



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Química
Departamento de Química Inorgánica

**“QUÍMICA DE COORDINACIÓN
CATIÓNICA Y ANIÓNICA DE
NUEVOS POLIAZARECEPTORES
POLITÓPICOS”**

Programa de Doctorado:

310E “Técnicas Experimentales en Química”

Doctorando:

Jorge González García

Directores

Dr. D. Enrique García-España Monsonís
Dra. D^a. Concepción Soriano Soto
Dr. D. José Miguel Llinares Berenguer

D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia, **D^a. Concepción Soriano Soto**, Profesora Titular E. U. del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y **D. José Miguel Llinares Berenguer**, Profesor Titular E. U. del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia.

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada “**Química de Coordinación Catiónica y Aniónica de Nuevos Poliazareceptores Politópicos**”, ha sido realizada bajo su dirección conjuntamente en los Departamentos de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Valencia, por la Licenciado **D. Jorge González García**, y que, encontrándose concluída, autorizan su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

Y para que así conste, expiden y firman el presente informe y la memoria ante la Facultad de Química.

Paterna, 9 de Noviembre de 2012.

D. Enrique García-España Monsonís

D^a. Concepción Soriano Soto

D. José Miguel Llinares Berenguer

D. **Jorge González García**, Licenciado en Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia, presenta esta Memoria, con el título "**Química de Coordinación Catiónica y Aniónica de Nuevos Poliazareceptores Politópicos**", en el marco del programa de doctorado "Técnicas Experimentales en Química" con el fin de optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que así conste, firma la presente en Paterna a 12 de Noviembre de 2012.

Fdo: **Jorge González García**

En primer lugar quiero agradecer a mi director de Tesis Enrique por la oportunidad que me dio al formar parte de su grupo de investigación hace ya bastantes años, porque lo poco que sé de química supramolecular y de investigación se te lo debo a sus lecciones, aunque siempre me quedará esa espina clavada que ha sido no poder enseñarte a jugar bien a frontón. Muchas gracias.

A Conxa, por tu preocupación, dedicación y compromiso con mi tesis. También tengo que agradecerte por tu infinita paciencia conmigo y, sin lugar a dudas, sin tu ayuda nunca habría continuado en este grupo ni habría terminado un trabajo de tesis en química supramolecular. Te aseguro que tendrás tus fichas y puntos de fusión!!!

A José Miguel por su permanente preocupación por mis estudios en el extranjero y su disponibilidad a cualquier hora para tomar un "coff" y charlar un rato.

A Salva, Rakel y Estefanía, comenzamos juntos el doctorado hace ± 7 años y hemos pasado muchos buenos ratos. Siempre habéis estado disponibles cuando se os necesitaba por muy ocupados que estuvierais. He aprendido muchas cosas sobre todo químicas aunque alguna que otra personal.

A todos los profesionales del ICMol que me recibieron con los brazos abiertos, Bego, Maricarmen, Tere, Juan, Maripaz, Paco, Antonio, Julio... incluso Pili. Sin lugar a dudas de todos ellos he aprendido alguna lección. A Manolo G. Basallote y a todo su equipo de la Universidad de Cadiz por los estudios cinéticos llevados a cabo.

A todos los que han compartido muchos momentos agradables en la Universidad: Dani muy buena persona donde las haya desde que te conozco hace ya un porrón de años, Mario un crack donde los haya, Javi el hombre imparable, Raúl, Oscar, Jeroen Gerum, Rafa, Noemí, Jordi, María, Cristina, Robert, Jennifer, Aida, Sara, Sofía, Sandra, José Ramón, Rosa, Marc, Voro, Krytin, Francesco, Jesús, Pau, Silvia, Astrid, Rosalisa, Elija... y disculparme, porque seguro que alguien se me olvida.

A toda mi gente de Requena por estar siempre allí, en los buenos y los malos momentos. Si una persona se define por los que le rodean, está muy claro que me puedo sentir orgulloso de quién soy; Tavo, David Satur, Juan Pablo Monty, Parra, Pipo Nieves, Marta, Tomé, Hektor, Harri, Ramón, Laura, Lolo, Dulce, Chapas, Charli, Mon, Viki, Miriam, Plaza, Ali, Antonio, Tere, Cabero, Chesco, Marien, Edu, Javi; Juan, Laura, Marisa, Oscarillo, Pedro,

Pepito, Juanillo, Manu...y seguro que me olvido de alguien, aunque siempre nos encontramos en el Rock'&'Cepas.

A toda la gente del Ruder Boskovic Institute en Zagreb por enseñarme un campo tan interesante como es la interacción con biomacromoléculas. A Ivo Piantanida por ser un buen supervisor, colaborador y paciente, a Marijana, Ivo (el otro) y Lidija. También acordarme de Renata, Vesna, Vera y a todos la gente con la que compartí muy buenos momentos en el Hostal Ravnice y viajando por los Balcanes.

Al grupo de fotoquímica de la Universidade Nova de Lisboa por acogerme tan bien, enseñarme fluorescencia y mostrarme varias lecciones sobre cómo organizar un grupo humano de investigación y mantener la pasión por la química. Al profesor Fernando Pina, por ser un magnífico supervisor, y a Raquel Gavara, Yoan Leydet, Ana Marta, Joao Carlo Lima, Raquel, Sandra Gago, Jorge Parola, Joao, Pedro, María Joao,...Y también quiero acordarme de toda los amigos de la residencia y de todos los buenos momentos que pasamos en Lisboa; Lino, Mari Estarly, Jesús, Mónica, Bea, Vinicius, Ricardito, Renata; Miguel, Jens, Philip, Zyap Tiburon... siempre me acordaré de la fiesta que llevábamos al volver todas las noches a Caparica en el ferri y las reuniones en nuestra cocina que siempre parecían unas *raves brasileiras do malandros*.

Al profesor Phil Gale y su equipo por acogerme en su grupo de Química Supramolecular en Southampton y enseñarme la química del transporte a través de membrana. A Steve, Cally, Issabel, Natalhie, Sam, Marco, Jenny, Yoshi, Louise, Ravi, ... por todas esas tardes/noches hablando de química, futbol y de lo que se pusiera por delante en el PUB de la universidad con una pinta, porque seguro que ninguna gran idea surgió con un zumo.

A mis padres Juan y Victoria, mi hermana Victoria y Víctor, por estar siempre a mi lado animándome en todas mis decisiones sean o no de su agrado, gracias de todo corazón. Y por último, a mis sobrinos que aún siendo tan pequeños son un gran apoyo, Rubén y Carlos.

Índice general

Índice general	I
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	X
Índice de abreviaturas y acrónimos	XXVII
Publicaciones relacionadas	XXXI
1.- Introducción	1
1.1.- Introducción a la química supramolecular	3
1.2.- Historia de la química supramolecular	3
1.3.- Química supramolecular receptor-sustrato	9
1.4.- Interacciones supramoleculares	9
1.5.- Autoensamblaje	22
1.5.1.- Autoensamblaje con centros metálicos	24
1.6.- Reconocimiento molecular	28
1.7.- Catálisis supramolecular	32
1.8.- Transporte supramolecular	34
1.9.- Receptores politópicos	37
1.9.1.-Receptores escorpiandos y dobles escorpiandos	43
1.10.- Vocabulario y nomenclatura	46
2.- Objetivos	59
3.- Material y métodos	65

3.1.- Potenciometría	67
3.1.1.- Sistema potenciométrico	67
3.1.2.- Adquisición de datos	69
3.1.3.- Medida de la concentración de iones hidrógeno	70
3.1.4.- Programa HYPERQUAD	71
3.2.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear	74
3.3.- Espectroscopía UV-Visible	74
3.4.- Espectroscopía de Emisión de Fluorescencia	75
3.5.- Punto de Fusión	75
3.6.- Análisis Elemental	75
3.7.- Espectroscopía de Masas	76
3.8.- Estudios Cinéticos.	76
3.9.- Difracción de rayos X	78
3.10.- Estudios teóricos	79
3.11.- Estudios de ^1H RMN paramagnética	80
3.12.- Determinación " <i>in vitro</i> " de la actividad SOD mediante el método Oberley-Spitz	80
3.13.- Metodología aplicable para determinar la interacción de los ligandos con polinucleótidos	84
3.13.1.- Espectroscopia de UV-Vis y fluorescencia	84
3.13.2.- Ensayos de desplazamiento con bromuro de etidio	86
3.13.3.- Medidas de la temperatura de fusión	86
3.13.4.- Dicroísmo circular	88
3.14.- Evaluación del efecto antiproliferativo " <i>in vitro</i> "	89
4.- Síntesis y caracterización	95

4.1.-Procedimientos sintéticos	97
4.2.-Síntesis del ligando precursor <i>pytren</i>	102
4.3.- Síntesis de los aldehídos de los espaciadores aromáticos	107
4.4.-Síntesis de ligandos politópicos	114
4.5.- Síntesis del ligando L5	120
5.- Protonación	137
5.1.- Comportamiento ácido-base	144
5.1.1.- Estudios potenciométricos	144
5.1.2.- Estudios UV-Vis	151
5.1.3.- Estudios fluorescencia	154
5.2.- Estudios RMN y secuencias de protonación	156
5.2.1.- Secuencia de protonación del ligando L1	157
5.2.2.- Secuencia de protonación de ligando L2	161
5.2.3.- Secuencia de protonación de ligando L3	163
5.2.4.- Secuencia de protonación de ligando L5	166
5.2.5.- Secuencia de protonación de ligando L6	168
6.- Química de coordinación catiónica de ligandos politópicos multinucleares	173
6.1.- Introducción a la química catiónica	175
6.2.- Estudios con Zn^{2+}	177
6.2.1.- Estudios de coordinación con Zn^{2+}	182
6.2.2.- Estudios de RMN	197
6.2.3.- Estudios de emisión de fluorescencia	200
6.2.4.- Cinéticas de formación de L6 con Zn^{2+}	203
6.3.- Estudios con Cu^{2+}	209

6.3.1.- Estudios de la coordinación con Cu^{2+}	210
6.3.2.- Estudios de ^1H RMN paramagnética	219
6.3.2.1- Estudios de ^1H RMN paramagnética de los complejos binucleares de L1 y L2	220
6.3.2.2- Estudios de ^1H RMN paramagnética del complejo trinuclear $\text{Cu}_3\text{L2}^{6+}$	224
6.4.- Estudios cinéticos	227
6.4.1.- Cinéticas de formación de los complejos de L1 y L2 con Cu^{2+}	227
6.4.2.- Cinéticas de descomposición promovidas por ácido de los complejos de Cu^{2+} con L1 y L2	233
6.5.- Coordinación con Mn^{2+}	236
6.5.1.- Estudios potenciométricos de la interacción con Mn^{2+}	237
6.6.-Actividad superóxido dismutasa	240
6.6.1.- Superóxido dismutasas de cobre y zinc	241
6.6.2.- Superóxido dismutasa de manganeso	243
6.6.3.- Miméticos de SOD	245
6.6.4.- Diseño del mimético para terapias antioxidantes	247
6.7.- Actividad de los complejos de Cu^{2+}	249
6.8.- Actividad de los complejos de Mn^{2+}	251
7.- Interacción con nucleótidos y aniones fosfato	263
7.1.- Estructuras de los nucleótidos	265
7.2.- Comportamiento ácido-base de los nucleótidos	269
7.3.- Estudio de la interacción de L1 y L2 con aniones fosfato y nucleótidos	278

7.3.1.- Estudio potenciométrico de la interacción de L1 y L2 con nucleótidos y aniones fosfatos	278
7.3.2.- Estudios de interacción de L1 y L2 con aniones fosfato y nucleótidos mediante RMN y dinámica molecular	292
7.3.2.1.- Estudios de interacción de L1 y L2 con aniones fosfato y ATP mediante RMN y dinámica molecular	292
7.3.2.2.- Estudios de interacción de L1 y L2 con nucleótidos monofosfato mediante RMN y dinámica molecular	297
7.4.- Estudio de los sistemas ternarios Zn^{2+} -ligando-anión	302
7.4.1.- Estudio potenciométrico de los sistemas ternarios Zn^{2+} -ligando-fosfatos	302
7.4.2.- Estudio por fluorescencia de la interacción del sistema binuclear $Zn_2L_2^{4+}$ con nucleótidos	312
7.5.- Apéndice del capítulo 7: tablas y figuras adicionales	315
8.- Interacción con ácidos nucleicos	331
8.1.- Introducción	333
8.2.- Características de los polinucleótidos	336
8.3.- Interacción ligando-polinucleótido	338
8.4.- Interacción de L1 y L2 con ácidos nucleicos	345
8.5.- Valoraciones espectrofotométricas	347
8.6.- Ensayos de desplazamiento con bromuro de etidio	350
8.7.- Experimentos de desnaturalización térmica	354
8.8.- Dicroísmo circular	357
8.9.- Evaluación del efecto antiproliferativo “ <i>in vitro</i> ”	361
8.10.- Apéndice del capítulo 8: figuras adicionales	365

9.- Conclusiones/Conclusions	377
9.1.- Synthesis	379
9.2.- Acid-base properties	379
9.3.- Metal complexation	380
9.3.1.- Zinc complexation	380
9.3.2.- Copper complexation	382
9.3.3.- Molecular reorganisations in Cu ²⁺ complexes	383
9.3.4.- Manganese complexation	383
9.3.5.- SOD mimics of Cu ²⁺ and Mn ²⁺ complexes	383
9.4.- Interaction with nucleotides and polyphosphate anions	384
9.4.1.- Interaction with nucleotides and polyphosphate anions of L1 and L2	384
9.4.2.- Formation of mixed complexes Zn ²⁺ -L-A	384
9.5.- Interaction with nucleic acids	385

Índice de tablas

1.1.- Cronología indicando los desarrollos de la química supramolecular	7
1.2.- Principales características de las interacciones intermoleculares	10
1.3.-Propiedades de los enlaces de hidrógeno	14
1.4.- Comparación de los productos moleculares y supramoleculares	23
3.1.- Descripción de los componentes del sistema potenciométrico.	68
5.1.- Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para los ligandos	145
5.2.- Variación de los logaritmos de las constantes de protonación de los ligandos	147
5.3.- Logaritmos de las constantes de protonación obtenidas mediante técnicas potenciométricas, UV-Vis y emisión de fluorescencia	156
6.1.- Logaritmos de las constantes de estabilidad globales para la interacción de los ligandos L1 , L2 , L3 y L6 con Zn^{2+}	183
6.2.- Logaritmos de las constantes de estabilidad sucesivas para la interacción de los ligandos L1 , L2 , L3 y L6 con Zn^{2+}	188
6.3.- Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción de los precursores con Zn^{2+}	189
6.4.- Datos cristalográficos de la estructura de Zn^{2+} con L1	194
6.5.- Distancias y ángulos seleccionados para los entornos de coordinación de los iones metálicos en la estructura Zn_2L1^{4+}	196

6.6.- Logaritmos de las constantes de estabilidad de los ligandos L1 , L2 , L3 y L5 con Cu^{2+}	211
6.7.- Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción de los precursores con Cu^{2+}	214
6.8.- Señales hiperfinas de ^1H RMN paramagnética de los complejos $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ y $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$	223
6.9.- Señales hiperfinas de ^1H RMN paramagnética del complejo $\text{Cu}_3\text{L2}^{6+}$	226
6.10.- Logaritmos de las constantes de estabilidades globales y sucesivas para la interacción de los ligandos L1 , L2 y L3 con Mn^{2+}	237
6.11.- Datos de la actividad SOD de los complejos de Cu^{2+} de los ligandos	250
6.12.- Datos de la actividad SOD de los complejos de Mn^{2+} de los ligandos	252
7.1.- Nombres y abreviaturas de las nucleobases de los ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos	267
7.2.- Logaritmos de las constantes de protonación de los aniones	269
7.3.- Logaritmos de las constantes de protonación del AMP, GMP, CMP y UMP determinadas mediante RMN y potenciometría	277
7.4.- Logaritmos de las constantes globales para la formación de los complejos binarios de L1 con nucleótidos y fosfatos	279
7.5.- Logaritmos de las constantes sucesivas para la formación de los complejos binarios de L1 con AMP	284
7.6.- Logaritmos de las constantes sucesivas para la formación de los complejos binarios de L1 con nucleótidos y fosfatos	287
7.7.- Logaritmos de las constantes sucesivas para la formación de los	

complejos binarios de L2 con nucleótidos y fosfatos	288
7.8.- Logaritmos de las constantes efectivas calculadas a pH 7.0 para la interacción entre L1 o L2 y nucleótidos monofosfato	290
7.9.- Logaritmos de las constantes globales para la formación de los complejos ternarios de L1 y L2 con Zn^{2+} y PPI, TPP y ATP	304
7.10.- Logaritmos de las constantes estabilidad y la variación de fluorescencia a pH 7.4 para la interacción de los aniones con el complejo $Zn_2L_2^{4+}$	315
7.11.- Logaritmos de las constantes globales o acumuladas para la formación de los complejos binarios de L2 con AMP, GMP, CMP, UMP, PPI, TPP y ATP	319
7.12.- $\Delta\delta$ (ppm) de las señales de 1H RMN de los complejos de L1 y L2 con los mononucleótidos y los ligandos o nucleótidos.	323
8.1.- Constantes de asociación y relaciones n de L2 con los polinucleótidos a pH 5.0 y 6.0	349
8.2.- Valores de IC_{50} determinados por el desplazamiento del EtBr de polinucleótidos al adicionar L1 y L2 a pH 7.0	352
8.3.- Valores de ΔT_m^a ($^{\circ}C$) a valor de pH 6.0 y diferentes relaciones [compuesto] / [polinucleótido] para la interacción de L1 y L2 con los polinucleótidos de doble hebra	354
8.4. Valores de ΔT_m^a a diferentes valores de pH de los polinucleótidos de doble hebra estudiados tras la adición de L1 y L2	355
8.5.- Valores de GI_{50} de citotoxicidad de L1 y L2 con líneas celulares	364

Índice de figuras

1.1.- Representación cronológica de los conceptos de la química supramolecular	4
1.2.- Representación cronológica de los conceptos de la química supramolecular	5
1.3.- Estructuras del NaCl y del catión bis(diazabicyclooctano) con $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	11
1.4.- Representación de un acuo complejo metálico y estructura de un éter corona interaccionando con un metal	12
1.5.- Interacciones dipolo-dipolo en carbonilos	13
1.6.- Enlaces de hidrógeno en un dímero de ácidos carboxílicos, emparejamiento de bases del ADN y complejo autoensamblado por enlaces de hidrógeno	14
1.7.- Orientaciones relativas de los cuadrupolos en las Interacciones π	15
1.8.- Estructuras del ferroceno y la sal de Ziesel	18
1.9.- Representación de las interacciones anión- π responsables de la formación del dímero de derivados de 2-aminopiridinas	19
1.10.- Representación del enlace de halógeno entre el yodo monoclورو y la trimetilamina.	19
1.11.- Estructura rayos X de S_8 y yodoformo.	20
1.12.- Interacción hidrofóbica de un huésped orgánico en disolución acuosa	22

1.13.- Estructura química y cristalina del primer metalomacrociclo obtenido por el profesor Fujita	25
1.14.- Autoensamblaje de un metalociclo de Pd y ligandos piridínicos en disolvente orgánico del profesor Stang.	25
1.15.- Esquema del reordenamiento de un sistema por adición de una molécula plantilla.	26
1.16.- Autoensamblaje de complejos de inclusión formados entre un receptor con forma de caja y un sustrato aromático	28
1.17.-Equilibrio de formación de complejos con ligandos mono- y bidentados	29
1.18.- Esquema de los efectos quelato, macrocíclico y criptando	30
1.19.- Estabilidades de un ligando y sus análogos macrocíclico y criptando con el ión metálico K^+ .	31
1.20.- Esquema de la interacción selectiva del receptor con el L-Glutámico frente al L-Aspartato.	32
1.21.- Centro activo de la anhidrasa carbónica y estructuras modelos de los complejos metálicos poliamínicos.	33
1.22.- Estructura de la caja G y reacciones Diels-Alder aceleradas por la caja G.	33
1.23.- Los principales mecanismos de transporte de iones a través de membrana y clasificación del transporte basado en la estequiometría y la dirección del transporte.	34
1.24.- Estructura de la valinomicina y estructura cristalina del mismo complejando el K^+ octaédricamente en el interior de su cavidad	35
1.25.-Transportadores aniónicos de Gale <i>et al.</i> y representación de	

una vesícula con el mecanismo de transporte $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$	36
1.26.- Estructura de la anfotericina y representación del canal que forma en las membranas.	36
1.27.- Estructura cristalina del criptando con 3 Cu^{2+} y un CO_3^{2-} puente y estructura del criptando asimétrico de Mateus <i>et al.</i>	38
1.28.- Estructura del macrociclo de Micheloni <i>et al.</i> y estructura cristalina del macrociclo con Zn^{2+} y un grupo hidroxilo.	39
1.29.- Ligandos y aniones estudiados por Tripier <i>et al.</i>	40
1.30.- Ligandos politópicos desarrollados contra el HIV por Bridge <i>et al.</i>	41
1.31.- Complejos metálicos de los ligandos di- y tritópicos de <i>ciclen</i> de Kimura <i>et al.</i>	42
1.32.- Un dibujo de un escorpión y un ligando tipo <i>escorpiando</i> de García-España <i>et al.</i>	43
1.33.- Un dibujo de un doble escorpiando y un ligando tipo <i>doble escorpiando</i> de García-España <i>et al.</i>	43
1.34.- Ejemplos de ligandos tipo <i>escorpiando</i> que se pueden encontrar en la bibliografía de Bencini, Bianchi, Fabbrizzi y colaboradores	44
1.35.- Ligandos tipo <i>doble escorpiando</i> que se pueden encontrar en la bibliografía de Fusi <i>et al.</i>	45
1.36.- Modelo propuesto para el complejo trinuclear de los receptores de Fusi <i>et al.</i>	45
1.37.- Estructura del precursor macrocíclico <i>pytren</i>	46
3.1.- Sistema potenciométrico utilizado	67
3.2.- Procedimiento en una valoración potenciométrica	73
3.3.- Esquema de un espectrofotómetro de flujo detenido	77

3.4.- Mecanismo propuesto de reducción del NBT	81
3.5.- Generación de superóxido mediante el sistema xantina/xantina oxidasa	82
3.6.- Representación esquemática de una curva de transición térmica mostrando la temperatura de desnaturalización para la doble hebra de ADN	87
3.7.- Representación de la curva de transición térmica para el ADN de doble hélice libre, el ADN en presencia de un ligando que desestabiliza la doble hélice y el ADN en presencia de un ligando que estabiliza la doble hélice	87
4.1.- Ligandos sintetizados	97
4.2.- Estructura del precursor escorpiando <i>pytren</i>	98
4.3. Reacción de tosiliación del tren	99
4.4.- Reacción de ciclación entre la 2,6-bisbromometilpiridina y el tren	100
4.5.- Esquema de síntesis de los aldehídos de la fenantrolina y de la bipyridina	100
4.6.- Esquema de síntesis de los receptores politópicos	101
4.7.- Esquema de síntesis del ligando precursor de tipo escorpiando <i>pytren</i>	103

4.8.- Esquema de síntesis de los aldehídos de la fenantrolina y la biperidina	107
4.9.- Esquema de síntesis de los receptores politópicos L1, L2, L3, L4 y L6	114
4.10.- Esquema de síntesis del derivado <i>pytren</i> protegido	121
4.11.- Esquema de síntesis del derivado <i>pytren</i> protegido	123
4.12.- Esquema de síntesis del receptor L5	124
5.1.- Representación esquemática del gradiente de protones que emplea el enzima F_0/F_1 -ATP sintasa en la síntesis de ATP	139
5.2.- Representación de la nanopartícula funcionalizada y de su mecanismo de liberación del fármaco	140
5.3.- Representación del sólido mesoporoso funcionalizado y de su mecanismo de liberación	140
5.4.- Excímero de los ligandos de bisnaftaleno de M. T. Albelda <i>et al.</i> y su mecanismo de acción	141
5.5.- Ligandos estudiados en el presente capítulo	144
5.6.- Conformerros de mínima energía de H_2L_2 , H_4L_2 y H_7L_2	149
5.7.- Diagramas de distribución de los ligandos en disolución acuosa	150
5.8.- Variación de los espectros de absorción UV-Vis de L2, L4 y L6 en función del pH. Curvas de valoración de la absorción de UV-Vis para L2, L4 y L6 junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas.	152

5.9.- Variación de los espectros de absorción UV-Vis de L3 en función del pH. Curvas de valoración de la absorción de UV-Vis para L3 junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas de cada ligando	153
5.10.- Variación de los espectros de emisión de fluorescencia de L2, L4 y L6 en función del pH. Curvas de valoración de la emisión de fluorescencia para L2, L4 y L6 junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas	155
5.11.- Diagrama de distribución de las especies de L1 con los desplazamientos químicos δ (ppm) de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	159
5.12.- Secuencia de protonación propuesta para L1	160
5.13.- Secuencia de protonación propuesta para L2	161
5.14.- Diagrama de distribución de las especies de L2 con los desplazamientos químicos δ (ppm) de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	162
5.15.- Diagrama de distribución de las especies de L3 con los desplazamientos químicos de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	164
5.16.- Secuencia de protonación propuesta para L3	165
5.17.- Secuencia de protonación propuesta para L5	166
5.18.- Diagrama de distribución de las especies de L5 con los desplazamientos químicos δ (ppm) de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	167
5.19.- Secuencia de protonación propuesta para L6	168

5.20.- Diagrama de distribución de las especies de L6 con los desplazamientos químicos δ (ppm) de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	169
6.1.- Estructura de rayos X de la alcohol deshidrogenasa (ADH1A)	175
6.2.- Estructura de rayos X de la anhidrasa carbónica.	178
6.3.- Estructura de rayos X de varios dedos de zinc formando un complejo con ADN (1A1G, Zif268)	179
6.4.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L1 y L2 con Zn ²⁺	185
6.5.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L3 y L6 con Zn ²⁺	186
6.6.- Estructuras de los ligandos <i>py22</i> , <i>pytren</i> y <i>pytren-2py</i>	189
6.7.- Modelos propuestos para la coordinación de los complejos mononucleares de Zn ²⁺	190
6.8.- Representación de la estructura de rayos X del complejo [Zn <i>py22</i>]Cl	191
6.9.- Modelos propuestos para la coordinación de los complejos binucleares de Zn ²⁺	192
6.10.- Representación de la estructura cristalina del complejo bimetalico con Zn ²⁺ de L1 mediante el programa MERCURY.	193
6.11.- Representación de la estructura cristalina del complejo bimetalico de Zn ²⁺ con L1 mediante el programa MERCURY.	195
6.12.- Señales de la zona aromática de los espectros de ¹ H RMN de Zn ²⁺ : L2 a pD ~ 7.4 a diferentes relaciones molares.	199
6.13.- Zona aromática de los espectros de ¹ H RMN de Zn ²⁺ : L2 a pD ~ 10.0 con diferentes relaciones molares.	200

6.14.- Diagramas de distribución de especies para la interacción del ligando L2 con Zn^{2+} en relaciones molares M:L 1:1, 2:1 y 3:1 superpuestas con la emisión de fluorescencia a 365 nm y del ligando L2 sin metal	202
6.15.- Variaciones del espectro de UV-Vis del ligando L6 a pH = 8 en presencia de 1 y 2 equivalentes de Zn^{2+} . Espectros de absorción en flujo detenido tras la adición de Zn^{2+} al ligando L6 en relación M:L 1:1. Variaciones del espectro de UV-Vis tras la adición de 1 equivalente de Zn^{2+} a una disolución de L6	204-205
6.16.- Mecanismo propuesto para la cinética de coordinación de Zn^{2+} con L6 .	206
6.17.- Variaciones del espectro de la emisión de fluorescencia de L6 a diferentes relaciones molares. Representación de las cinéticas de fluorescencia a 365 nm para relaciones molares Zn^{2+} : L6 1:1 y 2:1	208
6.18.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L1 y L2 con Cu^{2+}	212
6.19.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L3 y L5 con Cu^{2+}	213
6.20.- Estructuras cristalinas de $[Cupy22]Cl$, $[Cupytren]ClO_4$, $[Cupytren-2py](ClO_4)_2$	216
6.21.- Modelos propuestos para la coordinación de los complejos mononucleares de Cu^{2+}	217
6.22.- Modelo propuesto para las estructuras binucleares de Cu^{2+}	218
6.23.- Espectros de 1H RMN paramagnética de $Cu_2L_2^{4+}$ y $Cu_2L_1^{4+}$	220
6.24.- Modelos propuestos para los complejos binucleares con Cu^{2+} de L1 y L2 obtenidos mediante RMN de paramagnéticos y la numeración	

empleada en los espectros de paramagnéticos	221
6.25.- Espectro de ^1H RMN paramagnética de $\text{Cu}_3\text{L2}^{6+}$ a $\text{pD} = 7.2$.	224
6.26.- Modelos propuestos para el complejo trinuclear con Cu^{2+} de L2 obtenidos mediante ^1H RMN paramagnética y la numeración empleada en los espectros	225
6.27.- Espectros de las especies intermedias y productos observados en la formación de los complejos mono-, bi- y trinuclear de Cu^{2+} y L2	229
6.28.- Modelo cinético para el ajuste de la formación entre el Cu^{2+} y el ligando L2	229
6.29.- Ilustración de la secuencia del movimiento de los iones metálicos durante la formación de los complejos mono-, bi- y trinuclear	230
6.30.- Modelo cinético para el ajuste de la formación entre el Cu^{2+} y el ligando L1	231
6.31.- Espectros electrónicos de las especies intermedias y productos observados en la formación de los complejos de L1 con Cu^{2+} en relación molar 1:1 y 2:1	232
6.32.- Trazos de la dependencia con la concentración de ácido de las constantes de velocidad observadas para el segundo paso cinético en la descomposición cinética de los complejos de Cu^{2+} con L1 y L2	235
6.33.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L1 , L2 y L3 con Mn^{2+} en relación molar M:L 1:1.	238
6.34.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L1 , L2 y L3 con Mn^{2+} en relación molar M:L 2:1.	239
6.35.- Centro activo de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$	240
6.36.- Ciclo catalítico de $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$	243

6.37.- Centro activo de la MnSOD	244
6.38.- Ciclo catalítico de la MnSOD	245
6.39.- Ejemplos destacados de miméticos de Cu ₂ Zn ₂ SOD y MnSOD encontrados en la bibliografía	246
7.1.- Elementos estructurales de los nucleótidos más comunes	266
7.2.- Estructuras de los nucleótidos y aniones fosfatos estudiados junto con la numeración empleada en los estudios de RMN	270
7.3.- Diagramas de distribución de especies para la protonación de los aniones P _{Pi} , TPP y ATP	271
7.4.- Diagrama de distribución de las especies del AMP, GMP, CMP y UMP con los desplazamientos químicos de la señal de P _α en D ₂ O a varios valores de pD	272
7.5.- Diagrama de distribución de las especies del AMP con los desplazamientos químicos de las señales H _{A2} y H _{A8} de ¹ H RMN de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	274
7.6.- Diagrama de distribución de las especies del GMP con los desplazamientos químicos de la señal H _{G8} de ¹ H RMN en D ₂ O a varios valores de pD	274
7.7.- Diagrama de distribución de las especies del CMP con los desplazamientos químicos de ¹ H RMN de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	275
7.8.- Diagrama de distribución de las especies del UMP con los desplazamientos químicos de ¹ H RMN de sus espectros en D ₂ O a varios valores de pD	276
7.9.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas del	

ligando L2 con el PPI, TPP y el ATP	280
7.10.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas del ligando L1 con los nucleótidos monofosfatos	281
7.11.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas del ligando L2 con los nucleótidos monofosfatos	282
7.12.- Diagramas de distribución para el ligando L1 , el AMP y la formación de los aductos entre ambos	283
7.13.- Representación gráfica del logaritmo de la constante efectiva frente el pH para el ligando L1 con AMP	286
7.14.- Representación de la constante efectiva frente al pH para los sistemas binarios entre L1 y L2 y AMP, GMP, CMP, UMP, ATP, TPP y PPI	289
7.15.- Representación de los porcentajes de complejación para cada mononucleótido frente al pH para los sistemas con L1 y L2	291
7.16.- δ (ppm) de la señal de ^{31}P RMN frente a $[\text{PPI}]/[\text{L}]$ a pD = 7.0 en D_2O para el complejo L1 :PPI y L2 :PPI	292
7.17.- Espectros de ^{31}P RMN de L1 :ATP y ATP a pD = 7.0 y 9.0.	293
7.18.- Numeración utilizada para ^1H RMN	294
7.19.- Región a campo bajo del espectro de ^1H RMN donde se encuentran las señales aromáticas y anomérica de los sistemas L1 :ATP, L1 y ATP	295
7.20.- Región a campo bajo del espectro de ^1H RMN donde se encuentran las señales aromáticas y anomérica de los sistemas L2 :ATP, L2 y ATP	296
7.21.- Confórmero de mínima energía calculado para la interacción de $\text{H}_6\text{L}_2^{6+}$ y ATP	297
7.22.- Representación de los δ (ppm) de ^{31}P RMN de la señal P_α de los mononucleótidos y de los complejos formados para los mononucleótidos	

CMP y UMP con los ligandos L1 y L2 a lo largo del pH junto con el diagrama de distribución	298
7.23.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de la señal anomérica de los mononucleótidos (AMP, GMP, CMP y UMP) y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos L1 y L2 a lo largo del pH.	299
7.24.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de las señales aromáticas del AMP, GMP, CMP y UMP y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos L1 y L2 a lo largo del pH	300
7.25.- Confórmero de mínima energía calculado para la interacción de $\text{H}_4\text{L2}^{4+}$ y AMP	301
7.26.- Diagramas de distribución de especies para el sistema $\text{Zn}^{2+}:\text{L1}:\text{ATP}$ frente al pH con diferentes relaciones molares M:L:A.	305
7.27.- Diagramas de distribución de especies para el sistema $\text{Zn}^{2+}:\text{L2}:\text{ATP}$ frente al pH con diferentes relaciones molares M:L:A.	306
7.28.-Representación gráfica de los porcentajes de ATP complejoado por L1 , L2 , $\text{Zn}^{2+}:\text{L1}$ y $\text{Zn}^{2+}:\text{L2}$ frente al pH	308
7.29.-Representación gráfica de los porcentajes de TPP complejoado por L1 , L2 , $\text{Zn}^{2+}:\text{L1}$ y $\text{Zn}^{2+}:\text{L2}$ frente al pH.	309
7.30.-Representación gráfica de los porcentajes de PPI complejoado por L1 , L2 , $\text{Zn}^{2+}:\text{L1}$ y $\text{Zn}^{2+}:\text{L2}$ frente al pH.	310
7.31.-Representación de la cantidad total de ATP complejoado en los sistemas binarios y ternarios de L1 y L2 .	311
7.32.- Variación de los espectros de emisión de fluorescencia del complejo $\text{Zn}_2\text{L2}^{4+}$ en función de la relación molar $[\text{ATP}]:[\text{Zn}_2\text{L2}^{4+}]$ a pH = 7.4. El	

gráfico interior indica el máximo de la intensidad de fluorescencia a 369 nm en función de la relación molar [ATP]:[Zn ₂ L ₂ ⁴⁺] a pH = 7.4	313
7.33.- Representación del % de disminución de la fluorescencia frente a los nucleótidos monofosfatos y aniones fosfatos para la interacción de los aniones con el complejo Zn ₂ L ₂ ⁴⁺ .	314
7.34.- Diagrama de distribución de las especies del AMP con el desplazamiento químico de la señal H _{R1} a varios valores de pD	315
7.35.- Diagrama de distribución de las especies del CMP con los desplazamientos químicos de las señales es H _{R3} , H _{R4} y H _{R5} a varios valores de pD	316
7.36.- Diagrama de distribución de las especies del UMP con los desplazamientos químicos de ¹ H RMN de las señales H _{U5} y H _{R1}	316
7.37.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas binarios del ligando L ₁ con el PPI, TPP y el ATP	317
7.38.- Experimento ¹ D RMN NOE selectivo para L ₂ :ATP a pD = 7.0 excitando H _{A2}	317
7.39.- Familia de los 10 confórmers de mínima energía calculados para la interacción de H ₆ L ₁ ⁶⁺ y ATP.	318
7.40.- Representación de los δ (ppm) de ³¹ P RMN de la señal P _α de los mononucleótidos y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos a lo largo del pH junto con el diagrama de distribución de las especies	320
7.41.- Representación de los δ (ppm) de ¹ H RMN de las señales aromáticas del ligando L ₁ y de los complejos formados con cada mononucleótido a lo largo del pH	320
7.42.- Representación de los δ (ppm) de ¹ H RMN de las señales aromáticas del ligando L ₂ y de los complejos formados con cada mononucleótido a lo largo del pH	321
7.43.- Representación de los δ (ppm) de ¹ H RMN de la señal (H _{R5}) de los	

mononucleótidos y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos L1 y L2 a lo largo del pH	322
7.44.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} : L1 :TPP frente al pH a diferentes relaciones molares M:L:A.	324
7.45.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} : L2 :TPP frente al pH a diferentes relaciones molares M:L:A.	325
7.46.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} : L1 :PPi frente al pH a diferentes relaciones molares M:L:A.	325
7.47.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} : L2 :PPi frente al pH a diferentes relaciones molares M:L:A.	326
7.48.-Representación de la cantidad total de TPP complejoado en los sistemas binarios y ternarios de L1 y L2	326
7.49.-Representación de la cantidad total de PPi complejoado en los sistemas binarios y ternarios de L1 y L2	327
8.1.- Estructura química del ADN	335
8.2.- Empaquetamiento y situación del ADN dentro de la célula	336
8.3.- Conformaciones A, B y Z de la estructura del ADN	336
8.4.- Surcos mayor y menor de la conformación B del ADN	337
8.5.- Complejos anticancerígenos de platino	339
8.6.- Estructura del complejo entre el cis-platino y el ADN	340
8.7.- Complejos anticancerígenos organometálicos	341
8.8.- Estructura de la enzima ADN polimerasa interaccionando con el ADN estableciendo interacciones con los residuos de los fosfatos cargados negativamente	342
8.9.- Ejemplos de la interacción de la proteína dedos de Zn^{2+} con el ADN	342

8.10.- Estructuras de tipo Hoogsteen y Hoogsteen-reverso que se forman al interactuar oligonucleótidos naturales o sintéticos con los pares de bases del ADN y las estructuras tridimensionales del ADN triple	343
8.11.- Ejemplos de moléculas capaces de interactuar con el ADN a través de su surco menor.	344
8.12.- Ejemplo de interacción con el ADN por intercalación.	344
8.13.- Valoraciones fluorimétricas de L2 con ctADN	348
8.14.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly dA-poly dT con L1 con relación molar $r = 0.3$ a pH 7.0.	351
8.15.- Ensayos de desplazamiento con EB con poly A poly U y poly dA – poly dT con L1 y L2 con relación molar $r_{[EB]/[polinucleótido]}=0.3$ a pH = 7.0.	353
8.16.- Curvas de desnaturalización térmica a pH = 7.0 de los polinucleótidos poly dA-poly dT, poly A – poly U, y los complejos de poly dA – poly dT con L1 y con L2 y los complejos de poly A – poly U con L1 y con L2	356
8.17.- Valoración de DC del poly A- poly U con L1 y L2 a varias relaciones molares a pH = 6.0.	358
8.18.- Valoración de DC del poly dA-poly dT con L1 y L2 con relaciones molare $r_{[compuesto]/[polinucleótido]} = 0.1, 0.2$ y 0.3 a pH = 6.0.	360
8.19.- Valoración de DC del polímero poly dC-poly dG con L1 y L2 a distintas relaciones molares a pH 6.0.	361
8.20.- Estructuras de los ligandos previamente tripodales analizados previamente analizados mediante ensayos antiproliferativos	362
8.21.- Representaciones de la respuesta de las dosis para los ligandos L1 y L2 probados <i>in vitro</i> para el panel de líneas celulares humanas	

de cáncer.	362-363
8.22. Valoraciones fluorimétricas de L2 con poly A-poly U a pH 5.0 y a pH 6.0.	365
8.23. Valoraciones fluorimétricas de L2 con poly dA-poly dT a pH 5.0 y a pH 6.0.	365
8.24. Valoraciones fluorimétricas de L2 con poly dC-poly dG a pH 5.0 y a pH 6.0.	366
8.25.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con ct-ADN y L1 con relación molar $r_{\text{[polinucleótido]/[EtBr]}} = 0.3$ a pH 7.0.	366
8.26.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con ct-ADN y L2 con relación molar $r_{\text{[polinucleótido]/[EtBr]}} = 0.3$ a pH 7.0.	367
8.27.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly dA-poly dT y L2 con relación molar $r_{\text{[polinucleótido]/[EtBr]}} = 0.3$ a pH 7.0.	368
8.28.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly A-poly U y L1 con relación molar $r_{\text{[polinucleótido]/[EtBr]}} = 0.3$ a pH 7.0.	369
8.29.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly A-poly U y L2 con relación molar $r_{\text{[polinucleótido]/[EtBr]}} = 0.3$ a pH 7.0.	370
8.30.- Valoración de DC del ct-ADN con L1 a distintas relaciones molares a pH 5.0 y pH 6.0.	370
8.31.- Valoración de DC del ct-ADN con L2 a distintas relaciones molares a pH 5.0 y pH 6.0.	371
8.32.- Valoración de DC de los polímeros poly A-poly U con L1 a distintas relaciones molares a pH 5.0 y pH 6.0.	371
8.33.- Valoración de DC de los polímeros poly dA-poly dT con L2 a distintas relaciones molares a pH 5.0 y pH 6.0.	372

8.34.- Valoración de DC de los polímeros poly A-poly U con L2 a distintas relaciones molares a pH 5.0 y pH 6.0.	372
8.35.- Valoración de DC de los polímeros poly dA-poly dT con L2 a distintas relaciones molares a pH 5.0 y pH 6.0.	373
Figura 8.36.- Valoración de DC del polímero poly dC-poly dG con L1 y L2 a distintas relaciones molares a pH 5.0.	373

Abreviaturas y acrónimos

A	Anión
Å	Amstrong
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMP	Adenosín-5'-monofosfato
ARN	Ácido ribonucleico
aq.	Acuoso. Referido al agua como disolvente
ATP	Adenosín-5'-Trifosfato
BOC	Butoxicarbonilo
°C	Grados Celsius
CDP	Citosín-5'-difosfato
CMP	Citosín-5'-monofosfato
CTP	Citosín-5'-trifosfato
COSY	Correlación espectroscópica
Cu ₂ Zn ₂ SOD	Superóxido dismutasa de cobre y zinc
<i>d</i>	Doblete
δ	Desplazamiento químico
<i>E</i> o <i>emf</i>	Potencial
ϵ	Coefficiente de absorción molar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EtOH	Etanol

EtBr	Bromuro de etidio
F	Constante de Faraday
GDP	Guanosín-5'-difosfato
GMP	Guanosín-5-monofosfato
GTP	Guanosín-5'-trifosfato
H	Entalpia
HAc	Ácido acético
HBr/HAc	Ácido bromhídrico en ácido acético
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinaetanosulfónico
His	Histidina
HR-MS	Espectroscopia de masas de alta resolución
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
h ν	Energía de un fotón
Hz	Hercio
I	Intensidad de fluorescencia
IR	Espectroscopia de infrarrojos
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
J	Julio
k	Constante de velocidad
K	Grados Kelvin
k_{ef}	Constante efectiva
λ	Longitud de onda
L	Ligando
Log K	Logaritmo de la constante de estabilidad

m	Multiplete
<i>m</i>	Meta
M	Metal/Molar
mL	Mililitros
Ms	Milisegundos
mV	Milivoltios
MS	Espectroscopia de masas
MnSOD	Superóxido dismutasa de manganeso
m/z	Relación masa/carga
NBT	Azul de tetrazolio (" <i>nitroblue tetrazolium</i> ")
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
nm	Nanómetros
<i>p</i>	Para
pD	Potencial de deuterio $pD = -\log_{10}[D]$
PET <i>transfer</i>)	Transferencia electrónica fotoinducida (" <i>Photoinduced electron</i> ")
PhOH	Fenol
PM	Peso molecular
PPi	Pirofosfato
ppm	Parte por millón
R	Constante universal
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RX	Rayos X
s	Singlete/Sólido
SCIE	Servicio central de soporte a la investigación experimental
SHE	Electrodo estándar de hidrógeno

SOD	Superóxido Dismutasa
t	Triplete
T	Temperatura
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
TPP	Tripolifosfato
tren	Tris[2-(N- <i>p</i> -toluensulfonilaminoetil)]amina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminoetano
TsCl	Cloruro de <i>p</i> -toluensulfonilo
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltio
X.O.	Xantina oxidasa

Publicaciones

1. B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, **J. González**, J. Latorre, M. A. Mañez, M. G. Basallote, C. Soriano, E. García-España. Hydrogen and copper ion-induced molecular reorganisations in scorpiand-like ligands. A potentiometric, mechanistic and solid-state study. *Inorganic Chemistry*, **2007**, *46*, 5707-5719.
2. B. Verdejo, S. Blasco, **J. González**, E. García-España, P. Gaviña, S. Tatay, A. Doménech, T. Doménech-Carbó, H. R. Jiménez, C. Soriano. CO₂ fixation and activation by the Cu(II) complexes of 5,5''-terpyridinophane Macrocycles. *European Journal of Inorganic Chemistry*. **2008**, 84-97.
3. J. Alarcón, M. T. Albelda, R. Belda, M. P. Clares, E. Delgado-Pinar, J. C. Frías, E. García-España, **J. González**, C. Soriano. Synthesis, coordination properties of an azamacrocyclic Zn(II) chemosensor complexes containing pendent methylnaphthyl groups. *Dalton Transactions*. **2008**, 6530-6538.
4. J. Galisteo, P. Navarro, L. Campayo, M. R. J. Yunta, F. Gómez-Contreras, J. A. Villa-Pulgarin, B. G. Sierra, F. Mollinedo, **J. González**, E. García-España. Synthesis and Cytotoxic Activity of a New Potential DNA Bisintercalator: 1,4-Bis{3-[N-(4-chlorobenzo[g]phthalazin-1-yl)aminopropyl]}piperazine. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **2010**, *18*, 5301-5309.
5. **J. González**, J. M. Llinares, R. Belda, J. Pitarch, C. Soriano, R. Tejero, B. Verdejo, E. García-España. Tritopic phenanthroline and pyridine tail-tied azascorpiands. *Organic and Biomolecular Chemistry*. **2010**, *8*. 2367-2376.

6. C. E. Castillo, M. A. Máñez, **J. González**, J. M. Llinares, H. R. Jiménez, M. G. Basallote, E. García-España. Structural reorganisations in polytopic receptors revealed by kinetic studies. *Chemical Communications*. **2010**, *46*, 6081-6083.
7. E. Sanna, L. Martínez, C. Rotger, S. Blasco, J. González, E. García-España, A. Costa. Squaramide-based reagent for selective chromogenic sensing of Cu(II) through a zwitterions radical. *Organic Letters*. **2010**, *12*(17), 3840-3843.
8. M. P. Clares, S. Blasco, C. Soriano, E. García-España, B. Verdejo, **J. González**. Solicitud de patente, Metallic mimicking complex for SOD. N/R: WO2011/0036163-A2. Universidad de Valencia. España. **2011**.
9. M. P. Clares, S. Blasco, C. Soriano, E. García-España, B. Verdejo, M. Inclán, **J. González**, M. Sánchez, C. Marín, F. Olmo. Solicitud de patente, Macrocyclic aza-scorpion ligands and its application as antiparasitic drugs. N/R: P201132035. Universidad de Valencia. España. **2011**.
10. E. García-España, A. Bianchi, **J. González**, R. Belda, J. Pitarch. Capítulo de libro. *Supramolecular Chemistry: from molecules to nanomaterials. Receptors for nucleotides*. John Wiley & Sons. United Kingdom. **2011**.
11. **J. González**, R. Gavara, O. Gadea, S. Blasco, F. Pina, E. García-España. Kinetics of Zn(II) complexation by a ditopic phenanthroline aza-macrocyclic scorpion-like receptor. *Chemical Communications*. **2012**, *48*, 1994-1996.
12. S. J. Moore, C. J. E. Haynes, **J. González**, J. L. Sutton, S. J. Brooks, M. E. Light, J. Herniman, G. J. Langley, V. Soto-Cerrado, R. Pérez-Tomas, I. Marques, P. J. Costa, V. Félix, P. A. Gale. Chloride, carboxylate and carbonate transport by *ortho*-phenylenediamine-based bisureas. *Chemical Science*. 2013, *4*, 103-117.
13. **J. González-García**, L. Uzelac, M. Kralj, I. Piantanida, E. García-España. The size of aryl linker between two cyclic amine moieties controls the binding

selectivity to ds-RNA vs ds-DNA. *Aceptado in Organic and Biomolecular Chemistry.*

14. C. E. Castillo, **J. González-García**, M. A. Máñez, J. M. Llinares, H. R. Jiménez, M. G. Basallote, E. García-España. Equilibrium and kinetic studies on complex formation and decomposition and the movement of Cu^{2+} metal ions within polytopic receptors. *Aceptado en Dalton Transactions.*

15. **J. González-García**, Equilibrium and kinetic studies revealed the movement of Cu^{2+} metal ions within a polytopic double tail-tied scorpionand-type receptor. *Aceptado en La Chimica & L'Industria.*



Exposición de Michael Faraday en la conferencia de Navidad del 27 de Diciembre de 1855 en la Royal Institution of Great Britain.

“Las cinco habilidades para el éxito en el trabajo son concentración, discriminación, organización, innovación y comunicación.”

Capítulo 1.- Introducción

1.1.- Introducción

La química supramolecular es uno de los campos de la Química que más se ha desarrollado en los últimos 50 años. La importancia de la química supramolecular se ha potenciado por su carácter multidisciplinar, ya que se puede considerar como un triple punto de encuentro entre la Química, la Biología y la Física.

La primera definición de química supramolecular se atribuye a *Jean-Marie Lehn* que la describió como “*la Química más allá de la molécula*” en referencia a las entidades organizadas que resultan de la asociación de dos o más especies químicas unidas mediante fuerzas no covalentes.¹

1.2.-Historia de la química supramolecular

En el presente apartado, se hace una breve reseña cronológica sobre los principales descubrimientos, ideas y conceptos que han ido jalonando el desarrollo de la química supramolecular desde finales del siglo XIX.

Johannes Diderik van der Waals fue, en 1873, el primero en darse cuenta de la necesidad de tomar en consideración el volumen de las moléculas y postuló la existencia de las fuerzas intermoleculares (figura 1.1). Tiempo después, Alfred Werner enunció su teoría de la coordinación según la cual los átomos de los metales de transición actúan como un núcleo central alrededor del cual se ubican un número definido de otros átomos, radicales u otras moléculas según un patrón geométrico sencillo.²

En 1894, Emil Fisher dio a conocer su célebre modelo de encaje estérico “*llave-cerradura*” para sistemas enzimáticos en el que indicó que ambas moléculas, enzima y sustrato, deben poseer complementariedad geométrica para ejercer una función.³ Es decir, sus estructuras encajan exactamente la una en la otra, refiriéndose a la enzima como a una cerradura y al sustrato como una llave que acopla de forma perfecta en dicha cerradura. Este modelo constituye la primera aproximación al proceso de reconocimiento molecular.

Introducción

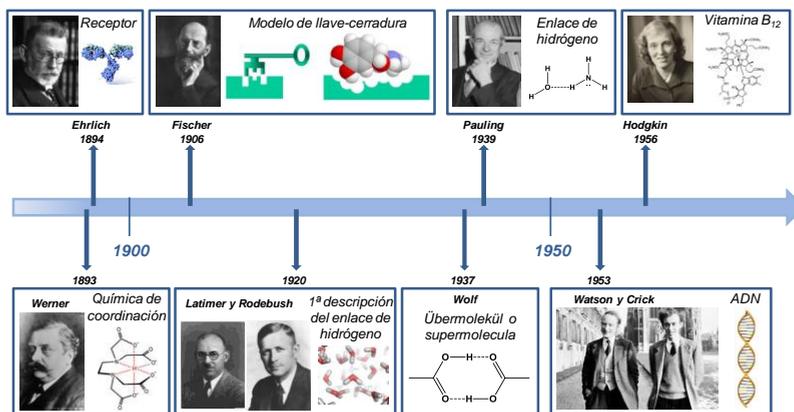


Figura 1.1.- Representación cronológica de los principales conceptos de la química supramolecular

Paul Ehrlich descubrió en 1906 que ciertas moléculas tienen actividad fisiológica en el cuerpo humano si se encuentran unidas mediante determinados grupos, introduciendo así el concepto de receptor y sustrato biológico.⁴

Latimer y Rodebush produjeron un notable avance en el entendimiento de las interacciones no covalentes al describir el enlace de hidrógeno en 1920.⁵ Tras ellos, Wolf y colaboradores introdujeron el término supramolécula o supermolécula (*“Übermoleküle”*), como consecuencia de su estudio sobre la formación de dímeros de ácidos carboxílicos mediante fuerzas no covalentes.⁶

En 1953, Watson, Crick y sus colaboradores resolvieron la estructura del ADN y descubrieron que esta biomolécula era el resultado del autoensamblaje de dos moléculas poliméricas mediante fuerzas no covalentes.⁷

Posteriormente, Daniel Koshland en 1958 (figura 1.2) sugirió un modelo alternativo al de Fisher, el modelo de encaje inducido, en el cual las enzimas son sistemas con una estructura flexible. Su centro activo puede cambiar su conformación estructural por la interacción con el sustrato,⁸ lo que permite a la enzima llevar a cabo su proceso catalítico. Estos conceptos aportados

sobre complementariedad geométrica constituyen la base del reconocimiento molecular y la catálisis supramolecular.

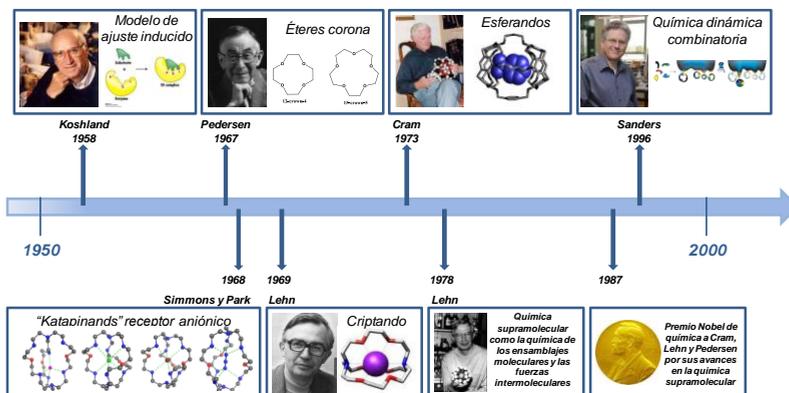


Figura 1.2.- Representación cronológica de los principales conceptos de la química supramolecular

En el periodo entre 1950-1960 se produjo el impulso definitivo en el campo de la química supramolecular con el reconocimiento del papel biológico de los cationes Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en los procesos eléctricos y musculares. En este sentido, una serie de antibióticos naturales (como la valinomicina) formaban complejos con cationes alcalinos y los transportaban selectivamente a través de las membranas.⁹ Estas moléculas poseían una estructura macrocíclica, es decir una molécula mono- o policíclica obtenida por repetición de pequeñas unidades moleculares, e hicieron plantearse a numerosos científicos si esta característica otorgaba cierta funcionalidad frente a moléculas acíclicas.

En 1967, Charles Pedersen obtuvo un éter cíclico como subproducto de una de las reacciones que estaba investigando. Posteriormente, sintetizó varios éteres cíclicos y los denominó éteres corona por su parecido con la forma de una corona.¹⁰

De forma paralela, Jean-Marie Lehn en 1969 obtuvo los primeros criptandos que tenían la peculiaridad de interactuar con iones metálicos selectivamente y transportarlos a través de las membranas¹¹

Donald Cram, contemporáneo de Lehn y Pedersen, resaltó que los compuestos que contienen una cavidad tridimensional esférica capaz de envolver completamente a un ión y forman complejos más estables que los macrociclos planos de Pedersen.¹²

De esta forma, se sintetizaron e investigaron las propiedades de varias familias de ligandos capaces de complejar cationes alcalinos y alcalinotérreos. Así pues, Lehn definió la química supramolecular como: *“Así como existe el campo de la química molecular basado en el enlace covalente, existe el campo de la química supramolecular basado en el enlace intermolecular y en ensamblajes moleculares”*. Los trabajos de Cram, Lehn y Pedersen pueden considerarse como pioneros en este campo, y por los cuales se les otorgó el Premio Nobel de Química en 1987.

Las investigaciones en química catiónica y aniónica comenzaron simultáneamente, puesto que Simmons y Park estudiaban la interacción de una familia de ligandos macrobíclicos con aniones haluro¹³ mientras que, en paralelo, Pedersen, Lehn y Cram analizaban la interacción con cationes.

Tras este comienzo, la química supramolecular se puede dividir en tres áreas superpuestas. La primera engloba la investigación en el reconocimiento molecular, la catálisis y el transporte. Esta fase se enfoca normalmente hacia el diseño de entidades supramoleculares construidas con unidades fotoactivas y electroactivas. Tales entidades almacenan, procesan y/o transfieren materia, señales e información, por lo que, en ciertos casos, se han aplicado como fármacos y sensores.

En una segunda fase, la química supramolecular explora los sistemas que experimentan autoorganización, es decir, sistemas capaces de generar espontáneamente arquitecturas supramoleculares funcionales bien definidas mediante el autoensamblaje de sus componentes. El diseño de estos sistemas autoorganizados produce una aproximación hacia la nanociencia y la nanotecnología. La generación de arquitecturas supramoleculares bien definidas, molecularmente funcionales y de tamaño nanométrico a través del

autoensamblaje, ofrece una herramienta complementaria o una alternativa a la nanofabricación y a la nanomanipulación.

En una tercera fase, la química supramolecular ha evolucionado hacia la denominada química dinámica combinatoria. La dinámica combinatoria se produce introduciendo en las entidades moleculares enlaces reversibles que puedan formarse y romperse, con lo cual se permite un cambio continuo en su estructura supramolecular debido al intercambio y/o reorganización de sus constituyentes. Para la química supramolecular se abren unas amplias perspectivas señalándola como una química emergente, adaptativa y evolutiva.

En la siguiente tabla se muestran cronológicamente los desarrollos en la química supramolecular desde los orígenes con compuestos de inclusión en estado-sólido, pasando por el nacimiento de la química macrocíclica del anfitrión-huésped, hasta su moderna evolución hacia materiales autoensamblados y química en nanoescala.

Tabla 1.1.- Cronología indicando los desarrollos de la química supramolecular

1810-	Sir Humphrey Davy: El descubrimiento del cloruro hidratado.
1920-	Latimer y Rodebush: primera descripción del enlace de hidrógeno
1823-	Michael Faraday: formulación del cloruro hidratado.
1841-	C. Schafhäutl: estudio de los intercalantes de grafito.
1849-	F. Wöhler: clatrato de H ₂ S con el β -quinol
1891-	Villiers y Hebd: las ciclodextrinas como compuestos de inclusión.
1893-	Alfred Werner: química de coordinación.
1894-	Emil Fischer: concepto llave-cerradura.
1906-	Paul Ehrlich: introducción del concepto de receptor.
1937--- ----- -----	K. L. Wolf: el término <i>Übermoleküle</i> se acuña para describir entidades organizadas partiendo de la asociación de especies coordinativamente saturadas (el dímero de ácido acético).
1939--- ----- -----	Linus Pauling: los enlaces de hidrógeno se incluyen en el libro "La naturaleza del enlace químico."
1940--	M. F. Bengen: compuestos de ureas utilizados como canales de inclusión.
1948--- ----- -----	H. M. Powell: la estructura de rayos X de los compuestos de inclusión β -quinol, el término clatrato se introduce para describir compuestos donde un componente se encierra dentro de la red de otro.
1949-	Brown y Farthing: síntesis del primer [2,2]paraciclofano.

Introducción

- 1953- Watson y Crick: la resolución de la estructura del ADN.
- 1956- Dorothy Crowfoot: estructura de rayos X de la vitamina 12.
- 1958- Daniel Koshland: modelo ajuste inducido.
- 1959--- Donald Cram: se intenta sintetizar complejos de transferencia de carga de
----- ciclofanos con $(NC)_2C=C(CN)_2$
- 1961- N.F. Curtis: macrociclo de base de Schiff a partir de acetona y etilendiamina.
- 1964- Busch y Jäger: macrociclos base de Schiff.
- 1967- Charles Pedersen: éteres corona.
- 1968- Park y Simmons: *katapinand*, un receptor que hospeda aniones.
- 1969- Jean Marie Lehn: síntesis del primer criptando.
- 1969- Jerry Atwood: clatratos líquidos a partir de sales de alquilamonio.
- 1971- G. M. J. Schmidt: topoquímica.
- 1973--- Donal Cram: anfitriones esféricos producen un efecto en la preorganización en el
----- huésped.
- 1978--- Jean Marie Lehn: introduce el término de química supramolecular, definido como
----- "*la química del autoensamblaje molecular y las fuerzas intermoleculares*"
- 1979- Gökel y Okahara: desarrollo de los éteres tipo lariat como una subclase de anfitrión.
- 1981- Vögtle y Weber: huéspedes de cadena abierta y desarrollo de la nomenclatura.
- 1986--- A. P. de Silva: sensores fluorescentes de iones metales alcalinos con derivados de
----- éteres corona.
- 1987--- Premio Nobel de Química para Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn y Charles J.
----- Pedersen por su trabajo en química supramolecular
- 1989- G. M. Whitesides: autoensamblajes de monocapas de tioles sobre oro.
- 1989- R. Robson: polímeros de coordinación tridimensionales tipo barra.
- 1996--- Premio Nobel de Química para Kroto, Smalley y Curl por su trabajo en la química de
----- los fulerenos
- 1996- J. K. M. Sanders: aparece el primer sistema de química combinatoria dinámica
- 1998--- Rowan y Nolte: formación por autoensamblaje de polímeros supramoleculares
----- helicoidales
- 1999- J. F. Stoddart: sistemas electrónicos basados en moléculas entrecruzadas.
- 2004- J. F. Stoddart: la primera molécula enlazada a un anillo moleculares Borromeo, un hito en la síntesis topológica.
-

1.3.- Química supramolecular receptor-sustrato

Se han designado varios términos en referencia al proceso de asociación entre dos moléculas. El primero corresponde a Cram que introdujo el término “*anfitrión-huésped*”, y el segundo corresponde a Ehrlich con “*receptor-sustrato*”, más enfocado a sistemas biológicos. En ambas acepciones, hay una analogía entre anfitrión-receptor y huésped-sustrato, el receptor es una estructura orgánica capaz de unir selectivamente especies mediante diferentes interacciones intermoleculares, proporcionando un ensamblaje de dos o más especies moleculares. En general, se considera que el receptor es una molécula de tamaño mayor que el sustrato y posee un hueco o cavidad. En cambio, el sustrato es cualquier ión (catión, anión o molécula neutra) o entidad molecular que normalmente es de menor tamaño que el receptor.

Durante el proceso de reconocimiento, es deseable que receptor y sustrato entren en contacto a través de una gran área, estableciendo numerosas interacciones no covalentes y se reconozcan a través de su tamaño y forma. El receptor se caracteriza por ser una entidad molecular con sitios de enlace complementarios a los del sustrato. Para conocer como se forman las entidades supramoleculares, se van a describir a continuación las principales interacciones no covalentes, supramoleculares o intermoleculares.

1.4.-Interacciones supramoleculares

Las interacciones intermoleculares constituyen la base de los procesos de autoensamblaje supramolecular, tanto en sistemas biológicos como sintéticos. Por consiguiente, para poder diseñar sistemas artificiales con elevada eficiencia y selectividad, es importante conocer los distintos tipos de interacciones no covalentes junto con sus propiedades y características.

Los criterios para clasificar las diferentes clases de interacciones no covalentes atienden a su fuerza, direccionalidad, distancia o ángulo de enlace.¹⁴

Tabla 1.2.- Principales características de las interacciones supramoleculares

Interacción	Direccionalidad	Energía de enlace ^a	Ejemplos
Ión-ión	No direccional	100 - 350	NaCl
Ión-dipolo	Ligeramente direccional	50 – 200	Éteres corona con K ⁺
Dipolo-dipolo	Ligeramente direccional	5 – 50	Grupos -C≡N-
Van der Waals	No direccional	< 5	Compuestos de inclusión
Enlace de hidrógeno	Direccional	4 – 120	Dímero de ácidos carboxílicos
Enlace de coordinación	Direccional	100 - 300	Piridina-Metal
Enlace de halógeno	Direccional	10 – 50	Complejo de azufre con yodo
π - π o apilamiento	Direccional	2 – 50	Benceno y ADN
Catión- π	Direccional	5 – 80	Entre un Na ⁺ y un indol de un lariat éter ¹⁵
Anión- π	Direccional	2 - 40	Hexafluorobenceno ¹⁶

^a Energía de enlace en kJ mol⁻¹.

Interacciones electrostáticas

Están basadas en la atracción o repulsión coulombiana entre cargas. Las interacciones ión-ión no son direccionales, mientras que sí lo son las interacciones ión-dipolo y dipolo-dipolo, puesto que el dipolo debe orientarse en una determinada dirección para maximizar la intensidad de la interacción. La gran fortaleza de la interacción electrostática ha hecho que sea una herramienta muy útil en química supramolecular y ha sido empleada con

profusión en numerosos sistemas. Estas interacciones son la base de la actuación de muchos receptores para cationes (éteres corona, criptandos y esferandos) y aniones (macrociclos de poliaminas protonadas).

Interacciones ión-ión

El enlace iónico es una fuerza no direccional y con una energía de enlace entre 100 y 350 kJ mol⁻¹ (ver Tabla 1.2). Los ejemplos más claros y ampliamente utilizados de materiales sólidos mantenidos por interacción ión-ión son las estructuras cristalinas de sales inorgánicas simples. El NaCl posee un sistema cúbico en el cual cada catión Na⁺ se rodea por seis átomos de Cl⁻ para maximizar sus interacciones no covalentes. Sin embargo, esta estructura se rompe en agua para dar especies más lábiles como el sistema octaédrico Na(H₂O)₆⁺.

Otro ejemplo dentro de la química supramolecular es la interacción entre el receptor bis(diazabicclooctano) con carga 3+ con aniones ferrocianuro (Fe(CN)₆³⁻) (figura 1.3).¹⁷

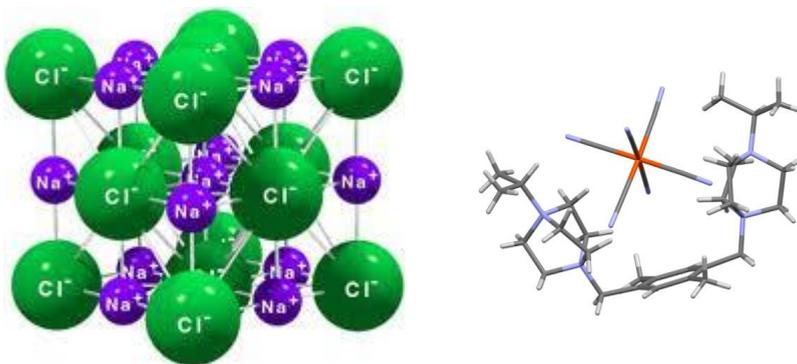


Figura 1.3.- Estructuras del NaCl (izda) y del catión bis(diazabicclooctano) con Fe(CN)₆³⁻ (dcha).

Interacciones ión-dipolo

Esta fuerza intermolecular corresponde a la interacción electrostática entre un ión y una molécula neutra con un dipolo. La solvatación de un catión

metálico es un ejemplo de interacción de esta clase (figura 1.4). Estas interacciones pueden considerarse desde débiles hasta moderadas. Aunque se basan principalmente en fuerzas electrostáticas, hay también una contribución anisotrópica de las moléculas polares. Otro ejemplo en el cual está involucrada esta interacción corresponde a la formación del complejo entre un ión metálico alcalino y un éter corona (figura 1.4).

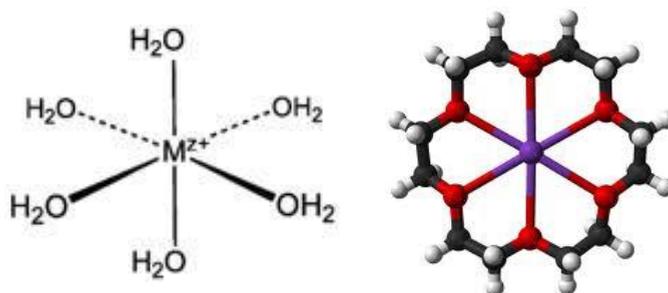


Figura 1.4.- Representación de un acuo complejo metálico (izda) y estructura de un éter corona interaccionando con un metal (dcha).

Interacciones dipolo-dipolo

La interacción dipolo-dipolo se produce por fuerzas electrostáticas entre los extremos positivo y negativo de moléculas neutras dipolares.

Son interacciones direccionales entre débiles y moderadas, puesto que al elevar la temperatura el movimiento transicional, rotacional y vibracional de las moléculas aumenta y produce más orientaciones aleatorias entre ellas. Estas interacciones se clasifican en dos grupos, en el primer grupo uno de los dipolos se alinea con el segundo de forma perpendicular produciendo una única interacción (figura 1.5, tipo 1), y en el segundo grupo los dos dipolos se alinean paralelamente formando el doble de interacciones relevantes (figura 1.5, tipo 2).

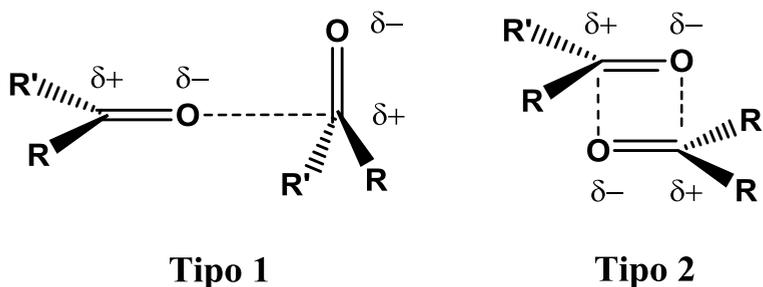


Figura 1.5.- Interacciones dipolo-dipolo en carbonilos

Enlace de hidrógeno

El enlace de hidrógeno se puede considerar como un caso particular de interacción dipolo-dipolo, donde un átomo de hidrógeno enlazado a un átomo electronegativo (un grupo electrón-atrayente) es atraído por un dipolo cercano de una molécula adyacente o grupo funcional.¹⁸ Se ha denominada como “*la interacción clave en la química supramolecular*” debido a su fortaleza y alta direccionalidad.

El enlace de hidrógeno abarca un amplio rango de longitudes, fuerzas y geometrías. De hecho, un único enlace de hidrógeno fuerte por molécula puede ser suficiente para determinar la estructura en estado sólido y ejercer una gran influencia en disolución o en fase gas. Incluso enlaces de hidrógeno débiles pueden estabilizar la estructura y/o llegar a influenciar significativamente las propiedades cuando hay un gran número de ellos.

Los enlaces de hidrógeno juegan un papel fundamental tanto en la estabilización de la estructura final de proteínas o de la doble hélice del ADN como en la interacción de aniones o especies neutras con ligandos sintéticos (figura 1.6).

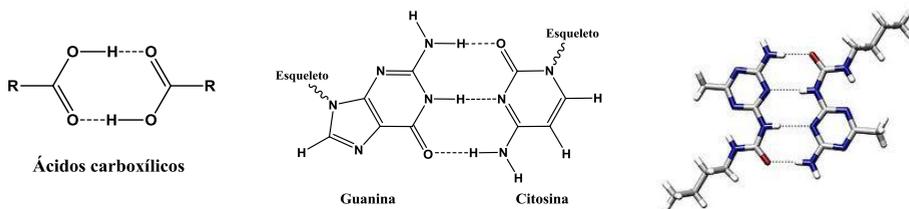


Figura 1.6.- Enlaces de hidrógeno en un dímero de ácidos carboxílicos (izda), emparejamiento de bases del ADN (cntro) y complejo dimérico autoensamblado por enlaces de hidrógeno¹⁹ (dcha).

Tabla 1.3.-Propiedades de los enlaces de hidrógeno

<i>Enlace de hidrógeno</i>	<i>Fuerte</i>	<i>Moderado</i>	<i>Débil</i>
Interacción A-H...B	Parcialmente covalente	Principalmente electrostático	Electrostático
Energía de enlace ^a	60 - 120	16 - 60	< 12
Longitud de enlace ^b	A-H ~ H...B	A-H < H...B	A-H << H...B
H...B	1.2 - 1.5	1.5 - 2.2	2.2 - 3.2
A...B	2.2 - 2.5	2.5 - 3.2	3.2 - 4.0
Ángulos de enlace	175 - 180	130 - 180	90 - 150
Ejemplos	Bases y ácidos fuertes: esponjas de protones; complejos de HF	Ácidos; alcoholes; moléculas biológicas	Componentes minoritarios de enlaces bifurcados; C-H...O, O-H...π

^a kJ mol⁻¹. ^b Å

Interacciones π - π o por apilamiento.

Esta denominación hace referencia al conjunto de interacciones no covalentes que tienen lugar entre superficies aromáticas π . Esta interacción es, en realidad, resultado de la combinación de otras: interacciones atractivas de tipo dipolo inducido-dipolo inducido (o dipolo-dipolo cuando hay presencia de heteroátomos en los anillos aromáticos), fuerzas electrostáticas repulsivas entre las nubes electrónicas, efectos solvatofóbicos o transferencia de carga entre un dador y un aceptor de electrones.

En general, la asociación entre dos anillos aromáticos puede presentar dos disposiciones: cara-cara y cara-lado (también llamada disposición en forma de T). Este tipo de interacciones han sido muy bien racionalizadas mediante el modelo desarrollado por Sanders y Hunter.²⁰ Dicho modelo considera de manera independiente el sistema σ y la nube π del anillo aromático, que queda formado por tres capas: una central constituida por el esqueleto σ con carga relativa +1, y dos capas con carga -1/2 para el sistema π . Mediante este sencillo modelo es posible justificar las interacciones cara-cara con desplazamiento lateral y cara-lado, así como la repulsión en la interacción cara-cara sin desplazamiento lateral (figura 1.7).

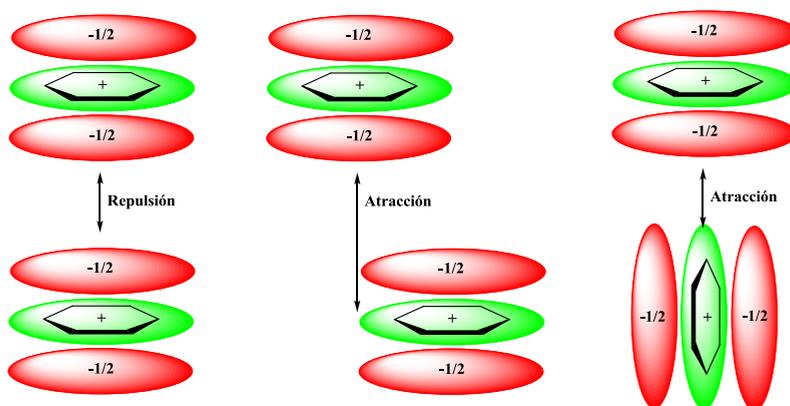


Figura 1.7.- Orientaciones relativas de los cuadrupolos en las Interacciones π .

Las interacciones cara-cara son más fuertes en sistemas π -deficientes, ya que presentan una menor densidad de carga y se reduce la repulsión entre las nubes π próximas. De especial relevancia es la interacción entre anillos π deficientes y π excedentes, que suelen dar interacciones relativamente fuertes, lo que incrementa la estabilidad de estos sistemas.

La presencia de un átomo de nitrógeno en un anillo aromático π disminuye la densidad de carga sobre el resto de los núcleos del sistema. Piridinas, bupiridinas y otros heterociclos aromáticos nitrogenados presentan una menor densidad de carga sobre los átomos de C del anillo aromático. Si además, los átomos de nitrógeno coordinan a un metal o están alquilados, su carácter π deficiente se acentúa. Este tipo de compuestos son útiles para establecer interacciones π - π en procesos de reconocimiento molecular.

Sin embargo, en la disposición en T se establece un enlace de hidrógeno entre la nube π de uno de los anillos y uno de los hidrógenos aromáticos del otro, denominada enlace $[C-H \cdots \pi]$. La interacción $[C-H \cdots \pi]$ retira densidad de carga electrónica (o desapantalla) a los núcleos del anillo que acepta el hidrógeno. En cambio, los átomos de hidrógeno que participan en esos enlaces se encuentran apantallados debido a que se sitúan por encima o por debajo del plano del anillo aromático, dentro de la zona de apantallamiento anisotrópico.

Fuerzas de van der Waals

Se designan como fuerzas de van der Waals a las interacciones que surgen de la polarización temporal de una nube electrónica por la proximidad de núcleos cercanos, dando como resultado una débil atracción electrostática.²¹ Se pueden considerar que son interacciones dipolo inducido-dipolo inducido, de naturaleza variada, muy débiles y que decrecen rápidamente con la distancia (proporcional a $1/r^6$).

Su baja intensidad y no direccionalidad las hacen poco útiles en la construcción de entidades supramoleculares, aunque contribuyen junto con otras fuerzas a la estabilización global de la supermolécula. Por ejemplo,

estas fuerzas producen una estabilización adicional en la coordinación de un sustrato hidrofóbico dentro de una cavidad hidrofóbica.

Enlaces de coordinación

El enlace de coordinación, conocido también como enlace covalente dativo o enlace dipolar, es un enlace covalente en el que cada par de electrones compartido por dos átomos es aportado por uno de ellos. El átomo que aporta el par de electrones se denomina dador, y el que lo recibe, aceptor. Típicamente un enlace de coordinación se forma cuando una base de Lewis dona un par de electrones a un ácido de Lewis. Es de fuerza intermedia y reversible (tabla 1.2).

Los enlaces de coordinación ofrecen una colección de herramientas del campo de la química inorgánica para aportar funcionalidad a las estructuras supramoleculares como el número de coordinación, quelación de ligandos polidentados, etc.²² Además, los enlaces de coordinación en las entidades supramoleculares puede provocar variaciones en las propiedades físicas (ópticas, magnéticas, etc.) a través de la coordinación de iones metálicos en ligandos.²³

Interacción catión- π

Las interacciones catión- π implican el enlace de un catión a un grupo de electrones π como los de las moléculas de benceno o acetileno. Estas interacciones se consideran electrostáticas con un componente de polarización. Por ejemplo, el benceno posee un momento cuadrupolar permanente que define regiones de carga negativa relativa por encima y debajo del plano aromático de la molécula, por lo que el catión experimenta una atracción favorable por la región negativa mediante interacciones electrostáticas.²⁴

Varios ejemplos de este tipo de interacción son los complejos de metales de transición (Fe^{2+} , Pt^{2+} ...) que interaccionan con olefinas e hidrocarburos aromáticos como el ferroceno $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$ y la sal de Zeisel $[\text{PtCl}_3(\text{C}_2\text{H}_4)]^-$

(figura 1.8). Los enlaces en estos complejos son fuertes y deben considerarse de tipo no covalente, aunque estén íntimamente relacionados con la ocupación parcial de los orbitales *d* de los metales. Los complejos metálicos de ciclofanos²⁵ o los éteres corona tipo "larial"²⁶ constituyen otros ejemplos de reconocimiento molecular a través de este tipo de interacción.

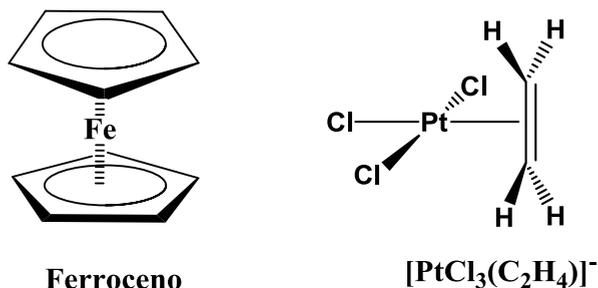


Figura 1.8.- Estructuras del ferroceno y la sal de Ziesel.

Interacción anión- π

Esta interacción no fue reconocida como tal hasta hace aproximadamente una década. A diferencia de la interacción catión- π , la interacción anión- π es poco intuitiva porque se presupone que los aniones exhiben una repulsión por sistemas aromáticos.

Mediante estudios teóricos se ha demostrado que las superficies aromáticas deficientes en densidad electrónica (hexafluorobenceno) interaccionan favorablemente con aniones, con energías de enlace muy débiles. Esta interacción parte de componentes electrostáticos y de polarización, correlacionada con el momento cuadrupolar de un anillo electrón-deficiente y el momento inducido del anión. Diversos ejemplos se pueden extraer de la Base Cristalográfica de Cambridge donde hay varios aniones que interaccionan con arenos o aminopiridinas (figura 1.9).²⁷

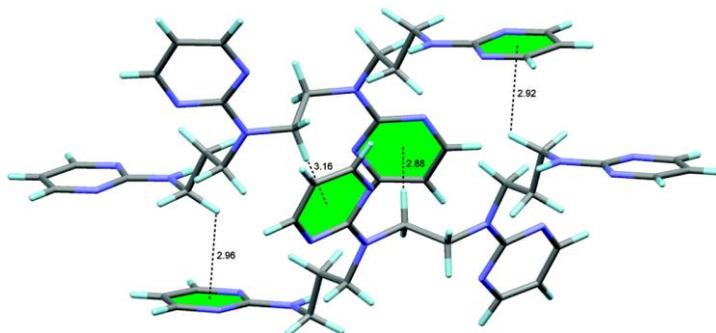


Figura 1.9.- Representación de las interacciones anión- π responsables de la formación del dímero de derivados de 2-aminopiridinas.

Enlaces de halógeno

La forma más sencilla de definir un enlace de halógeno es una atracción entre un halógeno electrón-deficiente y un átomo electrón-excedente.²⁸ Varios estudios demuestran que el ángulo definido por el enlace covalente y el halógeno de los átomos dadores muestra una gran tendencia a ser lineal.²⁹ Además, la formación del enlace de halógeno suele ir acompañada de una elongación del enlace covalente que une el halógeno al resto de la molécula (figura 1.10).³⁰

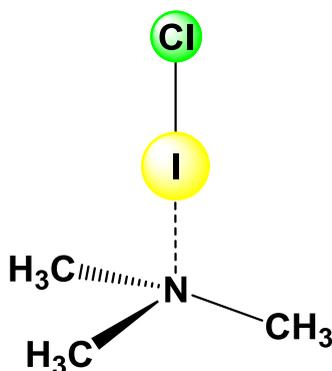


Figura 1.10.- Representación del enlace de halógeno entre el yodo monoclorigo y la trimetilamina.

Los halógenos unidos a sustituyentes electrón-aceptores, como grupos fluorados o insaturados, funcionan mejor como dadores de enlace de halógeno que los derivados de hidrocarbóno. Además, los átomos electronegativos y aniones son mejores aceptores de enlace de halógeno.

La magnitud de las interacciones son muy débiles y, por ello, existen muy pocos estudios de complejos con enlace de halógeno en disolución, aunque en estado sólido sí que se encuentran.^{28,30,31} Un ejemplo es el cristal del azufre molecular (S_8) y el iodoformo, donde los enlaces halógenos producen una corta e inusual separación entre los átomos de iodo y azufre.³²

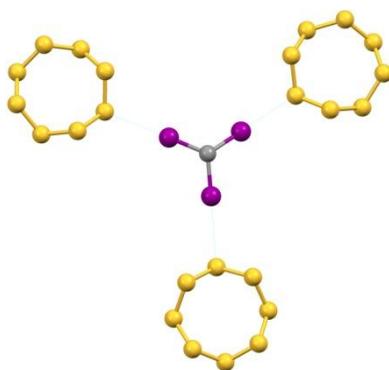


Figura 1.11.- Estructura rayos X de S_8 y iodoformo.

Empaquetamiento en estado sólido

Las estructuras llegan en estado sólido a una disposición cerrada y empaquetada que también se puede considerar como una fuerza conductora significativa. Según Kitaigorodsky,³³ es simplemente una manifestación de la maximización de las interacciones isotrópicas favorables de van der Waals. La teoría de Kitaigorodsky indica que las moléculas experimentan una simplificación de la forma cuando progresan hacia dímeros, trímeros, oligómeros y, finalmente, cristales. Esto significa que una molécula encaja en el hueco de sus vecinas para que se consiga el máximo número de contactos intermoleculares.

Un ejemplo lo constituyen las zeolitas, que con una estructura muy rígida poseen unas características físicas muy especiales, como la resistencia a la implosión o la alta porosidad. Tales materiales se han estudiado como catalizadores o extractores de contaminantes llegando algunos de ellos a la aplicación industrial.

Efecto hidrofóbico

Normalmente es considerado erróneamente como una fuerza, aunque este efecto está relacionado con la exclusión de disolventes polares, especialmente agua, de partículas de gran tamaño o débilmente solvatadas (disolventes no polares). En disolución acuosa, las moléculas de agua polares se atraen fuertemente provocando una aglomeración de las moléculas orgánicas apolares presentes en la disolución que se van atrayendo entre ellas, principalmente, por fuerzas de van der Waals e interacciones π - π .³⁴ El efecto hidrofóbico se divide en dos componentes energéticos, el entálpico y el entrópico.

El componente entálpico se debe a la estabilización de las moléculas de agua cuando se expelen fuera de la cavidad. Normalmente la cavidad del anfitrión es hidrofóbica y las moléculas del disolvente polares ubicadas dentro de la cavidad no interactúan fuertemente con los grupos situados en su superficie. Al desplazarse a la matriz del disolvente se estabilizan por interacciones con otras moléculas de agua, aumentando su energía y, por lo tanto, su entalpía.

El otro componente energético, el entrópico, surge del hecho que la presencia de dos moléculas en la disolución crea dos sitios en la estructura de la matriz acuosa. Sin embargo, la combinación de las dos moléculas (anfitrión y huésped) para formar un complejo da como resultado un menor trastorno a la estructura del disolvente y, por lo tanto, una ganancia entrópica (figura 1.12).

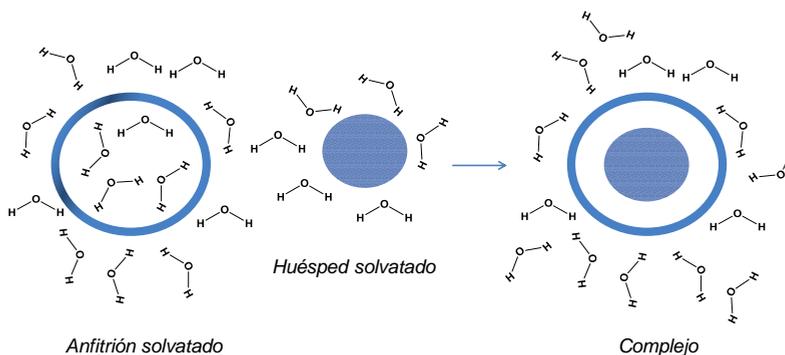


Figura 1.12.- Interacción hidrofóbica de un huésped orgánico en disolución acuosa.

1.5.-Autoensamblaje

El autoensamblaje es el fenómeno de asociación espontánea entre dos o más moléculas que, en equilibrio termodinámico, generan un agregado con unas características bien definidas. La química molecular trata sobre la formación de enlaces covalentes y, por lo tanto, enlaces irreversibles y atribuibles a la entalpia de formación y a la estabilidad cinética de los productos. Sin embargo, el producto de reacción en la química supramolecular es la estructura del mínimo energético termodinámico y su formación posee términos favorables entálpico y entrópico.

El autoensamblaje se encuentra habitualmente presente en la naturaleza para generar sistemas funcionales. El ejemplo más importante en biología es la formación de la doble hélice del ADN a partir de dos cadenas de oligonucleótidos complementarias. Las dos cadenas se mantienen unidas para mantener la estructura de doble hélice mediante enlaces de hidrógeno entre las bases púricas y pirimidínicas y otras fuerzas intermoleculares. Existen en la naturaleza otros ensamblajes supramoleculares esenciales para la Biología como la formación de los pliegues y asociaciones de las proteínas.³⁵

Tabla 1.4.- Comparación de los productos moleculares y supramoleculares

<i>Propiedades</i>	<i>Molecular (Enlace covalente)</i>	<i>Supramolecular (Interacciones supramoleculares)</i>
Clases de enlaces	Covalentes	Iónicos, hidrofóbicos, enlaces de hidrógeno, etc
Fortaleza del enlace (Kcal mol⁻¹)	25 - 200	0.1 - 20
Estabilidad de los enlaces en el producto	Cinéticamente estable	Cinéticamente reversible
Contribuciones a ΔG	Normalmente dominado por ΔH	ΔH y $T\Delta S$ son comparables
Estrategia de diseño	Reacción selectiva	Equilibrio directo
Importancia de los efectos del disolvente	Secundaria	Primaria

De la observación y deseo de imitar este tipo de arquitecturas por parte de los científicos, nació en la segunda mitad del siglo XX un nuevo concepto, el autoensamblaje supramolecular.^{36,37} Lehn definió este nuevo término como “*la evolución hacia el confinamiento espacial a través de la interconexión espontánea de unos pocos o varios componentes resultando en la formación de entidades discretas o extensas a un nivel molecular (covalente) o supramolecular (no covalente)*”. Esta definición introduce la diferenciación entre el autoensamblaje molecular y supramolecular, entendiéndose por este último el que implica interacciones no covalentes en el proceso como enlaces de hidrógeno, enlaces de coordinación, interacciones de van der Waals, etc.

Siguiendo los pasos de la naturaleza, los químicos han utilizado las interacciones covalentes e intermoleculares (tabla 1.4) para sintetizar compuestos autoensamblados formando agregados o redes tanto en disolución como en estado sólido.

1.5.1.-Autoensamblaje con centros metálicos

En las décadas de los 1980 y 1990, la incorporación del enlace de coordinación como una interacción más en el proceso de autoensamblaje condujo al desarrollo de nuevas arquitecturas supramoleculares autoensambladas.^{36,38} Asimismo, se incorporaron metales de transición a estructuras de tipo ciclófano dando lugar a los metalomacrociclos. Estas estructuras presentan numerosas ventajas, como altos rendimientos, capacidad de formar grandes estructuras, control sintético, etc. Probablemente, el primer ejemplo de metalomacrociclo diseñado como receptor sintético fue el complejo dinuclear de Cu^{2+} de Maverick,³⁹ en el cual se ensamblan iones Cu^{2+} con ligandos bis(β -dicetonas) como puntos de coordinación y espaciadores aromáticos. Desde entonces se han obtenido una amplia variedad de estructuras como hélices, redes y metalomacrociclos con estructuras poligonales diversas como triángulos, cuadrados, pentágonos, hexágonos y estructuras tridimensionales de tipo caja. Asimismo se han utilizado una amplia variedad de metales, entre lo que destacan los trabajos con Pd^{2+} , Pt^{2+} (Fujita, Stang),⁴⁰ Os^{2+} (Jeong),⁴¹ Re^{2+} (Hupp)⁴² y Au^{1+} (Puddephat).⁴³

La combinación de ligandos piridínicos con complejos de Pd^{2+} y Pt^{2+} para el autoensamblaje supramolecular constituye uno de los sistemas más estudiados en los últimos años. La primera preparación de este tipo de compuestos fue descrita por Fujita *et al.*, por la cual publicaron la formación de tetrámeros cíclicos mediante la reacción de un ligando puente no quelante (4,4'-bipiridina) y un complejo de Pd^{2+} con dos ligandos lábiles (figura 1.13).⁴⁴ En agua, la cavidad del complejo supone un espacio hidrofóbico en el que se pueden incluir compuestos orgánicos aromáticos, como por ejemplo el 1,3,5-trimetoxibenceno. La síntesis de este metalociclo y sus análogos, implica ligandos lineales puente y centros metálicos planocuatridos con dos posiciones de coordinación en *cis* protegidas por ligandos inertes (etilendiamina) y otras dos con ligandos lábiles (NO_3^-), fácilmente desplazables.

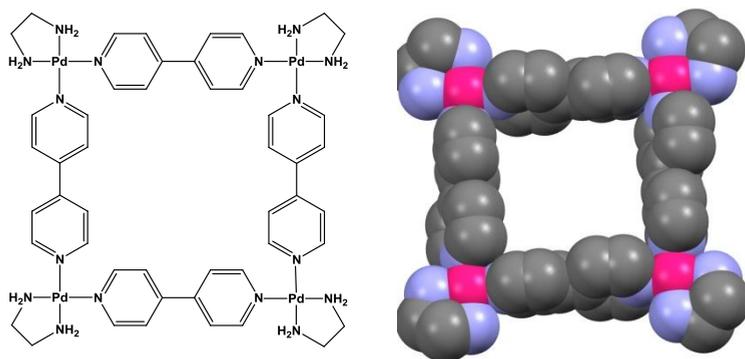


Figura 1.13.- Estructura del primer metalomacrociclo obtenido por el profesor Fujita (izda) y estructura cristalina del mismo, en la que se puede apreciar la cavidad hidrofóbica central (dcha).

Stang y colaboradores obtuvieron una estructura similar en disolvente orgánico, utilizando complejos de paladio y platino con fosfinas como ligandos cinéticamente inertes y triflatos como ligandos desplazables (figura 1.14), lo que confiere a las estructuras obtenidas una elevada solubilidad en disolventes orgánicos.⁴⁵ Estos trabajos manifiestan la versatilidad de los procesos de autoensamblaje de ligandos piridínicos y centros metálicos de Pd^{2+} y Pt^{2+} , al no estar restringidos al medio acuoso.

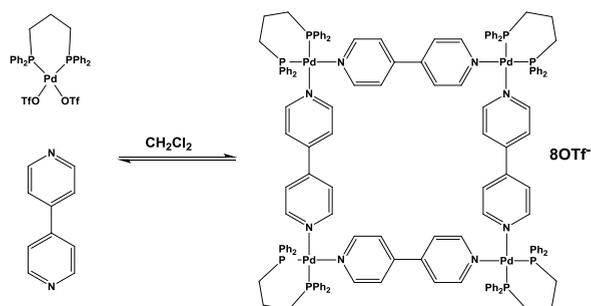


Figura 1.14.- Autoensamblaje de un metalociclo de Pd y ligandos piridínicos en disolvente orgánico del profesor Stang.

La labilidad del enlace de coordinación N-Pd²⁺ establece un equilibrio entre todas las especies posibles que conduce a la estructura más estable termodinámica, y da lugar, además, a procesos de autocorrección. Otra característica de estos sistemas, consecuencia de la labilidad del enlace N-Pd²⁺, es su capacidad de adaptarse a las variaciones del medio que alteran el equilibrio entre especies. Como ejemplo, el sistema forma tres estructuras supramoleculares distintas obtenidas por el autoensamblaje de 4,4'-bipiridina y un derivado de la triazina con Pd(en)(NO₃)₂ aunque tras la adición de CCl₃CO₂Na los componentes se reorganizan formando una única estructura supramolecular capaz de complejar el sustrato (figura 1.15).⁴⁶

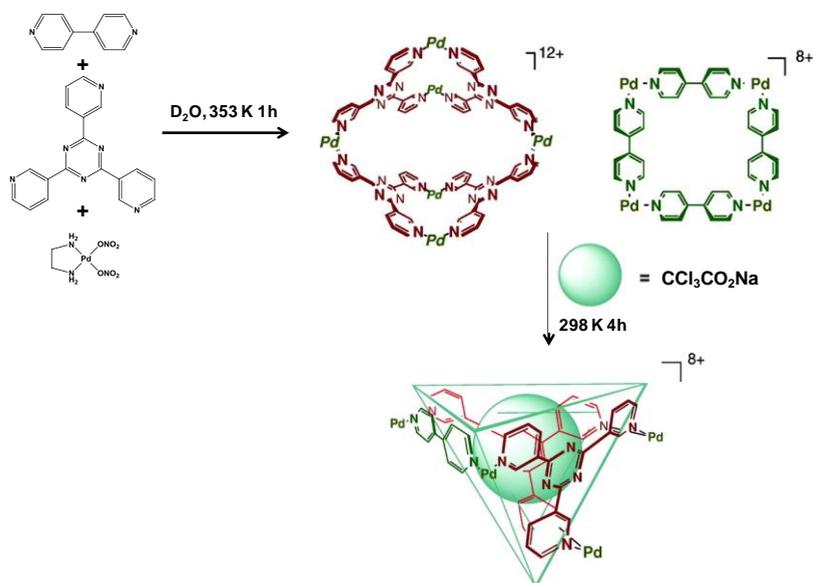


Figura 1.15.- Esquema del reordenamiento de un sistema por adición de una molécula plantilla.

Desde la preparación de estas primeras estructuras supramoleculares, el número de especies obtenidas ha aumentado considerablemente. Inicialmente, los estudios se centraron en la obtención de estructuras bidimensionales con diferentes formas: triángulos, cuadrados, pentágonos,

hexágonos,⁴⁷ etc, mediante una adecuada selección de ligandos y centros metálicos con características geométricas adecuadas. Sin embargo, pronto surgió el interés por aumentar la complejidad de los sistemas de cara a la obtención de estructuras tridimensionales como cajas,⁴⁸ cubos⁴⁹ y cubooctaedros.⁵⁰ La importancia de estas estructuras tridimensionales radica no sólo en la obtención de las propias estructuras, lo cual representa en sí mismo un reto importante, sino también en la gran capacidad que han mostrado estas estructuras para actuar como receptores de diferentes sustratos.

En este campo, destacan de nuevo los trabajos desarrollados recientemente por el profesor Fujita *et al.*,⁵¹ en los que describe la formación de una caja autoensamblada a partir de un ligando piridínico que contiene una unidad de triazina, $M(en)(NO_3)_2$ ($M = Pd, Pt$) y un tercer componente que puede ser pirazina, tetrametil-4,4'-bipiridina o un derivado de ésta, según el tamaño deseado para la estructura. Utiliza estas estructuras para incluir, en medio acuoso, entre una y tres unidades de sustratos aromáticos insolubles, como pireno o coroneno, solubilizándolos gracias a la alta solubilidad del receptor en agua.⁵² Estos complejos representan uno de los pocos casos descritos en la bibliografía de sistemas capaces de incluir más de una molécula de un mismo sustrato formando complejos de inclusión con estequiometría 1:2 y 1:3 (figura 1.16), ya que la mayoría de los sistemas diseñados para incluir unidades aromáticos tienen un tamaño adecuado para incluir una sola unidad de sustrato. Gran parte de las extraordinarias propiedades de estos compuestos se deben a la existencia de una cavidad interior hidrofóbica que crea un entorno de características muy diferentes al medio externo. Entre sus características cabe destacar la posibilidad de estabilizar especies inestables y de llevar a cabo reacciones que no serían posibles en esas mismas condiciones en ausencia del receptor y del disolvente.⁵³

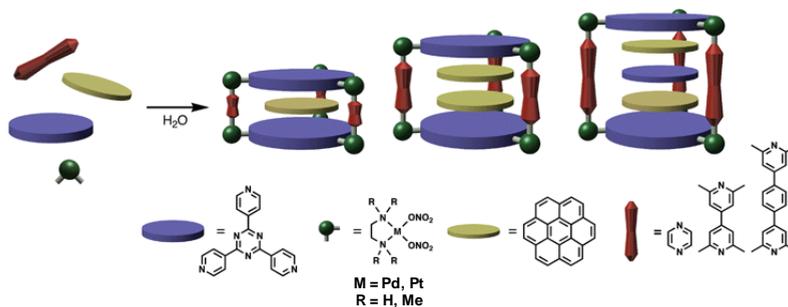


Figura 1.16.- Autoensamblaje de complejos de inclusión formados entre un receptor con forma de caja y un sustrato aromático.

1.6.-Reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular es el proceso que implica tanto la unión de un sustrato por el receptor como la selección entre diferentes sustratos.⁵⁴ Este proceso requiere de la introducción de dos factores íntimamente relacionados y desarrollados en los modelos de Fisher y Koshland, la *complementariedad* y la *preorganización*.

Para reconocer una molécula, el anfitrión debe tener el mayor número posible de sitios de enlace con carácter electrónico complementario a aquellos que posee el huésped. Por ejemplo, un dador de enlaces de hidrógeno ajusta con un aceptor, un ácido de Lewis a una base de Lewis, etc. Además, los sitios de unión deben estar lo suficientemente espaciados en el anfitrión para que sea posible la interacción con los sitios del huésped en la conformación de enlace. Un complejo receptor-sustrato no puede formarse si el sustrato es demasiado grande para entrar en la cavidad del receptor, ni tampoco formará el complejo si los grupos funcionales de las moléculas receptor y sustrato se repelen la una a la otra a medida que se aproximan. Cuando se consiguen estas características en el complejo receptor-sustrato se alcanza el primer factor en el reconocimiento molecular, la *complementariedad*.⁵⁵

El segundo factor que está involucrado en el reconocimiento molecular es la *preorganización*, un anfitrión con una elevada *preorganización* experimenta

un cambio conformacional mínimo tras enlazarse con el huésped. En general cuando más organizados para la unión están el receptor y sustrato, más estable será su complejo.⁵⁶

En definitiva, la unión selectiva es una combinación de ajuste estérico entre el sustrato o huésped y la cavidad del receptor o anfitrión, y una distribución espacial apropiada de los sitios de unión entre ambas moléculas, maximizando así las fuerzas atractivas y minimizando las repulsivas. Esta interacción entre sustrato y receptor para formar un complejo es un proceso dirigido por la entalpía de reacción desprendida en la unión ya que el factor entrópico es desfavorable.

Al incorporar varios sitios de unión, un receptor disminuye el coste energético, ya que el primer enlace tendría un coste entrópico negativo, pero los siguientes no. A este efecto se le denomina *efecto quelato* y se define como la estabilización adicional producida por la complejación de un ligando polidentado con respecto a su análogo monodentado.⁵⁷ Este efecto se refleja en la reacción descrita a continuación, donde el complejo quelado con 1,2-diaminoetano es 10^8 veces más estable que el complejo con amonio (figura 1.17).

