



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Química
Departamento de Química Inorgánica

Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas

Tesis Doctoral

Memoria para la obtención del título de Doctor en Nanociencia y
Nanotecnología por la Universidad de Valencia

Doctorando

Mario Alfonso Inclán Nafría

Directores

Enrique García-España Monsonís
M^a Teresa Albelda Gimeno

2016

Valencia, España

D. Enrique García-España Monsonís, catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia y **D^a. María Teresa Albelda Gimeno**, del Grupo de Investigación Biomédica en Imagen, del IIS La Fe de Valencia

CERTIFICAN

Que la presente memoria, titulada «Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas», ha sido realizada bajo su dirección en la Universidad de Valencia por el licenciado Mario Alfonso Inclán Nafría y que, encontrándose concluida, 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.

en Paterna, a 28 de diciembre de 2015

Enrique García-España Monsonís

M^a Teresa Albelda Gimeno

D. Mario Alfonso Inclán Nafría, Licenciado en Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia, presenta esta Memoria con el título «Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas», en el marco del programa de doctorado en Nanociencia y Nanotecnología (RD 1393/2007) con el fin de optar al título de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Paterna a 28 de diciembre de 2015.

Mario Alfonso Inclán Nafría

Agradecimientos

Esta tesis representa la culminación de muchos años de trabajo, dedicación y esfuerzo. Pero no sólo de mi parte. Este trabajo no hubiera sido posible sin la participación y el apoyo de mucha gente que me ha acompañado a lo largo del camino y a la que ahora tengo la oportunidad de agradecer.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Enrique y Teresa. A ambos lo conocí siendo yo un estudiante de Licenciatura, de ellos aprendí y por ellos me interesé en la investigación científica. Tuvieron la confianza de aceptarme en el Grupo de Química Supramolecular, el empeño en formarme como investigador y, finalmente, la paciencia de leer y revisar con diligencia esta tesis. A ambos les estoy sumamente agradecido.

Quiero también dar las gracias a Stephanie, que camina conmigo en este sendero de la vida haciendo que cada paso valga la pena. Por su apoyo incondicional y su paciencia en los momentos más difíciles. A ella va dedicada esta tesis.

A mis padres y a mi hermana, que siempre estuvieron allí para levantarme y darme ánimos en cada obstáculo que encontré. A mis sobrinas, Sofía y Jimena, por hacer que el mundo sea más bonito.

Y no puedo olvidarme de todos los compañeros del Grupo de Química Supramolecular. Los que están ahora y los que estuvieron antes. De todos he aprendido algo.

Finalmente quiero agradecer el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación, cuya financiación a través del programa Consolider ha hecho posible esta investigación. Y a los grupos que han participado en el proyecto Supramed y cuya colaboración ha enriquecido este trabajo.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Química supramolecular aplicada a la medicina	3
1.1.1. Breve historia de la química médica. De la alquimia a la química supramolecular.	3
1.1.2. Aproximación supramolecular a la química médica	6
1.2. Aplicaciones biomédicas de las poliaminas	19
1.2.1. Poliaminas en los sistemas biológicos.....	20
1.2.2. Los ácidos nucleicos como dianas supramoleculares de poliaminas sintéticas	23
1.2.3. Agentes antitumorales basados en poliaminas	29
1.2.4. Sensores basados en poliaminas para sustratos de interés biológico.....	38
1.2.5. Compuestos poliamínicos como miméticos de la superóxido dismutasa.....	42
1.2.6. Poliaminas con actividad tripanocida y leishmanicida.....	53
1.3. Regulación alostérica. Escorpiandos.....	59
1.3.1. Movimientos moleculares: ligandos poliamínicos de tipo escorpiando	63
2. Objetivos	67
3. Nomenclatura	73
3.1. Nomenclatura sistemática de los fanos	75
3.1.1. Nomenclatura sistemática de los escorpiandos	77
3.2. Nomenclatura simplificada	78
4. Material y métodos.....	81
4.1. Potenciometría.....	83
4.1.1. Fundamento teórico.....	83

4.1.2. Sistema potenciométrico	84
4.1.3. Adquisición y tratamiento de los datos	86
4.2. Espectroscopía de absorción UV-Vis y de emisión de fluorescencia.....	88
4.2.1. Estudios de interacción con aniones de interés biológico	89
4.2.2. Determinación de la estequiometría por el método de Job....	90
4.2.3 Rendimientos cuánticos y tiempos de vida media.....	92
4.2.4. Desnaturalizaciones térmicas	93
4.2.5. Estudios de desplazamiento de bromuro de etidio	95
4.3. Determinación de constantes de estabilidad mediante métodos espectroscópicos.....	96
4.3.1. Sistemas de estequiometría conocida	96
4.3.2. Sistemas ligando-polinucleótido	97
4.4. Dicroísmo circular.....	100
4.5. Viscosimetría.....	101
4.6. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear.....	103
4.7. Estudios cinéticos	104
4.7.1. Procedimiento.....	105
4.7.2. Tratamiento de los datos.....	106
4.8. Electroquímica.....	107
4.9. Estudios teóricos.....	108
4.10.1 Estudios de interacción con mononucleótidos.....	108
4.10.2. Estudios de interacción con la FeSOD	108
4.10 Estudios biológicos.....	110
4.8.1. Evaluación de las propiedades antitumorales.....	110
4.8.2. Estudios sobre la actividad superóxido dismutasa en bacterias	113
4.8.3. Determinación de la actividad tripanocida y leishmanicida	114
5. Síntesis	117
5.1. Procedimientos generales de síntesis.....	119

5.1.1. Tosilación.....	119
5.1.2. Ciclación.....	121
5.1.3. Alargamiento.....	122
5.1.4. Detosilación.....	123
5.1.6. Funcionalización	124
5.2. Síntesis de los derivados de L	126
5.2.1. Síntesis de L-A	126
5.2.2. Síntesis de L-P	128
5.2.3. Síntesis de L-S	129
5.3. Síntesis de los derivados de LI	130
5.3.1. Síntesis del LI-A	130
5.3.2. Síntesis de LI-P	132
5.3.3. Síntesis del LI-2Py	133
5.3.4. Síntesis del LI-4Py	134
5.3.5. Síntesis del LI-2Q	135
5.3.6. Síntesis del LI-Acr	136
5.4. Síntesis de los ligandos politópicos.....	138
5.4.1. Síntesis del TPA-L₃	138
5.4.2. Síntesis del L-O	140
6. Estudios de protonación e interacción con metales de transición	141
6.1. Propiedades ácido-base	143
6.1.1. Ligandos derivados de la poliamina L	143
6.1.2. Ligandos derivados de la poliamina LI	152
6.1.3. Ligandos politópicos	158
6.2. Interacción con metales de transición	162
6.2.1. Ligandos derivados de la poliamina L	162
6.2.2. Ligandos derivados de la poliamina LI	167
6.2.3. Estudios con otros metales de transición.....	173
6.2.4. Ligandos politópicos	179

7. Interacción con aniones de interés biológico.....	187
7.1. Interacción con mononucleótidos.....	190
7.1.1. Estudios potenciométricos.....	193
7.1.2. Estudios de resonancia magnética nuclear	201
7.1.3. Estudios fotoquímicos	207
7.1.4. Estudios teóricos.....	212
7.2 Interacción con ácidos nucleicos monohebra	215
7.2.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	216
7.2.2. Espectroscopia emisión de fluorescencia	218
7.3 Interacción con ácidos nucleicos de doble hebra	221
7.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis.....	222
7.3.2. Espectroscopia de emisión de fluorescencia	225
7.4 Modulación de la interacción. Efecto alostérico	227
7.4.1. Movimientos moleculares	228
7.4.2. Estudios espectroscópicos con ML^{2+} y polinucleótidos de doble hebra.....	231
7.4.3. Desnaturalizaciones térmicas	235
7.4.4. Dicroísmo circular	236
7.4.5. Desplazamiento del indicador fluorescente.....	238
7.4.6. Viscosimetría.....	240
7.5 Actividad biológica y modulación de la citotoxicidad	242
8. Miméticos de la superóxido dismutasa.....	251
8.1. Electroquímica.....	254
8.2. Estudios cinéticos	257
8.3. Actividad biológica	260
9. Actividad antiparasitaria.....	265
9.1. Actividad antiparasitaria.....	267
9.1.1. Actividad antichagásica.....	267
9.1.2. Actividad leishmanicida	271
9.2. Propiedades farmacocinéticas	274

9.3. Estudios teóricos sobre la inhibición de la FeSOD	276
10. Conclusiones	279
10.1. Síntesis	281
10.2. Comportamiento ácido-base y formación de complejos metálicos	282
10.2.1. Propiedades ácido-base	282
10.2.2. Formación de complejos metálicos	283
10.3. Interacción con aniones de interés biológico	285
10.3.1. Interacción con mononucleótidos.....	285
10.3.2. Interacción con ácidos nucleicos monohebra	286
10.3.3. Interacción con ácidos nucleicos de doble hebra	286
10.3.4. Efecto alostérico.....	287
10.4. Actividad como mimético de la superóxido dismutasa.....	289
10.5. Actividad antiparasitaria	290
Bibliografía	291
Anexos	

Índice de tablas

Tabla 1.1. Intervalo de valores aproximado para las energías de disociación de los distintos tipos de enlace no covalente.....	10
Tabla 1.2. Estudios de temperatura de fusión de los ligandos 7 y 8 con poli(A)–poli(U) y poli(dA)–poli(dT)	32
Tabla 1.3. Potenciales redox y actividad SOD de algunos complejos de manganeso descritos en esta tesis.....	52
Tabla 1.4. Actividad <i>in vitro</i> , toxicidad e índice de selectividad (SI) frente a las formas extracelular e intracelular de <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
Tabla 3.1. Abreviaturas empleadas en la nomenclatura simplificada. ...	79
Tabla 4.1. Descripción de los componentes del sistema potenciométrico.	85
Tabla 4.2. Equipos de espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia utilizados.	88
Tabla 4.3. Coeficientes de extinción molar de los polinucleótidos utilizados.	90
Tabla 4.4. Ejemplo de disoluciones preparadas para la determinación de la estequiometría mediante el método de Job.....	91
Tabla 4.5. Relación entre los parámetros de ajuste y las variables físicas.	99
Tabla 6.1. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, de los compuestos L , L-A , L-P y L-S	145
Tabla 6.2. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, de los compuestos L1 , L1-A y L1-P	153
Tabla 6.3. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, de los compuestos L1-2Py , L1-4Py , L1-2Q y L1-Acr	154
Tabla 6.4. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, del compuesto L-O	159
Tabla 6.5. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, del compuesto TPA-L₃	160
Tabla 6.6. Constantes de complejación de Cu ²⁺ para L , L-A y L-S en unidades logarítmicas.....	163

Tabla 6.7. Distancias y ángulos de enlace seleccionados para la estructura $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$	165
Tabla 6.8. Constantes de complejación de Mn^{2+} para L , L-A y L-S en unidades logarítmicas.....	166
Tabla 6.9. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Cu^{2+} de distintos derivados de LI	168
Tabla 6.10. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Mn^{2+} de distintos derivados de LI	171
Tabla 6.11. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Zn^{2+} de L-A , LI-A , LI-Pir y LI-2Q	174
Tabla 6.12. Constantes de complejación de Fe^{2+} para los ligandos LI-2Py y LI-4Py en unidades logarítmicas.....	176
Tabla 6.13. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Zn^{2+} con el ligando L-O	180
Tabla 6.14. Distancias y ángulos de enlace seleccionados para la estructura $[\text{Zn}(\text{L-O})(\text{ClO}_4)_2]$	182
Tabla 6.15. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Mn^{2+} con TPA-L₃	183
Tabla 7.1. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre L-A y ATP, ADP y AMP.....	194
Tabla 7.2. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre LI-A y ATP, ADP y AMP.....	195
Tabla 7.3. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre LI-2Py y ATP, ADP y AMP.....	195
Tabla 7.4. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre LI-4Py y ATP, ADP y AMP.....	196
Tabla 7.5. Rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia de los receptores L-A y LI-A libres y complejados con ATP y GTP.....	211
Tabla 7.6. Efecto hipocrómico (%H), desplazamiento del máximo de absorción, número de pares de bases ocluidos por cada molécula de ligando unida (N) y constantes de estabilidad (K).....	224
Tabla 7.7. Valores de pK para los cambios conformacionales inducidos por un gradiente de pH o por la presencia de cationes metálicos.....	231
Tabla 7.8. Efecto hipocrómico (%H) y desplazamiento del máximo de absorción para L-A y $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$	234
Tabla 7.9. Variación de las temperaturas de fusión a diferentes relaciones molares y pHs.....	236
Tabla 7.10. Valores de IC_{50} para los compuestos L-A , LI-A y LI-P	243
Tabla 8.2. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Mn^{2+}	257

Tabla 9.1. Actividad <i>in vitro</i> , toxicidad e índice de selectividad (SI) frente a las formas extracelular e intracelular de <i>Trypanosoma cruzi</i> . .	268
Tabla 9.2. Actividad <i>in vitro</i> , toxicidad e índice de selectividad (SI) frente a las formas extracelular e intracelular de <i>L. infantum</i> , <i>L. braziliensis</i> y <i>L. donovani</i>	272
Tabla 9.3. Biodisponibilidad oral y propiedades ADMET.....	275

Índice de figuras

Figura 1.1. “El Alquimista”, obra del pintor flamenco David Teniers el Joven.	4
Figura 1.2. Los científicos que impulsaron el desarrollo de la química supramolecular.	9
Figura 1.3. Modelo de las interacciones no covalentes en las que intervienen anillos aromáticos.	11
Figura 1.4. Representación esquemática de la hipótesis de la “llave y cerradura” desarrollada por Fischer.	12
Figura 1.5. (A) Estructura cristalina del fármaco Zanamivir (Relenza) en una enzima del virus de la influenza. (B) Esquema de las interacciones intermoleculares de la droga con el centro activo de la enzima	14
Figura 1.6. Estructura de la β -ciclodextrina e ilustración esquemática del modo de complejación por inclusión.	15
Figura 1.7. (A) Autoensamblaje de péptidos cíclicos para formar nanotubos a través de una red de enlaces de hidrógeno. (B) Interferencia de los nanotubos en la membrana celular.	16
Figura 1.8. (A) Adhesión del virus de la influenza a una célula huésped mediante interacción multivalente. (B) Inhibición de la interacción por la acción de un polímero funcionalizado con múltiples unidades de AS.	18
Figura 1.9. Ejemplos de poliaminas biogénicas. Los términos subrayados corresponden a aquellas poliaminas sintetizadas por los mamíferos	20
Figura 1.10. Interacción de la poliamina biogénica espermina con el surco mayor del (A) ADN y (B) ARN	22
Figura 1.11. (A) Estructura cristalina de un oligonucleótido de ADN. (B) Estructura cristalina del complejo formado por la droga antitumoral netropsina y ADN	24
Figura 1.12. (A) Estructura tridimensional de tARN de levadura. (B) Molécula de paromomicina unida a un segmento de la estructura cristalina del ARN del VIH.	25
Figura 1.13. Esquema del intercalador clásico proflavina y estructura cristalina del complejo formado con un hexámero de ADN.	26

Figura 1.14. Ejemplos de agentes intercalantes del tipo <i>threading intercalator</i>	27
Figura 1.15. Estructura cristalina del complejo formado por la droga anticancerígena daunomicina con el ADN del protozoo <i>Trypanosoma brucei</i>	28
Figura 1.16. Ejemplos de poliaminas sintéticas de cadena abierta con actividad antitumoral.....	30
Figura 1.17. Diagrama representando la relación entre afinidad con poli(A)-poli(U) y el número de cargas positivas.....	31
Figura 1.18. Ejemplos de poliaminas de cadena abierta selectivas por ARN frente a ADN.....	32
Figura 1.19. Derivados naftalimídicos de las poliaminas biogénicas espermina y espermidina. Derivado de la droga etopósido con la poliamina espermina.....	33
Figura 1.20. Ejemplos de bis- y tris-intercalantes basados en poliaminas.	34
Figura 1.21. Poliazamacrociclos modificados con grupos intercalantes.....	35
Figura 1.22. Ejemplos de compuestos de tipo poliazaciclofano.	37
Figura 1.23. Representación esquemática del diseño de un quimiosensor óptico mediante la unión de un receptor a un elemento óptico de señalización.	39
Figura 1.24. Esquema del reconocimiento de un analito mediante bloqueo del proceso PET.....	40
Figura 1.25. Ejemplos de sensores fluorescentes basados en el fenómeno de la transferencia electrónica fotoinducida.	41
Figura 1.26. Centros activos de las superóxido dismutasas MnSOD, CuZnSOD y NiSOD.....	44
Figura 1.27. Reacción de dismutación del radical superóxido.....	46
Figura 1.28. Superficies de potencial electrostático del túnel de acceso al centro activo de las enzimas (A) MnSOD humana y (B) FeSOD de <i>T. brucei</i>	47
Figura 1.29. Ejemplos de miméticos de la MnSOD.....	48
Figura 1.30. Ligandos poliamínicos utilizados en la preparación de miméticos de SOD.	49
Figura 1.31. Mn ^{II} (pentaazaciclopentadecano) y sus derivados.	50
Figura 1.32. Complejos de tipo escorpiando con actividad SOD.....	50
Figura 1.33. Ligandos de tipo escorpiando cuyos complejos de Mn ²⁺ presentan actividad SOD.	51
Figura 1.34. Compuestos comerciales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	54

Figura 1.35. Derivados de escuaramidas N,N'-disustituídas estudiados como agentes tripanocidas	55
Figura 1.36. Compuestos macrocíclicos y macrobicíclicos con unidades de pirazol estudiados como antiparasitarios.....	56
Figura 1.37. Ejemplos de poliaminas de tipo escorpiando con actividad tripanocida.....	57
Figura 1.38. Representación esquemática del principio de regulación alostérica	59
Figura 1.39. Estructuras de la proteína reguladora de peróxido en su conformación (A) “abierta” (apo-Zn) y (B) “cerrada” (PerRMnZn)	60
Figura 1.40. Compuestos poliamínicos que presentan efecto alostérico en su interacción con el ADN.	61
Figura 1.41. Esquema de la modulación de la actividad intercalante del compuesto antril(alquilamino)ciclodextrina.....	62
Figura 1.42. Primeros ejemplos de ligandos poliamínicos de tipo escorpiando.	63
Figura 1.43. Esquema representando el cambio en el modo de coordinación de un ligando de tipo escorpiando.	64
Figura 1.44. Ligandos de tipo escorpiando con nuevas funcionalidades.	65
Figura 1.45. Estructuras cristalinas del compuesto 64 en sus conformación (A) abierta, [H(64)] ⁺ , y (B) cerrada, [H ₃ (64)] ³⁺	66
Figura 3.1. Operación de simplificación en la nomenclatura de fanos ..	76
Figura 3.2. Operación de simplificación en un compuesto de tipo escorpiando.	77
Figura 3.3. Estructura de los compuestos de partida L y LI	78
Figura 3.4. Ejemplos de la nomenclatura simplificada utilizada en esta tesis.....	80
Figura 4.1. Esquema del potenciómetro.....	85
Figura 4.2. Representación de una curva de desnaturalización térmica.	93
Figura 4.3. Sistema xantina-xantina oxidasa para la generación de superóxido.	105
Figura 5.1. Mecanismo de reacción para la tosilación.	120
Figura 5.2. Esquema del mecanismo de la reacción de ciclación.	121
Figura 5.3. Esquema de la reacción de alargamiento.	122
Figura 5.4. Reacción de base de Schiff seguida de una reducción.....	124
Figura 5.5. Estrategia para la funcionalización mediante sustitución nucleofílica y desprotección.....	125
Figura 5.6. Esquema de L-A	127
Figura 5.7. Esquema de L-P	128

Figura 5.8. Esquema de L-S	129
Figura 5.9. Esquema de LI-A	131
Figura 5.10. Esquema de LI-P	132
Figura 5.11. Esquema de LI-2Py	133
Figura 5.12. Esquema de LI-4Py	134
Figura 5.13. Esquema de LI-2Q	135
Figura 5.14. Esquema de LI-Acr	137
Figura 5.15. Esquema de TPA-L₃	139
Figura 5.16. Esquema de L-O	140
Figura 6.1. Compuestos sintetizados a partir de la poliamina L	144
Figura 6.2. Diagramas de distribución de los ligandos de tipo escorpiando derivados de L	146
Figura 6.3. Variación del máximo de emisión de la fluorescencia en función del pH y diagrama de distribución del ligando L-A	147
Figura 6.4. Secuencia de protonación propuesta para los ligandos L-A y L-P	148
Figura 6.5. Variación de la absorbancia de L-S durante una valoración ácido-base.....	149
Figura 6.6. Espectros de RMN ¹ H en D ₂ O para L-S registrados en: (1) pD= 11.72 (2) pD= 9.23, (3) pD= 8.30, (4) pD= 7,53 (5) pD= 2.31.....	150
Figura 6.7. Secuencia de protonación propuesta para L-S	151
Figura 6.8. Poliaminas de tipo escorpiando sintetizadas a partir de LI	152
Figura 6.9. Diagramas de distribución de los ligandos de tipo escorpiando derivados de LI	155
Figura 6.10. Diagrama de barras representando el grado medio de protonación, a pH 7.4, de los derivados de L y LI	156
Figura 6.11. Variación del máximo de emisión de la fluorescencia en función del pH y diagrama de distribución de LI-Acr	157
Figura 6.12. Estructuras canónicas del ión 9-aminoacridinio.....	157
Figura 6.13. Secuencia de protonación propuesta para LI-Acr	158
Figura 6.14. Esquema de los ligandos politópicos estudiados.....	159
Figura 6.15. Diagramas de distribución de los ligandos L-O y TPA-L₃	161
Figura 6.16. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Cu ²⁺ – L-A y Cu ²⁺ – L-S	164
Figura 6.17. Estructura cristalina del catión [Cu(L-A)] ²⁺	165
Figura 6.18. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Mn ²⁺ – ligando, para L-A y L-S	167
Figura 6.19. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Cu ²⁺ – ligando para los derivados de LI	169

Figura 6.20. Representación del pCu^{2+} frente al pH de los derivados de L y LI para una disolución de concentración inicial $[Cu^{2+}] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.	170
Figura 6.21. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Mn^{2+} – ligando, para los derivados de LI	172
Figura 6.22. Representación del pMn^{2+} frente al pH de los derivados de L y LI . Calculado a partir de las constantes de estabilidad para una disolución de concentración inicial $[Mn^{2+}] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.	173
Figura 6.23. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Zn^{2+} – ligando, para los compuestos L-A , LI-A , LI-Pir y LI-2Q	175
Figura 6.24. Representación del pZn^{2+} frente al pH de los derivados de L y LI . Calculado a partir de las constantes de estabilidad para una disolución de concentración inicial $[Zn^{2+}] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.	176
Figura 6.25. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Fe^{2+} – ligando para los compuestos LI-2Py y LI-4Py	177
Figura 6.26. Representación del pFe^{2+} frente al pH de los derivados de L y LI	178
Figura 6.27. Potenciales modos de interacción de L-O con Zn^{2+}	179
Figura 6.28. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Zn^{2+} – L-O a diferentes relaciones molares.	180
Figura 6.29. Estructura cristalina del catión $[Zn(L-O)]^{2+}$	181
Figura 6.30. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Mn^{2+} – TPA-L₃ , a diferentes relaciones molares.....	184
Figura 7.1. Entorno del GTP en la proteína transglutaminasa 2	191
Figura 7.2. Esquema de los receptores estudiados.....	192
Figura 7.3. Esquema de los polinucleótidos estudiados.....	192
Figura 7.4. Protonación del GTP y UTP.	193
Figura 7.5. Logaritmos de las constantes efectivas frente al pH para la interacción con ATP, ADP y AMP de (A) L-A ; (B) LI-A ; (C) LI-2Py ; y (D) LI-4Py	197
Figura 7.6. Predicción del porcentaje de ATP complejado en función del pH, para una mezcla equimolar de los cuatro receptores y el ATP	199
Figura 7.7. Logaritmos de las constantes efectivas frente al pH para la interacción de los receptores poliamínicos con GTP, ATP y UTP	200
Figura 7.8. Representación de la complejación de mononucleótidos en función del pH para una mezcla equimolar de LI-4Py , ATP, GTP y UTP	201
Figura 7.9. Región aromática del espectro de RMN 1H del ATP, L-A y una mezcla de L-A + ATP	202

Figura 7.10. Región aromática del espectro de RMN ¹ H del GTP, L-A y una mezcla de L-A + GTP	203
Figura 7.11. Región aromática del espectro de RMN ¹ H del ATP, LI-4Py y una mezcla de LI-4Py + ATP	204
Figura 7.12. Región aromática del espectro de RMN ¹ H del GTP, LAI-4Py y una mezcla de LAI-4Py + GTP	205
Figura 7.13. Desplazamientos químicos de las señales de ³¹ P del GTP al interaccionar con los receptores estudiados.	206
Figura 7.14. Diagramas de Job para la interacción de los receptores fluorescentes con ATP.....	207
Figura 7.15. Emisión de fluorescencia para la valoración del L-A libre y para los sistemas L-A – ATP y L-A – GTP	209
Figura 7.16. Fotografía de tres viales conteniendo, de izquierda a derecha, soluciones de L-A , L-A + ATP y L-A + GTP a pH 7.	210
Figura 7.17. Estructuras optimizadas de los complejos π – π de antraceno con las nucleobases	212
Figura 7.18. Izquierda: estructuras optimizadas de los complejos π – π de piridina con las nucleobases	213
Figura 7.19. Representación del modelo optimizado para la interacción del LI-A con GTP.....	214
Figura 7.20. Espectros de absorción del L-A con cantidades crecientes (de 0 a 5 equivalentes) de A) poli-A y B) poli-G.	216
Figura 7.21. Espectros de absorción del L-A con cantidades crecientes (de 0 a 5 equivalentes) de A) poli-C y B) poli-U.	217
Figura 7.22. Espectros de emisión de fluorescencia y curvas de valoración para una disolución de L-A (20 μ M, λ_{exc} = 367 nm) con (A, B) poli-A y (B, C) poli-G.....	219
Figura 7.23. Espectros de emisión de fluorescencia del L-A (20 μ M, λ_{exc} = 367 nm) con cantidades crecientes de (A) poli-U y (B) poli-C.....	220
Figura 7.24. Elementos estructurales del ADN en la conformación B.	222
Figura 7.25. Espectros de absorción del L-A en presencia de cantidades crecientes (0-5 eq.) de (A) poli-A–poli-U ([L-A] ₀ = 20 μ M); (B) poli-(dAT) ₂ ([L-A] ₀ = 10 μ M); (C) poli-(dGC) ₂ ([L-A] ₀ = 20 μ M); (D) ctADN ([L] ₀ = 50 μ M).....	223
Figura 7.26. Espectros de emisión de fluorescencia y curvas de valoración del L-A con (A) poli-A–poli-U; (B) poli-(dAT) ₂ ; (C) poli-(dGC) ₂ y (D) ctADN.	226
Figura 7.27. Representación del proceso de reorganización molecular del compuesto L-A	228

Figura 7.28. Región aromática del espectro de RMN ^1H del compuesto L-A a (A) pD 5.0 y (B) pD 8.0.....	229
Figura 7.29. Dependencia con el pH de la absorción de (A) LI-A y (B) LI	230
Figura 7.30. Espectros UV-Vis para la valoración de (A) L-A con poli-A-poli-U; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con poli-A-poli-U; (C) L-A con ctADN y (D) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con ctADN.....	232
Figura 7.31. Espectros de emisión e fluorescencia para la valoración de (A) L-A con poli-A-poli-U; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con poli-A-poli-U; (C) L-A con ctADN y (D) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con ctADN.....	233
Figura 7.32. Espectros de emisión e fluorescencia para la valoración con poli-(dAT) $_2$ de (A) L-A ; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$	234
Figura 7.33. Espectros de DC de disoluciones de ctADN (30 μM) con cantidades crecientes de (A) L-A ; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$; (C) L-P y (D) $[\text{Cu}(\text{LI-P})]^{2+}$	237
Figura 7.34. Espectros de DC de disoluciones de ctADN (30 μM) con cantidades crecientes de LI	238
Figura 7.35. Espectros de fluorescencia para los ensayos de desplazamiento de BrEt. La proporción molar ligando :BrEt fue de 1:1, con $[\text{BrEt}] = [\text{ligando}] = 10 \text{ mM}$ y $[\text{ctADN}] = 30 \text{ mM}$	239
Figura 7.36. Viscosidades relativas de una disolución de ctADN con cantidades crecientes de LI-P , $[\text{Zn}(\text{LI-P})]^{2+}$ y LI	241
Figura 7.37. (A) Fotografía de una placa de 96 pocillos de células T24 después de su tratamiento con 0-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de L-A libre o del complejo $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$. (B) Diagrama de la viabilidad celular, incluyendo los resultados para el complejo de zinc $[\text{Zn}(\text{L-A})]^{2+}$	244
Figura 7.38. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células UMUC3 tratadas durante 16 horas con LI-A o su complejo metálico $[\text{Zn}(\text{LI-A})]^{2+}$ a la concentración indicada.....	245
Figura. 7.39. Imágenes de microscopía confocal de células tratadas durante 4 horas con LI-P 10 μM	246
Figura. 7.40. Porcentaje de supervivencia de células T24 tratadas con los compuestos durante 2 horas a 37°C y 4°C.....	247
Figura 7.41. (A) Células 253J sin tratar (control). (B) Células incubadas con el compuesto LI-P 10 μM	248
Figura 7.42. Western blot de células T24 incubadas con e compuesto LI-P a diferentes concentraciones.....	248
Figura 7.43. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células tratadas con un tinte fluorescente selectivo de la tubulina.....	249

Figura 7.44. (A) Estudios dosis-toxicidad. 5 ratones por grupo y 4 dosis separadas por intervalos de tres o cuatro días. (B) Tumores generados por inyección intradérmica 1×10^6 células de cáncer de vejiga en ratones inmunosuprimidos. (C) Evolución del volumen del tumor en ratones control y ratones tratados con LI-P	250
Figura 8.1. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Mn^{2+} con (A) LI-2Py y (B) LI-4Py . Velocidad de barrido 10 mV/s.	254
Figura 8.2. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Mn^{2+} con (A) L-A y (B) LI-A . Velocidad de barrido 10 mV/s.	255
Figura 8.3. (A) Voltamperograma cíclico del sistema de Mn^{2+} con TPA-L₃ . Velocidad de barrido 10 mV/s. (B) Voltametría de onda cuadrada.	255
Figura 8.4. (A) Voltamperograma cíclico del sistema de Mn^{2+} con L-S . Velocidad de barrido 10 mV/s. (B) Voltametría de onda cuadrada.	256
Figura 8.5. Porcentaje de inhibición de NBT frente a la concentración de compuesto.....	258
Figura 8.6. Ensayos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> tratadas con Mn^{2+} y con los complejos $[Mn(L-A)]^{2+}$ y $[Mn(LI-A)]^{2+}$	261
Figura 8.7. Ensayos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> tratadas con Mn^{2+} y con los complejos $[Mn(LI-2Py)]^{2+}$ y $[Mn(LI-4Py)]^{2+}$	262
Figura 8.8. Ensayos de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> tratadas con los complejos de Mn^{2+} de L-S (A) y TPA-L₃ (B).	263
Figura 9.1. Imagen TEM mostrando las alteraciones ultraestructurales en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> tratados con compuestos de tipo escorpiando. (A) Parásitos control. (B), (C) y (D) tratados con otros compuestos de tipo escorpiando. (D) Parásitos tratados con el compuesto LI-4Py a la concentración IC_{25} . N = núcleo, M = mitocondria, G = glicosomas, MT = microtúbulos, V = vacuolas, R = reservona, K = kinetoplasto y F = flagelo.....	270
Figura 9.2. Centro activo de la FeSOD de <i>T. Cruzi</i>	277
Figura 9.3. (A) Red de enlaces de hidrógeno entre el ligando LI-4Py y la FeSOD de <i>T. Cruzi</i> . (B) Superficie accesible al disolvente mostrando la oclusión del túnel de acceso al centro activo de la enzima debido a la interacción con LI-4Py	278

Índice de abreviaturas y acrónimos

ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
AS	ácido siálico
ATP	adenosín trifosfato
BrEt	bromuro de etidio
CHEF	chelation-enhanced fluorescence
CHEQ	chelation-enhanced quenching
CPK	representación Corey–Pauling–Koltun
ctADN	ácido desoxirribonucleico de timo de ternera
DC	dicroísmo circular
DCI	dicroísmo circular inducido
FID	ensayo de desplazamiento del indicador fluorescente
Gln	glutamina
GTP	guanosín trifosfato
HOMO	orbital molecular ocupado de mayor energía
IC ₅₀	concentración inhibitoria media
I.F.	intensidad de fluorescencia
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LUMO	orbital molecular no ocupado de más baja energía

MES	ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MF	monoformazano
NBT	nitroblue tetrazolium (azul de tetrazolio)
NHE	electrodo normal de hidrógeno
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay
PBS	tampón fosfato salino
PDB	protein data bank
PET	transferencia electrónica fotoinducida
poli-A	ácido poliadenílico (sal sódica)
poli-C	ácido policididílico (sal sódica)
poli-(dAT) ₂	ácido poli(deoxiadenílico-timidílico) (sal sódica)
poli-(dGC) ₂	ácido poli(deoxiguanílico-deoxicitidílico) (sal sódica)
poli-G	ácido poliguanílico
poli-U	ácido poliuridílico
PTS	sistema de transporte de poliaminas
ROS	especies reactivas de oxígeno
s.	siglo
SI	índice de selectividad
SOD	superóxido dismutasa
TEM	microscopía de transmisión electrónica
TPA	trifenilamina
Tren	Tris(2-aminoetil)amina
Ts	Tosilo

TSP	sistema de transporte de poliaminas
u.a.	unidades arbitrarias
UTP	uridina trifosfato
VIH	virus de la inmunodeficiencia humana

1.

Introducción

Introducción

1.1. Química supramolecular aplicada a la medicina

En el presente apartado se ofrecerá un breve recorrido histórico a través de las distintas etapas por las que ha cursado la química y la incidencia que ha tenido su desarrollo en el ámbito de la medicina. Se procurará a continuación dar una visión general sobre cómo las ideas y los conceptos aportados por la química supramolecular han venido a cambiar el paradigma de la química médica, no sólo aportando fundamentos teóricos para comprender e imitar los procesos biológicos, sino también cambiando la manera en que se diseñan y desarrollan los nuevos fármacos.

1.1.1. Breve historia de la química médica. De la alquimia a la química supramolecular.

Desde los inicios de la civilización, la humanidad ha intentado comprender y controlar los cambios en la naturaleza de las sustancias conocidas. Los primeros habitantes aprendieron a mantener y controlar el fuego y, siglos después, se esforzaron en transmutar metales baratos en oro. En esos primeros pasos, el arte de la *khemeia* se abrió camino principalmente en el campo de la metalurgia y tuvo poca influencia en el desarrollo de la medicina.

Los registros más antiguos sobre el uso terapéutico de plantas y minerales provienen de las antiguas civilizaciones chinas, hindúes, mayas y mediterráneas. Tratamientos para la malaria, la disentería, analgésicos, son algunos ejemplos de lo que se podía encontrar en estas antiguas farmacopeas. En el caso de los griegos, además de extractos de plantas o animales, se utilizaban también remedios inorgánicos, por ejemplo minerales de cobre o zinc, sulfato de hierro y óxido de cadmio [1].

Esta tradición antigua promulgaba la existencia de una sustancia necesaria para transmutar los metales comunes en oro, una sustancia llamada *xerion* por los griegos y, posteriormente, *al-iksir* o la piedra filosofal. Fue en la época del imperio árabe (s.VI d.C.) cuando surgió la idea de que este elíxir o piedra filosofal poseía además la propiedad de curar todas las enfermedades, devolver la juventud, prolongar la vida e incluso asegurar la inmortalidad. Con esta nueva idea, en los siglos siguientes la alquimia se desarrolla siguiendo dos caminos: uno mineral, con el propósito de transmutar metales en oro, y otro medicinal, cuyo principal objetivo era curar enfermedades y, en última instancia, alcanzar la inmortalidad. Algunos notorios alquimistas de esta época son: Jabir ibn-Hayyan (Geber, s. VIII), Al Razi (Rhazes, s. X) e Ibn Sina (Avicena, s. XI) [2].



Figura 1.1. “El Alquimista”, obra del pintor flamenco David Teniers el Joven.

Tras el derrumbe del imperio musulmán, la alquimia sufre un progresivo declive, propiciado, en buena medida, por la charlatanería y el engaño de aquellos que la practicaban, llegando a ser prohibida por reyes y papas. No fue hasta principios del siglo XVI cuando Theophrastus Bombast von Hohenheim, médico suizo y profesor, mejor conocido por el nombre de Paracelso, da un nuevo impulso a la alquimia y declara que la

misión de ésta debería ser la curación de la enfermedad. La gran influencia que ejerció Paracelso en su época, con su carácter violento y el ardor con que defendía sus ideas, llevó a muchos alquimistas a orientar sus esfuerzos hacia la preparación de drogas y remedios. Esta nueva vertiente, que intentaba unir el conocimiento heredado de la alquimia con la medicina, es conocida como *iatroquímica*. Su práctica se extendió entre los siglos XVI y XVII, y se puede considerar como un período de transición entre la alquimia y la verdadera química, que surge con la implantación definitiva del método científico en el siglo XVIII. Entre los avances que se introdujeron durante los siglos de la iatroquímica están el uso del mercurio y el azufre para tratar la sífilis (Paracelso), la preparación del cloruro de estaño (Libavius), la palabra *gas* (van Helmont) y el desarrollo de una primera teoría sobre la química ácido-base (Lemery) [3].

Al introducir de manera sistemática el método científico y el principio de conservación de la materia en su *Tratado elemental de química*, publicado en 1789, Antoine Lavoisier sienta las bases de la química moderna y da impulso a una auténtica revolución. A partir de entonces, los avances en la química y en sus aplicaciones biomédicas se suceden de manera vertiginosa. Kolbe y Berthelot sintetizan el ácido acético y el metano, respectivamente, estableciendo los principios de la química orgánica. El refinamiento de las técnicas de análisis químico cambian la perspectiva en la búsqueda de nuevos medicamentos: ya no se trata de encontrar nuevas plantas medicinales, sino de aislar los ingredientes activos que dan las propiedades a una planta determinada. Así, en las primeras décadas del siglo XIX, se aíslan la morfina del opio, la estricnina, la cafeína, la quinina, la codeína..., y la mayoría de los alcaloides de todas las plantas conocidas. A mediados de siglo empiezan a prepararse las primeras drogas sintéticas halogenadas. Y así, gracias a todos estos descubrimientos y a los avances en química orgánica, a finales del siglo XIX, nace la industria farmacéutica. Se empiezan a producir masivamente drogas totalmente sintéticas: analgésicos, anestésicos, vasodilatadores, antiinflamatorios, etcétera, aunque poco o nada se conocía sobre sus mecanismos de acción. Esto comienza a cambiar con los estudios de Paul Erlich y sus teorías sobre receptores [4].

A lo largo del siglo XX, la farmacopea se va ampliando con nuevos antiparasitarios, diuréticos, antibióticos, etcétera. Así, a medida que se fueron descubriendo tratamientos para las enfermedades más serias, la esperanza de vida fue aumentando hasta duplicarse en sólo unas décadas. De esta forma llegamos a la mitad del siglo XX, momento en el que la

importancia de las interacciones intermoleculares en todos los procesos vitales va siendo extensamente reconocida, y diversas disciplinas, como la física, la biología y la medicina, comienzan a converger con la química para dar lugar al surgimiento de un nuevo campo: la química supramolecular. Como veremos a continuación, esta nueva disciplina química va a aportar nuevas perspectivas y herramientas para combatir las enfermedades que aún continúan siendo un reto para la humanidad.

1.1.2. Aproximación supramolecular a la química médica

Como se ha comentado en el apartado anterior, tradicionalmente los compuestos con actividad farmacológica se han obtenido de la naturaleza, ya fuera utilizando directamente la materia orgánica con poco o ningún tratamiento o, más recientemente, mediante la identificación, aislamiento y purificación de los principios activos presentes en los organismos. A día de hoy los productos naturales siguen teniendo un papel importante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, de hecho el 50% de los que se obtuvieron entre 1981 y 2002 provenían de estas fuentes [5]. Sin embargo, la lentitud con la que se descubren nuevos productos naturales, junto con otras limitaciones, supone una desventaja que ha provocado que en las últimas décadas la industria química haya orientado sus esfuerzos más hacia la preparación de enormes librerías de compuestos sintéticos, obtenidos mediante química combinatoria. Esta aproximación permite obtener millones de compuestos con potencial actividad, que luego deben ser cribados para dejar sólo los candidatos más prometedores.

El químico, sin embargo, no puede depender únicamente del azar para descubrir nuevos fármacos. Para aumentar las posibilidades de acierto, reduciendo a la vez el tiempo y los costos del proceso, es necesario tener una idea clara de cómo las especies químicas interactúan con las dianas biológicas. Es aquí donde entra en escena la química supramolecular, la cual nos ofrece un marco teórico para comprender las fuerzas intermoleculares que intervienen en la interacción de las drogas potenciales con su entorno biológico [6]. Además, los conceptos de

autoensamblaje y reconocimiento molecular, ideas clave en la química supramolecular que discutiremos a continuación, han cambiado el punto de vista y las predicciones respecto a los mecanismos de las enfermedades y las estrategias de tratamiento [7]. Como veremos a lo largo de este apartado, tanto la química médica como la química supramolecular se han beneficiado la una de la otra: las primeras hipótesis de la química médica abonaron el camino de la química supramolecular, que a su vez ha ampliado el enfoque de la química médica, de manera que ambas disciplinas se han nutrido mutuamente.

Para desarrollar las ideas en este apartado procederemos de la siguiente manera: primero, se hará una breve introducción a la química supramolecular y, posteriormente, se irán desgranando los conceptos clave de ésta que han tenido un impacto en la medicina, ilustrando cada uno con ejemplos específicos.

Química supramolecular

De acuerdo con la definición de Jean-Marie Lehn, la química supramolecular es un campo interdisciplinar que se encarga del estudio de las propiedades químicas, físicas y biológicas de las especies químicas de mayor complejidad que las moléculas, las cuales se mantienen unidas a través de interacciones intermoleculares [8]. Al contrario que en la química molecular, basada en el enlace covalente, en la química supramolecular las interacciones son de tipo no covalente, lo que llevó a J.-M. Lehn a definir el campo como “química más allá de la molécula” [9].

