



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Síntesis y caracterización de ligandos derivados de piridoxal y sus complejos de Cu (II) y estudio de su interacción con el ADN y otras dianas biológicas

Síntese e caracterización de ligandos derivados de piridoxal e os seus complejos de Cu (II) e estudo da súa interacción co ADN e outras dianas biolóxicas

Synthesis and characterization of piridoxal-derived ligands and their Cu (II) complexes and study of their interaction with DNA and other biological targets

Lucía Ramos Pan

Curso: 2021 – 2022. Convocatoria: Junio

*Director 1: Fernando Avecilla Porto
Director 2: Cristian Robert Munteanu*

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ΔE : Energía de afinidad

COAD: Adenocarcinoma de Colon

DMSO: Dimetilsulfóxido

ESI: Electrospray Ionization

FABP6: Fatty Acid Binding Protein 6

IR: Infrarrojo

K_b : Constante de interacción compuesto-ADN

MS: Espectrometría de masas

m/z: Relación masa/carga

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDB: Program Database

PDBQT: Protein Data Bank, Partial Charge (Q), & Atom Type (T)

RMN 1H : Resonancia magnética nuclear de protón

RMN ^{13}C : Resonancia magnética nuclear de carbono

UV-Vis: Ultravioleta-visible

Índice

Abreviaturas	2
Resumen	1
Resumo	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. La química bioinorgánica	3
1.2. La química del cobre y su importancia en la química médica	3
1.3. Ligandos derivados de piridoxal.....	4
1.4. Actividades biológicas de hidrazonas	5
1.5. Complejos metálicos de hidrazonas como agentes anticancerígenos	6
2. Objetivos.....	8
3. Parte experimental.....	9
3.1. Reactivos y disolventes	9
3.2. Síntesis de ligandos.....	9
3.3. Síntesis de complejos.....	10
3.4. Caracterización.....	11
Análisis elemental.....	11
Espectrometría de masas	11
Espectroscopia infrarroja	11
Espectroscopia RMN ¹ H y RMN ¹³ C.....	11
Difracción de rayos X de monocristal.....	11
3.5. Espectroscopia electrónica de absorción UV-Vis.....	12
3.6. Estudio experimental de interacción con el ADN: espectroscopia UV-Vis.....	12
3.7. Estudio computacional de interacción con una diana proteica: <i>molecular docking</i>	14
4. Resultados y discusión	16
4.1. Síntesis.....	16
4.2. Caracterización.....	16
Análisis elemental.....	16
Espectrometría de masas	17
Espectroscopia infrarroja	19
Espectroscopia RMN ¹ H y RMN ¹³ C.....	20
Difracción de rayos X de monocristal.....	21
4.3. Espectroscopia electrónica de absorción UV-Vis.....	28
4.4. Estudio experimental de interacción con el ADN: Espectroscopia UV-Vis	28
4.5. Estudio computacional de interacción con una diana proteica: <i>Molecular docking</i>	30

5. Conclusiones	34
Conclusións	35
Conclusions	36
6. Cronograma.....	38
7. Bibliografía.....	39
8. Anexos	42
Espectrometría de masas.....	42
Ligando 1.....	42
Ligando 2.....	43
Ligando 3.....	44
Complejo 1	45
Complejo 2	46
Complejo 3	47
Complejo 4	48
Complejo 5	49
Espectroscopia infrarroja.....	50
Ligando 1.....	50
Ligando 2.....	50
Ligando 3.....	51
Complejo 1	51
Complejo 2	52
Complejo 3	52
Complejo 4	53
Complejo 5	53
Espectroscopia RMN ¹ H y RMN ¹³ C.....	54
Ligando 1.....	54
Ligando 2.....	55
Ligando 3.....	56
Difracción de rayos X de monocristal	57
Ligando 1.....	57
Ligando 2.....	58
Ligando 3.....	59
Complejo 1	60
Complejo 2	61
Complejo 4	62
Espectroscopia de absorción UV-Vis	63
Ligando 1.....	63

Ligando 2.....	63
Ligando 3.....	63
Ligando 4.....	64
Ligando 5.....	64
Complejo 3	64
Complejo 4	65
Estudio experimental de interacción con el ADN: Espectroscopia UV-Vis	65
Ligando 1.....	65
Ligando 2.....	65
Ligando 3.....	66
Ligando 4.....	67
Ligando 5.....	67
Complejo 4	68

Resumen

Los ligandos hidrazona derivados de piridoxal y sus complejos metálicos han generado un gran interés en química médica durante la última década debido a la gran versatilidad de este tipo de compuestos y a su amplia variedad de actividades biológicas, como su actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antivírica, antitumoral y antimicrobiana, entre otras. En base a esto, el presente trabajo se puede estructurar en dos partes.

En primer lugar, se ha sintetizado y caracterizado para su posterior estudio como paso inicial en la valoración de su potencial como posibles agentes farmacológicos tres ligandos hidrazona derivados de piridoxal (L1, L2 y L3) junto con otros dos previamente sintetizados y caracterizados (L4 y L5) y sus respectivos complejos de cobre (II) (C1, C2, C3, C4 y C5).

En segundo lugar, se realizó un estudio para determinar el tipo y la fortaleza de interacción de los compuestos con el ADN mediante espectroscopía de absorción UV-Vis y un estudio *in silico* mediante *molecular docking* para medir la interacción de los compuestos con la diana proteica FABP6, un potencial candidato a marcador de diagnóstico temprano del Adenocarcinoma de Colon.

Palabras clave: Hidrazonas, piridoxal, complejos de cobre, cáncer, interacción con ADN, interacción con dianas proteicas.

Resumo

Os ligandos de hidrazona derivados de piridoxal e os seus complexos metálicos xeraron un gran interese na química médica durante a última década debido á gran versatilidade deste tipo de compostos e a súa gran variedade de actividades biolóxicas, como as súa actividade antibacteriana, antiinflamatoria, antiviral, antitumoral e antimicrobiana, entre outras. En base a isto, o presente traballo pódese estruturar en dúas partes.

En primeiro lugar, sintetizáronse e caracterizáronse para o seu posterior estudo como paso inicial para avaliar o seu potencial como posibles axentes farmacolóxicos tres ligandos de hidrazona derivados do piridoxal (L1, L2 e L3) xunto con outros dous sintetizados e caracterizados previamente (L4 e L5) e os seus respectivos complexos de cobre (II) (C1, C2, C3, C4 e C5).

En segundo lugar, realizouse un estudo baseado na determinación do tipo e da fortaleza de interacción dos compostos co ADN mediante espectroscopia de absorción UV-Vis e un estudo *in silico* mediante *molécular docking* para medir a interacción dos compostos

coa proteína diana FABP6, un posible candidato a marcador de diagnóstico precoz do Adenocarcinoma de Colon.

Palabras clave: Hidrazonas, piridoxal, complejos de cobre, cancro, interacción co ADN, interacción con dianas proteicas.

Abstract

Pyridoxal-derived hydrazone ligands and their metal complexes have generated great interest in medicinal chemistry during the last decade due to the versatility of this type of compound and their wide variety of biological activities, such as antibacterial, anti-inflammatory, antiviral, antitumour and antimicrobial activity, among others. On this basis, the present work can be structured in two parts.

Firstly, three pyridoxal-derived hydrazone ligands (L1, L2 and L3) together with two previously synthesised and characterised (L4 and L5) and their respective copper (II) complexes (C1, C2, C3, C4 and C5) have been synthesised and characterised for further study as an initial step in the assessment of their potential as possible pharmacological agents.

Secondly, a study was performed to determine the type and strength of interaction of the compounds with DNA by UV-Vis absorption spectroscopy and another *in silico* study was performed by molecular docking to measure the interaction of the compounds with the protein target FABP6, a potential candidate as an early diagnostic marker for Colon Adenocarcinoma.

Keywords: Hydrazones, pyridoxal, copper complexes, cancer, interaction with DNA, interaction with protein targets.

1. Introducción

1.1. La química bioinorgánica

La química bioinorgánica es una nueva disciplina que surge a finales del siglo XX por el solapamiento entre la química inorgánica y la bioquímica ¹. Este nombre parece encerrar una contradicción en sí mismo, ya que *bio* significa vida e *inorgánico* es todo aquello carente de vida. La química bioinorgánica puede ser definida como “ciencia que trata del estudio de la reactividad química de los elementos y compuestos inorgánicos en los sistemas biológicos” ².

Actualmente, se conoce que hay por lo menos 25 elementos químicos esenciales para la vida que participan activamente en una gran variedad de procesos biológicos y, la mayoría de ellos, son considerados tradicionalmente como inorgánicos (Tabla 1). Es por ello que la química bioinorgánica es una de las disciplinas de mayor crecimiento en las últimas décadas, convirtiéndose en una parte muy importante de las investigaciones bioquímicas junto a la tradicional química orgánica ¹.

Tabla 1. Elementos químicos esenciales para la vida ¹.

Elementos biológicos masivos	C, H, O, N, P, S, Cl, Na, K, Mg, Ca
Elementos traza	B, F, Si, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, I
Elementos traza posiblemente esenciales	As, Br, W, Sn

Los descubrimientos en química bioinorgánica han tenido un gran impacto, principalmente en la medicina química moderna. Se han desarrollado sondas, agentes de contraste, terapias y fármacos basados en metales, que han supuesto el desarrollo de agentes médicos que no se podrían conseguir con compuestos puramente orgánicos y, además, una mayor comprensión de los mecanismos biológicos de ciertas enfermedades ³.

1.2. La química del cobre y su importancia en la química médica

El cobre es un metal de transición con número atómico 29 que encabeza el grupo 11 en la tabla periódica. Su configuración electrónica es $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ y presenta dos isótopos estables, ⁶³Cu y ⁶⁵Cu, junto con 27 radioisótopos.

Presenta dos estados de oxidación, Cu (I) y Cu (II), siendo el más común en la mayoría de sus compuestos el Cu²⁺. El Cu (I), con una configuración d^{10} , es diamagnético y sus disoluciones son generalmente incoloras. Los índices de coordinación más frecuentes en los complejos de Cu (I) son 2, 3 y 4 con geometrías lineal, triangular y tetraédrica respectivamente. Por otro lado, el Cu (II), con configuración d^9 , es paramagnético y sus

disoluciones suelen ser de color azul. Los complejos de Cu (II) generalmente presentan geometría planocuadrada con cuatro ligandos fuertemente coordinados en el plano xy, y adicionalmente pueden presentar uno o dos ligandos axiales más débilmente coordinados ¹.

El cobre es un componente fundamental del centro catalítico de diversas enzimas redox y, consecuentemente, es esencial para el normal desarrollo de funciones fisiológicas como la respiración celular, defensa frente a la toxicidad de radicales libres, síntesis del pigmento melanina, biosíntesis del tejido conjuntivo y metabolismo del hierro ¹.

En la actualidad, el cobre y sus complejos han producido un gran impacto en medicina debido a su uso como potenciales agentes antimicrobianos, antivirales, antiinflamatorios, antitumorales, inhibidores de enzimas o nucleasas químicas ⁴. En la mayoría de estos complejos el cobre suele coordinarse con moléculas aromáticas a través de átomos donadores como el N, O o S y, además, en muchos casos los ligandos suelen ser bases de Schiff ⁵. Algunos ejemplos de complejos de cobre con importante actividad biológica se muestran a continuación en la Figura 1.

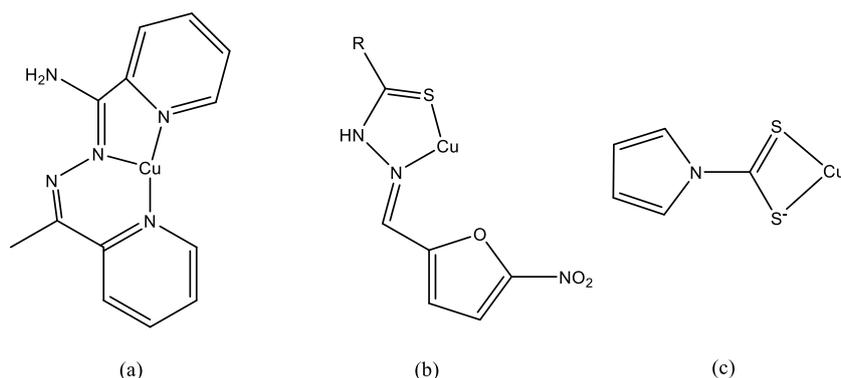


Figura 1. Esquema de las estructuras de complejos de cobre con importante actividad biológica: (a) piridil-2-carboxamidrazona con actividad anticancerígena, (b) 5-nitrofuran-2-carboxaldehído tiosemicarbazona con actividad antimicrobiana y (c) ditiocarbamato de pirrolidina como inhibidor de proteasoma e inductor de apoptosis ⁵.

1.3. Ligandos derivados de piridoxal

El fosfato de piridoxal es una de las variaciones de la vitamina B6 (Figura 2), que juega un papel fundamental en el sistema biológico, actuando como cofactor enzimático en reacciones de transaminación, descarboxilación, procesos de deshidratación y racemización. También tiene gran influencia en el metabolismo de los aminoácidos y es un potente antioxidante ⁶.

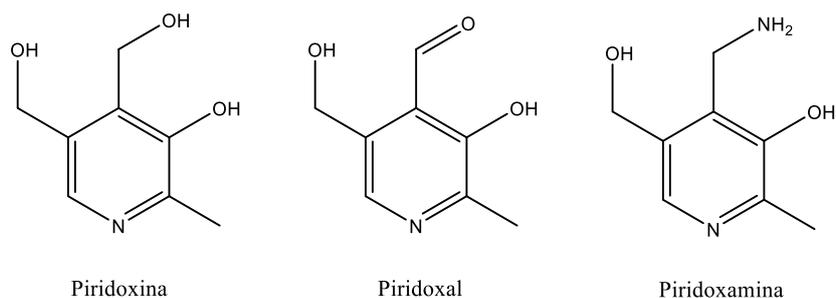


Figura 2. Esquema de las estructuras de las diferentes formas de presentarse el grupo piridoxal en la vitamina B6.

Además de su importante papel en los procesos biológicos, el grupo piridoxal también es interesante debido a la presencia de diferentes sitios de coordinación, lo que permite la formación de complejos metálicos. Al mismo tiempo, gracias a la presencia de un aldehído en su estructura, pueden realizar reacciones de condensación con aminas primarias dando lugar a iminas, presentando de esta forma mayor versatilidad de coordinación con centros metálicos ⁷. Particularmente, han generado gran interés las bases de Schiff, iminas con estructura general $RR'C=NR''$ donde R es un grupo orgánico, por el descubrimiento de sistemas modelo no enzimáticos que contienen piridoxal e iones metálicos que pueden imitar las reacciones enzimáticas que involucran a la vitamina B6 mediante la formación de complejos de bases de Schiff ⁸.

1.4. Actividades biológicas de hidrazonas

Las hidrazonas son compuestos orgánicos que pertenecen a la familia de bases de Schiff y están caracterizados por la presencia del grupo $R_1R_2C=NNR_3R_4$. Esta familia de compuestos posee aplicaciones en síntesis orgánica, química analítica y medicina. Además, presentan diferentes heteroátomos en su estructura que le permiten su uso en la química de coordinación como ligandos polidentados para la síntesis de complejos metálicos ⁹.

Las hidrazonas han cobrado un notable interés en la última década gracias a numerosos estudios que demuestran su aplicabilidad tanto en biología como farmacología por sus diversas actividades biológicas, como su actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antitumoral, antivírica, antituberculosa, anticonvulsiva y como agente analgésico, entre otras ^{6,10}. Además, a todas estas propiedades se le suma la escasez de efectos secundarios en pacientes. Por todo ello, en la actualidad ha incrementado en gran medida la síntesis y el estudio de estos compuestos portadores del grupo hidrazona para su uso en el desarrollo de nuevos fármacos, ya que parecen tener un futuro prometedor.

1.5. Complejos metálicos de hidrazonas como agentes anticancerígenos

Las múltiples aplicaciones de las hidrazonas mencionadas anteriormente pueden verse incluso más potenciadas cuando estas se coordinan con metales, ya que de esta forma se aumenta la lipofilia de los compuestos y, con ello, su actividad biológica ⁶. Así bien, en la actualidad se conocen diversos complejos basados en hidrazonas con un gran potencial como antitumoral, antimicrobiano y antituberculosis ⁹.

Entre todas las aplicaciones mencionadas los autores suelen centrarse en su actividad antitumoral debido al creciente aumento de la incidencia del cáncer en la población, siendo la principal causa de muerte a nivel mundial según la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 2020. A nivel global, los tipos de cánceres que causan mayor mortalidad son el cáncer de pulmón y el colorrectal, siendo este último el más diagnosticado en España ¹¹.

Actualmente, el tratamiento del cáncer se aborda desde diferentes disciplinas, entre las que se encuentran la cirugía y la radioterapia o tratamientos sistémicos como la hormonoterapia y la quimioterapia ¹². Esta última se basa en la administración de compuestos químicos por vía intravenosa o vía oral con el fin de destruir las células cancerígenas. Entre las estrategias principales para paliar el cáncer se busca que los fármacos actúen interrumpiendo el correcto flujo génico de las células mediante la unión de estos al ADN, forzando así la apoptosis. Sin embargo, estos fármacos no distinguen a las células cancerosas de células normales, por lo que, en la actualidad, se están desarrollando fármacos que actúen contra dianas terapéuticas, que son alteraciones genéticas o moleculares específicas de un tumor ¹³.

La mayoría de los fármacos antitumorales son sustancias puramente orgánicas, pero la química médica se está interesando cada vez más en el desarrollo de fármacos basados en complejos metálicos. Su amplio espectro de números de coordinación y geometrías ofrecen mecanismos de acción farmacológica que no pueden ser realizados por compuestos puramente orgánicos. El complejo metálico más conocido y utilizado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer es el cis-diaminodicloroplatino(II), comúnmente conocido como cisplatino (Figura 3) ¹⁴.

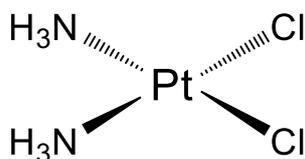


Figura 3. Estructura del cis-diaminodicloroplatino(II) o cisplatino.

El cisplatino se administra por vía intravenosa y dada la alta concentración de iones cloruro en el plasma sanguíneo se mantiene neutro, lo que le permite atravesar la membrana celular por difusión pasiva o por transporte activo a través de una molécula transportadora de cobre. Una vez en el interior celular, los ligandos cloruro son sustituidos por moléculas de agua debido a la menor concentración de iones cloruro con respecto al medio extracelular. De esta forma, la molécula queda cargada positivamente y puede atravesar la membrana nuclear. El complejo resultante es un potente electrófilo, por lo que puede interaccionar con diversos nucleófilos celulares como los grupos tiol de ciertas proteínas o nitrógenos dadores de los ácidos nucleicos. En este caso, este compuesto interacciona preferiblemente con los N7 de bases púricas del ADN (guaninas y adeninas), deformando la doble hélice e inhibiendo la replicación del ADN y, con ello, causando la muerte celular (Figura 4) ¹⁴.

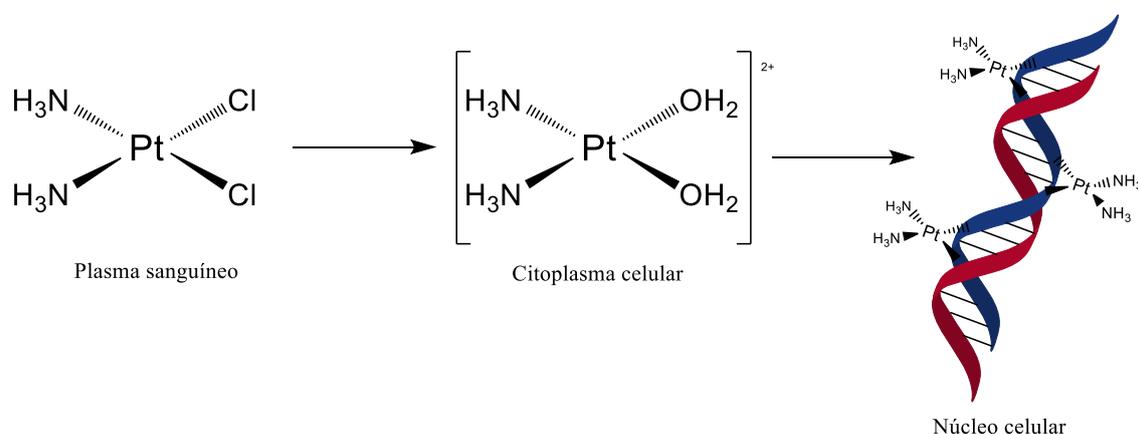


Figura 4. Mecanismo de acción del cisplatino como agente antitumoral.

Sin embargo, los complejos de platino no pueden tratar todo tipo de tumores y provocan efectos secundarios significativos, como toxicidad gastrointestinal y hematológica. Además, estos fármacos tienden a generar resistencias en las células cancerígenas, lo que reduce el impacto de los agentes ¹⁵. En base a esto, en la búsqueda de compuestos menos tóxicos cobran importancia los complejos metálicos de hidrazonas, especialmente los de cobre y zinc. Podrían tratarse de una buena alternativa a los complejos de platino, ya que el carácter endógeno de estos metales en el organismo induce menos efectos tóxicos.

2. Objetivos

En base a todo lo mencionado en la introducción y continuando con la línea de investigación del grupo NanoToxGen, el objetivo principal del presente trabajo es la síntesis de ligandos hidrazona derivados de piridoxal y sus respectivos complejos de cobre y el estudio de su interacción con el ADN y otras dianas biológicas como paso inicial en la valoración de su potencial como posibles agentes farmacológicos. Cabe destacar que este estudio fue complementado con un estudio de citotoxicidad en células de carcinoma pulmonar humano en el Trabajo de Fin de Grado de Biología coordinado con el presente.

De esta forma, los objetivos específicos del presente trabajo son:

1. Síntesis de ligandos hidrazona derivados de piridoxal (L1, L2 y L3) y sus respectivos complejos de cobre (II) (C1, C2, C3, C4 y C5).
2. Caracterización estructural de los compuestos mediante las técnicas de análisis elemental, espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja, espectroscopia RMN ^1H y ^{13}C y difracción de rayos X de monocristal.
3. Estudio de la estabilidad de los compuestos en disolución mediante espectroscopia de absorción UV-Vis.
4. Estudio de interacción de los compuestos con el ADN mediante espectroscopia de absorción UV-Vis y determinación de la constante de interacción.
5. Estudio *in silico* de la interacción de los compuestos con la diana proteica FABP6, un potencial candidato a marcador de diagnóstico temprano del Adenocarcinoma de Colon, mediante *molecular docking*.

3. Parte experimental

3.1. Reactivos y disolventes

A continuación, se indican los reactivos (Tabla 2) y disolventes (Tabla 3) que han sido empleados en la realización de este trabajo.

Tabla 2. Lista de reactivos empleados.

REACTIVOS
Hidrocloruro de piridoxal (Sigma-Aldrich, 99%)
4-Fluorobenzoico hidrazida (Sigma-Aldrich, 96%)
4-Bromobenzoico hidrazida (Sigma-Aldrich, 98%)
3-Bromobenzoico hidrazida (Sigma-Aldrich, 98%)
Cloruro de cobre (II) 2-hidrato (Panreac, 99,0-100,5%)
Trietilamina (Sigma-Aldrich, 99%)
Ct-ADN: Sal sódica de ácido desoxirribonucleico de timo de ternero (Tipo I, fibras, Sigma Aldrich)

Tabla 3. Lista de disolventes empleados.

DISOLVENTES
Metanol (Scharlab, 99,9%)
Diethyl éter (Fisher Chemical, 99%)
Dimetilsulfóxido-d ₆ (Merck, 99,96%)
Dihidrógeno fosfato sódico anhidro (Panreac, 99,0-100,5%)
Hidrógeno fosfato disódico anhidro (Panreac, 99%)

3.2. Síntesis de ligandos

La síntesis de los ligandos se llevó a cabo mediante una reacción de condensación entre hidrocloruro de piridoxal y las distintas hidrazidas: 4-fluorobenzoico hidrazida, 4-bromobenzoico hidrazida y 3-bromobenzoico hidrazida (Figura 5).

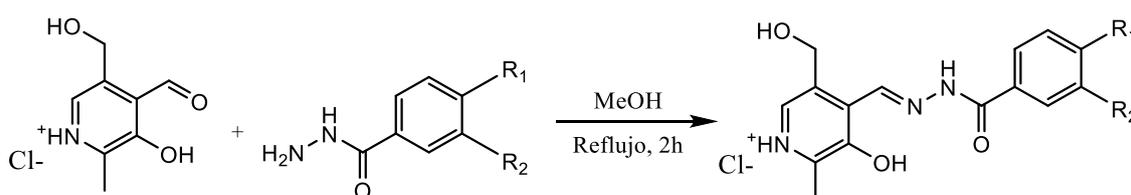


Figura 5. Reacción de síntesis de los ligandos: L1 ($R_1 = F$ y $R_2 = H$), L2 ($R_1 = Br$ y $R_2 = H$) y L3 ($R_1 = H$ y $R_2 = Br$).

En primer lugar, se disolvieron, por separado, cantidades equivalentes de ambos reactivos en la mínima cantidad de metanol (10-25 mL). Una vez disueltos por completo, se vertieron en un matraz de fondo redondo de 50 mL y se calentó a reflujo 2 horas.

El precipitado obtenido se filtró a vacío y se lavó con pequeñas porciones de metanol y dietiléter. Previamente al lavado se recogieron las aguas madres para conseguir la cristalización de más cantidad de producto. Por último, el precipitado se llevó al desecador para eliminar restos de humedad.

Además, se han estudiado otros dos ligandos ya sintetizados y caracterizados previamente (Figura 6).

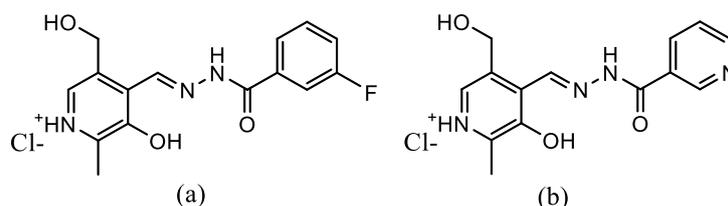


Figura 6. Estructuras de otros ligandos estudiados: (a) ligando L4 y (b) ligando L5.

3.3. Síntesis de complejos

La síntesis de los complejos se llevó a cabo mediante la reacción de cloruro de cobre (II) 2-hidrato y los ligandos previamente sintetizados (Figura 7). Además, para facilitar la coordinación del ligando, se añadió una base débil (trietilamina).

El procedimiento experimental es muy similar al descrito previamente para los ligandos. En primer lugar, se disolvieron, por separado, cantidades equivalentes de los dos reactivos en la mínima cantidad de metanol (10-25 mL). En el caso del ligando, se adicionó trietilamina en relación estequiométrica 2:1 (base:ligando). Una vez se disolvieron por completo, se vertieron en un matraz de fondo redondo de 50 mL y se calentó a reflujo 2 horas.