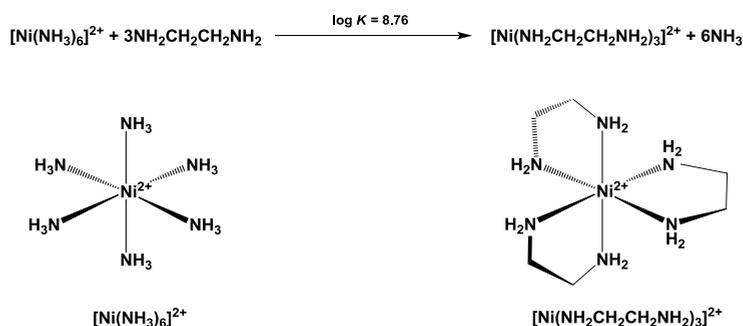


Figura 1.17.-Equilibrio de formación de complejos con ligandos mono- y bidentados

Sin embargo, los complejos de ligandos con estructuras macrocíclicas presentan una mayor estabilidad que para los ligandos de cadenas abiertas. Esta ciclación reduce la flexibilidad conformacional del receptor libre y el

coste entrópico se reduce durante la unión del sustrato. Este efecto, conocido en la literatura como *efecto macrocíclico*⁵⁸, fue introducido por Cabiness y Margerum⁵⁹ en 1969 y hace referencia a la estabilización adicional observada en la formación del complejo con un ligando macrocíclico con respecto a la formación del complejo con su análogo de cadena abierta (figura 1.18).

Asimismo, la complejidad en la estructura de un receptor y un número mayor de sitios de unión se pueden conseguir añadiendo una cadena lineal a una estructura macrocíclica. Los receptores así formados se denominan macrobicíclicos o criptandos, cuyas propiedades se engloban en el denominado *efecto criptando*.⁶⁰ Este efecto se caracteriza con respecto a su análogo macrocíclico, por una alta estabilidad y selectividad, bajas velocidades de intercambio y protección eficiente del medio cuando un ligando compleja a un sustrato (figura 1.19).

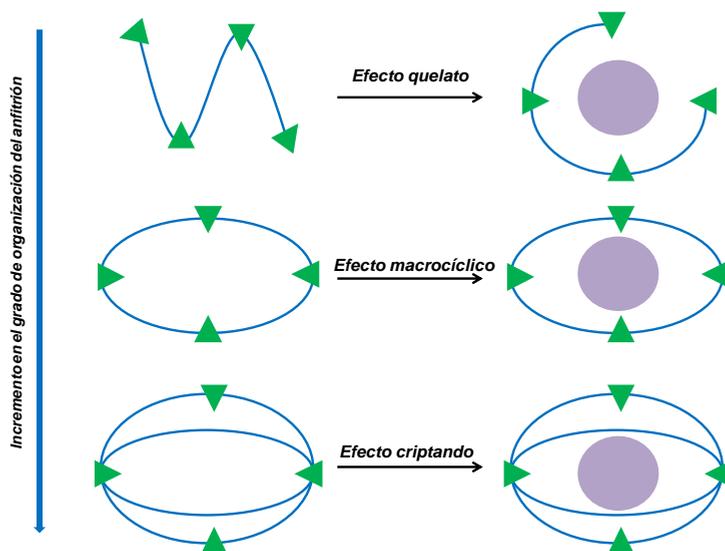


Figura 1.18.- Esquema de los efectos quelato, macrocíclico y criptando

Teniendo en cuenta los factores termodinámicos, se puede considerar que el *efecto quelato* es un efecto fundamentalmente entrópico. Sin embargo, en los otros dos efectos (*macrocíclico y criptando*), no es tan evidente el peso

de uno de los factores sobre el otro y es necesario considerar ambas contribuciones a la estabilidad del complejo. Así, en el *efecto macrocíclico*, la estabilidad termodinámica adicional se ha asignado en ciertas ocasiones al factor entrópico,⁶¹ considerando que hay un aumento del desorden producido por el desplazamiento de las moléculas de disolvente tras la formación del complejo. Sin embargo, en otras ocasiones, es el término entálpico el que se considera el responsable de este efecto y se ha encontrado, que para algunos compuestos, a medida que la interacción entre el receptor y sustrato aumenta, el disolvente también se ordena. Por lo tanto, el aumento en entalpía se compensa en parte por la disminución de entropía. Esto es lo que se denomina compensación entalpía-entropía.⁶²

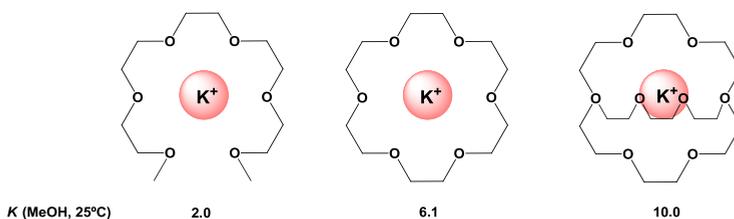


Figura 1.19.- Estabilidades de un ligando y sus análogos macrocíclico y criptando con el ión metálico K^+ .

En conclusión, el reconocimiento molecular es definido por el balance de información y energía química involucrada en los procesos de unión y selección y requiere del diseño de receptores que posean características estéricas y electrónicas complementarias de los sustratos a los que se unirán y un equilibrio apropiado entre rigidez y flexibilidad.

Un receptor que enlaza selectivamente a un sustrato es el receptor ciclofano binuclear de cobre mostrado en la figura 1.20 y desarrollado por *Verdejo et al.* El complejo interactúa selectivamente con L-glutámico frente a L-aspártico, que se diferencian en su estructura únicamente por un grupo metileno. La selectividad se debe a la complementariedad entre la cavidad del receptor y el sustrato, en la cual el L-glutámico se ajusta perfectamente pero no el L-aspártico que es más pequeño.

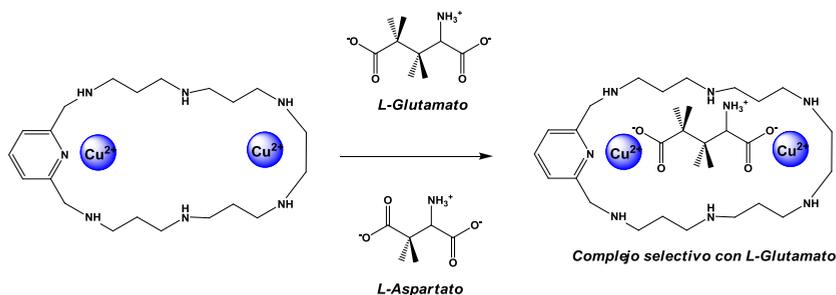


Figura 1.20.- Esquema de la interacción selectiva del receptor con el L-Glutámico frente al L-Aspartato.

1.7.-Catalisis supramolecular

Una función relacionada con el reconocimiento molecular es la catálisis supramolecular. Un catalizador es una especie química capaz de acelerar la velocidad de reacción permaneciendo inalterada a la finalización del proceso. Las principales características de un buen catalizador son la eficiencia, es decir, un gran aumento de la velocidad de reacción así como la selectividad, ya que hay ocasiones que es imprescindible llevar a cabo una transformación exclusivamente con un estereoisómero de un sustrato.

Dentro de la química supramolecular la búsqueda de catalizadores eficientes y selectivos para llevar a cabo transformaciones es un campo de gran interés, despertando una especial atención por el diseño de miméticos enzimáticos, es decir, aquellas entidades supramoleculares que catalizan reacciones enzimáticas. Tanto las enzimas como los miméticos enzimáticos utilizan mecanismos como son la catálisis nucleofílica, interacción con un estado de transición, catálisis ácido-base, reacciones controladas entrópicamente, etc.

La reactividad y catálisis supramolecular implica dos pasos principales: una unión efectiva y selectiva del catalizador al sustrato para formar la supermolécula y la transformación de las especies enlazadas en productos. Ejemplos de estructuras supramoleculares que mimetizan el centro activo de la anhidrasa carbónica son los complejos metálicos de Zn^{2+} mostrados en la

figura 1.21. La reacción que catalizan es la hidratación reversible del CO₂ a bicarbonato.

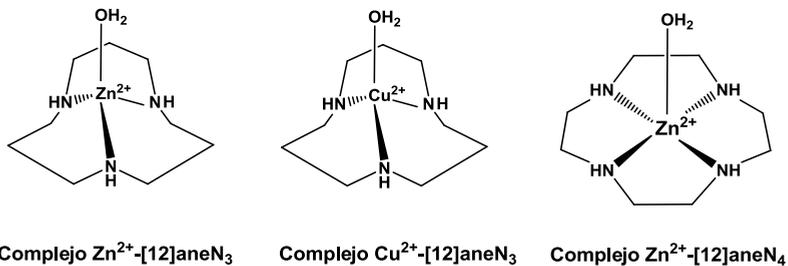


Figura 1.21.- Centro activo de la anhidrasa carbónica y estructuras modelos de los complejos metálicos poliamínicos.

Otro ejemplo son los contenedores moleculares⁶³ de Fujita *et al.* que con la caja G (figura 1.22) encapsula el 2-metil-1,3-butadieno y el ciclohexadieno en medio acuoso, y acelera la reacción de Diels-Alder entre ellos unas 110 veces.⁶⁴

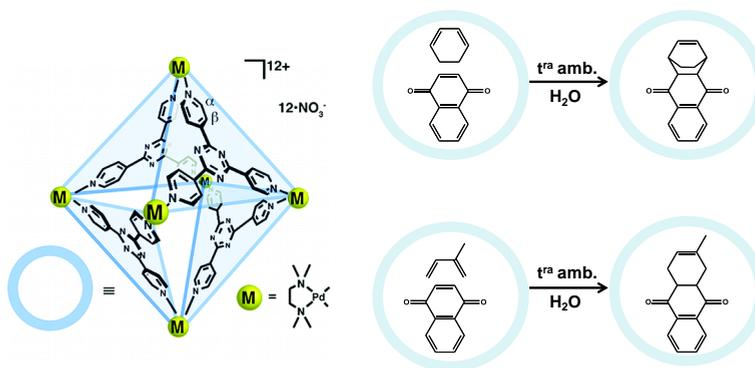


Figura 1.22.- Estructura de la caja G (izda) y reacciones Diels-Alder aceleradas por la caja G (dcha).

1.8.-Transporte supramolecular

Todas las células se rodean de membranas para separar el interior del medio exterior. Además, los diferentes orgánulos y compartimentos celulares están rodeados también de membranas y, es por ello, que muchas funciones de los organismos vivos se asocian a las estructuras y las funciones de la membrana. Un hecho característico de las membranas es que son impermeables a iones y macromoléculas, aunque permiten la relativa difusión libre de pequeños solutos apolares. Un mal funcionamiento en los mecanismos naturales de transporte de iones a través de las membranas celulares conducen a enfermedades llamadas *canalopatías*.⁶⁵

Existen dos mecanismos por los cuales los iones pueden difundirse a través de la membrana, el primero es hacer más lipófilo el sustrato mediante la utilización de un transportador y, el segundo, es la creación de un canal no lipofílico por el cual pueda pasar el sustrato (figura 1.23A).

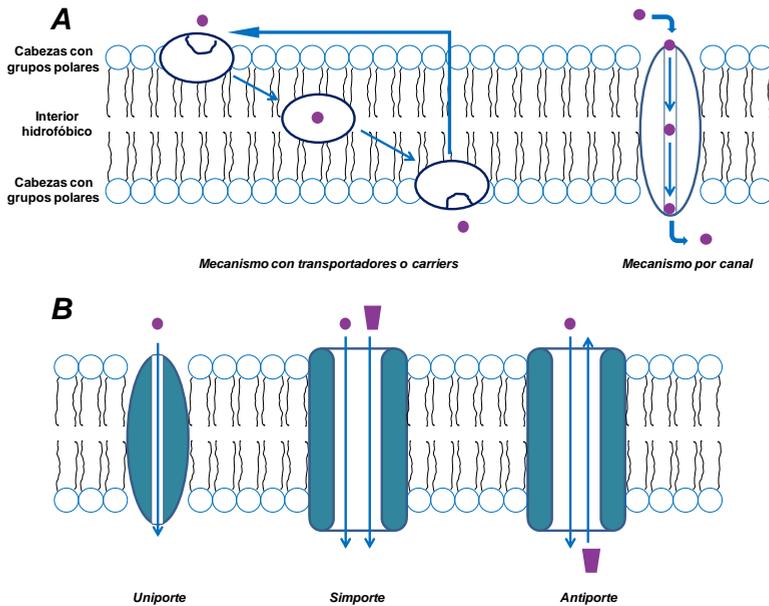


Figura 1.23.- A) Los principales mecanismos de transporte de iones a través de membrana y B) clasificación del transporte basado en la estequiometría y la dirección del transporte.

Además, los mecanismos de transporte se pueden clasificar según el sentido y número de sustratos transportados en tres grupos (figura 1.23B), el primero denominado *uniporte* corresponde al transporte de un único soluto en una dirección, en los otros dos grupos hay un co-transporte porque transportan dos iones simultáneamente, en el *simporte* los dos iones tienen la misma dirección y en el *antiporte* la dirección de cada ión es opuesta.

El producto natural valinomicina es el transportador más conocido, transporta K^+ a través de la membrana hacia el exterior de las células sin afectar la concentración de Na^+ . La valinomicina interacciona con el K^+ encapsulando al catión metálico en su interior con una coordinación octaédrica y protegiéndolo de la región lipofílica de las membranas y, finalmente, transportándolo a través de ellas (figura 1.24).

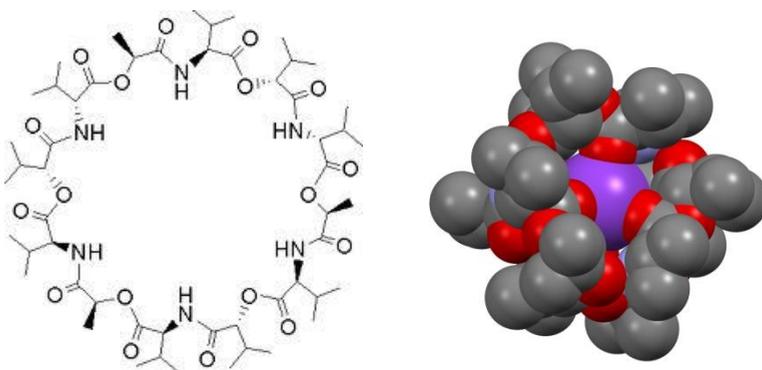


Figura 1.24.- Estructura de la valinomicina (izda) y estructura cristalina del mismo complejando el K^+ octaédricamente en el interior de su cavidad (dcha).⁶⁶

Otro ejemplo de entidad supramolecular empleada para transportar aniones a través de membranas son las tioureas basadas en el tris(2-aminoetil)amina de Gale y colaboradores (figura 1.25). Estos receptores son capaces de transportar cloruro a través de una variedad de mecanismos de co-transporte cloruro/protón, cloruro/nitrato, cloruro/bicarbonato y cloruro/sulfato.⁶⁷ Estos receptores interactúan con los iones formando un

complejo de inclusión, aumentando la lipofilia del anión, traspasando la membrana y liberándolo al pasarla.

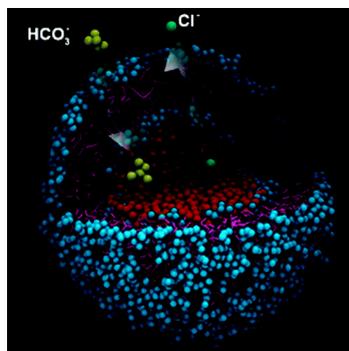
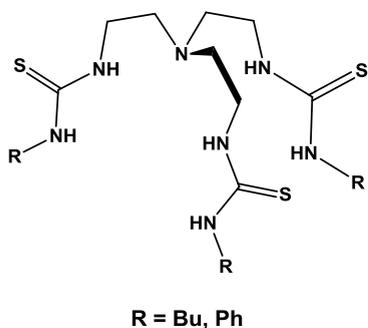


Figura 1.25.-Transportadores aniónicos de *Gale et al.* (izda) y representación de una vesícula con el mecanismo de transporte $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ (dcha).

La construcción de canales iónicos es el segundo mecanismo empleado en el transporte. En este tipo de mecanismo la velocidad alcanza los límites de la velocidad de difusión (10^8 iones por canal y segundo). La anfotericina es un producto natural extraído del *Streptomyces nodosus* que se fija a los esteroides de las membranas eucariotas, con mayor afinidad por el ergosterol de los hongos, alterando así la permeabilidad de la membrana con la salida de los iones Na^+ , K^+ y H^+ y provocando la muerte del hongo (figura 1.26).⁶⁸ Tiene un uso clínico en tratamientos contra la candidiasis invasiva grave o la leishmaniasis visceral.⁶⁹

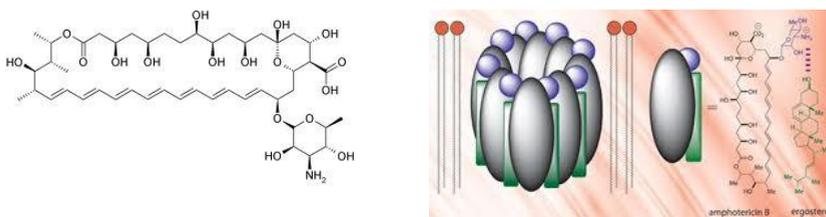


Figura 1.26.- Estructura de la anfotericina (izda) y representación del canal que forma en las membranas (dcha).

1.9.-Receptores politópicos

En el presente trabajo nos hemos centrado en la síntesis de receptores con estructuras macropolicíclicas, denominados politópicos. Los receptores politópicos contienen dos a más subunidades capaces de coordinar tanto simultáneamente como independientemente un sustrato. Los ligandos politópicos adoptan numerosas conformaciones aunque, en general, son estructuras grandes que contienen cavidades y/o hendiduras, con brazos, puentes y conexiones entre ellas. En el diseño del receptor politópico se puede disponer de grupos que aporten tanto la rigidez como la flexibilidad buscada. Y aunque con receptores rígidamente organizados puede alcanzarse un reconocimiento selectivo, los procesos de intercambio y regulación para el reconocimiento requieren de una flexibilidad del ligando para que puedan adaptarse y responder a los cambios del sustrato.

Más allá de los receptores monotópicos, capaces de reconocer sustratos con una topología definida, complejarlos y transportarlos, nos encontramos con los receptores politópicos que de acuerdo con su geometría y sus puntos de enlace pueden complejar de forma simultánea varios sustratos iguales o distintos. Las propiedades de estos receptores son potenciadas por efectos de carácter alostérico, cooperativo y regulatorio los cuales nos llevan más allá de las propiedades de los receptores monotópicos.^{37c}

La química de este tipo de receptores es poco común, pero se está convirtiendo en el objetivo de numerosos estudios en reconocimiento molecular en los últimos años. Los factores que caracterizan estos receptores son los siguientes:⁷⁰

- 1) La existencia de múltiples centros de complejación, que incrementa la afinidad coordinativa.
- 2) La existencia de múltiples centros de reconocimiento, que refuerza la selectividad por los sustratos.
- 3) La posibilidad de efectos catalíticos es mayor cuando se encuentran varios centros activos unidos a distintos centros de reconocimiento.

Hay una gran variedad de receptores politópicos en la literatura reciente que pueden clasificarse dentro de tres categorías:

- Macrocíclos o criptandos de gran tamaño, capaces de incorporar varios sustratos en el interior de su cavidad.⁷¹
- Estructuras en las que un ligando macrocíclico o de cadena abierta se conecta a otro ligando de estructura distinta a través de un puente.⁷²
- Estructuras de varios macrocíclos de igual o diferente estructura que están conectados por uno o varios ligandos puente.⁷³

Ejemplos de la primera categoría en la literatura serían algunos de los diseñados por el grupo de Rita Delgado en Lisboa con criptandos⁷⁴ donde destacan los estudios realizados en reconocimiento por Delgado, Mateus y colaboradores en receptores macrobícíclicos. Estos receptores tienen en su cavidad interior varios centros coordinativos distintos.⁷⁵ El criptando caracterizado por tener 2,4,6-trietilbenceno separados por unidades piridínicas (figura 1.27) coordina simultáneamente tres átomos de cobres y compleja carbonato de la atmosfera. El carbonato se sitúa en el interior de la cavidad y se estabiliza formando un enlace de coordinación con cada átomo de cobre, actuando como ligando puente entre ellos.⁷⁶

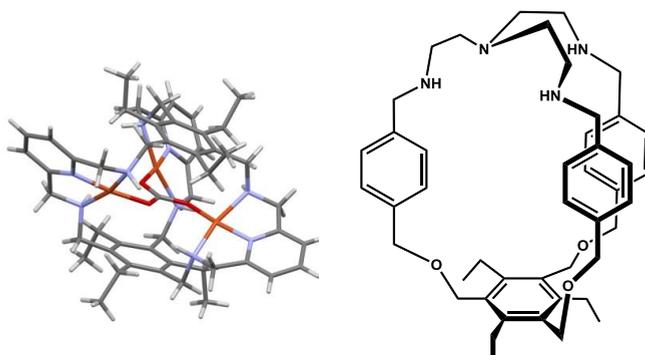


Figura 1.27.- Estructura cristalina del criptando con 3 Cu^{2+} y un CO_3^{2-} puente (izda) y estructura del criptando asimétrico (dcha) de Mateus *et al.*

Otro criptando diseñado por Mateus *et al.*, consiste en una estructura asimétrica con dos sitios de unión distintos dentro del mismo ligando (destacando una unidad de la poliamina *tren* y el 2,4,6-trietilbenceno separados por espaciadores de benceno). El ligando posee un tamaño de cavidad que le proporciona selectividad del fumarato frente otros ácidos carboxílicos como maleato, oxalato, malónato, succinato y glutarato (figura 1.27).⁷⁷

Un último ejemplo representativo dentro de esta categoría de ligandos politópicos corresponde al grupo de la Universidad de Urbino por Micheloni, Fusi y colaboradores. El ligando se caracteriza por ser un macrociclo compuesto por dos funciones esquamida y el macrociclo Me₂[12]aneN₄ (figura 1.28). La unidad macrocíclica coordina eficientemente el Zn²⁺ e interacciona a través de la esquamida con aniones, encontrándose una selectividad del fosfato frente a halógenos, sulfato y pirofosfato.⁷⁸

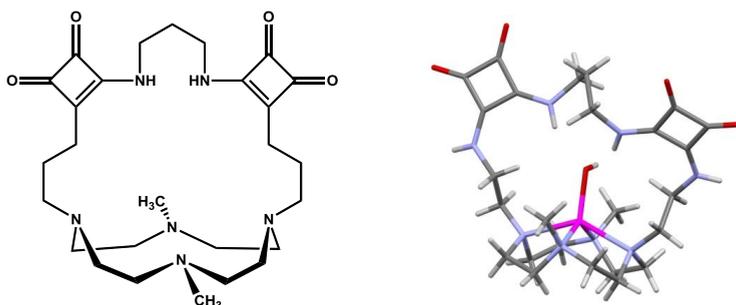


Figura 1.28.- Estructura del macrociclo de Micheloni *et al.* (izda) y estructura cristalina del macrociclo con Zn²⁺ y un grupo hidroxilo (dcha).

Dentro de la segunda clase se encuentran los ligandos sintetizados por Tripier y colaboradores, estos se caracterizan por ser algunos simétricos como *Trip2* y *Trip3* que se describen como dos unidades *ciclam* (*Trip2*) o cadenas poliamínicas lineales (*Trip3*) unidas por una piridina puente,⁷⁹ o el ligando asimétrico *Trip1* cuya estructura es un *ciclam* y una cadena

poliamínica lineal unidos por una piridina. La finalidad de estos receptores politípicos es enlazar eficientemente aniones para su aplicación como agentes secuestrantes y/o extractores de contaminantes.

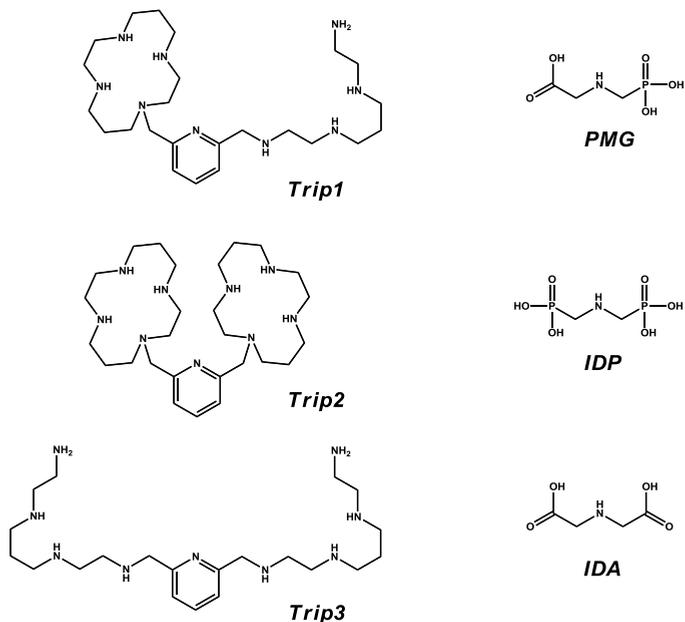


Figura 1.29.- Ligandos y aniones estudiados por Tripier *et al.*

Tripier compara la interacción de los ligandos descritos anteriormente y el herbicida glifosato [*N*-(fosfometil)glicina] o *PMG* y otros dos aniones relacionados, el ácido iminoacético o *IDA* y el ácido iminobis(metilfosfónico) o *IDP* (figura 1.29).⁸⁰ Los estudios indican la selectividad de *Trip1* por el herbicida a pH neutro. En la estructura del *PMG* se distinguen dos extremos aniónicos diferentes (un carboxilato y un fosfonato) y una función amonio central. Por otro lado, la estructura de *Trip1* se caracteriza por poseer dos dominios diferentes: un tetraazamacrocyclico (*cyclam*) doblemente protonado a pH neutro y una tetramina lineal flexible totalmente protonada a ese pH. La selectividad entre el ligando politípico *Trip1* con respecto a los restantes se debe a que la unidad macrocíclica se adapta y enlaza perfectamente al grupo

carboxilato mientras que la cadena lineal se acomoda alrededor del voluminoso grupo fosfonato.⁸¹ Finalmente, el átomo de nitrógeno del espaciador de la piridina aumenta la interacción a través de un enlace de hidrógeno con el amonio central. Este es un claro y sencillo ejemplo de las ventajas de los ligandos politópicos donde la presencia de múltiples centros de reconocimiento aumenta la interacción y selectividad por los sustratos.

En la última categoría encontramos los ligandos de Bridger, Clercq y colaboradores sintetizados en la década de los 90. Estos ligandos son bis-tetraazamacrocíclo, como el bis-*ciclám*, conectados por varias unidades puente (figura 1.30).⁸² Se encontró que estas familias de ligandos eran una clase de selectivos y potentes agentes anti-HIV-1 y HIV-2 porque inhiben la replicación del virus enlazándose al receptor CXCR4, el co-receptor para la entrada de los virus X4.

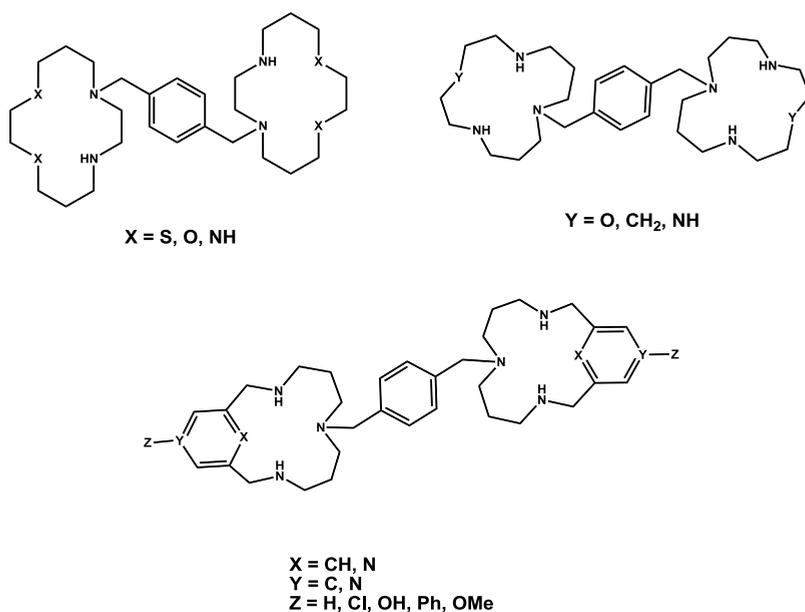


Figura 1.30.- Ligandos politópicos desarrollados contra el HIV por *Bridge et al.*

Otro de los pioneros en el desarrollo de ligandos pertenecientes a la última categoría es el profesor Kimura. Desarrolló varios complejos metálicos de ligando politópicos que reconocían selectivamente secuencias concretas de nucleótidos⁸³ y los aplicó como fármacos en terapias contra el SIDA (figura 1.31).⁸⁴

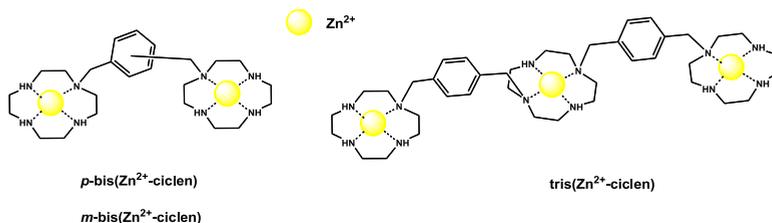


Figura 1.31.- Complejos metálicos de los ligandos di- y tritópicos de *ciclen* de Kimura *et al.*

Por último, los receptores sintetizados y caracterizados en la presente tesis se encuadran dentro del tipo c. En la literatura se recogen publicaciones sobre estructuras ditópicas, aunque el número de publicaciones sobre receptores tritópicos como los descritos en este trabajo es muy escaso, por lo que se espera que tengan unas propiedades interesantes en la complejación de sustratos y sus posibles aplicaciones como sensores, transportadores o catalizadores en un futuro.

1.9.1.-Receptores escorpiandos y dobles escorpiandos

Los ligandos desarrollados en este trabajo se pueden denominar, aparte de politópicos, ligandos *escorpiandos* y *dobles escorpiandos*. La estructura de los escorpiandos se puede describir como un macrociclo al cual se le ha conectado un residuo o cadena lateral (figura 1.32).

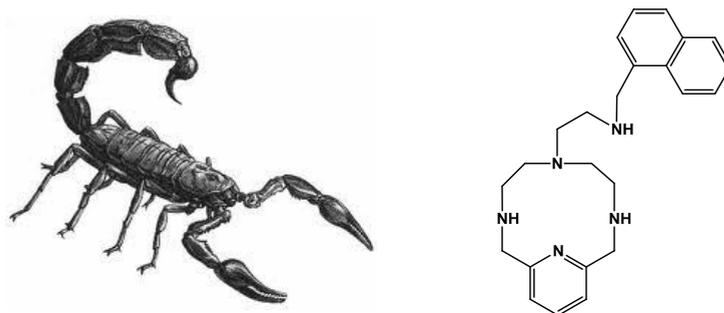


Figura 1.32.- Un dibujo de un escorpión (izda) y un ligando tipo *escorpiando* de García-España *et al.* (dcha).

En cambio, los *dobles escorpiandos* se describen como dos unidades macrocíclicas tipo escorpiando que se conectan a través de una unidad puente (figura 1.33).⁸⁵

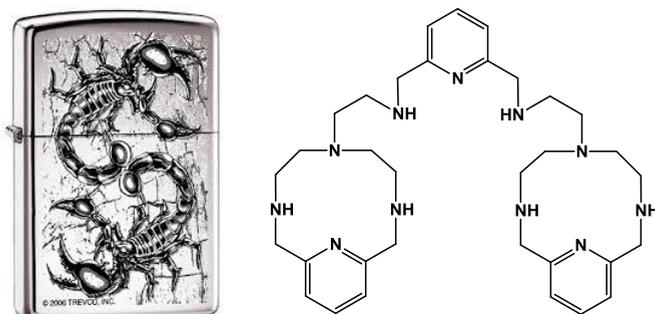


Figura 1.33.- Un dibujo de un doble escorpiando (izda) y un ligando tipo *doble escorpiando* de García-España *et al.* (dcha).

La química de los escorpiandos y la literatura científica sobre su interacción con metales, aniones, especies neutras, sus movimientos moleculares, propiedades ácido-base, propiedades como sensores, etc. es muy amplia.⁸⁶ Se pueden describir el trabajo de Fabbrizzi y colaboradores, los cuales incorporaron un grupo antraceno al *ciclam* (figura 1.34).⁸⁷ Los complejos con Ni^{2+} o Zn^{2+} de dicho receptor⁸⁸ inducen un cambio de conformación que depende del grado de protonación de la amina secundaria más próxima al antraceno, afectando así el índice de coordinación del metal y a la fluorescencia. El resultado es un sensor fluorescente sensible al ión metálico. Éste es también un ejemplo de movimiento molecular controlado por el metal ya que, el hecho de que la amina secundaria más próxima al antraceno coordine o no con el metal, provoca cambios conformacionales en la molécula.

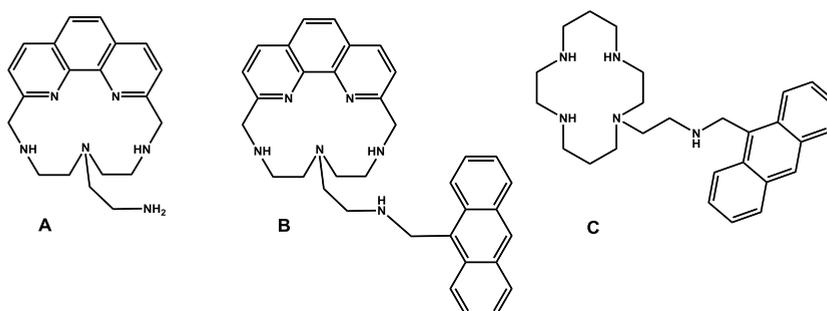


Figura 1.34.- Ejemplos de ligandos tipo *escorpiando* que se pueden encontrar en la bibliografía: A y B Bencini, Bianchi *et al.*, C Fabbrizzi *et al.*

Otro trabajo interesante es el realizado por Bianchi, Bencini y colaboradores,⁸⁹ donde introdujeron un espaciador aromático (fenantrolina) en la unidad macrocíclica y otra unidad aromática (antraceno) en el brazo flexible (figura 1.34). Al adoptar una conformación cerrada las dos unidades aromáticas se acercan y la fluorescencia se ve potenciada por la formación del excímero, incrementando la sensibilidad. El ligando actúa como una máquina molecular sencilla en la cual la cadena lateral es capaz de realizar

movimientos de apertura y cierre con respecto al macrociclo como respuesta a la metalación/desmetalación del ligando.

El término *doble escorpiando* es introducido por nuestro grupo en 2010, debido a la escasa bibliografía de receptores con las mismas características. El único ejemplo de similares características encontrado en la literatura corresponde a Fusi y colaboradores con varios receptores caracterizados por dos macrociclos con grupos aminos y fenol unidos por distintas cadenas poliamínicas lineales (figura 1.35).⁹⁰

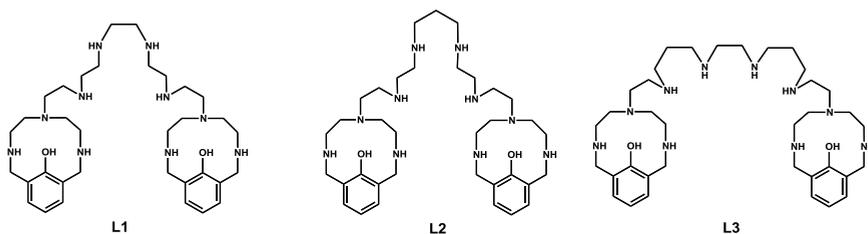


Figura 1.35.- Ligandos tipo *doble escorpiando* que se pueden encontrar en la bibliografía de Fusi *et al.*

El hecho más llamativo de estos ligandos es la capacidad de formar complejos trinucleares de Cu^{2+} donde se generan dos tipos de entornos de coordinación (figura 1.36), un hecho que abre un abanico de posibilidades para diseñar biomiméticos enzimáticos con centros catalíticos distintos.

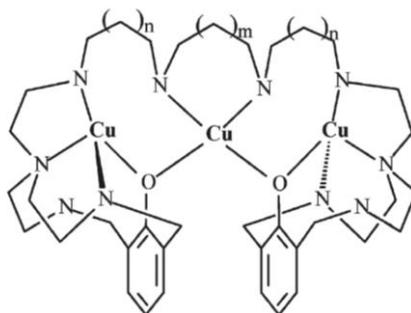
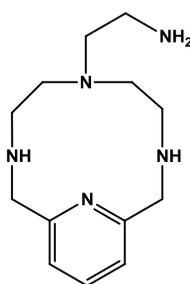


Figura 1.36 .- Modelo propuesto para el complejo trinuclear de los receptores de Fusi *et al.*

En el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, se sintetiza el ligando *pytren* (figura 1.37)⁹¹ mediante un procedimiento sencillo y con buen rendimiento. Dicho ligando y sus derivados tienen una interesante química de coordinación con una amplia variedad de sustratos como lo demuestran los numerosos trabajos publicados recientemente.⁹² Estas características junto con la idea de sintetizar ligandos con varios centros coordinativos distintos nos impulsó a diseñar y estudiar los ligandos *escorpiando* y *dobles escorpiandos* presentes en esta tesis.



pytren

Figura 1.37.- Estructura del precursor macrocíclico *pytren*

1.10.-Vocabulario y nomenclatura

Con respecto a las diferencias etimológicas entre receptor-ligando y metal/anión-sustrato existe una aceptación generalizada de los términos ligando, metal y complejo debido a la extensión de la nomenclatura en la química de coordinación. Sin embargo, en la presente tesis hay trabajos de química de coordinación aniónica, por lo cual, es evidente que no puede hablarse de metal y escogeremos anión.

En química supramolecular las ideas de ligando, metal y anión se utilizan preferentemente antes que receptor y sustrato y, por lo tanto, en el presente trabajo hemos empleado la nomenclatura de ligando-metal/anión aunque eventualmente utilizaremos los términos receptor/sustrato para evitar una excesiva repetición de la misma palabra.

El objetivo principal de la nomenclatura química es la identificación sencilla de cualquier compuesto a través de una serie de reglas que permitan establecer la estructura de una especie química determinada. La nomenclatura IUPAC surge como método para sistematizar los nombres asignados a las diferentes especies químicas y en un intento de recoger en ellos, de manera fiable e inequívoca, todas las características de los compuestos, convirtiéndolos en entidades únicas e inconfundibles. Sin embargo, a medida que las estructuras de los compuestos se van complicando, dichos nombres resultan demasiado complejos e incómodos para un manejo regular y cotidiano. Es entonces cuando surgen en el entorno de trabajo diferentes terminologías más manejables, permitiendo una mayor facilidad de comprensión e intercambio de la información.

En las tres últimas décadas se han desarrollado nuevos métodos sintéticos que permiten preparar moléculas de cualquier forma y tamaño y que raramente se nombran según las reglas de la IUPAC, sino que se les asignan nombres triviales, muchas veces referentes a objetos que pueden encontrarse en nuestro entorno: barriles,⁹³ cajas,⁹⁴ calixarenos,⁹⁵ cestas,⁹⁶ jaulas,⁹⁷ sepulcros,⁹⁸ futboleros,⁹⁹ coronas,¹⁰⁰ catapinandos,¹⁰¹ criptandos,¹⁰² mariposas,¹⁰³ esferandos,¹⁰⁴ ciclofanos,¹⁰⁵ escorpiandos,¹⁰⁶ etc.

Esta nomenclatura es la que utilizamos diariamente en el laboratorio y cuando realizamos colaboraciones con otros grupos, pero debido al nombre tan abstracto desde el punto de vista químico se ha preferido utilizar en esta Tesis una nomenclatura impersonal **L1**, **L2**, **L3**, **L4**, **L5** y **L6**, al igual que en los artículos donde se ha publicado parte del trabajo.

En referencia a los nombres de los ligandos orgánicos sintetizados serán escritos en negrita y para los ligandos orgánicos precursores en cursiva. Ejemplo: **L1** y *pytren*.

Así mismo, cuando hagamos referencia a un metal, el estado de oxidación del mismo lo indicaremos con los números en superíndice colocados en la parte posterior. Por ejemplo: Zn^{2+} . Los nombres de los complejos serán descritos utilizando dos nomenclaturas similares, en principio se utilizará una nomenclatura colocando, en primer lugar, el metal; a continuación, el ligando, con los protones delante, si los tiene; y en último

lugar, otros ligandos presentes en la esfera de coordinación si los hay. Ejemplo: $\text{Cu}_2\text{L1}(\text{H}_2\text{O})_2^{4+}$.

Los errores experimentales se indicarán colocando entre paréntesis la desviación estándar de la última cifra significativa. Por ejemplo: la escritura de 13.29(4) indica que dicha variable tiene un valor de 13.29 con un error de ± 0.04 .

Por último, con respecto a abreviaturas, acrónimos y anglicismos, se ha preferido evitar el uso de palabras inglesas en la medida que exista una palabra o expresión castellana con un significado equivalente. Por ejemplo, se prefiere el uso de disminución, atenuación o supresión en vez de *quenching*.

-
- 1 J. –M. Lehn, *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, 1995.
 - 2 A. Werner, *Zeitschr. Anorg. Chem.*, 1893, **3**, 267.
 - 3 a) E. Fischer, *Ber. Deutsch. Chem. Ges.*, 1894, **27**, 2985; b) J. –P. Behr, *The Lock and Key Principle, The State of Art-100 Years On*, Wiley, Chichester, 1994.
 - 4 P. Ehrlich, *Studies on Immunity*, Wiley, New York, 1906.
 - 5 W. M. Latimer y W. H. Rodebush, *J. Am. Chem. Soc.*, 1920, **42**, 1419.
 - 6 K. L. Wolf, H. Frahm y H. Harms, *Phys. Chem. B*, 1937, **36**, 237.
 - 7 J. D. Watson y F. H. C. Crick; *Nature*, 1953, **171** (4356), 737.
 - 8 D. E. Koshland, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1958, **44** (2), 98.
 - 9 a) C. Moore y B. C. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **15**, 562; b) S. N. Graven, H. A. Lardy, D. Johnson y A. Rutter, *Biochemistry*, 1966, **5**, 1729; c) J. B. Chapell y A. R. Crofts, *Biochem. J.*, 1965, **95**, 393; d) B. C. Pressman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1965, **53**, 1076.
 - 10 C. J. Pedersen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1988, **27**, 1021.
 - 11 B. Dietrich, J. –M. Lehn y J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, 1969, 2885.
 - 12 a) D. J. Cram, T. Kaneda, R. C. Helgeson y G. M. Lein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 6752; b) D. J. Cram, T. Kaneda, R. C. Helgeson, S. B.

- Brown, C. B. Knobler, E. Maverick y K. N. Trueblood, *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 3645.
- 13 C. H. Park y H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 2431.
- 14 P. D. Beer, P. A. Gale y D. K. Smith, *Supramolecular Chemistry*; Oxford GB, Oxford University, 1999.
- 15 L. R. MacGillivray y J. L. Atwood, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1996, **35**, 1828.
- 16 D. Quiñonero, C. Garau, C. Rotger *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2002, **41**, 3389.
- 17 P. J. Garratt, Y.-F. Nga y J. W. Steed, *Tetrahedron*, 2000, **56**, 4501.
- 18 G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press: Oxford, 1997.
- 19 F. H. Beijer, H. Kooijman, A. L. Spek, R. P. Sijbesma y E. W. Meijer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37** (1-2), 75.
- 20 C. A. Hunter y J. K. M. Sanders, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 5525.
- 21 V. A. Parsegian, *van der Waals Forces: A Handbook for Biologists, Chemists, Engineers and Physicists*, Cambridge University Press, New York, 2006.
- 22 S. Sato, Y. Ishido y M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, *131*, 6064.
- 23 a) N. L. Rosi, J. Eckert, M. Eddaoudi, *et al.*, *Science*, 2003, **300**, 1127; b) X. Zhao, B. Xiao, A. J. Fletcher, *et al.*, *Science*, 2004, **306**, 1012; c) R. Kitaura, S. Kitagawa, Y. Kubota, *et al.*, *Science*, 2002, **298**, 2358; d) D. Maspoch, D. Ruiz-Molina, K. Wurst, *et al.*, *Nat. Mater.*, 2003, **2**, 190; e) A. R. Millward y O. M. Yaghi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 17998.
- 24 J. C. Ma y D. Dougherty, *Chem. Rev.*, 1997, **97**, 1303.
- 25 a) T. D. Shepodd, M. A. Petti y D. A. Dougherty, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 6085; b) P. C. Kearny, L. S. Mizoue, R. A. Kumpf, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 9907.

- 26 a) G. W. Gokel, L. J. Barbour, R. Ferdani y J. X. Hu, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 878; b) J. X. Hu, L. J. Barbour y G. W. Gokel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 5121.
- 27 a) Y. S. Rosokha, S. V. Lindeman, S. V. Rosokha y J. K. Kochi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2004, **43**, 4650; b) C. S. Campos-Fernandez, B. L. Schottel, H. T. Chifotides, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 12909; c) B. P. Hay y R. Custelcean, *Cryst. Growth Des.*, 2009, **9**, 2539.
- 28 a) P. Metrangolo, H. Neukirch, T. Pilati y G. Resnati, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 386; b) J. M. Dumas, M. Gomel y M. Guerin, *The Chemistry of Functional Groups, Supplement D*, Ed. S. Patai y Z. Rappoport, John Wiley & Sons Ltd, New York, 1983
- 29 A. Legeon, *Halogen Bonding*, Ed. P. Metrangolo y G. Resnati, Springer, Berlin/Heidelberg, 2008.
- 30 P. Metrangolo, F. Meyer, T. Pilati, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 6114
- 31 a) H. A. Bent, *Chem. Rev.*, 1968, **68**, 587; b) S. Trigerero, R. Llusar, V. Polo y M. Fourmigué, *Cryst. Growth Des.*, 2008, **8**, 2241.
- 32 T. Bjorvatten, *Acta Chem. Scand.*, 1962, **16**, 749.
- 33 A. I. Kitaigorodski, *Molecular Crystals and Molecules*, Academic Press: New York, 1973.
- 34 D. M. Smithrud, E. M. Sanford, I. Chao, S. B. Ferguson, D. R. Carcanague, J. D. Evanseck, K. N. Houk y F. Diederich, *Pure. Appl. Chem.*, 1990, **62**, 2227.
- 35 a) T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties*; Freeman: New York, 1984; b) D. L. Nelson y M. M. Cox, *Lehninger: Principios de Bioquímica*, Omega, 2006; c) P. Levene, *J. Biol. Chem.*, 1919, **40** (2), 415.
- 36 J. -M. Lehn, *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Ed. Pergamon: New York, 1996

37 a) J. –M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1988, **27**, 89; b) V. Balzani, L. DeCola, *Supramolecular Chemistry*; Kluwer Academic Publishers: Netherlands, 1992; c) F. Vögtle, *Supramolecular Chemistry*; Wiley; New York, 1991.

38 a) H. Origino, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 1303; b) C. Dietrich-Buchecker, J. P. Sauvage y J. P. Kintzinger, *Tetrahedron Lett.*, 1983, **24**, 5095; c) A. W. Maverick y F. E. Klavetter, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 4129; d) J. –M. Lehn, A. Rigault, J. Siegel, J. Harrowfield y B. Chevrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1987, **84**, 2565.

39 a) A. W. Maverick y F. E. Klaveter, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 4129; b) A. W. Maverick, S. C. Buckingham, Q. Yao, J. R. Bradbury y G. G. Stanley, *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, **108**, 7430; c) J. R. Bradbury, J. L. Hampton, D. P. Martone y A. W. Maverick, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 2392; d) A. W. Maverick, M. L. Ivie, J. H. Waggenspack y F. R. Fronczek, *Inorg. Chem.*, 1990, **29**, 319.

40 a) M. Fujita, M. Tominaga, A. Hori y B. Therrien, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38** (4), 369; b) W. –Y. Sun, M. Yoshizawa, T. Kusukawa y M. Fujita, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2002, **6** (6), 757; c) D. H. Cao, K. Chen, J. Fan, J. Manna, B. Olenyuk, J. A. Whiteford y P. J. Stang, *Pure Appl. Chem.*, 1997, **69** (9), 1979; d) S. Leininger, B. Olenyuk y P. J. Stang, *Chem. Rev.*, 2000, **100** (3), 853.

41 a) K. –S. Jeong, Y. L. Cho, J. U. Song, H. –Y. Chang y M. G. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 10982; b) K. –S. Jeong, Y. L. Cho, H.-Y. Chang, T. –Y. Park y J. U. Song, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 9459; c) K. –S. Jeong y E. –J. Park, *J. Org. Chem.*, 2004, **69**, 2618.

42 a) J. L. O'Donnell, X. B. Zuo, A. J. Goshe, L. Sarkisov, R. Snurr, J. T. Hupp y D. M. Tiede, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 1578; b) P. H. Dinolfo, M. E. Williams, C. L. Stern y J. T. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 16814; c) P. H. Dinolfo, V. Coropceanu, J. –L. Brédas y T. J. Hupp, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 12592.

- 43 a) M. J. Irwin, L. M. Rendina, J. J. Vittal y R. J. Puddephatt, *Chem. Commun.*, 1996, 1281; b) W. J. Hunks, M. A. MacDonald, M. C. Jennings y R. J. Puddephatt, *Organometallics*, 2000, **19**, 5063; c) W. J. Hunks, J. Lapierre, H. A. Jenkins y R. J. Puddephatt, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 2885.
- 44 a) M. Fujita, J. Yazaki y K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 5645; b) M. Fujita, J. Yazaki y K. Ogura, *Tetrahedron Lett.*, 1991, **32**, 5589.
- 45 a) P. J. Stang y D. H. Cao, *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, **116**, 4981; b) P. J. Stang, D. H. Cao, S. Saito y A. M. Arif, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 6273.
- 46 Y. Kubota, S. Sakamoto, K. Yamaguchi y M. Fujita, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 4854.
- 47 a) P. J. Stang, N. E. Persky y J. Manna, *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 4777; b) H. -B. Yang, N. Das, F. Huang, A. Hawkrigde, D. D. Díaz, A. M. Arif, M. G. Finn, D. C. Muddiman y P. J. Stang, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 6644.
- 48 a) S. R. Siedel y P. J. Stang, *Acc. Chem. Res.*, 2002, **35**, 972; b) N. Takeda, K. Umemoto, K. Yamaguchi y M. Fujita, *Nature*, 1999, **398**, 794; c) K. Kabayashi, Y. Ozaki, M. Kawano y M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2008, **47**, 2046.
- 49 K. Suzuki, M. Tominaga, M. Kawano y M. Fujita, *Chem. Commun.*, 2009, 1638.
- 50 a) B. Olenyuk, J. A. Whiteford, A. Frechtenkötter y P. J. Stang, *Nature*, 1999, **398**, 796; b) K. Ghosh, J. Hu, H. S. White y P. J. Stang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 6695.
- 51 J. K. Klosterman, Y. Yamauchi y M. Fujita, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 1714.
- 52 a) K. Kumazawa, K. Biradha, T. Kusukawa, T. Okano y M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2003, **42**, 3909; b) K. Ono, M. Yoshizawa, T. Kato y M. Fujita, *Chem. Commun.*, 2008, 2328; c) Y. Yamauchi, M. Yoshizawa, M. Akita y M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 960.

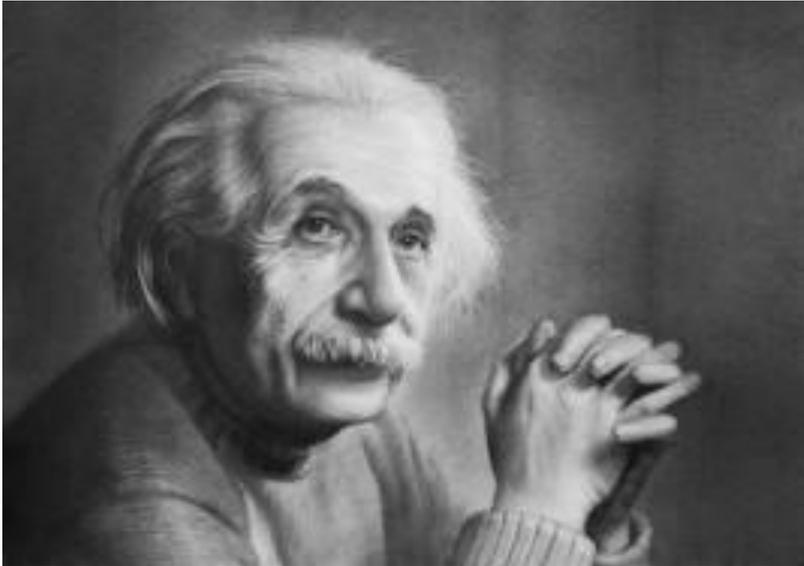
- 53 M. Yoshizawa, K. Kumazawa y M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 13456.
- 54 H. –J. Schneider y A. K. Yatsimirsky, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 263.
- 55 a) D. J. Cram, *From Design to Discovery*, American Chemical Society, Washington DC, 1991, b) E. Maverick y D. J. Cram, *Compr. Supramol. Chem.*, 1996, **1**, 213.
- 56 D. J. Cram, M. P. deGrandpre, C. B. Knobler y K. N. Trueblood, *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 3286.
- 57 R. D. Hancock, *J. Chem. Ed.*, 1992, **69**, 615.
- 58 a) J. S. Bradshaw, R. M. Izatt, A. V. Bordunov, C. Y. Zhu y J. K. Hathaway, *Compr. Supramol. Chem.*, 1996, **1**, 35; b) J. –M. Lehn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1988, **100**, 91.
- 59 D. K. Cabbiness y D. W. Margerum, *J. Am. Chem. Soc.*, 1969, **91**, 6540.
- 60 J. –M. Lehn, *Acc. Chem. Res.*, 1978, **11**, 49.
- 61 M. Kodama y E. Kimura, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 1976, 2941.
- 62 G. Gokel, *Crown Ethers and Cryptands*, The Royal Soc. Chem., 1991.
- 63 M. Yoshizawa, J. K. Klosterman y M. Fujita, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2009, **48**, 3418.
- 64 T. Kusukawa, T. Nakai, T. Okano y M. Fujita, *Chem. Lett.*, 2003, **32**, 284.
- 65 a) F. M. Ashcroft, *Ion Channels and Disease Channeolopathies*, Academic Press: San Diego, 2001; b) R. Planells-Cases y T. J. Jentsch, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, 2009, **1792**, 173; c) E. Cordat y J. R. Casey, *Biochem. J.*, 2009, **417**, 423; d) M. Maduke, C. Miller y J. A. Mindell, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2000, **29**, 411; e) D. N. Sheppard, D. P. Rich, L. S. Ostedgaard, R. J. Gregory, A. E. Smith y M. J. Welsh, *Nature*, 1993, **362**, 160.
- 66 V. Z. Pletnev, I. N. Tsygannik, Y. D. Fonarev, I. Y. Mikhaylova, Y. V. Kulikov, V. T. Ivanov, D. A. Lengs y V. L. Dyueks, *Bioorg Khim.*, 1995, **21**, 828.

- 67 a) N. Busschaert, M. Wenzel, M. E. Light, P. Iglesias-Hernández, R. Pérez-Tomás y P. A. Gale, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 14136-; b) N. Busschaert, P. A. Gale, C. J. Haynes, M. E. Light, S. J. Moore, C. C. Tong, J. T. Davis y W. A. Harrell, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 6252.
- 68 B. L. Velazquez, *Farmacología y su Proyección a la Clínica*. Ed. McGraw-Hill, 1992.
- 69 H. W. Murray, J. D. Berman, C. R. Davies y N. G. Saravia, *Lancet.*, 2005, **366**, 1561.
- 70 F. Diederich, *Cyclophanes*, The Royal Society of Chemistry, London, 1991.
- 71 a) A. E. Martell, *J. Incl. Phen.*, 1989, 99; b) B. Dietrich, *Cryptands in Comprehensive Supramolecular Chemistry*, ed. G. W. Gokel, Elsevier, Science, Amsterdam/New York, 1996, **1**, 153; c) V. Amendola, M. Bonizzoni, D. Esteban-Gomez, L. Fabbrizzi *et al.*, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250**, 1451.
- 72 a) C. Lodeiro y F. Pina, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253** (9+10), 1353; b) B. Champin, P. Mobian y J.-P. Sauvage, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36** (2), 358; c) T. Gunnlaugsson y J. P. Leonard, *Chem. Commun.*, 2005, **0**, 3114.
- 73 a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, S. Puccioni, B. Valtancoli, P. Gratteri, A. Garau y V. Lippolis, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 139; b) C. Bazzicalupi, A. Bencini y V. Lippolis, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 3709.
- 74 a) S. Carvalho, R. Delgado y V. Félix, *Tetrahedron*, 2010, **66**, 8714; b) P. Mateus, N. Bernier y R. Delgado, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 1729; c) P. Mateus, R. Delgado, P. Brandao, S. Carvalho y V. Félix, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 4661.
- 75 a) P. Mateus, R. Delgado, P. Brandao y V. Félix, *Org. Biomol. Chem.*, 2012, **10**, 5529.
- 76 P. Mateus, R. Delgado, F. Lloret, J. Cano, P. Brandao y V. Félix, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 11193.

- 77 P. Mateus, R. Delgado, P. Brandao y V. Félix, *J. Org. Chem.*, 2012, **77**, 4611.
- 78 G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini y P. Rossi, *Chem. Eur. J.*, 2011, **17**, 1670.
- 79 a) S. Develay, R. Tripier, M. L. Bacon, V. Patinec, G. Serratrice y H. Handel, *Dalton Trans.*, 2005, 3016; b) J. Pouessel, N. L. Bris, A. Bencini, C. Giorgi, B. Valtancoli y R. Tripier, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 10521; c) N. L. Bris, H. Bernard, Z. Chamas y H. Handel; *Synthetic Commun.*, 2009, **39**, 1992.
- 80 J. Pouessel, N. L. Bris, A. Bencini, C. Giorgi, H. Handel y R. Tripier, *Eur. J. Org. Chem.*, 2011, 6965.
- 81 a) N. L. Bris, H. Bernard, R. Tripier y H. Handel, *Inorg. Chim. Acta.*, 2007, 3026; b) A. -S. Delépine, R. Tripier, N. L. Bris, H. Bernard, A. Honraedt y H. Handel, *Inorg. Chim. Acta.*, 2009, **362**, 3829.
- 82 a) G. J. Bridger, R. T. Skerlj, E. D. Clercq *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1995, **38**, 366; b) G. J. Bridger, R. T. Skerlj, E. D. Clercq *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1996, **39**, 109; c) G. J. Bridger, R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, D. Thornton *et al.*, *J. Org. Chem.*, 1996, 1519; d) G. J. Bridger, R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, S. A. Mertellucci, G. W. Henson, S. Struyf, M. Witvrouw, D. Schols y E. D. Clercq, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 3971.
- 83 a) S. Aoki y E. Kimura, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 769; b) E. Kimura, Y. Kuramoto, T. Koike, H. Fujioka y M. Kodama, *J. Org. Chem.*, 1990, **55**, 42; c) S. Aoki, M. Zulkefeli, M. Shiro y E. Kimura, *Proc. Natl. Acad. Science*, 2002, **99** (8), 4894.
- 84 E. Kikuta, S. Aoki y E. Kimura, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 7911.
- 85 J. González, J. M. Llinares, R. Belda, J. Pitarch, C. Soriano, R. Tejero, B. Verdejo y E. Garcia-España, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8** (10), 2367.
- 86 V. Amendola, L. Fabbrizzi, M. Liccheli, C. Mangano, P. Pallavicini, L. Parodi y A. Poggi, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **190-192**, 649.

- 87 L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini y L. Parodi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1998, **37** (6), 800.
- 88 S. Aoki, S. Kaido, H. Fujioka y E. Kimura, *Inorg. Chem.*, 2003, **42** (4), 1023.
- 89 a) A. Bencini, A. Bianchi, C. Lodeiro, A. Masotti, J. Parola, F. Pina, J. S. deMelo y B. Valtancoli, *Chem. Commun.*, 2000, 1639; b) C. Bazzicalupi, A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, L. Borsari, C. Giorgi, B. Valtancoli, C. Lodeiro, J. C. Lima, J. Parola y F. Pina, *Dalton Trans.*, 2004, 591; c) A. Bencini, E. Berni, A. Bianchi, A. Fornasari, C. Giorgi, J. C. Lima, C. Lodeiro, M. J. Melo, J. S. deMelo, J. Parola, F. Pina y B. Valtancoli, *Dalton Trans.*, 2004, 2180.
- 90 G. Ambrosi, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, E. Macedi, M. Micheloni, P. Paoli y P. Rossi, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 10424.
- 91 B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano y E. García-España, *Inorg. Chem.*, 2007, **46** (14), 5707.
- 92 a) M. Inclán, M. T. Albelda, J. C. Frías, S. Blasco, V. Verdejo, C. Serena, C. Salat-Canela, M. L. Díaz, E. García-España y A. García-España, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134** (23), 9644; b) M. P. Clares, S. Blasco, M. Inclán, L. C. Agudo, B. Verdejo, C. Soriano, A. Doménech, J. Latorre y E. García-España, *Chem. Commun.*, 2011, **47** (21), 5988, c) S. Blasco, J. Cano, M. P. Clares, S. García-Granda, A. Doménech, H. R. Jiménez, B. Verdejo, F. Lloret y E. García-España, *Inorg. Chem.*, 2012, *en prensa*.
- 93 J. F. Stoddart, *J. Inclusion Phenom.*, 1989, **7**, 227.
- 94 B. Odell, M. V. Reddington, A. M. Slawin, N. Spencer, J. F. Stoddart y D. J. Williams, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1988, **27**, 1547.
- 95 C. D. Gutsche, *Calixarenes*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1989.
- 96 B. Dung y F. Vögtle, *J. Inclusion Phenom.*, 1988, **6**, 429.

- 97 a) S. Grammenudi y F. Vögtle, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1986, **25**, 1122; b) F. H. Kohnke, J. P. Mathias y J. F. Sttodart, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1989, **28**, 1103.
- 98 A. M. Sargeson, *Chem. Brit.*, 1979, **15**, 23.
- 99 H. W. Kroto, *Nature*, 1987, **329**, 529.
- 100 C. J. Pedersen, *Science*, 1988, **241**, 536.
- 101 C. H. Park y H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 2431.
- 102 B. Dietrich, J. -M. Lehn y J. P. Sauvage, *Tetrahedron Lett.*, 1969, **10**, 2885.
- 103 M. El Khalifa, F. Y. Pétilion, J. Y. Saillard y J. Talarmin, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 3849.
- 104 D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1986, **25**, 1039.
- 105 F. Diederich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1988, **27**, 362.
- 106 P. Pallavicini, A. Perotti, A. Poggi, B. Seghi y L. Fabbrizzi, *J. Am. Chem. Soc.*, 1987, **109**, 5139.



“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein, físico alemán considerado como el científico más importante del siglo XX, presentó la teoría de la relatividad y sentó las bases de la física del siglo XX.

Capítulo 2.- Objetivos

El grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, ubicado actualmente en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMol), se ha centrado en los últimos años en el estudio de la química de coordinación tanto catiónica como aniónica de ligandos poliamínicos.

A lo largo del capítulo de introducción se ha destacado la importancia de la química supramolecular y sus aplicaciones en el reconocimiento, catálisis y transporte molecular. Asimismo, se ha comentado la gran cantidad de literatura en este campo de investigación sobre la interacción de metales y aniones con ligandos poliamínicos. Sin embargo, los trabajos dedicados a la síntesis y estudio de ligandos politópicos son escasos en la literatura.

Dentro de este marco, la presente memoria de tesis se ha orientado a la síntesis de ligandos poliamínicos politópicos y su interacción con metales y aniones de interés biológico. Los objetivos del trabajo se dividen en los siguientes puntos:

OBJETIVO 1: Síntesis y caracterización de compuesto poliamínicos politópicos

En este objetivo se abordará la síntesis de ligandos politópicos derivados del *pytren*, ya sean ligandos escorpiandos o dobles escorpiandos.

OBJETIVO 2: Estudio de las propiedades ácido-base de los ligandos en disolución acuosa.

En primer lugar, se determinarán las constantes de basicidad de los ligandos como paso previo a cualquier estudio posterior. También es conveniente conocer las especies predominantes en función del pH y la secuencia de protonación de los receptores. Estos estudios se llevarán a cabo mediante potenciometría, RMN, UV-Vis, fluorescencia y dinámica molecular.

OBJETIVO 3: Estudio de la interacción de los ligandos con iones metálicos.

Los receptores poliamínicos son muy versátiles, ya que dependiendo de su grado de protonación pueden interactuar indistintamente con especies catiónicas, aniónicas y neutras. La coordinación de los ligandos con los metales Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} se estudiará mediante diversas técnicas como son potenciometría, UV-Vis, fluorescencia, flujo detenido, RMN y difracción de rayos X.

OBJETIVO 4: Estudio de la interacción de los ligandos con aniones de interés biológico.

Mediante técnicas potenciométricas, de RMN, espectroscópicas y de dinámica molecular se estudiará la interacción de los ligandos y sus complejos metálicos con nucleótidos y ácidos nucleicos.

OBJETIVO 5: Aplicaciones biológicas de los ligandos y sus complejos metálicos.

Se buscarán dos aplicaciones biológicas para los ligandos, la primera utilizando los complejos metálicos como miméticos de centros activos enzimáticos de SOD y la segunda, utilizando los ligandos como agentes antitumorales mediante la interacción de los ligandos con los ácidos nucleicos. Estos estudios preliminares se realizarán mediante ensayos enzimáticos e *in vitro* con líneas tumorales.

La presente tesis se encuentra dividida en nueve capítulos. En el primer capítulo se ha presentado una introducción general de la química supramolecular junto con las características de los ligandos politópicos, y tras el actual segundo capítulo donde se recogen los objetivos, se explican los detalles experimentales y metodológicos en el tercero. En el cuarto capítulo se discute la síntesis y caracterización de los ligandos, y en los cuatro siguientes se describen las propiedades ácido-base, la coordinación con metales y la interacción con aniones respectivamente. Por último, se presenta un capítulo de conclusiones generales.



Aunque la naturaleza comience con la razón y finalice con la experiencia, para nosotros es necesario hacer lo contrario, eso significa comenzar con las experiencias y continuar investigando la razón.

Leonardo Da Vinci, pintor italiano y símbolo del hombre del Renacimiento

Capítulo 3.- Material y métodos

3.1.- Potenciometría.

3.1.1.-Sistema potenciométrico

Los estudios potenciométricos se han realizado utilizando un potenciómetro controlado por un ordenador personal Pentium Dual-Core E5300. En la figura 3.1 se presenta el sistema potenciométrico empleado.

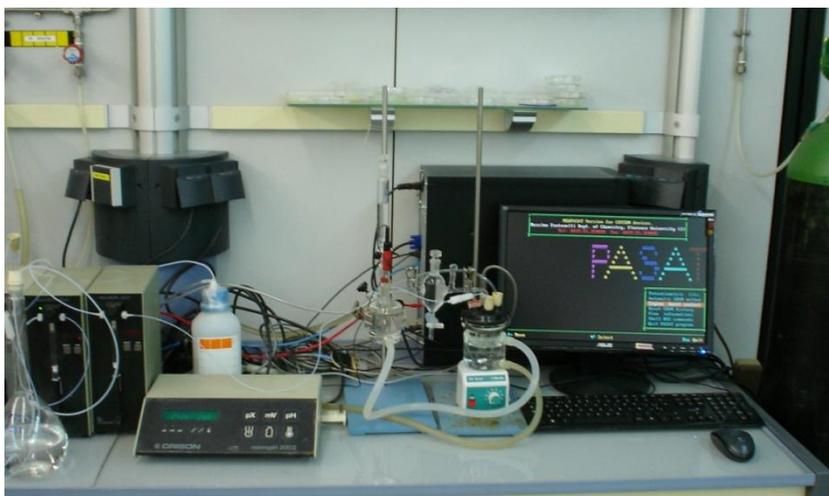


Figura 3.1.- Sistema potenciométrico utilizado

Todas las valoraciones potenciométricas se realizaron a temperatura constante de 298.1 ± 0.1 K. La fuerza iónica del medio se mantuvo constante en todo momento. Las medidas se realizaron con agitación continua y bajo atmósfera inerte de argón, de la que previamente se habrán eliminado las posibles trazas de CO_2 y O_2 pasando el gas por un tren de lavado compuesto por varios frascos, donde el primero contiene una disolución de Cr^{+2} que capta las posibles trazas de O_2 , y el segundo frasco contiene una disolución de sosa concentrada que absorbe las posibles trazas de CO_2 . Además, entre cada uno de estos frascos se coloca otro vacío para evitar mezclas de disoluciones por

sobrepresiones en el sistema en el momento de abrir o cerrar el gas. El contacto entre la disolución problema y el puente salino se realizó mediante un capilar en forma de J para evitar flujos gravitacionales (figura 3.1).

Una descripción más detallada de cada uno de los componentes se puede obtener de la siguiente tabla:

Tabla 3.1.- Descripción de los componentes de sistema potenciométrico.

<i>Potenciómetro (pH-metro)</i>	<i>Crison micropH 2002.</i>
<i>Bureta automática</i>	<i>Crison.</i>
<i>Ordenador personal</i>	<i>PC Pentium Dual-Core E5300.</i>
<i>Electrodo de vidrio</i>	<i>Orión mod. 91-01.</i>
<i>Electrodo de referencia</i>	<i>Ag/AgCl en NaCl 0.5 mol·dm⁻³ Modelo Ingold.</i>
<i>Puente salino tipo Wilhelm</i>	<i>NaCl 0.5 mol·dm⁻³.</i>
<i>Celda termostata</i>	<i>Vaso de vidrio pyrex (Ingold) con camisa termostata y volumen aproximado de 70 cm³.</i>
<i>Termostato</i>	<i>Frigiterm-30 JP Selecta.</i>
<i>Agitador magnético</i>	<i>Crison microstirrer 2038.</i>

3.1.2.- Adquisición de datos

Normalmente, los procedimientos de valoración potenciométrica implican una medida de la concentración de iones hidrógeno o de otro ión metálico mediante un electrodo selectivo, además de la medida del volumen de valorante añadido. El programa PASAT¹ está diseñado específicamente para la adquisición de datos potenciométricos. Este programa crea un archivo de salida secuencial ASCII que contiene los valores del volumen (mL) de valorante añadido y la medida del potencial (mV) de respuesta. Este archivo de salida es adecuado para su utilización directa con el programa HYPERQUAD,² que se emplea para calcular las constantes de equilibrio del sistema en estudio. Por último, con el programa HYSS³ se obtienen los diagramas de distribución para las distintas especies formadas.

Cuando se inicia la valoración, el sistema realiza dos funciones: añadir un volumen prefijado de valorante y leer el valor de potencial cuando se alcanza la estabilidad. Tras añadir un volumen de base, adquiere 10 datos diferentes de potencial, la desviación estándar y la deriva de los cuales viene fijada por el operario. En nuestro caso, la desviación estándar no puede ser superior a 0,05 y la deriva no debe ser mayor de 0,05. Si este conjunto de datos cumple los requisitos mencionados, se obtiene la media y esa será la lectura del potencial en mV.

Las distintas curvas de valoración de cada sistema constan de un determinado número de puntos experimentales; se necesita un mínimo de 10 puntos por constante del sistema, abarcando un intervalo de pH entre 2.0 y 11.0 y a distintas concentraciones de las especies de interés, para el ligando y anión entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $5 \cdot 10^{-3}$ M y, para el metal, entre $1 \cdot 10^{-3}$ y $1.5 \cdot 10^{-2}$ M. Estas curvas se tratan mediante el programa HYPERQUAD² considerando tales curvas como medidas individuales o medidas conjuntas, las desviaciones significativas de las constantes obtenidas deben de ser mínimas por ambos procedimientos.

3.1.3.- Medida de la concentración de iones hidrógeno

Para determinar las constantes de estabilidad de un sistema en equilibrio, es necesario conocer las concentraciones en el equilibrio de todas las especies presentes en la disolución, pero esto no es posible. Sin embargo, se puede relacionar la concentración de uno de los componentes con las constantes de estabilidad y las concentraciones iniciales del sistema. Por lo que, en principio, la medida de la variación de tan sólo una especie con la composición total de la disolución permite obtener los valores de las constantes de estabilidad. Esta medida se puede hacer midiendo la diferencia de potencial entre un electrodo de referencia de potencial conocido y otro electrodo cuyo potencial sea función de la concentración de la especie correspondiente. De este modo, al utilizar la potenciometría, se obtiene una relación directa con la concentración evitando así el molesto cálculo de coeficientes de actividad por el método de Debye-Hückel.

En disolución acuosa, en aquellos sistemas donde existan especies protonables, como los ligandos empleados en este trabajo, se mide la concentración de los iones hidrógeno H^+ con un electrodo de vidrio. Se utiliza la ecuación de Nernst que relaciona la concentración de los iones hidrógeno de la disolución con el potencial medido.

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln[H^+]$$

Para poder utilizar esta expresión, ha de conocerse el valor de $E^{0'}$ para cada experiencia concreta a la misma fuerza iónica que la experiencia en la que se vaya a realizar el estudio potenciométrico correspondiente. Dado que no es un término totalmente constante, sino que es la suma de potenciales variables con el tiempo:

$$E^{0'} = E^0 + E_J + E_{\text{ass}}$$

Donde E^0 es el potencial formal, E_J es el potencial de unión líquida que está relacionado con la concentración de iones H^+ , por lo que las valoraciones

potenciométricas se suelen realizar siempre a valores de pH superiores a 2.0, porque por debajo de este pH este término empieza a tener peso significativo y deja de ser constante, y por E_{ass} que es el potencial de asimetría y que varía con el tiempo.

El calibrado del electrodo se realiza efectuando medidas de potencial de distintas disoluciones cuya concentración de iones hidrógeno es conocida. La mejor manera de hacerlo es mediante una valoración de un ácido fuerte de concentración conocida con una base fuerte de la que no es necesario conocer la concentración exacta ya que se puede determinar de la propia valoración. El programa se basa en el método GRAN⁴ y con él, se obtiene el valor de E^0 y el valor del producto iónico del disolvente (pK_w).

Antes de cada estudio potenciométrico deben realizarse estas calibraciones, ya que para poder realizar los estudios potenciométricos de los sistemas, el error entre diferentes calibrados en las mismas condiciones debe ser inferior al 1%, así se obtiene un potencial constante. Valores superiores indican anomalías tales como inestabilidad en las lecturas potenciométricas o carbonatación de la base entre otras, que deben ser analizadas y resueltas antes de continuar con los estudios.

3.1.4.- Programa HYPERQUAD

Como se ha mencionado anteriormente, con el programa HYPERQUAD² se obtienen las constantes de equilibrio del sistema a estudiar. Este programa tiene unos supuestos básicos necesarios para su correcto funcionamiento:

- 1) Para cada especie en disolución hay una constante de equilibrio, la constante de formación, la cual se expresa como un cociente de concentraciones.
- 2) Cada electrodo exhibe un comportamiento de acuerdo con la ecuación de Nernst.

3) Los errores sistemáticos deben ser minimizados realizando un cuidadoso trabajo experimental. Las fuentes de error sistemático pueden ser la calibración del electrodo, la preparación de las disoluciones, la estandarización de los agentes valorantes y la temperatura.

4) La variable independiente, el volumen de valorante añadido, no está sujeta a error. Los errores en la variable independiente y en el potencial obtenido de la lectura del potenciómetro, tienen una distribución normal.

5) Inicialmente debe introducirse un modelo de sistema en equilibrio, con unas aproximaciones para las constantes de formación de cada especie.

El programa se basa en un ajuste no lineal por mínimos cuadrados en el que se minimizan la variable U , que está directamente relacionada con los datos experimentales. Además, incluye el error en la medida de ésta y el volumen de reactivo añadido:

$$U = \sum w_i [E_i(\text{calc}) - E_i(\text{exp})]^2$$

No todos los puntos experimentales tienen el mismo peso estadístico, w_i , sino que se les asigna un peso inversamente proporcional al parámetro σ_i^2 que se define como:

$$\sigma_i^2 = \sigma_v^2 + \left(\frac{\partial E_i}{\partial v}\right)^2 \cdot \sigma_v^2$$

Donde σ_0^2 y σ_v^2 son las varianzas estimadas del volumen de reactivo añadido y de la lectura del potenciómetro, y $\left(\frac{\partial E_i}{\partial v}\right)$ es la pendiente de la curva de valoración.

Los puntos próximos a un salto de potencial, aumentan el valor de σ_i^2 , lo que hace que a estos puntos se les atribuya un menor peso estadístico. En la zona

tamponada, las variaciones del potencial son suaves, así que el valor de σ_i^2 es pequeño; por lo que estos puntos tendrán un peso estadístico mayor y serán más importantes en el refinamiento global.

El potencial calculado $E_i(calc.)$ se obtiene a partir del potencial experimental $E_i(exp)$ y de las constantes de los distintos equilibrios que intervienen, de manera que el valor de potencial teórico debe hacer mínima la función U. En principio, no existen criterios fijos para eliminar especies del modelo inicial. Normalmente, si una constante es negativa o su desviación estándar es superior a un 33% del valor de dicha constante, se puede eliminar e iniciar un nuevo refinamiento. Se pueden refinar también otros parámetros como la concentración inicial de valorante, las cantidades iniciales de reactivo o el potencial estándar del electrodo. Sin embargo, estos parámetros, llamados peligrosos, es mejor no cambiarlos ya que pueden inducir a errores en el modelo. La siguiente figura muestra los pasos seguidos en el estudio potenciométrico de formación de complejos del ligando tanto con cationes como con aniones:

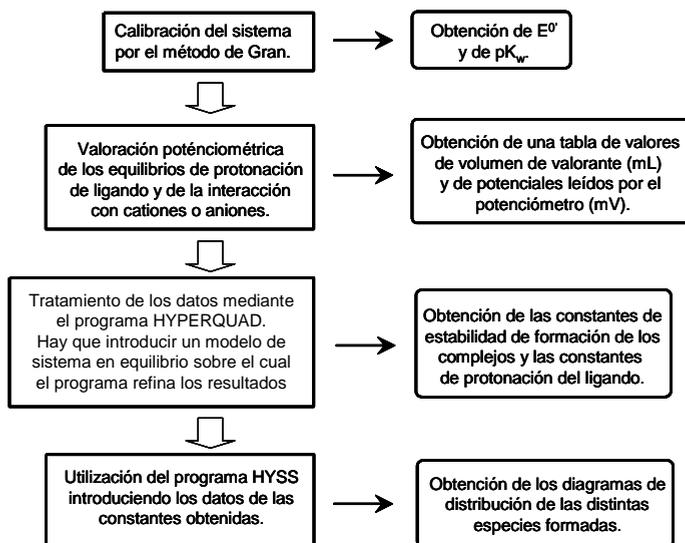


Figura 3.2.- Procedimiento en una valoración potenciométrica

3.2.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de RMN se realizaron a temperatura constante empleando los espectrómetros Avance DRX Bruker 300 MHz, Avance 400 MHz Bruker y Avance 500 MHz Bruker pertenecientes al Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

Los disolventes utilizados son D₂O, *d*₆-DMSO y CDCl₃, empleando las señales de tetrametilsilano (TMS) como referencia estándar en CDCl₃ y *d*₆-DMSO para los espectros de ¹³C y ¹H y las señales de la sal sódica de ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico (TSP) y el H₃PO₄ 85% como referencias para los espectros de ¹³C, ¹H y ³¹P respectivamente en D₂O.

Para ajustar las muestras con D₂O al pH deseado, se emplearon disoluciones stock de DCl o NaOD. El pD se calculó a partir del pD de lectura del pH-metro utilizando la siguiente fórmula.⁵

$$pD_{lectura\ pH-metro} = pD - 0.4$$

3.3.- Espectroscopía UV-Visible

Los espectros de absorción se han realizado utilizando un espectrofotómetro UV Agilent 8453, termostataado a 298.0 ± 0.1 K y empleando como blanco una disolución acuosa 0.15 M de NaCl. Se utilizaron celdas de cuarzo Hellma con 1 cm de camino óptico. El pH se ajustó a los valores requeridos por adición de pequeñas cantidades de HCl y/o NaOH.

3.4.- Espectroscopía de Emisión de Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se han realizado mediante un fluorímetro PTI modular con lámpara de xenón empleando una geometría en ángulo recto. Las celdas utilizadas son de cuarzo Hellma con 1 cm de camino óptico con las cuatro caras transparentes y se encuentran termostatadas a 298.1 ± 0.1 K.

La concentración de las disoluciones se ha ajustado para que la absorción a la longitud de onda de excitación no superase 0.2. Los datos de fluorescencia se han corregido con la absorbancia y con la dilución de volumen necesario para ajustar el pH.

En las valoraciones realizadas sin tampón, el pH se ajusta a los valores requeridos por adición de pequeñas cantidades de HCl y/o NaOH.

3.5.- Punto de Fusión

La determinación de puntos de fusión para la caracterización de los compuestos se llevó a cabo con un Equipo Reider. Los valores se dan sin corregir.

3.6.- Análisis Elemental

El análisis elemental de los compuestos se ha realizado mediante un equipo instrumental Carlo-Elba, modelo EA1108 CHNS-O, perteneciente al Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

3.7.- Espectroscopía de Masas

Los espectros de masas de alta resolución, se han realizado mediante un espectrómetro V. G. Autospec, TRIO 1000 (Fisons). El análisis mediante técnica electrospray (ESI-MS) se ha realizado en un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 3000 (Bruker), perteneciente al Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

3.8.- Estudios Cinéticos.

Los estudios cinéticos llevados a cabo en esta tesis se han realizado en colaboración con el grupo del profesor *Manuel García Basallote* de la Universidad de Cádiz y con el grupo del profesor *Fernando Pina* de la Universidade Nova de Lisboa. Los estudios se han realizado registrando los cambios en los espectros UV-Vis con el tiempo. La absorbancia de una especie se relaciona con su concentración mediante la ley de Lambert-Beer. Por tanto, con la medida de los cambios de absorbancia con el tiempo se obtiene, de forma indirecta, los cambios de concentración con el tiempo, es decir, la velocidad de la reacción. Los instrumentos empleados para dichas medidas son:

Espectrofotómetro de flujo detenido (“stopped-flow”) Applied Photophysics SX-17MV provisto de un detector de fotodiodos PDA.1. El equipo consiste en un espectrofotómetro de haz sencillo acoplado a un sistema de mezcla de reactivos automático que lo hace muy útil para el estudio de reacciones rápidas, ya que el tiempo de mezcla es de 1.7 ms aproximadamente (figura 3.3). Todo el sistema de depósito y mezcla de reactivos, así como la celda de medida, se encuentran dentro de un circuito termostatzado. En el sistema de mezcla hay dos jeringas que actúan de depósito de los reactivos, desde donde cada uno de ellos es impulsado hasta la celda de medida mediante un

pistón conectado a una línea de alta presión. Cuando la mezcla llega hasta la celda de medida, la disolución que se encontraba anteriormente en la celda pasa hasta la jeringa de parada, que es la que activa el detector. Este registra los espectros durante el tiempo seleccionado, siendo posible medir hasta 800 espectros por segundo.

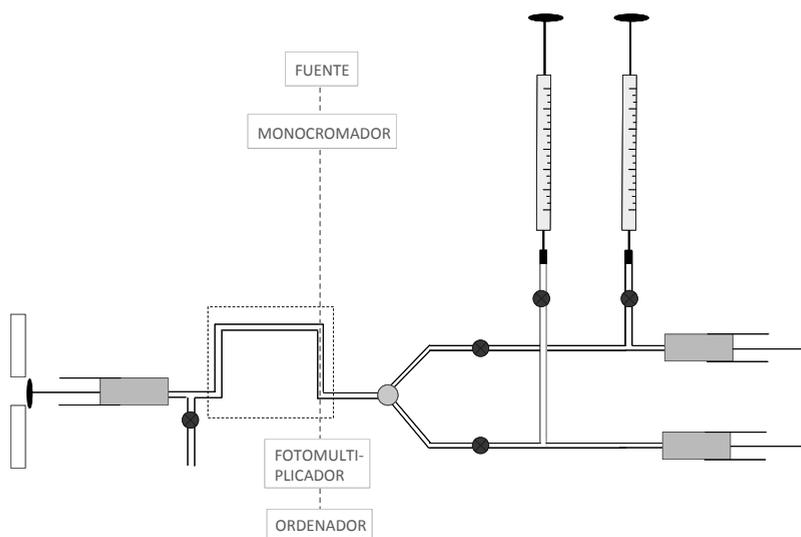


Figura 3.3.- Esquema de un espectrofotómetro de flujo detenido.

Espectrofotómetro UV-Vis Cary 50 Bio equipado con carril multicelda. Este instrumento es un espectrofotómetro convencional UV-Vis cuya peculiaridad es que presenta un carril multicelda, permitiendo que en un experimento se pueda realizar la recogida de datos en varias celdas de forma simultánea. Esto permite analizar en un mismo experimento distintas condiciones de reacción. El equipo se encuentra conectado a un termostato que permite el control de la temperatura. Este instrumento se emplea para

estudiar reacciones con cinética en el orden de los 100 segundos o más lentas, ya que no dispone de mezclador automático.

Tras el registro de los datos en cualquiera de los instrumentos anteriores, se obtiene un fichero con los valores de absorbancia en función del tiempo, para cada longitud de onda del intervalo seleccionado. Estos ficheros son analizados con los programas SPECFIT⁶ y Pro-KII.⁷ Con estos programas es posible ajustar los datos a un modelo cinético propuesto empleando el método de mínimos cuadrados.

3.9.- Difracción de rayos X

Los experimentos de difracción de rayos X de monocristal han sido realizados en los siguientes aparatos:

Enraf Nonius KappaCCD (radiación: generador de rayos X de cátodo rotatorio de molibdeno; detector: CCD con resolución 9 píxeles/mm²; software: Conjunto de programas “*Supergui*” incluyendo las utilidades Collect⁸ para la colección de datos, Denzo para el indexado y SCALEPACK⁹ para integración y escalado),

Gemini Oxford Diffraction (radiación: doble generador de rayos X de cátodo rotatorio de molibdeno o cobre respectivamente; detector: CCD con resolución 11 píxeles/mm²; software: Conjunto de programas “*Crysallis*”¹⁰), pertenecientes al Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

Cada celda unidad se ha determinado a partir de las reflexiones medidas de diez imágenes obtenidas de un ϕ -scan o de ω -scan.

Una vez determinada la celda unidad, se suministra al programa los parámetros de medida deseados (completitud, resolución, redundancia, tiempo de medida, etc.) y la estrategia de medida es calculada.

Con todos los datos medidos, se realiza la integración y escalado. Este paso incluye opcionalmente una corrección de absorción semiempírica realizada por el programa SCALEPACK.⁹

Con los datos integrados y escalados se determina el grupo espacial y se transforman los datos si procede. A continuación, los datos se introducen en cualquiera de los programas SHELXS-86,¹¹ SIR97,¹² Sir2004¹³ o DirDif¹⁴ para obtener una estructura inicial que comenzar a refinar.

Por último, se inicia un proceso iterativo de refinado con el programa SHELXL-97¹⁵ hasta obtener la estructura final. La consistencia de la estructura final es comprobada con la herramienta Checkcif.¹⁶

3.10.- Estudios teóricos

El estudio teórico de la protonación de **L1** y **L2** y su interacción con nucleótidos se realizó en colaboración con el profesor *Roberto Tejero* del Departamento de Química Física de la Universidad de Valencia. El software utilizado fue AMBER8¹⁷ y los potenciales GAFF a 325 K.¹⁸ El proceso de cada simulación se compone de una fase de calentamiento dividida en varios pasos hasta que se alcanza la temperatura de 325 K. Esta fase de calentamiento se compone de 6 pasos, la temperatura se incrementa lentamente durante un periodo de 30 picosegundos más 2 pasos adicionales de 20 picosegundos cada uno, hasta que se alcanza la temperatura final de 325 K. Entonces el sistema está preparado para una fase de producción de 77 nanosegundos entre los cuales las energías y los datos son grabados cada 500 pasos (cada paso es de 0.2 femtosegundos). Los confórmeros de mínima energía se extraen de las trayectorias obtenidas.

3.11.- Estudios de ^1H RMN paramagnética

Los estudios de ^1H RMN paramagnética se realizaron en colaboración con el profesor Hermas Jiménez del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia empleando un espectrómetro Bruker Avance 400. Los espectros monodimensionales se realizaron en D_2O con presaturación de la señal de H_2O . Se utilizaron tiempos de relajación entre 50-400 ms, anchura de bandas entre 30-75 KHz y tiempos de adquisición entre 60-300 ms. Los espectros de ^1H RMN paramagnético se procesaron usando funciones exponenciales de ensanchamiento de señal para suavizarlas con valores de 5-30 Hz. Los desplazamientos químicos se referenciaron a la señal de los protones del D_2O resonando a 4.76 ppm (298 K) relativo al TMS. Las concentraciones de las muestras de ^1H RMN paramagnético son de 2.5-3.0 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Los tiempos de relajación longitudinal de las señales de resonancias hiperfinas se determinaron usando la secuencia de pulso de recuperación invertida (d_1 -180°- τ -90°-acq, donde d_1 es el tiempo de relajación y acq es el tiempo de adquisición), se seleccionaron 15 valores de τ entre 0.4 ms y 500 ms. Los valores de (d_1 +acq) fueron fijados al menos 5 veces mayores que los esperados para T_1 entre un rango de 100 a 800 ms, y el número de escans de 1500. Los valores de T_1 se calcularon de la ecuación de recuperación-inversa. Además, los tiempos de relajación transversal (T_2) se obtuvieron midiendo la anchura de línea de las señales isotrópicas a la mitad de altura a través de la ecuación $T_2^{-1} = \pi \Delta\nu_{1/2}$.

3.12.- Determinación “in vitro” de la actividad SOD mediante el método Oberley-Spitz.

Los ensayos cuantitativos para medir la actividad superóxido dismutasa de los complejos metálicos aquí presentados se han determinado según el método de Oberley y Spitz¹⁹ con mínimas modificaciones. Se sigue la cinética del proceso tomando valores de la absorbancia a 560 nm. Estas medidas han

sido realizadas con un espectrofotómetro Agilent 8453. Los reactivos utilizados para llevar a cabo estos ensayos fueron suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich y Panreac.

Fundamento de la técnica

Para determinar la actividad SOD se ha generado un flujo constante y reproducible de aniones superóxido (O_2^-) mediante el sistema xantina-xantina oxidasa. Como indicador de la presencia de aniones superóxido (O_2^-) se ha utilizado la reducción del azul de tetrazolio (NBT) que fue seguida espectroscópicamente a 560 nm (figura 3.4). El porcentaje de reducción del NBT es utilizado como medida de la actividad SOD.

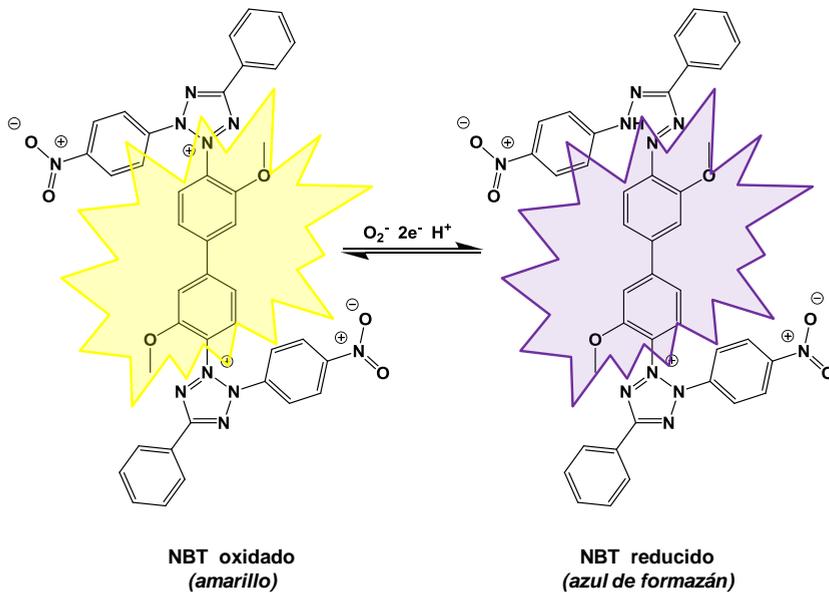


Figura 3.4.- Mecanismo propuesto de reducción del NBT y los colores de cada especie.

Para evitar las interferencias que puedan producirse por las posibles reacciones laterales entre los complejos y el enzima xantina oxidasa, con la consecuente inhibición de esta enzima, se realizaron medidas a 310 nm que nos indican la formación de ácido úrico a partir de la xantina. Las medidas se realizaron en presencia de las mismas concentraciones de complejo ensayadas a 560 nm, pero en este caso se sustituye el NBT por tampón TRIS 50 mM, pH 7.4. El ácido úrico presenta un máximo de absorción a 310 nm con lo cual realizando medidas a esta longitud de onda podemos cuantificar la cantidad de ácido úrico formado (figura 3.5). Si no existe interferencia por reacciones laterales entre la xantina oxidasa y los complejos, el valor de estas medidas será constante a concentraciones crecientes.

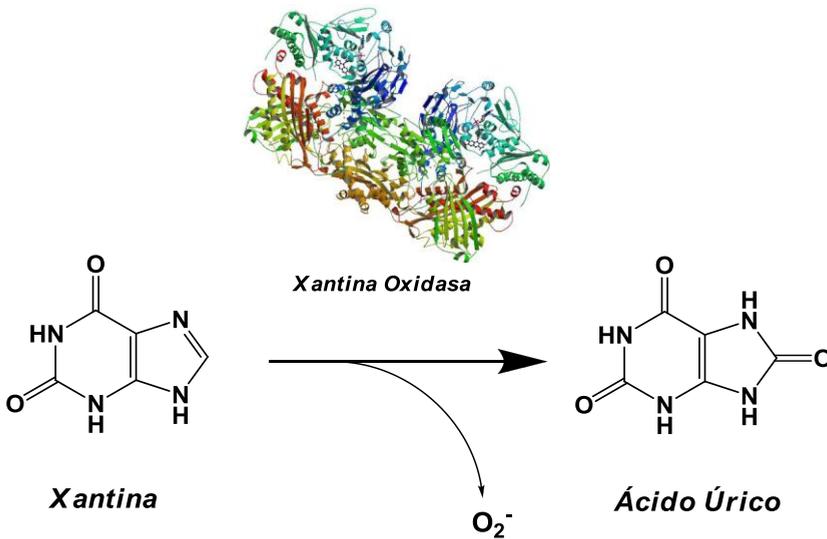


Figura 3.5.- Generación de superóxido mediante el sistema xantina/xantina oxidasa.

Para obtener la actividad SOD debida al complejo, el valor del porcentaje de inhibición del enzima xantina oxidasa se resta al valor del porcentaje de inhibición del NBT:

ACTIVIDAD SOD = % Inhibición NBT - % inhibición X.O.

La actividad SOD viene dada por el parámetro IC_{50} , que es la concentración de complejo que provoca una inhibición de la reducción del NBT del 50%. Este parámetro está relacionado con una constante, k_{cat} , que viene definida mediante la expresión:

$$k_{cat} = K_{NBT} [NBT] / IC_{50} \quad \text{donde } K_{NBT} = 5.94 \cdot 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{Ls}^{-1}$$

Protocolo general

Para la realización del ensayo se prepara una dilución de la enzima xantina oxidasa (X.O.) 1:20 v/v en tampón TRIS 50 mM, pH 7.4. Esta disolución se mantiene en hielo durante la realización del ensayo para evitar la pérdida de actividad de la enzima.

La mezcla de reacción constará de 26,6 mL de tampón HEPES 50 mM, 1 mL de NBT 2.24 mM y 3,4 mL de xantina 1.8 mM (estas dos últimas disoluciones se prepararon en tampón TRIS 50 mM, pH 7.4). La mezcla de reacción se guarda en un frasco de topacio a lo largo del ensayo.

Los compuestos a ensayar fueron disueltos en tampón HEPES. Se prepararon alícuotas de 1 mL con concentraciones crecientes del complejo 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 y 250 μM .

Una vez preparadas las disoluciones se realiza la mezcla de reacción que consiste en 100 μL de la disolución del compuesto (en el caso del blanco será sólo de tampón TRIS), 100 μL de la disolución de xantina oxidasa y 800 μL de la mezcla de reacción. Las medidas se realizan por triplicado.

3.13.- Metodología aplicable para determinar la interacción de los ligandos con polinucleótidos

Existen numerosas técnicas para determinar y cuantificar la interacción de pequeñas moléculas con polinucleótidos, a continuación se incluyen las utilizadas en el presente trabajo.

3.13.1.- Espectroscopia de UV-Vis y fluorescencia

Un compuesto, al unirse al polinucleótido, modifica su espectro de absorción ya que sufre modificaciones en su estructura electrónica. En el espectro de absorción se producen desplazamientos en los máximos con respecto al compuesto libre. Generalmente la interacción con polinucleótidos produce un desplazamiento a longitudes de onda mayores (efecto batocrómico), junto con una disminución de los coeficientes de extinción molar (efecto hipocrómico). Estos cambios espectrales permiten conocer aspectos como la estequiometría del complejo compuesto-polinucleótido y el tamaño del sitio de unión. En un equilibrio químico, en el que sólo una especie absorbe, aplicando la ley de Lambert-Beer, se puede determinar la constante de equilibrio midiendo la absorbancia como una función de la concentración, eso sí, la relación entre la absorbancia y la concentración debe ser lineal en los rangos de concentración utilizados en el ensayo. Se puede conocer el número de sitios de unión realizando estudios de equilibrio de unión y utilizando métodos de valoración. Esta valoración consiste experimentalmente en el cambio progresivo de las bandas de absorbancia de un compuesto tras la adición de polinucleótido. La adición de la disolución de polinucleótido a la disolución del compuesto da lugar a un cambio en la absorbancia que depende del comportamiento óptico del compuesto analizado.

La medida de la absorbancia (A) a cualquier longitud de onda, es un sumatorio entre la absorbancia debida a la forma libre y a la forma unida, como se puede ver en la siguiente ecuación:

$$A = A_l + A_u = \varepsilon_l \cdot C_l + \varepsilon_u \cdot C_u$$

Donde C es la concentración de ligando conocida ($C_{\text{libre}} + C_{\text{unido}}$), y ε es el coeficiente de extinción molar de cada especie. El análisis de la interacción requiere la determinación de C_l y por tanto, la cantidad r de ligando unido por unidad de polinucleótido. La determinación de C_u requiere una extrapolación a altas concentraciones de polinucleótido añadido, para asegurarnos que todo el ligando esté unido, pero con la precaución de que el exceso de polinucleótido no cause un incremento de absorbancia más allá del punto de saturación.

De la misma forma, si el compuesto posee fluorescencia intrínseca se pueden realizar los mismos ensayos que por absorción para determinar la constante de equilibrio y la estequiometría de la unión.

En las valoraciones de fluorescencia se excita a una longitud de onda donde absorbe el ligandos pero, en cambio, no absorbe el polinucleótido y se registran los cambios en la emisión de fluorescencia. Las valoraciones se realizaron adicionando el polinucleótido al ligando en una cubeta de 1 ml tamponada con un tiempo de espera de 90 s para que se alcance el equilibrio. El procesado de los datos de la valoración con un enorme exceso de sitios coordinantes ($r < 0.1$) se utiliza la ecuación de Scatchard²⁰ y el modelo propuesto por Slama-Schwok y Lehn²¹ dio las constantes de afinidad (K_s) y la relación [compuesto enlazado]/[polinucleótido fosfato] (n). Los valores de K_s y n tienen un coeficiente de correlación > 0.999 .

Del mismo modo que se pueden aplicar ensayos de desplazamiento con indicador para obtener una constante de asociación.

3.13.2.- Ensayos de desplazamiento con bromuro de etidio

Los ensayos de desplazamiento con bromuro de etidio (EtBr) se realizaron en un espectrofluorímetro Varian Eclipse con cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico. El EtBr se añade a una disolución de polinucleótido en relación $[\text{EtBr}]/[\text{polinucleótido}] = 0.1$, y se mide la disminución de la emisión de la fluorescencia del complejo EtBr-polinucleótido ($\lambda_{\text{exc}} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 550\text{-}700 \text{ nm}$) en función de la relación de $c(\text{EtBr})/c(\text{compuesto})$. Los valores de IC_{50} muestran la relación $c(\text{EtBr})/c(\text{compuesto}) = [\text{Int}(\text{EtBr/polinucleótido}) - \text{Int}(\text{EtBr libre})]/2$, donde $\text{Int}(\text{EtBr/polinucleótido})$ es la intensidad de fluorescencia del complejo de EtBr/polinucleótido y $\text{Int}(\text{EtBr libre})$ es la intensidad de fluorescencia del EtBr libre antes de añadir el polinucleótido.

3.13.3.- Medidas de la temperatura de fusión, desnaturalizaciones térmicas.

Los polinucleótidos de doble hélice se desnaturalizan a elevadas temperaturas, esto significa que sus dos hebras se separan por rotura de los enlaces de hidrogeno que las unen. A la temperatura que ocurre el fenómeno de desnaturalización se le llama temperatura de fusión (T_m). El proceso para determinar la T_m consiste en aumentar la temperatura gradualmente desde 20 °C hasta 97 °C, midiendo la absorbancia de forma permanente a la longitud de onda del máximo de cada polinucleótido. El valor de la absorbancia registrada va aumentando con la temperatura hasta alcanzar un máximo, que corresponde con el estado en que las dos hebras se han separado completamente (figura 3.6).