Desde este punto de vista, la mayoría de interacciones clave en los sistemas biológicos son de tipo supramolecular. Es más, la interacción en el organismo de cualquier fármaco será también, en alguna etapa, de este tipo [10]. Dado que el objetivo de la química médica es influenciar estos procesos, es evidente que las herramientas de la química supramolecular tendrán algo que aportar al desarrollo de la misma, tal como veremos más adelante.

Los antecedentes teóricos que sentaron las bases de la química supramolecular se remontan a la segunda mitad del siglo XIX. Johannes Diderik van der Waals postuló, ya en 1873, la existencia de fuerzas intermoleculares y, diez años después, Alfred Werner introdujo el concepto de química de coordinación [11]. En esos mismos años, concretamente en

1894, Emil Fischer publicó su artículo seminal en el que proponía un mecanismo para la interacción de especies químicas con las enzimas basado en la complementariedad estérica entre el sustrato y el centro activo de la enzima, conocida como “hipótesis de la llave y la cerradura” [12]. En 1906, Paul Ehrlich lleva el concepto de reconocimiento molecular, planteado por Fischer, al campo de la medicina introduciendo los conceptos de receptor y sustrato biológico en su teoría de la inmunidad de cadena lateral [13]. El término “supramolécula” (Übermoleküle) fue introducido en la literatura en 1937 por Karl Lothar Wolf y colaboradores, que lo utilizaron para describir los dímeros que forma el ácido acético a través de puentes de hidrógeno [14].

Pero no fue hasta la década de 1960 cuando se produjo el impulso definitivo a este nuevo campo de la química. El reconocimiento del papel biológico de cationes como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en procesos eléctricos y musculares, sumado al descubrimiento de una serie de antibióticos naturales (p. ej.: valinomicina [15], gramicidina [16], nonactina [17]), capaces de complejar selectivamente cationes alcalinos y transportarlos a través de las membranas celulares, inspiraron a un grupo de científicos a desarrollar sistemas sintéticos que tuvieran propiedades análogas a las de estos productos naturales.

Así, en el transcurso del año 1967, el químico americano Charles Pedersen sintetizó una serie de poliéteres cíclicos, denominados éteres corona, que demostraron ser capaces de complejar metales alcalinos de manera selectiva [18]. De forma paralela, el químico francés Jean-Marie Lehn propuso el diseño de una serie de compuestos sintéticos que fueran capaces de transportar cationes a través de membranas, mimetizando así el comportamiento de los antibióticos ciclopeptídicos descritos antes. Estos trabajos llevaron a la preparación de los primeros criptandos, ligandos macrobíclicos en los que átomos de nitrógeno, cabeza de puente, están conectados por cadenas poliéter [19, 20]. Otro científico llamado Donald Cram expandió los estudios realizados por Pedersen, con sus receptores planos, mediante la síntesis de moléculas tridimensionales que eran capaces de encapsular al ion, dando lugar a complejos más estables [21].

La relevancia del trabajo de estos tres científicos fue reconocida en 1987 mediante la concesión del Premio Nobel de Química (figura 1.2), por sus trabajos pioneros en el campo de la química “huésped-anfitrión” (del inglés “*host-guest*”). De esta manera, la química supramolecular ha ido construyendo sus bases teóricas y su propio lenguaje, gracias en buena

medida a los trabajos de Jean-Marie Lehn [22]. Las bases de esta disciplina y los principales avances que ha producido han sido recientemente recopilados en una enciclopedia de ocho volúmenes publicada en el año 2012 [23].

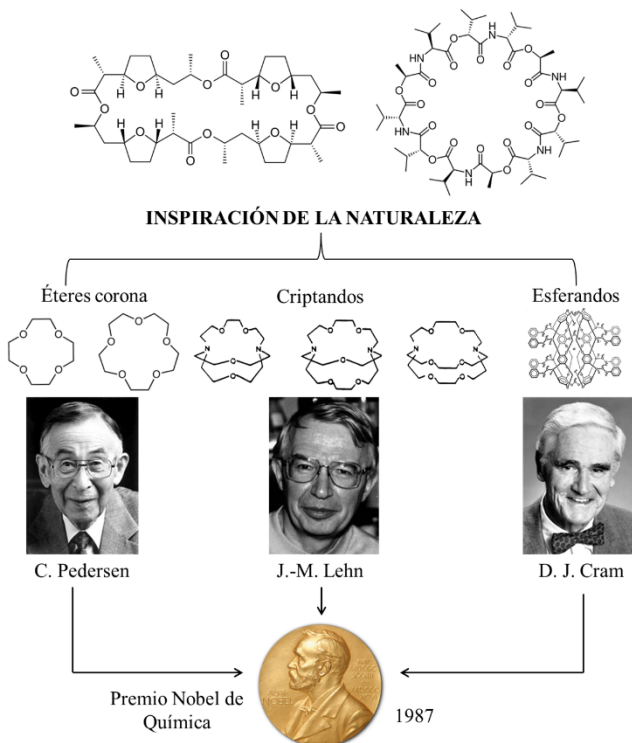


Figura 1.2. Los científicos que impulsaron el desarrollo de la química supramolecular.

A continuación, pasaremos a detallar algunos conceptos clave en la química supramolecular. La separación entre unos conceptos y otros es arbitraria, ya que a veces se superponen y complementan unos con otros. Además, no pretendemos en esta introducción cubrir todo el entramado teórico de la química supramolecular, sino más bien hacer énfasis en aquellos conceptos que han tenido un mayor impacto en la química médica, ilustrando los mismos con ejemplos de aplicaciones que han surgido gracias a la sinergia entre ambas ramas del conocimiento.

Fuerzas intermoleculares

Como ya se ha comentado, el conocimiento de las fuerzas intermoleculares precede al surgimiento de la química supramolecular. Sin embargo, dada su importancia para comprender los sistemas supramoleculares en general, creemos conveniente hacer aquí un breve repaso de las propiedades y características de los distintos tipos de interacciones no covalentes.

Estas fuerzas incluyen las interacciones ión-dipolo, ión-dipolo inducido, los enlaces de hidrógeno y las fuerzas de Van der Waals (dipolo permanente, dipolo inducido y fuerzas de dispersión). Según se desprende de los valores de las energías de disociación (tabla 1.1), estas interacciones son más débiles que los enlaces iónicos o covalentes, por lo que a veces nos referimos a ellas como fuerzas débiles.

Tabla 1.1. Intervalo de valores aproximado para las energías de disociación de los distintos tipos de enlace no covalente [24].

Tipo de interacción	Energía de disociación (kJ mol ⁻¹)
Enlace iónico	100–350
Enlace de coordinación	100–300
Ión-dipolo	50–200
Puente de hidrógeno	4–120
Catión- π y anión- π	5–80
Dipolo-dipolo	5–50
Fuerzas de Van der Waals	< 5

Otro tipo de interacciones con una gran relevancia en sistemas químicos y bioquímicos, y a las que haremos referencia con frecuencia en esta tesis, son las interacciones que involucran anillos aromáticos. Se derivan de una suma de factores electrostáticos, dipolos inducidos, contribuciones dispersivas y efectos hidrofóbicos [25]. Se pueden clasificar en las tres categorías que se muestran en la figura 1.3: apilamiento- π , ión- π y XH- π [26]. La interacción por apilamiento- π tienen energías de enlace inferiores a 50 kJ mol⁻¹, y son más intensas en el caso de sistemas con un anillo aromático π deficiente y otro π excedente. La presencia de un átomo de nitrógeno en un anillo aromático disminuye

la densidad de carga π sobre el resto de núcleos del esqueleto σ . Si además los átomos de nitrógeno coordinan un metal o están alquilados, su carácter π deficiente se acentúa [27].

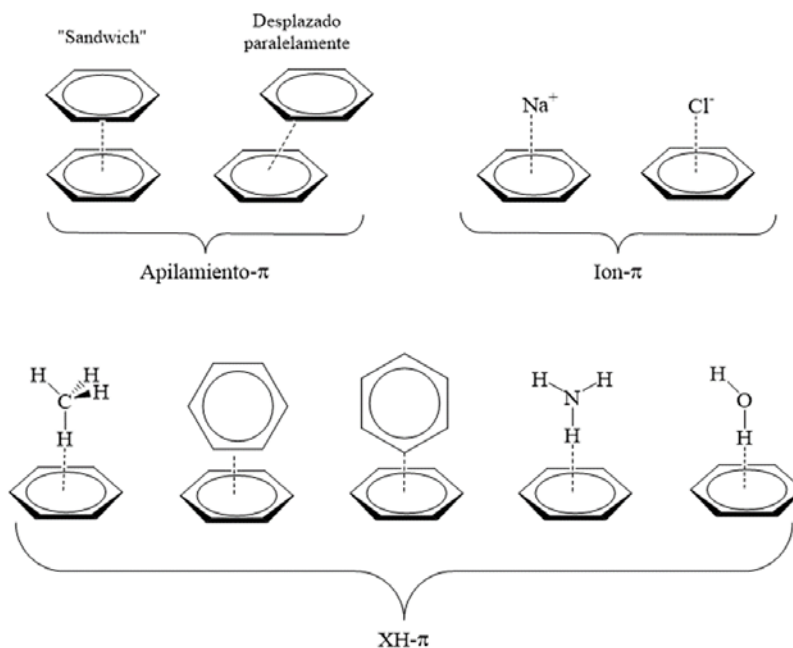


Figura 1.3. Modelo de las interacciones no covalentes en las que intervienen anillos aromáticos.

Hay que considerar que las interacciones entre una droga y su diana biológica –por ejemplo, un inhibidor y la enzima– tienen lugar en medio acuoso y, por tanto, es importante tener en cuenta los efectos hidrófobos, los cuales gobiernan la asociación de moléculas apolares en disolución acuosa [28]. Cuando se forma un complejo de inclusión, por ejemplo, las moléculas de agua son desplazadas por la molécula “huésped” hidrófoba. Este desplazamiento produce un efecto entrópico favorable, al retirar las moléculas de agua de la cavidad, que puede llegar a compensar el cambio de entropía desfavorable derivado de la inmovilización de la molécula “huésped” [29].

Reconocimiento molecular

Podemos definir el reconocimiento molecular como un proceso que incluye tanto la unión como la selección de sustratos por una molécula receptora dada para realizar una función específica. Éste ha sido un concepto ampliamente utilizado en biología, desde que Emil Fischer planteara su hipótesis de “llave y cerradura”. Y no es de extrañar, ya que es posiblemente el evento más importante en los sistemas vivos. La formación de las membranas lipídicas, el plegamiento de las proteínas, la replicación del ADN, la actividad de receptores y transportadores, y muchos otros procesos fundamentales están sujetos al reconocimiento de una entidad molecular por otra [30]. Con el surgir de la química supramolecular, el concepto de reconocimiento se extiende más allá de los sistemas biológicos, pasando de la terminología de “sustrato-enzima” a la de “huésped-anfitrión” [31].

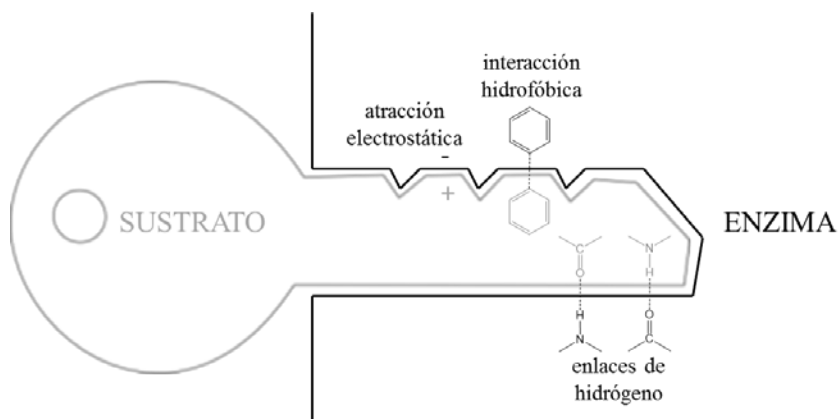


Figura 1.4. Representación esquemática de la hipótesis de la “llave y cerradura” desarrollada por Fischer.

El complejo formado, o supermolécula, puede estar constituido por dos o más moléculas o iones que se mantienen juntos a través de las fuerzas intermoleculares descritas antes. Para que exista reconocimiento tiene que haber no sólo una elevada afinidad, sino también selectividad por un

determinado sustrato [32]. Ésto se consigue haciendo uso de los principios de preorganización y complementariedad. El principio de preorganización establece que cuanto más organizadas estén, tanto la molécula huésped como la anfitrión, para unirse en un complejo, tanto más estable será el complejo formado [33]. La complementariedad implica una disposición adecuada de los sitios de unión del receptor que permita la complementariedad estereoelectrónica de éstos con los de la molécula huésped [31]. A continuación, veremos algunos ejemplos de cómo estos principios se han aplicado a la biomedicina.

Los patógenos –por ejemplo, los virus– dependen de un número de enzimas claves para su supervivencia, por lo que una estrategia para la síntesis de nuevos fármacos es el diseño de moléculas que puedan ser reconocidas por el centro activo de estas enzimas, de manera selectiva y con mayor afinidad que los sustratos naturales, de modo que inhiban la función de la enzima y prevengan así la proliferación del patógeno. Un buen ejemplo es el medicamento contra la gripe Zanamivir [34], comercializado a nivel mundial por GlaxoSmithKline bajo la marca Relenza. Este fármaco se diseñó para inhibir la enzima sialidasa, que se encuentra en la superficie del virus de la influenza. A partir de la resolución de la estructura cristalina de esta enzima en 1983 [35], los científicos han podido racionalizar el diseño del inhibidor más apropiado, haciendo uso de los conceptos de complementariedad y preorganización, maximizando así el número de interacciones intermoleculares. En la figura 1.5, se ilustra el modo de interacción de este fármaco con el centro activo de la enzima sialidasa del virus de la influenza. Como se puede apreciar, cada uno de los cuatro sustituyentes del anillo forma puentes de hidrógeno con algún residuo del centro activo de la enzima. Dos de estos, además, están reforzados por interacciones electrostáticas. Este diseño racional ha permitido obtener un compuesto que tiene tres veces más afinidad por la enzima que el sustrato natural, el ácido siálico, inhibiendo así todos los virus de la gripe estándar [6].

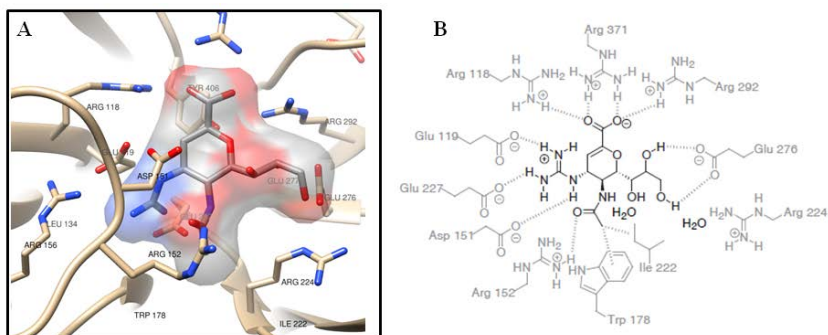


Figura 1.5. (A) Estructura cristalina (PDB ref. 4I00) del fármaco Zanamivir (Relenza) en una enzima del virus de la influenza [36]. (B) Esquema de las interacciones intermoleculares de la droga con el centro activo de la enzima. Las líneas discontinuas indican las interacciones supramoleculares responsables de la interacción. Figura reproducida de la referencia [6].

Otra área importante en la que se aplica el reconocimiento molecular es en la preparación de sistemas supramoleculares para el transporte controlado de fármacos, o *drug delivery*. Esto implica el reconocimiento y complejación no de un sustrato biológico, sino del fármaco que se desea hacer llegar hasta una diana celular determinada, con el fin de mejorar su administración y biodistribución. Las ciclodextrinas, como la mostrada en la figura 1.6, han sido ampliamente utilizadas para modificar las propiedades farmacocinéticas de un gran número de principios activos, mediante la formación de complejos de inclusión que permiten mejorar la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco [37].

Otro ejemplo importante hace referencia a la preparación de sondas fluorescentes para la detección de analitos biológicos. Este campo, en el que se viene trabajando desde hace muchos años en el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, se comentará con mayor detalle en la sección 1.2.6 de esta introducción.

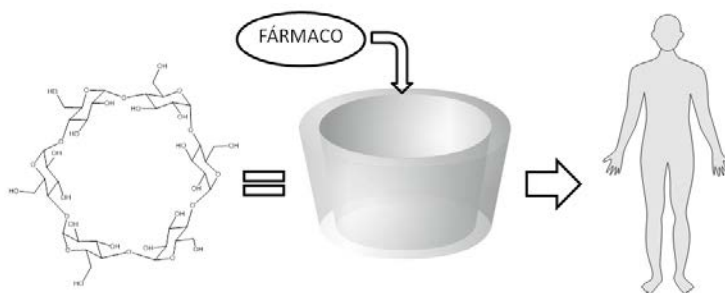


Figura 1.6. Estructura de la β -ciclodextrina e ilustración esquemática del modo de complejación por inclusión.

Autoensamblaje

Entendemos por autoensamblaje la formación de un producto final por asociación directa y espontánea de sus componentes, cuando éstos están en una mezcla en las condiciones adecuadas. El proceso debe ser completamente reversible, y el producto debe ser estable en equilibrio termodinámico [38]. Se trata, de nuevo, de un proceso que ocurre en la naturaleza y que es el responsable de la complejidad y elevada organización de los sistemas biológicos [39]: el autoensamblaje del ADN en una estructura de doble hélice a partir de dos oligonucleótidos complementarios, la formación de las membranas lipídicas, el plegamiento de las proteínas en su estructura tridimensional y el ensamblaje del virus del mosaico de tabaco son algunos ejemplos de este tipo de procesos que podemos encontrar en la naturaleza. Las células vivas, en definitiva, se autoensamblan, y entender la vida implica, por tanto, comprender el autoensamblaje. El reto para el químico supramolecular es el diseño de los componentes moleculares, llamados *building blocks*, que contengan toda la información necesaria codificada (como estructura, carga, polarizabilidad, etcétera) para que tenga lugar su autoorganización en el patrón deseado. Este autoensamblaje molecular involucra las fuerzas intermoleculares que se han discutido antes (Van der Waals, atracciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, enlaces de coordinación, fuerzas hidrofóbicas) [40].

Este poderoso concepto, inspirado en la naturaleza y desarrollado por la química supramolecular, ha atraído la atención de la biomedicina respecto a las posibles aplicaciones de las arquitecturas autoensambladas,

ya sea como nuevos agentes terapéuticos, biomateriales o sistemas para el transporte controlado de fármacos, o *drug delivery* [41]. Un ejemplo de esta aproximación supramolecular a la medicina es el desarrollo de nuevos antibióticos basados en una serie de péptidos cíclicos. Éstos poseen una estructura relativamente plana, rígida y con forma de aro, y son capaces de autoensamblarse, apilándose uno sobre otro. Esto lo logran estableciendo enlaces de hidrógeno entre sus grupos CONH, particularmente en ambientes no polares, en los que las moléculas de agua no compiten en la formación de los enlaces de hidrógeno (figura 1.7A) [42]. Estas estructuras apiladas, llamadas nanotubos, tienen tendencia a autoensamblarse en el ambiente apolar de las paredes celulares de las bacterias, causando una alteración de la misma que conduce a la muerte bacteriana (figura 1.7B) [43]. La hipótesis es que, si las bacterias desarrollan resistencia a un nanotubo específico, el péptido cíclico podría sobreponerse a esta resistencia al apilarse de manera diferente. De esta manera, el fármaco tiene su propio potencial para evolucionar, lo que ofrece un nuevo paradigma para el desarrollo de nuevas drogas supramoleculares, aprovechándose de la naturaleza dinámica de estos sistemas autoensamblados para responder a las cambiantes condiciones que puedan encontrar *in vivo* [6].

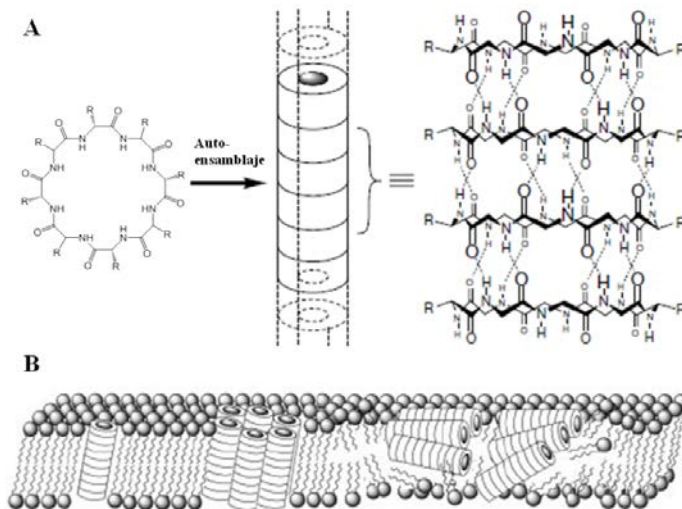


Figura 1.7. (A) Autoensamblaje de péptidos cíclicos para formar nanotubos a través de una red de enlaces de hidrógeno. (B) Interferencia de los nanotubos en la membrana celular. Figuras adaptadas de la referencia [43].

Multivalencia

Entendemos por interacción multivalente aquella en que múltiples ligandos, en una misma entidad, se unen simultáneamente a múltiples sustratos [44]. La energía libre de la interacción ligando-sustrato de tipo multivalente puede ser mayor, igual, o menor que la suma de las energías libres de las interacciones monovalentes análogas. A estas distintas situaciones se las conoce como interacciones cooperativas (sinérgicas), no cooperativas (aditivas) o anticooperativas (interferentes), respectivamente [45].

Las interacciones multivalentes son ubicuas en los sistemas biológicos, los cuales se benefician de ellas por varios motivos: permiten establecer enlaces fuertes con una superficie de contacto pequeña; multiplicar una interacción ya existente en vez de crear una nueva es evolutivamente más favorable; se pueden inducir grandes cambios conformacionales e inmovilización estérica; etcétera. Y así encontramos multitud de ejemplos en la naturaleza de este tipo de interacciones: en la unión de un virus o una bacteria a la superficie de la célula; en la adhesión de un neutrófilo a las células endoteliales; en la interacción de los anticuerpos con sus dianas; o en el enlace de los factores de transcripción a múltiples sitios del ADN [45]. Comprender este tipo de interacciones, por tanto, es importante para poder desarrollar sistemas sintéticos que permitan antagonizar procesos biológicos indeseados (como la unión de un virus a la célula [46]) o, al contrario, promover procesos beneficiosos (la acción de los anticuerpos).

Un ejemplo es la preparación de polímeros que inhiben el anclaje del virus de la influenza en los eritrocitos [47]. Uno de los más efectivos está basado en un polímero lineal de poliacrilamida con múltiples copias de ácido siálico (AS) como cadenas laterales. Este polímero es capaz de prevenir la hemaglutinación de los eritrocitos a concentraciones 10^8 veces más bajas que los monómeros de AS (figura 1.8) [48].

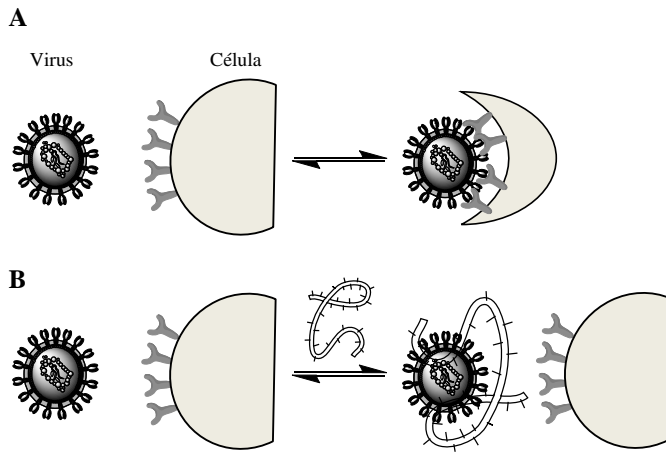


Figura 1.8. (A) Adhesión del virus de la influenza a una célula huésped mediante interacción multivalente. (B) Inhibición de la interacción por la acción de un polímero funcionalizado con múltiples unidades de AS.

1.2. Aplicaciones biomédicas de las poliaminas

Al descubrirse, en los años sesenta, que las poliaminas estaban unidas a un gran número de aniones celulares, incluyendo el ADN y el ARN, el estudio de las mismas salta a la primera línea de interés. Desde entonces, los esfuerzos en investigación en el campo de las aplicaciones biomédicas de las poliaminas han dado lugar a grandes avances. Esta área de investigación ha sido siempre multidisciplinar, siendo abordada desde las perspectivas de la química sintética, la química supramolecular, la biología molecular, la genética, la parasitología, el desarrollo de fármacos y otros campos relacionados. Y producto de toda esta sinergia, se han venido obteniendo resultados de manera periódica, plasmados en el descubrimiento de compuestos que actúan como antiparasitarios, miméticos enzimáticos, agentes de transferencia genética, agentes antitumorales, etcétera, algunos de los cuales se encuentran ya en fase clínica avanzada [49].

En este apartado se comenzarán describiendo las poliaminas de origen natural, siguiendo con las aplicaciones que se han abordado en esta tesis para los derivados sintéticos: como agentes antitumorales, miméticos enzimáticos y antiparasitarios.

1.2.1. Poliaminas en los sistemas biológicos

En todas las células vivas se pueden encontrar poliaminas, las cuales son esenciales para la vida en eucariotas al ejercer un rol fundamental en diversos procesos celulares. A continuación, se hará un breve repaso de la estructura, función, toxicidad y regulación de las poliaminas que se encuentran de forma natural en los sistemas vivos.

En la figura 1.9 podemos ver algunos ejemplos de la diversidad de poliaminas que se encuentran en la naturaleza [50]. Se trata de moléculas pequeñas, cargadas positivamente a pH fisiológico. La mayoría de las poliaminas más largas están presentes en organismos termófilos (de allí los nombres como termina, caldina y termoespermina), si bien también se pueden encontrar en otros organismos [51]. En el caso de los mamíferos, están presentes tres miembros de esta familia: espermina, espermidina y putrescina, y las tres son necesarias para el desarrollo y crecimiento normal de los organismos.

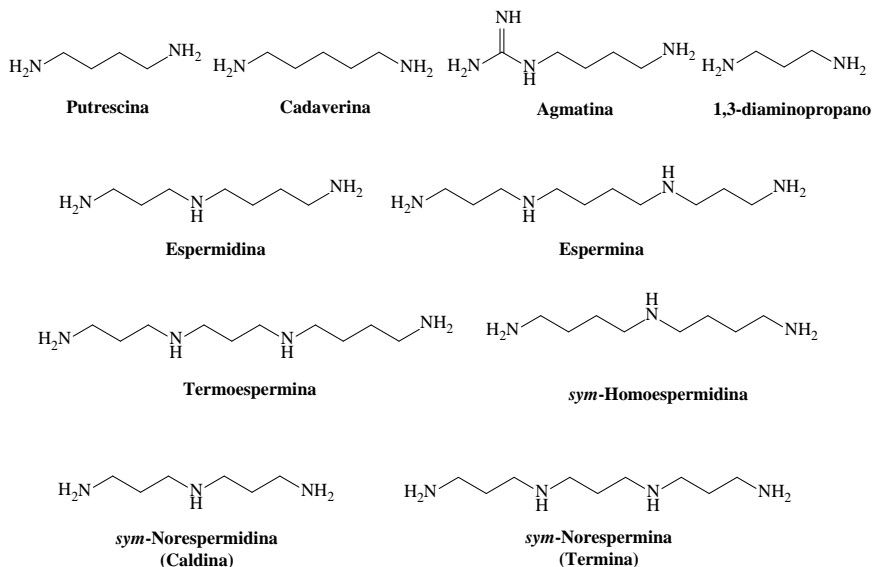


Figura 1.9. Ejemplos de poliaminas biogénicas. Los términos subrayados corresponden a aquellas poliaminas sintetizadas por los mamíferos [50].

Las principales fuentes de poliaminas exógenas son la alimentación y las bacterias gastrointestinales [52]. Sin embargo, sigue habiendo un conocimiento bastante limitado acerca de los mecanismos por los que las células adquieren las poliaminas a través del llamado, de manera general, sistema de transporte de poliaminas (o PTS, por sus siglas en inglés). Este ubicuo sistema está compuesto por una variedad de permeasas, específicas para diferentes sustratos, de cuya identidad y composición proteica aún conocemos poco. Lo que sí sabemos es que, con frecuencia, la actividad del PTS aumenta significativamente con la transformación oncogénica de las células [53], habiendo en la literatura una gran cantidad de información que relaciona el cáncer con elevados niveles de poliaminas [54, 55]. Es decir, el PTS está sobreexpresado en una gran variedad de células cancerígenas, lo que convierte a las poliaminas y sus derivados en excelentes candidatos como agentes antitumorales.

Las poliaminas biogénicas ejercen multitud de funciones que afectan al crecimiento y desarrollo celular: tienen un efecto estabilizador sobre la estructura de los ácidos nucleicos; poseen propiedades antioxidantes; juegan un papel en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos; regulan la expresión de muchos genes y controlan la actividad de los canales de iones y modulan la actividad quinasa [56, 57, 58]. Debido a que las poliaminas se encuentran parcial o totalmente protonadas a pH fisiológico, pueden unirse a los surcos mayor y menor del ADN y al surco mayor del ARN (figura 1.10) a través de interacciones electrostáticas con los grupos fosfatos. Esta interacción induce la condensación del ADN, estabilizando la cromatina y protegiendo el ADN de agentes peligrosos, como radiaciones ionizantes y especies reactivas de oxígeno [59]. Los complejos que forman con el ARN provocan cambios en la estructura de éste, lo que da lugar a la estimulación e incremento de la eficiencia en la síntesis de proteínas [52].

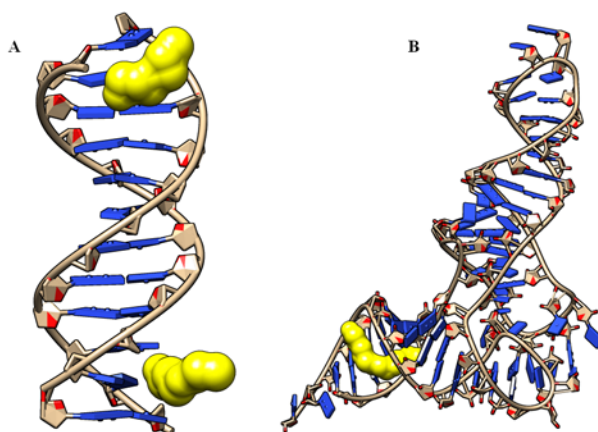


Figura 1.10. Interacción de la poliamina biogénica espermina (en amarillo) con el surco mayor del (A) ADN y (B) ARN. PDB refs. 1S2R [60] y 2TRA [61], respectivamente.

Sin embargo, y a pesar de la absoluta necesidad de los organismos por las poliaminas, éstas pueden tener también un efecto tóxico en el crecimiento y viabilidad de microorganismos, espermatozoos, cultivos de células de mamífero y virus [62]. Los primeros estudios sobre la farmacología de la espermina y espermidina revelaron que poseían una toxicidad elevada al ser inyectadas en animales [63]. Esta toxicidad puede tener varias causas: un exceso en la concentración intracelular de poliaminas conlleva un desajuste del metabolismo celular, incluyendo la síntesis de proteínas. También es posible que provoquen un desplazamiento de otros cationes, como magnesio, de los ácidos nucleicos, membranas, etcétera. La toxicidad puede no estar relacionada directamente con las poliaminas, sino con algunos productos del catabolismo oxidativo de estas, principalmente aldehídos [50].

Por todos estos motivos, la concentración intracelular de poliaminas se mantiene estrictamente controlada dentro de unos límites a través de una compleja red de mecanismos biosintéticos, catabólicos y de transporte altamente regulados [54]. Como ya se ha mencionado antes, fallos en este sistema de regulación, que provocan elevadas concentraciones de poliaminas intracelulares, están correlacionados con una alta proliferación celular, típica de la tumorigénesis [55].

1.2.2. Los ácidos nucleicos como dianas supramoleculares de poliaminas sintéticas

Como se ha mencionado en el capítulo anterior, los ácidos nucleicos son una de las principales dianas para las poliaminas naturales, las cuales juegan un papel importante en la estabilización conformacional de éstos. Estas interacciones son de tipo no covalente y pueden, por tanto, considerarse por sí mismas como química supramolecular *in vivo* [64]. En este apartado, se demostrará y ejemplificará cómo los derivados sintéticos de las poliaminas pueden también seguir este camino, interaccionando con los ácidos nucleicos y abriendo, de esta manera, la puerta a diversas aplicaciones en el campo de la biomedicina.

Los ácidos nucleicos como diana, desde el punto de vista de la química supramolecular, ofrecen diversas posibilidades para las interacciones de tipo no covalente. En primer lugar, están cargados negativamente, debido a su esqueleto fosfatado, por lo que pueden establecer interacciones de tipo electrostático con receptores poliamínicos que tengan grupos protonados a pH fisiológico. En segundo lugar, se ofrece la posibilidad de establecer interacciones por puentes de hidrógeno, a través tanto de los grupos fosfato como de las bases nitrogenadas. Y además, dado que en la mayoría de sus conformaciones las bases nitrogenadas se encuentran apiladas, se pueden establecer interacciones de tipo apilamiento π con ligandos que contengan anillos aromáticos condensados, interacciones que pueden verse favorecidas por el ambiente hidrofóbico del interior de la doble hélice.

Tomando en cuenta estas posibilidades, los tipos de interacción no covalente de pequeños ligandos orgánicos con las conformaciones más comunes de los ácidos nucleicos se pueden clasificar de manera general en una o varias de las siguientes categorías:

Interacción con el surco mayor o menor

En la figura 1.11A se representa un segmento de ADN de doble hebra en su conformación B, la fisiológicamente más relevante. Como se puede apreciar, los pares de bases se sitúan de manera aproximadamente ortogonal al eje de la hélice, y la estructura da lugar a dos tipos de surcos: uno mayor, de 11.6 Å de ancho y 8.5 Å de profundidad, y otro menor, con una anchura de solo 6.0 Å pero con una profundidad de 8.2 Å [65, 66]. El surco mayor puede interactuar tanto con moléculas pequeñas como con otras más voluminosas, incluyendo diversas proteínas. El surco menor es el sitio de unión más favorecido para muchas moléculas pequeñas, ya que presenta una mayor densidad de cargas negativas, particularmente cuando hay múltiples secuencias no alternadas de adenina-timina (AT). Existen diversos ejemplos de moléculas que interactúan con el surco menor: distamicina (antitumoral), netropsina (antibiótico y antiviral) o Hoechst 33528 (marcador fluorescente del núcleo celular). Las fuerzas intermoleculares que intervienen en esta interacción son principalmente de tipo electrostáticas, entre los grupos amino protonados y los grupos fosfato, y por puentes de hidrógeno con los pares de bases. En la figura 1.11B se representa la estructura cristalina del complejo netropsina-ADN, en ella se aprecia cómo el ligando estrecho encaja perfectamente en el surco menor, en contacto cercano a las paredes del surco [65].

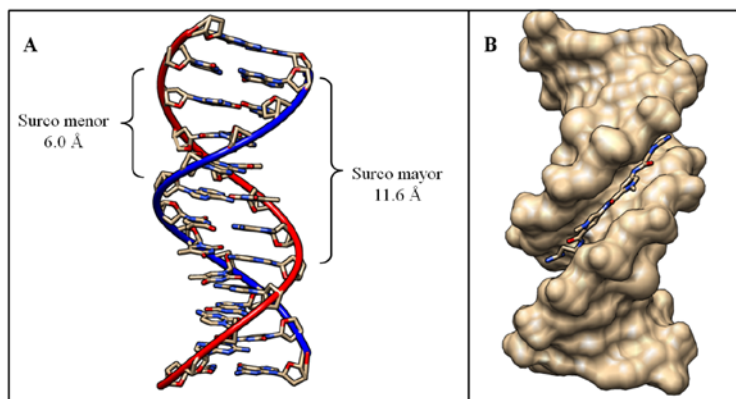


Figura 1.11. (A) Estructura cristalina (PDB ref. 1S2R) de un oligonucleótido de ADN [60]. (B) Estructura cristalina (PDB ref. 6BNA) del complejo formado por la droga antitumoral netropsina y ADN [67].

Si bien la mayor parte de la investigación relacionada con la interacción de pequeñas moléculas con los ácidos nucleicos se ha centrado principalmente en el ADN, en los últimos años se ha producido un creciente interés en el ARN como diana, tanto por su papel en la replicación y expresión de los genes como por la atención que hay puesta en los retrovirus. Las moléculas de ARN presentan una mayor diversidad estructural que las de ADN, con su repetitivo patrón de doble hélice. Estos motivos estructurales del ARN incluyen bucles, nudos y triples hélices [68] (figura 1.12A). Los ligandos que se unen preferentemente al ARN suelen hacerlo en el surco mayor, como es el caso del antibiótico aminoglucósido paromomicina, cuya estructura cristalina, unido a ARN de doble hélice del virus del VIH, aparece representada en la figura 1.12B.

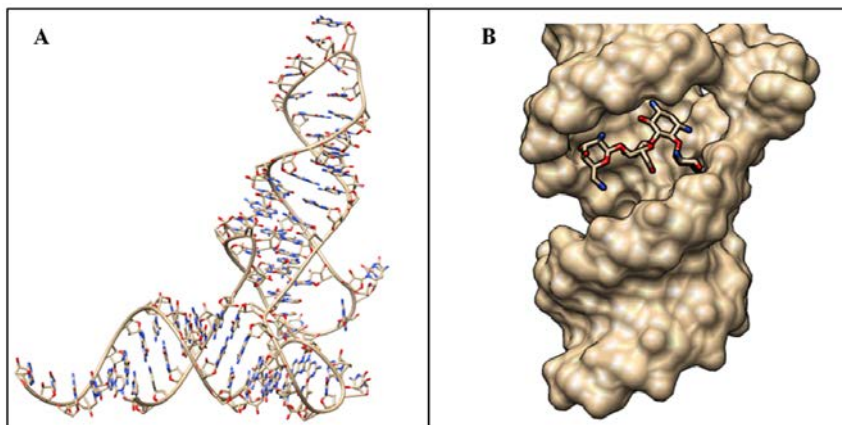


Figura 1.12. (A) Estructura tridimensional de tARN de levadura (PDB ref. 1VTQ) [69]. (B) Molécula de paromomicina unida a un segmento de la estructura cristalina del ARN del VIH (PDB ref. 3C44) [70].

Intercalación

Este modo de interacción, originalmente propuesto por Lerman y Pritchard en los años sesenta [71, 72], implica que el espacio entre dos pares de bases, apilados en la doble hélice, puede ser abierto para dar cabida a una molécula aromática plana, que se inserta en este espacio hidrófobo formando una interacción de tipo π - π con las bases, superior e inferior. El acceso del agente intercalante puede tener lugar tanto desde el surco mayor como del menor. El aumento, inducido por el fenómeno de intercalación, en la separación de los pares de bases provoca un desenrollamiento parcial de la doble hélice, que aumenta su longitud. El esqueleto fosfatado del ADN no es lo suficientemente flexible para permitir que un compuesto se inserte en cada espacio entre pares de bases, sino que, una vez que un espacio se ha llenado, los adyacentes deben permanecer vacíos, dando lugar a que, como máximo, pueda haber una molécula intercalante por cada dos espacios entre pares de bases. A este hecho se le conoce como el principio de exclusión del vecino próximo [73]. Las moléculas intercalantes que no tienen sustituyentes voluminosos, como los hidrocarburos poliaromáticos (antraceno, pireno, fenantreno, etcétera) o la proflavina, que se muestra en la figura 1.13, pueden intercalar sin que haya ninguna parte significativa de la molécula en ninguno de los surcos. A este tipo de compuestos se les denomina intercaladores clásicos [74].

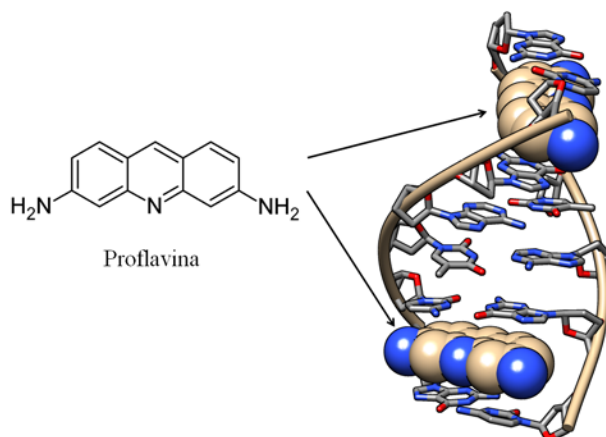


Figura 1.13. Esquema del intercalador clásico proflavina y estructura cristalina (PDB ref. 3FT6) [75] del complejo formado con un hexámero de ADN.

Sin embargo, muchas moléculas intercalantes poseen sustituyentes voluminosos que, en los complejos formados con el ADN, deben permanecer en alguno de los surcos. A este tipo de compuestos, llamados en inglés *threading intercalators*^a, pertenecen muchos de los compuestos estudiados en esta tesis, así como los compuestos representados en la figura 1.14: las antraciclinas (doxorubicina y daunomicina, usados como antitumorales) [76, 77], el bromuro de etidio y las drogas DACA [78] y quinacrina [79]. Y, para ilustrar este modo híbrido de interacción, en la figura 1.15 se muestra la estructura del complejo formado por la daunomicina, una importante droga antitumoral, y el ADN. Como se aprecia en la figura, el ligando se inserta por el surco menor, intercalando la parte aromática entre los pares de bases, mientras que la parte no aromática, cargada positivamente a pH fisiológico, se mantiene en la parte exterior interaccionando con la cadena fosfatada del surco menor.

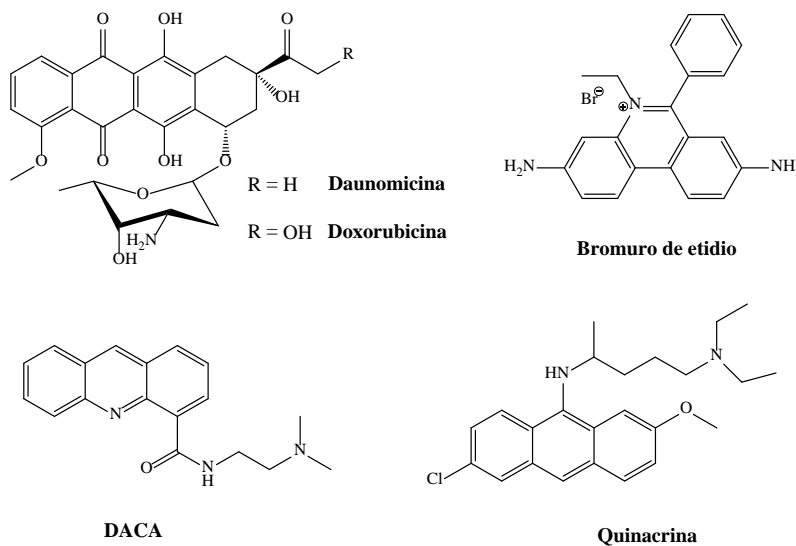


Figura 1.14. Ejemplos de agentes intercalantes del tipo *threading intercalator*.