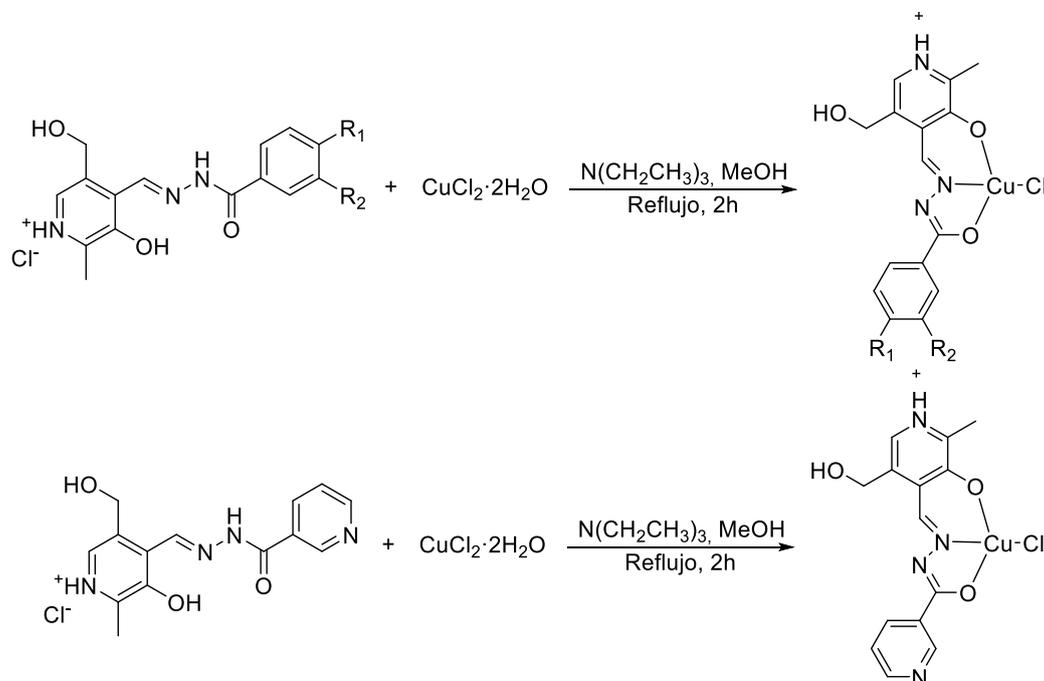


Figura 7. Reacciones de síntesis de los complejos. La primera se corresponde con los complejos C1 ($R_1 = F$ y $R_2 = H$), C2 ($R_1 = Br$ y $R_2 = H$), C3 ($R_1 = H$ y $R_2 = Br$) y C4 ($R_1 = H$ y $R_2 = F$), mientras que la segunda reacción se corresponde con el complejo C5.

El precipitado obtenido se filtró a vacío y se lavó con pequeñas porciones de metanol y dietiléter. Previamente al lavado, se recogieron las aguas madres para conseguir la cristalización de más cantidad de producto. Por último, el precipitado se llevó al desecador para eliminar restos de humedad.

3.4. Caracterización

Análisis elemental

La composición porcentual de carbono, nitrógeno e hidrógeno fue determinada por combustión en un analizador elemental Flash EA 1112 (ThermoQuest) en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

Espectrometría de masas

Los espectros de masas fueron obtenidos usando ionización por electrospray (ESI), tanto en modo positivo como negativo, usando un espectrómetro de masas LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

Espectroscopia infrarroja

Los espectros de IR fueron obtenidos por la técnica ATR (Attenuated Total Reflectance) con un espectrofotómetro FT-IR de infrarrojo medio (400 a 4000 cm^{-1}) BRUKER VECTOR 22 en los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña.

Espectroscopia RMN ^1H y RMN ^{13}C

Los espectros de RMN fueron obtenidos empleando un sistema de dos espectrómetros de Resonancia Magnética Nuclear de los Servicios de Apoyo á Investigación (SAI) de la Universidade da Coruña: Bruker AVANCE 500 equipado con una criosonda dual $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ y una sonda banda ancha BBI; y Bruker AVANCE III HD 400MHz, con una sonda BBFO (^1H , ^{19}F , ^{31}P - ^{15}N) y una sonda HR MAS ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$). Se ha empleado $\text{DMSO}-d_6$ como disolvente.

Difracción de rayos X de monocristal

Las estructuras cristalinas de los compuestos L1, L2, L3, C1, C2 y C4 fueron obtenidas con un difractor de rayos X de monocristal X8 APEX Kappa Bruker-Nonius con fuente de radiación Mo-K α ($\lambda=0,71073 \text{ \AA}$) por el método de escaneo φ - ω a baja temperatura. Las reflexiones fueron tomadas en un hemisferio de datos y se coleccionaron "frames" en intervalos de $0,3^\circ$ en ω . La resolución, refinado y representación de las distintas estructuras se realizaron utilizando los programas de los paquetes informáticos SHELXL y OLEX2 ^{16,17}.

3.5. Espectroscopia electrónica de absorción UV-Vis

Con el fin de conocer la estabilidad de los compuestos en disolución, se realizó un estudio de espectroscopia UV-Vis. Las medidas se han llevado a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis Jenway 6850 en un intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm en cubetas de cuarzo con camino óptico de 10 cm.

Para ello, previamente a la realización de las medidas se preparó una disolución de tampón fosfato 10 mM en agua ultrapura (pH = 7,4). A continuación, se prepararon las disoluciones stock de los distintos compuestos disolviendo aproximadamente 2 mg de compuesto en la cantidad mínima necesaria de tampón fosfato para su completa disolución. Se realizó una medida por espectroscopia de UV-Vis para conocer los intervalos de absorbancia de cada muestra.

A partir de la concentración adecuada, se realizaron medidas de espectroscopia UV-Vis a diferentes tiempos (t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{24h}) para comprobar que el espectro y, por lo tanto, el compuesto se mantiene estable.

3.6. Estudio experimental de interacción con el ADN: espectroscopia UV-Vis

La espectroscopia UV-Vis permite obtener información acerca de la interacción entre moléculas de pequeño tamaño y el ADN. Para ello, se realizaron medidas de absorbancia UV-Vis adicionando cantidades crecientes de ct-ADN y manteniendo constante la concentración del compuesto de estudio.

En primer lugar, se preparó la disolución stock de ADN de 1 mg/mL partiendo de las fibras de ct-ADN, las cuales se pesaron e hidrataron con la disolución de tampón fosfato durante un mínimo de 24 horas a 4°C para su correcta disolución. Una vez que el ADN se ha disuelto completamente, se determinó su concentración mediante una medida de absorbancia a 260 nm sabiendo que el coeficiente de absorción molar a esta longitud de onda es $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ¹⁸. Además, también fue necesario comprobar la pureza del ADN calculando la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm, correspondientes a los máximos de absorción del ADN y las proteínas respectivamente. La relación A_{260}/A_{280} debe encontrarse entre 1,8-1,9 para considerar que la disolución stock de ADN se encuentra suficientemente libre de proteínas ¹⁹. Una vez conocida la concentración de ADN de la disolución stock, se preparó una disolución de trabajo $1,7 \cdot 10^3 \mu\text{M}$.

A continuación, se prepararon las dos disoluciones de trabajo necesarias de los compuestos en tampón fosfato: 15 y 30 μM en los compuestos L2 y C4 y 20 y 40 μM en

los compuestos L1, L3, L4 y L5. El resto de los compuestos no pudieron estudiarse debido a su baja solubilidad.

Una vez preparadas todas las disoluciones necesarias, se llevó a cabo el experimento mediante adiciones directamente en la cubeta de medida. Para el primer punto experimental se tomó un volumen de 2 mL de la disolución 15 o 20 μM en función del compuesto y como referencia se empleó el mismo volumen de tampón fosfato. En los siguientes puntos experimentales se adicionaron sucesivamente 50 μL de ADN tanto en la cubeta de muestra como en la de referencia. Además, para mantener la concentración de compuesto constante, se adicionó la misma cantidad (50 μL) de la disolución doblemente concentrada (30 o 40 μM en función del compuesto) en la cubeta de muestra y de tampón fosfato en la de referencia. De esta forma, se consiguió mantener la concentración de compuesto constante (15 o 20 μM) y aumentar la concentración de ct-ADN en un intervalo de 0-283 μM . Las medidas de absorbancia se registraron siempre entre 190 y 500 nm.

A partir de los datos de absorbancia obtenidos se pudo evaluar de forma cuantitativa la interacción compuesto-ADN calculando la constante de interacción mediante la ecuación de Benesi-Hildebrand (1) ²⁰:

$$\frac{A_0}{A - A_0} = \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} + \frac{\varepsilon_G}{\varepsilon_{H-G} - \varepsilon_G} \cdot \frac{1}{K_b \cdot [ADN]} \quad (1)$$

Donde K_b es la constante de interacción, A_0 y A son las absorbancias del compuesto y de la especie formada entre el compuesto y el ADN, respectivamente, y ε_G y ε_{H-G} son los coeficientes de absorción del compuesto y de la especie compuesto-ADN, respectivamente.

Por otro lado, los datos también aportaron información cualitativa acerca del tipo de interacción que tuvo lugar. En general, un compuesto tras la interacción con el ADN puede provocar los siguientes cambios en su espectro original:

- (a) La unión por intercalación entre los pares de bases del ADN provoca una disminución de la intensidad de absorción del compuesto (efecto hipocrómico) y un desplazamiento de su máximo hacia mayores longitudes de onda (efecto batocrómico) como consecuencia de las interacciones π - π entre los sustituyentes aromáticos del cromóforo y los pares de bases del ADN ²¹. El acoplamiento entre el orbital π^* vacío de la molécula y el orbital π^* de las bases nitrogenadas del ADN provoca una reducción de la energía necesaria para la transición $\pi \rightarrow \pi^*$, lo que produce un desplazamiento hacia mayores longitudes de onda del máximo de

- absorción. Además, también disminuyen las probabilidades del tránsito electrónico por el llenado parcial del orbital π^* vacío, lo cual contribuye al efecto hipocrómico ²².
- (b) La interacción de los compuestos con el ADN mediante unión a los surcos provoca también un efecto hipocrómico, pero acompañado de un pequeño o nulo efecto batocrómico ²³.
- (c) La formación de un enlace covalente entre el compuesto y la doble hélice provoca la desnaturalización del ADN. Cuando esto sucede, las fuerzas que mantienen unidas las cadenas de ADN (mayoritariamente enlaces de hidrógeno) disminuyen, reduciéndose así el efecto que tienen como limitadoras de la resonancia del anillo aromático de las bases nitrogenadas. Esto se traduce en un aumento de la intensidad de absorción (efecto hiperocrómico) debido a la presencia de bases nitrogenadas en su forma libre ¹⁹.

3.7. Estudio computacional de interacción con una diana proteica: *molecular docking*

Se ha llevado a cabo un estudio *in silico* mediante *molecular docking* para conocer la forma más probable y la fortaleza de interacción de los compuestos con la diana proteica FABP6.

Numerosos estudios coinciden que el gen FABP6 presenta todas las características para ser propuesto como potencial candidato a marcador de diagnóstico temprano del Adenocarcinoma de Colon (COAD) debido a su especificidad en el tejido tumoral del colon y su falta de expresión en el tejido adyacente sano ²⁴. Por ello, teniendo en cuenta la gran incidencia de este tipo de cáncer, tal y como se menciona en la introducción, se ha estudiado la interacción de los distintos compuestos con las diferentes conformaciones de la proteína del gen FABP6, con el fin de buscar una posible inhibición de la actividad de la proteína.

Con el objetivo de cuantificar la interacción de los compuestos con la diana proteica FABP6 se ha empleado la técnica *molecular docking* para calcular la energía de afinidad (ΔE) entre un compuesto y una diana proteica (en kcal/mol). Esta energía se calcula mediante Mecánica Molecular, sumando las interacciones electrostáticas y de Van der Waals entre todos los átomos que interaccionan del compuesto y de la proteína. Por lo tanto, cuanto más negativos sean los valores de ΔE , mayor será la interacción, considerándose generalmente una interacción significativa cuando $\Delta E < -7,0$ kcal/mol ²⁴. Durante el *molecular docking*, la diana proteica se ha mantenido rígida y el ligando flexible para adaptarse a la superficie de interacción de la proteína.

Como hay diferentes estructuras cristalinas en el PDB databank para la misma diana proteica FABP6 (proteínas que resultan desde el mismo gen con splicing, etc.), se han calculado ΔE para cada par ligando-estructura PDB. Se han estudiado 4 ligandos (L1, L2, L4 y L5) y 6 estructuras PDB correspondientes a la proteína FABP6 (1O1U, 1O1V, 2MM3, 5L8I, 5L8N, 5L8O).

La metodología del *molecular docking* tiene los siguientes pasos:

1. Obtener las estructuras de los compuestos de las dianas proteicas en el formato PDB. La estructura de los compuestos se obtuvo mediante cristalografía de rayos X y la de las proteínas desde la plataforma PDB databank.
2. Preparar la proteína con un editor de texto. Se extrajo solo la parte proteica de la proteína en el PDB y se escogió sólo el modelo 1 (si hay más modelos).
3. Convertir los formatos PDB en formato PDBQT para añadir la carga parcial de cada átomo (necesarias para el cálculo de ΔE). En los compuestos se empleó el programa obabel, mientras que, en la proteína se usó el programa ADT tools, añadiendo los hidrógenos y las cargas específicas a los átomos de la proteína.
4. Definir la región de búsqueda en la superficie de la proteína como una “caja” limitada en el sitio activo de las estructuras proteicas. La región en la proteína para la búsqueda de interacción con un compuesto determinado es la misma donde se conoce que es el sitio activo de esta proteína (donde normalmente tiene interacción con su ligando natural).
5. Calcular la ΔE mediante *docking* para cada par compuesto-estructura proteica con el software libre Autodock Vina. Cada cálculo necesita los archivos PDBQT del compuesto y de la diana proteica y el archivo de configuración con la “caja” de búsqueda. Los resultados de cada *molecular docking* ofrece los mejores modos de interacción de cada compuesto con su diana proteica. El modo más interesante es el primero, ya que tiene la mejor energía de afinidad (ΔE).

4. Resultados y discusión

4.1. Síntesis

A continuación, se muestran los rendimientos de todas las síntesis que se han llevado a cabo en el presente trabajo y el aspecto de los compuestos (Tabla 4).

Tabla 4. Aspecto y rendimiento de los compuestos sintetizados.

Compuesto	Aspecto	Rendimiento
Ligando 1	Cristales amarillos	76 %
Ligando 2	Cristales amarillos claro	75 %
Ligando 3	Polvo blanco + cristales naranjas clarito	70 %
Complejo 1	Cristales verdes militar	89 %
Complejo 2	Cristales marrones verdoso	91 %
Complejo 3	Polvo marrón claro	63 %
Complejo 4	Cristales verdes oscuro	61 %
Complejo 5	Polvo verde militar	90 %

4.2. Caracterización

La caracterización de los compuestos se realizó mediante análisis elemental, espectrometría de masas, espectroscopia infrarroja, espectroscopia RMN ^1H y ^{13}C y difracción de rayos X de monocristal. Los espectros obtenidos mediante estas técnicas y los resultados cristalográficos se recogen en el apartado "Anexos".

Análisis elemental

Los análisis elementales permiten confirmar que las muestras analizadas se corresponden con las estructuras buscadas. Además, se puede conocer si hay solvatación con disolventes como el agua o el metanol.

En la siguiente tabla se recogen los porcentajes teóricos de los compuestos y los obtenidos experimentalmente (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados teóricos y experimentales de la técnica de análisis elemental para los ligandos y complejos sintetizados.

Compuesto		C (%)	H (%)	N (%)
Ligando 1	Experimental	50,83	4,49	11,49
	Teórico (L1·H ₂ O)	50,36	4,79	11,75
Ligando 2	Experimental	44,63	3,71	9,86
	Teórico (L2)	44,97	3,77	10,49
Ligando 3	Experimental	45,01	3,42	10,16
	Teórico (L3)	44,97	3,77	10,49
Complejo 1	Experimental	42,20	4,49	8,91
	Teórico (C1·H ₂ O· CH ₃ OH)	42,58	4,24	9,31
Complejo 2	Experimental	36,83	3,80	7,68
	Teórico (C2·2H ₂ O·CH ₃ OH)	36,24	3,99	7,92
Complejo 3	Experimental	35,53	2,91	7,91
	Teórico (C3·2H ₂ O)	36,16	3,44	8,43
Complejo 4	Experimental	42,75	3,79	9,51
	Teórico (C4·H ₂ O)	42,97	3,61	10,02
Complejo 5	Experimental	43,51	4,64	12,64
	Teórico (C6· 2CH ₃ OH)	42,86	4,72	12,50

Los resultados obtenidos se ajustan bastante bien a las estructuras propuestas tanto para los ligandos (Figura 5) como para los complejos (Figura 7).

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas permite conocer la composición y las relaciones isotópicas de los átomos que forman parte de los compuestos midiendo las relaciones masa/carga de los iones moleculares.

Los espectros se han obtenido mediante la técnica de ionización electrospray (ESI) que, al ser menos agresiva, permite observar los fragmentos de las moléculas de mayor masa. En la siguiente tabla se muestran las señales más intensas de los diferentes compuestos asignadas a su correspondiente ion molecular (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de las señales más intensas obtenidas en espectroscopía de masas (ESI⁺ y ESI⁻) para iones moleculares de los ligandos y complejos sintetizados, expresadas en relación m/z.

		ESI ⁺		ESI ⁻
L1	[C ₁₅ H ₁₅ FN ₃ O ₃] ⁺	304,1090	[C ₁₅ H ₁₃ FN ₃ O ₃] ⁻	302,0948
	[C ₁₅ H ₁₄ FN ₃ NaO ₃] ⁺	326,0909	[C ₁₅ H ₁₄ ClFN ₃ O ₃] ⁺	338,0712
L2	[C ₁₅ H ₁₅ BrN ₃ O ₃] ⁺	364,0924	[C ₁₅ H ₁₃ BrN ₃ O ₃] ⁻	362,0140
			[C ₁₅ H ₁₄ BrClN ₃ O ₃] ⁻	399,9881
			[C ₃₀ H ₂₈ Br ₂ ClN ₆ O ₆] ⁻	763,0092
L3	[C ₁₅ H ₁₅ BrN ₃ O ₃] ⁺	364,0294	[C ₁₅ H ₁₃ BrN ₃ O ₃] ⁻	362,0145
			[C ₁₅ H ₁₄ BrClN ₃ O ₃] ⁻	399,9888
			[C ₃₀ H ₂₈ Br ₂ ClN ₆ O ₆] ⁻	763,0106
C1	[C ₁₅ H ₁₃ CuFN ₃ O ₃] ⁺	365,0233	[C ₁₅ H ₁₁ CuFN ₃ O ₃] ⁺	364,0168
	[C ₁₆ H ₁₇ CuFN ₃ O ₄] ⁺	397,0495	[C ₁₅ H ₁₂ ClCuFN ₃ O ₃] ⁻	398,9856
C2	[C ₁₅ H ₁₃ BrCuN ₃ O ₃] ⁺	426,9413	[C ₁₅ H ₁₂ BrClCuN ₃ O ₃] ⁻	460,9035
	[C ₁₆ H ₁₇ BrCuN ₃ O ₄] ⁺	458,9675	[C ₃₀ H ₂₄ Br ₂ ClCu ₂ N ₆ O ₆] ⁻	884,8398
	[C ₃₀ H ₂₆ Br ₂ ClCu ₂ N ₆ O ₆] ⁺	888,8532	[C ₃₀ H ₂₄ Br ₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₆ NaO ₆] ⁻	944,7959
C3	[C ₁₅ H ₁₃ BrCuN ₃ O ₃] ⁺	426,9413	[C ₁₅ H ₁₂ BrClCuN ₃ O ₃] ⁻	460,9036
	[C ₁₆ H ₁₇ BrCuN ₃ O ₄] ⁺	458,9673	[C ₃₀ H ₂₄ Br ₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₆ NaO ₆] ⁻	944,7962
C4	[C ₁₅ H ₁₃ CuFN ₃ O ₃] ⁺	365,0234	[C ₁₅ H ₁₂ ClCuFN ₃ O ₃] ⁻	398,9856
			[C ₁₅ H ₁₁ CuFN ₃ O ₃] ⁻	365,0243
	[C ₁₆ H ₁₇ CuFN ₃ O ₄] ⁺	397,0494	[C ₃₀ H ₂₂ Cu ₂ F ₂ KN ₆ O ₆] ⁻	764,9997
			[C ₃₀ H ₂₄ Cl ₂ Cu ₂ F ₂ N ₆ NaO ₆] ⁻	822,9578
C5	[C ₁₄ H ₁₃ CuN ₄ O ₃] ⁺	348,0278	[C ₁₄ H ₁₂ ClCuN ₄ O ₃] ⁻	381,9900
	[C ₁₅ H ₁₇ CuN ₄ O ₄] ⁺	380,0539	[C ₁₄ H ₁₁ CuN ₄ O ₃] ⁻	347,0212
	[C ₂₈ H ₂₅ Cu ₂ N ₈ O ₆] ⁺	697,0467		

Analizando los espectros de masas en modo positivo de los ligandos, en los tres casos se identifica como señal de máxima intensidad al ligando protonado. En el caso de los complejos también es posible identificar en todos los casos como señal de máxima intensidad al complejo protonado sin la coordinación del ion cloruro.

Por otro lado, en cuanto a los espectros de masas en modo negativo, se identifica para los tres ligandos como señal de máxima intensidad al anión del ligando debido a la pérdida de un átomo de hidrógeno. En el caso de los complejos la señal de máxima intensidad se corresponde con el complejo coordinado a un ion cloruro.

Todos los espectros junto con las estructuras correspondientes a las señales de máxima intensidad que se acaban de mencionar se encuentran en el apartado “Anexos” (Figuras 20-35).

Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja permite estudiar la presencia de grupos funcionales concretos en los compuestos de estudio. Esta técnica se basa en la diferencia de las frecuencias de vibración de los diferentes enlaces de la molécula en función de su energía. En el presente trabajo se identificaron las bandas más representativas de los diferentes compuestos en base a resultados obtenidos por otros autores en compuestos similares^{9,10}.

En este caso, los ligandos presentan una banda característica sobre 1680 cm^{-1} correspondiente a la vibración de tensión $\nu(\text{C}=\text{O})$, la cual indica que el ligando se encuentra en su forma libre y que el compuesto en estado sólido se encuentra en su forma cetónica. También es indicativo de que el ligando se encuentra en su forma libre la presencia de una banda poco intensa sobre $1620\text{-}1631\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la $\nu(\text{C}=\text{N})$ y otra banda sobre $1000\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a $\nu(\text{N-N})$.

En el caso de los complejos, la ausencia de la banda correspondiente a la vibración de tensión $\nu(\text{C}=\text{O})$ junto con la aparición de una banda sobre $1200\text{-}1220\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la $\nu(\text{C-O}_{\text{enol}})$ indica que el ligando se ha coordinado. También es indicativo de esta coordinación el aumento de intensidad y desplazamiento de la banda correspondiente a la $\nu(\text{C}=\text{N})$ por debajo de 1600 cm^{-1} , lo cual es debido a la disminución del carácter de doble enlace y, con ello, de la fortaleza de enlace por la coordinación con el cobre a través del nitrógeno^{10,25}. La banda correspondiente a la $\nu(\text{N-N})$ también se desplaza a números de onda un poco mayores por la disminución de la repulsión entre los pares de no enlace de los dos nitrógenos debido a la coordinación con el cobre a través de uno de ellos.

Además, en todos los casos aparece una banda correspondiente a la vibración $\nu(\text{N-H})$ sobre $3160\text{-}3370\text{ cm}^{-1}$. En el caso de los ligandos esta banda es más intensa por la presencia del enlace N-H en el enlace del grupo hidrazona.

En la siguiente tabla se muestran las bandas representativas acabadas de mencionar para cada uno de los compuestos de estudio (Tabla 7) y en el apartado “Anexos” se encuentran todos los espectros (Figuras 36-43).

Tabla 7. Bandas más representativas en cm^{-1} obtenidas mediante espectroscopia de infrarrojo de los compuestos de estudio.

Compuesto	$\nu(\text{N-H})$	$\nu(\text{C=O})$	$\nu(\text{C=N})$	$\nu(\text{C-O}_{\text{enol}})$	$\nu(\text{N-N})$
Ligando 1	3161,58	1682,25	1631,32	-	1046,64
Ligando 2	3298,66	1674,13	1621,87	-	1007,97
Ligando 3	3325,66	1675,65	1622,89	-	1053,83
Complejo 1	3229,89	-	1599,99	1224,40	1090,35
Complejo 2	3369,02	-	1590,07	1202,00	1051,86
Complejo 3	3344,01	-	1588,68	1222,15	1075,68
Complejo 4	3342,11	-	1574,71	1216,51	1088,92
Complejo 5	3344,26	-	1603,99	1242,27	1029,75

Espectroscopia RMN ^1H y RMN ^{13}C

La espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C permite conocer el comportamiento de las especies en disolución. En este caso solo se pudieron analizar los ligandos ya que el Cu (II) al tratarse de una especie paramagnética dificulta el estudio por la presencia del electrón desapareado, que deriva en un ensanchamiento y desplazamiento de las señales ²⁶.

En el apartado “Anexos” se encuentran todos los espectros (Figuras 44-49) y a continuación se muestra la asignación de todas las señales obtenidas.

Ligando 1

^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6): δ (ppm) 2,64 (3H, s, Ar- CH_3), 4,78 (2H, s, Ar- $\text{CH}_2\text{-OH}$), 7,44 (2H, t, 3,5- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 8,15 (2H, dd, 2,4- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 8,23 (1H, s, $\text{H}_{\text{Ar-piridoxal}}$), 9,09 (1H, s, CH=N), 13,23 (2H, s, N- $\text{H}_{\text{hidrazona}}$ + $\text{OH}_{\text{piridoxal}}$).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 15,71 (CH_3 , Ar- C_{CH_3}), 58,71 (CH_2 , Ar- $\text{CH}_2\text{-OH}$), 116,35 (2CH, d, 3,5- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 126,76 (C, $\text{C}_{\text{Ar-C=O}}$), 128,49 (C, $\text{C}_{\text{Ar-piridoxal-CH}_2\text{-OH}}$), 131,07 (CH, $\text{C}_{\text{H}_{\text{piridoxal}}}$), 131,33 (2CH, d, 2,6- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 136,69 (C, $\text{C}_{\text{Ar-piridoxal-CH=N}}$), 144,45 (C, $\text{C}_{\text{Ar-piridoxal-CH}_3}$), 144,59 (CH, $-\text{CH=N}$), 153,20 (C, $\text{C}_{\text{Ar-piridoxal-OH}}$), 162,63 (C, C=O), 163,97 (C, d, $\text{C}_{\text{Ar-benz-F}}$).

Ligando 2

^1H RMN (400 Mz, DMSO- d_6): δ (ppm) 2,62 (3H, s, Ar- CH_3), 4,77 (2H, s, Ar- $\text{CH}_2\text{-OH}$), 7,83 (2H, d, 3,5- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 8,00 (2H, d, 2,6- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 8,22 (1H, s, $\text{H}_{\text{Ar-piridoxal}}$), 9,06 (1H, s, CH=N), 13,09 (1H, s, $-\text{OH}_{\text{piridoxal}}$), 13,18 (1H, s, N- $\text{H}_{\text{hidrazona}}$).

^{13}C RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 15,26 (CH_3 , Ar- C_{CH_3}), 58,21 (CH_2 , Ar- $\text{CH}_2\text{-OH}$), 126,15 (C, $\text{C}_{\text{Ar-benz-Br}}$), 126,75 (C, $\text{C}_{\text{Ar-piridoxal-CH}_2\text{-OH}}$), 129,99 (2CH, 2,6- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 130,55

(CH, $\underline{\text{C}}_{\text{piridoxal}}$), 130,76 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-benz-C=O}}$), 131,85 (CH, 3,5- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 136,20 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-C=N}}$), 144,02 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-CH}_3}$), 144,37 (CH, $-\underline{\text{C}}_{\text{H=N}}$), 152,70 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-OH}}$), 162,31 (C, C=O).

Ligando 3

$^1\text{H RMN}$ (400 Mz, DMSO- d_6) δ (ppm) 2,64 (3H, s, Ar- $\underline{\text{C}}_{\text{H}_3}$), 4,78 (2H, s, Ar- $\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}$ -OH), 7,58 (1H, t, 5- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 7,88 (1H, d, 2- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 8,05 (1H, d, 6- $\text{H}_{\text{Ar-benz}}$), 8,23 (2H, s, $\text{H}_{\text{Ar-piridoxal}+2-\text{H}_{\text{Ar-benz}}}$), 9,07 (1H, s, $\underline{\text{C}}_{\text{H=N}}$), 13,07 (1H, s, $-\underline{\text{O}}_{\text{H}_{\text{piridoxal}}}$), 13,22 (1H, s, N- $\underline{\text{H}}_{\text{hidrazona}}$).

$^{13}\text{C RMN}$ (500 MHz, DMSO- d_6): δ (ppm) 15,00 (CH_3 , Ar- $\underline{\text{C}}_{\text{H}_3}$), 58,17 (CH_2 , Ar- $\underline{\text{C}}_{\text{H}_2}$ -OH), 121,94 (C, $\text{C}_{\text{Ar-benz-Br}}$), 126,45 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-OH}}$), 127,21 (CH, 6- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 130,13 (CH, $\underline{\text{C}}_{\text{H}_{\text{piridoxal}}}$), 130,44 (CH, 2- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 131,04 (CH, 5- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 133,61 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-C=O}}$), 135,50 (CH, 4- $\text{C}_{\text{Ar-benz}}$), 136,51 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-CH=N}}$), 143,77 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-CH}_3}$), 144,46 (CH, $\underline{\text{C}}_{\text{H=N}}$), 152,82 (C, $\underline{\text{C}}_{\text{Ar-piridoxal-OH}}$), 161,76 (C, C=O).

