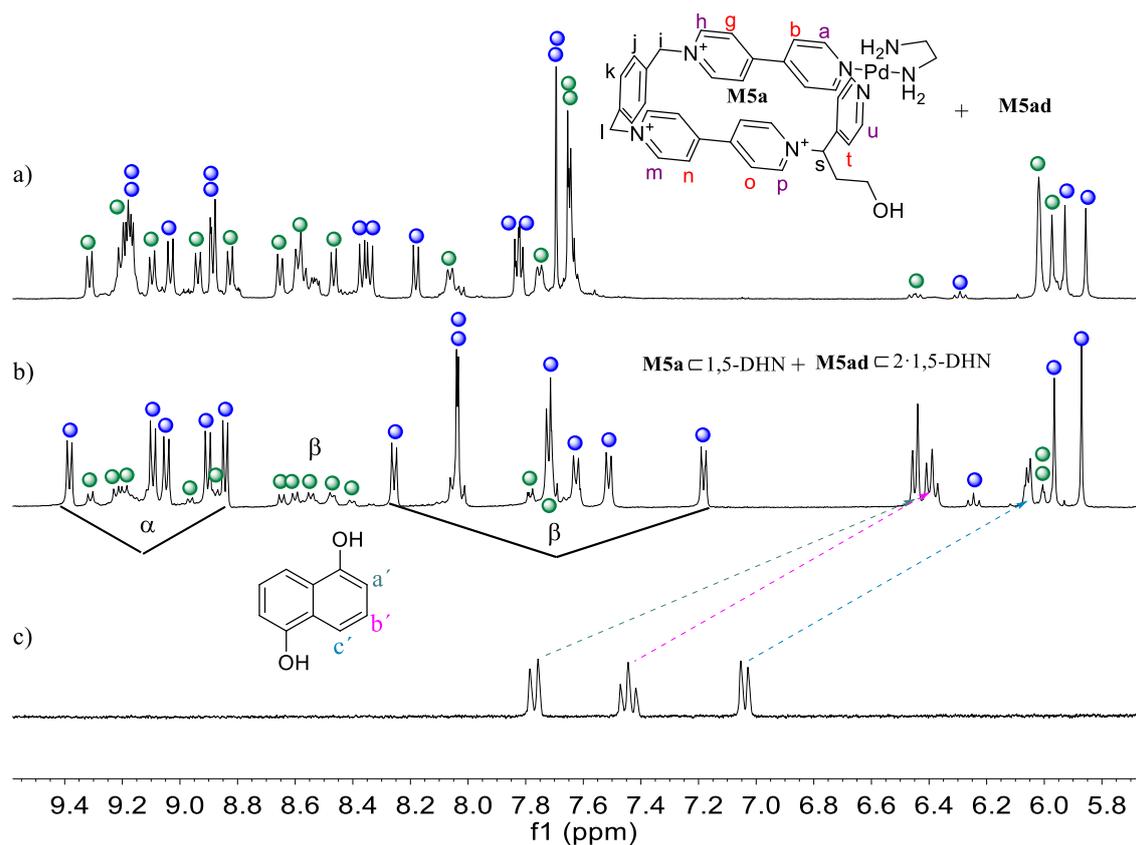
**Esquema 12:** Reordenamiento del sistema monómero-dímero mediante la adición de la plantilla 1,5-DHN.



**Figura 52:** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) parciales para a) mezcla  $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$  y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  a concentración 5mM, b) complejo de inclusión  $\text{M6a}\subset 1,5\text{-DHN}\cdot 5\text{NO}_3$  y c) 1,5-DHN.

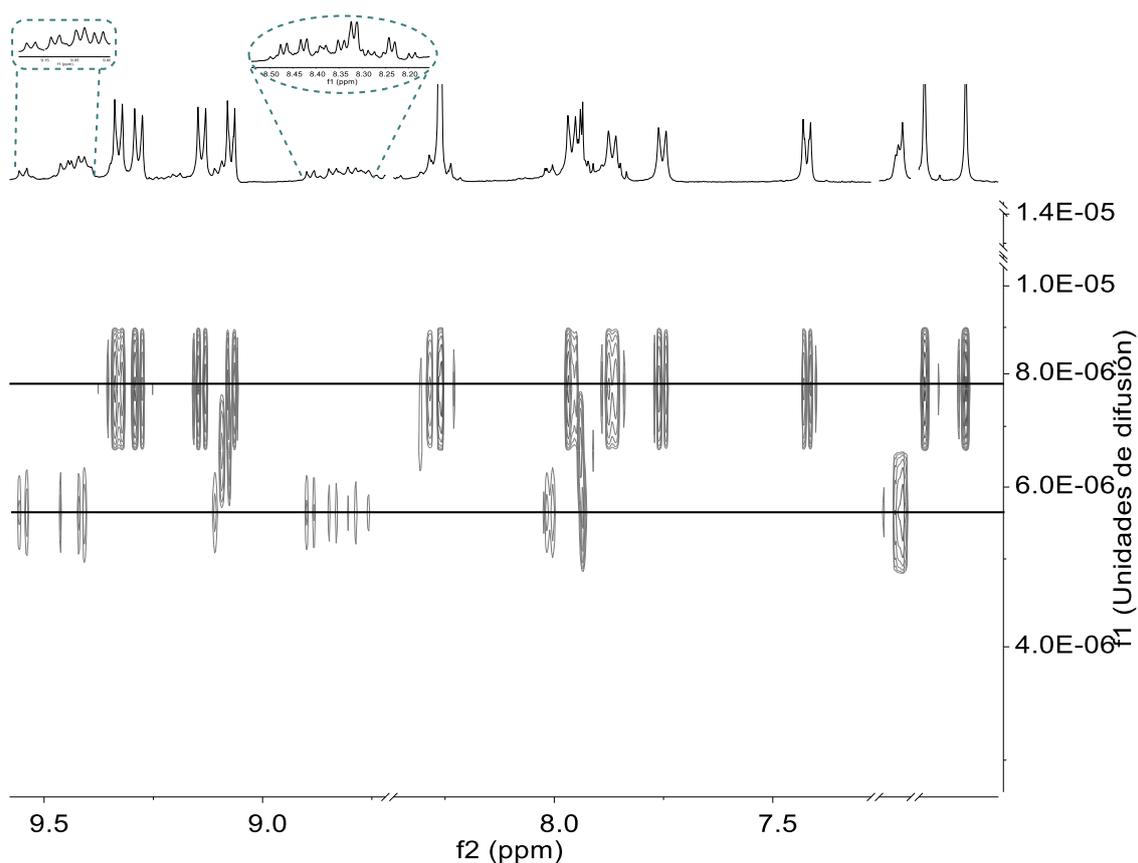
Así, sobre una disolución del ligando **L6** y el complejo  $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$  a concentración 5mM, en la que se observa mezcla del metalociclo mononuclear y dinuclear, se le añade un equivalente del sustrato aromático  $\pi$ -excedente 1,5-dihidroxinaftaleno. En el experimento de RMN de  $^1\text{H}$  de la mezcla resultante se observa únicamente las señales correspondientes al complejo de inclusión de una de las dos





**Figura 53:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla de los metalociclos **M5a** y **M5ad**, b) complejo de inclusión **M5a**  $\subset$  1,5-DHN  $\cdot$  5NO<sub>3</sub> y **M5ad**  $\subset$  1,5-DHN  $\cdot$  10NO<sub>3</sub> a 343 K y c) 1,5-DHN. Mismo código de colores que el empleado en la **Figura 46**.

El experimento DOSY de una mezcla del complejo del metalociclo mononuclear **M5a** (mayoritario) y del complejo del metalociclo dinuclear **M5ad** con el sustrato 1,5-DHN, confirma la existencia de las dos especies en disolución. Tal y como cabría esperar, las señales que se corresponderían con el complejo del metalociclo dinuclear difunden más lentamente (**Figura 54**).

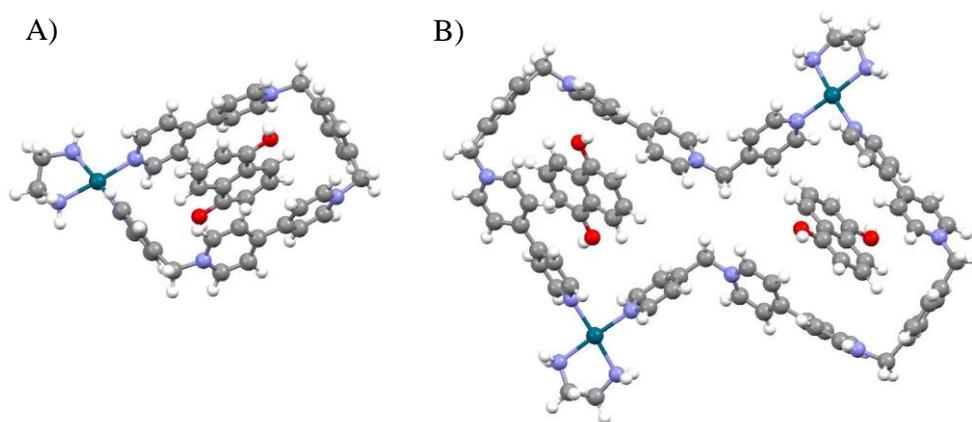


**Figura 54:** Experimento DOSY (500 MHz, D<sub>2</sub>O) para la mezcla de los complejos de inclusión **M5a**  $\subset$  1,5-DHN  $\cdot$  5NO<sub>3</sub> y **M5ad**  $\subset$  1,5-DHN  $\cdot$  10NO<sub>3</sub>. Leyenda: en las formas puntiagudas en azul cian aparecen las señales ampliadas correspondientes al complejo de inclusión **M5ad**  $\subset$  1,5-DHN  $\cdot$  10NO<sub>3</sub>. Se sigue el mismo código de colores para los círculos que el empleado en la **Figura 46**.

EL experimento de DOSY confirma que la adición de plantilla dirige hacia la formación preferente del complejo correspondiente a la especie mononuclear frente a la especie dinuclear. Dado que no se pueden caracterizar por espectrometría de masas los complejos formados; se lleva a cabo el ensamblaje de los metalociclos equivalentes de platino con un ciclofano con dos subunidades de 1,5-dihidroxi-naftaleno para formar los correspondientes catenanos. Para labilizar el enlace Pt-N y conseguir formar el catenano es necesario calentar a 150 °C durante 3 horas. Tras enfriar la estructura queda fijada, de modo que, en este caso si sería posible caracterizar el catenano formado por espectroscopia de masas.<sup>100</sup>

Por último, se realizan los cálculos DFT para determinar las posibles estructuras de los complejos de inclusión formados en disolución. Con el objetivo de simplificar los cálculos se utiliza el metalociclo corto **M1** con un tamaño de cavidad muy similar a **M4** y **M5**. De acuerdo con los resultados obtenidos (**Figura 55**), empleando como base de cálculo M06, tanto el complejo derivado del metalociclo mononuclear como el derivado

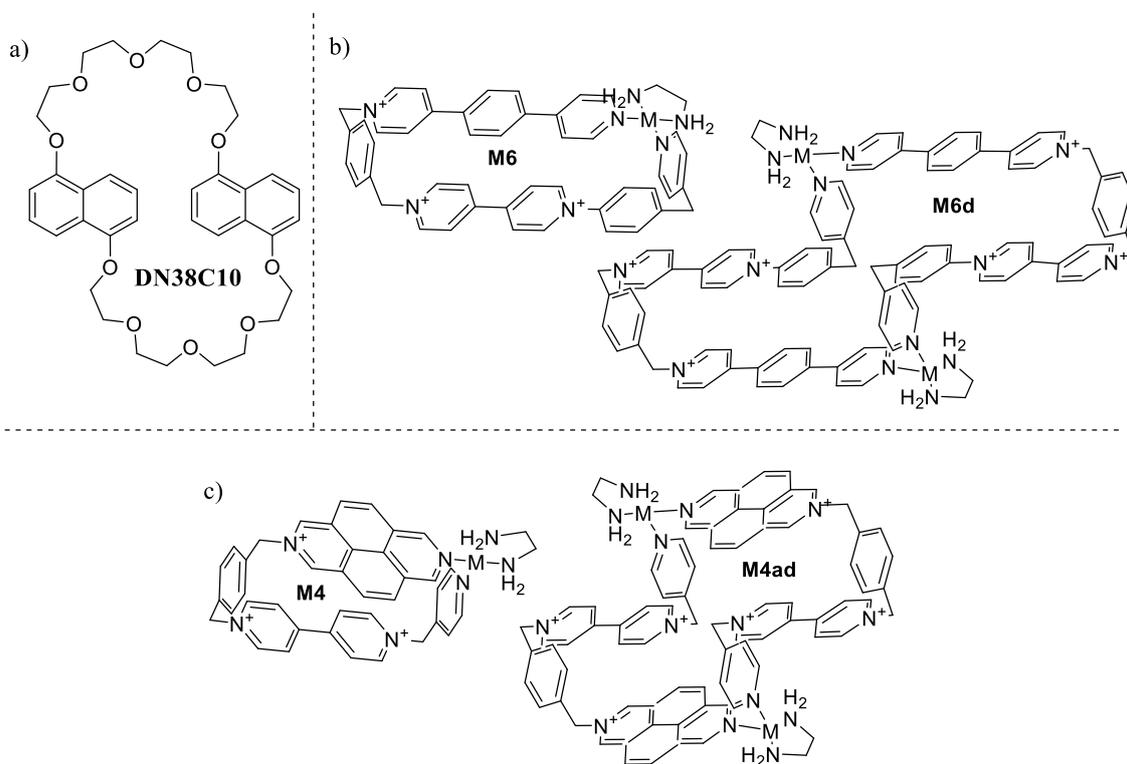
del metalociclo dinuclear resultarían estables en disolución, pudiendo coexistir. De esta forma, se puede suponer que la barrera energética de conversión entre monómero y dímero depende de la naturaleza del ligando, pudiendo producirse o no la reorganización completa del sistema hacía uno de los dos potenciales complejos de inclusión.



**Figura 55:** Estructuras obtenidas mediante cálculos DFT para los complejos de inclusión A) **M1a**⊂1,5-DHN·5NO<sub>3</sub> y B) **M1ad**⊂1,5-DHN·10NO<sub>3</sub>.

### 3.2.8 Autoensamblaje de [2]-Catenanos

Dada la capacidad de nuestros metalociclos para actuar como receptores de sustratos  $\pi$ -dadores, y formar así complejos de inclusión, cabe esperar que también sea viable la formación de catenanos empleando ciclofanos con unidades  $\pi$ -excedentes. Por ello, se seleccionó el ciclofano **DN38C10**<sup>106</sup> (**Figura 56**), el cual posee unidades derivadas del 1,5-DHN y en consecuencia las características electrónicas  $\pi$ -dadoras requeridas. Como metalociclos, con el objetivo de estudiar el proceso de reorganización de los sistemas monómero-dímero, se seleccionaron los derivados del ligando **L6**, de dimensiones mayores que los derivados de **L4** y **L5**, y los metalociclos derivados del ligando **L4** que presentan al menos una pared derivada del 2,7-diazapireno ideal para el establecimiento de interacciones óptimas  $\pi$ - $\pi$  con el ciclofano. Se decide no seleccionar los metalociclos derivados del ligando **L5**, ya que no se consiguen obtener los picos de masas de alta resolución ni del metalociclo mononuclear de platino **M5b** ni del metalociclo dinuclear de platino **M5bd**, por lo que cabe esperar que tampoco sea viable obtener los de sus catenanos derivados.



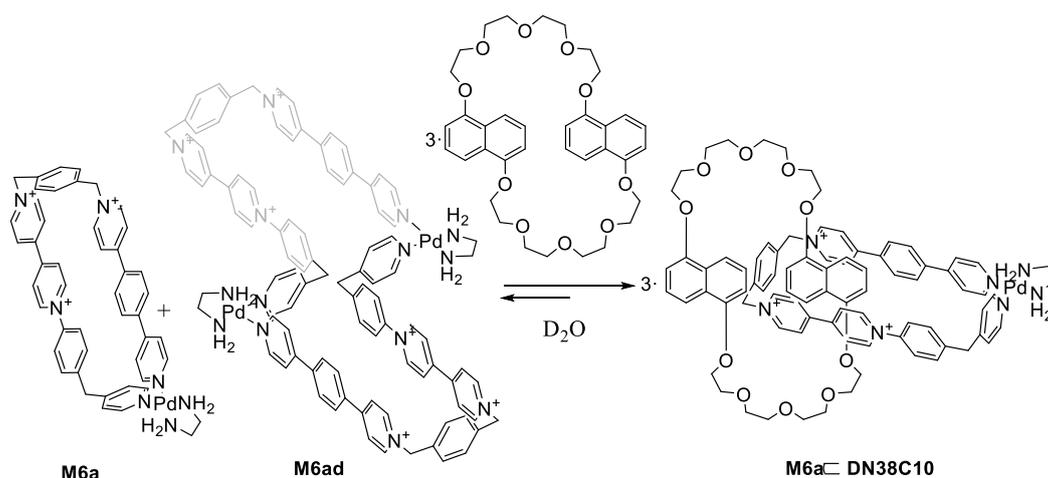
**Figura 56:** a) ciclofano **DN38C10**, b) metalociclo **M6a**·5NO<sub>3</sub> y **M6ad**·10NO<sub>3</sub> y c) metalociclo **M4a**·5NO<sub>3</sub> y **M4ad**·10NO<sub>3</sub>.

<sup>106</sup> Hamilton, D. J.; Davies, J. E.; Prodi, L.; Sanders, J. K. M. *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 608.

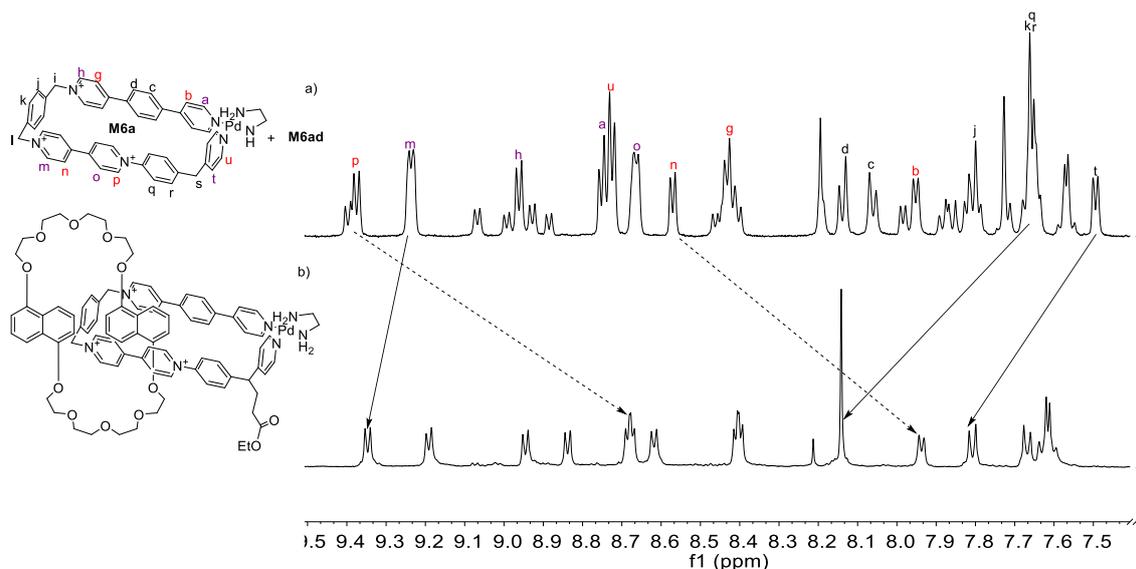
### 3.2.8.1 Catenano de **DN38C10** con **M6a**·5NO<sub>3</sub> y **M6ad**·10NO<sub>3</sub>

La adición de un equivalente del compuesto **DN38C10** a una disolución del ligando **L6** y el complejo (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> a concentración 2.5 mM en D<sub>2</sub>O se mantiene en agitación en un baño de ultrasonidos durante 170 horas. Transcurrido dicho tiempo, se observa un cambio de color en la disolución, que pasa de amarillo a naranja, como consecuencia del establecimiento de una banda de transferencia de carga en la región visible del espectro electromagnético.

Al comparar los espectros de RMN de <sup>1</sup>H de las especies de partida con el espectro de la mezcla final, se aprecian importantes cambios que son consistentes con la formación del catenano (**Figura 57**). Así, se observa en primer lugar la desaparición de un conjunto de señales (reorganización del sistema) y el desplazamiento del otro conjunto de señales (se presupone el desplazamiento de las señales que se corresponderían con el metalociclo mononuclear). El sistema, se reorganiza, al igual que ocurría con la plantilla de 1,5-DHN, para formar el [2]-catenano.



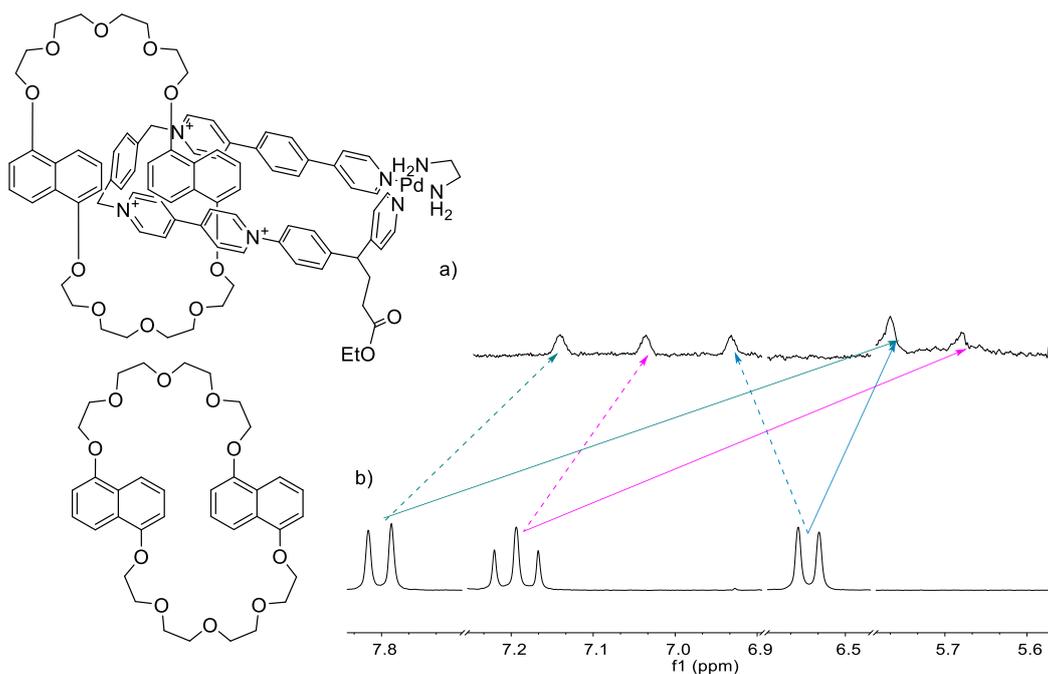
**Esquema 14:** Representación esquemática del reordenamiento del sistema monómero-dímero mediante la adición del ciclofano **DN38C10**.



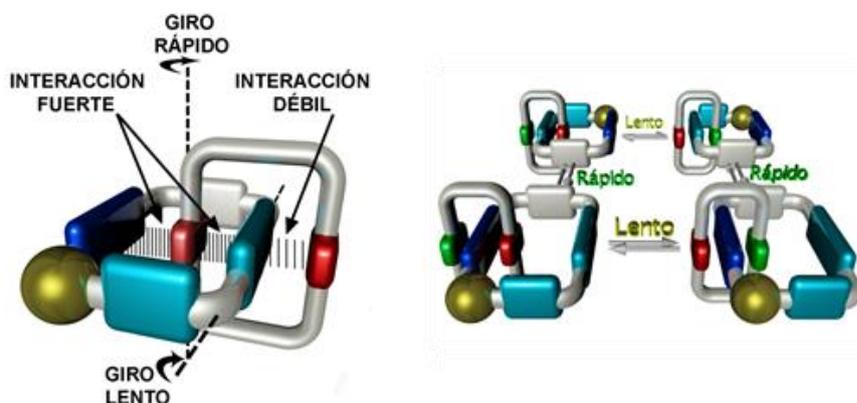
**Figura 57:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla del metalociclo  $\text{M6a}\cdot 5\text{NO}_3$  y del metalociclo  $\text{M6ad}\cdot 10\text{NO}_3$  y b) catenano  $\text{M6a}\cdot 5\text{NO}_3\subset \text{DN38C10}$ .

Así, como consecuencia de la formación del correspondiente [2]-catenano, en general, las señales de los lados largos del metalociclo se apantallan debido al establecimiento de interacciones  $\pi$ - $\pi$  con la subunidad de 1,5-DHN del ciclofano. Por el contrario, las señales del lado corto del metalociclo se desapantallan como consecuencia del establecimiento de interacciones  $\text{CH}\cdots\pi$  con el naftaleno del sustrato.

Respecto a las señales correspondientes al ciclofano, para su subunidad de 1,5-DHN se observan dos juegos de señales apantalladas con respecto al ciclofano libre (**Figura 58**). La aparición de los dos grupos de señales (el grupo más apantallado correspondiente al 1,5-dioxonaftaleno situado dentro de la cavidad y el otro grupo menos apantallado correspondiente al 1,5-dioxonaftaleno situado fuera de la cavidad) es indicativa de que la velocidad del giro en torno al metalociclo de las dos subunidades de 1,5-dioxonaftaleno es lenta en la escala de tiempos del RMN. Sin embargo, la aparición de un único grupo de señales para el metalociclo se debe a que el giro del metalociclo sobre su propio eje dentro de la cavidad del ciclofano es rápida en la escala de tiempos del RMN; corroborando que las interacciones de la unidad naftalénica externa y las paredes externas del metalociclo son más débiles que las interacciones que se establecen entre la unidad naftalénica interna y las paredes  $\pi$ -deficientes del metalociclo (**Figura 59**).

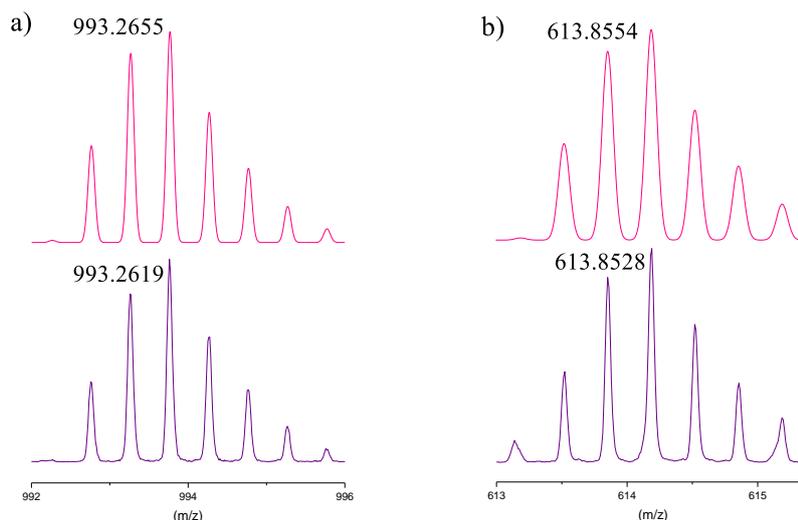


**Figura 58:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) catenano **M6a**· $5\text{NO}_3^-$  **DN38C10** y b) ciclofano **DN38C10**.



**Figura 59:** Esquema de las velocidades en la escala de tiempos de RMN de los posibles movimientos de los distintos componentes del [2]-catenano.

Para corroborar la formación del [2]-catenano de la especie mononuclear se recurre a la espectrometría de masas. Para ello se adiciona un equivalente del ciclofano **DN38C10** a una disolución del metalociclo análogo de platino **M6b**· $5\text{NO}_3^-$  y se calienta la mezcla en un horno microondas durante 3 horas a  $150^\circ$ . Al retirar el vial de microondas se comprueba que la mezcla ha cambiado de color, adquiriendo el color naranja intenso del catenano de Pd(II). El compuesto formado se precipita mediante la adición de hexafluorofosfato potásico, para obtener el correspondiente catenano como sal de hexafluorofosfato. El espectro de masas confirma la esperada formación del [2]-catenano derivado la especie mononuclear (**Figura 60**).

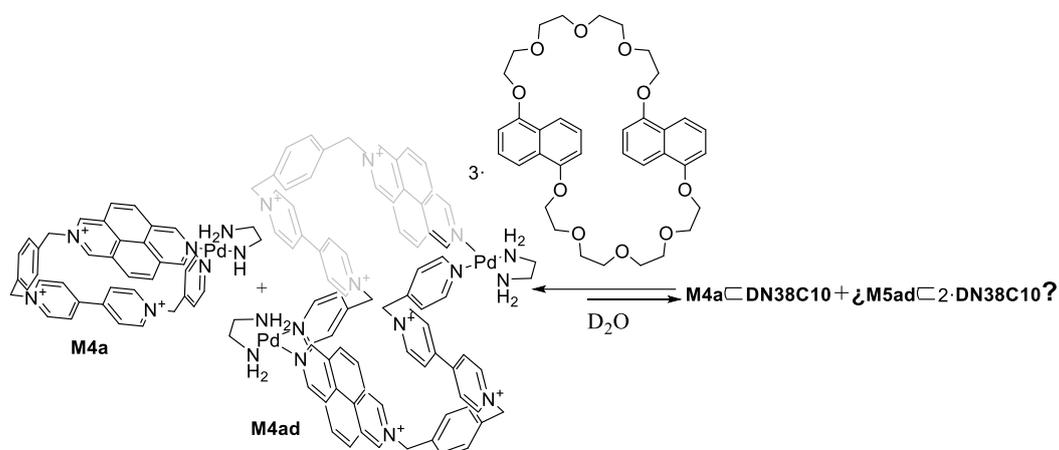


**Figura 60:** ESI-MS (m/z) calculada para: a)  $[M6a \cdot 3PF_6 \cdot DN38C10]^{+2}$  (arriba) y encontrada (debajo) y b)  $[M6a \cdot 2PF_6 \cdot DN38C10]^{+3}$  (arriba) y encontrada (debajo). Los códigos de colores representan: el color rosa a los picos de masa teórica y el violeta a los picos de masa (m/z) encontrados.

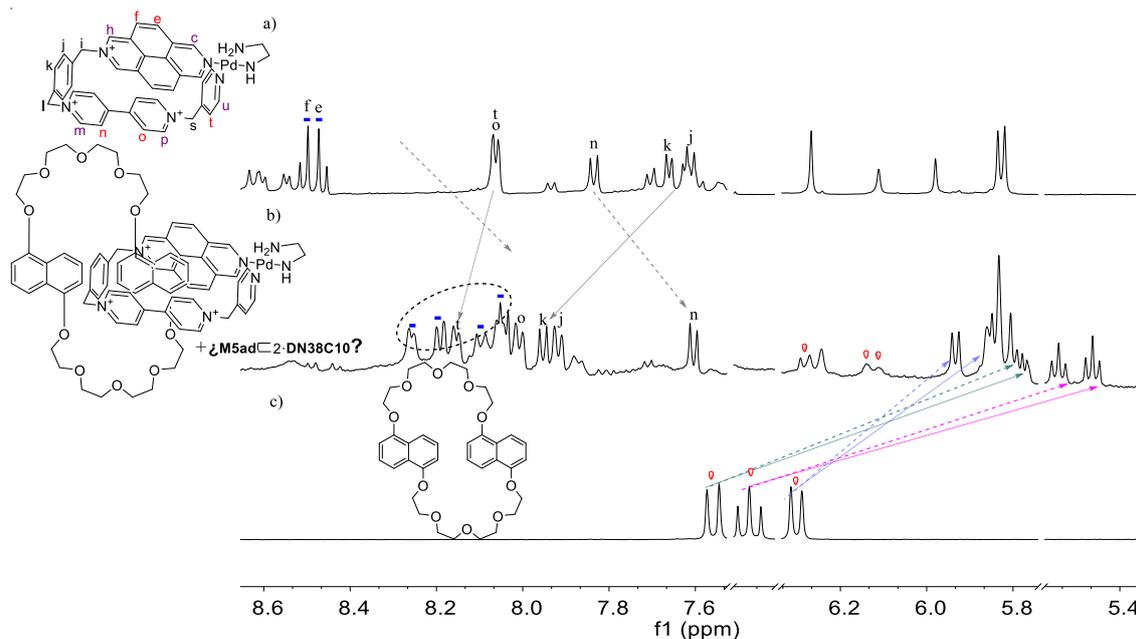
### 3.2.8.2 Catenano de *DN38C10* con *M4a*·5*NO*<sub>3</sub>

Al adicionar un equivalente del compuesto **DN38C10** a una disolución del ligando **L** y el complejo (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> a concentración 2.5 mM en D<sub>2</sub>O, y dejar agitando en un baño de ultrasonidos durante 12 horas, se observa en la disolución un cambio de color de amarillo a naranja intenso debido al establecimiento de una banda de transferencia de carga entre el sustrato y el metalociclo.

Los experimentos de RMN mono y bidimensionales confirman la formación del [2]-catenano como especie mayoritaria. Por ejemplo, en el espectro de RMN de <sup>1</sup>H de la mezcla 1:1, se observa el desdoblamiento de las señales correspondientes a la pared de 2,7-diazapireno del metalociclo (**Figura 61**).



**Esquema 15:** Representación esquemática del reordenamiento del sistema monómero-dímero mediante la adición del ciclofano **DN38C10**.