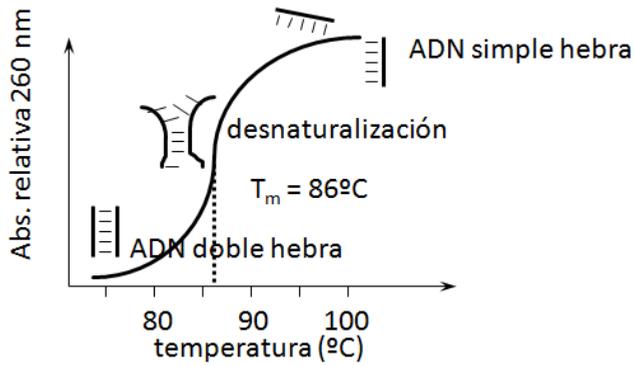


Figura 3.6.- Representación esquemática de una curva de transición térmica mostrando la temperatura de desnaturalización para la doble hebra de ADN.

Cuando se une un compuesto al polinucleótido, esta unión puede estabilizar las dos hebras frente al aumento de la temperatura, elevando así la T_m de dicho segmento o, por el contrario, favorecer la ruptura de los enlaces de hidrogeno disminuyendo su T_m (figura 3.7).

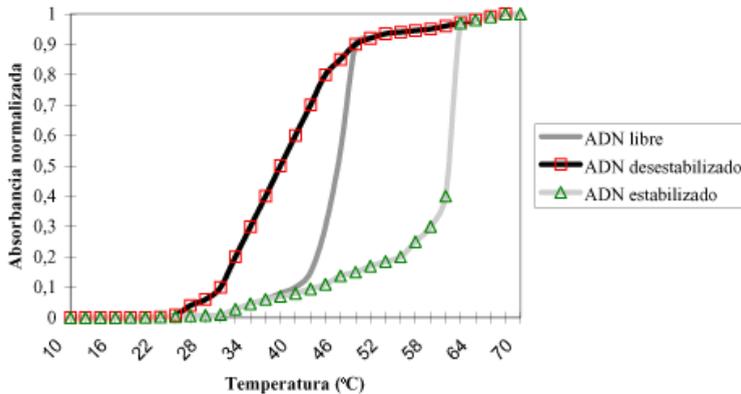


Figura 3.7.- Representación de la curva de transición térmica para el ADN de doble hélice libre (—), el ADN en presencia de un ligando que desestabiliza la doble hélice (□) y el ADN en presencia de un ligando que estabiliza la doble hélice (△).

Las curvas de desnaturalización térmica se realizaron en un espectrofotómetro de UV-Vis Varian Cary 1 Bio conectado a un controlador de temperatura Varian y una interfaz PC. Un termistor se fijo dentro de cada cubeta y se empleo para registrar la temperatura. El ácido nucleico se añade a 1 ml de tampón en microcubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico, y su concentración experimental se determina midiendo la absorbancia a la longitud de onda del máximo del ácido nucleico. Se realizaron las curvas de fusión con diferentes relaciones ligando/ácido nucleico siguiendo el cambio de absorbancia a la longitud de onda del máximo (normalmente 260-270 nm) como función de la temperatura con un gradiente de temperatura de $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La absorbancia del compuesto se sustrajo a cada curva y se normalizó la absorbancia. Los valores de T_m se calcularon como los puntos de inflexión de las curvas de transición, determinados como el máximo de la primera derivada o gráficamente por un método de tangente.²² Los valores de ΔT_m se calcularon sustrayendo T_m del ácido nucleico libre al T_m del complejo. Cada valor se reporta como una media de al menos dos medidas y un error de ΔT_m de $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$.²³

3.13.4.- Dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular se realizaron en un espectrofotómetro de dicroísmo circular JASCO J815 termostatado a $298.0 \pm 0.1\text{ K}$ y empleando como blanco una disolución acuosa del tampón utilizado. Se usaron celdas de cuarzo con 1 cm de camino óptico.

De los métodos disponibles para el análisis de interacciones ligando-ADN en disolución, el dicroísmo circular es uno de los más sencillos porque no requiere mucho material y proporciona información sobre la conformación que no puede ser obtenida por otros métodos. El principio en el que se basa el dicroísmo circular es el siguiente:

Se utilizan pulsos de campo eléctrico para alinear las moléculas de ADN en la dirección del vector del campo eléctrico, este alineamiento molecular se analiza mediante la medida de la absorbancia de la luz polarizada. Cuando se unen moléculas al ADN, si esta unión provoca cambios en la conformación del ADN, su espectro sufrirá cambios en mayor o menor medida.

La dirección y la magnitud del cambio de absorbancia inducido por los pulsos de campo indican la orientación del cromóforo con respecto al eje principal del ADN. Además, las constantes de tiempo del proceso de rotación molecular proporcionan información sobre la dimensión hidrodinámica del complejo. Esta técnica permite también conocer los parámetros eléctricos del complejo.

Si se realiza un experimento a una longitud de onda para la detección en la cual solo absorbe el ligando, no el ADN y tras incubar ambos juntos, no se produce absorbancia, se puede concluir que el ligando se une al ADN y si se repite el experimento a distintas concentraciones se puede utilizar para determinar la constante de unión. Además, la ausencia de absorbancia es porque el ligando unido al ADN se debe orientar preferentemente en dirección perpendicular al eje del ADN.

El dicroísmo circular se utiliza preferentemente en la caracterización de agentes intercalantes y requiere bien de un cromóforo asimétrico o de un cromóforo simétrico en un ambiente asimétrico, como es el caso de la molécula de ADN.

3.14.- Evaluación del efecto antiproliferativo “*in vitro*”.

Los ensayos del efecto antiproliferativo “*in vitro*” de los compuestos **L1** y **L2** se realizaron por la Dr. Marijeta Kralj en el laboratorio de terapia experimental del Ruđer Bošković Institute en Zagreb (Croacia).

Líneas celulares

Los experimentos se llevaron a cabo en 4 líneas celulares humanas, las cuales derivan de 3 tipos de cáncer. Las líneas celulares usadas son: MCF-7 de carcinoma de pecho, H 460 de carcinoma de pulmón y SW 620 y HCT 116, ambos de carcinoma de colon.

Cultivo celular

Las células de MCF-7, H 460, SW 620 y HCT 116 se cultivan como monocapas y se mantienen en un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un suplemento de 10% de suero fetal bovino (FBS), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin en una atmósfera humidificada con 5% CO₂ a 37 °C.

Ensayos de proliferación

Las células de las distintas líneas se inoculan en serie en una microplaca de 96 pocillos con una cantidad desde 1×10^4 hasta 2×10^4 células/mL dependiendo de los tiempos de duplicación de cada línea celular. Los compuestos a evaluar se añaden en varias concentraciones (desde 10^{-8} hasta 10^{-4} M) y se incuban adicionalmente otras 72 horas. Las disoluciones de trabajo se preparan el mismo día del ensayo. El disolvente también se ensaya por una posible actividad de inhibición ajustando su concentración a la misma en concentración de trabajo.

Después de las 72 horas de incubación, la velocidad de crecimiento celular se evalúa mediante el ensayo de MTT, el cual detecta la actividad deshidrogenasa en células viables. El ensayo celular de proliferación MTT es un ensayo colorimétrico, el cual mide la reducción de un compuesto de tetrazolio (MTT) a un producto insoluble de formazán por las mitocondrias reductasas de las células viables.²⁴ Con este propósito, el medio de cultivo se descarta y se añade el MTT a cada pocillo con una concentración de 20

$\mu\text{g}/40\mu\text{L}$. Después de 4 horas de incubación, el precipitado se disuelve en $160 \mu\text{L}$ de DMSO.

La absorbancia o densidad óptica (OD) de cada pocillo se mide en un lector de microplacas a 570 nm. La absorbancia es directamente proporcional a la viabilidad celular.

El porcentaje de crecimiento (PG) de las líneas celulares se calcula de acuerdo a las siguientes expresiones dependiendo de las densidades ópticas:

Si $OD_{\text{test}} - OD_{\text{tcero}} \geq 0$ entonces

$$PG = \frac{100 \times (OD_{\text{test}} - OD_{\text{tcero}})}{(OD_{\text{cntrl}} - OD_{\text{tcero}})}$$

Si $OD_{\text{test}} - OD_{\text{tcero}} < 0$ entonces

$$PG = \frac{100 \times (OD_{\text{test}} - OD_{\text{tcero}})}{OD_{\text{tcero}}}$$

Donde:

OD_{tcero} = la media de la densidad óptica antes de el tratamiento de las células con los compuestos.

OD_{test} = la media de la densidad óptica después del periodo de incubación.

OD_{cntrl} = la media de la densidad óptica después del periodo de incubación sin la exposición de las células a los compuestos.

Cada medida del PG se realiza por cuadruplicado en dos experimentos individuales. Los resultados se expresaron como GI_{50} , que es la

concentración necesaria para la inhibición del 50%, y cada resultado de GI_{50} es una media de los valores obtenidos de dos experimentos por separado.

Cálculos de GI_{50} y LC_{50}

Los valores de GI_{50} miden la inhibición del crecimiento para el compuesto evaluado y representa la concentración que causa una inhibición del 50% en el crecimiento de las células iniciales, mientras que el LC_{50} indica un efecto citotóxico y representa la concentración en la que mueren el 50% del número inicial de células. Los valores de GI_{50} y LC_{50} para cada compuesto se calculan de las curvas de la respuesta de la dosis usando un análisis de regresión lineal mediante el ajuste de las concentraciones de test que dan los valores de PG por encima y debajo del valor de referencia (ejemplo 50 para GI_{50}). Entonces, el valor real para cualquiera de los parámetros utilizados se obtiene si al menos una de las concentraciones ensayadas se encuentran por debajo del respectivo valor de referencia. Sin embargo, si para una línea celular dada todas las concentraciones evaluadas producen unos valores de PG superiores del respectivo nivel de referencia del efecto (por ejemplo el valor de PG de 50), entonces la concentración ensayada más alta se asigna como el valor por defecto.

1 M. Fontanelli y M. Micheloni. *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes*. Peñíscola, Castellón, 1990.

2 A. Sabatini, A. Vacca y P. Gans. *Talanta* 1996, **43**, 1739.

3 P. Gans. *Program to determine the distribution of species in multiequilibria systems from the stability constants and mass balance equations*.

4 a) G. Gran. *Analyst (London)*, 1952, **77**, 661; b) F. J. Rossotti y H. Rossotti. *J. Chem. Educ.*, 1965, **42**, 375.

- 5 A. K. Covington, M. Paabo, R. A. Robinson y R. G. Bates. *Anal. Chem.*, 1968, **40**, 2081.
- 6 R. A. Binstead, B. Jung y A. D. Zuberbühler, *SPECFIT-32*, Vol. Spectrum Software Associates, Chappel Hill, 2000.
- 7 M. Maeder, Y. M. Neuhold, G. Puxty y P. King, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2003, **5**, 2836.
- 8 Collect (Bruker AXS BV, 1997–2004)
- 9 HKL Denzo y Scalepack (Otwinowski & Minor 1997)
- 10 CrysAlisPro versión 171, Oxford Diffraction Ltd.
- 11 G. Sheldrick, C. Kruger y R. Goddard. *Crystallographic Computing*, Claredon Press, 1985, Oxford, England
- 12 A. Altomare, M. Burla, M. Camalli, G. Cascaramo, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, G. Polidori y R. Spagna. *J. Appl. Crystallog.*, 1999, **32**, 115.
- 13 M. Burla, R. Caliendo, M. Camalli, B. Carrozzini, G. Cascaramo, L. Caro, C. Giacovazzo, G. Polidori y R. Spagna. *J. Appl. Crystallog.*, 2005, **38**, 381.
- 14 P. Beurskens, G. Beurskens, R. de Gelder., S. García-Granda, R. Gould y J. Smits, *The DIRDIF2008 program system*, Crystallography Laboratory and University of Nijmegen and The Netherlands, 2008.
- 15 G. Sheldrick *SHELXL-93: Program for Crystal Structure Refinement*, Institut für Anorganische Chemie, University of Gottingen, Gottingen, Germany, 1993.
- 16 Herramienta gratuita ofrecida por la IUCr y disponible *online* en el sitio web <http://checkcif.iucr.org>.
- 17 D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, B. Wang, D. A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C.

- Schafmeister, J. W. Caldwell, W. S. Ross y P. A. Kollman, *AMBER* 8, 2004, University of California, San Francisco
- 18 AFF potentials; J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kolman y D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1157 at 325 K.
- 19 L. W. Oberley y D. R. Spitz *Handbook of methods for oxygen radicals research*, CRC Press, Boca Ratón. 1986.
- 20 a) I. Piantanida, B. S. Palm, M. Zinic y H. –J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2001, 1808; b) M. Maeder y A. D. Zuberbuehler, *Anal. Chem.*, 1990, **62**, 2220; c) H. Gampp, M. Maeder, C. J. Meyer y A. D. Zuberbuehler, *Talanta*, 1985, **32**, 257.
- 21 A. Slama-Schwok y J. –M. Lehn, *Biochemistry*, 1990, **29**, 7895.
- 22 W. D. Wilson, F. A. Tanius, M. Fernandez-Saiz y C. T. Rigl, *Evaluation of Drug/Nucleic acid Interactions by Thermal Melting Curve, from: Methods in Molecular Biology*, Vol. 90: Drug-DNA Interaction Protocols, ed. K. R. Fox, Humana Press Inc., Totowa, N. Y.
- 23 a) B. S. Palm, I. Piantanida, M. Zinic y H. J. Schneider, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2000, 385; b) J. -L. Mergny y L. Lacroix, *Oligonucleotides*, 2003, **13**, 515.
- 24 a) T. Mossman, *Immunol.*, 1983, **65**, 55; b) M. R. Boyd y D. P. Kenneth, *Drug Dev. Res.*, 1995, **34**, 91.



“Nos acercamos a una nueva edad de síntesis. El conocimiento no puede ser solamente un grado ni una habilidad; demanda de una visión más amplia, capacidades de un pensamiento crítico y deducción lógica, sin lo cual no podremos tener un progreso constructivo.”

Li Ka Shing, reputado hombre de negocios entre los más famosos y reconocidos del mundo.

Capítulo 4.- Síntesis y caracterización

4.1.- Procedimientos sintéticos

En la literatura está descrita que la construcción de ligandos politópicos polinucleares es, generalmente, una síntesis compleja que requiere múltiples pasos y con un bajo rendimiento final.^{1,2} En este trabajo se describe la síntesis de ligandos politópicos de tipo poliaza relativamente sencilla y con rendimientos aceptables. La estructura de los ligandos se ha obtenido uniendo covalentemente un fragmento fotoactivo y coordinante, como la fenantrolina, bipyridina, esquaramida o piridina, con una o varias estructuras macrocíclicas poliamínicas. En la figura 4.1 se muestran las estructuras de estos ligandos.

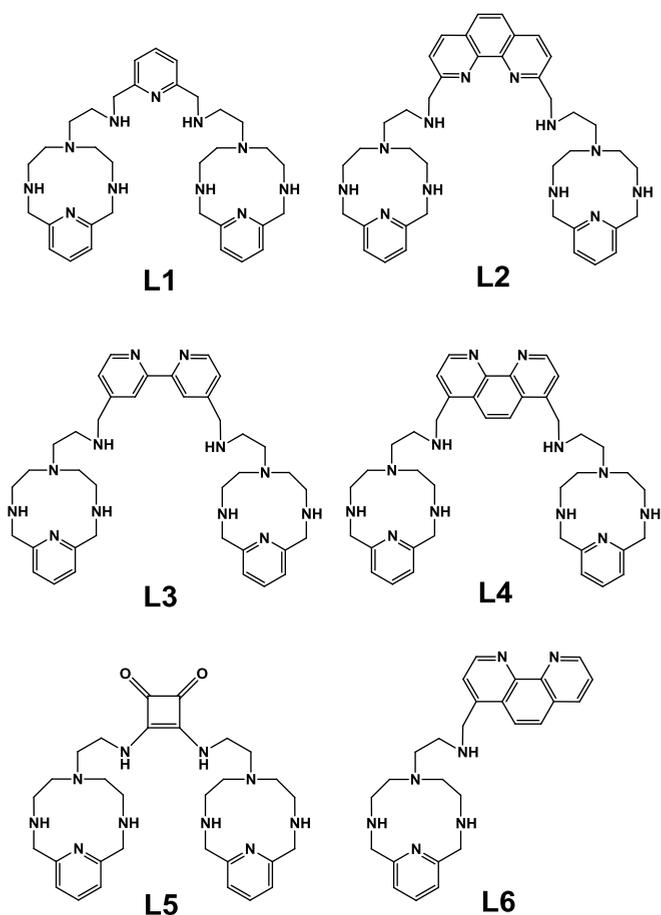


Figura 4.1.- Ligandos sintetizados en la presente tesis.

En el diseño de los ligandos se deben de tener en cuenta las características de las unidades fotoactivas, de la unidad macrocíclica y de su interconexión. Para el caso de la unidad fotoactiva se ha de tener en cuenta su topología, naturaleza y número de los heteroátomos y el tipo de señal emitida (electroquímica, fluorescente, fosforescente, luminosa...) y, con respecto al ligando, su topología, naturaleza y número de los heteroátomos.^{3,4}

En primer lugar, se escogió el ligando tipo escorpiando llamado *pytren* (figura 4.2), como precursor para la familia de ligandos estudiados en esta tesis. Este precursor tiene la habilidad de formar complejos tanto con diferentes metales de transición como con especies aniónicas. Además, el precursor *pytren* tiene cierto grado de flexibilidad estructural que le permite un movimiento molecular⁵ donde puede coordinar de diferente forma a una especie dependiendo del grado de protonación del precursor o del tipo de sustrato.⁶

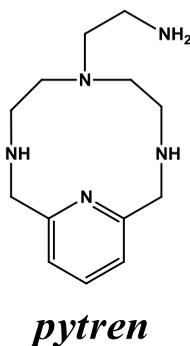


Figura 4.2.- Estructura del precursor escorpiando *pytren*

Se escogieron los ligandos bidentados fenantrolina, bipyridina y esquamida como unidades coordinantes fotoactivas, ya que en sus estructuras se sitúan dos átomos dadores cercanos y favorecen la formación de quelatos y, como última unidad coordinante y fotoactiva, se incluyó la piridina. Los ligandos politópicos **L1**, **L2**, **L3** y **L4** resultan de la unión de dos precursores *pytren* con las unidades fenantrolina y bipyridina mediante puentes metilénicos. Asimismo, el ligando **L5** surge de la conexión de dos precursores *pytren* con la unidad esquamida. Por lo tanto, los ligandos **L1**, **L2**, **L3**, **L4** y **L5** se denominan *dobles escorpiandos*

porque se describen como dos unidades macrocíclicas tipo escorpiando que se conectan a través de una unidad puente. Por último, el ligando **L6** resulta de la unión entre un único precursor *pytren* con una fenantrolina con lo cual se puede denominar de tipo escorpiando.

La primera etapa consiste en la protección de las aminas primarias del *tren* con el grupo tosilo (*p*-toluensulfonilo), que es un grupo protector ampliamente utilizado en síntesis orgánica.⁷ En esta reacción, el grupo que se desea proteger es nucleófilo, que en el caso de las aminas primarias son protonables, por lo cual requiere de la presencia de una base que las mantengan desprotonadas. En el mecanismo de la reacción descrito en la figura 4.3, la amina actúa como nucleófilo desplazando al ión cloruro y formando un enlace sulfonamida.

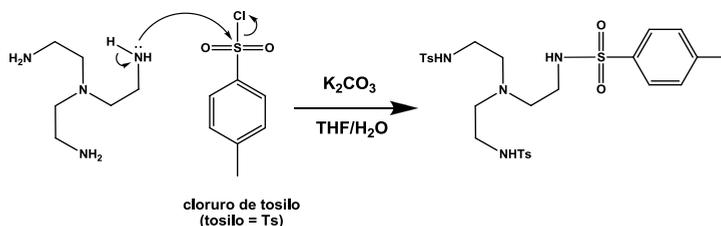


Figura 4.3. Reacción de tosilación del tren.

La segunda etapa se basa en la síntesis propuesta por J. E. Richman y T. J. Atkins,^{8, 9, 10} en la cual se preparan aminas cíclicas reaccionando una poliamina de cadena abierta N-tosilada con un reactivo que posee en los extremos buenos grupos salientes frente a la reacción de sustitución nucleófila (figura 4.4). La presencia de los grupos protectores tosilo anula la reactividad de los grupos amino secundarios de la cadena y activa la desprotonación del grupo funcional amino terminal retirando densidad electrónica de este grupo. Adicionalmente, las aminas tosiladas tienen la propiedad de cristalizar en etanol, lo que las convierte en muy prácticas para su purificación y manipulación. Por último, los voluminosos grupos tosilo actúan como plantilla en la reacción de ciclación, facilitando la conformación adecuada para su síntesis. Cabe mencionar que el método sintético fue mejorado por Richman y Atkins empleando K_2CO_3 como base y CH_3CN como disolvente.

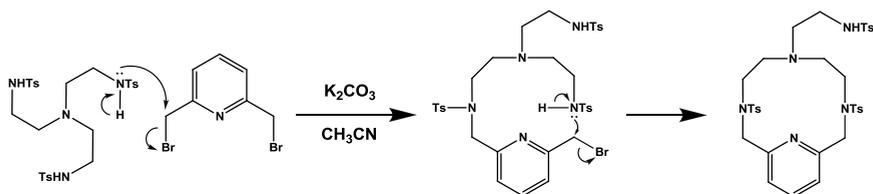


Figura 4.4.- Reacción de ciclación entre la 2,6-bisbromometilpiridina y el trents

La tercera etapa consiste en la desprotección de las aminas tosiladas y convertirlas en aminas primarias empleando condiciones muy energéticas con ácido sulfúrico a 100 °C durante 48 horas. Sin embargo, las condiciones de reacción fueron mejoradas por H. R. Snyder^{11, 12} mediante el empleo de ácido bromhídrico en ácido acético y fenol. Esta reacción tiene un mecanismo radicalario, razón por la cual se introduce fenol como captador de radicales. Con esta etapa se obtiene el precursor *pytren* en forma de su sal de bromhidrato.

Paralelamente a la síntesis del precursor *pytren* se han sintetizado los aldehídos no comerciales de la fenantrolina y bipiridina mediante los métodos propuestos por Le Bozec y Chandler (figura 4.5).

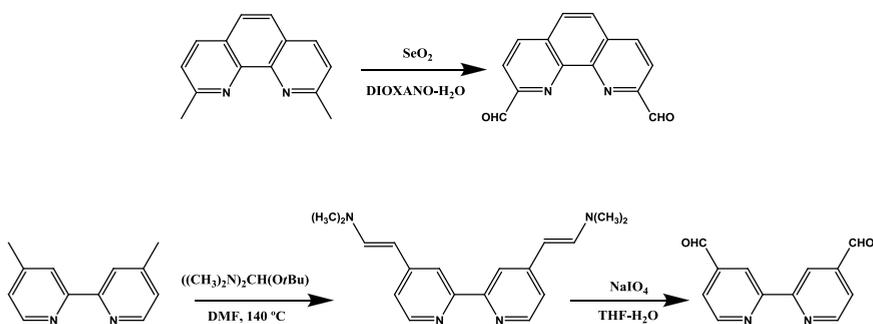


Figura 4.5.- Esquema de síntesis de los aldehídos de la fenantrolina y de la bipiridina.

El método propuesto por Chandler¹³, utiliza el SeO_2 , en dioxano y una cantidad catalítica de agua, para oxidar los grupos metilos de la fenantrolina a grupos carbaldehídos.¹⁴

Para la biperidina se aplica el método propuesto por Le Bozec¹⁵, en el cual forma la 4,4'-dienamina a partir de la 4,4'-dimetilbiperidina usando *tert*-butoxibis(dimetilamino)metano (reactivo de Bredereck)¹⁶ en DMF anhidro. Posteriormente, oxida los grupos enamina mediante periodato sódico en THF.¹⁷

Una vez se ha obtenido el precursor *pytren* con una amina primaria y las unidades coordinantes con carbaldehidos se procedió a la última etapa, que consiste en una condensación de base de Schiff. Esta etapa la describieron los grupos de Remers,¹⁸ Lehn¹⁹ y Nelson²⁰ en 1987, basándose en la condensación de un aldehído con una amina. Este método sintético se realiza en dos pasos y resulta fácil y eficiente, por lo que ha dado lugar a la síntesis de una gran variedad de nuevas poliaminas lineales, criptandos y macrocíclos. En esta etapa final se produce la condensación de la amina primaria del precursor *pytren* con cada uno de los carbaldehidos en una relación molar determinada, para formar la imina que posteriormente se reduce con NaBH₄ obteniéndose la correspondiente amina (figura 4.6). Se utilizan condiciones de alta dilución, reactivos de elevada pureza y en ausencia de agua del medio, ya que competiría como nucleófilo con el intermedio de la reacción, la imina, y el equilibrio se desplazaría hacia los reactivos, obteniéndose una mezcla de reactivos y producto final.

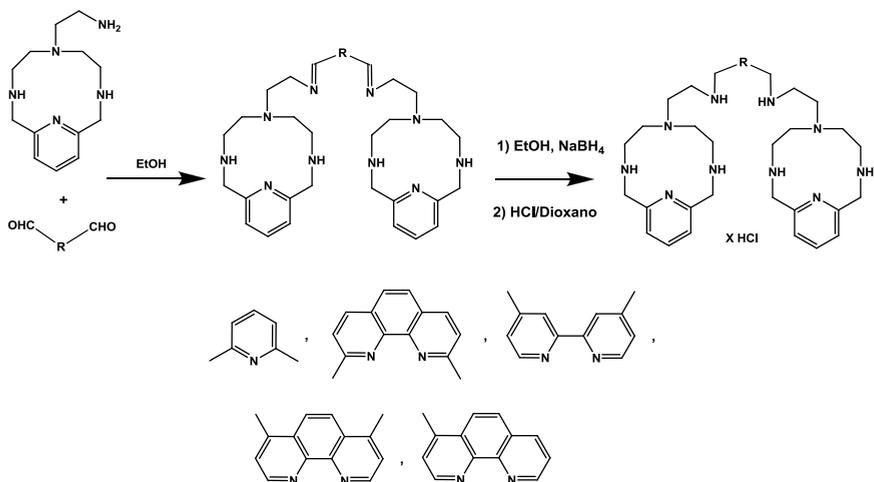


Figura 4.6.- Esquema de síntesis de los receptores politópicos

4.2.-Síntesis del ligando precursor *pytren*

A) Tosilación

En un matraz de fondo redondo de 1000 mL se introduce la poliamina tripodal tris[2-(*N-p*-toluensulfonilaminoetil)]amina (6 g, 41.0 mmol) disuelta en 400 mL de THF y K₂CO₃ (125.1 mmol) disuelto en 100 mL de H₂O. Se adiciona gota a gota durante una hora TsCl (23.46 g, 123.1 mmol) disuelto en 100 mL de THF y se mantiene en agitación durante 24 horas. Se separa la fase orgánica y se concentra en el rotavapor hasta sequedad. El residuo se somete a reflujo de EtOH y el sólido obtenido se filtra y se lava con EtOH.

B) Ciclación

En un matraz de fondo redondo se introduce la poliamina tosilada *P*₁ (5.09 g, 8.37 mmol) junto con K₂CO₃ (11.57 g, 83.72 mmol) en CH₃CN seco (100 mL). Se adiciona lentamente sobre esta suspensión, una disolución de 2,6-bis(bromometil)piridina (2.26 g, 8.37 mmol) en CH₃CN seco (300 mL). La mezcla se somete a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante 24 horas. El sólido obtenido se filtra, lavando con CH₃CN seco caliente y el líquido filtrado se concentra en el rotavapor, obteniéndose un aceite que se somete a un reflujo de etanol para dar un sólido blanco que se filtra.

C) Detosilación

En un matraz de fondo redondo se introduce el receptor tosilado *P*₂ (2.86 g, 4.01 mmol) junto con una mezcla de HBr/HAc (153mL) y PhOH (14.39 g, 153 mmol). Se somete a reflujo a 90 °C durante 20 horas. Se detiene la calefacción y se deja enfriar. El sólido obtenido se filtra y lava con una mezcla de EtOH/CH₂Cl₂ (1:1 v/v) obteniéndose el precursor *pytren* como su sal de bromohidrato.

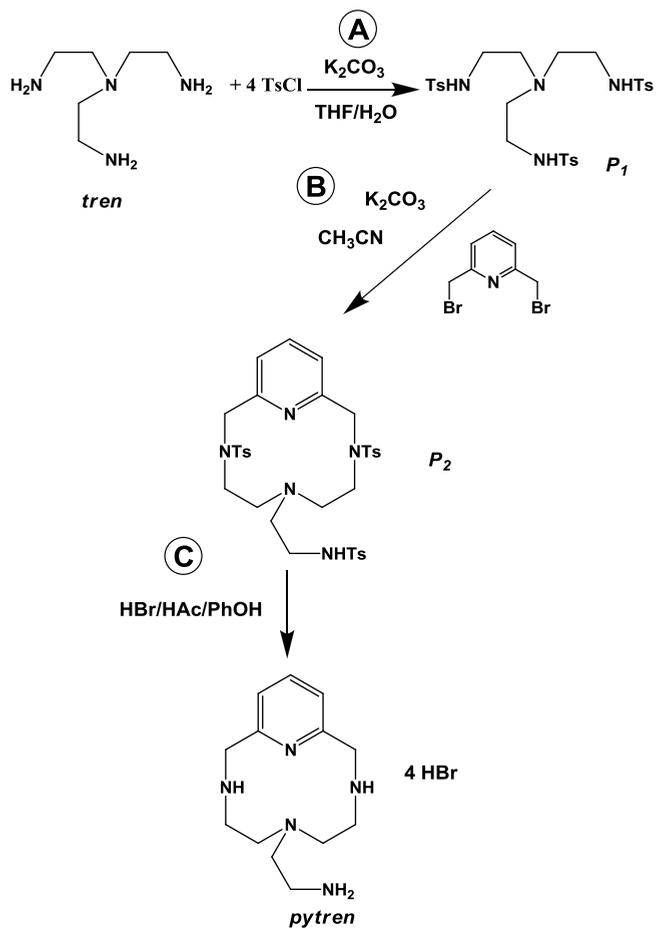
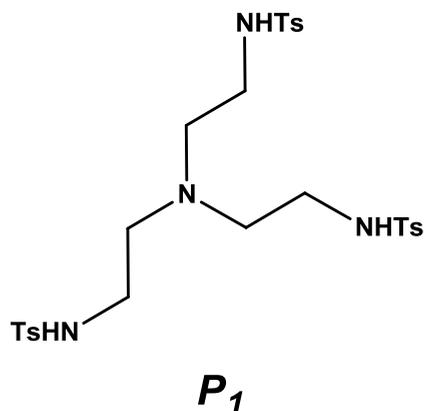


Figura 4.7.- Esquema de síntesis del ligando precursor de tipo escorpiando *pytren*.

Tris[2-(*N*-*p*-toluensulfonilamidoetil)]amina



$C_{27}H_{36}N_4O_6S_3$ (PM = 608.84 g/mol)

Rendimiento: 95 %.

Punto de fusión: 60-62 °C.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{27}H_{36}N_4O_6S_3$: 609 g/mol.

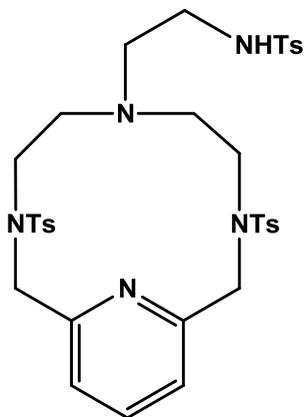
Experimental $[MH]^+$: m/z 609 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$, *J* en Hz):

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.80 (d, *J* = 8 Hz, 6H), 7.00 (d, *J* = 8 Hz, 6H), 5.94 (s, 3H), 2.92 (t, *J* = 6 Hz, 3H), 2.91 (t, *J* = 6 Hz, 3H), 2.47 (t, *J* = 5 Hz, 6H), 2.41 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 143.8, 137.2, 130.2, 127.7, 54.5, 41.2, 21.9.

6-[2-(*p*-Toluensulfonilamidoetil)]-3,6,9-triaza-3,9-*p*-toluensulfonil-1(2,6)-piridinaciclodecafano



***P*₂**

$C_{34}H_{41}N_5O_6S_3$ (PM = 711.22 g/mol)

Rendimiento: 51 %.

Punto de fusión: 151-153 °C.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{34}H_{42}N_5O_6S_3$: 712 g/mol.

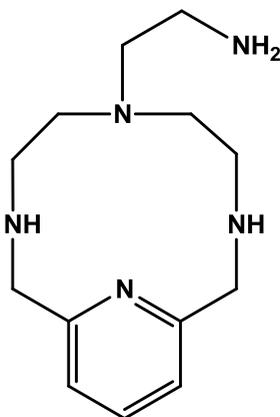
Experimental $[MH]^+$: m/z 711 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$, *J* en Hz):

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.75-7.68 (m, 7H), 7.36-7.28 (m, 8H), 5.05 (t, *J* = 6 Hz, 1H), 4.31 (s, 4H), 3.06 (t, *J* = 7 Hz, 4H), 2.87-2.81 (m, 2H), 2.45 (s, 6H), 2.41 (s, 3H), 2.36 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2.31 (t, *J* = 7 Hz, 4H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 155.5, 144.1, 143.9, 139.2, 137.1, 136.1, 130.2, 127.4, 124.1, 55.1, 54.2, 52.2, 45.9, 40.9, 21.9.

6-(2-Aminoetil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecáfano



pytren

C₁₃H₂₃N₅·4HBr (PM = 572.96 g/mol)

Rendimiento: 85.2 %.

Punto de fusión: 201-203 °C.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para C₁₃H₂₄N₅ 250.4 g/mol.

Experimental [MH]⁺: m/z 250.6 g/mol.

Análisis elemental (C₁₃H₂₃N₅·4HBr):

Teórico: C 27.3%, H 4.7%, N 12.2%.

Experimental: C 27.9%, H 5.1%, N 11.9%.

Espectros RMN (D₂O, J en Hz):

¹H NMR (D₂O, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.95 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8 Hz, 2H), 4.63 (s, 4H), 3.29-3.21 (m, 6H), 3.02 (t, J = 7 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 5 Hz, 4H).

¹³C NMR (D₂O, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 149.2, 140.1, 122.5, 52.3, 50.9, 49.8, 46.2, 35.6, 30.5.

4.3.- Síntesis de los aldehídos de los espaciadores aromáticos

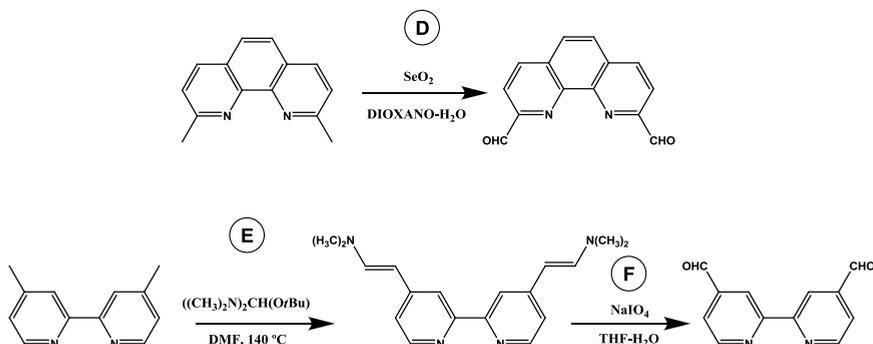


Figura 4.8.- Esquema de síntesis de los aldehídos de la fenantrolina (D) y de la biperidina (E y F).

D) Oxidación con SeO_2

En un matraz de fondo redondo de 250 mL se introduce dimetil-1,10-fenantrolina (2.5 g, 12 mmol) disuelto en 160 mL de dioxano y 7 mL de H_2O . Se mantiene la agitación y se calienta a reflujo. Se adiciona SeO_2 (2.68 g, 25 mmol) y se mantiene a reflujo durante 3 horas. La mezcla se filtra en caliente a través de Celite 521 y la disolución obtenida se concentra en el rotavapor hasta sequedad. El sólido obtenido se cristaliza en THF. En el caso de la 4-metil-1,10-fenantrolina el proceso continua siendo el mismo pero las proporciones varían a 4-metilfenantrolina (2.5 g, 12.87 mmol) y SeO_2 (1.45 g, 13 mmol).

E) Formación de la dienamina con el reactivo de Brederick (*tert*-butoxibis(dimetilamino)metano).

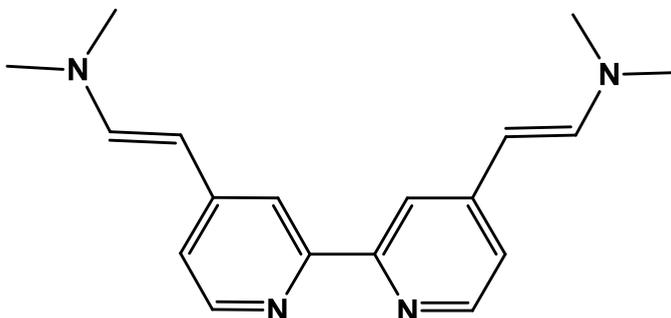
En un balón de fondo redondo de 100 mL bajo atmósfera controlada de argón se introduce la 4,4'-dimetil-2,2'-biperidina (1 g, 5.40 mmol) y DMF recién destilado (7 mL, 0.06 mmol). Se añade el reactivo de Brederick (4.7 mL, 22.6 mmol) y se continua agitando a reflujo durante 18 horas. La disolución se deja enfriar y se añade H_2O (50 mL) y extrae con CH_2Cl_2 (5 x 20 mL). Se seca la fase orgánica

con Na_2SO_4 y eliminando la mayor parte del disolvente, se añade pentano (1 mL) y se precipita con éter.

F) Oxidación de la dienamina con NaIO_4

Se introduce en un matraz de fondo redondo 4,4'-dienamina-2,2'-bipiridina (533 mg, 1.81 mmol) con THF (60 mL). Se añade el NaIO_4 (3.09 g, 14.48 mmol) durante 30 minutos y se agita durante 36 horas. Transcurrido este tiempo se filtra el sólido obtenido y se lava con THF. La fase orgánica se evapora, se añade CH_2Cl_2 (50 mL) y se lava con 3 x 20 mL de H_2O saturada con NaHCO_3 . Se seca la fase orgánica con Na_2SO_4 y se evapora hasta sequedad. El sólido obtenido se purifica en cromatografía de sílica gel (CH_2Cl_2 a ACOEt/ CH_2Cl_2 10 % v/v).

(1E, 1'E)-4,4'-Bis(2-dimetilaminoeten-1-il)-2,2'-bipiridina



$C_{18}H_{22}N_4$ (PM = 294.39 g/mol)

Rendimiento: 91 %.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{18}H_{22}N_4$ 294.39 g/mol.

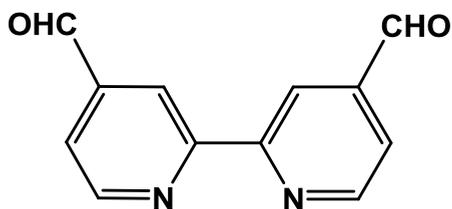
Experimental $[MH]^+$: m/z 295 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$, J en Hz):

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ_H (ppm): 8.28 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 8.05 (d, $J = 1.5$ Hz, 2H), 7.14 (d, $J = 13.6$ Hz, 2H), 6.88 (dd, $J_1 = 5.3$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, 2H), 5.03 (d, $J = 13.7$ Hz, 2H), 2.82 (s, 12H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 155.1, 149.3, 142.9, 124.3, 119.1, 114.2, 99.0, 41.5.

4,4'-Dicarbaldehido-2,2'-bipiridina



$C_{12}H_8N_2O_2$ (PM = 212.20 g/mol)

Rendimiento: 80 %.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{12}H_8N_2O_2$ 212.20 g/mol.

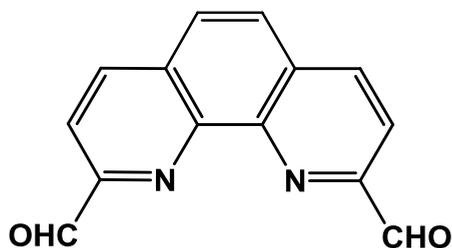
Experimental $[MH]^+$: m/z 213 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$, J en Hz):

1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ_H (ppm): 10.19 (s, 2H), 8.96 (d, $J = 5$ Hz, 2H), 8.90 (dd, $J_1 = 0.9$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 2H), 7.80 (dd, $J_1 = 5$ Hz, $J_2 = 1.5$ Hz, 2H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 192.5, 160.3, 158.0, 150.3, 125.9, 119.3.

2, 9 – Dicarbaldhido – 1, 10 –fenantrolina



$C_{14}H_8N_2O_2$ (PM = 236.23 g/mol)

Rendimiento: 70 %.

Punto de fusión: 157 - 159 °C.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{14}H_8N_2O_2$ 236.23 g/mol.

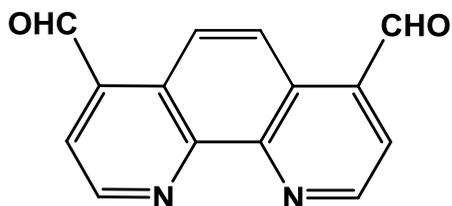
Experimental $[MH]^+$: m/z 237 g/mol.

Espectros RMN (d_6 -DMSO, J en Hz):

1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz), δ_H (ppm): 10.2 (s, 2H), 9.16 (s, 2H), 8.42 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.19 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.55 (s, 2H).

^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 192.0, 158.0, 141.5, 137.0, 128.0, 123.2, 118.0.

4, 7 – Dicarbaldhido – 1, 10 –fenantrolina



$C_{14}H_8N_2O_2$ (PM = 236.23 g/mol)

Rendimiento: 50 %.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{14}H_8N_2O_2$ 236.23 g/mol.

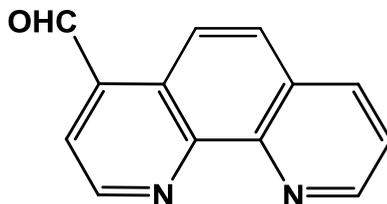
Experimental $[MH]^+$: m/z 237 g/mol.

Espectros RMN (d_6 -DMSO, J en Hz):

1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz), δ_H (ppm): 9.5 (s, 2H), 8.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.21 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.85 (s, 2H).

^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 195.0, 163.2, 143.8, 139.3, 133.0, 125.2, 119.2.

4 – Carbaldehído – 1, 10 –fenantrolina



$C_{13}H_8N_2O$ (PM = 208.22 g/mol)

Rendimiento: 75 %.

Punto de fusión: 227 °C.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{13}H_8N_2O$ 208.22 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 209.3 g/mol.

Espectros RMN (d_6 -DMSO, J en Hz):

1H NMR (d_6 -DMSO, 300 MHz), δ_H (ppm): 9.78 (s, 1H), 8.98 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H), 8.79 (dd, $J = 4.6$ Hz, 1H), 8.02 (dd, $J = 8.2$ Hz, 1H), 7.88 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.47 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H).

^{13}C NMR (d_6 -DMSO, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 149.35, 148.95, 140.31, 139.89, 128.01, 124.28, 122.06.

4.4.- Síntesis de ligandos politópicos

G) Condensación/Reducción

En un matraz de fondo redondo se introduce la amina (1.43 g, 5.73 mmol), obtenida previamente tras pasar la sal clorohidratada del ligando por una columna de intercambio iónico (AMBERLITE IRA-402), disuelta en 150 mL de EtOH seco y se adiciona gota a gota el aldehído del espaciador piridina, fenantrolina o biperidina (2.86 mmol para **L1**, **L2**, **L3** y **L4** y 5.73 mmol para **L6**) disuelto en 50 mL de EtOH seco bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurridas dos horas se añade NaBH₄ (22 mol) y se deja en agitación durante 2 horas. A continuación se elimina el disolvente en el rotavapor y al sólido obtenido se añade H₂O (30 mL) y se extrae con CH₂Cl₂ (4 x 25 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ y se concentra el disolvente hasta sequedad. El crudo obtenido se disuelve en la cantidad mínima de CH₂Cl₂ y se precipita con HCl en dioxano obteniéndose el clorhidrato del producto.

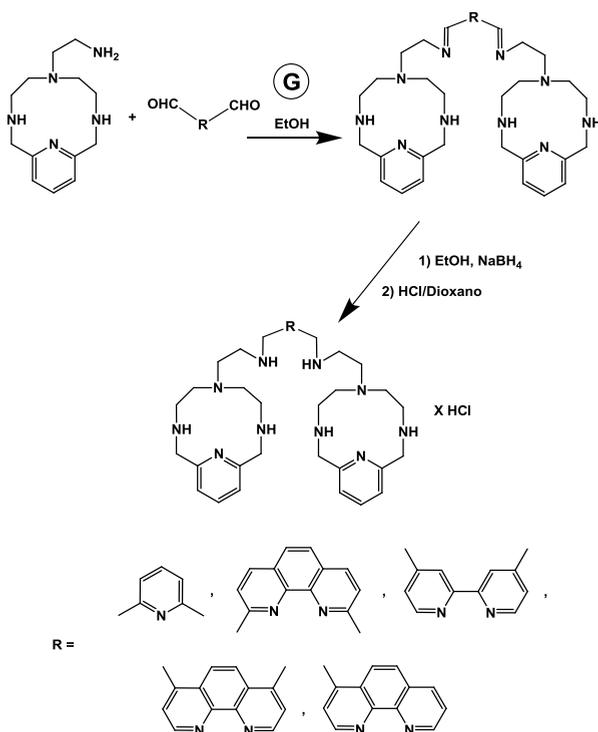
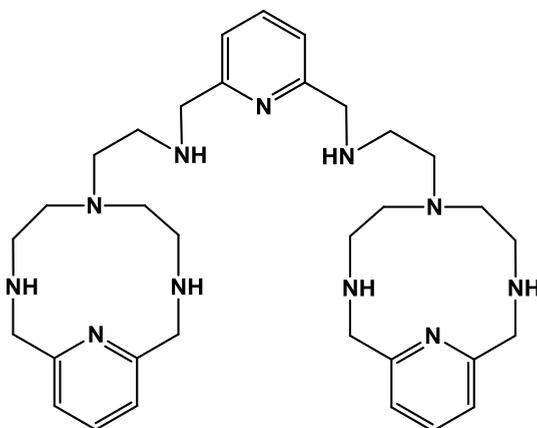


Figura 4.9.- Esquema de síntesis de los receptores politópicos **L1**, **L2**, **L3**, **L4** y **L6**

2,6-Bis[4-(3,6,9-triazo-1(2,6)piridinaciclodecapan-6-il)-2-azabutil]piridina



L1

$C_{33}H_{51}N_{11} \cdot 6HCl$

Rendimiento: 63 %.

Punto de fusión: >345 °C.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{33}H_{51}N_{11}$: 601 g/mol.

Experimental $[M]^+$: m/z 601 g/mol.

Análisis elemental ($C_{33}H_{51}N_{11} \cdot 6HCl$):

Teórico: C 44.6%, H 7.3%, N 17.3%.

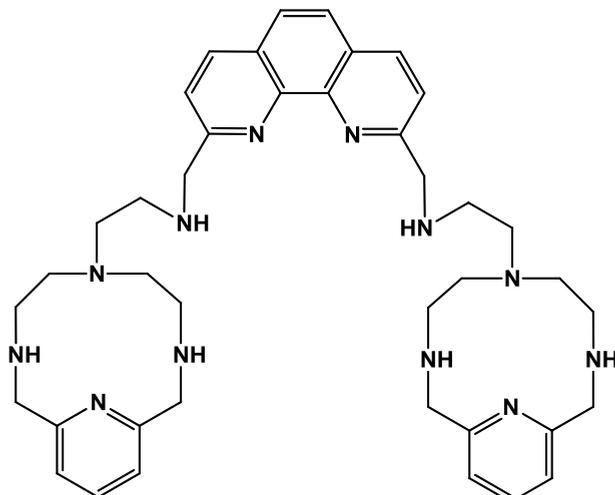
Experimental: C 44.6%, H 7.7%, N 16.5%.

Espectros RMN (D_2O , J en Hz):

1H NMR (D_2O , 300 MHz), δ_H (ppm): 7.64 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 7.63 (t, 1H), 8.03 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.18 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.13 (d, $J = 8$ Hz, 4H), 4.32 (s, 8H), 4.18 (s, 4H), 3.16-3.11 (m, 4H), 2.96-2.85 (m, 12H), 2.65-2.62 (m, 8H).

^{13}C NMR (D_2O , 75.43 MHz), δ_C (ppm): 140.1, 139.7, 123.5, 122.5, 51.4, 51.2, 50.9, 49.8, 46.3, 43.5.

2,9-Bis[4-(3,6,9-triazo-1(2,6)piridinaciclodecapan-6-il)-2-azabutil]-1,10-fenantrolina



L2

$C_{40}H_{54}N_{12} \cdot 6HCl$ (PM = 915.69 g/mol)

Rendimiento: 51 %.

Punto de fusión: 223-225 °C.

Análisis elemental ($C_{40}H_{54}N_{12} \cdot 6HCl$):

Teórico: C 52.5%, H 5.9%, N 18.4%.

Experimental: C 52.8%, H 8.0%, N 18.2%.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para $C_{40}H_{54}N_{12}$: 703 g/mol.

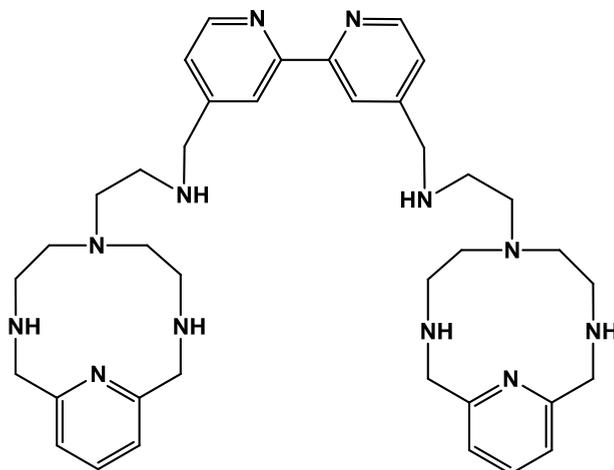
Experimental $[MH]^+$: m/z 704 g/mol.

Espectros RMN (D_2O , J en Hz):

1H NMR (D_2O , 300 MHz), δ_H (ppm): 8.73 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 8.12 (s, 2H), 8.03 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.95 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 7.44 (d, $J = 7$ Hz, 4H), 4.87 (s, 4H), 4.62 (s, 8H), 3.60-3.53 (m, 4H), 3.31-3.20 (m, 12H), 3.00-2.90 (m, 8H).

^{13}C NMR (D_2O , 75.43 MHz), δ_C (ppm): 150.6, 149.0, 141.7, 141.3, 139.9, 129.8, 127.8, 124.6, 122.3, 51.4, 51.2, 50.8, 49.6, 46.1, 43.8.

4,4'-Bis[4-(3,6,9-triazo-1(2,6)piridinaciclodecafan-6-il)-2-azabutil]-2,2'-bipiridina



L3

Rendimiento: 75 %.

Punto de fusión: >345 °C.

Análisis elemental (C₃₈H₅₄N₁₂·8HCl·9H₂O):

Teórico: C 40.3%, H 7.1%, N 14.8%.

Experimental: C 40.4%, H 7.3%, N 14.9%.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para C₃₈H₅₄N₁₂: 679 g/mol.

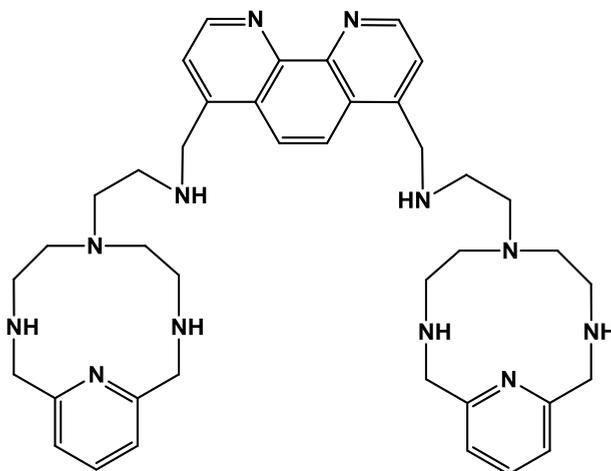
Experimental [MH]⁺: m/z 680 g/mol.

Espectros RMN (D₂O, J en Hz):

¹H NMR (D₂O, 300 MHz), δ_H (ppm): 8.88 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 8.55 (s, 2H), 7.94 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 7.92 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 8 Hz, 4H), 4.60 (s, 4H), 4.59 (s, 8H), 3.47 (t, J = 8 Hz, 4H), 3.26 (t, J = 5.3 Hz, 8H), 3.13 (t, J = 8 Hz, 4H), 2.92 (t, J = 5.3 Hz, 8H).

¹³C NMR (D₂O, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 149.4, 148.9, 147.7, 146.1, 139.8, 127.0, 124.3, 122.2, 50.8, 50.5, 50.0, 49.5, 45.9, 43.9.

4,7-Bis[4-(3,6,9-triazo-1(2,6)piridinaciclodecapan-6-il)-2-azabutil]-1,10-fenantrolina



L4

Rendimiento: 42 %.

Análisis elemental (C₄₀H₅₄N₁₂·9HCl·12H₂O):

Teórico: C 38.5%, H 7.0%, N 13.4%.

Experimental: C 38.3%, H 6.3%, N 12.4%.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para C₄₀H₅₄N₁₂: 703 g/mol.

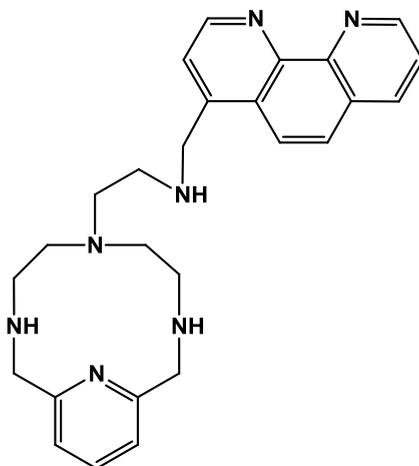
Experimental [MH]⁺: m/z 704 g/mol.

Espectros RMN (D₂O, J en Hz):

¹H NMR (D₂O, 300 MHz), δ_H (ppm): 9.27 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 8.51 (s, 2H), 8.25 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 7.90 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 7.39 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 5.11 (s, 4H), 4.58 (s, 8H), 3.60 (t, J = 8.1 Hz, 4H), 3.22 (m, 8H), 3.17 (t, J = 8.1 Hz, 4H), 2.93 (t, J = 5.2 Hz, 8H).

¹³C NMR (D₂O, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 148.9, 139.9, 127.7, 122.3, 112.9, 50.5, 49.9, 46.0, 44.3.

6-(4-Fenantrolil-3-azabutil)-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecafano



L6

Rendimiento: 75 %.

Punto de fusión: >345 °C.

Análisis elemental (C₂₆H₃₁N₇·4HCl·6H₂O):

Teórico: C 44.9%, H 6.8%, N 14.1%.

Experimental: C 44.6%, H 7.0%, N 14.5%.

Espectroscopía de masas (F. A. B.):

Calculado para C₂₆H₃₁N₇: 441.6 g/mol.

Experimental [MH]⁺: m/z 443.0 g/mol.

Espectros RMN (D₂O, J en Hz):

¹H NMR (D₂O, 300 MHz), δ_H (ppm): 8.69 (d, J = 5 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 4 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.86 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 4 Hz, 1H), 7.58 (dd, J₁ = 8 Hz, J₂ = 5 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8 Hz, 2H), 7.33 (d, J = 8 Hz, 1H), 4.62 (s, 2H), 4.55 (s, 4H), 3.44 (t, J = 7 Hz, 2H), 3.26-3.18 (m, 4H), 3.09 (t, J = 7 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 5 Hz, 4H).

¹³C NMR (D₂O, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 149.35, 148.95, 147.59, 141.41, 140.31, 139.89, 139.65, 128.01, 126.03, 124.28, 122.06, 121.56, 51.01, 50.56, 49.57, 46.82, 45.94, 44.18.

4.5.- Síntesis del ligando L5

El ligando **L5** se sintetizó en colaboración con el grupo del profesor Antoni Costa en la *Universitat de les Illes Balears*. En primer lugar, se intentó la condensación directa del escorpiando *pytren* con dietil esquarato pero se producía una mezcla compleja de derivados esquaramidinicos. Los rendimientos del producto final **L5** eran muy bajos (<10%) debido a la condensación de las aminas primaria y secundarias del precursor *pytren* con el dietil esquarato y a la dificultad de su posterior purificación. Se obtuvieron mejores rendimientos para la síntesis de **L5** con la preparación del precursor *pytren* con las aminas de la cavidad macrocíclica protegidas con grupos Boc, haciéndolos reaccionar con el dietil esquarato y, finalmente, retirándole los grupos Boc.

El precursor *pytren* Boc protegido se prepara a escala de gramo a través de una secuencia de pasos con protecciones y desprotecciones selectivas de los grupos amino del tren. En las tres primeras etapas se prepara el tren protegido con dos grupos tosilos y uno ftalamida mediante una modificación de los procedimientos descritos en la literatura.²¹ La cuarta etapa consiste en la condensación del tren protegido con 2,6-bis(bromometil)piridina mediante el procedimiento de Richman y Atkins descrito para el *pytren*. Tras esta etapa, la suceden tres donde se sustituyen los grupos tosilo por Boc a través del método de Snyder y se retira la ftalamida mediante la utilización de hidracina. Finalmente, las dos últimas etapas consisten en la condensación del precursor *pytren* con las aminas de la cavidad macrocíclica protegidas con el dietil esquarato²² y la eliminación de los grupos Boc para obtener el producto final.

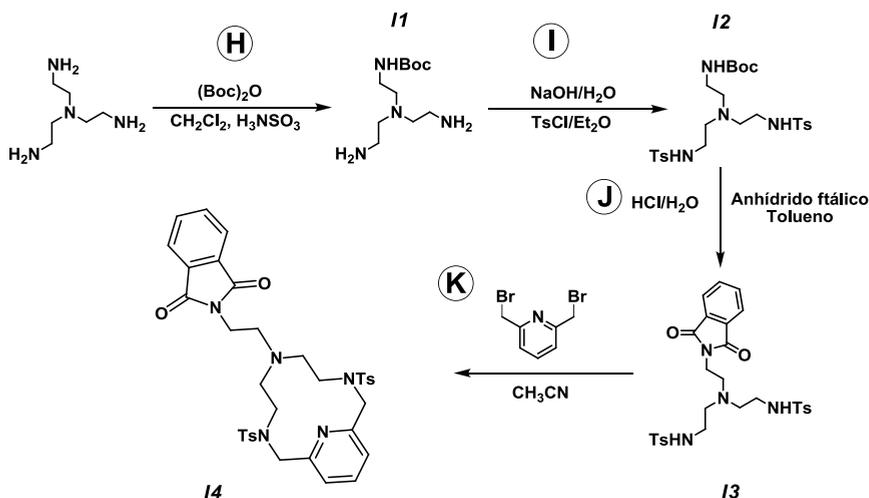


Figura 4.10.- Esquema de síntesis del derivado *pytren* protegido

H) Protección de tren con Boc

A una disolución de *tren* (5.1 mL, 34.07 mmol) disuelta en CH_2Cl_2 (100 mL) se añade ácido sulfámico (104 mg, 1.07 mmol). La disolución se deja enfriar en un baño de agua/hielo y se añaden una disolución de di-*tert*-butil dicarbonato (4.67 g, 21.4 mmol) en CH_2Cl_2 (70 mL) gota a gota durante 30 min. Posteriormente, la mezcla se basicifica fuertemente con agua (30 mL) y NaOH y se extrae con CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). Las fases orgánicas se secan con Na_2SO_4 y se evaporan para dar el intermedio de reacción monoprotegido **11** como un aceite viscoso.

I) Tosilación de 11

A una disolución de **11** (3.7 g, 15 mmol) suspendida en agua básica (1.55 g, 36 mmol de NaOH en 15 mL de agua) se añade una disolución de TsCl (5.75 g, 30.2 mmol) en éter (20 mL) gota a gota con agitación durante 30 min y se deja agitando vigorosamente durante 12 horas adicionales. La mezcla resultante se separa y la fase acuosa se extrae con éter (2 x 10 mL). La combinación de las fases orgánicas se secan con Na_2SO_4 y se evapora para dar un crudo que,

posteriormente se purifica en cromatografía de sílica gel ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$ 0.5 % v/v) para dar **I2** como un sólido incoloro.

J) Eliminación del Boc y reacción con ftálico del intermedio I2

El compuesto **I2** (6.9 g, 12.5 mmol) disuelto en 15 mL de HCl 3 N acuoso se somete a reflujo durante 5 horas. Después de enfriar, se realiza una extracción con CH_2Cl_2 (4 x 25 mL). Las fases orgánicas se lavan con HCl acuoso al 5 % (5 x 20 mL), se extraen con disoluciones de NaOH acuosa 1M (5 x 20 mL) y se separan. Las fases orgánicas se lavan posteriormente con una disolución saturada de NaCl, se secan sobre Na_2SO_4 y se evaporan hasta sequedad.

A una disolución del anterior producto (1.0 g, 2.2 mmol) en tolueno (50 mL) se añade anhídrido ftálico (0.36 g, 2.43 mmol). El balón se equipa con una trampa Dean-Stark y se calienta a reflujo durante 24 horas. Tras este periodo se observa la formación de un sólido cristalino y la mezcla se deja a temperatura ambiente durante la noche. El sólido resultante se separa mediante filtración y se recristaliza en etanol, obteniéndose el compuesto **I3** como cristales blancos.

K) Ciclación de I3

Una disolución de 2,6-bis(bromometil)piridina (1.52 g, 5.7 mmol) en CH_3CN (100 mL) se añade gota a gota durante 12 horas sobre una mezcla de **I3** (3.28 g, 5.6 mmol) y K_2CO_3 (2.5 g, 18.1 mmol) en CH_3CN (200 mL), bajo atmosfera de argón y se deja agitar a reflujo 24 horas. Después de enfriar, la mezcla se filtra y el sólido se lava con CH_3CN (3 x 15 mL). Las fases orgánicas se concentran a vacío para dar un sólido, el cual es purificado en cromatografía (Al_2O_3 neutra, act I; CH_2Cl_2 a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ACOEt}$ 10 % v/v) para dar **I4** como un sólido blanco.

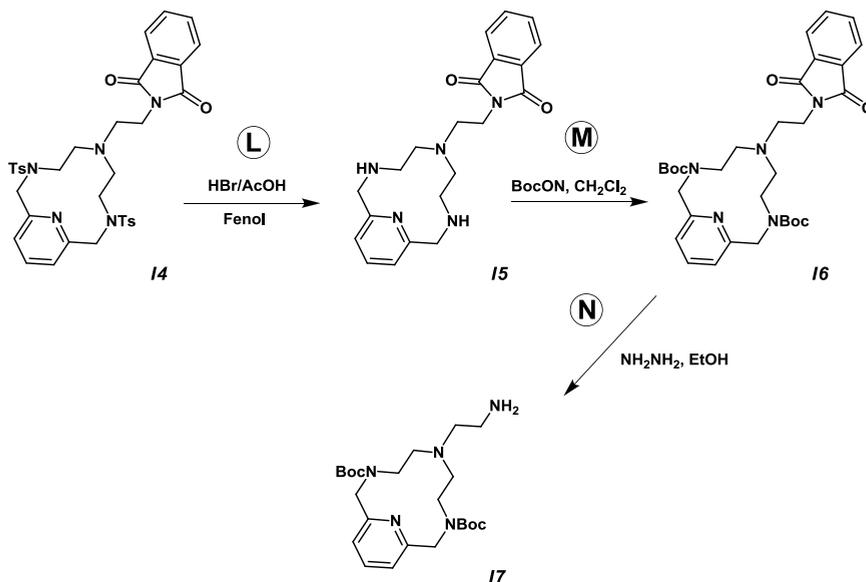


Figura 4.11.- Esquema de síntesis del precursor *pytren* protegido

L) Detosilación de **14**

El piridinofano **14** (2.5 h, 3.7 mmol) y fenol (13.0 g, 138.1 mmol) se disuelven en 140 mL de HBr/HAc 33 % y se calienta a 90 °C con agitación durante 3 días. El sólido resultante se filtra y se lava con AcOH glacial (3 × 20 mL) y con una mezcla de EtOH/Eter 25 % v/v (5 × 40 mL) para dar **15** como su sal bromohidratada. Este producto se recristaliza en EtOH/H₂O (1/1 v/v).

M) Protección de **15** con Boc

Una disolución de Boc (3.05 g, 12.38 mmol) en CH₂Cl₂ (50 mL) se añade sobre una mezcla de **15** (2.88 g, 4.09 mmol) y Et₃N (5 mL, 35.87 mmol) disueltos en CH₂Cl₂ (100 mL) y se calienta a reflujo durante 48 horas. Después de enfriar la fase orgánica de la reacción, se lava con una disolución de NaOH 1M (3 × 25 mL), se seca con Na₂SO₄ y se evapora. El sólido resultante se purifica por cromatografía (Al₂O₃ neutra, act I; CH₂Cl₂ a CH₂Cl₂/EtOH 0.5 % v/v) para dar el compuesto **16** como un sólido.

N) Eliminación de la ftalamida

Se mezcla el compuesto **16** (2.36 g, 4.07 mmol) con hidracina (0.26 mL, 5.36 mmol) en etanol (60 mL) y se calienta a reflujo durante 5 horas. Después de enfriar, la disolución se evapora, el sólido resultante se disuelve en CH_2Cl_2 (30 mL) y se lava con una disolución acuosa de NaOH 1N (30 mL). La porción acuosa se trata con CH_2Cl_2 (2 x 20 mL) y la combinación de fases orgánicas se seca sobre Na_2SO_4 y se evapora hasta sequedad para dar el compuesto **17** como un aceite viscoso.

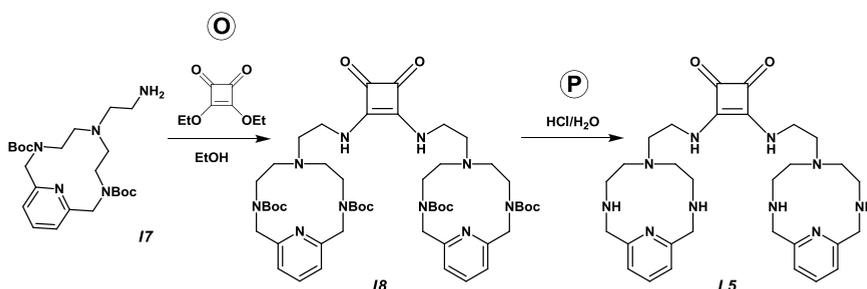


Figura 4.12.- Esquema de síntesis del receptor **L5**

O) Condensación de **17** y dietilesquarato

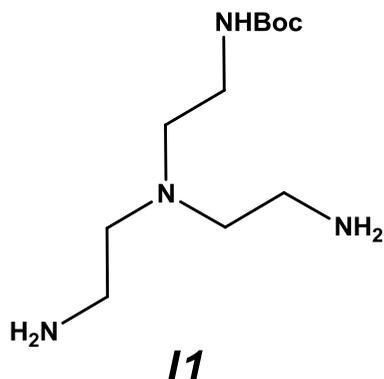
El dietil esquarato (0.32 mL, 2.18 mmol) y **17** (1.65 g, 3.67 mmol) se disuelven en etanol (25 mL) y la mezcla se agita durante dos días a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el etanol y se purifica por cromatografía (Al_2O_3 neutra, act I; CH_2Cl_2 a $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 10 % v/v) para dar la esquamida **18** como un sólido blanco.

P) Eliminación de los grupos Boc en **18**

El compuesto **18** (1.5 g, 1.53 mmol) disuelto con una disolución acuosa de HCl 3N (10 mL, 30 mmol) y agua (10 mL) se calienta a 50 °C durante 6 horas. La disolución resultante se basificó hasta pH > 10 con NaOH. La disolución acuosa se extrae con una mezcla de CH_2Cl_2 /iso-butanol (3/2 v/v) (5 x 25 mL). Las fases orgánicas se secan sobre Na_2SO_4 y se evaporan. El sólido resultante se

redisuelve en EtOH (20 mL) y se concentra hasta sequedad. Después de tres ciclos de disolución y concentración, el sólido se disuelve en 5 mL de CH₃CN caliente y se filtra para eliminar el material insoluble. El mismo proceso se repite redisolviendo en 5 mL de CHCl₃ y precipitando con hexano (3 ciclos). Finalmente, la esquaramida **19** se seca a vacío 70 °C para obtener un sólido blanco.

N,N-Bis(3-aminoetil)-N-(2-terc-butoxicarbonilaminoetil)amina



$C_{11}H_{26}N_4O_2$ (PM = 246.36 g/mol)

Rendimiento: 70 %.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{11}H_{27}N_4O_2$: 247.2 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 247.2 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$):

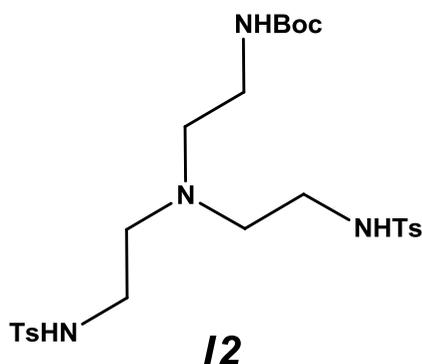
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ_H (ppm): 5.36 (br s, 1H), 3.2-3.18 (m, 2H), 2.78 (m, 4H), 2.54 (m, 6H), 2.17(m, 4H), 1.44 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 156.6, 79.4, 57.3, 54.5, 40.1, 39.2, 28.8.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3440, 2809, 2657, 2362, 2213, 2070, 1832, 1718, 1562, 1456, 1390, 1366, 1250, 1131, 1103, 1067.

N,N-Bis(2-*p*-toluensulfonilamida)-N-(2-*terc*-butoxicarbonilaminoetil)amina



$C_{25}H_{38}N_4O_6S_2$ (PM = 554.72 g/mol)

Rendimiento: 90 %.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{25}H_{39}N_4O_6S_2$ 555.2 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 555.2 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$):

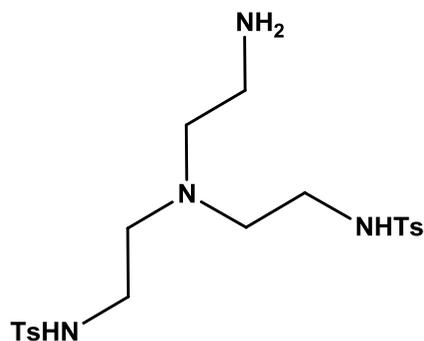
1H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.78 (d, $J = 8.1$, 4H), 7.31 (d, $J = 7.8$, 4H), 5.59 (br s, 2H), 4.97 (br s, 1H), 3.08 (m, 2H), 2.94 (m, 4H), 2.5 (m, 4H), 2.42 (br, 8H), 1.46 (s, 9H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 157.0, 143.6, 137.4, 130.1, 127.5, 80.1, 54.8, 54.2, 41.2, 38.87, 28.7, 21.8.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3588, 3390, 2825, 1923, 1712, 1599, 1522, 1456, 1399, 1367, 1332, 1152, 1093, 1059.

N-Aminoetil-N,N-bis[2-*p*-toluensulfonilaminoetil]amina



$C_{20}H_{31}N_4O_4S_2$ (PM = 454.60 g/mol)

Rendimiento: 87 %.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{20}H_{31}N_4O_4S_2$ 455.2 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 455.2 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$):

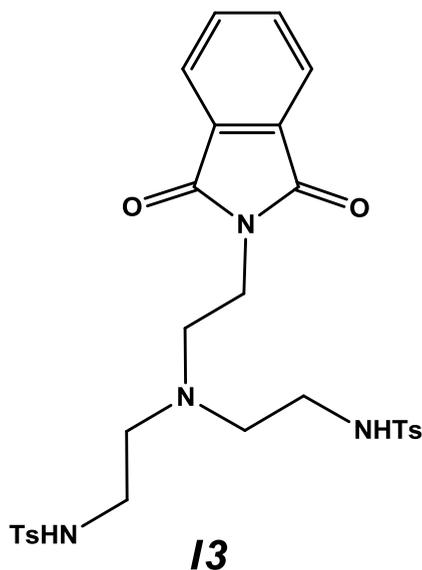
1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz), δ_H (ppm): 7.73 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.3 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 2.84 (m, 4H), 2.7 (m, 2H), 2.47 (m, 4H), 2.4 (s, 6H), 2.38 (m, 2H).

^{13}C NMR (CD_2Cl_2 , 75.43 MHz), δ_C (ppm): 143.5, 137.6, 130.0, 127.4, 55.3, 54.2, 41.6, 39.4, 21.8.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3584, 3292, 2924, 2829, 1922, 1650, 1597, 1494, 1453, 1326, 1161, 1095.

N-(2-Ftalamidaetil)-N,N-(2-*p*-toluensulfonilaminoetil)amina



$C_{28}H_{32}N_4O_6S_2$ (PM = 584.71 g/mol)

Rendimiento: 77 %.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{28}H_{33}N_4O_6S_2$ 585.2 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 585.2 g/mol.

Análisis elemental ($C_{28}H_{33}N_4O_6S_2$):

Teórico: C 57.5%; H 5.5%; N 9.6%; S, 10.9%.

Experimental: C 57.5%; H 5.5%; N 9.7; S, 11.0%.

Espectros RMN (CDCl₃):

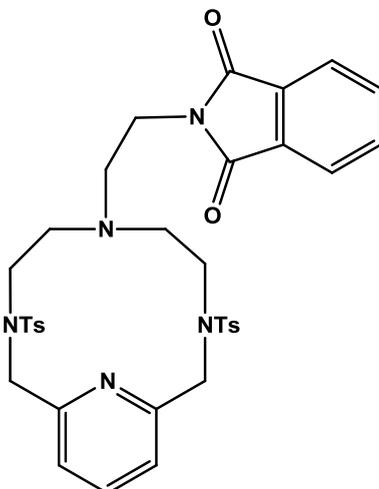
¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.81 (s, 4H), 7.6 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.36-7.30 (m + d, 6H), 3.44 (m, 2), 2.59 (m, 4H), 2.39-2.33 (m + s, 12H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 167.8, 142.49, 137.54, 134.33, 131.46, 129.56, 126.38, 122.95, 53.00, 51.00, 35.51, 20.9.

Espectro IR (KBr):

ν (cm⁻¹): 3328, 3232, 2930, 2862, 2362, 2334, 1771, 1714, 1597, 1395, 1314, 1155, 1098.

**6-(2-Ftalamidaetil)-3,6,9-triaza-3,9-*p*-toluensulfonil-
1(2,6)piridinaciclodecafano**



14

$C_{35}H_{37}N_5O_6S_2$ (PM = 687.83 g/mol)

Rendimiento: 66 %.

Análisis elemental ($C_{35}H_{37}N_5O_6S_2$):

Teórico: C 61.2%; H 5.4%; N 10.2%; S 9.3%.

Experimental: C 60.6%; H 5.4%; N 10.2%, S 9.2%.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{35}H_{38}N_5O_6S_2$ 688.2 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 688.2 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$):

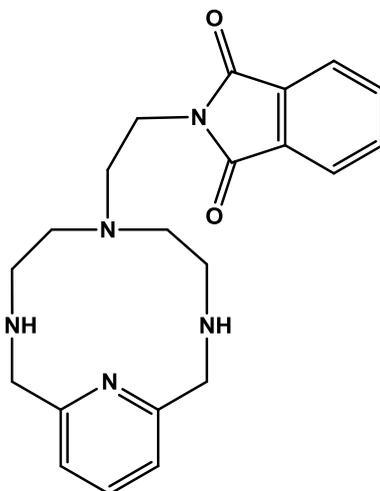
1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz), δ_H (ppm): 7.81 (m, 2H), 7.75-7.68 (m, 7H), 7.36 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.25 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.29 (m, 4H), 3.58 (m, 2H), 3.03 (m, 4H), 2.62 (m, 2H), 2.44 (s, 6H), 2.35 (m, 4H).

^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.43 MHz), δ_C (ppm): 168.5, 155.4, 143.7, 139.0, 136.4, 134.1, 132.5, 130.2, 127.6, 124.2, 123.5, 54.8, 53.1, 51.4, 44.6, 37.0, 21.9.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 2937, 2854, 2362, 2334, 1772, 1712, 1594, 1395, 1343, 1159, 1091.

6-(2-Ftalamidaetil)-3,6,9-triaza-1(2,6)piridinaciclodecafano



15

$C_{21}H_{25}N_5O_2 \cdot 2HBr$ (PM = 541.28 g/mol)

Rendimiento: 98 %.

Análisis elemental ($C_{21}H_{27}Br_2N_5O_2$):

Teórico: C 46.6%; H 5.0%; N 12.9%.

Experimental: C 46.1%; H 4.9%; N 12.9%.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{21}H_{26}N_5O_2$ 380.2 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 380.2 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$):

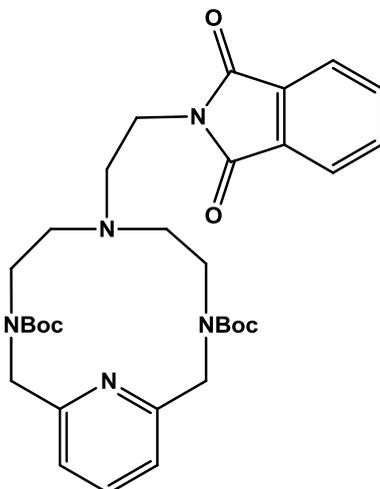
1H NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz), δ_H (ppm): 8.93 (br s, 4H), 7.97 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J = 3$ Hz, 4H), 7.46 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 4.55 (s, 4H), 3.77 (br m, 2H), 3.10 (br s, 4H), 2.87 (br m, 2H), 2.77 (br s, 4H).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.43 MHz), δ_C (ppm): 167.9, 149.9, 138.9, 134.5, 131.6, 123.1, 121.4, 51.9, 50.0, 49.0, 45.9, 33.7.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3474, 3043, 2927, 2755, 2597, 1774, 1720, 1603, 1572, 1466, 1442, 1393, 1341, 1290, 1227, 1166, 1117, 1026.

6-(2-Ftalamidaetil)-3,6,9-triaza-3,9-bis(tert-butoxicarbonil)-
1(2,6)piridinaciclodecafano



16

$C_{31}H_{41}N_5O_6$ (PM = 579.70 g/mol)

Rendimiento: 99 %.

Análisis elemental ($C_{31}H_{41}N_5O_6$):

Teórico: C 64.2%; H 7.1%; N 12.1%.

Experimental: C 64.2%; H 6.9%; N 12.0%.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{31}H_{42}N_5O_6$ 580.3 g/mol.

Experimental $[M - H]^+$: m/z 580.3 g/mol.

Espectros RMN ($CDCl_3$):

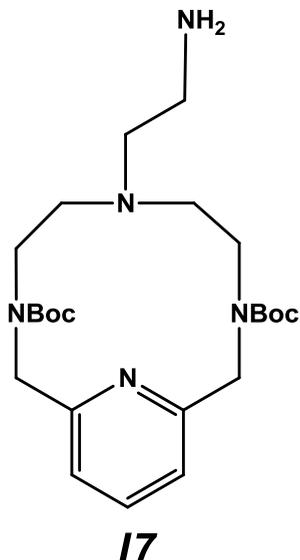
1H NMR (DMSO- d_6 /D $_2$ O, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.81 (br d, 4H), 7.68 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.21-7.15 (dd, $J = 9$ Hz, 2H), 4.4-4.36 (br, 4H), 3.52 (m, 2H), 3.23-3.15 (br, 4H), 2.73-2.65 (br, 6H), 1.35-1.18 (br, 18H)

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 75.43 MHz), δ_C (ppm): 167.9, 149.9, 138.9, 134.5, 131.6, 123.1, 121.4, 51.9, 50.0, 49.0, 45.9, 33.7.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3468, 2974, 2933, 2901, 1773, 1719, 1691, 1592, 1579, 1463, 1406, 1367, 1287, 1251, 1173, 1119.

**6-(2-Aminoetil)-3,6,9-triaza-3,9-bis(tert-butoxicarbonil)-
1(2,6)piridinaciclodecaano**



$C_{23}H_{39}N_5O_4$ (PM = 449.59 g/mol)

Rendimiento: 90 %.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{23}H_{40}N_5O_4$ 450.3 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 450.3 g/mol.

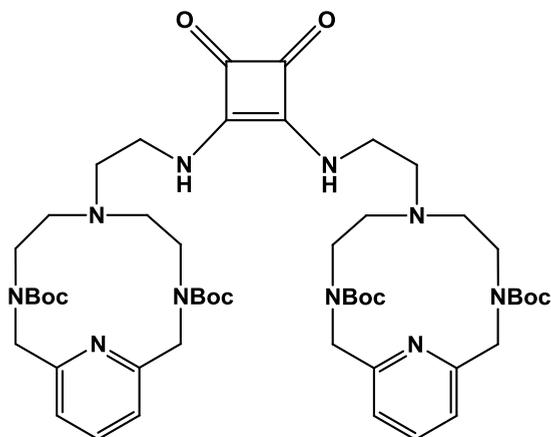
Espectros RMN ($CDCl_3$):

1H NMR (CD_2Cl_2 , 300 MHz), δ_H (ppm): 7.63 (t, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.25-7.17 (br d, 2H), 4.52-4.46 (br, 4H), 3.26 (br m, 4H), 2.65-2.37 (br, 8H), 1.41-1.39 (br, 18H).

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3482, 2974, 2931, 1697, 1592, 1577, 1458, 1409, 1366, 1249, 1166.

**3,4-Bis[3-(3,9-*tert*-butoxicarbonil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecáfan-6-
il)-1-azapropil]ciclobut-3-en-1,2-diona**



18

$C_{50}H_{76}N_{10}O_{10} \cdot H_2O$ (PM = 995.23 g/mol)

Rendimiento: 93 %.

Análisis elemental ($C_{50}H_{76}N_{10}O_{10} \cdot H_2O$):

Teórico: C 60.3%; H 7.9%; N 12.1%.

Experimental: C 60.0%; H 7.5%; N 13.6%.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{50}H_{77}N_{10}O_{10}$ 977.6 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 977.6 g/mol.

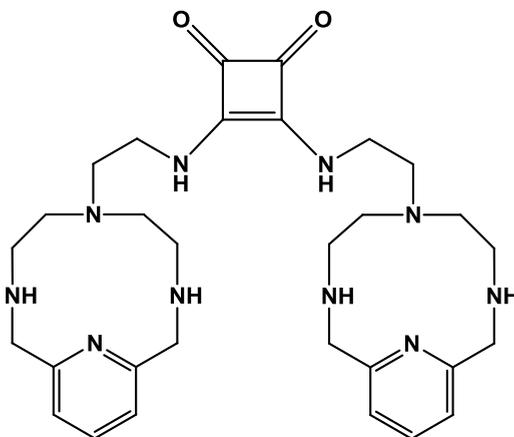
Espectros RMN ($CDCl_3$):

1H NMR ($DMSO-d_6/D_2O$, 300 MHz), δ_H (ppm): 7.72 (br t, 2H), 7.21 (m, 4H), 4.61 (br t, 2H), 4.44-4.39 (br, 8H), 3.41 (m, 4H), 3.28-3.22 (m, 8H), 2.77-2.65 (br, 12H), 1.34-1.22 (br, 36H)

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3567, 2929, 2399, 1800.

3,4-Bis[3-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecafan-6-il)-1-azapropil]ciclobut-3-en-1,2-diona



L5

$C_{30}H_{44}N_{10}O_2 \cdot 8 HCl \cdot 2 H_2O$ (PM = 896.44 g/mol)

Rendimiento: 37 %.

Análisis elemental ($C_{30}H_{44}N_{10}O_2 \cdot 8 HCl \cdot 2 H_2O$):

Teórico: C 39.8%, H 6.24%, N 15.5%.

Experimental: C 39.5%, H 6.1%, N 14.9%.

Espectroscopía de masas (HR-MS):

Calculado para $C_{30}H_{45}N_{10}O_2$ 577.3 g/mol.

Experimental $[MH]^+$: m/z 577.4 g/mol.

Espectros RMN (D_2O , J en Hz):

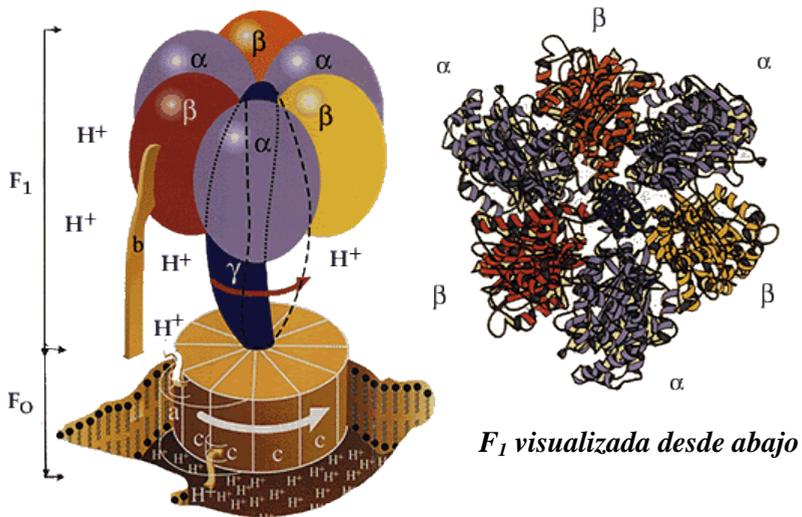
1H NMR (D_2O/TFA , 300 MHz), δ_H (ppm): 7.82 (t, $J = 7.8$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 4.48 (s, 8H), 3.66 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 3.11 (br s, 8H), 2.88-2.82 (m, 12H).

^{13}C NMR (D_2O/TFA , 75.43 MHz): δ_C 184.6, 171.2, 151.7, 142.5, 124.9, 58.3, 53.4, 52.2, 48.8, 43.3.

Espectro IR (KBr):

ν (cm^{-1}): 3439, 2920, 2850, 1764, 1654, 1596, 15401458, 1403, 1363, 1286, 1155, 1097.

- 1 a) J. D. Badjic, V. Balzani, A. Credi, S. Silvi y J. F. Stoddart, *Science*, 2004, **303**, 1845; b) A. Petitjean, L. A. Cuccia, M. Schmutz y J. –M. Lehn, *J. Org. Chem.* 2008, **73**, 2481.
- 2 a) E. R. Kay y D. A. Leigh, *Top. Curr. Chem.*, 2005, **262**, 133; b) S. Durot, F. Reviriego y J. –P. Sauvage, *Dalton Trans.*, 2010, **39** (44), 10557.
- 3 M. I. Burguete, L. V. Santiago, J. Miravet, L. Paya, M. Querol, E. García-España y C. Soriano, *Chem. Commun.*, 1998, **17**, 1823.
- 4 G. J. Bridger, R. T. Skerlj, S. Padmanabhan, S. Martellucci, G. W. Henson, S. Struyf, M. Witvrouw, D. Schols y E. De Clercq, *J. Med. Chem.*, 1999, **42**, 3971.
- 5 B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano y E. García-España, *Inorg Chem.*, 2007, **46** (14), 5707.
- 6 S. Blasco, B. Verdejo, M. P. Clares, C. E. Castillo, A. G. Algarra, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano y E. García-España, *Inorg. Chem.*, 2010, **49** (15), 7016.
- 7 W. Greene y P. G. M. Wuts; *Protective Groups in Organic Synthesis* (John Wiley & Sons, Inc., 1999).
- 8 J. E. Richman y T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.*, 1974; **96** (7), 2268.
- 9 J. E. Richman, T. J. Atkins y W. F. Oetl, *Organic Synthesis*; volume VI (J. Wiley & Sons, 1988).
- 10 B. L. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, 1975; **97** (13), 3856.
- 11 B. E. Haskell y S. B. Bowlus, *J. Org. Chem.*, 1976; **41** (1), 159.
- 12 H. R. Snyder y R. E. Hecker, *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, **74**, 2006;
- 13 C. J. Chandler, L. W. Deady y J. A. Reiss, *J. Heterocyclic. Chem.*, 1981, **18**, 599.
- 14 P. Kus, G. Knerr y L. Czuchajowski, *J. Heterocyclic. Chem.*, 1991, **28**, 7.
- 15 P. Dupau, T. Renouard y H. Le Bozec, *Tetrahedron Lett.*, 1996, **37** (42), 7503.
- 16 R. F. Abdulla y R. S. Brinkmeyer; *Tetrahedron Lett.*; 1979, **35**, 1675.
- 17 M. G. Vetelino y J. W. Coe, *Tetrahedron Lett.*, 1994, **35**, 219.
- 18 T. P. Wunz, R. T. Dorr, D. S. Alberts, C. L. Tunget, J. Einspahr, S. Milton y W. J. Remers, *J. Med. Chem.*, 1987, **30**, 1313.
- 19 J. Jawzinski, J. –M. Lehn, R. Meric, J. P. Vigneron, M. Cesario, J. Guilhem y C. Pascard, *Tetrahedron. Lett.*, 1987, **28**, 3489.
- 20 M. G. B. Drew, D. McDowell y J. Nelson, *Polyhedron*, 1988, **7**, 2229.
- 21 a) J. M. Boon, T. N. Lambert, B. D. Smith, A. M. Beatty, V. Ugrinova y S. N. Brown. *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 2168; b) D. J. Upadhyaya, A. Barge, R. Stefania y G. Cravotto, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 8318.
- 22 A. H. Schmidt, *Synthesis*, 1980, 961.



F₁ visualizada desde abajo

ATP sintasa

*...the formation and use of ATP is the principal net chemical reaction occurring in the whole world. This is obviously a very important reaction. How does it occur???*¹

Paul D. Boyer, premio Nobel de química en 1996 por el descubrimiento del mecanismo enzimático de la síntesis del ATP

Capítulo 5.- Protonación

La protonación o transferencia de un protón desde un átomo a otro átomo ha sido definida como “la reacción más general y la más importante en química”.² Su importancia se manifiesta por la gran cantidad de procesos biológicos que dependen de una rápida transferencia de protones, como la apertura de canales en las membranas,³ el movimiento de rotores moleculares como la ATP-F₀/F₁ sintasa,⁴ la rotación flagelar en bacterias⁵ y la generación de formas activas en enzimas.⁶

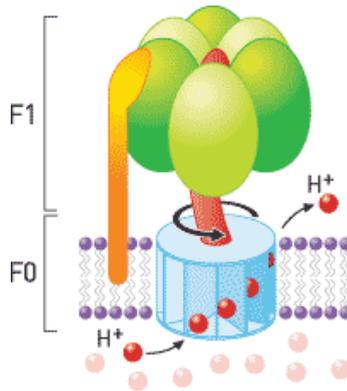


Figura 5.1.- Representación esquemática del gradiente de protones que emplea el enzima *F₀/F₁-ATP sintasa* en la síntesis de ATP.

Existen en la literatura varios ejemplos de sistemas artificiales controlados por la transferencia de protones. Los grupos de Fraser Stoddart⁷ y Martínez-Mañez⁸ han diseñado sistemas moleculares que transportan y liberan fármacos de una forma controlada en células diana. En la figura 5.2 se muestra la representación del mecanismo de acción para uno de los sistemas de Stoddart. En él, las nanopartículas tienen su superficie funcionalizada con unas nanomáquinas con válvulas que almacenan en su interior una molécula fármaco y que se libera mediante una desprotonación.

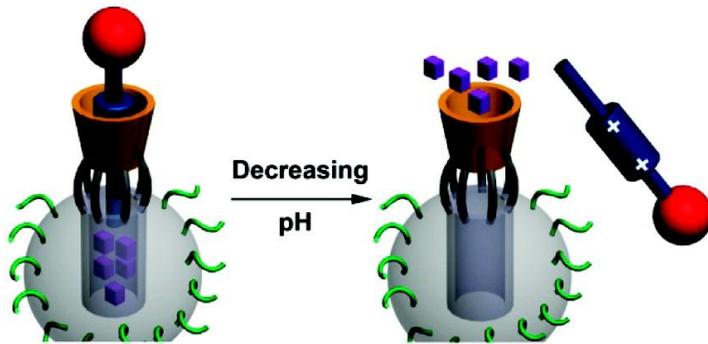


Figura 5.2.- Representación de la nanopartícula funcionalizada y de su mecanismo de liberación del fármaco.

El grupo de Martínez-Mañez ha descrito un sistema basado en sólidos mesoporosos (MCM-41) cuyas superficies están funcionalizadas con poliaminas lineales (figura 4.3).

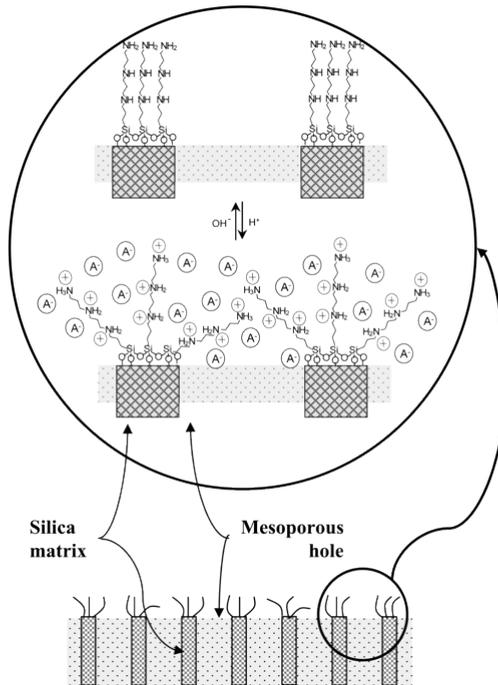


Figura 5.3.- Representación del sólido mesoporoso funcionalizado y de su mecanismo de liberación.

Las poliaminas lineales actúan como puertas permitiendo la liberación de las moléculas almacenadas en el interior de los microporos mediante un estímulo de pH. Las poliaminas al protonarse bloquean la salida de las moléculas debido a la rigidez estructural que adoptan porque sus cargas interactúan con los aniones del medio. Al desprotonarse, las poliaminas se quedan sin carga y adquieren una alta flexibilidad estructural permitiendo a las moléculas del interior su libertad de movimiento hacia el exterior (figura 5.3).

Otros sistemas artificiales controlados por la transferencia de protones son los diseñados por M. T. Albelda y colaboradores, en los cuales dos unidades de naftaleno están conectadas por cadenas poliamínicas lineales de distintas longitudes. Estos sistemas son sensores de pH porque se forma un excímero (figura 5.4, izda) al irradiar con luz a valores de pH básicos ($\text{pH} \geq 6$), como consecuencia de que las unidades de naftaleno se sitúan muy próximas entre sí (figura 5.4, dcha). Sin embargo a valores de pH ácidos ($\text{pH} = 2$) no se forma el excímero porque los grupos amino de la cadena lineal se encuentran protonados y reducen la movilidad del ligando imposibilitando el acercamiento de las dos unidades de naftaleno.⁹

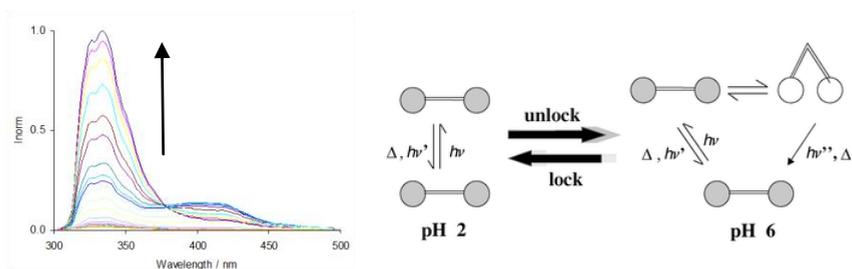


Figura 5.4.- Excímero de los ligandos de bisnaftaleno de M. T. Albelda *et al.* (izda) y su mecanismo de acción (dcha)

Los receptores estudiados en este trabajo son ligandos poliamínicos. Tradicionalmente, estos ligandos son receptores muy versátiles debido a su capacidad de coordinar tanto iones metálicos como de interactuar con

especies aniónicas,^{10,11} dependiendo de su grado de protonación. La coordinación con iones metálicos se produce a través de los pares solitarios de los átomos de nitrógeno no protonados, mientras que la coordinación con los aniones se produce principalmente mediante interacciones electrostáticas y por puentes de hidrógeno entre los nitrógenos cargados positivamente y las especies aniónicas.

En disolución acuosa las poliaminas se comportan como bases, compitiendo las reacciones de protonación con las de complejación, por ello, para estudiar la capacidad coordinativa de los receptores se debe de realizar previamente un estudio de sus propiedades ácido-base.

En este trabajo se estudian poliaminas que contienen en su estructura nitrógenos de diferente naturaleza, y que por lo tanto, van a tener diferentes características ácido-base. En fase gaseosa, la basicidad del amonio y sus derivados metilados, sigue la secuencia: $N(CH_3)_3 > NH(CH_3)_2 > NH_2(CH_3) > NH_3$.¹² La sustitución de los átomos de hidrógeno en el amoniaco por grupos metilo da lugar a un aumento de la basicidad en fase gas, ya que los grupos alquilo son dadores de electrones, estabilizando el ión alquilamonio que se obtiene por la reacción ácido-base al dispersar su carga positiva. Ahora bien, en disolución acuosa la secuencia es diferente¹³: $NH(CH_3)_2 \sim NH_2(CH_3) > N(CH_3)_3 > NH_3$ El responsable de alterar el orden así como de la menor basicidad de la trimetilamina en disolución acuosa es el comportamiento ácido-base intrínseco de las moléculas de agua. Las moléculas de agua son buenos dadores y aceptores de enlaces de hidrógeno y pueden solvatar de modo más efectivo los cationes poliamínicos que las poliaminas sin carga. Por otra parte, la solvatación aumentará en las aminas no sustituidas, ya que éstas pueden formar un mayor número de enlaces de hidrógeno con el disolvente.

El comportamiento ácido-base, se verá afectado por una gran cantidad de parámetros, como los efectos inductivos, rigidez, flexibilidad, capacidad de formar enlaces por puentes de hidrógeno, disolvente, etc. Aparte de estos efectos, la repulsión electrostática entre grupos amonio cargados determinará los valores de las constantes de protonación y la localización de los protones en el ligando.

De acuerdo con estos hechos, para comparar las constantes de protonación y de formación de complejos, los estudios físico-químicos de protonación y complejación se deben de realizar en las mismas condiciones. Por ello, es muy importante controlar todas las variables para que los experimentos sean reproducibles y comparativos. Uno de los aspectos a tener en cuenta es la fuerza iónica, que se debe mantener constante en las valoraciones en todo momento. Se disponen de varias disoluciones acuosas con sales de fondo de NEt_4ClO_4 , NaClO_4 , NaCl y KNO_3 , y la decisión sobre cuál de ellas se debe utilizar dependerá de la competencia de los iones de las sales con los nitrógenos poliamínicos por la coordinación de los sustratos y de otros aspectos como la solubilidad del sistema en cada uno de ellos.

En principio se iniciaron los estudios potenciométricos con **L2** y utilizando como fuerza iónica una disolución de NaClO_4 de concentración 0.15 M, ya que el anión perclorato interacciona menos con los nitrógenos poliamínicos protonados que el anión cloruro.¹⁴ Sin embargo, la solubilidad del ligando era muy baja, por lo que se utilizó finalmente como fuerza iónica NaCl 0.15 M y con propósitos comparativos se estudiaron los demás receptores en las mismas condiciones. Por otra parte, otro motivo para utilizar el NaCl es porque es una de las principales sales del fluido extracelular en muchos organismos.

A continuación se muestran los ligandos que se van a estudiar en este capítulo. Las estructuras moleculares de los ligandos **L1**, **L2**, **L3**, **L4** y **L5** se componen de dos unidades precursoras *pytren* enlazadas por un espaciador aromático de piridina, fenantrolina, bipyridina o esquaramida y/o un puente metileno, denominados “*dobles escorpiandos*”. En cambio, el ligando **L6** contiene en su estructura un único precursor *pytren* unido a un anillo de fenantrolina, formando un ligando tipo “*escorpiando*”.

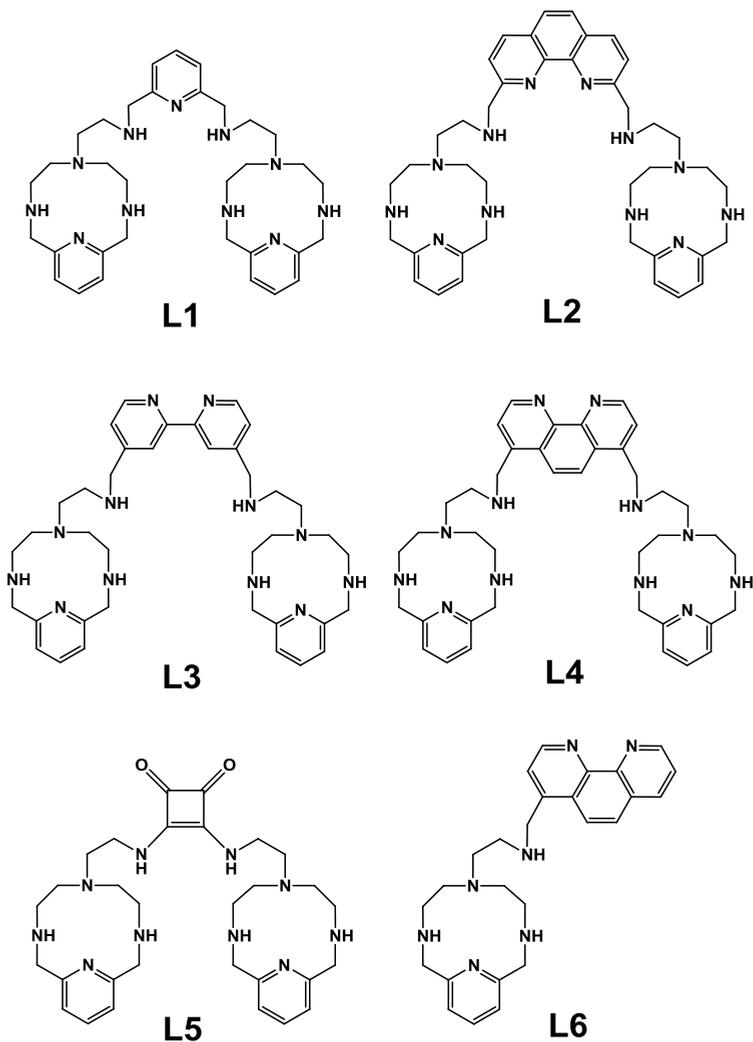


Figura 5.5.- Ligandos estudiados en el presente capítulo.