Con esta técnica se puede confirmar que la estructura de los ligandos sintetizados corresponde con la teórica propuesta (Figura 5).

Difracción de rayos X de monocristal

Se han podido estudiar mediante esta técnica los ligandos 1, 2 y 3 y los complejos 1, 2 y 4 gracias a la obtención de cristales aptos para su estudio por esta técnica por la lenta evaporación de las aguas madres obtenidas después de filtrar el precipitado formado en cada síntesis.

Las tablas con todos los datos del refinado estructural, distancias y ángulos de enlace aparecen recogidos en el apartado "Anexos" (Tablas 11-22).

Ligando 1

El ligando 1 presenta una estructura prácticamente plana. Aparece protonado en el nitrógeno N3 del grupo piridoxal con un anión cloruro como contraión y solvatado con una molécula de metanol (Figura 8). La especie cristaliza en un sistema monoclinico y pertenece al grupo espacial $P2_1/n$ (Tabla 11).

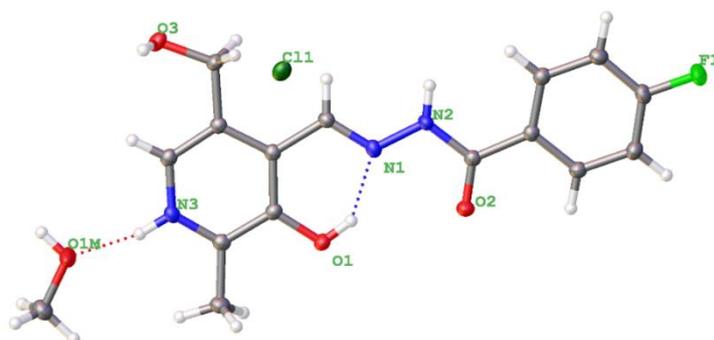


Figura 8. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del ligando 1 obtenida mediante el programa OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

El compuesto presenta enlaces de hidrógeno entre el anión cloruro y los grupos N2-H, O3-H y O1M-H y entre el grupo N3-H y el átomo O1M del metanol. Además, presenta enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el grupo O1-H y los átomos N1 y O2 (Tabla 12).

Además de los enlaces de hidrógeno ya mencionados, las interacciones intermoleculares que estabilizan el empaquetamiento cristalino son apilamientos π - π entre el anillo aromático del piridoxal y el anillo del fluorobenceno con una distancia de 3,655 Å entre los centroides marcados en la Figura 9 con una línea punteada gruesa. Además, en este caso son de gran importancia los enlaces del hidrógeno presentes del tipo C-H...O, marcados en la Figura 9 con líneas punteadas finas, entre el oxígeno del grupo carbonílico y los grupos CH del fluorobenceno con una distancia de 2,385 Å y CH₃ del piridoxal con una distancia 2,346 Å, similares a los enlaces de hidrógeno mencionados anteriormente.

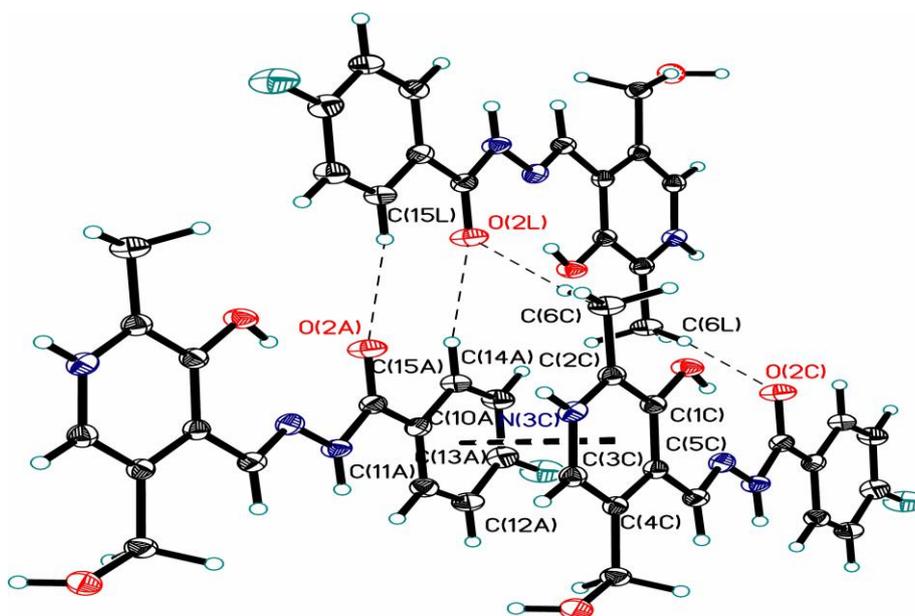


Figura 9. Imagen de las interacciones intermoleculares del ligando 1 obtenida mediante el programa SHELXTL. La línea negra punteada gruesa representa las interacciones π - π , mientras que las finas representan enlaces de hidrógeno.

Ligando 2

El ligando 2 presenta una estructura prácticamente plana, aparece protonado en el nitrógeno N3 del grupo piridoxal con un anión cloruro como contraión y solvatado con una molécula de metanol. Pero en este caso la unidad asimétrica contiene un dímero (Figura 10), lo cual es debido a la interacción entre el par de no enlace del bromo y el anillo aromático del grupo piridoxal. Esta interacción no aparece en el ligando 1 con el flúor ya que el bromo es un átomo más grande y menos electronegativo por lo que el par de no enlace está más disponible para interactuar con la nube π del anillo aromático. La especie cristaliza en un sistema triclinico y pertenece al grupo espacial $P\bar{1}$ (Tabla 13).

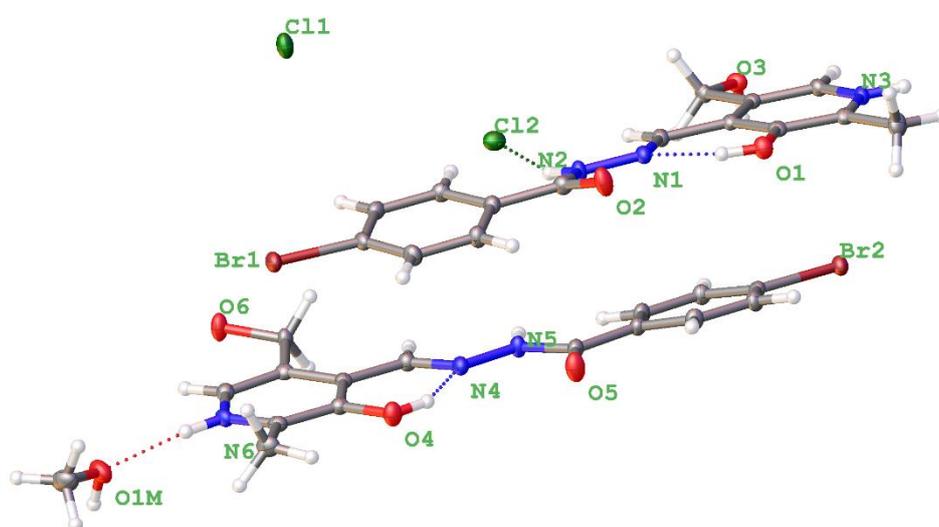


Figura 10. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del ligando 2 obtenida mediante el programa OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

Esta especie presenta enlaces de hidrógeno entre el ion cloruro 1 y los grupos N3-H, O6-H y O1M-H, entre el ion cloruro 2 y los grupos N2-H y O3-H y entre el átomo O1M del metanol y el grupo N6-H. Además, también presenta un enlace de hidrógeno intermolecular entre el grupo N5-H y el átomo O3 y enlaces de hidrógeno intramoleculares entre el grupo O1-H y el átomo N1 y entre el grupo O4-H y el átomo N4 (Tabla 14).

Otras interacciones intramoleculares que mantienen unido el empaquetamiento cristalino, además de los enlaces de hidrógeno, son la fuerte interacción ya mencionada entre la nube π del anillo del grupo piridoxal y el par de no enlace del bromo con una distancia de 3,591 Å en el caso del átomo de Br1 y de 3,372 Å en el caso del Br2 y la interacción entre la nube π del bromobenceno y la nube π del doble enlace C=N con una distancia de 3,415 Å en el caso del enlace C8-N1 y de 3,688 Å en el caso del enlace C23-N4 (Figura 11).

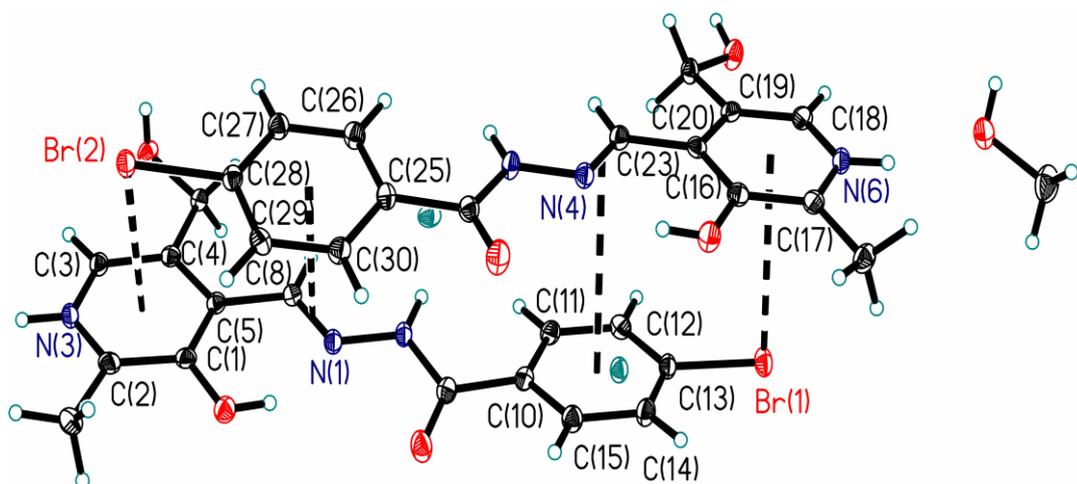


Figura 11. Imagen de las interacciones intermoleculares del ligando 2 representadas mediante las líneas negras punteadas. La imagen ha sido obtenida mediante el programa SHELXTL.

Ligando 3

El ligando 3 presenta una estructura prácticamente plana, aparece protonado en el nitrógeno N3 del grupo piridoxal con un anión cloruro como contraión (Figura 12). La especie cristaliza en un sistema monoclinico y pertenece al grupo espacial $P2_1/n$ (Tabla 15).

En este caso se puede observar un desorden en el bromobenceno, ya que el átomo de bromo aparece en las dos posiciones *meta*- (Figura 12), lo cual se debe a un tipo de isomería que pueden presentar este tipo de compuestos conocido como atropisomería. Los atropisómeros son confórmeros que, debido a restricciones estéricas o electrónicas, se interconvierten de forma suficientemente lenta como para poder observarlos. Esta rotación alrededor de un enlace simple puede provocar que un compuesto aparentemente simple sea en realidad una mezcla de dos ²⁷.

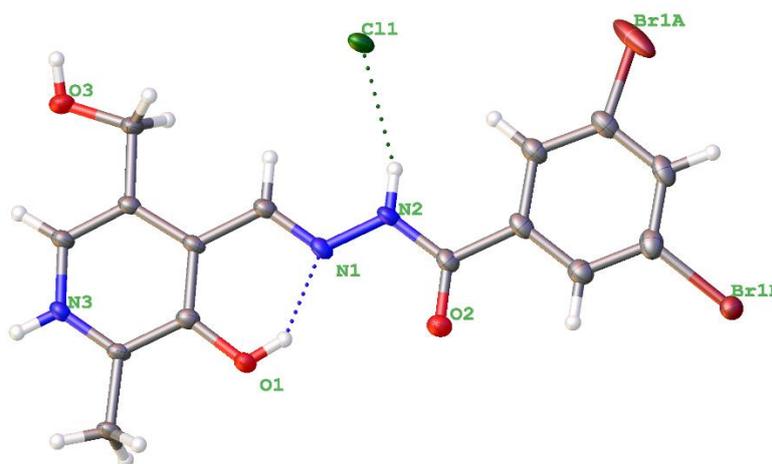


Figura 12. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del ligando 3 obtenida mediante el programa OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

En cuanto a los enlaces de hidrógeno, esta especie presenta dos enlaces de hidrógeno entre el ion cloruro y los grupos N2-H, O3-H y N3-H y, además, otro enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo O1-H y el átomo N1 (Tabla 16).

Complejo 1

La especie cristalina del complejo 1 se corresponde con un complejo planoc cuadrado de Cu (II). El centro metálico aparece coordinado a una molécula de metanol y al ligando 1, que actúa de manera tridentada y se enlaza a través de los átomos ONO. El ligando se encuentra protonado en el nitrógeno N3 del anillo del grupo piridoxal, de forma que el complejo resultante presenta una carga positiva contrarrestada por un anión cloruro que se encuentra como contraión. El átomo de oxígeno O3 presenta también un desorden por atropoisomería que fue refinado (Figura 13). La especie cristaliza en un sistema monoclinico y pertenece al grupo espacial $P2_1/c$ (Tabla 17). Además, en cuanto a los enlaces de hidrógeno que estabilizan al compuesto, únicamente interactúan el anión cloruro con el grupo N3-H (Tabla 18).

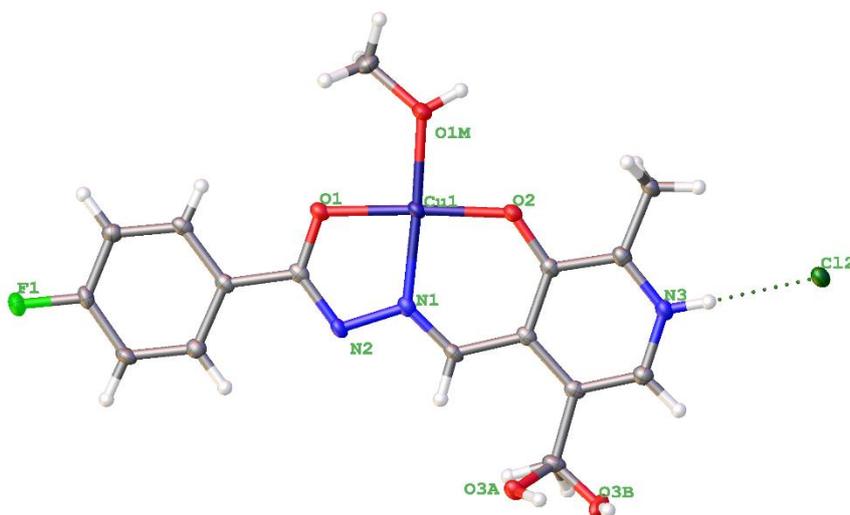


Figura 13. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del complejo 1 obtenida mediante el programa OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

Complejo 2

La especie cristalina del complejo 2 se corresponde a un complejo planoc cuadrado de Cu (II). El centro metálico aparece coordinado a un ion cloruro y al ligando 2, que actúa de forma tridentada y se enlaza a través de los átomos ONO. Además, aparecen también dos moléculas de metanol en la unidad asimétrica. El ligando aparece protonado en el átomo de nitrógeno N3 del anillo del grupo piridoxal, de forma que se trata de un complejo neutro (Figura 14). La especie cristaliza en un sistema monoclinico y pertenece al grupo espacial $P2_1/c$ (Tabla 19).

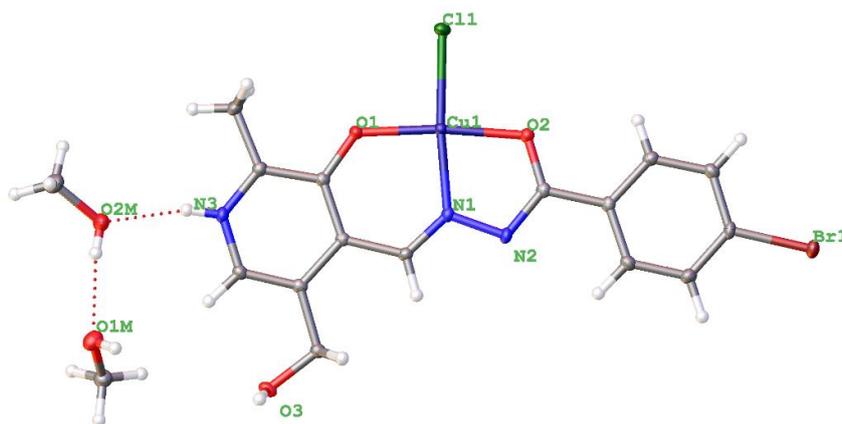


Figura 14. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del complejo 2 obtenida mediante el programa OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

Esta especie presenta diversos enlaces de hidrógeno que estabilizan al compuesto entre el ion cloruro y los grupos O3-H y O1M-H, entre las dos moléculas de metanol a través del grupo O2M-H y el átomo O1M, entre el grupo N3-H y el átomo O2M del metanol y un enlace intermolecular entre el grupo O3-H y el átomo O2 (Tabla 20).

Complejo 4

La especie cristalina del complejo 4 se corresponde a un complejo de Cu (II) con geometría piramidal de base cuadrada ligeramente distorsionada. El centro metálico aparece coordinado a dos iones cloruros y al ligando 2, que actúa de forma tridentada a través de los átomos ONO (Figura 15). Sin embargo, los dos iones cloruros no se coordinan de la misma forma y las distancias al centro metálico no son iguales. La distancia entre el átomo cobre y el átomo de cloro 1 es mayor, por lo que este enlace es más débil y podría haber un equilibrio entre la especie con geometría piramidal de base cuadrada y la especie con geometría planocuadrada, que contendría un sólo ion cloruro. Además, aparece también en la estructura obtenida una molécula de metanol.

Por otro lado, el ligando aparece protonado en el átomo de nitrógeno N3 del anillo del grupo piridoxal y en el átomo de nitrógeno N2 del enlace hidrazona, de forma que se trata de un complejo neutro (Figura 15). Esta especie cristaliza en un sistema monoclinico y pertenece al grupo espacial $P2_1/c$ (Tabla 21). Presenta diversos enlaces de hidrógeno que estabilizan al compuesto entre el ion cloruro Cl1 y los grupos O1M-H y N2-H, entre el ion cloruro Cl2 y el grupo N3-H y entre el átomo de F1A y el grupo O3-H (Tabla 22).

Además, en este caso se puede observar también la atropoisomería, ya que el fluor del fluorobenceno presenta un desorden en la estructura y se observa en las dos posiciones *meta*- en el refinamiento, debido a la rotación del enlace C-C entre el átomo de carbono del grupo carbonilo y el átomo de carbono del fluorobenceno al que está enlazado.

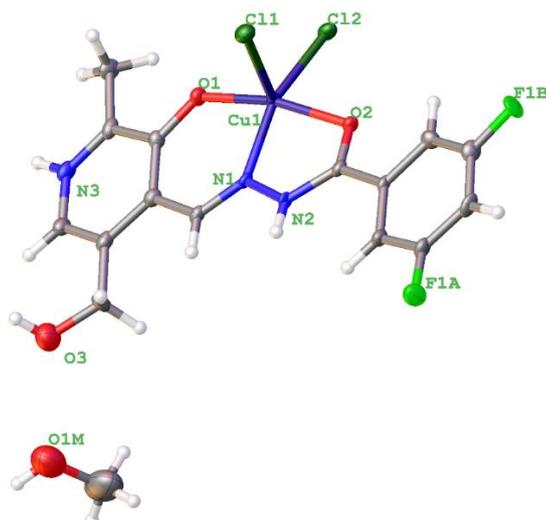


Figura 15. Diagrama ORTEP de la unidad asimétrica del complejo 4 obtenida mediante el programa OLEX2. Los elipsoides térmicos se representan al 50% de probabilidad.

Teniendo en cuenta las estructuras de rayos X obtenidas, se observa que las estructuras de los ligandos (Figuras 8, 10 y 11) se corresponden con las propuestas inicialmente (Figura 5), mientras que, en el caso de los complejos, sólo se corresponde con la estructura propuesta en un inicio la del complejo 2 (Figura 14). Las estructuras del complejo 1 y 4 (Figuras 13 y 15) no se corresponden a las propuestas inicialmente (Figura 7). Sin embargo, los resultados del análisis elemental y de la espectrometría de masas de estos complejos sí que se asemejan más a la estructura propuesta en un inicio. Por lo tanto, no se puede concluir que se forma una única especie en esta reacción de síntesis, sino que la cuarta posición de coordinación puede ser variable, de forma que se coordine un ion cloruro o una molécula de metanol e incluso puede existir una quinta posición de coordinación. En base a esto, es posible que el producto de la reacción de síntesis de los complejos sea un equilibrio entre las tres especies que se muestran a continuación (Figura 16).

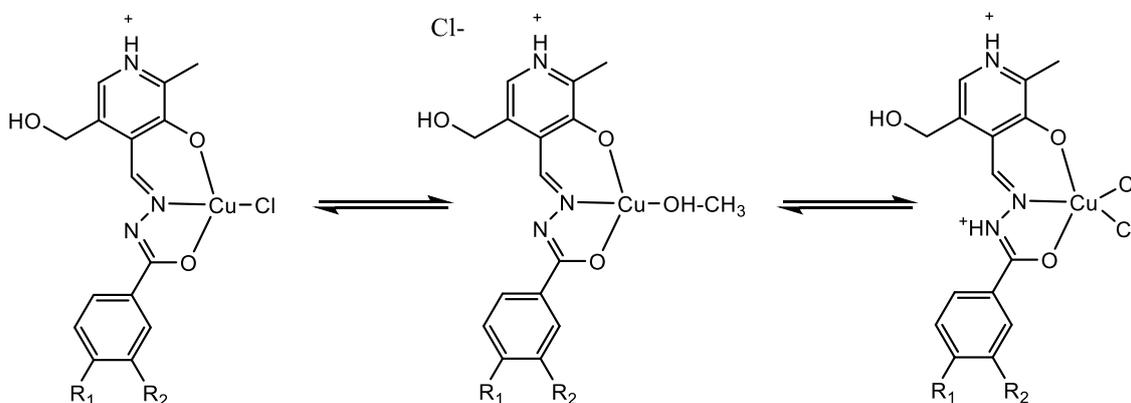


Figura 16. Equilibrio entre las posibles especies resultantes de la reacción de síntesis de los complejos.

4.3. Espectroscopia electrónica de absorción UV-Vis

Se han recogido los espectros de absorción de todos los ligandos (L1, L2, L3, L4 y L5) y de los complejos C3 y C4 en un intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm y a diferentes tiempos (t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{24h}) empleando la disolución de tampón fosfato como disolvente. El resto de los complejos no han podido analizarse mediante esta técnica por su baja solubilidad.

Los espectros de absorción recogidos en los diferentes tiempos no presentan diferencias apreciables en ninguno de los compuestos estudiados, por lo que se confirmó que se mantienen estables en el tiempo. En el apartado “Anexos” se muestran los espectros de todos los compuestos.

Además, a partir de los espectros obtenidos confirmó también la formación de los complejos, ya que las bandas de absorción de los complejos estudiados con respecto a su ligando libre no coinciden, aparecen desplazadas y muestran diferente intensidad. En la Figura 17 se muestran los espectros de absorción del ligando 3 y su respectivo complejo, ambos estudiados a una concentración de 30 μM .

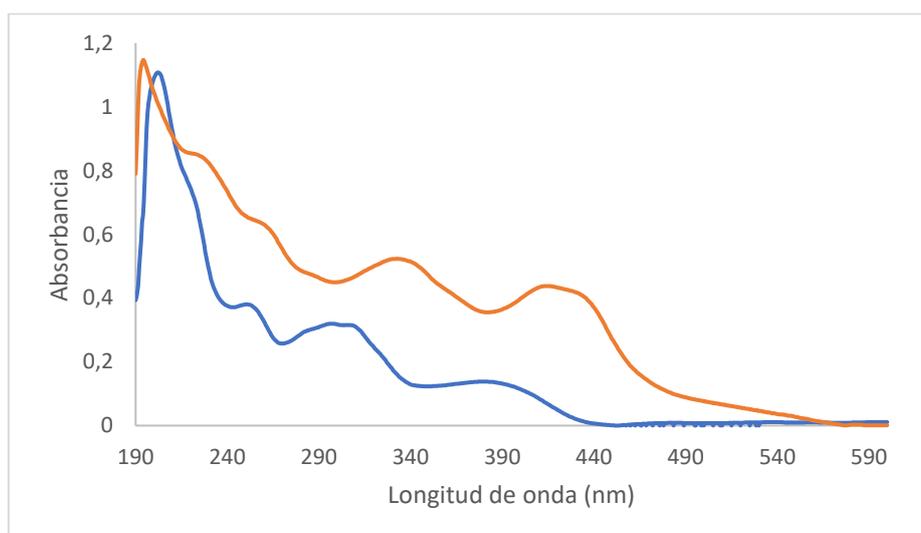


Figura 17. Espectros de absorción UV-Vis del ligando 3 (azul) y del complejo 3 (naranja) en disolución de tampón fosfato.

En base a estos resultados, como todos los compuestos estudiados se mantienen estables en el tiempo, se pudieron realizar los correspondientes estudios de interacción con el ADN.

4.4. Estudio experimental de interacción con el ADN: Espectroscopia UV-Vis

Con el objetivo de obtener información sobre la interacción entre los distintos compuestos y el ADN se han recogido los espectros de absorción de los compuestos

en presencia de cantidades crecientes de ct-ADN manteniendo constante la concentración del compuesto de estudio.

A partir de los resultados obtenidos se puede analizar el tipo de interacción de forma cualitativa y calcular la constante de interacción (K_b) siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand (1).

Todos los compuestos estudiados muestran perfiles muy similares. Presentan tres máximos de absorción situados sobre 200, 300 y 390 nm (los dos últimos un poco desplazados en el caso del complejo). A medida que se aumentó la concentración de ADN la banda de absorbancia que aparece sobre 200 nm fue disminuyendo su intensidad gradualmente (efecto hipocrómico) y se desplazó sutilmente hacia mayores longitudes de onda (efecto batocrómico). Estos efectos fueron despreciables en las otras dos bandas de absorción. A continuación, se muestra como ejemplo la variación del espectro de absorbancia del ligando 1 al añadir cantidades crecientes de ADN (Figura 18) y en el apartado “Anexos” se pueden observar los espectros del resto de compuestos estudiados.

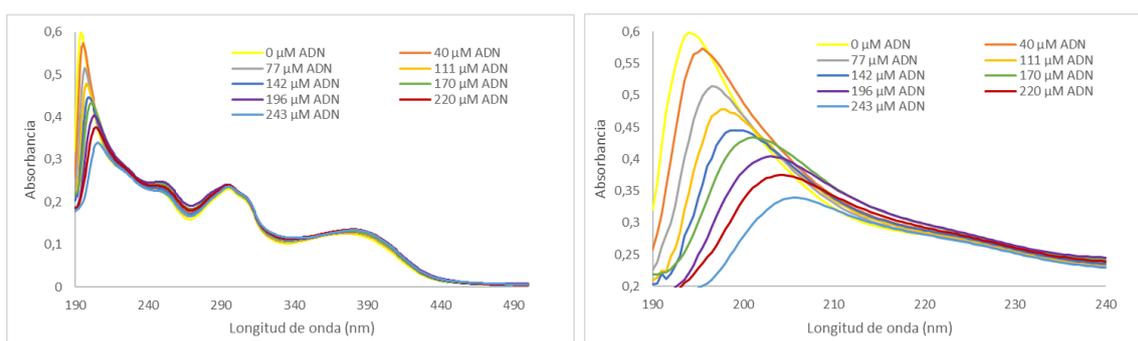


Figura 18. Variación del espectro de absorción UV-Vis del ligando 1 (20 μ M) al añadir cantidades crecientes de ADN.

La presencia de los efectos hipocrómicos y batocrómicos son indicativos de unión por intercalación entre los pares de bases del ADN ²¹. Sin embargo, como el efecto batocrómico no es muy marcado, es posible que se pueda tratar de una interacción de los compuestos con el ADN mediante unión a los surcos o de un conjunto de los dos tipos de interacción ²³.