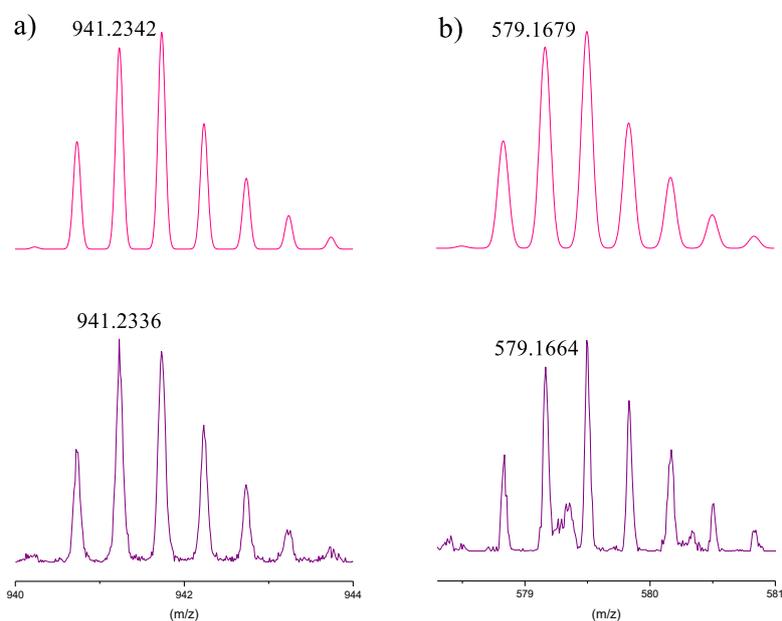


**Figura 61:** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ) para: a) mezcla del metalociclo **M4a**· $5\text{NO}_3$  y del metalociclo **M4ad**· $10\text{NO}_3$ , b) catenano **M4a**· $5\text{NO}_3$ ⊂**DN38C10** (0.5 mM) y c) ciclofano **DN38C10**.  
Leyenda: los círculos de color rojo se corresponden con los núcleos del ciclofano.

Al igual que ocurriría con el complejo de **M4a**· $5\text{NO}_3$ ⊂**1,5-DHN**, la inclusión del sustrato en la cavidad provoca la pérdida de simetría por el plano horizontal del metalociclo, de modo que la cara superior e inferior del metalociclo dejan de ser químicamente equivalentes, produciéndose el desdoblamiento de las señales de la unidad de diazapireno.<sup>103</sup> Con respecto al ciclofano, se observan para su subunidad de 1,5-DHN tres juegos de señales al formarse el catenano. Los dos grupos de señales más apantalladas, con respecto a la subunidad de 1,5-DHN del ciclofano libre, se corresponderían con los seis protones de la subunidad de naftaleno situado en el interior de la cavidad del metalociclo. La formación del catenano implica una pérdida de simetría de la subunidad de 1,5-DHN por la cual los seis protones naftalénicos dejan de ser equivalentes. En cuanto al juego de señales más similar a la subunidad de 1,5-DHN libre del ciclofano se correspondería con el anillo de naftaleno situado fuera de la cavidad, indicando que el proceso de rotación del sustrato es lento en la escala de tiempos de RMN. El ligero apantallamiento que experimentan estas señales con respecto a las del ciclofano libre podría deberse a la interacción del anillo de naftaleno situado fuera de la cavidad con la pared de 2,7-diazapireno. Por ello, probablemente el ciclofano se disponga con sus dos subunidades de 1,5-DHN situadas alrededor de la pared de 2,7-diazapireno, incrementándose, así las interacciones  $\pi$ - $\pi$ . La estequiometría de la especie formada se confirmó como 1:1 mediante la integración relativa de las señales de los componentes con defecto de ciclofano. Por último, indicar que las señales menos intensas de la **Figura**

**61**, las cuales resultan difíciles de asignar podrían corresponderse con el 3-catenano derivado del metalociclo **M6ad**.

Adicionalmente, el autoensamblaje a concentración 10mM de componentes de la mezcla de Pt(II) equivalente fue estudiada mediante EM-ESI. Se trataría de evaluar la posibilidad de que se formase el [3]-catenano derivado del metalociclo dinuclear mediante espectrometría de masas. Sin embargo, el espectro de alta resolución solo confirma la formación del [2]-catenano derivado de la especie monomérica. En la **Figura 62** se observan dos picos que se corresponderían con los cationes resultantes de la pérdida de dos y tres contraiones de  $\text{PF}_6^-$  por parte del [2]-catenano y cuyo patrón isotópico coincide con el teórico.



**Figura 62:** ESI-MS (m/z) calculada para: a)  $[\text{M4a} \cdot 3\text{PF}_6 \subset \text{DN38C10}]^{+2}$  (arriba) y encontrada (debajo) y b)  $[\text{M4a} \cdot 2\text{PF}_6 \subset \text{DN38C10}]^{+3}$  (arriba) y encontrada (debajo). Se sigue el mismo código de colores que en la **Figura 60**.

## *Capítulo II. Estudios de interacción con ADN*

### ***3.3 Influencia del tamaño de metalociclos $Pt_2L_2$ cuadrangulares en la interacción y selectividad con el ADN.***

#### *3.3.1 Introducción*

Como se ha comentado en la introducción del presente trabajo, en los últimos años ha cobrado especial relevancia el papel desempeñado por el ADN de estructura cuádruple en diversos procesos cancerígenos.<sup>86</sup> Dichas estructuras consisten en tétradas de guaninas apiladas, formadas en regiones de ADN ricas en guaninas como los telómeros y las regiones promotoras de ciertos oncogenes. Las moléculas pequeñas que se unen a estas estructuras han demostrado ser capaces de inhibir la acción de la enzima telomerasa, encargada de la reposición de restos de guanosina en las regiones teloméricas, y que se encuentra sobreexpresada en el 85-90% de las células tumorales. Además de la función de regulación en los telómeros, el ADN cuádruple tiene otras importantes funciones biológicas, como son la regulación de la transcripción de ciertos genes.

Los compuestos convencionales que se unen al ADN cuádruple son moléculas orgánicas, las cuales poseen largas superficies aromáticas y cargas positivas cerca del centro de la molécula o en posiciones laterales con el fin de incrementar su afinidad por los surcos de las estructuras de ADN cuádruple.<sup>107</sup> Una estrategia interesante consiste en diseñar moléculas capaces de interaccionar con el ADN-cuádruple empleando el autoensamblaje supramolecular, método que permite obtener amplias librerías de compuestos de una forma modular, estructuras difícilmente alcanzables con la química tradicional covalente. En este contexto, como se ha comentado en la introducción, Sleiman y colaboradores estudiaron la capacidad de interacción con el ADN cuádruple del metalociclo de platino de tipo  $M_4L_4$  desarrollado por Fujita y colaboradores.<sup>86</sup> En esta seminal publicación del 2008, los autores demuestran la elevada afinidad de dicho metalociclo cuadrangular por el ADN cuádruple, así como su capacidad para inhibir la acción de la telomerasa.

#### *3.3.2 Metalociclos $M_2L_2$ cuadrangulares seleccionados*

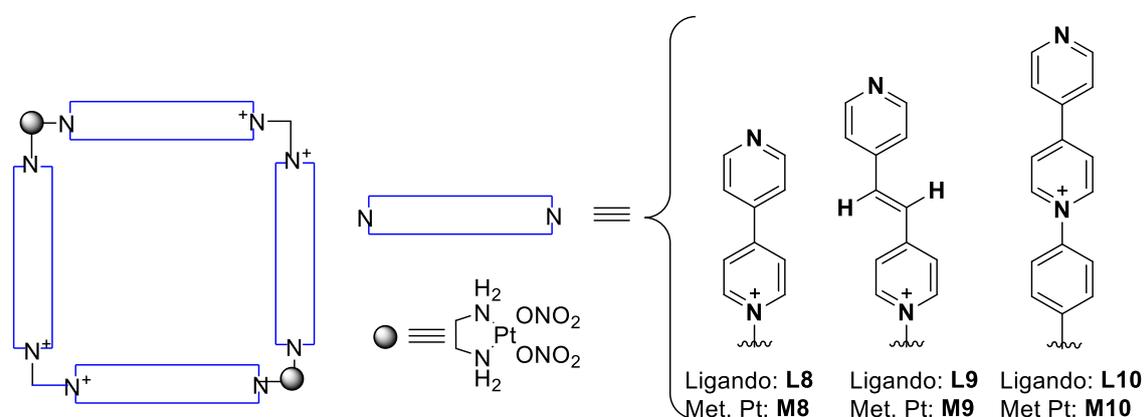
En base a lo publicado por Sleiman y colaboradores con el metalociclo cuadrangular de Fujita, **A34**, se decidió estudiar la interacción con el ADN de

---

<sup>107</sup> Reed, J.E.; Arnal, A. A.; Neidle, S.; Vilar, R. J. *J. Am. Chem. Soc.*, **2006**, *128*, 5992.

metalociclos de tipo  $M_2L_2$  cuadrangulares desarrollados en nuestro grupo de investigación, y evaluar la influencia de su tamaño en la fortaleza y selectividad de la interacción con el ADN dúplex versus cuádruple-G.

Con este fin, fueron seleccionados para su evaluación con el ADN los metalociclos cuadrangulares de la **Figura 63** (metalociclos **M8**, **M9** y **M10**), de tres tamaños diferentes y formados por ligandos derivados de *N*-monoalquil-4,4'-bipiridina (**L8**, **L9** y **L10**). Tanto los ligandos como los metalociclos de Pt(II) **M8**, **M9** y **M10** se prepararon de acuerdo a metodologías previamente publicadas por nuestro grupo de investigación,<sup>89a,89b,89c</sup> usándolos como sales de nitrato solubles en agua.



**Figura 63:** Representación esquemática de las estructuras de los ligandos **L8-L10**, y de sus correspondientes metalociclos de Pt(II) **M8-M10**.

Estratégicamente seleccionamos dichos metalociclos con dimensiones de cavidad crecientes (122 Å, 166 Å, 222 Å) y comparables con las del área de la tetrada de guaninas (92 Å). De esta forma, se planteó el estudio de la interacción de los ligandos **L8-L10** y sus correspondientes metalociclos **M8-M10**, tanto con ADN de doble hélice, como con diversas secuencias de ADN cuádruple de la región humana de los telómeros y de regiones promotoras de ciertos oncogenes. Las secuencias de estos oligonucleótidos comerciales se recogen en la siguiente tabla:

**Tabla 3:** secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados. En negrita se muestran las guaninas responsables de la formación de la estructura cuádruple.

Oligonucleótido	Secuencia
<i>h-Telo</i>	AGG <b>GTT</b> AGG <b>GTT</b> AGG <b>GTT</b> AGG <b>G</b>
<i>c-Myc</i>	TGG GGA <b>GGG</b> TGG GGA <b>GGG</b> TGG GGA AGG
<i>c-Kit1</i>	AGG <b>GAG</b> <b>GGC</b> GCT <b>GGG</b> AGG <b>G</b>
<i>h-TERT</i>	GGG <b>GGC</b> TGG <b>GCC</b> GGG GAC CCG GGA GGG GTC GGG ACG <b>GGG</b> <b>CGG</b> <b>GG</b>
<i>Bcl2</i>	AGG GGC GGG CGC GGG AGG AAG GGG GCG GGA GCG GGG CTG
<i>TERRA</i>	UUA <b>GGG</b> UUA <b>GGG</b> UUA <b>GGG</b> UUA <b>GGG</b>
<i>ds-DNA</i>	TATAGCTATA-Heg-TATAGCTATA

Una vez seleccionados tanto los ligandos y metalociclos, cómo las secuencias de ADN diana, el estudio de la interacción con ADN se realizó mediante técnicas espectroscópicas estándar en este tipo de estudios, que serán introducidas y discutidas brevemente antes de explicar los resultados propios derivados de su utilización en el presente trabajo.

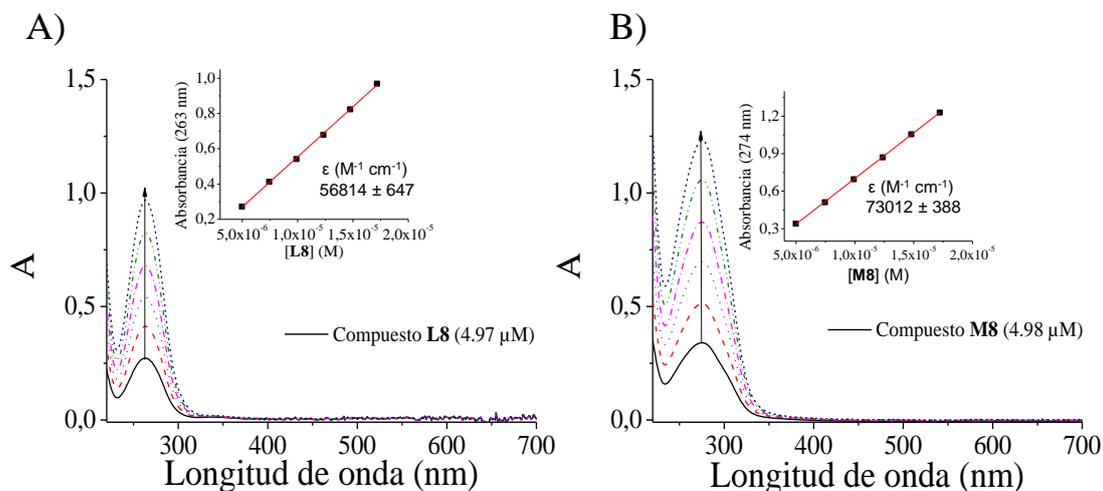
En lo que se refiere al estudio de la potencial actividad biológica de los ligandos y metalociclos, donde se analizaron sus efectos sobre la viabilidad de tres líneas celulares cancerígenas y la regulación de la expresión génica de ciertos oncogenes, dicha discusión se trasladará al último capítulo de la presente memoria.

### 3.3.3 Estudios preliminares

Antes de comenzar los estudios de interacción con el ADN de los compuestos preparados, se evalúa su estabilidad en el tampón en el que se llevarán a cabo dichos estudios (tampón Tris-KCl). Para ello se preparan disoluciones de los metalociclos (**M8**, **M9** y **M10**) en el tampón, y se registra su espectro Ultravioleta-Visible cada hora durante 24 horas. Los resultados muestran que los tres metalociclos son estables en el tampón Tris-KCl, al no observarse cambios en sus espectros de absorción con el tiempo (**Apéndice AII1-AII3**).

A continuación, como último estudio preliminar, se lleva a cabo la determinación de los coeficientes de extinción molar de los ligandos y metalociclos en el tampón Tris-

KCl. En la **Figura 64** se recoge, a modo de ejemplo, el estudio Lambert-Beer para el ligando **L8** y el metalociclo **M8** (Apéndice AIII4-AIII5 para **M9** y **M10**).



**Figura 64:** Espectros de UV-VIS y cálculo del coeficiente de  $\epsilon$  en el tampón Tris-KCl (Ajuste de Lambert-Beer) de: A) **L8**·2NO<sub>3</sub>,  $\lambda_{\max} = 263$  nm y, B) **M8**·8NO<sub>3</sub>,  $\lambda_{\max} = 274$  nm.

### 3.3.4 Estudio de la interacción por medida de la desnaturalización térmica

A mediados de la década de los años 50, varios trabajos demostraron que el ADN de doble hélice se podía desnaturalizar al estar sometido a estímulos como la temperatura o el pH. La temperatura a la que se produce dicha naturalización,  $T_m$ , depende del tipo de ADN y del disolvente en el que se encuentre la biomolécula.<sup>108</sup> Así, el método más popular para investigar la transición del ADN en forma de doble hélice a dos hebras de ADN individuales, consiste en observar los cambios que se producen en su banda UV de absorción a  $\lambda_{\max} = 260$  nm, la cual se ve incrementada sobre un 25%.<sup>109</sup>

El fenómeno de la desnaturalización térmica también se observa en las disoluciones de ADN cuádruple. Al igual, que ocurría con el ADN de doble hélice, al desnaturalizarse se producen cambios en su banda de absorción a  $\lambda_{\max} = 260$  nm, aunque en este caso las variaciones son demasiado pequeñas. Sin embargo, se obtiene una buena señal para una banda situada a  $\lambda_{\max} = 295$  nm, la cual experimenta un importante decrecimiento de la absorbancia al desnaturalizarse.<sup>110</sup>

<sup>108</sup> Wartell, R. M.; Benight, A. S. **1985**, *126*, 67.

<sup>109</sup> Rachwall, P. A.; Fox, K. R. *Methods*. **2007**, *43*, 291.

<sup>110</sup> Mergny, J.L.; Phan, A.T.; Lacroix, L. *FEBS Lett*. **1998**, *435*, 74.

Otras técnicas espectroscópicas utilizadas para monitorizar la desnaturalización térmica del ADN son: el dicroísmo circular<sup>111,112</sup> el RMN<sup>110,113</sup> y la fluorescencia.<sup>114,115</sup>

Dentro del estudio de la desnaturalización por fluorescencia, la variante más utilizada es la basada en el fenómeno FRET (*transmisión de energía de resonancia o transferencia de energía de resonancia de Förster*), proceso por el cual un fluoróforo en un estado excitado (dador), transfiere energía a una molécula vecina en estado fundamental (aceptor), mediante una interacción no radioactiva dipolo-dipolo. Se necesita por lo tanto que exista en el ácido nucleico un fluoróforo dador y uno aceptor.

Las curvas de desnaturalización se obtienen como un cambio en el nivel de la emisión de fluorescencia en el par de FRET al incrementar la temperatura.<sup>116</sup> En teoría usar un par FRET permite no sólo monitorizar la fluorescencia del dador en función de la temperatura, sino también confirmar el proceso de desnaturalización del ADN mediante el decrecimiento en la emisión del aceptor con la temperatura.<sup>117</sup>

En los experimentos llevados a cabo en la presente memoria, se emplean los oligonucleótidos de ADN previamente discutidos, marcados en el extremo 5' con el fluoróforo dador FAM (6-carboxífluoresceína) y en el extremo 3' con el aceptor TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina).<sup>118,119</sup> Se mide así el incremento de la fluorescencia de FAM durante la desnaturalización, ya que su señal es más reproducible que la de TAMRA y además es medible por la mayoría de los equipos de RT-PCR, los cuales no suelen servir para medir la fluorescencia de TAMRA. FAM se excita a  $\lambda_{exc} = 492$  nm y su emisión se mide a  $\lambda_{em} = 516$  nm.<sup>117</sup> En la estructura de ADN plegada, los dos fluoróforos se encuentran próximos en el espacio por lo que la fluorescencia de FAM está inactivada por TAMRA. Sin embargo, durante el experimento, a medida que aumenta la temperatura

---

<sup>111</sup> Petraccone, L.; Barone, G.; Giancola, C. *Curr. Med. Chem. Anti Cancer Agents*. **2005**, *13*, 463.

<sup>112</sup> Petraccone, L.; Erra, E.; Esposito, V.; Randazzo, A.; Galeone, A.; Barone, G.; Giancola, C. *Biopolymers*. **2005**, *77*, 75.

<sup>113</sup> Hardin, C. C.; Henderson, E.; Watson, T.; Prosser, J. K. *Biochemistry*, **1991**, *30*, 4460.

<sup>114</sup> Darby, R. A. J.; Sollogoub, M.; McKeen, C.; Brown, L.; Risitano, A.; Brown, N.; Barton, C.; Brown, T.; Fox, K.R. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 39.

<sup>115</sup> De Cian, J. A.; Guittat, L.; Kaiser, M.; Sacca, B.; Amrane, S.; Bourdoncle, A.; Alberti, P.; Teulade-Fichou, M.; Lacroix, P. L.; Mergny, J. L. *Methods*. **2007**, *42*, 183.

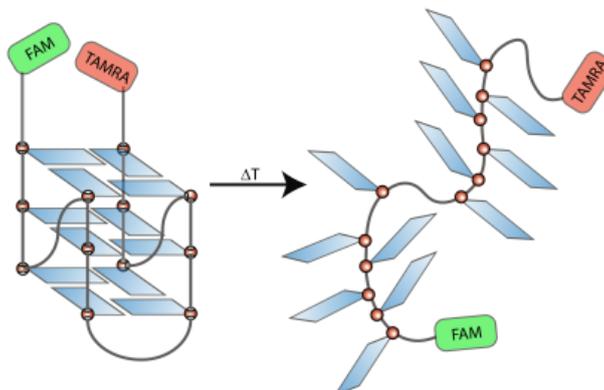
<sup>116</sup> Paramasivan, S.; Rujan, I.; Bolton, P. H. *Methods*. **2007**, *43*, 324.

<sup>117</sup> Renciuik, D.; Zhou, J.; Beaurepaire, L.; Guedin, A.; Bourdoncle, A.; Mergny, J.-L. *Methods*, **2012**, *57*, 122.

<sup>118</sup> Mergny, J. L.; Maurizot, J. C. *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 124.

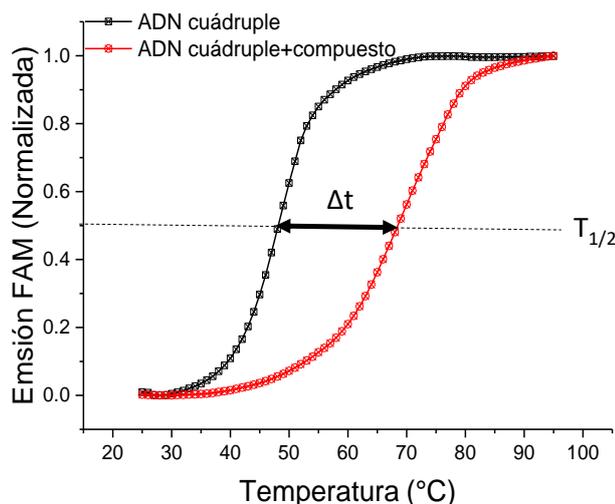
<sup>119</sup> Guedin, A.; Lacroix, L.; Mergny, J. L. *Methods Mol. Biol.*, **2010**, *613*, 25.

se produce el desplegamiento de la estructura secundaria del ADN, y en consecuencia, los dos fluoróforos se separan pudiendo detectar la fluorescencia de FAM (**Figura 65**).



**Figura 65:** Esquema de la desnaturalización térmica del ADN cuádruple marcado en un extremo con el fluoróforo FAM y en el otro extremo con el fluoróforo TAMRA.

Al registrar la fluorescencia del fluoróforo FAM del correspondiente oligonucleótido, en el rango de temperaturas de 25 a 95 °C, se obtiene una curva sigmoidea. El punto medio de esta curva representa el punto medio entre la forma de ADN completamente plegada y desplegada, y se le denomina temperatura de desnaturalización media ( $T_{1/2}$ ) (**Figura 66**). Al registrar el experimento en presencia de un compuesto que estabilice la estructura del ADN, la temperatura de desnaturalización media del oligonucleótido aumenta. Este incremento de temperatura ( $\Delta t_{1/2}$ ) depende de la interacción y de la concentración del compuesto en el medio. La concentración estándar del compuesto que se suele utilizar es  $1\mu\text{M}$  y la concentración de ADN  $0.2\mu\text{M}$ .<sup>120</sup>



**Figura 66:** Ejemplo de curva de desnaturalización térmica de una estructura de ADN cuádruple (h-Telo) en tampón cacodilato potásico sin (curva negra) y con compuesto (curva roja)

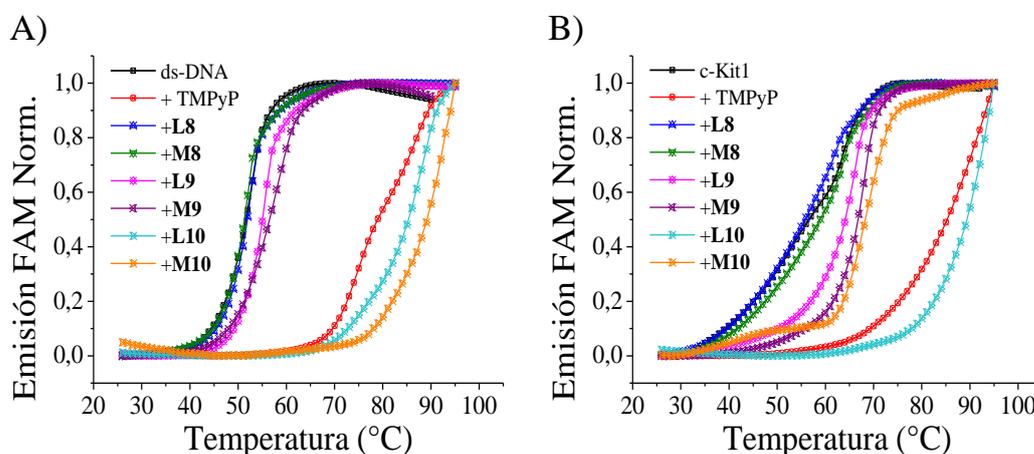
<sup>120</sup> Neidle. S.; *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, 1<sup>st</sup> edition, **2012**, ISBN 978 0 12 375138 6, Editorial Elsevier.

Las principales ventajas que presenta el uso de la técnica de FRET son la alta sensibilidad y la baja cantidad del oligonucleótido necesario para llevar a cabo el experimento. Además, se pueden testar muchas experiencias a la vez (se usan placas con 96 pocillos por experimento). Por el contrario, debe tenerse en cuenta que esta técnica es inadecuada en el caso de que el ligando interactúe con los fluoróforos o absorba a la misma longitud de onda que el fluoróforo.<sup>114,121</sup>

### 3.3.4.1 Estudios de desnaturalización térmica del ADN observados por FRET

En nuestro caso, para los experimentos de desnaturalización térmica del ADN mediante FRET de los ligandos y los metalociclos de Pt(II) seleccionados, se usaron las secuencias de la **Tabla 3** conjugadas con FAM y TAMRA, empleando la porfirina TMPyP4 como control no selectivo de agente de unión a ADN de doble y cuádruple hélice.<sup>82,122</sup>

Los perfiles de FRET para los oligonucleótidos a concentración 0.2  $\mu\text{M}$  tras la interacción con los ligandos y los metalociclos a concentración 1  $\mu\text{M}$  (salvo el metalociclo **M10** que fue necesario disminuir la concentración a 0.25  $\mu\text{M}$ ) (**Figura 67** y **Apéndice AII6**), muestran una actividad nula o casi nula de los ligandos **L8-L10** y, en contraste, una interacción remarcable con los correspondientes metalociclos de Pt(II).



**Figura 67:** Representación de los perfiles de FRET de ds-DNA (A) y de c-Kit1 (B) al interactuar con los compuestos **L8-L10**, **M8-M10** y TMPyP4 (control). El tampón utilizado: 60 mM cacodilato potásico, pH = 7.4. Los perfiles de desnaturalización con el resto de los oligonucleótidos se pueden consultar en el anexo (**AII4**).

<sup>121</sup> a) Guyen, B.; Schultes, C. M.; Hazel, P.; Mann, J.; Neidle, S. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 981; b) Schultes, C. M.; Guyen, B.; Cuesta, J.; Neidle, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 4347.

<sup>122</sup> Han, F. X.; Wheelhouse R. T.; Hurley, L. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1999**, *121*, 3561.

En particular, los metalociclos **M9** y **M10** interactúan fuertemente con el ds-DNA (dúplex) y los oligonucleótidos de ADN cuádruple, con valores de  $\Delta T$  mayores incluso que los exhibidos por el control (**Tabla 4**).

**Tabla 4:** valores de  $\Delta T_{1/2}$  de ds-DNA y cuádruple-G a concentración 0.2  $\mu\text{M}$  al interactuar con los compuestos **L8-L10** y **M8-M10** a concentración 1  $\mu\text{M}$  (\*compuesto **M10** a concentración 0.25  $\mu\text{M}$ ).

	<i>TMPyP</i>	<i>L8</i>	<i>L9</i>	<i>L10</i>	<i>M8</i>	<i>M9</i>	<i>M10</i>
<i>ds-DNA</i>	27.2	0.2	-0.4	3.5	4.9	33.7	37.5
<i>h-Telo</i>	31.8	-1.5	-0.4	3.9	1.5	36.9	12.3*
<i>c-Myc</i>	11.8	-2.9	-2.5	0.8	1.7	19.2	1.7*
<i>c-Kit1</i>	28.7	-0.7	2.3	7.6	10.2	32.8	10.2*
<i>h-TERT</i>	26.4	0.9	2.1	3.5	5.4	23.8	30.1
<i>bcl2</i>	35.0	-2.7	-1.8	0.8	3.8	32.2	36.2
<i>TERRA</i>	14.9	-0.9	0.6	3.8	4.0	19.9	4.0*

Para el metalociclo **M10**, en la mayoría de casos, fue necesario reducir la concentración a 0.25 $\mu\text{M}$  con el objetivo de observar una emisión de FAM apreciable, ya que al usar la concentración 1 $\mu\text{M}$  no era posible desnaturalizar las estructuras (**Apéndice AII7-AII9**).

Los resultados obtenidos muestran como el metalociclo de platino **M10**, el de mayor tamaño, es el mejor agente de unión al ADN, al menos en su estructura terciaria. Por otro lado, los resultados también muestran, que el metalociclo más pequeño, el metalociclo **M8**, muestra una interacción modesta con el ds-DNA pero, sin embargo, es capaz de unirse significativamente a oligonucleótidos de ADN cuádruple: c-Kit1 y hTERT.

Este último resultado remarca las evidencias encontradas en la bibliografía,<sup>87</sup> que sugieren que modulando el tamaño de los metalociclos de Pt(II) se pueden obtener geometrías adecuadas capaces de unirse de manera específica al ADN de estructura cuádruple.

### 3.3.5 Estudio de la interacción mediante espectroscopía UV-Vis y dicroísmo circular

#### 3.3.5.1 Dicroísmo circular (CD)

Las moléculas quirales son ópticamente activas, por lo que, exhiben el fenómeno de la rotación óptica (OR) y del dicroísmo circular (CD). Tanto la rotación óptica como el dicroísmo circular se usan de manera rutinaria para caracterizar la estereoquímica de moléculas quirales, incluidas biomoléculas como el ADN, especialmente su configuración absoluta y su estructura conformacional. En particular, las medidas de CD han proporcionado información crucial sobre los cambios estructurales en las biomoléculas debido a que, sus correspondientes estructuras secundarias y terciarias, presentan espectros de dicroísmo circular muy característicos y específicos.<sup>123</sup>

Como ya se ha comentado, existe una amplia variedad de conformaciones que pueden adoptar las secuencias ricas en guaninas al constituir la forma cuádruple-G.<sup>62,124,125</sup> Así, por ejemplo, los cuádruples unimoleculares de ADN telomérico están formados por tres tétradas de guaninas apiladas y conectadas unas con otras a través de bucles de TTA. La morfología de esta estructura secundaria depende de diversos factores como la concentración de cationes monovalentes de sodio o potasio en el medio. Así, si en disolución predominan los iones potasio, el oligonucleótido suele adoptar la conformación paralela. Por el contrario, si en disolución predominan los iones sodio, el oligonucleótido suele adoptar una conformación antiparalela. De esta forma, en función de la conformación que adopte el cuádruplex, se obtienen diferentes espectros de CD.<sup>67</sup>

Además de servir de huella dactilar para cada conformación, los experimentos de CD permiten seguir los cambios producidos en el espectro de CD del ADN al interaccionar con un ligando. Los cambios no siempre son lo suficientemente significativos, por lo cual se suele utilizar esta técnica en combinación con otras que permitan obtener en dichos casos resultados cuantitativos.<sup>116,126</sup>

---

<sup>123</sup> Berova, N.; Nakanishi, K.; Woody, R. W. *Circular Dichroism: Principles and Applications 2<sup>nd</sup> edition*. **2000**, ISBN 978-0-471-33003-5, John Wiley & Sons, Inc.

<sup>124</sup> Črnugelj, M.; Šket, P.; Plavec, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7866.

<sup>125</sup> Campbell, N. H.; Patel, M.; Tofa, A.B.; Ghosh, R.; Parkinson, G. N.; Neidle S. *Biochemistry*. **2009**, *48*, 1675.

<sup>126</sup> Karsisiotis, A. I.; Hessari, N. M.; Novellino, E.; Spada, G. P.; Randazzo, A.; Webba da Silva, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 10645.

### 3.3.5.2 *Espectroscopia UV-vis*

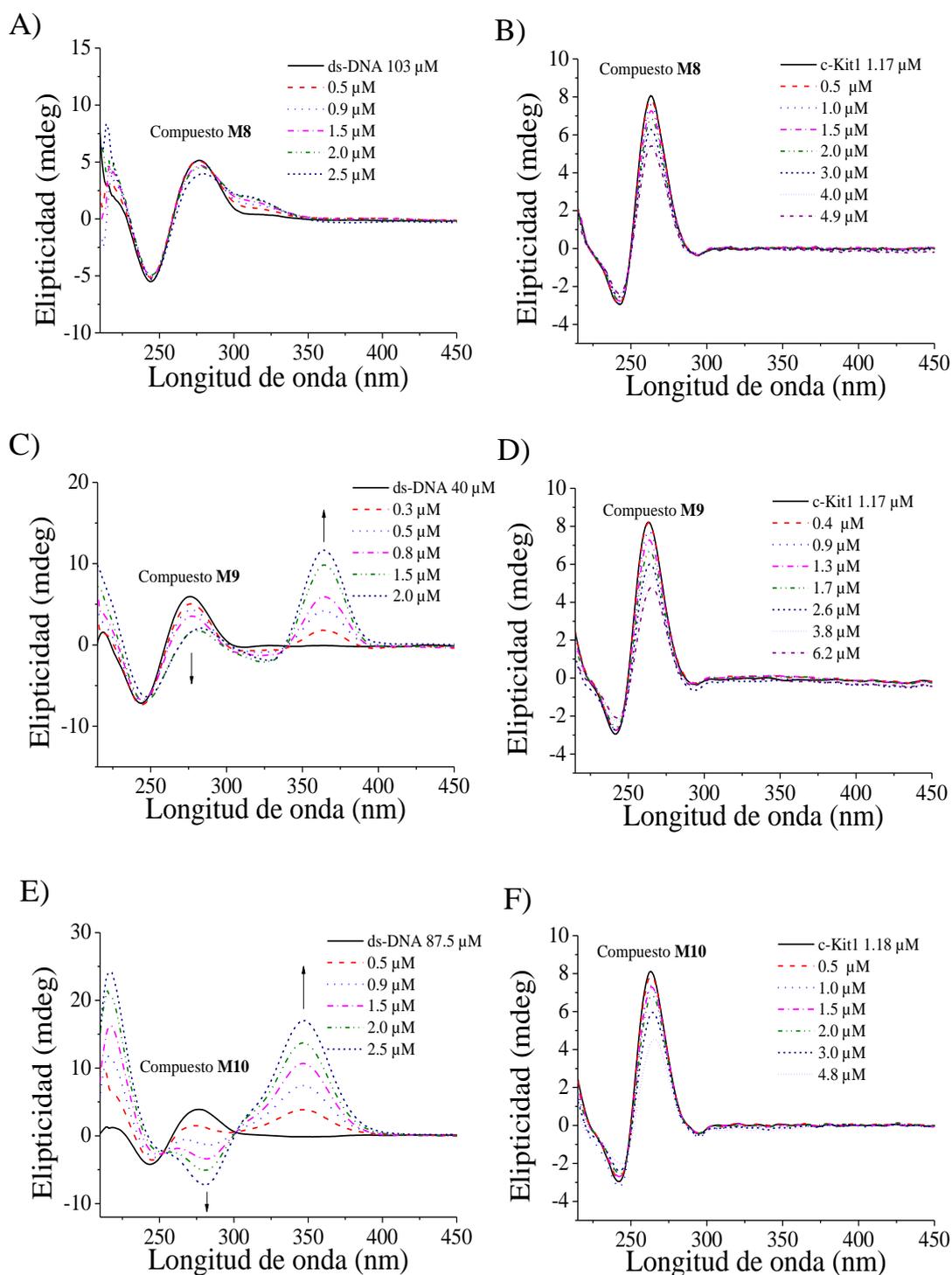
La valoración por espectroscopia Ultravioleta-Visible ha permitido determinar el valor de las constantes de asociación de diversos compuestos con oligonucleótidos de ADN.<sup>127</sup> El fundamento de esta técnica se basa en la diferencia que se produciría en el espectro de absorción del compuesto al ir añadiendo volúmenes crecientes del ADN. La principal limitación que presenta esta técnica, es la necesidad de que el compuesto presente en estado libre una banda de absorción diferenciada de la del ADN libre ( $\lambda_{\max} = 260\text{nm}$ ). Si se produce interacción se deberían observar cambios en dicha banda, pudiendo crecer o decrecer y desplazarse hacia el rojo o azul, dependiendo de la absorción del aducto formado entre el compuesto y el ADN.