^a La traducción literal del término sería “intercalador que enhebra”, haciendo una analogía con un hilo que pasa por el ojo de la aguja.

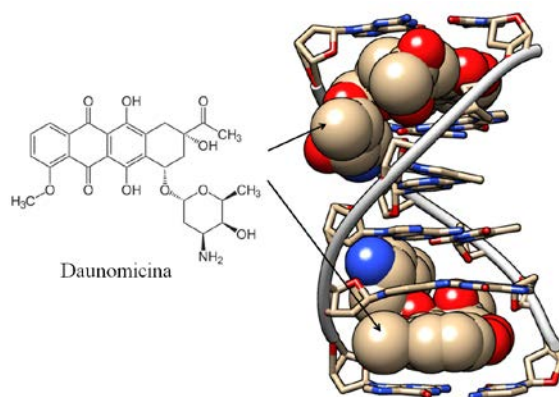


Figura 1.15. Estructura cristalina del complejo formado por la droga anticancerígena daunomicina con el ADN del protozoo *Trypanosoma brucei* (PDB ref. 308D) [80].

Además de moléculas orgánicas aromáticas, hay otro tipo de compuestos que pueden dar lugar al fenómeno de la intercalación: los complejos metálicos [81]. El primer ejemplo de este tipo de compuestos fue un complejo plano de Pt(II) y terpiridina, desarrollado por Lippard [82]. Posteriormente, se han desarrollado compuestos octaédricos de Ru(II) y Rh(III) con ligandos planos. Estos ligandos son capaces de intercalar entre los pares de bases del ADN, mientras que el metal y los coligandos adicionales se alojan sobre uno de los surcos [83].

Otro proceso relacionado puede tener lugar cuando dos intercalantes están unidos entre sí en una sola molécula. Si el espaciador es suficientemente largo y flexible, la molécula puede adoptar una conformación que permita a cada unidad intercalante insertarse en dos sitios diferentes del mismo dúplex de ADN. A este proceso se le denomina bis-intercalación [64, 73, 84, 85].

Los mecanismos de interacción antes mencionados, hacen referencia a la forma más relevante del ADN, la forma B. Cabe aquí mencionar que existen otros tipos de conformaciones no convencionales del ADN, como la forma Z, los cuartetos de guanina, las triples hélices, los motivos i, etcétera [86]. Estas conformaciones pueden dar lugar a otros modos de interacción con pequeñas moléculas, si bien estos aspectos sobrepasan el alcance planteado para la introducción de esta tesis doctoral.

1.2.3. Agentes antitumorales basados en poliaminas

Poliaminas sintéticas de cadena abierta

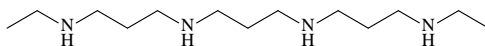
Como se ha mencionado en el apartado 1.2.1 de esta introducción, las poliaminas naturales interactúan con los ácidos nucleicos, ejercen multitud de funciones a nivel celular y su concentración es mayor en diversos tejidos tumorales. No es de extrañar, pues, que los primeros esfuerzos en el desarrollo de poliaminas sintéticas como potenciales agentes antitumorales fueran orientados hacia la obtención de análogos no naturales de las poliaminas biogénicas. Algunos de estos primeros análogos, desarrollados en los años ochenta, se prepararon introduciendo modificaciones sencillas a las poliaminas naturales: grupos amino alquilados, cambios en la longitud de la cadena carbonada, mayor número de grupos amino, etcétera [49, 87].

Los ensayos sobre la actividad de estos primeros análogos revelaron que la alteración en los valores de pK_a , producidos por la alquilación de los nitrógenos terminales, podía modificar el metabolismo de las poliaminas y tener, por tanto, un efecto terapéutico potencial. Esto llevó al diseño y preparación de una gran variedad de compuestos con poliaminas terminales secundarias. Ejemplos de estos primeros derivados son los compuestos **1**, **2** y **3** que se muestran en la figura 1.16. Estos análogos entran a las células a través del sistema de transporte de poliaminas (PTS) y provocan una disminución en la síntesis de las poliaminas naturales [88]. El compuesto **1** avanzó en fase clínica I y II, revelando que era de bajísima toxicidad y apto para su administración; sin embargo, no mostró efectos clínicos significativos en pacientes con cáncer de pulmón o de pecho [49].

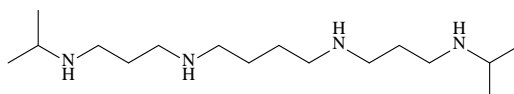
Debido al relativo éxito de estos compuestos, se diseñaron una serie de análogos de segunda generación con actividad antitumoral mejorada. Ésto se consiguió dotando a los compuestos de cierta rigidez estructural, restringiendo la rotación en el centro de las poliaminas mediante la incorporación de, por ejemplo, anillos ciclopropilo *cis*- y *trans* (**4**), triples enlaces (**5**) o anillos aromáticos 1,2-disustituídos (**6**) [89]. Otra conclusión derivada de estos estudios fue que los compuestos con un esqueleto carbonado de cadenas propilénicas (por ejemplo el compuesto **1**), eran más efectivos que los correspondientes análogos que alternaban

Introducción

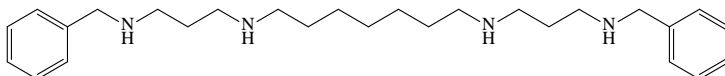
cadena propilénicas con otras más largas (compuestos **2** y **3**). También se observó que los derivados de la espermina eran más efectivos que los derivados de la espermidina [49, 54].



1, BENSpm



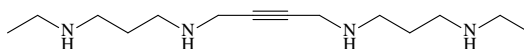
2, BIPSpM



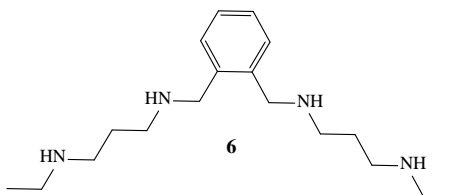
3, MDL 27695



4



5



6

Figura 1.16. Ejemplos de poliaminas sintéticas de cadena abierta con actividad antitumoral.

Respecto al número de cargas positivas en los compuestos, se ha encontrado que existe una correlación lineal entre la afinidad hacia un ácido nucleico y el número de posibles puentes salinos [90, 91]. Las tres poliaminas biogénicas también siguen esta dependencia, como se muestra en la figura 1.17.

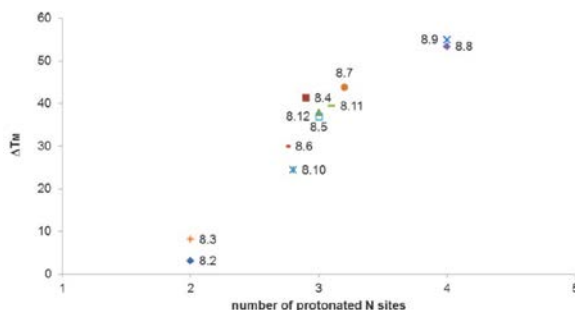


Figura 1.17. Diagrama representando la relación entre afinidad con poli(A)-poli(U) (en términos de ΔT_m) y el número de cargas positivas a pH = 6.25 [92].

Las causas de la actividad biológica de estos compuestos no está aún del todo establecida, si bien se suele asociar a alguno de estos factores: (a) interaccionan en los mismos sitios de unión que las poliaminas naturales, pero son incapaces de ejecutar las mismas funciones esenciales de estas; (b) activan los mecanismos de degradación de poliaminas en la célula, reduciendo la concentración de éstas por debajo del nivel necesario para el crecimiento celular; (c) inducen la condensación del ADN, especialmente los análogos α -metilados [50, 54, 64].

Respecto a la selectividad frente a modelos de ADN y ARN, de manera general, la afinidad (medida como un incremento de la temperatura de desnaturalización, ΔT_m) de la poliaminas es mayor para el ARN que por el ADN [93, 94]. De entre los múltiples compuestos estudiados, cabe destacar los casos de la poliamina lineal **7** y de la poliamina tripodal **8**, que se muestran en la figura 1.18, por la notable diferencia en la estabilización del modelo de ARN frente al de ADN. En el caso del compuesto **8** el $\Delta\Delta T_m$ es superior a 41 °C (ver tabla 1.2) [92, 95].

Introducción

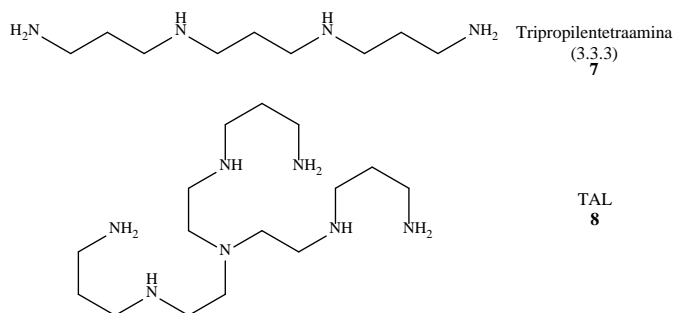


Figura 1.18. Ejemplos de poliaminas de cadena abierta selectivas por ARN frente a ADN.

Tabla 1.2. Estudios de temperatura de fusión de los ligandos 7 y 8 con poli(A)–poli(U) y poli(dA)–poli(dT)^a.

Ligando (n° de cargas)	r^b	ΔT_m (°C)	
		Poli(A)–poli(U)	Poli(dA)–poli(dT)
Tripropilentetraamina, 7 (+4)	0.1	41.6	11.2
	0.2	53.4	–
	0.3	^c	>50
TAL, 8 (+5-6)	0.1	30.9	0.9
	0.2	38.9	1.4
	0.3	43.2	1.4

^a Condiciones: 0.01 M tampón MES, pH 6.25, $I = 0.01$ M (ajustado con NaCl); error en $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C. ^b r , relación molar ligando/ácido nucleico. ^c Precipitación del complejo.

Conjugados poliamina-arilo

La funcionalización de las poliaminas con restos aromáticos permite que existan formas de interacción adicionales con los ácidos nucleicos, como apilamientos de tipo π – π con los pares de bases o por puentes de hidrógeno, en el caso de heterociclos aromáticos. Además se aumenta la hidrofobicidad del compuesto, lo que generalmente incrementa la asimilación celular, aumentando así su actividad biológica. Una ventaja adicional es que los anillos aromáticos condensados generalmente son

fotoluminiscentes, permitiendo ampliar los estudios mediante técnicas espectroscópicas altamente sensibles, como la emisión de fluorescencia.

Como ejemplos de este tipo de compuestos, en la figura 1.19 se representan derivados de las poliaminas biogénicas espermidina (**9**) y espermina (**10**) que han sido funcionalizadas con naftalimida, para dotarlas de una función intercalante [96]. La unión de un fármaco a una poliamina tiene también la ventaja de permitir explotar el sistema de transporte de poliaminas (PTS) e incrementar la afinidad por el ADN, lo que provoca una mayor eficiencia en la actividad biológica del fármaco, tal como se demostró en el caso del compuesto F14512 (**11**), que es un derivado del fármaco antitumoral etopósido, con una espermina en el lugar de la unidad glucosídica [64, 97].

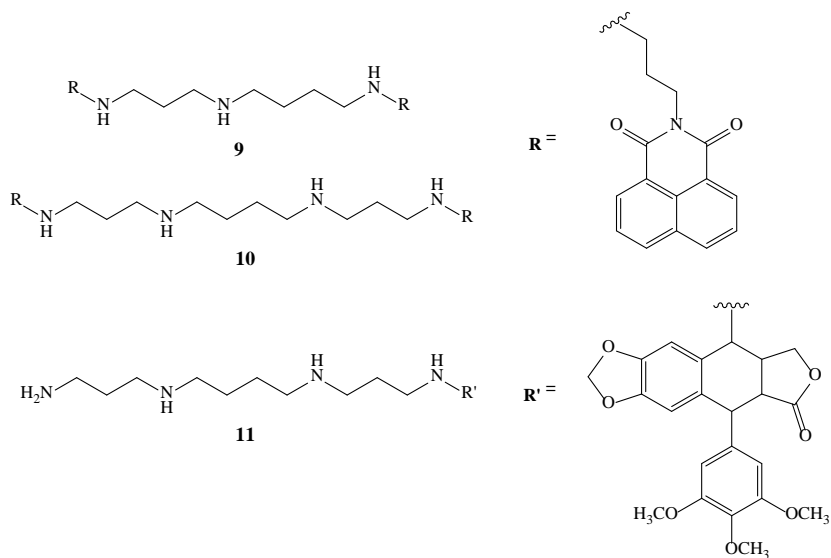


Figura 1.19. Derivados naftalimídicos de las poliaminas biogénicas espermina (**9**) y espermidina (**10**). Derivado de la droga etopósido con la poliamina espermina (**11**).

Una estrategia para mejorar la eficiencia antitumoral de una poliamina suele ser la de aumentar su afinidad por el ADN. Una forma de conseguirlo ha sido uniendo dos cromóforos a una misma poliamina para dar lugar al fenómeno de la bis-intercalación. Los compuestos pertenecientes a este grupo que más se han estudiado como agentes antitumorales son las bis(acridinas), como las que se muestran en la figura 1.20 (compuestos **12** y **13**) [98, 99]. Incluso se ha llegado a sugerir, en base a los resultados experimentales, que el compuesto **14** da lugar a una tris-intercalación, si bien la actividad biológica del mismo no difiere de la de los otros dos compuestos [100].

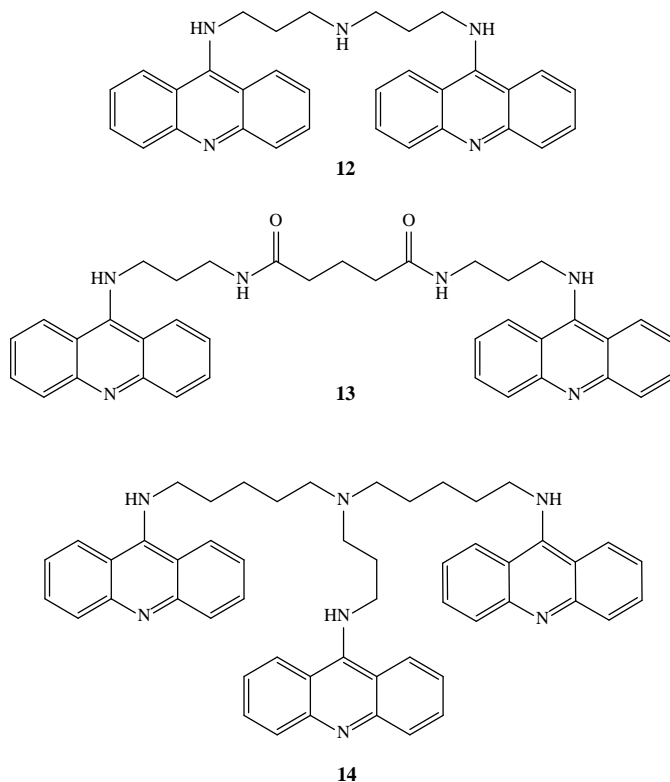


Figura 1.20. Ejemplos de bis- y tris-intercalantes basados en poliaminas.

Poliaminas macrocíclicas

En términos generales, las poliaminas de cadena abierta interactúan con el surco menor a través de puentes salinos con los grupos fosfato del ADN o del ARN. En consecuencia, la selectividad respecto a la secuencia de nucleobases es limitada. Para intentar soslayar este problema, se han estudiado un gran número de compuestos poliazamacrocíclicos, con la idea de que un esqueleto más rígido impondría ciertas restricciones estéricas en la interacción que podrían derivar en una mayor selectividad al optimizar los contactos entre los grupos amonio y los grupos fosfato o los pares de bases de una determinada secuencia. Además, tomando en cuenta que el surco mayor en el ARN es más estrecho que el del ADN en la habitual conformación B, la optimización en la estructura del ligando podría mejorar también la selectividad entre ácidos nucleicos [92].

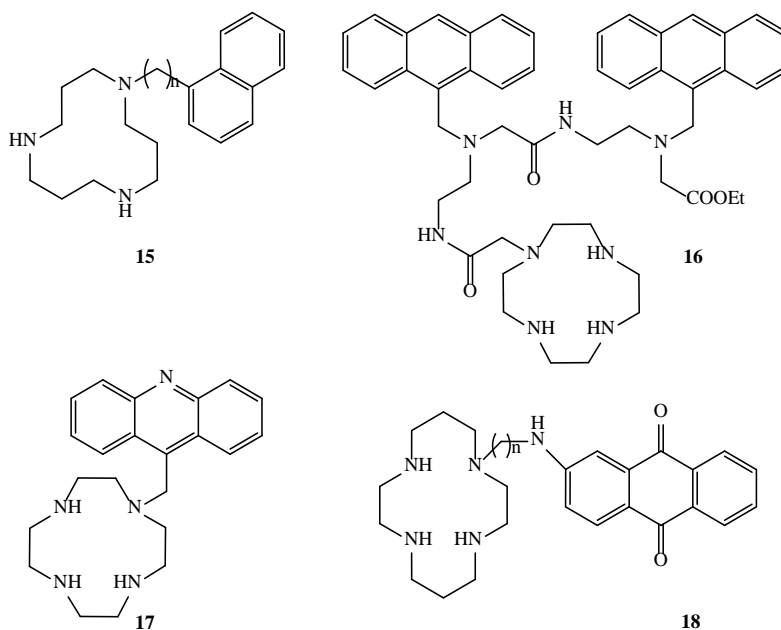


Figura 1.21. Poliazamacrociclos modificados con grupos intercalantes.

Algunos ejemplos de compuestos de este tipo que han sido ampliamente estudiados son los macrociclos: 1,4,7-triazaciclononano ([9]aneN₃), 1,5,9-triazaciclododecano ([12]aneN₃) y 1,4,7,10-tetraazaciclododecano ([12]aneN₄) [101, 102]. Al igual que con las poliaminas de cadena abierta, en algunos casos se ha utilizado la estrategia de combinar estos macrociclos con grupos intercalantes, como naftaleno, antraceno, acridina o antraquinona (figura 1.21, compuestos **15** [103], **16** [104], **17** [105] y **18** [106]) para incrementar la afinidad y, en consecuencia, la actividad biológica.

Un grupo particular de compuestos macrocíclicos son los llamados ciclofanos, que incluyen una o varias unidades aromáticas como parte del macrociclo. En el caso de los poliazaciclofanos, es una cadena poliamínica la que sirve de puente entre las unidades aromáticas. El estudio de estos compuestos como posibles agentes antitumorales fue inspirado por el éxito de los antibióticos policatiónicos de tipo aminoglucosídico (ver figura 1.12, sección 1.2.2 de esta introducción), que interaccionan selectivamente con el ARN, y por la necesidad de encontrar análogos que fueran sintéticamente accesibles [107]. Ya que los aminoglucósidos poseen un esqueleto relativamente rígido y cargado positivamente, la estrategia consistió en incluir grupos aromáticos que dotaran de rigidez a macrociclos con grupos amonio. El compuesto **19** (figura 1.22) fue uno de los primeros poliazaciclofanos estudiados con esta finalidad [108]. También los compuestos **20** y **21** demostraron tener una mayor afinidad por el modelo de ARN frente al ADN [92]. Además, si la unidad aromática del ciclofano posee varios anillos condensados, como el caso de la fenantrolina del compuesto **22**, éste puede actuar como unidad intercalante [109].

La capacidad de muchos de estos compuestos, tanto los de cadena abierta como los macrociclos, para coordinar metales de transición ha sido explorada. Gracias a la posibilidad de coordinar uno o varios cationes metálicos, dejando en algunos casos vacantes en las posiciones de coordinación, muchos de los complejos metálicos de Zn²⁺ y de Cu²⁺ se comportan como nucleasas artificiales, catalizando la rotura de los enlaces fosfodiéster de los ácidos nucleicos.

Introducción

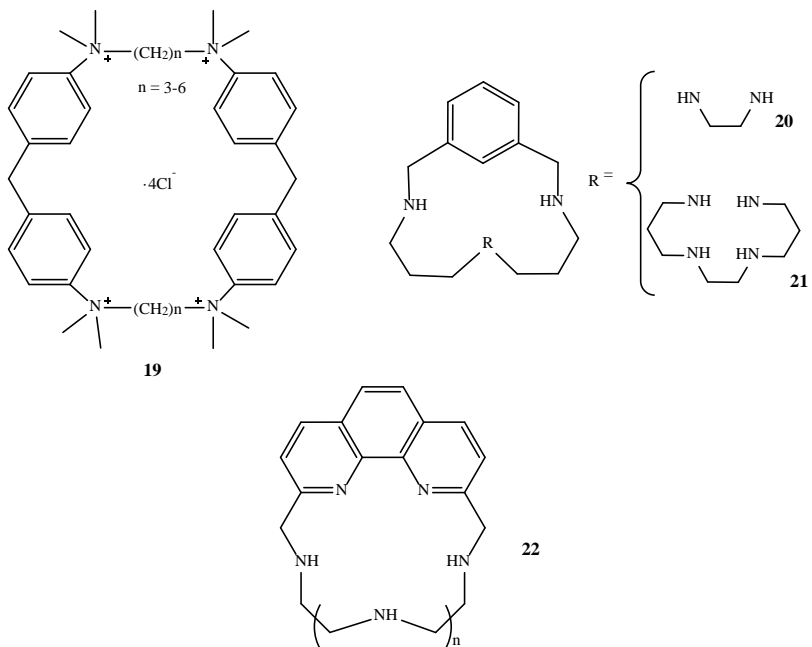


Figura 1.22. Ejemplos de compuestos de tipo poliazaciclofano.

1.2.4. Sensores basados en poliaminas para sustratos de interés biológico

El reconocimiento y cuantificación de biomoléculas ha sido un reto que ha impulsado décadas de esfuerzo en investigación debido a la enorme importancia que tiene en el campo de la medicina. Una aproximación a este fenómeno ha sido la utilización de biosensores en técnicas como Western blots, ELISAs y otros métodos inmunoquímicos. Sin embargo, estos sistemas basados en biomateriales han fracasado, casi en su totalidad, a la hora de convertirlos en dispositivos analíticos eficaces en tiempo real (con la notable excepción del monitor de glucosa), debido en gran parte a la dificultad de traducir los eventos de interacción biomolecular en una señal de salida fácilmente medible [110]. Por este motivo, muchos de los receptores sintéticos que se han venido preparando desde los inicios de la química supramolecular han sido orientados a esta aplicación, con la ventaja de que éstos, al contrario que los biosensores naturales, pueden ser fácilmente equipados con elementos de señalización (cromóforos, fluoróforos, etcétera). Suelen ser, además, más estables, y pueden adaptarse para trabajar en cualquier medio que se desee [111].

De manera general, nos referimos como sensor químico a aquel dispositivo capaz de transformar información química en señales analíticamente útiles [112]. Una manera de clasificarlos es atendiendo al tipo de señal que emitan. En esta introducción nos centraremos en la familia de sensores ópticos, haciendo énfasis en aquellos basados en poliaminas. En cualquier caso, al tratarse de sistemas supramoleculares, es importante que posean los requisitos antes mencionados en esta introducción: una gran sensibilidad (elevada energía libre de complejación, ΔG) y selectividad (elevada diferencia entre las energías libres para dos analitos distintos $\Delta\Delta G$)^b. Ambas propiedades se pueden ajustar haciendo uso de los principios de complementariedad y preorganización, ya discutidos en esta tesis [111].

^b Con la excepción de los sistemas de detección basados en redes de sensores (*array sensing*), desarrollados recientemente por el Prof. E. V. Anslyn, en los cuales una baja selectividad puede no ser una desventaja.

Sensores moleculares ópticos

Un quimiosensor óptico es una molécula que incorpora un sitio de enlace, un cromóforo o fluoróforo, y un mecanismo de comunicación entre los dos [113]. El receptor tiene que ser capaz de establecer interacciones de suficiente energía con el sustrato deseado, y este evento debe ser comunicado a la subunidad señalizadora para que emita una señal óptica perceptible y bien definida (figura 1.23). La eficiencia del sensor será comparable a la selectividad del receptor y a la facilidad de detectar y medir la señal emitida. Una propiedad óptica detectable y medible en tiempo real, utilizando instrumental de bajo coste, y que permite trabajar a concentraciones muy bajas es la fluorescencia [114, 115]. En un sensor fluorescente la unidad señalizadora será, evidentemente, un fluoróforo capaz de convertir la información (el evento de reconocimiento) en una señal óptica expresada como un cambio en las características fotofísicas del mismo. Estos cambios se deben a la perturbación de los procesos fotoinducidos, tales como la transferencia de carga, transferencia de energía, formación de excímeros, etcétera [116].

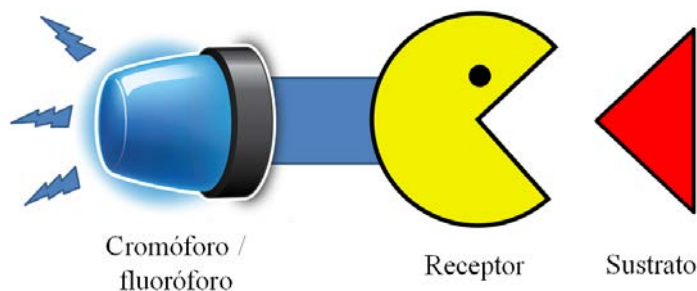


Figura 1.23. Representación esquemática del diseño de un quimiosensor óptico mediante la unión de un receptor a un elemento óptico de señalización. La presencia de un espaciador entre ambos es opcional.

Debido a la gran demanda en química analítica, bioquímica y química médica por el diseño de sensores fluorescentes, se han desarrollado una gran variedad de éstos. Los analitos de interés biológico que se pueden detectar incluyen cationes (H^+ , Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , etc.) [117, 118, 119, 120, 121], aniones (citratos, carboxilatos, fosfatos,

ácidos nucleicos, etc.) [122, 123, 124, 125], moléculas neutras (azúcares, hidrocarburos) [126, 127, 128] y gases (O_2 , CO_2 , NO , etc.) [129, 130, 131].

En el caso de los sensores fluorescentes basados en poliaminas, el proceso responsable de los cambios observados es, en muchos casos, la transferencia electrónica fotoinducida (PET). El principio teórico detrás de este proceso se ilustra en la figura 1.24. Cuando se excita el fluoróforo, irradiando con la frecuencia adecuada, uno de los electrones en el HOMO es promovido al LUMO. Este proceso deja una vacante, que puede ser cubierta por un electrón situado en el HOMO del átomo dador (el nitrógeno del receptor). Esta transferencia electrónica fotoinducida, del HOMO del nitrógeno al del fluoróforo, provoca la desactivación de la fluorescencia, ya que el electrón antes promovido no puede regresar a su vacante en el HOMO del fluoróforo, ahora ocupado por un par de electrones.

El fenómeno PET se interrumpe cuando el analito de interés se une al receptor, ya que esta interacción suele tener lugar a través de los electrones del átomo dador (por ejemplo en la coordinación de un catión metálico). Esto resulta en un aumento de la fluorescencia (fenómeno conocido como CHEF, siglas en inglés de *chelation enhanced fluorescence*). Si bien, en algunos casos, también puede dar lugar a nuevos procesos de transferencia de carga que resulten en una mayor atenuación de la fluorescencia (CHEQ, *chelation enhanced quenching*) [116].

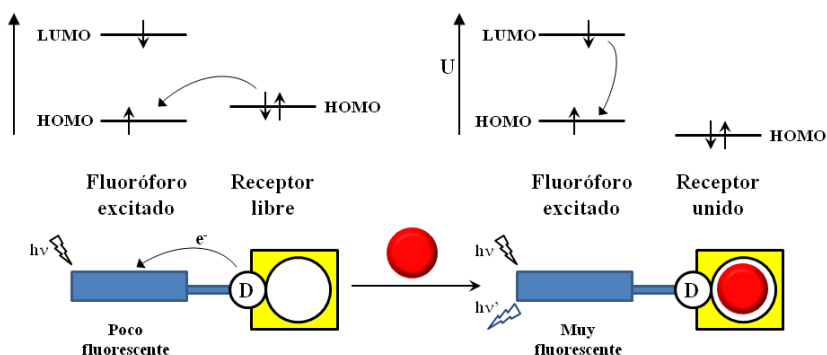


Figura 1.24. Esquema del reconocimiento de un analito mediante bloqueo del proceso PET. Figura adaptada de la referencia [116].

Basándose en este principio de transferencia electrónica fotoinducida se han preparado un gran número poliaminas como sensores fluorescentes. Podemos encontrar sensores de cadena abierta, como el compuesto **23** [132], o compuestos macrocíclicos, como los compuestos **24** [133] y **25** [134] (figura 1.25).

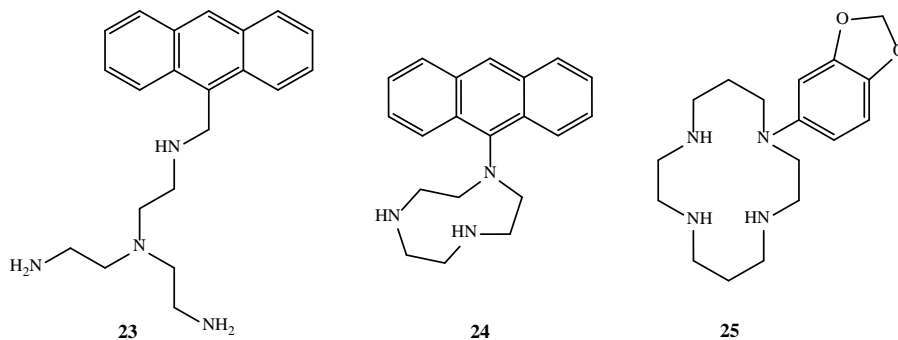


Figura 1.25. Ejemplos de sensores fluorescentes basados en el fenómeno de la transferencia electrónica fotoinducida.

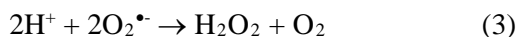
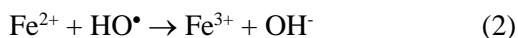
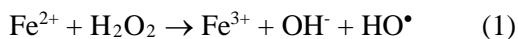
1.2.5. Compuestos poliamínicos como miméticos de la superóxido dismutasa

Todos los seres humanos tenemos una clara conciencia de la importancia vital que tiene el oxígeno, ya que no podemos prescindir de él más que unos pocos minutos. De hecho, el aumento de la concentración de oxígeno en la atmósfera hasta cantidades apreciables, impulsado por la fotosíntesis de las cianobacterias hace 2.3 billones de años, se considera como el evento que dio lugar a la aparición de la vida multicelular [135]. Estas nuevas formas de vida y su posterior diversificación hasta las criaturas de hoy en día, incluidos nosotros los humanos, se deben al oxígeno y al eficiente metabolismo que éste permite gracias, entre otras cosas, a su elevado potencial de reducción ($E(\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}) = +0.82 \text{ V vs. NHE}$) [136]. Las múltiples bondades de la vida aeróbica ocultan, sin embargo, otra realidad: el O_2 tiene muchos efectos tóxicos. Estos efectos nocivos del oxígeno se hacen patentes al observar que el tiempo de supervivencia de los organismos vivos disminuye al aumentar la concentración de oxígeno. Para explicar estos efectos dañinos del O_2 , en 1954 Gershan y Gilbert apuntan a los intermedios radicalarios de la reducción del dióxigeno [137]. Esta hipótesis fue desarrollada posteriormente por Fridovich en los años setenta, dando lugar a una teoría que establece que la formación del radical superóxido *in vivo* tiene un papel fundamental en los efectos tóxicos del oxígeno [138]. En este apartado, se abordarán los aspectos clave de esta teoría, se describirán las adaptaciones evolutivas que permiten a los seres vivos defenderse de estas especies tóxicas, las enfermedades que conlleva una disfunción en estos mecanismos protectores y, finalmente, se delinearán los miméticos enzimáticos derivados de poliaminas y sus posibles aplicaciones biomédicas.

Se define un radical libre como cualquier especie que posea uno o más electrones desapareados. Esta es una definición muy amplia que incluye al átomo de hidrógeno, a la mayoría de metales de transición e incluso al oxígeno molecular, que tiene dos electrones desapareados situados en dos orbitales π antienlazantes diferentes [139]. El hecho de que el O_2 sea paramagnético supone una restricción a la hora de reaccionar con especies diamagnéticas, como la materia orgánica, que hace que se ralenticen los tiempos de reacción (lo que evita que ardamos de manera

espontánea). Para superar esta restricción, dentro de las células, las enzimas encargadas de metabolizar el dióxígeno poseen metales de transición en sus centros activos, que les permiten dar y aceptar un electrón a la vez [140]. Cuando un solo electrón es aceptado por la molécula de O₂ se genera un radical superóxido, O₂^{•-}. Pequeñas cantidades de este radical se producen en muchos procesos dentro de las células aeróbicas, incluyendo la respiración celular normal, el metabolismo del ácido araquidónico, la actividad de la enzima xantina oxidasa y como resultado de la activación, en respuesta a una infección, de los fagocitos (neutrófilos, monocitos, macrófagos, etcétera) [136]. Para evitar esta reducción monoeléctronica, existen enzimas capaces de dismutar el O₂^{•-}.

El radical superóxido en sí mismo es tóxico y, si bien su reactividad real ha sido motivo de controversia, es potencialmente peligroso para todas las macromoléculas celulares. Es capaz de inactivar proteínas que contengan centros hierro-azufre (*clusters* de tipo [4Fe-4S]²⁺), y el hierro que se libera en este proceso, junto con el peróxido de hidrógeno proveniente de la dismutación del superóxido, dan lugar a reacciones de tipo Fenton (ecuaciones 1 y 2), en las que se forman especies más reactivas y peligrosas como el radical hidroxilo (el oxidante biológico más potente) o el peroxinitrito (oxidante, citotóxico y proinflamatorio) [141, 142, 143]. A este conjunto de moléculas oxidantes se les conoce como especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y su sobreproducción da lugar al estrés oxidativo, que es la situación en la cual los niveles de ROS en los tejidos exceden la capacidad de defensa de los sistemas antioxidantes. El estrés oxidativo está implicado en un gran número de trastornos patológicos: inflamación, daño por isquemia/reperfusión, enfermedades neurodegenerativas (esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, desorden bipolar, enfermedad de Alzheimer), diabetes, enfermedades oculares, cáncer [144, 145]. Existe, además, abundante evidencia que relaciona la producción de radicales libres de oxígeno con el envejecimiento [142].



Si bien el radical superóxido dismuta espontáneamente (ecuación 3), la reacción no es lo suficientemente rápida como para mantener la concentración intracelular a niveles suficientemente bajos [146]. Por este motivo, los organismos han evolucionado creando una familia de metaloenzimas protectoras llamadas superóxido dismutasas (SODs), que catalizan eficientemente esta reacción. Estas enzimas se pueden clasificar atendiendo al tipo de metal en su centro activo: cobre/zinc (CuZnSOD), manganeso (MnSOD), hierro (FeSOD) o níquel (NiSOD). Las SODs de hierro y manganeso están emparentadas evolutivamente, por lo que son estructuralmente similares, y se encuentran en las células procariotas y en las mitocondrias, respectivamente. Las SODs de níquel se encuentran en algunas células procariotas, mientras que las de cobre/zinc están en prácticamente todas las células eucariotas [136]. En el caso de los mamíferos, encontramos CuZnSOD en el citosol y extracelularmente, y MnSOD en el interior de las mitocondrias, donde se produce la mayor cantidad de superóxido [143, 147]. Los centros activos de estas tres familias están representados en la figura 1.26. En el caso de la MnSOD (al igual que para la FeSOD), un único metal está coordinado por dos histidinas y un ácido aspártico en el plano ecuatorial, y por otra histidina y una molécula de agua en posición axial, dando lugar a una geometría de bipirámide trigonal distorsionada. Una red de enlaces de hidrógeno se extiende desde esta molécula de agua hacia otros residuos. Esta molécula de agua y la red de enlaces de hidrógeno se consideran cruciales en el proceso de reducción del radical superóxido, al facilitar la transferencia de protón y controlar el potencial redox del centro metálico [143].

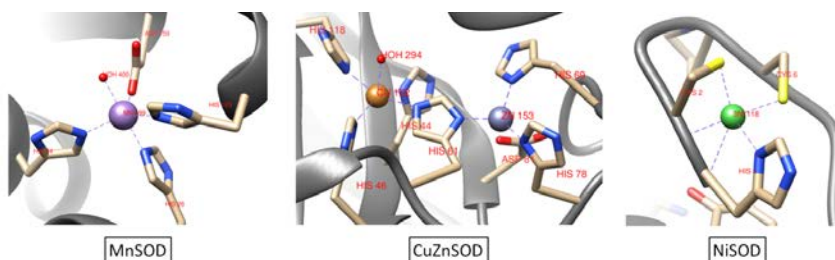


Figura 1.26. Centros activos de las superóxido dismutasas MnSOD [148], CuZnSOD (PDB ref. 2AEO) [149] y NiSOD (PDB ref. 1Q0D) [150].

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) se ha relacionado con mutaciones en la CuZnSOD, y una deficiencia de la misma está asociada con el envejecimiento prematuro y con una mayor incidencia de cáncer. Pero más importante aún es la MnSOD, la cual es esencial para la supervivencia de todos los organismos aeróbicos, desde las bacterias hasta los humanos. Ratones carentes de CuZnSOD han mostrado que son normales, aunque susceptibles de padecer lesiones neuronales. En cambio, ratones privados de MnSOD mueren entre los 10 a 21 días de nacer por cardiomiopatía, neurodegeneración y acidosis metabólica [136, 147]. Además, se ha encontrado que muchos tipos de tumor tienen bajos niveles de MnSOD [151].

Si bien se han llevado a cabo pruebas clínicas sobre el uso de la SOD como fármaco (CuZnSOD bovina, u Orgotein®), por ejemplo en el tratamiento de inflamación de vejiga, su uso no está muy extendido. Esto se debe a que las proteínas, en general, son fármacos poco eficientes: su gran tamaño y densidad de carga provoca una extravasación lenta y una eliminación renal rápida [144]. Además suelen provocar respuestas inmunológicas, no se pueden administrar por vía oral y los costos de producción son elevados [136]. Estas son las razones por las cuales se está realizando un importante esfuerzo en investigación encaminado a la obtención de compuestos no protéicos, de bajo peso molecular y capaces de imitar el comportamiento de las enzimas SOD, con el fin de utilizarlos como fármacos en el tratamiento de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

Cuando se diseña un mimético de la SOD interesa optimizar no solo la actividad catalítica del compuesto frente a la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, sino también su eficacia como fármaco (administración, asimilación y metabolismo). Por este motivo es necesario tener en cuenta una serie de factores que se detallan a continuación.

Potencial redox

La actividad SOD en disolución acuosa requiere de un potencial redox que esté cerca de 0.36V vs. NHE, que es el valor intermedio entre el potencial de oxidación y de reducción del radical superóxido (-0.16V y 0.89V vs. NHE, respectivamente). Este valor es óptimo para la reacción de

dismutación, ya que permite que ambas reacciones tengan lugar con la misma constante de velocidad [143, 145]. Este es el caso de las enzimas naturales, que tienen un potencial redox alrededor de 0.3V, independientemente del tipo de metal de su centro activo, y que son capaces de dismutar el $O_2^{\cdot-}$ con una constante de velocidad superior a $10^9 M^{-1}s^{-1}$ (ver figura 1.27).

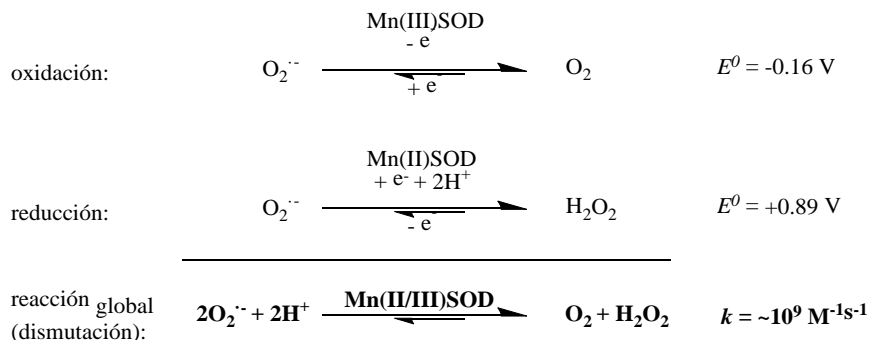


Figura 1.27. Reacción de dismutación del radical superóxido [145].

Presencia de cargas positivas

Otra de las razones por las que las SOD son enzimas tan eficientes es porque la disposición de las cargas positivas a lo largo del túnel de acceso permite “guiar” la molécula de $O_2^{\cdot-}$ hacia el centro activo (figura 1.28). La presencia de cargas positivas en los miméticos enzimáticos también es importante, no sólo porque permite establecer interacciones electrostáticas con el anión superóxido, sino también porque los compuestos cargados positivamente tienen tendencia a acumularse en las mitocondrias, y es en estos orgánulos celulares donde se produce la mayor cantidad de radicales superóxido [147, 152].

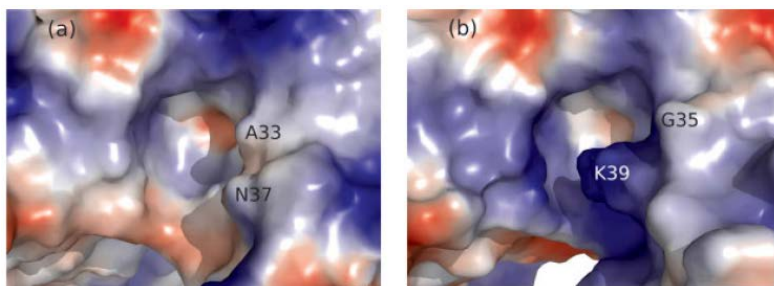


Figura 1.28. Superficies de potencial electrostático del túnel de acceso al centro activo de las enzimas (A) MnSOD humana y (B) FeSOD de *T. brucei*. Figura adaptada de la referencia [153].