5.1.- Comportamiento ácido-base

5.1.1.- Estudios potenciométricos

En primer lugar, hay que comentar que en los ligandos mostrados en la figura 5.5 se pueden encontrar centros protonables distintos: (i) las aminas

secundarias, (ii) los grupos amino de los heterociclos y (iii) los grupos amino terciarios restantes de las cadenas alifáticas. Cada uno de ellos, tendrán distinta basicidad en agua como se comento previamente.

Se utilizaron las técnicas potenciométricas para determinar las constantes de protonación de los ligandos. Los datos potenciométricos obtenidos de las valoraciones se trataron con el programa HYPERQUAD¹⁵ con el cual se calcularon los valores de las constantes. En la tabla 5.1 se muestran los valores obtenidos para todos los ligandos. El primer aspecto a destacar son los menores valores para las constantes de basicidad global de **L5** y **L6**. Esta menor basicidad es debida a un menor número de grupos amino secundarios, mientras que los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L4** tienen seis aminas secundarias, el ligando **L5** tiene 4 y el ligando **L6** sólo 3.

Tabla 5.1.- Logaritmos de las constantes sucesivas de protonación y de basicidad global para los ligandos determinadas en NaCl 0.15 M a 298 ± 0.1 K.

Reacción ^a	L1	L2	L3	L4	L5	L6
H + L = HL	9.96(2) ^b	10.04(1)	9.39(1)	10.65(5))	9.24	9.39(2)
H + HL = H₂L	9.52(2)	9.80(1)	9.27(1)	9.42(4)	8.93	7.39(3)
H + H₂L = H₃L	8.51(2)	8.88(1)	8.26(1)	9.01(5)	7.89	5.27(2)
H + H₃L = H₄L	7.64(2)	8.15(1)	8.05(1)	8.35(5)	6.91	3.44(4)
H + H₄L = H₅L	6.78(3)	6.78(1)	6.66(1)	7.47(6)		
H + H₅L = H₆L	5.94(4)	5.95(1)	5.92(1)	6.14(6)		
H + H₆L = H₇L		2.25(2)	1.97(3)	4.0(1)		
Log β^c	48.34	51.84	49.53	55.07	32.97	25.49

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa. ^c La constante de basicidad global es

$$\log \beta = \sum \log K_{HjL}$$

Se han obtenido en el intervalo de pH 2.0-11.0 siete constantes de protonación para **L2**, **L3** y **L4**, seis para **L1** y cuatro para **L5** y **L6**. Los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L4** presentan valores de las constantes sucesivas de protonación similares, con seis constantes entre 10 y 6 unidades logarítmicas y una séptima constante, cuyo valor es de aproximadamente 2 unidades logarítmicas para **L2** y **L3** y 4 para **L4**. Teniendo en cuenta la estructura de

estos ligandos y la basicidad en agua de los distintos grupos amino,^{10,16} cabe esperar que las seis primeras protonaciones ocurran en los átomos de nitrógeno secundarios de los ligandos y no en los nitrógenos terciarios. La séptima protonación de **L2**, **L3** y **L4** se producirá en los nitrógenos de la unidad de fenantrolina y biperidina respectivamente que son centros menos básicos que las aminas secundarias. Estas protonaciones se confirman mediante espectroscopia UV-Vis y de emisión de fluorescencia.

El análisis de los valores de las constantes puede aportarnos información, aunque no cuantitativa, sobre el patrón de protonación. Los valores de las constantes sucesivas disminuyen por el efecto de las repulsiones electrostáticas y, por lo tanto, los protones se situarían de forma alternada en los nitrógenos secundarios de cada brazo macrocíclico, de modo que se sitúen lo más distanciadadas que sea posible para minimizar la repulsión entre poliaminas cargadas.

Para los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L4**, no podemos describir una secuencia de protonación exacta, pero en función de los valores obtenidos y apoyándonos en los estudios de fluorescencia y resonancia magnética nuclear que se discuten más adelante, podemos deducir que los primeros cuatro protones se situarían mayoritariamente de forma alternada en los nitrógenos secundarios de los macrociclos mientras que, el quinto y sexto protón se situarían mayoritariamente en los dos nitrógenos secundarios de los brazos. Por último, la séptima protonación de los ligandos **L2**, **L3** y **L4** se produciría en los nitrógenos de la unidad de fenantrolina o biperidina respectivamente.

L5 tiene 4 constantes de protonación atribuibles a las 4 aminas secundarias. El ligando **L5** tiene en su estructura dos amidas tipo esquamida además de las aminas secundarias. Estas amidas son mucho menos básicas que las aminas,¹⁷ por lo cual se protonan a valores de pH muy ácidos e imposibilitan así la medida de sus constantes de protonación por potenciometría en disolución acuosa.^{17,18} La menor basicidad de las amidas con respecto a las aminas se puede explicar en términos de resonancia. Una amida neutra está estabilizada por la resonancia producida por el par de electrones no enlazantes del átomo de nitrógeno que resuena sobre el grupo carbonilo; en el caso de una amina desprotonada, ésta no

tiene el grupo carbonilo y, por lo tanto, no existe esta estabilización adicional por resonancia. Así pues, un grupo amida es más estable neutra que el correspondiente grupo amino.

En el caso de **L6** se detectan 4 constantes de protonación dentro del intervalo de pH de estudio 2.0-11.0. Las tres primeras protonaciones corresponderían a las aminas secundarias y la cuarta constante a los nitrógenos de la fenantrolina.

Tabla 5.2.- Variación de los logaritmos de las constantes de protonación de los ligandos ($\Delta\delta_n = |\log K_{n+1} - \log K_n|$ siendo $n = 2-7$).

$\Delta\delta$	L1	L2	L3	L4	L5	L6
$\Delta\delta_1$	0.44	0.24	0.12	1.22	0.31	2
$\Delta\delta_2$	1.01	0.92	1.01	0.41	1.04	2.12
$\Delta\delta_3$	0.87	0.73	0.21	0.66	0.98	1.83
$\Delta\delta_4$	0.86	1.37	1.39	0.88		1.14
$\Delta\delta_5$	0.84	0.83	0.74	1.33		
$\Delta\delta_6$		3.7	3.95	2.14		

En la tabla 5.2 se observan las diferencias de los logaritmos de las constantes sucesivas de protonación entre protonaciones consecutivas. Para los ligandos, **L1**, **L2**, **L3** y **L5**, los valores de $\log K_{HL}$ y $\log K_{H2L}$ son muy parecidos y $\Delta\delta_1$ es muy pequeña (0.2-0.4), sugiriendo que el primer protón se coloca en una de las aminas de la cavidad macrocíclica y el segundo protón en la cavidad restante. Los protones se encontrarían los más alejados posibles, minimizando así las repulsiones electrostáticas. Las variaciones ($\Delta\delta$) desde el estado de protonación $n = 2$ hasta 5 corresponden a las etapas de protonación correspondientes a la formación de la especie triprotonada hasta la hexaprotonada y tienen valores de $\Delta\delta = 0.8-1.3$, lo cual indica la protonación de un grupo amino cercanos a centros ya protonados.

Una excepción ocurre para la formación de la especie tetraprotonada de **L3** donde la variación es muy pequeña ($\Delta\delta_3=0.21$) sugiriendo que la cuarta protonación tiene lugar lejos de los otros centros protonados. Este hecho sugiere que las tres primeras protonaciones sucederían en los nitrógenos

secundarios de los macrociclos y la cuarta protonación sucedería en uno de los nitrógenos secundarios de los brazos.

Otro hecho es la mayor diferencia de $\Delta\delta_1$ de **L4** (1.22) con respecto a **L1** (0.44), **L2** (0.24), **L3** (0.12) y **L5** (0.31) y, también, una menor $\Delta\delta_2$ para **L4** (0.41) con respecto a **L1**, **L2**, **L3** y **L5** (1.01, 0.92, 1.01 y 1.04 respectivamente), sugiriendo que las dos primeras protonaciones se situarían cercanas en el mismo macrociclo y la tercera protonación se situaría más alejada en el macrociclo restante.

Además, los valores no disminuyen según el efecto estadístico, lo que sugiere una compartición de los protones por todos los centros protonables o una reorganización molecular de cada estado de protonación con la formación y rotura de enlaces de hidrógeno entre grupos amino protonados y los grupos amino desprotonados. Este hecho se ve apoyado en los estudios de dinámica molecular mostrados posteriormente.

Finalmente, la variación para la última protonación ($\Delta\delta_6$) para **L2**, **L3** y **L4** tiene un valor muy superior que las restantes debido a la dificultad de protonar la fenantrolina o bipyridina.¹⁹

Para el ligando con un sólo brazo, **L6**, se observan unas variaciones mayores, debido probablemente a que tiene una estructura más pequeña y flexible y a que las cargas se situarían más cercanas en el espacio que para los ligandos tipo doble escorpiando.

Se realizaron cálculos de dinámica molecular²⁰ de los ligandos **L1** y **L2** para los diferentes estados de protonación. Para ello, los protones se sitúan en las aminas secundarias y se modeliza su estructura obteniéndose la conformación más estable. Los estudios sugieren que estos receptores presentan dos familias mayoritarias de confórmeros:

(i) una familia con una conformación más cerrada que se observa para los grados de protonación entre 0–5.

(ii) una familia con una conformación más abierta para mayores grados de protonación (≥ 6).

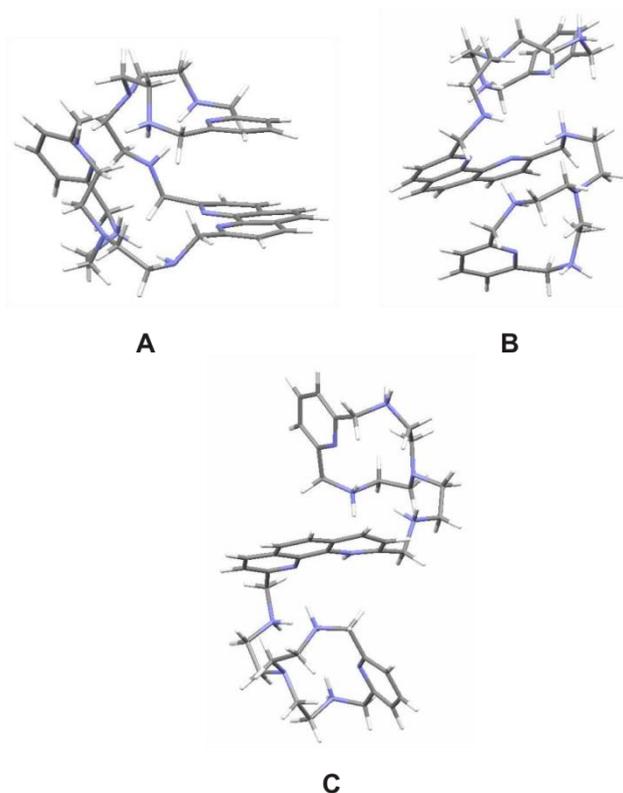


Figura 5.6.- Conformeros de mínima energía de H_2L2^{2+} (A), H_4L2^{4+} (B) y H_7L2^{7+} (C).

En las conformaciones cerradas se observa una red de enlaces de hidrógeno intramoleculares entre los grupos amonio protonados como dadores de enlaces de hidrógeno y los grupos amino desprotonados y los nitrógenos de las piridinas como aceptores de enlaces de hidrógeno (figura 5.6 A y B). La composición y número de enlaces de hidrógeno estarían cambiando de un estado de protonación a otro. Asimismo, en la conformación cerrada se observa un apilamiento π - π entre la piridina central y las piridinas de los brazos macrocíclicos para **L1** y entre la fenantrolina y las piridinas de los brazos macrocíclicos para **L2**.

Las conformaciones abiertas de **L1** y **L2** para un grado de protonación igual o mayor de seis (especies H_6L^{6+} y H_7L^{7+}) indican que adoptan una

conformación completamente extendida para minimizar la repulsión entre cargas positivas (figura 5.6 C).

A partir de los valores de los logaritmos de las constantes obtenidos con el programa HYPERQUAD¹⁵ se pueden calcular los diagramas de distribución con el programa HYSS²¹ y determinar qué especies se encuentran en disolución a un determinado valor de pH. En la figura 5.7 se muestran los diagramas de distribución para cada uno de los ligandos.

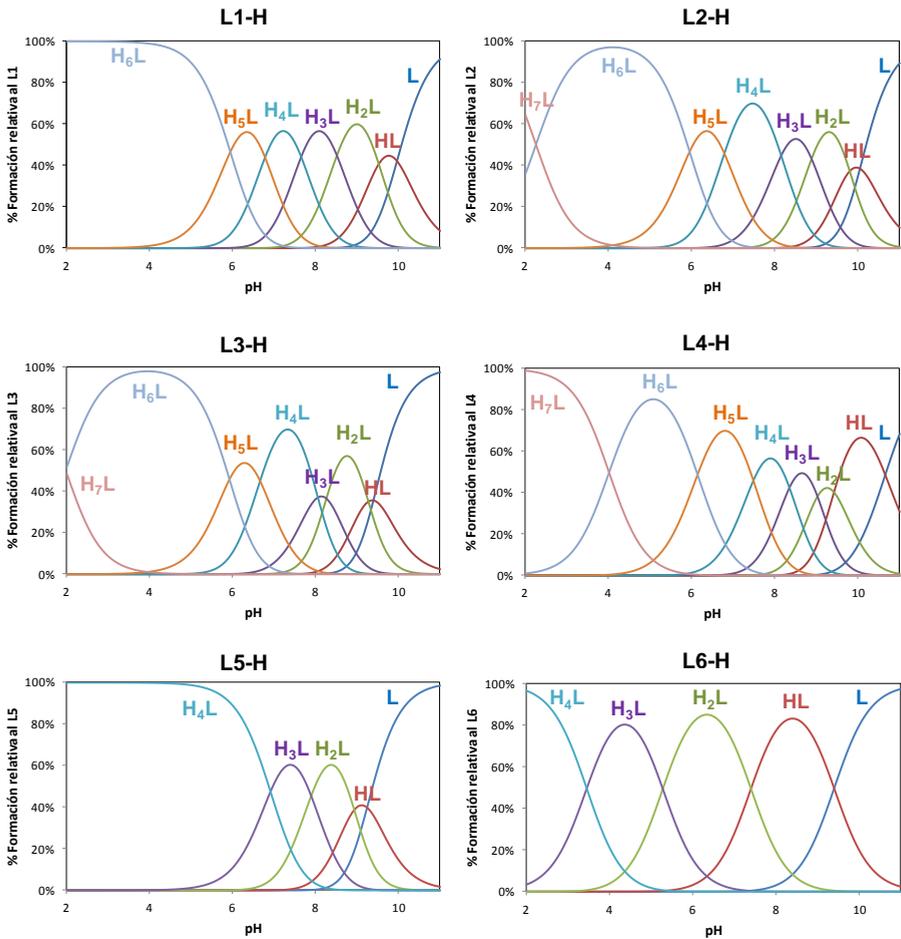


Figura 5.7.- Diagramas de distribución de los ligandos en disolución acuosa determinados en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

Las seis constantes altas de protonación observadas para **L1**, **L2**, **L3** y **L4** producen que la especie hexaprotonada empiece a predominar por debajo de pH ~ 6.0 para **L1** y entre 2.5-6.0 para **L2** y **L3**. La especie predominante para **L5** es la tetraprotonada por debajo de pH ~ 7.0. Sin embargo, para **L6** no hay ninguna especie que predomine significativamente en el rango de pH estudiado.

5.1.2.- Estudios UV-Vis

Las espectroscopias de emisión de fluorescencia y de absorción de UV-Vis son unas herramientas útiles para investigar los ligandos con unidades cromóforas, debido a la capacidad de proporcionar información espacial y temporal, a su especificidad del entorno de la molécula y a su alta sensibilidad. Los ligandos presentados en el trabajo contienen los grupos fenantrolina, bipyridina, piridina o esquaramida en su estructura y sus espectros de absorción y emisión dependen en gran medida del grado de protonación de estas unidades. El comportamiento ácido-base de los ligandos **L2**, **L3**, **L4** y **L6** se ha estudiado mediante métodos fotoquímicos.

Para conocer qué especie es la responsable de la absorción y/o de la emisión de un determinado compuesto, se han representado los máximos de las bandas de absorción o de emisión de fluorescencia conjuntamente con el diagrama de distribución de las diferentes especies protonadas obtenidas con los datos de potenciometría.²²

En primer lugar, el espectro de absorción de cada ligando se puede describir como el solapamiento de los espectros de absorción individuales de las unidades que absorben. Para los ligandos con unidades fenantrolina **L2**, **L4** y **L6**, los espectros de absorción de su forma libre (a pH básico > 7) se componen de dos bandas situadas a 269 y 231 nm respectivamente. La banda cuyo máximo se encuentra a 269 nm corresponde al solapamiento de las bandas de absorción de la fenantrolina y piridina, y la segunda banda situada a 231 nm corresponde a la piridina (figura 5.8).

Para los ligandos **L2**, **L4** y **L6** se advierten las mismas variaciones en el espectro de absorción con el pH. Al disminuir el pH desde 11.0 hasta 1.0 se observa como la banda situada a 267 nm disminuye y, simultáneamente, aparece una nueva banda situada a 279 nm que corresponde a la forma ácida o protonada de la fenantrolina. En todos los casos, se detecta un punto isobéptico a 272 nm (figura 5.8 A).

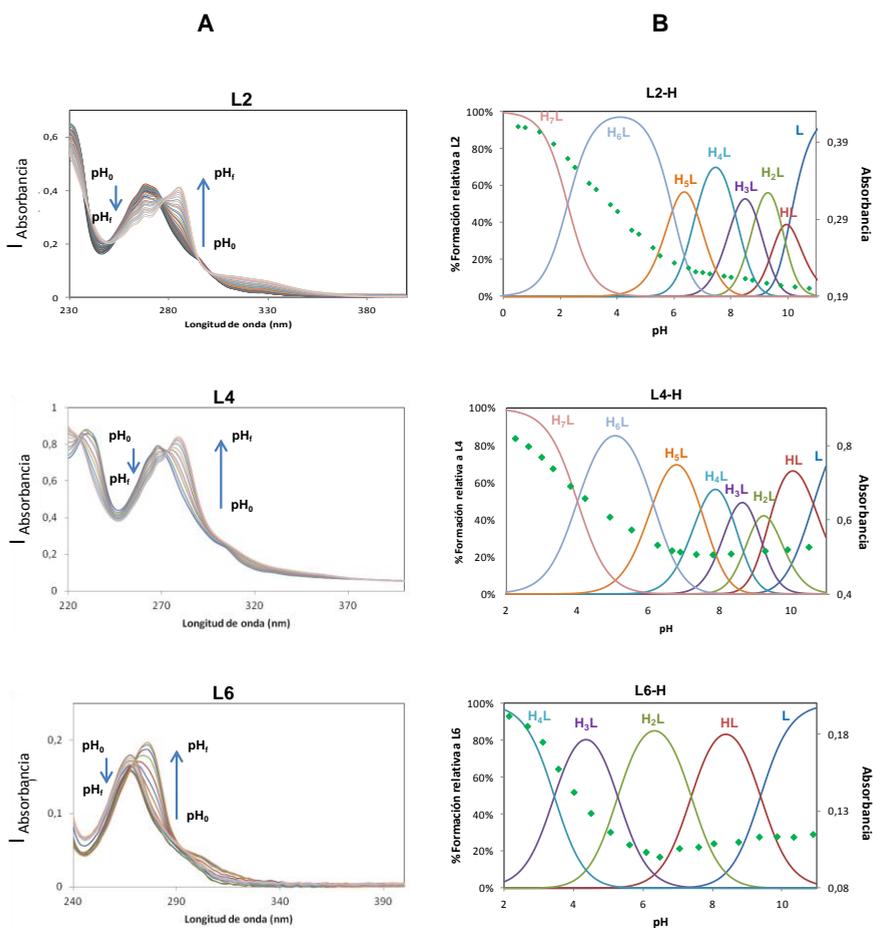


Figura 5.8.-A) Variación de los espectros de absorción UV-Vis de **L2**, **L4** y **L6** en función del pH. **B)** Curvas de valoración de la absorción de UV-Vis para **L2**, **L4** y **L6** junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas de cada ligando, donde el marcador (♦) representa un máximo de absorción a 279 nm.

En la figura 5.8 B se muestra el máximo de la banda situada a 279 nm, que corresponde a la forma ácida de la fenantrolina, representada junto con el diagrama de distribución molar de las especies obtenido mediante potenciometría para los ligando **L2**, **L4** y **L6**. Estas representaciones indican que la protonación de la fenantrolina se corresponde con la séptima especie para **L2** y **L4** y la cuarta para **L6**.

El espectro de absorción de **L3** en su forma desprotonada o libre presenta cuatro bandas centradas a 236, 260, 266 y 285 nm respectivamente. Las bandas situadas a 236 y 260 nm corresponden a las piridinas mientras que las bandas de 266 y 285 nm corresponden a la bipyridina (figura 5.9 A). Al pasar de pH 11.0 hasta pH 0.5, hay una disminución significativa de todas las bandas y, simultáneamente aparece una nueva banda a 305 nm atribuible a la forma ácida de la bipyridina.²³ Además, los espectros muestran cuatro puntos isobésticos a 226, 246, 257 y 293 nm respectivamente.

La representación de los máximos de las bandas situadas a 305, 284 y 274 nm indican que la formación de la especie heptaprotónada corresponde a la protonación de la bipyridina (figura 5.9, dcha).

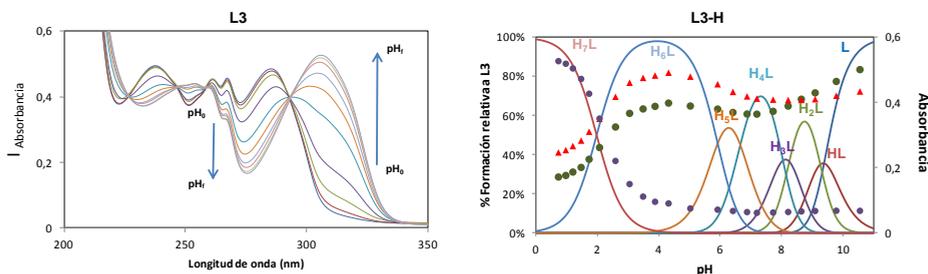


Figura 5.9.-Variación de los espectros de absorción UV-Vis de **L3** en función del pH (izda). Curvas de valoración de la absorción de UV-Vis para **L3** junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas de cada ligando (dcha), donde cada marcador representa las bandas a 274 (●), 288 (▲) y 305 (●) nm.

5.1.3.- Estudios de fluorescencia

Los ligandos **L1**, **L3** y **L5** contienen en sus estructuras anillos de piridina, bipyridina y esquamida respectivamente que no poseen fluorescencia, sin embargo los ligandos **L2**, **L4** y **L6**, contienen una unidad de fenantrolina y, por lo tanto, tienen fluorescencia.

Los espectros de emisión de fluorescencia obtenidos para **L2**, **L4** y **L6** son los característicos a la emisión de una fenantrolina, con dos bandas situadas a 377 y 396 nm respectivamente (figura 5.10 A). La intensidad de las bandas depende fuertemente del grado de protonación de los ligandos, sin embargo, la posición de las bandas no se ve afectada.

Al representar el máximo de fluorescencia junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas (figura 5.10 B) se observa como la intensidad de la fluorescencia es máxima al formarse la especie hexaprotonada para **L2** y **L4** y la especie triprotonada para **L6**. Así pues, la emisión de fluorescencia alcanza un máximo cuando todos los grupos amino secundarios están protonados en los ligandos. Este proceso se explica porque los electrones de los nitrógenos secundarios están bloqueados por estar enlazados con un protón, por lo que no se pueden producir procesos de transferencia electrónica fotoinducida (PET) y la fenantrolina emite debido a su imposibilidad de desactivarse mediante este proceso.

El segundo efecto es la disminución de la fluorescencia al acidificar el medio y formarse la especie heptaprotonada para **L2** y **L4** (pH < 2.0 y 4.0 aproximadamente) y la especie tetraprotonada para **L6** (pH < 4.0). Este efecto se atribuye a la protonación de la fenantrolina y su explicación fotoquímica es la estabilización del estado pobremente emisoro $n\pi^*$ con respecto al $\pi\pi^*$ en la protonación de la fenantrolina y que produce una inversión de estados, asociados a una disminución de la emisión de fluorescencia.²⁴

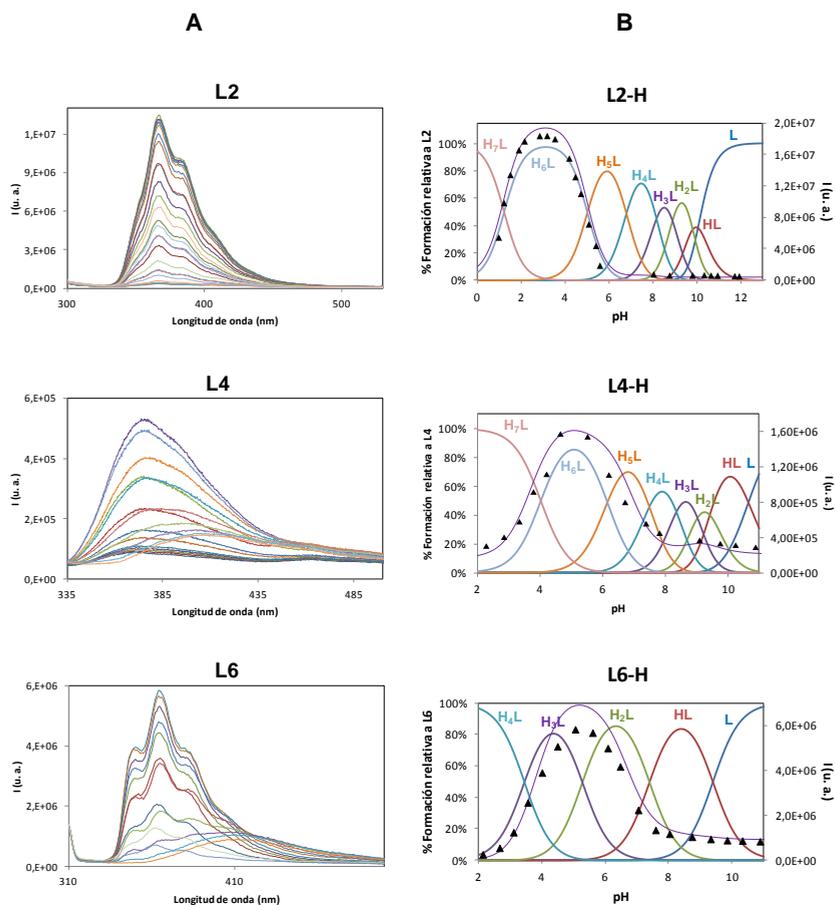


Figura 5.10.- A) Variación de los espectros de emisión de fluorescencia de **L2**, **L4** y **L6** en función del pH. B) Curvas de valoración de la emisión de fluorescencia para **L2**, **L4** y **L6** junto con los diagramas de distribución de las especies protonadas de cada ligando, donde (▲) indica el máximo de fluorescencia.

Mediante el programa HypSpec^{15,25} se calcularon las constantes de protonación asociadas a las variaciones de emisión de fluorescencia y absorción, resumidos en la tabla 5.3. En la tabla también se muestran las constantes obtenidas mediante potenciometría por motivos comparativos.

Las constantes de protonación de **L2**, **L3**, **L4** y **L6** obtenidas por potenciometría, UV-Vis y fluorescencia son del mismo orden, aunque difieren

ligeramente debido probablemente a la utilización de diferentes concentraciones entre técnicas y/o de la baja sensibilidad que muestra la técnica potenciométrica por debajo de pH 2.5. La única excepción corresponde a la constante de protonación obtenida por fluorescencia con respecto a las obtenidas por potencimetría y UV-Vis para **L2**, este hecho será probablemente debido a algún efecto fotoquímico como la formación de un excímero, aunque se requieren más experimentos para entender este comportamiento.

Tabla 5.3.- Logaritmos de las constantes de protonación obtenidas mediante técnicas potenciométricas, absorción UV-Vis y emisión de fluorescencia para **L2, L3, L4 y L6** determinados en NaCl 0.15 M a 298 ± 0.1 K.

Reaction ^a	L2	L3	L4	L6
Potencimetría	2.25(2) ^b	1.97(3)	4.0(1)	3.44(4)
UV-Vis	2.2(1)	2.25(1)	3.86(1)	3.6(1)
Fluorescencia	1.2(3)		3.9(2)	3.8(1)

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

5.2.- Estudios RMN y secuencias de protonación

Los estudios de potencimetría y fotoquímicos nos aportan los valores de las constantes de protonación mientras que la resonancia magnética nuclear (RMN) nos permite estudiar de forma cualitativa o cuantitativa la secuencia de protonación. Los espectros de ¹H RMN y ¹³C RMN dan información importante acerca del orden en el cual se protonan los centros básicos de la poliamina. Por lo tanto, el cambio en el desplazamiento químico (δ) en función del pH es el dato que nos informa de cuál es el centro que se ha protonado.

Con objeto de aportar información sobre la secuencia de protonación de los ligandos de este trabajo se han registrado los espectros de ¹H RMN a diferentes valores de pH y analizado sus desplazamientos.

Las señales más afectadas cuando una amina se protona son los átomos que se encuentran a dos enlaces de dicha amina, es decir, los hidrógenos de los carbonos en α y los carbonos en β .²⁶

La asignación de las distintas señales para cada ligando ha sido realizada teniendo en cuenta la bibliografía relacionada y los espectros registrados de correlación de RMN ^1H - ^1H (COSY) y ^1H - ^{13}C (HSQC). Los espectros de ^1H RMN de los ligandos **L1**, **L2**, **L3**, **L4** y **L5** tienen simetría binaria porque sus estructuras tienen un plano de simetría que pasa por la unidad central que une los macrociclos y las dividen en dos partes que son imágenes especulares. Por lo tanto, no se observarán todas y cada una de las señales de protón si no la mitad, reduciendo así el número de señales para cada ligando.

Para simplificar el análisis de los resultados y visualizar mejor las especies que contribuyen a cada desplazamiento químico se ha escogido una representación gráfica de los desplazamientos químicos a distintos valores de pH conjuntamente con el diagrama de distribución molar de las diferentes especies obtenidas mediante potenciometría.

5.2.1.- Secuencia de protonación del ligando L1.

En la figura 5.11 se representan los desplazamientos químicos de las señales de ^1H RMN a diferentes valores de pH junto con el diagrama de distribución obtenido mediante potenciometría y, en la figura 5.12 se indica la secuencia de protonación propuesta para **L1**. Las señales H1 y H9 se nombran bencílicas porque están situadas en posición α con respecto a un anillo aromático. Estas señales se encuentran en el carbono en β de la amina secundaria del brazo, además de en α del anillo aromático, lo que le proporciona una mayor sensibilidad cuando se protonan estas aminas con respecto al resto de señales. Asimismo, en nuestros ligandos las señales bencílicas son singuletes situadas entre 4.0 y 4.5 ppm, con lo cual son perfectamente visibles y no se solapan con ninguna otra señal. Por estas

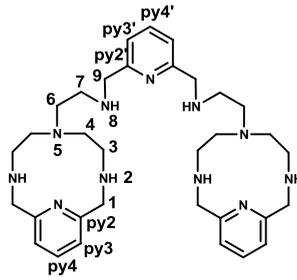
características, las señales bencílicas son las mejores referentes para analizar la protonación de los ligandos.

La señal bencílica H1, correspondiente al anillo aromático de la cavidad macrocíclica, experimenta un desplazamiento químico a campo bajo gradual y constante desde pD 12.0 hasta 7.0. Este intervalo de pD (7.0-12.0) corresponde a las cuatro primeras protonaciones del ligando. Además, la señal bencílica H9 situada en los brazos del ligando comienza a desplazarse a campo bajo a partir de pD ~ 8.0 y termina a pD ~ 6.0 cuando se forman las especies penta- y hexaprotonadas.

El hecho de que los desplazamientos químicos sean graduales y continuos indican que las protonaciones están compartidas por todos los centros protonables del ligando, es decir las aminas secundarias.

Sin embargo, las mayores variaciones de los desplazamientos químicos de las señales bencílicas en los intervalos de pD descritos anteriormente indican que las primeras cuatro protonaciones suceden mayoritariamente en los nitrógenos de la cavidad macrocíclica mientras que las dos últimas protonaciones ocurren mayoritariamente en los nitrógenos de los brazos.

Las señales alifáticas H3, H4, H6 y H7 están situadas junto a las aminas secundarias y se desplazan gradual y constantemente desde pD 12.0 (donde el ligando se encuentra totalmente desprotonado) a pD 6.0 (donde se encuentra la especie hexaprotonada) indicando que las seis protonaciones están compartidas por todas las aminas secundarias.



L1

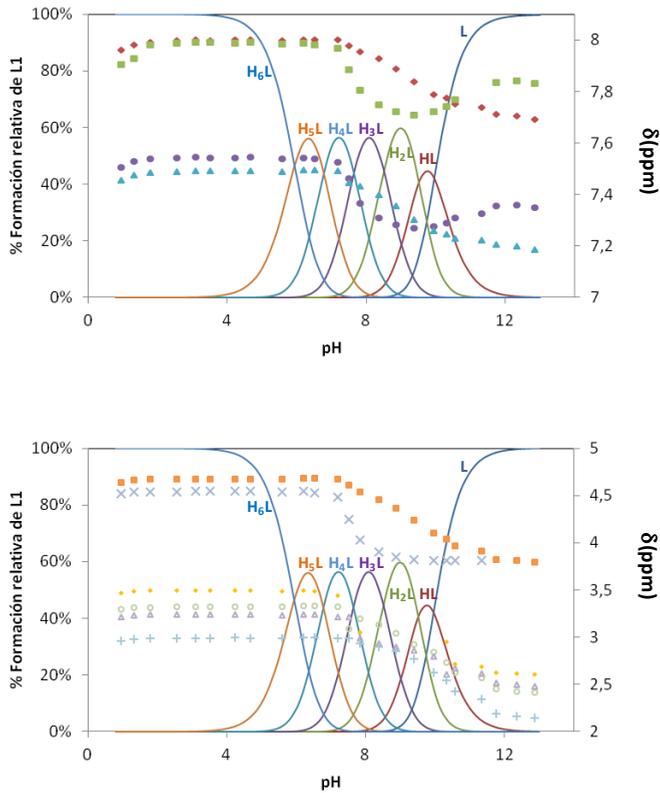


Figura 5.11.- Diagrama de distribución de las especies de L1 con los desplazamientos químicos δ (ppm) de sus espectros en D_2O a varios valores de pD. Las asignaciones de las señales son \blacklozenge py4 \blacksquare py4' \bullet py3' \blacktriangle py3 \times 1 \blacklozenge 9 \circ 3 \blacktriangle 6 +4.

Con respecto a las señales aromáticas de ^1H RMN de **L1**, las correspondientes a la piridina central, Hpy3' y Hpy4', muestran una variación tipo "barriga" (figura 4.11), donde primero experimentan un desplazamiento a campo alto desde pD 12.0 (desprotonado) hasta pD 9.5 (diprotonado) y, a partir de este valor de pD se desplazan hacia campo bajo hasta pD 6.0 donde se encuentra hexaprotonado. Este comportamiento es característico de un apilamiento primero entre la piridina central y las piridinas de los brazos y su posterior desapilamiento, como se ha observado en los estudios conformacionales. Además, las señales de ^1H RMN Hpy3' y Hpy4' experimentan un mayor desplazamiento químico ($\Delta\delta = 0.3$ ambos) al pasar de pD 8.9 a 6.5, en correspondencia con la formación de las especies penta- y hexaprotonada. Estos datos confirmarían que la quinta y sexta protonación ocurrirían preferentemente sobre las aminas secundarias de los brazos que se encuentran en α a la piridina central (figura 5.7).

Finalmente, las señales Hpy4 y Hpy3 se desplazan uniformemente a campo bajo desde la especie desprotonada (pD = 12.0) hasta la especie tetraprotonada (pD = 6.5), indicando que las cuatro primeras protonaciones corresponden mayoritariamente en los nitrógenos de las cavidades macrocíclicas, tal como se propuso con las señales alifáticas.

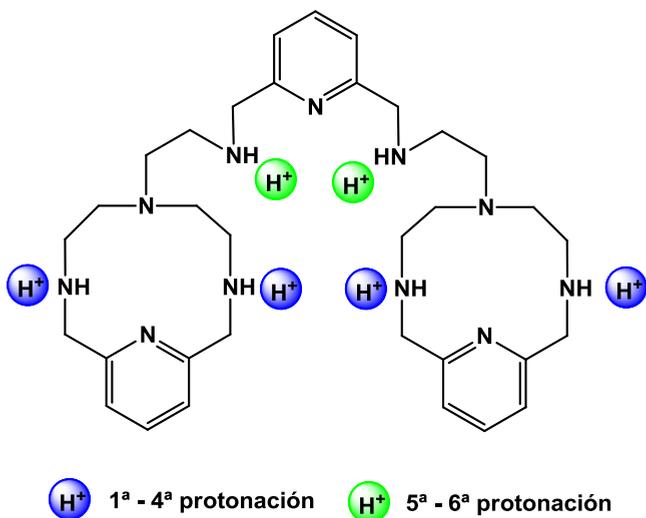


Figura 5.12.- Secuencia de protonación propuesta para **L1**.

5.2.2.- Secuencia de protonación de ligando L2.

La secuencia de protonación supuesta para el receptor **L2** se representa en la figura 5.13. En primer lugar, el ligando **L2** tiene siete constantes de protonación, en lugar de seis como sucedía para **L1**.

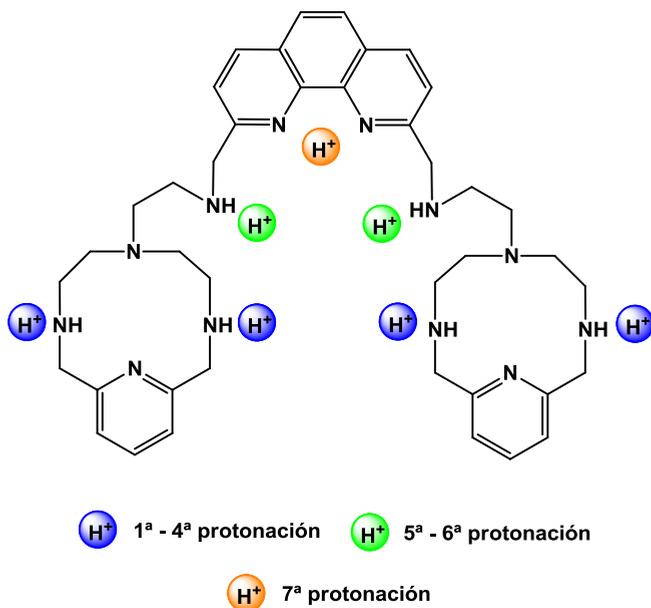


Figura 5.13.- Secuencia de protonación propuesta para **L2**.

Las señales bencílicas, H1 y H9, experimentan desplazamientos químicos de ^1H RMN a campo bajo al disminuir el pD dentro del intervalo de pD 13.0-6.0. Este hecho indica que los protones se encuentran compartidos por todos los centros protonables (las aminas secundarias) en las seis primeras protonaciones.

La mayor variación de desplazamiento químico de ^1H RMN entre las señales bencílicas corresponde a la señal H1 ($\Delta\delta = 1.1$ para H1 y 0.7 ppm para H9), lo cual sugiere que las primeras cuatro protonaciones suceden mayoritariamente en los cuatro nitrógenos secundarios de los macrociclos.

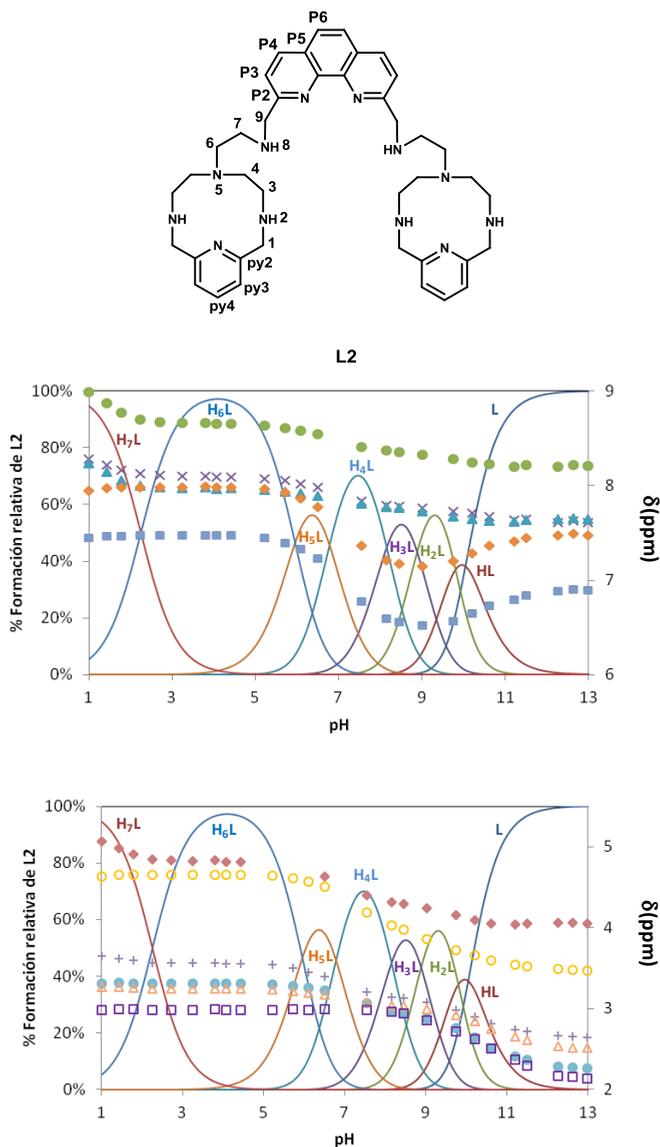


Figura 5.14.- Diagrama de distribución de las especies de **L2** con los desplazamientos químicos de sus espectros en D₂O a varios valores de pD. Las asignaciones de las señales son ●P4 ×P6 ▲P3 ◆py4 ■py3 ◆9 ○1 +7 ▲3 ●6 □4

Asimismo, las señales alifáticas de ¹H RMN H3, H4, H6 y H7 de **L2** se desplazan desde pD 13.0 (especie desprotonada) hasta pD 6.0 (especie

hexaprotonada) representadas en la figura 5.13, y confirmarían que los protones se encuentran compartidos en las seis primeras protonaciones.

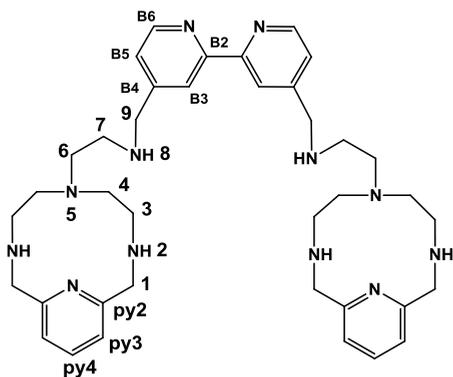
Las señales aromáticas de ^1H RMN de las piridinas de los macrociclos Hpy4 y Hpy5 muestran otra representación tipo “barriga” como para L1, donde se desplazan a campo alto desde pD 13.0 hasta 9.0 y a partir de este pD, donde está formada la especie triprotonada, se desplaza a campo bajo hasta pD 5.2, donde se forma la especie hexaprotonada. Este hecho se interpreta como un apilamiento y desapilamiento entre la fenantrolina y las piridinas, como se observó en los estudios conformacionales.

Con respecto a las señales aromáticas de ^1H RMN pertenecientes a la fenantrolina (HP6, HP4 y HP3) y a la señal bencílica más próxima a la fenantrolina (H9), estas se desplazan a campo bajo desde pD 10.0 hasta pD 3.0 gradual y constantemente, aunque al disminuir el pD por debajo de 3.0 hay un aumento en la variación del desplazamiento ($\Delta\delta = 0.4, 0.2, 0.3$ y 0.3 ppm para HP6, HP4, HP3 y H9). Puesto que en este intervalo de pD es donde se forma la especie heptaprotonada, se confirmaría que la séptima protonación sucedería en los nitrógenos del anillo de la fenantrolina.

5.2.3.- Secuencia de protonación de ligando L3.

El ligando L3 muestra unos desplazamientos químicos similares a L2 (figura 5.15). Ambas señales bencílicas (H1 y H9) experimentan un desplazamiento químico de ^1H RMN hacia campo bajo al bajar desde pD 10.0 (especie L) a 5.5 (especie H₆L). El desplazamiento continuo indica que las seis primeras protonaciones se encuentran compartidos por todas las aminas secundarias.

Se observa un desplazamiento químico de ^1H RMN de las señales aromáticas py4, py3 y de las alifáticas H3, H4, H6 y H7 a campo bajo gradual y constante al pasar desde pD 10.5 a 5.5, donde pasa el ligando de estar desprotonado a hexaprotonado, confirmando que las seis primeras protonaciones están compartidas por todas las aminas secundarias.



L3

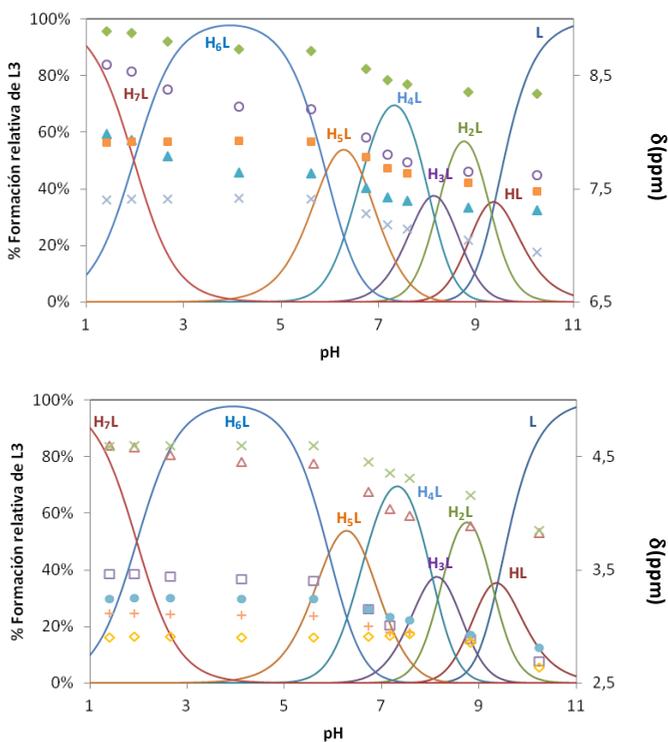


Figura 5.15.- Diagrama de distribución de las especies de L3 con los desplazamientos químicos de sus espectros en D_2O a varios valores de pD. Las asignaciones de las señales son \blacklozenge B6 \circ B3 \blacksquare py4 \blacktriangle B5 \times py3 \times 1 \triangle 9 \square 7 \bullet 3 $+$ 6 \diamond 4.

Las señales pertenecientes a la biperidina HB3, HB5 y HB6 experimentan un primer desplazamiento químico a campo bajo desde pD 7.5 (H₄L) a 5.5 (H₆L), lo cual puede interpretarse que la quinta y sexta protonación suceden mayoritariamente en las aminas secundarias de los brazos. El segundo desplazamiento de estas señales ocurre desde pD 4.0 (H₆L) a 1.0 (H₇L) señalando que la séptima protonación tiene lugar en la biperidina.

Finalmente, otro hecho a considerar es la inexistencia de una variación de las señales aromáticas tipo “barriga” como sucediera con los ligandos L1 y L2, indicando que no hay apilamiento entre las piridinas y la biperidina, probablemente por la disposición antiparalela que adopta la biperidina y que imposibilita una conformación adecuada para apilarse con las piridinas de los brazos.

La secuencia de protonación sería probablemente como indica la figura 5.16.

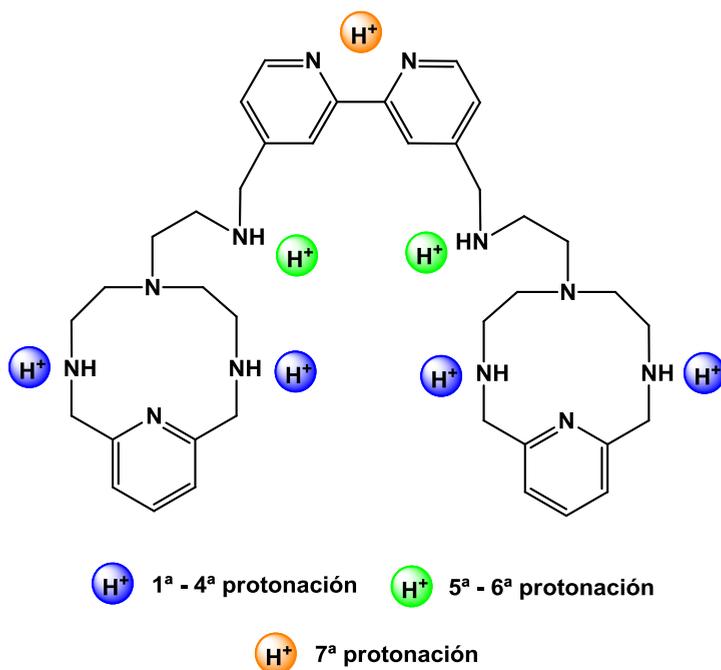


Figura 5.16.- Secuencia de protonación propuesta para L3.

5.2.4.- Secuencia de protonación de ligando L5.

El ligando **L5** tiene 4 sitios protonables, las cuatro aminas secundarias. Todas las señales de ^1H RMN se desplazan desde pD 10.0, donde la especie se encuentra desprotonada, hasta pD 5.0, donde se encuentra la especie tetraprotonada, indicando que los cuatro protones se comparten por las aminas secundarias (figura 5.17). Las señales aromáticas (py3 y py4) no poseen una variación tipo “barriga” como sucede con **L3**, lo que indica que **L4** no adopta una conformación en la cual se apilan las piridinas con la esquamida.

Debido a la experiencia en protonaciones de ligandos similares y a la separación de cargas para minimizar las repulsiones electrostáticas, en la secuencia propuesta para **L5** (figura 5.18) los dos primeros protones se situarían en los nitrógenos secundarios de cada uno de los macrocíclos y el tercer y cuarto protón se situarían en los grupos amino sin protonar en cada cavidad macrocíclica. Como se ha descrito anteriormente, esta secuencia se apoya en la diferencias entre los logaritmos de las constantes de protonación presentada en la tabla 5.2, donde la primera variación correspondiente a la entrada del segundo protón en brazos distintos ($\Delta\delta = 0.31$ ppm) es muy inferior a la entrada del tercer ($\Delta\delta = 1.0$ ppm) o cuarto protón ($\Delta\delta = 0.98$ ppm) debido a que cada brazo ya se encontraría protonado.

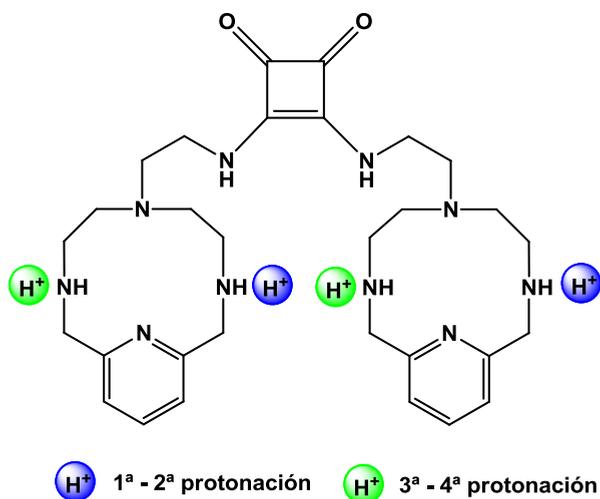


Figura 5.17.- Secuencia de protonación propuesta para L5.

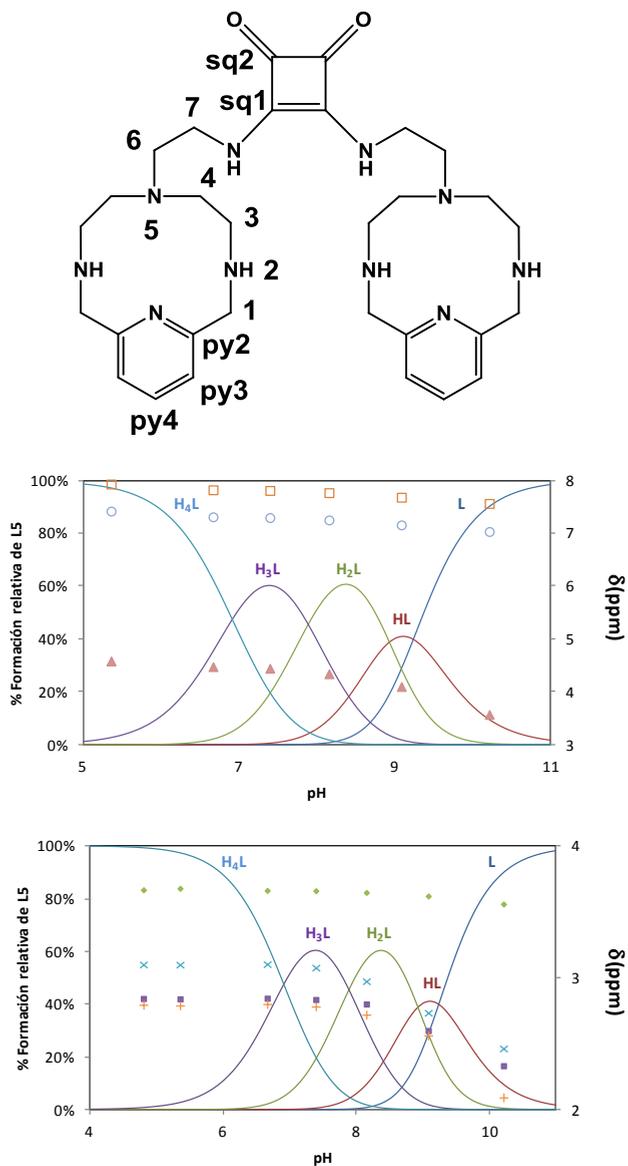


Figura 5.18.- Diagrama de distribución de las especies de L5 con los desplazamientos químicos de sus espectros en D₂O a varios valores de pD. Las

asignaciones de las señales son \square py4 \circ py3 \blacktriangle 1 \blacklozenge 7 \times 3 \blacksquare +4.

5.2.5.- Secuencia de protonación de ligando L6.

El ligando **L6** tiene menos sitios protonables que los anteriores ligandos dentro del intervalo de pH estudiado. En este caso, las señales bencílicas H1 y H2 se desplazan hacia campo bajo desde pD 11.0 hasta 5.0 indicando que los tres primeros protones se encuentran compartidos por las aminas secundarias.

Asimismo, las señales aromáticas Hpy4 y Hpy3 y alifáticas H3, H4, H6 y H7 se desplazan desde pD 12.0, donde se encuentra la especie desprotonada, hasta pD 4.9, donde se encuentra la especie triprotonada, indicando que las tres primeras protonaciones se comparten por las aminas secundarias del ligando.

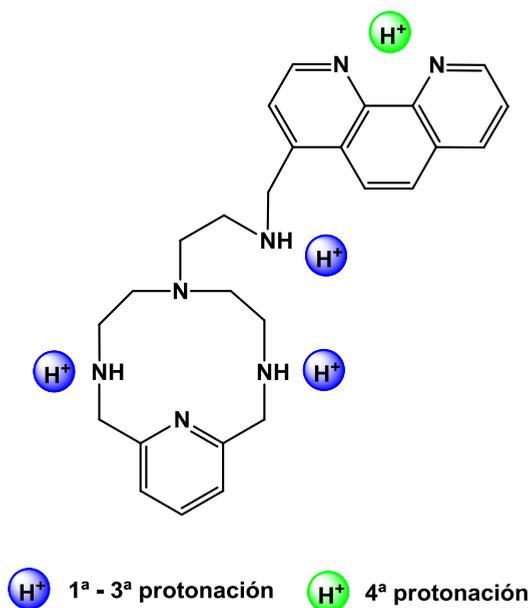


Figura 5.19.- Secuencia de protonación propuesta para L6.

Las señales aromáticas de la fenantrolina (P2, P3, P6, P7, P9, P10 y P11) experimentan un desplazamiento químico desde pD 6.3 a 2.7, donde prevalecen las especies triprotonada y tetraprotonada respectivamente,

sugiriendo que la cuarta protonación tiene lugar en la fenantrolina. La secuencia propuesta se representa en la figura 5.19.

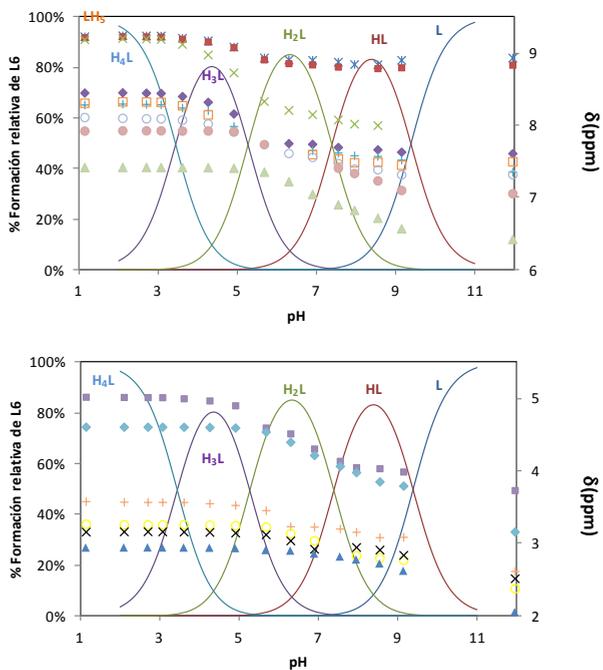
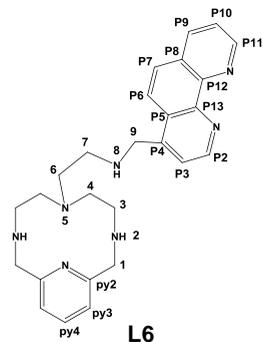
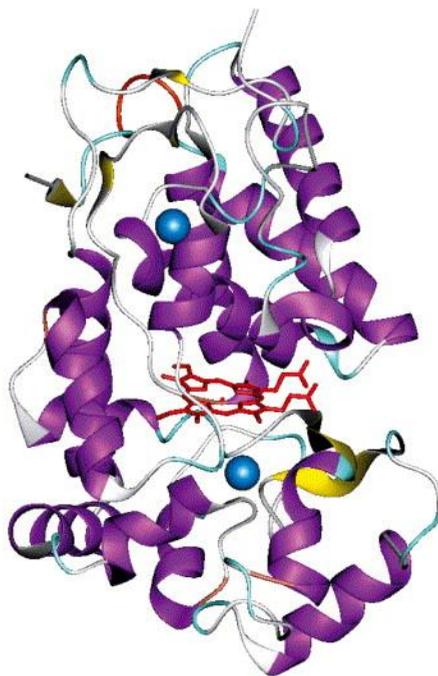


Figura 5.20.- Diagrama de distribución de las especies de **L6** con los desplazamientos químicos de sus espectros en D₂O a varios valores de pD. La asignación de las señales es xP11 ■P9 xP3 ♦P2 +P10 □P6 ○P7 ●py4 ▲py3 ■9 ◆1 +7 x3 ○6 ▲4.

- 1 http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1997/boyer-lecture.pdf.
- 2 E. F. Caldin y V. Gold, *Proton – Transfer Reactions*, 1975, Chapman and Hall, London.
- 3 a) G. Chang, R. H. Spencer, A. T. Lee, M. T. Barclay y D. E. Rees, *Science*, 1998, **282**, 2220; b) J. D. Lear, *FEBS Lett.*, 2003, **552**, 17; c) A. Sapranova, V. S. Bystrov y M. E. Green, *Front. Biosci.*, 2003, **8**, 1356; d) L. H. Pinto y R. A. Lamb, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, **5**, 629.
- 4 N. Sone, T. Hamamoto y Y. Kagawa, *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 2873.
- 5 H. C. Berg, *Ann. Rev. Biochem.*, 2003, **72**, 19.
- 6 a) V. Guallar, D. L. Harris, V. S. Batista y W. H. Miller, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 1430; b) J. H. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1970, **66**, 874; c) C. J. Chang, M. C. Y. Chang, N. H. Damrauer y D. G. Nocera, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 2004, **1665**, 13.
- 7 Y. Zhao, Z. Li, S. Kabehie, Y. Y. Botros, J. F. Stoddart y J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 13016.
- 8 R. Casasús, M. D. Marcos, R. Martínez-Máñez, J. V. Ros-Lis, J. Soto, L. A. Villaescusa, P. Amorós, D. Beltrán, C. Guillem y J. Latorre, *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **126**, 8612.
- 9 M. T. Albelda, P. Diaz, E. Garcia-Espana, M. A. Bernardo, F. Pina, J. Seixas de Melo, C. Soriano y S. V. Luis, *Chem. Commun.*, 2001, **16**, 1520.
- 10 A. Bencini, A. Bianchi, E. García-España, M. Micheloni y J. A. Ramírez, *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **188**, 97.
- 11 a) B. Dietrich, M. W. Hosseini, J. -M. Lehn y R. Sessions, *Helv. Chim. Acta*, 1983, **66**, 1262; b) E. García España y S. V. Luis, *Supramol Chem.*, 1996, **6**, 257.
- 12 a) J. I. Brauman y L. K. Blair, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 6561; b) J. I. Brauman, J. M. Riveros y L. K. Blair, *J. Am. Chem. Soc.*, 1971, **93**, 3914.

- 13 a) J. E. Huheey, *Inorganic Chemistry*, 2nd edition, 1978, p. 269, Harper & Row, New York. b) G. L. Meissler y D. A. Tarr, *Inorg. Chem.*, 1991, p. 189. Prentice – Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- 14 a) Y. Zhang y P. S. Cremer, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 658; b) F. Hofmeister, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1988, **24**, 247.
- 15 P. Gans, A. Sabatini y A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739.
- 16 E. García-España, P. Diaz, J. M. Llinares y A. Bianchi, *Coord. Chem. Rev.*, 2006, **250** (23+24), 2952.
- 17 a) V. Amendola, G. Bergamaschi, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi y M. Milani, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 4368; b) E. W. Neuse y B. R. Green, *J. Org. Chem.*, 1974, **39**, 3881.
- 18 a) G. Ambrosini, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini y P. Rossi, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 702; b) E. Sanna, L. Martinez, C. Rotger, S. Blasco, J. González, E. García-España y A. Costa, *Org. Lett.*, 2010, **12** (17), 3840.
- 19 a) C. Lodeiro, J. A. Parola, F. Pina, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, A. Masotti y B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2001, **40** (13), 2968; b) J. González, J. M. Llinares, R. Belda, J. Pitarch, C. Soriano, R. Tejero, B. Verdejo y E. García-España, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8** (10), 2367; c) J. Pina, J. S. de Melo, F. Pina, C. Lodeiro, J. C. Lima, A. J. Parola, C. Soriano, M. P. Clares, M. T. Albelda, R. Aucejo y E. García-España, *Inorg. Chem.*, 2005, **44** (21), 7449; d) M Arca, A. Bencini, E. Berni, C. Caltagirone, F. Devillanova, F. Isaia, A. Garau, C. Giorgi, V. Lippolis, A. Perra, L. Tei y B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2003, **42** (21), 6929.
- 20 a) A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, B. Wang, D. A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C. Schafmeister, J. W. Caldwell, W. S. Ross y P. A. Kollman, *AMBER 8*, 2004, University of California, San Francisco; b) J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell, P. A. Kollman y D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1157.

- 21 P. Gans, *Program to determine the distribution of species in multiequilibria systems from the stability constants and mass balance equations*.
- 22 a) M. A. Bernardo, S. Alves, F. Pina, J. Seixas de Melo, M. T. Albelda, E. García-España, J. M. Llinares, C. Soriano y S. V. Luis, *Supramol. Chem.*, 2001, **13**, 435; b) M. T. Albelda M. A. Bernardo, P. Diaz, E. García-España, J. Seixas de Melo, F. Pina, C. Soriano y S. V. Luis; *Chem Commun.*, 2001, 1520.
- 23 C. Lodeiro, J. A. Parola, F. Pina, C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, A. Masotti y B. Valtancoli, *Inorg. Chem.*, 2001, **40** (13), 2968.
- 24 a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, V. Fusi, B. Valtancoli, M. A. Bernardo y F. Pina, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 3806; b) A. Bencini, M. A. Bernardo, E. García-España, C. Giorgi, S. V. Luis, F. Pina y B. Valtancoli, *Advances in Supramolecular Chemistry*, ed. G. Gokel, 2002, **8**, 79.
- 25 P. Gans, A. Sabatini y A. Vacca, *Annali di Chimica*, 1999, **89**, 45.
- 26 a) J. E. Sarnesky, H. L. Surprenant, F. K. Molen and C. N. Reiley, *Anal. Chem.*, 1975, **47**, 2116; b) C. Frassinetti, S. Gheli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi y A. Vaca, *Anal. Biochem.*, 1995, **231** (2), 374; c) C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vaca y S. Gheli, *Anal. Biochem.*, 2003, **376** (7), 1041; d) S. P. Dagnall, D. N. Hague, M. E. McAdam y A. D. Moreton; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1985, **81** (6), 1483; e) D. N. Hague y A. D. Moreton; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1994, 265.



Estructura de rayos X de la enzima peroxidasa del rábano¹

What is the final goal of enzyme research? The first stage is to investigate the entire steric constitution of all enzymes - a nice little job!

Hugo Theorell, premio Nobel de fisiología y medicina en 1955 por su trabajo sobre la naturaleza y modo de acción de enzimas oxidasas.

Capítulo 6.- Química de Coordinación Catiónica de Ligandos Politópicos

6.1.- Introducción a la química de coordinación catiónica

La primera aplicación de la química supramolecular fue el desarrollo de sistemas ionóforos macrocíclicos que transportaban iones metálicos a través de medios no polares.^{2,3} Esta habilidad sigue siendo de gran interés actualmente aunque se han desarrollado otras muchas aplicaciones durante los últimos 30 años. Entre ellas, una de las más importantes y que guarda una mayor relación con el trabajo desarrollado en esta tesis es el diseño de complejos metálicos que mimetizan centros activos de enzimas.⁴

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que catalizan reacciones bioquímicas. Son generalmente proteínas globulares que presentan tamaños muy variables y sus actividades vienen determinadas por su estructura tridimensional. Las enzimas requieren, en su mayoría de la unión de moléculas no proteicas denominadas cofactores para ejercer su actividad. Los cofactores pueden ser compuestos inorgánicos, como iones metálicos o compuestos orgánicos. A las enzimas que poseen iones metálicos en sus estructuras se las denominan *metaloenzimas*. En la figura 6.1 se muestra la estructura de rayos X de una enzima con ambos tipos de cofactores, la alcohol deshidrogenasa con un ión Zn^{2+} y un NAD.⁵

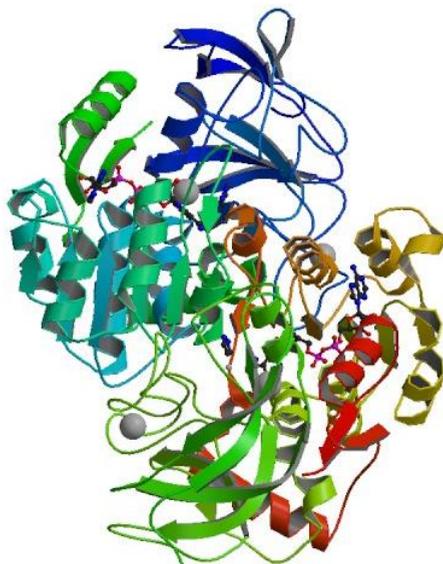


Figura 6.1.- Estructura de rayos X de la alcohol deshidrogenasa (ADH1A)

La importancia de las enzimas se pone de manifiesto en el hecho de que una enfermedad letal puede ser causada por el mal funcionamiento de un único tipo de enzima de todos los tipos que existen en nuestro cuerpo. Existe un fuerte control de la actividad enzimática y de la homeostasis de los iones metálicos de los centros activos de las enzimas, puesto que cualquier fallo en el funcionamiento (mutación, deleción, incremento o reducción de la expresión) de una única enzima crítica puede conducir al desarrollo de una enfermedad genética.

Las enzimas se clasifican según el tipo de reacción que catalizan en:

1. Oxido-reductasas (reacciones de oxido-reducción).
2. Transferasas (transfieren grupos funcionales).
3. Hidrolasas (reacciones de hidrólisis).
4. Liasas (reacciones de adición a los dobles enlaces).
5. Isomerasas (reacciones de isomerización).
6. Ligasas (formación de enlaces con consumo de ATP).

Una característica recurrente en el centro activo de muchas *metaloenzimas* es que presentan uno o varios iones metálicos que se encuentran coordinativamente insaturados. La presencia de posiciones vacantes o de ligandos lábiles en la esfera de coordinación de los iones metálicos permite fijar distintos sustratos induciendo su transformación. Por otro lado, en centros multinucleares, los iones pueden cooperar en el reconocimiento y/o la activación de un determinado sustrato.⁶

A lo largo de la evolución, la naturaleza ha optimizado tanto la estructura del centro activo de estas *metaloenzimas* como la especificidad de los distintos iones metálicos para obtener la necesaria selectividad en las reacciones que tienen lugar en los procesos biológicos. De hecho, la eliminación de uno o ambos iones metálicos del centro activo conduce generalmente, a una menor actividad o total inactivación de la enzima.

Por lo tanto, una de las ideas básicas en el diseño de ligandos sintéticos para el desarrollo de modelos enzimáticos, es la generación de centros metálicos polinucleares coordinativamente insaturados capaces de interaccionar con diferentes sustratos. El sustrato se coordinará con el metal

formando un complejo ternario a través de las posiciones vacantes en la esfera de coordinación del metal o desplazando alguno de los átomos coordinantes facilitando así la transformación del sustrato en los productos de reacción.

En las *metaloenzimas* esta insaturación coordinativa se consigue con la ayuda del esqueleto polipeptídico, pero en ligandos sintéticos la idea es impedir que se complete la esfera de coordinación con la propia estructura del receptor. En este sentido, la introducción de espaciadores aromáticos en ligandos poliamínicos puede ser útil gracias a su capacidad para alejar a los átomos dadores más próximos al espaciador, asegurando que la primera esfera de coordinación del ión metálico no se sature.

En el presente trabajo se han diseñado ligandos que tienen en su estructura un gran número de grupos amino y cabe la posibilidad que interaccionen con varios iones metálicos simultáneamente, actuando como miméticos enzimáticos politópicos multinucleares. Asimismo, los ligandos poliamínicos se caracterizan por ser normalmente receptores solubles en agua, capaces de coordinar metales cuando disponen de un suficiente número de grupos amino desprotonados. En el presente capítulo se muestran los resultados referentes a la formación de complejos metálicos de Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} con los diferentes ligandos. Se han escogido estos metales porque son algunos de los principales iones metálicos encontrados como cofactores.

Se ha estudiado en los cinco primeros apartados la interacción de los ligandos con los metales Zn^{2+} , Cu^{2+} y Mn^{2+} respectivamente en el orden en el que fueron sintetizados. Aunque para algún ligando no se han completado todos los estudios, está planificado terminarlos en un futuro próximo. En los últimos apartados se trata sobre la aplicación de los complejos metálicos de Cu^{2+} y Mn^{2+} como miméticos de la enzima SOD.

6.2.- Estudios con Zn^{2+}

El zinc no fue reconocido como un metal hasta el siglo XIV en India, aunque se han descubierto ornamentos de aleaciones con zinc con más de 2500 años de antigüedad. Tras su descubrimiento, se utilizó como moneda o

medicamento (bálsamo anti-hongos) por China y Persia entre los siglos XIV y XVII.⁷ En Europa no fue hasta el siglo XVI cuando *Georgius Agricola* informó de la obtención de un metal blanco (el posteriormente conocido como zinc) en el proceso de extracción de plomo y plata en el norte de Alemania.⁸ Sin embargo, fue *Paracelsus* el primer europeo quien aclaró que el zinc (*zincum*) era un nuevo metal y que sus propiedades diferían de los restantes metales conocidos.⁹ Desde entonces el zinc se utiliza en numerosas aplicaciones industriales, como la galvanización del acero para protegerlo de la corrosión o la producción de aleaciones como el latón y el bronce.

No obstante, no fue hasta mediados del siglo XX cuando el zinc se calificó como un oligoelemento metálico esencial para el ser humano y la mayoría de los seres vivos. Es también uno de los más abundantes en un humano adulto con alrededor de 2~3 g. Durante los últimos 70 años se ha establecido el diferente papel que el zinc juega en los procesos biológicos:¹⁰ reconocimiento de ácidos nucleicos, transmisión de las señales neurológicas, centros catalíticos enzimáticos, etc.¹¹

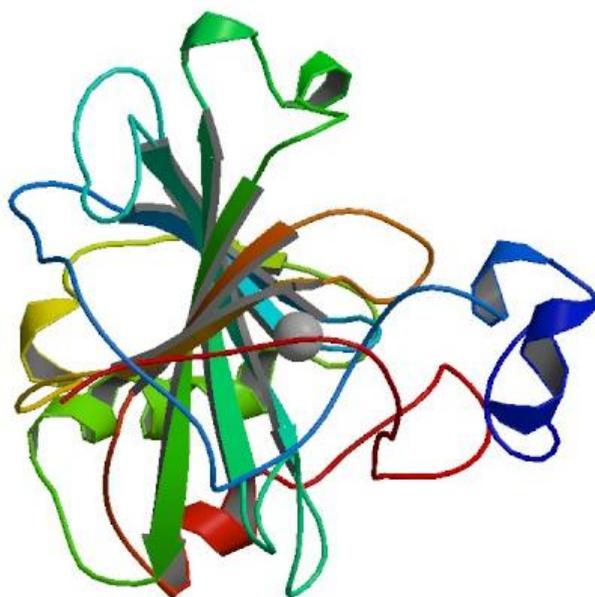


Figura 6.2.- Estructura de rayos X de la anhidrasa carbónica.¹²

El primer papel biológico del zinc se descubrió en 1940 cuando se reveló la necesidad de la presencia del zinc para activar la anhidrasa carbónica (figura 6.2).¹³ Tras este hallazgo, se han caracterizado numerosas enzimas con zinc.¹⁴ En la mayoría de estas enzimas el zinc está directamente implicado en la catálisis, interaccionando con el sustrato y produciendo su transformación. En otras enzimas su papel es meramente estructural, determinando su estructura tridimensional final y en algunos casos, regulando su actividad catalítica y/o selectividad.

El papel del zinc en los factores de transcripción no fue propuesto hasta 1983 por Hanas *et al.*¹⁵ para el TFIIIA (factor de transcripción IIIA de la *Xenopus laevis*), donde encontró pequeños dominios de zinc, llamados “dedos de zinc”, que estaban involucrados en la regulación genética.¹⁶ Posteriormente, se ha visto que este motivo estructural se encuentra en una amplia variedad de estructuras tridimensionales proteicas caracterizadas por la coordinación de uno o más iones zinc que estabilizan un plegamiento característico.

La mayoría funcionan como reguladores de la interacción entre proteínas y ácidos nucleicos y una alteración en la estructura del *dedo de zinc* produce una variación de la selectividad para enlazarse a las proteínas (figura 6.3).

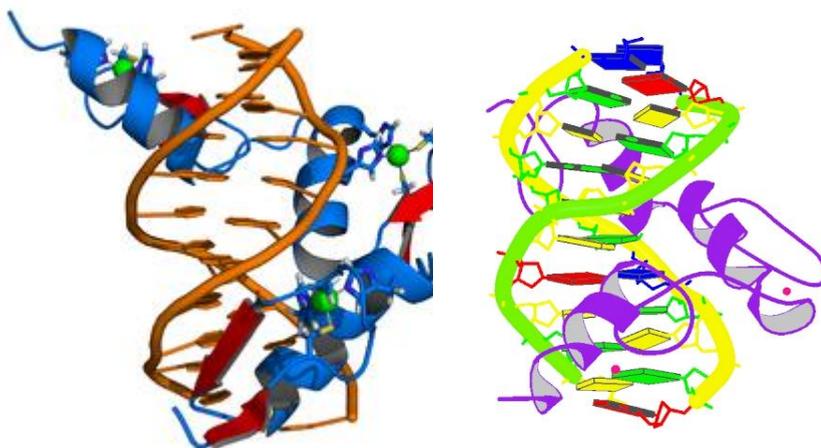


Figura 6.3.- Estructura de rayos X de varios dedos de zinc formando un complejo con ADN (1A1G, Zif268).¹⁷

Además de estas funciones, el zinc interviene como modulador de la transmisión sináptica, en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos, estimula la actividad de numerosas enzimas, colabora en el buen funcionamiento del sistema inmunitario, es necesario para la cicatrización de las heridas, interviene en las percepciones del gusto y el olfato, en la síntesis del ADN y se encuentra en la insulina.

El zinc se ha convertido en el transcurso de la evolución como uno de los metales de transición más abundantes en los seres vivos. Su importancia deriva de su configuración electrónica $3d^{10}$, que le confiere unas características especiales. Esta configuración electrónica tiene 4 consecuencias muy importantes:

1. El zinc (Zn^{2+}) no tiene energía de estabilización de campo cristalino cuando se coordina a ligandos en cualquier geometría.¹⁸
2. Según la teoría ácido-base de Pearson, el Zn^{2+} se clasifica como un ácido intermedio.¹⁹ Por ello, el Zn^{2+} puede interaccionar fuertemente con una variedad de ligandos, como el azufre de la cisteína, el nitrógeno de la histidina y el oxígeno del glutamato, aspartato y agua.
3. El zinc divalente no tiene comportamiento redox en condiciones fisiológicas, ni el potencial de la forma oxidada (Zn^{3+}) ni el potencial de la forma reducida (Zn^+) son accesibles bajo estas condiciones.²⁰
4. Finalmente, el Zn^{2+} es relativamente lábil en términos cinéticos, es decir, experimenta reacciones de intercambio de ligandos relativamente rápidas.²¹

Estas propiedades son las responsables de la presencia del Zn^{2+} en una gran variedad de dominios proteicos y que se van a discutir detalladamente a continuación. Con respecto a la mayoría de las *metaloenzimas*, éstas utilizan el zinc como centro catalítico que actúa esencialmente como ácido de Lewis. La bioselección del zinc para desempeñar un papel de ácido de Lewis se debe a las propiedades químicas intrínsecas, descritas anteriormente, que lo

hacen más adecuado que otros iones metálicos esenciales como Ca^{2+} , Mg^{2+} o los iones M^{2+} de transición.

En primer lugar, de todos estos iones metálicos, el Zn^{2+} es, junto con el Cu^{2+} y Ni^{2+} , el ácido de Lewis más efectivo. Además, a diferencia del Cu^{2+} o Ni^{2+} , no presenta actividad redox ya que sólo presenta un estado de oxidación. Sólo este motivo ya sería suficiente para que el Zn^{2+} sea preferido, por ciertos sistemas biológicos, frente al Cu^{2+} o Ni^{2+} , ya que se elimina el riesgo de que se generen radicales libres.

Asimismo se deben de considerar las preferencias estructurales del ión metálico. El Zn^{2+} no presenta efectos de estabilización del campo de los ligandos y, por lo tanto, no tendrá una preferencia por un número de coordinación determinado. El número de coordinación del zinc, casi siempre 4 o 5 en sus *metaloenzimas*, así como su estereoquímica, serán determinados por la carga y el tamaño de los ligandos. En sus complejos simples, el zinc presenta números de coordinación 4, 5 y 6, siendo la más habitual la tetracoordinación. Sin embargo, a diferencia de otros iones metálicos la barrera de interconversión entre la coordinación cuatro, cinco y seis es muy pequeña. Esta flexibilidad en cuanto al número de coordinación es una característica muy importante debido a las restricciones estructurales impuestas por la propia proteína.

Por otro lado, el zinc, en sus *metaloenzimas*, se encuentra por lo general fuertemente unido a las cadenas laterales de la proteína, de donde resulta difícil de extraer. Al ser un ácido intermedio, el zinc presenta una elevada afinidad por dadores intermedios como el átomo de nitrógeno de histidina, así como por átomos dadores blandos como el azufre de metionina o tiolato de cisteína, e incluso por dadores duros como el carboxilato. También es capaz de unirse a grupos carbonilo, tanto de la propia proteína como de sustratos e inhibidores.

Mientras que el zinc se encuentra fuertemente retenido por la proteína y forma enlaces cinéticamente inertes, presenta al mismo tiempo la característica de que los ligandos no proteicos, incluida el agua, son cinéticamente lábiles. De hecho, no sólo las reacciones de canje de ligando son rápidas, sino también las redistribuciones intramoleculares del ligando.

Como ya se ha indicado, en los enzimas de zinc el ión metálico normalmente presenta número de coordinación cuatro o cinco y, en muchas de estas metaloenzimas, existe una molécula de agua coordinada que es lábil. El sustrato se puede unir al zinc sustituyendo a la molécula de agua o aumentando el índice de coordinación. De esta forma, el zinc puede actuar como ácido de Lewis activando directamente al sustrato mediante la polarización de un enlace del grupo coordinado.

Todo este conjunto de características que presenta el zinc favorecen una elevada actividad catalítica, ya que se permiten la unión rápida de sustrato, su activación, cambios en la unión de especies intermedias y una rápida disociación de los productos formados.

Debido a las características del zinc y de su empleo por diversos procesos biológicos se han desarrollado en los últimos años un gran número de sistemas supramoleculares para la detección y cuantificación del Zn^{2+} en los seres vivos, la preparación de modelos enzimáticos sintéticos como la anhidrasa carbónica o para desarrollar matrices de *dedos de zinc* que se enlazan específicamente a factores transcripcionales.

Tras analizar la importancia y las principales características del Zn^{2+} , en esta tesis se ha estudiado su coordinación con los ligandos preparados mediante técnicas potenciométricas, espectroscópicas de RMN, rayos X y fotoquímicas cuyos resultados se explican a continuación.

6.2.1.- Estudios de coordinación con Zn^{2+}

Los estudios de la interacción con Zn^{2+} de los ligandos se inician con la determinación de las constantes de formación de los complejos mediante técnicas potenciométricas. Para ello, se utilizan las mismas condiciones de trabajo que para los estudios de protonación, es decir, en disolución acuosa con NaCl 0.15 M como fuerza iónica y temperatura constante de 298.0 K.

En primer lugar, en las tablas 6.1 y 6.2 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad globales y sucesivas para la interacción de los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L6** con el Zn^{2+} obtenidas mediante esta técnica.

Tabla 6.1.- Logaritmos de las constantes de estabilidad globales para la interacción de los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L6** con Zn^{2+} determinadas en NaCl 0.15 M y a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción	L1	L2	L3	L6
$4H + Zn + L \rightleftharpoons ZnH_4L^a$	45.26(2) ^b	45.43(1)	43.53(1)	
$3H + Zn + L \rightleftharpoons ZnH_3L$	41.00(5)	41.82(1)	38.34(3)	
$2H + Zn + L \rightleftharpoons ZnH_2L$	36.77(5)	35.54(4)	31.84(4)	
$H + Zn + L \rightleftharpoons ZnHL$	29.10(8)	27.06(3)	23.96(5)	17.93(6)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnL$	19.81(8)	16.90(7)	13.83(5)	12.59(5)
$Zn + L + H_2O = ZnL(OH) + H$			3.18(5)	3.52(5)
$Zn + L + 2H_2O = ZnL(OH)_2 + 2H$				-6.95(5)
$Zn + 2L + 2H \rightleftharpoons ZnH_2L_2$				34.27(6)
$2H + 2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2H_2L$			39.08(3)	
$H + 2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2HL$	36.99(2)	37.49(1)	34.46(5)	
$2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2L$	32.16(2)	33.12(1)	28.21(8)	17.59(7)
$2Zn + L + H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH) + H$	22.97(5)	23.07(2)	19.3(1)	1.47(9)
$2Zn + L + 2H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH)_2 + 2H$		11.2(1)	9.28(5)	
$3Zn + L \rightleftharpoons Zn_3L$			33.91(5)	
$3Zn + L + H_2O \rightleftharpoons Zn_3L(OH) + H$			24.95(1)	
$3Zn + L + 2H_2O \rightleftharpoons Zn_3L(OH)_2 + 2H$		20.46(2)	16.81(6)	
$3Zn + L + 3H_2O \rightleftharpoons Zn_3L(OH)_3 + 3H$	11.56(3)	11.50(3)	7.29(7)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

El análisis de los datos potenciométricos muestra que, dependiendo de la relación molar empleada, para todos los ligandos se forman tanto especies mononucleares como binucleares. En el caso de los ligandos **L1**, **L2** y **L3**, que contienen más grupos amino en la estructura, se forman incluso especies trinucleares con relación molar M:L 3:1. La estequiometría correspondiente a las especies mononucleares es $[\text{ZnH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$ donde los valores de x van de 0 a 4 para **L1** y **L2**, de -1 a 4 para **L3** y de -2 a 1 para **L6**. Para los complejos binucleares se detectan especies de estequiometría $[\text{Zn}_2\text{H}_x\text{L}]^{(4+x)+}$ con valores de x que van de -2 a 1 para **L2** y **L3**, de -1 a 1 para **L1**, y desde -1 hasta 0 para **L6**. Además, para los sistemas binarios M:**L6** se detecta adicionalmente una especie de estequiometría $[\text{Zn}_2\text{H}_2\text{L}_2]^{2+}$. Con respecto a los complejos trinucleares, se detectan especies de estequiometría $[\text{Zn}_3\text{H}_x\text{L}]^{(6+x)+}$ con valores de x entre 0 y -3 para **L3**, de -2 a -3 para **L2** y únicamente se forma una especie trinuclear trihidroxilada para **L1** (tabla 6.1).

Mediante el programa HYSS²² y los valores de las constantes obtenidos en la tabla 6.1 se calculan los diagramas de distribución con distintas relaciones molares M:L y mostrados en las figuras 6.4 y 6.5.

Para la interacción de Zn^{2+} con **L1** y **L2** en relación molar M:L 1:1 las especies mononucleares predominan en todo el intervalo de pH estudiado (2.5-10.0, figuras 6.4 a y b respectivamente), aunque para el ligando **L2** la especie binuclear Zn_2L^{4+} se forma hasta un 35% entre pH 5.0 y 9.0. Con respecto a la interacción de **L3** con Zn^{2+} con la misma relación molar (M:L 1:1), coexisten las especies mononucleares y las binucleares en todo el rango de pH (figura 6.5 a), predominando estas últimas. Para concluir con los diagramas de distribución para la interacción de Zn^{2+} con **L6** en relación equimolar, se observa como las especies binucleares predominan en el intervalo de pH 4.0-6.0, mientras que las especies mononucleares predominan por encima de pH 6.0 (figura 6.5 b).

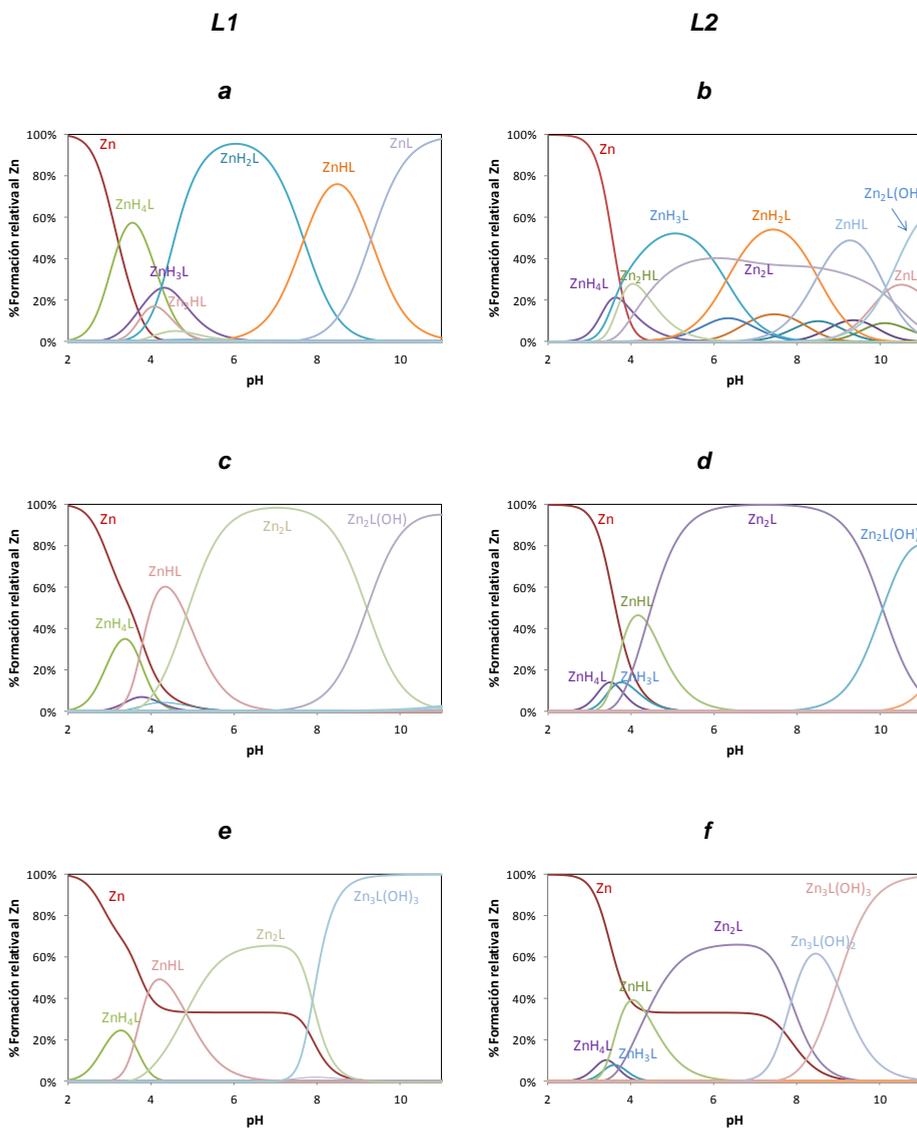


Figura 6.4.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos **L1** y **L2** con Zn^{2+} en relaciones molares M:L 1:1 (a y b), 2:1 (c y d) y 3:1 (e y f) respectivamente

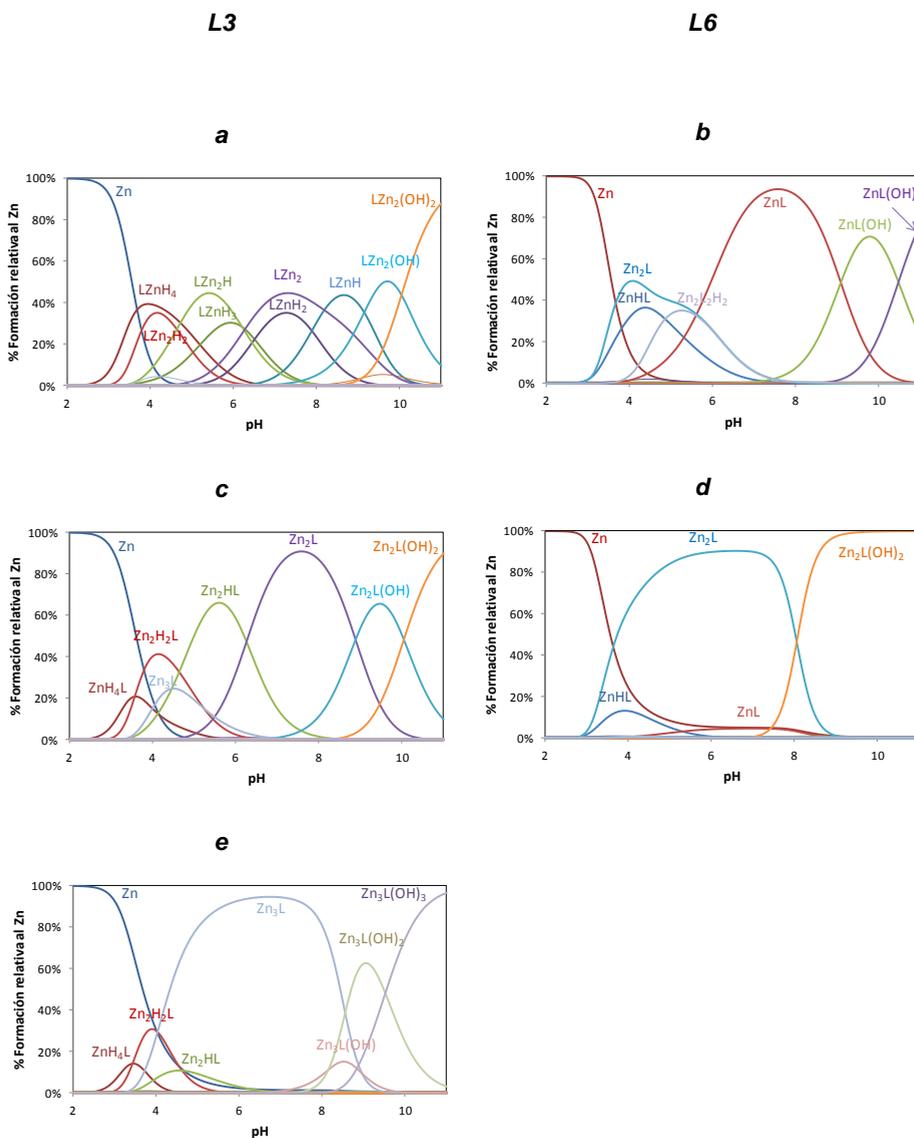


Figura 6.5.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos **L3** y **L6** con Zn²⁺ en relaciones molares M:L 1:1, (a y b) 2:1 (c y d) y 3:1 (e) respectivamente

Con respecto a los sistemas binarios metal-ligando en relación molar M:L 2:1, se observa como las especies binucleares predominan a partir de pH ~ 4.0. La especie Zn_2L^{4+} predomina en un intervalo más amplio de pH y la que prevalece a pH fisiológico (pH 7.4).

Por último, en los sistemas binarios M-L con relación molar M:L 3:1 para la interacción de los ligandos **L1**, **L2** y **L3** con Zn^{2+} , predomina las especies trinucleares por encima de pH ~ 8.0 para el sistema con el ligando **L1** (figura 6.4 e), por encima de pH ~ 9.0 para el sistema con **L2** (figura 6.4 f) y para **L3** se forman a partir de pH ~ 4.0 (figura 6.5 e) prevaleciendo en un intervalo de pH mayor (4.0-10.5) que para los sistemas con **L1** y **L2**.

A continuación se va a analizar la coordinación de los iones metálicos con los ligandos. En el caso de las especies mononucleares, es poco probable que los nitrógenos pertenecientes a los dos brazos macrocíclicos puedan disponerse lo suficientemente cerca para interaccionar a la vez con un mismo ión metálico. Por lo tanto, las aminas del brazo del ligando que no está coordinando con el ión metálico tendrán la posibilidad de protonarse. En la tabla 6.2 se muestran las constantes de protonación sucesivas de las especies mononucleares. Los valores obtenidos para el equilibrio $ZnL^{2+} + H^+ \rightleftharpoons ZnHL^{3+}$ son más altos ($\log K_{ZnHL} = 9.3, 10.2$ y 10.1 para **L1**, **L2** y **L3** respectivamente) que el equiparable equilibrio de protonación $H_2L^{2+} + H^+ \rightleftharpoons H_3L^{3+}$ ($\log K_{H_3L} = 8.5, 8.8$ y 8.3 para **L1**, **L2** y **L3** respectivamente), indicando que estos procesos de protonación tienen lugar en átomos de nitrógeno que no están coordinados al metal y, por lo tanto, que el ión metálico coordinará únicamente las aminas de uno de los brazos macrocíclicos.

Hay diferencias en las constantes de formación de los complejos mononucleares de cada ligando. En la tabla 6.1 se pueden diferenciar dos grupos de valores de constantes para el equilibrio $Zn^{2+} + L \rightleftharpoons ZnL^{2+}$. El primer grupo lo componen los ligandos **L1** y **L2** con constantes altas ($\log K_{ZnL} = 19.8$ y 16.9) y un segundo grupo lo constituyen **L3** y **L6** con constantes mucho menores ($\log K_{ZnL} = 13.8$ y 12.6).

Tabla 6.2.- Logaritmos de las constantes de estabilidad sucesivas de los ligandos L1, L2, L3 y L6 con Zn²⁺ determinadas en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción	L1	L2	L3	L6
$ZnH_3L + H \rightleftharpoons ZnH_4L^a$	4.24(5) ^b	3.61(1)	5.19(3)	
$ZnH_2L + H \rightleftharpoons ZnH_3L$	4.23(5)	6.28(4)	6.50(4)	
$ZnHL + H \rightleftharpoons ZnH_2L$	7.7(1)	8.48(4)	7.88(5)	
$ZnL + H \rightleftharpoons ZnHL$	9.3(1)	10.2(1)	10.13(5)	5.34(6)
$Zn_2HL + H \rightleftharpoons Zn_2H_2L$			4.6(1)	
$Zn_2L + H \rightleftharpoons Zn_2HL$	4.83(2)	4.37(1)	6.2(1)	
$ZnL + Zn \rightleftharpoons Zn_2L$	12.4(1)	16.2(1)	14.4(1)	5.0(1)
$Zn_2L + H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH) + H$	-10.6(1)	-10.05(2)	-8.9(1)	-16.1(1)
$Zn_2L(OH) + H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH)_2 + H$		-11.9(3)	-10.0(1)	
$Zn_2L + Zn \rightleftharpoons Zn_3L$			5.7(8)	
$Zn_3L + H_2O \rightleftharpoons Zn_3L(OH) + H$			-8.96(5)	
$Zn_3L(OH) + H_2O \rightleftharpoons Zn_3L(OH)_2 + H$			-8.14(6)	
$Zn_3L(OH)_2 + H_2O \rightleftharpoons Zn_3L(OH)_3 + H$		-8.96(3)	-9.52(7)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa

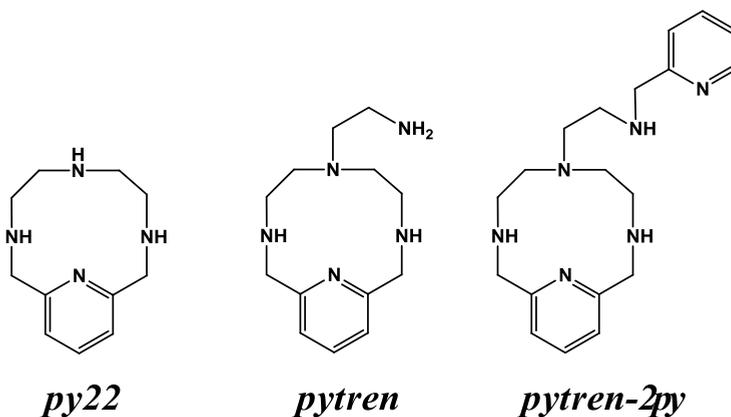


Figura 6.6.- Estructuras de los ligandos *py22*, *pytren* y *pytren-2py*.

Por motivos comparativos se muestra la tabla 6.3 con las constantes de la interacción del Zn^{2+} con los precursores *py22*, *pytren* y *pytren-2py*²³ (cuyas estructuras se muestran en la figura 6.6). Las constantes de estabilidad para la formación del complejo mononuclear para el precursor *pytren-2py* y el ligando **L1** son parecidas ($\log K_{ZnL} = 19.8$ y 18.9). Puesto que el Zn^{2+} coordina al *pytren-2py* mediante las cuatro aminas del macrociclo, la amina del brazo y el nitrógeno de la piridina,²⁴ se puede considerar que el ligando **L1** coordina al Zn^{2+} de la misma manera para formar el complejo mononuclear (figura 6.7).

Tabla 6.3.- Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción del Zn^{2+} con los precursores determinados en disolución acuosa de NaCl 0.15 M y a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción ^a	<i>py22</i>	<i>pytren</i>	<i>pytren-2py</i>
$2H + Zn + L \rightleftharpoons ZnH_2L$		26.59(3)	
$H + Zn + L \rightleftharpoons ZnHL$	18.03(1) ^b	22.65(4)	22.31(2)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnL$	14.73(2)	17.41(2)	18.91(1)
$Zn + L + H_2O \rightleftharpoons ZnL(OH) + H$	5.94(1)		7.65(3)
$ZnL + H \rightleftharpoons ZnHL$	3.30(2)	5.24(4)	
$ZnHL + H \rightleftharpoons ZnH_2L$		3.94(4)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Por otra parte, se observa una similitud de los valores de la constante para la formación del complejo Zn_2L^{4+} para **L2** y *pytren* ($\log K_{ZnL} = 16.9$ y 17.4), y puesto que está descrito en la literatura que en la coordinación del Zn^{2+} al *pytren* participan los cuatro nitrógenos del macrociclo y la amina primaria del brazo,²⁵ se puede concluir que **L2** tendrá coordinado el metal de la misma forma, con los cuatro nitrógenos del macrociclo y la amina secundaria del brazo (ver el modelo propuesto en la figura 6.7).