### 3.3.5.3 *Valoraciones de Dicroísmo Circular y de espectroscopía Ultravioleta Visible*

Para obtener más información acerca de la interacción de los metalociclos **M8-M10** con ADN de doble hélice (ds-DNA) y cuádruple (c-Kit1), se llevaron a cabo valoraciones de CD (**Figura 68** y **Figura 69**) y de espectroscopia UV-Vis (**Figura 70**).

---

<sup>127</sup> Kieltyka, R.; Englebienne, P.; Moitessier, N.; Sleiman, H. *G-Quadruplex DNA, Methods and Protocols*. **2010**, 233, Editorial Springer (Humana Press).



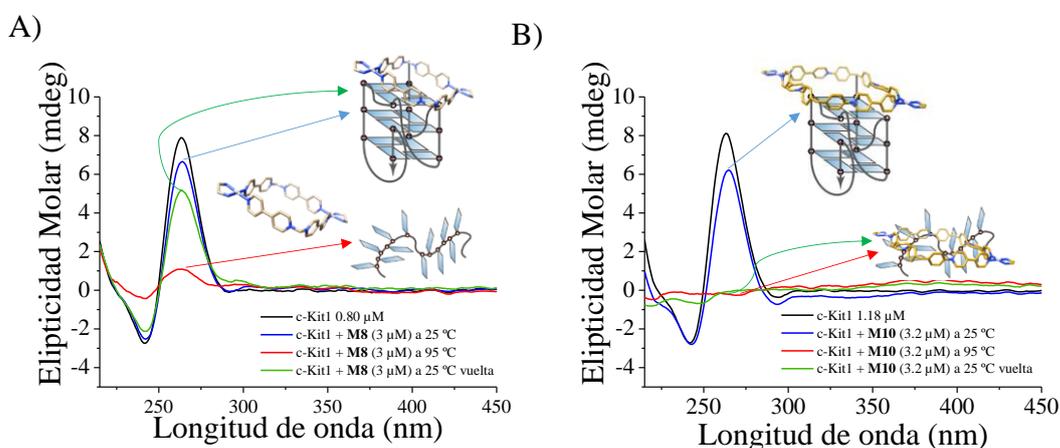
**Figura 68:** Espectros de dicroísmo circular de la interacción de A) metalociclo **M8** con ds-DNA; B) metalociclo **M8** con c-Kit1; C) metalociclo **M9** con ds-DNA; D) metalociclo **M9** con c-Kit1; E) metalociclo **M10** con ds-DNA y F) metalociclo **M10** con c-Kit1.

Así, el espectro de CD en la **Figura 68C** confirma la fuerza de la interacción del compuesto **M10** con el ds-DNA, con la aparición de una banda inducida en el CD a  $\lambda \approx 350$  nm. Además, la banda característica del ds-DNA ( $\lambda = 260$  nm) se modifica

intensamente, indicando un posible efecto de doblamiento de la biomolécula. Por otra parte, la interacción de **M8** con ds-DNA es más débil (**Figura 68A**), produciendo únicamente la aparición de una pequeña banda de CD inducida, pero no observándose cambios significativos en la banda del ADN.

Además, como se muestra en la **Figura 68**, la intensidad de la banda del c-Kit1 decrece generalmente tras la interacción con **M8-M10**, siendo más acusado el cambio con el compuesto **M10**. Se puede decir además que los efectos de CD observados para la interacción de ds-DNA y c-Kit1 con los metalociclos, se incrementan típicamente en todas las valoraciones realizadas con el tamaño del metalociclo (**M10 > M9 > M8**).

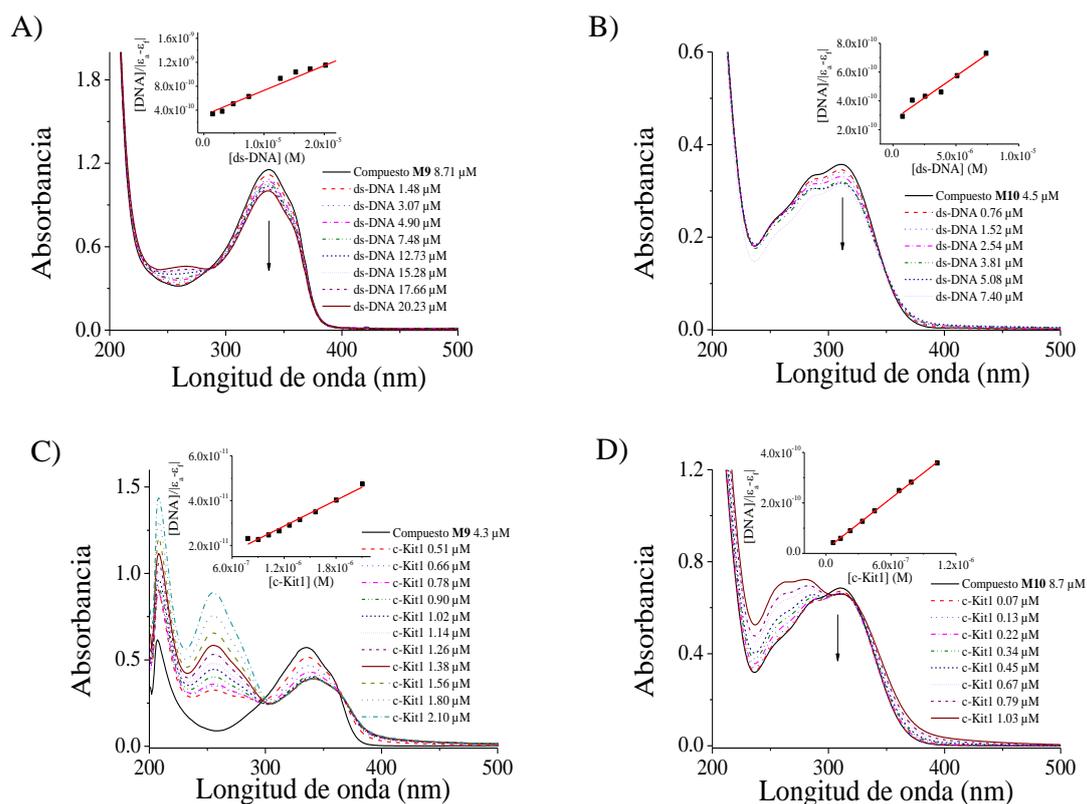
Con el fin de estudiar el efecto de los metalociclos **M8** y **M10** en el plegamiento de la estructura del cuádruple, se monitoriza mediante CD la interacción con c-Kit1 a diferente temperatura. Así, con el compuesto **M8**, la estructura de c-Kit1 se mantiene en disolución después de un ciclo de calentamiento-enfriamiento (**Figura 69A**). Sin embargo, la estructura del cuádruple del c-Kit1 no se vuelve a formar con el compuesto **M10** (**Figura 69B**). Esta es otra prueba de la importancia del tamaño de la cavidad del metalociclo de platino en la interacción. El metalociclo **M9** muestra el mismo comportamiento que el metalociclo **M10**, aunque menos pronunciado (**Apéndice AIII11**).



**Figura 69:** Espectros de dicroísmo circular de la interacción de c-Kit1 a 25°C y 95°C con a) metalociclo **M8** y b) metalociclo **M10**.

A continuación se llevó a cabo la valoración de la interacción de los metalociclos **M9** y **M10** con el ADN de doble hélice (ds-DNA) y cuádruple (c-Kit1) por espectroscopia UV-Vis. Para el metalociclo **M8** no resulta posible realizar la valoración, debido a que su banda en el espectro de absorbancia se solapa con la del ADN (**Apéndice AIII12**). Afortunadamente, si fue posible realizar las valoraciones con los metalociclos **M9** y **M10**, pudiéndose calcular los valores de sus constantes de asociación con ds-ADN (**M10**:  $K_a$

$=1.3 \pm 0.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , **M10**:  $K_a = 2.3 \pm 0.4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , **Figura 70**). Dichos valores de las constantes de interacción se ven aumentados al evaluar la interacción de los metalociclos **M9** y **M10** con la secuencia de ADN cuádruple correspondiente al c-Kit1, indicando el incremento de afinidad de dichos compuestos por el c-Kit1 frente al ds-DNA. En concreto los valores de las constantes de asociación ( $K_a$ ) con el c-Kit1 para los metalociclos **M9** y **M10** son  $(3.5 \pm 1.0) \times 10^6$  y  $(2.0 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 70:** Espectros Ultravioleta-Visible de la interacción de A) metalociclo **M9** con ds-DNA, B) **M10** con ds-DNA, C) metalociclo **M9** con c-Kit1 y D) metalociclo **M10** con c-Kit1.

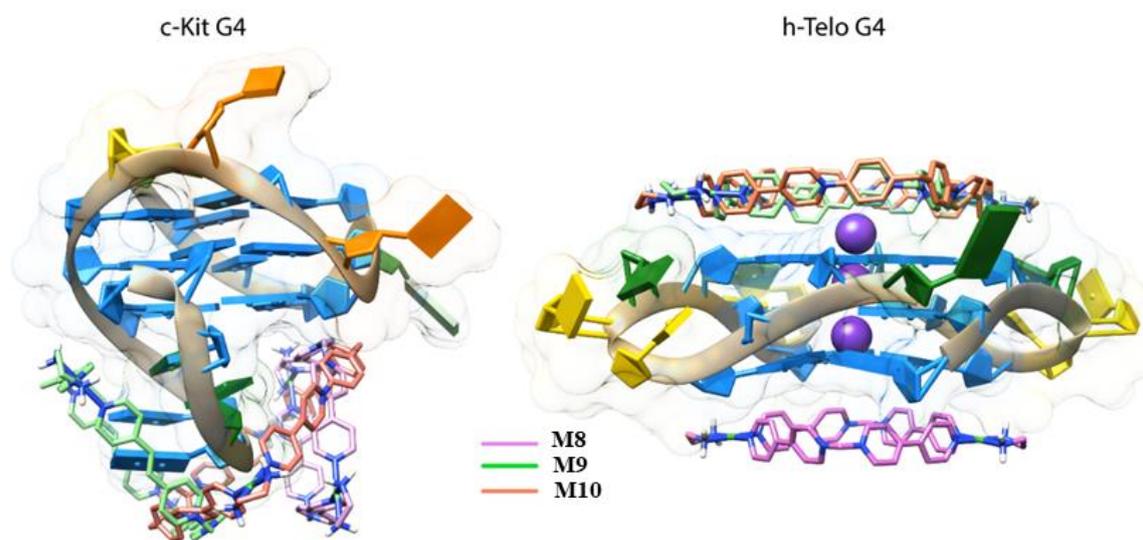
### 3.3.5.4 Estudios de Docking molecular

Con el fin de obtener información estructural, que nos ayudase a racionalizar los resultados de interacción obtenidos, se realizaron estudios de Docking Molecular empleando el programa AutoDock Vina 1.1.2<sup>128</sup> (para más detalle consultar el apéndice IV). Éstos muestran como los metalociclos **M8**, **M9** y **M10** se dispondrían encima y debajo de las caras del cuádruple telomérico (h-Telo), como ya se había encontrado para  $[\text{Pt}(\text{en})(4,4'\text{-dipyridyl})_4]$  (**Figura 71**).<sup>86,87,129</sup>

<sup>128</sup> Trott, O.; Olson, A. J. *J. Comput. Chem.*, **2010**, *31*, 455.

<sup>129</sup> Zheng, X. H. Zhong, Y. F.; Tan, C. P.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. *Dalton Trans.*, **2012**, *41*, 11807.

Sin embargo, los metalociclos se disponen en regiones diferentes al interactuar con el c-Kit1. Así, el compuesto **M8** se comporta de manera diferente al compuesto **M9** y **M10** al ser el único que encaja en el surco de unión del c-Kit1.



**Figura 71:** Docking molecular: dibujo mostrando los posibles sitios de unión de los metalociclos **M8**, **M9** y **M10** con c-Kit1 y h-Telo.

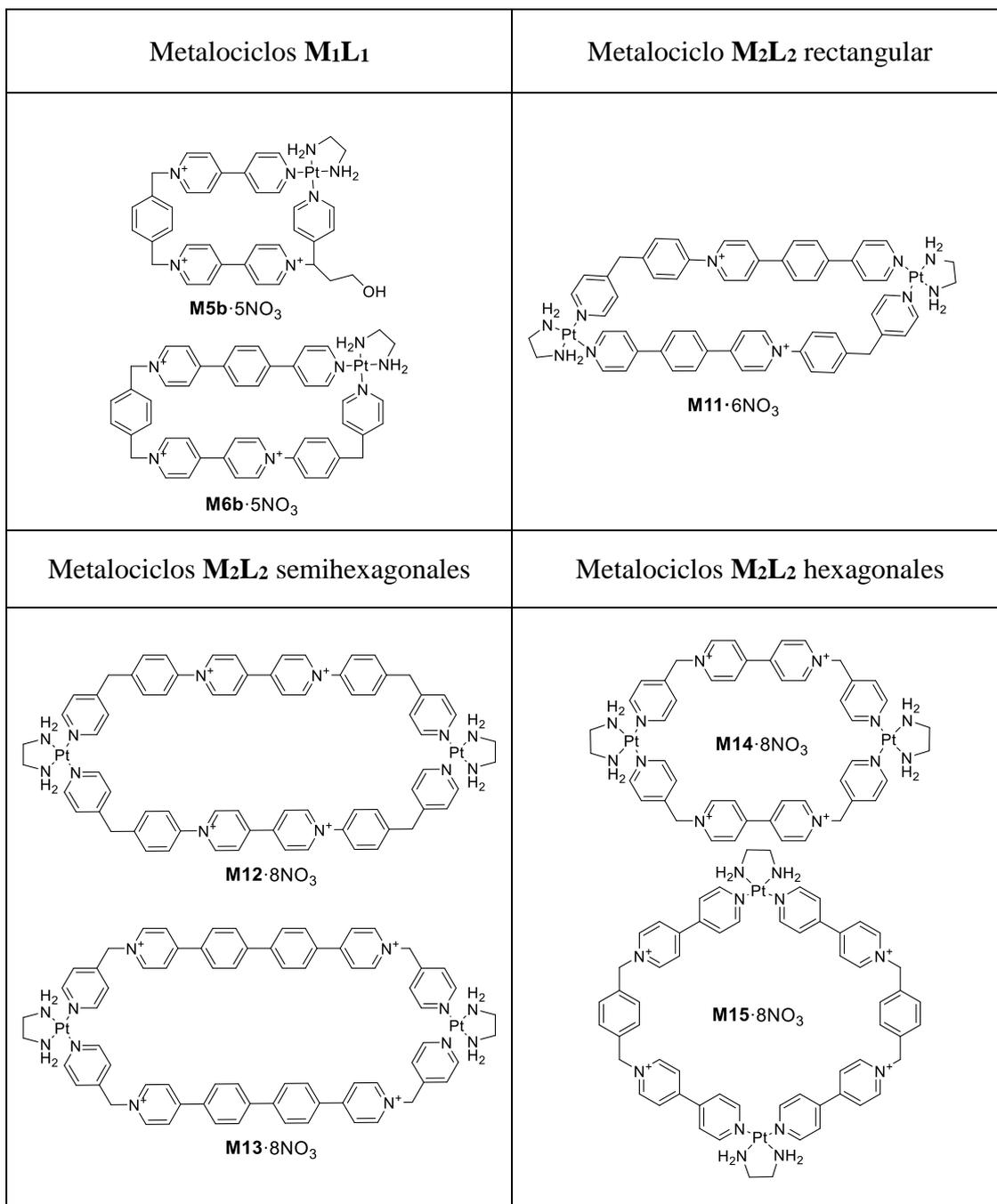
### ***3.4 Estudio de la interacción con ADN de una librería estructuralmente heterogénea de metalociclos***

#### ***3.4.1 Metalociclos seleccionados***

Con el objetivo de arrojar luz sobre los requisitos estructurales necesarios por parte de los metalociclos desarrollados por el grupo, en su perfil de interacción con el ADN, se preparó y analizó una librería de ligandos y de sus respectivos metalociclos en los que se varía el tamaño, forma, funcionalización, características de absorción-emisión, o carga y distribución de la misma. Así, por un lado, siguiendo la ruta sintética descrita en la primera sección, se pudieron preparar en cantidades razonables los metalociclos de tipo  $M_1L_1$  **M5b**·5NO<sub>3</sub> y **M6b**·5NO<sub>3</sub>. Ambos metalociclos difieren en el tamaño de la cavidad, siendo mayor en el caso del compuesto **M6b**. Además, **M5b**, es el único que presenta funcionalización *exo*-cíclica, presentando un sustituyente hidroxietil en su estructura.

Se sintetiza también un metalociclo rectangular, **M11**, y dos metalociclos de tipo  $M_2L_2$  semihexagonales (**M12**, y **M13**).<sup>89d</sup> Los metalociclos **M12** y **M13** difieren del metalociclo **M11** en tamaño y forma. Por un lado, el metalociclo **M12** deriva de un ligando en L con 4,4'-bipiridinio, mientras que el metalociclo **M13** deriva de un ligando en L con 4,4'-bipiridinio con un puente de 1,4-bifenilo, difiriendo por lo tanto ambos metalociclos, en la distribución de sus cargas. Por otra parte, el metalociclo **M11** ha sido publicado previamente por el grupo de investigación y deriva de un ligando en L con 4,4'-bipiridinio con un puente de fenilo.<sup>45</sup>

Por último, se sintetizan dos metalociclos de tipo  $M_2L_2$  hexagonales, los cuales varían en tamaño y forma.<sup>42</sup>



**Figura 72:** Metalociclos de Pt(II) seleccionados.

Para los estudios de interacción con el ADN se han realizado experimentos FRET, FRET competitivo, y valoraciones mediante espectroscopia UV-Vis, CD y fluorescencia. Las secuencias de los oligonucleótidos comerciales empleados se recogen en la siguiente tabla:

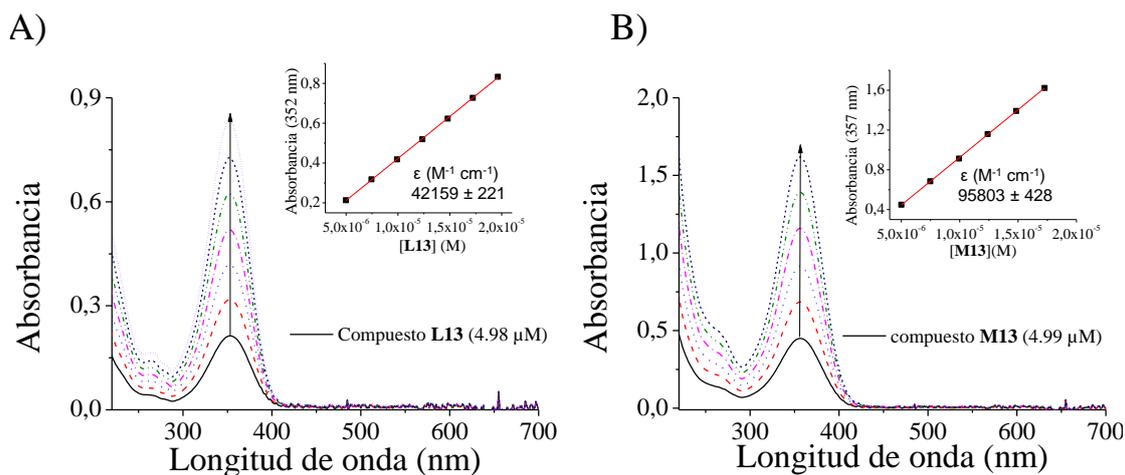
**Tabla 5:** secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótidos	Secuencia
<i>h-Telo</i>	AGG GTT AGG GTT AGG GTT AGG G
<i>c-Kit1</i>	AGG GAG GGC GCT GGG AGG G
<i>c-Kit2</i>	CGG GCG GGC GCG AGG GAG GGG
<i>hTERT</i>	GGG GGC TGG GCC GGG GAC CCG GGA GGG GTC GGG ACG GGG CGG GG
<i>hTERT-s</i>	AGG GGA GGG GCT GGG AGG GC
<i>Bcl2</i>	AGG GGC GGG CGC GGG AGG AAG GGG GCG GGA GCG GGG CTG
<i>VEGF</i>	CGG GGC GGG CCT TGG GCG GGG T
<b>ds-DNA</b>	TATAGCTATA-Heg-TATAGCTATA
<b>G4-nl</b>	TGG GGG TTG GGG GTT GGG GGT TGG GGG T

### 3.4.2 Estudios preliminares

Antes de comenzar los estudios de interacción, se evalúa la estabilidad de los metalociclos en la disolución tampón (Tris-KCl) que se va a emplear para realizar las valoraciones de espectroscopía. Para ello se registra el espectro UV-Vis de los compuestos cada hora durante 24 horas. Los resultados muestran que tanto los ligandos como los metalociclos son estables con el tiempo, al no observar cambios en los espectros registrados (**apéndice AII13-AII26**)

A continuación, se realizan los experimentos Lambert-Beer de los ligandos y de los metalociclos en el Buffer Tris-KCl, comprobándose que se cumple dicha ley y determinándose los valores de  $\epsilon$  para cada ligando y su correspondiente metalociclo. A modo de ejemplo, se muestran en la **Figura 73** los espectros de espectroscopía UV-Vis y los valores de  $\epsilon$  calculados para el ligando **L13** y el metalociclo **M13**.



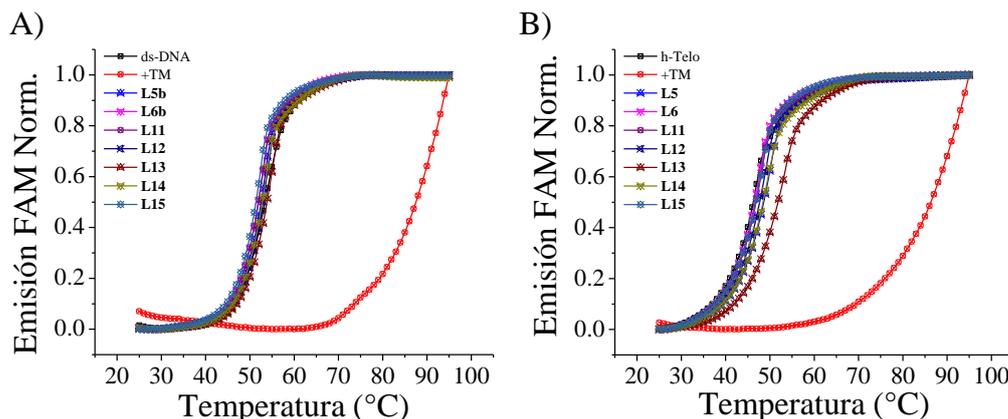
**Figura 73:** Espectros de absorción y cálculo del coeficiente de extinción molar en el tampón Tris-KCl (Ajuste de Lambert Beer) de A) el ligando **L13**·2NO<sub>3</sub> ( $\lambda=352$  nm) y B) metalociclo **M13**·8NO<sub>3</sub>.

### 3.4.3 Estudios de interacción

#### 3.4.3.1 Experimentos de FRET

Una vez comprobado que los ligandos y los metalociclos son estables con el tiempo, se realizan experimentos FRET con el fin de hacer una selección rápida de los compuestos con un mejor perfil de interacción. Esta información podría obtenerse también, de modo realmente cuantitativo, por medio de valoraciones por espectroscopía UV-Vis, CD o fluorescencia, pero se requeriría realizar un experimento para cada compuesto. Así, por medio del FRET, se puede realizar una selección rápida y preliminar de los compuestos que resultan más interesantes y someter a éstos a un estudio posterior más exhaustivo.

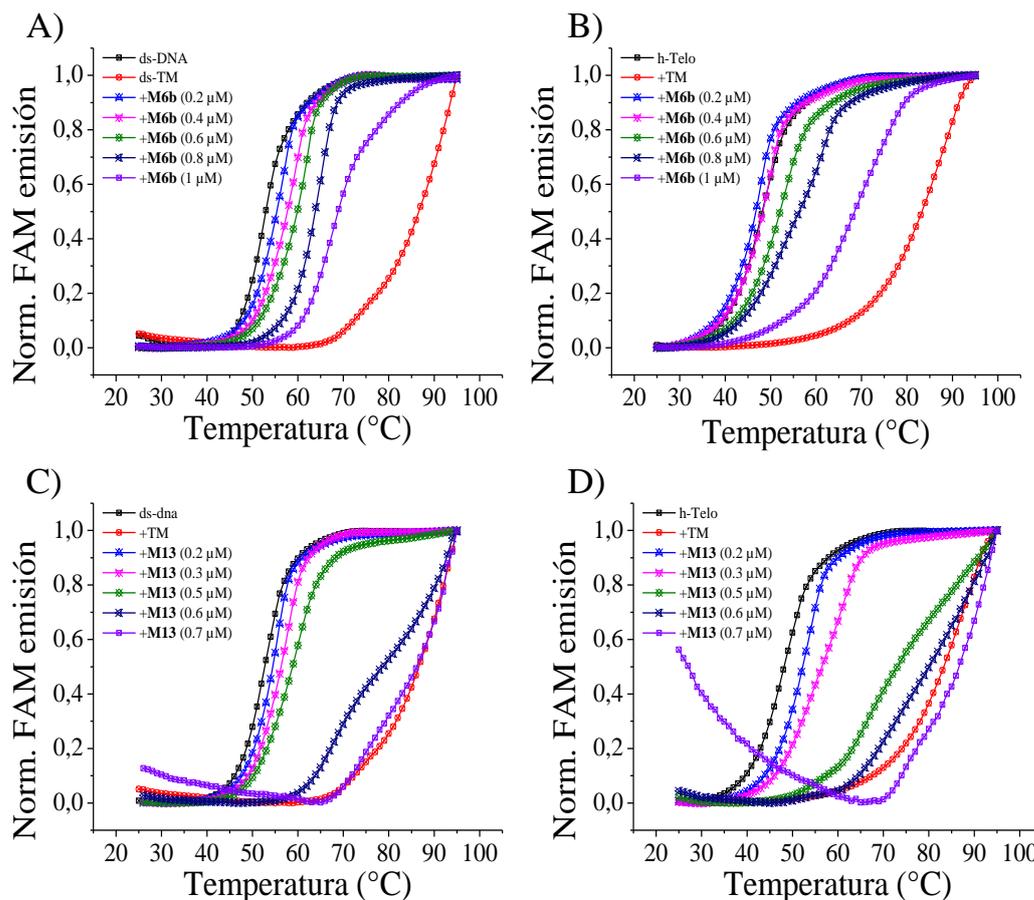
El primer experimento de FRET llevado a cabo consiste en evaluar la fortaleza de la interacción de todos los ligandos con una secuencia de ADN de doble hélice (ds-DNA) y con una secuencia de ADN-cuádruple (h-Telo). De acuerdo con los resultados obtenidos previamente, se espera que la interacción de los ligandos con el ADN sea muy débil o inexistente. De esta forma, los resultados confirman que los ligandos apenas interaccionan ni con el ADN de doble hélice ni con el ADN cuádruple, lo que permiten descartarlos para estudios posteriores como potenciales agentes de unión al ADN (**Figura 74**).



**Figura 74:** Representación de los perfiles de FRET de ds-DNA (A) y de ADN G-cuádruple, h-Telo (B) al interactuar con los compuestos **L5, L6, L11-L15** y con el compuesto TMPyP4. El buffer utilizado: 60 mM de cacodilato potásico, pH=7.4.

A continuación, se estudia la interacción por FRET de los metalociclos. En el experimento llevado a cabo se evalúa la variación de la temperatura de desnaturalización del ADN, de doble hélice (ds-DNA) y de estructura cuádruple (h-Telo), al añadir cantidades crecientes de los metalociclos preparados. Con este experimento, se pretende, por un lado, establecer la relación que existe entre la concentración de los metalociclos y el incremento en la temperatura de desnaturalización del ADN, y por el otro, escoger la mejor concentración de los metalociclos a la que llevar a cabo estudios sucesivos. Por último, este experimento, permite seleccionar aquellos metalociclos que ofrezcan mejores resultados. En la **Figura 75** se recogen a modo de ejemplo, los resultados para los metalociclos **M6b** y **M13**.

En general, los resultados, muestran en todos los casos (**Figura 75** y **Apéndice AII39**), que a medida que se incrementa la concentración de los metalociclos aumenta la temperatura de desnaturalización tanto del ADN de doble hélice como del ADN cuádruple.



**Figura 75:** Variación de la temperatura media de desnaturalización de ct-ADN y h-Telo al añadir concentraciones crecientes del metalociclo **M6b** (A y B) y **M13** (C y D).

En particular, los metalociclos de tipo  $Pt_2L_2$  **M11-M15** son los que más consiguen estabilizar el ADN y, especialmente, al ADN cuádruple. Por ello, estos metalociclos son sometidos a otro experimento de FRET en los que se evaluará su interacción con una secuencia de ds-DNA y con una amplia selección de secuencias de ADN cuádruple (h-Telo, h-TERT-s, h-TERT, c-Kit1, c-Kit2, Bcl2 y VEGF). En la realización de estos experimentos se añaden los metalociclos a concentración  $0,4 \mu M$ , estimada en base a los resultados obtenidos en la estabilización de h-Telo. Para este oligonucleótido, se observa que a concentraciones superiores no se produce una emisión de FAM apreciable, lo que implica una estabilización muy significativa que impide, en la mayoría de los casos, su desnaturalización. Este fenómeno indica que, a priori, la interacción de estos metalociclos con el ADN es mayor que la mostrada por los metalociclos cuadrangulares **M8** y **M9** estudiados en la sección anterior.

**Tabla 6:** valores de  $\Delta T_{1/2}$  de ds-ADN y distintas secuencias de ADN-cuádruple a concentración 0.2 $\mu$ M al interaccionar con los compuestos **M11**, **M13-M15** a concentración 0.4  $\mu$ M.