Estabilidad de los complejos metálicos

Es importante que los ligandos tengan una alta afinidad por el metal de transición, tanto si se encuentra en su estado oxidado como en el reducido, para que los complejos sean estables en condiciones fisiológicas y no se libere el catión metálico mientras transita entre ambos estados de oxidación durante el ciclo catalítico. Ésto resulta particularmente importante en el caso de los complejos de cobre y de hierro porque, como ya se ha comentado antes, estos metales son tóxicos, ya que pueden dar lugar a la generación de radicales libres mediante reacciones de tipo Fenton. Otro motivo por el que es conveniente que los complejos sean estables es que el metal en sí mismo puede tener actividad SOD [154], por lo que resultaría difícil discernir si la actividad biológica es ejercida por el complejo o si, por el contrario, el ligando actúa sólo como un vehículo para el metal de transición [143]. Como se verá en los ejemplos que se discutirán más adelante, las estrategias empleadas para obtener complejos estables suelen estar basadas en el uso de ligandos de tipo quelato o macrocíclico.

Selección del metal

Entre los diferentes compuestos estudiados hasta la fecha como miméticos de la SOD, los complejos de manganeso han recibido especial atención, debido en gran parte a la menor toxicidad del manganeso en

comparación al hierro o al cobre. El caso del cobre es particularmente complicado, ya que la especie reducida, el ion Cu(I), es extremadamente lábil, con velocidades de intercambio de ligando muy elevadas [155].

Propiedades farmacocinéticas

Las propiedades farmacocinéticas comprenden los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADMET). Están relacionadas, de acuerdo a la aproximación empírica de Lipinski, con el peso molecular del compuesto, el número de dadores/aceptores de enlaces de hidrógeno y la relación lipofilia/hidrofilia [156]. Es necesario considerar estas propiedades de cara a la futura administración del compuesto y de su éxito como fármaco.

En la literatura, encontramos una gran cantidad de ejemplos de complejos de manganeso estudiados como miméticos de la SOD y, si bien no se pretende en esta introducción, centrada en los complejos de manganeso de ligandos poliamínicos, abarcar todas las familias de compuestos, sí se considera interesante hacer mención, por su relevancia en este campo, a dos familias de compuestos. En primer lugar, tenemos los complejos de Mn(salen), desarrollados por Jacobsen [157] y patentados por Eukarion, Inc. (compuesto **26**, figura 1.29) [158]. En segundo lugar hay que destacar los complejos de porfirina, cuya actividad SOD fue descrita por primera vez por Pasternack [159] y, posteriormente, ampliada y revisada por Batinić-Haberle (compuestos **27** y **28**, figura 1.29) [145].

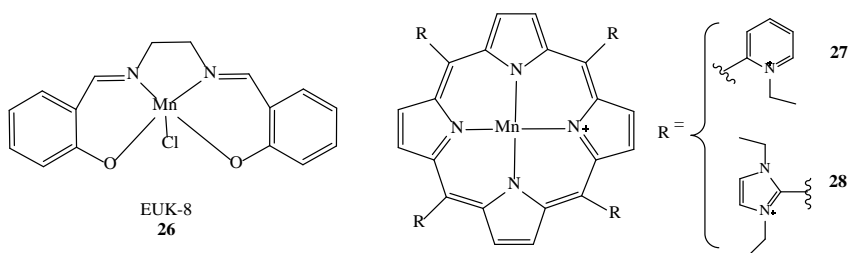


Figura 1.29. Ejemplos de miméticos de la MnSOD.

Algunos de los primeros complejos de manganeso, basados en poliaminas y publicados como miméticos de SOD, se muestran en la figura 1.30. Estos incluyen ligandos de cadena abierta, como el etilendiaminodiacetato (EDDA) [160] y el ligando tris[2-[N-(2-piridilmetil)aminoetil]amina (TPAA) [161], y también azamacrociclos, como el ciclam [162]. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que estos complejos poseían constantes catalíticas bajas, o que reaccionaban con el superóxido de manera estequiométrica [155].

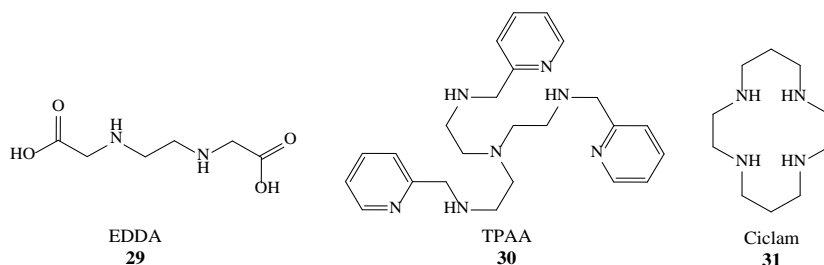


Figura 1.30. Ligandos poliamínicos utilizados en la preparación de miméticos de SOD.

Entre los miméticos más activos descritos hasta la fecha, encontramos los complejos heptacoordinados de Mn(II) con ligandos macrocíclicos basados en el pentaazaciclopentadecano [15]aneN5 [155, 163] (figura 1.31). Algunos compuestos de esta familia han sido los primeros miméticos de SOD que han entrado en fase clínica, por su eficiencia en el tratamiento de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo [164]. Como se muestra en la figura 1.31, se han realizado diversos tipos de sustituciones en estos compuestos para mejorar su actividad y estabilidad. Entre ellos, cabe destacar el compuesto M40403, que presenta valores de k_{cat} cercanos a los de la enzima MnSOD nativa [165].

Introducción

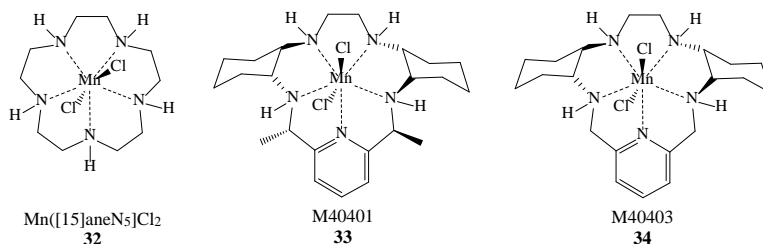


Figura 1.31. Mn^{II} (pentaazaciclopentadecano) y sus derivados.

En cuanto a los compuestos con un modo de coordinación de tipo “escorpiando”, es decir, ligandos macrocíclicos que poseen cadenas laterales con átomos dadores adicionales, encontramos en la literatura los ejemplos mostrados en la figura 1.32. Los compuestos **35** y **36**, incluyen unidades de benzimidazol que completan la esfera de coordinación del $\text{Mn}(\text{II})$, formando un octaedro distorsionado. De esta manera, se consigue crear un ambiente hidrofóbico en torno al centro metálico que parece favorecer la actividad SOD del compuesto, y también se mejora la estabilidad termodinámica y cinética de los complejos en disolución acuosa [166].

En el caso de los compuestos **37** y **38**, se ha funcionalizado el ciclén con dos cadenas laterales de ácido acético. Este compuesto muestra una gran afinidad por el $\text{Mn}(\text{II})$ y capacidad para dismutar el superóxido. Sin embargo, no es un catalizador, ya que la reacción tiene lugar de manera estequiométrica, debido a su elevado potencial de oxidación y a la irreversibilidad del proceso [167].

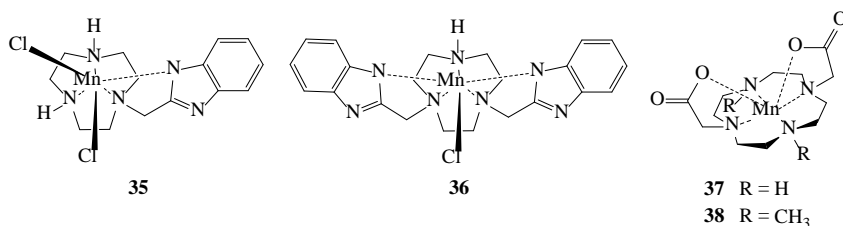


Figura 1.32. Complejos de tipo escorpiando con actividad SOD.

Finalmente hay que destacar los compuestos recientemente sintetizados en nuestro laboratorio de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. Recientemente se ha publicado la actividad MnSOD, tanto *in vitro* como *in vivo*, de los complejos de Mn^{2+} de las poliaminas mostradas en la figura 1.33 [168]. En particular, el complejo Mn-**39** demostró tener una elevada actividad, similar a la del compuesto **34** (M40403), discutido con anterioridad. Dicha actividad parece estar asociada con la presencia de una molécula de agua en la esfera de coordinación del complejo, de manera similar a lo que ocurre en la enzima MnSOD nativa.

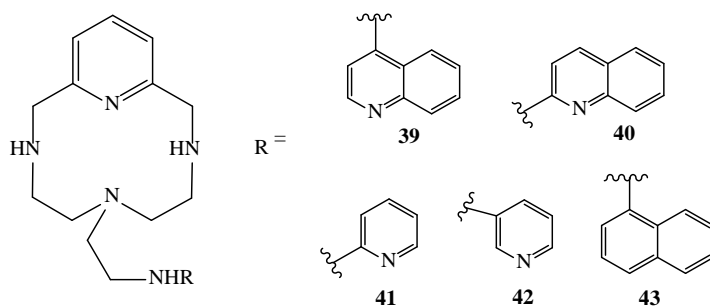


Figura 1.33. Ligandos de tipo escorpano cuyos complejos de Mn^{2+} presentan actividad SOD.

Para resumir los resultados descritos en la literatura para los compuestos antes mencionados como antecedentes, en la tabla 1.3 se muestran los valores de potencial redox y actividad SOD.

Tabla 1.3. Potenciales redox y actividad SOD de algunos complejos de manganeso descritos en esta tesis. Valores tomados de las referencias [143, 147, 168].

Compuesto	Potencial redox $E_{1/2}$ (mV) vs. NHE	Actividad SOD	
		IC_{50} (μ M)	$\log k_{cat}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
Enzimas SOD	~300	—	8.84-9.30
Mn^{2+}	850	—	6.11
EUK-8, 26	-130	—	5.78
27	228	—	7.76
28	346	—	7.83
M40403, 34	525	—	7.21
39	680	0.30	7.18
40	850	1.17	6.48
41	660	0.4	6.81
42	770	3.1	5.99
43	710	0.8	6.56

1.2.6. Poliaminas con actividad tripanocida y leishmanicida

Actualmente, la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos corren a cargo, en gran medida, de las grandes empresas farmacéuticas, las cuales suelen moverse guiadas más por intereses económicos que humanitarios. Esta situación ha llevado a que, para algunas enfermedades, no existan herramientas terapéuticas adecuadas debido, en gran parte, a que afectan a países que están en vías de desarrollo y que, por lo tanto, no representan un mercado de interés para las farmacéuticas por los escasos recursos económicos de su población. De hecho, de los 1556 nuevos fármacos aprobados entre 1975 y 2004, solo 21 (el 1.3%) fueron desarrollados específicamente para tratar enfermedades tropicales y tuberculosis [169]. Tampoco contribuye a solucionar el problema el hecho de que muchos de estos países carezcan de políticas públicas de investigación y desarrollo. Estas enfermedades, conocidas como “olvidadas” (*neglected diseases*), son, en su mayoría, enfermedades tropicales infecciosas causadas por protozoos, entre las que destacan las dos de las que nos ocuparemos en esta introducción: la tripanosomiasis americana (o enfermedad de Chagas) y la leishmaniasis. Ambas enfermedades están causadas por protistas de la familia *Trypanosomatidae*.

Los tratamientos disponibles para estas dos enfermedades son caros, poco eficaces, tóxicos, de larga duración y, algunos, de obligada administración intravenosa bajo supervisión médica, normalmente hospitalaria, lo que impide que muchos enfermos sin recursos puedan acceder a ellos [170]. En el caso de la enfermedad de Chagas, se siguen utilizando los mismos compuestos descubiertos empíricamente hace tres décadas: nifurtimox (un nitrofurano distribuido por Bayer como Lampit[®]) y benznidazol (derivado del nitroimidazol y antes distribuido por Roche como Rochagan[®]), ambos poco eficaces en la fase crónica de la enfermedad (figura 1.34) y con múltiples efectos secundarios.

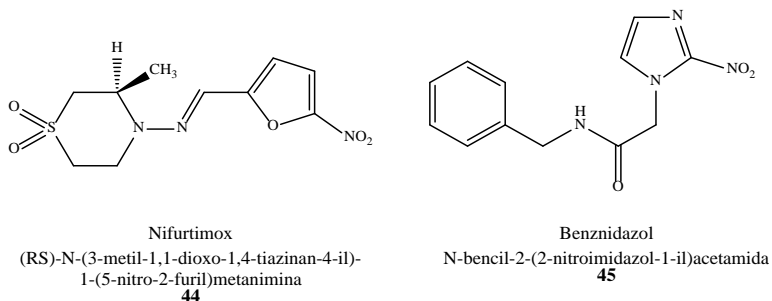


Figura 1.34. Compuestos comerciales para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En el caso de la leishmaniasis la lista de medicamentos disponibles es muy limitada, y el problema se agudiza debido al rápido desarrollo de resistencia por parte de los parásitos. Los medicamentos basados en antimonio pentavalente se han estado usando durante más de 60 años y, además de los problemas de resistencia, presentan una elevada toxicidad. Nuevos medicamentos, como pentamidina y anfotericina B, siguen presentando problemas de toxicidad, además de elevados costes de producción, lo que restringe su acceso a países en vías de desarrollo.

Uno de los objetivos en la búsqueda de nuevos compuestos tripanocidas es que tengan acción selectiva. Las dianas terapéuticas más estudiadas con este propósito son enzimas del parásito que presentan diferencias bioquímicas y estructurales respecto a sus homólogas humanas y que están implicadas en la evasión del daño originado por el estrés oxidativo [171]. Dos de estas enzimas son la superóxido dismutasa de hierro (FeSOD), defensa antioxidante exclusiva de tripanosomátidos, y la tripanotiona reductasa (TryR), involucrada en la biosíntesis de la tripanotiona, que es el principal sistema de defensa de los tripanosomátidos frente al daño oxidativo [172, 173].

En esta línea, nuestro grupo de investigación inició una colaboración con el grupo de Parasitología Molecular de la Universidad de Granada, dirigido por el profesor Manuel Sánchez Moreno, para la evaluación de nuevos compuestos como agentes tripanocidas. Como antecedentes de esta tesis doctoral, destacaremos los compuestos más interesantes de tres familias de derivados poliamínicos que han demostrado

tener una baja toxicidad y una elevada actividad en las diferentes formas de *T. cruzi* (amastigota, epimastigota y tripomastigota) y leishmania.

La primera de esta familia comprende las escuaramidas N,N'-disustituídas, sintetizadas en el grupo del profesor A. Costa y cuyos compuestos más relevantes aparecen representados en la figura 1.35. Una de las conclusiones que alcanzó este estudio fue que las escuaramidas con carga positiva permanente (grupos tetraalquilamonio), o con grupos ácido aminoescuárico tenían poca actividad. Las aminoescuaramidas más sencillas **46-49**, en cambio, dieron buenos resultados, con actividades mayores que el benznidazol para ambas formas del parásito y menor toxicidad frente a células Vero. Respecto a los índices de selectividad (SI = $(IC_{50}, \text{células Vero}) / (IC_{50}, \text{parásito})$), el compuesto **49** resultó tener el mayor potencial, con valores de SI 60 y 88 veces mayores que los del benznidazol, para las formas extra e intracelular respectivamente. Este compuesto, además, redujo el número de amastigotes en las células infectadas en un 52%, respecto al control, mientras que el benznidazol muestra una reducción de solo el 15% [174].

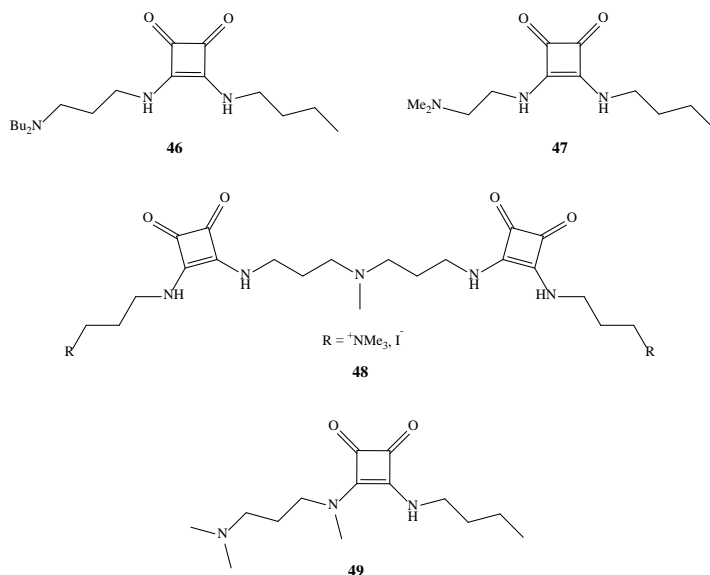


Figura 1.35. Derivados de escuaramidas N,N'-disustituídas estudiados como agentes tripanocidas [174].

A la segunda familia de compuestos pertenecen los poliazamacrociclos con unidades de pirazol 3,5-disustituído que aparecen representados en la figura 1.36, sintetizados en el Instituto de Química Médica del CSIC de Madrid en colaboración con el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. El compuesto **50** es un criptando con tres unidades de 1H-pirazol, mientras que el **51** es un macrociclo con dos unidades de 1-metilpirazol. Como se aprecia en los datos de la tabla 1.4, ambos son activos en los ensayos *in vitro* frente a las dos formas de *T. cruzi* y de baja citotoxicidad frente a células Vero. Al compararlos con el compuesto de referencia, tenemos que el SI de **50** es 144 y 40 veces mayor que el de la droga de referencia, para las formas extra- e intracelular, respectivamente; y 173 y 43 veces mayor, en el caso de **51** [175].

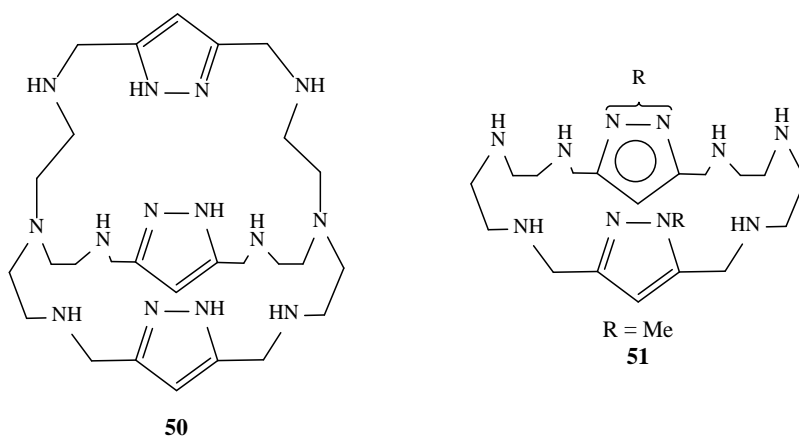


Figura 1.36. Compuestos macrocíclicos y macrobicíclicos con unidades de pirazol estudiados como antiparasitarios [175].

La tercera familia de compuestos destacados son una serie de piridinofanos de tipo escorpiando, sintetizados también en nuestro grupo de investigación, y estructuralmente similares a los estudiados en la presente tesis doctoral. De los cinco compuestos publicados en este trabajo, **52** y **53** (figura 1.37) fueron los más interesantes, en cuanto a sus elevados índices de selectividad [176]. Cabe destacar aquí que estos dos compuestos, junto con **49**, exceden en más de 50 veces el SI del

benznidazol, para ambas formas del parásito. Esta es la barrera fijada por algunos autores para considerar interesante un candidato como antiparasitario [177].

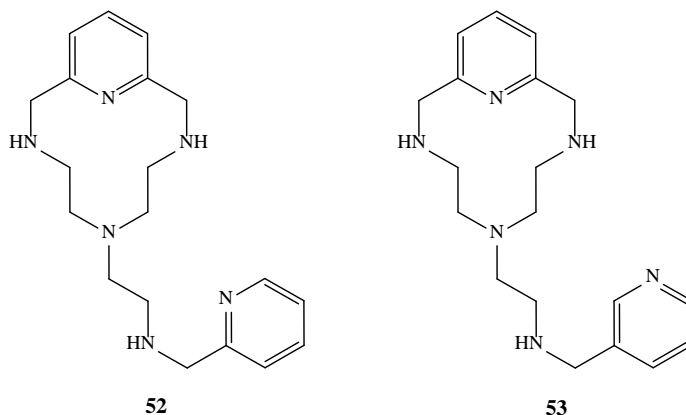


Figura 1.37. Ejemplos de poliaminas de tipo escorpiando con actividad tripanocida [176].

Para resumir los resultados obtenidos para los compuestos que discutiremos a continuación, en la tabla 1.4 se muestran los valores obtenidos para la IC_{50} (concentración necesaria para obtener un 50% de inhibición), tanto para epimastigotas como para la forma intracelular (amastigotas); los valores de toxicidad frente a células Vero; y el índice de selectividad. Además de los compuestos que se van a discutir en esta introducción, se muestran también los resultados para el benznidazol, la droga de referencia. Entre paréntesis, junto al SI, se muestra el número de veces que el SI del compuesto excede el SI del benznidazol, ya que este valor es indicativo del potencial *in vitro* del compuesto ensayado respecto a la droga de referencia.

Tabla 1.4. Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad (SI) frente a las formas extracelular e intracelular de *Trypanosoma cruzi*^a. Valores obtenidos de las referencias [174, 175, 176].

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^b		IC ₅₀ (μM) Células Vero ^c	SI ^d	
	Epimastigota	Amastigota		Epimastigota	Amastigota
Benznidazol, 45	16 ± 1	23 ± 5	13.6 ± 0.9	0.8	0.6
<i>Escuaramidias N,N'-disustituídas</i>					
46	21 ± 4	6.0 ± 0.4	148 ± 8	7 (9)	25 (42)
47	11 ± 7	9 ± 6	260 ± 11	24 (30)	29 (48)
48	19 ± 1	17.1 ± 0.4	300 ± 23	16 (20)	18 (30)
49	9.4 ± 0.4	8.5 ± 0.4	453 ± 23	48 (60)	53 (88)
<i>Macrociclos basados en pirazol</i>					
50	1.3 ± 0.1	6.2 ± 0.8	149 ± 14	115 (144)	24 (40)
51	1.3 ± 0.3	7 ± 2	179 ± 21	138 (173)	26 (43)
<i>Poliaminas de tipo escorpiando</i>					
52	9 ± 2	10 ± 1	366 ± 15	41 (51)	37 (62)
53	8 ± 1	10 ± 1	425 ± 30	53 (66)	43 (72)

^aLos resultados son promedios de cuatro determinaciones diferentes.

^bIC₅₀ = concentración necesaria para obtener un 50% de inhibición, calculado por análisis de regresión lineal de los valores obtenidos a las concentraciones de trabajo (1-100 μM).

^cFrente a células Vero después de 72h de cultivo.

^dÍndice de selectividad = IC₅₀(células Vero)/IC₅₀(forma intracelular o extracelular del parásito). En paréntesis: número de veces que el SI del compuesto excede al de la droga de referencia.

Otro aspecto interesante en este estudio son los datos obtenidos para los complejos de Mn²⁺, los cuales resultaron ser mucho menos eficaces que los ligandos libres. Esto puede ser probablemente atribuido a que, como ya se discutió anteriormente en esta introducción, los complejos de manganeso ejercen un efecto protector frente a los radicales libres, el cual puede, en parte, compensar el efecto inhibitor de la FeSOD del parásito.

1.3. Regulación alostérica. Escorpiandos

Los organismos vivos son sistemas altamente regulados y capaces de adaptarse rápidamente a los continuos cambios de su medioambiente. Una de las formas en las que la naturaleza ha conseguido alcanzar esta capacidad de adaptación es a través de lo que se conoce como regulación alostérica. Este concepto, ampliamente utilizado en bioquímica, hace referencia a la variación en la actividad de una proteína por la unión de un átomo o molécula efectora. La unión de este efector tiene lugar en una parte de la proteína llamado sitio alostérico, y suele venir acompañada por un cambio conformacional en la proteína, que a su vez potencia o inhibe su actividad (figura 1.38). Las proteínas no son, por tanto, objetos estáticos, sino actores dinámicos capaces de recibir señales externas y reaccionar a ellas modificando su estructura, y regulando así su función y actividad [178].

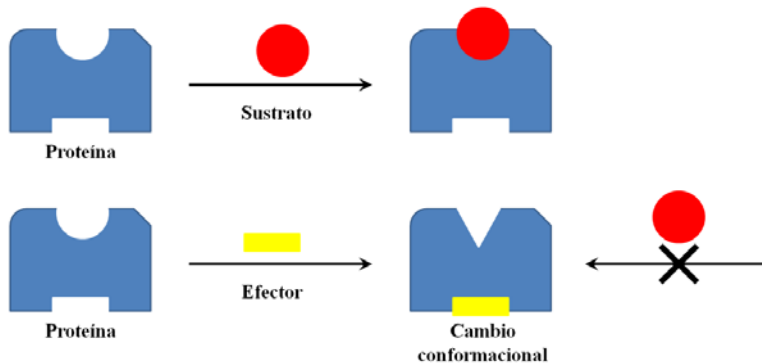


Figura 1.38. Representación esquemática del principio de regulación alostérica.

Este dinamismo de las proteínas se comenzó a intuir hace más de un siglo al observarse las interacciones entre los grupos hemo de la hemoglobina (Bohr, Hasselbalch y Krogh, 1903). Aunque tuvieron que pasar muchas décadas para que se descubrieran nuevos ejemplos que permitieran establecer las teorías necesarias para interpretar los efectos alostéricos [179]. Actualmente el alosterismo es aceptado como un mecanismo de regulación universal, presente en la mayoría de procesos biológicos: transducción de señales, metabolismo, catálisis y regulación genética; y se dispone de una base de datos (ASD, <http://mdl.shsmu.edu.cn/ASD>) que reúne la información disponible sobre la estructura y función de las más de 1200 proteínas alostéricas conocidas y sus efectores [180]. En la figura 1.39 se muestran las estructuras cristalinas de la proteína PerR, en su conformación abierta (apo-Zn) y cerrada (PerR-MnZn) [181], como ejemplo de los grandes cambios estructurales que pueden acompañar a la unión de una proteína con su efector. En este ejemplo en concreto, el cambio conformacional se produce por la coordinación de un catión cinc.

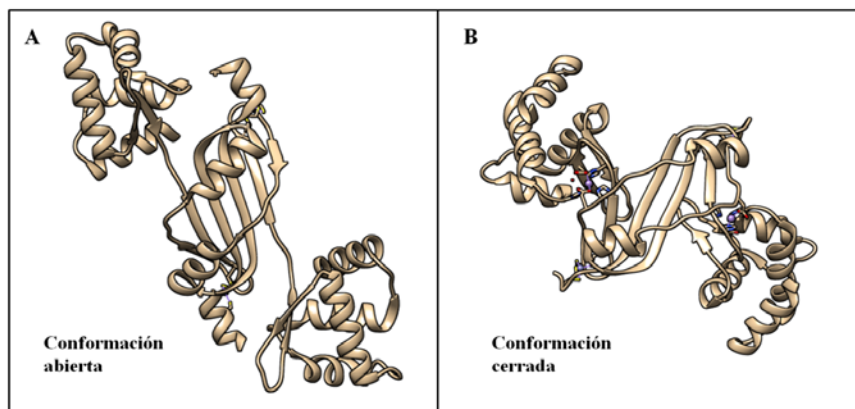


Figura 1.39. Estructuras de la proteína reguladora de peróxido en su conformación (A) “abierta” (apo-Zn) y (B) “cerrada” (PerRMnZn). PDB refs. 2FE3 y 3F8N, respectivamente [182].

En el contexto de imitar a la naturaleza, diversos grupos de investigación han desarrollado sistemas capaces de modular sus propiedades mediante la aplicación de estímulos externos. Entre los ejemplos tenemos compuestos peptídicos capaces de regular su interacción con el ADN en respuesta a la luz [183] o a la presencia de cationes metálicos [184, 185], así como dispositivos moleculares capaces de manipular mecánicamente a una segunda molécula a través de cambios conformacionales fotoinducidos [186]. Para los objetivos de esta tesis doctoral, nos centraremos en los antecedentes de poliaminas sintéticas capaces de modular su interacción con el ADN por efecto alostérico.

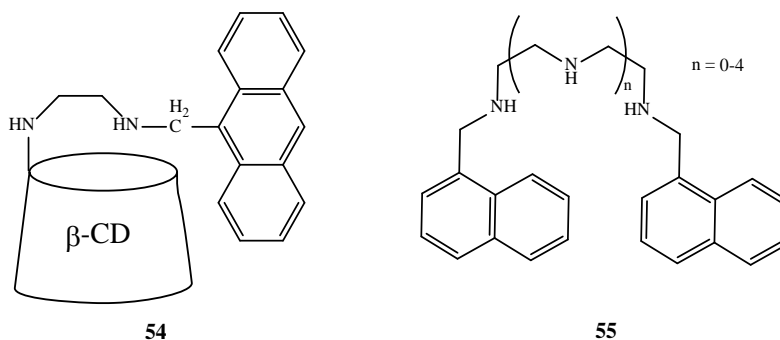


Figura 1.40. Compuestos poliamínicos que presentan efecto alostérico en su interacción con el ADN.

El compuesto **54**, representado en la figura 1.40, surge de la fusión de una antrilamina y una β -ciclodextrina (β -CD). La unidad de antrilamina posee una actividad potente como intercalante de ADN, pero en el compuesto **54** tiene la tendencia de alojarse en la cavidad hidrofóbica de la β -CD, como se muestra de manera esquemática en la figura 1.41. En esta conformación, la unidad de antraceno está impedida para actuar como intercalante. Sin embargo, si se añade a la disolución un compuesto que tenga una gran afinidad para formar complejos intracavidad con la ciclodextrina, como puede ser el 1-adamantol (AN), es posible desplazar la unidad antrílica fuera de la cavidad de la β -CD, permitiendo así que intercale eficientemente con el ADN [187].

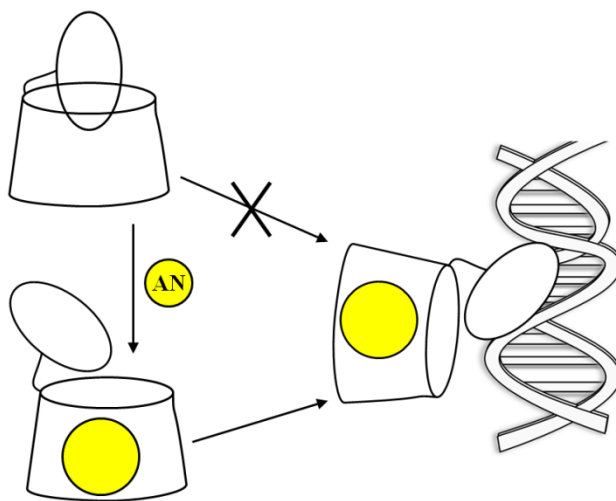


Figura 1.41. Esquema de la modulación de la actividad intercalante del compuesto antril(alquilamino)ciclodextrina **54**.

El compuesto **55**, al igual que otras diaril-poliaminas, tienen la capacidad de actuar como bis-intercalantes al interactuar con el ADN. Sin embargo, al añadir Cu(II) se observa un cambio drástico en la afinidad de estos compuestos por el ADN. Dicho cambio ha sido atribuído al efecto que ejerce el Cu(II) sobre la conformación del ligando, el cual se tiene que plegar para poder coordinar efectivamente al metal. En esta nueva conformación, el fenómeno de la bis-intercalación ya no es estéricamente posible [188].

1.3.1. Movimientos moleculares: ligandos poliamínicos de tipo escorpiando

En los inicios de la química supramolecular, en la década de los sesenta, la mayoría de los ligandos macrocíclicos que se estudiaban poseían los átomos coordinantes como parte integral de la estructura cíclica (p. ej. los éteres corona, criptandos, etcétera). Ya en los setenta se describen los primeros ejemplos de ligandos macrocíclicos que, además de los átomos dadores del anillo poseen grupos coordinantes incorporados a una cadena lateral [189, 190]. La mayor flexibilidad de estos ligandos, respecto a los requerimientos geométricos del metal coordinado, despierta el interés por el estudio de sus estructuras. Estos estudios llevaron a T. J. Lotz y T. A. Kaden a publicar, en 1977, un artículo en el que se describe la posibilidad de cambiar la geometría de coordinación del compuesto **56** (figura 1.42) a través de cambios en el pH de la disolución.

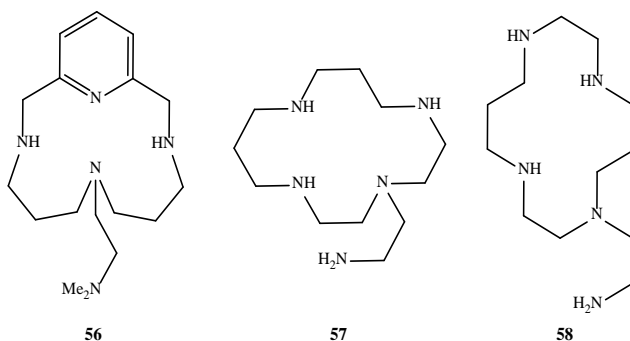


Figura 1.42. Primeros ejemplos de ligandos poliamínicos de tipo escorpiando.

Lo que Lotz y Kaden observaron fue cómo una disolución del complejo $[\text{Ni}(\mathbf{56})]^{n+}$ cambiaba de color al variar el pH. Este cambio lo asignaron al equilibrio de protonación del grupo dimetilamino, que provoca que el catión Ni^{2+} pase de estar coordinado en una geometría cuadrado plana, amarilla (bajo spin), a una octaédrica, azul (alto spin), como se muestra en la figura 1.43 [191]. Algunos años después, L.

Fabbrizzi destaca las propiedades peculiares de esta nueva clase de ligandos: por un lado, la tendencia del anillo a incorporar el metal para formar complejos cinéticamente estables y, por otro, la capacidad de la cadena flexible de coordinar el metal en la posición axial de manera lábil. En vista del papel activo de la cadena lateral o “cola” y siguiendo la tendencia de la época de dar nombres pintorescos a los ligandos, Fabbrizzi acuña el nombre de “escorpiandos” (*scorpiands*, en inglés) para esta familia de compuestos poliamínicos [192].

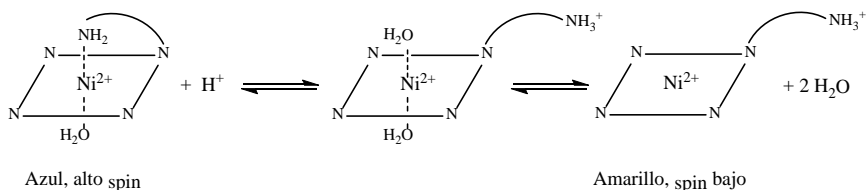


Figura 1.43. Esquema representando el cambio en el modo de coordinación de un ligando de tipo escorpiando.

Con el paso del tiempo, se van abriendo nuevas rutas sintéticas y se van optimizando los procesos de preparación de estos compuestos, lo que permite sintetizar nuevos escorpiandos, como **57** y **58** (figura 1.42). Y en 1998, nuevamente en el grupo de L. Fabbrizzi, la capacidad de controlar los movimientos intermoleculares de estos compuestos se aplicó para generar diferentes señales fluorescentes. Esto se consiguió con el compuesto **59**, un escorpiando cuya cadena lateral ha sido funcionalizada con el grupo fluoróforo antraceno [193]. Otros grupos de investigación han seguido la senda, preparando nuevos ligandos con múltiples cadenas laterales (**60**) [194], ligandos politópicos (**61**) [195], con diferentes grupos fluoróforos (**62**) [196], o con átomos dadores en la cadena lateral distintos del nitrógeno (**63**) (figura 1.44) [197].

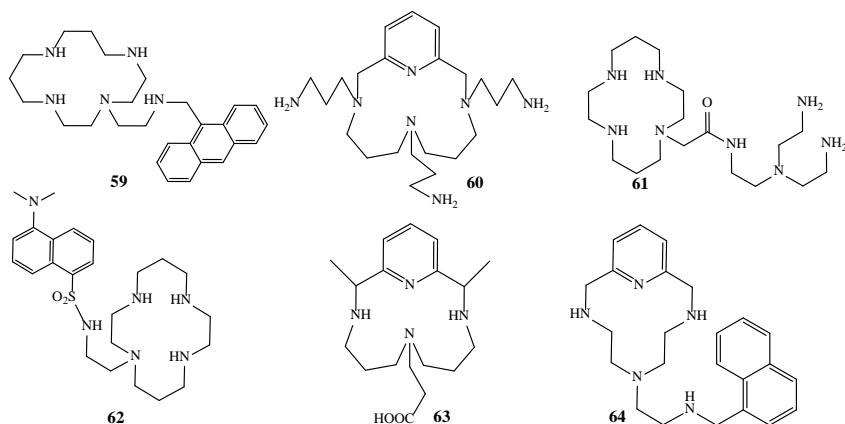


Figura 1.44. Ligandos de tipo escorpiando con nuevas funcionalidades.

En todos los ejemplos anteriores, sin embargo, la capacidad de controlar los movimientos intermoleculares se considera condicionada a la presencia de un catión metálico situado en el macrociclo. Un avance en este aspecto se logra en este grupo de investigación de Química Supramolecular cuando se describe la posibilidad de generar un cambio conformacional en el compuesto **64** inducido sólo por el gradiente de protones. El movimiento intermolecular está favorecido por la posibilidad de establecer un puente de hidrógeno entre un nitrógeno del macrociclo y el nitrógeno de la “cola” cuando está desprotonado, así como por la interacción de tipo apilamiento- π entre los dos anillos aromáticos. Al estar el compuesto totalmente protonado, las interacciones electrostáticas entre las cargas positivas hacen que adopte la conformación abierta. Se pudieron obtener estructuras cristalinas del compuesto **64** en ambas conformaciones, las cuales se muestra en la figura 1.45 [198, 199, 200].

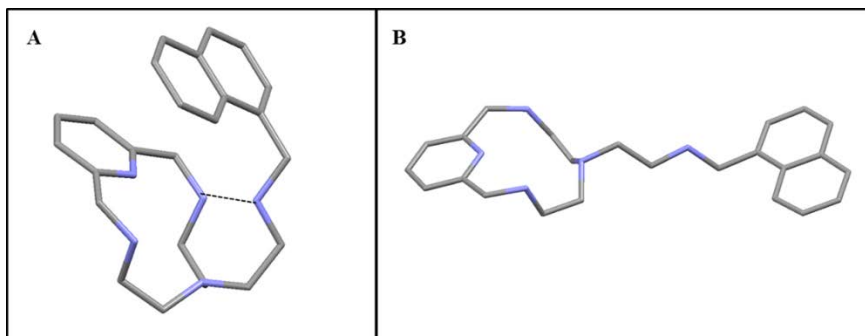


Figura 1.45. Estructuras cristalinas del compuesto **64** en sus conformación (A) abierta, [H(**64**)]⁺, y (B) cerrada, [H₃(**64**)]³⁺. Adaptadas de la referencia [198].

La presente tesis doctoral es un esfuerzo más para continuar ampliando nuestros conocimientos sobre las propiedades y aplicaciones de esta familia de ligandos poliamínicos, en el campo de la química supramolecular en general y en cuanto a sus aplicaciones biomédicas en particular.

2.

Objetivos

Objetivos

La presente Tesis Doctoral nace en el marco del proyecto Consolidar titulado “Aplicación de la Química Supramolecular al Diseño, Síntesis y Estudio de Compuestos Bioactivos de Acción Antiinflamatoria, Antitumoral o Antiparasitaria” (CSD2010-00065, BOE del 27 de febrero de 2010). El principal objetivo de este proyecto era la formación en España de un grupo de investigación multidisciplinar dedicado a la Química Médica Supramolecular (SUPRAMED, www.supramedic.com) que centraría sus esfuerzos, como su nombre indica, en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos con actividad antiparasitaria, antiinflamatoria o antitumoral. Como miembro investigador en este proyecto (dentro del grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia), el autor de la presente tesis ha orientado su trabajo a desarrollar y cumplir con las metas del mismo.

A continuación se detallan los objetivos planteados para esta Tesis Doctoral, jerarquizados como objetivos generales (OG) y objetivos específicos (OE).

OG1.- Diseño, síntesis y caracterización de nuevas moléculas poliamínicas con aplicaciones biomédicas.

OE1.1.- Avanzar en las rutas sintéticas ya establecidas en el grupo de investigación para la obtención de nuevos ligandos con características mejoradas, basados en el diseño de los compuestos ya sintetizados y con actividad biológica comprobada.

OE1.2.- Desarrollar nuevas rutas sintéticas para la preparación de compuestos poliamínicos con diferentes comportamientos químicos, orientados a dianas biológicas específicas.

OG2.- Caracterización de las propiedades ácido-base en disolución acuosa de los ligandos sintetizados.

OE2.1.- Dado que las poliaminas poseen, por definición, varios grupos susceptibles a la protonación y que las características químicas y su actividad biológica pueden depender de la especie concreta que hay en disolución a un determinado valor de pH, se plantea determinar las constantes de protonación de todos los compuestos estudiados.

OE2.2.- Con las constantes de equilibrio ácido-base calculadas se construirán los diagramas de distribución de especies correspondientes a cada uno de los compuestos estudiados, con el fin de determinar las especies predominantes y el grado de protonación para cada valor de pH.

OE2.3.- En los sistemas que lo permitan, determinación de las secuencias de protonación mediante técnicas espectroscópicas.

OG3.- Estudio de la capacidad coordinante de los ligandos poliamínicos sintetizados con metales de transición.

OE3.1.- Determinación de las constantes de estabilidad de los complejos con metales de transición de interés para las aplicaciones biomédicas: Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+} .

OE3.2.- Predicción de la distribución de especies frente al pH de los sistemas ligando-metal, basada en las constantes de estabilidad encontradas.

OE3.3.- Determinación por difracción de rayos X y estudios de modelización de la estructura cristalina de los complejos metálicos.

OG4.- Estudio de los movimientos moleculares de los ligandos de la familia de los escorpiandos, asociados a cambios en el pH y a la presencia de cationes metálicos.

OE4.1.- Mediante técnicas espectroscópicas y de RMN se intentarán dilucidar y cuantificar los posibles cambios conformacionales que muestran los ligandos en respuesta a cambios en su entorno químico.

OG5.- Evaluación de la capacidad de interacción con aniones de interés biológico: mononucleótidos y ácidos nucleicos.

OE5.1.- Determinación de las constantes de estabilidad de los complejos supramoleculares que surjan de la interacción de los ligandos sintetizados y los sustratos biológicos.

OE5.2.- Evaluación de la selectividad de los ligandos frente a distintos mononucleótidos o secuencias específicas de ADN/ARN.

OE5.3.- Caracterización del modo de interacción de los distintos ligandos con los sustratos biológicos estudiados, con la intención de establecer una relación entre la estructura del ligando y su modo de interacción. También se intentarán correlacionar las diferentes estructuras terciarias de los ácidos nucleicos estudiados con el modo preferente de interacción y la selectividad.