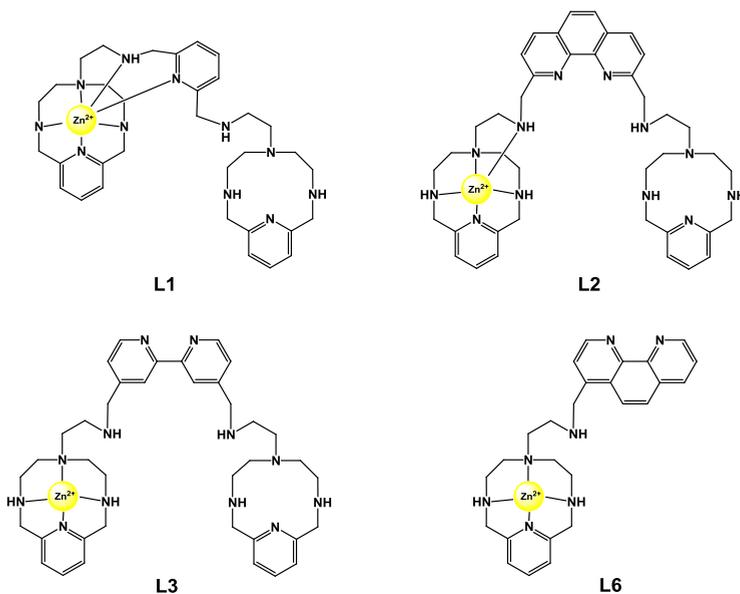


Figura 6.7.- Modelos propuestos para la coordinación de los complejos mononucleares de Zn^{2+}

Al analizar los complejos mononucleares de **L3**, **L6** y los precursores, observamos una cierta semejanza entre sus constantes de estabilidad ($\log K_{ZnL} = 13.8$ y 12.6) y la correspondiente al precursor *py22* ($\log K_{ZnL} = 14.7$).^{23,26} Asimismo, la estructura cristalina del *py22* con Zn^{2+} tiene el metal coordinado únicamente a los cuatro nitrógenos del macrociclo (figura 6.8),²⁷ por lo tanto, se puede relacionar el valor de la constante con la estructura de rayos X y proponer el modelo de coordinación indicado en la figura 6.7 donde el metal estará coordinado de la misma manera dentro del macrociclo en los ligandos **L3** y **L6**.

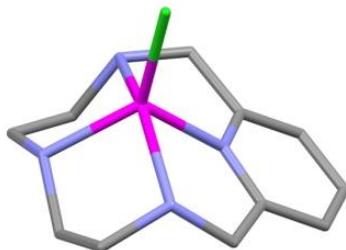


Figura 6.8.- Representación de la estructura de rayos X del complejo $[Znpy_{22}]Cl$.²⁷

En todos los sistemas binarios de los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L6** con Zn^{2+} y con relación molar M:L 2:1 se forman complejos binucleares por encima de pH 4 para **L1**, **L2** y **L6** y, por encima de pH 3 para **L3** (figuras 6.4 y 6.5). Como se comentó previamente, en los diagramas de distribución la especie predominante en un mayor intervalo de pH es Zn_2L^{4+} .

Las constantes sucesivas para la formación del complejo binuclear de **L2** con Zn^{2+} ($ZnL^{2+} + Zn^{2+} \rightleftharpoons Zn_2L^{4+}$) son del mismo orden que la constante de formación del complejo mononuclear, lo cual indica la ausencia de cooperatividad en el proceso de coordinación del segundo metal por el complejo mononuclear. La constante de formación del complejo binuclear para **L3** es superior que la constante de formación del complejo mononuclear, sugiriendo que la coordinación del primer ión metálico favorece la entrada del segundo ión en el ligando **L3**, y por lo tanto, manifestando un fenómeno de cooperatividad positiva.

Puesto que el valor de la constante K_{Zn_2L} ($\log K_{Zn_2L} = 16.2$) para **L2** también es del mismo orden que el valor de la constante K_{ZnL} para el *pytren* ($\log K_{ZnL} = 17.4$), se puede suponer que la coordinación del segundo Zn^{2+} en **L2** es idéntica a la del *pytren*. En conclusión, para el complejo Zn_2L^{4+} ambos iones metálicos están coordinados cada uno de ellos a cuatro nitrógenos de un macrociclo y a la amina secundaria de uno de los brazos (figura 6.9).

Al analizar los valores de las constantes del sistema binario del Zn^{2+} con **L3**, se detecta la misma similitud entre los valores de las constantes de

formación del complejo binuclear para **L3** ($\log K_{Zn_2L} = 14.4$) y del complejo mononuclear del *py22* ($\log K_{ZnL} = 14.7$), indicando que el segundo metal coordinará a los cuatro nitrógenos de la cavidad macrocíclica disponible. Por lo tanto, en el complejo $Zn_2L_3^{4+}$ los dos iones metálicos tendrán coordinados los dos iones metálicos a las cavidades macrocíclicas.

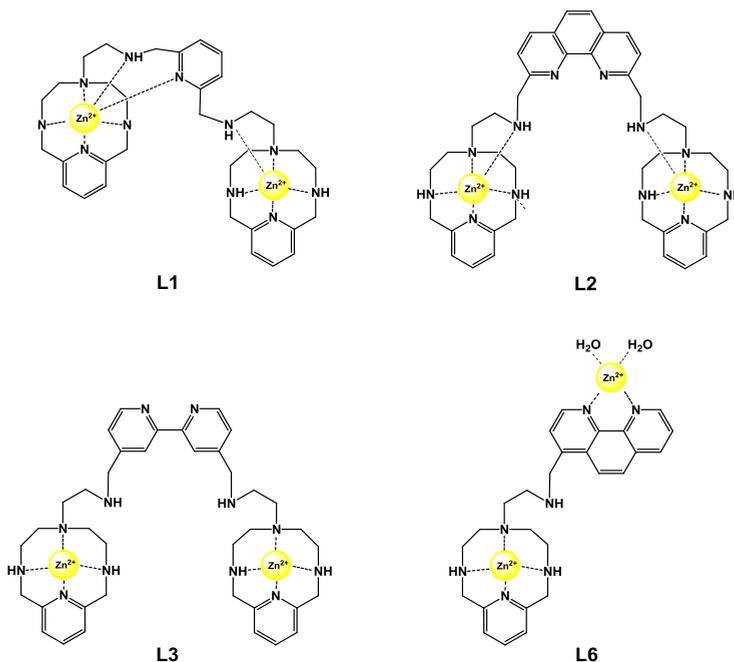


Figura 6.9.- Modelos propuestos para la coordinación de los complejos binucleares

Tras examinar las constantes para la complejación de **L2** y **L3** se analizan los resultados para **L1**. El ligando **L1** tiene una constante del complejo binuclear ($\log K_{Zn_2L} = 12.4$) siete ordenes inferior que la del complejo mononuclear ($\log K_{ZnL} = 19.8$), indicando que en la formación de $Zn_2L_1^{4+}$ la coordinación del segundo ión metálico implica un menor número de nitrógenos que para **L2** o **L3** o requiere de una reorganización molecular de la esfera de coordinación, rompiendo y formando nuevos enlaces. Como se ha descrito para el complejo mononuclear, uno de los iones Zn^{2+} coordina a los cuatro nitrógenos del macrociclo, la amina secundaria del brazo y el nitrógeno

de la piridina central, mientras que se supone que el segundo ión Zn^{2+} coordina a las cuatro aminas del macrociclo y la amina secundaria del brazo restante. Esta coordinación se confirma mediante la obtención de la estructura de rayos X del complejo Zn_2L1^{4+} (figuras 6.10 y 6.11).

La evaporación lenta de una disolución acuosa 1×10^{-3} M del clorhidrato de **L1** y 2×10^{-3} M de $Zn(ClO_4)_2$ ajustada a un pH inicial de 10 con NaOH, lleva a la obtención de un compuesto en forma cristalina, de fórmula $[Zn_4NaC_{66}H_{102}Cl_2N_{22}]\cdot(ClO_4)_7\cdot 2H_2O$ (tabla 6.4). Como se aprecia en la figura 6.10, la estructura de rayos X del compuesto está dividida en dos subunidades, cada una de ellas constituida por 3.5 aniones perclorato, 1 anión cloruro, 2 iones zinc, 1 ligando **L1** y $\frac{1}{2}$ ión sodio. Este sodio se encuentra tetracoordinado y actúa como puente entre los dos subunidades.

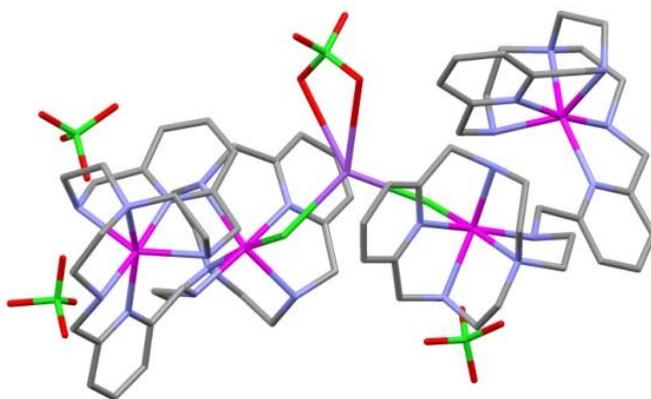


Figura 6.10.- Representación de la estructura cristalina del complejo bimetalico con Zn^{2+} de **L1** mediante el programa MERCURY.

Aunque las geometrías de coordinación del Zn^{2+} en ambas subunidades es la misma, en cada una de ellas los iones metálicos zinc presentan un entorno de coordinación diferente (figura 6.11). Uno de los metales está coordinado a los cuatro grupos amino del macrociclo, el grupo amino del brazo y el grupo amino de la piridina central (con una distancias de enlace entre el metal y los átomos dadores de 2.24, 2.06, 2.25, 2.40, 2.23 y 2.08 Å,

tabla 6.5) formando una geometría de base octaédrica donde todas las posiciones está ocupadas por las aminas del ligando. El otro ión metálico se encuentra coordinado a los cuatro grupos amino del macrociclo, el grupo amino del brazo (con unas distancias de enlace de 2.09, 2.29, 2.18, 2.21 y 2.20 Å) y un anión cloruro (2.35 Å) formando otra pirámide de base octaédrica. Es interesante mencionar que cada subunidad se encuentra unida a través de un puente compuesto por dos aniones cloruro unidos mediante un sodio que completa su esfera de coordinación con un perclorato. Asimismo, la distancia entre los dos iones metálicos Zn^{2+} es 6.28 Å.

Tabla 6.4.- Datos cristalográficos de la estructura de Zn^{2+} con **L1** medidos 293(2) con radiación MoKa ($\lambda = 0.71073$ Å)



peso molecular (g/mol)	2291.33	$d_{calc.}$ (g/cm ³)	1.620
fórmula molecular	$C_{66}H_{102}Cl_2N_{22}NaZn_4 \cdot 7(ClO_4) \cdot 2(H_2O)$	μ (mm ⁻¹)	1.36
sist. cristalino	Ortorómbico	F(000)	4720
grupo espacial	Pbcn	refls. únicas	10673
a, (Å)	13.1143(2)	restricciones	47
b, (Å)	18.5283(2)	params.	599
c, (Å)	38.6732(5)	$R1, F > 4\sigma$	0.068
V, (Å ³)	9397.0(2)	$\omega R2$	0.234
Z	4	Goof	1.050

Para los dos iones Zn^{2+} , la distancia más corta es la que corresponde con los nitrógeno de la piridinas de los macrociclos ($Zn1-N1 = 2.09 \text{ \AA}$ y $Zn2-N7 = 2.06 \text{ \AA}$, figura 6.11 y tabla 6.5). Un hecho resaltable es la mayor distancia de uno de los iones Zn^{2+} al nitrógeno de la piridina central ($Zn2-N8 = 2.24 \text{ \AA}$) con respecto a la piridina del macrociclo, indicando que hay cierta tensión estructural y que existe una cierta reorganización para que la piridina central interactúe con el metal. Esta reorganización apoyaría la diferencia entre las constantes obtenidas para el complejo mono- y binuclear.

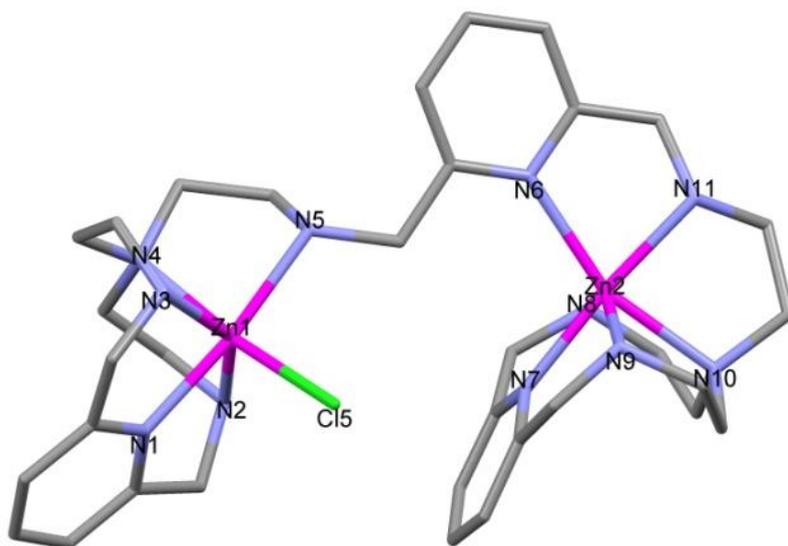


Figura 6.11.- Representación de la estructura cristalina del complejo bimetálico de Zn^{2+} con L1 mediante el programa MERCURY.

Tabla 6.5.- Distancias (Å) y ángulos seleccionados para los entornos de coordinación de los iones metálicos.

	Distancias (Å)		Ángulos		Ángulos
Zn1-N1	2.09(1) ^a	N1-Zn1-N2	76.2(2)	N6-Zn2-N7	107.7(2)
Zn1-N2	2.29(1)	N1-Zn1-N3	78.1(2)	N6-Zn2-N8	100.0(1)
Zn1-N3	2.19(1)	N1-Zn1-N4	91.0(2)	N6-Zn2-N9	106.2(1)
Zn1-N4	2.21(1)	N1-Zn1-N5	172.0(2)	N6-Zn2-N10	159.2(2)
Zn1-N5	2.20(1)	N1-Zn1-Cl5	93.9(2)	N6-Zn2-N11	78.1(2)
Zn1-Cl5	2.35(1)	N2-Zn1-N3	146.4(2)	N7-Zn2-N8	77.6(1)
Zn2-N6	2.24(1)	N2-Zn1-N4	78.2(2)	N7-Zn2-N9	77.8(2)
Zn2-N7	2.06(1)	N2-Zn1-N5	101.2(2)	N7-Zn2-N10	92.7(2)
Zn2-N8	2.25(1)	N2-Zn1-Cl5	107.9(2)	N7-Zn2-N11	173.8(2)
Zn2-N9	2.24(1)	N3-Zn1-N4	80.9(2)	N8-Zn2-N9	148.3(1)
Zn2-N10	2.23(1)	N3-Zn1-N5	101.2(2)	N8-Zn2-N10	80.2(1)
Zn2-N11	2.08(1)	N3-Zn1-Cl5	95.2(2)	N8-Zn2-N11	99.7(2)
Na1-O22	3.03(1)	N4-Zn1-N5	81.1(2)	N9-Zn2-N10	81.4(1)
Na1-Cl5	2.61(1)	N4-Zn1-Cl5	172.9(2)	N9-Zn2-N11	102.8(2)
Zn1-Zn2	6.27(1)	N5-Zn1-Cl5	94.0(1)	N10-Zn2-N11	81.3(2)
		O22-Na1-O22	43.1(2)	Cl5-Na1-O22	133.2(4)
		O22-Na1-Cl5	108.8(3)	Cl5-Na1-O22	108.8(3)
		O22-Na1-Cl5	133.2(4)	Cl5-Na1-Cl5	114.4(3)

^a Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Al analizar las constantes de formación del complejo binuclear para el ligando **L6** con Zn^{2+} ($\log K_{Zn2L} = 5.0$) se observa que es 7 unidades menor que la constante de formación del complejo mononuclear ($\log K_{ZnL} = 12.6$). Mientras que **L1**, **L2** y **L3** tienen dos brazos donde pueden coordinar un metal cada uno independientemente, en **L6** sólo existe un brazo donde coordinar un metal y el segundo metal tendrá coordinará presumiblemente a la fenantrolina. Este hecho se apoya porque la constante de formación sucesiva del complejo binuclear ($\log K_{Zn2L} = 5.0$) es de orden similar a la coordinación de un Zn^{2+} a una fenantrolina.²⁸ Por lo tanto, uno de los metales se encontrará dentro de la cavidad macrocíclica coordinando los cuatro grupos

amino y, posiblemente, el grupo amino del brazo mientras que los nitrógenos de la fenantrolina coordinarán bidentadamente al metal (figura 6.9).

Asimismo, la especie Zn_2L^{4+} sufre procesos de hidrólisis con valores de pK similares y altos indicando que ocurren independientemente y que los grupos hidroxilo no se comportan como ligandos puente.

Los diagramas de distribución muestran que la nuclearidad de las especies formadas depende estrechamente de la relación molar M:L empleada. Se detectaron complejos trinucleares para relaciones molares M:L 3:1 con los ligandos **L1**, **L2** y **L3**, para **L1** estas especies se observan por encima de pH ca. 8, para **L2** por encima de pH ca. 9 y para **L3** por encima de pH ca. 4 (figuras 6.4 y 6.5).

En el complejo trinuclear es de suponer que tendrá el tercer metal coordinando a la unidad central (piridina, fenantrolina o bipyridina) porque es la única parte disponible ya que los restantes iones metálicos de Zn^{2+} coordinaran cada cavidad macrocíclica.

La única constante de interacción para la formación del complejo trinuclear (equilibrio $Zn_2L^{4+} + Zn^{2+} \rightleftharpoons Zn_3L^{6+}$) se obtiene para el ligando **L3**. El valor de esta constante ($\log K_{Zn_3L} = 5.7$) es siete ordenes inferior que las constantes de formación de los complejos mono- y binuclear ($\log K_{ZnL} = 13.83$ y $\log K_{Zn_2L} = 14.4$), indicando que el tercer metal coordina un número menor de nitrógenos. Por lo tanto, el tercer metal coordina la bipyridina. Asimismo, este hecho se ratifica porque la constante del Zn^{2+} con bipyridina²⁹ es del mismo orden que la obtenida para el complejo trinuclear ($\log K_{Zn_3L} = 5.7$ para **L3** y $\log K_{ZnL} = 5.1$ para la bipyridina).

6.2.2.- Estudios de RMN

Para obtener más información sobre la coordinación del Zn^{2+} con el ligando **L2** en disolución se han realizado estudios de resonancia magnética nuclear de protón (1H RMN) a varias relaciones molares M:L y a diferentes valores de pD. La multiplicidad, desplazamiento y ensanchamiento de las señales de 1H RMN aportan información sobre el sitio de coordinación del Zn^{2+} en la estructura del ligando. La selección de **L2** es debido a que fue el

primer ligando de la familia en sintetizarse aunque se pretende completar los estudios con el resto de los ligandos.

Seleccionamos primero dos valores de pD mediante los diagramas de distribución obtenidos por potenciometría (figura 6.4). El primer valor pD = 10.5 se escogió porque a este pD se forman especies mononucleares cuando se utiliza relación molar 1:1, binucleares al emplear una relación 2:1 y trinucleares al utilizar la relación molar 3:1. El segundo valor de pD que se utiliza es 7.4 donde se forman especies mononucleares al emplear una relación molar M:L 1:1 y se forman especies binucleares al utilizar tanto una relación molar 2:1 como 3:1. Con estos experimentos, se podrá corroborar la formación de especies trinucleares a diferentes relaciones molares M:L.

Los diagramas de distribución de **L2** de la figura 6.4 muestran que a pD 7.4 y con una relación molar M:L 1:1 se forman mayoritariamente las especies mononucleares ZnH_3L^{5+} y Zn_2L^{4+} . Al aumentar la relación molar M:L a 2:1 se forma la única especie binuclear Zn_2L^{4+} y que continua siendo la misma al pasar a una relación molar 3:1. Mientras que a pD 10.0 se observa como predominan las especies mono- y binucleares para relaciones molares M:L 1:1 y 2:1 respectivamente y, sin embargo, con relaciones molares 3:1 se forma el complejo trinuclear $Zn_3L(OH)_3^{3+}$.

La figura 6.12 muestra las señales de 1H RMN de la región aromática (6.0-9.5 ppm) en diferentes relaciones molares M:L a pD ~ 7.4. El ligando libre a este pD tiene 5 señales aromáticas (P6, P4, P3, py4 y py3). Una disolución con un equivalente del ión metálico Zn^{2+} y de **L2** muestra como todas las señales de protón se desdoblan a este pD, sugiriendo que la simetría binaria del espectro de 1H RMN se ha roto debido a la coordinación del ión metálico Zn^{2+} a uno de los brazos macrocíclicos y haciendo la estructura asimétrica. Además, se forma un porcentaje de especies binucleares que tienen los desplazamientos diferentes a las especies mononucleares de las señales de 1H RMN. Al aumentar la relación molar M:L a 2:1 se forma la especie Zn_2L^{4+} y la simetría del espectro de resonancia se recupera, indicando que cada ión se encuentra en cada uno de los brazos macrocíclicos. Para una relación molar 3:1 no hay variación con respecto al

espectro en relación 2:1 porque según los diagramas de distribución se forma la misma especie binuclear Zn_2L^{4+} .

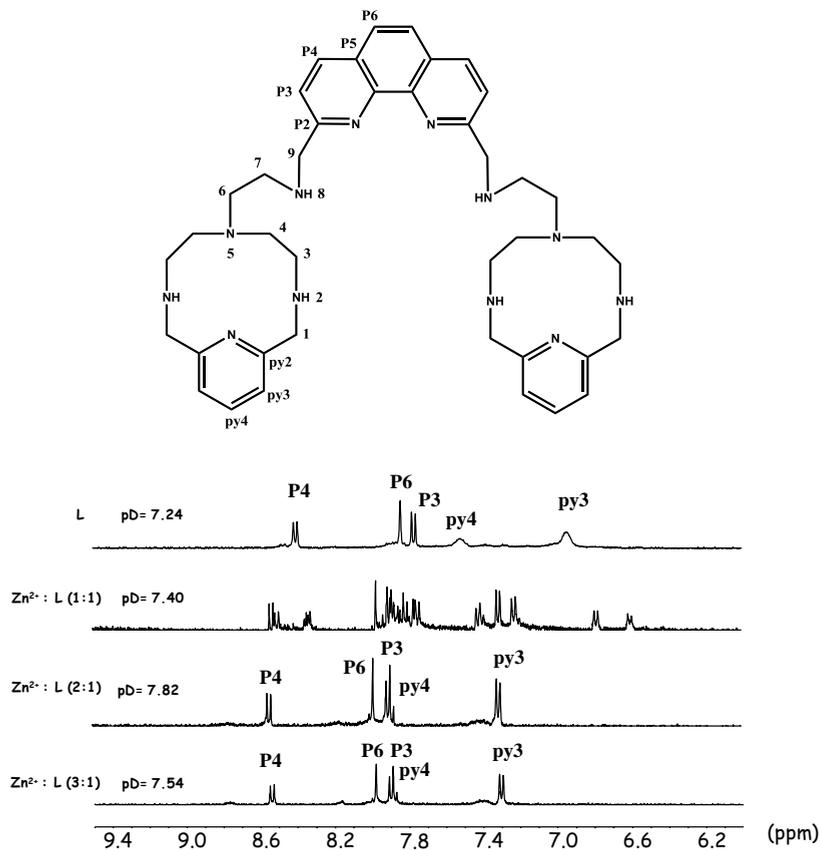


Figura 6.12.- Señales de la zona aromática de los espectros de 1H RMN de $Zn^{2+}:L2$ a pD ~ 7.4 a diferentes relaciones molares.

En la figura 6.13 se muestran las señales de 1H RMN de la región aromática a pD 10.0 y con diferentes relaciones molares. Las señales se desdoblan para una disolución con relación molar M:L 1:1 al igual que a pD ~ 7.4 por la coordinación del Zn^{2+} en uno de los brazos macrocíclicos. Para disoluciones con relación molar M:L 2:1 se recupera la simetría del espectro de 1H RMN porque los dos Zn^{2+} se sitúan simétricamente en cada cavidad

macrocíclica. Sin embargo, para las disoluciones con relación molar M:L 3:1 todas las señales aromáticas de la fenantrolina (P3, P4 y P6) se ensanchan y desplazan a campo bajo con respecto al espectro de ^1H RMN de las disoluciones con relación molar 2:1, este hecho indica que se forma el complejo trinuclear a pD ~ 10.0 y que el tercer ión metálico de Zn^{2+} se coordina a la fenantrolina.

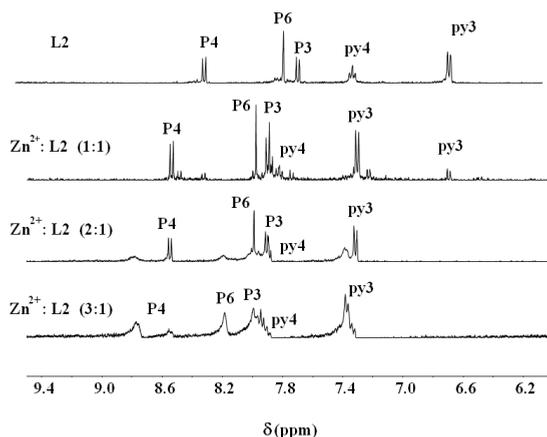


Figura 6.13.- Zona aromática de los espectros de ^1H RMN de $\text{Zn}^{2+}:\text{L2}$ a pD ~ 10.0 con diferentes relaciones molares.

6.2.3.- Estudios de emisión de fluorescencia

Se han medido los espectros de emisión de fluorescencia de los ligandos a diferentes relaciones molares M:L y valores de pH porque pueden modificar su comportamiento fotoquímico por el hecho de protonarse o complejar cationes.

La formación de los complejos metálicos de Zn^{2+} con ligandos poliamínicos conduce, generalmente, a un aumento de la intensidad de emisión de la fluorescencia, produciendo un efecto conocido como CHEF.³⁰ Este aumento se explica por la supresión de la transferencia fotoelectrónica (PET) desde las aminas al fluoróforo excitado cuando el catión se enlaza a los pares solitarios de los átomos de nitrógeno de los grupos amino.³¹

El único sistema binario estudiado mediante técnicas espectrofotométricas estacionarias es Zn^{2+} -**L2**, puesto que los sistemas con Zn^{2+} -**L1** y Zn^{2+} -**L5** no poseen fluorescencia y en los sistemas Zn^{2+} -**L3** y Zn^{2+} -**L6** la escala de tiempo donde variaban sus espectros era demasiado grande para estudiarlos mediante técnicas estacionarias.

El sistema binario Zn^{2+} -**L2** posee la fluorescencia intrínseca de la fenantrolina con un espectro de emisión de la fenantrolina de dos bandas situadas a 377 y 296 nm. La figura 6.14 se muestran las variaciones del máximo de emisión de fluorescencia a 377 nm a diferentes valores de pH y con diferentes relaciones molares superpuesto con los diagramas de distribución obtenidos por potenciometría.

Se obtiene un máximo de intensidad de la emisión para el sistema Zn^{2+} -**L2** con relación molar Zn^{2+} :L 1:1 centrado a 377 nm (figura 6.14 a). Asimismo, el intervalo donde la emisión es máxima corresponde a la especie hexaprotonada. La fluorescencia disminuye al aumentar el pH ($pH > 3$) porque las aminas del complejo mononuclear protonado se desprotonan y la emisión de fluorescencia se puede desactivar por efecto PET. Asimismo, al disminuir el pH por debajo de 3 hay una atenuación de la emisión de fluorescencia porque se forma la especie heptaprotonada ($H_7L_2^{7+}$) y como se indicó en el capítulo de protonación produce una disminución de la emisión de la fluorescencia.

La emisión de la fluorescencia alcanza el máximo por debajo de pH 8.0 para los mismos experimentos con relaciones molares M:L, 2:1 y 3:1 (figura 6.14 b y b respectivamente), donde se forma la especie binuclear $Zn_2L_2^{4+}$ y se mantiene con una emisión máxima hasta $pH \sim 2$ donde comienza a formarse la especie $H_7L_2^{7+}$ y disminuye la fluorescencia como se indicó en el capítulo de protonación.

Asimismo, se observa en la figura 6.14 como hay un aumento en la fluorescencia de los complejos (marcador ●) con respecto al ligando libre por encima de pH 5 (marcador ▲).

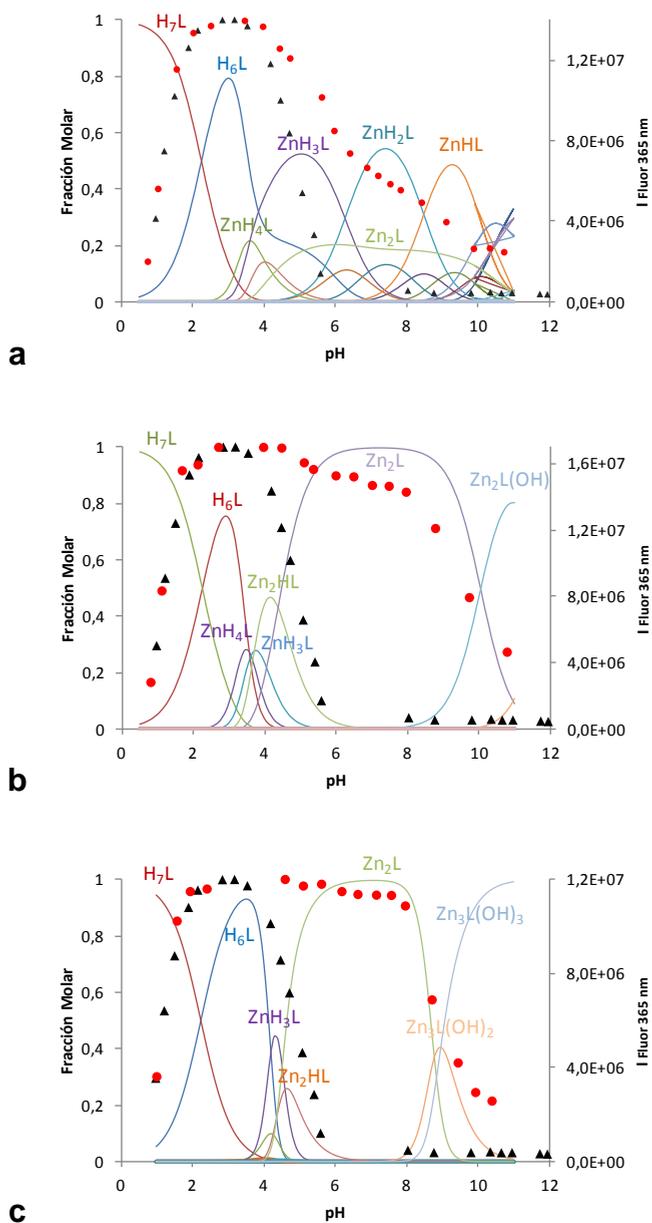


Figura 6.14.- Diagramas de distribución de especies para la interacción del ligando **L2** con Zn^{2+} en relaciones molares M:L 1:1 (a), 2:1 (b) y 3:1 (c) superpuestas con la emisión de fluorescencia a 365 nm (●) y del ligando **L2** sin metal (▲), $\lambda_{exc} = 269$ nm.

Asimismo, la disminución de la emisión de la fluorescencia por encima de pH 8.0 correspondiente a la formación de especies hidroxiladas que son no emisivas.³²

Otro hecho resaltable es la similitud de la emisión de la fluorescencia entre la especie Zn_2L^{4+} y H_6L^{6+} probablemente porque los dos iones Zn^{2+} coordinan todas las aminas secundarias a semejanza de la especie hexaprotonada donde cada amina secundaria está protonada impidiendo en ambas especies su desactivación por un efecto PET.

6.2.4.- Cinéticas de formación de L6 con Zn^{2+}

La emisión de la fluorescencia debido a la interacción de Zn^{2+} con **L6** variaba con el tiempo, lo cual nos indicó un posible proceso de reorganización. Por ello se pensó en estudiar la cinética de formación del complejo con Zn^{2+} mediante técnicas fotoquímicas incluyendo experimentos en flujo detenido. Este estudio se ha realizado en una estancia en el grupo de fotoquímica del *Profesor Fernando Pina* en la *Universidade Nova de Lisboa*.

En la literatura se encuentran diversos trabajos sobre las reorganizaciones y movimientos del cobre en ligandos politópicos. Sin embargo, el número de este tipo de trabajos con zinc es escaso debido a la elevada velocidad de las cinéticas de la coordinación de Zn^{2+} junto con la ausencia de bandas *d-d* en el visible de los complejos con Zn^{2+} que hacen más difícil la detección de las especies.

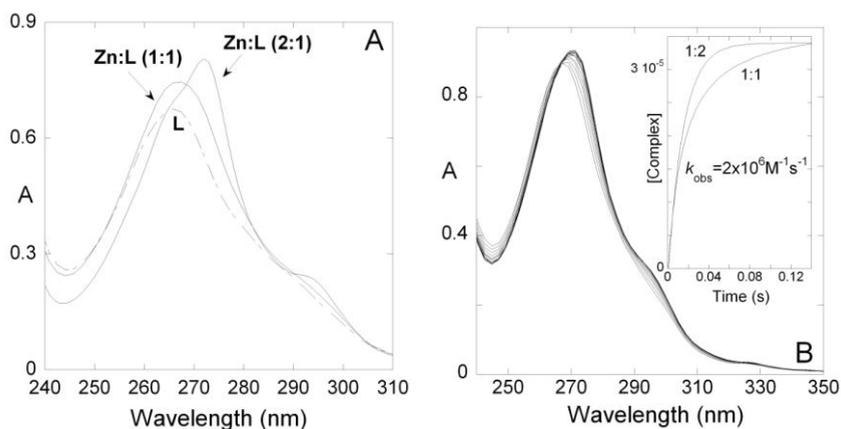
El ligando politópico **L6** tiene en su estructura dos sitios diferentes de coordinación, (1) un macrociclo poliamínico tipo escorpiando y (2) una unidad quelante de fenantrolina. La disposición relativa de los dos sitios impide su coordinación simultánea a un único ión metálico de Zn^{2+} , permitiendo un movimiento del ión metálico entre ambas unidades. Además, las propiedades espectroscópicas de la unidad de fenantrolina permiten señalar la coordinación o la pérdida del metal en esta unidad.

Los estudios potenciométricos han demostrado que el complejo mononuclear de **L6** en equilibrio, el Zn^{2+} se encuentra en la cavidad

macrocíclica mientras que en el complejo binuclear, el segundo ión metálico coordina a la fenantrolina.

En primer lugar, se midieron los espectros de absorción tras dejar que alcanzaran el equilibrio de varias disoluciones del complejo de Zn^{2+} y **L6** con diferentes relaciones molares M:L (1:1 y 2:1) y a varios valores de pH. En la figura 6.15 se muestran los espectros a pH de 8.0 donde se forman mayoritariamente una única especie mono- y binuclear (ZnL^{2+} y Zn_2L^{4+}) para relaciones molares 1:1 y 2:1 respectivamente.

El espectro de absorción a pH 8.0 del ligando libre **L6** se caracteriza por tener una banda situada a 267 nm, mientras que el espectro de la disolución del complejo Zn^{2+} :**L6** en relación molar 1:1 muestra un pequeño aumento de esta banda (figura 6.15 A). Con respecto al espectro de absorción para la relación molar M:L 2:1 hay un aumento de la banda acompañado por un desplazamiento de la banda al rojo hasta 272 nm (figura 6.15 A). Si se analizan los datos conjuntos de potenciometría y absorción, se observa que la coordinación del metal en el macrociclo o en la fenantrolina produce un incremento de la absorción mientras que la coordinación a la fenantrolina produce también un desplazamiento al rojo.³³



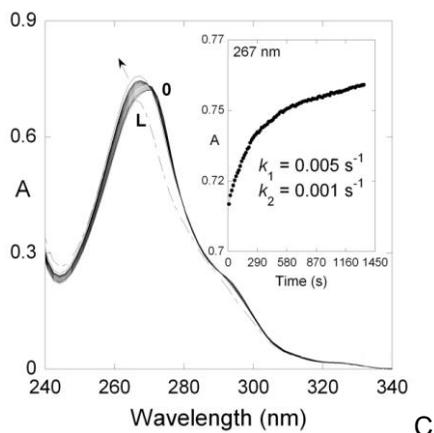


Figura 6.15.- (A) Variaciones del espectro de UV-Vis del ligando **L6** a pH = 8 en presencia de 1 y 2 equivalentes de Zn^{2+} . (B) Espectros de absorción en flujo detenido tras la adición de Zn^{2+} al ligando **L6** en relación M:L 1:1, (pH = 8.0) teniendo en cuenta el primer proceso muy rápido. La gráfica interior muestra los trazos cinéticos a 276 nm obtenidos para ambas relaciones molares Zn^{2+} :**L6** 1:1 y 2:1. (C) Variaciones del espectro de UV-Vis tras la adición de 1 equivalente de Zn^{2+} a una disolución de **L6** (2.5×10^{-5} M, línea a trazos) a pH = 8.0. El espectro grabado inmediatamente (8 s) después de la adición del metal se indica (0). La gráfica interior muestra los trazos cinéticos a 276 nm.

Un hecho resaltante es que el espectro de absorción registrado inmediatamente después de la adición de un equivalente de Zn^{2+} es más intenso que el espectro del ligando libre (0 en la figura 6.15 C) y se encuentra desplazado al rojo, sugiriendo una coordinación inicial del metal a la fenantrolina (figura 6.15 C). El espectro inicial del complejo evoluciona a otro espectro más intenso y con una λ_{max} situada igual a la del espectro del ligando libre. Estas evidencias sugieren que en la formación del complejo mononuclear, el Zn^{2+} coordinará inicialmente a la fenantrolina para moverse hacia el macrociclo y terminar coordinando únicamente a los nitrógenos de la cavidad macrocíclica (mecanismo propuesto en la figura 6.16).

Para obtener información sobre las etapas cinéticas de formación del complejo mononuclear se han realizado experimentos de flujo detenido a pH 8.0 con y relación molar 1:1 (figura 6.15 B). Los resultados cinéticos indican

una primera etapa después de 100 ms con un valor de $k_{\text{obs}} = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Este valor es de la misma magnitud que aquellos descritos para la coordinación de metales de transición con la 1,10-fenantrolina,³⁴ indicando que en la primera etapa el Zn^{2+} se coordina a la fenantrolina.

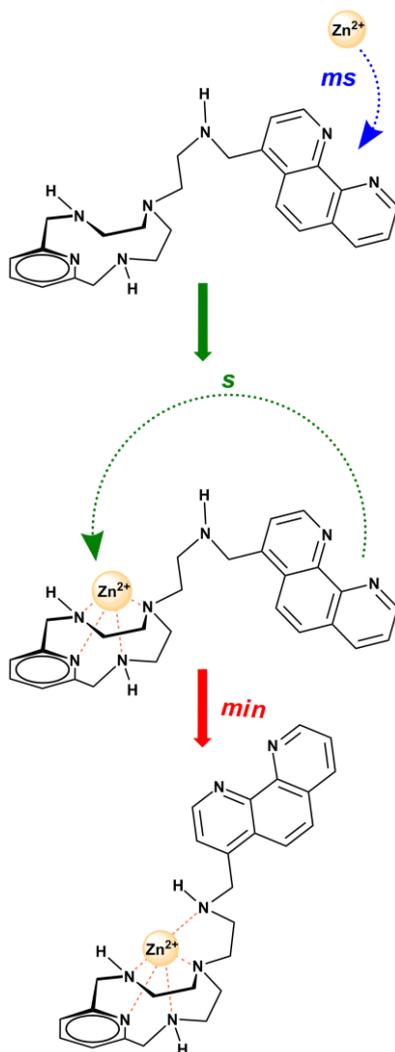


Figura 6.16.- Mecanismo propuesto para la cinética de coordinación de Zn^{2+} con **L6**.

Esta primera etapa va seguida por un segundo proceso más lento, cuya cinética se ajusta a un proceso biexponencial con unos valores de constantes de 0.005 s^{-1} y 0.001 s^{-1} . La existencia de dos etapas cinéticas para el segundo proceso se explica atribuyendo a la primera etapa la entrada del Zn^{2+} dentro del macrociclo y la segunda etapa a una reorganización molecular permitiendo la coordinación del grupo amino secundario del brazo al metal (figura 6.16).

Aunque, por potenciometría se ha sugerido que la coordinación del Zn^{2+} involucraría únicamente los cuatro nitrógenos de la cavidad macrocíclica, los estudios cinéticos indican que además coordinaría a la amina del brazo. Por lo tanto, aunque la coordinación por el Zn^{2+} sea igual para **L6** y *pytren*, el valor de la constante de formación del complejo mononuclear de **L6** ($\log K_{\text{ML}} = 12.6$) determinada por potenciometría tendría un valor tan bajo en comparación con el precursor *pytren* ($\log K_{\text{ML}} = 17.4$) debido probablemente a esta reorganización molecular.

Todos estos procesos son dependientes del pH y se hacen más lentos al disminuir el pH como consecuencia de la competición entre el metal y los protones por los lugares de coordinación.

La cinética de formación del complejo del Zn^{2+} con **L6** se ha estudiado también mediante emisión de fluorescencia porque el ligando tiene la unidad de fenantrolina que es emisiva. El ligando **L6** posee una emisión de fluorescencia característica de la fenantrolina con un máximo a 365 nm (figura 6.17). El espectro de emisión de fluorescencia de una disolución en equilibrio del ligando **L6** con Zn^{2+} en relación molar 1:1 a pH 8.0 experimenta un enorme incremento de intensidad al compararlo con el ligando **L6** libre al mismo pH (figura 6.17).

El ligando **L6** en su forma libre a pH 8.0 se encuentra monoprotonado HL6^+ con dos aminas alifáticas desprotonadas y, por lo tanto, la emisión de fluorescencia se desactiva a través de un efecto PET.³⁵ Al formarse el complejo mononuclear ZnL6^{2+} , el ión metálico coordina todos las aminas secundarias del ligando, por lo tanto, los pares solitarios de electrones de las aminas están bloqueados, no pueden producir ninguna desactivación de la emisión y aumenta así su emisión con respecto a la especie HL6^+ (figura 6.17)

A). En una disolución en equilibrio de **L6** y Zn^{2+} a pH 8.0 para la relación molar 2:1, los dos iones metálicos están coordinados a ambas unidades del ligando produciendo un aumento de la fluorescencia. Este aumento es debido a la suma de dos efectos: (1) la coordinación del Zn^{2+} a las aminas secundarias imposibilitando la desactivación de la fluorescencia y (2) la coordinación del Zn^{2+} a la fenantrolina que produce un aumento de la fluorescencia.

La formación del complejo mononuclear se ha estudiado mediante emisión de fluorescencia de flujo detenido, encontrándose que sucede en dos procesos cinéticos consecutivos con los mismos valores de constantes encontrados previamente por absorción (0.005 s^{-1} y 0.001 s^{-1} , figura 6.17 B). El carácter de doble exponencial del incremento en la emisión de la fenantrolina concuerda con la interpretación dada para las cinéticas por absorción: (i) al principio la intensidad de fluorescencia aumenta debido a la coordinación del metal al macrociclo impidiendo los procesos PET entre las aminas y la fenantrolina, (ii) y el aumento final de la fluorescencia, corresponde a la coordinación del nitrógeno de la cadena lateral (figura 6.16).

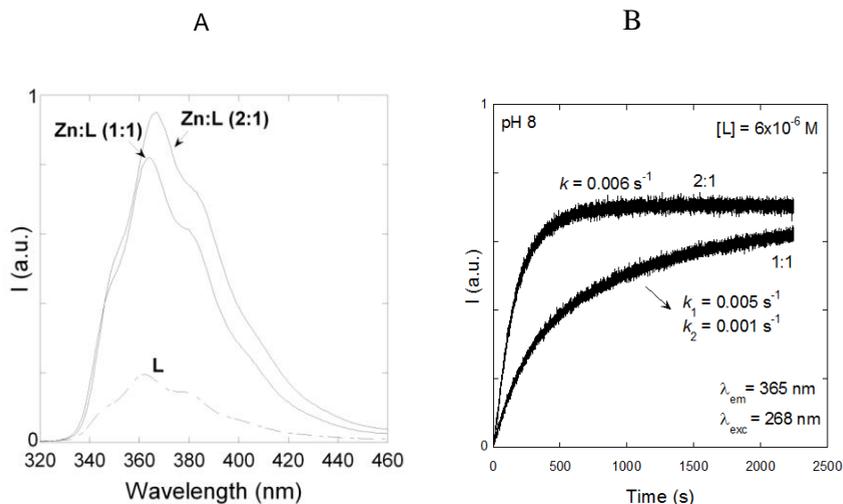


Figura 6.17.- (A) Variaciones del espectro de la emisión de fluorescencia de **L6** ($\lambda_{\text{exc}} = 268 \text{ nm}$) a diferentes relaciones molares. (B) Representación de las cinéticas de fluorescencia a 365 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 268 \text{ nm}$) para relaciones molares Zn^{2+} :**L6** 1:1 y 2:1. Condiciones generales son $[\text{NaCl}] = 0.15 \text{ M}$, 5% (v/v) de tampón universal, pH = 8.0

6.3.- Estudios con Cu^{2+}

Las buenas propiedades mecánicas de cobre y su fácil obtención, han hecho que junto con su aleación con estaño, el bronce, adquirieran tanta importancia que los historiadores han llamado Edad de Cobre y Edad de Bronce a dos periodos de la Antigüedad.³⁶ Con el desarrollo de la metalurgia, su uso perdió importancia relativa aunque se continuó utilizando en monedas, campanas, cañones, etc. Fue a partir del siglo XIX, al descubrirse sus magníficas propiedades conductoras de electricidad, cuando se convirtió de nuevo en un metal estratégico. El cobre es el tercer metal más utilizado en el mundo, por detrás del hierro y el aluminio, y entre las aplicaciones industriales más importantes destacan, la fabricación de cables eléctricos, componentes electrónicos, de coches, camiones, trenes, barcos o monedas.

En los sistemas biológicos, el cobre es un oligoelemento esencial para la vida humana, participa en la fotosíntesis, en la síntesis de glóbulos rojos, en el mantenimiento de los vasos sanguíneos, nervios, sistema inmunitario y huesos. El cobre es un cofactor en una gran variedad de proteínas y enzimas en distintas localizaciones celulares. Puede adoptar la forma oxidada y reducida en procesos cíclicos, lo cual le hace adecuado para un amplio rango de enzimas que tienen funciones catalíticas. Aunque son esas mismas propiedades redox las que producen un daño oxidativo celular cuando el cobre se encuentra en concentraciones excesivas. El cobre participa en reacciones de producción de especies oxidativas altamente reactivas (radicales hidroxilo o superóxido) que pueden tener efectos devastadores en las células, incluyendo el daño al ADN y la oxidación de proteínas y lípidos. Por otro lado, el cobre tiene una mayor afinidad por ciertos entornos proteicos pudiendo desplazar a los iones metálicos nativos de sus centros activos, alterando el plegamiento de las proteínas y produciendo una toxicidad por la inhibición de su actividad enzimática. Por lo tanto, la asimilación, distribución, utilización y excreción del cobre están altamente reguladas y los iones cobre están siempre enlazados a proteínas en vez de permanecer libres. En las células, este tráfico de cobre a través de la membrana celular y su transporte al destino final o intermedio se produce mediante proteínas transportadoras.³⁷

El cobre se puede encontrar en condiciones fisiológicas en dos estados de oxidación, la forma reducida Cu^+ y la forma oxidada Cu^{2+} . La forma reducida Cu^+ tiene una configuración electrónica $3d^{10}$, lo que significa que es diamagnético y que puede formar complejos con disposiciones geométricas flexibles (tetraédricas, trigonales o lineales). La forma oxidada Cu^{2+} posee una configuración $3d^9$, por lo que es paramagnético y favorece conformaciones geométricas plano-cuadradas, pirámide-trigonal y cuadrado-piramidal o incluso geometrías octaédricas debido a la distorsión de Jahn-Teller.

En este trabajo se ha estudiado la interacción del Cu^{2+} con los ligandos a través de estudios potenciométricos, de resonancia paramagnética de protón y fotoquímicos. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

6.3.1.- Estudios de la coordinación con Cu^{2+}

En la tabla 6.6 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad globales y sucesivas para la formación de complejos de Cu^{2+} con los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L5** determinadas potenciométricamente en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

Química de Coordinación catiónica de ligandos politópicos

Tabla 6.6.- Logaritmos de las constantes de estabilidad de los ligandos **L1, L2, L3** y **L5** con Cu^{2+} determinadas a 298.0 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Reaction ^a	L1	L2	L3	L5
$5\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_5\text{L}$			47.58(5)	
$4\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}$			44.21(6)	
$3\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$		46.28(5)	40.21(3)	
$2\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	40.65(3) ^b	39.25(6)	33.52(2)	
$\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	33.07(5)	30.40(7)	25.18(2)	19.64(3)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	23.8(1)	20.27(9)	16.25(4)	11.52(3)
$\text{Cu} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} = \text{CuL}(\text{OH}) + \text{H}$			6.38(6)	
$2\text{H} + 2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}$		47.74(9)		
$\text{H} + 2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{HL}$	42.48(3)	45.03(7)	38.00(3)	
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	38.04(5)	39.31(9)	32.90(6)	18.60(5)
$2\text{Cu} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	27.4(1)	28.84(9)	23.85(7)	11.70(5)
$2\text{Cu} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2 + 2\text{H}$				2.87(5)
$\text{H} + 3\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}$			42.61(3)	
$3\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}$	42.46(4)	44.19(1)	38.82(4)	
$3\text{Cu} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$			31.91(6)	
$3\text{Cu} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}(\text{OH})_2 + 2\text{H}$			22.70(9)	
$3\text{Cu} + \text{L} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}(\text{OH})_3 + 3\text{H}$			12.64(8)	
$\text{CuH}_4\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_5\text{L}$			3.37(6)	
$\text{CuH}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}$			4.00(6)	
$\text{CuH}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$		7.02(6)	6.69(3)	
$\text{CuHL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	7.58(5)	8.85(3)	8.34(2)	
$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	9.27(5)	10.1(1)	8.93(6)	8.12(3)
$\text{Cu}_2\text{LH} + \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}$		2.71(5)		
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{HL}$	4.44(5)	5.72(4)	5.1(3)	
$\text{CuL} + \text{Cu} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	14.24(5)	19.0(1)	16.65(6)	7.08(5)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	-10.64(5)	-10.46(6)	-9.05(7)	-6.90(5)
$\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}$				-8.83(5)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{Cu} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}$	4.42(5)	4.9(1)	5.92(6)	
$\text{Cu}_3\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$			-6.91(6)	
$\text{Cu}_3\text{L}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}$			-9.21(9)	
$\text{Cu}_3\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{L}(\text{OH})_3 + \text{H}$			-10.06(9)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Se encuentran tanto especies mononucleares como binucleares, e incluso trinucleares para los sistemas binarios Cu^{2+} -L1, Cu^{2+} -L2 y Cu^{2+} -L3 dependiendo de la relación molar empleada. Las figuras 6.18 y 6.19 muestran los diagramas de distribución obtenidos con el programa HYSS²² usando los valores de las constantes obtenidas por potenciometría.

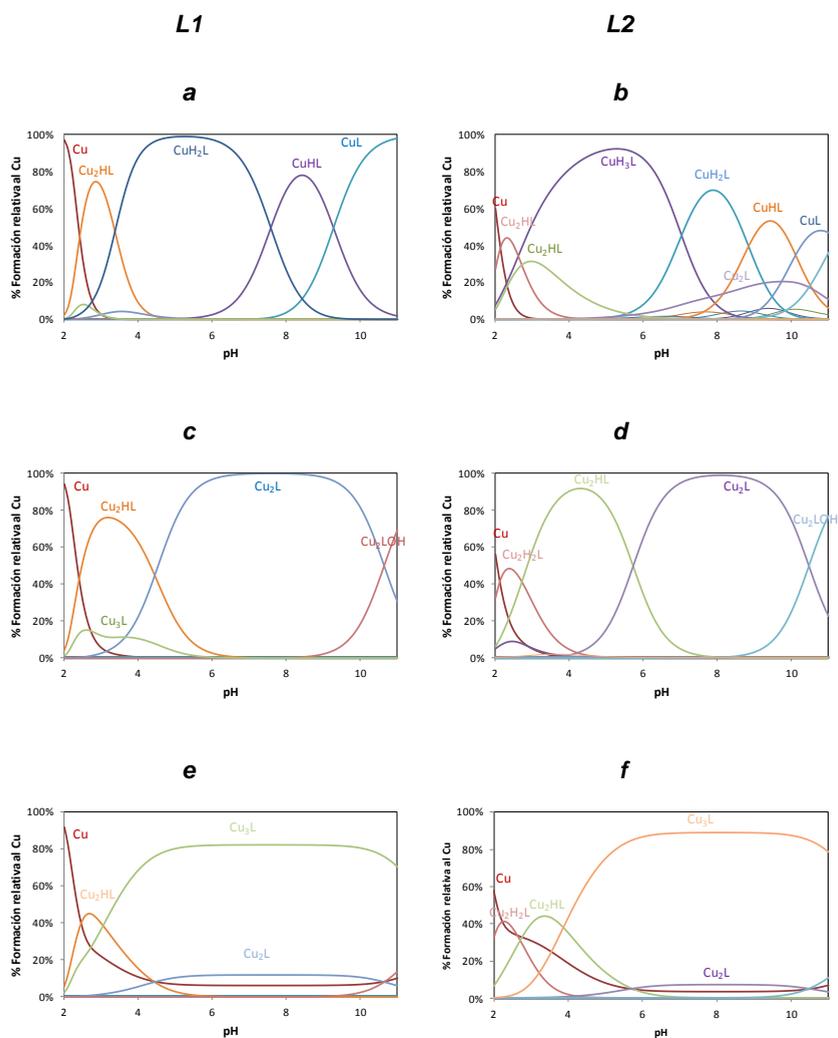


Figura 6.18.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos L1 y L2 con Cu^{2+} en relaciones molares M:L 1:1 (a y b), 2:1 (c y d) y 3:1 (e y f) respectivamente

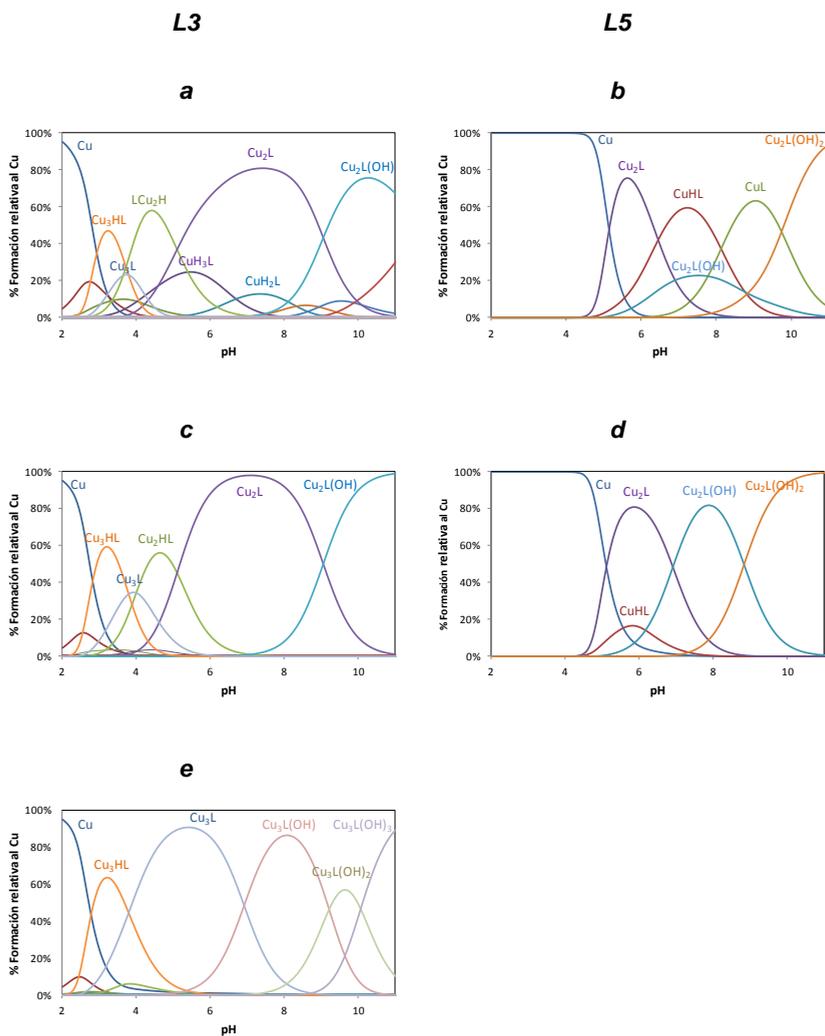


Figura 6.19.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos **L3** y **L5** con Cu^{2+} en relaciones molares M:L 1:1 (a y b), 2:1 (c y d) y 3:1 (e) respectivamente

La estequiometría obtenida para las especies mononucleares es $[CuH_xL]^{(2+x)+}$ donde los valores de x van de 0 a 2 para **L1**, de 0 a 3 para **L2**, de -1 a 5 para **L3** y de 0 a 1 para **L5**. Para los sistemas binucleares se obtienen especies con estequiometría $[Cu_2H_xL]^{(4+x)+}$ y valores de x que van de

-1 y 1 para **L1** y **L3**, de -1 a 2 para **L2** y de -1 a 1 para **L5**. Con respecto a los complejos trinucleares, la estequiometría encontrada es $[\text{Cu}_3\text{H}_x\text{L}]^{(6+x)+}$ donde para **L3** los valores de x van de 0 a -3 y para los ligandos **L1** y **L2** únicamente se encuentra la especie Cu_3L^{6+} .

En los estudios realizados con relación molar Cu:L 1:1 las especies mononucleares predominan en la mayor parte del intervalo de pH estudiado excepto para **L3** para el que coexisten las especies mono- y binucleares, predominando estas últimas (figuras 6.18 y 6.19).

Por otra parte, los estudios realizados para la interacción de Cu^{2+} con los ligandos con relación molar 2:1 muestran como las especies binucleares predominan en todo el rango de pH para todos, siendo la especie Cu_2L^{4+} la que prevalece en un mayor intervalo de pH.

Para los sistemas binarios de Cu^{2+} con **L1**, **L2** y **L3** en una relación molar $\text{Cu}^{2+}:\text{L}$ 3:1, se detectan especies trinucleares por encima de pH ca. 3 para (figura 6.18 e y f y figura 6.19 e respectivamente). El aducto que predomina en disolución es Cu_3L^{6+} para todos los sistemas binarios.

Para un análisis más adecuado de la interacción de Cu^{2+} con los ligandos se muestran las constantes obtenidas para los precursores *py22*, *pytren* y *pytren-2py* (tabla 6.7) y las estructuras cristalinas de los complejos de Cu^{2+} obtenidos para ellos.

Tabla 6.7.- Logaritmos de las constantes de estabilidad de los ligandos *py22*, *pytren* y *pytren-2py* con Cu^{2+} determinadas a 298.0 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Reacción ^a	<i>py22</i>	<i>pytren</i>	<i>pytren-2py</i>
$2\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$			
$\text{H} + \text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuHL}$		24.28(2)	
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	17.78(2)	20.43(3)	22.6(1)
$\text{Cu} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuL}(\text{OH}) + \text{H}$		9.42(3)	
$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$		3.85(3)	
$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuL}(\text{OH}) + \text{H}$		-11.01(3)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Las constantes de estabilidad para los ligandos y precursores se pueden agrupar según la similitud de sus valores para el equilibrio $\text{Cu}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}^{2+}$ en cuatro tipos. En el primer grupo se encuentran el ligando **L1** y el *pytren-2py*, el segundo tipo se colocan **L2** y *pytren*, el tercero corresponde a **L3** y *py22*, mientras que el cuarto tipo tiene únicamente a **L5**, cuya constante no guarda ningún parecido con los valores de las restantes.

Los logaritmos de las constantes K_{CuL} para **L1** (23.8) y *pytren-2py* (22.6) son similares entre ellos, lo que indicaría una coordinación parecida. Asimismo, si se tiene en cuenta la estructura del complejo *pytren-2py* con Cu^{2+} donde el metal coordina los cuatro grupos amino del macrociclo, el grupo amino de la cola y el de la piridina central (figura 6.20), se puede suponer que la coordinación en el complejo mononuclear del Cu^{2+} con el **L1** es de la misma manera (figura 6.21).

Los valores de las constantes de estabilidad K_{ML} son iguales para **L2** y *pytren* ($\log K_{\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}} = 20.3$ y 20.4) y si se considera la estructura cristalina del *pytren* con Cu^{2+} donde el ión metálico coordina a los cuatro grupos amino del macrociclo y la amina primaria de la cola (figura 6.20) se concluye que el primer ión Cu^{2+} tiene la misma coordinación para el complejo mononuclear de Cu^{2+} con **L2** (figura 6.21).

La constante de estabilidad del complejo mononuclear de **L3** con Cu^{2+} es parecida al *py22*, su similitud junto a la estructura de rayos X del *py22* (figura 6.20) nos hace suponer que el ligando coordina el primer cobre mediante los cuatro grupos amino de uno de los brazos. Adicionalmente, la coordinación del Cu^{2+} por **L3** en la cavidad macrocíclica se confirma porque hay 5 protonaciones a las que el ligando puede acceder para el complejo mononuclear, presumiblemente dos en el macrociclo que permanece desmetalado, dos en los brazos y una en la bipyridina.

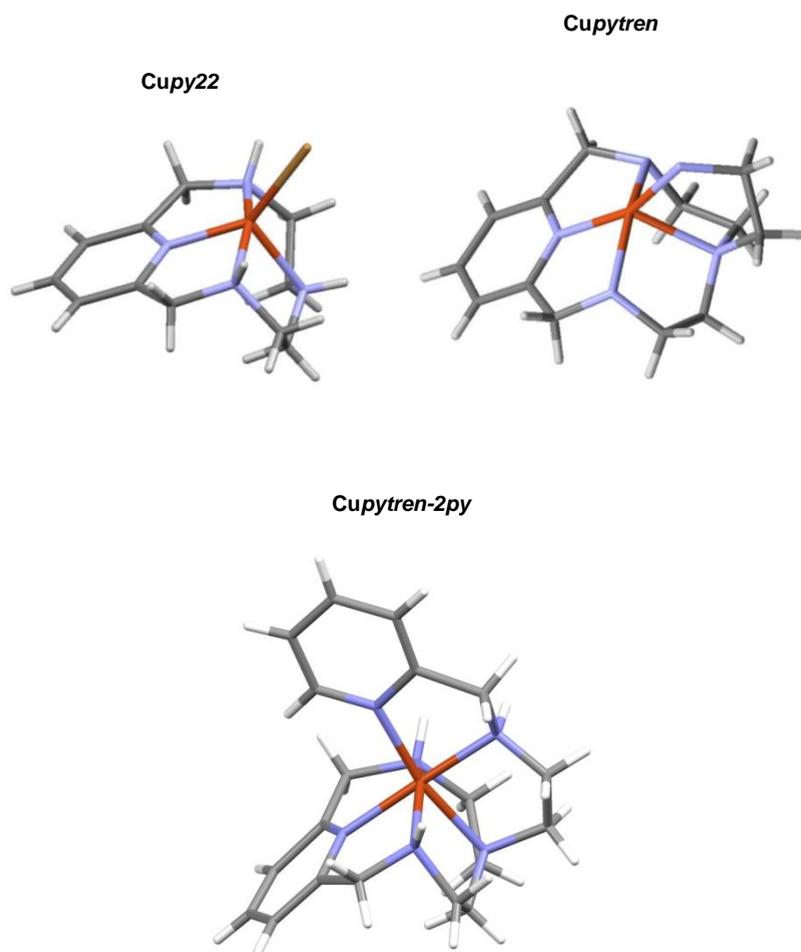


Figura 6.20.- Estructuras cristalinas de [Cupy22]Cl, [Cupytren]ClO₄, [Cupytren-2py](ClO₄)₂.

Para el último caso, **L5** tiene una constante de estabilidad muy baja ($\log K_{CuL} = 11.5$), indicando que tiene un índice inferior de coordinación al *py22* o que la esquaramida afecta los nitrógenos adyacentes retirándoles densidad electrónica a los átomos dadores y disminuyendo su capacidad coordinante, como se ha visto para otros receptores similares.³⁸

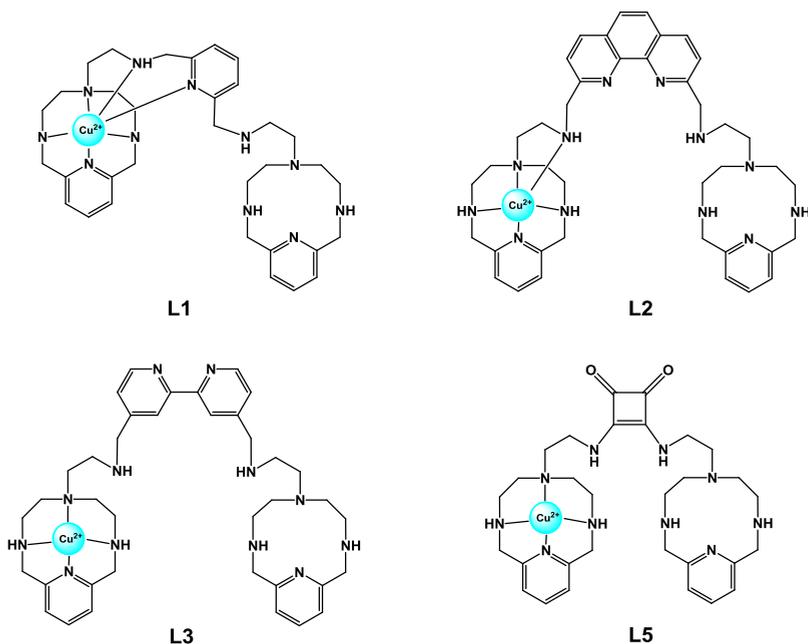


Figura 6.21.- Modelos propuestos para la coordinación de los complejos mononucleares de Cu^{2+} .

Para conocer el índice de coordinación de los sistemas binucleares analizamos las constantes de estabilidad de los complejos binucleares ($\log K_{\text{Cu}_2\text{L}}$) junto con las correspondientes de los complejos mononucleares ($\log K_{\text{CuL}}$). La constante de formación del complejo binuclear para **L1** ($\log K_{\text{Cu}_2\text{L}} = 14.2$) es 9 órdenes inferior que la mononuclear ($\log K_{\text{CuL}} = 23.8$), indicando que en la formación del complejo binuclear $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ sucede una reorganización molecular de la esfera de coordinación, rompiendo y formando enlaces o que la coordinación del metal implica un menor número de nitrógenos que para el complejo mononuclear. Los valores de las constantes de estabilidad junto con los estudios de ^1H RMN paramagnético para el complejo $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ confirman una coordinación similar al complejo $\text{Zn}_2\text{L1}^{4+}$, sugiriendo que uno de los metales coordinará a los cuatro nitrógenos de uno de los macrociclos y el nitrógeno secundario de un brazo y el segundo metal coordinará a los mismos nitrógenos junto al nitrógeno de la piridina central (figura 6.22).

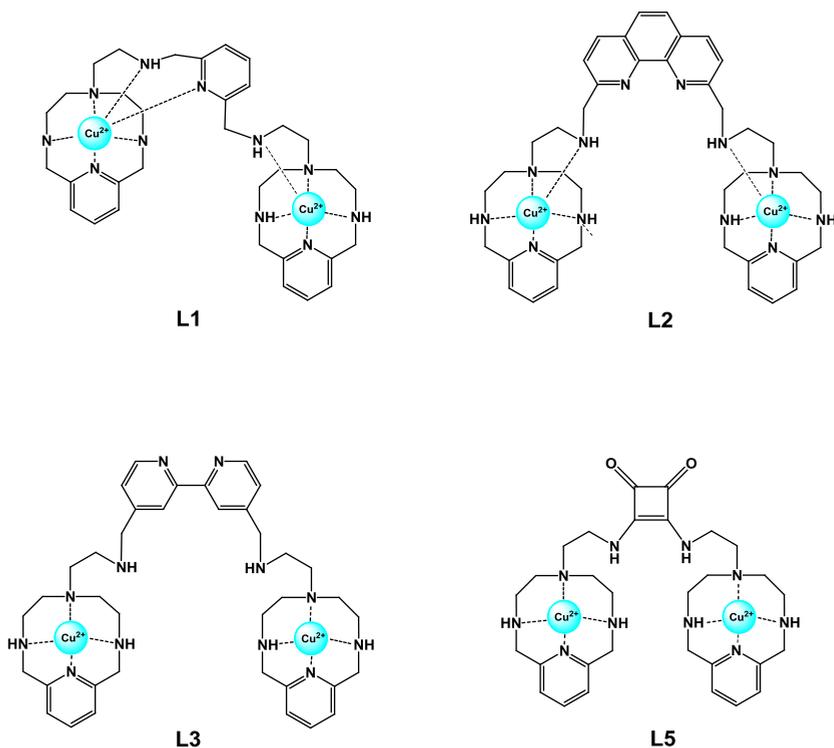


Figura 6.22.- Modelo propuesto para la coordinación de los complejos binucleares

Las constantes de formación de los complejos mono- y binuclear para el sistema binario entre el Cu²⁺ y **L2** son idénticas, mientras que para **L3** la constante de formación del complejo binuclear es ligeramente superior que para el complejo mononuclear. Se puede concluir que **L3** tiene una cooperatividad positiva mientras que para **L2** no hay prácticamente cooperatividad.

Este hecho indica que el segundo metal tendrá la misma coordinación que el primero para el sistema binario Cu²⁺-**L2** con los dos metales coordinando los cuatro nitrógenos del macrociclo y el nitrógeno del brazo mientras que para **L3**, los dos metales coordinarán los cuatro nitrógenos de cada macrociclo. Los índices de coordinación se han confirmado mediante estudios de ¹H RMN paramagnético mostrados en el siguiente apartado.

Con respecto a la formación del complejo binuclear de Cu^{2+} y **L5**, se observa una disminución del valor de $K_{\text{Cu}_2\text{L}}$ de 4 unidades respecto al valor de la constante del complejo mononuclear K_{CuL} . Esta disminución se debe probablemente a la repulsión que experimenta la entrada del segundo metal en el complejo mononuclear y la unidad escuaramida que, al igual que ocurriera con el complejo mononuclear, disminuye la capacidad de coordinación de los grupos aminos que tiene en su estructura. Por lo tanto, los dos iones metálicos coordinados a los cuatro átomos de nitrógeno de cada cavidad en la coordinación de los cobres propuesta para el complejo $\text{Cu}_2\text{L5}^{4+}$ como indica la figura 6.22.

Finalmente, en la formación de los complejos trinucleares Cu_3L^{6+} para **L1**, **L2** y **L3**, las constantes son muy inferiores ($\log K_{\text{Cu}_3\text{L}} = 4.4, 4.9$ y 5.9) en comparación con los binucleares ($\log K_{\text{Cu}_2\text{L}} = 14.2, 19.0$ y 16.5) indicando primero que coordinan un número muy inferior de grupos amino. Adicionalmente, las constantes del complejo trinuclear son del mismo orden que las constantes correspondientes a la coordinación del cobre con la 2,6-(bis aminometil)piridina,³⁹ la fenantrolina^{28a,40} y la bipyridina.⁴¹ Estos análisis nos indican que el tercer metal coordinará la piridina central, la fenantrolina o la bipyridina respectivamente. Asimismo, esta coordinación se ha confirmado mediante ^1H RMN paramagnética para el complejo $\text{Cu}_3\text{L2}^{6+}$; con los ligandos **L1** y **L3** no se ha podido confirmar mediante esta técnica por problemas de solubilidad.

6.3.2.- Estudios de ^1H RMN paramagnética

En la última década, la espectroscopia de ^1H RMN paramagnética se ha aplicado a estudiar complejos multinucleares de Cu^{2+} .⁴² Los estudios aportan información sobre la estructura electrónica y la geometría de coordinación del ión metálico en disolución. Por ello, se han realizado estudios de ^1H RMN paramagnética de los complejos bi- y trinucleares de cobre de **L1** y **L2**. Los estudios se han realizado en colaboración con el profesor Hermas Jiménez del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia. Para ello, se han preparado disoluciones a distinta relación molar $\text{Cu}^{2+}:\text{L}$ 1:1 y 2:1, a pD ~ 7.5 donde se forman los complejos binucleares y trinucleares

cuantitivamente (figuras 6.18-19) y se han realizado los experimentos de ^1H RMN paramagnética.

6.3.2.1- Estudios de ^1H RMN paramagnética de los complejos binucleares de L1 y L2.

En trabajos previos, se han descrito la asignación de las señales y las propiedades características de otros sistemas dinucleares de cobre para piridinofanos y terpiridinofanos⁴² que han servido de referencia para un análisis adecuado de los espectros.

El espectro de ^1H RMN paramagnética del sistema $\text{Cu}^{2+}:\text{L1}$ con relación molar M:L 2:1 en D_2O a $\text{pD} = 7.8$ muestra a campo bajo (figura 6.23) tres señales resueltas isotrópicamente (a'), (b') y (d') y una señal no resuelta (c'). Los valores de los desplazamientos químicos (δ), los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y las anchuras de las señales a media altura ($\Delta\nu_{1/2}$) se indican en la tabla 6.8 mientras que las asignaciones de las señales se muestran en la figura 6.24.

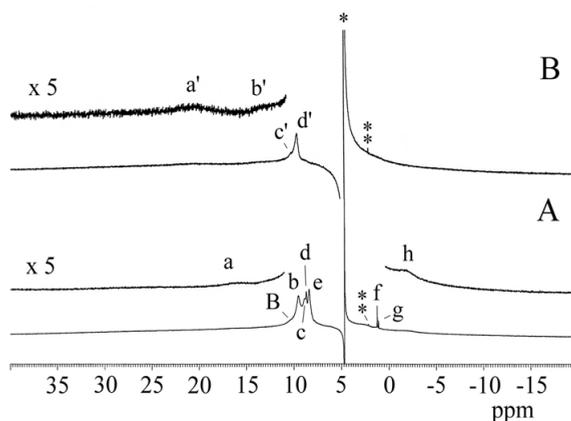


Figura 6.23.- Espectro de ^1H RMN paramagnética con un aparato de 400 MHz en D_2O a 298 K a $\text{pD} = 7.7$ de (A) $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$ y (B) $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$. En las regiones de campo bajo y

campo alto, la intensidad del espectro es multiplicada por cinco. Los asteriscos indican las señales de disolvente residual e impurezas (* H₂O y ** HOD).

Para el complejo Cu₂L1⁴⁺, las señales se agrupan en dos tipos: (1) el primer tipo de señales están situadas a 20.5 y 13.0 ppm respectivamente (a' y b') tienen unos valores cortos de T₁ (< 1 ms), una anchura de ~1000 Hz (tabla 6.7), integran 38 protones y se asignan a los protones α-CH₂, (figura 6.24) que se encuentran más cerca a los iones cobre (figura 6.23). (2) El segundo tipo de señales (c' y d') integran 9 protones y muestran valores relativamente cortos de T₁ (6.9 y 4.5 ms), pudiéndose asignar a los protones en meta y para de la piridinas.

Por lo tanto, el patrón de las señales paramagnéticas para los protones de Cu₂L1⁴⁺ y los datos potenciométricos sugiere pentacoordinación para un cobre y hexacoordinación para el segundo, como se indica en la figura 6.24.

En el espectro de ¹H RMN paramagnética para el sistema Cu²⁺:L2 con relación molar M:L 2:1 en D₂O a pH = 7.8 (figura 6.23) se observan seis señales a campo bajo, tres bien resueltas (a, b y e) y tres señales no resueltas (B c y d) y a campo alto se muestran otras tres señales (f-h). Las asignaciones de las señales se muestran en la figura 6.24 y los valores de desplazamientos químicos, tiempo de relajación longitudinal (T₁) y anchura de señal se recogen en la tabla 6.8.

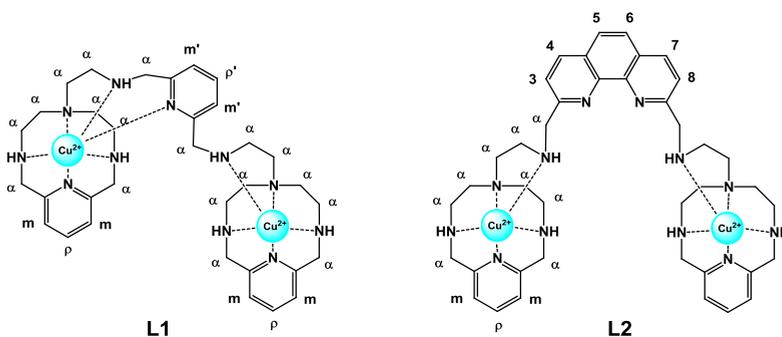


Figura 6.24.- Modelos propuestos para los complejos binucleares con Cu²⁺ de L1 y L2 obtenidos mediante RMN de paramagnéticos y la numeración empleada en los espectros de paramagnéticos.

El espectro de ^1H RMN paramagnética de $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$ difiere en varios aspectos del espectro de $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$. En primer lugar, todas las señales de $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$ están desplazadas a campo alto con respecto a las señales de $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ (figura 6.23). Asimismo, se observa un ensanchamiento de las señales paramagnéticas $\alpha\text{-CH}_2$ y un aumento de los tiempos de relajación longitudinal. Este comportamiento se debe al mayor canje magnético que el grupo fenantrolina produce en el sistema binuclear Cu_2L^{4+} en comparación con la piridina. Estos resultados se pueden interpretar asumiendo que ambos iones presentan una geometría pentacoordinada para el sistema $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$ como muestra la figura 6.24.

El espectro de ^1H RMN paramagnética se registró a varias temperaturas (desde 283 a 323 K) para los sistemas $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ y $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$. Las señales isotrópicas muestran un comportamiento anti-Curie o independiente de la temperatura exceptuando las señales de resonancia (a, h) y (a' y b') correspondientes a los protones $\alpha\text{-CH}_2$ de los brazos macrocíclicos. Estos resultados están de acuerdo con la existencia de una interacción magnética en los sistemas binucleares de Cu^{2+} acoplados. Además, se observa una interacción antiferromagnética entre los iones Cu^{2+} a través de los puentes de fenantrolina o piridina central.

Tabla 6.8.- Señales hiperfinas de ^1H RMN paramagnética de los complejos $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ y $\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$ en D_2O a 298 K y pD = 7.8.

Sistema	Señal	δ (ppm)	Nº protones	Asignación	Dependencia de la T^{fa}	T_1 (ms)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	T_2^{a} (ms)
$\text{Cu}_2\text{L2}^{4+}$	a	16.4			Curie	< 1	840	0.38
	b	9.5			Indep. de T^{fa}	2.7	~ 280	~ 1.1
	B ^b	10.3	36	αCH_2	---	c	c	c
	c	8.8			anti-Curie	2.3	c	c
	h	-1.9			Curie	< 1	720	0.44
	e	8.4	6	$\text{H}_{\text{m,p}}\text{-Py}$	anti-Curie	4.2	~ 128	~ 2.5
	d	8.7	4	$\text{H}_{3,4,7,8}\text{-Phen}$	anti-Curie	5.2	c	c
	f	1.3	2	$\text{H}_{5,6}\text{-Phen}$	anti-Curie	167.0	16	19.9
g	1.1			anti-Curie	62.9	14	22.7	
$\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$	a'	20.5	36		Curie	< 1	1200	0.27
	b'	13.0		αCH_2	Curie	< 1	840	0.38
	c'	10.2	9	$\text{H}_{\text{m,p}}\text{-Py}$	anti-Curie	6.9	b	b
	d'	9.7		$\text{H}_{\text{m,p}}\text{-Py}$	anti-Curie	4.5	180	1.8

^a Medidas desde la anchura de banda a media altura. ^b Medida a 313 K. ^c Su solapamiento impide la medida del valor.

6.3.2.2- Estudios de ^1H RMN paramagnética del complejo trinuclear $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$.

El espectro de ^1H RMN paramagnético del complejo $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$ muestra un patrón de desplazamientos químicos distinto que para el complejo $\text{Cu}_2\text{L}_2^{4+}$, y, por lo tanto, confirman la formación del complejo trinuclear. En la figura 6.25 se observan a campo bajo once señales bien resueltas (a-d, h, i, k-n y A) y cuatro señales no resueltas (e-g y j) mientras que a campo alto se observa una única señal (o). La estructura hiperfina, anchuras de señales, tiempos de relajación longitudinal y las asignaciones de las señales se indican en la tabla 6.9 y la figura 6.26. El espectro de ^1H RMN paramagnética de $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$ presenta algunas diferencias en comparación con el espectro de $\text{Cu}_2\text{L}_2^{4+}$.

En primer lugar, se observa que es mayor el número de señales isotrópicas $\alpha\text{-CH}_2$, así como el número de señales de los protones de la piridina y fenantrolina para $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$. En segundo lugar, las señales se ensanchan 1600 Hz como mínimo y disminuyen los tiempos de relajación longitudinal (T_1) y transversal (T_2). Este comportamiento se puede atribuir al cambio de las propiedades magnéticas del cobre porque se coordina de diferente modo al complejo binuclear $\text{Cu}_2\text{L}_2^{4+}$.

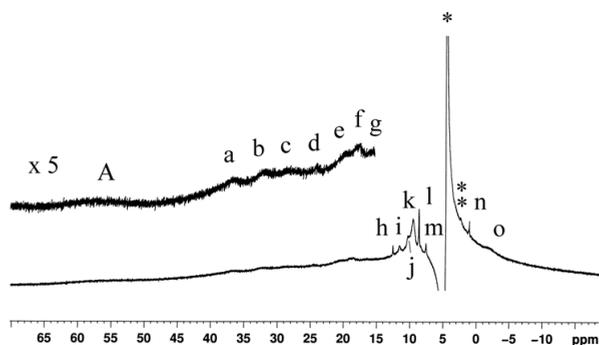


Figura 6.25.- Espectro de ^1H RMN paramagnética de $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$ con un aparato de 400 MHz en D_2O a 298 K a pD = 7.2. En la región de campo bajo la intensidad del espectro es multiplicada por cinco. Los asteriscos indican las señales de disolvente residual e impurezas (* H_2O y ** HOD).

Asimismo, las señales α -CH₂ para Cu₃L2⁶⁺ se desplazan hasta 40 ppm en comparación con las señales del espectro del complejo Cu₂L2⁴⁺ y el grupo de señales de los protones de la fenantrolina (H_{5,6}-Phen) del sistema trinuclear se ensanchan de manera distinta al sistema binuclear. Las propiedades electrónicas del sistema trinuclear son debidas a la gran interacción antiferromagnética entre los tres iones Cu²⁺ y se pueden interpretar en función de dos posibles geometrías para el complejo Cu₃L2⁶⁺, una geometría tetracoordinada para los tres iones cobres como se representa en la figura 6.26 o una geometría en la cual dos iones Cu²⁺ están pentacoordinados y el restante está tetracoordinado a la fenantrolina.

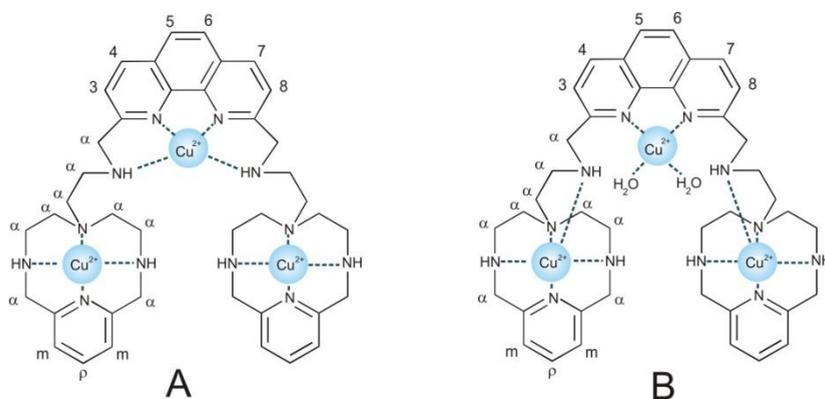


Figura 6.26.- Modelos propuestos para el complejo trinuclear con Cu²⁺ de L2 obtenidos mediante ¹H RMN paramagnética y la numeración empleada

Finalmente, se registraron los espectros de ¹H RMN paramagnética a varias temperaturas para Cu₃L2⁶⁺. Las señales mostradas en la tabla 6.9 tienen tanto comportamiento Curie como anti-Curie e indican un acoplamiento magnético para el sistema trinuclear de cobre.⁴³

Tabla 6.9.- Señales hiperfinas de ^1H RMN paramagnética del complejo $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$ en D_2O a 298 K y pD = 7.2.

Sistema	Señal	δ (ppm)	Nº protones	Asignación	Dependencia de la T^a	T_1 (ms)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	T_2^a (ms)	
$\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$	A	56.2			Curie	< 1	2570	0.12	
	a	36.5			Curie	< 1	914	0.35	
	b	32.2			Curie	< 1	686	0.46	
	c	28.3			Curie	< 1	800	0.40	
	d	24.7	36	αCH_2	Curie	< 1	457	0.70	
	e	20.4			Curie	< 1	b	b	
	f	18.6			Curie	< 1	b	b	
	g	16.6			Curie	< 1	b	b	
	o	-1.9			Curie	< 1	578	0.55	
	h	12.6				anti-Curie	9.1	39	8.2
	l	8.7	6	$\text{H}_p\text{-Py};$ $\text{H}_{4,5,6,7}\text{-Phen}$		anti-Curie	8.6	44	7.2
	m	7.6				anti-Curie	8.0	53	6.0
	n	1.1				anti-Curie	9.5	36	8.8
	i	11.6				anti-Curie	5.7	120	2.7
	j	10.3	6	$\text{H}_m\text{-Py};$ $\text{H}_{3,8}\text{-Phen}$		anti-Curie	b	b	b
k	9.6				anti-Curie	4.9	241	1.3	

^a Medidas desde la anchura de banda a media altura. ^b El solapamiento impide la medida del valor.

6.4.- Estudios cinéticos

Con idea de obtener más información sobre el proceso de formación y disociación del ión metálico en los complejos politópicos se han realizado estudios cinéticos de formación y descomposición de los complejos de Cu^{2+} con **L1** y **L2** en colaboración con el grupo del *profesor Manolo García Basallote* de la Universidad de Cádiz.

6.4.1.- Cinéticas de formación de los complejos de L1 y L2 con Cu^{2+}

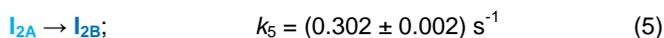
Las cinéticas de formación de los complejos de el Cu^{2+} con **L1** y **L2** se estudiaron en un medio ligeramente ácido (pH 3.0 – 5.5) bajo condiciones de pseudo primer orden, con relaciones molares M:L de 1:1, 2:1 y 3:1. Además, los experimentos se llevaron a cabo sin la utilización de ningún tampón, porque se ha comprobado que introduce algunas complicaciones en este tipo de estudios.⁴⁴

El producto final de reacción es, de acuerdo con los equilibrios en disolución, una mezcla variable de diferentes especies $\text{Cu}_y\text{H}_x\text{L}^{(2y+x)+}$. La naturaleza y concentración de estas especies depende del valor de pH, tipo de ligando y relación molar empleada. En el caso de **L2**, las especies formadas son $\text{CuH}_3\text{L}_2^{5+}$, $\text{Cu}_2\text{HL}_2^{5+}$ y la especie trinuclear $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$ se forma para una relación molar 3:1. Para **L1**, las especies formadas son $\text{CuH}_2\text{L}_1^{4+}$ y $\text{Cu}_2\text{HL}_1^{5+}$ aunque para ningún caso es posible extraer información acerca de la formación de especies trinucleares porque precipita cuando la relación molar es 3:1.

Aunque existe una similitud estructural entre **L1** y **L2**, los resultados cinéticos obtenidos para la complejación con Cu^{2+} revelan un comportamiento diferente. En ambos casos, los cambios espectrales indican cinéticas polifásicas con constantes de velocidad dependientes del pH.

El análisis de los datos indica que la formación de los complejos mono- bi- y trinucleares de Cu^{2+} bajo las condiciones experimentales ocurren a partir de la especie H_5L^{5+} , representada en la ecuación (1). Aunque la forma H_6L^{6+} es la

mayoritaria en disolución, parece que la alta carga de dicha especie y la posible formación de una red de puentes de hidrógeno hacen que esta especie sea inefectiva para la formación del complejo. Los experimentos en relación molar 1:1 proporcionan información sobre la cinética de coordinación del primer ion metálico, e indican la formación de una especie I_A (I_A, k₁ ecuación, figuras 6.27-6.29) con un espectro UV-Vis típico de un Cu²⁺ coordinado a una fenantrolina.⁴⁵ Sin embargo, esta especie evoluciona lentamente a una especie (I_{A'}, k₃, ecuación 3) con un máximo a 680 nm que coincide con el espectro observado para los complejos con el ión metálico coordinado a la cavidad macrocíclica aunque no es posible evidenciar si hay alguna interacción con el grupo NH del brazo lateral (figuras 6.27-6.29).²⁵ Entre estas dos etapas se forma otro intermedio con una banda centrada a 730 nm (I_B, k₂) que parece indicar que el ión metálico está coordinado simultáneamente a la unidad de fenantrolina y a alguno de los átomos de nitrógeno alifáticos.⁴⁵



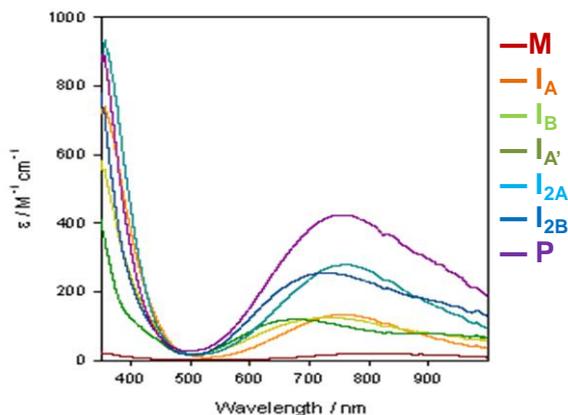


Figura 6.27.- Espectros de las especies intermedias y productos observados en la formación de los complejos mono-, bi- y trinuclear de Cu^{2+} y **L2**

La constante de velocidad para la primera etapa de formación ($k_1 = (1.27 \pm 0.01) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) es mucho menor que la observada para la formación de complejos de Cu^{2+} con fenantrolina ($6.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Sin embargo, esta diferencia puede ser debida a las repulsiones electrostáticas entre el ión metálico y las especies altamente protonadas del ligando. Los procesos reorganizativos posteriores en el complejo mononuclear tienen lugar con constantes de velocidad de primer orden de $k_2 = 0.200 \pm 0.006 \text{ s}^{-1}$ y $k_3 = (5.67 \pm 0.08) \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$.

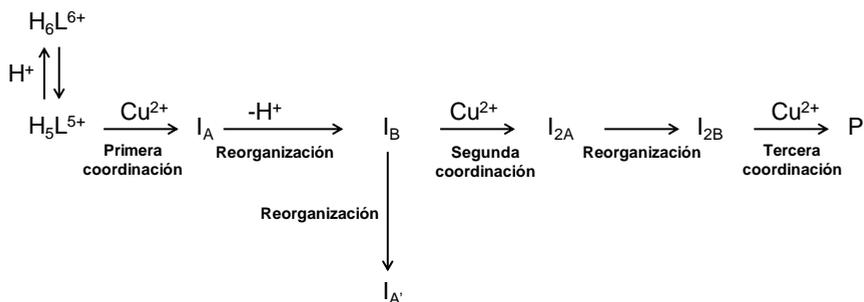


Figura 6.28.- Modelo cinético para el ajuste de la formación entre el Cu^{2+} y el ligando **L2**.

El análisis de los experimentos cinéticos con relación molar 2:1 revela que el segundo ión metálico reacciona con el intermedio I_B para formar inicialmente una especie binuclear con un máximo a 760 nm (I_{2A}, k_4 , figuras 6.27-6.29). A continuación, el intermedio evoluciona a una especie con una banda centrada a 730 nm (I_{2B}, k_5), indicando que el segundo ión metálico se mueve desde su posición inicial en la fenantrolina a una coordinación entre la fenantrolina y la parte alifática del receptor (figura 6.29). Los datos cinéticos no proporcionan ninguna evidencia del posterior reagrupamiento para acomodar este segundo ión exclusivamente hacia el anillo macrocíclico. El menor valor de k_4 ($k_4 = (13.80 \pm 0.05) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) con respecto a k_1 ($k_1 = (1.27 \pm 0.01) \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) puede ser otra vez razonado mediante consideraciones electrostáticas, mientras que la similitud de k_2 y k_5 apoya la interpretación que corresponden con el mismo tipo de reorganización molecular.

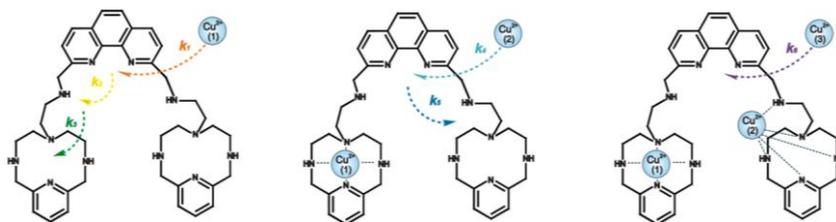


Figura 6.29.- Ilustración de la secuencia del movimiento de los iones metálicos Cu²⁺ durante la formación de los complejos mono- bi- y trinuclear en L2.

Los resultados cinéticos acerca de la formación de las especies trinucleares indican que el tercer Cu²⁺ está localizado en el único sitio disponible, coordinando a la unidad de fenantrolina (P, k_6). El proceso ocurre con una constante de velocidad de segundo orden $k_6 = (1.2 \pm 0.1) \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y produce una especie con un máximo a 750 nm (figura 6.27), que es probablemente el resultado del solapamiento entre el cromóforo Cu²⁺-fenantrolina (770 nm) y dos iones Cu²⁺ coordinadas a las cavidades macrocíclicas (690 nm).

Para el caso de **L1**, los cambios espectrales requieren de un modelo distinto, con tres pasos cinéticos consecutivos (figura 6.30); el primer paso muestra una dependencia de primer orden respecto a metal y ligando, y los dos últimos pasos corresponden a una reorganización molecular con constantes de primer orden también. Los valores de las constantes de velocidad son similares para las relaciones molares 1:1 y 2:1. El ajuste satisfactorio para ambas relaciones sugiere el modelo con las ecuaciones 7-13 (figura 6.30).

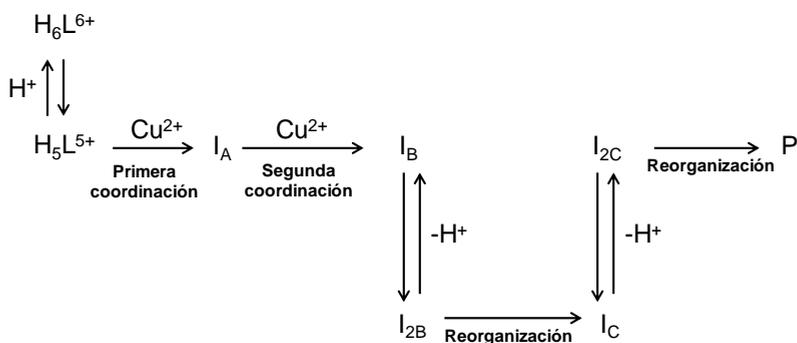
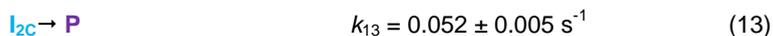
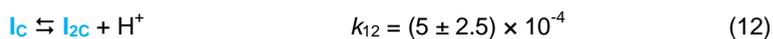
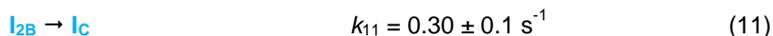
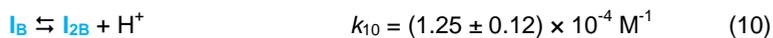
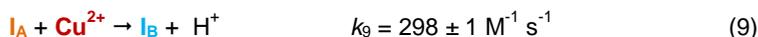
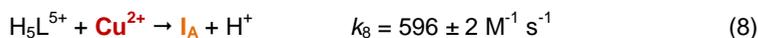


Figura 6.30.- Modelo cinético para el ajuste de la formación entre el Cu^{2+} y el ligando **L1**.

La figura 6.31 muestra los espectros de absorción de las diferentes especies, siendo idénticos para ambas relaciones molares 1:1 y 2:1. Estos espectros y la similitud de los valores obtenidos para las constantes, se interpretan considerando que la formación de las especies binucleares están controladas por un factor estadístico,⁴⁶ es decir, la coordinación de ambos metales ocurre en dos procesos consecutivos con dos constantes de velocidad, aunque por razones matemáticas sólo uno de los procesos con una constante de velocidad correspondiente a la coordinación del segundo metal se requiere para ajustar los datos experimentales.

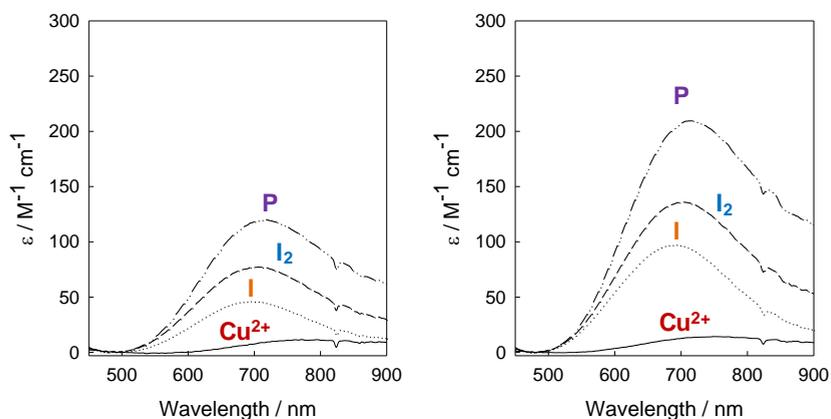


Figura 6.31.- Espectros electrónicos de las especies intermedias y productos observados en la formación de los complejos de **L1** con Cu^{2+} en relación molar 1:1 (izda) y 2:1 (dcha).

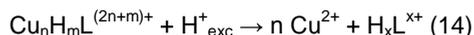
Al igual que para **L2**, la especie reactiva inicial en el sistema Cu^{2+} -**L1** es $\text{H}_5\text{L1}^{5+}$. La observación de una única etapa dependiente de la concentración del metal indica que la coordinación de ambos centros metálicos tiene lugar mediante un proceso controlado estadísticamente. Después de esta etapa inicial tienen lugar dos procesos de reorganización finalizando con la formación del producto $\text{Cu}_2\text{HL1}^{5+}$. El incremento de las absorptividades molares en cada paso se relaciona con un aumento en el número de átomos de nitrógeno que participa en la coordinación del metal. Por otro lado, el

espectro final obtenido es similar al del complejo de Cu^{2+} coordinado con la cavidad macrocíclica, lo que sugiere que en el complejo binuclear los dos iones Cu^{2+} están coordinados en las cavidades macrocíclicas. Asimismo, un proceso de formación controlado estadísticamente indica que ambas cavidades macrocíclicas se comportan independientemente.

Por lo tanto, la rigidez introducida por la fenantrolina es el origen del comportamiento cinético diferente observado para la formación de complejos en ambos ligandos, ya que la cinética estadística requiere que un ligando sea lo suficientemente flexible para llevar rápidamente todos los cambios estructurales requeridos para la coordinación de los dos metales

6.4.2.- Cinéticas de descomposición promovidas por ácido de los complejos de Cu^{2+} con L1 y L2

En esta apartado se analizan los resultados correspondientes a la disociación del ión metálico en los complejos. La adición de un exceso de ácido a disoluciones de los complejos metálicos produce una descomposición con la salida del Cu^{2+} y la formación de la especie protonada del ligando (ecuación 14). Las cinéticas de este proceso se pueden estudiar monitorizando la desaparición de las bandas de absorción del complejo. Este tipo de estudios nos aportan información tanto de la descomposición del complejo como de la existencia de reorganizaciones estructurales de los complejos metálicos.⁴⁷



Un hecho común en la descomposición de las especies estudiadas para los complejos de **L1** y **L2** es la existencia de una etapa rápida que se produce dentro del tiempo de mezcla del instrumento de flujo-detenido (ca. 1.7 ms) que está señalizada por el desplazamiento de la banda de absorción del complejo tras la adición del ácido.

Tras esta etapa inicial, se produce una segunda etapa donde se observa la desaparición de la banda hasta la descomposición completa del complejo en un proceso tan lento que se puede seguir con un espectrómetro convencional. Estos hechos indican que la descomposición del complejo ocurre con cinética bifásica en todos los casos. Aunque la primera etapa es demasiado rápida para que la constante de velocidad ($k_{1\text{obs}}$) sea medida mediante técnicas de flujo-detenido, si que existe la formación de un intermedio que se descompone lentamente en Cu^{2+} libre en un proceso cuyos cambios espectrales pueden ser ajustados satisfactoriamente por una exponencial con una velocidad de constante $k_{2\text{obs}}$ (ecuaciones 15 y 16).

$$k_{2\text{obs}} = a + b [\text{H}^+] \quad (15)$$

$$k_{2\text{obs}} = c + d [\text{H}^+]^2 \quad (16)$$

Se escogieron las especies mayoritarias en disolución mostradas en la figura 6.18 para las relaciones molares M:L 1:1 ($\text{CuH}_3\text{L}_2^{5+}$), 2:1 ($\text{Cu}_2\text{L}_2^{4+}$) y 3:1 ($\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$). Los estudios muestran una etapa rápida donde las bandas de absorción de cada especie (640 nm para $\text{CuH}_3\text{L}_2^{5+}$, 647 nm para $\text{Cu}_2\text{L}_2^{4+}$ y 710 nm para $\text{Cu}_3\text{L}_2^{6+}$ se desplazan hasta 750 nm. En la segunda etapa, el intermedio con el máximo a 750 nm desaparece con constantes de velocidad que dependen linealmente de la concentración de ácido. Puesto que los datos de descomposición del intermedio en los experimentos empiezan con tres especies diferentes son idénticas, se puede sugerir que se forma en todos los casos el mismo intermedio y mediante la ecuación 15 se obtiene $a = (1.8 \pm 0.7) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $b = (3.2 \pm 0.1) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Las especies estudiadas para el sistema $\text{Cu}^{2+}\text{-L1}$ corresponden a las mayoritarias en disolución, $\text{CuH}_2\text{L1}^{4+}$ y $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ (figura 6.18). Ambas especies muestran una banda de absorción centrada a 690 nm que se desplaza a 730 nm dentro del tiempo de mezcla del instrumento. La figura 6.32 muestra que la descomposición de los intermedios con ambos ligandos ocurren en cinéticas parecidas, los intentos de ajustar los valores de $k_{2\text{obs}}$ para la descomposición de los complejos de **L1** con la ecuación 15 fueron

infructuosos y únicamente se ajustaron con la ecuación 16 que corresponden a una dependencia de segundo orden con respecto a la concentración de ácido. Este tipo de comportamiento también se ha observado previamente para complejos metálicos poliamínicos análogos.⁴⁸ Los valores derivados para c son $(2 \pm 1) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para $\text{CuH}_2\text{L1}^{4+}$ y $(1.3 \pm 0.6) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ y los obtenidos de d son $(3.2 \pm 0.3) \times 10^{-3}$ y $(3.0 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ s}^{-1}$ para $\text{CuH}_2\text{L1}^{4+}$ y $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ respectivamente. Además, los valores similares de las constantes de velocidad y la similitud de la posición de la banda de absorción para los intermedios formados durante la descomposición de ambas especies es la misma. Un ajuste adecuado de todos los datos para ambas especies proporciona el valor de $c = (1.4 \pm 0.6) \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ y $d = (3.1 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ mol}^{-2} \text{ dm}^6 \text{ s}^{-1}$.