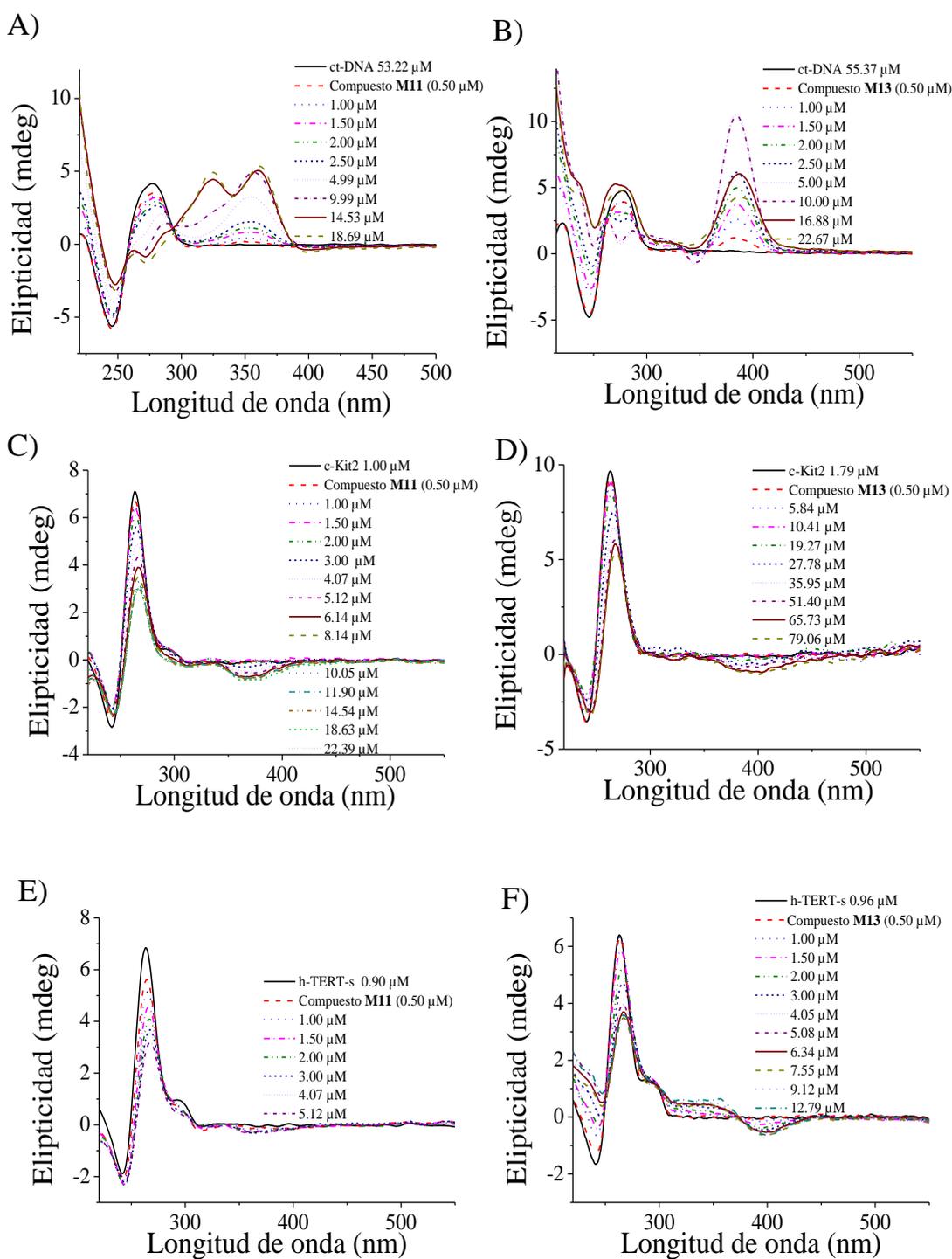
	<i>TMPyP</i>	<i>M11</i>	<i>M13</i>	<i>M14</i>	<i>M15</i>
<i>ds-DNA</i>	10.4	3.3	4.79	-1.8	24.7
<i>h-Telo</i>	11.5	7.1	6.7	-1.4	9.3
<i>hTERT-s</i>	5.8	10.7	13.8	-1.1	13.9
<i>h-TERT</i>	13.5	8.7	6.4	3.7	13.7
<i>c-Kit1</i>	32.7	22.8	20.4	8.8	27.0
<i>c-Kit2</i>	11.4	16.6	18.0	4.8	16.3
<i>Bcl2</i>	9.8	8.0	10.4	1.4	12.1
<i>VEGF</i>	8.1	10.4	9.1	0.6	16.1

En general los resultados (**Tabla 6**) indican que todos los metalociclos interaccionan fuertemente con la secuencia de ADN cuádruple c-Kit (c-Kit1 y c-Kit2), al igual que ocurría en el caso de los metalociclos cuadrangulares estudiados en la sección anterior. Además, se observa una apreciable interacción con la secuencia de ADN cuádruple correspondiente al h-TERT (h-TERT-s y h-TERT). En el caso de los compuestos **M11** y **M13** se observa una selectividad remarcable por el ADN cuádruple frente al ADN de doble hélice. En base a los resultados, se decide seleccionar los metalociclos **M11** y **M13** y las secuencias de ADN cuádruple correspondientes al c-Kit y al h-TERT para llevar a cabo otros estudios. En concreto se seleccionan las secuencias correspondientes al c-Kit2 y al h-TERT-s y no las correspondientes al c-Kit1 y al h-TERT, al ser estas últimas, con las que el control (TMPyP) exhibe mayor interacción.

#### 3.4.3.2 Valoraciones mediante Dicroísmo Circular

Se lleva a cabo la valoración mediante CD de la interacción de los metalociclos **M11** y **M13** con el ADN de doble hélice (ct-DNA) y con el ADN cuádruple (c-Kit2 y h-TERT-s), confirmando los resultados la existencia de interacción entre ambos metalociclos y las distintas formas de la biomolécula analizadas (**Figura 76**). Así, al adicionar cantidades crecientes del metalociclo **M11** manteniendo constante la concentración de la secuencia de ADN duplex (ct-DNA) se observa la aparición de dos bandas inducidas, en torno a 350 nm (**Figura 76a**). Al no ser el compuesto **M11** una molécula quiral, la aparición de una banda inducida sólo se puede deber a su interacción con una estructura quiral, el ADN. En el caso de la valoración con el metalociclo **M13**,

se observa que al añadir cantidades crecientes del mismo aparece una banda inducida, en torno a 360 nm (**Figura 76b**). Del mismo modo, en ambos casos se observa una importante variación en la banda correspondiente al ADN ( $\lambda_{\max} = 260$  nm), indicando un posible efecto de doblamiento de la biomolécula.



**Figura 76:** Espectros de dicroísmo circular de la interacción de ct-DNA con A) M11 y B) M13; de c-Kit2 con C) M11 y D) M13 y de h-TERT-s con E) M11 y F) M13.

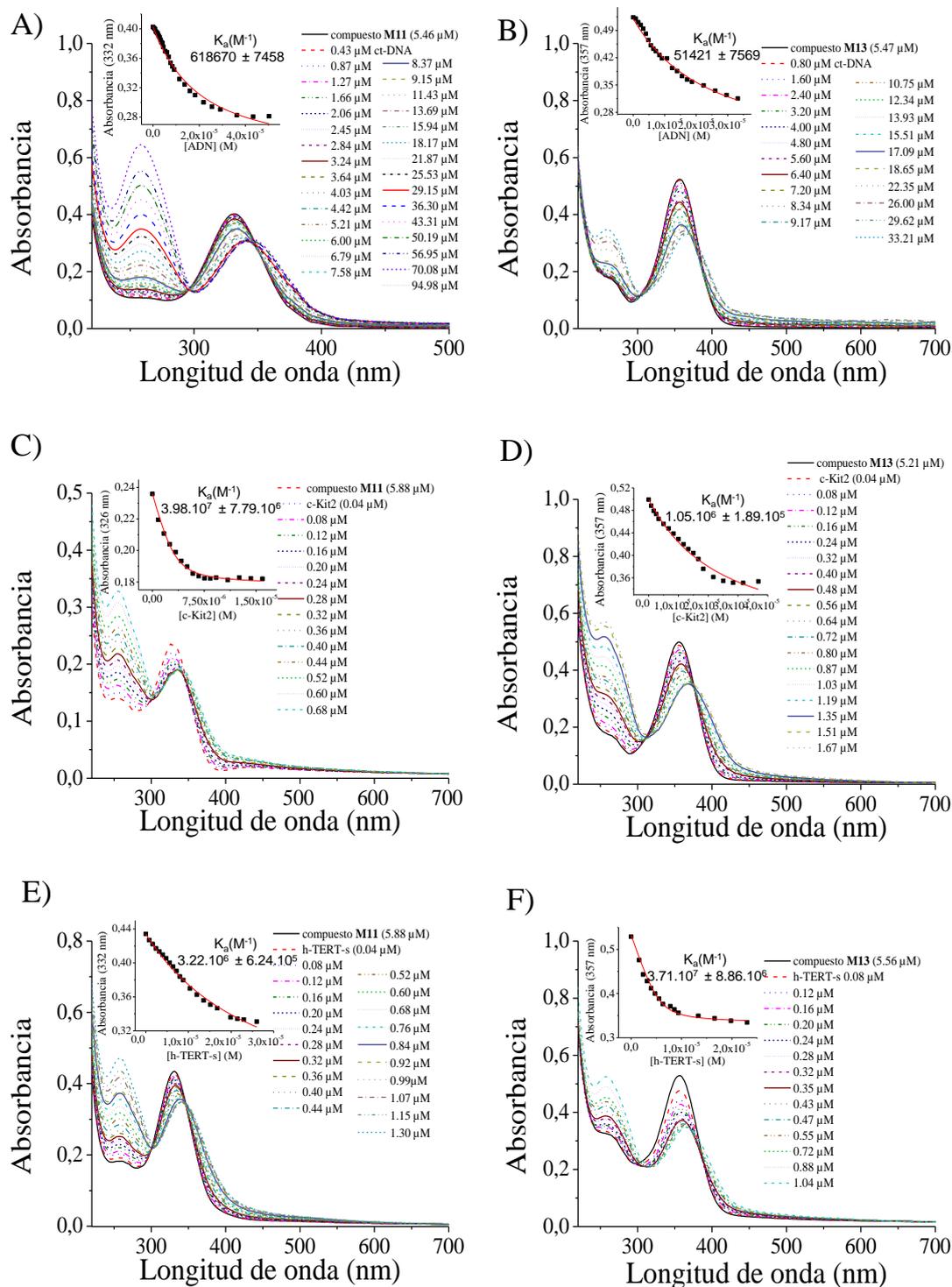
En el caso de las valoraciones de **M11** y **M13** con las secuencias de ADN cuádruple (c-Kit2 y h-TERT-s), también se observa la aparición de bandas inducidas que confirman la interacción. En este caso las bandas inducidas, al contrario que con el ADN de doble hélice, exhibieron un efecto Cotton negativo. Así mismo, también se vio afectada la banda correspondiente a las secuencias de ADN cuádruple como resultado de la interacción con los metalociclos (**Figura 76**).

#### 3.4.3.3 Valoraciones mediante espectroscopía Ultravioleta Visible

Las valoraciones por espectroscopía UV-Vis de los metalociclos **M11** y **M13** con el ADN de doble hélice (ct-DNA) y cuádruple (c-Kit2 y h-TERT-s), permiten determinar cuantitativamente los valores de las constantes de interacción. Para los dos compuestos, los resultados muestran como al ir añadiendo cantidades crecientes de ADN, y como resultado de la interacción con la biomolécula, se produce una disminución de la banda de absorción asociada (**Figura 77**).

Los valores de las constantes de asociación con el ADN de doble hélice (ct-DNA) de los metalociclos **M11** y **M13**, obtenidos mediante las valoraciones son ( $K_a$  (**M11**) =  $6.2 \pm 0.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  y  $K_a$  (**M13**) =  $5.1 \pm 0.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  (**Figura 77A** y **77B**), valores del mismo orden de magnitud que los determinados para los metalociclos cuadrangulares similares en tamaño y número de cargas **M8** y **M10** de la sección anterior.

En lo referido a los valores de las constantes de interacción con las secuencias de ADN cuádruple, éstos son significativamente mayores, con  $K_a$  (**M11**, c-Kit2) =  $3.98 \pm 0.8 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_a$  (**M11**, h-TERT-s) =  $3.22 \pm 0.6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_a$  (**M13**, c-Kit2) =  $1.05 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  y  $K_a$  (**M13**, h-TERT-s) =  $3.7 \pm 0.9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Estos resultados indican que los metalociclos escogidos muestran una potencial selectividad por el ADN cuádruple frente al ADN de doble hélice.



**Figura 77:** Espectros de UV-Vis para las valoraciones de interacción de ct-ADN con A) M11 y B) M13; c-Kit-2 con C) M11 y D) M13; y h-TERT-s con E) M11 y F) M13.

#### 3.4.3.4 Desnaturalización térmica del ADN por FRET competitivo

Una variante del experimento de FRET analizado anteriormente consiste en la adición, además de las secuencias de ADN marcadas con etiquetas fluorescentes, de alícuotas de una secuencia de ADN diferente no marcada, en exceso estequiométrico y que pueda actuar como competidor. El protocolo experimental es idéntico al anterior, pero incorporando el oligonucleótido competidor, de modo que tras el registro de la fluorescencia, se comparan los valores de las temperaturas medias de desnaturalización obtenidos para la secuencia de ADN marcada con los fluoróforos en presencia y ausencia de ADN competidor a distintas concentraciones.<sup>79,130</sup>

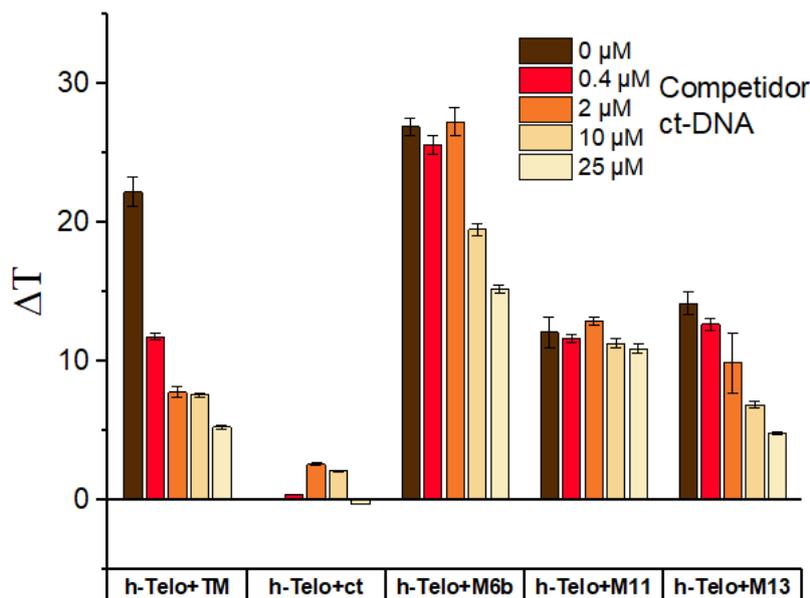
Para llevar a cabo con éxito el experimento es necesario que la diferencia entre la temperatura de desnaturalización de la secuencia de ADN marcada y la secuencia de ADN que va actuar como competidor sea, como mínimo, de 20 grados. Por ello se utiliza en este experimento un tampón con menor concentración de potasio (5K: Tampón con LiCl (95 mM) y cacodilato potásico (10 mM)), lo cual disminuye la temperatura media de desnaturalización del ADN cuádruple.<sup>79</sup>

En nuestro caso, se llevaron a cabo experimentos de FRET competitivo con los tres metalociclos con potencial para ser fluorescentes (**M6b**, **M11** y **M13**), dos de los cuales (**M11** y **M13**) se revelaron como los metalociclos más prometedores en cuanto a su selectividad con el ADN cuádruple. Así, en el primero de los experimentos se empleó la secuencia de h-Telo marcado con FAM y TAMRA a concentración 0,2  $\mu\text{M}$ , adicionándose como competidor una secuencia de ADN de doble hélice no marcada (ct-DNA) a diferentes concentraciones (0, 0.4, 2, 10 y 25 $\mu\text{M}$ ).

Los resultados para los tres metalociclos (**M6b**, **M11** y **M13**) muestran selectividad por el h-Telo (ADN cuádruple) frente al ct-DNA (ADN de doble hélice). Por otra banda, la porfirina utilizada como control (TMyP4) no resultó selectiva, disminuyendo la temperatura media de desnaturalización del h-Telo al añadir el competidor (ct-DNA).

---

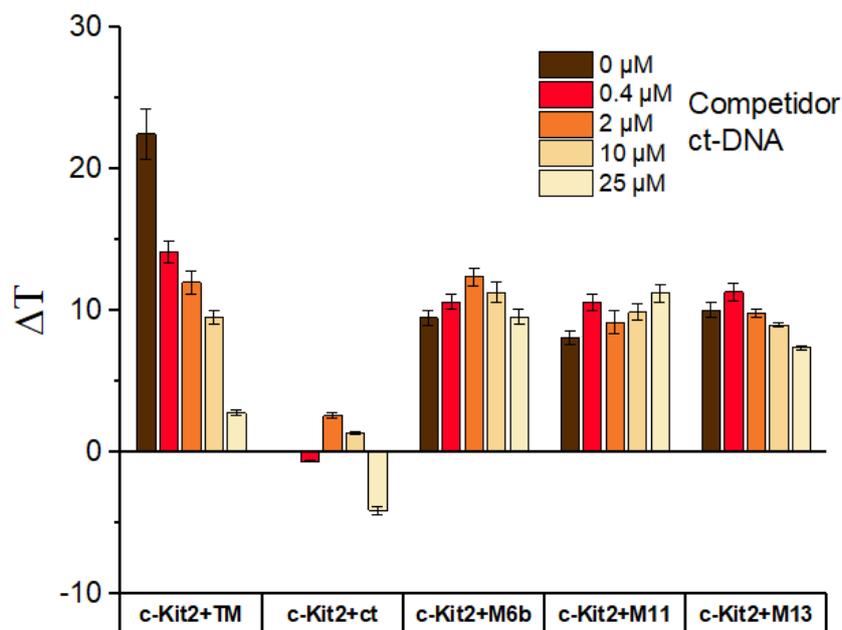
<sup>130</sup> De Cian, A.; Guittat, L.; Shin-ya, K.; Riou, J. -F.; Mergny, J. L. *Nucleic Acids Symposium*, **2005**, *49*, 235.



**Figura 78:** Representación de la variación de  $\Delta T_{1/2}$  de h-Telo a concentración  $0.2\mu\text{M}$  en presencia de cantidades crecientes del competidor ct-DNA ( $0\mu\text{M}$ ,  $0.4\mu\text{M}$ ,  $2\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $25\mu\text{M}$ ) en el tampón 5K ( $95\text{mM}$  de LiCl+ $10\text{mM}$  cacodilato potásico).

A continuación, se evalúa la selectividad de los metalociclos por la secuencia de ADN cuádruple correspondiente a c-Kit2 frente al ADN de doble hélice (ct-DNA). Para ello se emplea la secuencia de c-Kit2 marcado con FAM y TAMRA a concentración  $0,2\mu\text{M}$ . Como en el caso anterior con h-Telo, el ct-DNA se usa como competidor a diferentes concentraciones ( $0$ ,  $0.4$ ,  $2$ ,  $10$  y  $25\mu\text{M}$ ).

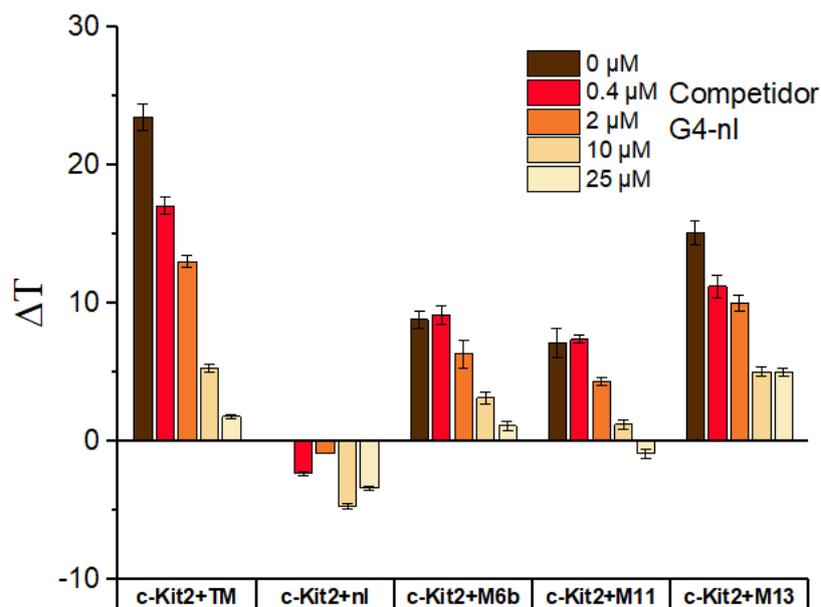
Los resultados para los tres metalociclos (**M6b**, **M11** y **M13**) muestran selectividad por el c-Kit-2 frente al ct-DNA. Sin embargo, la porfirina utilizada como control (TMyP4) no resulta selectiva, disminuyendo la temperatura media de desnaturalización del c-Kit2 al añadir el competidor (ct-DNA).



**Figura 79:** Representación de la variación de  $\Delta T_{1/2}$  de c-Kit2 a concentración 0.2  $\mu\text{M}$  en presencia de cantidades crecientes del competidor ct-DNA (0  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) en el tampón 5K.

Por último, se evalúa la selectividad de los metalociclos por la secuencia de ADN cuádruple correspondiente a c-Kit2 frente a una secuencia de ADN que forma estructura cuádruple sin surcos (ADN G4-nl). Para ello, se emplea la secuencia de c-Kit2 marcada con los fluoróforos FAM y TAMRA a concentración 0,2  $\mu\text{M}$ , y ADN G4-nl como competidor a diferentes concentraciones (0, 0.4, 2, 10 y 25  $\mu\text{M}$ ).

Se realiza este estudio con el objetivo de obtener información acerca de la unión de los metalociclos al ADN, se trata de evaluar así, si tienen preferencia por las secuencias de ADN cuádruple que presentan surcos. Los resultados para los tres metalociclos (**M6b**, **M11** y **M13**), muestran que no existe una selectividad remarcable por el c-Kit2 frente a la secuencia de ADN cuádruple sin surcos (**Figura 80**). Este resultado parece indicar que no existe preferencia clara de los metalociclos por el ADN cuádruple con surcos.



**Figura 80:** Representación de la variación de  $\Delta T_{1/2}$  de c-kit-2 a concentración 0.2  $\mu\text{M}$  en presencia de cantidades crecientes del competidor ADN G4-nl (0  $\mu\text{M}$ , 0.4  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ ) en el tampón 5K.

A partir de los valores de la temperatura media de desnaturalización ( $\Delta T_{1/2}$ ) obtenidos, se puede calcular un valor de selectividad  $^{FRET}S$  a través de la siguiente fórmula:

$$^{FRET}S = \Delta T_{1/2} (10 \mu\text{M oligo competidor}) / \Delta T_{1/2} (\text{sin oligo competidor})$$

**Ecuación 1:** Cálculo de la selectividad  $^{FRET}S$ .

Si los valores de selectividad se aproximan a 1, se considera que los ligandos muestran una elevada selectividad por la secuencia marcada con los fluoróforos. En la tabla se recogen los valores de  $^{FRET}S$  en el tampón 5K (95mM de LiCl+10mM cacodilato potásico)<sup>131</sup>.

**Tabla 7:** Valores de la selectividad  $^{FRET}S$  para los metalociclos **M6b**, **M11** y **M13** en el tampón 5K.

$^{FRET}S$	TMPyP 0.4 $\mu\text{M}$	M06b 1 $\mu\text{M}$	M11 0.4 $\mu\text{M}$	M13 0.4 $\mu\text{M}$
<b>h-Telo/ct-DNA</b>	<b>0.34</b>	<b>0.73</b>	<b>0.94</b>	<b>0.52</b>
<b>c-Kit2/ct-DNA</b>	<b>0.42</b>	<b>1.19</b>	<b>1.22</b>	<b>0.90</b>
<b>c-Kit2/G4-nl</b>	<b>0.22</b>	<b>0.34</b>	<b>0.17</b>	<b>0.36</b>

Los resultados muestran gráficamente y a través de los valores de  $^{FRET}S$  calculados la selectividad de los metalociclos **M6b**, **M11** y **M13** con el ADN cuádruple, siendo

<sup>131</sup> Granzham, A.; Monchaud, D.; Saettel, N.; Guedin, A.; Mergny, J.-L.; Teulade-Fichou, M.-P. J. *Nucleic Acids. Res.* **2010**, ID 460561, 1.

valores elevados especialmente en el caso del c-Kit-2 frente al ADN de doble hélice (ct-ADN). Por otro lado, los metalociclos no muestran elevada selectividad por los surcos del ADN cuádruple (c-Kit2).

#### 3.4.3.5 Espectroscopía de Fluorescencia

La espectroscopía de fluorescencia permite no sólo la determinación indirecta de la asociación mediante FRET entre compuesto y biomolécula marcada sino también su determinación directa. Así, si el agente que se une al ácido nucleico es fluorescente, la modificación de dicha propiedad por causa de la asociación podría ser estudiada de una forma muy sensible y podría ofrecer información directa sobre el modo de interacción. Por ejemplo, en la bibliografía encontramos como si el compuesto fluorescente se une mediante un proceso de intercalación (p. ej. el compuesto Natural Red), se produce un incremento de la fluorescencia del compuesto.<sup>132</sup>

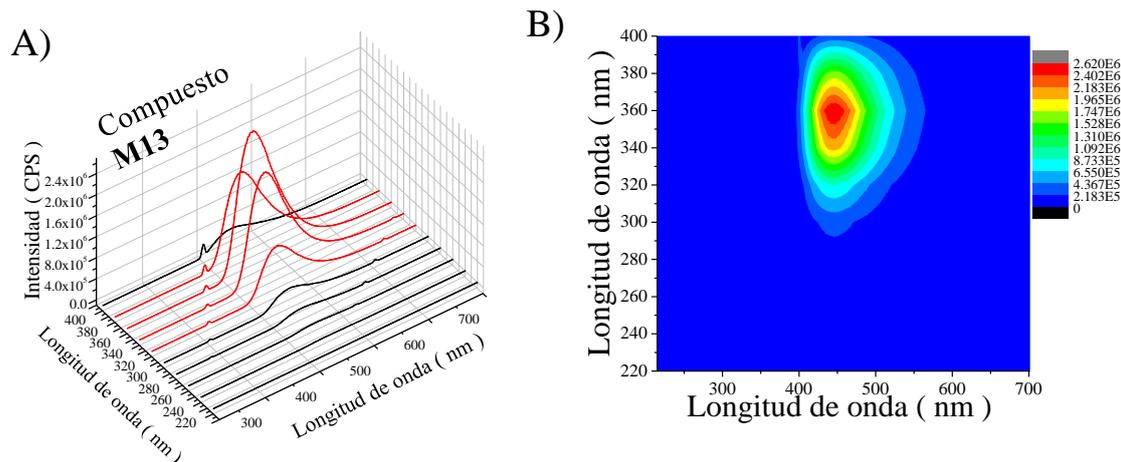
Del mismo modo, la presencia de fluorescencia en los metalociclos diseñados podría ser de mucha utilidad para posteriores estudios biológicos en los que, por ejemplo, se desee obtener información sobre la localización celular de este tipo de compuestos.

#### 3.4.3.6 Análisis de la fluorescencia de los metalociclos

Con el fin de determinar el perfil de fluorescencia de los metalociclos que podrían potencialmente incorporar esta propiedad **M6b**, **M11** y **M13** (en esencia, aquellos que incluyen en su estructura ligandos altamente fluorescentes), se realizaron sobre éstos estudios de fluorescencia 3D en el tampón Tris-KCl (**Figura 81** y **Apéndices AII45-AII46**).

---

<sup>132</sup> a) Lin, J.; Liu, R.; Gao, C. *Spectrochimica Acta Part A*, **2012**, 97, 532. 19; b) Bi, S.; Qiao, C.; Songa, D.; Tian, Y.; Gaoa, D.; Suna, Y.; Zhang, H. *Sensors and Actuators B*, **2006**, 119, 199.



**Figura 81:** Experimento 3D de fluorescencia del metalociclo **M13** en el tampón Tris-KCl.

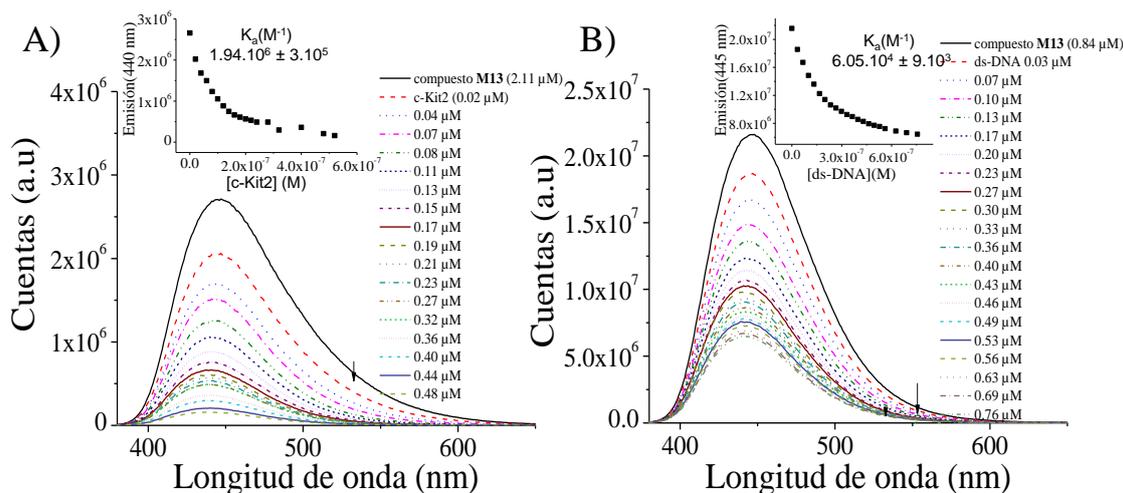
El experimento 3D mostró una elevada fluorescencia para los metalociclos **M6b**, **M11** y **M13**, permitiendo además seleccionar las mejores condiciones experimentales (concentración, apertura de rendija...) para llevar a cabo las valoraciones por fluorescencia de la interacción de los metalociclos fluorescentes con el ADN. En el caso del metalociclo **M13** (**Figura 81**) a concentración  $2.1 \mu\text{M}$  (determinada por espectroscopía UV-Vis,  $A=0.18$ ) fue necesario reducir la rendija de salida de 5 a 0.6 con el fin de no superar las cuentas de fluorescencia máximas del equipo. Se observó en estas condiciones el máximo de fluorescencia a  $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$ .

#### 3.4.3.7 Valoración de fluorescencia con c-Kit2

A continuación, se realiza la valoración cuantitativa de la interacción de los metalociclos con una secuencia de ADN cuádruple (c-Kit2) por fluorescencia. En este experimento se mantiene constante la concentración del metalociclo y se va variando la concentración del oligo de c-Kit2. Para los tres metalociclos fluorescentes, **M6b**, **M11** y **M13** se observa que al ir aumentando la concentración del oligonucleótido va disminuyendo la banda de fluorescencia del metalociclo (**Figura 82A** y **Apéndice A47-48**) indicando que se está produciendo la interacción. En el caso de la valoración del metalociclo **M13** con c-Kit1 (**Figura 82**) se emplearon las mejores condiciones analizadas en el experimento 3D ( $\lambda_{\text{exc}} = 360 \text{ nm}$ , rendija de entrada= 5; Rango de emisión= 375-675 nm; rendija de salida= 0.6).

El valor de la constante de interacción del metalociclo **M13** con c-Kit2 determinado por fluorescencia es  $K_a = 1.94 \pm 0.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ , valor que se sitúa dentro del intervalo de error del obtenido por espectroscopía UV-Vis ( $K_a = 1.05 \pm 0.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).

Por último, con el objetivo de evaluar la selectividad del metalociclo también por fluorescencia, se realiza la valoración de la interacción del metalociclo **M13** con ds-DNA (**Figura 82B**). En este caso, el valor obtenido de la constante de interacción del metalociclo **M13** con ds-DNA es  $K_a = 6.05 \pm 0.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ , valor dentro del intervalo de error del obtenido por espectroscopía UV-VIS ( $K_a(\text{M13}) = 5.1 \pm 0.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ ). Los datos obtenidos corroboran la potencial selectividad del metalociclo **M13** por el ADN cuádruple frente al ADN de doble hélice.



**Figura 82:** Espectros de UV-Vis para las valoraciones de interacción de **M13** con A) c-Kit2 y B) ds-DNA.

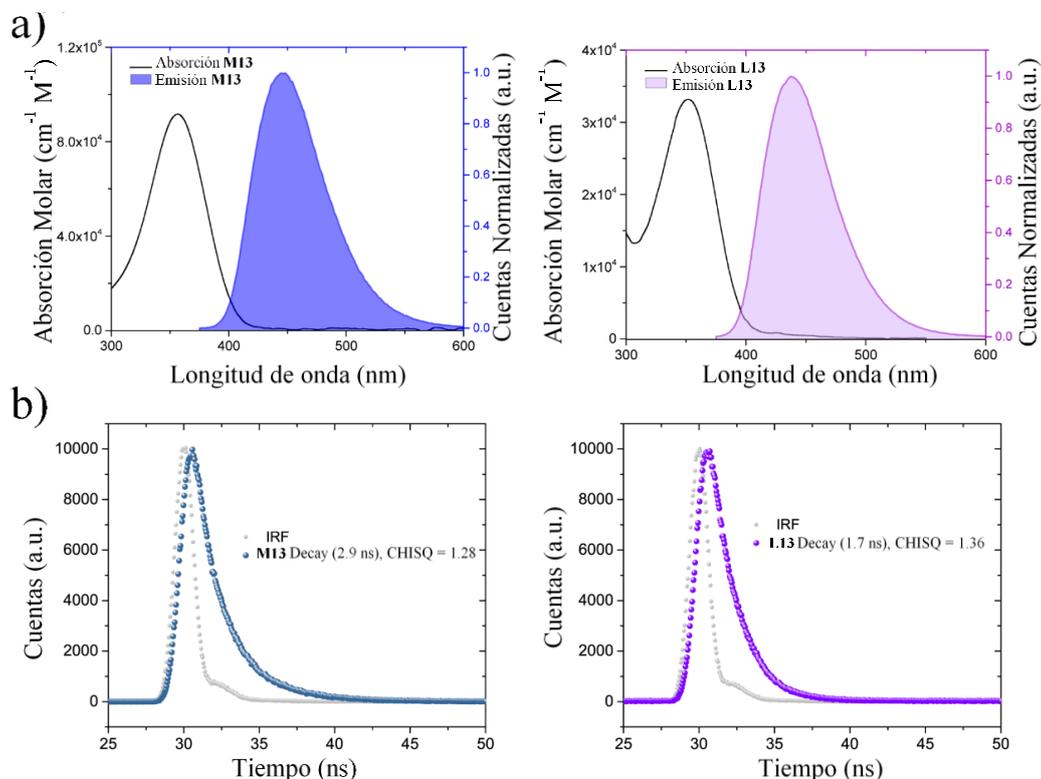
### 3.4.3.8 Análisis del tiempo de vida media de fluorescencia del ligando **L13** y de su metalociclo derivado **M13**

Recientemente de los tres metalociclos fluorescentes estudiados, Stoddart y colaboradores han publicado un ciclofano con estructura similar al metalociclo **M13**, que presenta interesantes propiedades emisivas.<sup>133</sup> En este contexto se decide ampliar el estudio de las propiedades emisivas del metalociclo **M13**.