Los espectros de absorción sugieren el mismo tipo de interacción para todos los compuestos estudiados, pero la fortaleza de esta interacción viene determinada por la constante de interacción (K_b) entre el compuesto y el ADN, y es diferente en cada caso. Para el cálculo de la constante se realizó un ajuste lineal representando $A_0/(A-A_0)$ frente a $1/[ADN]$ siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand. Se tomaron como valores de absorbancia los correspondientes al máximo de absorción que aparece sobre 200 nm y

se seleccionaron los intervalos de concentraciones de ADN que se más se ajustan en cada caso.

Las constantes de interacción obtenidas para los compuestos estudiados se muestran en la siguiente tabla (Tabla 8). Las gráficas de ajuste lineal empleadas para el cálculo de la constante se muestran en el apartado “Anexos”.

Tabla 8. Constantes de interacción entre los compuestos de estudio y el ADN.

Compuesto	Constante de interacción (K_b)
Ligando 1	$0,67 \cdot 10^3 M^{-1}$
Ligando 2	$3,37 \cdot 10^3 M^{-1}$
Ligando 3	$6,24 \cdot 10^3 M^{-1}$
Ligando 4	$4,11 \cdot 10^3 M^{-1}$
Ligando 5	$1,22 \cdot 10^3 M^{-1}$
Complejo 4	$1,87 \cdot 10^3 M^{-1}$

De esta forma, se puede determinar que la interacción más fuerte con el ADN es la del ligando 3 y la más débil la del ligando 1. Aun así, todas las constantes obtenidas son del mismo orden y comparables a las observadas en la bibliografía en fármacos que interaccionan mediante unión al surco como la 2-imidazolidinetona o el levetiracetam con $K_b = 1,4 \cdot 10^3 M^{-1}$ y $K_b = 4,9 \cdot 10^3 M^{-1}$, respectivamente²⁸. Estos resultados contribuyen a la hipótesis de que los compuestos de estudio interaccionan con el ADN mediante unión al surco y no por intercalación entre los pares de bases, ya que las constantes de interacción observadas en la bibliografía para compuestos intercalantes clásicos como el bromuro de etidio y el $[Ru(phen)_2DPPZ]^{2+}$ ascienden al orden de 10^6 - $10^7 M^{-1}$ ²⁹. Para un mayor conocimiento acerca de estas interacciones sería necesario seguir realizando estudios como, por ejemplo, un estudio *in silico* mediante *molecular docking* entre los compuestos y el ADN.

4.5. Estudio computacional de interacción con una diana proteica: *Molecular docking*

Para conocer la forma de interacción más probable y la energía de afinidad (ΔE) entre los ligandos L1, L2, L4 y L5 y las distintas estructuras cristalinas de la proteína FABP6, propuesto como un potencial candidato a marcador de diagnóstico temprano del Adenocarcinoma de Colon, se han realizado cálculos de *molecular docking*.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos con el software Autodock Vina para el cálculo de las energías de afinidad (Tabla 9).

Tabla 9. Energías de afinidad (ΔE) entre los ligandos L1, L2, L3 y L4 y las distintas estructuras PDB de la proteína FABP6.

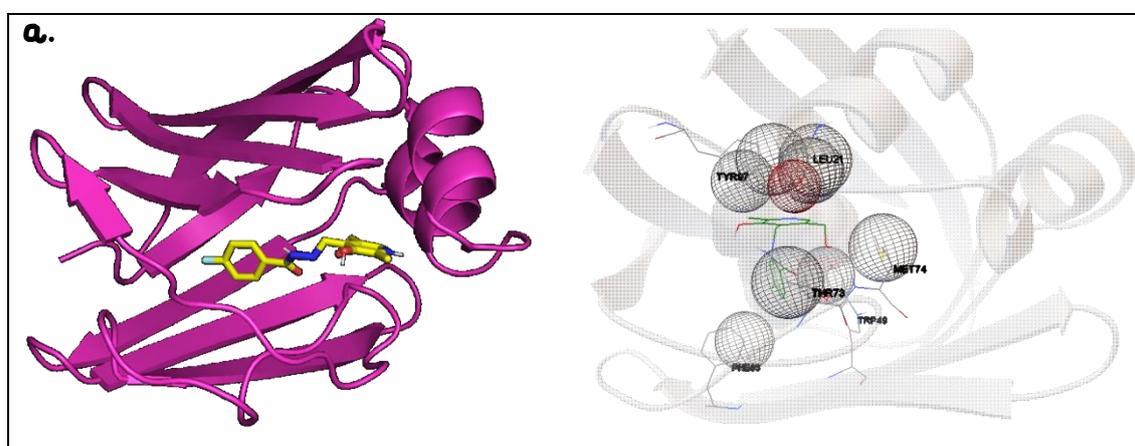
ΔE (kcal/mol)	Diana proteica (PDBs)						
Ligando	1O1U	1O1V	2MM3	5L8I	5L8N	5L8O	Promedio
L1	-6,7	-8,3	-8,7	-8	-7,7	-7,4	-7,8
L2	-6,7	-7,9	-8,8	-7,6	-7,5	-7,2	-7,6
L4	-7	-8,2	-8,9	-7,9	-7,5	-7,8	-7,9
L5	-6,4	-7,8	-8,4	-7,4	-6,7	-6,8	-7,3

Tal y como se muestra en la Tabla 4, todos los ligandos muestran una energía de afinidad promedio $< -7,0$ kcal/mol, por lo que todos ellos presentan una interacción significativa con la proteína FABP6. Por lo tanto, estos compuestos podrían proponerse como posibles fármacos que interactúan específicamente con estas dianas proteicas.

Con el fin de conocer más detalles del *molecular docking* se muestra en la Figura 4 las formas de interacción de cada ligando con la diana proteica 2MM3. Además, también se especifican los aminoácidos de la proteína implicados en cada interacción (Tabla 10 y Figura 4). Se ha escogido esta estructura cristalina de la proteína porque todos los ligandos muestran su interacción más fuerte con ella.

Tabla 10. Aminoácidos de la proteína FABP6 (PDB ID: 2MM3) con los que interaccionan cada ligando.

Ligando	Aminoácidos
L1	MET74, THR73, LEU21, PHE63, TYR97, TRP49
L2	THR73, MET74, PHE47, LEU21, PHE63, LEU90, TRP49
L4	LEU108, GLU102, PHE2, PHE47, VAL37, ILE36, THR38, SER101, GLN51, MET8
L5	PHE2, TRP49, PHE47, THR38, ILE36, GLU102, VAL37, SER101, VAL109, MET8



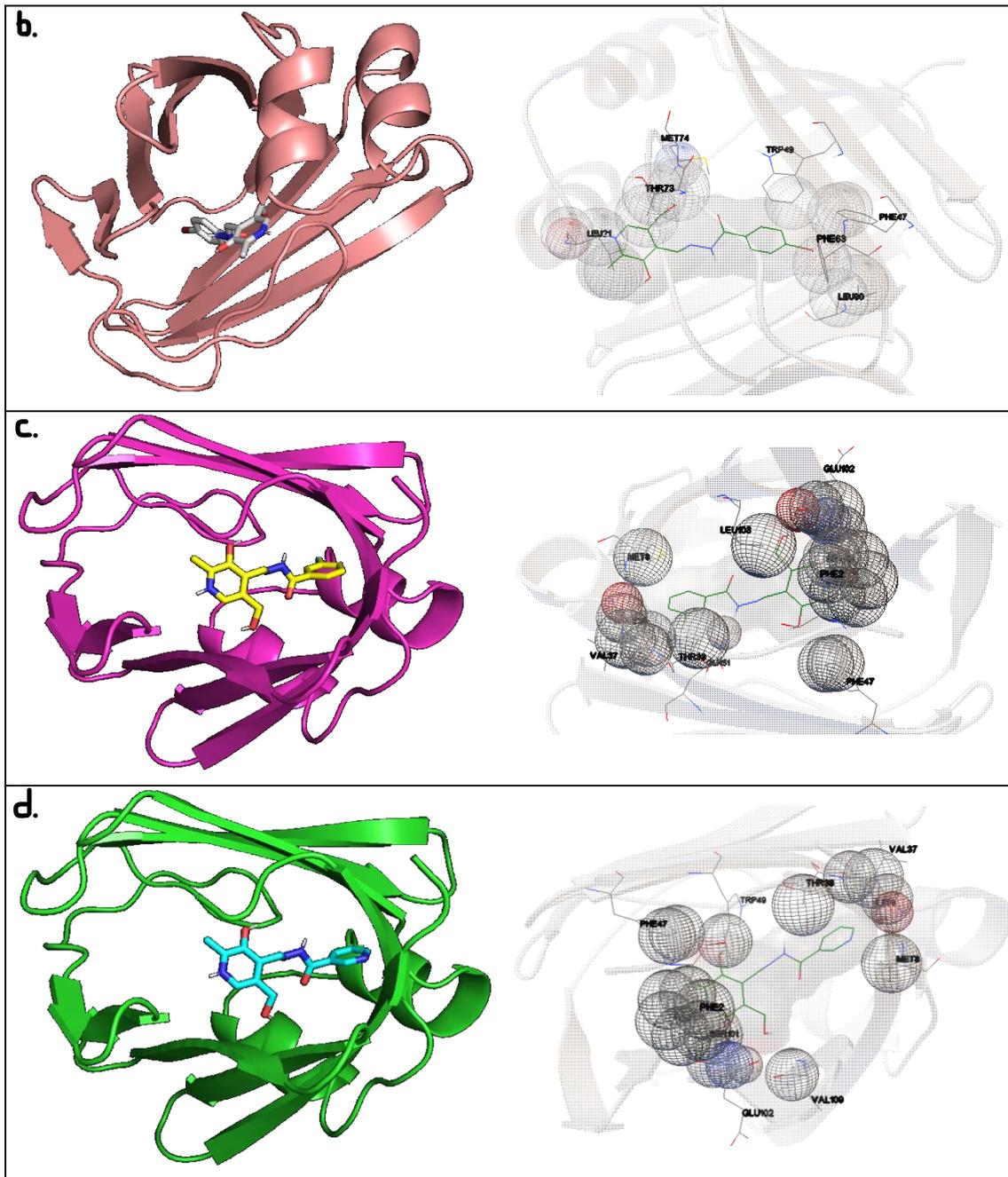


Figura 19. En la columna de la izquierda se representa la proteína FABP6 (PDB ID: 2MM3) con el ligando y en la columna de la derecha los aminoácidos de la proteína FABP6 (PDB ID: 2MM3) que interaccionan con el ligando, donde: a) Ligando 1, b) Ligando 2, c) Ligando 4 y d) Ligando 5.

Esta diana proteica presenta como ligandos naturales dos sales biliares presentes en la bilis humana (glicocolato y glicoquenodesoxicolato), por lo que la proteína presenta dos sitios activos para los dos ligandos. El sitio activo para el ligando glicocolato está definido por 22 aminoácidos: PHE2, PHE6, MET8, MET18, ALA31, ILE36, THR38, VAL40, PHE47, TRP49, GLN51, MET74, LEU90, SER101, GLU102, LEU108, VAL109, GLU110, TYR119, ARG121 y SER123. El sitio activo para el glicoquenodesoxicolato está definido por 17 aminoácidos: LEU21, ILE23, TRP49, ASN61, PHE63, GLN72, THR73, MET74, GLY75, LYS77, PHE79, VAL83, LEU90, VAL92, TYR97 y GLN99 ²⁴.

Teniendo en cuenta esto y con los resultados obtenidos, se observa que los ligandos L1 y L2 interactúan con aminoácidos que están definidos en el sitio activo del ligando glicoquenosodexicolato, mientras que los ligandos L4 y L5 interactúan con aminoácidos definidos en el sitio activo del ligando glicocolato. Por lo tanto, en función del compuesto suministrado se interrumpirá la actividad de transporte de uno de los lípidos. Analizando los compuestos, estas diferencias pueden ser causa de la posición del sustituyente en el anillo aromático, ya que L1 y L2 presentan el sustituyente en la posición *para*-, mientras que L4 lo presenta en la posición *meta*- y el anillo aromático de L5 es una piridina. Por lo tanto, esto debe de afectar en las distintas interacciones con los aminoácidos, favoreciendo una forma de interacción frente a otra en función de la posición de los sustituyentes del compuesto.

5. Conclusiones

Teniendo en cuenta los objetivos iniciales establecidos y los resultados obtenidos se pueden extraer las siguientes conclusiones del presente trabajo:

1. Los ligandos hidrazona derivados de piridoxal (L1, L2 y L3) y sus respectivos complejos de cobre (II) (C1, C2, C3, C4 y C5) fueron sintetizados eficazmente, con rendimientos por encima del 60%.
2. Las distintas técnicas de caracterización efectuadas confirman que las rutas de síntesis escogidas fueron las adecuadas para la síntesis de los ligandos y complejos. No obstante, las estructuras obtenidas a partir de la difracción de rayos X de monocristal en los complejos llevaron a concluir que no se forma una única especie en esta reacción de síntesis. La cuarta posición de coordinación puede ser variable, de forma que se coordine un ion cloruro o una molécula de metanol e incluso aparecer ocupada una quinta posición de coordinación. Estos ligandos tan lábiles permiten comparar este tipo de complejos con lo que ocurre en el caso del cisplatino.
3. Todos los ligandos (L1, L2, L3, L4 y L5) y los complejos C3 y C4 se estudiaron en disolución mediante espectroscopia de absorción UV-Vis. Este estudio en función del tiempo (t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{24h}) confirmó la estabilidad de estos en disolución en el tiempo. Los complejos C1, C2 y C5 no pudieron analizarse debido a su baja solubilidad.
4. Se pudo estudiar la interacción de todos los ligandos (L1, L2, L3, L4 y L5) y del complejo C4 con el ADN mediante espectroscopia de absorción UV-Vis. Este estudio mostró un patrón similar en todos los compuestos, apareciendo en todos los espectros los efectos hipocrómico y batocrómico indicativos de interacción por intercalación entre los pares de bases del ADN o por interacción mediante unión a los surcos. Sin embargo, a partir de la constante de interacción se puede concluir que el tipo de interacción más probable es mediante interacción en el surco, ya que las constantes obtenidas fueron todas del orden de 10^3 M^{-1} , alejadas de las registradas en la bibliografía para especies intercalantes y similares a las especies que interaccionan en el surco. Por otro lado, a pesar de que las constantes obtenidas fueron bastante similares, el ligando 3 es el que presenta una interacción más fuerte con una $K_b = 6,24 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ y el ligando 1 el que presenta una interacción más débil con una $K_b = 0,67 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.
5. Se realizó un estudio *in silico* de la interacción de los ligandos L1, L2, L4 y L5 con la diana proteica FABP6 un potencial candidato a marcador de diagnóstico temprano del Adenocarcinoma de Colon, mediante *molecular docking*. Todos los ligandos muestran una energía de afinidad promedio $< -7,0 \text{ kcal/mol}$, por lo que todos ellos presentan una interacción significativa con la proteína FABP6. Por lo tanto, estos

compuestos podrían proponerse como posibles fármacos que interactúan específicamente con estas dianas proteicas.

Conclusiones

Tendo en conta os obxectivos iniciais establecidos e os resultados obtidos, deste traballo pódense extraer as seguintes conclusións:

1. Sintetizáronse eficientemente os ligandos hidrazona derivados do piridoxal (L1, L2 e L3) e os seus respectivos complexos de cobre (II) (C1, C2, C3, C4 e C5), con rendementos superiores ao 60%.
2. As diferentes técnicas de caracterización realizadas confirman que as vías de síntese escollidas foron adecuadas para a síntese dos ligandos e complexos. Non obstante, as estruturas obtidas a partir da difracción de raios X nos complexos levaron á conclusión de que nesta reacción de síntese non se forma unha única especie. A cuarta posición de coordinación pode ser variable, de forma que se coordina un ión cloruro ou unha molécula de metanol, e incluso pode aparecer ocupada unha quinta posición de coordinación. Estos ligandos tan lábiles permiten comparar este tipo de complejos con lo que ocorre en el caso del cisplatino.
3. Todos os ligandos (L1, L2, L3, L4 e L5) e os complexos C3 e C4 estudáronse en disolución mediante espectroscopia de absorción UV-Vis. Este estudo en función do tempo (t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{24h}) e confirmo a estabilidade destes en disolución ao longo do tempo. Os complexos C1, C2 e C5 non puideron analizarse pola súa baixa solubilidade.
4. A interacción de todos os ligandos (L1, L2, L3, L4 e L5) e do complexo C4 co ADN estudouse mediante espectroscopia de absorción UV-Vis. Este estudo mostrou un patrón similar en todos os compostos, con efectos hipocrómicos e batocrómicos en todos os espectros indicativos de interacción de intercalación entre pares de bases de ADN ou interacción de unión aos surcos. Non obstante, a partir do cálculo da constante de interacción conclúese que o tipo de interacción máis probable é a interacción no surco, xa que as constantes obtidas foron todas da orde de 10^3 M^{-1} , lonxe das rexistradas na bibliografía para especies intercalantes e semellantes ás especies que interactúan no surco. Por outra banda, a pesar de que as constantes obtidas eran bastante similares, o ligando 3 é o que presenta unha interacción máis forte cunha $K_b = 6,24 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$ e o ligando 1 o que presenta unha interacción máis débil cunha $K_b = 0,67 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$.
5. Realizouse un estudo *in silico* da interacción dos ligandos L1, L2, L4 e L5 coa diana proteica FABP6, un posible candidato a marcador para o diagnóstico precoz do

Adenocarcinoma de Colon, mediante *molecular docking*. Todos os ligandos mostran unha enerxía de afinidade media $< -7,0$ kcal/mol, polo que todos mostran unha interacción significativa coa proteína FABP6. Polo tanto, estes compostos poderían propoñerse como potenciais fármacos que interactúan especificamente con estas dianas proteicas.

Conclusions

Taking into account the initial objectives established and the results obtained, the following conclusions can be drawn from the present work:

1. The pyridoxal-derived hydrazone ligands (L1, L2 and L3) and their respective copper (II) complexes (C1, C2, C3, C4 and C5) were synthesized efficiently, with yields greater than 60%.
2. The different characterization techniques confirm that the synthesis routes chosen were adequate for the synthesis of the ligands and complexes. However, the structures obtained from X-ray diffraction of the complexes led to the conclusion that not only one species was formed in this synthesis. The fourth coordination position can be variable, so that a chloride ion or a methanol molecule can be coordinated, and even a fifth coordination position can be occupied by another ligand.
3. All ligands (L1, L2, L3, L4 and L5) and complexes C3 and C4 were studied in solution by UV-Vis absorption spectroscopy at different times (t_{0h} , t_{1h} , t_{2h} , t_{24h}) and their stability in solution over time was confirmed. The complexes C1, C2 and C5 could not be analyzed due to their low solubility.
4. The interaction of all ligands (L1, L2, L3, L4 and L5) and the C4 complex with DNA could be studied by UV-Vis absorption spectroscopy. These studies showed a similar pattern for all compounds, with hypochromic and bathochromic effects indicative of interaction by intercalation between DNA base pairs or by interaction via groove binding appearing in all spectra. However, from the calculation of the interaction constant we concluded that the most probably type of interaction is by groove interaction, since the constants obtained were all of the order of 10^3 M⁻¹, far from those recorded in the literature for intercalating species and like the species interacting in the groove. On the other hand, although the constants obtained were quite similar, the ligand 3 showed the strongest interaction with a value of $K_b = 6.24 \cdot 10^3$ M⁻¹ and the ligand 1 the weakest interaction with a value of $K_b = 0.67 \cdot 10^3$ M⁻¹.
5. An *in silico* study of the interaction of ligands L1, L2, L4 and L5 with the protein target FABP6, a potential candidate as an early diagnostic marker for colon

adenocarcinoma (COAD), was performed by *molecular docking*. All ligands showed an average affinity energy $< -7,0$ kcal/mol, so all of them had significant interaction with the FABP6 protein. Therefore, these compounds could be proposed as potential drugs that interact specifically with these protein targets.

6. Cronograma

Mes	Septiembre		Octubre				Noviembre				Diciembre				Enero				Febrero				Marzo				Abril				Mayo				Junio							
Semanas	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4								
Búsqueda bibliográfica	■																														■											
Síntesis de los ligandos	■		■																																							
Síntesis de los complejos			■												■																											
Caracterización			■								■								■												■											
Espectroscopia UV-Vis			■								■								■												■											
Interacción con el ADN																							■				■															
<i>Molecular docking</i>							■								■																				■							
Redacción de la memoria																																			■				■			

7. Bibliografía

- (1) Vallet, M.; Faus, J.; García-España, E.; Moratal, J. Introducción a La Química Bioinorgánica; *Síntesis*: Madrid. **2010**.
- (2) Fuertes, M. Á.; Pérez, J. M. Química Bioinorgánica. Una Ciencia Interdisciplinar En Desarrollo. *Encuentros Multidisciplinares*. **2000**, 2 (5), 1–5.
- (3) Cohen, S. M. New Approaches for Medicinal Applications of Bioinorganic Chemistry. *Curr Opin Chem Biol*. **2007**, 11(2), 115–120. doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.012.
- (4) Hordyjewska, A.; Popiolek, Ł.; Kocot, J. The Many “Faces” of Copper in Medicine and Treatment. *BOMEEH*. **2014**, 27(4), 611–621. doi: 10.1007/s10534-014-9736-5.
- (5) Iakovidis, I.; Delimaris, I.; Piperakis, S. M. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach. *Mol. Biol. Int.* **2011**, 2011, 1–13. doi:10.4061/2011/594529.
- (6) Siqueira, J. D.; de Pellegrin, S. F.; dos Santos, S. S.; Iglesias, B. A.; Piquini, P. C.; Arantes, L. P.; Soares, F. A.; Chaves, O. A.; Neves, A.; Back, D. F. SOD Activity of New Copper II Complexes with Ligands Derived from Pyridoxal and Toxicity in *Caenorhabditis Elegans*. *J. Inorg. Biochem.* **2020**, 204. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110950.
- (7) Siqueira, J. D.; Flores de Pellegrin, S.; Fontana, L. A.; Iglesias, B. A.; Sagrillo, M. R.; Oliveira, P. S.; Rossato, A.; da Silva Silveira, L.; Neves, A.; Chaves, O. A.; Back, D. F. Copper (II) Complexes Derived from Pyridoxal: Structural Correlations, Cytotoxic Activities, and Molecular Docking. *Inorganica Chim. Acta*. **2021**, 526. doi: 10.1016/j.ica.2021.120530.
- (8) Nunes, P.; Marques, F.; Cavaco, I.; Costa Pessoa, J.; Correia, I. Exploring the Therapeutic Potential of Cu (II)-Complexes with Ligands Derived from Pyridoxal. *Inorganica Chim. Acta*. **2020**, 507. doi: 10.1016/j.ica.2020.119558.
- (9) Santiago, P. H. O.; Santiago, M. B.; Martins, C. H. G.; Gatto, C. C. Copper(II) and Zinc(II) Complexes with Hydrazone: Synthesis, Crystal Structure, Hirshfeld Surface and Antibacterial Activity. *Inorganica Chim. Acta*. **2020**, 508. doi:10.1016/j.ica.2020.119632.
- (10) Mezey, R. Ş.; Máthé, I.; Shova, S.; Grecu, M. N.; Roşu, T. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Copper (II) Complexes with Hydrazone Derived from 3-Hydroxy-5-(Hydroxymethyl)-2-Methylpyridine-4-Carbaldehyde. *Polyhedron*. **2015**, 102, 684–692. doi: 10.1016/j.poly.2015.10.035.
- (11) González, L. V.; de Miguel Ibáñez, R.; Sotos, F. E. Colorectal Cancer Prevalence and Survival in Cuenca (Spain). *J. of Gastrointest. Cancer*. **2022**. doi:10.1007/s12029-021-00784-x.
- (12) Gómez-Ruiz, S. Evolución y Desarrollo de Complejos Metálicos Con Aplicación Potencial Como Agentes Antitumorales. *An. R. Soc. Esp. Quím.* **2010**, 106(1), 13–21.

- (13) Zitvogel, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Kroemer, G. Immunological Aspects of Cancer Chemotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2008**, *8*(1), 59–73. doi:10.1038/nri2216.
- (14) Cuevas, O. A.; Castro Ramírez, R.; Sánchez García, J. J.; López-Sandoval, H.; Barba-Behrens, N. Química Inorgánica Medicinal: Vanadio, Platino, Oro. *Educ. quím.* **2012**, *23*(1), 33-40. doi: 10.1016/S0187- 893X(17)30095-2.
- (15) Ott, I.; Gust, R. Non Platinum Metal Complexes as Anti-Cancer Drugs. *Arch. Pharm.* **2007**, *340*(3), 117–126. doi:10.1002/ardp.200600151.
- (16) Sheldrick, G. M. Crystal Structure Refinement with SHELXL. *ACSCGG.* **2015**, *71*, 3–8. doi: 10.1107/S2053229614024218.
- (17) Dolomanov, O. v.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. OLEX2: A Complete Structure Solution, Refinement and Analysis Program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42* (2), 339–341. doi:10.1107/S0021889808042726.
- (18) Zhang, G.; Hu, X.; Fu, P. Spectroscopic Studies on the Interaction between Carbaryl and Calf Thymus DNA with the Use of Ethidium Bromide as a Fluorescence Probe. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2012**, *108*, 53–61. doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.12.011.
- (19) Xu, Z. H.; Chen, F. J.; Xi, P. X.; Liu, X. H.; Zeng, Z. Z. Synthesis, Characterization, and DNA-Binding Properties of the Cobalt(II) and Nickel(II) Complexes with Salicylaldehyde 2-Phenylquinoline-4-Carboylhydrazone. *J. Photochem. Photobiol.* **2008**, *196* (1), 77–83. doi: 10.1016/j.jphotochem.2007.11.017.
- (20) Sirajuddin, M.; Ali, S.; Badshah, A. Drug-DNA Interactions and Their Study by UV-Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltametry. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **2013**, *124*, 1–19. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.03.013.
- (21) Thakor, K. P.; Lunagariya, M. v.; Bhatt, B. S.; Patel, M. N. Fluorescence and Absorption Studies of DNA–Pd (II) Complex Interaction: Synthesis, Spectroanalytical Investigations and Biological Activities. *Luminescence.* **2019**, *34* (1), 113–124. doi: 10.1002/bio.3587.
- (22) Kumar, M.; Kaushik, M.; Chaudhary, S.; Kukreti, S. Spectroscopic Studies of the Binding Interactions of Phenothiazinium Dyes (Thionine Acetate, Azure A and Azure B) with Calf-Thymus DNA. *J. Drug Metab. Toxicol.* **2016**, *7* (3), 1-7. doi:10.4172/2157-7609.1000214.
- (23) Mushtaque, M.; Avecilla, F.; Haque, A.; Yab, Z.; Rizvi, M. M. A.; Khan, M. S. Synthesis, Structural and Biological Activity of N-Substituted 2-Methyl-4-/5-Nitroimidazole Derivatives. *J. Mol. Struct.* **2019**, *1185*, 440–449. doi:10.1016/j.molstruc.2019.02.101.
- (24) Liñares-Blanco, J.; Munteanu, C. R.; Pazos, A.; Fernandez-Lozano, C. Molecular Docking and Machine Learning Analysis of Abemaciclib in Colon Cancer. *BMC Mol. Cell Biol.* **2020**, *21* (1). doi: 10.1186/s12860-020-00295-w.
- (25) Maurya, M. R.; Dhaka, S.; Kumar, N.; Avecilla, F. Synthesis, Characterization, Reactivity, Identification of Isomeric Species and Crystal Structure of Dinitrosylmolybdenum(0) Complexes of 2-(α -Hydroxyalkyl/Aryl)Benzimidazole. *Transit. Met. Chem.* **2013**, *38* (5), 535–542. doi: 10.1007/s11243-013-9721-9.