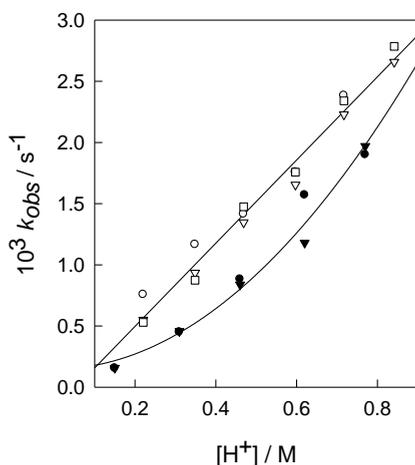


Figura 6.32.- Trazos de la dependencia con la concentración de ácido de las constantes de velocidad observadas para el segundo paso cinético en la descomposición cinética de $\text{CuH}_2\text{L1}^{4+}$ (●), $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ (▲) y de los complejos de **L2** mononucleares (○), binucleares (Δ) y trinuclear (□).

Los espectros registrados de los intermedios formados durante la descomposición muestran que las absorptividades molares de $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ son aproximadamente el doble que la del intermedio derivado de $\text{CuH}_2\text{L1}^{4+}$, indicando una cinética estadística durante la descomposición del complejo.

^{49,50} En este caso, las dos subunidades macrocíclicas de **L1** se comportarían independientemente durante la descomposición del complejo.

6.5.- Coordinación con Mn^{2+}

El término manganeso procede de Magnesia, que en griego designaba una región de Tesalia (Grecia) donde se obtenían minerales que contenían este metal. Los minerales que contenían manganeso se utilizaban por Griegos, Egipcios y Romanos como colorantes del vidrio y en la producción de acero.

En el siglo XVIII, varios alquimistas emplearon compuestos de manganeso en sus experimentos aunque fue *Johan Gottlieb Gahn* el primero en aislar una muestra de manganeso metálico mediante la reducción del dióxido de manganeso con carbono. En la actualidad el manganeso se utiliza principalmente en la metalurgia y como componente en las baterías.

En manganeso se puede encontrar en múltiples estados de oxidación (+2, +3, +4, +6 y +7). Este metal es un oligoelemento esencial para todas las formas de vida donde los iones metálicos Mn^{2+} se encuentran como cofactores de una gran variedad de enzimas. Las enzimas de manganeso son particularmente importantes en la eliminación de radicales libres de oxígeno en los organismos. Entre las enzimas más importantes destacan la superóxido dismutasa de manganeso y la arginasa. El manganeso se acumula también en el fotosistema II de los cloroplastos de las plantas, responsable de la fotooxidación del agua durante las reacciones con luz de la fotosíntesis.

En este trabajo se hace especial atención a la utilización de complejos metálicos para mimetizar enzimas del tipo superoxidismutasa. Por lo cual, se ha estudiado la coordinación de los ligandos al Mn^{2+} mediante potenciometría.

6.5.1.- Estudios potenciométricos de la interacción con Mn^{2+}

Se estudió por potenciometría la coordinación del Mn^{2+} a los ligandos **L1**, **L2** y **L3** en disolución acuosa de NaCl 0.15 M como fuerza iónica y una temperatura de 298.0 K. En la tabla 6.10 se muestran los logaritmos de las constantes globales y sucesivas de estabilidad obtenidos para esta interacción.

Tabla 6.10.- Logaritmos de las constantes de estabilidad globales y sucesivas para la interacción de los ligandos **L1**, **L2** y **L3** con Mn^{2+} determinadas en NaCl 0.15 M y a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción ^a	L1	L2	L3
$4H + M + L \rightleftharpoons MH_4L$	41.22(2) ^b		
$3H + M + L \rightleftharpoons MH_3L$	35.5(1)	34.73(4)	32.47(4)
$2H + M + L \rightleftharpoons MH_2L$	28.89(2)	28.32(5)	26.68(1)
$H + M + L \rightleftharpoons MHL$	20.82(4)	19.63(4)	18.80(3)
$M + L \rightleftharpoons ML$	10.95(6)	9.16(3)	9.78(4)
$M + L + H_2O \rightleftharpoons ML(OH) + H$			0.29(3)
$H + 2M + L \rightleftharpoons M_2HL$	25.97(4)	25.85(3)	
$2M + L \rightleftharpoons M_2L$	18.3(1)	18.38(5)	16.84(2)
$2M + L + H_2O \rightleftharpoons M_2L(OH) + H$	9.4(1)	7.93(7)	8.00(3)
$2M + L + 2H_2O \rightleftharpoons M_2L(OH)_2 + 2H$	-1.1(1)	-2.76(6)	
$MH_3L + H \rightleftharpoons MH_4L$	5.72(2)		
$MH_2L + H \rightleftharpoons MH_3L$	6.61(2)	6.91(5)	5.79(4)
$MHL + H \rightleftharpoons MH_2L$	8.07(4)	8.69(5)	7.88(3)
$ML + H \rightleftharpoons MHL$	9.87(6)	10.47(4)	9.02(4)
$ML + H_2O \rightleftharpoons ML(OH) + H$			9.49(4)
$M_2L + H \rightleftharpoons M_2HL$	7.67(4)	7.47(5)	
$ML + M \rightleftharpoons M_2L$	7.35(6)	9.22(5)	7.06(4)
$M_2L + H_2O \rightleftharpoons M_2L(OH) + H$	-8.9(1)	-10.45(7)	-8.84(3)
$M_2L(OH) + H_2O \rightleftharpoons M_2L(OH)_2 + H$	-10.5(1)	-10.69(7)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

La coordinación de Mn^{2+} con los ligandos muestra la formación de especies mono- y binucleares dependiendo de la relación molar utilizada. La estequiometría de los complejos mononucleares es $[MnH_xL]^{(2+x)+}$ donde los valores de x van desde 0 a 4 para **L1**, desde 0 a 3 para **L2** y desde -1 a 3 para **L3**. Para los complejos binucleares se encuentra una estequiometría $[Mn_2H_xL]^{(4+x)+}$ con valores de x que varían desde -2 hasta 1 para **L1** y **L2** y desde -1 hasta 0 para **L3**.

La figura 6.33 muestran los diagramas de distribución obtenidos con el programa HYSS²² con una relación molar M:L 1:1, donde se observa como las especies mononucleares predominan por encima de pH 5.0 para **L1** y de pH 6.0 para **L2** y **L3**. Un hecho resaltable ocurre para el sistema binario de Mn^{2+} con **L2** donde coexisten las especies mono y binucleares con una contribución entre el 30–40 % de estas últimas.

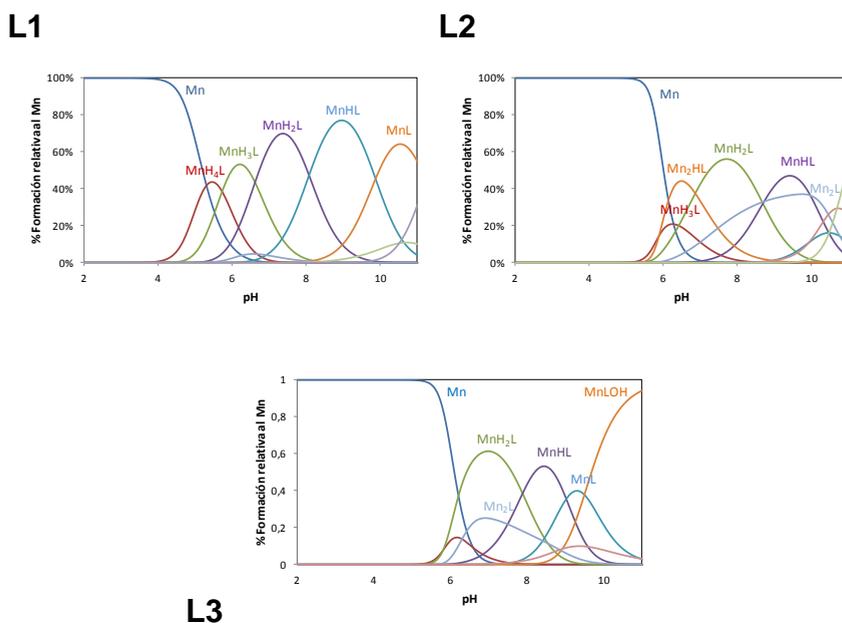


Figura 6.33.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos **L1**, **L2** y **L3** con Mn^{2+} en relación molar M:L 1:1.

Para los sistemas binarios con relación molar M:L 2:1 (ver figura 6.34) predominan las especies binucleares por encima de pH 6.0. Las constantes sucesivas para la formación del complejo binuclear Mn_2L^{4+} ($\log K_{M_2L}$) son inferiores que las constantes del complejo mononuclear MnL^{2+} para **L1** y **L3** mientras que son iguales estadísticamente para **L2**. Este hecho sugiere una cooperatividad positiva en la coordinación del segundo Mn^{2+} .

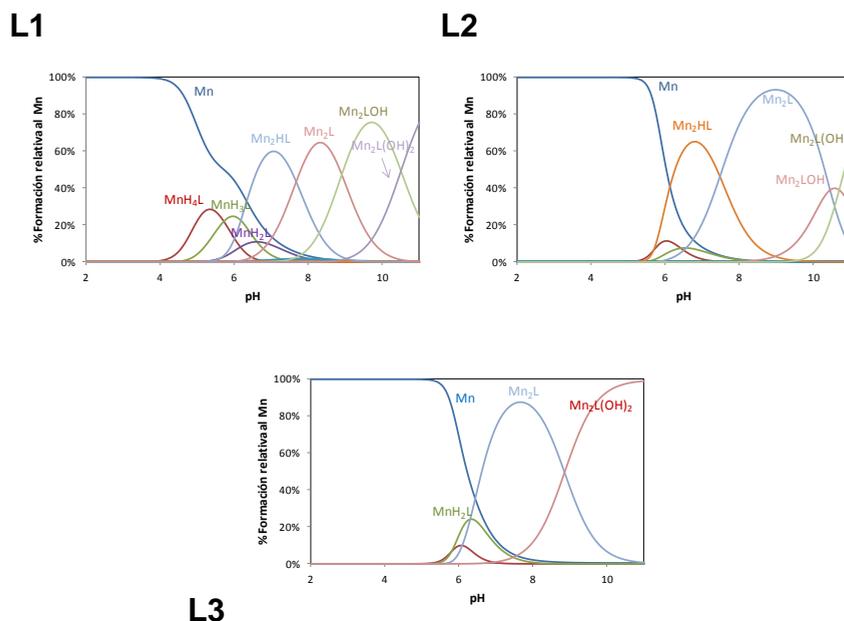


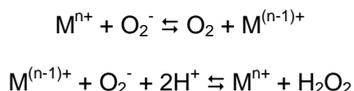
Figura 6.34.- Diagramas de distribución de especies para la interacción de los ligandos **L1**, **L2** y **L3** con Mn^{2+} en relación molar M:L 2:1.

6.6.-Actividad superóxido dismutasa

La mayoría de los seres vivos consumen oxígeno en la respiración celular y una fracción de este oxígeno es metabolizado, formando el anión superóxido. El anión superóxido se ha demostrado que es un mediador en enfermedades derivadas de procesos inflamatorios como la apoplejía o el infarto de miocardio, en enfermedades como la artritis y juegan un papel fundamental en el inicio de desordenes neurológicos como la enfermedad de Parkinson.⁵¹ También, se le ha relacionado como mediador en diferentes estados de enfermedades como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA),⁵² apoptosis neuronal,⁵³ cáncer^{54,55} o síndrome de inmunodeficiencia adquirida⁵⁵ (SIDA).

El anión superóxido dismuta espontáneamente a una velocidad relativamente alta en condiciones fisiológicas, aunque está no es lo suficientemente alta como para mantener la concentración del superóxido lo suficientemente baja para que sus efectos tóxicos no se manifiesten. Por este motivo, los seres vivos necesitan catalizar esta dismutación con enorme eficacia utilizando las enzimas superóxido dismutasa o SOD.

Las SODs constituyen una familia de metaloenzimas en cuyo centro activo hay un metal capaz de catalizar reacciones redox por un electrón. La catálisis es posible gracias a que el metal actúa de intermediario en la transferencia del electrón mediante un mecanismo tipo "ping-pong"⁵⁶ mostrado en las siguientes reacciones:



Entre los metales más habituales presentes en las SOD, se encuentran el Cu^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+} , aunque recientemente han sido descubiertas⁵⁷ SODs que tienen Ni^{2+} como en *streptomyces*⁵⁸ y cianobacterias.⁵⁹ En el cuerpo humano existen básicamente tres tipos de SOD, llamados SOD1, SOD2 y SOD3. Tanto la SOD1 como la SOD3 son de cobre y zinc. La SOD1 se encuentra en el citoplasma celular y la SOD2 se encuentra en el espacio extracelular. Por otro lado, la SOD2 contiene manganeso en su centro activo y se encuentra principalmente en las mitocondrias.

6.6.1.- Superóxido dismutasas de cobre y zinc

Las primeras enzimas SOD en ser aislados fueron las de cobre y zinc por Mann y Keilin⁶⁰ en 1932, aunque no se determinó su función biológica hasta 1969 cuando McCord y Fridovich las relacionaron con la catálisis de la dismutación del anión superóxido.⁶¹

Las enzimas de cobre y zinc se abrevian como Cu₂Zn₂SOD y son dímeros, en su mayoría, de alrededor de 32 kDa. Cada dímero se compone de ocho hojas antiparalelas formando un motivo estructural de barril-β. En cada dímero hay un átomo de cobre y otro de zinc (figura 6.35).

El centro catalítico se encuentra en el interior de una cavidad en forma de cono de la proteína de 24 Å de diámetro en la parte externa y 4 Å en la parte interna. Esta cavidad se encuentra fuera del barril-β y posee en sus paredes, cadenas laterales de aminoácidos cargados que crean un campo eléctrico que atrae las cargas negativas hacia el interior de la cavidad.⁶²

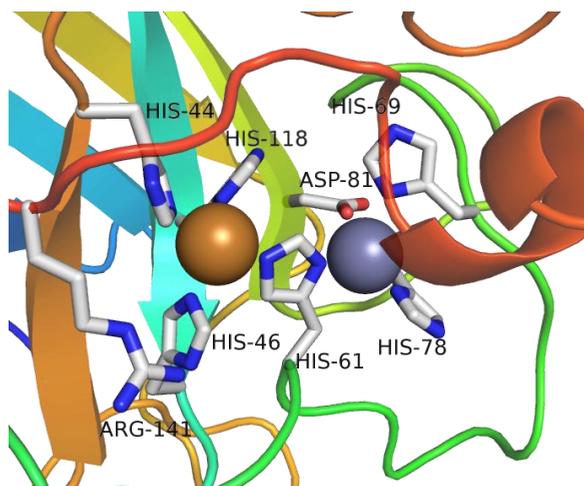


Figura 6.35.- Centro activo de la Cu₂Zn₂SOD

En el interior de la cavidad se encuentra un átomo de cobre y otro de zinc unidos por una histidina cuyo grupo imidazol se encuentra desprotonado y hace de puente entre ambos iones metálicos. Cuando el cobre se encuentra en su estado oxidado, la esfera de coordinación la completan tres residuos de histidina: His-44, His-46 y His-118 y una molécula de agua (figura 6.35). La geometría de coordinación es piramidal de base cuadrada distorsionada. Con respecto al zinc, su esfera de coordinación la completan dos histidinas His-69 e His-78 y un aspartato Asp-81, adoptando una geometría de tetraedro distorsionado.

En el centro activo el cobre es el metal electroactivo y el zinc tiene una función estructural, próximo al cobre se encuentra una cadena lateral de una arginina (Arg-141) que está cargada positivamente y cuya función es ayudar en la transferencia de protones, colocando al anión superóxido en la posición adecuada, y crear un gradiente de potencial eléctrico.

El mecanismo propuesto para el ciclo catalítico de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ consta de una etapa de oxidación y otra de reducción y, entre ambas, etapas de transferencia de protones y de entrada del sustrato y salida del producto (figura 6.36).⁶³

El anión superóxido se difunde desde el entorno hasta el centro activo guiado por un campo eléctrico causado por aminoácidos cargados situados en las paredes de la cavidad. Entre ellos, la Arg-141 juega un papel muy importante porque, no sólo atrae al O_2^- , sino que lo coloca en la orientación adecuada para poder reaccionar eficazmente. Una vez unido el superóxido al átomo de cobre, se produce una transferencia electrónica por un mecanismo de esfera interna: el O_2^- se oxida a O_2 y el átomo de Cu^{2+} se reduce a Cu^+ . El O_2 generado se libera al medio. Al reducirse el centro de cobre, éste se descoordina de la His-61, la cual se protona. El siguiente paso consiste en la fijación de un segundo O_2^- de forma similar al caso anterior. Una vez fijado, tiene lugar una transferencia electrónica por un mecanismo de esfera interna asociado a la transferencia del protón de la His-61 al superóxido para formar HO_2^- . La transferencia de un electrón regenera el Cu^{2+} y el anión HO_2^- el cual es liberado y se protona para formar H_2O_2 ; el puente imidazolato entre el Cu^{2+} y el Zn^{2+} se regenera y se vuelve al comienzo del ciclo catalítico.

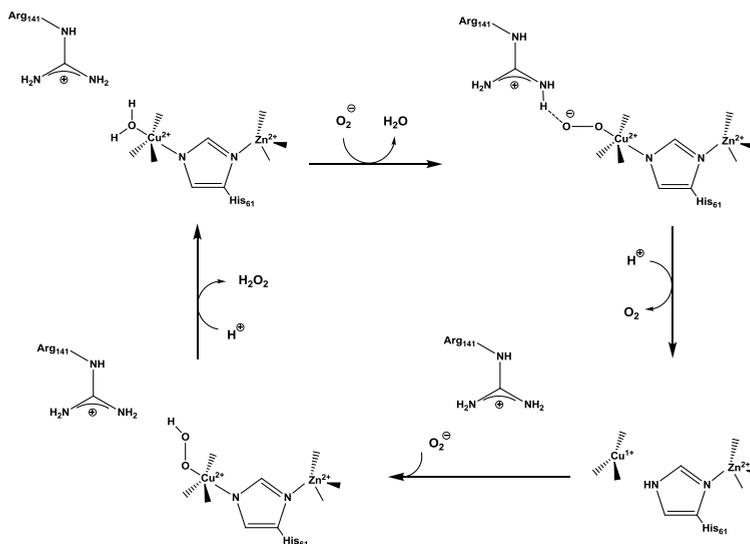


Figura 6.36.- Ciclo catalítico de Cu₂Zn₂SOD, mecanismo propuesto de esfera interna. Adaptado de Cabelli *et al.*⁶³

6.6.2.- Superóxido dismutasa de manganeso

La MnSOD fue descubierta por Fridovich y McCord en 1970⁶⁴, es una enzima presente en casi todos los seres vivos, desde bacterias hasta el ser humano. Su estructura primaria está compuesta por unos 200 residuos⁶⁵ y la estructura secundaria se dispone en dos dominios, el primero tiene dos hélices- α (α 1 y α 2) y el segundo, cinco hélices- α (de α -3 a α -7) y tres hojas β . Asimismo, el centro activo se sitúa entre ambos dominios.

La MnSOD suelen encontrarse en forma de dímeros y esta asociación propicia ciertos residuos localizados cerca de los centros metálicos^{65,66} de modo que ambos átomos de manganeso quedan a una distancia de unos 18 Å.^{66a,67}

En su centro activo tiene un catión Mn²⁺ está coordinado a tres histidinas (His-28, His-83 e His-170), un aspartato (Asp-166) y una molécula de agua. La geometría de coordinación es una bipirámide trigonal distorsionada con una de las histidinas y el agua en las posiciones axiales (figura 6.37). El metal se encuentra, por lo tanto, pentacoordinado; sin embargo, pequeñas

moléculas pueden alcanzar el centro metálico y coordinarse a él, convirtiéndolo en hexacoordinado. Este hecho sugiere que durante el ciclo catalítico, el superóxido se une directamente al metal.⁶⁸

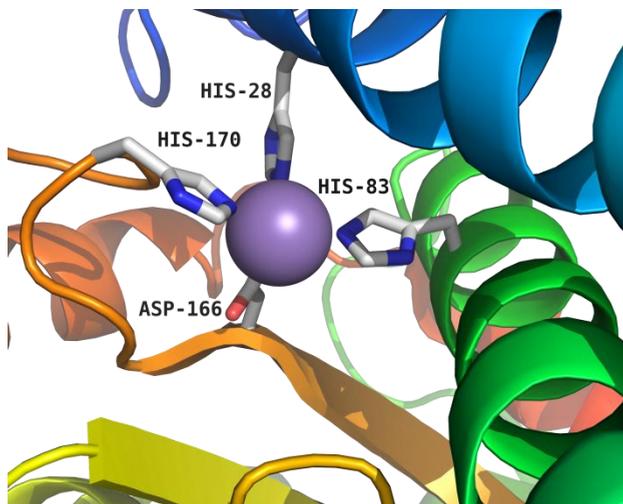


Figura 6.37.- Centro activo de la MnSOD

El mecanismo es similar a la de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$: el ciclo consiste en pasos de oxidación-reducción junto con pasos de transferencia de protones y coordinación-descoordinación al centro metálico (figura 6.38).

El centro metálico posee un ligando acuo/hidroxo, que en algunos pasos del ciclo catalítico actúa como dador o aceptor de protones. Además de ayudar en la transferencia de protones, también ayuda al O_2^- a colocarse en el centro activo en la orientación adecuada.

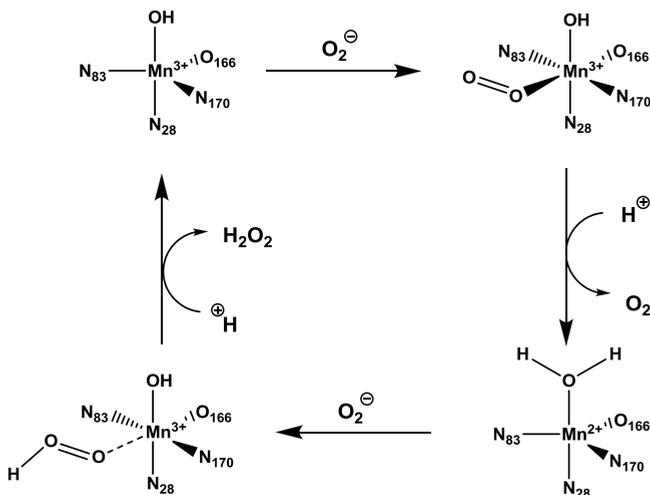


Figura 6.38.- Ciclo catalítico de la MnSOD. Adaptado de Cabelli *et al.* y Holm *et al.*⁶⁹

La fijación del superóxido al metal en el paso de oxidación tiene lugar sin desplazamiento del ligando hidroxilo; es decir: aumenta el índice de coordinación del manganeso.⁶² La oxidación del superóxido transcurre por un mecanismo de esfera interna. En la siguiente etapa, el superóxido es reducido por un mecanismo de esfera externa. El manganeso posee un ligando acuoso, el cual cree que tiene una gran importancia en el mecanismo catalítico, tanto como dador o aceptor de protones como para coordinar al superóxido en la posición adecuada.

6.6.3.- Miméticos de SOD

Un complejo metálico es un mimético enzimático cuando reproduce las funciones del centro activo de una enzima. Un diseño adecuado de un mimético enzimático nos aporta información sobre los mecanismos de reacción de la enzima nativa y abre la posibilidad de su uso como fármaco si posee una actividad considerable.

En la literatura hay abundantes ejemplos de miméticos enzimáticos de la superóxido dismutasa y sus distintas clases (figura 6.39). La mayoría de los

intentos de reproducir el centro activo de las $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ se han dirigido a imitar el centro activo mediante la síntesis de complejos binucleares con imidazol puente, bien con dos átomos de cobre⁷⁰ o con un átomo de cobre y otro de zinc.⁷¹

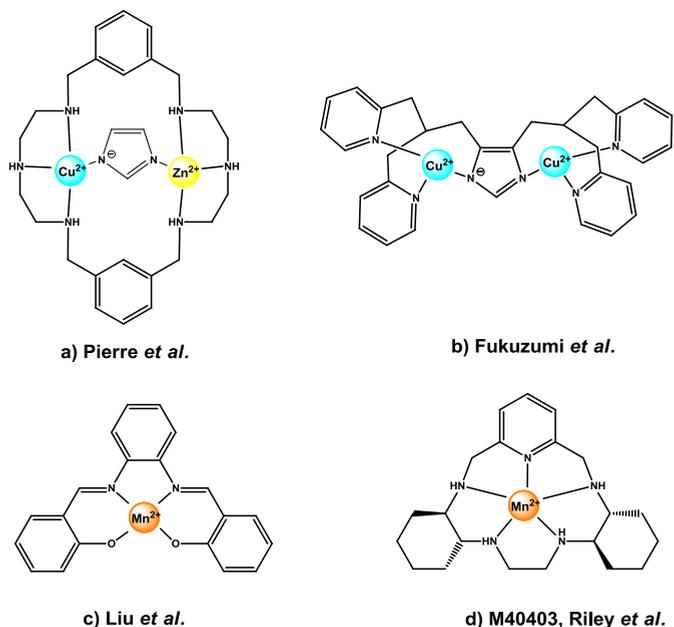


Figura 6.39.- Algunos ejemplos destacados de miméticos de $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ y MnSOD encontrados en la bibliografía.

En todos los sistemas biológicos, la estructura determina la función. En el diseño de miméticos, la filosofía es la misma: imitar estructuralmente el centro activo de una enzima porque, probablemente, tenga como resultado un funcionamiento similar. Sin embargo, también es posible el enfoque contrario: diseñar complejos de Cu^{2+} sin similitud estructural con el centro activo de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ y ensayar su actividad como catalizadores de la dismutación del superóxido. Entre los ejemplos bibliográficos que se incluyen en esta categoría hay una gran variedad estructural: complejos mononucleares, binucleares e incluso trinucleares, los cuales no necesariamente presentan similitudes estructurales con la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$, pero son capaces de catalizar la dismutación del O_2^- .

Aunque la mayoría de los esfuerzos por mimetizar la SOD se han centrado en la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ se han desarrollado en la última década la síntesis y caracterización de miméticos de MnSOD con aplicaciones terapéuticas. Entre los ejemplos bibliográficos encontramos ciclofanos, fanos lineales, bases de Schiff o porfirinas.⁷²

Por último, también se pueden encontrar miméticos de FeSODs y NiSODs en la literatura científica aunque son minoritarios en la actualidad.

6.6.4.- Diseño del mimético para terapias antioxidantes

El estrés oxidativo de una persona sana a lo largo de su vida puede ser prevenido con una dieta saludable y rica en antioxidantes.⁷³ El aporte de antioxidantes en la dieta, junto con las defensas naturales de organismo basta para proteger al individuo. Sin embargo, cuando esto no es suficiente, se hace necesario el desarrollo de fármacos que puedan tratar los efectos del estrés oxidativo.

El uso clínico de enzimas antioxidantes, como la SOD y catalasa, para prevenir o tratar los daños causados por ROS ha tenido un éxito relativo.⁷⁴ Por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con SOD y/o catalasa protege contra la inflamación,⁷⁵ previene daños por hiperoxia en los pulmones,⁷⁶ reduce el daño en tejidos en enfermedades inflamatorias crónicas⁷⁷ y previene la isquemia miocardiaca.⁷⁸

Sin embargo, la utilización directa de las enzimas presenta un perfil farmacológico desfavorable por diversas razones: la inestabilidad de las disoluciones, dificultades para su administración,⁷⁹ corta vida media⁸⁰ y una baja permeabilidad a través de la membrana celular,⁸¹ así como respuesta inmune y otros efectos adversos en el organismo.⁸² Frente a los inconvenientes de utilizar las enzimas antioxidantes naturales, la Química ofrece la posibilidad de sintetizar miméticos de dichas enzimas que pueden utilizarse en sustitución de aquellas, manteniendo sus beneficios y evitando o minimizando sus inconvenientes.⁸³

A la hora de diseñar un mimético, hay una serie de características a tener en cuenta:

a) Selección del metal.

Únicamente los complejos de los metales Cu, Mn, Fe y Ni pueden catalizar la dismutación del anión superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno. Entre estos metales, los complejos de Cu^{2+} son los más estudiados aunque por varios motivos, que se comentarán más adelante, el Mn^{2+} es el más utilizado actualmente para diseñar miméticos de SOD. En primer lugar, el ión Cu^{2+} es por sí mismo un catalizador de la SOD, esto presenta un problema de interpretación de las actividades debido al complejo o a trazas de metal libres debido a la disociación del complejo o una impureza de Cu^{2+} libre. La segunda razón es la menor toxicidad del acuo-complejos de Mn^{2+} en comparación con los de Cu^{2+} y Fe^{2+} que pueden producir radicales hidroxilo a partir de peróxido de hidrógeno.⁸⁴

b) Estabilidad del complejo metálico.

Muchos de los complejos metálicos son susceptibles de una disociación del metal asistida por protones o de una oxidación del metal o los ligandos, por lo tanto, además de tener una alta estabilidad termodinámica es importante que el complejo tenga una alta estabilidad cinética. Ello implica que en medios ácidos como el estómago u oxidantes como el hígado no haya una degradación del complejo liberando el metal con el potencial efecto tóxico que acarrea.

c) Toxicidad.

Como he comentado previamente hay un efecto tóxico derivado del ión metálico libre pero se ha de considerar también posibles efectos tóxicos de la actividad SOD del complejo. Por ejemplo, miméticos de SOD puede aumentar los niveles de óxido nítrico, un vasodilatador y antitrombótico,⁸⁵ también reduciendo o eliminando la difusión entre el anión superóxido y el óxido nítrico se produce una sobreproducción de peroxinitrito, otro metabolito tóxico derivado del oxígeno.⁸⁶

d) Aspectos biológicos.

Otra consideración para diseñar un buen mimético es la optimización del reparto del fármaco en el tejido objetivo. Un fármaco altamente lipofílico es el adecuado en el tratamiento del Parkinson porque pueden superar la barrera sangre/cerebro. En contraste, un fármaco para tratar una lesión de reperfusión que deriva en infarto de miocardio probablemente es mejor que permanezca en la circulación sanguínea el mayor tiempo posible y no se absorba.

Hay otros aspectos económicos para el diseño de un mimético de SOD como su fácil administración y bajo coste de producción. Aunque son muchos los miméticos de SOD que pueden encontrarse en la literatura, son pocos los que han llegado a la fase clínica

Entre los miméticos de SOD, cabe destacar los complejos de manganeso de Salvemini y colaboradores. Algunos de estos han llegado a la fase de estudios en animales y han demostrado tener actividad antiinflamatoria, destacando el mimético llamado M40403.⁸⁷ Este complejo tiene una $k_{cat} = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que es aproximadamente un orden de magnitud menor que la actividad de la enzima nativa, sin embargo, en comparación con otros miméticos de SOD, es un valor muy destacable. En ensayos in vivo en ratas se ha probado que es un eficaz antiinflamatorio y citoprotector.⁸⁸ Esta familia de miméticos sí reacciona específicamente con el superóxido⁸⁸ y no otras ROS, lo cual es un indicio de que la mera eliminación de dicho radical es suficiente para proporcionar protección.

6.7.- Actividad de los complejos de Cu^{2+}

En primer lugar, se determina la actividad SOD de los complejos de Cu^{2+} con los ligandos mediante el ensayo de McCord-Fridovich. Para preparar los complejos se han disuelto cada uno de los ligandos **L1**, **L2**, **L3** y **L5** con Cu^{2+} a diferentes relaciones molares a $\text{pH} = 7.4$. A este valor de pH , las disoluciones con relaciones molares M:L 1:1 se forman mayoritariamente los complejos mononucleares con todos los ligandos, en disoluciones con

relaciones molares M:L 2:1 se forman únicamente especies binucleares con todos los ligandos y, por último, en disoluciones con relaciones molares M:L 3:1 se forman especies trinucleares para **L1**, **L2** y **L3** pero no para el ligando **L5**. Los resultados obtenidos del ensayo de McCord-Fridovich se encuentran resumidos en la tabla 6.11.

Tabla 6.11.- Datos de la actividad SOD de los complejos de Cu²⁺ de los ligandos. Sistemas tamponados con TRIS a pH = 7.4.

Ligando	Relación Cu:L 1:1		Relación Cu:L 2:1		Relación Cu:L 3:1	
	IC ₅₀ /μm	k _{cat} /10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹	IC ₅₀ /μm	k _{cat} /10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹	IC ₅₀ /μm	k _{cat} /10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹
L1	> 10	NO	1.0(1)	5.6	0.15(2)	37.8
L2	> 10	NO	0.6(1)	3.5	0.08(2)	30.4
L3	> 10	NO	1.5(1)	2.1	0.070(1)	47.4
L5	2.8(7)	1.1	0.25(3)	14.9		
Cu(atbsa)₂im^a	0.66 ⁸⁹	4.46				
CuCD^b	0.30(1) ⁹⁰	97				
Cu(ClO₄)₂	1.1(1)	2.7				
Cu₂Zn₂SOD	0.010(2)	430				

^a atbsa = 4-amino-N-(tiazol-2-il)-bencenosulfonamida. ^b CD = ciclodextrina

Existe una tendencia de aumentar la actividad al incrementar la nuclearidad del complejo, los complejos mononucleares apenas tienen actividad, los binucleares presentan una actividad alta y los trinucleares una actividad muy alta.

Respecto a los complejos mononucleares, el único que presenta una actividad considerable es **L5** debido posiblemente a la insaturación del Cu^{2+} porque tiene menos grupos amino en cada brazo que completan la esfera de coordinación como ocurre con el resto de los ligandos.

Todos los complejos binucleares presentan una actividad alta, el que presenta mayor actividad es el $\text{Cu}_2\text{L5}^{4+}$ indicando el mismo hecho que con los complejos mononucleares, las esferas de coordinación de los dos cobres no se encuentran saturadas con lo cual los sustratos presentes en el disolvente pueden acceder más fácilmente al metal.

Asimismo, se observa como todos los complejos trinucleares de Cu^{2+} con **L1**, **L2** o **L3** tienen una actividad muy alta con valores cercanos a los compuestos de $\text{Cu}(\text{atbsa})_2\text{im}^{89}$ y CuCD^{90} (tabla 6.11). El orden de actividad es **L3 > L1 > L2**, aunque los mecanismos por los cuales presentan esta actividad no se han estudiado todavía.

6.8.- Actividad de los complejos de Mn^{2+}

En segundo lugar se estudia los complejos de Mn^{2+} como miméticos enzimáticos de la SOD. Para ello se han preparado disoluciones de los complejos mono- y binucleares de manganeso, mezclando cada ligando con uno o dos equivalentes de Mn^{2+} a $\text{pH} = 7.4$. A ese valor de pH se encuentran las especies mono- y binucleares respectivamente como muestran los diagramas de distribución de las figuras 6.18 y 6.19. Tras preparar las disoluciones se estudia su actividad SOD mediante el ensayo de McCord-Fridovich, los resultados se muestran en la tabla 6.12 junto con algunos compuestos de referencia extraídos en bibliografía.

Tabla 6.12.- Datos de la actividad SOD de los complejos de Mn^{2+} de los ligandos. Sistemas tamponados con TRIS a pH = 7.4.

Ligando	Relación Mn:L 1:1		Relación Mn:L 2:1	
	$IC_{50}/\mu M$	$k_{cat}/10^6 M^{-1} s^{-1}$	$IC_{50}/\mu M$	$k_{cat}/10^6 M^{-1} s^{-1}$
L1	0.6(1)	7.45	0.5(1)	9.0
L2	0.43(5)	5.18	0.35(8)	5.68
L3	0.3(1)	9.9	0.27(5)	12.0
L5	1.3(3)	2.3	0.7(1)	4.1
Pytren-4q		15		
M40403		20		
MnSO₄	3.6(5)	0.80		
MnSOD		100		

Todos los complejos presentan una actividad superior a la del manganeso libre, lo cual indica que la coordinación del metal por parte del ligando cambia sus propiedades catalíticas en un sentido favorable. Los complejos binucleares tienen una actividad superior aunque del mismo orden que los complejos mononucleares, indicando que el segundo ión de Mn^{2+} no es determinante para catalizar la transformación del anión superóxido.

Tanto los complejos mononucleares como los binucleares siguen el orden de actividad siguiente **L3 > L1 > L2 > L5**. Otro hecho resaltable es la alta actividad para los complejos de Mn^{2+} con **L1** y **L3** que son del mismo orden que los complejos con mayor actividad encontrados en la literatura (*pytren-4q*⁹¹ y *M40403*⁸⁷). La actividad catalítica se encuentra relacionada con la estructura que adopta el complejo y que favorece enormemente la interacción del anión superóxido con el ión metálico y su transformación.

Los prometedores resultados de estos ensayos ha planteado el desarrollo de futuros fármacos en patologías derivadas del estrés oxidativo de las células. Por ello, se están realizando ensayos biológicos por el grupo del profesor Manuel Sánchez Moreno en la Universidad de Granada y el Dr. Jose Luís Mullor en el Hospital La Fe de Valencia.

-
- 1 N. C. Veitch, *Phytochemistry*, 2004, **65**, 249.
 - 2 a) M. Dobler, *Compr. Supramol. Chem.*, 1996, 267; b) C. Moore y B. C. Pressman, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, **15**, 562; c) B. C. Pressman, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1965, **53**, 1076; d) J. B. Chapel y A. R. Crofts, *Biochem. J.*, 1965, **95**, 393.
 - 3 a) S. N. Graven, H. A. Lardy, D. Johnson y A. Rutter, *Biochemistry*, 1966, **5**, 1729; b) B. C. Pressman, E. J. Harris, W. S. Jagger y J. H. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1967, **58**, 1949.
 - 4 a) D. P. Riley, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2573; b) C. Belle y J. -L. Pierre, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2003, 4137; c) Y. Murakami, J. Kikuchi, Y. Hisaeda y O. Hayashida, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 721.
 - 5 M. S. Niederhut, B. J. Gibbons, S. Perez-Miller y T. D. Hurley, *Protein Sci.*, 2001, **10**, 697.
 - 6 T. E. Devlin, *Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th Edition, John Wiley & Sons, 2004.
 - 7 http://www.zinc.org/basics/history_of_zinc
 - 8 <http://elements.vanderkrogt.net/element.php?sym=zn>
 - 9 <http://mysite.du.edu/~jcalvert/phys/zinc.htm>
 - 10 J. M. Berg y Y. Shi, *Science*, 1996, **271**, 1081.
 - 11 P. Jiang y Z. Guo, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 205.
 - 12 <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1CA2>
 - 13 D. Keilin y T. Mann, *Biochem. J.*, 1940, **34**, 1163.
 - 14 a) J. E. Coleman, *Annu. Rev. Biochem.*, 1992, **61**, 897; b) B. L. Vallee y D. S. Auld, *Biochemistry*, 1990, **29**, 5647.

- 15 J. Hanas, D. J. Hazuda, D. F. Bogenhagan, F. H. Wu y C.-W. Wu, *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**, 14120.
- 16 J. Miller, A. D. McLachlan y A. Klug, *EMBO J.*, 1985, **4**, 1604.
- 17 <http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1A1G>
- 18 B. Figgis, *Introduction to Ligand Fields* (Interscience, New York, 1966).
- 19 R. G. Pearson, *Survey in Progress in Chemistry*, A. Scott, Ed. (Academic Press, New York, 1969).
- 20 I. Resa, E. Carmona, E. Gutierrez-Puebla y A. Monge, *Science*, 2004, **305** (5687), 1136.
- 21 M. Eigen, *Pure Appl. Chem.*, 1963, **6**, 105.
- 22 P. Gans, *Program to determine the distribution of species in multiequilibria systems from the stability constants and mass balance equations*.
- 23 J. González, J. M. Linares, R. Belda, J. Pitarch, C. Soriano, R. Tejero y E. García-España, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2367.
- 24 S. Blasco, B. Verdejo, M. P. Clares, C. E. Castillo, A. Algarra, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano y E. García-España, *Inorg. Chem.*, 2010, **49** (15), 7016.
- 25 B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano y E. García-España, *Inorg. Chem.*, 2007, **46** (14), 5707.
- 26 a) J. Costa y R. Delgado, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 5257; b) V. Félix, J. Costa, R. Delgado, M. G. B. Drew, M. T. Duarte y C. J. Resende, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2001, 1462.
- 27 N. W. Alcock, D. H. Busch y C. Y. Liu, *Private Commun.*, 2006. Identificador CSD: LESSIE.
- 28 a) H. Irving y D. H. Mellor, *J. Chem. Soc.*, 1962, 5237; b) A. E. Martell, R. M. Smith y R. J. Motekaitis, *NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes Database, NIST Standard Reference Database*, version 4, 1997.

- 29 a) G. Atkinson y J. A. Bauman, *Inorg. Chem.*, 1962, **1**, 900; b) S. Cavani y M. Landucci, *J. Chem. Soc.*, 1962, 278; c) H. Irving y D. H. Mellor, *J. Chem. Soc.*, 1962, 5222.
- 30 L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, L. Parodi y A. Taglietti; *Fluorescent Sensors for and with Transition Metals* en J. P. Sauvage (Ed), *Transition Metals in Supramolecular Chemistry*, 1999, 93, John Wiley & Sons Ltd.
- 31 V. Balzani y F. Scandola, *Supramolecular Photochemistry*, Ellis Horwood Lim. Ed., 1991.
- 32 C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, C. Giorgi, V. Fusi, B. Valtancoli, M. A. Bernardo y F. Pina, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 3806.
- 33 a) C. Bazzicalupi, A. Bencini, A. Bianchi, V. Fedi, V. Fusi, C. Giorgi, P. Paoletti, L. Tei, B. Valtancoli, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 1101.; b) C. Bazzicalupi, S. Biagini, A. Bianchi, E. Faggi, P. Gratteri, P. Mariani, F. Pina, B. Valtancoli, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 10128.
- 34 R. H. Holyer, C. D. Hubbard, S. F. A. Kettle y R. G. Wilkins, *Inorg. Chem.*, 1965, **4**, 929.
- 35 a) F. Pina, M. A. Bernardo y E. García-España, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2000, **10**, 2143; b) C. Lodeiro y F. Pina, *Coord. Chem. Rev.*, 2009, **253**, 1353; c) C. Bazzicalupi, A. Bencini, S. Biagini, A. Bianchi, B. Valtancoli, *Chem. Eur. J.*, 2009, **15**, 8049.
- 36 <http://es.wikipedia.org/wiki/Cobre>
- 37 L. Banci, I. Bertini, F. Cantini y S. Ciofi-Baffoni. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2010, **67**: 2563.
- 38 G. Ambrosini, M. Formica, V. Fusi, L. Giorgi, A. Guerri, M. Micheloni, P. Paoli, R. Pontellini y P. Rossi, *Chem. Eur. J.*, 2007, **13**, 702.
- 39 Y. Couturier y C. Petitfaux, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1975, **1043**, 1545.
- 40 B. R. James y R. J. P. Williams, *J. Chem. Soc.*, 1961, 2007.
- 41 R. L. Gustafson y A. E. Martell, *J. Am. Chem. Soc.*, 1959, **81**, 525

- 42 a) V. Clementi y C. Luchinat, *Acc. Chem. Res.*, 1998, **31**, 351; b) B. Verdejo, S. Blasco, E. García-España, F. Lloret, P. Gaviña, C. Soriano, S. Tatay, H. R. Jiménez, A. Doménech y J. Latorre; *Dalton Trans.*, 2007, 4726;
- c) B. Verdejo, J. Aguilar, A. Doménech, C. Miranda, P. Navarro, H. R. Jiménez, C. Soriano y E. García-España, *Chem. Commun.*, 2005, 3086.
- 43 M. C. Machczynski, E. Vijgenboom, B. Samyn y G. W. Canters, *Protein Sci.*, 2004, **13**, 2388.
- 44 M. G. Basallote, J. Durán, J. Fernandez-Trujillo, M. A. Mañez y B. Szpoganicz, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 2836.
- 45 C. Bazzicalupi, A. Bencini, S. Ciattini, C. Giorgi, A. Masotti, P. Paoletti, B. Valtancoli, N. Navon y D. Meyertein, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2000, 2383.
- 46 a) M. Maeder, Y. M. Neuhold, G. Putxy y P. King, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2003, **5** (13), 2836; b) M. G. Basallote, J. Durán, M. J. Fernandez-Trujillo, M. A. Mañez y B. Szpoganicz, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, **7**, 1093; c) N. McCann, G. A. Lawrence, Y. M. Neuhold y M. Maeder, *Inorg. Chem.*, 2007, **46** (10), 4002.
- 47 a) A. Mendoza, J. Aguilar, M. G. Basallote, L. Gil, J. C. Hernandez, M. A. Mañez, E. García-España, L. Ruiz-Ramirez, C. Soriano y B. Verdejo, *Chem. Commun.*, 2003, **24**, 3032; b) J. Aguilar, M. G. Basallote, L. Gil, J. C. Hernandez, M. A. Mañez, E. García-España, C. Soriano y B. Verdejo, *Dalton Trans.*, 2004, **1**, 94.
- 48 a) R. W. Hay, R. Bembi, W. T. Moodie y P. R. Norman, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1982, 2131; b) R. W. Hay, M. P. Pujari y F. McLaren, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 3033; c) N. F. Curtis y S. R. Osvath, *Inorg. Chem.*, 1988, **27**, 305; d) W. J. L. Hay, M. T. H. Tarafder y M. M. Hassan, *Polyhedron*, 1996, **15**, 725; e) G. D. Santis, L. Fabbrizzi, A. Perotti, N. Sardone y A. Taglietti, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1998.
- 49 a) M. G. Basallote, M. J. Fernández-Trujillo y M.A. Mañez, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 2002, 3691; b) M. G. Basallote, J. Durán, M. J.

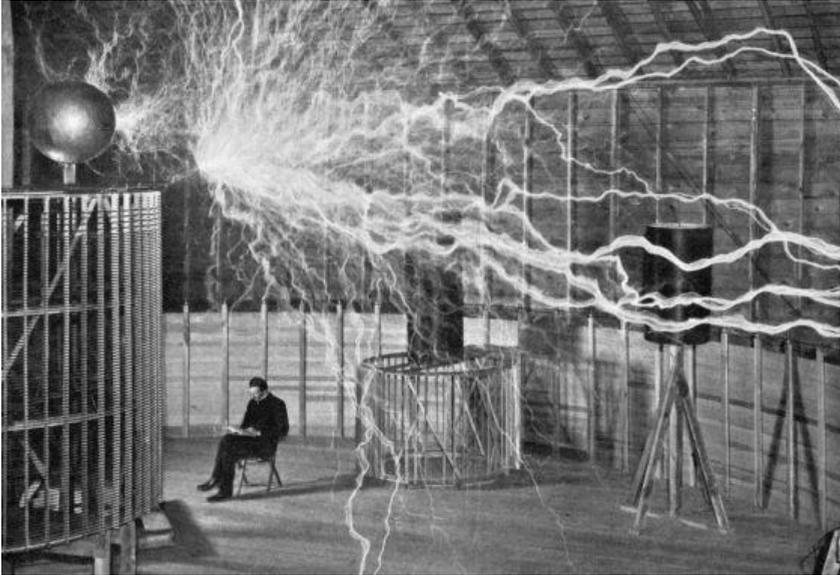
- Fernández-Trujillo y M. A. Máñez, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1999, 3817.
- 50 A. G. Algarra, M. J. Fernández-Trujillo y M. A. Máñez, *Chem. Eur. J.*, 2012, **18**, 5036.
- 51 D. P. Riley, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2573.
- 52 a) M. F. Beal, *Biochim. Biophys. Acta-Bioenergetics*, 1998, **1366** (1-2), 211; b) D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson *et al.*, *Nature*, 1993, **362** (6415), 59; c) D. W. Cleveland y J. D. Rothstein, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2001, **2** (11), 806; d) H. X. Deng, A. Hentati, J. A. Tainer *et al.*, *Science*, 1993, **261**, 1047; e) J. S. Valentine y P. J. Hart, *P. Natl. Acad. Sci.*, 2003, **100** (7), 3617.
- 53 a) H. X. Deng, A. Hentati, J. A. Tainer *et al.*, *Science*, 1993, **261**, 1047; b) D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson *et al.*, *Nature*, 1993, **362**, 59; c) R. H. Brown, *Cell*, 1995, **80**, 687; d) C. M. Troy y M. L. Shelanski, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1994, **91**, 6384; e) L. J. S. Greenlund, T. L. Deckwerth y E. M. Johnson, *Neuron*, 1995, **14**, 303.
- 54 a) A. Bravard, L. Sabatier, F. Hoffschir, M. Ricoul, C. Luccioni y B. Dutrillaux, *Int. J. Cancer*, 1992, **51**, 476; b) S. E. Safford, T. D. Oberley, M. Urano y D. K. StClair, *Cancer Res.*, 1994, **54**, 4261; c) N. Yoshizaki, Y. Mogi, H. Muramatsu, K. Koike, K. Kogawa y Y. Niitsu, *Int. J. Cancer*, 1994, **57**, 287.
- 55 a) S. L. Church, J. W. Grant, L. A. Ridnour, L. W. Oberley, P. E. Swanson, P. S. Meltzer y J. M. Trent, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1993, **90**, 3113; b) D. L. StClair, T. D. Oberley, K. E. Muse y W. H. StClair, *Free Radical. Biol. Med.*, 1994, **16**, 275.
- 56 R. H. Holm, P. Kennepohl y E. I. Solomon, *Chem. Rev.*, 1996, **96** (7), 2239.
- 57 D. P. Barondeau, C. J. Kassmann, C. K. Bruns, J. A. Tainer y E. D. Getzoff, *Biochem.*, 2004, **43** (25), 8038.

- 58 a) H. D. Youn, H. Youn, J. W. Lee, Y. I. Yim, J. K. Lee, Y. C. Hah y S. O. Kang, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1996, **334** (2), 341; b) H. D. Youn, E. J. Kim, J. H. Roe, Y. C. Hah y S. O. Kang, *Biochem. J.*, 1996, **318** (3), 889.
- 59 B. Palenik, B. Brahamsha, F. W. Larimer, M. Land, L. Hauser, P. Chain, J. Lamerdin, W. Regala, E. E. Allen, J. McCarren, I. Paulsen, A. Dufresne, F. Partensky, E. A. Webb y J. Waterbury, *Nature*, 2003, **424** (6952), 1037.
- 60 T. Mann y D. Keilin, *Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci.*, 1938, **126** (844), 303.
- 61 a) J. M. McCord y I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244** (22), 6049; b) J. M. McCord y I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244** (22), 6056.
- 62 M. Vallet, J. Faus, E. García-España y J. Moratal, *Introducción a la Química Bioinorgánica*, Editorial Síntesis, 2003.
- 63 D. E. Cavelli, D. P. Riley, J. A. Rodriguez, J. S. Valentine y H. Zhu, *Models of Superoxide Dismutases In Biomimetic Oxidations Catalysed by Transition Metal Complexes*, Imperial College Press, London, 2000.
- 64 B. B. Keele, J. M. McCord y I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1970, **245**, 6176.
- 65 U. G. Wagner, K. A. Patridge, R. K. Strong, W. C. Stallings, M. M. Werber, C. Oefner, F. Frolow y J. L. Sussman, *Prot. Sci.*, 1993, **2** (5), 814.
- 66 a) W. C. Stallings, K. A. Patridge, R. K. Strong y M. L. Ludwig, *J. Biol. Chem.*, 1985, **260** (30), 16424; b) B. L. Sttodart, P. L. Howell, D. Ringe y G. A. Petsko, *Biochem.*, 1990, **29** (38), 8885; c) M. L. Ludwig, A. L. Metzger, K. A. Patridge y W. C. Stallings, *J. Mol. Biol.*, 1991, **219** (2), 335.
- 67 a) R. A. Edwards, H. M. Baker, M. M. Whittaker, J. W. Whittaker, G. B. Jameson y E. N. Baker, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 1998, **3** (2), 161; b) W. C. Stallings, T. B. Powers, K. A. Patridge, J. A. Fee y M. L. Ludwig, *P. Natl. Acad. Sci.*, 1983, **80** (13), 3884.
- 68 V. L. Pecoraro, M. J. Baldwin y A. Gelasco, *Chem. Rev.*, 1994, **94** (3), 807.
- 69 R. H. Holm, P. Kennepohl y E. Solomon, *Chem. Rev.*, 1996, **96** (7), 2239.

- 70 H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, H. Itoh y S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122** (24), 5733.
- 71 J. L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A. E. Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman y P. Rey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1965.
- 72 a) R. Kachadourian, I. Batinic-Haberle y I. Fridovich, *Inorg. Chem.*, 1999, **38** (2), 391; b) B. Drahos, J. Kotek, P. Hermann, I. Lukes y E. Toth, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 3224; c) V. Lanza y G. Vecchio, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103** (3), 381.
- 73 B. Halliwell, *Annu. Rev. Nutr.*, 1996, **16**, 33.
- 74 S. Cuzzocrea, D. P. Riley, A. P. Caputi y D. Salemini, *Pharmacol. Rev.*, 2001, **53** (1), 135.
- 75 J. M. McCord, *Science*, 1974, **185**, 529.
- 76 a) D. W. Thibeault, M. Rezaiekhalthigh, S. Mabry y T. Beringer, *Pediatr. Pulmonol.*, 1991, **11** (4), 318; b) J. R. Wispé, B. B. Warner, J. C. Clarck, C. R. Dey, J. Neuman, J. D. Crapo, L. Y. Chang y J. A. Whitsett, *J. Biol. Chem.*, 1992, **267** (33), 23937; c) S. G. Simonson, K. E. Welty-Wolf, Y. C. T. Huang, D. E. Taylor, S. P. Kantrow, M. S. Carraway, J. D. Crapo y C. A. Piantadosi, *J. Appl. Physiol.*, 1997, **83** (2), 550.
- 77 a) S. Delanian, F. Baillet, J. Huart, J. Lefaix, C. Maulard y M. Housset. *Radiother. Oncol.*, 1994, **32** (1), 12; b) J. Emerit, S. Pelletier, D. Tosoni-Verlignue y M. Mollet, *Free Radic. Biol. Med.*, 1989, **7** (2), 145.
- 78 T. J. Gardner y J. R. Stewart, *Inflammation. Basic Principles and Clinical Correlates*, 2^a Ed., Raven Press, New York, 1999.
- 79 C. Regnault, M. Soursac, M. Roch-Arveiller, E. Postaire y G. Hazebroucq, *Biopharm. Drug Dispos.*, 1996, **17** (2), 165.
- 80 R. Igarashi, J. Hoshino, M. Takenaga, S. Kawai, Y. Morizawa, A. Yasuda, M. Otani y Y. Mizushima, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1992, **262** (3), 1214.
- 81 M. Inoue, N. Watanabe, Y. Morino, Y. Tanaka, T. Amachi y J. Sasaki, *Febs Lett.*, 1990, **269** (1), 89.

- 82 a) S. G. Shaffer, D. H. O'Neill y D. W. Thibeault, *J. Pediatr.*, 1987, **110** (6), 942; b) C. Lardot, F. Broeckaert, D. Lison, J. P. Buchet y R. Lauwerys, *J. Toxicol. Env. Health*, 1996, **47** (6), 509.
- 83 T: Yaping, F. Yunzhong, L. Qinhui, S. Mengchang, L. Quin y S. Wemmei, *Free Radical. Biol. Med.*, 1992, **13** (5), 533.
- 84 a) E. Mavra, M. Chevion y J. Golenser, *Free Radical Res. Commun.*, 1991, **12-13**, 137; b) M. S. Baker, J. M. Gebicki, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1984, **234**, 258; c) H. C. Sutton y C. C. Winterbourn, *Free Radicals Biol. Med.*, 1989, **6**, 53; d) S. D. Aust, L. A. Morehouse y C. E. Thomas, *Free Radicals Biol. Med.*, 1985, **1**, 3-25.
- 85 a) T. P. Kasten, S. L. Settle, T. P. Misko, D. P. Riley, R. H. Weiss, M. G. Currie y G. A. Nickols, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1995, **208**, 170; b) Y. Y. Meng, J. Trachtenburg, U. S. Ryan y D. R. Abendschein, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 1995, **25**, 269.
- 86 D. Salvemini, M. P. Jensen, D. P. Riley y T. P. Misko, *Drugs News Persp.*, 1998, **11** (4), 204.
- 87 D. Salvemini, Z. Q. Wang, J. L. Zweier, A. Samouilov, H. Macarthur, T. P. Misko, M. G. Currie, S. Cuzzocrea, J. A. Sikorski y D. P. Riley, *Science*, 1999, **286**, 304; b) D. Salvemini, E. Mazzon, L. Dugo, D. P. Riley, I. Serraino, A. P. Caputi y S. Cuzzocrea, *Brit. J. Pharmacol.*, 2001, **132** (4), 815.
- 88 R. Krämer, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2000, **39** (24), 4469.
- 89 J. Casanova, G. Alzuet, J. Borrás y O. Carugo, *Dalton Trans.*, 1996, **11**, 2239.
- 90 Y. H. Zhou, W. X. Zhao, W. L. Chen, C. Y. Su, H. Sun, L. N. Ji y Z. W. Mao, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 734.
- 91 a) M. P. Clares, S. Blasco, M. Inclán, L. C. Agudo, C. Soriano, E. García-España, B. Verdejo, A. Doménech, J. Latorre, *Chem. Commun.*, 2011, **47** (21), 5988; b) M. P. Clares, S. Blasco, C. Soriano, E. García-España, B.

Verdejo, J. González. Solicitud de patente, Metallic mimicking complex for SOD. N/R: WO2011/0036163-A2. Universidad de Valencia. España. 2011.



***Nikola Tesla**, físico, matemático, inventor e ingeniero croata, fue una de las mentes más brillantes de la humanidad. Formuló la teoría de la corriente alterna en electricidad, entre innumerables trabajos, patentó el motor de inducción y el método de distribución de la corriente eléctrica.*

"El científico no tiene por objeto un resultado inmediato. Él no espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para aquellos que están por venir, y señalar el camino".

Capítulo 7.- Interacción con aniones fosfato y nucleótidos

7.- Interacción con nucleótidos y aniones fosfato

El estudio de las interacciones con aniones se ha incrementado en las últimas décadas debido al interés que despierta su papel en los sistemas biológicos. La mayoría de sustratos y cofactores implicados en los ciclos de la vida son especies aniónicas.¹

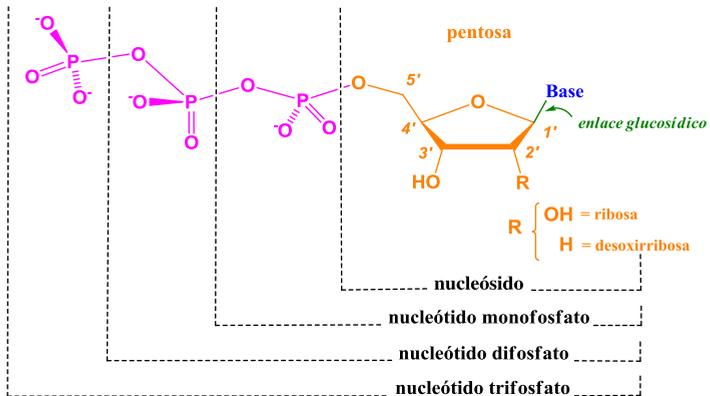
A pesar de su importancia en los organismos vivos, el desarrollo de receptores orgánicos selectivos para especies aniónicas no ha sido tan rápido como para las especies catiónicas. Sin embargo, podemos considerar que las moléculas capaces de enlazar cationes (química catiónica) y aniones (química aniónica) aparecieron al mismo tiempo. En 1967 se publicaron dos artículos en el *Journal of American Chemical Society*, en uno de ellos, C. J. Pedersen estudiaba la interacción de éteres corona con cationes,² y en el otro artículo, C. H. Park y H. E. Simmons trataban sobre la complejación de haluros por compuestos bicíclicos.³ El trabajo de Pedersen originó multitud de estudios sobre éteres corona, sin embargo, el trabajo de Park y Simmons no se retomó hasta muchos años después. La diferente evolución de la química de coordinación catiónica y aniónica se debe a la estructura de los aniones, ya que en general, los aniones tienen una estructura más compleja con propiedades especiales que complican su estudio.

Entre los aniones de interés biológico, los nucleótidos destacan porque constituyen los biopolímeros de ADN y ARN, cuya función es almacenar la información genética en los organismos e iniciar la síntesis de proteínas.⁴ Los nucleótidos son los productos finales “*ricos en energía*” de muchas vías liberadoras de energía. Además, regulan muchas rutas metabólicas como la síntesis de ADN, ARN, proteínas o la señalización celular y forman parte de coenzimas como el NAD⁺, NADP⁺, FMN, FAD y coenzima A.⁴

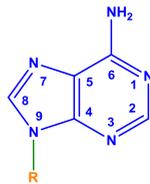
7.1.- Estructuras de los nucleótidos

Los nucleótidos son ésteres fosfato de pentosas (azúcares), en los que una nucleobase heterocíclica se une al C1' del resto de azúcar. Las nucleobases heterocíclicas se clasifican en dos grupos, las purinas o bases púricas y las pirimidinas o bases pirimidínicas. Las principales purinas son la

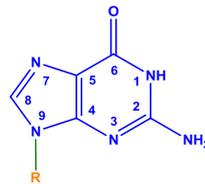
adenina (A) y la guanina (G) y en el caso de las pirimidinas son la citosina (C), el uracilo (U) y la timina (T) (ver figura 7.1).



Purinas



Adenina



Guanina

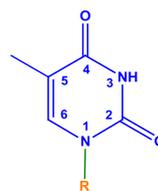
Pirimidinas



Citosina



Uracilo



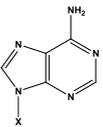
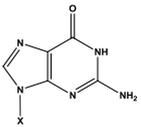
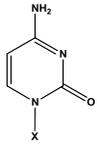
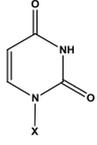
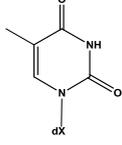
Timina

Figura 7.1.- Elementos estructurales de los nucleótidos más comunes

A su vez, la pentosa del nucleótido puede ser ribosa, en cuyo caso se denomina ribonucleótido, o desoxirribosa, donde se utiliza el término

desoxirribonucleótido. A la unión entre la pentosa y la nucleobase heterocíclica se le nombra nucleósido, en la tabla 7.1 se han dibujado y nombrado las principales nucleobases, nucleótidos y nucleósidos. Estos nucleótidos son los más comunes aunque existen más de 80 nucleósidos distintos formando parte de los ácidos nucleicos.⁵

Tabla 7.1.- Nombres y abreviaturas de las nucleobases de los ácidos nucleicos, nucleósidos y nucleótidos.

Fórmula de la base	Nucleobase X = H	Nucleósido X = ribosa	Nucleótido X = ribosa-monofosfato
	Adenina Ade A	Adenosina Ado A	Adenosina monofosfato Adenosín monofosfato AMP
	Guanina Gua G	Guanosina Guo G	Guanosina monofosfato Guanosín monofosfato GMP
	Citosina Cyt C	Citidina Cyd C	Citosina monofosfato Citosín monofosfato CMP
	Uracilo Ura U	Uridina Urd U	Uridina monofosfato Uridín monofosfato UMP
	Timina Thy T	Desoxitimidina dThd dT	Desoxitimidina monofosfato Desoxitimidín monofosfato dTMP

Los nucleótidos pueden tener en su estructura un único grupo fosfato, en cuyo caso se nombra nucleótido monofosfato, dos grupos fosfato, (nucleótido difosfato) y tres grupos fosfato (nucleótido trifosfato). Los nucleótidos más importantes tienen el enlace éster fosfato enlazado a la posición 5' de la pentosa (adenosín 5'-trifosfato o ATP) aunque existen algunos nucleótidos en los cuales este enlace se encuentra en otra posición del azúcar (por ejemplo, la adenosina-3',5'-monofosfato cíclico o cAMP y el guanosina-3',5'-monofosfato cíclico o cGMP).

Las nucleobases, los nucleósidos y los nucleótidos son solubles en agua en un amplio intervalo de pH en distintos grados. Los nucleósidos son más solubles que sus correspondientes nucleobases debido a la naturaleza hidrofílica de los azúcares. Sin embargo, las nucleobases por debajo de $\text{pH} \sim 4$ se encuentran cargadas porque se han protonado en algún punto de su estructura y les confieren mayor solubilidad. Tras la fosforilación de los nucleósidos se produce un aumento en la solubilidad, ya que los nucleótidos tienen los fosfatos como centros protonables.

El grupo fosfato de un nucleótido monofosfato se encuentra doblemente desprotonado a pH básico, la primera protonación se produce alrededor de 6.5, por lo tanto los fosfatos siempre se encuentran cargados negativamente a pH fisiológico con un equilibrio entre el anión con una carga negativa y el anión con dos cargas negativas. La segunda protonación del grupo fosfato se produce a $\text{pH} \sim 1$.

Sin embargo, los nucleótidos con dos o tres grupos fosfatos pueden llevar múltiples cargas negativas. La presencia de estos grupos cargados negativamente en los nucleótidos produce lugares de interacción electrostática con los centros cargados positivamente de proteínas o iones metálicos.⁴

Los nucleósidos y nucleótidos son estables a lo largo de un amplio intervalo de pH. La hidrólisis de los grupos ésteres fosfato suceden bajo fuertes condiciones básicas.⁶ Por otro lado, los enlaces N-glicosídicos son estables bajo estas condiciones aunque bajo condiciones ácidas son considerablemente más lábiles. A elevadas temperaturas y en medio muy ácido (< 2.5), la protonación de las bases púricas (G y A) produce una rápida

escisión del enlace entre el azúcar y la base. Entre los nucleótidos, los derivados con bases pirimidínicas son más estables que los derivados con purinas, aunque en medio muy ácido se produce tanto la destrucción del enlace glicosídico como la degradación del azúcar.

7.2.- Comportamiento ácido-base de los nucleótidos

Los aniones fosfatos y nucleótidos estudiados en este apartado se representan en la figura 7.2, y son especies que en disolución acuosa se ven implicados en diferentes equilibrios ácido-base como consecuencia de su interacción con el agua. Para ello, se han determinado mediante potenciometría en NaCl 0.15 M a 298.0 K las constantes de protonación (tabla 7.2) y calculado los diagramas de distribución (figuras 7.3 y 7.4).

Tabla 7.2.- Logaritmos de las constantes de protonación de los diferentes aniones determinadas en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción ^a	AMP	GMP	CMP	UMP	PPi ^b	TPP ^b	ATP ^b
$H + H_1A \rightleftharpoons A$		9.45(2) ^c		9.39(1)			
$H + A \rightleftharpoons HA$	6.26(1)	6.30(3)	6.27(1)	6.13(1)	8.34(1)	7.55(1)	6.67(1)
$H + HA \rightleftharpoons H_2A$	3.87(1)	2.55(1)	4.43(1)		6.18(1)	5.41(1)	4.11(1)
$H + H_2A \rightleftharpoons H_3A$						1.7(1) ^c	1.2(1) ^c

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Referencia 7. ^c Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

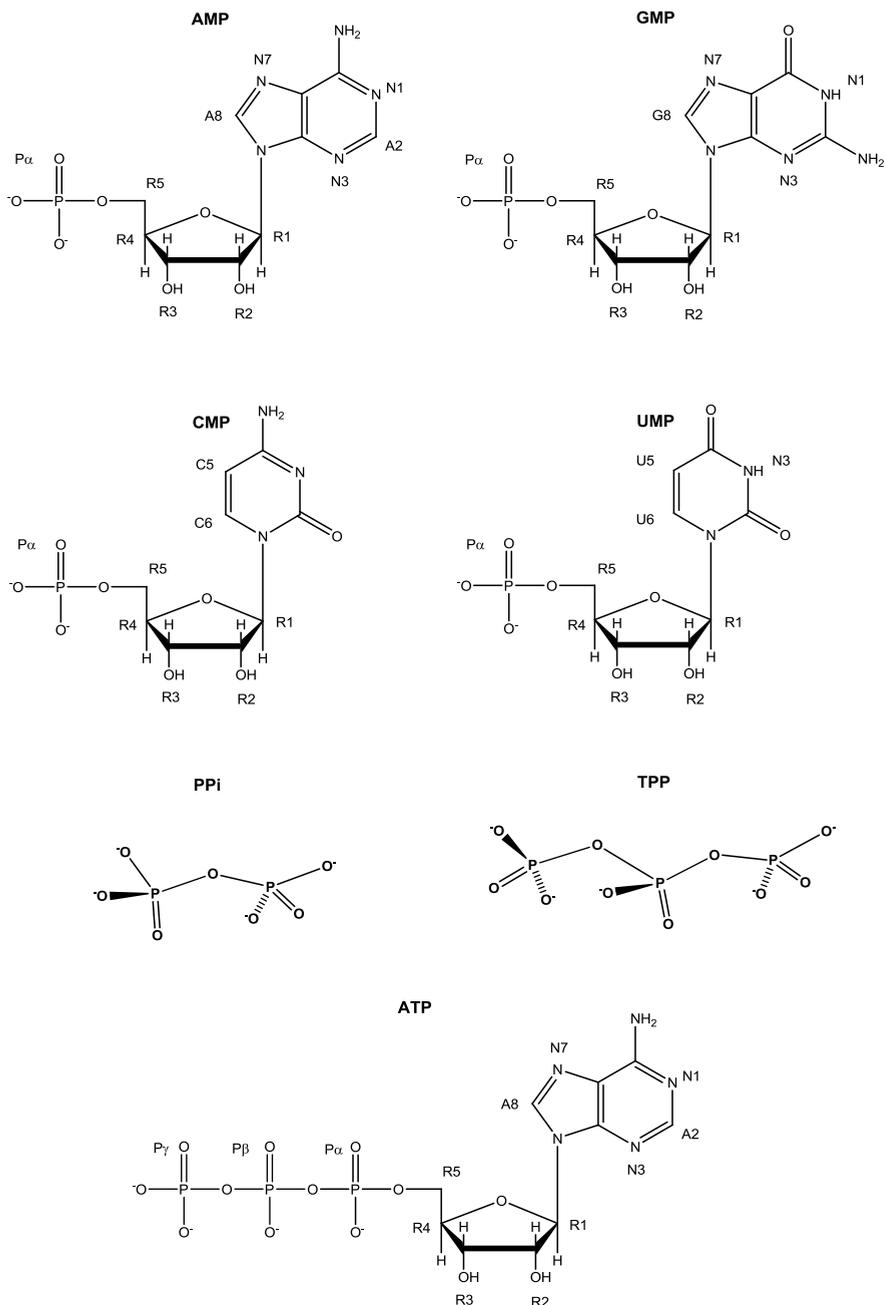


Figura 7.2.- Estructuras de los nucleótidos y aniones fosfato estudiados junto con la numeración empleada en los estudios de RMN.

Los diagramas de distribución para los aniones pirofosfato (PPi), tripolifosfato (TPP) y ATP calculados con el programa HYSS⁸ se muestran en la figura 7.3. En el caso del TPP y el ATP se observan hasta tres etapas de protonación mientras que para el PPi se observan dos etapas. En el pirofosfato y tripolifosfato las protonaciones suceden en los grupos fosfatos, en el caso del ATP, la primera protonación con un $pK_a \sim 6.7$ corresponde a la protonación del grupo fosfato en posición γ , la segunda protonación ($pK_a \sim 4.1$) se produce en el nitrógeno N1 del anillo de la adenina⁹ y, la última protonación tiene lugar en otro de los grupos fosfatos (pK_a de 1.2).¹⁰

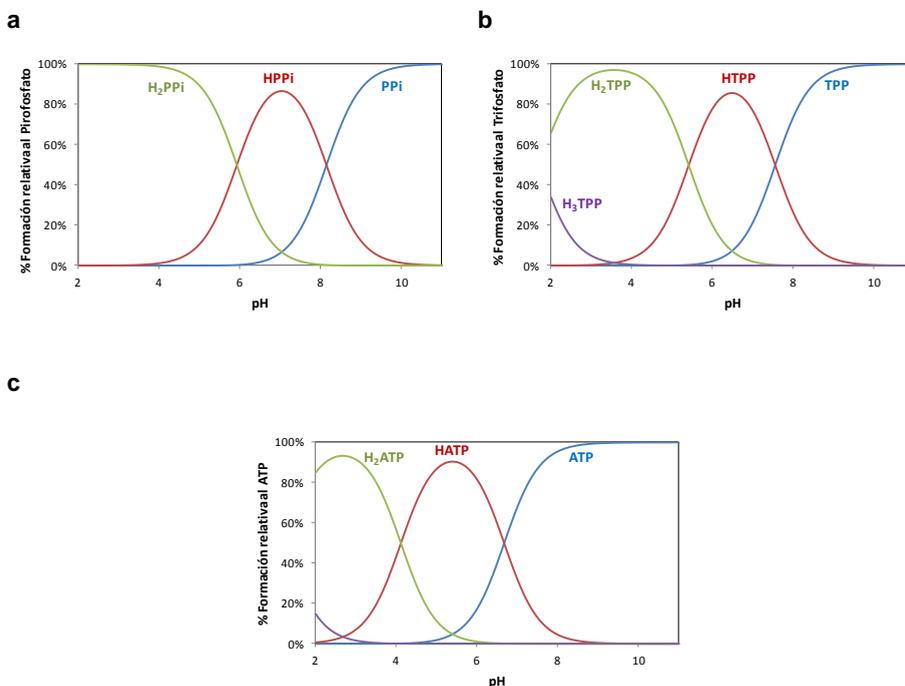


Figura 7.3.- Diagramas de distribución de especies para la protonación de los anioenes PPI (a), TPP (b) y ATP (c).

Los diagramas de distribución obtenidos a partir de las constantes de protonación para AMP, GMP, CMP y UMP se muestran en la figura 7.4. En

ellos se observan 3 especies para el AMP, CMP y UMP y cuatro para el GMP. Para todos los nucleótidos monofosfato, la protonación asociada al grupo fosfato siempre sucede alrededor de $pK_a \sim 7.0$.¹¹

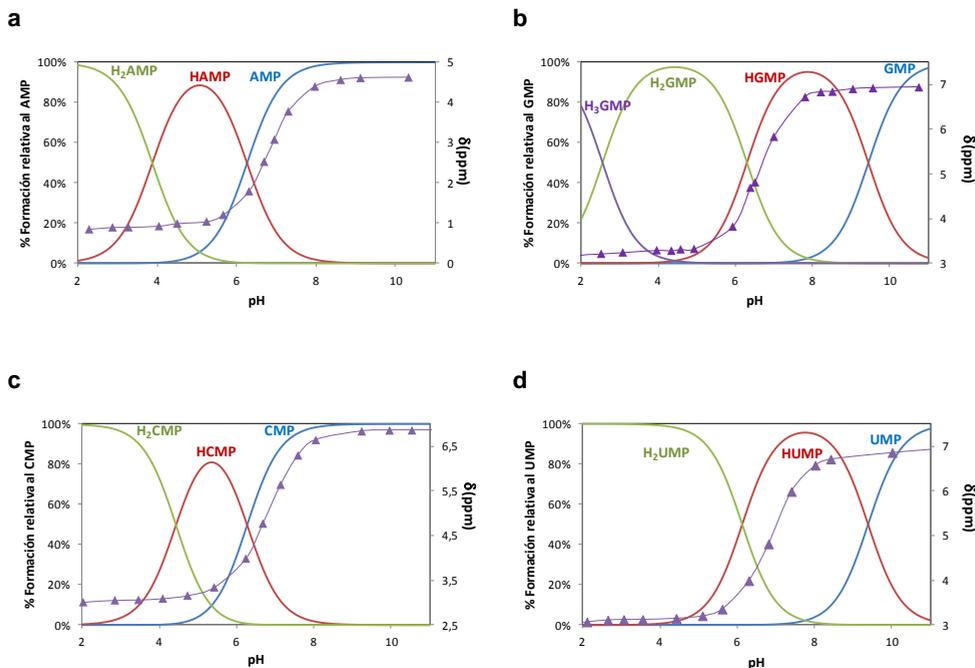


Figura 7.4.- Diagrama de distribución de las especies del AMP (a), GMP (b), CMP (c) y UMP (d) con los desplazamientos químicos de la señal de P_{α} en D_2O a varios valores de pD.

La primera protonación del AMP ($pK_a \sim 6.3$) ocurre en el grupo fosfato y la segunda ($pK_a \sim 3.9$) tiene lugar en el grupo N1 del anillo de adenina.^{9,12} Para el CMP, la primera protonación sucede en el grupo fosfato y la segunda en el nitrógeno N3 del anillo de citosina.¹³

Los anillos de guanina y uracilo pueden sufrir un proceso de desprotonación a valores de pH muy básicos con los que se ven involucrados los protones N1 (G) y N3 (U) respectivamente. Por ello, la especie libre de

ambos aniones se representa como $H_{-1}A$.¹⁴ En el comportamiento ácido-base del GMP, el primer protón se ubica en el átomo N1 desprotonado ($pK_a = 9.4$), el segundo protón en el grupo fosfato y el tercero se produce en el átomo N7 del anillo de purina. En el caso del UMP, en primer lugar se protona el átomo N3 desprotonado¹⁵ y la segunda protonación se produce en el grupo fosfato.

En la figura 7.4 se muestran los diagramas de distribución para las especies protonadas de los nucleótidos monofosfatos junto con los desplazamientos químicos (δ) de la señal de fósforo (P_α) a varios valores de pD. En todos los casos, existe un desplazamiento químico a campo bajo de la señal de P_α conforme se aumenta el pH. La mayor variación del desplazamiento químico corresponde al intervalo de pH entre 6.4 y 7.1 que confirma que la protonación del grupo fosfato sucede con un valor de pK_a cercano a 6.7. Este hecho corresponde con la primera protonación del AMP y CMP y la segunda protonación del GMP y UMP como señalamos anteriormente en potenciometría.

Asimismo se registraron los espectros de 1H RMN de los nucleótidos monofosfatos a varios valores de pD. En las figuras 7.5 y 7.36 (en apéndice) se muestran los desplazamientos químicos de las señales aromáticas (H_{A2} y H_{A8}) y de la anomérica (H_{R1}) en 1H RMN del AMP superpuestas con el diagrama de distribución obtenido por técnicas potenciométricas. Las señales H_{A2} y H_{A8} experimentan un desplazamiento a campo alto desde un valor de pD 10.5 hasta pD 6.5, indicando que se ven afectadas por la protonación del grupo fosfato. En segundo lugar, la protonación de N1 provoca un desplazamiento de las señales aromáticas H_{A2} y H_{A8} y H_{R1} hacia campo bajo al pasar de pD 6.0 a 3.0.

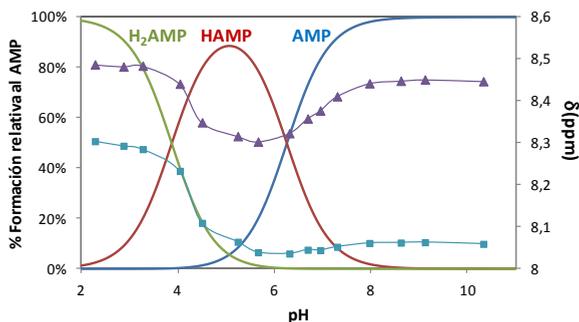


Figura 7.5.- Diagrama de distribución de las especies del AMP con los desplazamientos químicos de las señales $\blacktriangle H_{A2}$ y $\blacksquare H_{A8}$ de 1H RMN de sus espectros en D_2O a varios valores de pD.

En el caso del GMP, los espectros muestran desplazamientos hacia campo bajo para las señales H_{G8} y H_{R1} al pasar de pD 4.0 a 1.2, apoyando que la cuarta protonación se produce en el átomo N7 de la guanina, al estar estos protones más cercanos a estos núcleos (ver figura 7.6).

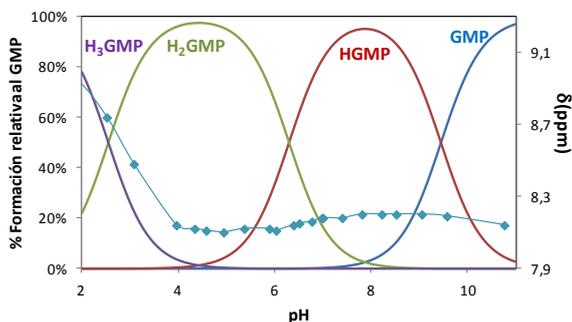


Figura 7.6.- Diagrama de distribución de las especies del GMP con los desplazamientos químicos de la señal $\blacklozenge H_{G8}$ de 1H RMN en D_2O a varios valores de pD.

Las señales del CMP a diferentes valores de pD muestran como las señales H_{C5} , H_{C6} y H_{R3} se desplazan hacia campo alto y la señal H_{R5} hacia campo bajo a pasar de pD 9.0 a 6.0 (figuras 7.7 y 7.37 en apéndice). Este hecho indica que la protonación del grupo fosfato afecta todas las señales.

Asimismo, se observa un desplazamiento de las señales H_{C5} , H_{C6} , H_{R3} y H_{R4} al pasar de pD 6.0 a 2.5, este efecto se puede asociar a una protonación del átomo N3 de la citosina.

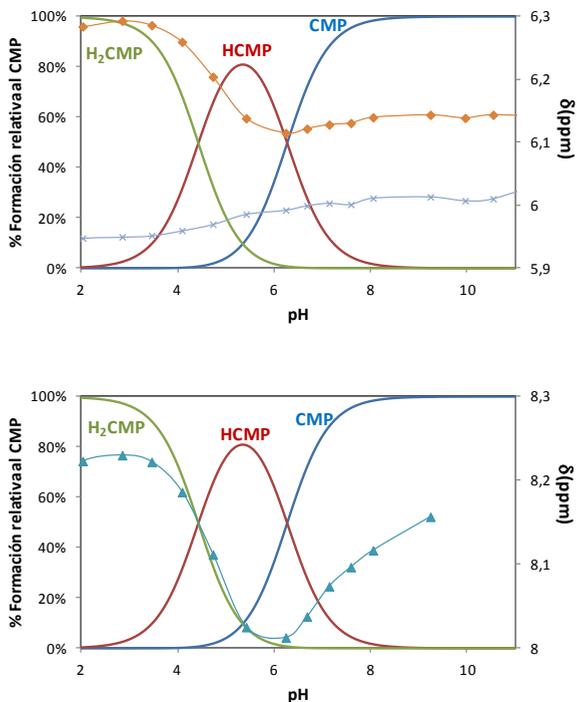


Figura 7.7.- Diagrama de distribución de las especies del CMP con los desplazamientos químicos de 1H RMN de sus espectros en D_2O a varios valores de pD.

Las asignación de las señales es $\blacktriangle H_{C6}$, $\blacklozenge H_{C5}$ y $\times H_{R1}$.

Por último, las figuras 7.8 y 7.38 (en el apéndice) muestran los desplazamientos químicos de las señales del UMP a diferentes valores del pD. Todas las señales experimentan un desplazamiento hacia campo bajo desde pD 12.0 hasta 9.0, confirmando que el átomo desprotonado N3 del uracilo se protona en esta posición. Además, todas las señales se desplazan hacia campo alto al pasar de pD 9.0 a 6.0, en correspondencia con la protonación del grupo fosfato y, finalmente, se observa un desplazamiento a

campo alto por debajo de pD de 3.0, debido a una segunda protonación del grupo fosfato.

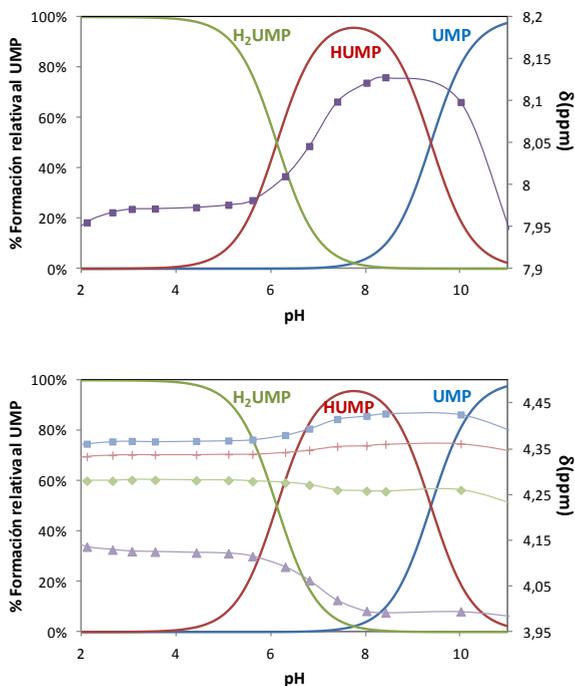


Figura 7.8.- Diagrama de distribución de las especies del UMP con los desplazamientos químicos de ¹H RMN de sus espectros en D₂O a varios valores de pD. Las asignación de las señales es ■H_{U6}, ■H_{R2}, +H_{R3}, ◆H_{R4} y ▲H_{R5}.

Se han calculado las constantes de protonación mediante el tratamiento de los desplazamientos químicos de los espectros de ¹H y ³¹P RMN con el programa HyperNMR.¹⁶ En la tabla 7.3 se muestran los valores de las constantes obtenidas mediante con este método y las obtenidas potenciométricamente.

Las valoraciones se ajustaron para un valor de pK_a alrededor de 6.7 atribuible a la protonación del grupo fosfato de los distintos mononucleótidos. Adicionalmente, se han obtenido una segunda constante de protonación para todos los mononucleótidos. Se calcularos los valores de pK_a de 4.25 para el

AMP, 2.84 para el GMP, 4.78 para el CMP y 1.16 para el UMP. La constante obtenida para el AMP con un pK_a de 4.25 correspondería con la protonación del átomo N1 de la adenina. En el caso del GMP ($pK_a = 2.84$) la protonación corresponde al átomo N7 de la guanina y, por último, para el CMP la constante obtenida tiene un valor de 4.78 que correspondería con la protonación del átomo N3 de la citosina. La constante de protonación obtenida para el UMP y no detectada por potenciometría tiene un valor de 1.2 y probablemente sea debido a la protonación de la nucleobase en algún punto aunque no podemos concluir en que posición.

Al comparar las constantes obtenidas mediante las dos técnicas se observan que las medidas por resonancia son superiores debido a que se realizan en ausencia de fuerza iónica.

Tabla 7.3.- Logaritmos de las constantes de protonación del AMP, GMP, CMP y UMP determinadas mediante potenciometría y $^1\text{H} / ^{31}\text{P}$ RMN.

Reacción ^a	Técnica	AMP	GMP	CMP	UMP
$\text{H} + \text{H}_{-1}\text{A} \rightleftharpoons \text{A}$	Pot. ^b		9.45(2) ^d		9.39(1)
$\text{H} + \text{A} \rightleftharpoons \text{HA}$	Pot.	6.26(1)	6.30(3)	6.27(1)	6.13(1)
	RMN ^c	6.81(1)	6.62(1)	6.84(1)	6.86(1)
$\text{H} + \text{HA} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{A}$	Pot.	3.87(1)	2.55(1)	4.43(1)	1.16(6)
	RMN	4.25(6)	2.84(3)	4.78(7)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Obtenida mediante potenciometría en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K. ^c Obtenida mediante $^1\text{H} / ^{31}\text{P}$ RMN. ^d Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

7.3.- Estudio de la interacción de L1 y L2 con aniones fosfato y nucleótidos

El desarrollo de receptores que interaccionen selectivamente con aniones fosfato y nucleótidos es un campo de gran auge en los últimos años debido a su importancia en multitud de procesos químicos y biológicos.^{17,18}

En la bibliografía, hay una gran variedad de receptores que interaccionan con nucleótidos como poliaminas de cadena lineal¹⁹ o macrocíclicas.²⁰ En el presente trabajo, se ha estudiado la interacción de estos aniones con los ligandos politópicos **L1** y **L2**.

7.3.1.- Estudio potenciométrico de la interacción de L1 y L2 con nucleótidos y aniones fosfatos

Tras determinar las constantes de protonación de los aniones (nucleótidos y fosfatos) y de los ligandos (**L1** y **L2**) se ha estudiado su interacción mediante potenciometría. En las tablas 7.4 y 7.12 se detallan los logaritmos de las constantes de asociación globales de los aductos formados por **L1** y **L2** con AMP, GMP, CMP, UMP, PPI, TPP y ATP. Estas constantes fueron determinadas potenciométricamente en disolución acuosa 0.15 M de NaCl a temperatura constante de 298.0 K. El cálculo de las constantes se realizó con el programa HYPERQUAD.²¹

Primeramente, se ha de especificar que en los equilibrios, las especies son distintas para el GMP y UMP que como se comentó en la sección dedicada a la protonación de los nucleótidos, tanto el GMP como el UMP pueden sufrir una etapa de desprotonación a valores de pH altos. Sin embargo, la notación con la letra A que se incluyen en las tablas se corresponde con la especie desprotonada H₋₁A. Las razones para no cambiar este formato son una simplificación en el análisis de los resultados aunque siempre debemos de tener en cuenta que estamos hablando de los nucleótidos desprotonados para GMP y UMP.

Tabla 7.4.- Logaritmos de las constantes globales para la formación de los complejos binarios de **L1** con AMP, GMP, CMP, UMP, PPI, TPP y ATP determinadas en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción ^a	AMP	GMP	CMP	UMP	PPI	TPP	ATP
$L + A \rightleftharpoons LA$		3.91(4) ^b	3.38(3)				
$H + L + A \rightleftharpoons HLA$	13.38(3)	14.14(4)	14.19(2)	13.24(3)	13.08(8)		13.59(4)
$2H + L + A \rightleftharpoons H_2LA$	23.28(1)	24.05(3)	23.91(2)	23.27(1)	23.38(2)		22.88(3)
$3H + L + A \rightleftharpoons H_3LA$	32.14(2)	33.18(3)	32.70(2)	32.45(2)	32.06(6)		31.47(4)
$4H + L + A \rightleftharpoons H_4LA$	40.06(2)	41.79(3)	40.49(2)	41.14(1)	40.67(4)	39.67(4)	40.00(2)
$5H + L + A \rightleftharpoons H_5LA$	47.07(2)	49.45(3)	47.38(2)	48.83(2)	48.91(3)	48.26(1)	47.96(1)
$6H + L + A \rightleftharpoons H_6LA$	53.52(2)	56.38(2)	53.76(1)	55.62(1)	56.08(3)	55.06(3)	54.48(1)
$7H + L + A \rightleftharpoons H_7LA$	58.80(2)	62.61(3)	58.90(2)	62.06(2)	62.01(3)	59.8(1)	58.87(2)

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Es interesante destacar el hecho de que ambos receptores forman únicamente especies mononucleares. En los sistemas binarios **L1-A** se forman especies de estequiometría H_xLA donde x varía desde 1 hasta 7 para los aductos con PPI, ATP, AMP y UMP; x varía desde 0 hasta 7 para los aniones con GMP y CMP y los complejos con TPP tienen unos valores de x desde 4 hasta 7. Los aductos formados para los sistemas binarios **L2-A** tienen igual estequiometría que para el sistema **L1-A**, H_yLA , aunque presentan en general un mayor número de especies protonadas, donde y cambia desde 1 hasta 8 para los aniones PPI, ATP, CMP y UMP; y varía desde 2 hasta 8 para el TPP. En el caso del CMP el valor de y varía desde 1

sistemas binarios de **L2-A** se muestran en la figura 7.11, las especies aductas predominan en todo el rango de pH para la interacción de **L2** con GMP, CMP y UMP. Sin embargo, para el sistema **L2-AMP** las especies binarias son minoritarias y predomina el anión libre en disolución.

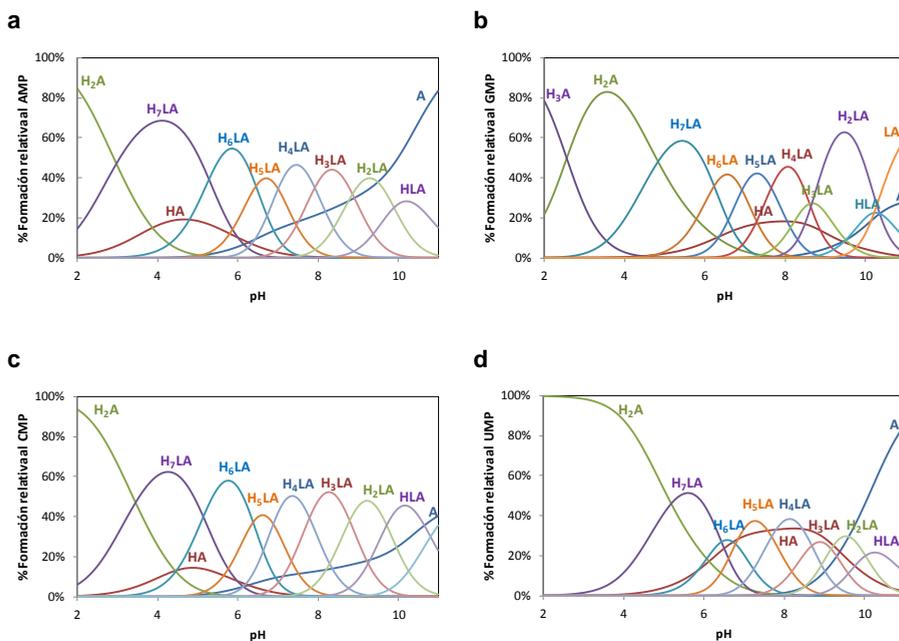


Figura 7.10.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas del ligando **L1** con los nucleótidos monofosfatos AMP (a), GMP (b), CMP (c) y UMP (d).

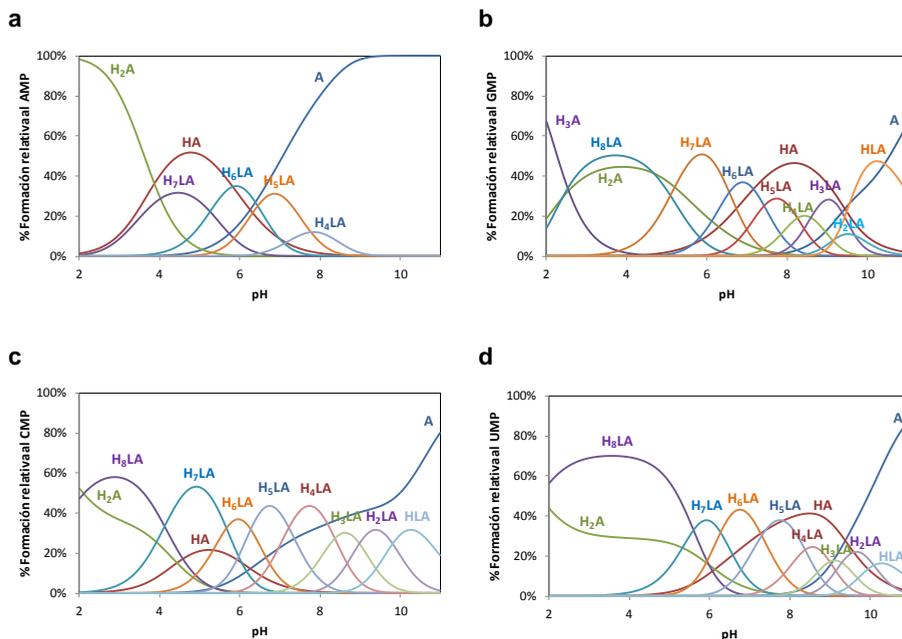


Figura 7.11.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas del ligando **L2** con los nucleótidos monofosfatos AMP (a), GMP (b), CMP (c) y UMP (d).

En disolución acuosa, tanto los ligandos poliamínicos (L) como los aniones (A) son especies que intervienen en equilibrios ácido-base con el agua y participan en la superposición de los procesos de transferencia de protón. Los valores de las constantes de asociación globales de los aductos formados que el programa HYPERQUAD²¹ proporciona, se ven afectadas por los diferentes equilibrios ácido-base del ligando y el anión. Por lo tanto, las constantes globales no son muy adecuadas para extraer conclusiones sobre la magnitud de la interacción, por lo que es necesario descomponerlas en constantes sucesivas de formación, que reflejen de forma más apropiada los equilibrios que tienen lugar.

Previamente al análisis de los resultados, se explica el procedimiento seguido para el cálculo de estas constantes sucesivas de formación, tomamos como ejemplo la formación del aducto del ligando **L1** y el AMP. En la figura 7.12 se muestran los diagramas de distribución de la protonación de

L1 y el AMP y el diagrama de distribución de los aductos formados entre ambos. Los aductos varían de la especie HLA hasta la H₇LA.

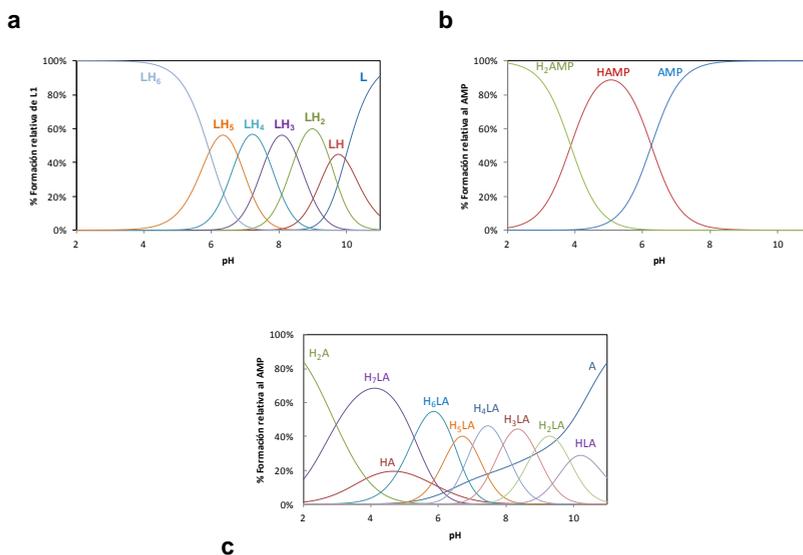
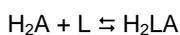


Figura 7.12.- Diagramas de distribución para el ligando L1 (a), el AMP (b) y la formación de los aductos entre ambos (c).

En primer lugar, se definen los intervalos de pH donde predominan cada uno de los aductos formados y se rechazan aquellos equilibrios que no tienen una existencia real en el intervalo de pH analizado o a valores próximos. Hay que tener en cuenta que la interacción entre una especie aniónica y un ligando poliamínico cargado positivamente, susceptibles ambos de participar en un equilibrio de protonación, hace que aumente la basicidad del ligando y la acidez del anión. Por lo tanto, sus constantes de protonación se desplazarán ligeramente con el pH. Por ejemplo, la especie H₂LA nunca procederá del equilibrio:



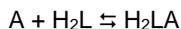
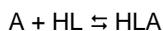
Porque en el intervalo donde se forma la especie H₂LA (8.0 – 10.5) nunca se solapa con la especie H₂A para el anión libre (figura 7.12). Así pues, este equilibrio nunca se tendría en cuenta.

Tabla 7.5.- Logaritmos de las constantes sucesivas para la formación de los complejos binarios de L1 con AMP determinadas en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

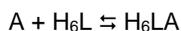
Reacción ^a	AMP	Reacción	AMP
HL + A ⇌ HLA	3.42(3) ^b	H ₅ L + A ⇌ H ₅ LA	4.65(2)
H ₂ L + A ⇌ H ₂ LA	3.80(1)	H ₄ L + H ₂ A ⇌ H ₆ LA	7.76(2)
H ₂ L + HA ⇌ H ₃ LA	6.4(2)^c	H ₅ L + HA ⇌ H ₆ LA	4.84(2)
H ₃ L + A ⇌ H ₃ LA	4.15(2)	H ₆ L + A ⇌ H ₆ LA	5.16(2)
H ₄ L + A ⇌ H ₄ LA	4.42(2)	H ₅ L + H ₂ A ⇌ H ₇ LA	6.25(2)
H ₃ L + HA ⇌ H ₄ LA	5.81(2)	H ₆ L + HA ⇌ H ₇ LA	4.18(2)
H ₃ L + H ₂ A ⇌ H ₅ LA	8.95(2)		
H ₄ L + HA ⇌ H ₅ LA	5.17(2)		

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa. ^c El tachado indica que el equilibrio no existe realmente.