OE5.4.- En el caso de los ligandos con propiedades fotoluminiscentes, se evaluará su potencial como sensores fluorescentes de los sustratos biológicos o como marcadores de secuencias específicas de ADN/ARN.

OE5.5.- Se realizarán estudios a distintos valores de pH y en presencia de cationes metálicos para intentar relacionar los movimientos moleculares de los ligandos con variaciones en la afinidad por un determinado sustrato (efecto alostérico).

OG6.- Determinación de la actividad superóxido dismutasa de los complejos metálicos de los nuevos ligandos sintetizados.

OG6.1.- Se determinarán los potenciales redox de los complejos metálicos mediante técnicas electroquímicas.

OG6.2.- Se realizarán estudios cinéticos indirectos para evaluar la actividad de los complejos para dismutar eficientemente el radical superóxido en disolución acuosa. Posteriormente se evaluará si existe una relación entre las actividades determinadas y la estructura de los compuestos estudiados, así como con el potencial redox de los complejos metálicos.

OG6.3.- Se realizarán estudios *in vitro* con cultivos de bacterias deficientes de la enzima SOD para evaluar el posible efecto protector de los complejos metálicos más prometedores.

OG7.- Evaluación de la actividad biológica de los nuevos compuestos.

OG7.1.- Aprovechando la red multidisciplinar de grupos de investigación organizada dentro del proyecto SUPRAMED se establecerán colaboraciones para la determinación de la citotoxicidad de los compuestos estudiados, así como la posibilidad de modular su actividad biológica mediante estímulos externos, como la presencia de cationes metálicos.

OG7.2.- En colaboración con grupo de Biología Molecular del Epitelio en Inflamación y Cáncer, en el Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Joan XXIII de Tarragona, se evaluará la actividad antitumoral de los compuestos capaces de interactuar con los ácidos nucleicos frente a líneas celulares de cáncer de vejiga.

OG7.3.- En colaboración con el Grupo de Parasitología Molecular, del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, se evaluará la eficiencia de los compuestos sintetizados como antiparasitarios, frente a los agentes causantes de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

3.

Nomenclatura

Nomenclatura

3.1. Nomenclatura sistemática de los fanos

El objetivo de la nomenclatura sistemática es generar, para cada molécula, un nombre mediante el cual quede identificada unívocamente y sin ambigüedades. Para ello se ha desarrollado una metodología que permite identificar a cada molécula mediante el ensamblaje de nombres que describen los componentes de la misma. Las reglas que rigen esta nomenclatura están tuteladas por la IUPAC, la cual publica guías y recomendaciones para la asignación de nombres [201]. En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de moléculas orgánicas formadas, de manera general, por una cadena y un espaciador aromático. Este tipo de compuestos reciben el nombre de fanos. Cuando los fanos son cíclicos, se denominan ciclofanos [202].

Las recomendaciones emitidas por la IUPAC en referencia a la nomenclatura de los fanos [203, 204] se basan en una operación denominada simplificación, ilustrada en la figura 3.1, que consiste en la construcción de un esqueleto simplificado mediante la sustitución de los espaciadores aromáticos por “superátomos”. La inversa de esta operación se llama amplificación.

El nombre del esqueleto de la molécula consistirá en el término *fano* precedido de un nombre que especifique la estructura del ciclo simplificado. En el ejemplo anterior sería ciclohexafano. El esqueleto simplificado se numera de manera consecutiva, dando prioridad a los superátomos por los números más bajos. Finalmente se nombran los sustituyentes y los espaciadores aromáticos, indicando su posición en la estructura simplificada y terminando el nombre en “a”. Se indica también, de la manera convencional, la numeración de la sustitución. En el ejemplo anterior el nombre de la estructura sería 1,4-(1,3)-dibencenaciclohexafano.

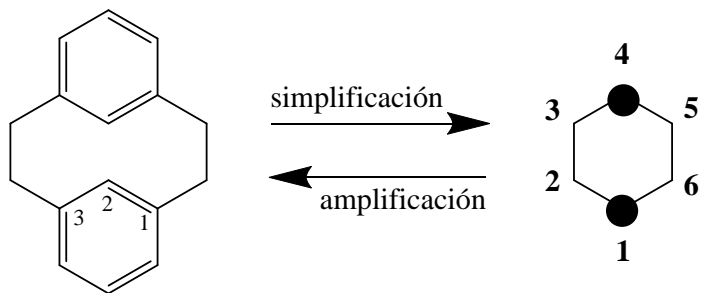


Figura 3.1. Operación de simplificación en la nomenclatura de fanos.
Figura adaptada de la referencia [203].

3.1.1. Nomenclatura sistemática de los escorpiandos

Los compuestos que se han sintetizado en la presente tesis doctoral pertenecen a la familia de los denominados escorpiandos. Como ya se ha discutido en la introducción a esta tesis doctoral (apartado 1.3.1., movimientos moleculares: ligandos poliamínicos de tipo escorpiando) se trata de piridinaciclofanos con una cadena lateral que contiene átomos dadores adicionales. Aplicando las recomendaciones de la IUPAC antes descritas al compuesto de tipo escorpiando que se muestra en la figura 3.2, obtenemos una estructura simplificada que consta de un ciclo de 10 “átomos” y que contiene un grupo 2,6-piridina en la posición 1, un grupo 2-aminoetil en la posición 6 y tres grupos azo en las posiciones 3, 6 y 9. El nombre sistemático para este compuesto es, por tanto, 6-(2-aminoetil)-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano.

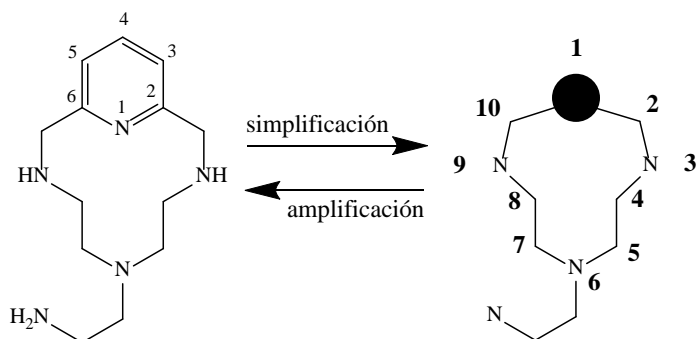


Figura 3.2. Operación de simplificación en un compuesto de tipo escorpiando.

3.2. Nomenclatura simplificada

Como se ha mencionado antes, la nomenclatura sistemática es unívoca y no ambigua; sin embargo en muchos casos es excesivamente compleja y aparatosa para su uso cotidiano. Es por esta razón que, habitualmente, en la literatura científica los autores proponen nomenclaturas simplificadas para las nuevas familias de compuestos químicos que son sintetizadas. Esta es la opción por la que se ha optado en la presente tesis doctoral, en la que se usará la nomenclatura simplificada para todo el texto (exceptuando el capítulo 5, “Síntesis”) con el objetivo de facilitar la lectura y discusión de los resultados.

Parte de los compuestos sintetizados en el transcurso de esta tesis doctoral derivan de una estructura básica la cual, por simplicidad, llamaremos **L**. Este compuesto, reportado por primera vez en 2007 por Begoña Verdejo, et al. [198], encaja en la categoría de los escorpiandos, al ser un poliazamacrociclo con una cadena lateral que contiene átomos dadores adicionales. La otra parte de los compuestos sintetizados derivan de una estructura similar a la anterior, pero cuya cadena lateral ha sido alargada con una cadena de propilamina, de manera que contiene un átomo de nitrógeno adicional. Este compuesto, que se puede considerar un **L** largo, lo llamaremos **Ll** (figura 3.3). Cuando se emplee la letra L sin resaltar nos estaremos refiriendo a un ligando sin especificar.

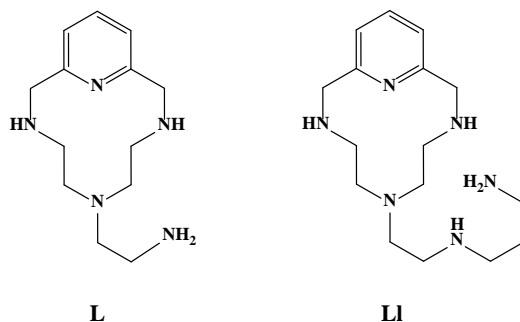


Figura 3.3. Estructura de los compuestos de partida **L** y **Ll**.

Los nuevos ligandos sintetizados en esta tesis doctoral son en su mayoría derivados de **L** y **LI** en los que la amina terminal de la cadena lateral ha sido funcionalizada con un grupo aromático. Con el objetivo, nuevamente, de simplificar la nomenclatura, a cada grupo aromático se le asociará una abreviatura de pocas letras, relacionada con su nombre largo. En caso que se hayan sintetizados varios derivados con el mismo grupo en diferentes posiciones, se indicará con un número la posición de la sustitución. En la tabla 3.1 se recogen todas las abreviaturas empleadas en la nomenclatura de estos compuestos.

Tabla 3.1. Abreviaturas empleadas en la nomenclatura simplificada.

Nombre largo	Abreviatura
Antraceno	A
Pireno	P
Hidroxibenceno (derivado del salicilo)	S
Piridina	Py
Quinolina	Q
Acridina	Acr
Trifenilamina	TPA
2-fenil-5-piridil-[1,3,4]-oxadiazole	O

Los compuestos se nombrarán, por tanto usando **L** o **LI**, dependiendo del compuesto de partida, seguidos por un guion y la letra del sustituyente aromático correspondiente, con la única excepción del compuesto tripodal TPA-**L**₃ en el que el subíndice representa el número de unidades de **L** unidas al núcleo de TPA. Esta molécula se muestra en la figura 3.4 junto con otros dos ejemplos de la nomenclatura simplificada utilizada en esta tesis.

Nomenclatura

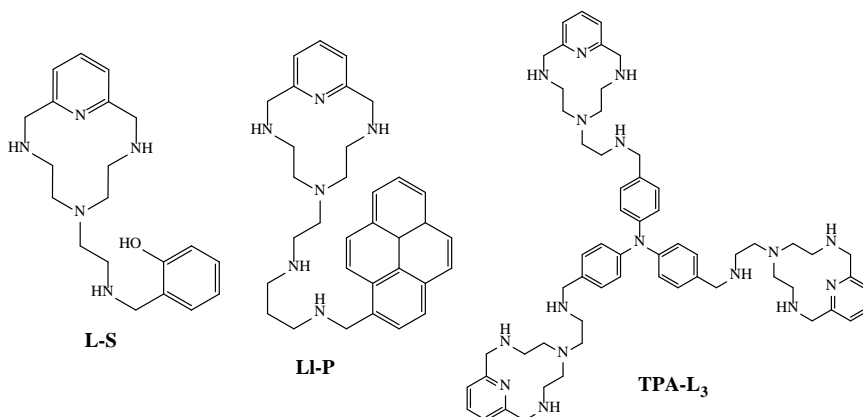


Figura 3.4. Ejemplos de la nomenclatura simplificada utilizada en esta tesis.

4.

Material y métodos

Material y métodos

4.1. Potenciometría

La potenciometría es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de equilibrios en disolución. En el presente trabajo, ha sido la técnica utilizada en la determinación de las constantes de estabilidad de los diferentes sistemas estudiados.

4.1.1. Fundamento teórico

La potenciometría se basa en la medida de la fuerza electromotriz de una disolución. Dicha fuerza electromotriz depende de la concentración en el equilibrio de las especies para las cuales el electrodo es sensible. Y esta concentración depende, a su vez, de las condiciones iniciales y de las constantes de equilibrio del sistema. En los equilibrios estudiados en este trabajo, en disolución acuosa y donde existen diversas especies protonables, hay equilibrios ácido-base y, por tanto, esta fuerza electromotriz se puede medir con un electrodo de pH. En estos casos, la fuerza electromotriz se relaciona con la concentración de protones presentes de la disolución a través de la ecuación de Nernst.

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

Donde $E^{0'}$ es un valor que incluye el potencial estándar, el potencial de unión líquida (que varía para valores de pH inferiores a 2.5, por lo que siempre trabajaremos por encima de este valor de pH) y el potencial de asimetría. Es necesario conocer el valor de $E^{0'}$ para cada experimento, a la misma fuerza iónica y en las mismas condiciones de trabajo, para lo cual es necesario realizar un calibrado de los electrodos (*vide infra*).

Si pudiéramos medir de forma directa las concentraciones de todas las especies en equilibrio presentes en la disolución, podríamos determinar las constantes de estabilidad. Esto no es posible, pero sí se puede relacionar la concentración de uno de los componentes (en este caso la concentración de protones) con las constantes de estabilidad y las condiciones iniciales del sistema. De esta manera, con la medida de la variación de tan sólo una especie con la composición total de la disolución, se pueden obtener los valores de las constantes de estabilidad.

Al realizar la valoración potenciométrica obtenemos una tabla con valores de la fuerza electromotriz frente al volumen de disolución valorante. Al añadir la disolución valorante estamos alterando la concentración de todos los componentes presentes en la disolución. A partir de los datos bibliográficos y de nuestro conocimiento del sistema en estudio, es posible plantear un modelo para las constantes de estabilidad y los coeficientes estequiométricos. A continuación, las constantes de estabilidad de este modelo se ajustan a nuestros valores experimentales, optimizando su valor mediante un procedimiento computarizado de regresión no lineal de mínimos cuadrados.

4.1.2. Sistema potenciométrico

Las medidas potenciométricas han sido realizadas en un potenciómetro automático controlado por ordenador. El potenciómetro está compuesto por dos celdas: una de medida y otra de referencia. Ambas celdas están unidas por un puente salino, mediante un capilar en forma de J (para evitar flujos gravitacionales) que contiene NaCl 0.5 M. El electrodo de medida es un electrodo de vidrio Crison 52 50 y el electrodo de referencia es un electrodo Crison 52 40 de Ag/AgCl en KCl 3 M. Como disolución valorante, hemos utilizado NaOH 0.1 M libre de carbonato, la cual es adicionada con una bureta automática Crison modelo micro BU 2031. Tanto la celda de medida como la de referencia están termostataadas a 298.1 ± 0.1 K con un baño de agua Haake EK51. La celda de medida contiene tres entradas: para el electrodo de medida, para el puente salino y otra más que permite burbujear Ar de manera continua para mantener la

muestra desoxigenada. Esta celda está también equipada con un sistema de agitación magnética.

A continuación, en la figura 4.1 se muestra un esquema del sistema empleado, seguido de una tabla con la descripción más detallada de los componentes del potenciómetro.

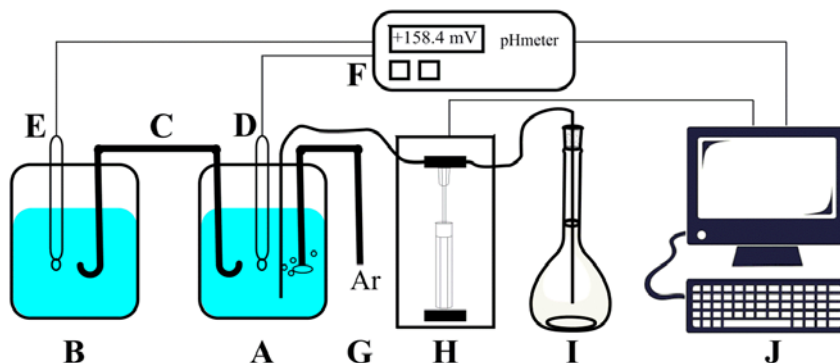


Figura 4.1. Esquema del potenciómetro. **A:** celda de medida, **B:** celda de referencia, **C:** puente salino, **D:** electrodo de medida, **E:** electrodo de referencia, **F:** pH-metro, **G:** inyección de argón, **H:** bureta automática, **I:** NaOH 0.1 M, **J:** Sistema informático.

Tabla 4.1. Descripción de los componentes del sistema potenciométrico.

Potenciómetro (pH-metro)	Crison micropH 2002
Buereta automática	Crison BU 20 31
Ordenador personal	PC con procesador 386
Electrodo de vidrio	Crison 52 50
Electrodo de referencia	Ag/AgCl en KCl 3 M Crison 52 40
Puente salino tipo Wihelm	NaCl 0.5 M
Celda termostatada	Vaso de vidrio Pyrex con camisa termostatada (Vol. aprox. 70 cm ³)
Termostato	Haake EK 51
Agitador magnético	Crison microstirrer 2038

4.1.3. Adquisición y tratamiento de los datos

Calibrado de los electrodos. Previamente a cada medida potenciométrica, se realiza un calibrado de los electrodos valorando un ácido fuerte (HCl 0.1 M) con una base fuerte, que será la misma disolución valorante que utilizaremos después en la medida. Tanto la valoración como el tratamiento de los datos son realizados automáticamente por el programa PASAT [205]. Este programa calcula, mediante una representación de Gran [206, 207], el valor de $E^{0'}$, el valor del producto iónico del disolvente (pK_w) y la concentración de valorante (NaOH). Mediante la diferencia de concentración de valorante en la zona ácida y en la zona básica podemos conocer también el grado de carbonatación de la disolución de NaOH, el cual se debe mantener por debajo del 1%.

Adquisición de los datos. La obtención de los datos potenciométricos está también automatizada mediante el programa PASAT. Este programa controla tanto la adición de valorante mediante la bureta automática, como la lectura y registro de los datos ofrecidos por el pH-metro. Por cada alícuota de valorante añadida, el programa adquiere 10 datos de potencial y calcula la desviación estándar y la diferencia entre el primer y el último valor (deriva). Si estos parámetros superan los criterios de selección fijados (en nuestro caso ambos deben ser inferiores a 0.05), se registra la media de las 10 medidas en un archivo de salida ASCII, que contendrá los valores de los volúmenes de valorante añadidos (mL) y las medidas de la fuerza electromotriz (mV).

Tratamiento de los datos. Con los datos obtenidos, se calculan las constantes de equilibrio del sistema de manera computarizada, con los programas HYPERQUAD y SUPERQUAD [208, 209]. Estos programas utilizan el método de Levenberg-Marquard para realizar un ajuste de mínimos cuadrados no lineal dirigido a optimizar los valores de las constantes del modelo propuesto, hasta obtener el mejor ajuste de éstos a los valores experimentales.

La definición termodinámica de una constante de formación es un cociente de actividades. Para estos cálculos, sin embargo, se asume que el

cociente de los coeficientes de actividad es constante (esta suposición está justificada, ya que los experimentos se hacen en un medio de elevada fuerza iónica) y, por tanto, se pueden expresar las constantes de formación como un cociente de concentraciones:

$$\beta_{ab\dots} = \frac{[A_a B_b \dots]}{[A]^a [B]^b \dots}$$

$A_a B_b \dots$ representa cada especie química en equilibrio en la disolución. $[A]$, $[B]$ son las concentraciones de los reactivos libres.

El algoritmo de refinamiento toma como variable independiente el volumen de la disolución valorante y, como variable dependiente, el potencial medido. Este potencial se relaciona con la concentración de protones a través de la ecuación de Nernst, por lo que necesitamos conocer previamente, mediante el calibrado antes descrito, el valor del potencial estándar E^0 . Mediante un proceso iterativo se minimiza la suma de los errores cuadráticos de los parámetros estimados inicialmente, hasta obtener valores que satisfagan los criterios establecidos.

Para asegurar la reproducibilidad de los datos, los valores finales de las constantes globales de equilibrio se obtienen siempre del ajuste de al menos dos conjuntos de datos de diferentes experimentos. Finalmente, con las constantes globales de equilibrio, se pueden calcular los diagramas de distribución utilizando el programa HYSS [210].

4.2. Espectroscopía de absorción UV-Vis y de emisión de fluorescencia

Las técnicas de espectroscopía UV-Vis y de emisión de fluorescencia se han empleado extensivamente en el presente trabajo para realizar diversos experimentos que se detallan en la tabla 4.2 junto con los equipos utilizados en cada caso.

Tabla 4.2. Equipos de espectroscopía UV-Vis y de fluorescencia utilizados.

Equipo		Especificación y accesorios	Experimentos
Espectrofotómetro UV-Vis	UV-	Agilent 8453. Con control de temperatura.	Valoraciones ácido-base, estudios de interacción, estudios cinéticos.
Espectrofotómetro UV-Vis	UV-	Agilent Cary 300, con soporte de celdas múltiple y control de temperatura (5-90 °C)	Desnaturalizaciones térmicas.
Fluorímetro		PTI, modular. Opción de lámpara de Xenon o láser de N ₂ .	Valoraciones ácido-base, estudios de interacción, determinación de tiempos de vida media.

En la mayoría de casos, se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico, salvo en las medidas cinéticas, en las que se emplearon celdas desechables de poliestireno. La temperatura fue termostatada a 25.0 ± 0.1 °C. Los valores de pH, en el caso de disoluciones no tamponadas, se ajustaron mediante la adición de pequeñas cantidades de HCl y/o NaOH.

Para las medidas de fluorescencia, se empleó siempre una geometría en ángulo recto y celdas de cuarzo con las cuatro caras transparentes. La concentración de las disoluciones se ajustó para que la absorción a la longitud de onda de excitación no fuese mayor de 0.2. Los

datos de fluorescencia se han corregido con la absorbancia y con la dilución de volumen necesario para ajustar el pH.

A continuación se dan los detalles específicos de cada uno de los experimentos realizados utilizando estas técnicas espectroscópicas. De los estudios cinéticos se darán más detalles en la sección 4.9.

4.2.1. Estudios de interacción con aniones de interés biológico

Los aniones estudiados en esta tesis se pueden clasificar en dos categorías: mononucleótidos y polinucleótidos. De manera general, los estudios se realizaron valorando una disolución de nuestro ligando mediante la adición de pequeñas alícuotas de una disolución concentrada de la biomolécula en estudio hasta alcanzar la estequiometría deseada. Estas valoraciones se llevaron a cabo en medio tamponado, utilizando disoluciones de cacodilato sódico 0.05 M al pH deseado (5.0, 7.0 y 7.4).

Las disoluciones de polinucleótidos se prepararon en cacodilato a pH 7.0 disolviendo una pequeña cantidad de la sal liofilizada (~1 mg) en 200 μ L de tampón. Esta disolución se dejó reposar a 4°C un mínimo de 24 horas y luego se sonicó durante unos segundos para homogenizarla antes de su uso. Para calcular la concentración se utilizó una cubeta de cuarzo de volumen reducido con 1 mL de disolución tampón. Después de registrar el espectro del tampón (blanco) se añadió 1 μ L de la disolución de polinucleótido y se midió la absorbancia. Esta operación se repitió tres veces. Finalmente, utilizando la ley de Lambert-Beer y los coeficientes de extinción molar que se detallan en la tabla 4.3, se calcularon las concentraciones para cada una de las adiciones. La concentración final se obtuvo como la media de las tres medidas.

Tabla 4.3. Coeficientes de extinción molar de los polinucleótidos utilizados.

Polinucleótido	$\epsilon / M^{-1}cm^{-1}$	λ_{max} / nm
<i>Calf thymus</i> DNA	6600	260
poli-A – poli-U	6000	260
poli-G – poli-C	7400	253
poli-(dAdT) ₂	6600	262
poli-d(GdC) ₂	8400	254
poli-A	9800	258
poli-G	10400	253
poli-C	6200	269
poli-U	9350	258

4.2.2. Determinación de la estequiometría por el método de Job

En el presente trabajo, uno de los métodos por los que se llevó a cabo la determinación de la estequiometría media de los sistemas receptor/sustrato fue a través del llamado método de la variación continua o método de Job [211]. Este método implica medir una propiedad intensiva en una serie de disoluciones con una molaridad total constante, pero variando la relación metal-ligando o sustrato-receptor [212]. En el caso de los experimentos realizados en esta tesis, la propiedad medida fue la intensidad de emisión de fluorescencia.

Para llevarlo a cabo se prepararon, en eppendorfs, disoluciones receptor/sustrato en diferentes proporciones, pero manteniendo siempre constante la concentración total ($C_t = [receptor] + [sustrato]$). También se prepararon disoluciones del ligando libre a las mismas concentraciones. Para ilustrar, de manera general, como se prepararon estas disoluciones, en la tabla 4.4 se muestra un ejemplo (los valores de las concentraciones y las unidades son arbitrarios). Una vez registrados los espectros de emisión de todas las disoluciones, se integraron las áreas de los espectros. Con estos

datos se representó la diferencia de las áreas $\Delta A = A(\text{libre}) - A(\text{complejo})$ frente a la relación de las concentraciones $R = [\text{receptor}] / [\text{receptor}] + [\text{sustrato}]$, para obtener un diagrama de Job (Job plot). En estos diagramas, la estequiometría se deduce de el valor de la abscisa en el máximo de la curva [213, 214].

Tabla 4.4. Ejemplo de disoluciones preparadas para la determinación de la estequiometría mediante el método de Job.

Disoluciones A+B			Disoluciones A
[A]	[B]	[A+B]	[A]
10	0	10	10
9	1	10	9
8	2	10	8
7	3	10	7
6	4	10	6
5	5	10	5
4	6	10	4
3	7	10	3
2	8	10	2
1	9	10	1

4.2.3 Rendimientos cuánticos y tiempos de vida media

El rendimiento cuántico, definido como la relación entre el número de fotones emitidos frente al número de fotones absorbidos (Φ_F), se midió utilizando un aparato de fotoluminiscencia absoluta, o esfera de integración, Hamamatsu C9920-02. Se prepararon las disoluciones en una cubeta de cuarzo con las cuatro caras transparentes y se desoxigenaron previamente a cada medida burbujeando Ar durante 10 minutos, ya que el oxígeno molecular puede ser un amortiguador de la fluorescencia. Se seleccionó la longitud de onda de excitación adecuada para cada compuesto y se irradió la luz desde un lateral de la esfera. La fluorescencia emitida se detectó con un espectrómetro multicanal conectado en la parte inferior. El programa integrado al ordenador del aparato calcula el valor del rendimiento cuántico en base a los valores de intensidad de luz absorbida y emitida. La ventaja de la esfera de integración para calcular rendimientos cuánticos, frente a las técnicas relativas, reside en la rapidez y simplicidad del método y a que no es necesario el uso de materiales de referencia.

Los tiempos de vida media se obtuvieron con el fluorímetro PTI, utilizando como fuente un láser de nitrógeno ($\lambda_{exc} = 337 \text{ nm}$) y un intervalo de emisión de 145-300 ns. Los datos de caída exponencial de la fluorescencia se ajustaron utilizando el software FeliX32, proporcionado por el fabricante. La bondad de los ajustes se evaluó a través del parámetro χ^2 , que en todos los casos fue cercano a 1.

4.2.4. Desnaturalizaciones térmicas

Esta técnica se utiliza para determinar la estabilidad de la estructura secundaria del ADN o ARN y los principios en que se basan este tipo de experimentos fueron presentados hace más de 60 años [215]. La idea es simple: al elevar la temperatura se rompe la estructura secundaria del ácido nucleico, que pasa de la forma asociada (dúplex) a la forma desplegada en monohebras. Este cambio conformacional tiene lugar en una ventana relativamente estrecha de temperatura y va acompañado de un efecto hipercrómico de un 15-20 %. De esta manera, si representamos la variación de la absorbancia frente a la temperatura, obtenemos una curva como la que se muestra en la figura 4.2. A bajas temperaturas, tenemos la línea base inferior que representa la zona en la que las hebras del ácido nucleico se encuentran asociadas a través de puentes de hidrógeno, lo que da lugar a la estructura secundaria; a altas temperaturas, encontramos la línea base superior, que indica que el polímero se ha disociado, perdiendo su estructura secundaria. La temperatura de fusión, T_m , se corresponde con la temperatura a la que la mitad de la muestra está disociada, y generalmente se asigna al punto de mayor pendiente en el salto de curva (el máximo de la primera derivada).

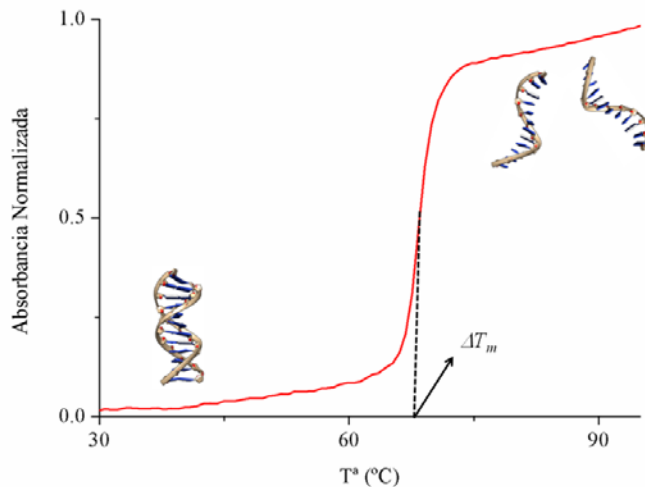


Figura 4.2. Representación de una curva de desnaturalización térmica.

En el caso de un ligando que interactúe con el ADN o ARN, estos experimentos permiten demostrar la estabilización (o desestabilización) de la estructura secundaria por parte del ligando. Un incremento de la temperatura de desnaturalización, ΔT_m , indica que el ligando tiene una mayor preferencia a interactuar con la forma asociada (doble hebra) que con la disociada. Pero es complicado correlacionar este incremento con una constante de afinidad, ya que ΔT_m no solo depende de la afinidad, sino también del número de sitios de enlace, de posibles efectos cooperativos entre ellos y de la afinidad por las formas disociadas [216]. También es complicado extraer conclusiones sobre el modo de interacción del ligando con el ADN o ARN simplemente de una variación en la T_m , ya que, si bien en la literatura se establece que las pequeñas moléculas que interactúan con el ADN a través de un modo de intercalación típicamente incrementan la T_m [217,218], también existen ejemplos de ligandos que intercalan, pero no producen cambios significativos en las T_m [219], así como de moléculas que interactúan con los surcos del ADN y que también estabilizan la doble hélice [220,221].

En nuestro caso, para realizar estos experimentos, hemos utilizado el espectrofotómetro de absorción Cary 300, que está equipado con un sistema multicubeta termostataado. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando seis cubetas de cuarzo de volumen reducido. En cada cubeta, se añadió 1 mL de la disolución tampón (se ha utilizado cacodilato sódico 0.05 M, cuyo pK_a es prácticamente independiente de la temperatura), y la cantidad necesaria de una disolución de polinucleótido para que la concentración final, expresada en pares de bases, estuviera cerca de 1.5×10^{-5} M. La concentración real en cada cubeta se obtuvo por medida de la absorbancia. En dos cubetas se añadió una alícuota de disolución madre de ligando para obtener una relación molar $[L]/[\text{polinucleótido}] = 0.1$, y en otras dos cubetas la cantidad necesaria para una relación molar de 0.5. Las dos cubetas restantes se utilizan como referencia. Una vez preparadas las muestras, se somete a las cubetas a una rampa de temperatura, desde 25 hasta 98 °C, midiendo la absorbancia del máximo de emisión del polinucleótido a intervalos de 0.5 °C y con un tiempo de espera de 30 s entre cada medida. Los valores de las temperaturas de desnaturalización, T_m , se extraen de las curvas de transición tomando el máximo de la primera derivada. Finalmente, la variación en la temperatura, ΔT_m , se calculó sustrayendo la T_m del ácido nucleico libre de la T_m del complejo. Los valores que se presentan son la media de al menos dos medidas, con un error en $\Delta T_m = \pm 0.5$ °C.

4.2.5. Estudios de desplazamiento de bromuro de etidio

Entre los métodos para estudiar la interacción de pequeñas moléculas con ácidos nucleicos se encuentran los llamados ensayos de desplazamiento del indicador fluorescente (FID) [222]. Estas técnicas se basan en la pérdida de emisión de fluorescencia de un intercalante (como el bromuro de etidio) unido al ADN al ser desplazado por una molécula que interactúa también con el ácido nucleico. Es una técnica ampliamente usada, ya que requiere de pequeñas cantidades de muestra y permite estudiar también ligandos que no son fluorescentes. Además, ahora también se puede realizar los ensayos FID con nuevas moléculas fluorescentes que interactúan selectivamente con el surco menor del ADN (Hoechst 33258) o con estructuras de tipo cuarteto de guanina (naranja de tiazolio) [223].

De los datos de desplazamiento, se puede extraer información sobre el modo de interacción de un ligando con el ADN y sobre la estabilidad del complejo formado, generalmente expresada como IC_{50} (la concentración necesaria de ligando para reducir un 50 % la emisión del bromuro de etidio) o como constante de estabilidad. Sin embargo, hay que tener en cuenta que se trata de un ensayo indirecto y que la fluorescencia del bromuro de etidio se puede ver afectada por otros factores distintos al desplazamiento de la molécula por intercalación del ligando.

Estos ensayos se realizaron preparando una disolución de bromuro de etidio (1×10^{-5} M en cacodilato sódico pH = 7.0) y registrando su emisión de fluorescencia como blanco ($\lambda_{exc} = 520$ nm, $\lambda_{em} = 540-680$ nm). Luego, se añadió un exceso de tres equivalentes de ADN, lo cual provoca un drástico aumento de la fluorescencia del bromuro de etidio. A continuación, se añaden alícuotas del ligando y se registran los cambios en la emisión del bromuro de etidio. En el caso de ligandos fluorescentes, se verificó previamente que la emisión del ligando no se solapara con la del bromuro de etidio.

4.3. Determinación de constantes de estabilidad mediante métodos espectroscópicos

Como ya se ha mencionado antes en este capítulo, la técnica empleada preferentemente para el cálculo de constantes de estabilidad de sistemas en equilibrio es la potenciometría. Sin embargo, hay casos en los que se han empleado técnicas espectroscópicas, ya sea para complementar y validar los resultados obtenidos por potenciometría, o bien, porque el sistema de estudio no puede ser directamente abordado por técnicas potenciométricas, como es el caso de los sistemas ligando-polinucleótido, o el de equilibrios que tienen lugar a pHs muy ácidos ($\text{pH} < 2.5$) o muy básicos ($\text{pH} > 11.0$). A continuación, se detallan los métodos empleados en estas situaciones.

4.3.1. Sistemas de estequiometría conocida

Los datos se obtuvieron bien por espectroscopía de absorción, por ejemplo, al hacer valoraciones ácido-base (registrando la absorbancia a diferentes valores de pH), o por espectroscopía de emisión de fluorescencia. En este segundo caso, se registró previamente el espectro de absorción para localizar un punto isobéptico y, posteriormente, utilizar esta longitud de onda como λ_{exc} en la valoración por fluorescencia, de manera que no hubiera cambios en la energía de excitación durante el experimento.

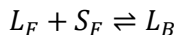
Posteriormente, se empleó el programa HypSpec [208] para calcular las constantes de estabilidad. Este programa realiza una regresión no lineal de mínimos cuadrados para ajustar los valores de las constantes

de estabilidad a nuestros datos experimentales con base en el modelo (coeficientes estequiométricos) propuesto por el investigador. El programa ofrece la ventaja de poder trabajar con múltiples longitudes de onda.

4.3.2. Sistemas ligando-polinucleótido

De los datos de absorción obtenidos al valorar nuestros ligandos con ácidos nucleicos, se pueden obtener las constantes de estabilidad de dichos sistemas en equilibrio. Desde hace más de 50 años, se han propuesto una variedad de métodos diferentes con este propósito, la mayoría de ellos basados en representaciones de tipo Scatchard [224, 225, 226]. Estos métodos tienen diversas desventajas: se viola el principio de independencia en la regresión lineal y se tiene que realizar un tratamiento extenso de los datos que requiere, en ocasiones, del juicio subjetivo del operario. Por estos motivos, hemos optado por utilizar en el presente trabajo el llamado método intrínseco, basado en el modelo propuesto por Rodger, Nordén y sus colaboradores [227] y que ha sido recientemente actualizado por Stootman y Aldrich-Wright [228]. Una de las ventajas de este método es que permite extraer el valor de la constante de estabilidad utilizando directamente los puntos experimentales, mediante un ajuste no lineal de mínimos cuadrados de un modelo de equilibrio simple, que se detalla a continuación.

Utilizaremos la siguiente nomenclatura: L_F y L_B para representar las concentraciones de ligando libre y unido, respectivamente; S_F y S_B para la concentración de los sitios de enlace en el sustrato que están libres y complejados, respectivamente. Partimos de la suposición de que podemos medir mediante una técnica espectroscópica (en nuestro caso por absorción en UV-Vis) la especie L_B . Al realizar la valoración, tendremos el siguiente equilibrio:



La constante de equilibrio K estará, por tanto, definida como:

$$K = \frac{L_B}{L_F S_F}$$

Si definimos L_T como la concentración total de ligando, entonces tenemos que $L_T = L_F + L_B$. De igual manera, si suponemos que S_T es la concentración total de sitios de enlace en el polinucleótido, tenemos que $S_T = S_F + S_B$. Si sustituimos en la ecuación del equilibrio, y asumimos que $L_B = S_B$, se obtiene que:

$$K = \frac{L_B}{(L_T - L_B)(S_T - L_B)}$$

$$L_B^2 - L_B \left(\frac{1}{K} + L_T + S_T \right) + S_T L_T = 0$$

La solución estándar a esta ecuación cuadrática es:

$$L_B = \frac{1}{2} \left\{ \frac{1}{K} + L_T + S_T - \sqrt{\left(\frac{1}{K} + L_T + S_T \right)^2 - 4S_T L_T} \right\}$$

De las dos soluciones matemáticas a la ecuación cuadrática solamente la de signo negativo ofrece soluciones realistas físicamente. Hay que recordar ahora que la variable L_B está relacionada con nuestros datos experimentales de absorbancia a través de la ley de Lambert-Beer.

Con el fin de poder ajustar nuestros datos a este modelo, usando un programa de regresión no lineal, resulta conveniente reescribir esta última ecuación en términos de una variable dependiente y (nuestra medida experimental), la variable independiente x (S_T , número total de sitios de enlace) y tres parámetros que llamaremos A , B y R , y cuyo significado se resume en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Relación entre los parámetros de ajuste y las variables físicas.

Parámetro del ajuste	Variable física
$A = 1/K$	$K = 1/A$
$B = B_T/n$	$n = B_T/B$
$R = \varepsilon_0$	$\varepsilon_0 = R$

Además incluiremos la variable n , que será el número de pares de bases por sitio de enlace o, lo que es lo mismo, el número de pares de bases que son ocluidos por la unión de cada ligando. Siendo, por tanto: $S_T = B_T/n$, donde B_T será la concentración total de pares de bases.

La ecuación parametrizada será, por tanto:

$$y = 0.5R \left\{ A + B + x - \sqrt{(A + B + x)^2 - 4Bx} \right\}$$

El ajuste nos permite calcular, por tanto, tres parámetros físicos: el valor de la constante de estabilidad K , la relación de concentración de ligando frente a la concentración de pares de bases n (el inverso de este valor $n^{-1} = N$ se corresponde, por tanto, con el número de pares de bases ocluidos por cada molécula de ligando) y el coeficiente de extinción molar ε_0 .

Los experimentos se realizaron añadiendo pequeñas alícuotas de polinucleótido a una disolución de ligando, y registrando el espectro de absorción en cada caso, después de un tiempo de estabilización de 5 min. Posteriormente, se representa la variación del máximo de absorbancia del ligando (que absorbe cerca de los 370 nm, una zona alejada de la banda de absorción de los polinucleótidos, a 260 nm) frente a la concentración de polinucleótido. Esta representación, con forma de curva de saturación, se utiliza para ajustar los parámetros de nuestro modelo mediante un programa de regresión no lineal de mínimos cuadrados. De los valores de los parámetros optimizados se extraen las constantes de estabilidad y los valores de n .

4.4. Dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular (DC) es altamente sensible al estado conformacional de los ácidos nucleicos. Por este motivo, se ha venido utilizando en el estudio de la estructura tridimensional del ADN/ARN y del efecto que tiene sobre la misma la interacción con distintos tipos de ligandos, cationes metálicos, etc.

La técnica se desarrolló a mediados del siglo pasado con el objetivo de asignar la configuración absoluta a moléculas quirales y desde entonces, gracias a su alta sensibilidad a las variaciones estereoquímicas, se ha convertido en una técnica importante para estudiar sutiles variaciones conformacionales en interacciones supramoleculares [229]. La técnica se basa en la diferencia de absorción de la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha por parte de moléculas quirales [230]. Y si bien la quiralidad es un requisito necesario para que exista señal de DC, en el caso de cromóforos aquirales, como los ligandos estudiados en el presente trabajo, al interactuar con el ADN pueden dar lugar a señales denominadas de dicroísmo circular inducido (DCI) debidas al ambiente asimétrico al que está sometido el ligando en su interacción supramolecular con la doble hélice. El sentido y la intensidad de estas señales puede servir para asignar la orientación relativa del cromóforo respecto al eje de la hélice [231].

En este trabajo se realizaron los espectros de DC en un espectrofotómetro de dicroísmo circular JASCO J815, termostatado a 298.0 ± 0.1 K y usando celdas de cuarzo con 1 cm de camino óptico. Se configuró la sensibilidad a 5 mdeg y se recolectaron los datos entre 400 y 200 nm en modo continuo a una velocidad de 50 nm/s. Se realizaron 3 acumulaciones en cada muestra y se sustrajo el blanco, que en nuestro caso era una disolución acuosa del mismo tampón. Los espectros obtenidos se trataron con un programa para suavizar las curvas mediante un promediado de puntos.

4.5. Viscosimetría

La medida de la viscosidad es un método simple, de bajo costo, complementario y reconocido para conocer el modo de interacción de pequeñas moléculas con el ADN. La técnica se basa en el hecho de que un ligando que interactúe con el ADN a través de un modo de intercalación, es decir, situándose a modo de “sándwich” entre los pares de bases, provocará un aumento de la longitud total de la cadena de ADN. Este aumento en la longitud, de L_0 a L , se traduce en un aumento de la viscosidad intrínseca de η a η_0 , según la relación [232]:

$$\frac{L}{L_0} = \left[\frac{\eta f(p)_0}{\eta_0 f(p)} \right]^{1/3} = 1 + r$$

Donde r es la relación entre ligando y pares de bases de ADN; $f(p)_0$ y $f(p)$ son funciones que dependen de la geometría del polímero libre y complejo respectivamente. En el caso del ADN se asume que estas funciones se cancelan mutuamente, ya que varían mínimamente con la concentración de ligando y, por tanto, una representación de $(\eta / \eta_0)^{1/3}$ frente a r debería dar una línea recta de pendiente 1, para el caso de un intercalante ideal. Intercalantes clásicos como la proflavina o el bromuro de etidio dan pendientes de 0.80 y 0.73 respectivamente [233].