- (26) Alcaraz, L. A.; Donaire, A. Resonancia Magnetica Nuclear En Sistemas Paramagneticos. *An. R. Soc. Esp. Quím.* **2006**, *1*, 27–33.
- (27) Clayden, J.; Moran, W. J.; Edwards, P. J.; Laplante, S. R. The Challenge of Atropisomerism in Drug Discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48* (35), 6398–6401. doi: 10.1002/anie.200901719.
- (28) Shahabadi, N.; Moradi Fili, S.; Shahlaei, M. Synthesis, Characterization and Comparative DNA Interaction Studies of New Copper(II) and Nickel(II) Complexes Containing Mesalamine Drug Using Molecular Modeling and Multispectroscopic Methods. *J. Coord. Chem.* **2015**, *68* (20), 3667–3684. doi:org/10.1080/00958972.2015.1078897.
- (29) Vaidyanathan, V. G.; Nair, B. U. Photooxidation of DNA by a Cobalt (II) Tridentate Complex. *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *94* (1–2), 121–126. doi: 10.1016/S0162-0134(02)00620-7.

8. Anexos

Espectrometría de masas

Ligando 1

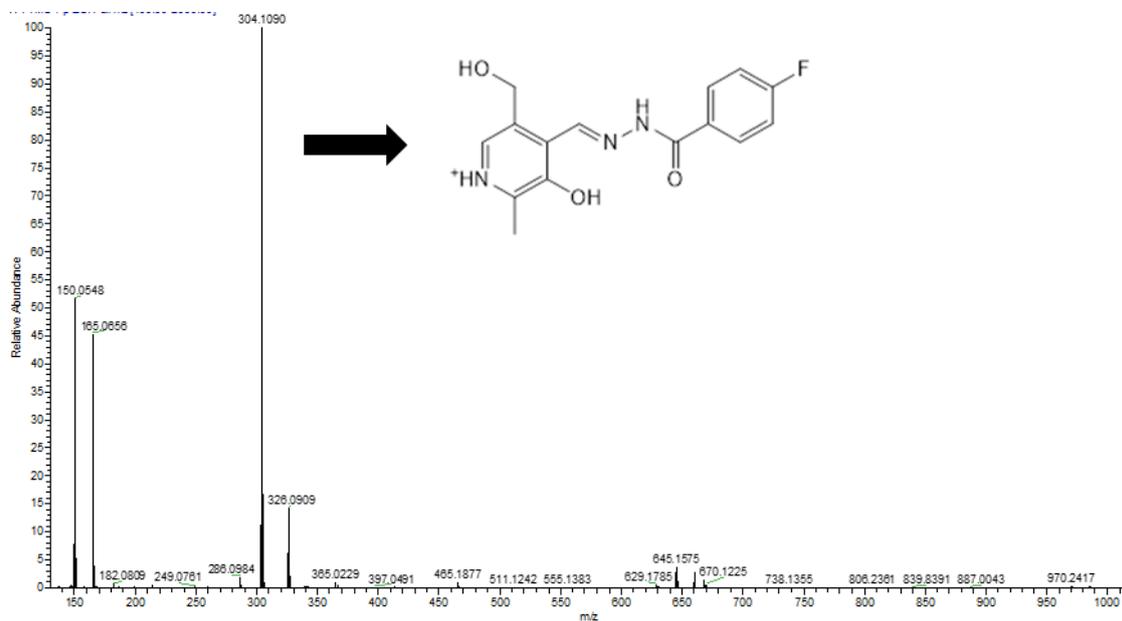


Figura 20. Espectro de masas ESI⁺ del ligando 1.

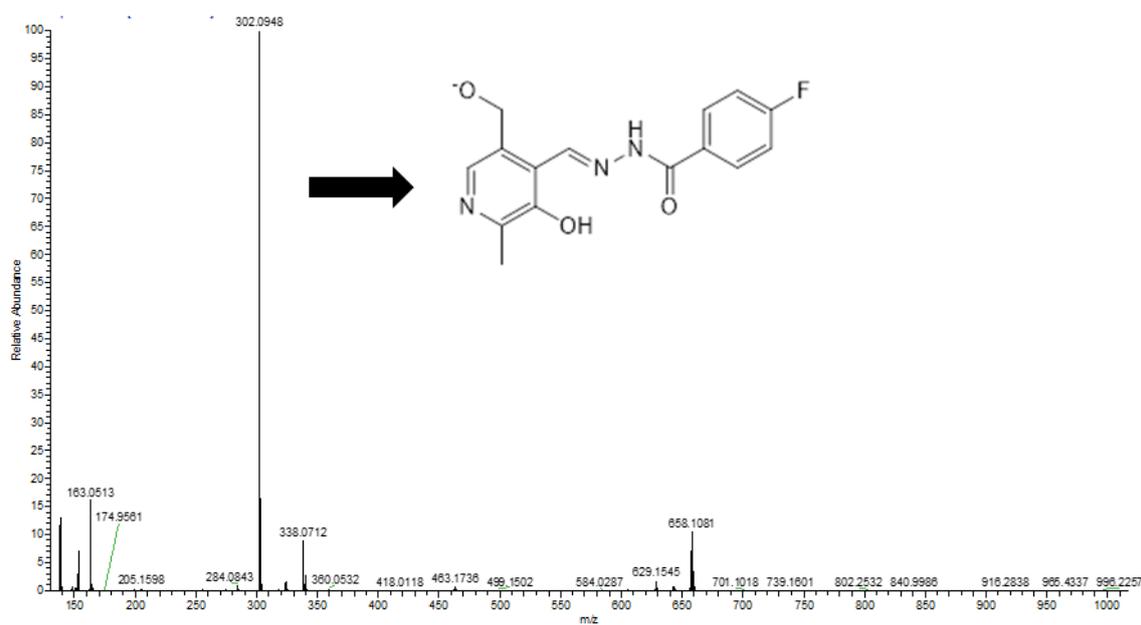


Figura 21. Espectro de masas ESI⁻ del ligando 1.

Ligando 2

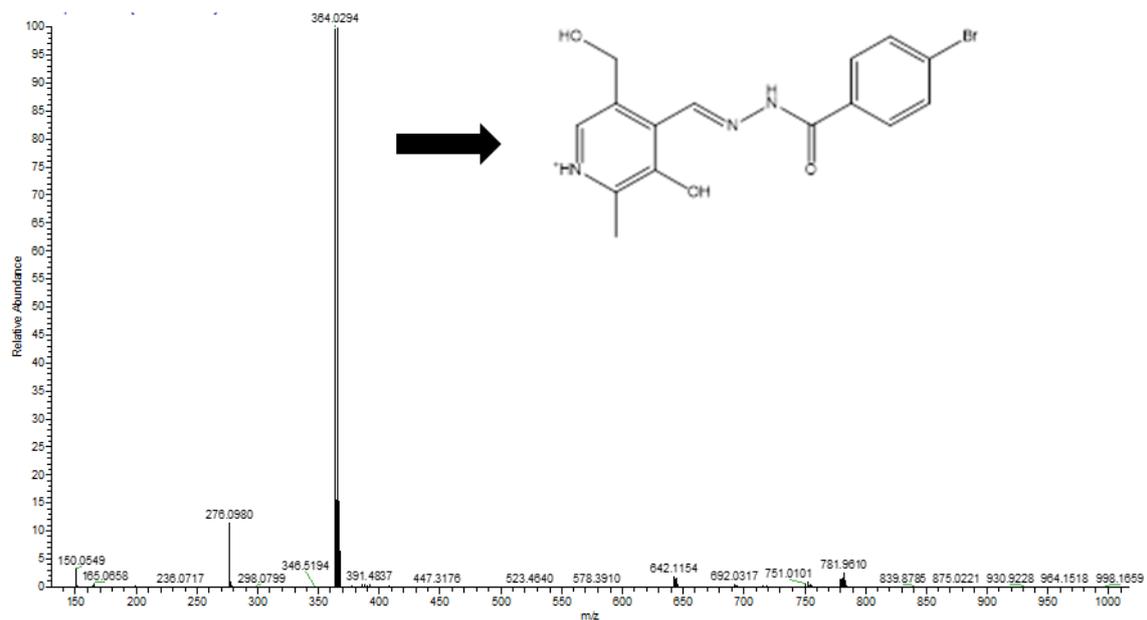


Figura 22. Espectro de masas ESI⁺ del ligando 2.

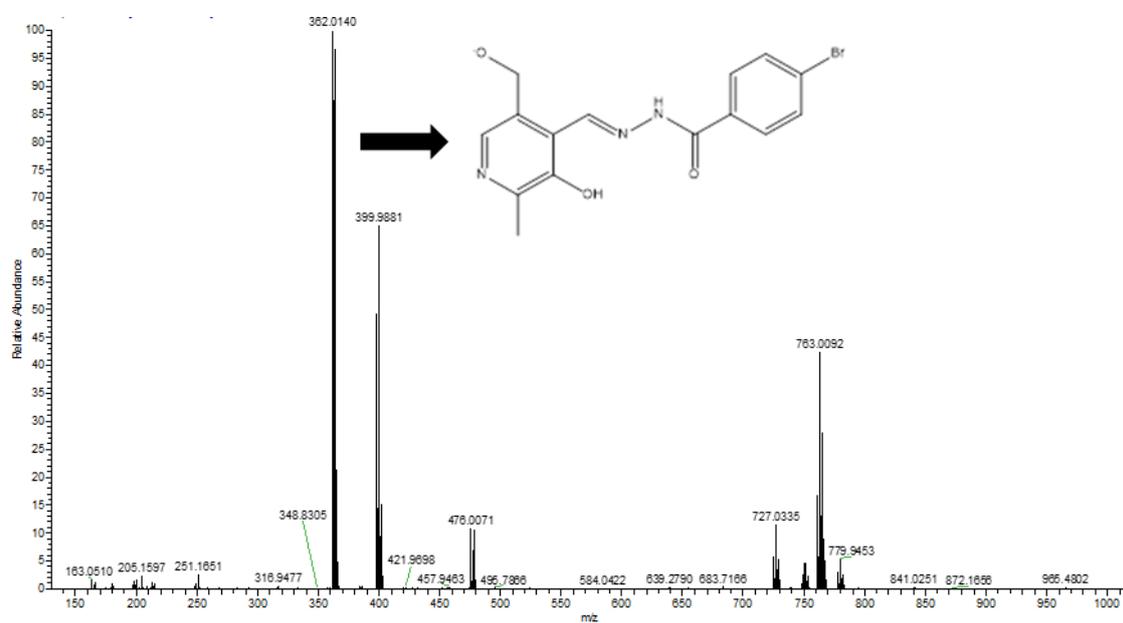


Figura 23. Espectro de masas ESI⁺ del ligando 2.

Ligando 3

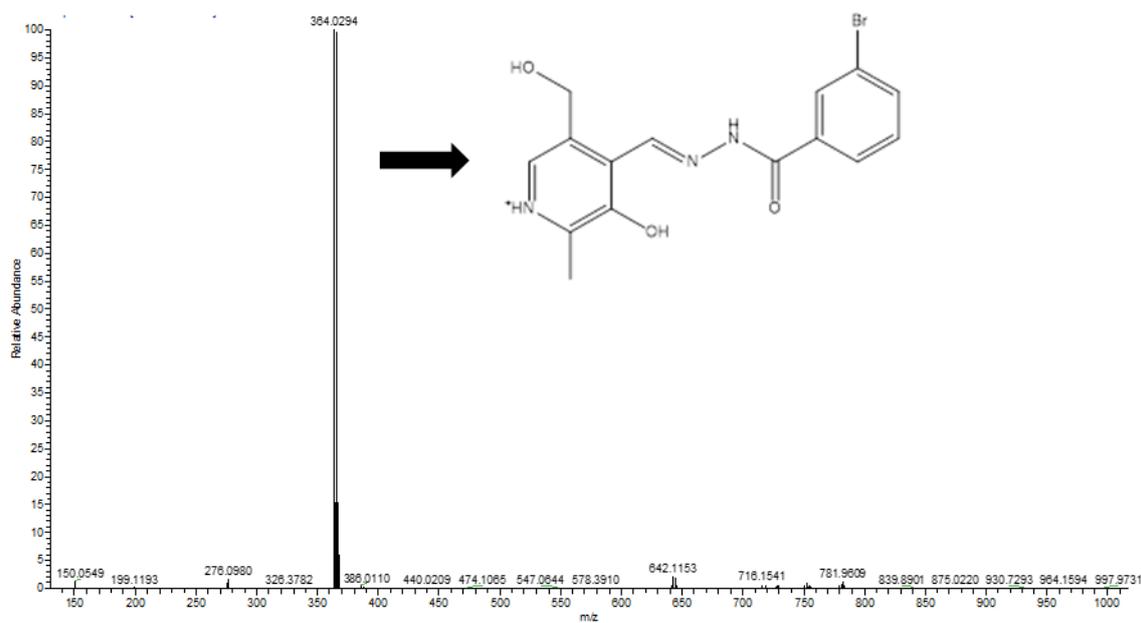


Figura 24. Espectro de masas ESI⁺ del ligando 3.

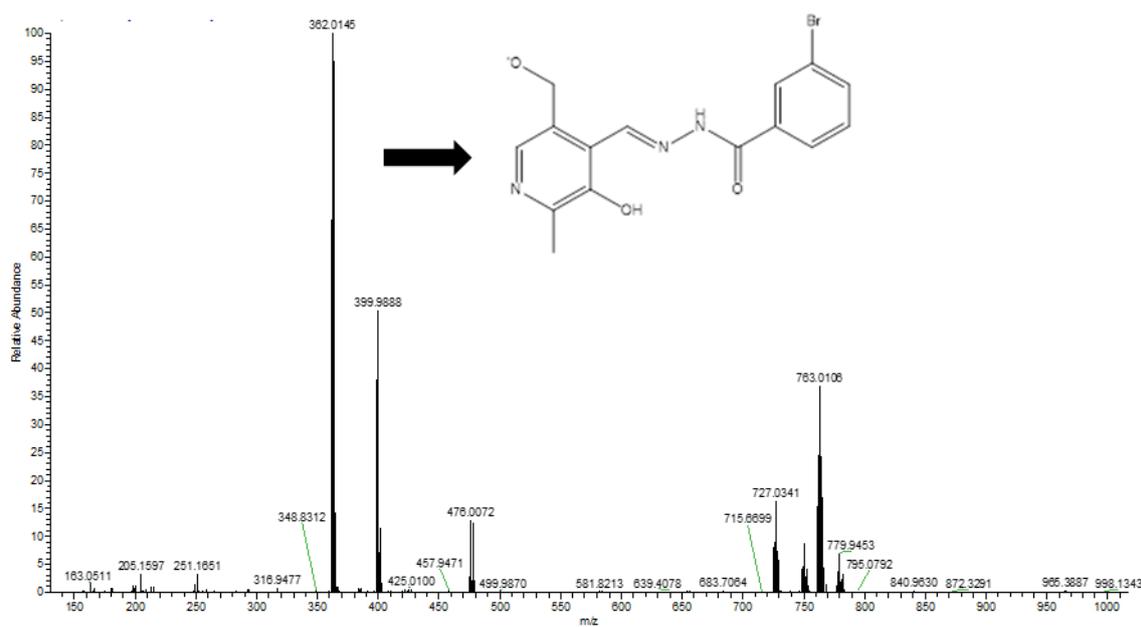


Figura 25. Espectro de masas ESI⁺ del ligando 3.

Complejo 1

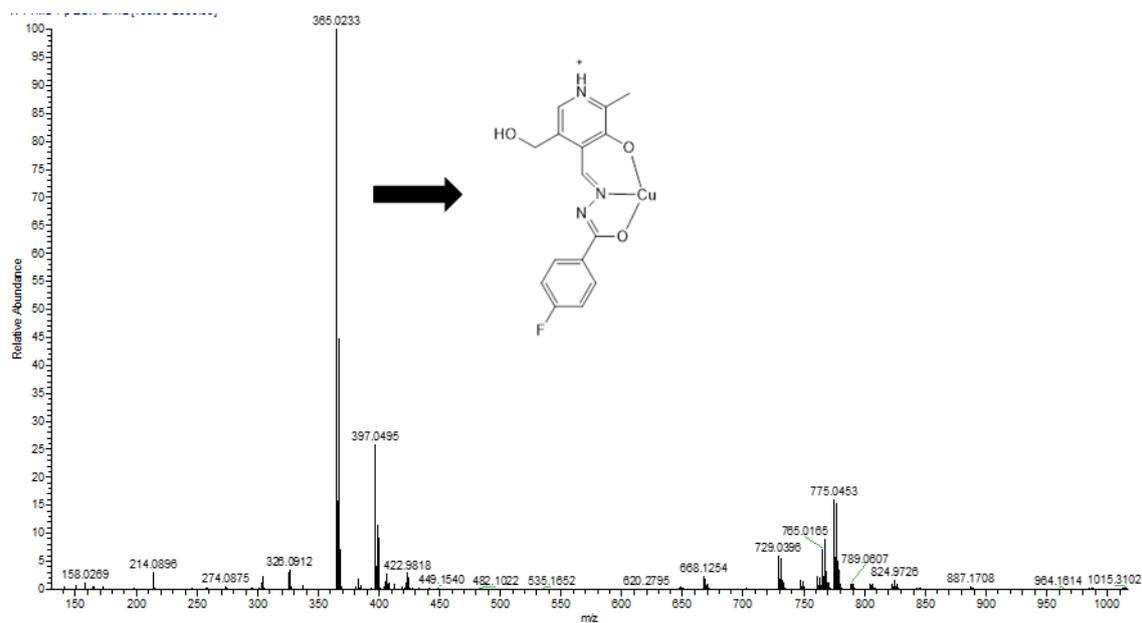


Figura 26. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 1.

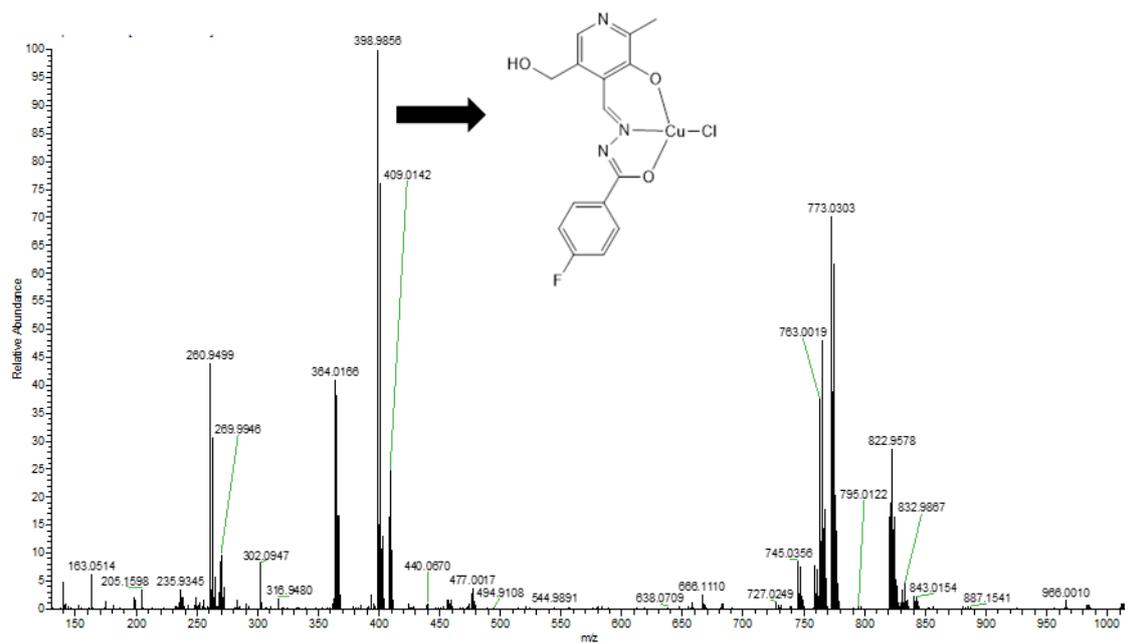


Figura 27. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 1.

Complejo 2

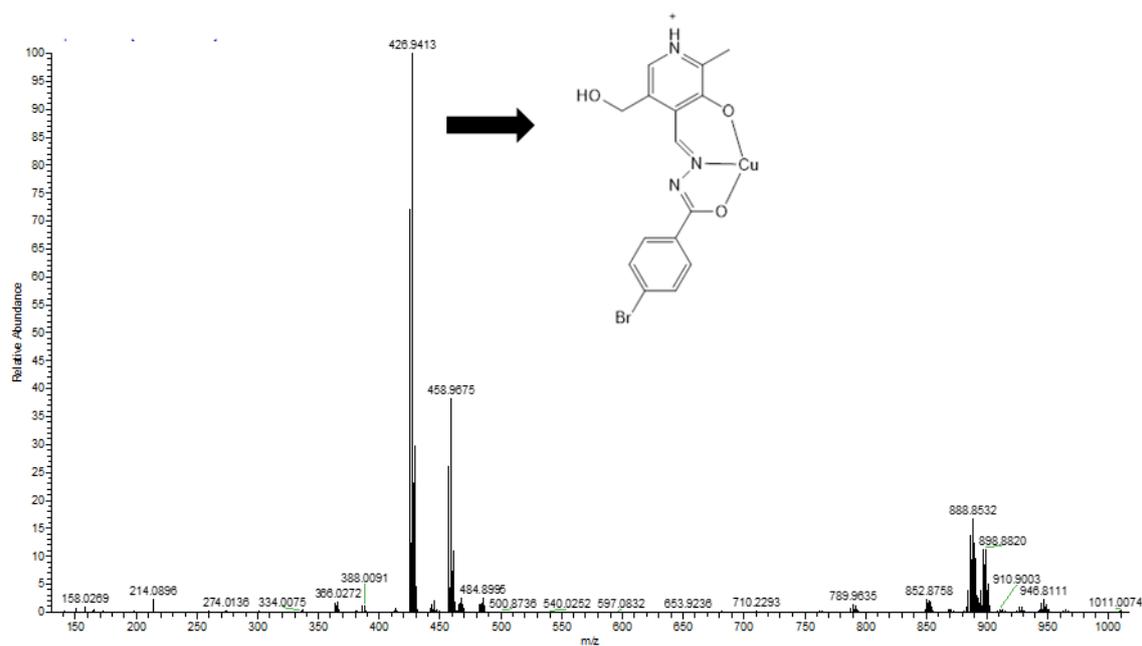


Figura 28. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 2.

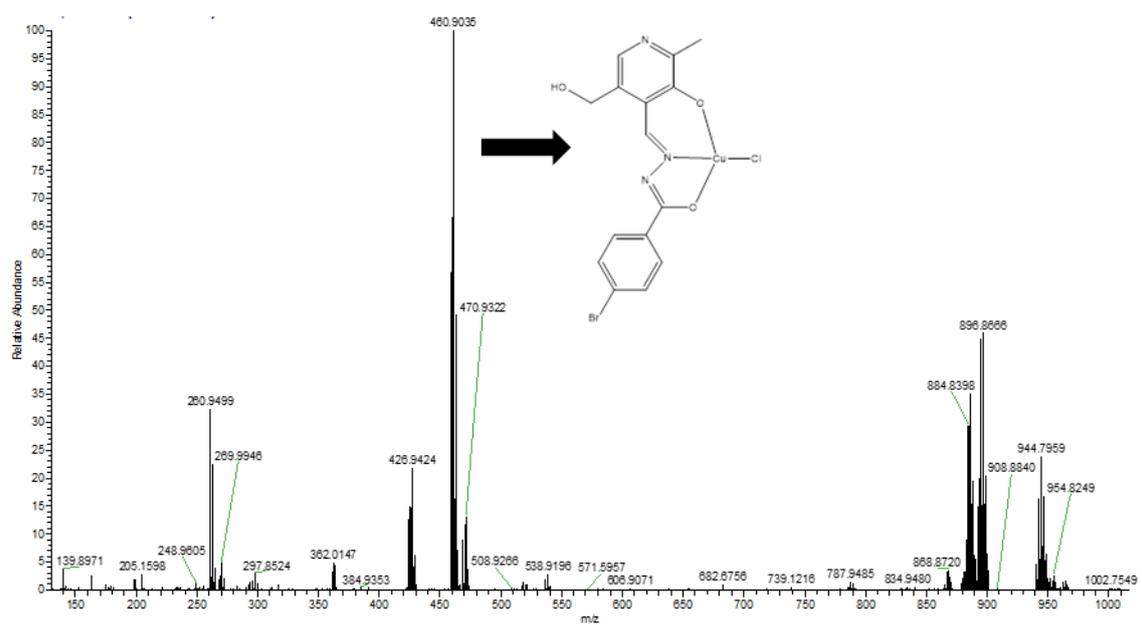


Figura 29. Espectro de masas ESI⁻ del complejo 2.

Complejo 3

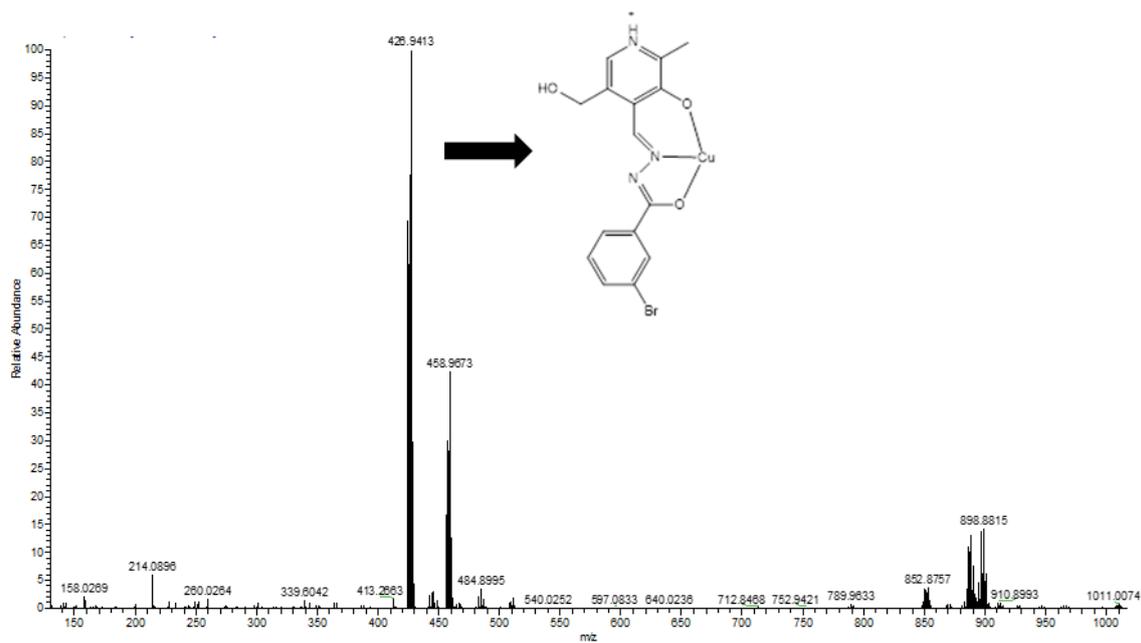


Figura 30. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 3.

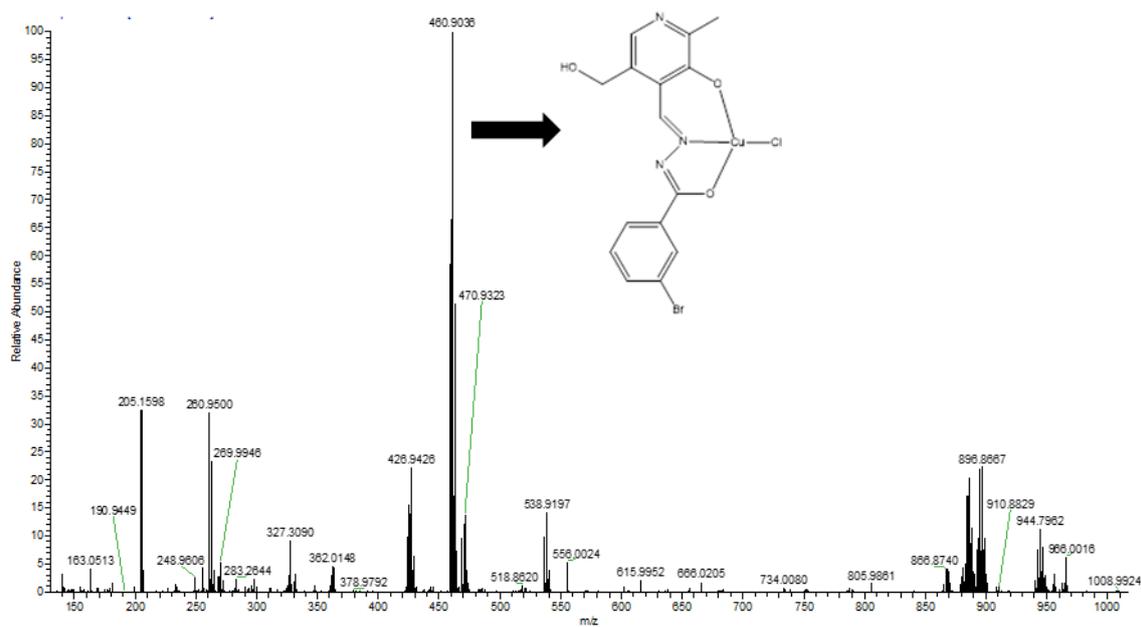


Figura 31. Espectro de masas ESI⁻ del complejo 3.