Siguiendo este criterio, en la zona donde predominan las especies HLA y H₂LA únicamente existe el AMP en su forma completamente desprotonada (AMP). Por tanto, la formación de las dos especies debe tener lugar a partir de los equilibrios siguientes:



Sin embargo, la especie predominante a pH 6.0 es H₆LA y puede ser el resultado a los siguientes equilibrios:



Siguiendo este criterio, no se descarta ningún equilibrio porque todas las especies reactivas existen a ese pH aunque no se formen considerablemente (< 10% para las especies H₂A y H₄L). Aún así, probablemente alguno de los equilibrios sea inconsistente. Para solucionar este problema, se ha definido una constante efectiva (K_{ef}) para cada valor de pH, que se compara con los equilibrios propuestos con anterioridad y se deducirá la contribución de cada uno de ellos para la formación de la especie H₆LA. El cálculo de este parámetro K_{ef} se define mediante la siguiente ecuación:

$$K_{ef} = \frac{\Sigma[H_{i+j}LA]}{(\Sigma[H_iA] \times \Sigma[H_jL])}$$

Donde el término $\Sigma[H_iA]$ es la cantidad total de anión libre, el término $\Sigma[H_jL]$ es la cantidad total de ligando libre y el término $\Sigma[H_{i+j}LA]$ es la cantidad de aducto formado a un determinado pH. Para facilitar su interpretación, en la práctica se utiliza la representación del logaritmo K_{ef} respecto al pH (figura 7.13). Finalmente, se comparan la constante de formación sucesiva deducida para cada aducto AMP-L1 con el valor que presenta la constante efectiva en el intervalo de pH de cada aductos y se descarta si son distintas.

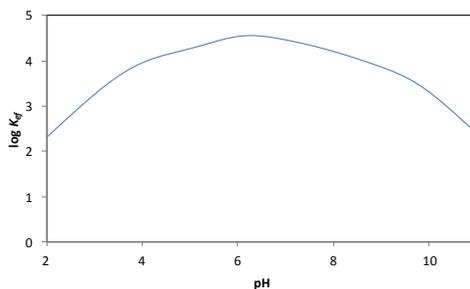


Figura 7.13.- Representación gráfica del logaritmo de la constante efectiva frente el pH para el ligando **L1** con AMP.

Para el aducto H_6LA que estamos discutiendo, los valores calculados de las constantes sucesivas son:



Si se observa la figura 7.13, en todo el intervalo de pH ningún valor de logaritmo K_{ef} alcanza el valor de 7.8, por lo queda descartado este equilibrio (tachados en la tabla 7.5) siendo los equilibrios más lógicos el primero y el segundo. Este método se ha aplicado en todos los sistemas ligando-anión que se han estudiado.

Una vez explicado cómo se obtienen las constantes efectivas y sucesivas, se han representado en las tablas 7.6 y 7.7 las constantes sucesivas de los ligandos **L1** y **L2** con PPI, TPP y los nucleótidos.

Las constantes sucesivas tienen un valor alto de logaritmo de K entre 3 y 7 comparable a los sistemas que mejor interaccionan en la literatura como los ligandos lineales con antraceno descritos por M. T. Albelda *et al.*²²

Tabla 7.6.- Logaritmos de las constantes sucesivas para la formación de los complejos binarios de **L1** con AMP, GMP, CMP, UMP, PPi, TPP y ATP, determinadas en NaCl 0.15 M a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción ^a	AMP	GMP	CMP	UMP	PPi	TPP	ATP
HL + A ⇌ HLA	3.42(3) ^b	4.18(4)	4.23(2)	3.28(3)	3.12(4)		3.63(4)
H ₂ L + A ⇌ H ₂ LA	3.80(1)	4.57(4)	4.43(2)	3.79(1)	3.90(2)		3.40(3)
H ₃ L + A ⇌ H ₃ LA	4.15(2)	5.19(4)	4.71(2)	4.46(2)	4.07(5)		3.48(4)
H ₄ L + A ⇌ H ₄ LA	4.42(2)	6.15	4.85(2)	5.50(1)	5.03(4)	4.04(4)	4.36(2)
H ₃ L+HA ⇌ H ₄ LA	5.81(2)	4.35(3)		3.76(1)	4.54(4)	4.13(5)	
H ₅ L + A ⇌ H ₅ LA	4.65(2)		4.96(2)			5.84(1)	5.54(1)
H ₄ L + HA ⇌ H ₅ LA	5.17(2)	4.36(3)	5.48(2)	3.80(2)	5.13(3)	5.07(1)	5.65(1)
H ₅ L + HA ⇌ H ₆ LA	4.84(2)	4.51(3)	5.08(1)	3.81(1)	5.52(3)	5.09(3)	5.39(1)
H ₆ L + A ⇌ H ₆ LA	5.16(2)		5.40(1)				
H ₆ L + HA ⇌ H ₇ LA	4.18(2)	4.80(3)	4.28(2)	4.31(2)	5.51(3)	3.9(1)	3.84(2)
H ₅ L + H ₂ A ⇌ H ₇ LA		4.44(3)	5.78(2)	4.12(2)			
H ₆ L + H ₂ A ⇌ H ₈ LA					5.83(3)	4.5(1)	

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Tabla 7.7.- Logaritmos de las constantes sucesivas para la formación de los complejos binarios de **L2** con AMP, GMP, CMP, UMP, PPi, TPP y ATP, determinadas en 0.15 M de NaCl a 298.0 ± 0.1 K.

Reacción ^a	AMP	GMP	CMP	UMP	PPi	TPP	ATP
HL + A ⇌ HLA		3.90(5) ^b	3.48(2)	3.0(1)	3.3(1)		4.52(3)
H ₂ L + A ⇌ H ₂ LA		3.26(7)	3.50(1)	3.35(4)	3.58(4)	4.11(1)	4.95(3)
H ₃ L + A ⇌ H ₃ LA		4.06(8)	3.61(2)	3.76(9)	3.91(6)	4.09(3)	5.34(3)
H ₄ L + A ⇌ H ₄ LA	2.52(7)	4.52(7)	3.83(2)	4.62(5)	4.60(3)	5.05(2)	5.86(2)
H ₃ L+HA ⇌ H ₄ LA	4.41(7)	3.22(6)		3.38(5)	4.61(4)	5.65(2)	
H ₅ L + A ⇌ H ₅ LA	3.52(2)		4.28(2)		5.98(4)	6.26(2)	6.88(2)
H ₄ L + HA ⇌ H ₅ LA	4.04(2)	3.33(7)	4.79(2)	3.61(5)	4.62(4)	5.49(2)	6.99(2)
H ₅ L + HA ⇌ H ₆ LA	3.71(2)	3.99(7)	4.28(2)	4.14(5)	5.43(3)	6.32(2)	6.88(1)
H ₆ L + A ⇌ H ₆ LA	4.02(2)		4.60(2)				
H ₆ L + HA ⇌ H ₇ LA	3.02(3)	4.60(8)	4.00(2)	4.46(5)	5.88(3)	6.66(2)	7.07(2)
H ₅ L + H ₂ A ⇌ H ₇ LA		4.25(6)		4.28(5)			
H ₆ L + H ₂ A ⇌ H ₈ LA		3.40(5)	3.69(3)	3.93(6)	5.32(4)	5.65(3)	6.64(3)

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

En la figura 7.14 se representan las constantes efectivas en función del pH de los distintos sistemas binarios estudiados para comparar las estabilidades relativas. Las constantes efectivas para el sistema binario L1–A presentan un máximo de interacción a valores de pH neutros, ya que los aniones presentan todavía carga negativa y los ligandos se encuentran totalmente protonados. Este hecho indica que las interacciones electrostáticas son la principal fuerza en la formación de los aductos y que dentro de este intervalo (6.5 – 8.0) forman un aducto con una conformación óptima para maximizar las interacciones entre ligando y anión. Al disminuir el pH, ligando y anión se protonan y la interacción es menor porque se produce una mayor repulsión entre cargas positivas. Por encima de pH ~ 10.0 hay también una disminución de la constante efectiva indicando que no se produce interacción porque las aminas no están protonadas y no pueden interactuar electrostáticamente.

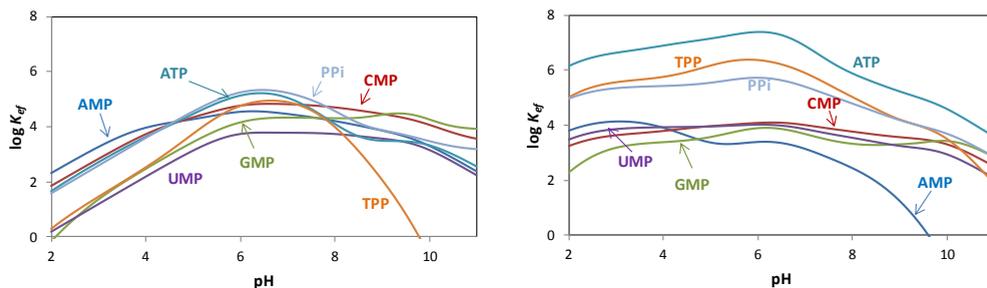


Figura 7.14. - Representación de la constante efectiva frente al pH para los sistemas binarios entre L1 (izda) y L2 (dcha) y AMP, GMP, CMP, UMP, ATP, TPP y PPI.

Analizando las constantes efectivas para los sistemas binarios L2–A, existe una diferencia entre ellas. Siendo los valores de PPI, TPP y ATP dos unidades logarítmicas superiores que el resto de aniones en un amplio intervalo de pH (2.5-9.0). Por lo tanto, hay una selectividad del PPI, TPP y ATP con respecto a los nucleótidos monofosfato.

En la representación de la constante efectiva de **L1** con los aniones se observa una máximo sobre pH ~ 7.0, al igual que sucediera con **L2**. Este hecho correspondería con la optimización de las fuerzas que unen al anión y ligando, (electrostáticas, apilamiento, solvatación...).

Si se comparan los valores de las constantes efectivas de los sistemas **L1-A** y **L2-A**, se observa como el ligando **L2** tiene unos valores mayores a pH ácido y, puesto que a esos valores de pH los ligandos están cargados positivamente, se puede sugerir que hay una interacción por apilamiento entre las unidades aromáticas de la fenantrolina y las nucleobases.

En la tabla 7.8 se recogen los valores de las constantes efectivas a pH ~ 7.0 que es donde se produce un máximo en la interacción de los ligandos con todos los aniones. A este pH, **L1** interacciona más fuertemente con el AMP, GMP y CMP que **L2**; en cambio **L2** forma complejos más estables con el TPP y ATP que el ligando **L1**. Las mayores diferencias de los valores de la constante efectiva del mismo anión con cada ligando se observan para el AMP, CMP, TPP y ATP, donde los complejos con AMP y CMP tienen un valor de constante efectiva de una unidad logarítmica mayor para los sistemas binarios con el ligando **L1**. Sin embargo, para el anión TPP el ligando **L2** forma complejos más estables con un valor de constante efectiva una unidad logarítmica mayor que los complejos con **L1**. Por último, en el caso del anión ATP, el sistema con **L2** posee un valor de constante efectiva de 1.8 órdenes de magnitud mayor que para los sistemas con **L1**. En términos de selectividad, es aproximadamente 100 veces más selectivo el sistema con **L2** que con **L1**.

Tabla 7.8.- Logaritmos de las constantes efectivas calculadas a pH 7.0 a partir de las representaciones gráficas.

	AMP	GMP	CMP	UMP	PPi	TPP	ATP
L1	4.45	4.35	4.82	3.77	5.20	4.88	5.01
L2	3.12	3.70	3.99	3.84	5.37	5.88	6.84

Se ha representado en la figura 7.15 el porcentaje de anión complejoado para cada ligando obtenido del diagrama de distribución del sistema L-AMP-GMP-CMP-UMP en relación equimolar (L:AMP:GMP:CMP:UMP 1:1:1:1), donde se mezclan un equivalente de ligando y de cada anión.

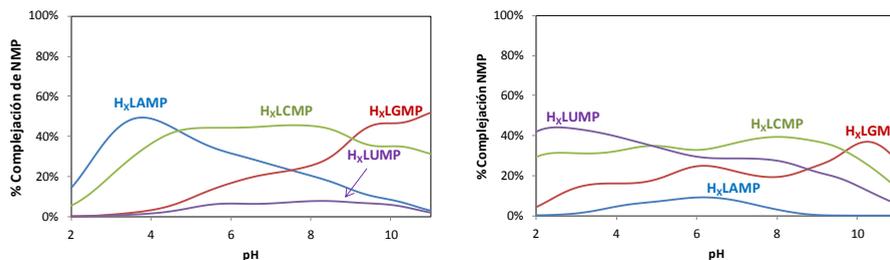


Figura 7.15.- Representación de los porcentajes de complejación para cada mononucleótido frente al pH para los sistemas con **L1** (izda) y **L2** (dcha).

Para el ligando **L1** predominan las especies binarias con AMP por debajo de pH 4.0, a partir de este pH el porcentaje de aductos formados con CMP es superior a los demás hasta pH 9.0. A partir de este pH comienzan a prevalecer los aductos con GMP. Para **L2**, se observa la misma selectividad que para **L1** aunque intercambiando los complejos de AMP por los complejos de UMP por debajo de pH 5.0.

Con las anteriores figuras se puede representar el porcentaje de anión complejoado con cada ligando a un valor de pH e indicar cual se forma en mayor extensión y, por lo tanto, cuál es el que interacciona más fuertemente. Para el sistema con el ligando **L1** a pH 7.0 se observa como el complejo con UMP es el que se forma en menor extensión y, por lo tanto, sugiere que se forman los complejos menos estables como indicaban los valores de las constantes efectivas. En el caso del sistema con **L2** se observa de acuerdo con las constantes efectivas un orden idéntico para los aniones $CMP > UMP > GMP > AMP$, y donde se muestra cierta selectividad del CMP sobre el AMP.

7.3.2.- Estudios de interacción de L1 y L2 con aniones fosfato y nucleótidos mediante RMN y dinámica molecular

La formación de las especies aductas entre los ligandos **L1** y **L2** y los aniones fosfato y nucleótido se ha estudiado mediante ^1H RMN y ^{31}P RMN.

7.3.2.1.- Estudios de interacción de L1 y L2 con aniones fosfato y ATP mediante RMN y dinámica molecular

Los estudios potenciométricos indican que se forman especies binarias L-A de estequiometría 1:1 para todos los sistemas. Aunque para confirmarlo con los aniones de menor tamaño (PPi y TPP) se han realizado valoraciones con diferentes relaciones molares [A]:[L] por RMN. La figura 7.16 muestra el desplazamiento químico de ^{31}P RMN a diferentes relaciones [A]:[L] para los sistemas binarios **L1**-PPi y **L2**-PPi (figura 7.16). Al extrapolar las partes inicial y final de las gráficas se cruzan en un punto que representa la estequiometría del aducto. En ambos casos, se cruzan para cuando la relación molar es [A] = [L], confirmando que se forman exclusivamente especies con estequiometría 1:1.

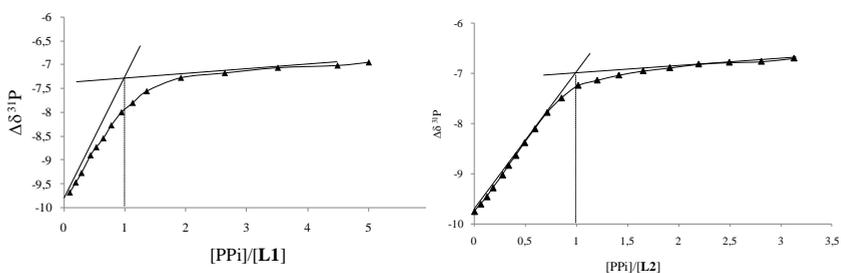


Figura 7.16.- δ (ppm) de la señal de ^{31}P RMN frente a [PPi]/[L] a pD = 7.0 en D_2O para el complejo **L1**:PPi (izda) y **L2**:PPi (dcha)

Se registraron los espectros de ^1H RMN y ^{31}P RMN para disoluciones que contienen ATP, ligando o una mezcla equimolar a varios valores de pD. En primer lugar, las señales de ^{31}P RMN del espectro a pD = 7.0 para el sistema L1-ATP se encuentran desplazadas a campo bajo si las comparamos con las del ATP al mismo pD (figura 7.17). Los núcleos de $\text{P}\gamma$ y $\text{P}\beta$ se desplazan 3.9 y 1.6 ppm respectivamente.

Un hecho resaltable es la coincidencia de los desplazamientos de las señales de ^{31}P RMN para los sistemas L1-ATP a pD = 7.0 y el ATP a pD = 9.0, indicando que la interacción del ATP con el ligando poliamínico hace más ácido al ATP y, por lo tanto, sus señales de ^{31}P RMN se comportan como si fuera el espectro del ATP a un pH más básico (pH = 9.0).

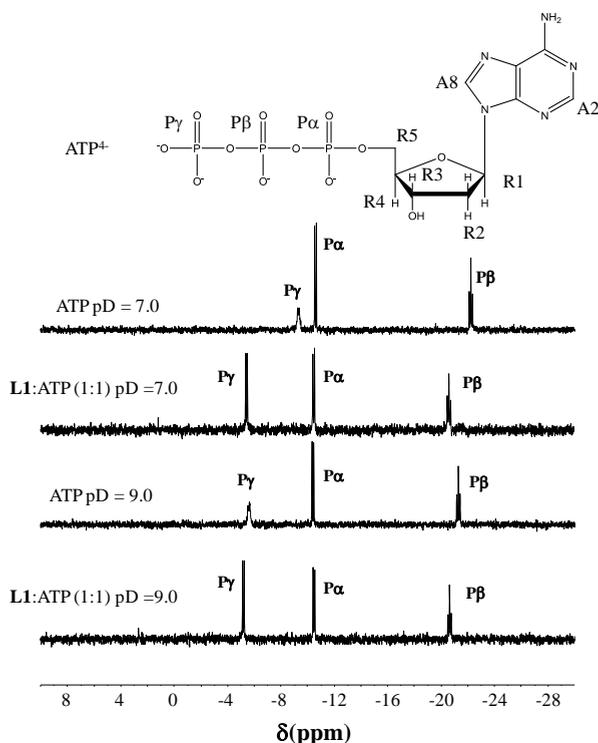


Figura 7.17.- Espectros de ^{31}P RMN de L1:ATP y ATP a pD = 7.0 y 9.0.

Asimismo, el espectro de ^{31}P RMN a $\text{pD} = 9.0$ del sistema **L1**-ATP no presenta prácticamente diferencias con respecto al espectro de ^{31}P RMN del ATP al mismo valor de pD . Este hecho es porque aunque el ATP se acidifique más se encuentra totalmente desprotonado y la interacción con el ligando no produce ningún cambio en su grado de protonación. Para el sistema **L2**-ATP se encuentran los mismos resultados.

Los espectros de ^1H RMN registrados para los sistemas binarios L-ATP a $\text{pD} = 7.0$ (figura 7.19) muestran como las señales aromáticas ($\text{H}_{\text{A}2}$ y $\text{H}_{\text{A}8}$), la anomérica ($\text{H}_{\text{R}1}$) y las señales aromáticas de las unidades centrales de los ligandos (P3, P4 y P6 de la fenantrolina en **L2** y $\text{py}3'$ y $\text{py}4'$ de la piridina en **L1**, para ver la numeración ver la figura 7.18) se desplazan a campo alto con respecto a las señales de los sustratos libres. Este hecho indica un apilamiento entre la adenina y los anillos aromáticos de los ligandos en ambos sistemas. Sin embargo, los desplazamientos químicos para el sistema **L2**-ATP son mayores que los correspondientes para el sistema **L1**-ATP, indicando un apilamiento más efectivo con **L2** debido a la mayor área de superficie aromática de la fenantrolina en comparación con la piridina.

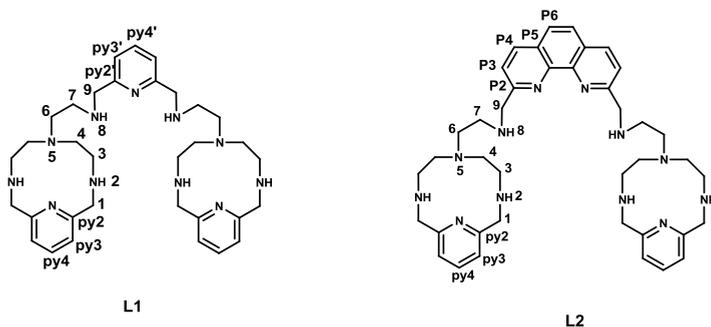


Figura 7.18.- Numeración utilizada para ^1H RMN.

El análisis más detallado de los desplazamientos químicos de las señales de ^1H RMN a $\text{pD} = 7.0$ nos permite extraer varias conclusiones adicionales. En primer lugar, en el sistema **L1**-ATP las señales de las piridinas de las cavidades macrocíclicas ($\text{H}_{\text{py}3}$ y $\text{H}_{\text{py}4}$) sufren un mayor desplazamiento a

campo bajo que las señales del anillo central de piridina ($H_{py3'}$ y $H_{py4'}$, figura 7.19), lo cual indica que la conformación del ligando a este pH no se ve muy afectada por la interacción con el ATP y, por lo tanto, el apilamiento de la adenina ocurrirá principalmente con las piridinas de los macrociclos.

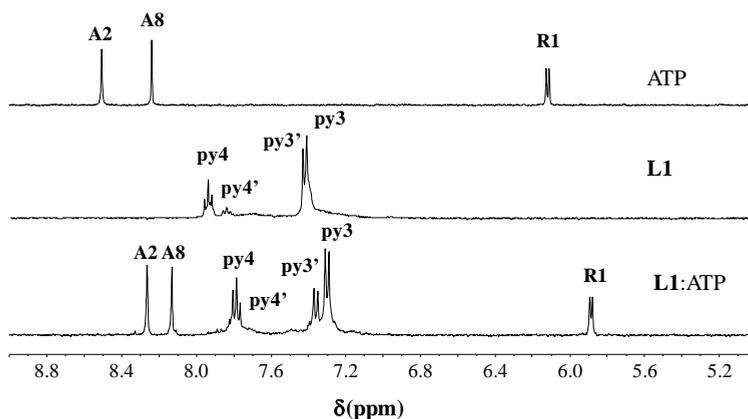


Figura 7.19.- Región a campo bajo del espectro de ^1H RMN donde se encuentran las señales aromáticas y anomérica de los sistemas **L1-ATP**, **L1** y **ATP** a pD = 7.0 en D_2O .

En segundo lugar, para el sistema **L2-ATP** a pD = 7.0, las señales aromáticas y anomérica del ATP (H_{A8} , H_{A2} y H_{R1}) y las señales pertenecientes a la fenantrolina (H_{P3} , H_{P4} y H_{P6}) muestran un desplazamiento a campo alto, sin embargo, las señales de los anillos de piridina (H_{py4} y H_{py3}) sufren un desplazamiento a campo bajo (figura 7.20). Este hecho indica que el apilamiento entre la fenantrolina y las piridinas que se produce en la conformación del ligando libre se rompe para formar el aducto **L2-ATP**, en el cual la adenina y la fenantrolina se encuentran apilados. Este apilamiento se confirma con los experimentos ^1D RMN NOE selectivos donde al irradiar la señal H_{A2} se ven picos cruzados con los protones de la fenantrolina H_{P3} y H_{P4} (figura 7.38 en el apéndice).

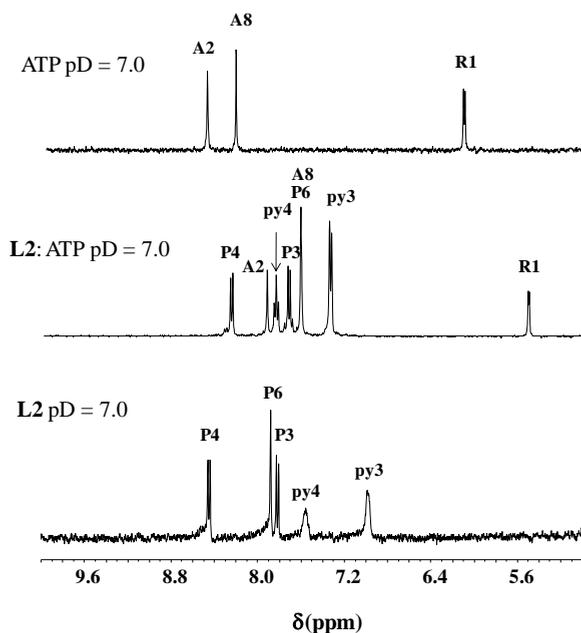


Figura 7.20.- Región a campo bajo del espectro de ^1H RMN donde se encuentran las señales aromáticas y anomérica de los sistemas **L2:ATP**, **L2** y **ATP** a pD = 7.0 en D_2O .

Asimismo, se han realizado cálculos de dinámica molecular para los sistemas binarios **L1-ATP** y **L2-ATP**.²³ En las modelizaciones se ha escogido la especie H_6L^{6+} para ambos ligandos ya que es la mayoritaria a pH = 7.0 (ver capítulo 5). En todos los conformeros de mínimos de energía para el sistema **L2-ATP** (figuras 7.21 y 7.39) se observa el apilamiento entre la adenina y la fenantrolina mientras que no se produce ningún apilamiento interno en el ligando. La cadena fosfatada se sitúa entre los brazos macrocíclicos maximizando así las interacciones electrostáticas con las cargas positivas del ligando protonado, observándose la formación de por lo menos cinco puentes de hidrógeno.

El conformero de mínima energía para la especie H_6LA del sistema **L1-ATP** muestra un apilamiento entre la adenina y las piridinas de los brazos

mientras que la cadena fosfatada forma en este caso siete puentes de hidrógeno con las aminas protonadas (figura 7.21).

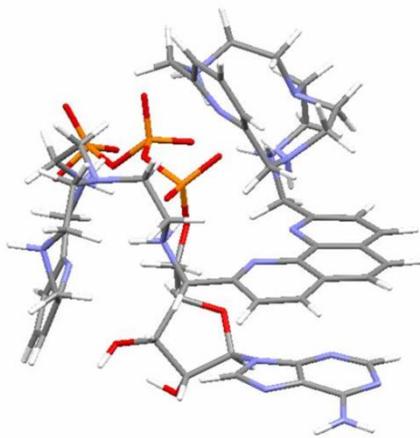


Figura 7.21.- Confórmero de mínima energía calculado para la interacción de $H_6L_2^{6+}$ y ATP.

7.3.2.2.- Estudios de interacción de L1 y L2 con nucleótidos monofosfato mediante RMN y dinámica molecular

Para analizar la interacción de los nucleótidos con los ligandos **L1** y **L2** se han registrado espectros de 1H RMN y ^{31}P RMN a lo largo de todo el rango de pH de los sistemas binarios L-A.

En las figuras 7.22 y 7.40 se muestran las señales de ^{31}P RMN a diferentes valores de pD para los diferentes nucleótidos libres y de sus complejos con los ligandos **L1** o **L2**. Se observa cómo hay una variación del desplazamiento químico de los complejos con respecto a los nucleótidos libres. Este hecho indica que el anión experimenta una acidificación debida a su interacción con el ligando y, por lo tanto, las señales de los sustratos libres y el aducto tienen un desplazamiento distinto.

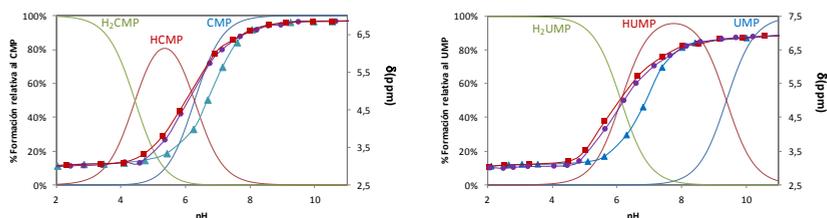


Figura 7.22.- Representación de los δ (ppm) de ^{31}P RMN de la señal P_α (\blacktriangle) de los mononucleótidos (CMP y UMP) y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos **L1** (\blacksquare) y **L2** (\blacklozenge) a lo largo del pH junto con el diagrama de distribución des especies para el CMP (izda) y UMP (dcha).

En la figura 7.23 se han representado conjuntamente los desplazamientos químicos de la señal anomérica ($\text{H}_{\text{R}1}$) de ^1H RMN de los nucleótidos monofosfato y de sus complejos con **L1** y **L2**. En todos los aductos se puede observar como la señal $\text{H}_{\text{R}1}$ se desplaza a campo alto en comparación con el anión libre y el desplazamiento es mayor para los sistemas con **L1**. Para todos los sistemas binarios L-A se advierte un intervalo de pH entre pH 6.7 y 7.2 donde hay un mayor desplazamiento de las señales.

Comparando los desplazamientos de la señal anomérica entre los sistemas binarios L-A se observa una mayor variación de esta señal para los complejos con **L2** que con **L1**, indicando que se produce una mayor interacción con **L2** debido probablemente a que el ligando tiene una conformación más flexible e interacciona más fuertemente con los nucleótidos.

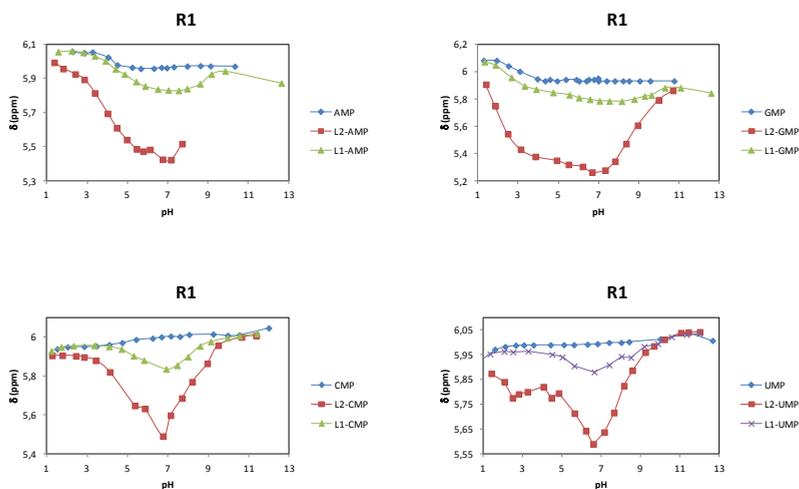


Figura 7.23.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de la señal anémica ($\text{H}_{\text{R}1}$) de los mononucleótidos (AMP, GMP, CMP y UMP) y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos **L1** y **L2** a lo largo del pH.

Los desplazamientos de las señales de ^1H RMN correspondientes a las unidades aromáticas de las nucleobases de los nucleótidos y de los sistemas binarios L-A se muestran en la figura 7.24. Las señales para el complejo con **L2** muestran una mayor variación que para el complejo con **L1**, lo que está de acuerdo con el apilamiento más intenso producido por la fenantrolina con los diferentes nucleótidos. Asimismo, hay un intervalo de pH donde hay un mayor variación de las señales (pD 6.7-7.1), apuntando que en este intervalo se forma el aducto que tiene una mayor interacción.

Un hecho resaltable es la diferencia de la variación de los desplazamientos entre los complejos de ambos ligandos en la zona ácida. Mientras que las señales para los complejos con **L2** varían a partir de pD ~ 1.0 para **L1** no hay variación hasta aumentar de pD ~ 2 - 3. Esta diferencia entre ligandos es debida a la mayor contribución de las interacciones electrostáticas o al apilamiento más efectivo por parte de **L2**.

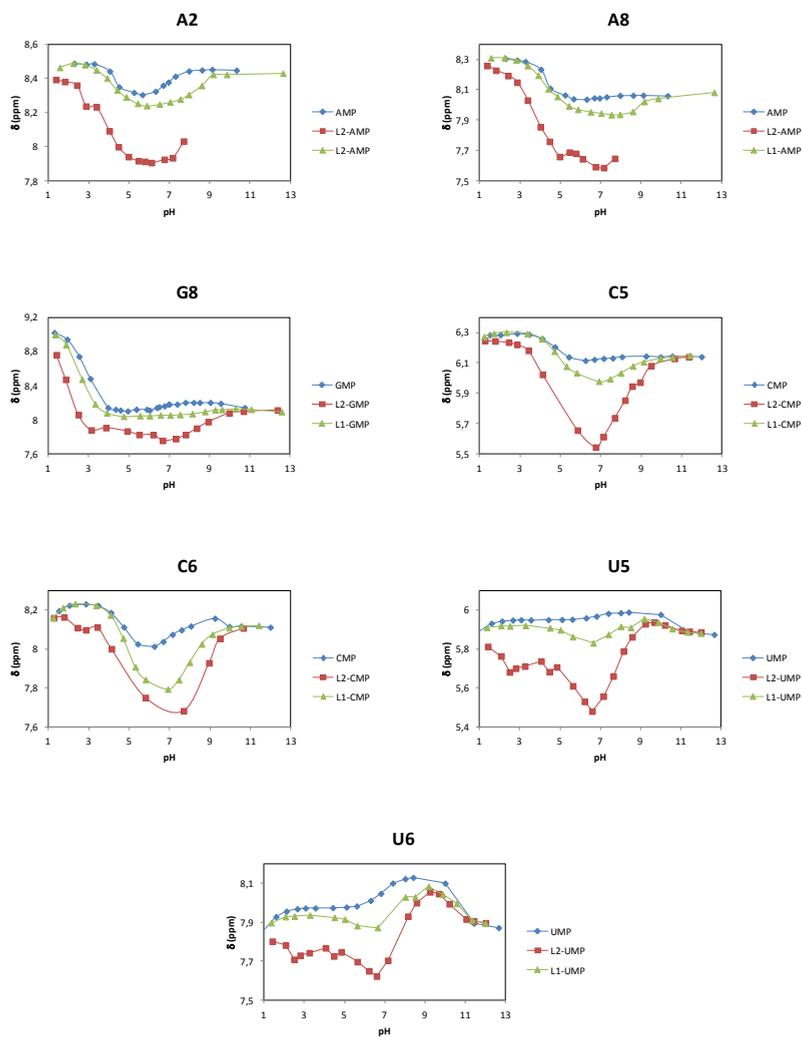


Figura 7.24.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de las señales aromáticas del AMP ($\text{H}_{\text{A}2}$ y $\text{H}_{\text{A}8}$), GMP ($\text{H}_{\text{G}8}$), CMP ($\text{H}_{\text{C}5}$ y $\text{H}_{\text{C}6}$) y UMP ($\text{H}_{\text{U}5}$ y $\text{H}_{\text{U}6}$) y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos **L1** y **L2** a lo largo del pH.

El cálculo de dinámica molecular para el sistema **L2-AMP** (figura 7.25) sugiere una conformación idéntica al sistema **L2-ATP**, en la cual la adenina se apila con la fenantrolina. Sin embargo, la cadena fosfatada más corta no

se coloca entre los macrociclos sino en un lateral formando únicamente dos enlaces de hidrógeno con el brazo macrocíclico. Este hecho confirma que la interacción entre **L2** y AMP es debido a una mezcla de fuerzas electrostáticas y de apilamiento y que la mayor estabilidad con el ATP con respecto al AMP es debido a la mayor carga del ATP y a la formación de más puentes de hidrógeno (figura 7.25).

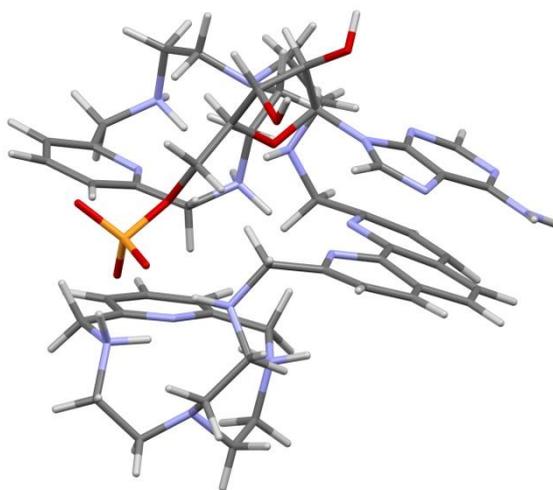


Figura 7.25.- Conformero de mínima energía calculado para la interacción de H_4L2^{4+} y AMP.

Asimismo en el apéndice de este capítulo se encuentran las variaciones de los desplazamientos de las señales aromáticas de los ligandos (figuras 7.41-7-43) y la tabla 7.12 con las variaciones de los desplazamientos a pH 7.0 donde se puede resumir que las señales del ligando **L2** sufre una mayor variación de los desplazamientos, indicando que hay una mayor interacción por apilamiento que con respecto a **L1**.

7.4.- Estudio de los sistemas ternarios Zn^{2+} -ligando-anión

Los complejos metálicos con centros coordinativamente insaturados o con ligandos lábiles en su esfera de coordinación pueden estabilizar especies aniónicas a través de enlaces coordinativos.²⁴

Por ello, en el siguiente apartado se estudia la formación de complejos ternarios entre los ligandos **L1** y **L2**, Zn^{2+} y los aniones fosfato y ATP.

7.4.1.- Estudio potenciométrico de los sistemas ternarios Zn^{2+} -ligando-fosfatos.

Los estudios de formación de complejos con Zn^{2+} ya se presentaron en el capítulo 6, en el cual se detectaron la formación de complejos mono- y binucleares para todos los ligandos y cuyos centros metálicos pueden presentar geometría penta- o hexacoordinada. Asimismo, se han detectado especies trinucleares de zinc para los ligandos **L1**, **L2** y **L3** al emplearse relaciones molares M:L 3:1. La entrada del tercer metal produce vacantes de coordinación en los centros metálicos, que son óptimos para la interacción con especies aniónicas. Se puede dar el caso en que los centros metálicos de zinc pentacoordinados interaccionen con ligandos adicionales e incrementen su número de coordinación a seis.

Para los complejos mononucleares de **L1** y **L2**, el metal se situaría en una de las unidades macrocíclicas por lo que la otra subunidad macrocíclica se puede protonar. Mientras que el centro metálico puede interaccionar con especies aniónicas mediante enlaces coordinativos, el macrociclo sin metal puede interaccionar a través de enlaces de hidrógeno e interacciones carga-carga con el anión formando especies ternarias. Esto hecho puede suponer una mezcla de modos de interacción con los aniones.

Para analizar la formación de especies ternarias, se ha estudiado mediante potencimetría la formación de complejos ternarios entre los ligandos **L1** y **L2**, el ión metálico Zn^{2+} y los aniones PPI, TPP y ATP. El número de constantes que se requiere para definir el modelo es elevado en

todos los sistemas ternarios estudiados. Estas constantes se reparten entre las constantes de protonación del ligando y del anión, las constantes de interacción entre el ligando y el ión metálico, las constantes de interacción entre el anión y el ión metálico y, finalmente, las constantes de interacción entre el ligando y el anión. Una vez introducidos correctamente todos los valores de las constantes de partida, se ajustan las constantes de asociación del ligando con el ión metálico y el anión. Completado el ajuste, la exactitud del modelo se comprueba repitiendo el proceso iterativo pero ampliando el grado de libertad del sistema, es decir ajustando simultáneamente las constantes de los aductos ternarios (M-L-A) y los binarios (L-A).

En la tabla 7.9 se detallan las constantes globales de la formación de los complejos ternarios $Zn^{2+}:L:A$ determinadas potenciométricamente para relaciones molares metal:ligando:anión 1:1:1, 2:1:1 y 3:1:1. Se han detectado complejos con TPP de estequiometrias $[ZnH_rLTPP]^{(r-3)+}$ (**L1**, $r = 1 - 5$; **L2**, $r = 0 - 6$), $[Zn_2H_rLTPP]^{(r+1)+}$ (**L1**, $r = 0 - 2$; **L2**, $r = -1 - 2$) y $[Zn_3H_rLTPP]^{(2+r)+}$ (**L1**, $r = 1 - 0$; **L2**, $r = -2 - 1$). Para los complejos con ATP se determinaron las estequiometrias $[ZnH_rLATP]^{(r-2)+}$ (**L1**, $r = 2 - 6$; **L2**, $r = 0 - 6$), $[Zn_2H_rLATP]^{r+}$ (**L1**, $r = -1 - 2$; **L2**, $r = -1 - 2$) y $[Zn_3H_rLATP]^{(2+r)+}$ (**L1**, $r = -1 - 0$; **L2**, $r = -2 - 2$). Finalmente, se determinaron los complejos de PPI de estequiometrias $[ZnH_rLPPi]^{(r-2)+}$ (**L1**, $r = 1 - 5$; **L2**, $r = 0 - 5$) y $[Zn_2H_rLPPi]^{r+}$ (**L1**, $r = 0 - 2$; **L2**, $r = -1 - 2$) y los complejos $[Zn_3H_rLPPi]^{(2+r)+}$ ($r = -2 - 1$). Al trabajar en relación molar 3:1:1 en el caso de Zn:**L1**:PPI se produce precipitación imposibilitando su análisis.

Interacción con nucleótidos y aniones fosfato

Tabla 7.9.- Logaritmos de las constantes globales para la formación de los complejos ternarios de **L1** y **L2** con Zn^{2+} y PPI, TPP y ATP, determinadas a 298.1 ± 0.1 K y fuerza iónica 0.15 M de NaCl.

Reacción ^a	L1:PPI	L1:TPP	L1:ATP	L2:PPI	L2:TPP	L2:ATP
$6H + Zn + L + A \rightleftharpoons ZnH_6LA$			59.78(4) ^b		64.86(6)	63.73(3)
$5H + Zn + L + A \rightleftharpoons ZnH_5LA$	59.1(1)	58.01(8)	55.72(8)	62.50(1)	61.70(1)	60.54(1)
$4H + Zn + L + A \rightleftharpoons ZnH_4LA$	54.90(4)	54.10(3)	52.61(3)	57.20(5)	56.12(8)	55.56(6)
$3H + Zn + L + A \rightleftharpoons ZnH_3LA$	48.69(6)	48.30(4)	47.44(4)	49.54(5)	49.88(5)	49.15(5)
$2H + Zn + L + A \rightleftharpoons ZnH_2LA$	41.13(6)	40.92(4)	40.71(4)	42.21(6)	42.34(5)	41.55(5)
$H + Zn + L + A \rightleftharpoons ZnHLA$	32.40(8)	32.22(9)		33.45(4)	33.90(5)	32.26(6)
$Zn + L + A \rightleftharpoons ZnLA$				23.50(7)	24.50(5)	21.74(8)
$2H + 2Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_2H_2LA$	50.29(4)	50.16(3)	48.23(2)	54.52(2)	53.21(3)	52.09(1)
$H + 2Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_2HLA$	44.58(7)	44.77(4)	43.48(2)	49.79(3)	47.79(4)	46.19(2)
$2Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_2LA$	36.43(4)	36.98(5)	37.09(3)	41.59(5)	40.00(6)	36.31(6)
$H_2O + 2Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_2LA(OH) + H$			27.50(4)	31.45(5)	29.97(6)	27.50(4)
$2H + 3Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_3H_2LA$						55.66(3)
$H + 3Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_3HLA$				53.99(4)	52.71(4)	50.99(4)
$3Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_3LA$		43.56(2)	41.73(2)	49.27(4)	47.76(4)	42.8(1)
$H_2O + 3Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_3LA(OH) + H$		35.16(3)	33.37(3)	41.11(4)	39.24(7)	34.82(4)
$2H_2O + 3Zn + L + A \rightleftharpoons Zn_3LA(OH)_2 + 2H$				31.50(6)	29.48(6)	25.3(1)

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

Los diagramas de distribución se han representado para estos sistemas ternarios estudiados para relaciones molares M:L:A 1:1:1, 2:1:1 y 3:1:1

(figuras 7.26-7.27 y 7.44-7.47 en el apéndice). Los complejos ternarios M-L-A predominan en un amplio intervalo de pH, únicamente a valores de pH ácido no se observan los sistemas ternarios Zn^{2+} -L-A puesto que todavía no se han formado los sistemas binarios Zn^{2+} -L. Asimismo, para una relación molar M:L:A 3:1:1 y a valores de pH básico, el anión hidroxilo reemplaza a los aniones fosfato o ATP en la esfera de coordinación del complejo ternario.

En el caso del ATP, ambos ligandos forman especies ternarias a partir de pH ~ 4.0 (figuras 7.26 y 7.27). Dependiendo de la relación molar empleada se forman especies mononucleares para una relación molar M:L:A 1:1:1, especies binucleares para una relación molar M:L:A 2:1:1 o especies trinucleares para una relación molar M:L:A 3:1:1. Asimismo, se forman especies ternarias hidroxiladas para ambos ligandos por encima de pH ~ 9.0 cuando la relación molar es 2:1:1 (figuras 7.26b y 7.27b) y pH ~ 8.0 cuando la relación es 3:1:1 (figuras 7.26c y 7.27c). Sin embargo, para los sistemas Zn-L1-ATP con la relación molar es 3:1:1 (figura 7.26c), el complejo ternario se deja de formar para predominar el complejo binario $Zn_3L(OH)_3^{3+}$.

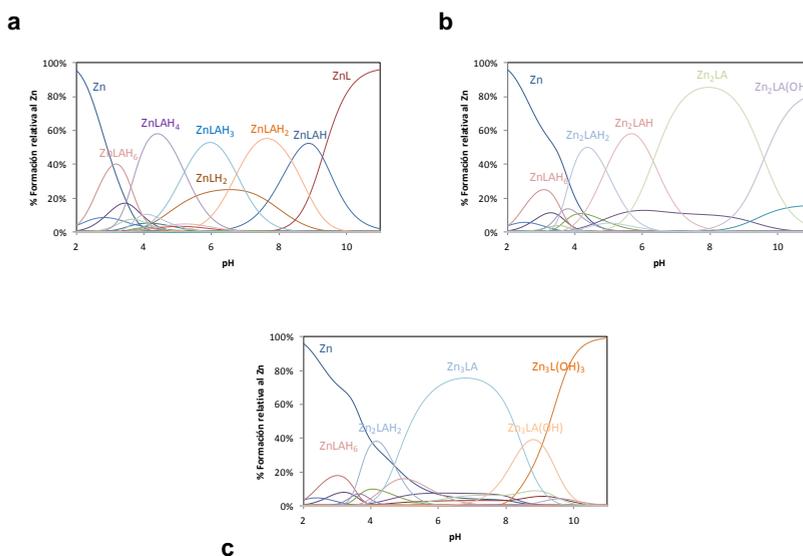


Figura 7.26.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} :L1:ATP frente al pH con relaciones molares M:L:A 1:1:1 (a), 2:1:1 (b) y 3:1:1 (c) respectivamente.

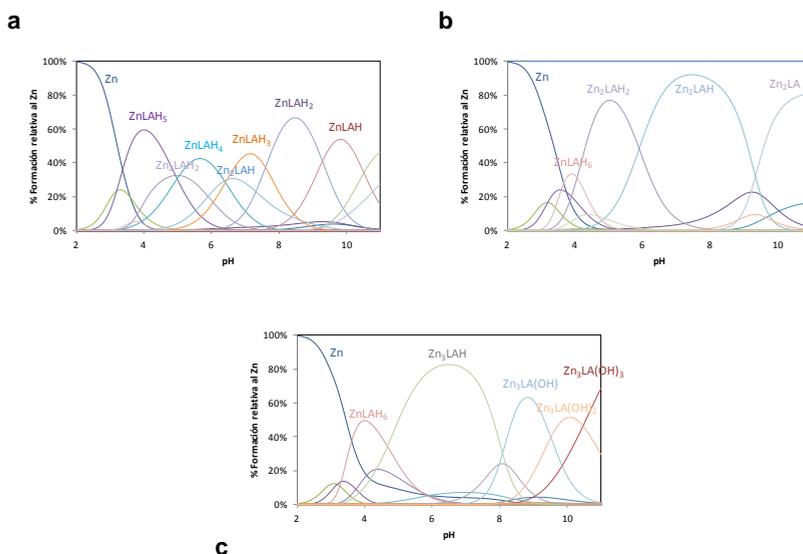


Figura 7.27.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} :L2:ATP frente al pH con relaciones molares M:L:A 1:1:1 (a), 2:1:1 (b) y 3:1:1 (c) respectivamente.

Con respecto a los complejos con TPP se observan los mismos efectos que con el ATP, se forman especies ternarias mono- bi- y trinucleares dependiendo de la relación molar utilizada a partir de $pH = 3.0$. También, a valores de pH altos se forman especies hidroxiladas (figuras 7.44 y 7.45).

La formación de complejos con el anión PPI es ligeramente diferente que los sistemas anteriores. Para L1–PPI se forman únicamente especies ternarias mono- y binucleares. Además, cuando la relación molar es 2:1:1 el anión se disocia formándose el complejo binario $Zn_2L(OH)^{3+}$ a partir de $pH 10.0$ (figura 7.46).

Existe una única diferencia para el sistema ternario del Zn^{2+} :L2:PPi con respecto a los otros aniones, que es el gran nivel de formación del complejo Zn_2HLA , cuando la relación molar es 1:1:1. Este hecho indica la mayor estabilidad de los complejos binucleares para este ligando (figura 7.47a).

La descomposición de las constantes acumuladas en sucesivas para sistemas ternarios es complicada debido a los múltiples equilibrios en disolución. Debido a ello, se ha empleado un método alternativo para comparar la eficiencia de los sistemas Zn^{2+} -L1-A y Zn^{2+} -L2-A para enlazar el anión que consiste en representar los diagramas de distribución para el sistema Zn^{2+} -L1-L2-A en las relaciones molares apropiadas y calcular la cantidad de anión coordinado a los sistemas Zn^{2+} -L1 o Zn^{2+} -L2 en función del pH.

La forma de realizar este cálculo es introducir en el programa HYSS⁸ todas las constantes de protonación de los ligandos y anión, de la coordinación del metal con los ligandos y anión, de la interacción entre los ligandos con el anión y, por último, la interacción del metal con los ligandos y el anión. Tras introducir todas las constantes en el modelo, representamos el diagrama de distribución de las especies formadas y calculamos el porcentaje de anión coordinado para los sistemas ternarios Zn^{2+} -L1-A y Zn^{2+} -L2-A y binarios con L1-A y L2-A frente al pH

En la figura 7.28 se muestran estas representaciones para los sistemas Zn^{2+} :L1:L2:ATP en relaciones molares 2:1:1:1, 4:1:1:1 y 6:1:1:1. Cuando la relación molar M:L1:L2:A del sistema es 2:1:1:1 predomina el complejo binario L2-ATP a valores de pH menores de 3.0 (figura 7.28a). Sin embargo, a partir de pH 3 predomina el complejo ternario Zn^{2+} -L2-ATP. El mismo hecho sucede al aumentar la relación molar de 2:1:1:1 a 4:1:1:1, donde únicamente se diferencian a valores de pH superiores a 8.0 porque comienza a predominar el complejo ternario Zn^{2+} :L1:ATP (figura 7.26b). Por último, el nivel de complejación del ATP al aumentar la relación molar hasta 6:1:1:1 es muy similar a la relación 4:1:1:1, sin embargo, el complejo ternario de L1 nunca predomina en disolución a valores de pH mayores de 10.0 (figura 7.26 c).

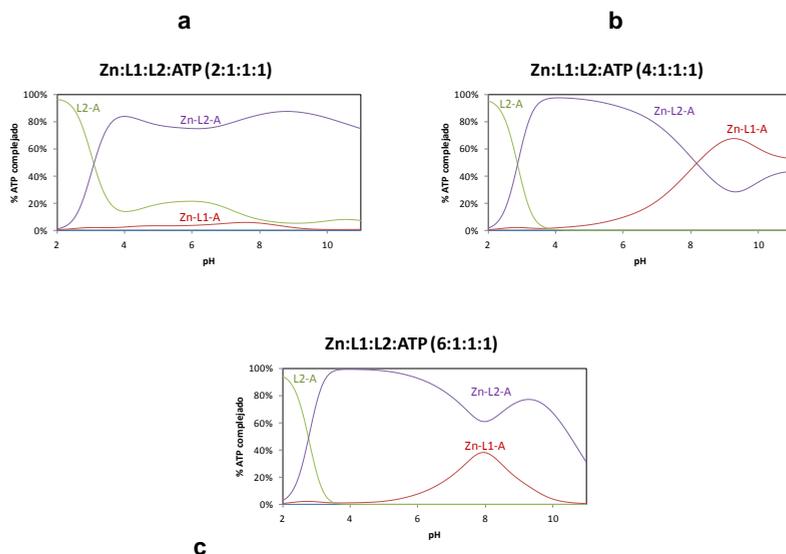


Figura 7.28.-Representación gráfica de los porcentajes de ATP complejoado por **L1**, **L2**, $\text{Zn}^{2+}\text{:L1}$ y $\text{Zn}^{2+}\text{:L2}$ frente al pH calculados a partir del diagrama de distribución de especies de $\text{Zn}^{2+}\text{:L1:L2:ATP}$ para concentraciones $[\text{L1}] = [\text{L2}] = [\text{ATP}] = 1 \times 10^{-3}$ M. (a) $[\text{Zn}^{2+}] = 2 \times 10^{-3}$ M, (b) $[\text{Zn}^{2+}] = 4 \times 10^{-3}$ M y (c) $[\text{Zn}^{2+}] = 6 \times 10^{-3}$ M.

El grado de complejación del TPP para las distintas relaciones molares se muestra en la figura 7.29 e indica un comportamiento muy similar para cualquier relación molar. El complejo binario $\text{Zn}^{2+}\text{-L2}$ predomina hasta pH 3.0 y por encima de este pH y hasta 11 predominan los complejos ternarios $\text{Zn}^{2+}\text{-L2-TPP}$. Estos resultados confirman que tanto **L2** como su forma complejada con Zn^{2+} muestra mayor afinidad por los aniones ATP y TPP que el ligando **L1** y su complejo metálico.

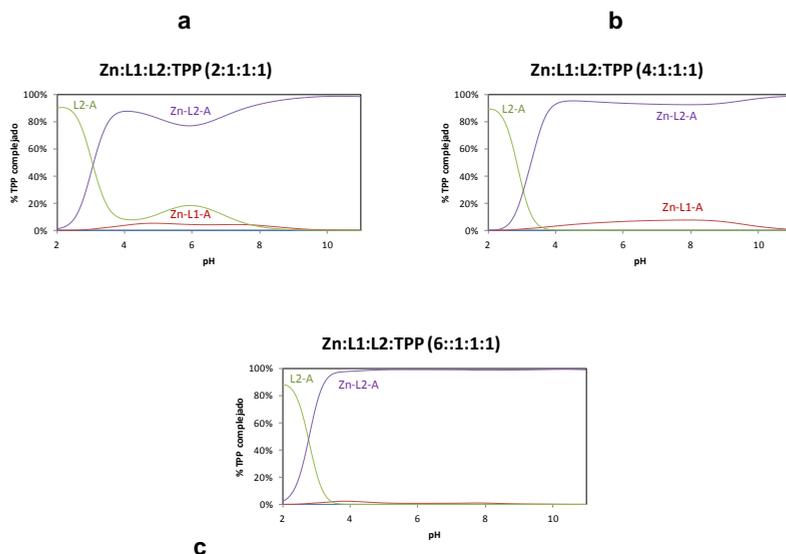


Figura 7.29.-Representación gráfica de los porcentajes de TPP complejoado por **L1**, **L2**, Zn^{2+} :**L1** y Zn^{2+} :**L2** frente al pH calculados a partir del diagrama de distribución de especies de Zn^{2+} :**L1**:**L2**:TPP para concentraciones $[L1] = [L2] = [TPP] = 1 \times 10^{-3}$ M. (a) $[Zn^{2+}] = 2 \times 10^{-3}$ M, (b) $[Zn^{2+}] = 4 \times 10^{-3}$ M y (c) $[Zn^{2+}] = 6 \times 10^{-3}$ M.

Con respecto al anión PPI, los diagramas de distribución de los sistemas ternarios para las relaciones molares **M:L1:L2:A** 4:1:1:1 y 6:1:1:1 (figuras 7.30 b y c) son similares al caso del TPP. Sin embargo para una relación 2:1:1:1 hay una diferencia con respecto al anión TPP. La especie binaria **A-L2** predomina por debajo de pH 3.0, donde comienza a predominar la especie ternaria Zn^{2+} -**L2-A**. Sin embargo, las especies binarias vuelven a predominar desde pH 6.0 hasta 8.0. Este hecho indica que el pirofosfato forma especies más estables a valores de pH neutro debido a una posible maximización de las interacciones electrostáticas en ese intervalo de pH.

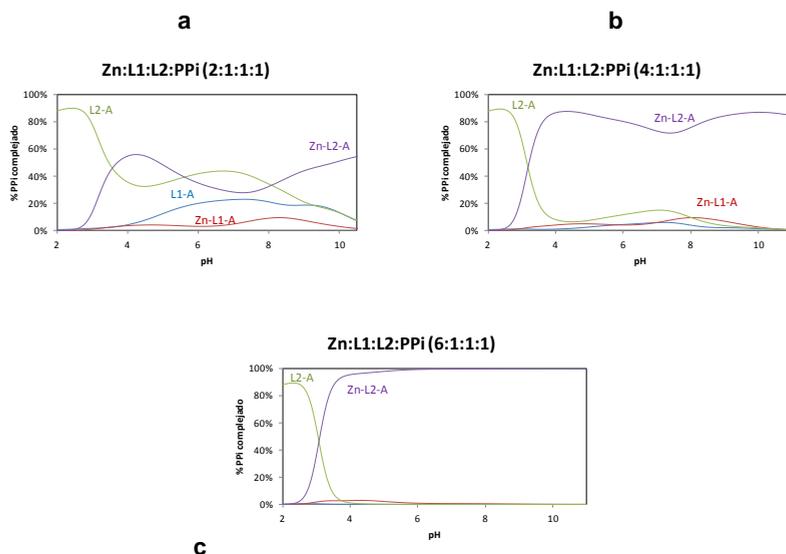


Figura 7.30.-Representación gráfica de los porcentajes de PPI complejoado por **L1**, **L2**, Zn^{2+} :**L1** y Zn^{2+} :**L2** frente al pH calculados a partir del diagrama de distribución de especies de Zn^{2+} :**L1**:**L2**:PPi para concentraciones $[L1] = [L2] = [PPi] = 1 \times 10^{-3}$ M. (a) $[Zn^{2+}] = 2 \times 10^{-3}$ M, (b) $[Zn^{2+}] = 4 \times 10^{-3}$ M y (c) $[Zn^{2+}] = 6 \times 10^{-3}$ M.

Existe otra cuestión a resolver sobre si la introducción del ión metálico produce un mayor grado de complejación de los aniones cuando los sistemas se comparan con los respectivos sistemas sin metal. Para ello, se han representado el % de anión complejoado en la ausencia del ión metálico y en presencia de uno, dos y tres equivalentes del ión metálico zinc para cada ligando.

En la figura 7.31 se muestra esta representación para la interacción del ATP con ambos ligandos, en primer lugar a valores de pH ácidos no se forman complejos con ATP para ningún sistema. En ambos ligandos, las especies binarias y las ternarias con relación 2:1:1 y 3:1:1 tienen una complejación similar hasta pH 8.0. También se produce un aumento en la complejación al pasar de un equivalente metálico a dos o tres equivalentes. En la mayoría de sistemas se disminuyen su nivel de complejación a valores

de pH mayores de 8, aunque el sistema de **L1** con relación 3:1:1 mantiene su complejación en este rango de pH.

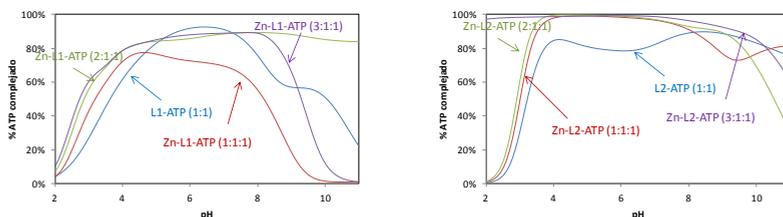


Figura 7.31.-Representación de la cantidad total de ATP complejo en los sistemas binarios y ternarios de **L1** (izda) y **L2** (dcha)

Para los sistemas con TPP (figura 7.48) ambos ligandos tienen un comportamiento similar al ATP. A valores de pH ácidos no se forman complejos, la complejación aumenta a partir de pH 3.0 y el nivel de complejación es superior. El aumentar en número de equivalente metálicos se mantiene constante el nivel de complejación entre valores de pH 4.0 y 9.0. A valores de pH por encima de 9, para **L1** todos los sistemas bajan su nivel de complejación de anión. En el caso de **L2** no todos los sistemas disminuyen su complejación, los sistemas binarios y ternarios con relación 1:1:1 y 2:1:1 todavía forman especies con TPP hasta pH 11.

Para el PPI se observa en la figura 7.49 como para **L1** el sistema binario predomina sobre los sistemas ternarios. Sin embargo, para **L2** los complejos ternarios con relaciones molares 2:1:1 y 3:1:1 se forman en mayor extensión que los complejos binarios y que el ternario con relación 1:1:1.

Estos resultados apoyan otra vez los altos números de coordinación deducidos para la especiación de los complejos con zinc. En los sistemas binarios en relación molar M:L 1:1 y 2:1, los iones metálicos tienen totalmente ocupada su esfera de coordinación, lo que resulta difícil para el anión coordinar el metal. Únicamente los sistemas ternarios M-L-A en relación molar M:L:A 2:1:1 y 3:1:1 complejan una cantidad de especies aniónicas ligeramente superior que para el sistema ternario M:L:A en relación molar

1:1:1 o para el sistema binario L-A. Este hecho indica que el ligando no tiene suficientes átomos de nitrógeno para saturar la esfera de coordinación del segundo y tercer metal y, posibilitando así, un enlace coordinativo con el anión.

7.4.2.- Estudio por fluorescencia de la interacción del sistema binuclear Zn_2L2^{4+} con nucleótidos

Se ha determinado la interacción de los nucleótidos y los aniones fosfatos con el complejo bimetalico de zinc de **L2** (Zn_2L2^{4+}) a pH fisiológico (pH = 7.4). Los estudios de coordinación de zinc con **L2** muestran como el ligando compleja cuantitativamente los dos iones metálicos dentro de un intervalo de pH desde 5.0 hasta 8.0 y posee una fluorescencia intrínseca haciéndolo idóneo para medir su interacción con aniones mediante valoraciones fluorimétricas. Entre los iones seleccionados se han escogido los trifosfatos de los nucleótidos de adenina (ATP), guanosina (GTP), citosina (CTP) y uracilo (UTP), los difosfatos de los mismos nucleótidos (ADP, GDP, CDP y UDP), TPP, PPI y el fosfato (Pi).

La adición de cualquier anión al complejo Zn_2L2^{4+} produce una disminución de la fluorescencia. En la figura 7.32 se muestra la variación de la fluorescencia en la valoración del complejo Zn_2L2^{4+} con ATP. Asimismo, en la grafica interior de la figura 7.32 se muestra la intensidad de fluorescencia a un λ de 369 nm con respecto a la relación molar ATP: Zn_2L2^{4+} y se logra apreciar como con relaciones molares altas se satura la emisión de fluorescencia.

En la figura 7.33 se muestra la diferencia entre la fluorescencia máxima al inicio de la valoración y la mínima obtenida al finalizar la valoración (el punto donde no hay más cambios de fluorescencia). Se observa como la variación es mayor para los fosfatos y nucleótidos con bases púricas que los nucleótidos con bases pirimidínicas. Al comparar, los nucleótidos de bases púricas con la misma cadena fosfatada no hay diferencia entre ambos, por ejemplo ATP y GTP o ADP y GDP, y el mismo hecho sucede con los nucleótidos de bases pirimidínicas entre ellos. La disminución de fluorescencia del complejo bimetalico por la interacción con aniones será

probablemente debido a la transferencia electrónica entre las unidades aromáticas de las moléculas (para el ligando la fenantrolina y para los nucleótidos las nucleobases A, G, C y U).^{20c,25} Como está descrito en la literatura, la mayor variación para los nucleótidos con bases púricas es debido a una mejor transferencia asociada a las superficies aromáticas más extensas que las correspondientes a las bases pirimidínicas.

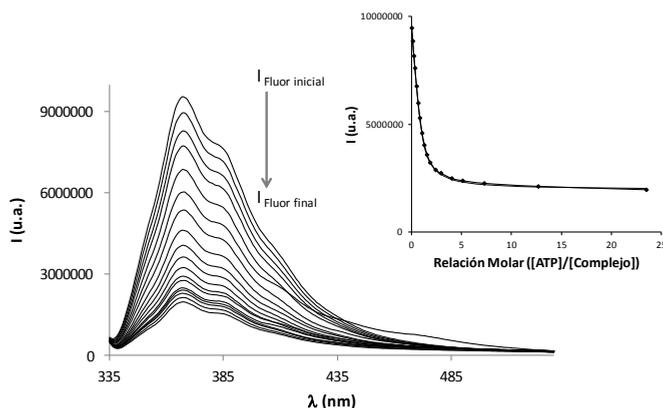


Figura 7.32.- Variación de los espectros de emisión de fluorescencia del complejo $Zn_2L_2^{4+}$ en función de la relación molar $[ATP]:[Zn_2L_2^{4+}]$ a pH = 7.4. El gráfico interior indica el máximo de la intensidad de fluorescencia a 369 nm en función de la relación molar $[ATP]:[Zn_2L_2^{4+}]$ a pH = 7.4.

Entre los nucleótidos con la misma base y diferentes cadenas fosfatadas se observa como para los nucleótidos con pirimidinas la disminución de la cadena, y por lo tanto de la carga, provoca una variación considerable de la disminución de la fluorescencia mientras que para los derivados de purina no hay tal variación entre los tri- y difosfatos aunque si se hay un ligero descenso entre el ATP/ADP y el AMP. Este hecho indica que la cadena fosfatada influye en menor medida en el caso de los aniones de purina a la hora de formar el complejo y adoptar la conformación adecuada para producirse una transferencia electrónica adecuada que produce una disminución de la fluorescencia que en el caso de los aniones de pirimidina.

El grupo de fosfato y polifosfatos indica otra secuencia de interacción, $\text{PPi} > \text{TPP} > \text{Pi}$, la variación entre ellos es considerable y el PPi interacciona mejor que el TPP . Al no poseer grupos aromáticos, la interacción que produce la reducción de la fluorescencia puede asociarse a un proceso de retirada de carga electrónica al complejo metálico al coordinar el anión los centros metálicos.²⁶

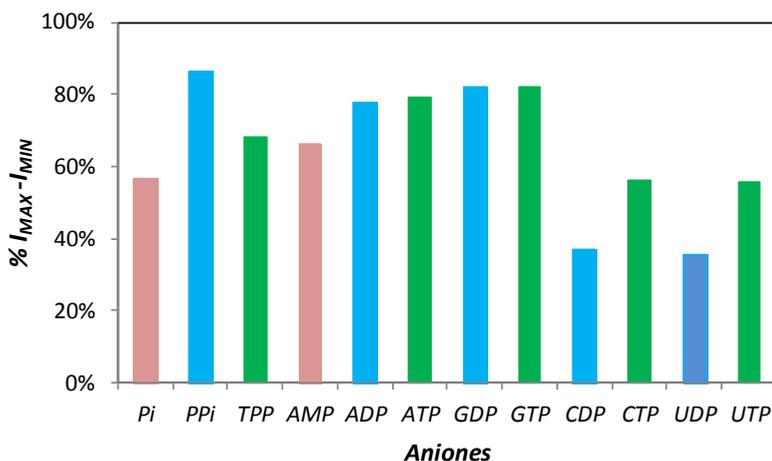


Figura 7.33.—Representación del % de disminución de la fluorescencia frente a la nucleobase seleccionada y el n° de grupos fosfatos para la interacción de los aniones con el complejo $\text{Zn}_2\text{L}_2^{4+}$.

En la tabla 7.10 mostramos la variación de fluorescencia anterior y las constantes de estabilidad a pH 7.4. Las constantes muestran como el anión más estable es el PPi , tras él tenemos el TPP , GTP y UTP y la serie se continua con $\text{ATP} > \text{GDP} > \text{CTP} > \text{CDP} > \text{ADP} > \text{UDP} > \text{Pi}$. Esta serie indica que el complejo ternario más estable se forma con el PPi y TPP , que no poseen nucleobase, y tras ellos, los nucleótidos trifosfato y finalmente, los difosfatos. La diferencia entre tri- y difosfatos indica que la mayor carga de los trifosfatos produce una mayor interacción con el complejo metálico y adopta una conformación que mejora la transferencia electrónica entre superficies aromáticas.

Tabla 7.10.- Logaritmos de las constantes estabilidad y la diferencia de variación de fluorescencia a pH 7.4 para la interacción de los aniones con el complejo Zn_2L2^{4+} determinadas en 0.15 M de NaCl a 298 K.

	Pi	PPi	TPP	AMP	ADP	ATP
log K	4.77	6.81	6.51	4.35	5.51	5.96
$I_{MAX}-I_{MIN}$ (%)	56.6	86.3	68.3	66.0	77.8	79.2
	GDP	GTP	UDP	UTP	CDP	CTP
log K	5.87	6.48	5.15	6.27	5.59	5.77
$I_{MAX}-I_{MIN}$ (%)	82.0	82.1	35.3	55.7	37.2	56.4

7.5.- Apéndice capítulo 7: tablas y figuras adicionales.

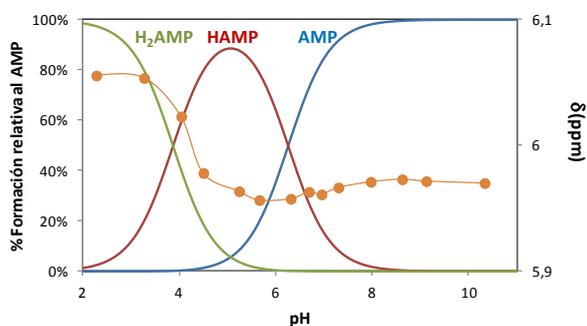


Figura 7.34.- Diagrama de distribución de las especies del AMP con el desplazamiento químico de la señal $\bullet H_{R1}$ a varios valores de pH.

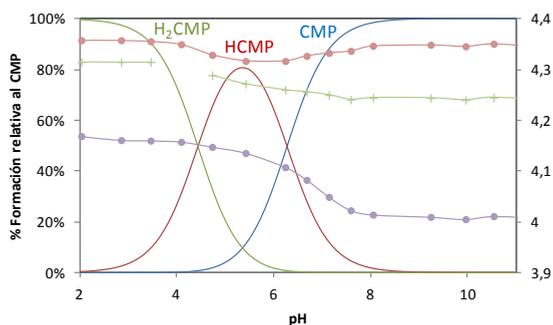


Figura 7.35.- Diagrama de distribución de las especies del CMP con los desplazamientos químicos de las señales es ●H_{R3}, +H_{R4} y ●H_{R5} a varios valores de pD.

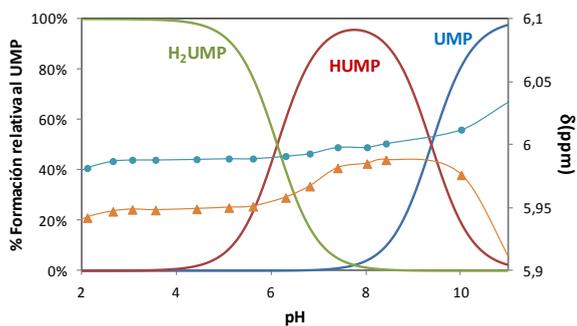


Figura 7.36.- Diagrama de distribución de las especies del UMP con los desplazamientos químicos de ¹H RMN de sus espectros en D₂O a varios valores de pD.

La asignación de las señales es ▲H_{U5} y ●H_{R1}.

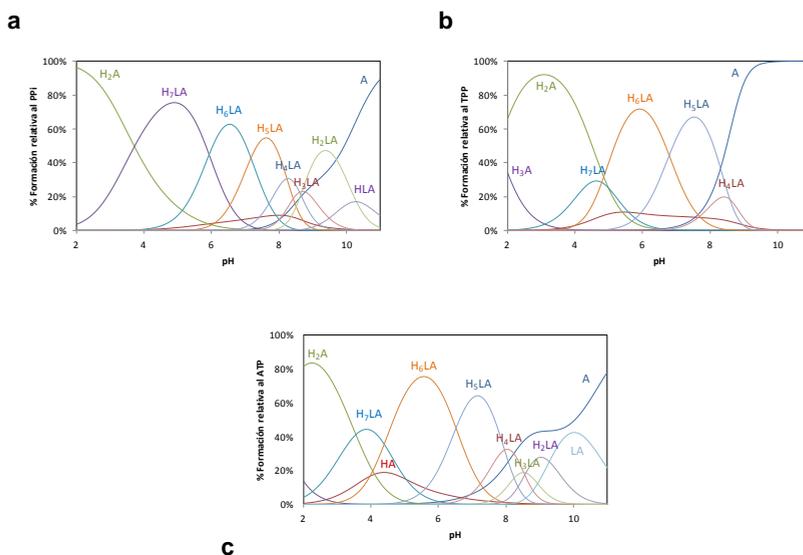


Figura 7.37.- Diagramas de distribución de especies para las diferentes sistemas binarios del ligando **L1** con el PPI (a), TPP (b) y el ATP (c).

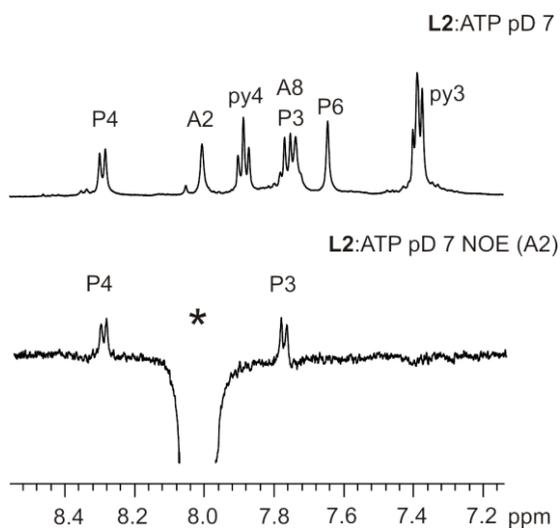


Figura 7.38.- Experimento ^1D RMN NOE selectivo para el sistema **L2**-ATP a pD = 7.0 excitando $\text{H}_{\text{A}2}$ (*) con un tiempo de mezcla de 700 ms.

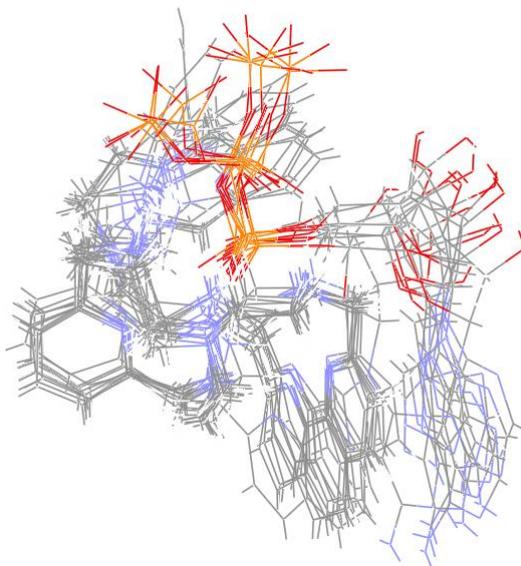


Figura 7.39.- Familia de los 10 conformeros de mínima energía calculados para la interacción de H_6L1^{6+} y ATP.

Interacción con nucleótidos y aniones fosfato

Tabla 7.11.- Logaritmos de las constantes globales o acumuladas para la formación de los complejos binarios de **L2** con AMP, GMP, CMP, UMP, PPi, TPP y ATP calculadas mediante potenciometría a 0.15 M de NaCl y 298.1 ± 0.1 K.

Reacción ^a	AMP	GMP	CMP	UMP	PPi	TPP	ATP
H + L + A ⇌ HLA		13.91(7) ^b	13.52(2)	13.1(1)	13.3(1)		14.56(3)
2H + L + A ⇌ H ₂ LA		23.10(7)	23.34(1)	23.19(4)	23.42(4)	23.94(1)	24.79(2)
3H + L + A ⇌ H ₃ LA		32.79(8)	32.33(2)	32.48(9)	32.63(5)	32.81(3)	34.06(2)
4H + L + A ⇌ H ₄ LA	39.39(7)	41.39(7)	40.70(2)	41.49(5)	41.46(3)	41.92(1)	42.73(2)
5H + L + A ⇌ H ₅ LA	47.17(2)	49.65(7)	47.93(2)	49.87(5)	49.62(4)	49.91(2)	50.53(2)
6H + L + A ⇌ H ₆ LA	53.62(2)	57.09(4)	54.20(2)	57.17(5)	57.21(3)	57.52(2)	58.01(2)
7H + L + A ⇌ H ₇ LA	58.88(3)	63.65(4)	59.87(2)	63.45(5)	63.62(3)	63.81(2)	63.34(3)
8H + L + A ⇌ H ₈ LA		68.75(5)	63.99(3)	69.05(6)	68.98(4)	68.21(3)	67.04(3)

^a Las cargas se omiten para simplificar. ^b Los números entre paréntesis indican la desviación estándar de la última cifra significativa.

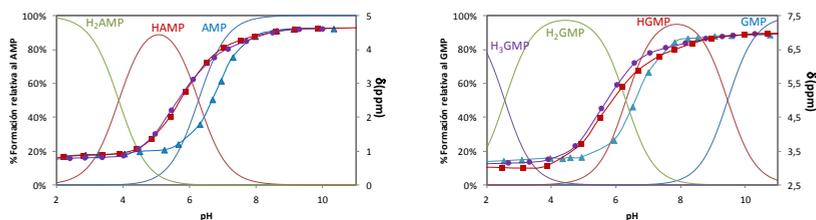


Figura 7.40.- Representación de los δ (ppm) de ^{31}P RMN de la señal P_{α} (▲) de los mononucleótidos (AMP, GMP, CMP y UMP) y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos L1 (■) y L2 (●) a lo largo del pH junto con el diagrama de distribución des especies para el AMP (izda) y GMP (dcha).

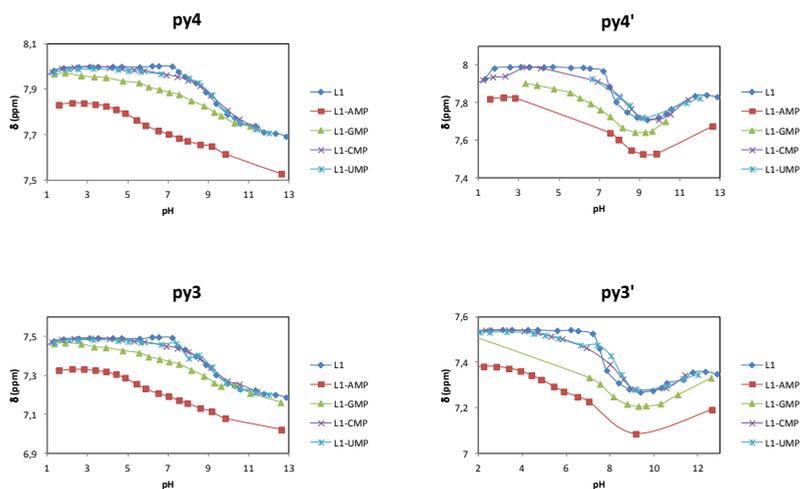


Figura 7.41.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de las señales aromáticas del ligando L1 ($\text{H}_{\text{py}3}$, $\text{H}_{\text{py}4}$, $\text{H}_{\text{py}3'}$ y $\text{H}_{\text{py}4'}$) y de los complejos formados con cada mononucleótido a lo largo del pH.

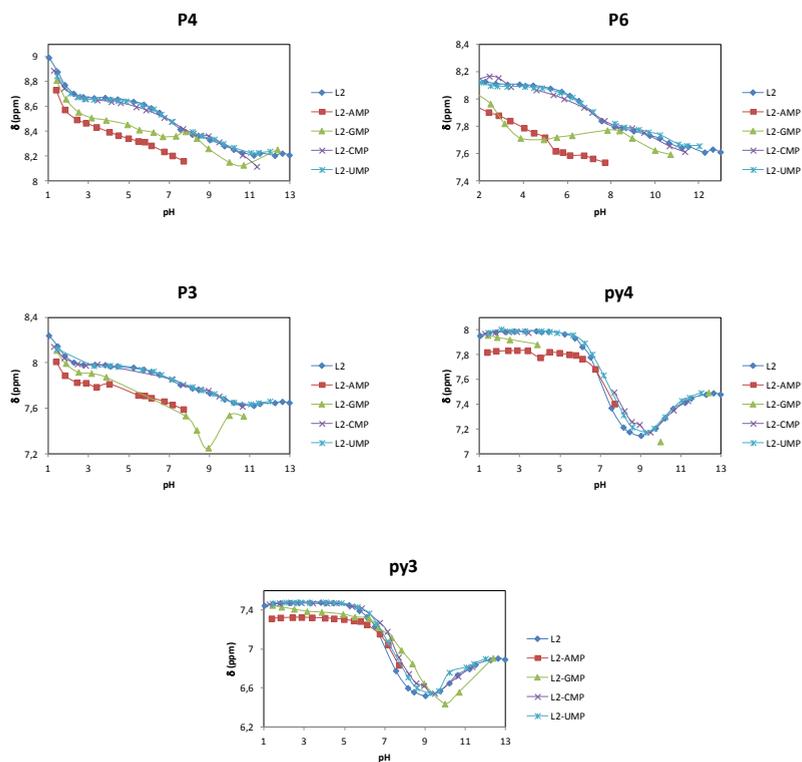


Figura 7.42.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de las señales aromáticas del ligando L2 ($\text{H}_{\text{py}3}$, $\text{H}_{\text{py}4}$, $\text{H}_{\text{P}3}$, $\text{H}_{\text{P}4}$ y $\text{H}_{\text{P}6}$) y de los complejos formados con cada mononucleótido a lo largo del pH.

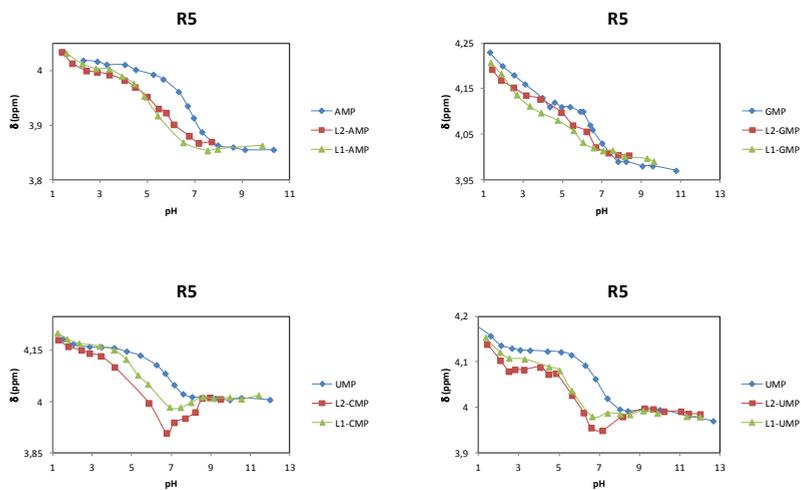


Figura 7.43.- Representación de los δ (ppm) de ^1H RMN de la señal (H_{R5}) de los mononucleótidos (AMP, GMP, CMP y UMP) y de los complejos formados para cada mononucleótido con los ligandos L1 y L2 a lo largo del pH.

Interacción con nucleótidos y aniones fosfato

Tabla 7.12.- $\Delta\delta$ (ppm) de las señales de ^1H RMN de los complejos de **L1** y **L2** con respecto a los mononucleótidos, los ligandos y los nucleótidos libres a pD = 7.0.

	L1:AMP	L2:AMP	L1:GMP	L2:GMP	L1:CMP	L2:CMP	L1:UMP	L2:UMP
R1	0,14 ^a	0,54	0,15	0,68	0,17	0,51	0,11	0,40
R3	0,10	0,18	0,15		0,08	0,29	0,13	0,25
R4	0,07	0,13	0,06		0,12	0,26		
R5	0,03	0,02	0,02	0,05	0,07	0,17	0,08	0,11
A2	0,13	0,48						
A8	0,12	0,47						
G8			0,13	0,40				
C5					0,15	0,06		
C6					0,28			
U5							0,14	0,49
U6							0,17	0,42
py4	0,30	0,10	0,12		0,04		0,04	-0,02
py3	0,30	0,08	0,12	0,01	0,04	-0,04	0,04	-0,03
py4'			0,21		0,06		0,06	
py3'	0,30		0,19		0,06		0,06	
P3		0,24				0,04		0,00
P4		0,31		0,19		0,04		0,02
P6		0,40				0,05		0,19
1	0,05	-0,01	0,05	-0,01	0,27	0,11	0,11	0,02
9	0,024	0,14	0,14	0,43	0,05	0,03	0,08	-0,01
3	0,251	0,162	0,073	0,007	0,041	0,01	0,04	-0,004

Interacción con nucleótidos y aniones fosfato

4	0,272	0,1335	0,069	-0,093	0,047	-0,015	0,057	-0,012
6		0,125	0,055	-0,039	0,018	-0,015	0,035	-0,02
7	0,224	0,098	0,062	-0,156	0,046	-0,033	0,078	-0,021

^aLa magnitud de la señales se mide en ppm y el valor positivo (+) indica un desplazamiento hacia campo alto mientras que un valor negativo (-) hacia campo bajo

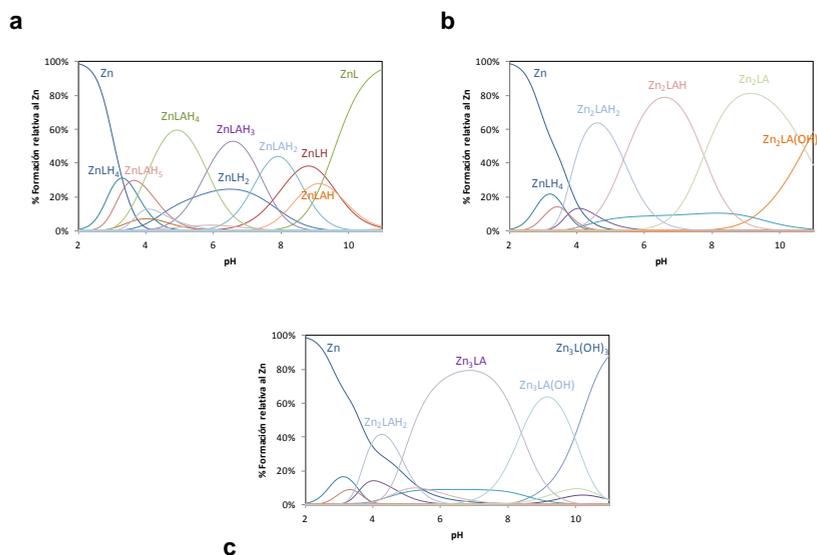


Figura 7.44.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} :L1:TPP frente al pH con relaciones molares M:L:A 1:1:1 (a), 2:1:1 (b) y 3:1:1 (c) respectivamente.

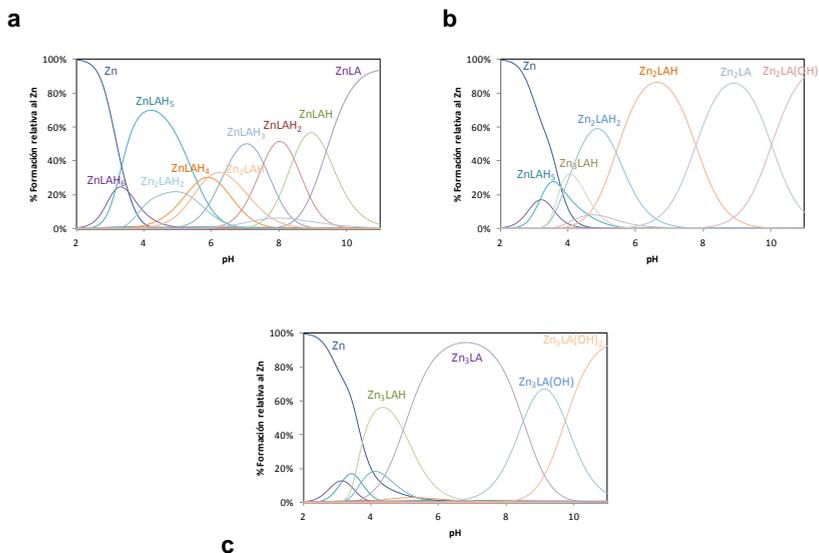


Figura 7.45.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} :L2:TPP frente al pH con relaciones molares M:L:A 1:1:1 (a), 2:1:1 (b) y 3:1:1 (c) respectivamente

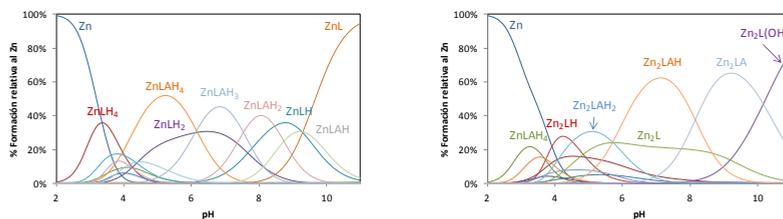


Figura 7.46.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn^{2+} :L1:PPi frente al pH con relaciones molares M:L:A 1:1:1 (izda) y 2:1:1 (dcha).

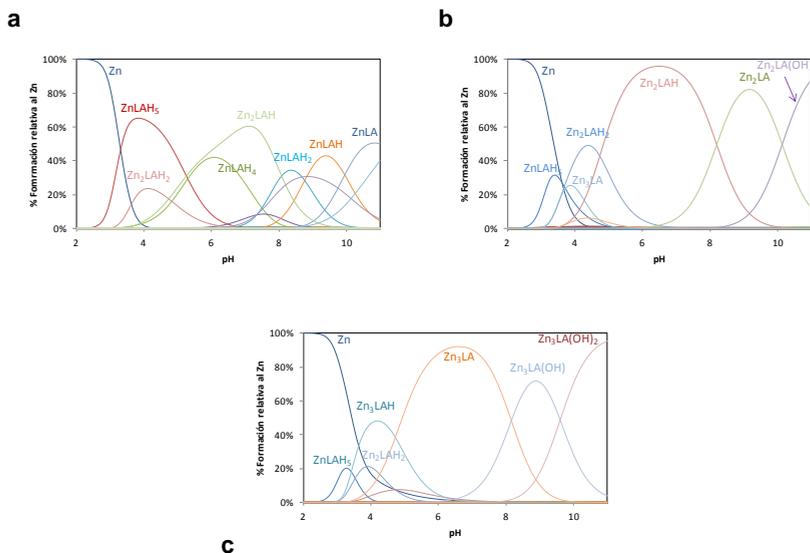


Figura 7.47.- Diagramas de distribución de especies para el sistema Zn²⁺:L2:PPi frente al pH con relaciones molares M:L: A 1:1:1 (a), 2:1:1 (b) y 3:1:1 (c) respectivamente.

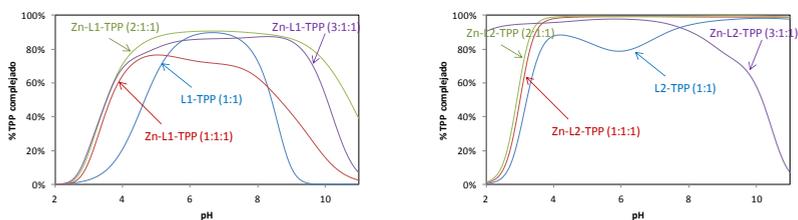


Figura 7.48.-Representación de la cantidad total de TPP complejoado en los sistemas binarios y ternarios de L1 (izda) y L2 (dcha)

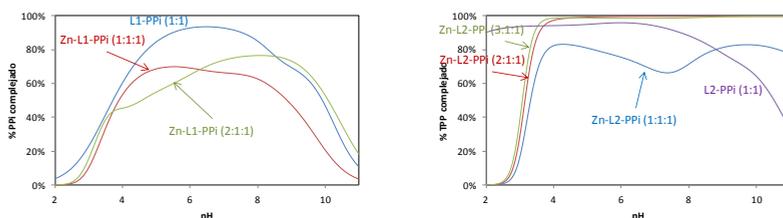


Figura 7.49.-Representación de la cantidad total de PPI complejo en los sistemas binarios y ternarios de L1 (izda) y L2 (dcha)

1 a) J. -M. Lehn, *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives*, VCH, Weinheim, 1995; b) H. J. Schneider, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2000; c) *Supramolecular Chemistry of Anions*, ed. A. Bianchi, K. Bowman- James y E. García-España, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 1997; d) J. L. Sessler, P. A. Gale y W. S. Cho, *Anion Receptor Chemistry*, RSC Publishing, Cambridge, UK, 2006; e) C. Caltagirone y P. A. Gale, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 520; (f) J. W. Steed, *Chem. Soc. Rev.*, 2009, **38**, 506; (g) S. Kubik, C. Reyheller y S. Stuwe, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2005, **52**, 137; (h) H. J. Schneider y A. K. Yatsimirsky, *Chem. Soc. Rev.*, 2008, **37**, 263; (i) K. Bowman-James, A. Bianchi y E. García-España *Anion Coordination Chemistry*, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2012.

2 C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.*, 1967, **89**, 7017.

3 C. H. Park y H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.*, 1968, **90**, 2431.

4 a) T. E. Devlin, *Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th Edition, John Wiley & Sons, 2004; b) M. Vallet, J. Faus, E. García-España y J. Moratal, *Introducción a la Química Bioinorgánica*, ed. Síntesis, 2003.

5 a) A. E. Hargrove, S. Nieto, T. Zhang, J. L. Sessler y E. V. Anslyn, *Chem. Rev.*, 2011, **111**, 6603; b) E. García-España, A. Bianchi, J. González, R. Belda y J. Pitarch, "Receptors for Nucleotides" in "Supramolecular

Chemistry: From Molecules to Nanomaterials”, ed. P. A. Gale y J. W. Steed, John Wiley & Sons: New York, 2011.

6 A. Bencini, A. Bianchi, E. García-España, E. C. Scott, L. Morales, B. Wang, T. Deffo, F. Takusagawa, M. P. Mertes, K. Bowman y P. Paoletti, *Biorganic. Chem.*, 1992, **20** (1), 8.

7 a) A. Andrés, J. Aragón, A. Bencini, A. Bianchi, A. Domenech, V. Fusi, Vieri, E. Garcia-España, P. Paoletti y J. A. Ramirez, *Inorg. Chem.*, 1993, **32** (16), 3418; b) M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España y S. V. Luis, *Org. Biomol. Chem.*, 2004, **2** (6), 816.

8 P. Gans, *Program to determine the distribution of species in multiequilibria systems from the stability constants and mass balance equations.*

9 a) J. A. Aguilar, E. García-España, J. A. Guerrero, S. V. Luis, J. M. Llinares, J. F. Miravet, J. A. Ramirez y C. Soriano, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1995, **21**, 2237; b) J. A. Aguilar, E. García-España, J. A. Guerrero, S. V. Luis, J. M. Llinares, J. A. Ramirez y C. Soriano, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **246** (1-2), 287.

10 J. L. Oscarson, P. Wang, S. E. Gillespie, R. M. Izatt, G. D. Watt, C. D. Larsen y J. A. R. Renuncio, *Journal of Solution Chemistry*, 1995, **24** (2), 171.

11 a). M. A. Kurinovich y J. K. Lee, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 6258; b) M. D. Laudo, S. R. Whittleton y S. D. Wetmore, *J. Phys. Chem. A*, 2003, **107**, 10406.

12 a) G. Kampf, L. E. Kapinos, R. Griesser, B. Lippert y H. Sigel, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2002, 1320; b) R. B. Martin y Y. H. Mariam, *Met. Ions Biol. Syst.*, 1979, **8**, 57; c) R. L. Benoit y M. Fréchette, *Can. J. Chem.*, 1984, **62**, 995.

13 (a) H. A. Arab, Z. M. Anwar y M. Sokar, *J. Chem. Eng. Data*, 2004, **49**, 256; b) Y. Kinjo, R. Tribolet, N. A. Corfù y H. Siegel, *Inorg. Chem.*, 1989, **28**, 1480; c) Y. Kinjo, L. -N. Ji, N. A. Corfù y H. Siegel, *Inorg. Chem.*, 1992, **31**, 5588.

14 H. Siegel, *Pure Appl. Chem.*, 2004, **76** (10), 1869

- 15 B. Knobloch, C. P. da Costa, W. Linert y H. Siegel, *Inorg. Chem. Commun.*, 2003, **6**, 90.
- 16 a) C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, S. Sabatini, M. S. Moruzzi y A. Vacca, *Anal. Biochem.*, 1995, **231**, 374; b) C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca y S. Ghelli, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 1041; c) L. Alderighi, A. Bianchi, L. Biondi, L. Calabi, M. D. Miranda, P. Gans, S. Ghelli, P. Losi, L. Paleari, A. Sabatini y A. Vacca, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1999, 2741; d) C. Frassinetti, L. Alderighi, P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca y S. Ghelli, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 1041.
- 17 S. Licht y I. Lee, *Biochemistry*, 2008, **47** (12), 3595.
- 18 Z. Zeng, A. J. Torriero, A. M. Bond y L. Spiccia, *Chem. Eur. J.*, 2010, **16**, 9154.
- 19 a) E. Kimura, M. Kodama y T. Yatsunami, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 3182; b) B. Dietrich, M. W. Hosseini y J. –M. Lehn y S. B. Sessions, *J. Am. Chem. Soc.*, 1981, **103**, 1282; c) M. T. Albelda, E. García-España, H. R. Jimenez, J. M. Llinares, C. Soriano, A. Sornosa-Ten y B. Verdejo, *Dalton Trans.*, 2006, 4474.
- 20 a) K. G. Raganathan y H. –J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1996, 2597; b) M. –P. Teulade-Fichou, J. –P. Vigneron y J. –M. Lehn, *Supramol. Chem.*, 1995, **5**, 139; c) C. Bazzicalupi, A. Bencini, S. Biagini, E. Faggi, S. Meini, C. Giorgi, A. Spepi y B. Valtancoli, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 7349.
- 21 P. Gans, A. Sabatini y A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739.
- 22 a) M. T. Albelda, M. T. Burguete, J. C. Frías, E. García-España, S. V. Luis, J. F. Miravet y M. Querol, *J. Org. Chem.*, 2001, **66** (22), 7505; b) A. Sornosa-Ten, M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España, J. M. Llinares, A. Budimir e I. Piantanida, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8** (11), 2567.
- 23 a) A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham III, C. L. Simmerling, J. Wang, R. E. Duke, R. Luo, K. M. Merz, B. Wang, D. A. Pearlman, M. Crowley, S. Brozell, V. Tsui, H. Gohlke, J. Mongan, V. Hornak, G. Cui, P. Beroza, C.

Schafmeister, J. W. Caldwell, W. S. Ross y P. A. Kollman, *AMBER* 8, 2004, University of California, San Francisco; b) J.Wang, R. M.Wolf, J.W. Caldwell, P. A.Kolman y D. A. Case, *J. Comput. Chem.*, 2004, **25**, 1157.

24 a) L. Rodriguez, J. C. Lima, A. J. Parola, F. Pina, R. Meitz, R. Aucejo, E. García-España, J. M. Llinares, C. Soriano y J. Alarcón, *Inorg. Chem.*, 2008, **47**, 6173; b) A. Ojida, M. Inoue, Y. Mitooka y I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 10184; c) D. H. Lee, J. H. Im, S. U. Son, Y. K. Chung y J. – I. Hong, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 7752.

25 a) Z. Xu, N. J. Singh, J. Lim, J. Pan, H. N. Kim, S. Park, K. S. Kim y J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.*, 2009, **131**, 15528; b) M. Cano, L. Rodriguez, J. C. Lima, F. Pina, A. D. Cort, C. Pasquini y L. Schiaffino, *Inorg. Chem.*, 2009, **48**, 6229.

26 a) A. Ojida, H. Nonaka, Y. Miyahara, S. Tamaru, K. Sada, I. Hamachi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2006, **45**, 5518; b) T. Kohira, K. Onda, A. Ojida y I. Hamachi, *ChemBioChem.*, 2008, **9**, 698.



¡Hemos encontrado el secreto de la vida!

Francis Crick entró gritando esta famosa frase en el pub The Eagle de Cambridge la mañana del 28 de Febrero de 1953, el día en el que con la ayuda de James Dewey Watson, Rosalind Franklin y Maurice Wilkins resolvieron finalmente la estructura tridimensional del DNA.¹

Capítulo 8.- Interacción con ácidos nucleicos

8.1.- Introducción

La presente parte del trabajo se realizó en una estancia en el *Ruđer Bošković Institute* en Zagreb (Croacia) bajo la supervisión del *Dr. Ivo Piantanida*, investigador experto en el campo de la interacción de pequeñas moléculas con biomacromoléculas.

Tras varias hipótesis sobre la estructura del ADN de grandes científicos como Linus Pauling,² fueron James Watson y Francis Crick quienes, tras su artículo en *Nature* titulado "*Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*" publicado el 25 de abril de 1953,³ resolvían la estructura de doble hélice de ADN y dejaban claro el modo en que el ADN se podía desenrollar para que fuera posible su lectura o copia y como se aseguraba la transmisión de los caracteres hereditarios entre células.

El ADN ó ácido desoxirribonucleico es la molécula que contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los seres vivos y de algunos virus. Su análisis estructural nos indica que el ADN es un polímero de unidades simples conectadas entre sí, llamadas nucleótidos.⁴ Como se ha descrito anteriormente, los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de una pentosa, concretamente la desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada. A estos polímeros de nucleótidos se les denomina más comúnmente polinucleótidos o ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se componen mayoritariamente de dos tipos de bases clasificadas como púricas (A y G) y pirimidínicas (T, C y U). El ADN es una molécula bicatenaria, es decir, compuesta por dos cadenas enroscadas de polinucleótidos dispuestas de forma antiparalela y con las bases nitrogenadas enfrentadas formando una doble hélice (ver figuras 8.1 y 8.3).

Una mención especial requiere el ARN, que es un polinucleótido formado por una cadena de ribonucleótidos, presente en las células y el único material genético de ciertos virus. Generalmente, es lineal y de hebra sencilla, aunque en el genoma de algunos virus hay de doble hebra. En los organismos celulares es la molécula encargada de transferir la información del ADN durante la síntesis de proteínas.

En las estructuras tridimensionales del ADN y ARN se pueden distinguir tres niveles, que se describen a continuación:

1. *Estructura primaria*

Se denomina estructura primaria a la estructura química del polinucleótido, es la secuencia de nucleótidos unidos unos a otros mediante enlaces fosfodiéster cargados negativamente. Existen dos importantes diferencias entre el ADN y el ARN; el ADN utiliza la base pirimidínica timina y la pentosa desoxirribosa en su estructura mientras que el ARN utiliza el uracilo en lugar de la timina y la ribosa como pentosa.