Los espectros de excitación-emisión (**Figura 83a**), mostraron que el metalociclo **M13** en el tampón tris-KCl emite y absorbe con un máximo a:  $\lambda_{em} = 445 \text{ nm}$  y  $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$ . El perfil de fluorescencia de **M13** es bastante similar al de su ligando precursor **L13**, que tiene un máximo de emisión levemente desplazado hacia el azul ( $\lambda_{em} = 437 \text{ nm}$ , **Figura 83a**). El perfil similar de ambos compuestos, unido a que ambos tiene tiempos de vida de aproximadamente de 2 ns (**Figura 83b**), sugiere que la fluorescencia depende

<sup>133</sup> Wu, Y.; Zhou, J.; Phelan, B. T.; Mauck, C. M.; Stoddart, J. F.; Young, R. M.; Wasielewski, M. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14265.

principalmente de los estados excitados del ligando, en buen acuerdo con lo publicado para otros derivados de Pt (II).<sup>134</sup>



**Figura 83:** a) Espectros de absorción y emisión de **M13** y **L13** en Tris-HCl 5 mM, KCl 50 mM, pH= 7.8 y b) Decaimiento del tiempo de vida del estado excitado para **M13** y **L13** en Tris-HCl 5 mM, KCl 50 mM, pH= 7.8. Ambos compuestos exhiben un decaimiento mono-exponencial IRF (puntos en gris) = respuesta del equipo (Prompt).

### 3.4.3.9 Rendimiento cuántico de fluorescencia del ligando **L13** y del metalociclo **M13**

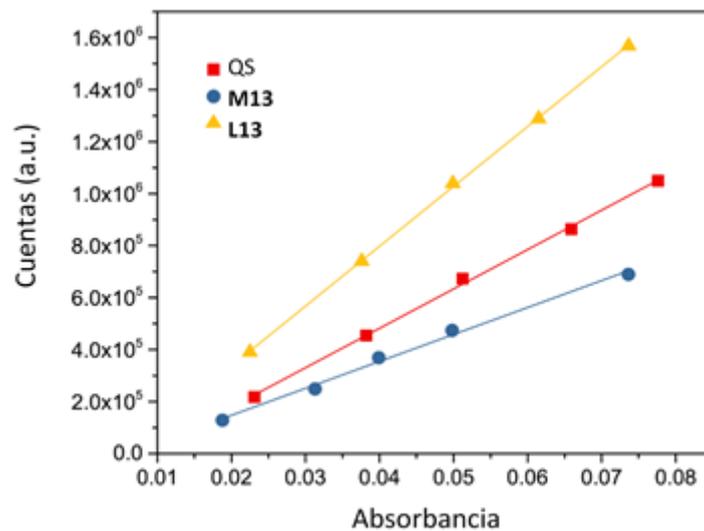
A continuación, se determinó el rendimiento cuántico de fluorescencia para el ligando **L13** y el metalociclo **M13** empleando como patrón sulfato de quinina (QS).

Los resultados mostraron que el metalociclo **M13** presenta un buen rendimiento cuántico en agua ( $\phi_F = 0.38$  a  $\lambda_{em} = 445$  nm), en contraste con lo observado recientemente para otros derivados similares de Pt(II) que sólo muestran emisiones altas en disolventes no polares. El hecho de que el metalociclo **M13** presente un buen rendimiento cuántico en agua lo convierte en un buen candidato para rastrear la distribución celular.

Por otra parte, y como era de esperar, el ligando libre **L13** es más emisivo que su correspondiente metalociclo **M13** en agua ( $\phi_F = 0.84$  a  $\lambda_{em} = 437$  nm, **Figura 84**) lo que sugiere que el ensamblaje del ligando con los centros metálicos de platino produce efectos

<sup>134</sup> Grishagin, I. V.; Pollock, J. B.; Kushal, S.; Cook, T. R.; Stang, P. J.; Olenyuk, B. Z. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2014**, *111*, 18448.

de quencheo relacionados con átomos pesados, tal y como se ha observado en numerosos complejos de platino.



**Figura 84:** Gráfico de la emisión frente a la absorción en agua de L13 y M13 y sulfato de quinina (QS) para la evaluación del rendimiento cuántico.



### Capítulo III. Estudios biológicos

Los resultados de ensayos biológicos que se recogen en la presente tesis doctoral se llevaron a cabo por los grupos de investigación del Profesor Walter Berger (Universidad Médica de Viena) y el Doctor Alessio Terenzi (Instituto de Química Inorgánica de la Universidad de Viena). En este contexto, dichos resultados sirven para ejemplificar el gran interés de los compuestos desarrollados en el presente trabajo dentro del campo de la biomedicina.

#### 3.4.4 Ensayos celulares con los metalociclos de $Pt_2L_2$ cuadrangulares **M8-M10**

En vista a los resultados espectroscópicos de interacción con el ADN de doble hélice y cuádruple discutidos en el anterior capítulo de la presente memoria, se procedió a la determinación de las citotoxicidades de los metalociclos **M8-M10** y de sus respectivos ligandos **L8-L10** en diversas líneas celulares cancerígenas. Para ello, se trataron tres líneas celulares cancerígenas (osteosarcoma U2OS, melanoma VM-1 y cáncer de pulmón MCF-7), durante 72 horas con concentraciones crecientes de **M8-M10** / **L8-L10** (empleando cisplatino como referencia). A continuación se llevó a cabo la determinación de las citotoxicidades mediante ensayos colorimétricos MTT (**Tabla 8**).

**Tabla 8:** valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) de los compuestos **L8-L10** y **M8-M10** tras 72h de incubación.

	<b>L8</b>	<b>L9</b>	<b>L10</b>	<b>M8</b>	<b>M9</b>	<b>M10</b>
<b>U2OS</b>	>50	38.2 +/- 3.4	>50	37.8 +/- 3.3	28.9 +/- 4.1	42.3 +/- 4.6
<b>VM-1</b>	>50	>50	>50	>50	31.8 +/- 0.5	>50
<b>MCF7</b>	>50	>50	>50	32.1 +/- 7.4	39.4 +/- 3.4	39.6 +/- 4.5

Como se puede ver en la **Tabla 8**, mientras los ligandos **L8-L10** no son activos (con excepción de **L9** que muestra algo de actividad frente a U2OS), los metalociclos **M8-M10** reducen significativamente la viabilidad celular en la mayoría de los modelos celulares estudiados, con valores de  $IC_{50}$  en el rango de  $\sim 32$  a  $45 \mu M$ . Cabe destacar que el metalociclo de tamaño intermedio, **M9**, es el más activo contra U2OS, siendo el único metalociclo de platino activo contra la línea celular VM-1.

A continuación se investigó el impacto de los ligandos y los metalociclos en la progresión del ciclo celular. Los resultados mostraron que la exposición de las células cancerosas analizadas a los ligandos (**L8**, **L9** y **L10**) durante 48 horas no tiene un impacto pronunciado en la progresión de su ciclo celular. Sin embargo, el metalociclo **M10** (25  $\mu\text{M}$ ) produce una detención significativa de G0-G1 en células MCF-7, mientras que el metalociclo **M9** (25  $\mu\text{M}$ ) produce un aumento distinto de la fase G2-M en el modelo de melanoma; ambos resultados consistentes con mecanismos de daño del ADN en ambas líneas. Derivado del tratamiento con el metalociclo **M9**, se observó además, la inducción de muerte celular en células de melanoma VM-1, indicado por un aumento en la cantidad de células que se localizan en la fracción del ciclo sub-G0-G1.

Por último, se comprobó el efecto de los metalociclos en la expresión oncogénica de c-Kit1, h-TERT y Bcl2, empleando la técnica qRT-PCR (**Apéndice AIII1**). Al comparar los resultados de los metalociclos usando los de los ligandos como control, se corroboró como el metalociclo de mayor tamaño, **M10**, reduce significativamente los niveles de expresión de los tres oncogenes tras 24 horas de exposición, siendo particularmente activo en la expresión de h-TERT. El metalociclo de tamaño intermedio, **M9**, reduce los niveles de expresión de h-TERT y c-Kit1, pero también su respectivo ligando, **L9**, produce los mismos resultados, indicando, junto con el ensayo de MTT y los resultados del ciclo celular, un posible mecanismo de acción diferente al de **M8** y **M10**. Por su parte, el metalociclo más pequeño, **M8**, produce un efecto selectivo en la expresión de c-Kit1, siendo su ligando inactivo. Este último resultado está en buen acuerdo con los datos obtenidos espectroscópicamente, lo que sugiere que el metalociclo más pequeño tiene menos afinidad, pero más selectividad, por una particular topología de ADN cuádruple.

### 3.4.5 Ensayos celulares con el ligando **L13** y el metalociclo **M13**

El buen perfil de potencia y selectividad observado en la interacción del metalociclo **M13** con el ADN doble y cuádruple (ver sección 4.4.3), además de sus excelentes propiedades de absorción emisión (ver secciones 4.4.3.6-4.4.3.9), hicieron que este compuesto fuese elegido para la realización de una serie de ensayos biológicos, ensayos encaminados no sólo a la determinación de su citotoxicidad *in vitro*, si no a la observación de su perfil de localización celular, con la vista puesta en un mejor entendimiento del mecanismo de acción a nivel celular de los diversos metalociclos desarrollados por el grupo de investigación.

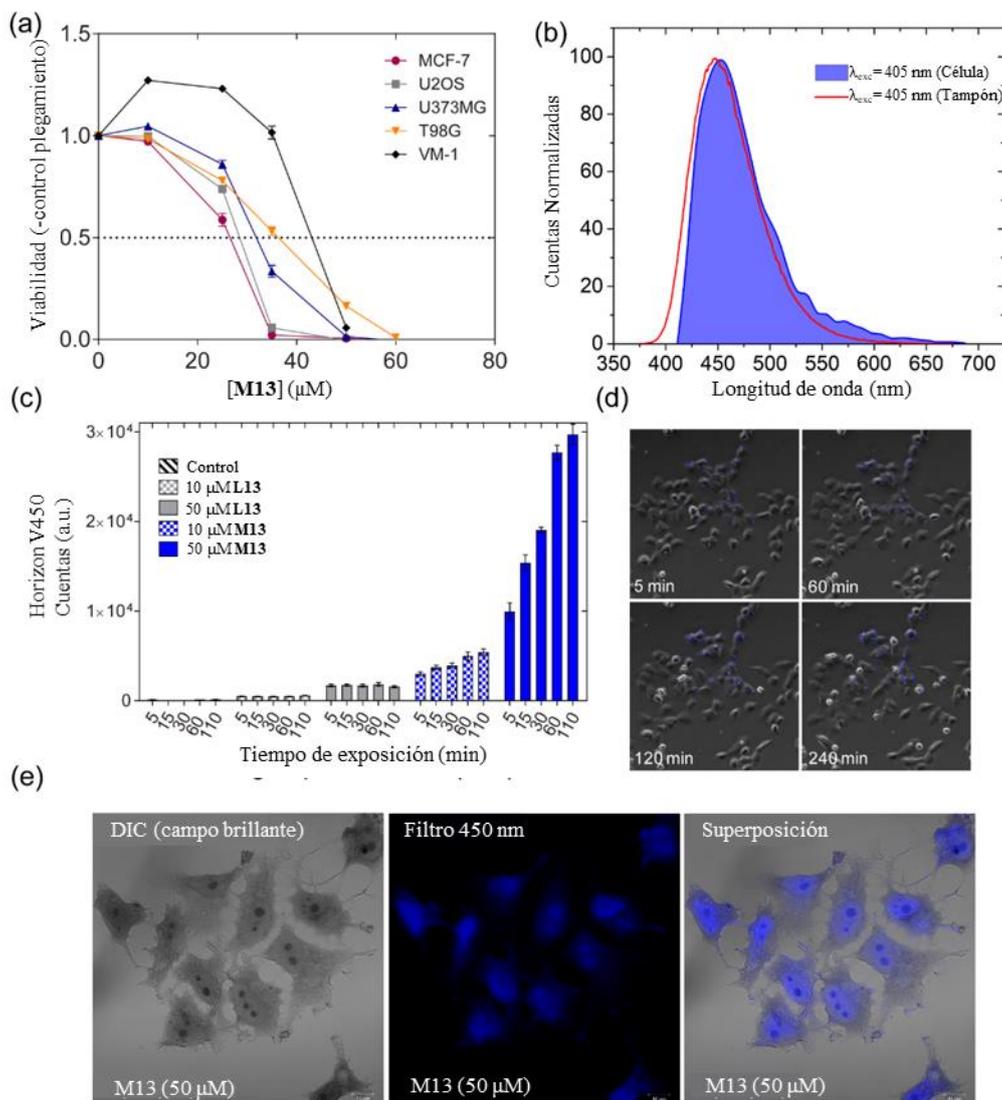
Así, en primer lugar, se llevaron a cabo ensayos MTT con dicho compuesto, evaluándose la citotoxicidad de **M13** en células humanas derivadas de diferentes orígenes primarios incluyendo cáncer de pulmón, osteosarcoma, melanoma y glioblastoma (MCF-7, U2OS, VM-1, U373MG y T98G, respectivamente).

Los resultados mostraron que el metalociclo exhibe similares efectos en todas las líneas celulares cancerígenas estudiadas, después de 72 horas de incubación, mostrando valores de  $IC_{50}$  en el rango de 30-45  $\mu$ M. De todas las líneas analizadas, se observó que las correspondientes a MCF-7 y U2OS son las que presentan mayor sensibilidad al compuesto **M13** (**Figura 85c**). Los resultados del ensayo de MTT están en buen acuerdo con la baja citotoxicidad general de los metalociclos de platino de tipo  $M_2L_2$  cuadrangulares comentados en la anterior sección así como con los resultados obtenidos para metalociclos de platino similares publicados por Olenyuk.<sup>134</sup> En general, la baja citotoxicidad de los metalociclos de platino se pone de manifiesto al comparar sus resultados con los obtenidos por el compuesto de referencia, el cisplatino, ( $IC_{50}$  en torno a 5  $\mu$ M). El ligando **L13** sigue el mismo comportamiento que su metalociclo derivado **M13**, siendo significativamente menos activo (**Apéndice AIII2**).

A la vista de los resultados de MTT, se decide estudiar también la sensibilidad de MCF-7 y U2OS al metalociclo **M13** a través de ensayos clonogénicos, seleccionando un largo tiempo de incubación (7 días). Ambas líneas celulares mostraron la formación de la colonia dañada tras la incubación con el metalociclo **M13** a la concentración 15-20  $\mu$ M (**Anexo AIII3**). La línea U2OS experimento un impacto más fuerte que la línea MCF-7 al largo tratamiento con el metalociclo (15  $\mu$ M frente 20  $\mu$ M, respectivamente). Sin embargo, el análisis de la distribución del ciclo celular reveló que, después de 24 horas de incubación, solo en las células MCF-7 había una dosis significativa de células acumuladas en la fase G0-G1, mientras que en las células de U2OS no se observaron cambios apreciables (**Apéndice AIII4**).

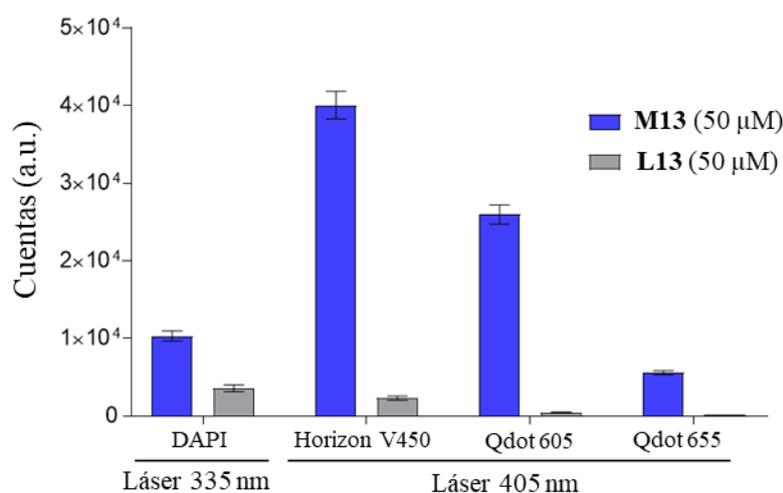
Una vez evaluada la actividad biológica del metalociclo, se estudió su capacidad emisiva bajo condiciones celulares. Los estudios se llevaron a cabo a través de microscopía confocal de barrido láser (LSM), la cual, constituye una técnica muy útil para evaluar la emisión característica de un fluoróforo en la célula. El tratamiento del metalociclo con las células MCF-7 reveló una notable señal de fluorescencia en el rango de 420-518 nm después de la excitación con un láser de 405 nm (**Figura 85b** y **Apéndice AIII5**), siendo posible superponer la banda obtenida a la banda de emisión en condiciones

libres del entorno celular usando un espectrofluorómetro normal (**Figura 85b**). Tras la excitación con otros láseres, no se detectaron señales de emisión distintas a la ya comentada.



**Figura 85:** a) Análisis por ensayos de MTT de la viabilidad celular en diversas líneas durante su exposición (72 horas) a concentraciones crecientes de **M13** (50  $\mu\text{M}$ ). La línea punteada se refiere al 50% de la viabilidad celular e indica el IC<sub>50</sub>. Cada punto de datos representa la media  $\pm$ SD de las tres repeticiones realizadas para cada experimento representativo, b) Comparación entre el espectro de emisión de **M13** en células MCF-7 obtenido con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 tras excitar con un láser de 405 nm (área en azul), y el espectro de **M13** empleando un tampón sin células adquirido en un espectrofluorómetro normal tras la excitación a 350 nm, c) Análisis de citometría de flujo de células de U2OS tratadas con el tiempo con 10 o 50  $\mu\text{M}$  de **L13** (gris) y **M13** (azul) utilizando el láser de 405 nm y el filtro 450/50 (Horizon V450), d) Microscopía en células vivas que muestra la acumulación intracelular con el tiempo de **M13** dentro de las células U2OS ( $\lambda = 395/25 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 460/50 \text{ nm}$ ) y e) Células MCF-7 fijadas con PFA e incubadas durante 30 minutos con 50  $\mu\text{M}$  de **M13** y finalmente analizadas con microscopía confocal usando el láser de 405 nm y un objetivo de 63x con aceite de inmersión.

Los análisis de células activadas por fluorescencia (FACS) en la línea U2OS tratada con el metalociclo **M13** confirmaron los resultados obtenidos por LSM. El metalociclo **M13** dio lugar a una señal de fluorescencia considerable en la parte azul del espectro (filtro de 450/50 nm, Horizon V450 y canales DAPI), que se excita con los láseres de 405 o 355 nm (**Figura 85b y 86**). Además, solo cuando se usó un láser de 405 nm, se detectaron señales de fluorescencia en la porción roja del espectro usando los filtros de 605/12 nm y 655/8 nm (Qdot605 y Qdot655 respectivamente). Cabe mencionar que tanto en el ensayo LSM como en los experimentos FACS, la emisión del ligando **L13** fue considerablemente menor a la del metalociclo **M13**. El análisis FACS, por ejemplo, reveló una reducción drástica de fluorescencia de aproximadamente 85% para **L13** cuando se usó el láser de 405 nm. Este resultado es sorprendente teniendo en cuenta que, en una solución libre de células, el rendimiento cuántico del ligando **L13** es muy superior a **M13**, lo que sugiere un tráfico dinámico diferente dentro de las células entre los dos compuestos (**Figura 86**).



**Figura 86:** Intensidad de fluorescencia en células U2SO tras la exposición durante 1 hora a **M13** (azul) y su ligando **L13** (gris), ambos a concentración 50 μM. Las señales de emisión se detectaron después de la excitación con el láser de 355 nm en el canal del DAPI y después de la excitación con el láser de 405 nm en los canales del Horizon V450, Qdot 605 y Qdot 655.

Además, el análisis citométrico de flujo de las células U2OS tratadas con **M13**, reveló una considerable acumulación del compuesto en la primera hora de incubación. Sin embargo, para el ligando **L13** no se observó un aumento de la intensidad de fluorescencia independientemente de cual fuese el tiempo de incubación y la dosis aplicada (**Figura 85c**).

Para confirmar estas observaciones, se llevaron a cabo imágenes de células vivas con el fin de investigar la dinámica de distribución intracelular de los compuestos. La exposición a **M13** a concentración 35  $\mu\text{M}$ , reveló un incremento de la fluorescencia con el tiempo, (**Figura 85d**) lo que corrobora muy bien los resultados de FACS. Por otro lado, la emisión del ligando estaba por debajo del límite de detección del instrumento y no se pudo seguir usando esta técnica (**Apéndice AIII7**). Así, el distinto comportamiento emisor del ligando y de su metalociclo permite descartar una posible descomposición del metalociclo dentro de la célula.

Finalmente, y con el fin de obtener una mejor resolución, se estudió la distribución del fármaco dentro de las células mediante microscopía láser de barrido confocal (CLSM). Las células U2OS y MCF-7, fijadas con paraformaldehído (PFA), fueron incubadas con **M13** (**Figura 85e**). Las micrografías confocales obtenidas utilizando el láser a 405 nm revelaron una buena tinción de todo el núcleo, confirmando que el ADN es el objetivo al que se adhiere el metalociclo. Curiosamente, las imágenes adquiridas en el campo brillante utilizando el modo DIC de luz transmitida revelaron una fuerte mejora del contraste de los núcleos y una buena tinción de las subestructuras tipo nucléolos. Este efecto es independiente del método de fijación (**Apéndice AIII8**). Es necesario mencionar que el efecto de enriquecimiento de contraste no estaba presente cuando las células se incubaron con el ligando **L13** y DAPI, observándose una tinción de ADN nuclear convencional (**Apéndice AIII9**). Además, las señales de fluorescencia de **L13** eran apenas visibles, como ya se esperaba a partir del análisis previo en células vivas.

De acuerdo con los estudios realizados en disolución, el metalociclo de platino **M13** interactúa preferentemente con las estructuras de ADN cuádruple frente al ADN de doble hélice. Además, a través de microscopía confocal con células vivas, se demostró que el **M13** va al núcleo de las células cancerosas generando una fluorescencia azul similar a DAPI. Para tener una primera pista sobre la posible interacción de **M13** con el ADN de estructura cuádruple en las células, se supuso que al aumentar el número de estructuras cuádruples disponibles, empleando un estabilizador conocido de ADN cuádruple, se produciría un aumento de esta fluorescencia azul. Para corroborarlo, las células VM-47 se trataron previamente durante 24 h con la porfirina TMPyP4 y luego se fijaron e incubaron con **M13**. Los análisis citométricos de flujo posteriores revelaron un aumento de la fluorescencia azul del 29% confirmando la hipótesis (**Apéndice AIII10**). El mismo efecto se produjo cuando las células se incubaron con TMPyP4 y el metalociclo

**M13** simultáneamente y sin la posterior fijación. El tiempo extra de análisis FACS reveló que, después de 60 minutos, la fluorescencia azul sobrepasa la fluorescencia roja producida por la porfirina (**Apéndice AIII10**), lo que sugiere que el metalociclo de platino actúa como un competidor de la porfirina TMPyP4. Este resultado también se confirmó mediante imágenes en células vivas.

A la vista de los prometedores resultados obtenidos tanto en disolución como en las células se planteó la posibilidad de que la distribución celular con el metalociclo **M13** pudiera verse influenciada por la presencia de estructuras de ADN cuádruple. Por ello, se realizaron una serie de estudios de inmunofluorescencia usando el anticuerpo específico de ADN cuádruple BG4, el cual permite la visualización directa de estructuras cuádruples (ADN y ARN) en células humanas.<sup>135</sup>

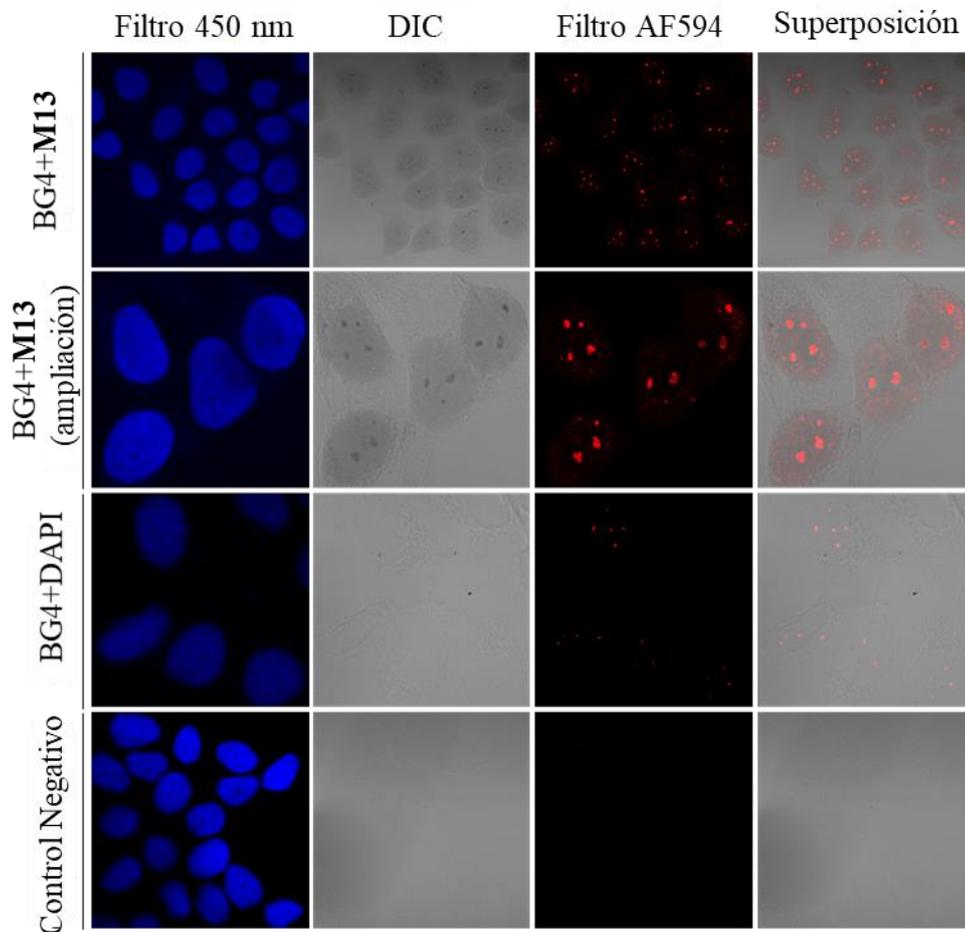
De este modo, las células U2OS se fijaron con MeAc, se incubaron primero con BG4 y luego se trataron con el metalociclo **M13**. Las imágenes confocales mostraron claramente que el metalociclo se coloca en las mismas zonas celulares que el anticuerpo específico de ADN cuádruple BG4 (**Figura 87**). Tal y como se ha comentado anteriormente, el metalociclo marcó el núcleo completo con una fluorescencia azul y las estructuras nucleares teñidas en el canal DIC. El anticuerpo BG4 proporcionó señales rojas en el filtro AF594 exactamente en los mismos puntos, lo que indica que ambas moléculas tienen el mismo objetivo nuclear. Se sabe que la acumulación de BG4 depende del método de fijación utilizado, publicándose recientemente que cuando se usa MeOH para la fijación, como en este caso, el anticuerpo marca las estructuras de los nucléolos, lo que finalmente sugiere que el metalociclo **M13** se dirige realmente a estas estructuras subnucleares. Este resultado es consistente con el hecho de que el nucléolo es particularmente rico en secuencias que forman ADN cuádruple, y al conocido hecho de que otros estabilizadores de ADN cuádruple se localizan dentro de estos orgánulos nucleares.<sup>136</sup> Además, cabe mencionar que se cree que el Quarfloxin (CX) -3543), uno de

---

<sup>135</sup> a) Biffi, G.; Tannahill, D.; McCafferty, J.; Balasubramanian, S. *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 182; b) Biffi, G.; Di Antonio, M.; Tannahill, D.; Balasubramanian, S. *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 75.

<sup>136</sup> a) Laguerre, A.; Wong, J. M.; Monchaud, D. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1; b) Rodriguez, R.; Miller, K. M.; Forment, J. V.; Bradshaw, C. R.; Nikan, M.; Britton, S.; Oelschlaegel, T.; Xhemalce, B.; Balasubramanian, S.; Jackson, S. P. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 301; c) Lefebvre, J.; Guetta, C.; Poyer, F.; Mahuteau-Betzer, F.; Teulade-Fichou, M. P. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2017**, *56*, 11365; d) Doria, F.; Nadai, M.; Zuffo, M.; Perrone, R.; Freccero, M.; Richter, S. N. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 2268.

los dos aglutinantes de estructuras cuádruples en ensayos clínicos, ejerce su actividad anticancerígena mediante su acumulación en los nucléolos.<sup>137</sup>



**Figura 87:** Imágenes confocales representativas de tinción de inmunofluorescencia con BG4 (rojo) en células U2OS fijadas MeAc, contratintadas con el metalociclo **M13** (azul).

Adicionalmente se repitió el experimento cambiando el orden de incubación. Cuando las células U2OS fijadas a MeAc se incubaron primero con el metalociclo **M13** y luego con el anticuerpo, el análisis de microscopía confocal reveló una pérdida de tinción de BG4 en los nucléolos (**Apéndice AIII11**). Las micrografías con brillo y contraste corregidos revelaron, en cambio, una débil tinción general del citoplasma. El resultado fue el mismo cuando las células se trataron previamente con el metalociclo, a continuación se fijaron, y finalmente se marcaron con BG4 (**Apéndice AIII11**). Estos experimentos sugieren que el metalociclo **M13**, una vez dentro del nucléolo, detiene la

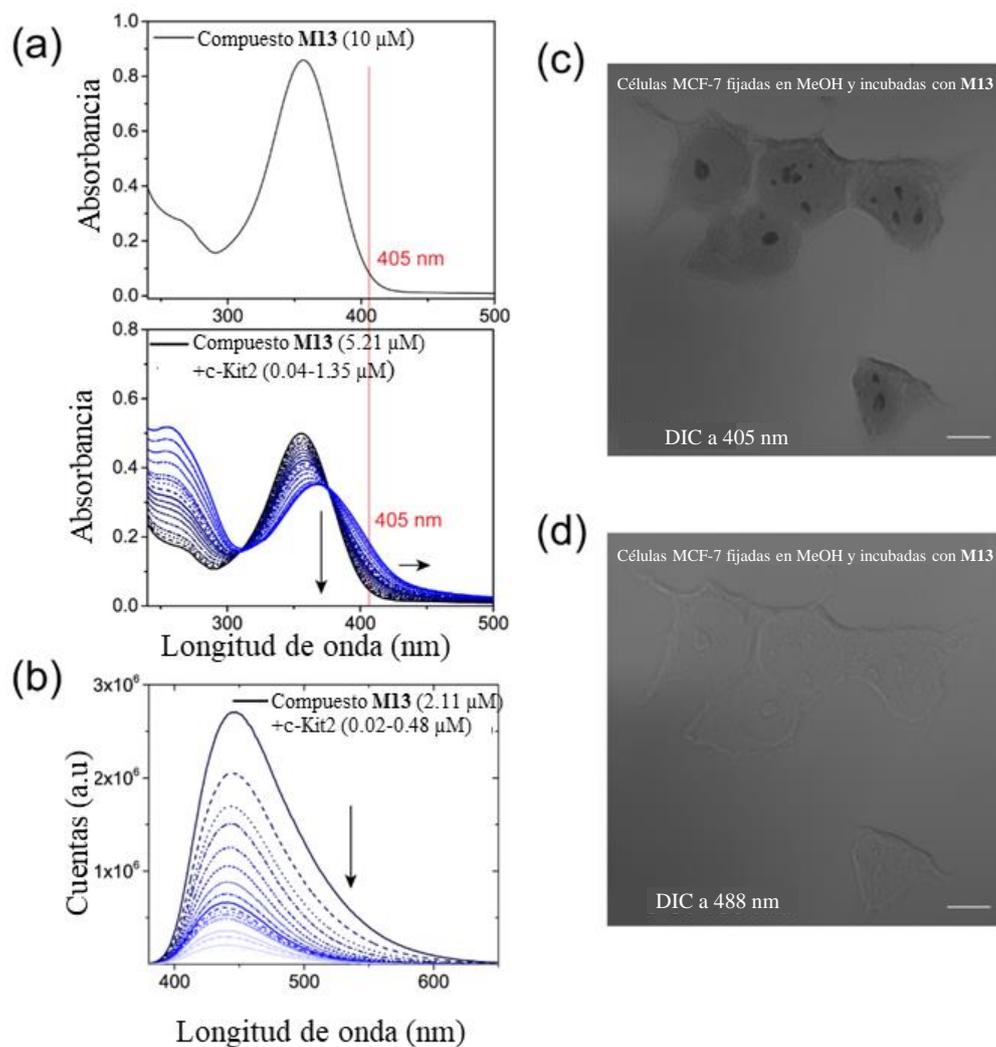
<sup>137</sup> Drygin, D.; Siddiqui-Jain, A.; O'Brien, S.; Schwaebe, M.; Lin, A.; Bliesath, J.; HO, C. B.; Proffitt, C.; Trent, K.; Whitten, J. P.; Lim, J. K.; Von Hoff, D.; Anderes, K.; Rice, W. G. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 7653.

entrada de BG4 y el reconocimiento de su epítipo, actuando como un competidor del anticuerpo.

Como se ha comentado brevemente, además de su co-localización con el anticuerpo específico BG4 y de sus propiedades emisivas tanto en solución como en células, el metalociclo **M13** demostró la capacidad de proporcionar imágenes bien contrastadas de las células configurando el microscopio confocal en luz transmitida modo DIC. El canal de campo brillante a menudo se ignora en los estudios de acumulación de fármacos y el uso de etiquetas fluorescentes predomina en el campo por varias razones (contraste pobre, localización difícil de los bordes de las células, núcleos débiles, etc.).<sup>138</sup> Sin embargo, en este caso, se logró la tinción significativa del nucléolo, "tinción negra" proporcionada por el metalociclo, que resultó ser fácilmente reproducible e independiente del método de fijación.

---

<sup>138</sup> Selinummi, J.; Ruusuvuori, P.; Podolsky, I.; Ozinsky, A.; Gold, E.; Yli-Harja, O.; Aderem, A.; Schmulevich, I. *PLoS One*, **2009**, *4*, 7947.



**Figura 88:** a) Espectro de absorción UV-VIS de **M13** a 10 $\mu$ M y de **M13** con el oligonucleótido c-Kit2; b) Espectros de fluorescencia resultantes de la adición al metalociclo **M13** de cantidades crecientes del oligonucleótido c-Kit2 y por último imágenes de campo brillante de células MCF-7 fijadas con MeOH incubadas con **M13** adquiridas usando el modo DIC de luz transmitida con el láser c) 405 nm y d) 488 nm.