Para medir la viscosidad existen diversos tipos de viscosímetro. En nuestro caso, utilizaremos uno de los más sencillos: el modelo Ubbelohde, llamado así en honor al químico alemán que lo inventó. Se trata de una pieza de vidrio en forma de U que contiene un tubo de llenado por un lado y un tubo de medida con un capilar por el otro. Calcularemos la viscosidad de nuestra muestra midiendo el tiempo que tarda en pasar la disolución a través de dos marcas calibradas en el instrumento, de manera que $\eta = t - t_b$. Siendo t el tiempo que tarda en pasar la disolución conteniendo el polímero y t_b el tiempo que tarda la disolución tampón (buffer). La medida del tiempo se realiza de forma manual, utilizando un cronómetro de mano. Esto tiene una ventaja, que es la sencillez de la medida, y una desventaja, que es que el tiempo de reacción del operario puede llevar a un error sistemático en la medida.

Existen otros dos aspectos que hay que considerar al realizar la medida: el primero es que pequeños cambios en la temperatura pueden producir cambios significativos en la viscosidad de un fluido, por lo que todas las medidas se deben realizar a temperatura constante. En nuestro caso, esto se logró sumergiendo el viscosímetro en un baño de agua conectada a un termostato a 25.0 ± 0.1 °C. El segundo aspecto que hay que tener en cuenta es que el proceso de intercalación tiene lugar a través de varios pasos, y que la cinética juega un papel importante en alguno de ellos, por lo que es importante que todas las disoluciones de medida tengan el mismo tiempo de incubación.

En nuestro caso, para cada ligando se prepararon un total de 6 disoluciones de 4 mL, todas ellas con una concentración de ADN de 50 μ M y concentraciones crecientes de ligando de 0, 1, 3, 5, 7 y 10 μ M. Las disoluciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura constante antes de hacerlas pasar por el capilar de medida. Se registró el tiempo que tardaba cada disolución en transitar por las dos marcas del aparato. Para los cálculos se utilizó como valor del tiempo la media aritmética de al menos tres medidas.

4.6. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN se realizaron en los equipos disponibles en el Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia: Bruker DPX 300 (7 T, 300 MHz), Bruker 400AV (9.4 T, 400 MHz) y Bruker DRX 500 (11.7 T, 500 MHz).

Las muestras se disolvieron utilizando disolventes deuterados: D₂O y CDCl₃. Como referencia, se empleó la señal del tetrametilsilano (TMS) o del ácido 3-(trimetilsilil)-propiónico (TSP) para CDCl₃ y D₂O respectivamente.

El pH de las muestras disueltas en D₂O se ajustó utilizando disoluciones stock de DCl y NaOD. El pD se calculó a partir del pH de lectura del pH-metro utilizando la siguiente fórmula [234]:

$$pD = pH_{lectura} + 0.4$$

4.7. Estudios cinéticos

Los estudios cinéticos realizados en el transcurso de esta tesis doctoral tuvieron como objetivo la determinación de la actividad SOD de los complejos de Cu^{2+} y Mn^{2+} de los nuevos ligandos de tipo escorpiando sintetizados. Los diferentes métodos propuestos en la literatura para la determinación de la actividad SOD pueden clasificarse en dos categorías: métodos directos, que miden directamente cómo varía la concentración de superóxido, e indirectos. En estos últimos se estima la variación en la concentración de superóxido a través de la medida de la concentración de un indicador capaz de reaccionar con él y de emitir una señal fácilmente detectable. Los métodos indirectos son, con diferencia, los más utilizados hasta la fecha en la literatura, ya que no requieren equipos especializados ni tiempos largos de medida, y son por los que se ha optado en esta tesis para tener una primera aproximación a la actividad SOD de nuestros compuestos.

El método que se ha utilizado fue desarrollado por los mismos descubridores de la actividad biológica de la superóxido dismutasa, Charles Beauchamp e Irwin Fridovich y estaba basado en el uso del citocromo c como indicador [235], si bien con los años se han ido introduciendo algunas variaciones [236]. En el caso de nuestro grupo de investigación, se utilizó una adaptación del método anterior, puesto a punto por el Dr. Salvador Blasco y que está ampliamente descrito en su tesis doctoral [237].

El denominado método de McCord-Fridovich para la determinación de la actividad SOD se basa en la conjunción de dos sistemas: un sistema capaz de generar radicales superóxido y el sistema indicador, cuya velocidad de reducción se puede seguir por técnicas espectroscópicas. Para generar los radicales superóxido se utiliza el sistema xantina-xantina oxidasa. La xantina oxidasa es una monooxigenasa que cataliza la conversión de xantina en ácido úrico, en un proceso en el que una fracción de moléculas de dióxígeno, en vez de oxidar al sustrato, son reducidas a superóxido (figura 4.3) [238].

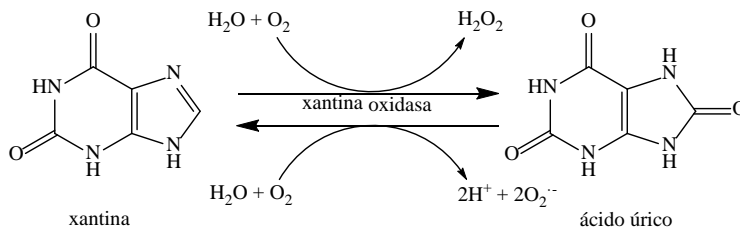


Figura 4.3. Sistema xantina-xantina oxidasa para la generación de superóxido.

Como se ha mencionado antes, en el método original el indicador usado era el citocromo c, en nuestro caso se ha optado por el azul de tetrazolio (NBT, por sus siglas en inglés). Este compuesto es de color amarillo pálido en la forma oxidada y, tras una reducción monoelectrónica, se convierte en monoformazano (MF), de color violeta y con un máximo de absorción a 560 nm. Al introducir la muestra en la disolución, si ésta presenta actividad SOD competirá con el NBT por los radicales superóxido, de manera que la variación de la absorbancia a 560 nm disminuirá como resultado de esta inhibición.

4.7.1. Procedimiento

En una cubeta de 1 mL de capacidad se introducen, en este orden: 100 μL de la disolución de compuesto preparada en tampón Tris 50 mM a pH 7.4 (o 100 μL del tampón, en el caso de las medidas del blanco); 800 μL de una mezcla de reacción conteniendo el NBT (6.25×10^{-5} M) y xantina ($\sim 2 \times 10^{-4}$ M) en tampón HEPES a pH 7.4; y 100 μL de una disolución de xantina oxidasa en el mismo tampón HEPES. Al instante después de añadir la enzima se agita vigorosamente la cubeta y se inicia la medida de la absorbancia a 560 nm de manera continua durante dos minutos.

Las medidas se realizan por triplicado. En el caso de la medida del blanco, ésta se realiza por triplicado al inicio de las medidas y por triplicado

al final, para verificar que la velocidad de reducción del NBT en ausencia del compuesto no ha variado.

4.7.2. Tratamiento de los datos

De cada experimento obtenemos un valor para la pendiente de la gráfica de absorbancia frente al tiempo, que representa la velocidad de la reacción. La diferencia entre el valor obtenido para el blanco y la de las disoluciones conteniendo el compuesto representa la contribución del compuesto a la dismutación de radicales superóxido. Esta diferencia se divide entre el valor del blanco para anular diferencias en las concentraciones de reactivos entre diferentes experimentos. Este valor se conoce como inhibición.

Los valores de la inhibición se representan frente a la concentración del compuesto. El valor de la actividad SOD del compuesto se da como IC_{50} , esto es la concentración a la cual la inhibición es del 50%. Este valor puede calcularse bien por interpolación o bien ajustando los datos a un modelo y despejando el valor. En nuestro caso se ha utilizado el software desarrollado por el Dr. Salvador Blasco para ajustar los datos y calcular la IC_{50} [239].

Uno de los problemas de usar el valor de IC_{50} es que su valor depende de la naturaleza del indicador así como de su concentración, por lo que no es posible comparar valores de IC_{50} que hayan sido obtenidos usando diferentes indicadores. Por este motivo se suele dar también el valor de la constante catalítica, k_{cat} , la cual es una medida de la actividad independiente de las condiciones experimentales. En los métodos indirectos la k_{cat} se obtiene de manera aproximada a partir del IC_{50} mediante la siguiente expresión:

$$k_{cat} = k_{detector} \cdot [detector]/IC_{50}$$

El valor para la constante del detector utilizada en nuestro caso fue $k_{NBT} = 5.94 \pm 0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ [236].

4.8. Electroquímica

Como ya se ha mencionado en la introducción, uno de los parámetros fundamentales a tener en cuenta en la preparación de compuestos que actúen como miméticos de la superóxido dismutasa es su potencial redox, que debe estar comprendido entre el potencial de oxidación y reducción del $O_2^{\cdot-}$.

Las medidas electroquímicas se realizaron con un equipo compuesto por un potenciostato CV-50W y una celda de medida C3 de Bioanalytical Systems dotado de purga de argón y agitador magnético perteneciente al Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia o con un equipo CHI-660 dotado de los mismos accesorios y electrodos, perteneciente al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia. Para preparar la muestra, se ha utilizado un volumen típico de 5 mL y una concentración de analito de 1 mM. Las disoluciones acuosas contenían NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar y el pH de la disolución se ajustó con HCl y NaOH. Los electrodos utilizados han sido: como referencia Ag/AgCl, electrodo auxiliar de hilo de platino y electrodo de trabajo de grafito BASi MF-2012.

Además, en colaboración con el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, se han realizado diversos estudios de voltametría de micropartículas y de microscopía electroquímica de barrido. Los estudios de voltametría de micropartículas se realizaron utilizando electrodos de grafito impregnados con parafina (PIGEs) siguiendo la metodología descrita por el Prof. Antonio Doménech [240].

4.9. Estudios teóricos

4.10.1 Estudios de interacción con mononucleótidos

Estos estudios se llevaron a cabo en colaboración con la Universidad de la Islas Baleares. Todos los cálculos se realizaron usando el paquete Turbomole v.6.4, con un nivel de teoría BP86-D3/def2-TZVPD [241], el cual incluye las últimas correcciones para la dispersión. Todas las geometrías (receptores, sustratos y complejos) fueron totalmente optimizados sin restricciones de simetría. Los efectos de los disolventes se evaluaron mediante la aproximación COSMO usando agua como disolvente [242].

4.10.2. Estudios de interacción con la FeSOD

Los cálculos de mecánica y dinámica molecular se realizaron usando el programa AMBER [243]. Las estructuras iniciales de los compuestos de estudio fueron construidas con LEaP (AmberTools12) y usando un campo de fuerza GAFF [244]. En el caso del complejo de la proteína con el ligando, se utilizó el campo de fuerza ff99SB. Una vez creados, los compuestos se sometieron a una minimización de la energía seguida por no menos de 20 ns de dinámica molecular a 300 K para permitir una conveniente exploración del espacio conformacional. De las trayectorias obtenidas, se seleccionó una serie de al menos 10 conformeros de mínima energía y se volvieron a optimizar. Después de la superposición de los 10 conformeros, aquel con la menor energía fue seleccionado para realizar los estudios de interacción. Todas las

simulaciones se llevaron a cabo en disolvente implícito usando la aproximación general de Born.

Las coordenadas de la enzima de FeSOD de *T. cruzi* se obtuvieron del Banco de Datos de Proteínas de Brookhaven (www.rcsb.org, PDB ref. 2gpc). Los estudios de interacción se realizaron restringiendo el sistema a una distancia entre los átomos pesados de los residuos del sitio activo y los átomos pesados del compuesto, usando un promedio de $\langle r^{-6} \rangle^{-1/6}$ para todas las distancias de interacción de átomos en los grupos. La formación del complejo para estudiar la interacción se realizó aproximando los compuestos al sitio activo y después calentando a 300 K, con las posiciones del PDB_ID 2gpc fijas y el compuesto libre para moverse. Finalmente, se realizó una serie de simulaciones de dinámica molecular del complejo a 300 K, manteniendo fijos los residuos del sitio activo, y de las 10 trayectorias de mínima energía que se seleccionaron, se minimizó la energía retirando las restricciones de distancia y las posiciones fijas.

4.10 Estudios biológicos

Los estudios biológicos se realizaron en colaboración con el grupo de investigación de Biología Molecular, del Institut de Investigació Sanitaria Pere Virgili (IISPV) y con el grupo de Parasitología Molecular, del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, para evaluar las propiedades de los compuestos sintetizados en este trabajo como agentes antitumorales y antiparasitarios. A continuación, se detallan los distintos estudios realizados.

4.8.1. Evaluación de las propiedades antitumorales

Ensayos de citotoxicidad. Para valorar la toxicidad de los ligandos y su posible aplicación como agentes antitumorales, se realizaron ensayos de viabilidad sobre diferentes líneas celulares de cáncer de vejiga: T24, 253J y UMUC-3. Los estudios se realizaron con el método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) [245]. Éste es un ensayo colorimétrico que se basa en el hecho de que las células vivas pueden reducir el MTT (amarillo) a formazán (púrpura) gracias a la acción de las enzimas presentes en las mitocondrias de las células vivas. Este cambio de color puede relacionarse directamente con el número de células viables mediante una curva de calibrado.

La metodología que se siguió en los ensayos de MTT es la siguiente: se preparan cultivos celulares ($3-5 \times 10^3$ células en 200 μ L del medio correspondiente) en placas de 96 pocillos, permitiendo que estas se adhieran y recuperen de la tripsinización durante 24 h. Pasado este tiempo, el medio se retira y se añaden los compuestos a diferentes concentraciones, disueltos en 200 μ L de medio. Después de 24, 48 o 72 horas de incubación con los compuestos, las células se incuban otras 3 h adicionales en medio

fresco, sin compuestos, pero con $1.2 \mu\text{molL}^{-1}$ de MTT. El precipitado de formazán se disuelve en 200 μL de DMSO y se mide la absorbancia a 540 nm usando un espectrómetro automático. El porcentaje de supervivencia se calcula de la siguiente manera: $(A_{\text{pocillo experimental}} / A_{\text{pocillo control}}) \times 100$. El IC_{50} , definido como la concentración de compuesto que causa una reducción del 50 % en la viabilidad celular, se calculó usando un ajuste por regresión no lineal de las curvas dosis-respuesta.

La viabilidad celular y la distribución de los compuestos dentro de la célula también se pudieron verificar de manera visual mediante experimentos de microscopía de fluorescencia. Se utilizó un microscopio de fluorescencia Nikon (TE2000-E) y se procesaron las imágenes con el programa MacBiophotonics Image J 1.43.

Inmunoensayos. La presencia de daño en el ADN de las células se verificó analizando si los compuestos provocaban la activación de la respuesta celular al daño del ADN. Esta respuesta celular activa las quinasas ATM, que por su parte fosforilan la proteína p53 en el residuo Ser15. Como control a estos experimentos, se utilizaron doxorubicina y 5-fluoracilo, dos drogas anticancerígenas de las que se ha verificado su capacidad como activadoras de la respuesta del daño al ADN. El inmunoensayo se desarrolló transfiriendo la disolución celular a membranas de nitrocelulosa que se trataron con anticuerpo policlonal de conejo anti-p53 (p-Ser15) (Ab-3), anti p-53 Ab-1, y anti- β -actin (Clone AC-74). La expresión de las proteínas p53 y pSer15-p53 se cuantificó por densitometría usando el programa Quantity One (Bio-Rad).

Estudios de microscopía confocal. Las células incubadas se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído 4% durante 10 minutos y luego se volvieron a lavar. Las muestras se bloquearon y permeabilizaron (5% suero de cabra, 0.3% Triton X-100 en PBS) por 1 h. Después de lavarse dos veces con PBS las células se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo Phospho-H2AX previamente conjugado a AlexaFluor 647. A continuación se lavaron dos veces con PBS y el núcleo se tizó con NucGreen Dead 488 por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavarse dos veces con PBS los especímenes se montaron utilizando el

reactivo Prolong Gold Antifade. Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Nikon TE2000E y un microscopio conocal Leica TCS-SP2.

Ensayos de permeabilidad de membrana artificial paralela (PAMPA). Los ensayos PAMPA se realizaron en placas de filtro MultiScreen IP PAMPA de 96 pocillos. Se añadieron 5 μL de una disolución 1% (p/v) de lecitin en dodecano a los pocillos dadores. Inmediatamente, se añadieron 150 μL de una disolución 0.5 mM del compuesto en PBS, también en los pocillos dadores. A continuación 300 μL de PBS se añadió a los pocillos aceptores. Una vez que las placas estaban llenas con las disoluciones, la placa dadora se colocó sobre la aceptora, asegurando que la parte baja de la membrana estaba en contacto con la disolución tampón en todos los pocillos. La placa se incubó a 25°C por 16 horas con agitación. Finalmente, para determinar la concentración del compuesto en la placa aceptora, se analizaron usando un espectrómetro UV-Vis.

Ensayo de inhibición del transporte activo. Para estudiar los efectos de la temperatura en la asimilación de los compuestos se incubaron células T24 en placas de 96 pocillos y se dejaron 24 horas para recuperarse de la tripsinización. Luego se pre-incubaron por 1 hora a 4°C o a 37°C antes de añadir los compuestos a 1 misma temperatura por 2 horas. Después se quitó el medio y se lavaron las células con PBS. Después de 24 horas de incubación se midió la viabilidad celular por el método del MTT antes descrito.

Ensayos de competición del sistema de transporte de poliaminas. Se analizó la capacidad de los compuestos para competir con las poliaminas naturales para entrar en células T24. Para ello se sembraron en placas de 96 pocillos y se dejaron 24 horas para recuperarse de la tripsinización. Luego se eliminó el medio y se añadió un nuevo medio que contenía los compuestos a diferentes concentraciones en ausencia (control) o presencia de 500 μM de putrescina, 100 μM de espermidina o 50 μM de espermina. Todos los experimentos se realizaron en un medio que contenía 2 mM de aminoguanidina para prevenir la citotoxicidad inducida por los

productos derivados de la oxidación de las poliaminas. Después de 48 horas de incubación, la supervivencia celular se determinó utilizando el ensayo del MTT antes descrito.

4.8.2. Estudios sobre la actividad superóxido dismutasa en bacterias

Ensayos de crecimiento con *Escherichia coli*. Para estos estudios se utilizaron dos cepas de *E. coli*: una cepa salvaje (AB1157) y una cepa SOD-deficiente (PN134). Para los ensayos de crecimiento las bacterias se sembraron en placas de 96 pocillos (200 μL /pocillo) y se siguió su crecimiento turbidimétricamente a 620 nm mediante un espectrofotómetro para placas microtituladoras termostataado a 37 °C. Las disoluciones madre de todos los compuestos en agua (con y sin Mn^{2+}) se diluyeron en el medio de cultivo (M9CA) a la concentración deseada para cada ensayo. Se realizaron tres experimentos independientes y en cada uno de ellos los compuestos se probaron por duplicado.

4.8.3. Determinación de la actividad tripanocida y leishmanicida

Ensayos in vitro. Para obtener información preliminar sobre la actividad tripanocida, se evaluaron in vitro los compuestos con las formas extracelulares (epimastigotes y tripomastigotes) e intracelulares (amastigotes) del *Trypanosoma cruzi*. Las formas extracelulares se trataron añadiendo dosis de los compuestos al medio de cultivo (100, 50, 25, 10, 1, 0.5, 0.25 y 0.1 μM) y verificando sus efectos a las 72 h mediante una cámara hematocitométrica de Neubauer. Para el estudio de las formas intracelulares se infectaron células Vero con la forma metacíclica del parásito, a razón de 10:1, durante 24 h. Posteriormente, se trataron con diferentes dosis de compuesto por 72 h y se determinó la actividad de los compuestos haciendo un conteo visual de los parásitos en los cultivos de células tratadas y en las control.

La actividad leishmanicida se verificó en la forma extracelular de las especies *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani* disolviendo los compuestos en el medio de cultivo hasta concentraciones finales de 100, 50, 25, 10 y 1 μM . El efecto se expresó luego como el valor de la IC_{50} calculado por análisis de regresión lineal. La actividad frente a las formas intracelulares se evaluó haciendo crecer macrófagos en microplacas de 24 pocillos durante 2 días para posteriormente infectarlos con los promastigotes de las especies antes descritas durante 24 h. Los parásitos no fagocitados se eliminaron del medio mediante lavados, mientras que el cultivo infectado se trató con los compuestos estudiados a diferentes concentraciones (1 – 100 μM) durante 72 h. La actividad se determinó como porcentaje de reducción del número de amastigotes en los cultivos tratados frente a los no trataos.

Ensayos in vivo. Con el visto bueno del comité de ética de la Universidad de Granada, se hizo una selección entre los compuestos más activos en los ensayos in vitro para proseguir con los ensayos in vivo sobre un modelo murino (ratones BALB/c). Grupos de seis ratones hembra fueron inoculados por vía intraperitoneal con 5×10^5 tripomastigotes de *T. cruzi* obtenidos de la sangre de ratones previamente infectados, y se dividieron en dos grupos: ratones infectados pero no tratados y ratones

tratados. A los ratones del segundo grupo, a los 7 días de infectados, se les administró una dosis de 25 mg/Kg en peso y por día, durante 5 días, por vía intraperitoneal. Se realizó un control del número de parásitos en sangre cada 3 días, durante 40 días.

Estudios de excreción de metabolitos. Cultivos de *T. cruzi*, *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani* fueron tratados con una dosis equivalente al IC₂₅ de los compuestos durante 96 h. Posteriormente, fueron centrifugados y el sobrenadante se recogió para analizar los metabolitos mediante ¹H RMN.

Alteraciones ultraestructurales. De manera similar, parásitos tratados con dosis IC₂₅ de los compuestos durante 72 h se centrifugaron y se recogieron como una pastilla sólida para luego lavarla con PBS y mezclarla con paraformaldehído/glutaraldehído (2 % v/v, en 0.05 M de tampón cacodilato, pH 7.4). Las muestras se prepararon para los estudios de microscopía de transmisión electrónica (TEM).

Evaluación de las propiedades farmacocinéticas. Para evaluar las propiedades farmacocinéticas de los compuestos y su posible administración oral se determinaron los descriptores de Lipinski y se calcularon las propiedades ADMET (administración, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) mediante la aplicación admetSAR [246].

5.

Síntesis

Síntesis

5.1. Procedimientos generales de síntesis

Como ya se ha expuesto en la introducción, la Química Supramolecular es un campo multidisciplinar en cuyo desarrollo intervienen diversas ramas de la química. Entre ellas, la Química Orgánica ha jugado un papel fundamental, aportando las herramientas que permiten el diseño y la síntesis de receptores con propiedades bien definidas. A lo largo de este capítulo, se expondrán los procedimientos generales de la síntesis de estos receptores, seguido de los resultados concretos de la síntesis de los nuevos compuestos estudiados en esta tesis doctoral.

Durante el desarrollo de este trabajo se sintetizaron de manera continuada y en grandes cantidades los precursores **L** y **LI** (ver capítulo 3, “Nomenclatura”). Su síntesis se describirá de manera general, pero no se incluirán los resultados ya que forman parte de tesis doctorales anteriores [237, 247, 248, 249] y han sido publicados previamente [198, 199, 250].

5.1.1. Tosilación

El 4-toluensulfonilo (tosilo o Ts) ha sido ampliamente usado en Química Orgánica como grupo protector de aminas, desde que fuera descrito por Emil Fischer [251, 252]. El reactivo de partida utilizado es el cloruro del ácido p-toluensulfónico, y el mecanismo de la reacción consiste en una sustitución nucleofílica en la cual la amina actúa como nucleófilo desplazando al cloruro y formando un enlace sulfonamida (figura 5.1). Dado que el grupo amino es protonable, es necesario el uso de una base para mantenerlo desprotonado. Una de las ventajas del uso del tosilo como grupo protector es que la rigidez conformacional que aporta permite preorganizar el producto de cara a la siguiente reacción de ciclación, favoreciendo la formación del ciclo frente a otras reacciones de oligomerización.

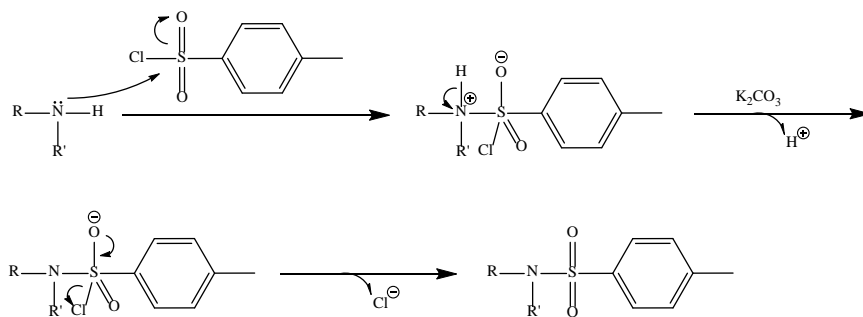


Figura 5.1. Mecanismo de reacción para la tosilación.

El proceso general consiste en disolver la amina (20-40 mmol) en 200 mL de THF, junto con 10 equivalentes de K_2CO_3 , por cada grupo amino que se desea tosilar, disueltos en 100 mL de H_2O . Esta mezcla se pone en un matraz de fondo redondo con agitación fuerte a temperatura ambiente. A continuación se añade, gota a gota, 1 equivalente de cloruro de tosilo por cada grupo amino que se desea tosilar, disuelto en 200 mL de THF. Se deja transcurrir la reacción por 24 horas, pasadas las cuales se rotavapora la fase orgánica. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 , para posteriormente rotavaporar el diclorometano a sequedad, obteniéndose un aceite amarillo. Este aceite se purifica disolviéndolo en etanol a reflujo y dejando cristalizar. El rendimiento de esta reacción suele ser superior al 95 %.

5.1.2. Ciclación

El proceso de ciclación llevado a cabo consiste en la reacción entre una poliamina tosilada y un dibromuro, en relación molar 1:1 y presencia de base, para dar lugar a un poliazamacrociclo (figura 5.2). Esta reacción está basada en el proceso descrito en los años setenta por J. E. Richman y T. J. Atkins [253]. Para desfavorecer la formación de oligómeros, y aumentar así el rendimiento de la reacción, ésta se realiza en condiciones de alta dilución. Esto se consigue usando un volumen de disolvente grande, en relación a la cantidad de reactivos, y añadiendo uno de los reactivos gota a gota, muy despacio y con agitación vigorosa, para que la cantidad de reactivo sin reaccionar en el matraz sea lo más baja posible, evitando así concentraciones locales altas.

Se disuelven 5-10 mmoles de la poliamina tosilada y 10 equivalentes de K_2CO_3 en 400 mL de acetonitrilo seco, en un matraz de fondo redondo de dos bocas. Aparte, se disuelve el dibromuro en otros 100 mL de acetonitrilo seco y se colocan en un embudo de adición conectado a una de las bocas del matraz, mientras la otra boca se conecta a una columna de reflujo. Se calienta la mezcla bajo agitación intensa y atmósfera de nitrógeno. Cuando la mezcla está ya a reflujo se empieza a adicionar el dibromuro, gota a gota muy lentamente, en el transcurso de varias horas. Una vez terminada la adición, la reacción se deja continuar por 20 horas más, al cabo de las cuales se deja enfriar la mezcla y se filtra en placa para retirar el carbonato. Se elimina el disolvente mediante vacío y el sólido obtenido, en forma de espuma blanca, se purifica por recristalización en etanol caliente, obteniéndose el compuesto en forma de lentejas blancas de elevada pureza y con un rendimiento superior al 60 %.

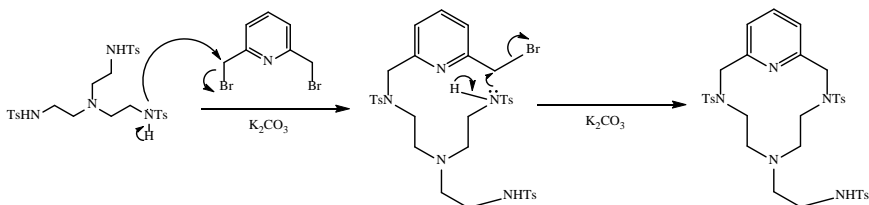


Figura 5.2. Esquema del mecanismo de la reacción de ciclación.

5.1.3. Alargamiento

Este proceso se ha utilizado para introducir un grupo 3-aminopropilo en la cadena lateral de nuestros macrociclos. El proceso, que es una variante de la síntesis de Gabriel [254], consta de dos pasos: el primero es una sustitución nucleofílica entre nuestra poliamina tosilada, que actúa como nucleófilo, y la N-(3-bromopropil)ftalimida, cuyo carbono en posición α al bromuro actúa como electrófilo (figura 5.3). Esta reacción se favorece por el uso de una base, que cumple una doble función: por un lado neutraliza el bromuro de hidrógeno generado y, por otro, mantiene desprotonado el grupo sulfonamida, lo que aumenta su nucleofilia.

El segundo paso de la reacción consiste en la desprotección del grupo ftalimida por el método de Ing-Manske [255], que implica la reacción con hidracina. Esta reacción da como productos la amina primaria junto con un precipitado de ftalhidrazida.

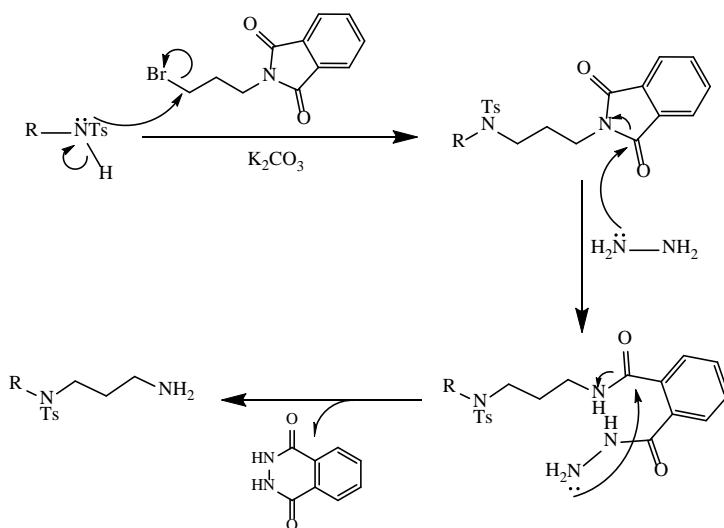


Figura 5.3. Esquema de la reacción de alargamiento.

Esta reacción se lleva a cabo de la siguiente manera: se disuelven 5-10 mmol de la amina tosilada, 1.3 equivalentes de la N-(3-bromopropil)ftalimida y 8 equivalentes de K_2CO_3 en 200 mL de acetonitrilo seco. La mezcla se somete a reflujo con agitación magnética durante 48 horas. Una vez enfriada la reacción, se filtra en placa para eliminar el carbonato y el filtrado se rotavapora a sequedad obteniéndose un aceite. Este producto se redissuelve en 100 mL de etanol a reflujo y se añaden 12 equivalentes de hidracina. La reacción se deja a reflujo por 24 horas más en atmósfera inerte. Al enfriarse aparece un precipitado blanco que se elimina por filtración en placa. Se evapora el disolvente a vacío hasta sequedad para obtener un producto en forma de espuma. El rendimiento de esta reacción es superior al 90 %.

5.1.4. Detosilación

La eliminación de los grupos tosilo se realiza bajo condiciones severas, utilizando ácido bromhídrico en ácido acético (que hace las veces de disolvente) y en presencia de fenol [252, 256]. La razón por la cual se añade fenol es porque la reacción transcurre por un mecanismo radicalario, y el fenol es un buen captador de radicales. Para el montaje de la reacción es necesario colocar una trampa de gases a la salida del reflujo, cargada con una disolución concentrada de NaOH para capturar el exceso de ácido bromhídrico que se libera.

El procedimiento general es el siguiente: se colocan 1-10 mmol del compuesto tosilado en un matraz de fondo redondo junto con 12.7 equivalentes de fenol por cada grupo tosilo y 12.7 mL de HBr (al 33 % en ácido acético) por cada mol de tosilo. La mezcla se calienta a 90 °C durante 24 horas. Al enfriarse la disolución precipita el bromhidrato de la poliamina detosilada. Este precipitado se recupera por filtración y se lava con etanol seco. El producto se suele obtener con un rendimiento del 70-80 %.

5.1.6. Funcionalización

En el desarrollo de un fármaco, una vez que se ha obtenido un producto con una actividad biológica prometedora, se suele modificar mediante la incorporación de grupos funcionales que permitan variar sus propiedades para alcanzar, por ejemplo, una mayor selectividad, mayor actividad, menor toxicidad, una mejor biodistribución, etc. También en la química supramolecular es de gran interés modificar un receptor mediante la incorporación de grupos funcionales. Los propósitos pueden ser varios: incluir un grupo fluoróforo para dotar al receptor de propiedades fotoluminiscentes; incluir átomos dadores adicionales; mejorar la solubilidad del compuesto; etc. A este proceso de incluir un grupo funcional en el “esqueleto” de un receptor dado, con el fin de modificar sus propiedades es a lo que nos referimos como funcionalización.

En este trabajo se han empleado dos estrategias sintéticas diferentes para llevar a cabo este proceso. La primera de ellas consiste en la reacción entre una amina primaria y un carbaldehído para dar lugar a una base de Schiff (llamada así en honor al químico alemán Hugo Schiff, quien propuso la reacción en 1864 [257]). Esta base de Schiff, o imina, se reduce *in situ* con NaBH_4 para dar el producto deseado, como se ilustra en la figura 5.4.

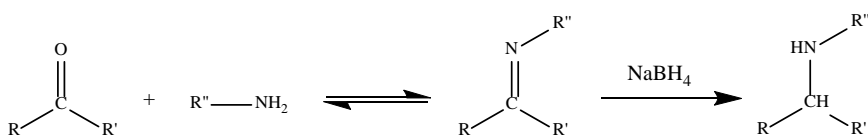


Figura 5.4. Reacción de base de Schiff seguida de una reducción.

Esta reacción requiere que se utilice la amina libre, no la sal amónica, por lo que, en caso de tener el producto de partida en forma de bromhidrato o clorhidrato, el primer paso en el proceso de síntesis consiste en la obtención de la amina libre, ya sea por extracción en medio básico o mediante la utilización de una resina de intercambio iónico (para este trabajo se ha empleado Amberlite IRA-402). A continuación se disuelven

2-4 mmol de esta amina en 50-150 mL de etanol seco. Aparte, se disuelven 1-1.2 equivalentes del carbaldehído por cada grupo amino que se desea funcionalizar en 50-100 mL de etanol seco (el volumen dependerá de la solubilidad del reactivo) y se pasan a un embudo de adición. Se añade el carbaldehído a la disolución de amina gota a gota y bajo agitación vigorosa. Se deja reaccionar durante dos horas, pasadas las cuales se adicionan 10 equivalentes de NaBH₄ y se deja una hora más. Se elimina el disolvente a vacío y el sólido obtenido se extrae con CH₂Cl₂/H₂O. La fase orgánica se lleva a sequedad en un rotavapor para dar el producto en forma de aceite. Por conveniencia y dado que es más fácil trabajar con sales que con aceites, se procede a disolver la amina obtenida en un disolvente orgánico seco (normalmente etanol o CH₂Cl₂) y se precipita utilizando una disolución de HCl 4.0 M en dioxano. La sal se recupera por filtración en placa y se seca a vacío.

Para poder utilizar esta estrategia de síntesis es necesario disponer del carbaldehído del grupo funcional. Sin embargo, a veces, éste no se encuentra comercialmente disponible y/o su síntesis resulta demasiado complicada. Por este motivo, en algún caso se ha optado por una segunda estrategia para la funcionalización. Ésta consiste en hacer reaccionar la amina protegida con un bromuro o cloruro de del grupo funcional en presencia de una base, seguida de una desprotección (figura 5.5) [258]. Esta sustitución nucleofílica no suele ser cuantitativa, por lo que se requiere de una purificación por cromatografía en columna antes de la desprotección.

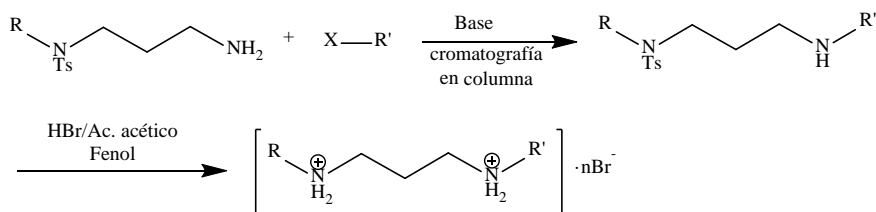


Figura 5.5. Estrategia para la funcionalización mediante sustitución nucleofílica y desprotección.

5.2. Síntesis de los derivados de **L**

Los siguientes compuestos han sido sintetizados a partir de la poliamina **L**. Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la síntesis de este precursor ha formado parte de tesis doctorales y artículos científicos previos a la realización de este trabajo [198, 199, 237, 247, 248, 249, 250]. En esta sección se detallará únicamente la preparación de los nuevos ligandos sintetizados y estudiados en el transcurso de esta tesis. Los espectros de RMN ^1H de todos los compuestos se pueden consultar en el Anexo 2.

5.2.1. Síntesis de **L-A**

El **L-A**, 6-[4-(9-antril)-3-azabutil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano, se ha preparado a partir de la poliamina **L** y el antraceno-9-carbaldehído siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.1.6. La síntesis de este compuesto se publicó en el transcurso de esta tesis doctoral en el *J. Am. Chem. Soc.* [259] (ver Anexo 1, Publicaciones relacionadas).

La amina libre de **L** (0.84 g, 3.4 mmol) se disolvió en etanol seco (150 mL), y se añadió gota a gota una disolución de antraceno-9-carbaldehído (0.9 g, 4.4 mmol) en 100 mL de etanol seco. La mezcla se mantuvo con agitación vigorosa por 2 horas. Se añadió NaBH_4 (1.27 g, 34 mmol) y la disolución resultante se agitó durante una hora más a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó en un rotavapor y el sólido obtenido se trató con H_2O y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente para obtener el producto en forma de amina libre, la cual se disolvió en etanol seco y se precipitó con HCl 4.0 M en dioxano para obtener la sal de clorhidrato (0.85 g, rendimiento del 40%).

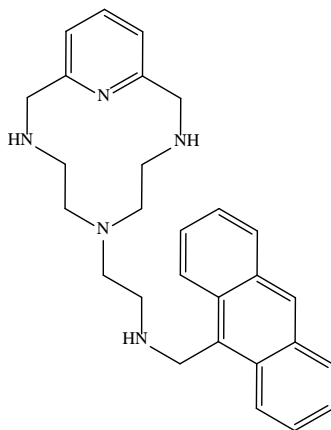


Figura 5.6. Esquema de L-A.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ_{H} 8.57 (s, 1H), 8.23 (d, J = 9 Hz, 2H), 8.08 (d, J = 9 Hz, 2H), 7.96 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.59 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.45 (d, J = 8 Hz, 2H), 5.19 (s, 2H), 4.61 (s, 4H), 3.48 (t, J = 6 Hz, 2H), 3.23 (m, 4H), 3.04 (t, J = 6 Hz, 2H) 2.88 (t, J = 5 Hz, 4H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 131.1, 130.5, 129.7, 128.1, 125.8, 122.8, 122.4, 120.7, 50.9, 50.6, 49.7, 46.1, 43.3, 40.1. Anal. Calc. para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_5 \cdot 4\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 54.1; H, 6.6; N, 11.3. Exp.: C, 53.9; H, 6.8; N, 11.2.

5.2.2. Síntesis de **L-P**

El compuesto 6-[4-(1-pirenil)-3-azabutil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano se ha obtenido de manera análoga al anterior, utilizando como reactivos la poliamina **L** (0.52 g, 2.1 mmol), el pireno-1-carbaldehído (0.5 g, 2.5 mmol) y NaBH₄ (0.78 g, 21 mmol). La sal de clorhidrato se obtuvo con un rendimiento del 45%. La síntesis de este compuesto se publicó en la revista *RSC Advances* [260].

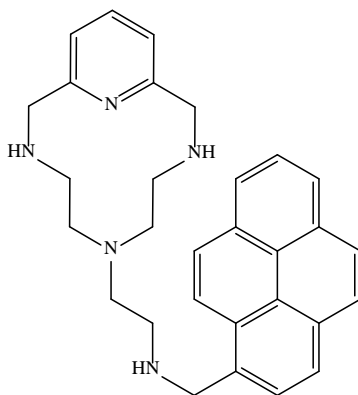


Figura 5.7. Esquema de **L-P**.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ_H 7.98 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.86 (m, 2H), 7.78 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 3 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.66 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8 Hz, 2H), 4.44 (s, 2H), 4.35 (s, 4H), 3.08 (t, J = 6 Hz, 2H), 2.87 (br, 4H), 2.78 (t, J = 6 Hz, 2H), 2.49 (br, 4H). ¹³C RMN (D₂O, 75.43 MHz): δ_C 149.03, 140.07, 131.79, 130.69, 130.02, 128.90, 129.78, 128.67, 128.34, 127.22, 126.74, 126.13, 126.03, 124.99, 123.54, 123.30, 122.78, 122.44, 121.52, 50.94, 50.51, 49.73, 48.62, 46.11, 42.86. Anal. Calc. para C₃₀H₃₃N₅·4HCl·2H₂O: C, 55.9; H, 6.4; N, 10.9. Exp.: C, 55.9; H, 6.5; N, 11.4.

5.2.3. Síntesis de L-S

El 6-[4-(2-hidroxifenil)-3-azabutil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano (**L-S**), se sintetizó siguiendo el protocolo descrito antes, utilizando como reactivos la poliamina **L** (0.50 g, 2.0 mmol), el salicilaldehído (0.25 g, 2.0 mmol) y NaBH_4 (0.75 g, 20 mmol). El proceso de extracción resultó poco eficiente ya que, como se discutirá en el capítulo 6, “Estudios de protonación e interacción con metales de transición”, no es posible obtener una especie neutra en disolución. Debido a esto el rendimiento de la reacción resultó ser inferior al 30%.

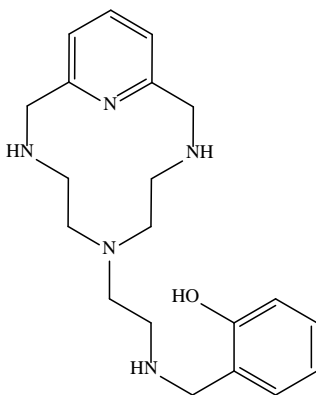


Figura 5.8. Esquema de **L-S**.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ_{H} 7.90 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 6.92 (m, 2H), 4.57 (s, 4H), 4.24 (s, 2H), 3.20 (m, 6H), 3.03 (m, 2H), 2.85 (m, 4H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 155.47, 149.27, 140.16, 132.24, 132.07, 122.57, 121.03, 117.54, 116.02, 51.08, 50.84, 49.84, 47.60, 46.26, 42.59. Anal. Calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_5\text{O} \cdot 4\text{HCl}$: C, 48.0; H, 6.6; N, 13.9. Exp.: C, 48.3; H, 6.9; N, 13.9.