Dado que el esqueleto es el mismo para todo el ADN, la información genética se encuentra en la secuencia específica de bases nitrogenadas, cada secuencia presenta un código que determina una información u otra según en orden de las bases.

2. *Estructura secundaria:*

Es el plegamiento regular local que adoptan dos cadenas cercanas de polinucleótidos mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases enfrentadas (Figura 8.1).

El ADN forma una estructura de doble hélice, mientras que el ARN tiene una estructura helicoidal.

En la estructura de doble hélice las dos cadenas son complementarias, uniéndose en el caso del ADN la guanina a la citosina y la adenina a la timina y para el ARN se une la adenina al uracilo siguiendo los apareamientos convencionales de Watson y Crick. Las dos cadenas son también antiparalelas, pues el extremo 3' de una se enfrenta al extremo 5' de la homóloga.

Esta magnífica estructura permite explicar el almacenamiento de la información genética y el mecanismo de duplicación del ADN.

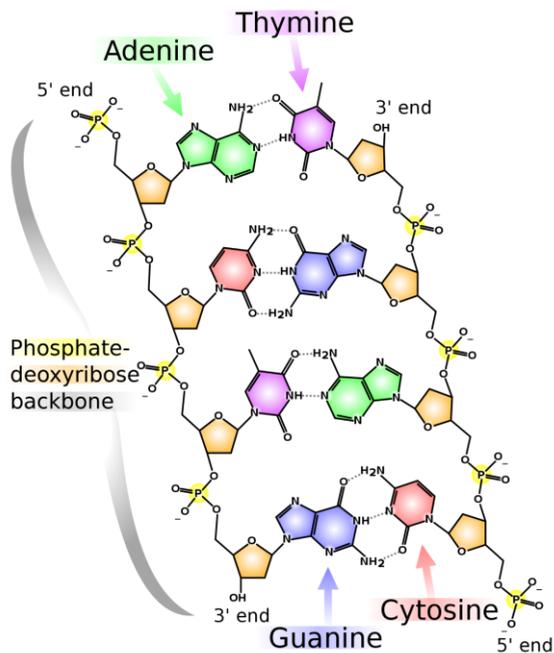


Figure 8.1.- Estructura química del ADN

3. *Estructura terciaria:*

La estructura terciaria se refiere a cómo se almacena el ADN en un espacio reducido para formar los cromosomas. Esta estructura varía según se trate de organismos procariontes o eucariontes. En procariontes y orgánulos celulares como las mitocondrias y los cloroplastos, el ADN se pliega como una súper-hélice, generalmente en forma circular asociada a una pequeña cantidad de proteínas. En eucariontes, dado que la cantidad de ADN de cada cromosoma es muy grande, el empaquetamiento ha de ser más complejo y compacto, para ello se necesita la presencia de proteínas, como las histonas y otras proteínas de naturaleza no histónica (figura 8.2).⁵

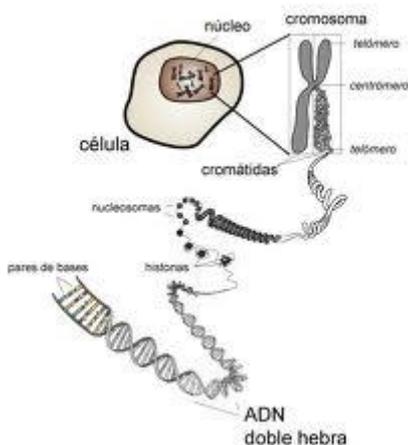


Figura 8.2.- Empaquetamiento y situación del ADN dentro de la célula

8.2.- Características de los polinucleótidos

Los ácidos nucleicos de ADN y ARN pueden adoptar varias conformaciones,⁶ en los organismos vivos se observan mayoritariamente las tres conformaciones de ADN mostradas en la figura 8.3: ADN-A, ADN-B y ADN-Z.

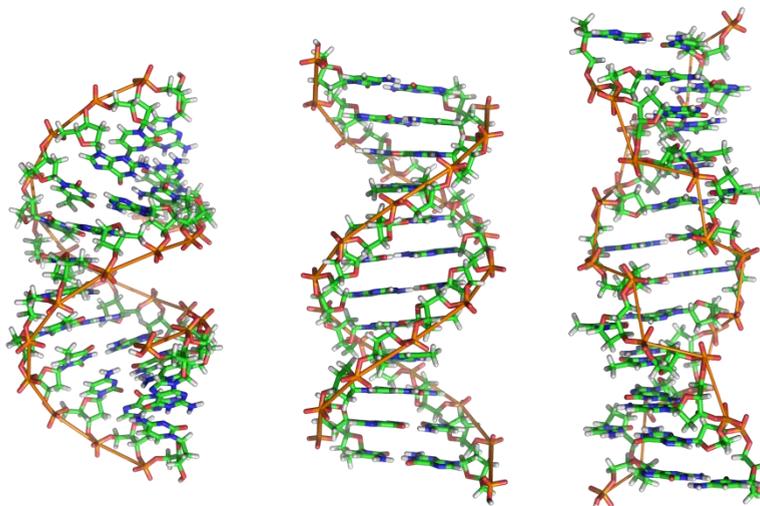


Figura 8.3.- Conformaciones A (izda), B (entro) y Z (dcha) de la estructura del ADN

La conformación que adopta depende de la secuencia, de la cantidad y de la dirección del superenrollamiento que presenta, de la presencia de modificaciones químicas en las bases y de las condiciones de la solución, tales como la concentración de iones metálicos y de poliaminas. De las tres conformaciones, la forma B es la más común en las condiciones existentes en las células.⁷

En la conformación B las dos hebras se enrollan la una sobre la otra formando hendiduras, surcos o huecos entre ellas que dejan accesibles las bases nitrógenadas del interior desde el medio exterior (figura 8.4). Debido a los ángulos formados entre los azúcares de ambas cadenas aparecen dos hendiduras alrededor de la superficie de la doble hélice; una de ellas, la hendidura o surco mayor mide 22 Å de ancho y la hendidura o surco menor mide 12 Å.⁸ Cada vuelta de hélice, cuando ha realizado un giro de 360° mide 34 Å y tiene unos 10.5 pares de bases.

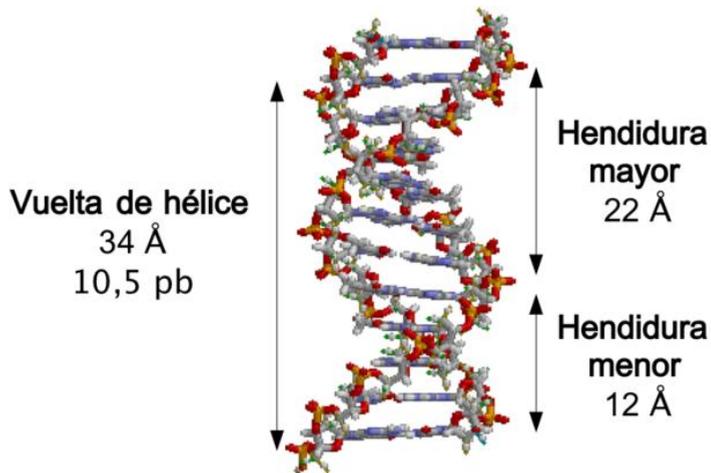


Figura 8.4.- Surcos mayor y menor de la conformación B del ADN

Los extremos de las bases se encuentran accesibles desde el exterior en las hendiduras mayor y menor, facilitando la interacción de moléculas con estas bases expuestas. Asimismo, se podrá reconocer una secuencia del

ácido nucleico expuesta en las hendiduras por parte de diferentes proteínas o moléculas sin necesidad de abrir la doble hélice.

Entre las conformaciones de doble hélice, la forma A es la única que adopta el ARN, es una espiral más amplia que la B que gira hacia derechas, posee un surco mayor muy profundo y estrecho y un surco menor amplio y superficial.

La forma Z es una conformación distinta a las anteriores, donde las dos hebras giran alrededor del eje de la hélice en una espiral levógira. Esta conformación suele aparecer cuando existen segmentos de polinucleótidos en los cuales las bases han sido metiladas.

8.3.- Interacción ligando-polinucleótido

En los últimos años se han desarrollado fármacos que interaccionan con los ácidos nucleicos debido a su importancia como moléculas transportadoras y transferidoras de la información genética. El control sobre esta interacción permite interferir en la transcripción (síntesis de proteínas y expresión genética) y la replicación del ADN y, de esta manera, se puede intervenir en procesos como la división y el crecimiento celular. Este modo de actuación supone, en última instancia, un gran avance en la lucha contra enfermedades como el cáncer.⁹

Existen principalmente tres vías de interacción selectiva de fármacos con el ADN.¹⁰

- En primer lugar, los ligandos pueden interaccionar con las proteínas que se enlazan al ADN, de este modo se obtiene el control de las polimerasas y/o de sus factores de transcripción.
- En segundo lugar, pueden interaccionar con la estructura de triple hélice (llamada también hibridación del ARN) que está formada por el ARN enlazado a la doble hélice de ADN.
- Por último, los fármacos que contienen pequeñas unidades aromáticas y/o cargadas pueden enlazarse al ADN por medio de distintos modos de interacción.

Dentro de esta última vía existen, a su vez, distintos modos de interacción selectiva de los ligandos con el ADN.¹¹

1. *Enlace directo con los pares de bases.*

Uno de los modos de interacción con el ADN más ampliamente empleado por los medicamentos anticancerígenos es el enlace directo con las pares de bases. Los medicamentos que interaccionan de este modo son, generalmente, compuestos de coordinación, y a continuación se describen las principales familias de compuestos que emplean este modo de interacción.

La primera familia de compuestos que interaccionan directamente con los pares de bases son los complejos de platino. Esta familia de compuesto es la más ampliamente utilizada como fármacos anticancerígenos. Entre ellos, el *cis*-platino comercializado como *Platinol* y su generación posterior, el carboplatino y el oxaliplatino (figura 8.5) están aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) y son los principales fármacos empleados para el tratamiento de cánceres de testículo, ovario, útero, cabeza y cuello, esófago, pulmón y colon.¹²

Estos compuestos inducen la apoptosis en células tumorales enlazándose al ADN del núcleo y formando una serie de aductos estructurales que desencadenan varias respuestas celulares, una de las cuales es la inhibición de la transcripción.

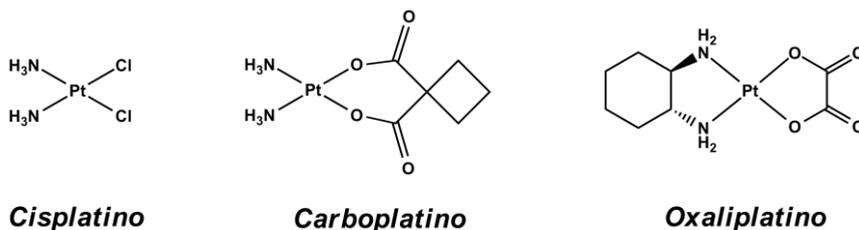


Figura 8.5.- Complejos anticancerígenos de platino

El mecanismo utilizado por el *cis*-platino y sus derivados transcurre en 4 etapas. En la primera etapa se produce la acumulación de las moléculas dentro de la célula mediante difusión pasiva y por absorción activa mediante proteínas de membrana. En el segundo paso se produce una activación del complejo de platino (2+), en el cual se reemplazan los cloruros por moléculas de agua, conducidos por la diferencia de concentración de iones cloruro cuando el compuesto cruza la membrana celular. En el tercera etapa, el acuocomplejo enlaza al ADN en la posición N7 de las bases púricas para formar puentes 1,2-intrahebra donde el prefijo 1,2 indica bases en posiciones contiguas de la cadena (figura 8.6). Y en la última etapa, el daño sobre el ADN provoca la interrupción de varios procesos celulares incluyendo la transcripción y la replicación.

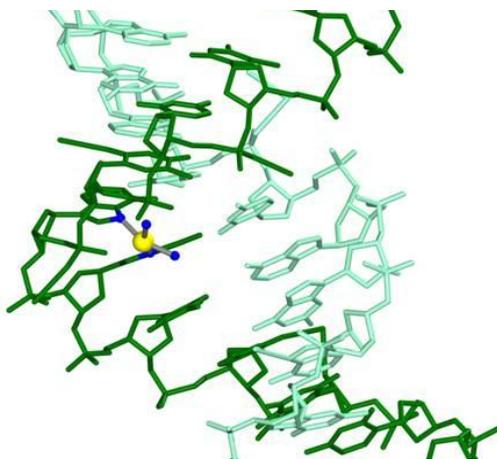
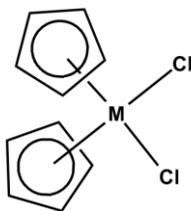


Figura 8.6.- Estructura del complejo entre el *cis*-platino y el ADN, interaccionando directamente con los pares de bases del ADN.

La segunda familia de fármacos empleados como anticancerígenos y que se enlazan directamente a los pares de bases son los metalocenos disustituidos de titanio, vanadio, molibdeno, estaño y renio mostrados en la figura 8.7.¹³ Dentro de esta familia, el dicloruro de titanoceno está en fase II de ensayos clínicos.

Varios estudios sugieren un mecanismo similar al *cis*-platino donde en primer lugar hay una acumulación celular y una transformación en el

acuocomplejo¹⁴ seguido de la formación de enlaces de coordinación con las bases y los grupos fosfatos.



M = Ti, V, Nb, Mo, Re, Sn

Figura 8.7.- Estructura de los metalocenos anticancerígenos

2. Interacción con el esqueleto aniónico de azúcar fosfato.

El esqueleto azúcar-fosfato se encuentra dispuesto en el exterior de la hélice del ácido nucleico y presenta cargas negativas en los grupos fosfatos. La estabilidad de la conformación del polinucleótido enroscado requiere de su interacción con cationes metálicos tales como Na^+ o Mg^{2+} o por proteínas cargadas, en un proceso llamado “condensación de contraiones”.¹⁵ Estos contraiones juegan un papel muy importante al determinar la organización del polinucleótido en la célula. Asimismo, esta interacción por carga depende de la concentración de sales en disolución y son generalmente débiles bajo condiciones fisiológicas. Por lo tanto, se pueden establecer interacciones entre moléculas cargadas positivamente con los residuos negativos de los fosfatos debido a este carácter aniónico del ácido nucleico y reconocer el polinucleótido, generalmente produciendo un efecto de condensación.

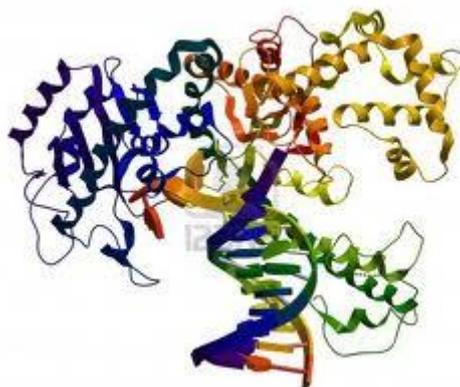


Figura 8.8.- Estructura de la enzima ADN polimerasa interaccionando con el ADN estableciendo interacciones con los residuos de los fosfatos cargados negativamente.

3. *Interacciones con el surco mayor.*

Los residuos de las bases situados en el surco mayor son un punto de interacción con ligandos. Un ejemplo de este tipo de interacción lo encontramos en varias proteínas, que forman un complejo mediante la interacción con la secuencia de bases expuesta en el surco mayor.

Una clase de proteínas que utilizan este modo de interacción son los dedos de zinc que se ajustan perfectamente al surco mayor como se puede comprobar en la figura 8.9.

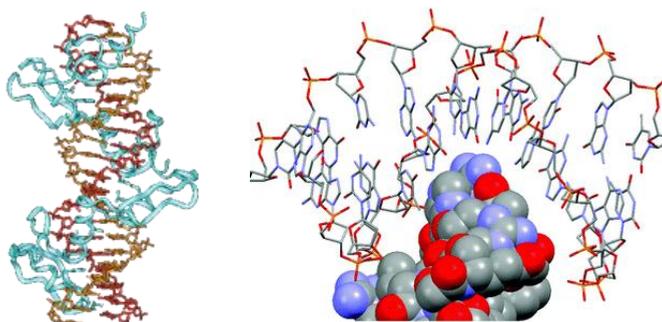


Figura 8.9.- Ejemplos de la interacción de la proteína dedos de Zn^{2+} con el ADN.

Otra familia de compuestos que interactúan por el surco mayor son algunos oligonucleótidos (sintéticos o naturales). Estos oligonucleótidos son capaces de reconocer las nucleobases de purina en el surco mayor formando apareamientos de tipo Hoogsteen o Hoogsteen reverso (figura 8.10). Este tipo de apareamientos dan lugar a estructuras con tres hélices llamadas ADN triple.

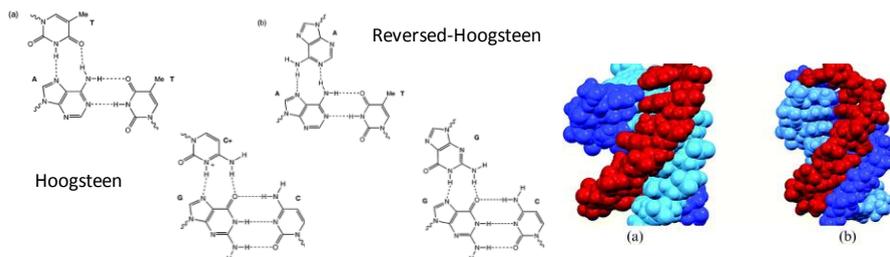


Figura 8.10.- Estructuras de tipo Hoogsteen y Hoogsteen-reverso que se forman al interactuar oligonucleótidos naturales o sintéticos con los pares de bases del ADN (izda). También se muestran las estructuras tridimensionales del ADN triple (dcha).

4. *Interacción con el surco menor.*

Otro punto de interacción con el ADN es el surco menor. La mayor parte de las moléculas que interactúan con el ADN a través del surco menor son pequeñas moléculas sintéticas. Por ello, debido sobre todo al menor tamaño, un esfuerzo considerable en investigación se ha enfocado hacia el diseño de este tipo de ligandos que han encontrado aplicación clínica como agentes antivirales, antibacterianos y en el tratamiento de diversos cánceres. Como ejemplo de moléculas que reconocen el ADN a través del surco menor se encuentran la molécula natural distamicina y moléculas sintéticas derivadas de las diarilamidinas (figura 8.11).

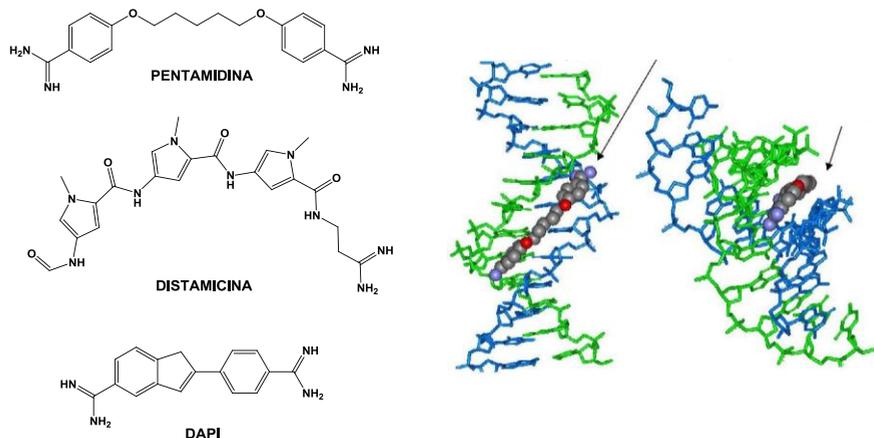


Figura 8.11.- Ejemplos de moléculas capaces de interactuar con el ADN a través de su surco menor (izda) y estructura de rayos X de la pentamidina enlazada al surco menor de un ADN dúplex¹⁶ (dcha).

5. Interacción por intercalación.

El último modo de interacción con el ADN es la intercalación, considerada como el resultado de una interacción hidrofóbica en la cual una molécula aromática hidrofóbica se conduce a un entorno hidrofóbico de pares de bases desde el entorno acuoso hidrofílico (figura 8.12). Los agentes intercalantes poseen la capacidad de introducirse entre dos pares de bases adyacentes causando de ese modo una alteración de la estructura de la doble hélice. Como consecuencia del proceso de intercalación se pueden inducir mutaciones o inhibir procesos tales como la síntesis del ADN o la transcripción.

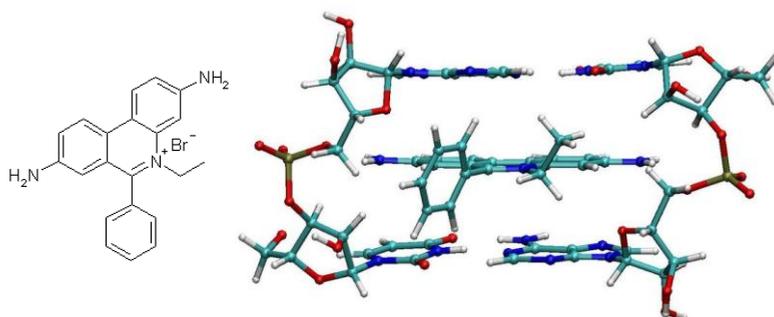


Figura 8.12.- Ejemplo de interacción con el ADN por intercalación. La estructura química del intercalante bromuro de etidio (izda) y el modo de intercalación del bromuro de etidio en el ADN (dcha).

8.4.-Interacción de L1 y L2 con ácidos nucleicos

Se ha estudiado mediante varias técnicas la interacción de los ligandos politópicos **L1** y **L2** con varios polinucleótidos o ácidos nucleicos. Los ligandos presentan en su estructura distintos grupos como la fenantrolina, las piridinas o las aminas y pueden interaccionar con los ácidos nucleicos mediante varios modos.

Para realizar estos estudios de interacción con ácidos nucleicos se han empleado cuatro polímeros de nucleótidos con distintas estructuras químicas. Puesto que los polinucleótidos tienen una nomenclatura especial se hará una breve explicación de ellos. Como se ha indicado anteriormente, las bases se nombran por su inicial, A para adenina, G para guanina, T para timina, C para citosina y U para uracilo. A continuación, se coloca previamente a la base una d para indicar que la base está enlazada a una desoxirribosa o no se coloca nada para indicar que la pentosa enlazada a la base es una ribosa. Así, por ejemplo, dA indicará la nucleobase de adenina con desoxirribosa y U indicará la nucleobase de uracilo con la ribosa.

Los polímeros de nucleótidos o polinucleótidos se nombran siempre utilizando el prefijo *poly* seguidos de la base de la que está compuesto la hebra, con lo cual, un polímero de la base adenina se nombrará poly dA y un polímero compuesto por la base guanina es poly dG.

En el caso de ser de doble hebra se nombra la primera hebra seguido de un guión y del nombre de la segunda hebra enfrentada. Así por ejemplo, el polinucleótido poly dA-poly dT significa una hebra de bases de adenina enfrentada con otra hebra sólo con bases de timina. Estos polinucleótidos que contienen cada una de las hebras con una única base se denominan *homopolímeros*, en contraposición con los *heteropolímeros* que contienen distintas bases.

Para diferenciar los heteropolímeros se escribe una de las hebras como se ha descrito anteriormente seguida a continuación de la otra hebra. Así pues, el poly d(C-G)•poly d(C-G) indica que cada una de las dos hebras está compuesta químicamente por bases alternadas de citosina y guanina y cada

hebra se enfrenta a la otra interaccionando la citosina de una hebra con la guanina de la otra y así consecutivamente.

Para este estudio nos centramos en los polinucleótidos de doble hebra que difieren en sus estructuras secundarias:

- Calf thymus ADN o ct-ADN, que es el polinucleótido natural extraído del ADN bovino y que presenta un estructura clásica de hélice B y con una composición mixta de pares de bases (48% de pares de bases G-C y 52% de A-T).¹⁷
- poly dG-poly dC, que presenta una estructura de hélice B también pero con un surco menor impedido estéricamente por los grupos amino de la guanina.
- poly dA-poly dT, que forma un estructura secundaria retorcida caracterizada por un surco menor mucho más estrecho y profundo en comparación con el ct-ADN o poly dG-poly dC.¹⁸
- poly A-poly U, que se caracteriza por una estructura de hélice A con un surco menor escondido y poco profundo y un surco mayor ancho y profundo.

En primer lugar, se intentaron realizar valoraciones espectroscópicas UV-Vis para cuantificar la interacción, pero esto no fue posible porque los máximos de absorción UV-Vis de los compuestos estudiados se superponen con los espectros de UV de los ácidos nucleicos ($\lambda < 300$ nm). Además, la adición de algunos ácidos nucleicos provocó la precipitación de los ligandos a concentraciones superiores a 2.0×10^{-5} mol dm⁻³. Este hecho también imposibilitó la realización de experimentos por viscosimetría para demostrar la elongación del ácido nucleico de doble hebra después de interaccionar con los compuestos porque se necesitan concentraciones de ácido nucleico superiores a $c = 1.0 \times 10^{-4}$ mol dm⁻³.

8.5.- Valoraciones espectrofotométricas

La fluorescencia intrínseca de **L2** permitió realizar valoraciones fluorimétricas a concentraciones donde no se observa precipitación ($c < 2.5 \times 10^{-6}$ M). Las valoraciones se realizaron a valores de pH 5.0 y 6.0 (figura 8.13 y las figuras 8.22-8.24 en el apéndice) para los cuatro ácidos nucleicos, sin embargo, no se pudieron realizar las valoraciones a pH 7.0 porque el ligando no tiene suficiente fluorescencia (ver capítulo 4) para detectar variaciones significativas al añadir polinucleótido y hacer una valoración correcta.

La emisión de la fluorescencia de **L2** experimenta una disminución de la emisión de la fluorescencia tras la adición de los ácidos nucleicos. El ácido nucleico que contiene los pares de bases dG – dC (poly dC-poly dG, figura 8.24) produce una mayor disminución en las valoraciones que los polinucleótidos que contienen los pares de bases A – U (poly A-poly U, figura 8.22) y A – T (poly dA-poly dT, figura 8.23).

Un hecho destacable es que se encuentran pocos compuestos descritos en la literatura capaces de producir diferentes cambios de fluorescencia tras la adición de pares de bases A - U, A - T y G – C.¹⁹

Esta mayor disminución de la emisión de la fluorescencia del polinucleótido poly dC-poly dG se correlaciona con las características de la guanina dado que es la nucleobase mejor electrón-dadora de las cinco (A, U; C; G y T).²⁰ La disminución de la fluorescencia se produce debido a la interacción del fluoróforo electrón-aceptor (fenantrolina) y la nucleobase mediante interacciones de apilamiento aromáticas o por interacción a larga distancia y, por lo tanto, como la nucleobase mejor electrón-dadora es la guanina mayor será la disminución de la fluorescencia. Este hecho indica que el fluoróforo se encuentra apilado dentro de la doble hélice del ácido nucleico, ya sea apilamiento paralelo (cara a cara o intercalación) como perpendicular (borde a cara o enlace al surco).²¹

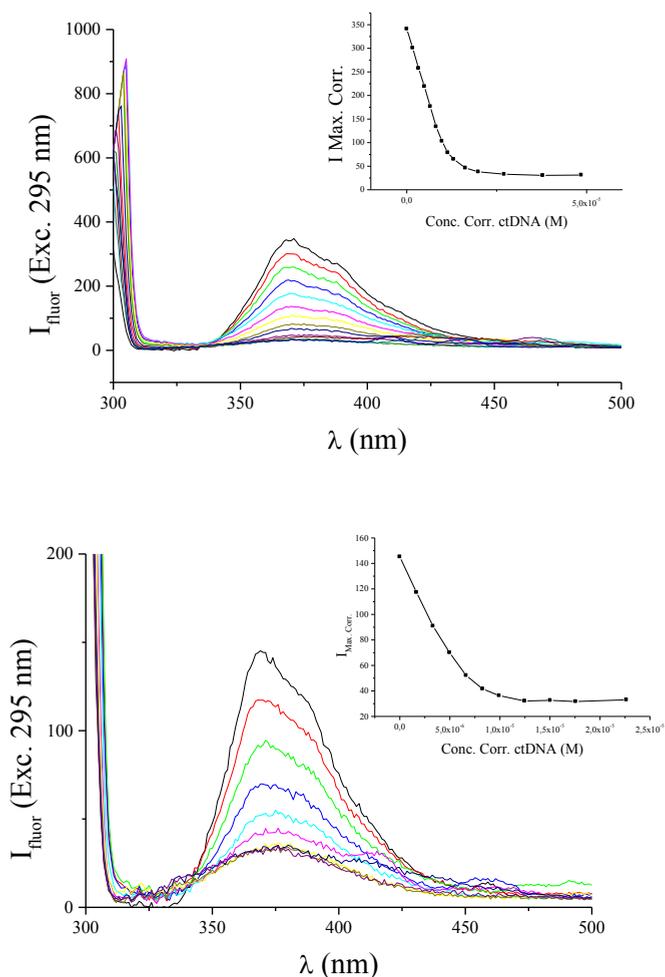


Figura 8.13. Valoraciones fluorimétricas de **L2** ($c = 2.5 \times 10^{-6} \text{ mol dm}^{-3}$, $\lambda_{\text{exc}} = 296 \text{ nm}$) con ctADN a pH 5.0 (arriba) y a pH 6.0 (abajo) en tampón cacodilato con $I = 0.05 \text{ M}$.

Las constantes de asociación K_s y las relaciones [compuesto enlazado]:[polinucleótido] presentadas como el parámetro n se obtuvieron mediante el procesamiento de las valoraciones fluorimétricas de **L2** con los ácidos nucleicos a través de la ecuación Scatchard²² y utilizándose un exceso de polinucleótido sobre el compuesto (tabla 8.1).

Los valores de las constantes de asociación son mayores para el poly A-poly U, evidenciando cierta selectividad del polinucleótido de ARN (poly A-poly U) sobre los polinucleótidos de ADN (ct-ADN, poly dA-poly dT y poly dC-poly dG).

Tabla 8.1.- Constantes de asociación ($\log K_s$) y relaciones n ([compuesto enlazado]/[polinucleótido]) calculadas de las valoraciones fluorimétricas de **L2** con los polinucleótidos a pH 5.0 y 6.0 utilizando tampón cacodilato sódico, $I = 0.05$ M.

	ctADN		poly dA-poly dT		poly dG-poly dC		poly A-poly U	
	$\log K_s^a$	n^b	$\log K_s$	n	$\log K_s$	n	$\log K_s$	n
pH 5.0	6.7	0.16	6.1	0.35	6.7	0.28	7.1	0.31
pH 6.0	5.7	0.63	5.2	0.80	6.5	0.33	7.6	0.16

^a Exactitud de $n \pm 10$ -30%, por lo tanto los valores de $\log K$ varían en el mismo orden de magnitud. ^b El procesamiento de los datos de la valoración se realiza con la ecuación de Scatchard.

Además, los valores de las constantes nos muestran una mayor afinidad de **L2** por los ácidos nucleicos de ADN (ct-ADN, poly dA-poly dT y poly dC-poly dG) a pH 5.0 que a pH 6.0, y un orden inverso para el caso del ácido nucleico de ARN (poly A-poly U), por el cual **L2** tiene más afinidad a pH 6.0 que a pH 5.0.

Estos hechos indican que las cargas del ligando tienen un efecto en la interacción con los polinucleótidos, puesto que el ligando se encuentra más cargado al disminuir el pH como indicamos en el apartado de protonación. Por lo tanto, la interacción es mayor cuando más cargado está el ligando para los polinucleótidos de ADN y menor para los polinucleótidos de ARN.

8.6.- Ensayos de desplazamiento con bromuro de etidio.

La afinidad de **L1** por los polinucleótidos mediante valoraciones fluorimétricas no se puede determinar porque no posee fluorescencia intrínseca y la afinidad de **L2** a pH 7.0 tampoco, porque no tiene suficiente emisión de fluorescencia para producir cambios significativos. Por ello, se ha utilizado un método alternativo para esta estimación de la afinidad en condiciones cercanas a la saturación de los sitios de enlace. El método escogido es un ensayo de desplazamiento con indicador; entre los indicadores se escoge el bromuro de etidio porque es una molécula ampliamente estudiada que interacciona con el ADN y ARN y sirve como indicador fluorescente. Finalmente, se comparan las habilidades de los ligandos estudiados compitiendo con el indicador por enlazarse al polinucleótido.²³

Inicialmente se prepara una disolución del ácido nucleico con el bromuro de etidio, en ella, el bromuro de etidio se encuentra intercalado con el polinucleótido y tiene una emisión intensa. La valoración se realiza añadiendo ligando, si éste tiene la suficiente afinidad por los sitios donde se encuentra el bromuro de etidio, lo desplaza y la fluorescencia disminuye porque el EtBr sin intercalar no posee fluorescencia. El ajuste de la valoración se realiza mediante la ecuación de Scatchard²² proporcionando un parámetro denominado IC_{50} , con el cual podemos comparar afinidades entre los ligandos y con el propio bromuro de etidio. El valor de IC_{50} indica la relación entre el bromuro de etidio y el ligando ($[EtBr]/[ligando]$) cuando ha disminuido a la mitad la emisión de la fluorescencia inicial del bromuro de etidio $[I_{EtBr-polinucleótido} - I_{EtBr libre}] / 2$, donde $I_{EtBr-polinucleótido}$ es la intensidad de fluorescencia del complejo EtBr-polinucleótido e $I_{EtBr libre}$ es la intensidad de fluorescencia del bromuro de etidio libre antes de la adición del polinucleótido.

La figura 8.14 muestra los espectros realizados con un ensayo por desplazamiento con indicador en una valoración para la interacción de **L1** con poly dA-poly dT. Además, se muestran en la figura 8.14 los ajustes obtenidos del máximo de emisión del bromuro de etidio con la relación $[EtBr]:[L]$ y el porcentaje de variación de la emisión del bromuro de etidio con la relación

[EtBr]:[L]. Las restantes valoraciones se muestran en las figuras 8.25-8.29 situadas en el apéndice.

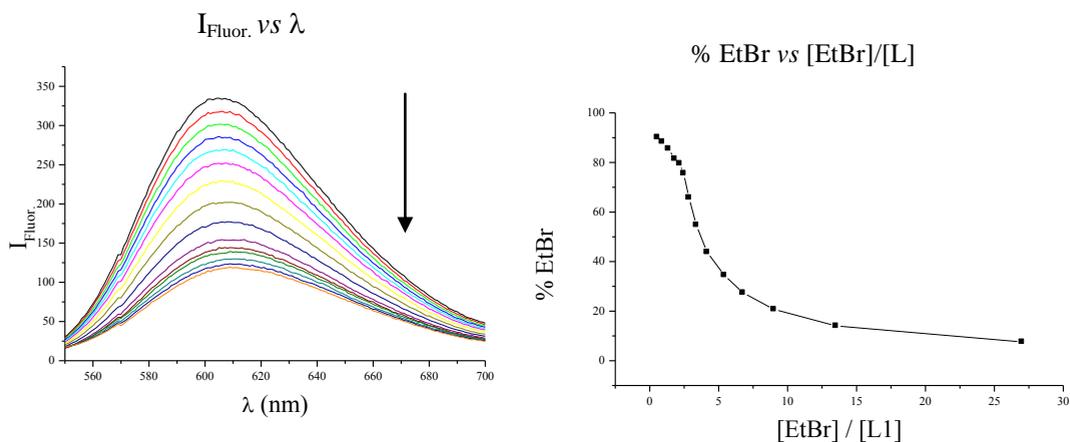


Figura 8.14.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly dA-poly dT ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) con **L1** con relación molar $r = 0.3$ (tampón cacodilato, $I = 0.05 \text{ mol dm}^{-3}$) a pH 7.0.

Los ligandos **L1** y **L2** producen una disminución de la fluorescencia al añadirlos a una disolución con el polinucleótido y bromuro de etidio, por lo que sí se desplaza al indicador del polinucleótido (figura 8.14). Los valores de IC_{50} obtenidos para ambos ligandos con los ácidos nucleicos se indican en la tabla 8.2 y tienen un valor de 1.5-3.7 μM . Asimismo, el valor de IC_{50} del EtBr es 1 y su constante de afinidad a pH = 7.0 es $\log K_s \sim 6$.²⁴ Los valores de IC_{50} obtenidos para los ligandos **L1**, **L2** y EtBr se encuentran dentro del mismo rango, por lo tanto, se puede considerar que los ligandos tienen una constante de afinidad próxima ($\log K_s = 5 - 6$).

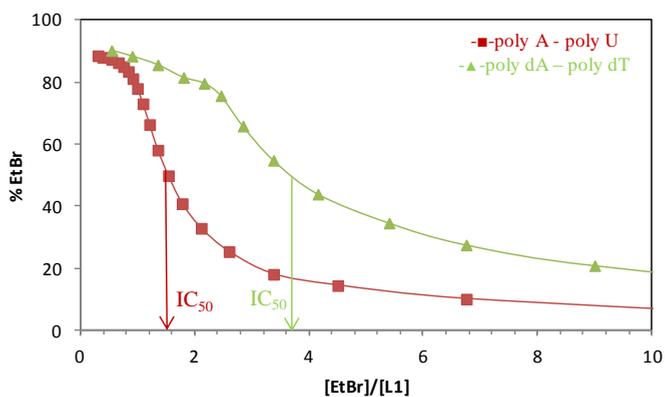
Tabla 8.2.- Valores de IC₅₀ determinados por el desplazamiento del EtBr de polinucleótidos al adicionar **L1** y **L2** a pH 7.0 (tampón cacodilato, *l* = 0.05 M).

	ct-ADN	poly A – poly U	poly dA – poly dT
L1	1.53	1.55	3.69
L2	2.15	1.67	3.46
EtBr	1.0 ⁻²⁴		

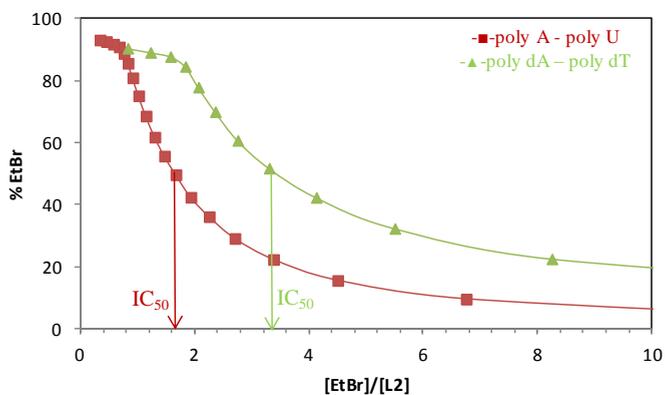
Ensayo de desplazamiento con bromuro de etidio (EtBr). A una disolución de polinucleótido ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) se añade bromuro de etidio ($r_{\text{EtBr}/[\text{polinucleótido}]}=0.3$), y la variación de la emisión de fluorescencia del complejo EtBr-polinucleótido ($\lambda_{\text{ex}}=520$ nm, $\lambda_{\text{em}}=602$ nm) se monitoriza como función de $c(\text{EtBr})/c(\text{compuesto})$.

La comparación de las constantes de asociación obtenidas por valoraciones directas fluorimétricas para **L2** a valores de pH 5.0 y 6.0 (log K = 6.7 y 5.7 respectivamente) con la estimada con bromuro de etidio a pH 7.0 indica una disminución de los valores de K_s en el orden pH 5.0 > pH 6.0 > pH 7.0, lo cual concuerda con la disminución del grado de protonación o número de cargas positivas. Por lo tanto, mediante el ensayo de desplazamiento con el indicador EtBr, se puede confirmar que al disminuir el valor de pH se produce un aumento de la interacción con los ácidos nucleicos.

Entre los distintos polinucleótidos, los valores de IC₅₀ son menores para poly A-poly U (figura 8.15), sugiriendo una selectividad del polinucleótido de ARN sobre el de ADN para ambos ligandos, en concordancia con los resultados obtenidos para **L2** en las valoraciones fluorimétricas directas.



A



B

Figura 8.15.- Ensayos de desplazamiento con EtBr con poly A poly U y poly dA – poly dT ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) con L1 (A, arriba) y L2 (B, abajo) con relación molar $r_{[EtBr]/[polinucleótido]}=0.3$ a pH = 7.0 en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

8.7.- Experimentos de desnaturalización térmica.

Las interacciones de los compuestos **L1** y **L2** con los polinucleótidos de ADN (ct-ADN, poly dA – poly dT) y con el análogo de doble hebra de ARN (poly A – poly U) se han estudiado mediante experimentos de desnaturalización térmica (figura 8.16). La tabla 8.3 muestra los valores de ΔT_m para **L1** y **L2** con diferentes relaciones molares relación [compuesto] / [polinucleótido] a pH 6.0. Los valores de ΔT_m son positivos, indicando que estabilizan fuertemente la doble hélice del polinucleótido. Existe una dependencia no lineal de los valores de ΔT_m obtenidos con la relación polinucleótido/ligando sugiriendo una saturación de los sitios de enlace sobre $r_{[\text{polinucleótido}] / [\text{compuesto}]} = 0.1 - 0.2$.

Tabla 8.3.- Valores de ΔT_m^a (°C) a valor de pH 6.0 y diferentes relaciones [compuesto] / [polinucleótido] para la interacción de **L2** y **L1** con los polinucleótidos de doble hebra estudiados (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M).

Ligando	Polinucleótido	$r^b = 0.1$	0.2	0.3
L1	ct-ADN	4.01	-	P ^c
	poly dA – poly dT	3.77	20.87	-
	poly A – poly U	22.52	28.04	-
L2	ctADN	7.75	-	-4.19
	poly dA – poly dT	13.79	c	P
	poly A – poly U	16.35	17.89	P

^a Error en ΔT_m : $\pm 0.5^\circ\text{C}$; ^b relación $r_{[\text{compuesto}] / [\text{polinucleótido}]}$; ^c Precipitación.

Los ligandos confieren una mayor estabilización sobre el polinucleótido de doble hebra de ARN (poly A–poly U) que sobre cualquier otro polinucleótido de ADN (tabla 8.4), de igual forma que indicaban los ensayos fluorimétricos.

La variación del punto de fusión de los complejos L-poly A-poly U es mucho mayor para **L1** que para **L2** confiriéndole una selectividad, como puede observarse en la figura 8.16. Asimismo, se observa un incremento en el efecto de estabilización con la disminución del pH (tabla 8.4) que indica el importante impacto del número de cargas positivas en la estabilización del ADN/ARN. Por lo tanto, se confirma que al aumentar la carga hay una mayor estabilización de los ácidos nucleicos.

Tabla 8.4. Valores de ΔT_m^a (°C) a diferentes valores de pH de los polinucleótidos de doble hebra estudiados tras la adición de **L2** y **L1** (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M).

Ligando	polinucleótido	pH = 5.0	6.0	7.0
L1	<i>ct-ADN</i>	-	4.0	-
	<i>poly dA-poly dT</i>	<i>b</i>	3.8	1.9
	<i>poly A-poly U</i>	26.4	22.5	15.1
L2	<i>ct-ADN</i>	-	7.75	-
	<i>poly dA-poly dT</i>	16.06	13.39	9.86
	<i>poly A-poly U</i>	20.66	16.35	13.15

^a Error en ΔT_m : $\pm 0.5^\circ\text{C}$; relación $r_{[\text{compuesto}] / [\text{polinucleótido}]} = 0.1$; ^b Precipitación.

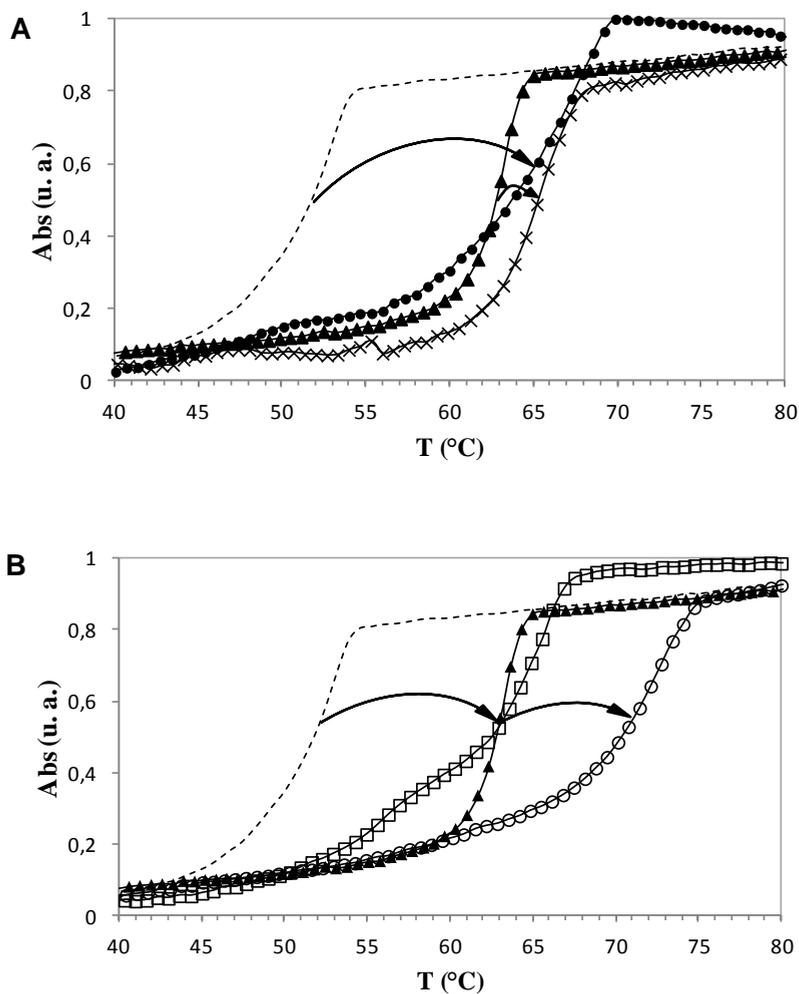


Figura 8.16.- Curvas de desnaturalización térmica a pH = 7.0 de los polinucleótidos poly dA-poly dT (-), poly A – poly U (▲), y los complejos de poly dA – poly dT con L1 (x) y con L2 (o) y los complejos de poly A – poly U con L1 (●) y con L2 (□).

8.8.- Dicroísmo circular

Se ha escogido la espectroscopía de dicroísmo circular (DC) para obtener más información acerca del modo de enlace y la estructura que forman los complejos de **L1**, **L2** y los polinucleótidos de ADN/ARN. El DC es un método altamente selectivo y sensible para evaluar los cambios conformacionales en la estructura secundaria de los polinucleótidos.²⁵

L1 y **L2** son moléculas aquirales que no tienen espectro de DC, pero pueden mostrar señales inducidas (IDC) después de enlazarse al polinucleótido, lo cual proporciona información sobre los modos de interacción.²⁶ La señal y magnitud de la banda IDC puede depender de la geometría de enlace, por ejemplo, en el apilamiento de varias moléculas de un compuesto dentro del ADN/ARN resulta una banda de excitón de DC, el enlace al surco menor de un ADN de doble hebra, orienta el ligando aproximadamente 45° respecto al eje quiral del ADN produciendo una fuerte banda IDC positiva, mientras que la intercalación conduce a que el compuesto adopte una disposición coplanar con los pares de bases dando una débil banda IDC negativa.^{27,28}

La adición de **L1** y **L2** a polinucleótidos de doble hebra de ADN y de ARN producen cambios en el espectro de DC. La magnitud del cambio depende estrechamente de la estructura secundaria del polinucleótido. Con relaciones $r_{[\text{ligando}]/[\text{polinucleótido}]}$ superiores a 0.3 se observa precipitación o aglomeración del ligando con el polinucleótido lo cual dificulta la medición del espectro de DC. Como se puede observar en los espectros de DC de la interacción de los ligandos con ct-ADN en las figuras 8.30 y 8.31 situadas en el apéndice del capítulo. Por lo cual, únicamente se han analizado los espectros con un exceso de polinucleótido sobre el ligando menor a 0.3.

Las variaciones del espectro de DC a valores de pH 5.0 y 6.0 con los polinucleótidos de ADN son similares, apuntando la independencia del modo de coordinación para ambos ligandos con el estado de protonación con estos ácidos nucleicos. Sin embargo, la interacción con los polinucleótidos de ARN sí que muestran cambios en el espectro de DC con el pH.

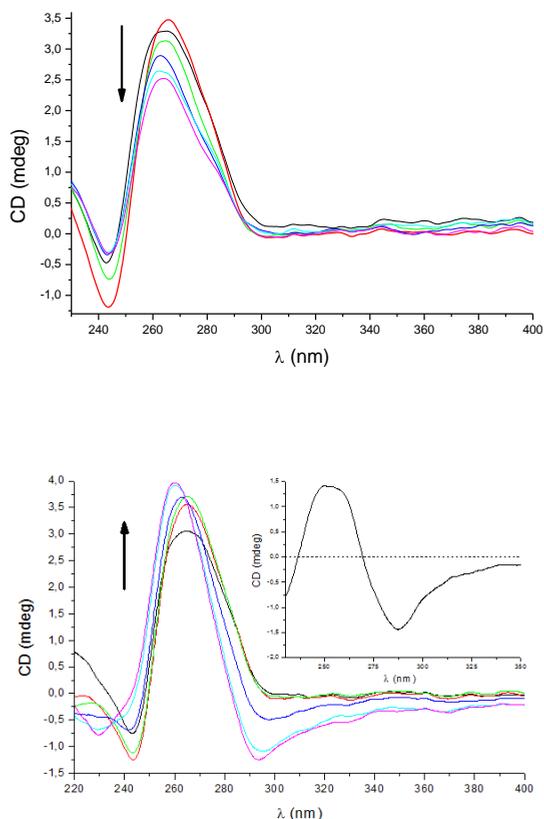


Figura 8.17.- Valoración de DC del poly A- poly U ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con **L2** (arriba) y **L1** (abajo) con relaciones molare r [compuesto]/[polinucleótido] = 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 a pH = 6.0 (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M). Grafica interior es la diferencia entre el espectro de DC del L1/ARN ($r = 0.5$) y el espectro del ARN.

La adición de **L2** al poly A – poly U produce una disminución de la banda situada a 265 nm (figura 8.17) probablemente por la distorsión de la doble hélice del ARN tras enlazarse a las moléculas de **L2** de gran tamaño. Además, no se observa ninguna banda de IDC, debido a la ausencia de una orientación dominante de las moléculas de **L2** con respecto al eje quiral o porque la banda negativa débil de IDC esperada para la intercalación de la

fenantrolina se sitúa dentro de la disminución del espectro de DC (< 300 nm). Los cambios del espectro inducidos por **L1** difieren pronunciadamente de los inducidos por **L2**. Al adicionar **L1** al polinucleótido de ARN se observa un incremento en la intensidad del DC a 265 nm y la aparición de una banda negativa de IDC a 294 nm. La sustracción del espectro de DC del ARN y el espectro del complejo **L1**-ARN muestra dos bandas de IDC de diferente signo (grafica interior de la figura 8.17, parte inferior), que es característico de la formación de dímeros.

El poly dA – poly dT se caracteriza por una banda positiva de IDC a 260 nm acoplada con una banda negativa de IDC entre 280 y 310 nm (figura 8.18). La adición de ambos ligandos a una disolución de este polinucleótido de ADN produce importantes cambios en el espectro de DC, mucho mayores que los registrados para el análogo de ARN (poly A-poly U).

Ambos ligandos provocan unos mayores cambios en el espectro de DC del análogo de ADN, el poly dA – poly dT que con el poly A – poly U. El complejo L-poly dA-poly dT se caracteriza por una banda positiva de IDC a 260 nm acoplada con una banda negativa de IDC entre 280 y 310 nm (figura 8.18). Estas bandas corresponden a las bandas de absorción de la piridina (**L1**) y fenantrolina (**L2**), respectivamente. Los espectros de IDC del complejo **L2**-poly dA-poly dT a diferentes relaciones molares muestran un punto isobéptico a 274 nm, apoyando la formación de un único tipo de complejo, mientras que la formación de las bandas de IDC de doble signo indican la dimerización de **L2** dentro del surco menor del ADN. Al contrario que con **L2**, el complejo de **L1**-poly dA-poly dT muestra en los espectros de IDC una desviación del punto isobéptico hacia menores longitudes de onda, sugiriendo la presencia de más de un modo de interacción.

El espectro del complejo **L1**-dAdT a relación molar 0.1 se parecen al espectro de DC de poly dA-poly dT sin banda negativa de IDC a $\lambda > 290$ nm y, por lo tanto, se puede considerar que una única molécula de **L1** está enlazada en el surco menor de ADN. Para el complejo **L1**-poly dA-poly dT con relaciones molares mayores de 0.2 se forman unas fuertes bandas de doble signo, señalando la formación de dímeros de **L1** dentro del surco menor del ADN.

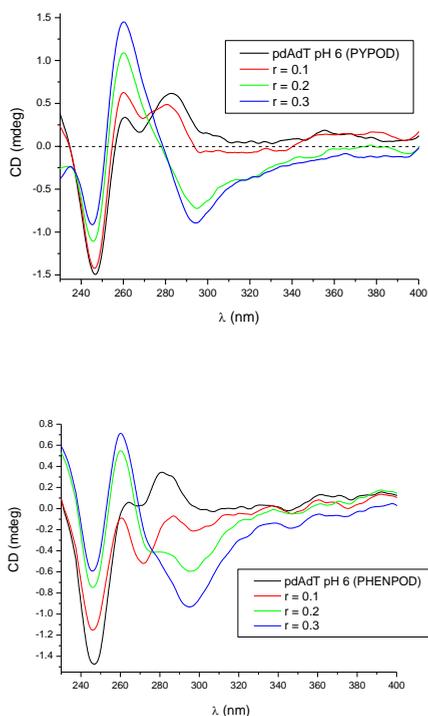


Figura 8.18.- Valoración de DC del poly dA-poly dT ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con **L1** (arriba) y **L2** (abajo) con relaciones molare $r_{\text{[compuesto]}/\text{[polinucleótido]}} = 0.1, 0.2$ y 0.3 a $\text{pH} = 6.0$ (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M).

Con respecto a los cambios de los espectros de DC del poly dC-poly dG con una secuencia mixta (figuras 8.19 y 8.36) y ct-ADN con un 42% de pares de bases de G-C (figuras 8.30 y 8.31), tras la adición de **L1** y **L2** son significativamente menores en comparación al poly dA-poly dT con bandas de IDC de intensidad significativamente menores.

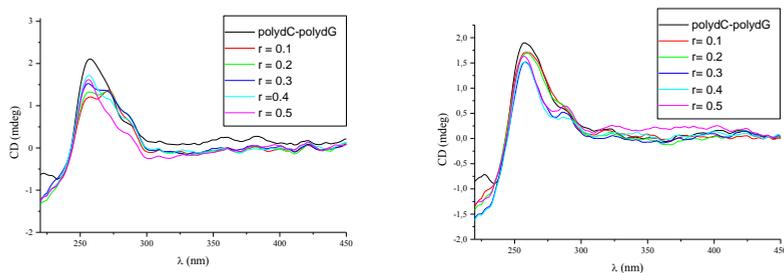


Figura 8.19.- Valoración de DC del polímero poly dC-poly dG ($c = 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol dm}^{-3}$) con **L1** (izda) y **L2** (dcha) a distintas relaciones molares $r = [\text{polinucleótido}] / [\text{ligando}]$ a pH 6.0 en tampón cacodilato, $I = 0.05 \text{ M}$.

8.9.- Evaluación del efecto antiproliferativo in vitro.

Se evaluó la actividad antoproliferativa de los ligandos de varias líneas celulares en el laboratorio de terapia experimental en la división de medicina molecular del Ruđer Bošković Institute en colaboración de la Dr. Marijeta Kralj.

Se evaluaron los ligandos poliamínicos tripodales mostrado en la figura 8.20, previamente a los ligandos **L1** y **L2**. Estos ligandos tripodales muestran una alta afinidad por ADN y ARN²⁹ pero ninguna actividad antiproliferativa en líneas celulares. Esta ausencia de actividad biológica se atribuyó a que las moléculas tienen una alta carga positiva y tienen baja hidrofobicidad. Por lo tanto, no pueden atravesar la membrana celular,³⁰ acumularse en el interior celular e interactuar con el ADN/ARN.

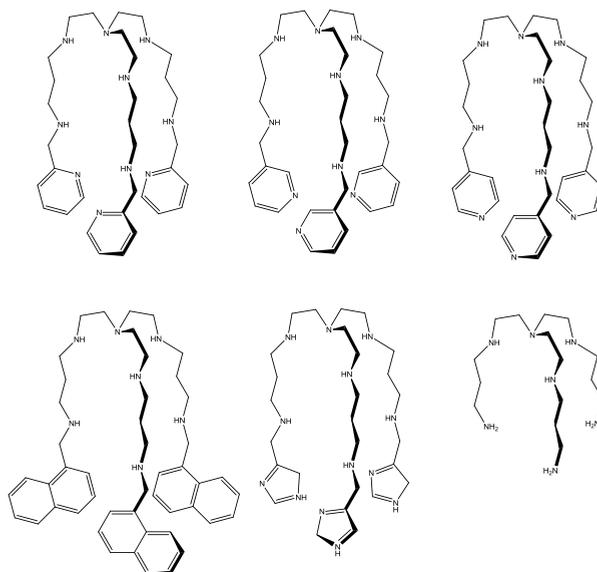
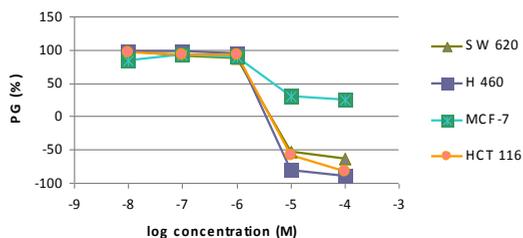


Figura 8.20.- Estructuras de los ligandos tripodales analizados previamente mediante ensayos antiproliferativos.

La actividad antiproliferativa de **L1** y **L2** se evaluaron con un panel de 4 líneas celulares humanas procedentes de tres tipos de cáncer: SW 620 y HCT 116 que derivan del carcinoma de colon, MCF-7 del carcinoma de pecho y H 460 del carcinoma de pulmón (figura 8.21).



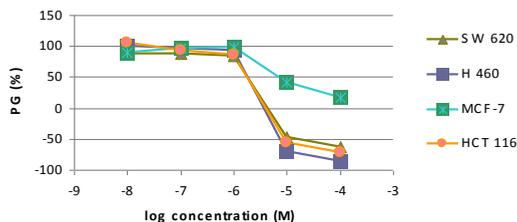


Figura 8.21.- Representaciones de la respuesta de las dosis para los ligandos **L1** (arriba) y **L2** (abajo) probados in vitro para el panel de líneas celulares humanas de cáncer. PG es el porcentaje de crecimiento.

En estos estudios biológicos preliminares, ambos compuestos muestran una fuerte actividad antiproliferativa hacia todas las líneas celulares ensayadas. Los valores de la concentración que provoca la inhibición del 50 % de las células (GI_{50}) se encuentran entre 2-7 μM (ver la tabla 8.5). Los valores de GI_{50} se encuentran cercanos al valor de un agente alquilante clásico como es el cisplatino³¹ y, por encima, de un intercalante como es la doxorubicina,³¹ por lo cual se puede concluir que los ligandos **L1** y **L2** poseen una citotoxicidad del mismo orden al cisplatino. Asimismo, los compuestos no muestran ninguna selectividad entre las líneas celulares excepto por las células de MCF-7 que son más resistentes al tratamiento.

La alta afinidad de **L1** y **L2** hacia ds-ADN y ds-ARN además de la pobre selectividad entre líneas celulares sugieren que los ácidos nucleicos pueden ser los objetivos dentro de la célula. El efecto antiproliferativo significativamente mayor de **L1** y **L2** en células humanas, con respecto a los ligandos tripodales mostrados en la figura 8.20, se puede atribuir a la enmascaración de las cargas positivas y el incremento de la hidrofobicidad de **L1** y **L2**, dando como resultado una mejora en la permeabilidad de la membrana por los compuestos y su acumulación celular.

Sin embargo, se necesitan estudios más detallados para la determinación de los mecanismos de la acción biológica que se están realizando

actualmente en el grupo de Antonio García-España en el Hospital Universitario de Tarragona Joan XXIII.

Tabla 8.5.- Valores de GI_{50} (μM)

Ligando	GI_{50}^a (μM)			
	Líneas celulares			
	HCT 116	SW 620	MCF-7	H 460
L1	2 ± 0.5	2 ± 0.01	5 ± 0.4	2 ± 0.1
L2	2 ± 0.2	2 ± 0.02	7 ± 1.5	2 ± 0.1
Cis ^b	-	4 ± 1.8^{31}	12 ± 6	-
Dox ^c	-	0.02 ± 0.02	0.04 ± 0.01	-

^a GI_{50} ; concentración que provoca la inhibición del 50% del crecimiento. ^b Cisplatino. ^c Doxorubicina

8.10.- Apéndice del capítulo 8: figuras adicionales

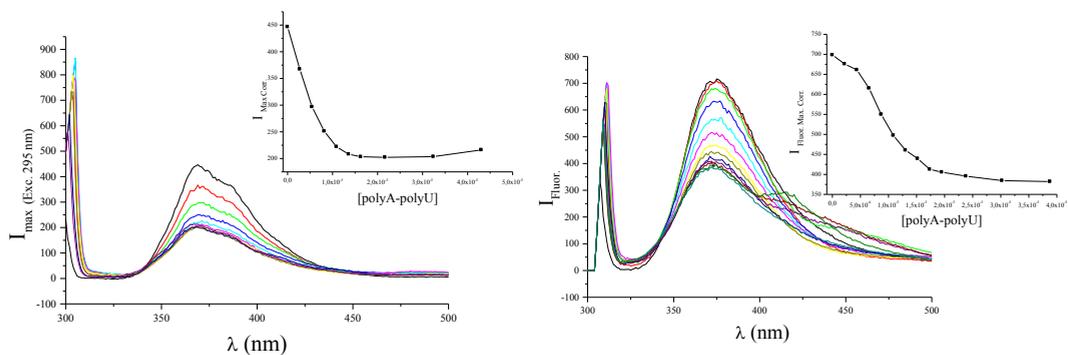


Figura 8.22. Valoraciones fluorimétricas de L2 ($c = 2.5 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 296$ nm) con poly A-poly U a pH 5.0 (izda) y a pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato con $I = 0.05$ M.

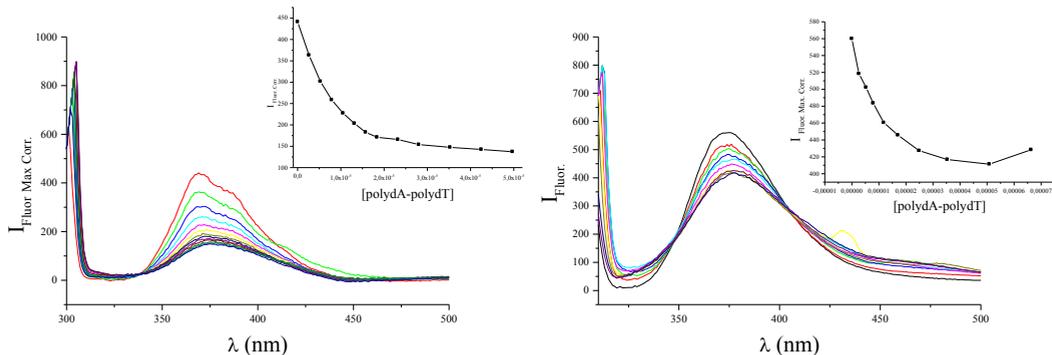


Figura 8.23. Valoraciones fluorimétricas de L2 ($c = 2.5 \times 10^{-6}$ M, $\lambda_{\text{exc}} = 296$ nm) con poly dA-poly dT a pH 5.0 (izda) y a pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato con $I = 0.05$ M.

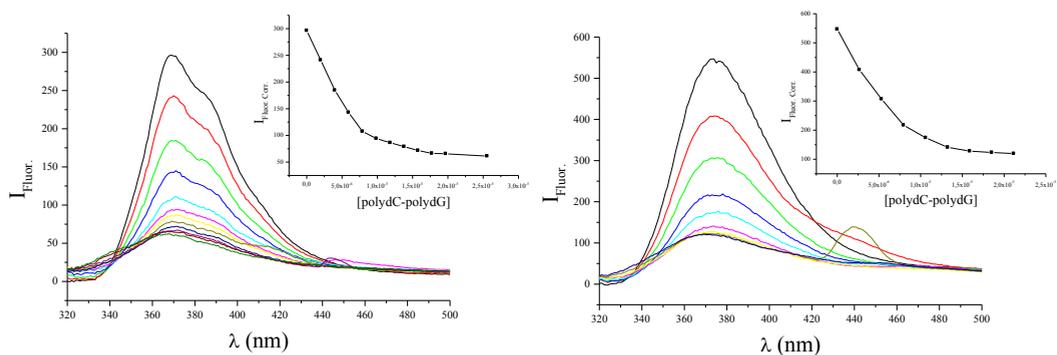


Figura 8.24. Valoraciones fluorimétricas de L2 ($c = 2.5 \times 10^{-6}$ M, $I_{exc} = 296$ nm) con poly dC-poly dG a pH 5.0 (izda) y a pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato con $I = 0.05$ M.

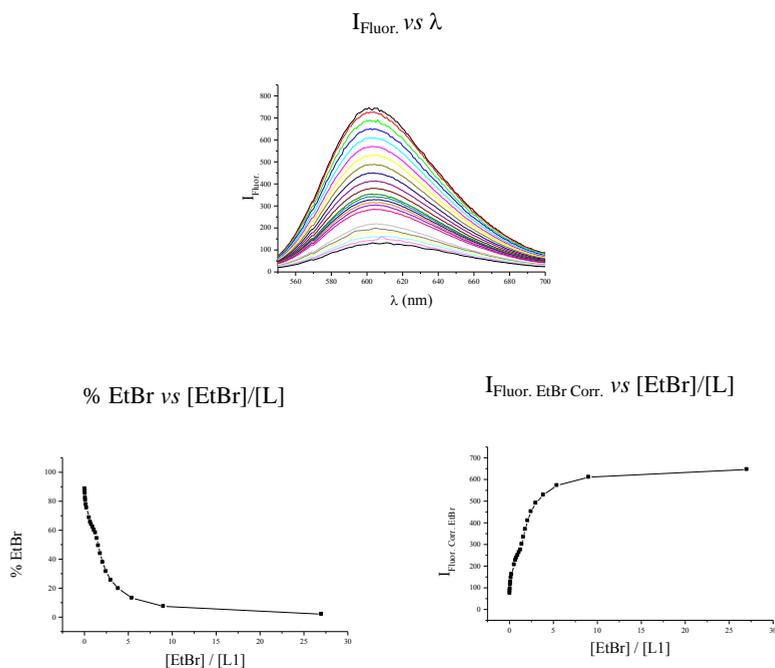


Figura 8.25.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con ct-ADN ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) L1 con relación molar $r_{[polinucleótido]/[EtBr]} = 0.3$ (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M) a pH 7.0.

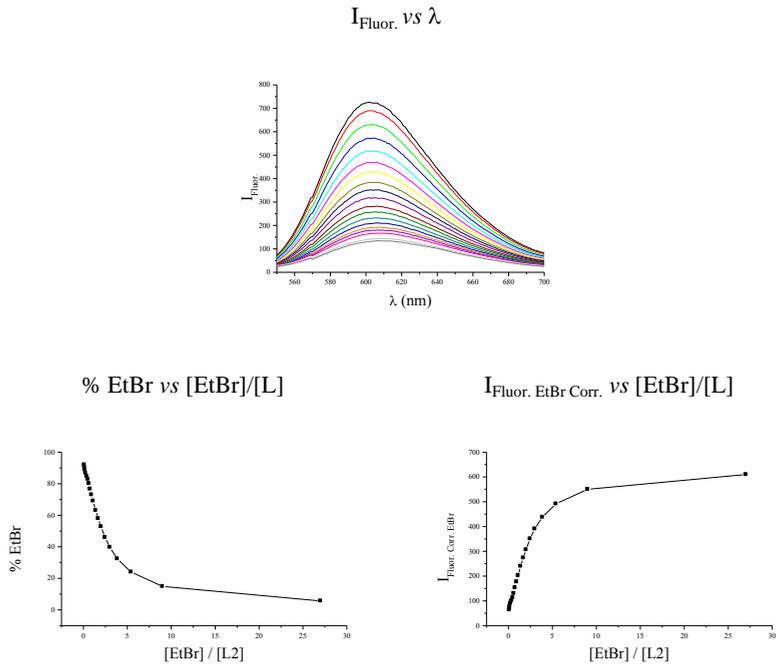


Figura 8.26.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con ct-ADN ($c = 9.0 \times 10^{-6} \text{ M}$) L2 con relación molar $r_{\text{[polinucleótido]}/[\text{EtBr}]} = 0.3$ (tampón cacodilato, $I = 0.05 \text{ M}$) a pH 7.0.

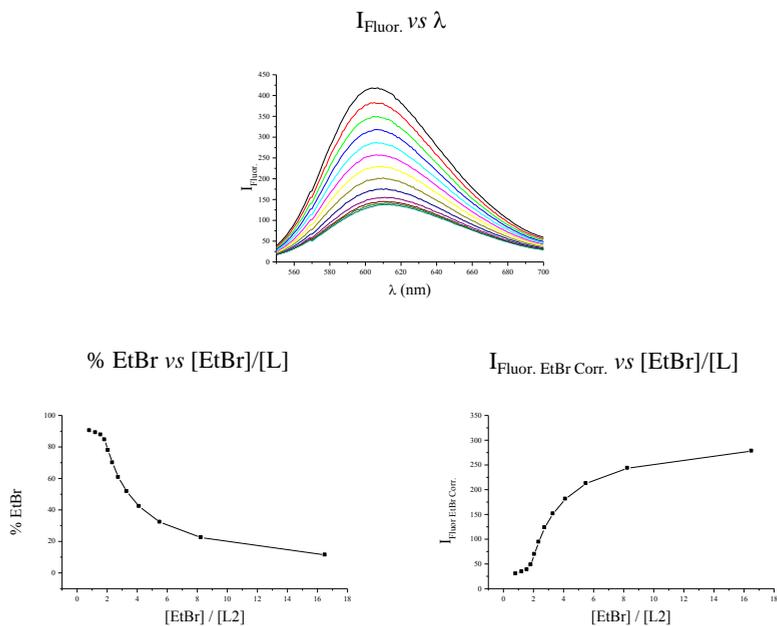


Figura 8.27.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly dA-poly dT ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) **L2** con relación molar $r_{[\text{polinucleótido}]/[\text{EtBr}]} = 0.3$ (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M) a pH 7.0.

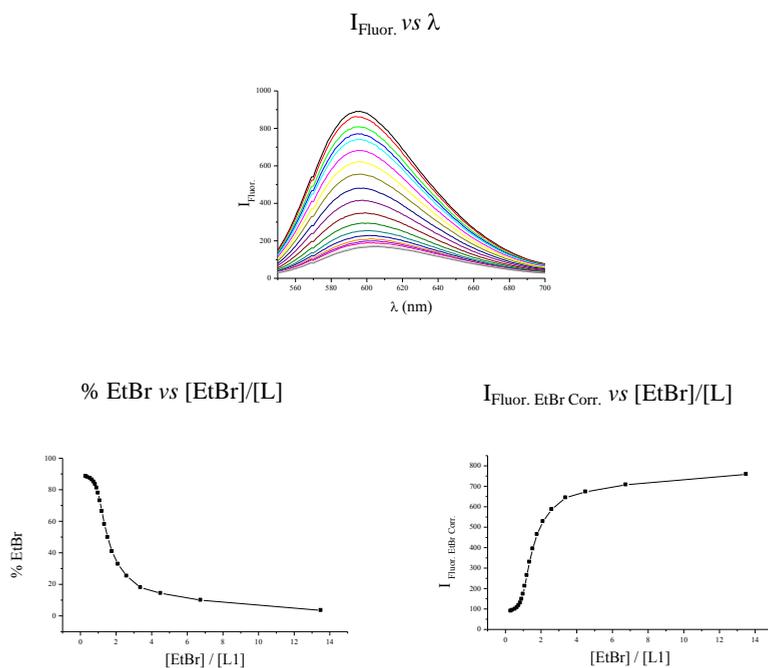


Figura 8.28.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly A-poly U ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) L1 con relación molar $r_{[\text{polinucleótido}]/[\text{EtBr}]} = 0.3$ (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M) a pH 7.0.

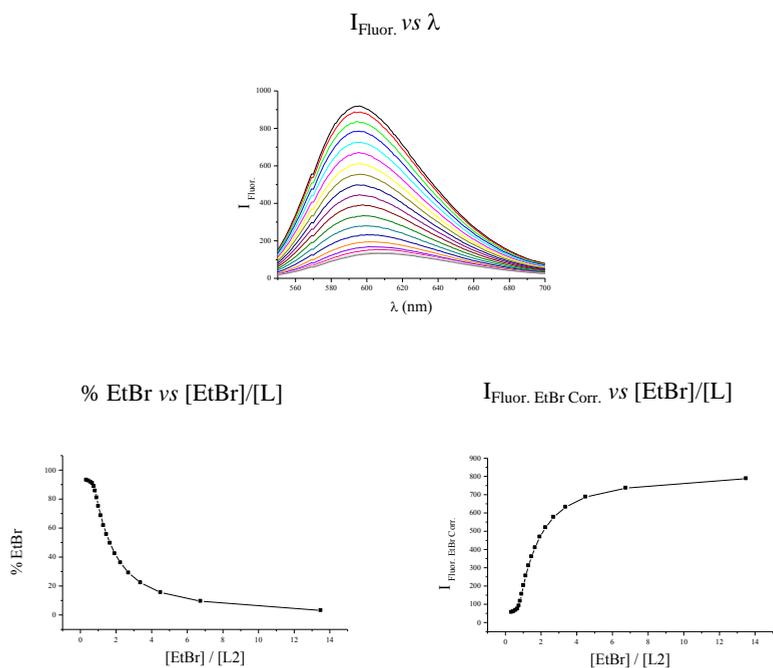


Figura 8.29.- Ensayos de desplazamientos de EtBr con poly A-poly U ($c = 9.0 \times 10^{-6}$ M) L2 con relación molar r $r_{[\text{polinucleótido}]/[\text{EtBr}]} = 0.3$ (tampón cacodilato, $I = 0.05$ M) a pH 7.0.

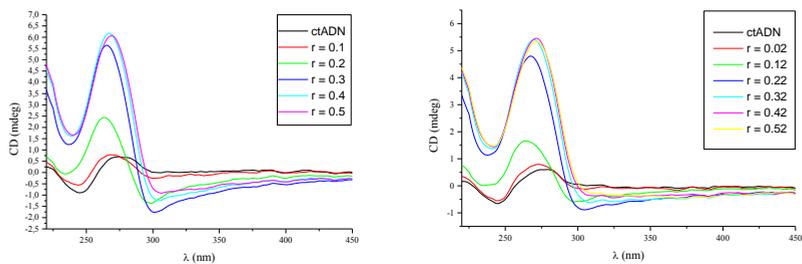


Figura 8.30.- Valoración de DC del ct-ADN ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con L1 a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 (izda) y pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

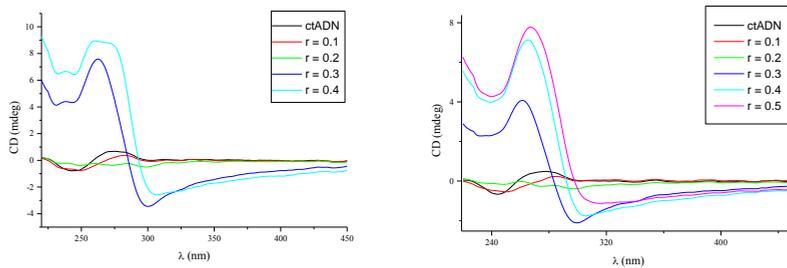


Figura 8.31.- Valoración de DC del ct-ADN ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con L2 a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 (izda) y pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

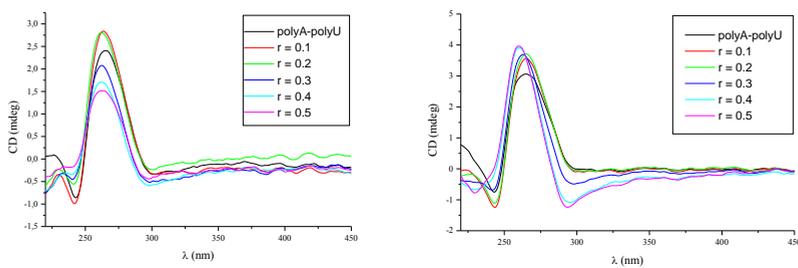


Figura 8.32.- Valoración de DC de los polímeros poly A-poly U ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con L1 a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 (izda) y pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

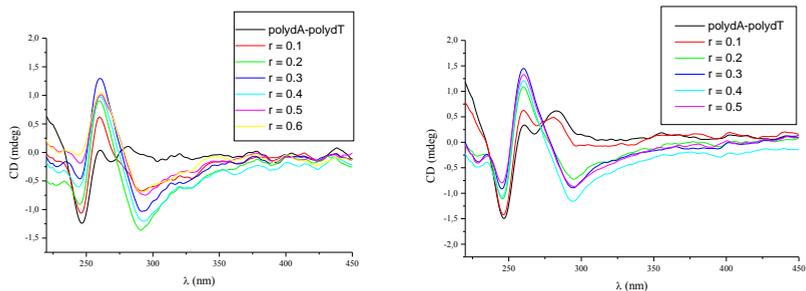


Figura 8.33.- Valoración de DC de los polímeros poly dA-poly dT ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con **L2** a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 (izda) y pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

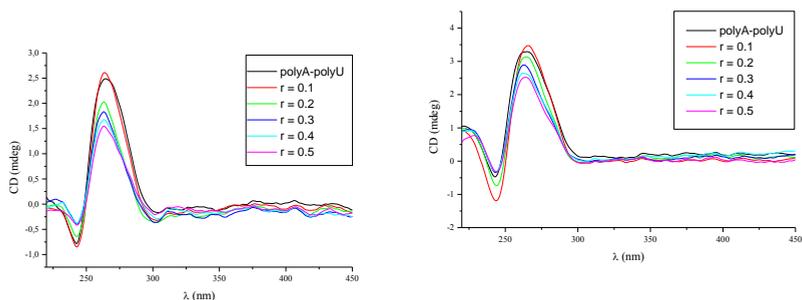


Figura 8.34.- Valoración de DC de los polímeros poly A-poly U ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con **L2** a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 (izda) y pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

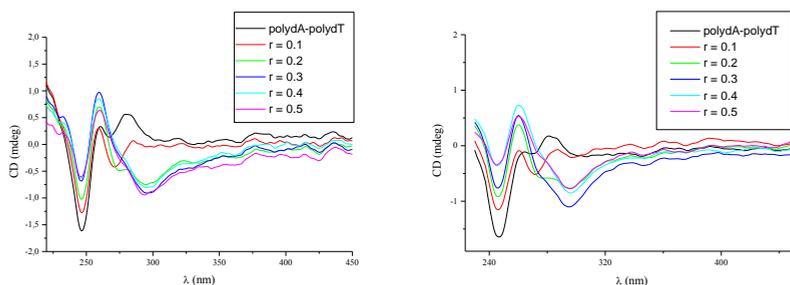


Figura 8.35.- Valoración de DC de los polímeros poly dA-poly dT ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ M) con **L2** a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 (izda) y pH 6.0 (dcha) en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

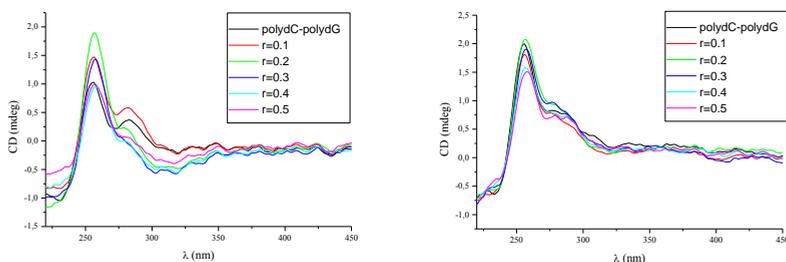


Figura 8.36.- Valoración de DC del polímero poly dC-poly dG ($c = 1.0 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) con **L1** (izda) y **L2** (dcha) a distintas relaciones molares $r = [\text{ligando}] / [\text{polinucleótido}]$ a pH 5.0 en tampón cacodilato, $I = 0.05$ M.

1 J. D. Watson, *La doble hélice. Relato personal del descubrimiento de la estructura del ADN*. Ed. Alianza, 2011.

2 a) L. Pauling y R. B. Corey, *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, 1953, **39**, 84; b) L. Pauling y R. B. Corey, *Nature*, 1951, **168**, 550; c) L. Pauling y R. B. Corey, *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1956, **65**, 164.

3 J. D. Watson y F. H. C. Crick; *Nature*, 1953, **171** (4356), 737.

4 T. E. Devlin, *Biochemistry with Clinical Correlations*, 6th Edition, John Wiley & Sons, 2004.

- 5 J. Hib y E. D. P. De Robertis, *Fundamentos de biología celular y molecular*. El Ateneo, 3ª Ed. 1998.
- 6 A. Ghosh y M. Bansal; *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 2003, **59**, 620.
- 7 A. G. Leslie, S. Arnott, R. Chandrasekaran y R. L. Ratliff; *J. Mol. Biol.*, 1980, **143** (1), 49.
- 8 R. Wing, H. Drew, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura y R. Dickerson; *Nature*, 1980, **287** (5784), 755.
- 9 a) S. Niedle; *Prog. Med. Chem.*, 1979, **16**, 151; b) C. A. Frederick, L. D. Williams, G. Ugheto, G. A. Van der Marel, J. H. Van Boom, A. Rich y A. H. Wang; *Biochemistry*, 1990, **29**, 2538.
- 10 a) G. Capanico y F. Zunino, *Molecular basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interactions*, eds Pullman B.; J. Jortner, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1990, 167; b) M. Duguet, C. Lavenot, F. Harper, G. Mirambeau y A. -M. de Recondo; *Nucleic Acids Research*, 1983, **11**, 1059.
- 11 L. Strekowski y B. Wilson; *Mutat. Res.*, 2007, **623**, 3.
- 12 a) R. C. Todd y S. J. Lippard, *Metallomics*, 2009, **1**, 280; b) Y. Jung y S. J. Lippard, *Chem. Rev.*, 2007, **107** (5), 1389; c) K. S. Lovejoy y S. J. Lippard, *Dalton. Tans.*, 2009, 10651.
- 13 a) P. Yang y M. Guo; *Coord. Chem. Rev.*, 1999, **185-186**, 211; b) M. M. Harding y G. Mokdsi, *Cur. Med. Chem.*, 2010, **7** (12), 1289; c) F. Caruso y M. Rossi, *Met. Ion Bio. Syst.*, 2004, **42**, 353.
- 14 a) J. H. Toney y T. J. Marks; *J. Am. Chem. Soc.*, 1985, **107**, 947; b) T. Nataume, S. Aizawa, K. Hatano y S. Funahashi; *J. Chem. Soc. Dalton. Trans.*, 1994, 2749.
- 15 G. S. Maining; *Q. Rev. Biophys.*, 1978, **11**, 179.
- 16 K. J. Edwards, T. C. Jenkins y S. Neidle, *Biochemistry*, 1992, **31**, 7104.
- 17 C. R. Cantor y P. R. Schimmel, *Biophysical Chemistry*, vol 3. W. H. Freeman y Co., San Francisco, 1980, 1109.

- 18 W. D. Wilson, Y. -H. Wang, C. R. Krishnamoorthy y J. C. Smith, *Biochemistry*, 1985, **24**, 3991.
- 19 I. Jarak, M. Kralj, I. Piantanida, L. Suman, M. Zinic, K. Pavelic y G. Karminski-Zamola, *Bior. Med. Chem.*, 2006, **14**, 2859.
- 20 a) J. Ramstein y M. Leng; *Biochim. Biophys. Acta*; 1972, **281**, 18; b) M. G. Badea y S. Georghiou; *Photochem. and Photobiol.*, 1976, **24**, 417; c) S. Georghiou; *Photochem. and Photobiol.*, 1977, **26**, 59.
- 21 (a) S. O. Kelley y J. K. Barton; *Science*, 1999, **283**, 375; b) S. A. E. Marras, F. R. Kramer y S. Tyagi; *Nucleic Acids Res.* 2002, **30**, 122.
- 22 a) G. Scatchard, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, **51**, 660; b) J. D. McGhee y P. H. von Hippel, *J. Mol. Biol.*, 1976, **103**, 679.
- 23 D. L. Boger, B. E. Fink, S. R. Brunette, W. C. Tse y M. P. Hedrick, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, **123**, 5878.
- 24 B. S. Palm, I. Piantanida, M. Žinić y H.-J. Schneider, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2000, 385.
- 25 A. Rodger y B. Norden, *Circular Dichroism and Linear Dichroism*, Oxford University Press, New York, 1997.
- 26 N. Berova, K. Nakanishi y R. W. Woody, *Circular dichroism Principles and Applications*, 2nd Ed., Wiley-VCH, New York, 2000.
- 27 M. Eriksson y B. Norden, *Methods in Enzymology* 2001, **340**, 68.
- 28 a) B. Norden y F. Tjerneld, *Biopolymers* 1982, **21**, 1713; b) R. Lyng, A. Rodger y B. Norden, *Biopolymers*, 1991, **31**, 1709; c) P. E. Schipper, B. Norden y F. Tjerneld, *Chem. Phys. Lett.* 1980, **70**, 17.
- 29 A. Sornosa-Tena, M. T. Albelda, J. C. Frías, E. García-España, J. M. Llinares, A. Budimir e I. Piantanida, *Org. Biomol. Chem.*, 2010, **8**, 2567.
- 30 R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Elsevier Academic Press, New York, 2004.
- 31 I. Jarak, M. Kralj, I. Piantanida, L. Suman, M. Zinic, K. Pavelic y G. Karminski-Zamola, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 2859.



Se ha dicho tantas veces que el problema de España es un problema de cultura. Urge, en efecto, si queremos incorporarnos a los pueblos civilizados, cultivar intensamente los yermos de nuestra tierra y de nuestro cerebro, salvando para la prosperidad y enaltecimiento patrios todos los ríos que se pierden en el mar y todos los talentos que se pierden en la ignorancia

Santiago Ramón y Cajal, premio Nobel de Medicina en 1906 por descubrir los mecanismos que gobiernan la morfología y los procesos conectivos de las células nerviosas.

Capítulo 9.- Conclusiones

Conclusions

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the International Doctorate.

Atención: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del Doctorado Internacional.

9.1.- Synthesis

The major achievement concerning the synthesis is to have designed a new family of polytopic receptors named with the term *double tail-tied scorpianids* consisting in two macrocyclic cores appended with a flexible arm which are connected through a coordination unit such as phenanthroline (**L2** and **L4**), pyridine (**L1**), bipyridine (**L3**) and squaramide (**L5**). Moreover, it has been extended the synthesis of *pytren scorpianid* family with a new ligand (**L6**). Indeed, all ligands have been fully characterized with different techniques such as NMR, mass spectroscopy and elemental analysis.

It is also remarkable that the synthesis of these ligands has been scale up to hundreds of milligram amounts.

9.2.- Acid-base properties

The protonation constants for the five *double tail-tied scorpianids* (**L1-L5**) and the *scorpianid* (**L6**) have been determined by potentiometric, UV-Vis and fluorimetric studies (tables 5.1 and 5.3).

Further insight into the protonation was made by means of NMR titrations. The data obtained are qualitative because the protonation equilibria are fast and therefore the NMR signals represent an average of all states that are present in solution in the pH conditions in which the samples were prepared.

From these data the following approximate protonation rule has been established for the double tail-tied scorpianids: The first four protonations occur more extensively in the secondary amines of the macrocycles cores alternatively in each macrocyclic cavity, i.e. the first protonation in one macrocycle following by the second protonation in the another one, the third protonation in one of the protonated macrocycle and the fourth in the remaining secondary amine. The fifth and sixth protonations should occur at the secondary amines in the arms. Finally, the seventh protonation is in the

coordinated unit (phenanthroline or bipyridine). Furthermore, the data suggest the formation of different intramolecular hydrogen bonds between protonated and non-protonated sites and the pyridine in the intermediate protonation sites although, as it is commented, the protonation steps occurs more extensively in the sequence proposed.

Moreover, the photophysical measurements indicate that the seventh protonation involves a change in absorption and fluorescence denoting that this step is in the connecting unit (phenanthroline and bipyridine).

Molecular dynamic calculations suggest that **L1** and **L2** present two major different families of conformers, i) a family with more closed conformations that is observed for protonation degrees from 0 to 5 and ii) a family with more open conformations for higher protonation degrees (Figure 5.6). In the closed conformations, intramolecular hydrogen bond networks involving the protonated ammonium groups at each state as hydrogen bond donors and the deprotonated amino groups and the pyridine nitrogen atoms are observed. The composition and number of hydrogen bonds would be changing from one protonation state to another. π - π Stacking between the central connecting unit and the pyridine rings is also observed in the closed conformation.

9.3.- Metal complexation

9.3.1.- Zinc complexation

The speciation of ligands **L1**, **L2**, **L3** and **L6** with Zn^{2+} has been studied by potentiometry and the equilibrium constants have been determined (table 6.1). Moreover, crystal structure of binuclear zinc complex of **L1** has been obtained giving valuable information about the coordination characteristics of the complex in the solid state. In addition, NMR and fluorescence experiments have been performed of the different complexes of **L2** in order to obtain information about the mode of coordination of Zn^{2+} in the complex.

All the studied ligands form mono- and binuclear complexes with different stoichiometries in the whole pH range of study (pH 3-11). Additionally trinuclear complexes have been observed for **L1**, **L2** and **L3**. All these ligands display very strong affinity for Zn^{2+} . The distribution diagrams show that the nuclearity of the species formed depends very much on the Zn^{2+} -ligand molar ratio.

The constants obtained for the mononuclear complexes rank from 19.8 to 12.6 logarithmic units. Taking into account all the data, it can be suggested that the binding of the metal in the ZnL1^{2+} species is likely involving the four nitrogens of the macrocyclic unit, the secondary nitrogen of the tail and the pyridine nitrogen of the linker. In the case of ZnL2^{2+} , however, the metal ion would be pentacoordinated by the four nitrogen atoms of the macrocycle and the secondary nitrogen atom of the linker. For the coordination of **L3** and **L6**, the ZnL^{2+} species is involving the four nitrogens of the macrocyclic cavity.

Concerning the binuclear complexes, in all systems formation of binuclear complexes is observed above pH 4 for $\text{Zn}^{2+}:\text{L}$ 2:1 molar ratio. The much lower stepwise value obtained for the formation of $\text{Zn}_2\text{L1}^{4+}$, indicates that the binding of the second metal ion will either involve a lower number of nitrogens than in **L2** or will require of a molecular re-organisation of the coordination sphere implying breaking and bond formation. From the crystal structure of $\text{Zn}_2\text{L1}^{4+}$ we can conclude that the second metal ion coordinates the four nitrogens of the macrocyclic cavity and the nitrogens of the arm. For the metal coordination of $\text{Zn}_2\text{L2}^{4+}$, we can suggest that both metal ions coordinate each macrocyclic cavity and the nitrogen of the arm. In the case of binuclear **L3** complex, we can suggest that both metal ions coordinate only the four nitrogens of the macrocycle. Finally, for 2:1 $\text{Zn}^{2+}:\text{L6}$ mole ratio the second metal has to necessarily coordinate the phenanthroline unit

Trinuclear complexes are observed above pH ca. 8 for 3:1 Zn^{2+} ligand molar ratios for **L1**, pH ca. 9 for **L2** and pH ca. 4 for **L3**. In all these trinuclear complexes, the third Zn^{2+} coordinates the connecting unit (pyridine for **L1**, phenanthroline for **L2** and bipyridine for **L3**).

Regarding **L6**, we have studied the formation of zinc complexes by UV-Vis and fluorescence stopped-flow techniques. The data show for formation of ZnL6^{2+} the presence of a molecular reorganisation in three steps, the first one being the coordination to the phenanthroline with a $k_{\text{obs}} = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, followed by the slow movement of the metal to the polyamine macrocycle and a final possible re-arrangement to coordinate the pendent arm. The kinetics of this movement can be fitted in a two step process according to a bi-exponential process with rate constants of 0.005 and 0.001 s^{-1} .

9.3.2.- Copper complexation

In order to check the thermodynamic properties the coordination mode of polytopic ligands **L1**, **L2**, **L3** and **L4** with Cu^{2+} , we have carried out potentiometric studies. As well to get further information about the coordination mode of the binuclear Cu^{2+} complexes, paramagnetic ^1H NMR spectra have been performed for solutions containing Cu_2L^{4+} complexes as major species.

The pH-metric titrations show formation of mono- and binuclear species for all cases. Furthermore, a trinuclear species is detected in solution for **L1**, **L2** and **L3**. The distribution diagrams show that the nuclearity of the species formed depends very much on the Cu^{2+} -ligand molar ratio.

Regarding the mononuclear complexes, the first aspect that deserves to be commented on is the significant difference in stability between the CuL^{2+} complexes of the ligands. Taking into account the stability constant values for the formation of the CuL1^{2+} complex and the crystal structures obtained for the Cu^{2+} complexes of precursors, it can be suggested that the binding of the metal in the CuL1^{2+} species is likely involving the four nitrogens of the macrocyclic unit, the secondary nitrogen of the tail and the pyridine nitrogen of the linker. In the case of CuL2^{2+} , however, the metal ion would be pentacoordinated by the four nitrogen atoms of the macrocycle and the secondary nitrogen atom of the linker. Concerning to **L3** and **L4**, it can be suggested that the metal ion coordinates the four nitrogens from the macrocyclic cavity.

The stepwise constants for the formation of the binuclear complexes (Table 6.5) show the different cooperative formation processes. The value obtained for the formation of $\text{Cu}_2\text{L1}^{4+}$ and the paramagnetic studies indicate that the binding of the second metal ion will either involve a lower number of nitrogens than in **L2** or will require of a molecular reorganisation of the coordination sphere, implying bond breaking and formation. In the case of binuclear **L3** and **L4** complexes, we can suggest that both metal ions coordinate only the four nitrogens of the macrocycle.

Trinuclear complexes are observed in the whole pH range above pH ca. 3 for 3:1 Cu^{2+} -ligand molar ratios. The constants for coordination of the third metal ion is similar to the constants obtained for copper coordination in phenanthroline and bipyridine units and the paramagnetic experiments with solutions containing Cu_3L^{6+} suggest that the coordination of the third metal ion involves the connecting unit.

9.3.3.- Molecular reorganisations in Cu²⁺ complexes with polytopic ligands.

A kinetic study has been performed on the formation and decomposition processes with the polytopic ligands **L1** and **L2**. In both cases, the spectral changes obtained during the decomposition of the intermediate reveal a statistically controlled kinetic, where the first metal center dissociates with a rate constant that is twice as large as the corresponding to the second one.

The statistically controlled kinetics has been observed for the formation and decomposition processes with receptor **L1** clearly indicates that both scoriand sub-units of **L1** behave independently during complex formation and decomposition (rate constants in chapter 6).

The results obtained for the Cu²⁺-**L2** system reveal that metal centers follow well defined routes for their movement through the polytopic ligand. The coordination of the first metal ion occurs with the initial formation of a species coordinated to phenanthroline and a final species were the metal ion coordinates the macrocycle cavity. In the binuclear complex, the second metal ion coordinates first the phenanthroline unit to be finally in the macrocycle. As regards to trinuclear complex, the third metal ion coordinates the phenanthroline that is the only available unit to coordinate.

9.3.4.- Manganese complexation

The speciation of ligands **L1**, **L2** and **L3** with Mn²⁺ has been studied by potentiometry and the equilibrium constants have been determined (table 6.9). The pH-metric titrations show formation of mono- and binuclear species for all cases and the distribution diagrams show that the nuclearity of the species formed depends very much on the Mn²⁺- ligand molar ratio.

9.3.5.- SOD mimics of Cu²⁺ and Mn²⁺ complexes

The SOD activity has been assayed by nitroblue tetrazolium assay for the mono- and binuclear complexes of Cu²⁺ and Mn²⁺ complexes for **L1**, **L2**, **L3** and **L5**. The data show for Cu²⁺ complexes, the highest activity of the trinuclear systems due to the insaturation of the coordination sphere. The binuclear systems show high/medium activity and the mononuclear systems show low activity.

Concerning to Mn^{2+} complexes, it is observed that the activity of binuclear systems are higher than mononuclear systems and that they are comparable to the best MnSOD mimics in literature.

9.4.- Interaction with nucleotides and polyphosphate anions

9.4.1.- Interaction with nucleotides and polyphosphate anions of L1 and L2

Interaction of **L1** and **L2** with PPI, TPP, ATP, AMP, GMP, CMP and UMP has been followed by potentiometric studies, 1H and ^{31}P NMR spectroscopy and molecular dynamic analysis. For all the studied systems only anion-ligand adducts of 1:1 stoichiometry have been found. The adducts prevail in a wide pH range for all the studied systems as can be noted from the distribution diagrams.

The stability constants clearly show that **L2** interacts stronger with TPP, ATP and PPI than with nucleotides monophosphates. Furthermore, **L1** interact with all anions with comparable effective constants (figure 7.14). The formation of more stable adducts for each systems is due to the maximization of electrostatic and π - π stacking interactions.

1H NMR spectra coupled with molecular dynamic studies provide interesting structural insights about the interaction of nucleotides with **L1** and **L2**. Both ligands show formation of π - π stacking between nucleobase and phenanthroline (**L2**) or pyridines (**L1**). Furthermore, the phosphate chain is placed between the macrocyclic rings so that maximum electrostatic interaction is achieved with the positive charges of the ligands.

9.4.2.- Formation of mixed complexes Zn^{2+} -ligand-A

We have studied the interaction of the Zn^{2+} complexes of **L1** and **L2** with PPI, TPP and ATP by pH-metric experiments. For each system Zn^{2+} -L-A, the formation of mono-, bi- and trinuclear species depend on the molar ratio used.

The distribution diagrams show that the mixed complexes predominate throughout a wide pH range. Binary anion-receptor complexes are only observed at acidic pH values where the zinc complexes are not yet formed. Also disruption of the ternary complexes is observed for Zn^{2+} :**L** 3.1 molar ratio

at basic pH values, where the hydroxo anions compete with ATP for binding to the anion. In general, ATP, P_i and TPP are bound preferentially by the ZnL₂ complexes.

Furthermore, it can be seen that although the addition of the metal ion favours the complexation of the anion at basic pH values, the percentages of anion complexation are quite close in the remaining pH window. As above mentioned, only at the acidic pH values in which formation of Zn²⁺ complexes does not occur, the binary species anion-L predominate.

These results support the high coordination numbers inferred from the speciation studies for the Zn²⁺ complexes. In these complexes, the nitrogen atoms will either fully or almost fully occupy the coordination spheres and there is no available room for new ligands to get close to the metal and therefore, the interaction with the anion should mainly be of charge to charge nature. It is only for the trinuclear complexes where significant differences in the amounts of complexed anionic species are found for the free and complexed systems. This can be ascribed to the fact that there are not enough nitrogen atoms to saturate the coordination sphere of the third metal ion. Nevertheless, as the metal complex almost quantitatively complex the anions in the form of mixed species, this should represent a new binding mode that can be of relevance in various respects, one of them the likely interaction of these systems with nucleic acids, which we are currently exploring.

Finally, the interaction of Zn₂L₂⁴⁺ complex with nucleotides has been studied by fluorescence titrations. The data suggest the higher interaction with P_i, TPP and ATP than with other nucleotides (GTP, GDP, CTP, CDP, UTP and UDP). The explanation can be easily rationalized by considering adduct formed with higher interactions between the anion and Zn₂L₂⁴⁺ complex.

9.5.- Interaction with nucleic acids

We have studied the interaction of L₁ and L₂ with nucleic acids by thermal denaturation, circular dichroism and fluorescence techniques.

The data show a clear pH dependent tendency of ΔT_m and K_s values pointed toward important impact of the number of protonation-controlled positive charges of L₁ and L₂ on the stabilization of DNA/RNA as well as on their affinity. However, the absence of pH-dependence in CD experiments revealed that the protonation state of compounds within the pH=5-7 range has

no significant impact on the structural features of the binding mode. All applied methods consistently support binding of **L1** and **L2** within the DNA minor groove, whereby at high ratios $r > 0.2$ both compounds form dimmers. However, the steric and binding properties of DNA minor groove significantly influence the dimer formation, being much more efficient at AT- than at GC-DNA, most likely due to the negative impact of protruding amino groups of guanine of the latter DNA. Most intriguingly, for ds-RNA analogue poly A - poly U only **L1** showed dimer-characteristic bisignate ICD band at 294 nm, very similar to ICD bands observed for **L1**/AT-DNA. Since the very broad and shallow minor groove of ds-RNA is not suitable for the accommodation of small molecules, binding of **L1** within RNA major groove can be assumed. Intriguingly, **L1** revealed very pronounced ds-RNA over ds-DNA selectivity in affinity (K_s , IC_{50} values) and thermal stabilisation effects (ΔT_m). Although bisignate ICD bands suggest dimerization of **L1** within the DNA/RNA grooves, and the width of AT-DNA minor groove (3.8 Å) and AU-RNA major groove (3.3 Å) are similar, obviously much deeper AU-RNA groove (13.5 Å) in comparison to ds-DNA (7.5-8.5 Å) allowed more efficient binding interactions of **L1** dimer, thus yielding the mentioned RNA over DNA selectivity. Less pronounced RNA over DNA selectivity of **L2**, could be correlated to the family of compounds which switch binding mode from minor groove binding (ds-DNA) to intercalation (ds-RNA). Namely, absence of any bisignate ICD bands with ds-RNA excluded major groove located dimer formation and the phenanthroline (unlikely pyridine of **L1**) is a well-known intercalator.

The antiproliferative activity of cyclic amine derivatives **L1** and **L2** was significantly improved in respect with previous generation of tripodal linear polyamines, which proved our presumption about the essential role of masking of the positive charges and increasing hydrophobicity on the efficient cellular uptake. This finding will guide the design and future studies on RNA vs. DNA selective polyamine analogues.