En un intento de racionalizar el resultado observado, se propuso que la tinción de los nucléolos podría surgir de la absorción o refracción (o ambas) de la luz láser por acumulación del metalociclo **M13** dentro de las estructuras sub-nucleares. Curiosamente, las células MCF-7 fijadas con MeOH incubadas con el metalociclo mostraron tinción de nucléolos en el campo brillante solo con el láser de 405 nm y no, por ejemplo, con el de 488 nm, donde el contorno celular era visible en el microscopio DIC (**Figura 88c,d**). El espectro UV-Vis del metalociclo presentó una banda centrada a 355 nm con una cola que termina a alrededor de 430 nm (**Figura 88a**). Además, la absorbancia a 405 nm aumenta significativamente cuando se añadieron alícuotas de cuádruple paralelo plegado previamente (**Figura 88a**). Estas consideraciones sugieren consistentemente que la

tinción negra podría producirse por absorción del metalociclo **M13** unido a estructuras de ADN cuádruple.

Adicionalmente, se probó a llevar a cabo el experimento empleando el metalociclo **M6b** de la librería. En este caso la tinción con nucléolos no fue visible en células fijas MCF-7 debido a su transparencia a 405 nm (**Anexo AIII12**).

La batería de pruebas realizadas sugiere que la tinción negra se produce por la absorción del metalociclo **M13** al interactuar con las estructuras cuádruples situadas en el nucléolo, lo cual lleva asociado una fuerte destrucción de la fluorescencia del metalociclo tal y como se demostró espectroscópicamente (**Figura 88b**).



## 4. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado una nueva estrategia sintética que ha permitido la obtención con mejores rendimientos de los ligandos ditópicos **L1**, **L2** y **L3** previamente publicados por el grupo de investigación, al evitar los procesos de la polialquilación que presentaba la anterior ruta.

2. Se han sintetizado nuevos ligandos ditópicos (**L4**, **L5**, **L6** y **L7**) con diferente tamaño y funcionalización empleando la nueva ruta diseñada. El ensamblaje de los nuevos ligandos en torno a centros metálicos planocuartados de Pd(II) y Pt(II) ha conducido a la formación de un sistema constitucionalmente dinámico constituido por los correspondientes metalociclo mononuclear **M<sub>1</sub>L<sub>1</sub>** y dinuclear **M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>**.

3. Se ha estudiado el proceso de especiación a diferentes concentraciones de las estructuras monoméricas y diméricas de Pd(II) formadas. Se ha conseguido dirigir la especiación hacia la formación mayoritaria de una de las dos especies a través de la concentración y la adición de plantillas. Así, a bajas concentraciones se ha conseguido aislar el metalociclo mononuclear (**M4a**, **M5a**, **M6a** y **M7a**) mientras que a altas concentraciones la especie aislada fue el metalociclo dinuclear (**M4ad**, **M5ad** y **M6ad**). La adición de plantillas  $\pi$ -excedentes a una mezcla del monómero y el dímero condujo en todos los casos a la amplificación de la especie monomérica resultando en el correspondiente complejo de inclusión o catenano derivado.

4. Se ha estudiado la interacción de metalociclos **M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** cuadrangulares con diferente tamaño (**M8-M10**), similares en forma al metalociclo de Fujita, con el ADN de doble hélice y con el ADN cuádruple mediante diferentes técnicas: FRET, espectroscopía UV-vis y dicroísmo circular. Se ha comprobado que a medida que aumenta el tamaño la interacción con el ADN es mayor pero disminuye la selectividad con el ADN cuádruple frente al ADN de doble hélice.

5. Se han llevado a cabo ensayos biológicos en los que se ha observado que los tres metalociclos cuadrangulares estudiados muestran actividad frente a las células cancerígenas y ejercen un gran efecto sobre los genes que se sabe que forman en sus regiones promotoras estructuras cuádruple. El metalociclo más pequeño (**M8**) muestra menos actividad pero mayor selectividad para un cuádruple formado en el gen c-Kit1. Se ha demostrado así que es posible modular la actividad de unión y el efecto in vitro sobre las células cancerosas en función del tamaño de los metalociclos de Pt(II).

6. Se ha estudiado la interacción con el ADN de doble hélice y con el ADN cuádruple de una librería de compuestos con gran diversidad estructural (tamaño, forma, carga, distribución de carga, número de centros metálicos y funcionalización (**M5b**, **M6b**, **M11-M15**). Los metalociclos que mostraron una mayor selectividad y que resultaron fluorescentes (**M6b**, **M11** y **M13**) fueron sometidos a un estudio espectroscópico más completo.

7. El metalociclo que ofreció un mejor perfil de interacción y que resultó fluorescente (**M13**) fue sometido a posteriores ensayos intracelulares, en los que se observó que el metalociclo se localiza en el nucléolo interaccionando con el ADN cuádruple-G.

8. Los experimentos realizados permitieron descartar la posible degradación del metalociclo **M13** después de la internalización celular.

## CONCLUSIONS

1. A new synthetic strategy has been developed, which has allowed the obtaining of better yields of the ditopic ligands **L1**, **L2** and **L3**, previously published by this research group, by avoiding the processes of polyalkylation that the previous route presented.

2. New ditopic ligands with different size and functionalization have been synthesized using the new designed route. The assembly of the new ligands around flat-square metallic centers of Pd (II) and Pt (II) has led to the formation of a constitutionally dynamic system constituted by the corresponding mononuclear metallacycle **M<sub>1</sub>L<sub>1</sub>** and dinuclear **M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>**.

3. The speciation process has been studied at different concentrations of the formed monomeric and dimeric structures. It has managed to direct the speciation towards the majority formation of one of the two species through concentration and the addition of templates. Thus, at low concentrations, it has been possible to isolate the mononuclear metallacycle, whereas at high concentrations the isolated species was the dinuclear metallacycle. The addition of  $\pi$ -surplus templates to a mixture of the monomer and the dimer led in all cases to the amplification of the monomeric species, which resulted in the corresponding inclusion complex or catenane derivative.

4. The interaction of quadrangular **M<sub>2</sub>L<sub>2</sub>** metallocycles with different size, similar in shape to the Fujita metallocycle, with double helix DNA and with quadruple DNA has been studied. We have proved that it is possible to modulate the DNA binding activity and the in vitro effect on cancer cells of Pt supramolecular architectures according to their sizes and shapes. We are currently using our self-assembly strategy to build a wide serie of novel Pt compounds for the fine-tuning of affinities and selectivity towards specific G-quadruplex structures.

5. Biological assays have been carried out. Through them, it has been observed that the three quadrangular metallacycles studied show activity against the cancer cells and exert a great effect on the genes that are known to form quadruple structures in their promoter regions. The smallest metallacycle (**M8**) shows less activity but higher selectivity for a quadruple formed in the cKit1 gene. It has thus been demonstrated that it is possible to modulate the binding activity and the in vitro effect on the cancer cells according to the size of the Pt (II) metallacycles.

6. The interaction with double-helical DNA and with quadruple DNA from a serie of compounds with different size, shape, charge, charge distribution, number of metal centers and functionalization (**M5b**, **M6b**, **M11-M15**) has been studied. The metallacycles that showed the highest selectivity and that were fluorescent (**M6b**, **M11** and **M13**) were subjected to a more complete spectroscopic study.

7. The metallacycle that offered a better fluorescence profile (**M13**) biological assays was subjected to intracellular assays, in which it was observed that the metallacycle is located in the nucleolus interacting with the quadruplex DNA.

8. The experiments carried out allowed to rule out the possible degradation of the metallacycle **M13** metallacycle after the cellular internalization.

## 4.1 Publicaciones

“Self-assembly of Pd<sub>2</sub>L<sub>2</sub> Metallacycles Owning Diversely Functionalized Racemic Ligands” T. Rama, C. Alvariño, O. Domarco, C. Platas-Iglesias, V. Blanco, M. D. García, C. Peinador y J. M. Quintela. *Inorg. Chem.*, **2016**, 55, 2290-2298

“Self-assembled Pt<sub>2</sub>L<sub>2</sub> boxes strongly bind G-quadruplex DNA influence gene expression in cancer cells”. Olaya Domarco, D. Lötsch, J. Schreiber, C. Dinhof, S. Van Schoonhoven Marcos D. García, Carlos Peinador, Bernhard Keppler, Walter Berger y Alessio Terenzi. *Dalton Trans.* **2017**, 46, 329. **Cover**

“Synthesis of non-symmetric viologin-containing ditopic ligands and their Pd (II)/Pt (II)-directed self-assembly”. Olaya Domarco, Iago Neira, Tamara Rama, Arturo Blanco-Gómez, Marcos D. García, Carlos Peinador y José M. Quintela. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 3594. **Cover and Hot Article.**

“Self-assembly of dinuclear Pd(II)/Pt(II) metallacyclic receptors incorporating N-heterocyclic carbene complexes as corners”. Ismael Marcos, Olaya Domarco, Carlos Peinador, Alberto Fernández, Jesús José Fernández Sánchez, Digna Vázquez García y Marcos D. García. *Dalton Trans.*, **2017**, 46, 4182. **Front cover.**

“Amplification of a metallacyclic receptor out of a dynamic combinatorial library”. Arturo Blanco, Tamara Rama, Olaya Domarco, Iago Neira, Víctor Blanco, José M. López Quintela, Marcos D. García Romero y Carlos Peinador. *Dalton Trans.* **2017**, 46, 15671.

“Integrative Self-Sorting of Bipyridinium/Dizapyrenium-Based Ligands Into Pseudo[1]rotaxanes”. Tamara Rama, Arturo Blanco, Iago Neira, Olaya Domarco, Marcos D. García Romero, José M. Quintela López y Carlos Peinador. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 16743.

Subcellular G-quadruplex interaction profiling by a semihexagonal Pt(II) metallacycle. Olaya Domarco, Claudia Kieler, Christine Pirker, Carina Dinhof, Bernhard Englinger, Johannes M. Reisecker, Gerald Timelthaler, Marcos D. García, Carlos Peinador, Bernhard K. Keppler, Walter Berger and Alessio Terenzi. **Submitted.**

## 4.2 Estancias de investigación

Nacionales: Estancia en la facultad de Farmacia de Alcalá de Henares bajo la supervisión de Lourdes Gude Rodríguez

Internacionales: Estancia en el Instituto de Inorgánica de la Universidad de Austria bajo la supervisión de Bernhard Keppler.

### 4.3 Comunicaciones a Congresos

10th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (10-ISMSC), Palais des Congrès Place de Bordeaux, Estrasburgo, Francia, 28 junio al 2 de julio de 2015. *Catenation in aqueous media using a self-assembled Pd (II) metallacycle receptor. Complexation in aqueous media using a self-assembled Pd (II) metallacycle receptor. Self-assembly of Pd (II)/ Pt (II) metallacyclic receptors owning isomeric anthracenesubunits. An adaptative [4]pseudorotaxane-based system.*

XXXV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química. A Coruña, España, 19-23 de julio de 2015. Comunicación póster: *Nueva estrategia sintética para la obtención de metalociclos mononucleares funcionalizados de Pd (II) y Pt (II). Modulación de la fluorescencia en estado sólido en 7-aril-4-feni-1,8-naftiridinas. Síntesis de metalociclos de Pd (II) y Pt (II) Funcionalizados.*

13th European Biological Inorganic Chemistry Conference. Budapest, Hungría, del 28 de Agosto al 1 de Septiembre de 2016. Comunicación oral: *“Platinum(II) supramolecular square boxes able to bind G-quadruplex structures”*.

14th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry. Toulouse Francia, del 7 al 10 de Junio de 2017. Comunicación oral: *“Fluorescent mono- and bis-platinum(II) boxes binding G-quadruplex motifs”*.

2<sup>nd</sup> Biennial Young Researchers Workshop on Biomaterials and Applications (bioMAP17). Santiago de Compostela, del 27 al 28 de Abril 2017. *A library of Pt(II)-based metallocycles that bind G-quadruplex motifs.*

12 th International Symposium on Macrocyclic and Supramolecular Chemistry (ISMSC) in conjunction with ISACS: Challenges in Organic Materials & Supramolecular Chemistry. Cambridge, UK, del 2 al 6 de Julio de 2017. Comunicación poster: *Pt II-boxes bind G4 motifs and influence gene expression in cancer cells. Synthesis and self-assembly of non-symmetric viologen containing ditopic ligands. Integrative Self-sorting of Bipyridinium/Diazapyrenium-Based ligands into Scorpionand-Shaped Supramolecules. Amplification of a metallacyclic receptor out of a dynamic combinatorial library.*

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### *Parte Experimental I. Síntesis*

#### 5.1 General.

Los reactivos comerciales se emplearon sin necesidad de purificación adicional. En los casos necesarios, los disolventes se purificaron según los procedimientos descritos en la bibliografía.<sup>139</sup>

Los espectros de RMN se obtuvieron en espectrómetros Bruker Avance de 500MHz para <sup>1</sup>H y 125MHz para <sup>13</sup>C, Bruker Avance de 400 MHz para <sup>1</sup>H y 100MHz para <sup>13</sup>C, y Bruker Avance 300, de 300 MHz para <sup>1</sup>H y 75MHz para <sup>13</sup>C empleando disolvente deuterado como “lock” y la señal del disolvente protonado como referencia.

Los coeficientes de difusión en los experimentos DOSY en D<sub>2</sub>O fueron referenciados usando el valor  $1.92 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  para la señal de DHO en D<sub>2</sub>O a 298 K.<sup>140</sup>

Los espectros de masas han sido realizados en el equipo Applied Biosystems QSTAR Elite con analizador híbrido LC-Q-q-TOF para ESI de baja y alta resolución.

El ensamblaje de los metalociclos de platino se ha llevado a cabo en un reactor Anton Paar Monowave 300 operando a 2455 MHz en viales sellados de 30ml, 6ml o 1ml provistos de barrita magnética. Las muestras se irradiaron con la potencia apropiada (de 0-850 W) para alcanzar la temperatura de 150° C utilizando el modo de calentamiento “as fast as posible”. La temperatura que alcanza la muestra se controla por radiación infrarroja.

La agitación de las muestras se ha llevado a cabo con energía de ultrasonidos utilizando un equipo de ultrasonidos Branson 2510.

Los complejos de Pd (II)<sup>141</sup> y Pt(II)<sup>142</sup> ((en)M(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>), y el cloruro de *N*-(2,4-dinitrofenil)-4,4'-bipiridinio, **5**,<sup>143</sup> han sido sintetizados de acuerdo a los procedimientos descritos en la bibliografía y su síntesis y pureza ha sido corroborados mediante RMN.

---

<sup>139</sup> Perrin, D. D.; Amarego, W. L. F. *Purification of Laboratory Chemicals*, Pergamon Press, New York, **1998**.

<sup>140</sup> Megyes, T.; Jude, H.; Grósz, T.; Bakó, I.; Radnai, T.; Tárkányi, G.; Pálinkás, G.; Stang, P. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10731.

<sup>141</sup> Drew, H. D. K.; Pinkard, F. W.; Preston, G. H.; Wardlaw, W. J. *Chem. Soc.* **1932**, 1895.

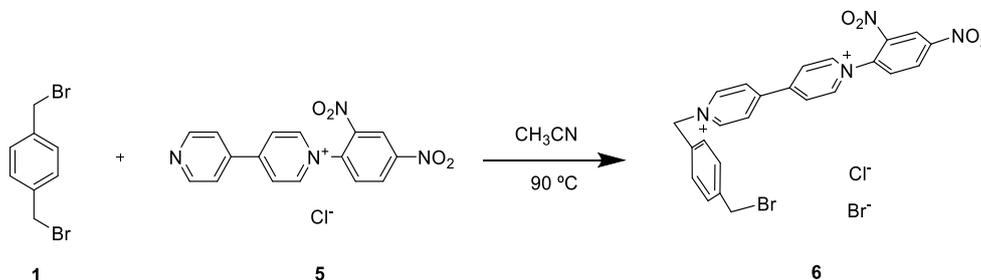
<sup>142</sup> a) Fujita, M.; Yazaki, J.; Ogura, K. *Chem. Lett.* **1991**, 1031; b) Popov, L. V.; Zheligovskaya, N. N.; Grevtsev, A. M.; Kharina, E. A.; Spitsyn, V. I. *Seriya Khimicheskaya.* **1977**, *7*, 1677.

<sup>143</sup> Bongard, D.; Möller, M.; Nagaraja Rao, S.; Corr, D.; Walder, L. *Helv. Chim. Acta.* **2005**, *88*, 3200.

## 5.2 Procedimientos sintéticos

### 5.2.1 Procedimiento experimental para la síntesis de los precursores 6-13

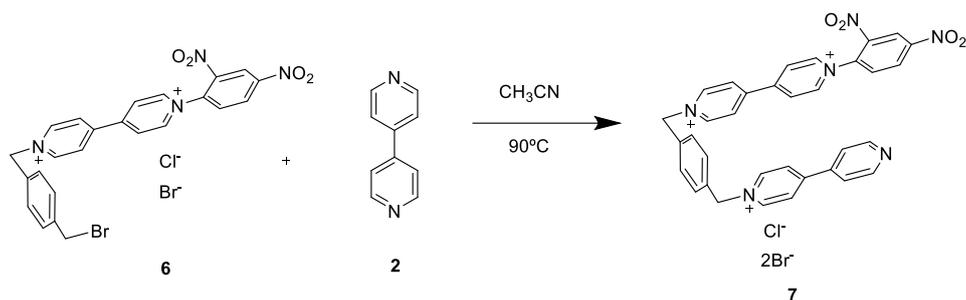
#### Síntesis del compuesto 6



A una disolución de  $\alpha,\alpha'$ -dibromo-*p*-xileno (6,5 g, 24,6 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (200ml) se le adiciona la sal de 4,4'-bipiridinio (1,2 g, 3,3 mmol) y la mezcla se calienta a ebullición durante 18 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, el precipitado amarillo formado se filtra y se lava con  $\text{CH}_3\text{CN}$  para obtener  $\mathbf{6}\cdot\text{Cl}\cdot\text{Br}$  (90%), que se puede utilizar en la siguiente etapa sin necesidad de mayor purificación. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.43 – 9.40 (m, 3H), 9.23 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 8.95 (dd,  $J = 8.7, 2.5$  Hz, 1H), 8.81 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.66 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.30 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.57 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.52 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 4.69 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 153.05 (C), 149.79 (C), 146.55 (CH), 145.65 (CH), 142,76 (C), 142.28 (C), 138.18 (C), 131.37 (C), 131.05 (CH), 130.63 (CH), 129.61 (CH), 128.35 (CH), 127.38 (CH), 127.15 (CH), 122.72 (CH), 64.65 ( $\text{CH}_2$ ), 63.23 ( $\text{CH}_2$ ).

A una disolución de  $\mathbf{6}\cdot\text{Cl}\cdot\text{Br}$  (9.5 mg) en agua (2 ml) se le añade exceso de  $\text{KPF}_6$ , formándose un precipitado amarillo que se lava con agua y se seca a vacío para obtener  $\mathbf{6}\cdot 2\text{PF}_6$ . El compuesto obtenido presenta datos espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ ) en buen acuerdo con la muestra  $\mathbf{6}\cdot\text{Cl}\cdot\text{Br}$  y HR-ESI-MS ( $m/z$ ) calc. para  $[\text{M}\cdot\text{PF}_6]^+$  651.0226, enc. 651.0220.

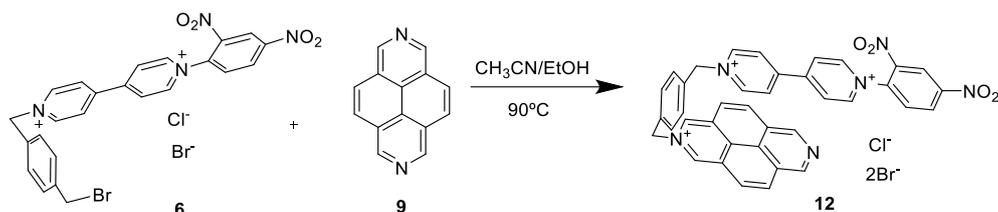
## Síntesis del compuesto 7



A una disolución de **6**·Cl·Br (1,3 g, 2,08 mmol) en una mezcla CH<sub>3</sub>CN/EtOH (85:15, 300ml) se le adiciona 4,4'-bipiridina (391 mg, 2,50 mmol), y se calienta a ebullición durante 18 horas. Tras enfriar, se elimina el disolvente bajo presión reducida y se suspende en acetonitrilo. La suspensión se filtra y se lava con abundante CH<sub>3</sub>CN (75ml) para obtener un sólido de color naranja **7**·Cl·2Br (93%), que se puede utilizar en la siguiente etapa sin necesidad de purificación adicional. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.43 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 9.41 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 9.26 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 9.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 9.03 – 8.98 (m, 2H), 8.96 (dd, *J* = 8.9, 2.4 Hz, 1H), 8.84 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.70 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.55 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H), 8.47 – 8.40 (m, 2H), 8.32 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.67 (d, *J* = 3.2 Hz, 4H), 6.04 (s, 2H), 6.00 (s, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 152.96 (C), 151.82 (C), 151.38 (C), 143.35 (CH), 142.76 (CH), 138.19 (C), 134.22 (C), 133.93 (C), 131.11 (CH), 130.67 (CH), 130.40 (CH), 130.29 (CH), 129.64 (CH), 127,56 (CH), 127.22 (CH), 127.07 (CH), 125.67 (CH), 125.52 (CH), 122.72 (CH), 64.27 (CH<sub>2</sub>), 63.97(CH<sub>2</sub>).

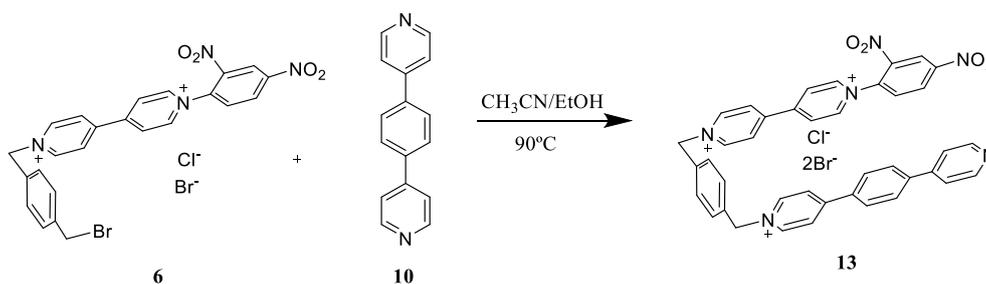
A una disolución de **7**·Cl·2Br (10.2 mg) en agua (1.5 ml) se le añade exceso de KPF<sub>6</sub>, formándose un precipitado amarillo que se lava con agua y se seca a vacío para obtener **7**·3PF<sub>6</sub>. HR-ESI-MS (*m/z*) calc. para [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 873.1371, enc. 873.1348.

### Síntesis del compuesto 12



A una disolución de **6**·Cl·Br (117 mg, 0.19 mmol) en una mezcla CH<sub>3</sub>CN/EtOH (85:15, 300ml) se le adiciona una cantidad estequiométrica de diazapireno, y la mezcla se calienta a reflujo durante 56 horas. Tras enfriar, el disolvente se elimina bajo presión reducida y se lava con CH<sub>3</sub>CN (50 ml) para obtener el compuesto **12**·Cl·2Br (83%) como un sólido naranja, que se puede utilizar en la siguiente etapa sin necesidad de purificación adicional. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 10.16 (s, 2H), 9.87 (s, 2H), 9.41 (d, *J* = 3.3 Hz, 2H), 9.40 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 9.23 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.94 (dd, *J* = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 8.83 (d, *J* = 4.0 Hz, 4H), 8.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.66 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.28 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.76 – 7.61 (m, 4H), 6.44 (s, 2H), 6.01 (s, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 152.95 (C), 149.98 (C), 149.76 (C), 146.56 (CH), 145.81 (CH), 145.58 (CH), 141.23 (CH), 138.60 (C), 138.15 (C), 134.64 (C), 134.01 (C), 131.03 (CH), 130.72 (CH), 130.42 (CH), 130.39 (CH), 130.11 (CH), 129.17 (C), 127.51 (CH), 127.10 (CH), 126.2 (CH), 122.72 (CH), 65.78 (CH<sub>2</sub>), 64.26 (CH<sub>2</sub>).

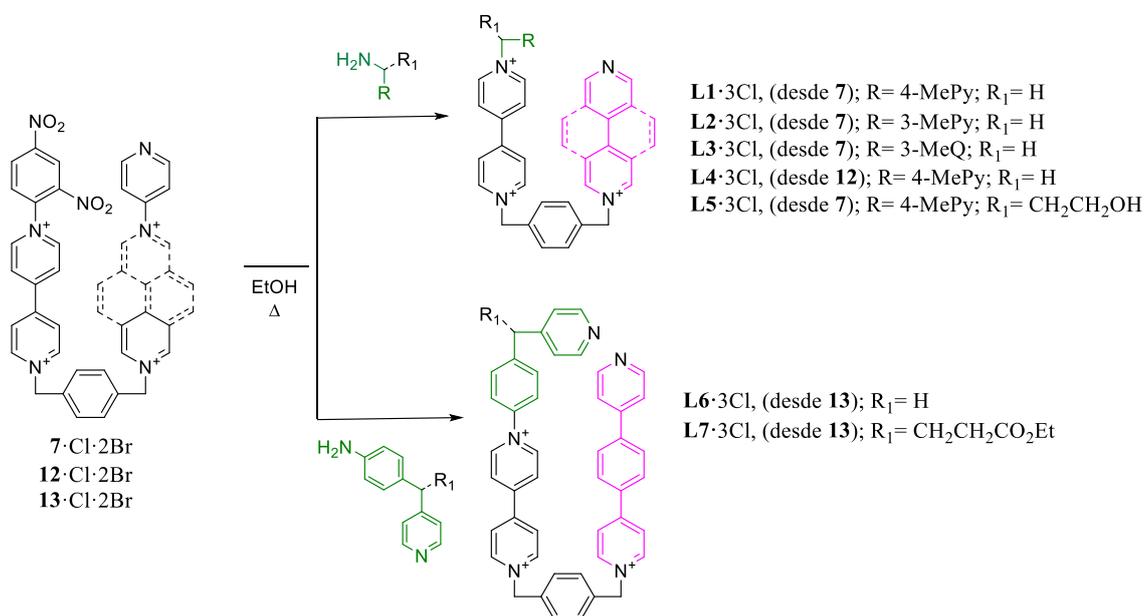
A una disolución de **12**·Cl·2Br (5 mg) en agua (1 ml) se le añade exceso de KPF<sub>6</sub>, formándose un precipitado amarillo que se lava con agua y se seca a vacío para obtener **12**·3PF<sub>6</sub>. HR-ESI-MS (m/z) calc. para [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 873.1371, enc. 873.1348. ESI-MS (m/z): calc. para [M-2PF<sub>6</sub>]<sup>+2</sup> 388.0862; enc. 388.0878.

Síntesis del compuesto **13**

A una disolución del precursor **6** (880 mg, 1,12 mmol) en una mezcla  $\text{CH}_3\text{CN/EtOH}$  (1:1) 130 mL se adiciona el compuesto **10** (313 mg, 1,34 mmol). Se deja agitando a reflujo durante 18 horas. Transcurrido dicho tiempo, se observa la aparición de abundante precipitado de color naranja, el cual, se filtra y se lava con 75 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  para obtener el compuesto **13**·Cl<sup>-</sup>·2Br<sup>-</sup> (89%). RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.39 – 9.34 (m, 3H), 9.19 (m, 2H), 8.92 – 8.87 (m, 2H), 8.76 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.69 (m, 3H), 8.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 8.36 (d, *J* = 6.7 Hz, 1H), 8.24 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 8.11 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.02 (m, 4H), 7.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.94 (s, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 155.70 (C), 152.92 (C), 149.77 (C), 146.57 (CH), 145.76 (CH), 144.48 (CH), 144.29 (CH), 142.74 (C), 139.27 (C), 138.20 (C), 136.92 (C), 134.92 (C), 133.86 (C), 131.06 (CH), 130.65 (CH), 130.31 (CH), 130.00 (CH), 129.12 (C), 128.80 (CH), 128.35 (CH), 127.47 (C), 127.14 (CH), 125.63 (CH), 125.18 (CH), 122.91 (CH), 122.7 (CH), 64.38 (CH<sub>2</sub>), 63.27 (CH<sub>2</sub>) ppm.

A una disolución del compuesto **13**·Cl<sup>-</sup>·2Br<sup>-</sup> (10 mg) en agua (2 ml) se le adiciona exceso de hexafluorofosfato potásico hasta que no se observa más precipitado. El precipitado se filtra y se lava con abundante agua (30 ml) para obtener **13**·PF<sub>6</sub>. Los datos espectroscópicos de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) de **13**·PF<sub>6</sub> están en buen acuerdo con la muestra **13**·Cl<sup>-</sup>·2Br<sup>-</sup>. HR-ESI-MS (*m/z*) calc. para [M+2PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 949.1684, enc. 949.1673.

## 5.2.2 Procedimiento experimental para la síntesis ligandos

Procedimiento general para la síntesis de los ligandos L1-L7·3NO<sub>3</sub>

**Esquema 16:** Ruta sintética para la preparación de los ligandos L1-L7·3Cl a partir de sus correspondientes precursores

La correspondiente sal de dinitrofenilpiridinio **7·Cl·2Br**, **12·Cl·2Br** o **13·Cl·2Br** se disuelve en EtOH, y se le añade la correspondiente amina en las condiciones que se muestran en la **tabla 9**. La reacción se monitoriza mediante TLC hasta que se completa. Una vez que termina, el disolvente se elimina bajo presión reducida y el residuo obtenido se disuelve en agua (20 ml). La fase acuosa se lava con tres porciones de AcOEt (3x10 ml). El residuo obtenido tras evaporar el agua se purifica mediante cromatografía flash (SiO<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>CN, NaCl<sub>aq</sub> (0,6M)/MeOH (4:1:1)). Las fracciones que contienen el ligando se combinan y el disolvente se elimina bajo presión reducida para obtener los ligandos **L1-L7·3Cl**. A continuación para eliminar las sales de cloruro sódico provenientes del eluyente, se añade la mínima cantidad de EtOH necesaria para disolver el ligando como cloruro y se filtra a vacío.

**Tabla 9:** Condiciones sintéticas para la obtención de los ligandos **L1-L7·3Cl**.

<b>L</b>	<b>Condiciones</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>L1·3Cl</b>	1.5 equiv, 1h, T <sup>a</sup> amb.	58%
<b>L2·3Cl</b>	1.5 equiv, 1h, T <sup>a</sup> amb.	55%
<b>L3·3Cl</b>	1.2 equiv, 1h, T <sup>a</sup> amb.	57%
<b>L4·3Cl</b>	1.3 equiv, 3h, T <sup>a</sup> amb	48%
<b>L5·3Cl</b>	1.3 equiv, 1h, T <sup>a</sup> amb	69%
<b>L6·3Cl</b>	1.5 equiv, 16h, reflujo	51%
<b>L7·3Cl</b>	1.3 equiv, 1h, 16h, reflujo	54%

A continuación, se llevan a cabo los cambios de contraíón que permiten obtener el ligando como sal de nitrato puro. Para ello, los ligandos como cloruro se disuelven en la mínima cantidad de agua y se añade hexafluorofosfato hasta que no se observa la formación de más precipitado. Se agita durante 1 hora y posteriormente se filtra a vacío. El sólido resultante se lava con abundante agua para eliminar las sales de  $KPF_6$  en exceso y se redissuelve en acetonitrilo. El disolvente se elimina a presión reducida para obtener los ligandos **L1-L7·3PF<sub>6</sub>**.

#### **Síntesis de L1·3NO<sub>3</sub>**

**L1·3NO<sub>3</sub>**: Sólido amarillento. Los datos espectroscópicos están en buen acuerdo con los publicados anteriormente por el grupo de investigación.<sup>42</sup>

#### **Síntesis de L2·3NO<sub>3</sub>**

**L2·3NO<sub>3</sub>**: Sólido amarillento. Los datos espectroscópicos están en buen acuerdo con los publicados anteriormente por el grupo de investigación.<sup>42</sup>

#### **Síntesis de L3·3NO<sub>3</sub>**

**L3·3NO<sub>3</sub>**: Sólido amarillento. Los datos espectroscópicos están en buen acuerdo con los publicados anteriormente por el grupo de investigación.<sup>90</sup>

**Síntesis de L4·3NO<sub>3</sub>**

**L4·3PF<sub>6</sub>**: Sólido higroscópico anaranjado. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 9.89 (s, 2H), 9.69 (s, 2H), 8.98 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.74 (s, 2H), 8.71 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.54 (m, 2H), 8.45 – 8.38 (m, 2H), 8.34 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.74 – 7.68 (m, 2H), 7.64 – 7.56 (m, 2H), 7.37 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 6.23 (s, 2H), 5.87 (s, 2H), 5.80 (s, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (126 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 151.17 (CH), 150.80 (CH), 150.69 (C), 150.40 (C), 148.33 (CH), 146.09 (CH), 138.29 (CH), 135.40 (C), 135.22 (C), 134.55 (C), 134.11 (C), 131.38 (CH), 130.27 (CH), 130.06 (C), 129.28 (C), 127.60 (CH), 126.32 (CH), 125.96 (C), 125.76 (CH), 123.07 (CH), 121.83 (CH), 65.10 (CH<sub>2</sub>), 64.06 (CH<sub>2</sub>), 63.18 (CH<sub>2</sub>). ESI-MS (m/z): calc. para [M-2PF<sub>6</sub>]<sup>+2</sup> 846.1779; enc. 846.1752.