Complejo 4

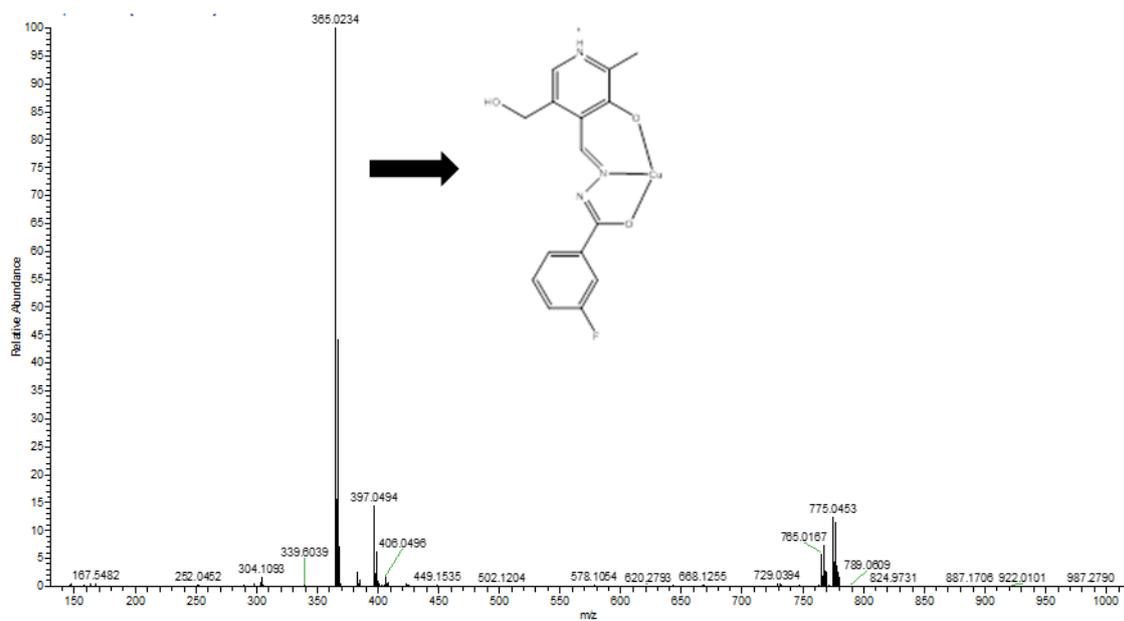


Figura 32. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 4.

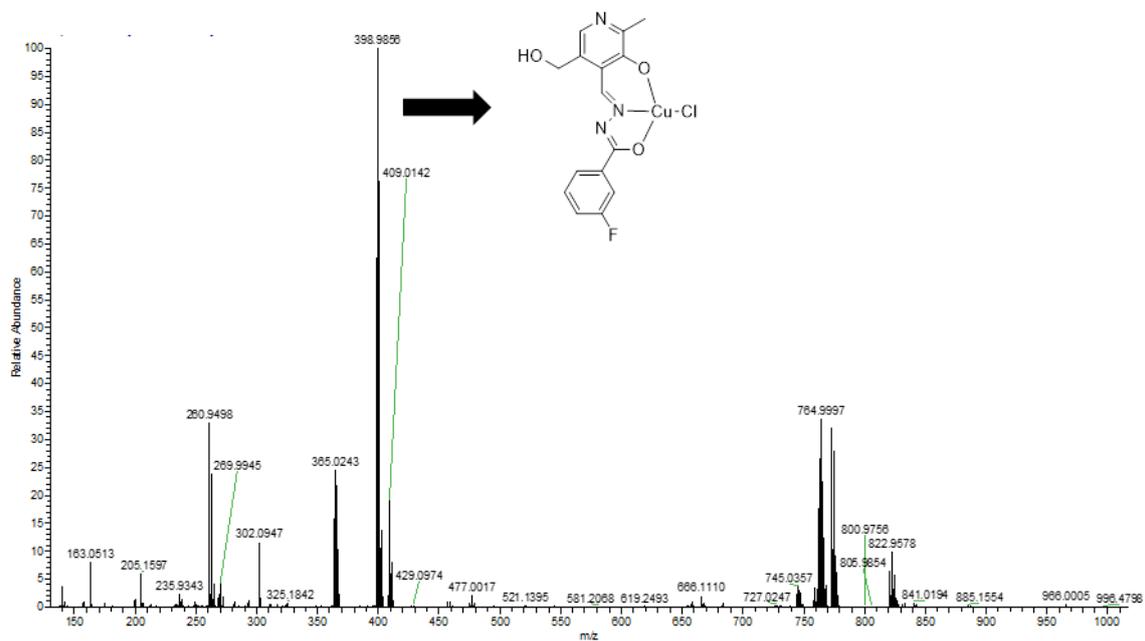


Figura 33. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 4.

Complejo 5

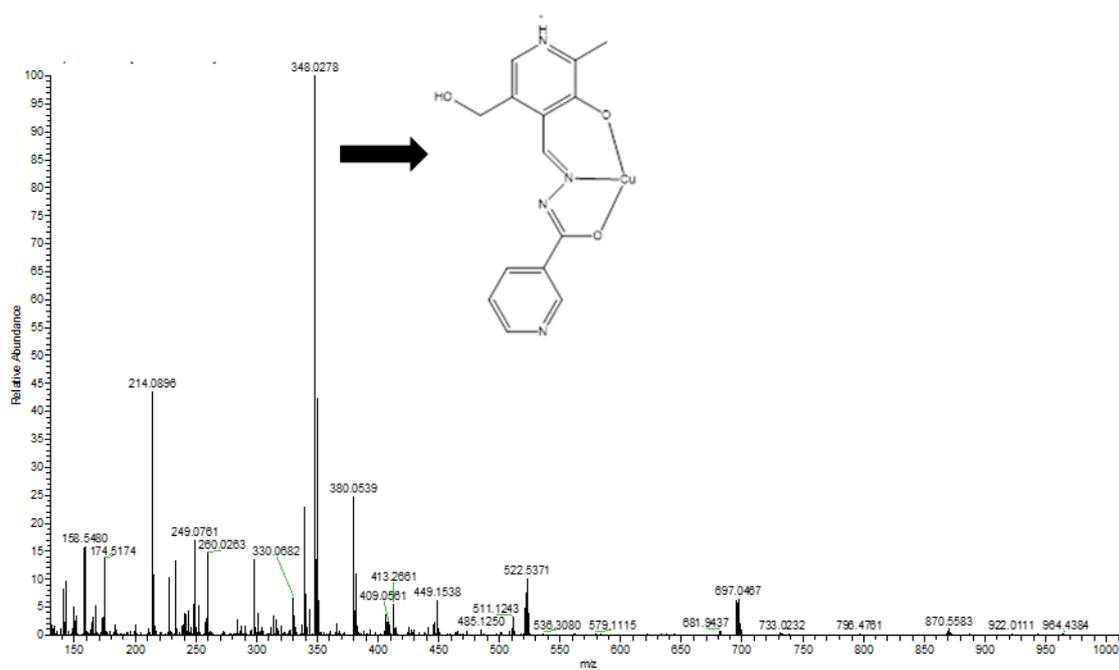


Figura 34. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 5.

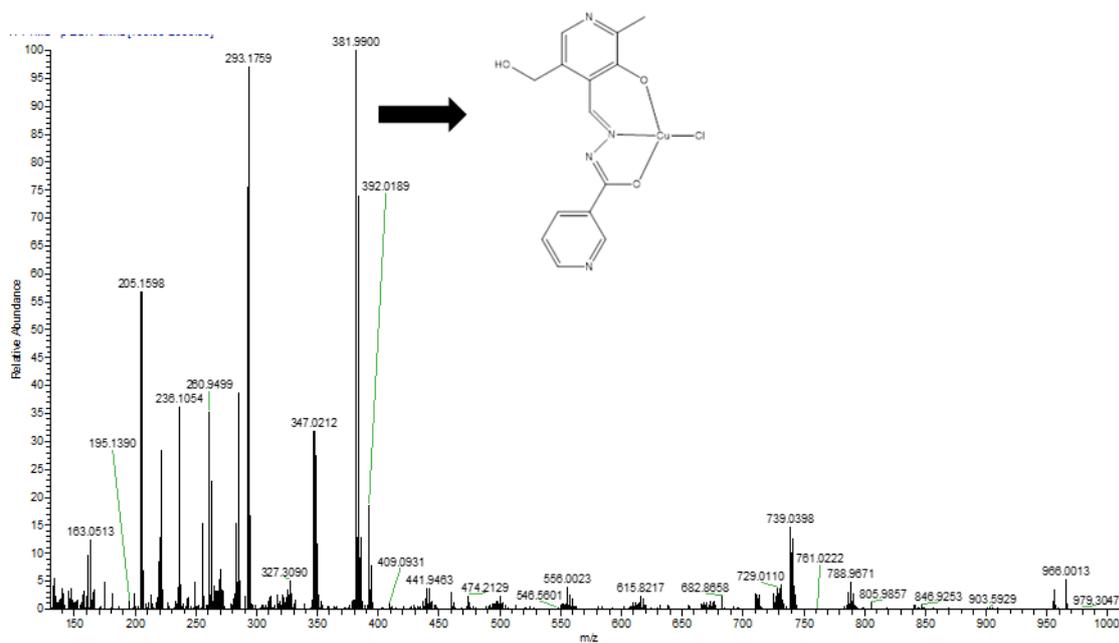


Figura 35. Espectro de masas ESI⁺ del complejo 5.

Espectroscopia infrarroja

Ligando 1

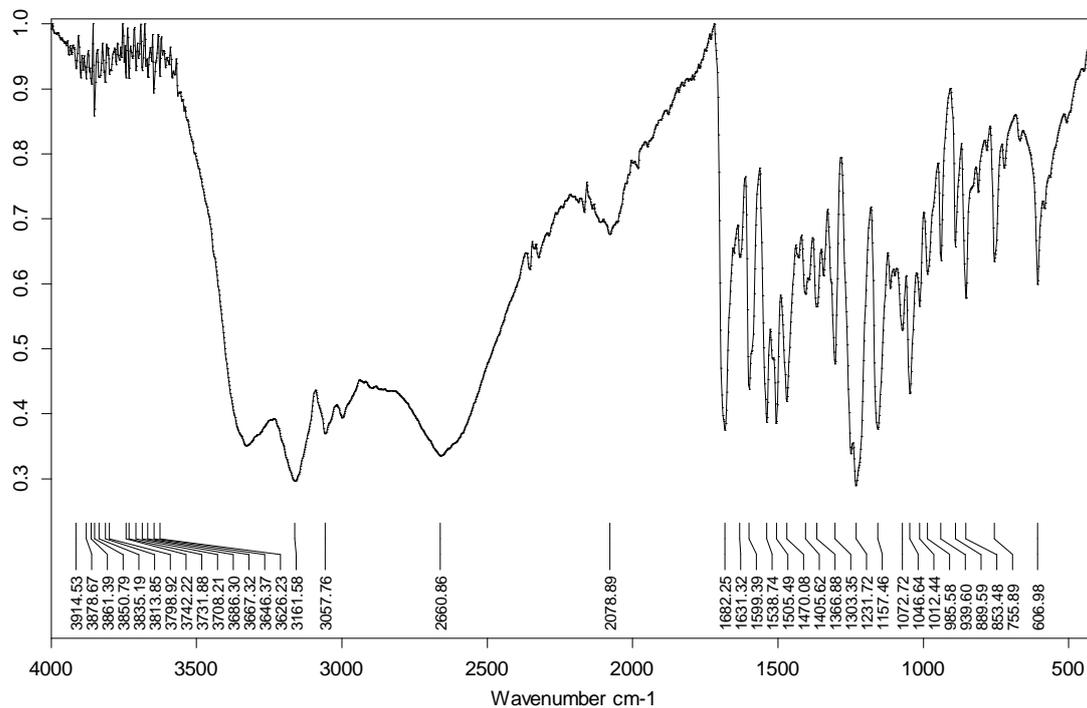


Figura 36. Espectro de IR del ligando 1 (Transmitancia vs. Número de onda).

Ligando 2

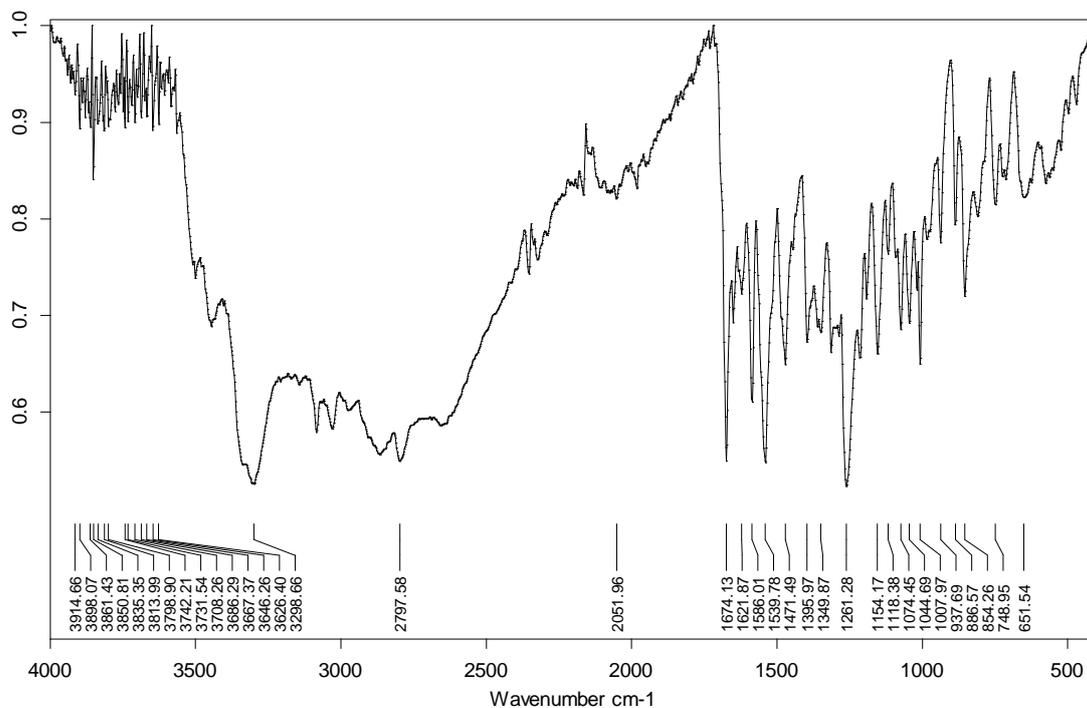


Figura 37. Espectro de IR del ligando 2 (Transmitancia vs. Número de onda).

Ligando 3

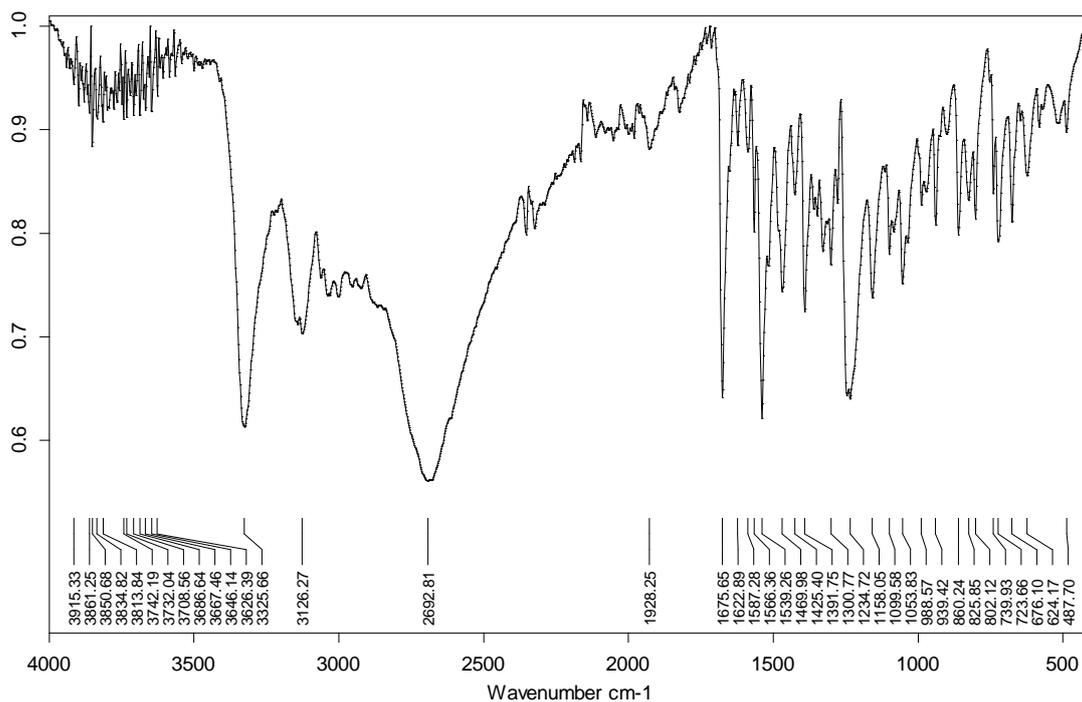


Figura 38. Espectro de IR del ligando 3 (Transmitancia vs. Número de onda).

Complejo 1

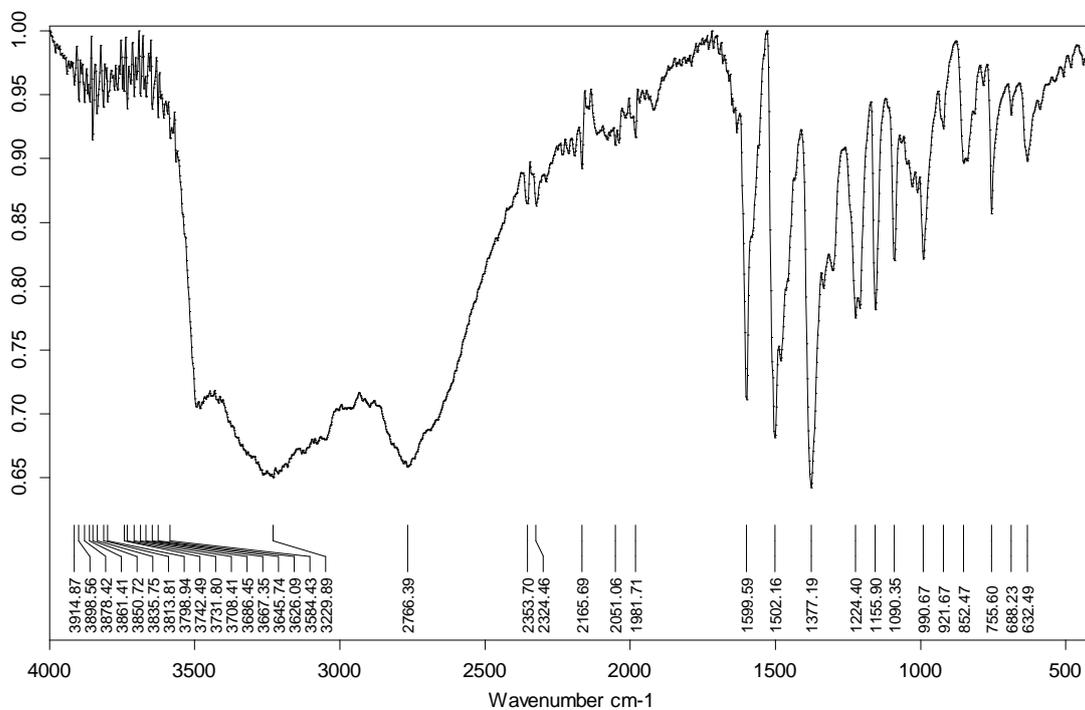


Figura 39. Espectro de IR del complejo 1 (Transmitancia vs. Número de onda).

Complejo 2

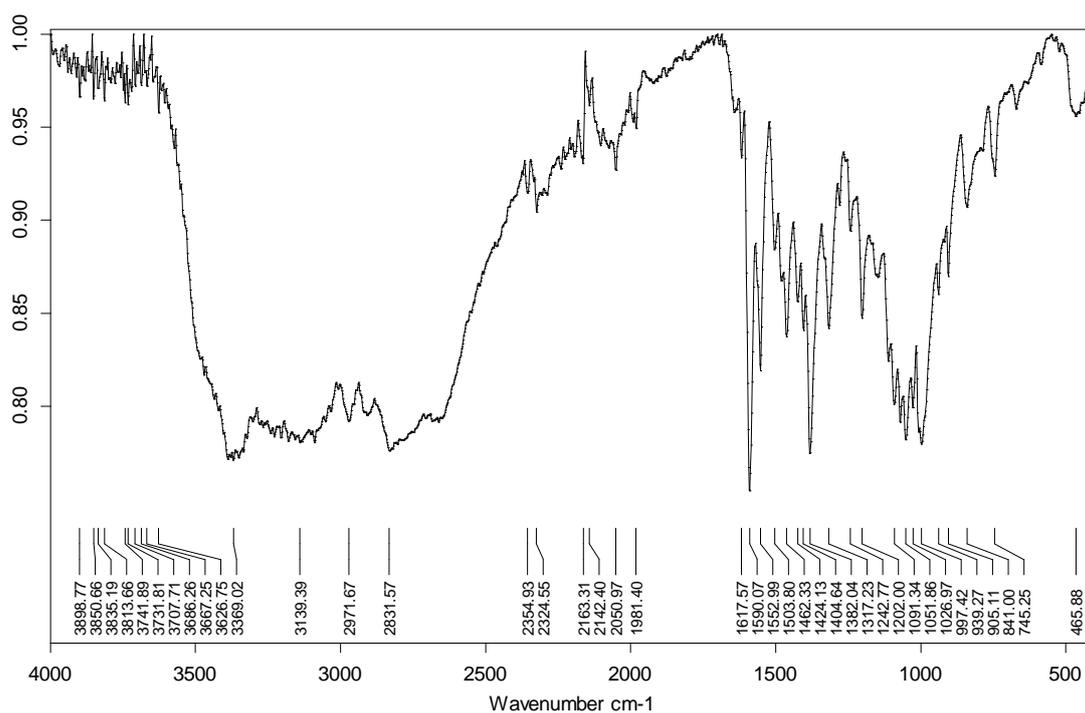


Figura 40. Espectro de IR del complejo 2 (Transmitancia vs. Número de onda).

Complejo 3

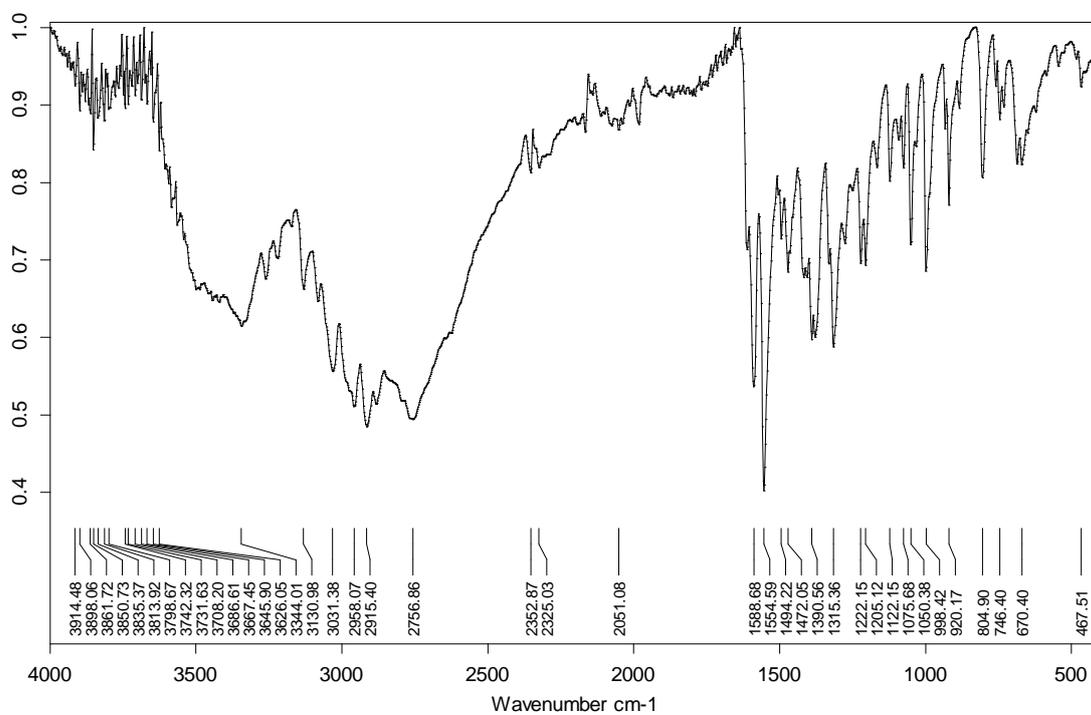


Figura 41. Espectro de IR del complejo 3 (Transmitancia vs. Número de onda).

Complejo 4

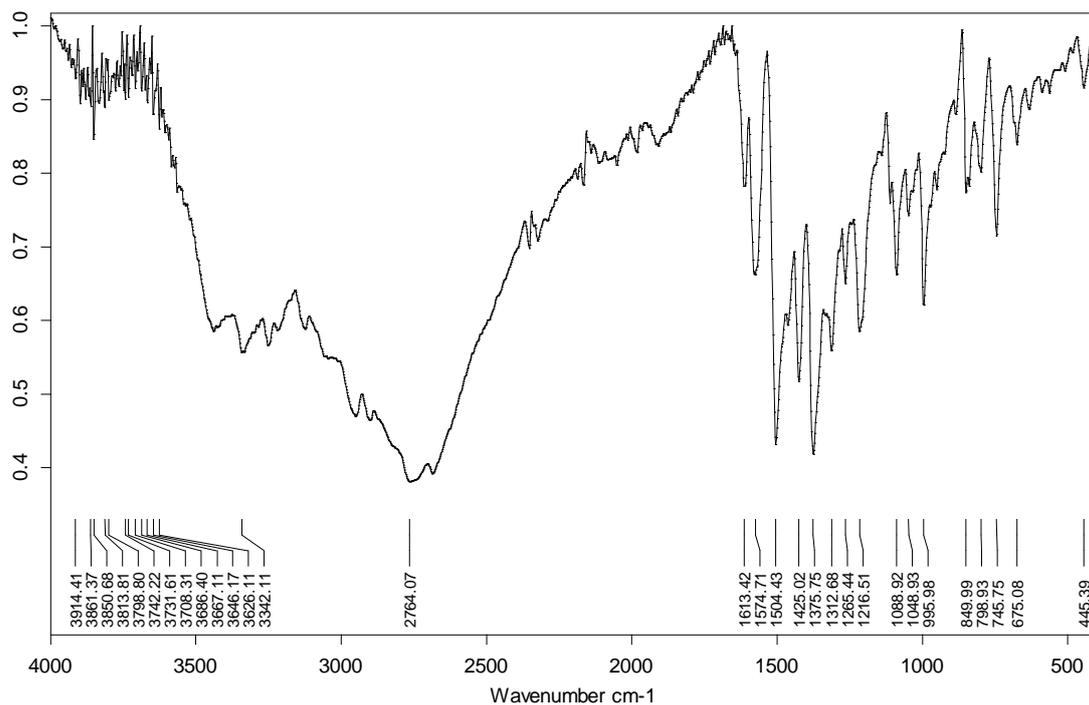


Figura 42. Espectro de IR del complejo 4 (Transmitancia vs. Número de onda).