5.3. Síntesis de los derivados de **LI**

Los ligandos presentados en esta sección fueron obtenidos a partir de la poliamina **LI**, 6-(3,7-diazaoctil)-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinacilodecafacano, o de su intermedio tosilado, siguiendo la síntesis ya descrita [**¡Error! Marcador no definido.**], que emplea los procedimientos generales comentados en la sección 5.1. Esta poliamina se obtiene en forma de sal de bromhidrato por lo que es necesario recurrir a una columna de intercambio iónico para obtener la amina libre que será utilizada en la síntesis de estos compuestos.

5.3.1. Síntesis del **LI-A**

El **LI-A**, 6-[8-(9-antril)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinacilodecafacano, se ha preparado utilizando como precursor la poliamina **LI** y el antraceno-9-carbaldehído siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.1.6. La síntesis de este compuesto se publicó en el transcurso de esta tesis doctoral en la referencia [259].

La amina libre de **LI** (0.42 g, 1.4 mmol) se disolvió en etanol seco (150 mL), y se añadió gota a gota una disolución de antraceno-9-carbaldehído (0.3 g, 1.4 mmol) en 100 mL de etanol seco. La mezcla se mantuvo con agitación vigorosa por 2 horas. Se añadió NaBH_4 (0.5 g, 14 mmol) y la disolución resultante se agitó por una hora más a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a vacío y el sólido obtenido se trató con H_2O y se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se eliminó el disolvente en un rotavapor para obtener el producto en forma de amina libre, la cual se disolvió en etanol seco y se precipitó con HCl 4.0 M en dioxano para obtener la sal de clorhidrato (0.66 g, rendimiento del 65%).

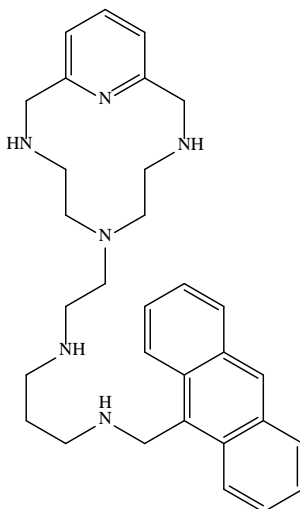


Figura 5.9. Esquema de **LI-A**.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ_{H} 8.46 (s, 1H), 8.11 (d, $J = 9$ Hz, 2H), 8.02 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 7.98 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 7.69 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 7.58 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 5.04 (s, 2H), 4.64 (s, 4H), 3.28 (m, 8H), 3.17 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3.05 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2.92 (t, $J = 5$ Hz, 4H), 2.16 (m, 2H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 140.2, 131.1, 130.6, 129.8, 128.1, 125.9, 122.8, 122.5, 120.6, 66.9, 51.2, 50.8, 49.8, 46.2, 45.3, 45.0, 43.8, 43.3, 23.1. Anal. Calc. para $\text{C}_{31}\text{H}_{40}\text{N}_6 \cdot 5\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 52.1; H, 6.9; N, 11.8. Exp.: C, 52.2; H, 7.0; N, 11.8.

5.3.2. Síntesis de **LI-P**

El 6-[8-(1-pirenil)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecaéfano (**LI-P**), se ha preparado de manera análoga al receptor descrito antes, utilizando **LI** (0.48 g, 1.6 mmol), el pireno-1-carbaldehído (0.36 g, 1.6 mmol) y NaBH_4 (0.6 g, 16 mmol). Se obtuvieron 0.28 g de producto, con un rendimiento del 27%. La síntesis de este compuesto aparece también publicada en la referencia [259].

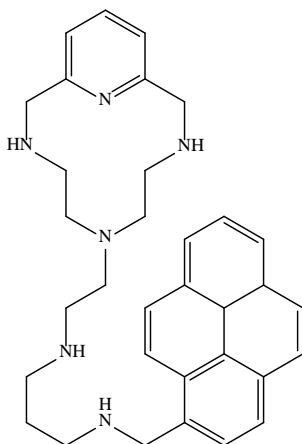


Figura 5.10. Esquema de **LI-P**.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ_{H} 7.98 (t, $J = 8$ Hz, 2H), 7.86 (m, 2H), 7.78 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.75 (d, $J = 3$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 2$ Hz, 1H), 7.66 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 9$ Hz, 1H), 7.31 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.45 (s, 4H), 3.05 (m, 8H), 2.85 (m, 4H), 1.97 (m, 2H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 149.1, 140.1, 131.8, 130.8, 130.1, 128.8, 128.7, 128.6, 128.4, 127.3, 126.7, 126.2, 126.1, 125.0, 123.6, 123.3, 122.4, 121.48, 51.0, 50.5, 49.8, 46.1, 44.4, 43.5, 23.0. Anal. Calc. para $\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_6 \cdot 4\text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C, 55.0; H, 7.0; N, 11.7. Exp.: C, 54.9; H, 6.9; N, 11.8.

5.3.3. Síntesis del **LI-2Py**

El **LI-2Py**, 6-[8-(2-piridil)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano, se ha preparado siguiendo el procedimiento antes descrito, utilizando **LI** (0.57 g, 1.86 mmol), la piridina-2-carbaldehído (0.20 g, 1.86 mmol) y NaBH_4 (0.70 g, 18.6 mmol). Se obtuvieron 0.67 g, rendimiento del 62 %. La síntesis de este compuesto se publicó en *Chem. Eur. J.* [261].

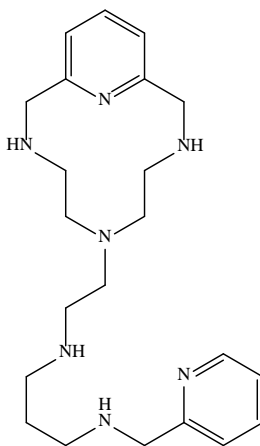


Figura 5.11. Esquema de **LI-2Py**.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ_{H} 8.83 (d, $J=6$ Hz, 1H), 8.51 (t, $J=8$ Hz, 1H), 8.03 (d, $J=8$ Hz, 1H), 8.00 (m, 2H), 7.49 (d, $J=8$ Hz, 2H), 4.69 (s, 2H), 4.68 (s, 4H), 3.34 (m, 10H), 3.10 (t, $J=8$ Hz, 2H), 2.98 (m, 4H), 2.28 (m, 2H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 149.2, 146.4, 145.5, 140.1, 127.5, 127.4, 122.6, 51.3, 50.8, 49.9, 48.9, 46.3, 45.3, 45.2, 44.0, 23.1. Anal. Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_7 \cdot 5\text{HCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 42.9; H, 7.2; N, 15.9. Exp.: C, 42.4; H, 7.5; N, 15.4.

5.3.4. Síntesis del **Ll-4Py**

El mismo proceso se ha empleado para preparar el **Ll-4Py**, 6-[8-(4-piridil)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano, utilizando **Ll** (0.49 g, 1.60 mmol), la piridina-4-carbaldehído (0.18 g, 1.60 mmol) y NaBH_4 (0.60 g, 16.0 mmol), y obteniéndose 0.67 g de producto final, con un rendimiento del 49 %. La síntesis de este compuesto también aparece publicada en la referencia [261].

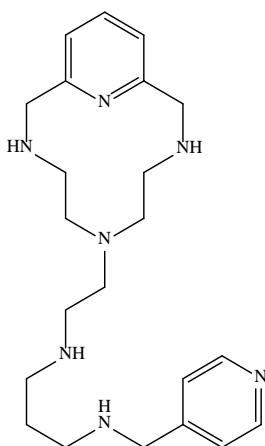


Figura 5.12. Esquema de **Ll-4Py**.

^1H RMN (D_2O , 300 MHz): δ_{H} 8.83 (d, $J=7$ Hz, 2H), 8.10 (d, $J=7$ Hz, 2H), 7.90 (t, $J=8$ Hz, 1H), 7.39 (d, $J=8$ Hz, 2H), 4.58 (s, 6H), 3.28 (m, 10H), 3.02 (m, 2H), 2.87 (m, 4H), 2.19 (m, 2H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 151.7, 149.2, 142.4, 140.1, 127.9, 122.6, 51.3, 50.8, 49.9, 49.8, 46.3, 45.6, 45.3, 44.1, 23.1. Anal. Calc. para $\text{C}_{22}\text{H}_{35}\text{N}_7 \cdot 5\text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C, 40.5; H, 7.4; N, 15.0. Exp.: C, 40.4; H, 7.4; N, 14.7.

5.3.5. Síntesis del **LI-2Q**

De manera análoga a los compuestos antes descritos, el **LI-2Q**, 6-[8-(2-quinolil)-3,7-diazaoctil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclo-decafino, se preparó utilizando **LI** (0.63 g, 2.5 mmol), quinolina-2-carbaldehído (0.48 g, 3.05 mmol) y NaBH₄ (0.93 g, 25 mmol). Se recuperaron 0.70 g de producto, con un rendimiento del 48 %. La síntesis de este compuesto fue publicada en la referencia [260].

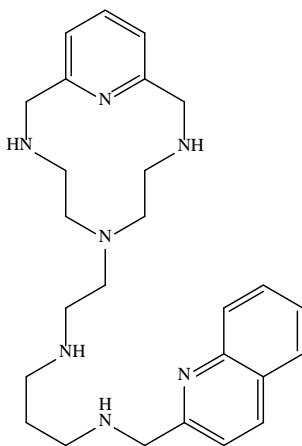


Figura 5.13. Esquema de **LI-2Q**.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ_H 8.41 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 9 Hz, 1H), 7.82 (t, J = 8, 1H), 7.77 (t, J = 8, 1H), 7.59 (t, J = 8, 1H), 7.50 (d, J = 8, 1H), 7.32 (d, J = 8 Hz, 2H), 4.52 (s, 2H), 4.49 (s, 4H), 3.16 (m, 10H), 2.93 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.78 (m, 4H), 2.12 (m, 2H). ¹³C RMN (D₂O, 75.43 MHz): δ_C 149.13, 148.85, 143.36, 142.84, 139.76, 133.39, 129.14, 128.71, 128.33, 124.41, 122.16, 121.03, 66.55, 50.86, 50.43, 49.66, 49.49, 45.87, 44.95, 43.55, 22.75. Anal. Calc. para C₂₆H₃₇N₇·5HCl: C, 49.7; H, 6.7; N, 15.6. Exp.: C, 51.3; H, 7.5; N, 15.3.

5.3.6. Síntesis del **LI-Acr**

La síntesis del **LI-Acr**, 6-[7-(9-acridina)-3,7-diazaheptil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano, formó parte del proyecto de fin de carrera de Iván Rodríguez Carrión [262], realizado en la Universidad de Valencia bajo la supervisión del autor de esta tesis doctoral. Al no disponerse del aldehído de la acridina se optó por utilizar como reactivo la 9-cloroacridina, la cual se hizo reaccionar con el **LI** tosilado siguiendo la segunda estrategia discutida en la sección 5.1.6. Por este motivo el compuesto presenta una diferencia estructural respecto a sus análogos antes descritos: el nitrógeno de la cadena lateral está directamente unido al grupo funcional. Es, por tanto, un nitrógeno exocíclico.

La amina tosilada **LITs** (1.79 g, 2.34 mmol) se hizo reaccionar con la 9-cloroacridina (0.23 g, 2.34 mmol) en presencia de trietilamina (0.23 g, 2.27 mmol) como base, utilizando diclorometano como disolvente. La reacción se siguió durante 24 horas mediante cromatografía de capa fina (eluyente CH_2Cl_2 /metanol 10:1). Una vez completada la reacción se eliminó el disolvente a vacío y el producto obtenido, en forma de aceite, se purificó por cromatografía de columna (alúmina neutra, CH_2Cl_2 /metanol 200:1, hasta metanol/ NH_3). La reacción se repitió en dos ocasiones para acumular producto. El ligando obtenido **LITs-Acr** (3.5g, 4.55 mmol) se detosiló utilizando ácido bromhídrico en ácido acético (175 mL) y fenol (16.34 g, 173 mmol) a reflujo durante 24 horas. El producto se filtró, se lavó con CH_2Cl_2 y se secó (rendimiento global del 40%).

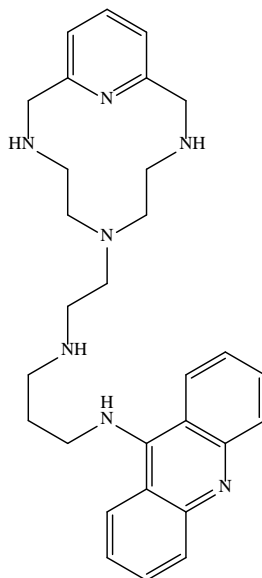


Figura 5.14. Esquema de LI-Acr.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ_H 8.03 (d, J = 9Hz, 2H), 7.89 (t, J = 8 Hz, 1H), 7.78 (t, J = 8 Hz, 2H), 7.39 (m, 6H), 4.56 (s, 4H), 3.98 (t, J = 7 Hz, 2H), 3.21 (m, 8H), 3.00 (t, J = 8 Hz, 2H), 2.85 (t, J = 5Hz, 4H), 2.24 (m, 2H). ¹³C RMN (D₂O, 75.43 MHz): δ_C 157.26, 148.83, 139.79, 135.32, 124.05, 122.21, 118.23, 111.82, 50.82, 50.46, 49.49, 45.90, 45.62, 45.40, 43.54, 25.97. Anal. Calc. para C₂₉H₃₇N₇·4HCl: C, 43.2; H, 5.1; N, 12.1. Exp.: C, 44.4; H, 5.5; N, 12.3.

5.4. Síntesis de los ligandos politópicos

En esta sección se detalla la síntesis de aquellos ligandos capaces de generar complejos polimetálicos, ya sea por la presencia de varios macrociclos poliamínicos o por la funcionalización de uno de estos mediante ligandos capaces de actuar como sitios de unión diferenciados.

5.4.1. Síntesis del TPA-L₃

Este compuesto, tris[4-(6-(2-aminoetil)-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclo-decafano]fenilamina se preparó haciendo reaccionar la tris(4-formifenil)amina con tres equivalentes de la amina libre **L**, dando lugar a una imina. Ésta se redujo *in situ* con NaBH₄ para dar lugar a la amina libre, la cual se precipitó con HCl para obtener la sal de clorhidrato.

En detalle, la amina libre de **L** (0.70 g, 2.8 mmol) se disolvió en etanol seco (50 mL), y se añadió gota a gota una disolución de tris(4-formifenil)amina (0.31 g, 0.93 mmol) en 100 mL de etanol seco. La mezcla se mantuvo con agitación vigorosa por 2 horas. Se añadió NaBH₄ (1.1 g, 28 mmol) y la disolución resultante se agitó por una hora más a temperatura ambiente. El disolvente se eliminó a vacío y el sólido obtenido se trató con H₂O y se extrajo con CH₂Cl₂ (3 x 30 mL). La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se eliminó el disolvente en un rotavapor para obtener el producto en forma de amina libre. Ésta se disolvió en CH₂Cl₂ seco y se precipitó con HCl 4.0 M en dioxano para obtener la sal de clorhidrato (1.0 g, rendimiento del 22%).

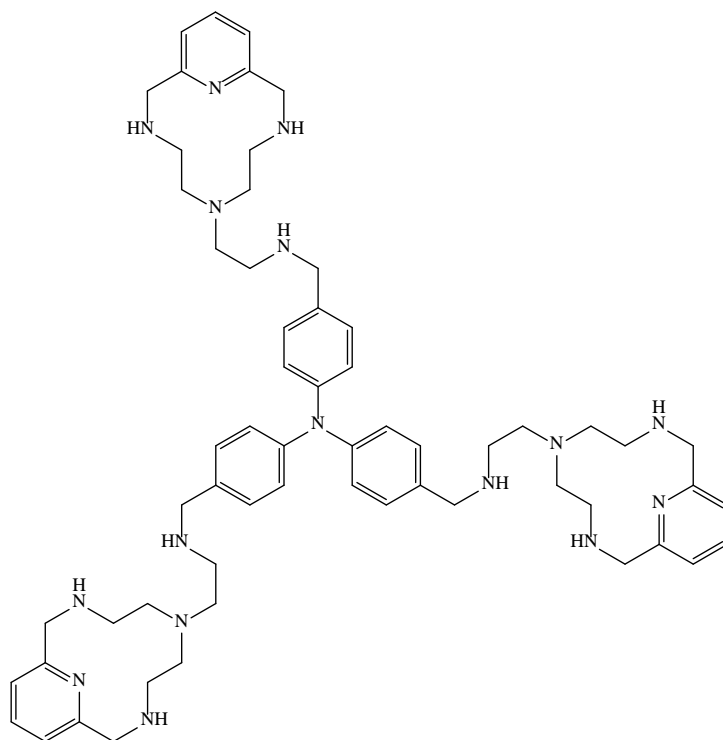


Figura 5.15. Esquema de TPA-L₃.

¹H RMN (D₂O, 300 MHz): δ_H 7.98 (t, J = 8 Hz, 3H), 7.46 (m, 12H), 7.22 (d, J = 9 Hz, 6H), 4.66 (s, 12H), 4.28 (s, 6H), 3.39 (m, 6H), 3.30 (m, 12H), 3.12 (m, 6H), 2.96 (t, J = 5 Hz, 12H). ¹³C RMN (D₂O, 75.43 MHz): δ_C 149.49, 148.76, 140.41, 131.94, 126.07, 125.21, 122.81, 51.73, 51.51, 51.12, 50.11, 46.54, 43.29. Anal. Calc. para C₆₀H₈₄N₁₆·10HCl·9H₂O·0.5C₄H₈O₂: C, 46.5; H, 7.3; N, 14.0. Exp.: C, 46.8; H, 7.4; N, 13.8.

5.4.2. Síntesis del L-O

Este compuesto, 6-[4-(2-fenil-5-piridil-[1,3,4]oxadiazol)-3-azabutil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano, se preparó en colaboración con el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Urbino, quienes se encargaron de funcionalizar la amina L previamente sintetizada en nuestro laboratorio.

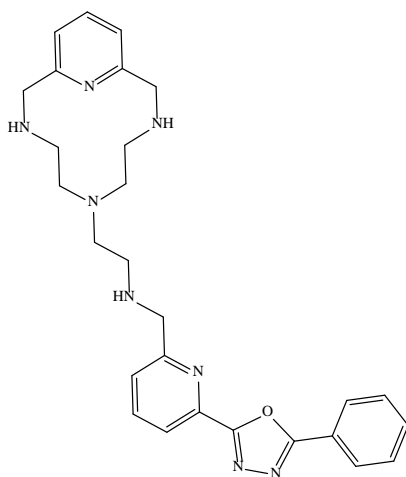


Figura 5.16. Esquema de L-O.

^1H RMN (D_2O , 400 MHz): δ_{H} 8.20 (d, $J = 8$ Hz, 1H), 8.10 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 8.09 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.91 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.62 (m, 4H), 7.40 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.58 (s, 4H), 4.55 (s, 2H), 3.43 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 3.24 (m, 4H), 3.14 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J = 5$ Hz, 4H). ^{13}C RMN (D_2O , 75.43 MHz): δ_{C} 148.96, 139.82, 129.49, 127.14, 122.20, 50.77, 50.45, 49.57, 45.84, 43.15. Anal. Calc. para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{N}_8\text{O} \cdot 3\text{HClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot 1/2\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$: C, 40.7, ; H, 4.9; N, 13.5. Exp.: C, 40.7; H, 4.7; N, 13.2.

6.

**Estudios de protonación
e interacción con metales
de transición**

6.1. Propiedades ácido-base

Los ligandos sintetizados y estudiados en esta tesis doctoral pertenecen al grupo de las poliaminas y tienen, por tanto, varios átomos de nitrógeno con pares de electrones no compartidos, susceptibles de ser protonados. Dado que muchas de las propiedades de estos ligandos a la hora de interactuar con otros sustratos dependen del número de cargas positivas y del número de átomos dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno o, lo que es lo mismo, del grado de protonación de los ligandos, es necesario conocer cuál es la distribución de las diferentes especies protonadas en el intervalo de pH de trabajo. Esto se ha conseguido mediante el cálculo de las constantes de protonación a partir de medidas potenciométricas. En algunos casos, estos estudios se han complementado con valoraciones espectroscópicas.

6.1.1. Ligandos derivados de la poliamina **L**

En la figura 6.1 se muestran los compuestos preparados a partir de la funcionalización de la poliamina macrocíclica **L** (ver capítulos 3, “Nomenclatura” y 5, “Síntesis”) con unidades aromáticas de antraceno, pireno y 2-hidroxifenilo. Y, en la tabla 6.1, se recogen los valores de las constantes de protonación obtenidas para estos compuestos incluyendo, para su comparación, las del precursor **L** (publicadas en trabajos anteriores de este grupo de investigación [198]).

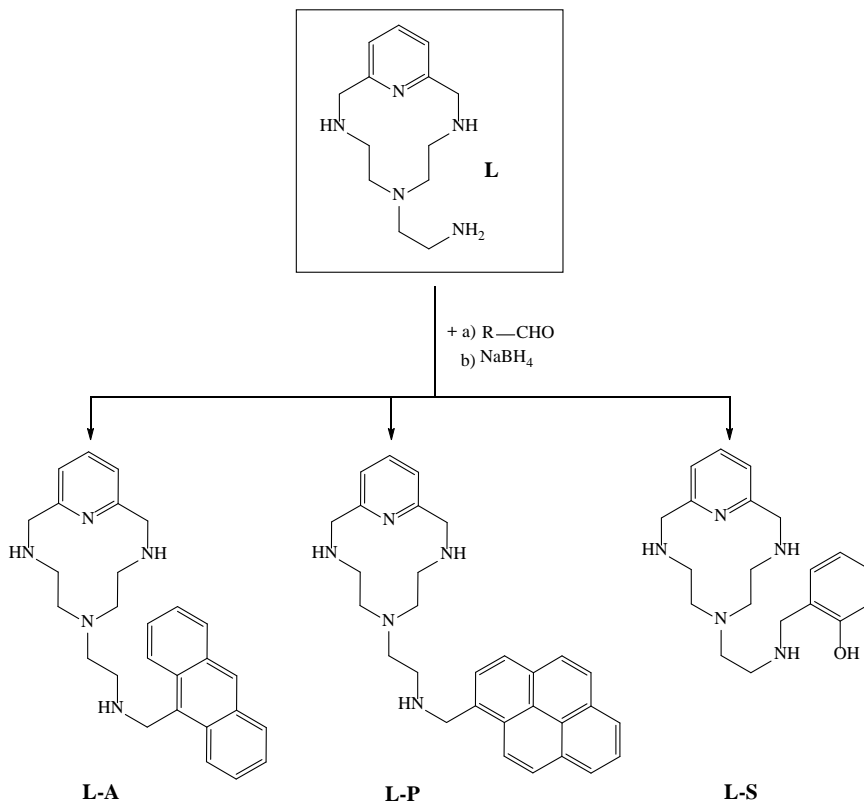


Figura 6.1. Compuestos sintetizados a partir de la poliamina **L**.

En todos los casos las constantes sucesivas disminuyen en cada paso, como cabría esperar, debido al aumento de las repulsiones electrostáticas. Se puede observar que, a pesar de que cada compuesto tiene cinco átomos de nitrógeno, sólo se han detectado tres o cuatro equilibrios de protonación en el intervalo de pH estudiado ($2.5 < \text{pH} < 11.0$). Estos equilibrios corresponden a la protonación de las aminas secundarias (y también la primaria, en el caso de **L**) y del grupo fenol del **L-S**. Las otras dos protonaciones, no detectadas, involucrarían el nitrógeno de la piridina y la amina terciaria y tendrán valores muy bajos debido a las fuertes repulsiones electrostáticas que se generarían por los tres grupos amonio próximos [198]. Además, los nitrógenos terciarios en disolución acuosa son menos básicos que los primarios o secundarios [263].

Tabla 6.1. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, de los compuestos **L**, **L-A**, **L-P** y **L-S**.

Equilibrio	L ^(b)	L-A	L-P	L-S
$L + H \rightleftharpoons HL$ ^(a)	10.20(6) ^(c,d)	9.80(2)	9.16(1)	9.93(2)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.18(3)	8.66(2)	8.06(1)	9.11(1)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	7.84(4)	7.19(3)	6.30(1)	7.91(2)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	—	—	—	6.74(3)
logβ	27.32(8) ^(e)	25.65(3)	23.53(1)	33.69(3)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Valores obtenidos de la referencia [198]. ^(c)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar (excepto en el caso de **L**, que se utilizó NaClO₄ 0.15 M). ^(d)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa. ^(e)La basicidad global β se define como $\beta = \sum_i K_i$.

Las constantes sucesivas y globales de los dos compuestos con sustituyentes aromáticos policíclicos, **L-A** y **L-P**, son menores a las del precursor **L**. La tendencia sería $L > L-A > L-P$. Existen dos razones fundamentales que permiten explicar este hecho: en primer lugar, la presencia de un grupo amino primario en **L**, más básico que los demás debido a una mayor energía de hidratación, hace que la primera constante de protonación de este compuesto sea más elevada. En segundo lugar, la mayor hidrofobicidad de los compuestos con sustituyentes poliaromáticos dificulta la solvatación de los grupos amonio [263, 264]. Este efecto es más acusado en el compuesto que contiene pireno ya que, como es evidente, la solubilidad en agua de los hidrocarburos aromáticos policíclicos disminuye al aumentar su peso molecular. El caso del **L-S** es particular, ya que tiene una constante de protonación extra asociada al equilibrio fenolato/fenol. Por este motivo la constante de basicidad global es mayor que la del resto de compuestos discutidos aquí.

Estas constantes de protonación nos permiten calcular los diagramas de distribución de las distintas especies en disolución, los cuales se muestran a continuación en la figura 6.2.

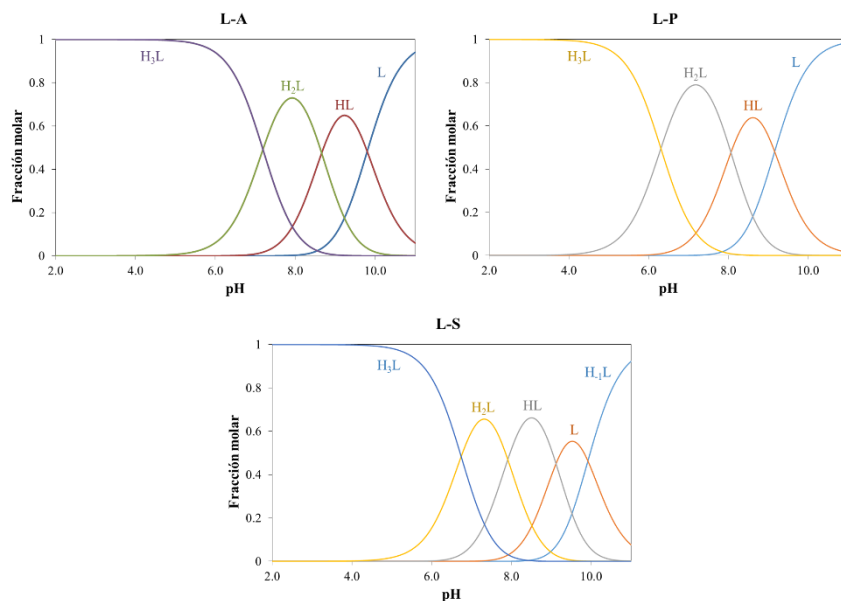


Figura 6.2. Diagramas de distribución de los ligandos de tipo escorpiando derivados de **L**, calculados a partir de las constantes de protonación. Las cargas se han omitido.

Los valores de las constantes de protonación descritas nos ofrecen información importante sobre el comportamiento ácido-base de los compuestos. Sin embargo, estas constantes son un dato macroscópico que no aporta información acerca de cada átomo protonable de forma individual. Para tener una idea más clara de la secuencia que siguen estas reacciones de protonación es necesario, por tanto, recolectar evidencias mediante otras técnicas. Es importante aclarar que una secuencia de protonación solamente refleja la situación más probable ya que, al tratarse de equilibrios, no podemos asignar unívocamente un protón a un único átomo dador.

Registrando la emisión de la fluorescencia en el transcurso de una valoración ácido-base podemos obtener valiosa información acerca de la protonación de los compuestos. Podemos determinar, por ejemplo, el intervalo de pH en el que tiene lugar la protonación del grupo amino secundario contiguo al grupo fluoróforo. Esto es posible ya que, como se ha explicado en la introducción (apartado 1.2.6), la presencia de un átomo

dador con un par de electrones disponibles (en nuestro caso, un grupo amino secundario) en las proximidades del grupo fluoróforo, puede dar lugar a un fenómeno de transferencia electrónica fotoinducida (PET). Al protonarse la amina, el par de electrones deja de estar disponible y este fenómeno PET se verá interrumpido, lo que se traducirá en un aumento de la fluorescencia.

Valiéndonos de la fluorescencia intrínseca del compuesto que contiene antraceno, **L-A**, se hicieron medidas de la emisión de fluorescencia a intervalos de 0.5 ± 0.1 unidades de pH, abarcando el intervalo de pH de 2.0 a 11.0. Los resultados de estas medidas se representan en la figura 6.3 (triángulos rojos), superpuestos a los correspondientes diagramas de distribución de cada compuesto (líneas sólidas).

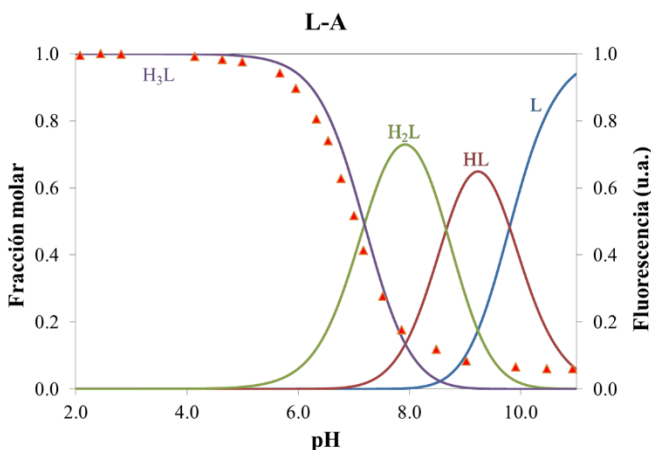


Figura 6.3. Variación del máximo de emisión de la fluorescencia en función del pH (triángulos rojos, eje secundario) y diagrama de distribución del ligando **L-A** (líneas sólidas, eje principal).

Como se puede observar, el aumento de la fluorescencia se corresponde, con bastante precisión, con el momento en el que tiene lugar la última protonación. Las pequeñas diferencias se pueden explicar por los errores intrínsecos al experimento (por ejemplo en la medida del pH, así

como por fluctuaciones en la intensidad de la lámpara). De estos resultados se puede deducir, por tanto, que la protonación de la amina secundaria de la cadena lateral tiene lugar, mayoritariamente, en el último paso.

Con este dato podemos ya proponer una secuencia de protonación para los compuestos **L-A** y **L-P**, que contienen sólo un átomo dador en la cadena lateral. Si la última protonación tiene lugar preferentemente en esta amina secundaria, como indican los datos de emisión de fluorescencia, las dos primeras protonaciones tendrán lugar mayoritariamente en las aminas secundarias del macrociclo, las cuales son indistinguibles (figura 6.4).

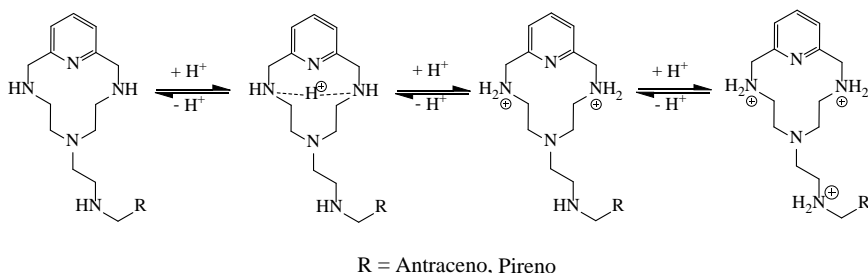


Figura 6.4. Secuencia de protonación propuesta para los ligandos **L-A** y **L-P**.

Como se ha comentado antes, el compuesto **L-S** tiene una constante de protonación adicional, respecto a los otros derivados de **L**, que está asociada al equilibrio fenolato/fenol (ver tabla 6.1). Para determinar el valor de esta constante se ha seguido la absorbancia del compuesto a diferentes valores de pH. Como se puede apreciar en la figura 6.5, la banda de absorción a 292 nm, asociada al fenolato, aumenta a pH básico.

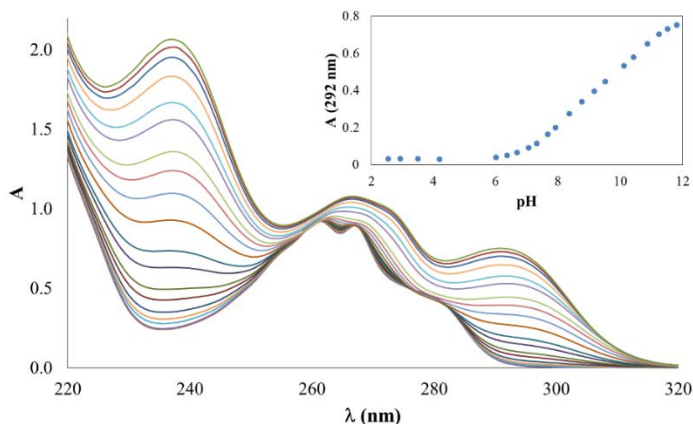


Figura 6.5. Variación de la absorbancia de **L-S** durante una valoración ácido-base. En el recuadro se representa la variación de la banda a 292 nm frente al pH.

Utilizando estos datos y mediante el programa de ajuste de mínimos cuadrados no lineal HypSpec [208] se ha obtenido un valor para el logaritmo la constante del equilibrio fenol/fenolato de 9.1. Este valor coincide con el de la segunda constante sucesiva de protonación calculada a partir de los datos potenciométricos. El hecho de que el valor calculado sea menor que el valor del pK_a del fenol ($pK_a = 10.0$) se explica por la presencia de una carga positiva en el macrociclo, y es coherente con otros ejemplos encontrados en la literatura para compuestos similares [265]. Sin embargo, como se observa en el recuadro de la figura 6.5, este equilibrio fenol/fenolato se extiende desde pH 7 a 12.

Analizando los espectros de RMN 1H a diferentes valores de pH podemos obtener más información acerca de estos equilibrios. Como se aprecia en la figura 6.6, al pasar de pH 11.7 a 9.2, lo que se corresponde con la primera protonación del ligando, se observa un desplazamiento a campo bajo en las señales tanto del macrociclo como del grupo fenolato. Concretamente, las señales **1**, **2** y **3** del macrociclo son las más afectadas, con desplazamientos de 0.33, 0.34 y 0.40 ppm respectivamente. Sin embargo, también la señal **6** de la cadena lateral se desplaza a campo bajo 0.37 ppm y las señales **f2** y **f3** lo hacen 0.10 y 0.17 ppm.

Al disminuir a pH 8.3 tiene lugar la segunda protonación, y nuevamente las señales **1** y **3** del macrociclo son las más afectadas, con un cambio de 0.15 ppm, seguidas de la señal **f3** con 0.07 ppm. La tercera protonación afecta principalmente a la señal **2** (0.22 ppm) y la cuarta y última protonación provoca un fuerte desplazamiento de las señales **5** y **6** de la cadena lateral (0.22 y 0.17 ppm, respectivamente) y **f1** (0.28 ppm).

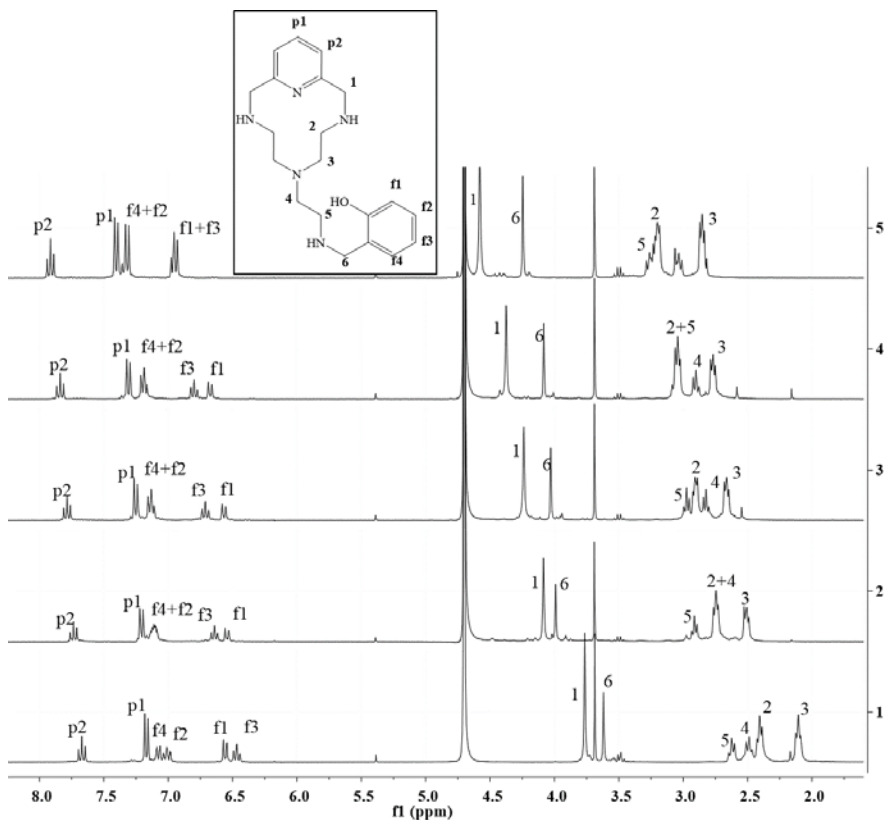


Figura 6.6. Espectros de RMN ¹H en D₂O para L-S registrados en: (1) pD= 11.72 (2) pD= 9.23, (3) pD= 8.30, (4) pD= 7,53 (5) pD= 2.31.

Teniendo en cuenta estos datos y habiendo calculado el valor de la constante para el equilibrio fenol/fenolato, podemos sugerir la secuencia de protonación para el compuesto **L-S** que se muestra en la figura 6.7. Es interesante resaltar dos aspectos, el primero es que a valores de pH en torno a 9 predomina la especie zwitteriónica, no pudiéndose tener en disolución acuosa una especie neutra, lo que explica los problemas asociados a la extracción del compuesto y el bajo rendimiento obtenido en su síntesis (ver capítulo 5, “Síntesis”). El segundo aspecto interesante es que la presencia de la carga negativa del fenolato aumenta la basicidad de las aminas próximas, lo que explica que el valor de la primera constante de protonación de **L-S** sea mayor que en los otros derivados de **L**.

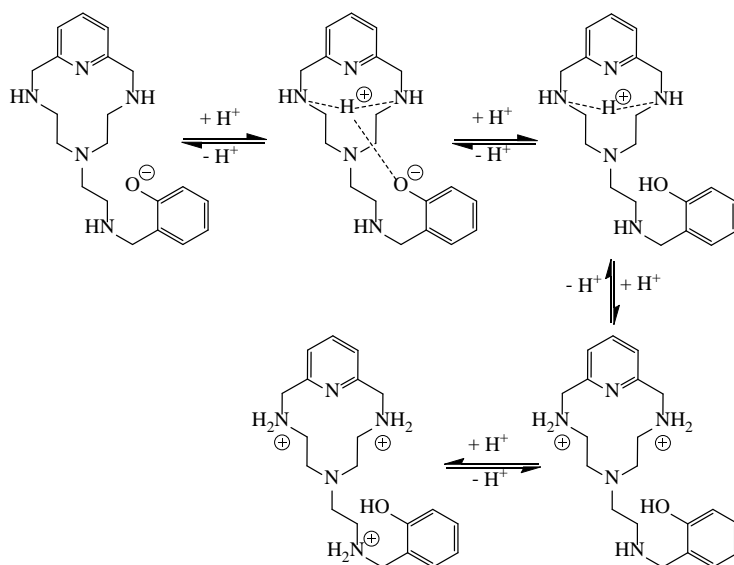


Figura 6.7. Secuencia de protonación propuesta para **L-S**.

6.1.2. Ligandos derivados de la poliamina **L**

Al alargar la cadena lateral del **L** con un grupo propilamina se obtiene el segundo precursor, **LI**, que ha servido de punto de partida para la preparación de otra familia de compuestos de tipo escorpiando, representados en la figura 6.8, que contienen un átomo dador adicional en la cadena lateral, que es ahora más larga y flexible.

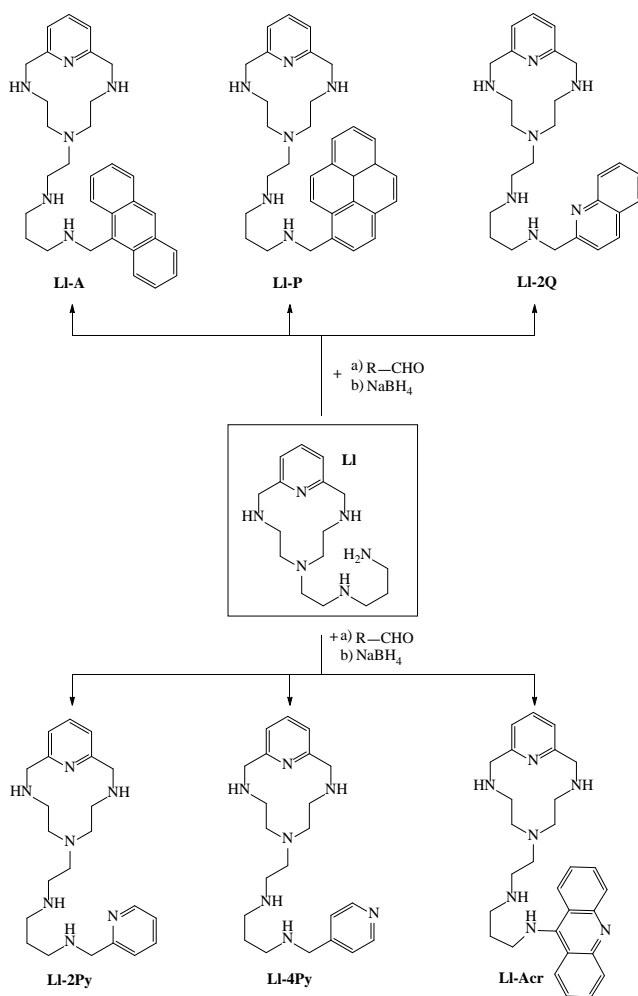


Figura 6.8. Poliaminas de tipo escorpiando sintetizadas a partir de **LI**.