**L4·3NO<sub>3</sub>**: Sólido higroscópico anaranjado. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.83 (s, 2H), 9.67 (s, 2H), 9.22 – 9.15 (m, 4H), 8.67 – 8.60 (m, 4H), 8.57 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.54 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.64 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.46 (d, *J* = 5.4 Hz, 2H), 6.35 (s, 2H), 6.04 (s, 2H), 5.99 (s, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 151.17 (CH), 150.80 (CH), 150.69 (C), 150.40 (C), 148.33 (CH), 146.09 (CH), 138.29 (CH), 135.40 (C), 135.22 (C), 134.55 (C), 134.11 (C), 131.38 (CH), 130.27 (CH), 130.06 (C), 129.28 (C), 127.60 (CH), 126.32 (CH), 125.96 (C), 125.76 (CH), 123.07 (CH), 121.83 (CH), 65.10 (CH<sub>2</sub>), 64.06 (CH<sub>2</sub>), 63.18 (CH<sub>2</sub>).

**Síntesis de L5·3NO<sub>3</sub>**

**L5·3PF<sub>6</sub>**: Sólido higroscópico anaranjado. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 9.03 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.95 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 8.82 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.70 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.38 (m, 4H), 8.33 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.57 (m, 4H), 7.48 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 5.84 (s, 2H), 5.78 (s, 2H) 3.72 – 3.65 (m, 1H), 3.50 – 3.41 (m, 1H), 2.75 – 2.61 (m, 2H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>CN) δ (ppm): 156.02 (C), 152.30 (CH), 152.24 (C), 151.87 (CH), 151.71 (C), 147.04 (CH), 146.40 (CH), 145.86 (C), 142.68 (C), 136.09 (C), 135.48 (C), 131.66 (CH), 131.49 (CH), 129.11 (CH), 128.96 (CH), 128.92 (CH), 127.71 (CH), 124.12 (CH), 123.32 (CH), 72.97 (CH), 65.36 (CH<sub>2</sub>), 64.74 (CH<sub>2</sub>), 58.17 (CH<sub>2</sub>), 36.30 (CH<sub>2</sub>). ESI-MS (m/z): calc. para [M-PF<sub>6</sub>]<sup>+</sup> 842.2041; enc. 842.2053.

**L5·3NO<sub>3</sub>**: Sólido higroscópico anaranjado. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.30 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 9.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 9.03 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.78 (d, *J* =

6.6 Hz, 2H), 8.66 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 8.59 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.55 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 8.42 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 7.90 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 7.59 (s, 4H), 6.47 – 6.39 (m, 1H), 5.95 (s, 2H), 5.93 (s, 2H), 3.84 – 3.72 (m, 1H), 3.68 – 3.56 (m, 1H), 2.94 – 2.78 (m, 2H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 153.51 (C), 151.21 (C), 150.39 (C), 150.10 (C), 147.92 (CH), 147.80 (CH), 145.65 (CH), 145.59 (CH), 145.09 (CH), 134.41 (C), 134.04 (C), 133.89 (C), 130.22 (CH), 130.09 (CH), 127.66 (CH), 127.22 (CH), 127.14 (CH), 126.50 (CH), 123.83 (CH), 123.54 (CH), 71.23 (CH), 64.18 ( $\text{CH}_2$ ), 64.11 ( $\text{CH}_2$ ), 63.71 ( $\text{CH}_2$ ), 56.93 ( $\text{CH}_2$ ).

### Síntesis de $\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$

$\text{L6}\cdot 3\text{PF}_6$ : RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm): 9.13 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 9.00 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.79 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.77 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 8.62 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 8.54 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 8.48 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.36 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 8.26 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 8.15 – 8.08 (m, 4H), 7.85 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 7.75 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.64 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.62 – 7.55 (m, 4H), 5.87 (s, 2H), 5.77 (s, 2H), 4.45 (s, 2H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm): 156.93 (C), 151.96 (C), 151.6 (C), 147.09 (CH), 146.85 (CH), 146.03 (CH), 136.26 (C), 135.45 (C), 132.84 (CH), 131.65 (CH), 131.42 (CH), 130.71 (CH), 130.67 (CH), 128.98 (CH), 128.89 (C), 128.62 (CH), 127.26 (CH), 126.40 (CH), 126.14 (C), 65.39 ( $\text{CH}_2$ ), 64.48 ( $\text{CH}_2$ ), 41.67 ( $\text{CH}_2$ ). ESI-MS (m/z): calc. para  $[\text{M}\cdot\text{PF}_6]^+$  950.2405; enc. 950.2391.

$\text{L6}\cdot 3\text{NO}_3$ : Sólido amarillento. mp ( $^\circ\text{C}$ ): 258.8. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.38 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 9.24 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.96 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 8.74 – 8.68 (m, 4H), 8.66 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H), 8.64 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 8.42 (d,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 8.13 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 8.07 (d,  $J = 9.9$  Hz, 4H), 7.83 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2H), 7.77 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 7.72 – 7.63 (m, 6H), 6.04 (s, 2H), 5.92 (s, 2H), 4.44 (s, 2H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 155.92 (C), 150.39 (C), 150.23 (C), 146.62 (CH), 145.61 (CH), 145.27 (CH), 144.30 (CH), 142.44 (C), 140.99 (C), 139.69 (C), 134.96 (C), 134.87 (C), 133.83 (C), 131.32 (CH), 131.34 (CH), 130.23 (CH), 129.97 (CH), 128.82 (CH), 128.39 (CH), 127.22 (CH), 126.90 (CH), 126.22 (CH), 125.26 (CH), 124.43 (CH), 122.85 (CH), 64.20 ( $\text{CH}_2$ ), 63.14 ( $\text{CH}_2$ ), 40.17 ( $\text{CH}_2$ ).

### Síntesis de $\text{L7}\cdot 3\text{NO}_3$

$\text{L7}\cdot 3\text{PF}_6$ : RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm): 9.11 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.99 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 8.76 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.72 (d, 2H), 8.56 (d, 2H), 8.52 (d,  $J = 6.4$

Hz, 2H), 8.47 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 8.35 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.08 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 8.01 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.82 – 7.75 (m, 2H), 7.71 (m,  $J =$  Hz, 4H), 7.59 (d,  $J = 2.2$  Hz, 4H), 7.48 (d, 2H), 5.87 (s, 2H), 5.75 (s, 2H), 4.28 (t,  $J = 7.9$ , 1H), 4.08 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 2.51 – 2.40 (m, 2H), 2.29 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.20 (t,  $J = 7.3$ , 7.3 Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{CN}$ )  $\delta$  (ppm): 173.54 (C), 164.85 (C), 156.97 (C), 151.95 (C), 151.57 (C); 147.10 (CH), 146.83 (CH), 146.23 (C), 146.02 (CH), 144.38 (CH), 143.66 (CH), 142.87 (C), 139.65 (C), 137.76 (C), 136.27 (C), 135.43 (C), 131.77 (CH), 131.66 (CH), 131.39 (CH), 130.68 (CH), 130.59 (CH), 128.97 (CH), 128.62 (CH), 127.83 (CH), 127.22 (CH), 126.47 (CH), 125.90 (CH), 65.37 ( $\text{CH}_2$ ), 64.44 ( $\text{CH}_2$ ), 61.74 ( $\text{CH}_2$ ), 50.62 (CH), 32.78 ( $\text{CH}_2$ ), 30.42 ( $\text{CH}_2$ ), 14.82 ( $\text{CH}_3$ ). ESI-MS ( $m/z$ ): calc. para  $[\text{M}-2\text{PF}_6]^{+2}$  452.6641; enc. 452.6659.

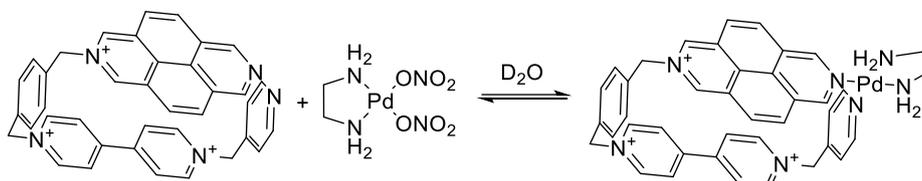
**L7**·3 $\text{NO}_3$ : sólido higroscópico amarillento. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.31 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 9.25 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 8.93 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.67 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.63 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 8.49 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 8.44 (d,  $J = 5.3$  Hz, 2H), 8.31 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.98 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.89 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.79 – 7.67 (m, 10H), 7.47 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 6.05 (s, 2H), 5.90 (s, 2H), 4.27 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.10 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.52 (m,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.43 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 175.84 (C), 155.80 (C), 153.83 (C), 150.25 (C), 150.09 (C), 148.93 (CH), 148.62 (CH), 147.36 (C), 146.66 (C), 145.58 (CH), 145.17 (CH), 144.18 (CH), 140.85 (C), 140.37 (C), 134.99 (C), 134.08 (C), 130.25 (CH), 130.13 (CH), 129.99 (CH), 128.65 (CH), 127.98 (CH), 127.19 (CH), 126.85 (CH), 125.02 (CH), 124.31 (CH), 123.81 (CH), 121.89 (CH), 64.26 ( $\text{CH}_2$ ), 63.15 ( $\text{CH}_2$ ), 61.74 ( $\text{CH}_2$ ), 48.88 (CH), 32.23 ( $\text{CH}_2$ ), 28.78 ( $\text{CH}_2$ ), 13.21 ( $\text{CH}_3$ ).

### 5.2.3 Procedimiento experimental para el ensamblaje de los metalociclos *M4a-M7a*

#### Procedimiento general para el ensamblaje de los metalociclos de Pd(II) *M4a-M7a*·5NO<sub>3</sub>

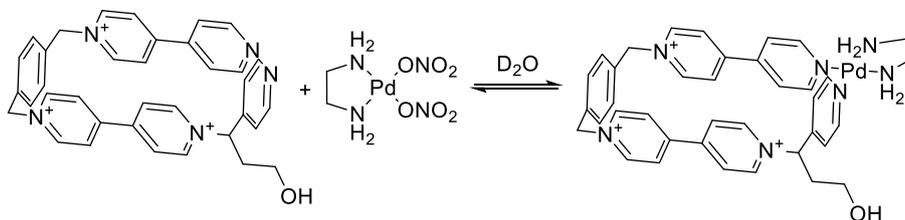
A una disolución acuosa (D<sub>2</sub>O) del ligando **L4-L6** (0.1-2.5 mM) y **L7** (0.1-5 mM) se le adiciona un equivalente del complejo de (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> para obtener los correspondientes metalociclos como especies mayoritaria a diferentes concentraciones. No es posible aislar los metalociclos de paladio (II), por lo que los estudios se llevan a cabo en la propia mezcla de reacción.

#### Ensamblaje de *M4a*·5NO<sub>3</sub>



**M4a**·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.95 (s, 2H), 9.94 (s, 2H), 8.99 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.92 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 8.55 – 8.44 (m, 4H), 8.07 (d, *J* = 4.4 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.27 (s, 2H), 5.83 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 2.98 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 152.10 (CH), 149.43 (C), 148.55 (C), 148.00 (CH), 145.43 (C), 145.08 (CH), 144.70 (CH), 138.73 (CH), 136.23 (C), 136.00 (C), 130.17 (CH), 130.09 (CH), 130.01 (CH), 129.68 (C), 129.60 (CH), 128.31 (C), 127.83 (CH), 126.91 (CH), 126.79 (CH), 66.39 (CH<sub>2</sub>), 64.99 (CH<sub>2</sub>), 62.46 (CH<sub>2</sub>), 47.18 (CH<sub>2</sub>).

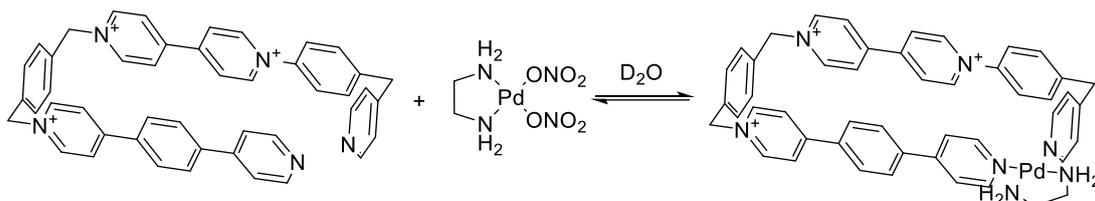
#### Ensamblaje de *M5a*·5NO<sub>3</sub>



**M5a**·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.16 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 9.11 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 9.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.84 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.35 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.32 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.17 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.66 (m, 4H), 6.27 (dd, *J* = 9.1, 6.2 Hz, 1H),

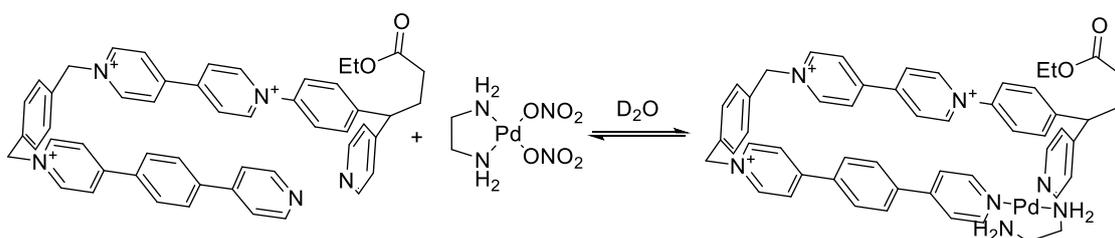
5.90 (s, 2H), 5.83 (s, 2H), 3.72 – 3.63 (m, 1H), 3.53 – 3.45 (m, 1H), 2.78 – 2.74 (m, 2H), 2.61 (m, 4H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 152.37 (CH), 151.98 (CH), 151.10 (C), 150.33 (C), 149.08 (C), 148.12 (C), 144.81 (CH), 144.41 (CH), 144.16 (CH), 136.04 (C), 135.89 (C), 130.25 (C), 130.21 (CH), 130.03 (CH), 127.30 (CH), 127.24 (CH), 126.38 (CH), 125.68 (CH), 124.67 (CH), 70.85 (CH), 65.01 ( $\text{CH}_2$ ), 64.57 ( $\text{CH}_2$ ), 64.12 ( $\text{CH}_2$ ), 56.90 ( $\text{CH}_2$ ), 46.70 ( $\text{CH}_2$ ), 32.95 ( $\text{CH}_2$ ).

### Ensamblaje de $\text{M6a} \cdot 5\text{NO}_3$



$\text{M6a} \cdot 5\text{NO}_3$ : RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.12 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 8.93 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.80 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 8.59 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 8.53 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 8.29 (d,  $J = 6.3$  Hz, 2H), 8.26 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 8.05 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 7.74 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.70-7.63 (m, 4H), 7.60 (m, 4H), 7.53 (d,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 7.47 – 7.41 (m, 4H), 5.84 (s, 2H), 5.68 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 2.81 (s, 4H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 157.19 (C), 151.07 (CH), 151.01 (CH), 150.06 (C), 144.85 (CH), 144.79 (CH), 143.54 (CH), 138.24 (C), 136.23 (C), 135.76 (C), 135.29 (C), 130.19 (CH), 129.97 (CH), 129.70 (CH), 128.60 (CH), 128.09 (CH), 127.07 (CH), 126.56 (CH), 125.45 (CH), 125.34 (CH), 124.29 (CH), 124.15 (CH), 64.90 ( $\text{CH}_2$ ), 63.81 ( $\text{CH}_2$ ), 47.18 ( $\text{CH}_2$ ).

### Ensamblaje de $\text{M7a} \cdot 5\text{NO}_3$



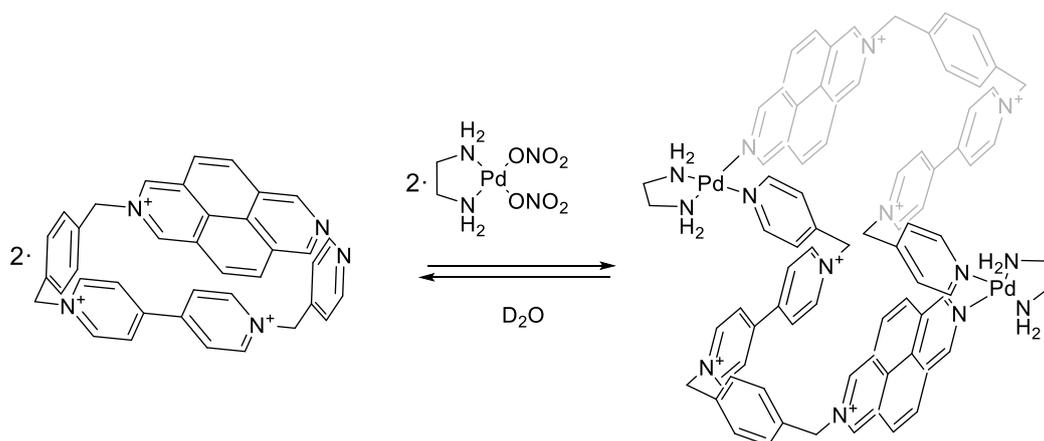
$\text{M7a} \cdot 5\text{NO}_3$ : RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.25 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 9.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 8.94 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.74 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H), 8.72 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 8.45 – 8.38 (m, 4H), 8.20 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 7.89 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.82 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.79 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 7.74 (s, 4H), 7.64 – 7.60 (m, 6H), 5.97 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 4.33 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 4.11 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.95 (s, 4H), 2.66 – 2.51 (m, 2H), 2.47 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 1.25 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$

(ppm): 175.65 (C), 157.47 (C), 151.09 (CH), 151.01 (CH), 150.06 (C), 144.85 (CH), 144.72(CH), 143.54 (CH), 138.24 (C), 136.20 (C), 135.74 (C), 135.03 (C), 130.12 (CH), 129.99 (CH), 129.70 (CH), 128.57 (CH), 128.11(CH), 127.47 (CH), 126.60 (CH), 125.83 (CH), 125.38 (CH), 124.35 (CH), 124.11 (CH), 64.96 (CH<sub>2</sub>), 63.83 (CH<sub>2</sub>), 61.77 (CH<sub>2</sub>), 48.87 (CH), 46.56 (CH<sub>2</sub>), 32.06 (CH<sub>2</sub>), 27.27 (CH<sub>2</sub>), 13.17 (CH<sub>3</sub>).

#### 5.2.4 Procedimiento experimental para el ensamblaje de los metalociclos **M4ad-M6ad**

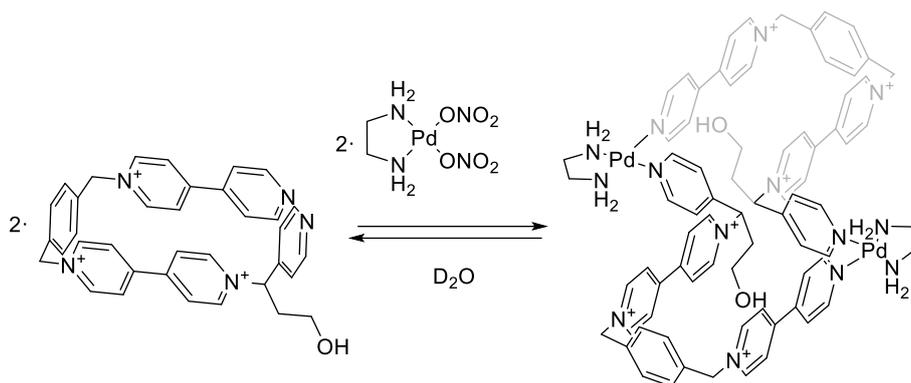
A una disolución acuosa (D<sub>2</sub>O) del ligando **L4-L6** (10-15 mM) se le adiciona un equivalente del complejo de (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> para obtener los correspondientes metalociclos diméricos como especies mayoritarias.

##### Ensamblaje de **M4ad**·10NO<sub>3</sub>



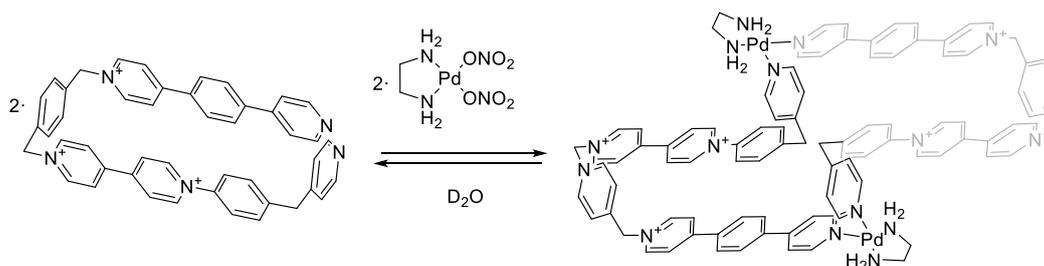
**M4ad**·10NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.83 (s, 2H), 9.72 (s, 2H), 9.08 (m, 4H), 8.64 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.47 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.44 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.36 (m, 4H), 7.68 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.58 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.43 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 6.27 (s, 2H), 6.01 (s, 2H), 5.91 (s, 2H), 2.67 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 152.47 (CH), 152.13 (C), 150.95 (C), 149.99 (C), 149.02 (CH), 146.51 (CH), 146.15 (CH), 145.55 (C), 139.35 (CH), 138.54 (C), 134.86 (C), 132.70 (CH), 130.23 (CH), 130.11 (CH), 129.69 (CH), 129.01 (C), 127.45 (CH), 127.08 (CH), 124.92 (CH), 65.36 (CH<sub>2</sub>), 64.07 (CH<sub>2</sub>), 62.17 (CH<sub>2</sub>), 45.57 (CH<sub>2</sub>).

**Ensamblaje de M5ad·10NO<sub>3</sub>**



**M5ad·10NO<sub>3</sub>**: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 9.17 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 9.06 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.90 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.79 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.62 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.43 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.02 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.71 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.66 – 7.59 (m, 4H), 6.42 (dd, *J* = 9.0, 6.2 Hz, 1H), 5.98 (s, 2H), 5.94 (s, 2H), 3.78 – 3.72 (m, 1H), 3.61 – 3.54 (m, 1H), 2.85 – 2.74 (m, 2H), 2.69 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 152.86 (CH), 152.82 (CH), 152.46 (C), 151.34 (C), 150.03 (C), 145.65 (CH), 145.17 (C), 145.11 (CH), 144.82 (CH), 134.32 (C), 133.91 (C), 130.23 (CH), 130.12 (CH), 130.08 (C), 127.73 (CH), 127.23 (CH), 127.14 (CH), 126.53 (CH), 124.90 (CH), 124.51 (CH), 70.68 (CH<sub>2</sub>), 64.19 (CH<sub>2</sub>), 63.80 (CH<sub>2</sub>), 56.82 (CH<sub>2</sub>), 47.40 (CH<sub>2</sub>), 47.04 (CH<sub>2</sub>).

**Ensamblaje de M6ad·10NO<sub>3</sub>**



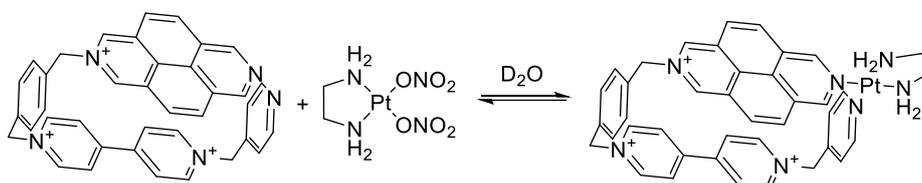
**M6ad·10NO<sub>3</sub>**: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.25 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 9.11 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.84 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.64 – 8.57 (m, 4H), 8.54 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.44 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.29 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.81 (m, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.56 – 7.49 (m, 6H), 7.36 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 5.91 (s, 2H), 5.79 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 2.59 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 156.94 (C), 153.91 (C), 151.82 (CH), 151.32 (CH), 150.38 (C), 150.22 (C), 149.90 (C), 145.52 (CH), 145.20 (CH), 144.27 (CH), 142.55 (C), 140.88 (C), 135.28 (C), 134.68 (C), 133.64 (C), 131.44 (C), 131.16 (CH), 130.12 (CH), 129.85 (CH),

128.78 (CH), 128.32 (CH), 127.12 (CH), 126.82 (CH), 125.54 (CH), 125.28 (CH), 124.29 (CH), 123.77 (CH), 64.06 (CH<sub>2</sub>), 63.03 (CH<sub>2</sub>), 47,26 (CH<sub>2</sub>), 39.48 (CH<sub>2</sub>).

### *Procedimiento general para el ensamblaje de los metalociclos de Pt(II) mononucleares*

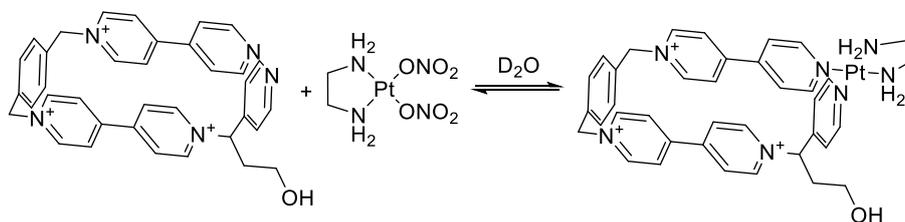
Una disolución acuosa (H<sub>2</sub>O Mili-Q) del complejo (en)Pt(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1.25 mM) y el correspondiente ligando **L4-L7** (1.25 mM) se irradia con energía asistida por microondas a 150 °C durante 3 horas. El disolvente se elimina bajo presión reducida para obtener los correspondientes metalociclos de platino (II) como sólidos.

#### **Ensamblaje de M4b·5NO<sub>3</sub>**



**M4b·5NO<sub>3</sub>**: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.96 (s, 2H), 9.95 (s, 2H), 8.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.93 (d, *J* = 6 Hz, 2H), 8.49 – 8.46 (m, 4H), 8.06 (d, *J* = 4.5 Hz, 2H), 7.85 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.67 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.63 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.27 (s, 2H), 5.85 (s, 2H), 5.82 (s, 2H), 2.66 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 153.56 (C), 152.95 (CH), 149.25 (C), 149.07 (CH), 146.28 (C), 145.03 (CH), 144.69 (CH), 138.74 (CH), 136,27 (C), 136.04 (C), 130.22 (CH), 130.05 (CH), 129.57 (CH), 128.71 (C), 127.87 (CH), 128.67 (C), 127.36 (CH), 126.84 (CH), 126.75 (CH), 66.41 (CH<sub>2</sub>), 64.99 (CH<sub>2</sub>), 62.37 (CH<sub>2</sub>), 47.5 (CH<sub>2</sub>).

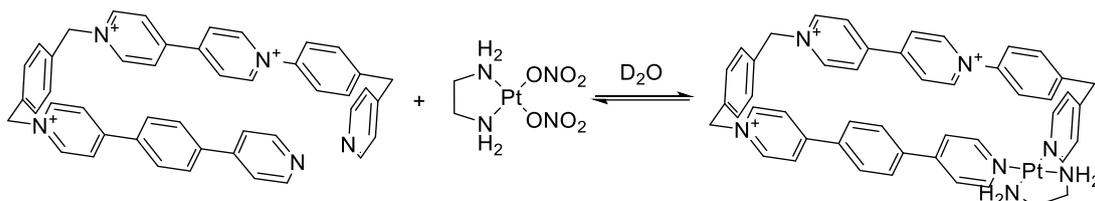
#### **Ensamblaje de M5b·5NO<sub>3</sub>**



**M5b·5NO<sub>3</sub>**: Sólido higroscópico anaranjado. Rto.: 89%. RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.20 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 9.11 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 9.00 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.87 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.84 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.34 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.31 (m, 2H), 8.17 (m, 2H), 7.91 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.78 (m, 2H), 7.65 (d, *J* = 6.3 Hz, 4H), 6.28 (dd, *J* = 9.1, 6.2 Hz, 1H), 5.90 (s, 1H), 5.82 (d, *J* = 7.3

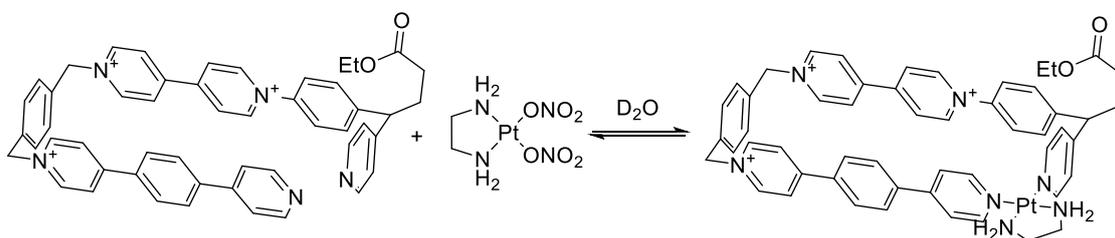
Hz, 2H), 3.90 – 3.70 (m, 1H), 3.59 (m 1H), 2.82 – 2.69(m, 2H), 2.67 (s, 4H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 153.17 (CH), 152.80 (CH), 150.90 (C), 150.34 (C), 149.08 (C), 147.88 (C), 144.84 (CH), 144.41 (CH), 144.15 (CH), 136.02 (C), 135.87 (C), 130.22 (CH), 130.06 (CH), 130.06 (CH), 129.43 (C), 127.26 (CH), 126.46 (CH), 126.32 (CH), 126.13 (CH), 125.04 (CH), 70.78 ( $\text{CH}_2$ ), 65.07 ( $\text{CH}_2$ ), 64.65 ( $\text{CH}_2$ ), 56.93 ( $\text{CH}_2$ ), 47.40 ( $\text{CH}_2$ ), 32.99 ( $\text{CH}_2$ ).

### Ensamblaje de **M6b**·5NO<sub>3</sub>



**M6b**·5NO<sub>3</sub>: Sólido higroscópico anaranjado. Rto.: 90%. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.24 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 9.06 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H), 8.93 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 8.75 (t,  $J = 6.22$  Hz, 4H), 8.73 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 8.43 (m, 4H), 8.19 (s, 2H), 7.86 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H), 7.81 (m, 4H), 7.72 (m, 4H), 7.56 (m, 4H), 6.04 (s, 2H), 5.92 (s, 2H), 2.78 (s, 4H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 157.21 (C), 151.03 (CH), 150.78 (CH), 150.06 (C), 148.85 (CH), 144.81(CH), 143.56 (CH), 138.21 (C), 136.25 (C), 135.77 (C), 135.27 (C), 130.18 (CH), 129.97 (CH), 129.72 (CH), 128.61 (CH), 128.07(CH), 127.06 (CH), 126.56 (CH), 125.45 (CH), 125.32 (CH), 124.33 (CH), 124.19 (CH), 64,93 ( $\text{CH}_2$ ), 63.83 ( $\text{CH}_2$ ), 47,29 ( $\text{CH}_2$ ). ESI-MS ( $m/z$ ): calc. para  $[\text{M}-4\text{PF}_6]^+$  265.0770; enc 265.0800.

### Ensamblaje de **M7b**·5NO<sub>3</sub>



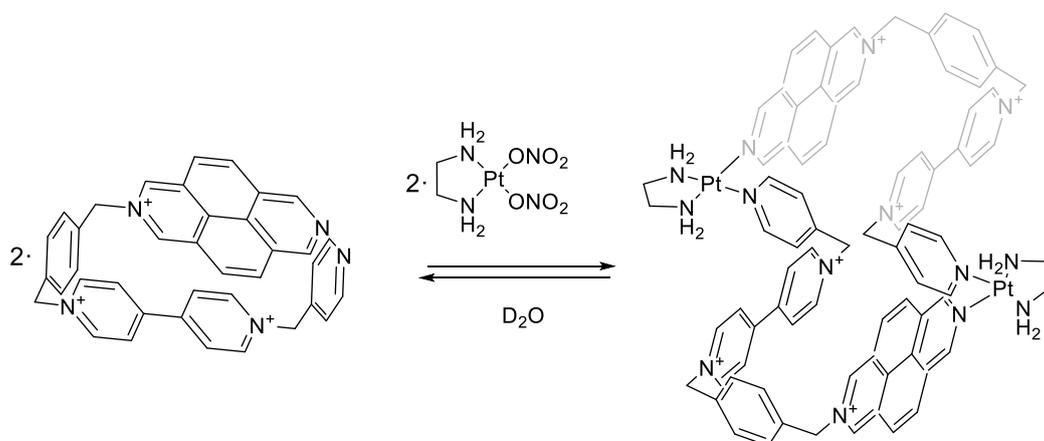
**M7b**·5NO<sub>3</sub>: Sólido higroscópico anaranjado. Rto.: 92%. RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.24 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 9.07 (d,  $J = 4.1$  Hz, 2H), 8.94 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 8.79 – 8.69 (m, 4H), 8.41 (d,  $J = 7.6$  Hz, 4H), 8.19 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.88 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.83 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 7.76 (d,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 7.73 (s, 4H), 7.61 (s, 6H), 5.96 (s, 2H), 5.81 (s, 2H), 4.32 (t,  $J = 14.9, 7.6$  Hz, 1H),

4.11 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 2.86 (s, 4H), 2.68 – 2.53 (m, 2H), 2.53 – 2.38 (m, 2H), 1.24 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 175.68 (C), 157.39 (C), 151.78 (CH), 151.01 (CH), 149.87 (C), 144.87 (CH), 144.75 (CH), 143.56 (CH), 138.07 (C), 136.22 (C), 135.75 (C), 135.06 (C), 130.15 (CH), 130.03 (CH), 129.74 (CH), 128.59 (CH), 128.07 (CH), 127.46 (CH), 126.60 (CH), 125.83 (CH), 125.37 (CH), 124.41 (CH), 124.18 (CH), 64.99 ( $\text{CH}_2$ ), 63.86 ( $\text{CH}_2$ ), 61.79 ( $\text{CH}_2$ ), 48.69 (CH), 47.39 ( $\text{CH}_2$ ), 32.07 ( $\text{CH}_2$ ), 27.24 ( $\text{CH}_2$ ), 13.19 ( $\text{CH}_3$ ). ESI-MS ( $m/z$ ): calc. para  $[\text{M}-2\text{PF}_6]^{+2}$  725.1452; enc. 725.1454.