Complejo 5

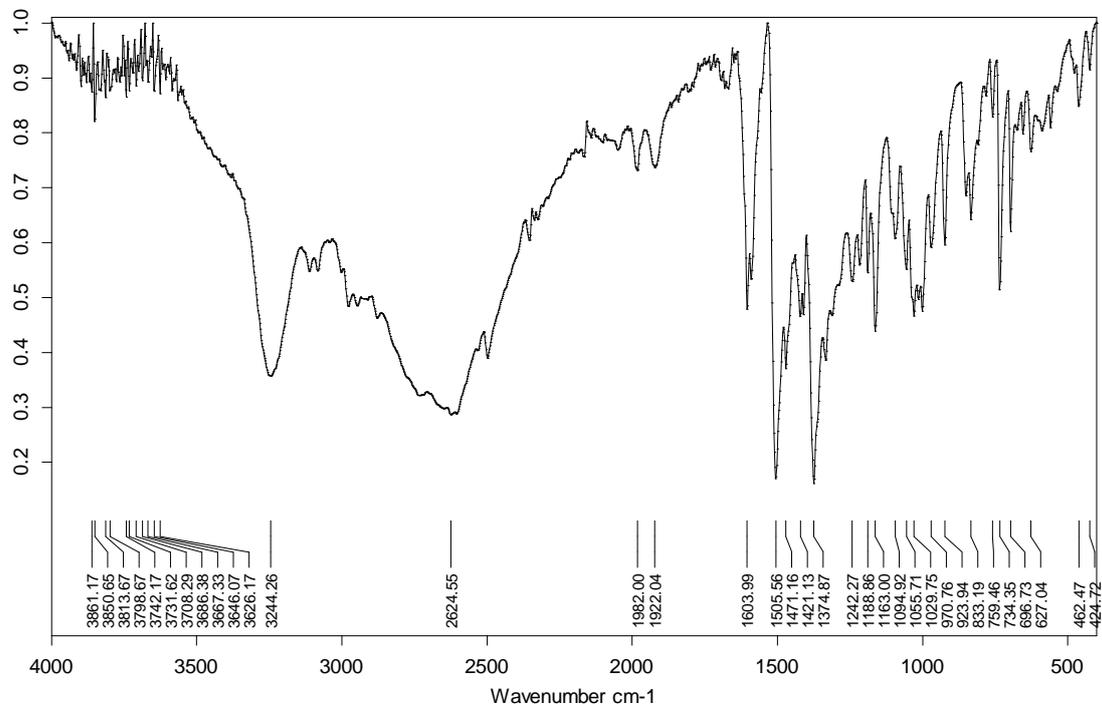


Figura 43. Espectro de IR del complejo 4 (Transmitancia vs. Número de onda).

Espectroscopia RMN ^1H y RMN ^{13}C

Ligando 1

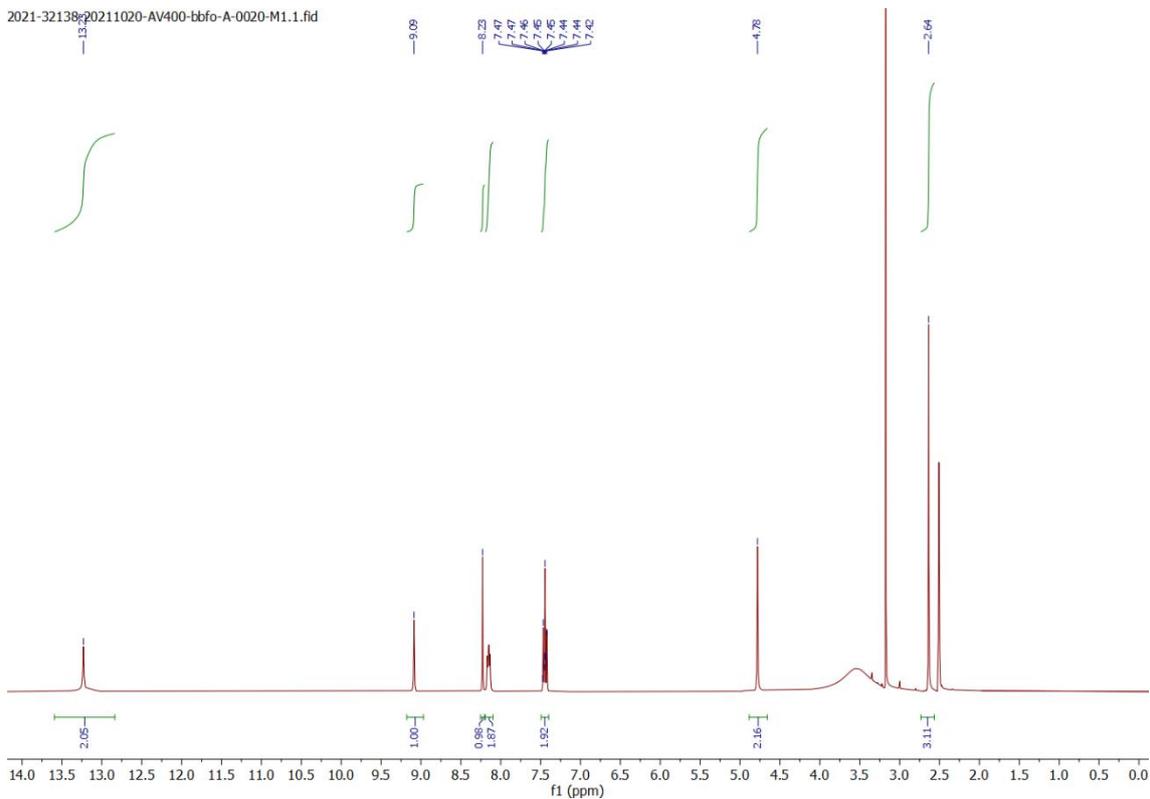


Figura 44. Espectro de RMN ^1H en DMSO- d_6 del ligando 1.

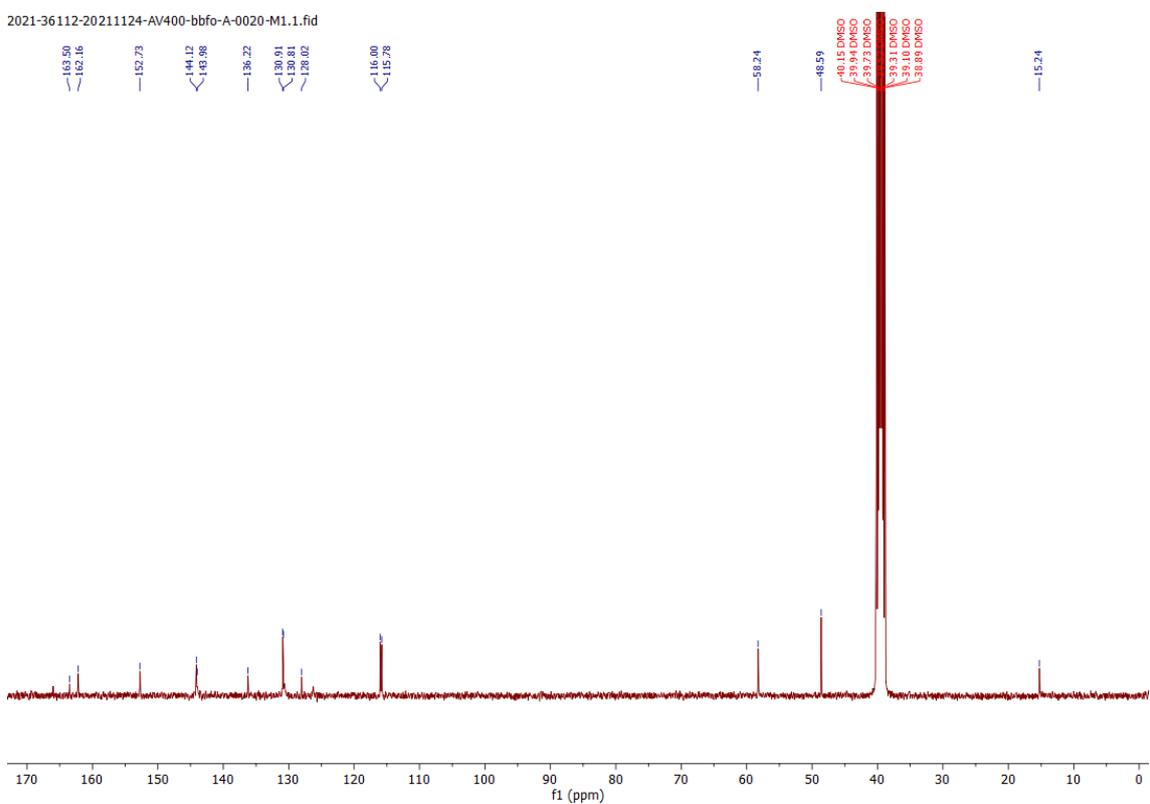


Figura 45. Espectro de RMN ^{13}C en DMSO- d_6 del ligando 1.

Ligando 2

2021-29880-20211007-AV400-bbfo-A-0020-M2.1.fid

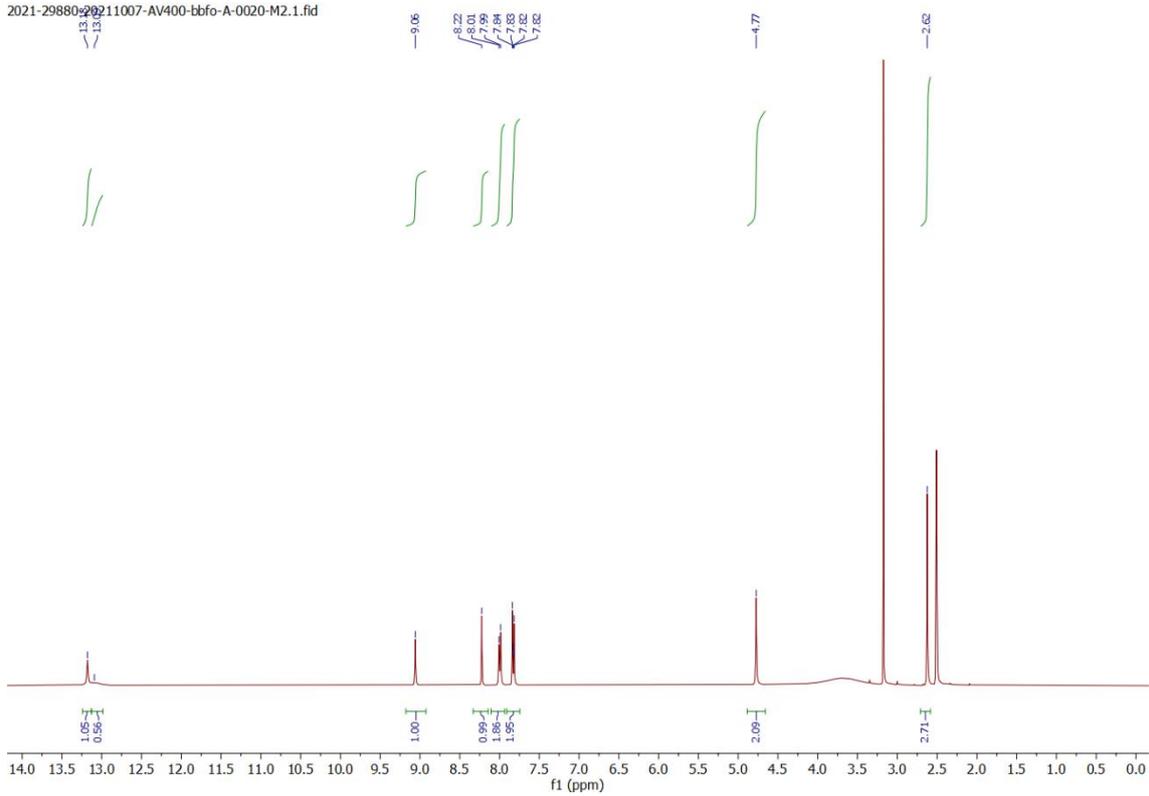


Figura 46. Espectro de RMN ^1H en DMSO-d_6 del ligando 2.

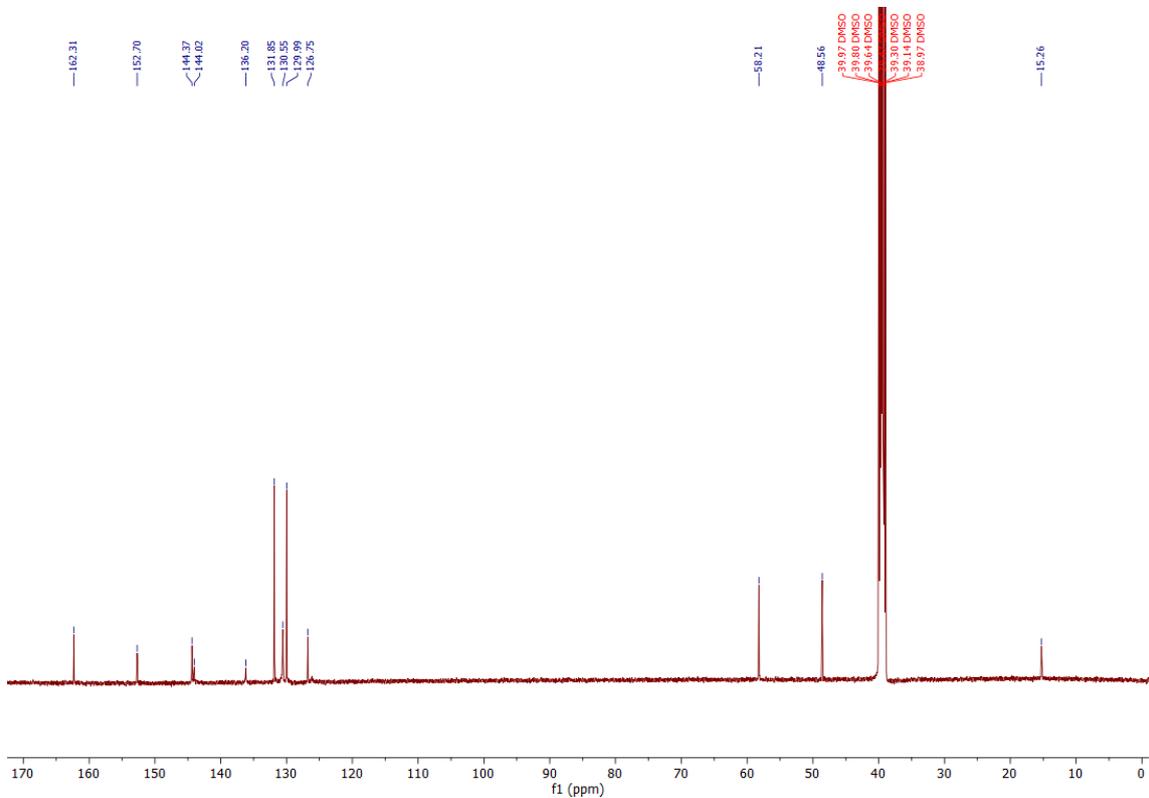


Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C en DMSO-d_6 del ligando 2.

Ligando 3

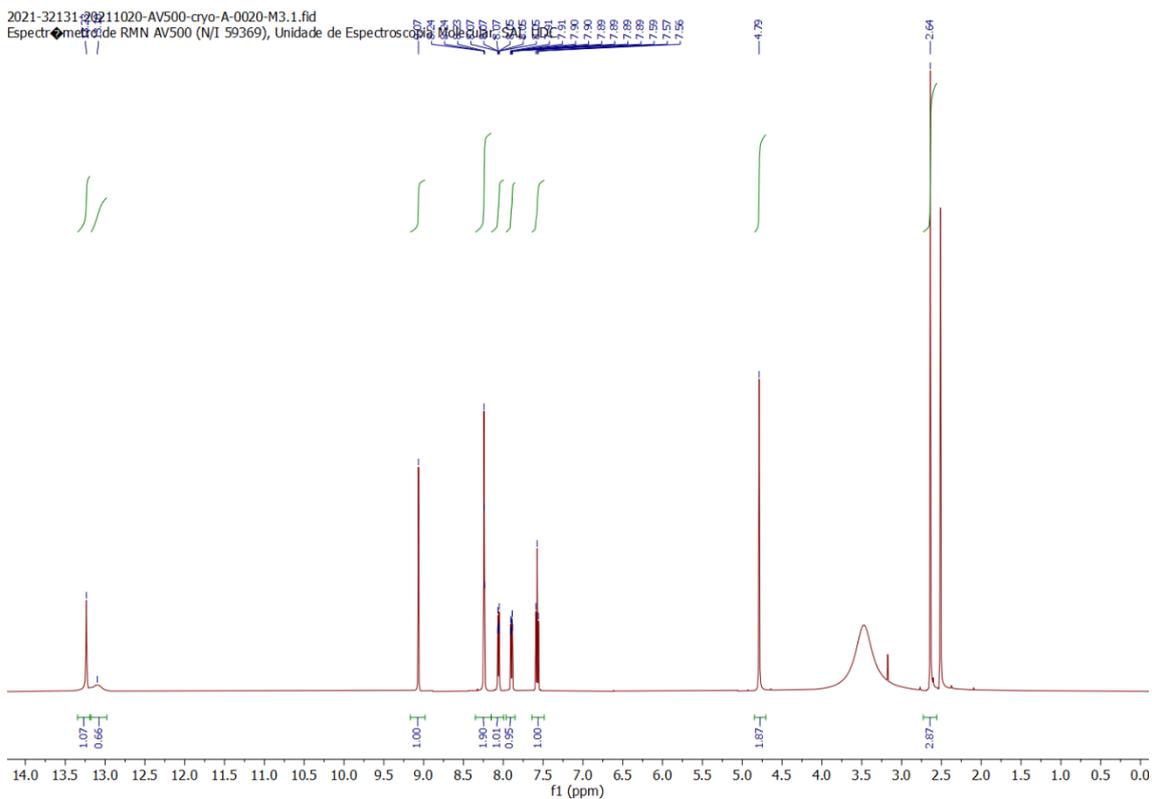


Figura 48. Espectro de RMN 1H en DMSO- d_6 del ligando 3.

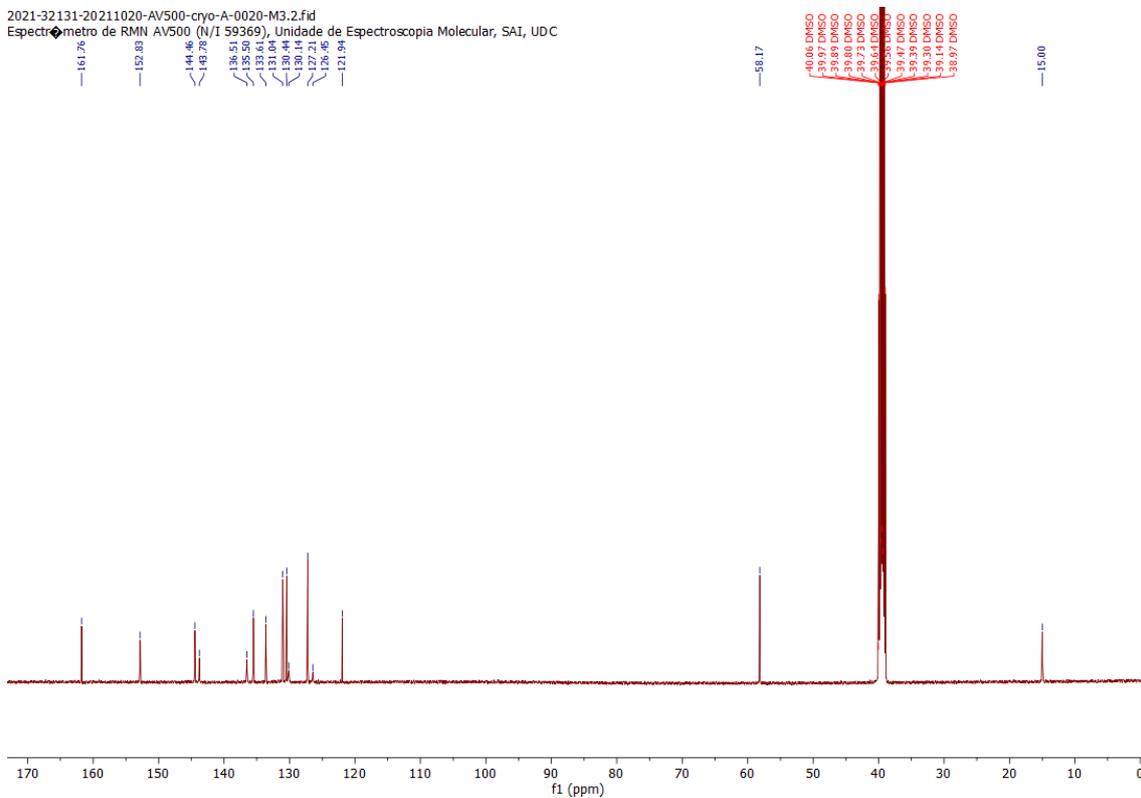


Figura 49. Espectro de RMN ^{13}C en DMSO- d_6 del ligando 3.

Difracción de rayos X de monocristal

Ligando 1

Tabla 11. Información cristalográfica del ligando 1.

Fórmula empírica	C ₁₆ H ₁₉ ClFN ₃ O ₄	
Peso molecular	371.79	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 ₁ /n	
Dimensión celda unidad	a = 7.8657(3) Å	α = 90°
	b = 9.0718(3) Å	β = 90.7960(14)°
	c = 24.9326(9) Å	γ = 90°
Volumen	1778.92(11) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.388 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	0.251 mm ⁻¹	
F(000)	776	
Tamaño cristal	0.14 x 0.08 x 0.07 mm ³	
Rango theta para la colección de datos	2.39 a 28.32°.	
Rangos indexación	-10 ≤ h ≤ 10, -12 ≤ k ≤ 12, -33 ≤ l ≤ 33	
Reflexiones recogidas	66500	
Reflexiones independientes	4430 [R(int) = 0.0486]	
Complejidad para theta = 28.32°	100.0 %	
Max. y min. transmisión	0.9827 y 0.9658	
Datos / restricciones / parámetros	4430 / 0 / 231	
Calidad de ajuste en F²	1.039	
Índice final R [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0319, wR ₂ = 0.0797	
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0390, wR ₂ = 0.0841	
Densidad residual	0.356 y -0.240 e.Å ⁻³	

Tabla 12. Distancias y ángulos en los enlaces de hidrógeno formados en el ligando 1. Simetrías: #1 x-1,y,z #2 -x+3/2,y+1/2,-z+1/2 #3 -x+1/2,y+1/2,-z+1/2.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	∠(DHA)
O(1)-H(1)...N(1)	0.84	1.81	2.5382(13)	143.8
O(1)-H(1)...O(2)	0.84	2.66	3.4066(12)	149.2
O(1M)-H(1M)...Cl(1)#1	0.84	2.21	3.0431(11)	172.9
N(2)-H(2)...Cl(1)#2	0.88	2.34	3.1871(11)	162.2
N(3)-H(3)...O(1M)	0.88	1.77	2.6345(14)	166.1
O(3)-H(3B)...Cl(1)#3	0.84	2.30	3.1405(10)	176.0

Ligando 2

Tabla 13. Información cristalográfica del ligando 2.

Fórmula empírica	C _{15.50} H ₁₇ BrClN ₃ O _{3.50}	
Peso molecular	416.68	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Triclínico	
Grupo espacial	P $\bar{1}$	
Dimensión celda unidad	a = 7.9565(3) Å	$\alpha = 85.8067^\circ$
	b = 13.7937(5) Å	$\beta = 85.9625(14)^\circ$
	c = 15.6080(5) Å	$\gamma = 88.9374(16)^\circ$
Volumen	1703.99(10) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.624 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	2.591 mm ⁻¹	
F(000)	844	
Tamaño cristal	0.10 x 0.06 x 0.05 mm ³	
Rango tetha para la colección de datos	2.57 to 28.33°	
Rangos indexación	-10<=h<=10, -18<=k<=18, -20<=l<=20	
Reflexiones recogidas	91224	
Reflexiones independientes	8493 [R(int) = 0.0757]	
Complejitud para theta = 28.32°	99.8 %	
Max. y min. transmisión	0.8814 y 0.7816	
Datos / restricciones / parámetros	8493 / 0 / 441	
Calidad de ajuste en F²	1.029	
Índice final R [$I > 2\sigma(I)$]	R ₁ = 0.0279, wR ₂ = 0.0562	
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0412, wR ₂ = 0.0605	
Densidad residual	0.429 y -0.372 e.Å ⁻³	

Tabla 14. Distancias y ángulos en los enlaces de hidrógeno formados en el ligando 2. Simetrías: #1 -x+1, -y, -z+1 #2 -x+1, -y+1, -z #3 -x, -y+1, -z #4 x+1, y, z

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	$\angle(DHA)$
O(1)-H(1)...N(1)	0.84	1.83	2.561(2)	144.1
O(1M)-H(1M)...Cl(1)#1	0.84	2.31	3.1455(16)	173.2
N(2)-H(2)...Cl(2)	0.88	2.35	3.1774(17)	157.7
O(3)-H(3)...Cl(2)#2	0.84	2.20	2.9781(14)	154.6
N(3)-H(3A)...Cl(1)#3	0.88	2.18	3.0587(16)	174.9
O(4)-H(4)...N(4)	0.84	1.88	2.613(2)	144.8

N(5)-H(5)...O(3)#2	0.88	2.14	2.961(2)	156.1
O(6)-H(6)...Cl(1)#4	0.84	2.25	3.0911(14)	177.6
N(6)-H(6D)...O(1M)	0.88	1.90	2.752(2)	163.0

Ligando 3

Tabla 15. Información cristalográfica del ligando 3.

Fórmula empírica	C ₁₅ H ₁₄ BrClN ₃ O ₃		
Peso molecular	399.65		
Temperatura	100(2) K		
Longitud de onda	0.71073 Å		
Sistema cristalino	Monoclínico		
Grupo espacial	P2 ₁ /n		
Dimensión celda unidad	a = 7.2675(4) Å	α = 90°	
	b = 12.4378(5) Å	β = 95.042(2)°	
	c = 17.4321(8) Å	γ = 90°	
Volumen	1569.62(13) Å ³		
Z	4		
Densidad (calculada)	1.691 Mg/m ³		
Coefficiente de absorción	2.807 mm ⁻¹		
F(000)	804		
Tamaño cristal	0.11 x 0.04 x 0.03 mm ³		
Rango theta para la colección de datos	2.86 a 28.34°		
Rangos indexación	-9 ≤ h ≤ 9		
	-16 ≤ k ≤ 16		
	-22 ≤ l ≤ 23		
Reflexiones recogidas	34523		
Reflexiones independientes	3925 [R(int) = 0.0610]		
Completitud para theta = 28.32°	99.8 %		
Max. y min. transmisión	0.9205 y 0.7476		
Datos / restricciones / parámetros	3925 / 0 / 221		
Calidad de ajuste en F²	1.040		
Índice final R [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0620, wR ₂ = 0.1231		
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0760, wR ₂ = 0.1297		
Densidad residual	0.560 y -0.655 e.Å ⁻³		

Tabla 16. Distancias y ángulos en los enlaces de hidrógeno formados en el ligando 3. Simetrías: #1 - $x+5/2, y+1/2, z+5/2$ #2 $x-1/2, -y+1/2, z-1/2$

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1)...N(1)	0.84	1.82	2.549(4)	143.5
N(2)-H(2)...Cl(1)	0.88	2.41	3.229(4)	154.2
O(3)-H(3)...Cl(1)#1	0.84	2.28	3.110(3)	167.8
N(3)-H(3A)...Cl(1)#2	0.88	2.24	3.105(3)	167.1

Complejo 1

Tabla 17. Información cristalográfica del complejo 1.

Fórmula empírica	C ₁₆ H ₁₆ ClCuFN ₃ O ₄	
Peso molecular	432.31	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 ₁ /c	
Dimensión celda unidad	a = 12.8632(8) Å	α = 90°
	b = 7.4246(4) Å	β = 103.537(2)°
	c = 17.9262(12) Å	γ = 90°
Volumen	1664.46(18) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.725 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	1.512 mm ⁻¹	
F(000)	880	
Rango theta para la colección de datos	2.34 a 28.28°	
Rangos indexación	-17 ≤ h ≤ 16	
	-9 ≤ k ≤ 9	
	-23 ≤ l ≤ 23	
Reflexiones recogidas	35672	
Reflexiones independientes	4116 [R(int) = 0.0643]	
Completitud para theta = 28.32°	99.9 %	
Datos / restricciones / parámetros	4116 / 18 / 272	
Calidad de ajuste en F²	1.059	
Índice final R [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0352, wR ₂ = 0.0780	
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0534, wR ₂ = 0.0864	
Densidad residual	0.783 y -0.650 e.Å ⁻³	

Tabla 18. Distancias y ángulos en los enlaces de hidrógeno formados en el complejo 1.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(3)-H(3)...Cl(2)	0.88	2.24	3.121(2)	177.5

Complejo 2

Tabla 19. Información cristalográfica del complejo 2.

Fórmula empírica	C ₁₇ H ₂₁ BrClCuN ₃ O ₅	
Peso molecular	526.27	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 ₁ /c	
Dimensión celda unidad	a = 14.0053(6) Å	α = 90°
	b = 7.2042(3) Å	β = 97.966(2)°
	c = 19.6242(8) Å	γ = 90°
Volumen	1960.92(14) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.783 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	3.323 mm ⁻¹	
F(000)	1060	
Rango theta para la colección de datos	2.39 a 28.33°	
Rangos indexación	-18<=h<=18	
	-9<=k<=9	
	-26<=l<=26	
Reflexiones recogidas	78527	
Reflexiones independientes	4887 [R(int) = 0.0474]	
Completitud para theta = 28.32°	99.9 %	
Datos / restricciones / parámetros	4887 / 0 / 337	
Calidad de ajuste en F²	1.033	
Índice final R [I>2sigma(I)]	R ₁ = 0.0194, wR ₂ = 0.0475	
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0230, wR ₂ = 0.0489	
Densidad residual	0.436 y -0.365 e.Å ⁻³	

Tabla 20. Distancias y ángulos en los enlaces de hidrógeno formados en el complejo 2. Simetrías: #1 x-y+1/2,z+1/2

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1M)-H(1O)...Cl(1)#1	0.74(2)	2.46(2)	3.1944(14)	172(2)
O(2M)-H(2M)...O(1M)	0.75(2)	2.02(2)	2.7532(18)	170(2)
O(3)-H(3O)...O(2)#1	0.73(3)	2.35(3)	2.9644(15)	142(2)
O(3)-H(3O)...Cl(1)#1	0.73(3)	2.64(2)	3.2579(12)	143(2)
N(3)-H(3N)...O(2M)	0.80(2)	1.93(2)	2.7133(17)	164(2)

Complejo 4

Tabla 21. Información cristalográfica del complejo 4.

Fórmula empírica	C ₁₆ H ₁₈ Cl ₂ CuFN ₃ O ₄	
Peso molecular	469.77	
Temperatura	100(2) K	
Longitud de onda	0.71073 Å	
Sistema cristalino	Monoclínico	
Grupo espacial	P2 ₁ /c	
Dimensión celda unidad	a = 7.4748(4) Å	α = 90°
	b = 18.6023(14) Å	β = 96.299(2)°
	c = 13.2872(10) Å	γ = 90°
Volumen	1836.4(2) Å ³	
Z	4	
Densidad (calculada)	1.699 Mg/m ³	
Coefficiente de absorción	1.519 mm ⁻¹	
F(000)	956	
Rango theta para la colección de datos	1.89 a 26.40°	
Rangos indexación	-8 ≤ h ≤ 9	
	-23 ≤ k ≤ 23	
	-16 ≤ l ≤ 16	
Reflexiones recogidas	49698	
Reflexiones independientes	3772 [R(int) = 0.1149]	
Completitud para theta = 28.32°	99.8 %	
Datos / restricciones / parámetros	3772 / 15 / 258	
Calidad de ajuste en F²	1.089	
Índice final R [I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0649, wR ₂ = 0.1299	
Índices R (todos los datos)	R ₁ = 0.0813, wR ₂ = 0.1362	
Densidad residual	1.362 y -0.715 e.Å ⁻³	

Tabla 22. Distancias y ángulos en los enlaces de hidrógeno formados en el complejo 4. Simetrías: #1 x, y, z+1 #2 -x+1, -y+1, -z+1 #3 x, -y+3/2, z+1/2 #4 -x+1, y+1/2, -z+3/2.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1M)-H(1MO)...Cl(1)#1	0.84	2.36	3.196(6)	170.8
N(2)-H(2N)...Cl(1)#2	0.88	2.27	3.120(4)	161.5
N(3)-H(3N)...Cl(2)#3	0.88	2.36	3.193(4)	158.1
O(3)-H(3O)...F(1A)#4	0.84	1.46	2.011(13)	119.9

Espectroscopia de absorción UV-Vis

Ligando 1

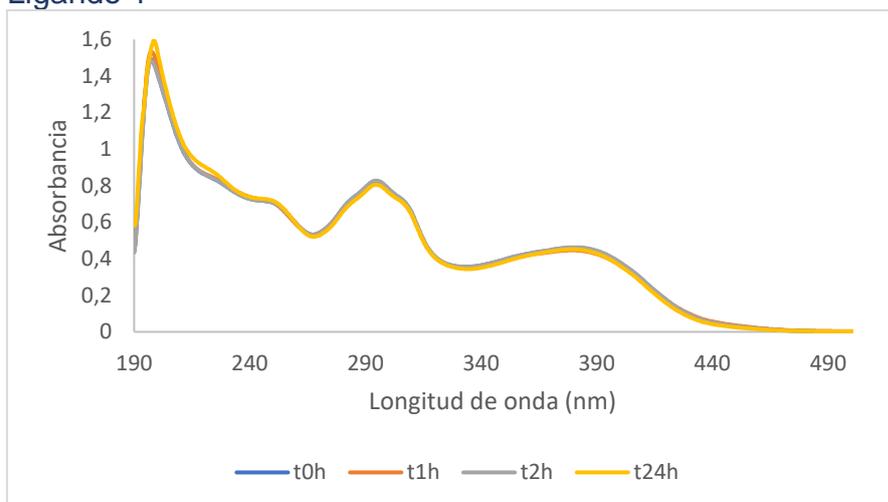


Figura 50. Variación del espectro de absorción del ligando 1 (55 μM) con el tiempo.

Ligando 2

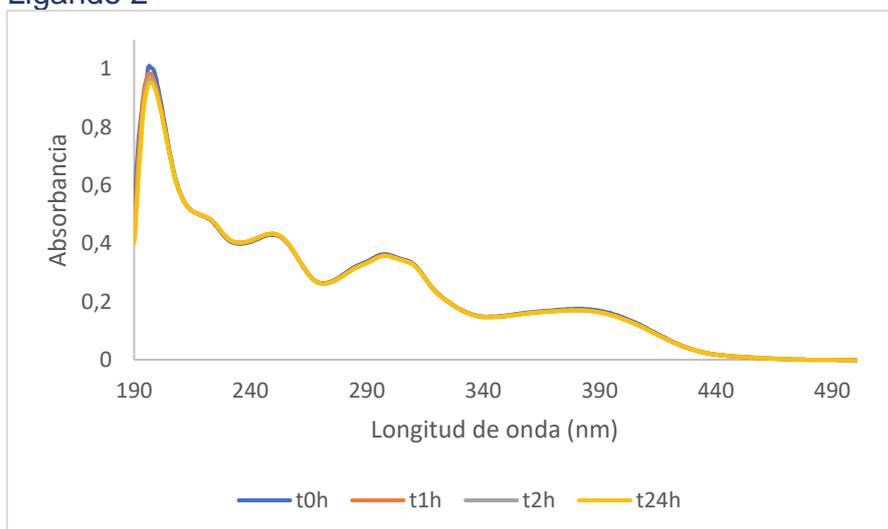


Figura 51. Variación del espectro de absorción del ligando 2 (45 μM) con el tiempo.

Ligando 3

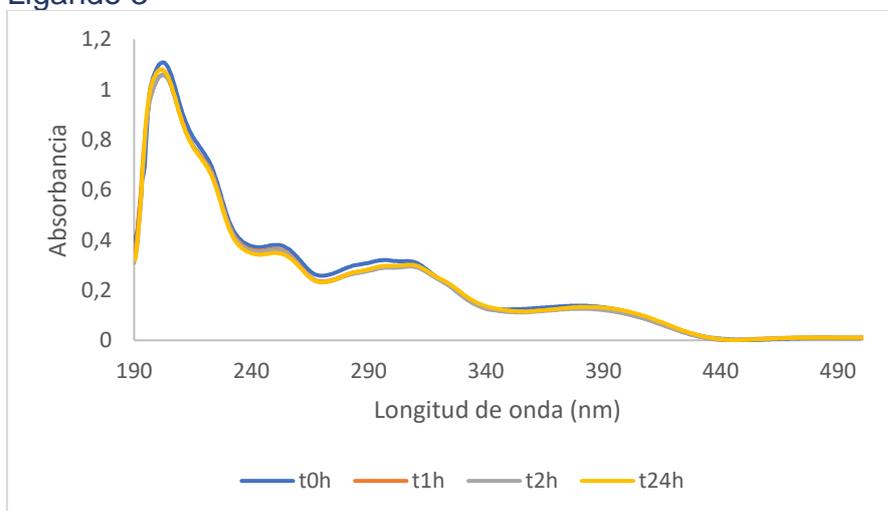


Figura 52. Variación del espectro de absorción del ligando 3 (30 μM) con el tiempo.

Ligando 4

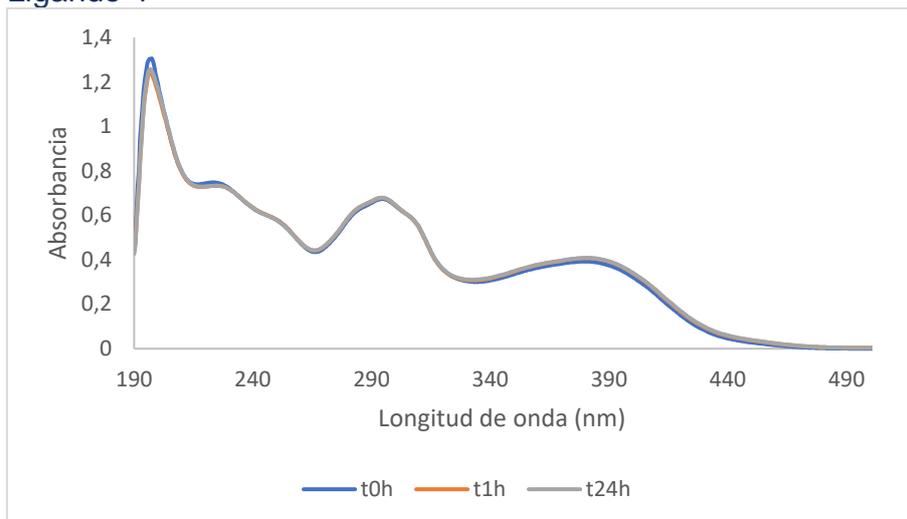


Figura 53. Variación del espectro de absorción del ligando 4 (45 μM) con el tiempo.

Ligando 5

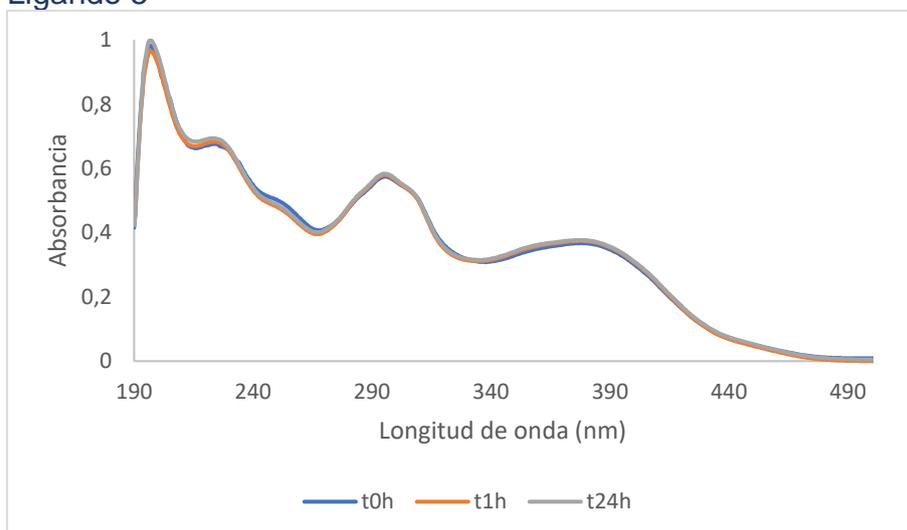


Figura 54. Variación del espectro de absorción del ligando 5 (35 μM) con el tiempo.

Complejo 3

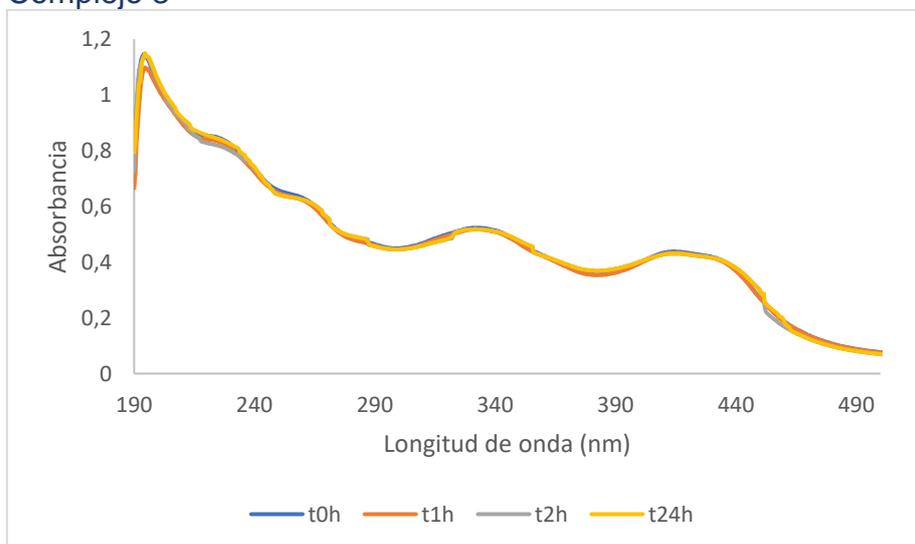


Figura 55. Variación del espectro de absorción del complejo 3 (30 μM) con el tiempo.

Complejo 4

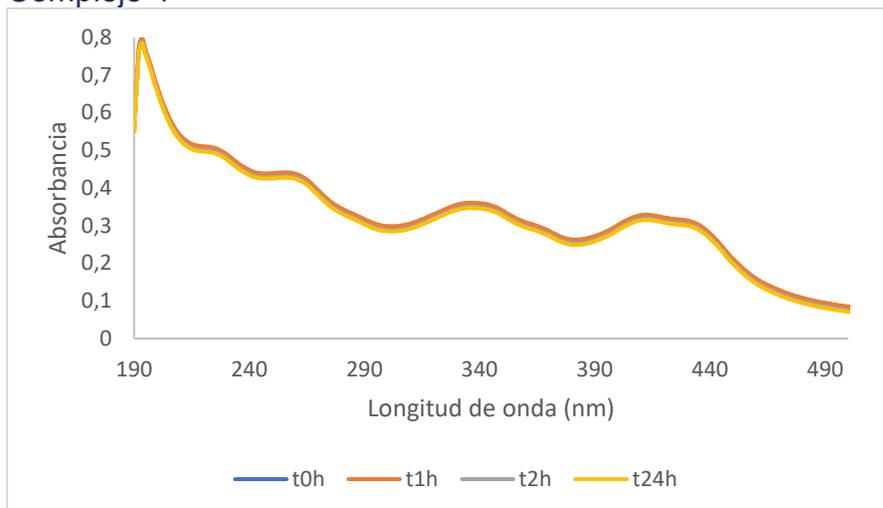


Figura 56. Variación del espectro de absorción del complejo 4 (30 μM) con el tiempo.

Estudio experimental de interacción con el ADN: Espectroscopia UV-Vis

Ligando 1

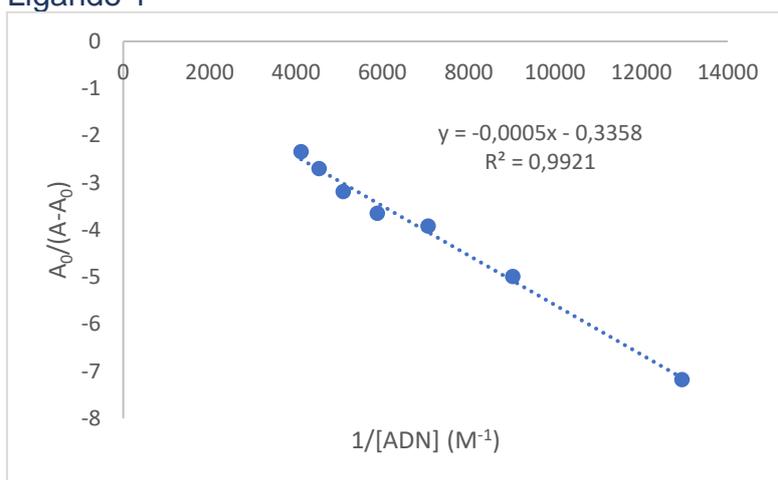


Figura 57. Ajuste lineal de los valores de absorbancia obtenidos para el ligando 1 siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Ligando 2

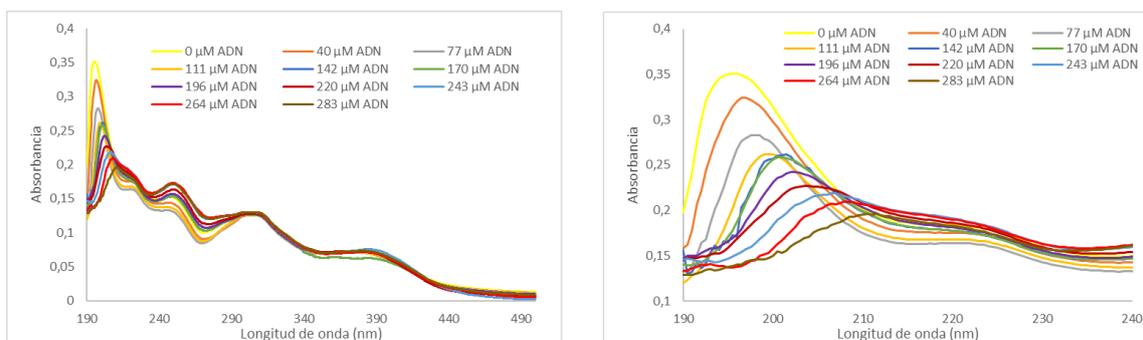


Figura 58. Variación del espectro de absorción UV-Vis del ligando 2 (15 μM) al añadir cantidades crecientes de ADN.

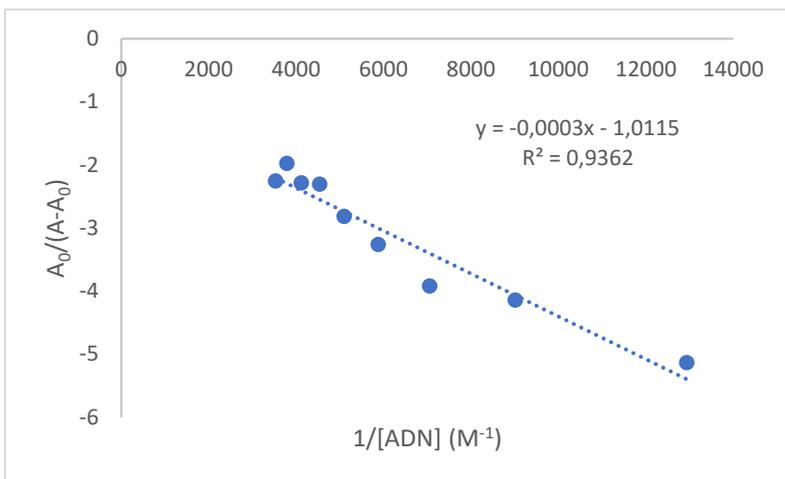


Figura 59. Ajuste lineal de los valores de absorbancia obtenidos para el ligando 2 siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Ligando 3

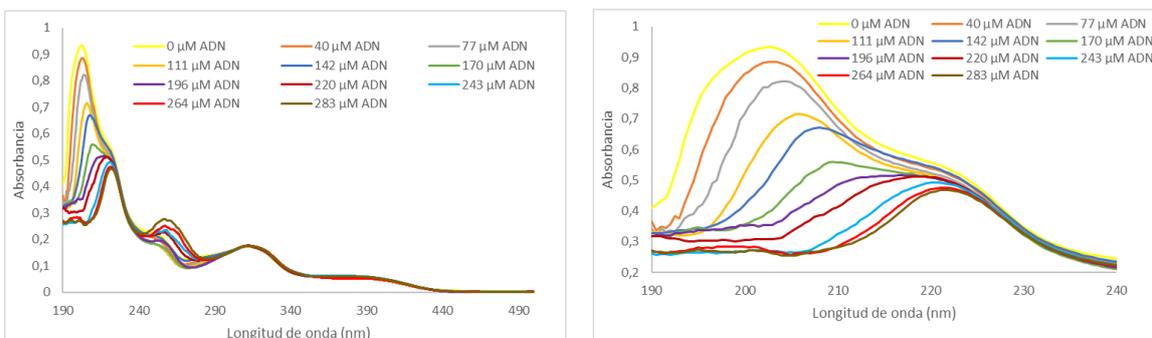


Figura 60. Variación del espectro de absorción UV-Vis del ligando 3 (20 μM) al añadir cantidades crecientes de ADN.

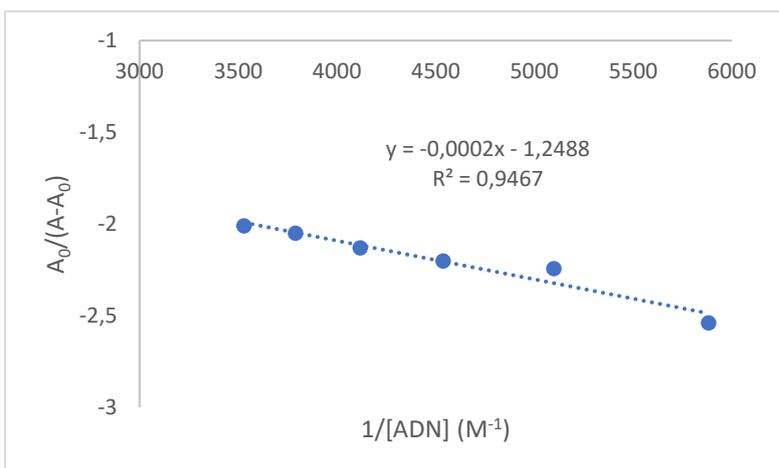


Figura 61. Ajuste lineal de los valores de absorbancia obtenidos para el ligando 3 siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Ligando 4

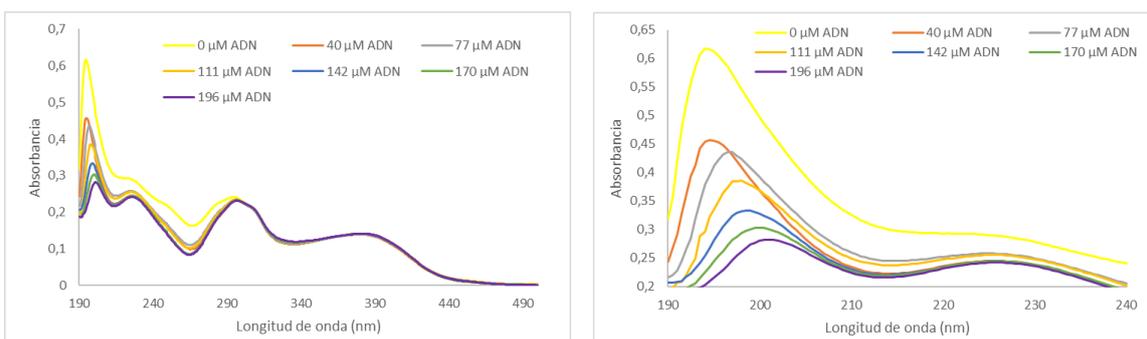


Figura 62. Variación del espectro de absorción UV-Vis del ligando 4 (20 μM) al añadir cantidades crecientes de ADN.

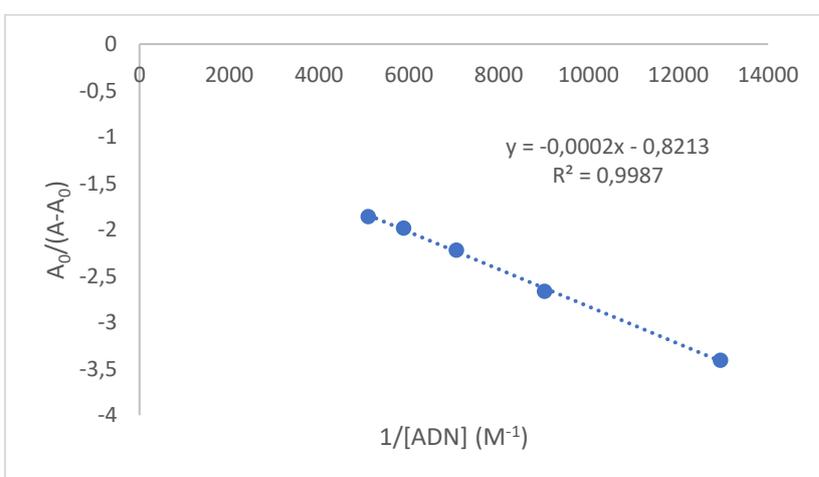


Figura 63. Ajuste lineal de los valores de absorbancia obtenidos para el ligando 4 siguiendo la ecuación de Benesi-Hildebrand.

Ligando 5

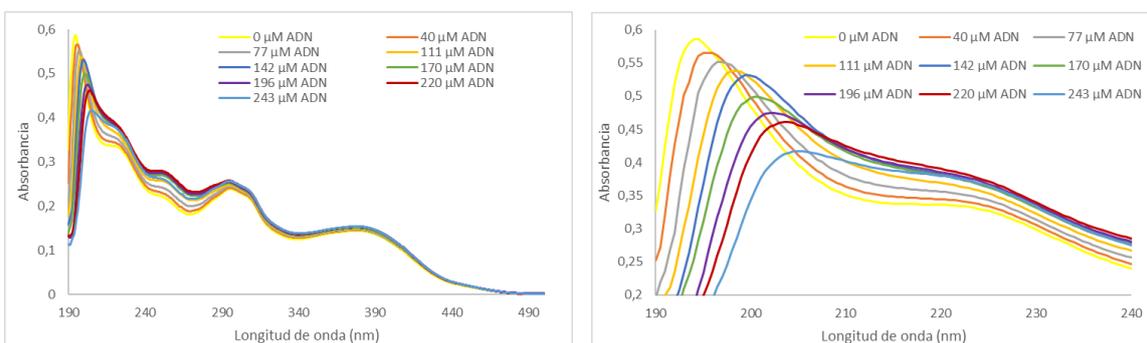
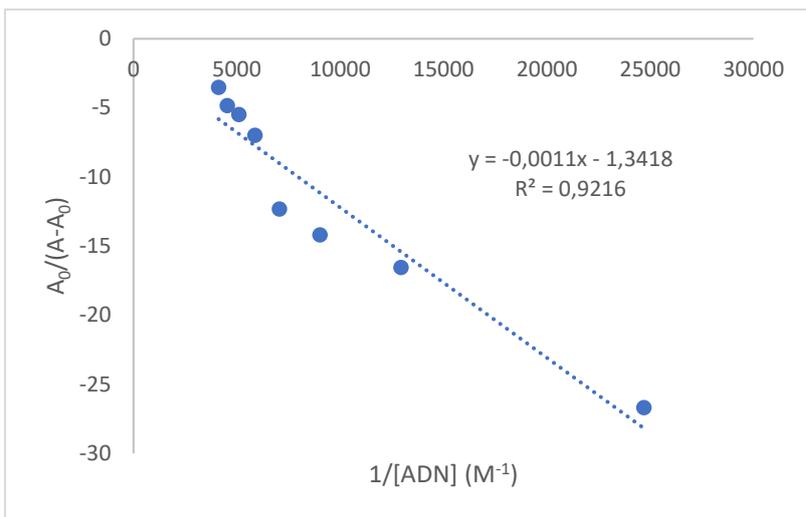


Figura 64. Variación del espectro de absorción UV-Vis del ligando 5 (20 μM) al añadir cantidades crecientes de ADN.



Complejo 4