### 5.2.5 Procedimiento general para el ensamblaje de los metalociclos de Pt(II) dinucleares

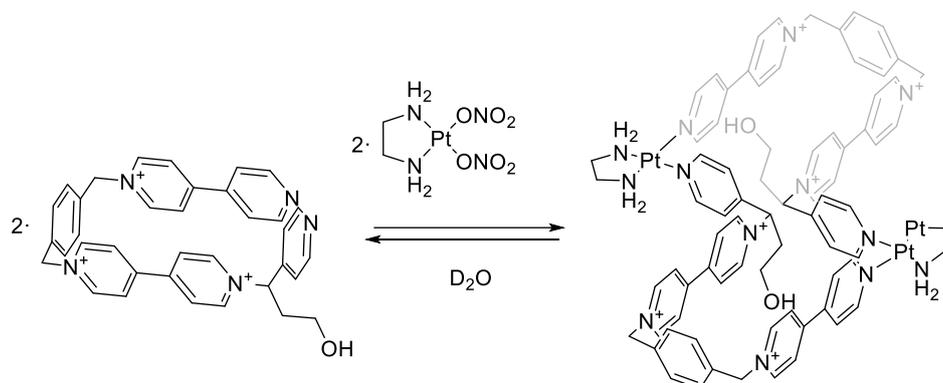
Una disolución acuosa ( $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q) del complejo (en)Pt( $\text{NO}_3$ ) $_2$  (5-10 mM) y el correspondiente ligando **L4-L7** (5-10 mM) se irradia con energía asistida por microondas a 150 °C durante 3 horas. El disolvente se elimina bajo presión reducida para obtener los correspondientes metalociclos de platino (II) como sólidos.

#### Ensamblaje de **M4bd**·10 $\text{NO}_3$



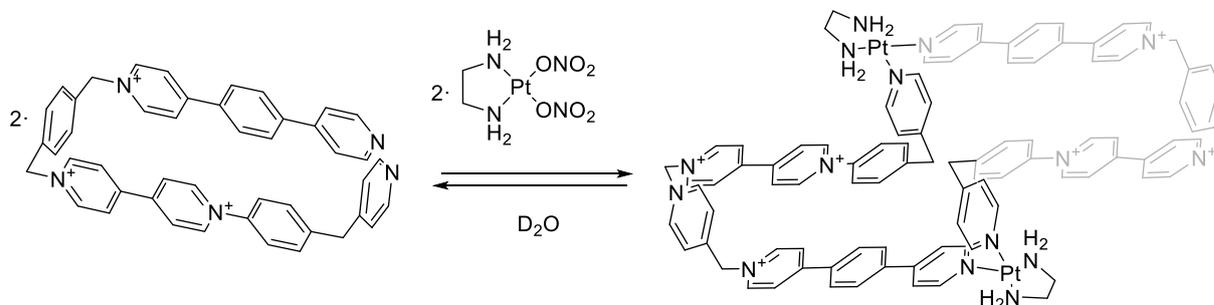
**M4bd**·10 $\text{NO}_3$ : RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 9.95 (s, 2H), 9.94 (s, 2H), 9.24-9.14 (m, 4H), 8.80 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H), 8.68 (d,  $J = 9.2$  Hz, 2H), 8.61 (d,  $J = 9.1$  Hz, 2H), 8.55 (m, 4H), 7.72 (d,  $J = 2.8$  Hz, 2H), 7.70 (d,  $J = 2.2$  Hz, 2H), 7.55-7.47 (m, 2H), 6.37 (s, 2H), 6.11 (s, 2H), 5.98 (s, 2H), 2.60 (s, 4H).

**Ensamblaje de M5bd·10NO<sub>3</sub>**



**M5bd·10NO<sub>3</sub>**: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.29 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 9.17 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 9.07 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.96 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.85 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.63 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.56 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.45 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.99 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.79-7.75 (m, 2H), 7.68 – 7.66 (m, 2H), 7.74-7.60 (m, 2H), 6.43 (dd, *J* = 9.0, 6.2 Hz, 1H), 5.99 (s, 2H), 5.94 (s, 2H), 3.80 – 3.71 (m, 1H), 3.68 – 3.63 (m, 1H), 2.80 – 2.75 (m, 1H), 2.64 (s, 4H).

**Ensamblaje de M6bd·10NO<sub>3</sub>**

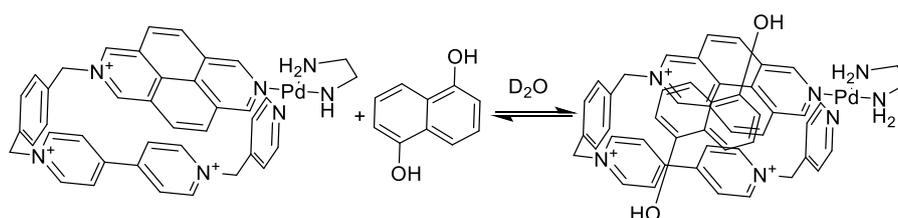


**M6bd·10NO<sub>3</sub>**: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ (ppm): 9.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 9.24 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 8.96 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 8.75 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.72 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.66 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.57 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 8.43 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 8.06 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.66 (m, 6H), 7.49 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 6.04 (s, 2H), 5.92 (s, 2H), 4.56 (s, 2H), 2.72 (s, 4H).

### 5.2.6 Procedimiento experimental para la síntesis de los complejos de inclusión

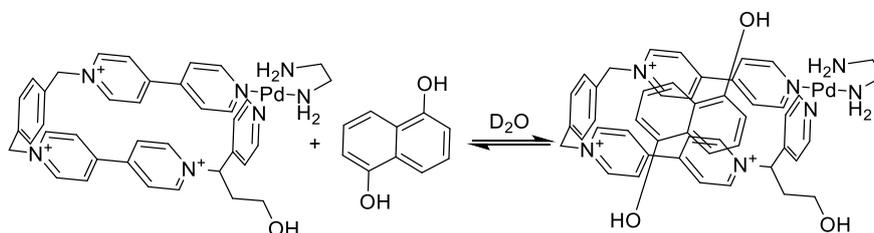
A una disolución acuosa ( $D_2O$ ) del metalociclo **M4-M7** (2.5 mM) se le adiciona un equivalente del sustrato 1,5-DHN observando en todos los casos un cambio en el color de la disolución debido al establecimiento de una banda de transferencia de carga indicativo de la formación del complejo de inclusión.

#### Complejo (**M4a**·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>:



(**M4a**·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): δ 9.90 (s, 1H), 9.88 (s, 1H), 9.77 (s, 1H), 9.74 (d, 1H), 9.39 (d, *J* = 4.9 Hz, 2H), 8.76 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.91 (d, 2H), 8.76 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.10 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.10-7.90 (m, 6H), 7.27 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.15-6.85 (m, 4H), 6.75-6.55 (m, 2H), 6.28-6.14 (m, 2H), 5.81 (s, 2H), 2.74 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 151.17(C), 147.61 (C), 145.83 (CH), 145.16 (CH), 144.82 (CH), 144.46 (C), 143.46 (C), 136.62 (CH), 136.25 (CH), 136.20 (CH), 134.42 (CH), 132.71 (CH), 131.20 (C), 129.57 (C), 129.37 (CH), 128.82 (CH), 127.70 (CH), 125.70 (CH), 125.11 (C), 123.03 (CH), 117.43 (C), 115.47 (C), 113.31 (CH), 109.26 (CH), 66.40 (CH<sub>2</sub>), 65.17 (CH<sub>2</sub>), 62.64 (CH<sub>2</sub>), 46.91 (CH<sub>2</sub>).

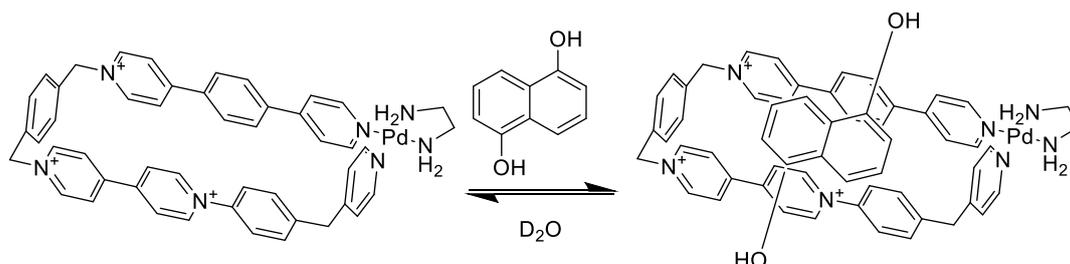
#### Complejo (**M5a**·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>:



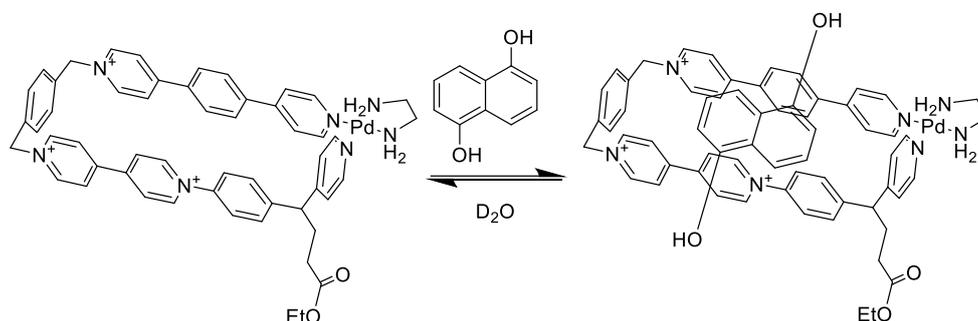
(**M5a**·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 9.34 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 9.04-8.97 (m, 4H), 8.84 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.77 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 8.21 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 8.03-7.92 (m, 4H), 7.62 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.56 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 7.42 (d, 6.3 Hz, 2H), 6.82 – 6.50 (m, 6H), 6.20 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.90 (s, 2H), 5.79 (s, 2H), 4.74 – 3.67 (m, 1H), 3.02 – 2.83 (m, 3H), 2.77 (s, 4H). RMN

de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta(\text{ppm})$ : 152.69(C), 152.58 (CH), 152.12(C), 151.94 (CH), 150.42(C), 148.53 (CH), 144.80 (CH), 144.29 (CH), 144.02 (CH), 136.77 (CH), 136.15(C), 134.01(C), 131.95(C), 130.88(C), 130.33 (CH), 130.16 (CH), 126.03(CH), 125.79 (CH), 124.47 (CH), 65.06 ( $\text{CH}_2$ ), 64.77 ( $\text{CH}_2$ ), 64.41 ( $\text{CH}_2$ ), 56.63 ( $\text{CH}_2$ ), 45.70 ( $\text{CH}_2$ ), 45.19 ( $\text{CH}_2$ ), 30.14 ( $\text{CH}_2$ ).

### Complejo (M6a·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>:



(M6a·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>: RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta(\text{ppm})$ : 9.29 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 8.88 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 8.73 (m,  $J = 6.7$  Hz, 4H), 8.54 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 8.15 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 8.02 – 7.89 (m, 4H), 7.79 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 7.71 – 7.59 (m, 8H), 7.53 – 7.47 (m, 2H), 7.33 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 7.16 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H), 6.63 (d, 2H), 6.27 (t, 2H), 6.03 (d, 2H), 6.00 (s, 1H), 5.80 (s, 2H), 4.25 (s, 2H), 2.95 (s, 4H). RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta(\text{ppm})$ : 151.94 (C), 151.44 (C), 151.06 (CH), 151.03 (CH), 145.65 (CH), 145.34 (C), 144.84 (CH), 144.48 (C), 144.40 (C), 143.77(C), 143.27 (CH), 140.78 (C), 139.30 (C), 136.89 (C), 136.20 (C), 131.56 (CH), 130.81 (CH), 130.34 (CH), 130.18 (CH), 127.44 (CH), 127.27 (CH), 127.14 (CH), 126.66 (CH), 124.49 (CH), 123.89 (CH), 123.74 (CH), 119.01 (CH), 112.13 (CH), 108.01 (CH), 65.18 ( $\text{CH}_2$ ), 64.24 ( $\text{CH}_2$ ), 63.86 ( $\text{CH}_2$ ), 47.62 ( $\text{CH}_2$ ), 40.01( $\text{CH}_2$ ).

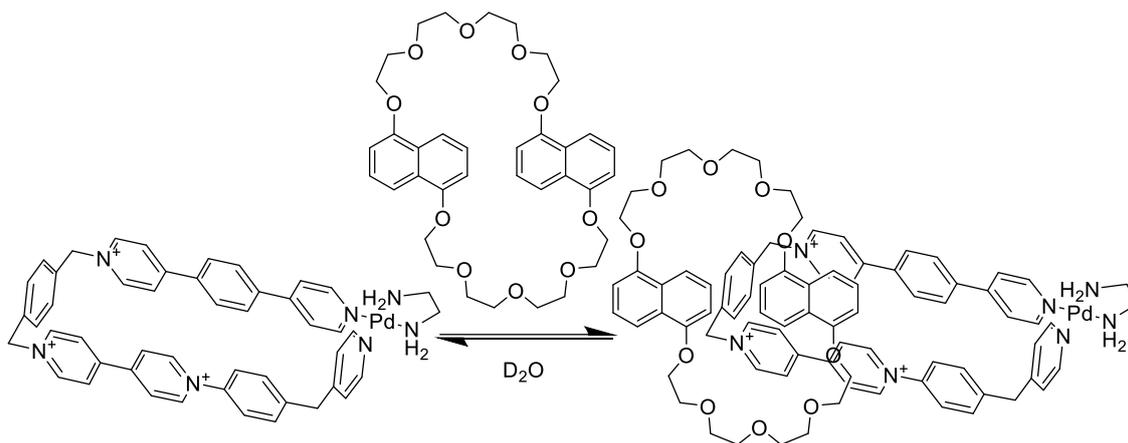
**Complejo (M7a·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>:**

(M7a·1,5DHN)·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 9.28 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.90 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 8.78 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.72 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.59 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.17 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.96 – 7.88 (m, 4H), 7.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 7.75 (d, *J* = 5.9 Hz, 2H), 7.71 – 7.66 (m, 4H), 7.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.53 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.22 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 5.98 (s, 2H), 5.94 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 5.80 (s, 2H), 5.55 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.44 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.36 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.08 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.94 (s, 4H), 2.59 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.46 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 1.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 175.65 (C), 157.69 (C), 151.15 (C), 151.01 (CH), 150.25 (C), 145.96 (CH), 144.81 (C), 143.78 (C), 143.32 (CH), 140.39 (C), 136.63 (C), 136.05 (C), 130.25 (CH), 130.11 (CH), 129.83 (CH), 127.78 (CH), 127.49 (CH), 126.98 (CH), 125.91 (CH), 125.65 (CH), 124.77 (CH), 124.44 (CH), 124.08 (CH), 123.83 (CH), 112.13 (CH), 107.91 (CH), 65.03 (CH<sub>2</sub>), 63.81 (CH<sub>2</sub>), 61.78 (CH<sub>2</sub>), 48.80 (CH), 46.70 (CH<sub>2</sub>), 46.57 (CH<sub>2</sub>), 45.70 (CH<sub>2</sub>), 32.05 (CH<sub>2</sub>), 27.28 (CH<sub>2</sub>), 13.18 (CH<sub>3</sub>).

### 5.2.7 Ensamblaje de los catenanos (**M6a**·**DN38C10**)·5NO<sub>3</sub> y (**M4a**·**DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>

#### Catenano (**M6a**· **DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>:

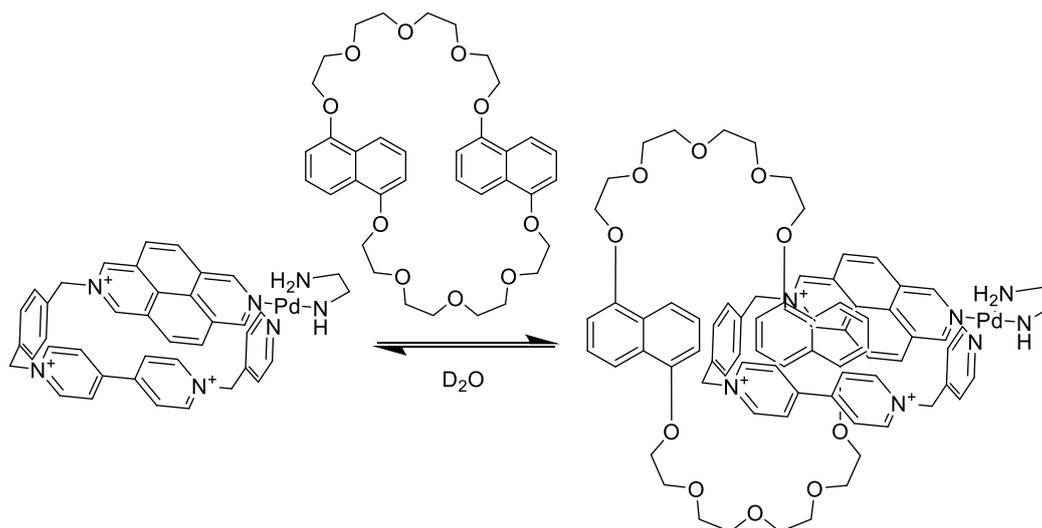
A una disolución del ligando **L6** (5 mM) y el complejo de (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (5mM) se le adiciona el ciclofano **DN38C10**. La mezcla se irradia con energía de ultrasonidos a 25 °C durante 56 horas.



(**M6a**·**DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 9.36 (d, *J* = 6.7 Hz, 2H), 9.20 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.85 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 8.71 – 8.66 (m, 4H), 8.63 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.41 (m, 4H), 8.15 (m, 4H), 7.95 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 7.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.68 – 7.55 (m, 4H), 7.13 (m, 2H), 7.02 (m, 2H), 6.92 (m, 2H), 6.00 (s, 2H), 5.88 (s, 2H), 5.75-5.67 (m, 6H), 4.52 (s, 2H), 4.33 – 3.29 (m, 32H), 2.78 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 165.60 (C), 164.38 (C), 162.08 (C), 155.89 (C), 155.78 (C), 145.63 (CH), 145.32 (CH), 144.47 (CH), 141.21 (CH), 140.71 (CH), 131.48 (CH), 130.14 (CH), 129.93 (CH), 129.31 (CH), 129.10 (CH), 129.10 (CH), 127.88 (CH), 127.42 (CH), 127.17 (CH), 126.93 (CH), 126.35 (CH), 125.75 (CH), 125.63 (CH), 125.21 (CH), 124.83 (CH), 124.62 (CH), 72.57 (CH<sub>2</sub>), 72.08 (CH<sub>2</sub>), 71.65 (CH<sub>2</sub>), 71.56 (CH<sub>2</sub>), 70.67 (CH<sub>2</sub>), 69.67 (CH<sub>2</sub>), 69.59 (CH<sub>2</sub>), 69.36 (CH<sub>2</sub>), 69.28 (CH<sub>2</sub>), 67.39 (CH<sub>2</sub>), 66.64 (CH<sub>2</sub>), 57.48(CH<sub>2</sub>), 41.15 (CH<sub>2</sub>), 40.45(CH<sub>2</sub>), 40.20 (CH<sub>2</sub>).

**Catenano (M4a·DN38C10)·5NO<sub>3</sub>:**

A una disolución del ligando **L4** (5 mM) y el complejo de (en)Pd(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (5mM) se le adiciona el ciclofano **DN38C10**. La mezcla se irradia con energía de ultrasonidos a 25 °C durante 24 horas.

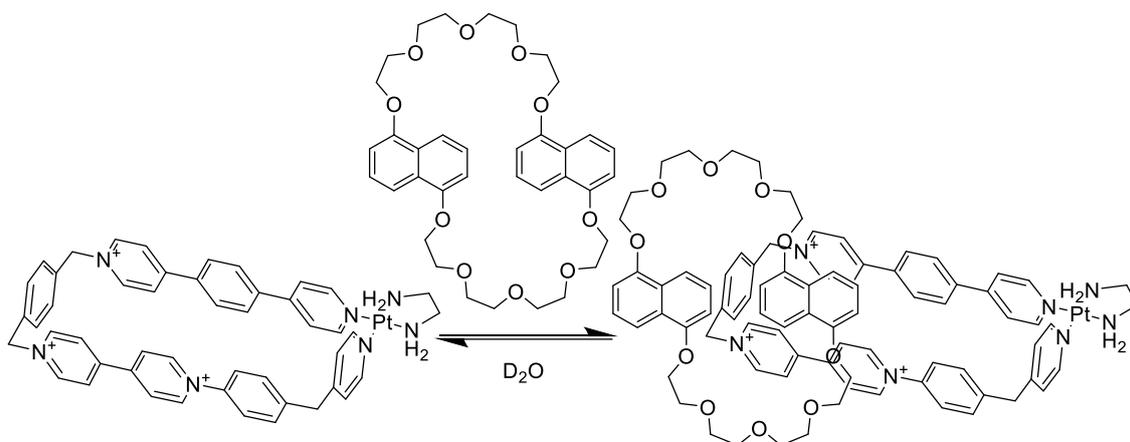


(**M4a DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 9.84 (s, 1H), 9.75 (s, 1H), 9.70 (s, 1H), 9.60 (s, 1H), 9.48 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 8.88 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.74 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 8.26 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 8.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.15 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 8.10 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.92 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.28 (d, *J* = 10.5 Hz, 2H), 6.24 (s, 2H), 6.14 (m, 2H), 6.11 (m, 2H), 5.93 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 5.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.83 (s, 2H), 5.81 (s, 2H), 5.78 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.77 (m, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.55 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.47 (t, 1H), 4.39 – 3.49 (m, 32H), 2.74 (s, 4H). RMN de <sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 150.18 (C), 147.57 (C), 145.60 (C), 145.57 (CH), 144.51 (CH), 144.27 (C), 136.20 (C), 132.74 (CH), 130.92 (CH), 130.71 (CH), 129.41 (CH), 128.42(CH), 128.40 (CH), 126.70 (CH), 126.56 (CH), 125.84 (CH), 125.27 (C), 122.25 (CH), 118.67 (C), 106.97 (C), 106.71 (CH), 104.20 (CH), 103.81 (CH), 103.42 (CH), 70.75 (CH<sub>2</sub>), 70.42 (CH<sub>2</sub>), 70.40 (CH<sub>2</sub>), 70.24 (CH<sub>2</sub>), 69.76 (CH<sub>2</sub>), 69.47 (CH<sub>2</sub>), 67.76 (CH<sub>2</sub>), 67.65 (CH<sub>2</sub>), 67.60 (CH<sub>2</sub>), 66.51 (CH<sub>2</sub>), 65.29 (CH<sub>2</sub>), 52.40 (CH<sub>2</sub>), 48.07 (CH<sub>2</sub>), 47.11 (CH<sub>2</sub>), 45.71 (CH<sub>2</sub>).

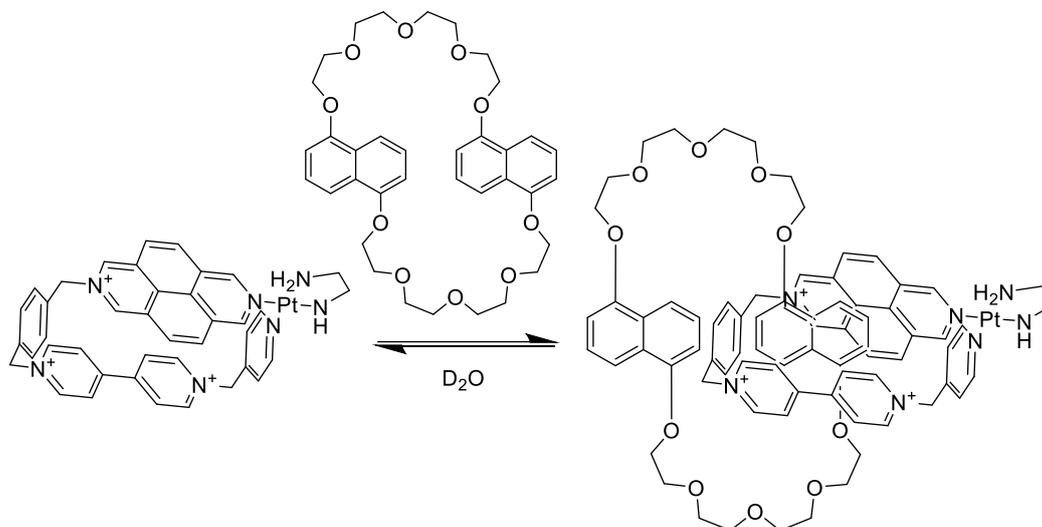
### 5.2.8 Ensamblaje de los catenanos (**M6b**·**DN38C10**)·5NO<sub>3</sub> y (**M4b**·**DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>

A una disolución del ligando **L4** (5 mM) y el complejo de (en)Pt(ONO<sub>2</sub>)<sub>2</sub> (5mM) se le adiciona el ciclofano **DN38C10**. La mezcla se irradia con energía asistida por microondas a 150 °C durante 3 horas. El disolvente se elimina bajo presión reducida para obtener los correspondientes catenanos como sólidos.

#### Catenano (**M6b**· **DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>:



(**M6a**·**DN38C10**)·5NO<sub>3</sub>: RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ(ppm): 9.34 (d, *J* = 6.1 Hz, 2H), 9.20 (m, 2H), 8.93 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.81 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 8.72 – 8.67 (m, 4H), 8.64-8.60 (m, 4H), 8.39 (m, 4H), 8.12-8.08 (m, 4H), 7.78 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.67-7.60 (m, 6H), 7.26 (m, 2H), 7.12 (m, 2H), 6.88 (m, 2H), 6.00 (s, 2H), 5.89 (s, 2H), 5.25 (m, 6H), 4.52 (s, 2H), 4.36 – 3.09 (m, 32H), 2.79 (s, 4H).

**Catenano (M4b· DN38C10)·5NO<sub>3</sub>:**

**(M4a DN38C10)·5NO<sub>3</sub>:** RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 9.78-9.74 (m, 3H), 9.59 (s, 1H), 9.48 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 8.89 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H), 8.80 (m, 2H), 8.25 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 8.20 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 8.12 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 8.07 (m, 1H), 8.04 (m, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.95 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.92 (m, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.30 (m, 2H), 6.24 (s, 2H), 6.11 (m, 2H), 6.10 (m, 2H), 5.94 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.89 (m, 1H), 5.87 (s, 2H), 5.86 (s, 2H), 5.83 (m, 1H), 5.81 (m, 1H), 5.58 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.47 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 4.37–3.41 (m, 32H), 2.74 (s, 4H).

## *Parte Experimental II. Estudios de interacción*

### **5.3 Oligonucleótidos**

Todos los oligonucleótidos fueron comprados en IDT (integrated DNA Technologies) con grado de pureza HPLC. En las pruebas de FRET se usó FAM (6-carboxifluoresceína) y TAMRA (6-carboxitetrametilrodamina). Como modelo para ds-DNA se usó la secuencia TATAGCTA-[(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)<sub>6</sub>]-TATAGCTATA.

Las concentraciones stock de las disoluciones de los oligonucleótidos fueron determinados midiendo la absorbancia a 260 nm de las correspondientes disoluciones diluidas y empleando los coeficientes de extinción molar suministrados por el fabricante.

El calf-thymus DNA (ct-ADN, Sigma Aldrich) fue usado como modelo de ADN dúplex para los experimentos UV-VIS y CD. Fue suspendido en una disolución 1.0 mM de tris-hidroximetil-aminometano (TRIS-HCl) a pH=7.5. La concentración de ADN fue determinada por espectrometría UV-VIS usando 6600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> como coeficiente de absorción molar a 260 nm.<sup>144</sup>

### **5.4 Estudios de interacción por desnaturalización térmica**

#### *5.4.1 Desnaturalización térmica del ADN por FRET*

Los experimentos de FRET se han llevado a cabo en un Applied Biosystems® 7500 Real-Time PCR cycler equipado con un filtro FAM ( $\lambda_{ex} = 492$  nm y  $\lambda_{em} = 516$  nm).

Los oligonucleótidos fueron en primer lugar diluidos con agua MiliQ para obtener stocks 100  $\mu$ M. Estas a su vez, fueron diluidas a concentración 400 nM en una disolución buffer de potasio cacodilato (60mM, pH=7.4) y a continuación fueron tratadas para formar las estructuras G4 por calentamiento a 95 °C durante 5 minutos en ausencia de luz, seguido de enfriamiento lento a temperatura ambiente y posteriormente se mantuvieron en nevera a 4°C durante toda la noche protegidos de la luz con papel de plata.

Los experimentos se llevaron a cabo en 96 platos con un volumen total de 30  $\mu$ l. La concentración final de los oligonucleótidos fue 200 nM. El compuesto de estudio fue previamente disuelto en DMSO para dar concentraciones Stock 1 mM. Estas fueron

---

<sup>144</sup> Reichmann, M. E.; Rice, S. A.; Thomas C. A.; Doty, P. *J. Am. Chem. Soc.*, **1954**, 76, 3047–3053.

diluidas a 60 mM usando el buffer de potasio cacodilato, y añadido para obtener una concentración final de 1  $\mu$ M (con un porcentaje total de DMSO alrededor de 0.1%).

La rampa de temperaturas programada fue puesta con un incremento de 1 grado cada 30 segundos comenzando en 25 grados hasta alcanzar los 95 grados, y las medidas se adquirieron después de cada paso. Para comparar los resultados estos fueron normalizados (de 0 a 1). Las medidas se realizaron por duplicado.

## ***5.5 Estudios de la interacción mediante técnicas espectroscópicas***

### ***5.5.1 Espectroscopia Ultravioleta-Visible.***

Los espectros UV-VIS fueron recogidos en un espectrofotómetro Jasco V-650 y en un espectrofotómetro PerkinElmer LAMBDA 35 de doble haz, equipado con un controlador de temperatura Peltier, y usando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en una disolución buffer de 100 mM de KCl y 50 mM Tris-HCl a pH=7.5.

Los oligonucleótidos se disolvieron en agua Mili-Q para obtener una disolución Stock de los mismos 100  $\mu$ M. Luego, esta fue diluida usando el Buffer 50 mM Tris-HCl/ 100 mM KCl (pH=7.4) hasta obtener la concentración deseada. Todos los oligonucleótidos alcanzaron su estructura secundaria por calentamiento a 90 °C durante 5 minutos y posterior enfriamiento a temperatura ambiente. El ct-DNA fue diluido usando Buffer 50 mM Tris-HCl/ 100 mM KCl (pH=7.4) y se empleó si necesidad de mayor tratamiento.

Los espectros de absorción de UV-VIS se recogieron a 25 °C. Las valoraciones se llevaron a cabo añadiendo cantidades crecientes de DNA (ct-DNA o G4) a una disolución constante del metalociclo de platino. Para asegurarse que durante la valoración la concentración del metalociclo de platino permanecía inalterada, para cada adición de la disolución de ADN se añadía el mismo volumen de una disolución del metalociclo de platino el doble de concentrada.

Los valores de la constante se obtuvieron mediante el ajuste de los datos empleando la ecuación  $[DNA]/|\epsilon_a - \epsilon_f| = [DNA]/|\epsilon_b - \epsilon_f| + 1/(|\epsilon_b - \epsilon_f| \times K_b)$ ,<sup>6</sup> donde  $\epsilon_a = A_{observada}/[Pt-box]$ ,  $\epsilon_b$  es el coeficiente de extinción molar del ADN unido al metalociclo de platino y  $\epsilon_f$  es el coeficiente de extinción molar del metalociclo de platino libre

determinado por la curva de calibración del metalociclo de platino aislado en disolución acuosa, siguiendo la ley de Lambert-Beer.

### 5.5.2 *Dicroísmo circular*

Los espectros de dicroísmo circular fueron recogidos en un Chirascan™ CD (by AppliedPhotophysics) usando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico a 25 °C con los siguientes parámetros: rango 600-200 nm, ancho de banda: 1.0 nm, tiempo por punto: 0.5 s, repeticiones: 4. Las valoraciones se llevaron a cabo añadiendo cantidades crecientes de la Stock del metalociclo de Pt a una disolución de ADN/G4 de concentración constante. Para asegurarse que durante la valoración la concentración del DNA/G4 permanecía inalterada, para cada adición de la disolución de metalociclo de platino se añadía el mismo volumen de una disolución del DNA/G4 el doble de concentrada.

### 5.5.3 *Espectroscopia de fluorescencia*

Los espectros de fluorescencia fueron recogidos en Fluoromax Plus-P (by Horiba Scientific).

La valoración se llevó a cabo añadiendo cantidades crecientes de ADN (ct-DNA o G4) a una disolución constante del metalociclo de platino. Para asegurarse que durante la valoración la concentración del metalociclo de platino permanecía inalterada, para cada adición de la disolución de ADN se añadía el mismo volumen de una disolución del metalociclo de platino el doble de concentrada.

### 5.5.4 *Tiempo de vida media*

La determinación del tiempo de vida media se llevó a cabo empleando un nanoled que irradia a  $370\pm 10$  nm (modelo: Horiba Nanoled N-370 (amplitud del pulso: 1.2 ns)).

Las medidas de tiempo de vida (TCSPC) se llevaron a cabo en un equipo Fluoromax-4 equipado con un controlador SPC (FluoroHub, Horiba Jobin Yvon). La fuente de emisión seleccionada fue un Nanoled Horiba N-370 (pulso  $< 1.2$  ns). Como prompt se empleó una dilución al 0.01% de sílica coloidal Ludox AS40 en agua. Los datos obtenidos se ajustaron usando métodos de mínimos cuadrados con el software de análisis de la descomposición de la fluorescencia DAS6.

### 5.5.5 Rendimiento cuántico

Los espectros UV-vis se recogieron en un espectrofotómetro PerkinElmer LAMBDA y Jasco V-650 empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico

Los espectros de fluorescencia en un espectrofluorómetro Fluoromax-4 (Kyoto, Japón). Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente seleccionando las rendijas de emisión y excitación que se corresponderían con los máximos de los compuestos analizados.

Los espectros de emisión y absorción se obtuvieron para las muestras del ligando **L13** y el metalociclo **M13** en un rango de concentraciones de 0.2-5  $\mu\text{M}$ , donde la absorción se sitúa entre 0.01 y 0.08.

El rendimiento cuántico se determinó empleando sulfato de quinina como referencia (con  $\phi_F = 0.55$  a  $\lambda_{exc}=365$  nm and  $\lambda_{exc}=451$  nm).