Para facilitar la discusión, las constantes de protonación obtenidas se presentan en dos tablas diferentes. La primera de ellas (tabla 6.2) contiene las constantes referidas al compuesto de partida, **LI** [266], y a los dos derivados obtenidos de la funcionalización de éste con los hidrocarburos aromáticos policíclicos, antraceno y pireno: **LI-A** y **LI-P**.

Tabla 6.2. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, de los compuestos **LI**, **LI-A** y **LI-P**.

Equilibrio	LI ^(b)	LI-A	LI-P
$L + H \rightleftharpoons HL$ ^(a)	10.13(1) ^(c,d)	10.09(1)	9.43(2)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.40(1)	9.31(1)	9.18(2)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	8.27(1)	8.03(3)	7.88(3)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	7.02(1)	7.01(4)	6.92(3)
logβ	34.84(1) ^(e)	34.44(1)	33.41(3)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Valores obtenidos de la referencia [266]. ^(c)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar (excepto en el caso de **LI**, que se utilizó NaClO₄ 0.15 M). ^(d)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa. ^(e)La basicidad global β se define como $\beta = \sum_i K_i$.

Las constantes globales de basicidad son, como cabría esperar, mayores que las de sus análogos de cadena lateral corta, ya que ahora tenemos un átomo dador adicional y, por tanto un equilibrio de protonación extra. Se observa la misma tendencia de disminuir la basicidad global al aumentar la hidrofobicidad de los compuestos. Sin embargo, la diferencia entre la basicidad de los dos compuestos con antraceno y pireno es menor, probablemente debido a que los sustituyentes aromáticos influyen menos en la solvatación de los grupos amonio, al ser la cadena lateral más larga y encontrarse más alejados unos de otros.

A continuación, en la tabla 6.3, se presentan los resultados de los estudios del comportamiento ácido-base de los derivados del **LI** que contienen heterociclos aromáticos como sustituyentes. En concreto, los grupos elegidos para la funcionalización han sido: 2-piridina, 4-piridina, 2-quinolina y 9-acridina. El par de electrones libre de los nitrógenos presentes en estos grupos no forma parte del sistema π aromático y son, por tanto susceptibles de protonación. Sin embargo, como ya se comentó al referirnos a la piridina que forma parte del macrociclo, su basicidad puede ser bastante menor que la de las aminas secundarias por lo que, en

algunos casos, no se ha podido determinar el valor de la constante mediante medidas potenciométricas [267].

Tabla 6.3. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, de los compuestos **LI-2Py**, **LI-4Py**, **LI-2Q** y **LI-Acr**.

Equilibrio	LI-2Py	LI-4Py	LI-2Q	LI-Acr
$L + H \rightleftharpoons HL^{(a)}$	9.49(1) ^(b,c)	10.16(1)	9.71(2)	9.64(3)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	8.91(1)	9.17(1)	9.03(1)	9.49(3)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	7.85(1)	8.12(1)	7.90(2)	8.15(3)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	6.66(2)	6.77(1)	6.80(2)	7.22(3)
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	—	3.72(1)	2.24(8)	—
logβ	32.92(2) ^(d)	37.95(1)	35.68(1)	34.50(2)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa. ^(d)La basicidad global β se define como $\beta = \sum_i K_i$.

En el caso de los compuestos funcionalizados con piridina podemos observar que fue posible calcular una quinta constante de protonación únicamente para el ligando con la piridina sustituida en la posición 4, y no para el compuesto con la piridina en la posición 2. Esta última protonación involucraría probablemente al nitrógeno de la piridina terminal. En el compuesto **LI-2Py**, la posición del nitrógeno posiblemente permita que se establezca un enlace de hidrógeno con uno de los grupos amonio de la cadena lateral. Si éste fuera el caso, la protonación del nitrógeno de la piridina conllevaría la rotura de este enlace, lo que probablemente explique la baja basicidad de este compuesto en comparación al **LI-4Py** [268]. Lo mismo ocurre para el compuesto **LI-2Q**, sin embargo en este caso sí se pudo determinar la cuarta constante de protonación. Como se puede observar en la tabla 6.3, esta constante es 1.5 órdenes de magnitud menor que la de la piridina sustituida en la posición 4 del compuesto **LI-4Py**.

En la figura 6.9 se representan los diagramas de distribución de especies para estos compuestos, calculados a partir de las constantes de basicidad globales obtenidas.

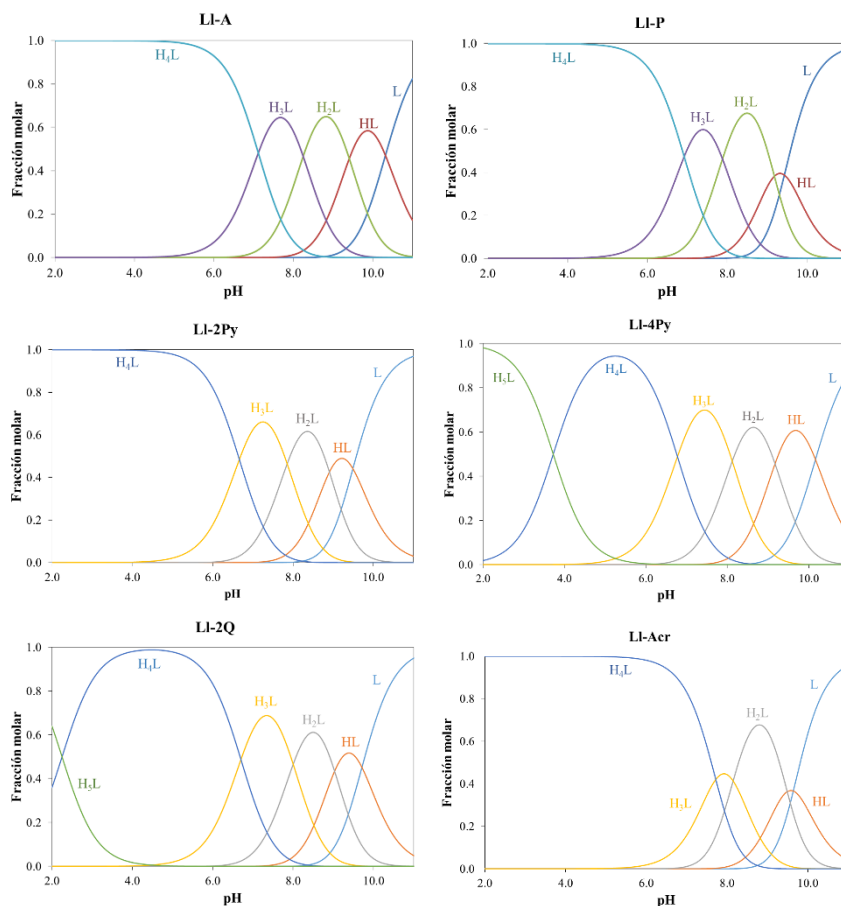


Figura 6.9. Diagramas de distribución de los ligandos de tipo escorpiando derivados de **LI**, calculados a partir de las constantes de protonación. Las cargas se han omitido.

Para tener información cuantitativa sobre el grado de protonación a un determinado pH es posible calcular el grado medio de protonación. Los resultados obtenidos para $\text{pH} = 7.4$ se representan en la figura 6.10. En el caso de los derivados de **L**, a este valor de pH, el grado medio de protonación está en torno a 2.0, siendo la especie predominante el catión $[H_2L]^{2+}$. Para los derivados de **LI**, con un grado medio de protonación alrededor de 3.0, la especie predominante a pH 7.4 es $[H_3L]^{3+}$ (salvo en el

caso de **LI-Acr**, en el que la especie predominante a ese pH es $[H_4L]^{4+}$ debido a la presencia del grupo acridinio).

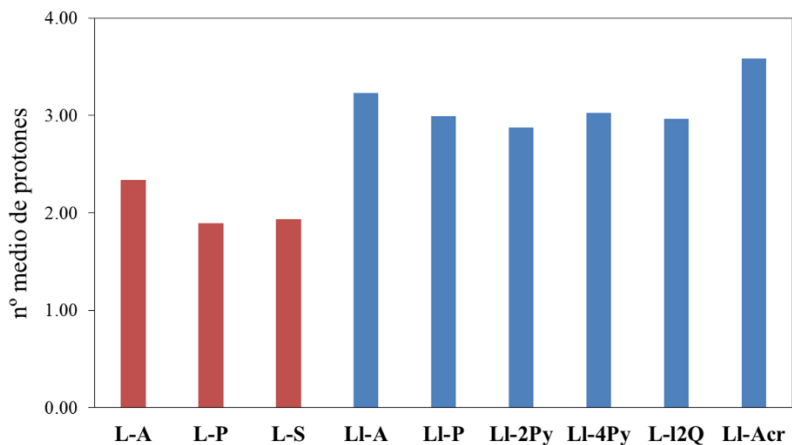


Figura 6.10. Diagrama de barras representando el grado medio de protonación, a pH 7.4, de los derivados de **L** (barras rojas) y **LI** (barras azules).

Ya que el compuesto **LI-Acr** posee un único nitrógeno protonable en la cadena lateral (la amina contigua al grupo fluoróforo es exocíclica, a diferencia de los otros derivados de **LI**, y tendrá un valor de pK_a bajo) fue posible deducir la secuencia de protonación mediante estudios espectroscópicos. Al seguir la emisión de la fluorescencia a diferentes valores de pH se observó una fuerte disminución de la fluorescencia que se corresponde con la aparición de la especie monoprotonada (Figura 6.11).

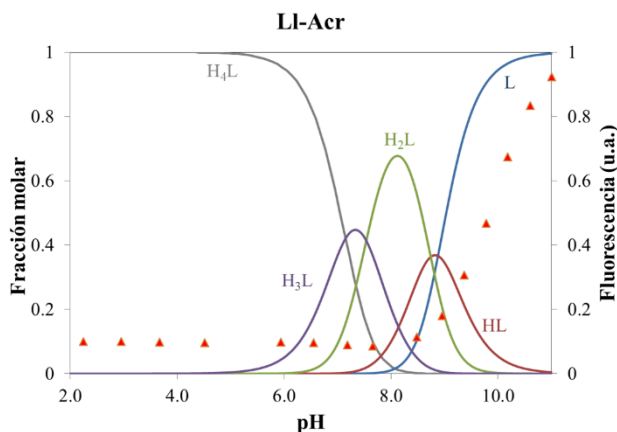


Figura 6.11. Variación del máximo de emisión de la fluorescencia en función del pH (triángulos rojos, eje secundario) y diagrama de distribución de **LI-Acr** (líneas sólidas, eje principal).

Esta disminución de la fluorescencia no está relacionada con un efecto PET, como se observó en el caso de **L-A**, sino que está asociada a la protonación de la acridina. Esto puede parecer sorprendente en un primer momento, ya que la acridina es una base relativamente débil ($pK_a = 5.60$). Sin embargo hay que considerar que la presencia de un grupo amino en la posición 9 de la acridina aumenta drásticamente su basicidad, debido a lo que se conoce como “efecto de resonancia iónica adicional”, que no es más que la generación de nuevas formas de resonancia en el ión. Por ejemplo en el caso de la 9-aminoacridina esta estabilización tiene lugar a través de las estructuras canónicas representadas en la figura 6.12, y este efecto provoca un aumento en la basicidad hasta un $pK_a = 9.99$ [269].

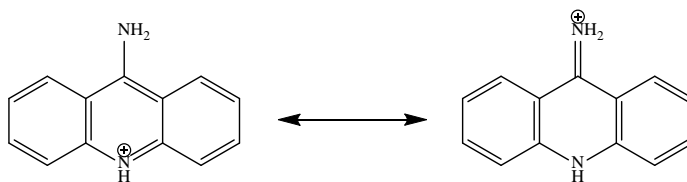


Figura 6.12. Estructuras canónicas del ión 9-aminoacridinio.

Tomando en cuenta este hecho y suponiendo que las siguientes protonaciones siguen el orden ya descrito para los derivados de **L**, la secuencia de protonación propuesta para este compuesto sería la representada en la figura 6.13.

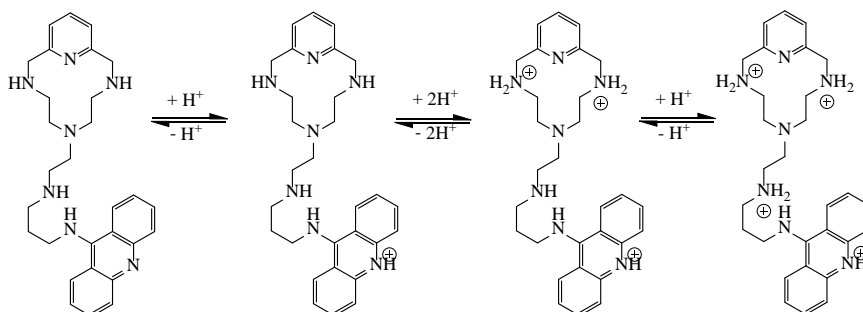


Figura 6.13. Secuencia de protonación propuesta para **LI-Acr**.

6.1.3. Ligandos politópicos

Por ligandos politópicos nos referimos a aquellos que presentan elementos estructurales que permiten coordinar a más de un catión metálico. En la presente tesis doctoral se han estudiado dos ejemplos de este tipo de compuestos (figura 6.14), ambos derivados del precursor **L**. El primero de ellos, sintetizado en colaboración con el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Urbino, no difiere en gran medida de los ligandos discutidos antes y los valores de las constantes de protonación (tabla 6.4) son, por tanto similares a los discutidos en la tabla 6.1, con tres constantes sucesivas correspondientes a los tres nitrógenos secundarios de la estructura. Las constantes de protonación del grupo 2-fenil-5-piridil-[1,3,4]oxadiazol así como del grupo amino terciario y del nitrógeno de la piridina del macrociclo no han podido ser determinadas por estar fuera del intervalo de trabajo de la técnica utilizada ($\text{pH} < 2.0$).

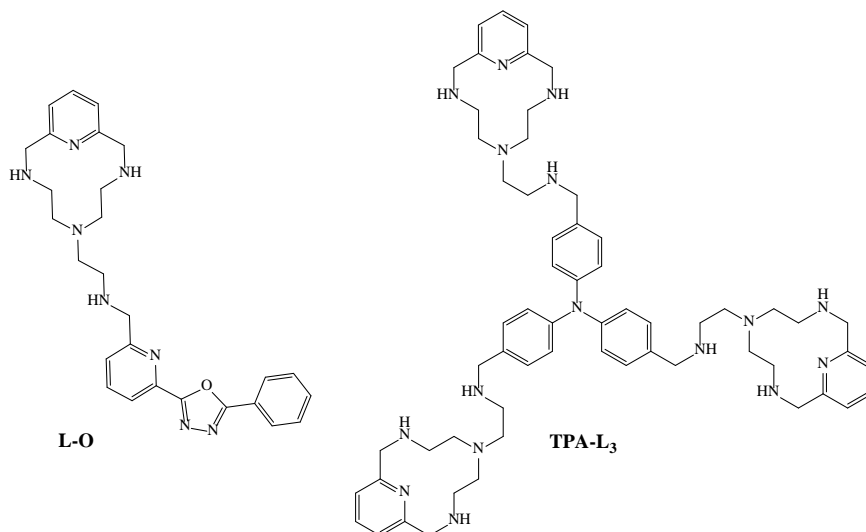


Figura 6.14. Esquema de los ligandos politópicos estudiados.

Tabla 6.4. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, del compuesto **L-O**.

Equilibrio	L-O
$L + H \rightleftharpoons HL^{(a)}$	9.84(1) ^(b,c)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	8.60(1)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	6.74(1)
logβ	25.18(1) ^(d)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaClO₄ 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa. ^(d)La basicidad global β se define como $\beta = \sum_i K_i$.

El segundo ligando politópico, **TPA-L₃**, consiste en tres macrociclos de **L** unidos simétricamente en las posiciones *para* de un grupo trifenilamina (TPA) y tiene, por tanto nueve aminas secundarias susceptibles de protonarse, además del grupo trifenilamina. Estas diez constantes de protonación han podido ser determinadas y sus valores se

muestran en la tabla 6.5. Las dos primeras constantes se detectan simultáneamente y a continuación se registran el resto de constantes de manera sucesiva y con valores decrecientes, como cabría esperar por el aumento de las repulsiones electrostáticas.

Tabla 6.5. Constantes de protonación, en unidades logarítmicas, del compuesto **TPA-L₃**.

Equilibrio	TPA-L₃
$L + 2H \rightleftharpoons H_2L^{(a)}$	19.17(1) ^(b,c)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	9.09(1)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	8.88(2)
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	8.61(2)
$H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$	8.08(2)
$H_6L + H \rightleftharpoons H_7L$	7.79(2)
$H_7L + H \rightleftharpoons H_8L$	7.33(2)
$H_8L + H \rightleftharpoons H_9L$	7.00(2)
$H_9L + H \rightleftharpoons H_{10}L$	5.97(2)
logβ	81.92(2) ^(d)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa. ^(d)La basicidad global β se define como $\beta = \sum_i K_i$.

Con los valores de estas constantes se ha podido predecir la distribución de las especies en función del pH del medio (figura 6.15). En el caso del ligando **L-O** la especie más abundante a pH 7.4 es claramente $[H_2L]^{2+}$, predominando en disolución con más de un 80%. Por el contrario, en el caso de **TPA-L₃** encontramos en disolución las diez especies diferentes en un intervalo de sólo cuatro unidades de pH, no habiendo ninguna que predomine claramente a pH 7.4.

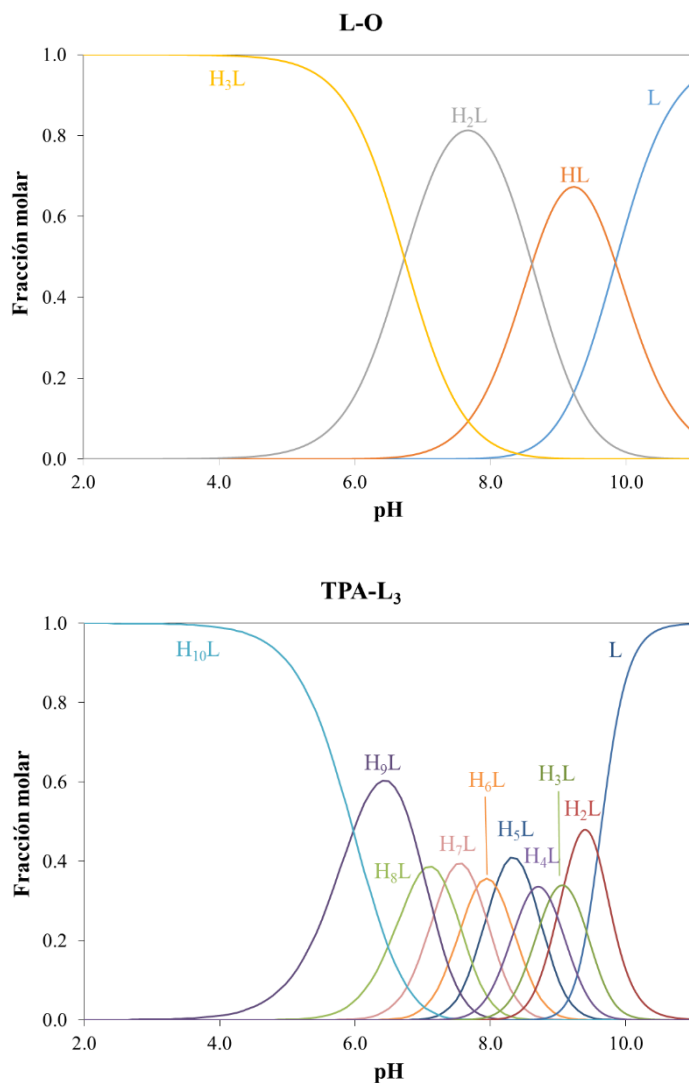


Figura 6.15. Diagramas de distribución de los ligandos **L-O** y **TPA-L₃**, calculados a partir de las constantes de protonación. Las cargas se han omitido.

6.2 Interacción con metales de transición

En esta sección discutiremos los resultados obtenidos para la especiación de los ligandos sintetizados con diferentes metales de transición obtenidos mediante medidas potenciométricas. Para facilitar la discusión y en coherencia con el capítulo anterior se dividirá la sección en cuatro apartados. Los dos primeros corresponderán a los derivados de **L** y de **LI**. Debido a su relevancia biológica y en relación a los objetivos de esta tesis, los estudios se han centrado en dos metales: Cu^{2+} y Mn^{2+} . Sin embargo, en algunos casos también se han estudiado otros elementos de la primera serie de transición, como Zn^{2+} y Fe^{2+} . Estos casos particulares se discutirán en el tercer apartado. Finalmente, en la cuarta sección, se presentarán los resultados obtenidos para la interacción de los ligandos politópicos con diferentes metales de transición.

6.2.1. Ligandos derivados de la poliamina **L**

Para los estudios de especiación con metales se han elegido dos de los derivados de la poliamina **L**, **L-A** y **L-S**. El ligando **L-P** se descartó de estos estudios debido a la escasa solubilidad de sus complejos metálicos, que hace imposible su estudio a las concentraciones requeridas para las medidas potenciométricas. El compuesto **L-A** es un ligando potencialmente pentadentado, teniendo en cuenta que el nitrógeno de la cadena lateral puede participar en la coordinación del catión metálico. El compuesto **L-S** es potencialmente hexadentado ya que el oxígeno del grupo fenol podría también coordinar al metal. Como veremos a continuación, la presencia de este átomo dador, distinto al nitrógeno, tiene un efecto importante en la estabilidad de los complejos formados.

Estudios de especiación con Cu²⁺

En la tabla 6.6 se muestran los valores de las constantes de afinidad calculadas para los derivados de **L**, así como los valores del precursor para su comparación (obtenidos de a referencia [198]).

Tabla 6.6. Constantes de complejación de Cu²⁺ para **L**, **L-A** y **L-S** en unidades logarítmicas.

Equilibrio	L ^(b)	L-A	L-S
$L + Cu \rightleftharpoons CuL^{(a)}$	20.43(3) ^(c,d)	18.48(1)	21.84(5)
$CuL + H \rightleftharpoons CuHL$	3.85(3)	3.94(1)	5.60(2)
$CuHL + H \rightleftharpoons CuH_2L$	—	—	3.49(4)
$CuL \rightleftharpoons CuL(OH)$	-11.01(3)	-11.34(4)	—

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Valores tomados de la referencia [198]. ^(c)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar (excepto en el caso de **L**, en el que se usó NaClO₄). ^(d)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Los complejos de cobre formados son muy estables en todos los casos, detectándose la formación de especies mononucleares a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado, con grados de protonación 0 y 1 para **L-A** y 0, 1 y 2 para **L-S**. El complejo [Cu(**L-S**)]²⁺ es especialmente estable, con una constante tres órdenes de magnitud mayor que las del resto de ligandos, lo que indica que el oxígeno del fenolato participa en la coordinación del cobre.

Como puede apreciarse en los diagramas de distribución (figura 6.16), las especies de cobre se forman desde pH 2, y a partir de pH 4 el cobre está cuantitativamente complejado. En el caso de **L-A** la especie [CuL]²⁺ predomina a partir de pH 4 y a lo largo de todo el intervalo estudiado. Para **L-S**, por debajo de pH 6 se encuentran las especies protonadas [CuH₂L]⁴⁺ y [CuHL]³⁺, mientras que a pH superior a 6 sólo se detecta la especie [CuL]²⁺.

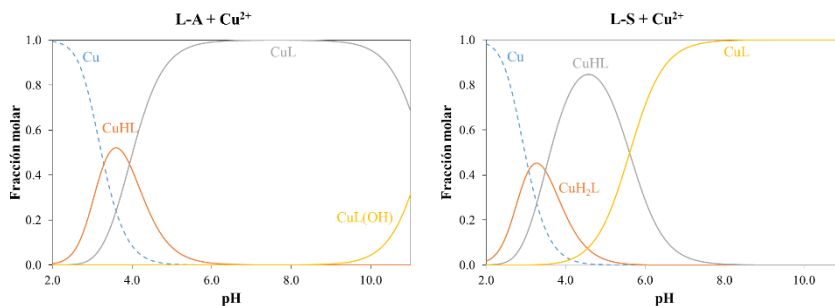


Figura 6.16. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de $\text{Cu}^{2+} - \text{L-A}$ y $\text{Cu}^{2+} - \text{L-S}$.

Mediante evaporación lenta de una disolución equimolar de **L-A** con Cu^{2+} se obtuvieron monocristales aptos para la difracción con rayos X, de composición $[\text{Cu}(\text{L-A})](\text{ClO}_4)_2$. La estructura resuelta se presenta en la figura 6.17. La unidad asimétrica consta de cuatro cationes $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ casi equivalentes y ocho aniones perclorato. En todas las unidades $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$, el Cu^{2+} está coordinado por los cuatro nitrógenos del macrociclo y por el nitrógeno de la cadena lateral, con una geometría de pirámide de base cuadrada ligeramente distorsionada ($\tau \approx 12\%$). La mayor distancia de enlace se da para el nitrógeno terciario del macrociclo. Las unidades aromáticas de piridina y antraceno están apiladas a una distancia de 3.6 Å. Comparando con la estructura del complejo de cobre del precursor **L**, $[\text{Cu}(\text{L})]^{2+}$ [198], las distancias de enlace para el nitrógeno en posición axial son menores en el caso del compuesto con antraceno ($d_{\text{Cu}(1)-\text{N}(3)} = 2.19$ y 2.12 Å para $[\text{Cu}(\text{L})]^{2+}$ y $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$, respectivamente). Parece ser que el apilamiento $\pi-\pi$ entre las dos unidades aromáticas cancela en alguna medida el efecto Jahn-Teller, evitando que la posición axial esté muy distorsionada. Los datos de la estructura cristalina de $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ se encuentran en la tabla 6.7 y en el Anexo 3.

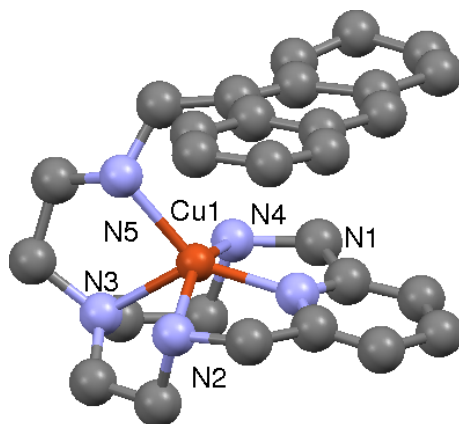


Figura 6.17. Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$. Los átomos de hidrógeno han sido omitidos.

Tabla 6.7. Distancias y ángulos de enlace seleccionados para la estructura $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$.

Distancias de enlace (Å)	
Cu(1)–N(1)	1.90(3)
Cu(1)–N(2)	2.06(2)
Cu(1)–N(3)	2.12(2)
Cu(1)–N(4)	2.01(3)
Cu(1)–N(5)	2.07(2)
Ángulos de enlace (grados)	
N(1)–Cu(1)–N(2)	83.6(10)
N(1)–Cu(1)–N(4)	83.1(13)
N(1)–Cu(1)–N(5)	142.3(10)
N(2)–Cu(1)–N(3)	85.0(7)
N(2)–Cu(1)–N(5)	100.8(8)
N(3)–Cu(1)–N(4)	86.8(11)
N(3)–Cu(1)–N(5)	84.4(8)

Estudios de especiación con Mn²⁺

En la tabla 6.8 se muestran los valores de las constantes de afinidad calculadas para dos derivados de **L**, así como los valores de este precursor para su comparación [270]. La estabilidad de los complejos de Mn²⁺ es menor que la de los de Cu²⁺, si bien las constantes de estabilidad siguen siendo lo suficientemente elevadas como para considerar que los complejos son bastante estables.

Tabla 6.8. Constantes de complejación de Mn²⁺ para **L**, **L-A** y **L-S** en unidades logarítmicas.

Equilibrio	L ^(b)	L-A	L-S
$L + Mn \rightleftharpoons MnL^{(a)}$	11.43(1) ^(c,d)	9.16(2)	12.52(1)
$MnL + H \rightleftharpoons MnHL$	5.89(4)	6.63(4)	6.24(1)
$MnL \rightleftharpoons MnL(OH)$	-10.85(1)	-10.51(4)	-10.17(2)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Valores tomados de la referencia [270]. ^(c)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar (excepto en el caso de **L**, en el que se usó NaClO₄). ^(d)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

En todos los casos estudiados se detectaron especies mononucleares de Mn²⁺ con estequiometrías [MnHL]³⁺ y [MnL]²⁺, así como la especie hidroxilada [MnL(OH)]⁺. El valor de la constante de estabilidad para la formación del complejo [MnL]²⁺ es significativamente mayor en el caso de **L-S** en comparación con el resto de ligandos, probablemente debido a la participación del oxígeno del fenolato en la complejación del manganeso.

Como se puede observar en los diagramas de distribución de la figura 6.18, debido a la menor estabilidad de los complejos de manganeso respecto a los de cobre, los complejos de manganeso se empiezan a formar a valores de pH superiores a 5. En el caso de **L-A**, el manganeso no está cuantitativamente complejoado ([Mn²⁺] < 5%) hasta pH 7.5. La situación mejora para **L-S**, gracias a la mayor estabilidad asociada a la presencia del oxígeno del fenolato a partir de pH 7 ya no hay manganeso libre en disolución.

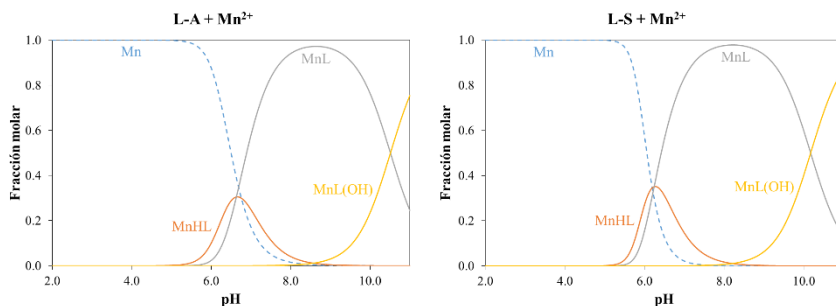


Figura 6.18. Diagramas de distribución de especies para los sistemas Mn^{2+} – ligando, para **L-A** y **L-S**. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

6.2.2. Ligandos derivados de la poliamina **LI**

Los derivados de la poliamina **LI**, al contar con un átomo dador adicional en la cadena lateral tienen la capacidad de hexacoordinar el catión metálico. En el caso de los ligandos **LI-2Py** y **LI-2Q** el átomo de nitrógeno del heterociclo de la cadena lateral está también en una posición favorable para interactuar con un centro metálico situado en el macrocilco, por lo que potencialmente pueden actuar como ligandos heptadentados. Este no es el caso de **LI-4Py** el cual tiene el nitrógeno de la piridina apuntando hacia fuera del macrocilco, lo que impide que se coordine al metal. A continuación se analizará cómo estas diferencias estructurales afectan a la estabilidad de los complejos metálicos.

Estudios de especiación con Cu²⁺

En la tabla 6.9 se presentan los valores de las constantes de estabilidad de los complejos de cobre con ligandos derivados de la poliamina alargada **LI**, determinados por potenciometría. Estos valores son mayores en comparación con los de los ligandos de cadena corta, lo que indica la participación del segundo átomo dador de la cadena lateral en la coordinación del metal.

Tabla 6.9. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Cu²⁺ de distintos derivados de **LI**.

Equilibrio	LI-A	LI-P	LI-2Py	LI-4Py	LI-2Q
$L + Cu \rightleftharpoons CuL^{(a)}$	20.49(4) ^(b,c)	20.09(5)	21.77(2)	20.63(3)	23.19(2)
$CuL + H \rightleftharpoons CuHL$	6.44(1)	6.19(5)	5.16(2)	5.89(2)	8.15(2)
$CuHL + H \rightleftharpoons CuH_2L$	4.61(1)	4.30(5)	4.17(2)	4.47(1)	4.18(2)
$CuH_2L + H \rightleftharpoons CuH_3L$	—	—	—	3.60(2)	—
$CuL \rightleftharpoons CuL(OH)$	-11.8(1)	—	—	—	—

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

A primera vista se observa que los ligandos con capacidad de formar complejos heptacoordinados, **LI-2Py** y **LI-2Q**, forman complejos comparativamente más estables. En todos los casos, además del complejo $[CuL]^{2+}$, se han detectado especies de estequiometría $[CuHL]^{3+}$ y $[CuH_2L]^{4+}$. En el caso de **LI-4Py** se ha detectado una especie adicional $[CuH_3L]^{5+}$. Esta protonación coincide con el valor de la quinta constante sucesiva de protonación detectada para el ligando libre ($pK_a = 3.72$), y probablemente involucra, como ya se discutió en la sección 6.1.2, al nitrógeno de la piridina de la cadena lateral.

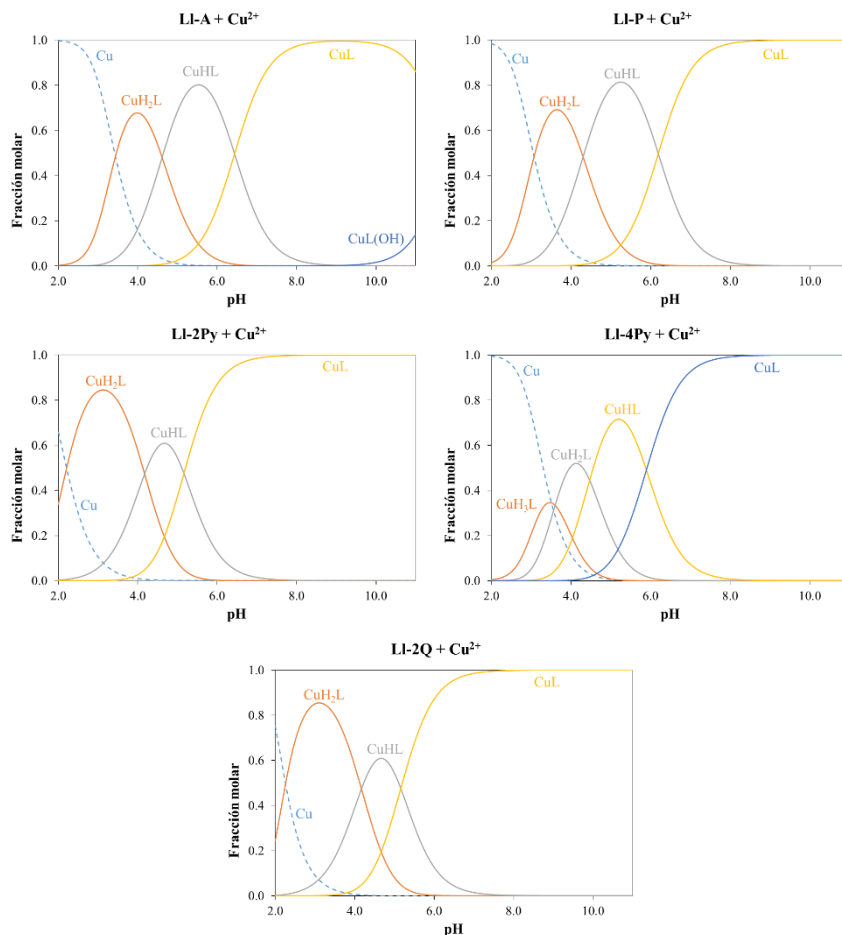


Figura 6.19. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Cu^{2+} – ligando para los derivados de **LI**. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

En los diagramas de distribución (figura 6.19) se puede apreciar que en el caso de los compuestos con la cadena lateral alargada, a pH neutro, la especie $[\text{CuL}]^{2+}$ no es la única que se encuentra en disolución, sino que sigue habiendo cantidades apreciables de $[\text{CuHL}]^{2+}$. También es evidente cómo con los ligando potencialmente heptacoordinados, **LI-2Py** y **LI-2Q**, los complejos se empiezan a formar a menor pH.

Para poder comparar todos los sistemas, en la figura 6.20 se representa el pCu^{2+} ($-\log[Cu^{2+}]$) frente al pH. Como se puede observar, el compuesto que forma los complejos menos estables a pH básico es el ligando de cadena corta **L-A**. En la secuencia de estabilidad le siguen los compuestos con la cadena lateral alargada y sustituyentes aromáticos **LI-P** y **LI-A**, así como el compuesto **LI-4Py**. El hecho de que el compuesto sustituido con la unidad 4-piridina esté en este mismo intervalo de estabilidad nos indica que el nitrógeno de la piridina de la cadena lateral no está participando en la coordinación del catión metálico. Siguiendo la secuencia de estabilidad nos encontramos el compuesto **L-S**, con una mayor afinidad por el cobre gracias a la participación del oxígeno del fenolato en la coordinación, seguido por el compuesto heptacoordinado **LI-2Py**, el cual es más estable que **L-S** a pHs inferiores a 9 debido a la protonación del grupo fenolato. Finalmente, el ligando que genera los complejos de cobre más estable es **LI-2Q**. La secuencia de estabilidad, por tanto sería **L-A** < **LI-P** \approx **LI-A** \approx **LI-4Py** < **L-S** < **LI-2Py** < **LI-2Q**.

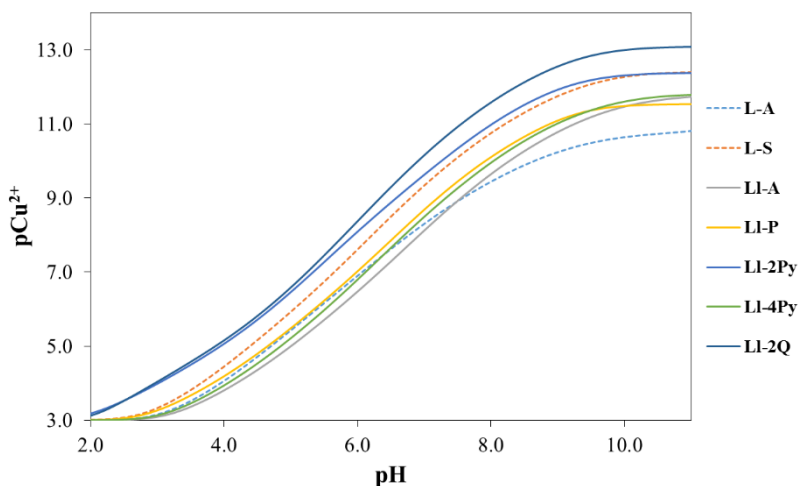


Figura 6.20. Representación del pCu^{2+} frente al pH de los derivados de **L** (líneas discontinuas) y **LI** (líneas sólidas). Calculado a partir de las constantes de estabilidad para una disolución de concentración inicial $[Cu^{2+}] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

Estudios de especiación con Mn²⁺

Los valores de las constantes de asociación con Mn²⁺ de estos compuestos, presentadas en la tabla 6.10, son elevadas, del orden de 10⁹, aunque inferiores a las de los complejos de Cu²⁺. En el caso del ligando **LI-A**, sus constantes de estabilidad son aproximadamente un orden de magnitud superiores a las del ligando de cadena corta **L-A** (tabla 6.8), lo que nos indica que el segundo nitrógeno de la cadena participa en la coordinación del metal.

Tabla 6.10. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Mn²⁺ de distintos derivados de **LI**.

Equilibrio	LI-A	LI-2Py	LI-4Py	LI-2Q
L + Mn \rightleftharpoons MnL ^(a)	9.89(5) ^(b,c)	9.67(3)	9.93(5)	8.42(3)
MnL + H \rightleftharpoons MnHL	8.94(5)	6.80(4)	8.28(5)	8.97(3)
MnL \rightleftharpoons MnL(OH)	—	—	—	-11.1(1)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

En la figura 6.21 se representan los diagramas de distribución de especies construidos para estos sistemas. Como se puede observar, los complejos se forman a partir de pH 5, y las principales especies detectadas son de estequiometría [MnL]²⁺ y [MnHL]³⁺, siendo esta última la especie predominante a pH 7.4, salvo para **LI-2Py**.

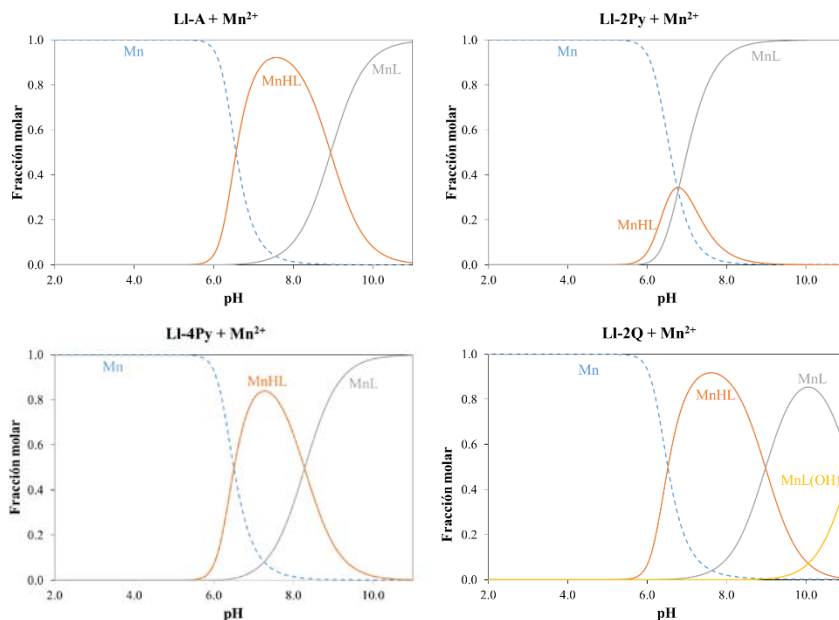


Figura 6.21. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Mn^{2+} – ligando, para los derivados de **LI**. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

Para comparar la estabilidad de los complejos de Mn^{2+} con los diferentes ligandos estudiados, en la figura 6.22 se representa el pMn^{2+} frente al pH. Como se puede apreciar, los complejos no empiezan a formarse hasta alcanzar un pH cercano a 6. Lo primero que llama la atención es que, al contrario que con el Cu^{2+} , los complejos menos estables son los del compuesto **LI-2Q**. A continuación, y con estabilidades similares encontramos al ligando de cadena corta **L-A** y los compuestos **LI-A**, **LI-4Py** y **LI-2Py**. En esta ocasión, la posibilidad de formar complejos heptacoordinados del ligando **LI-2Py** no parece contribuir a incrementar de forma sensible la estabilidad de los complejos con Mn^{2+} . Mucho más estables son los complejos formados por el ligando **L-S**, lo que pone en evidencia la importancia del oxígeno del fenolato en la coordinación del Mn^{2+} . La secuencia de estabilidad es, por tanto: **LI-2Q** < **L-A** \approx **LI-A** \approx **LI-4Py** \approx **LI-2Py** \ll **L-S**.

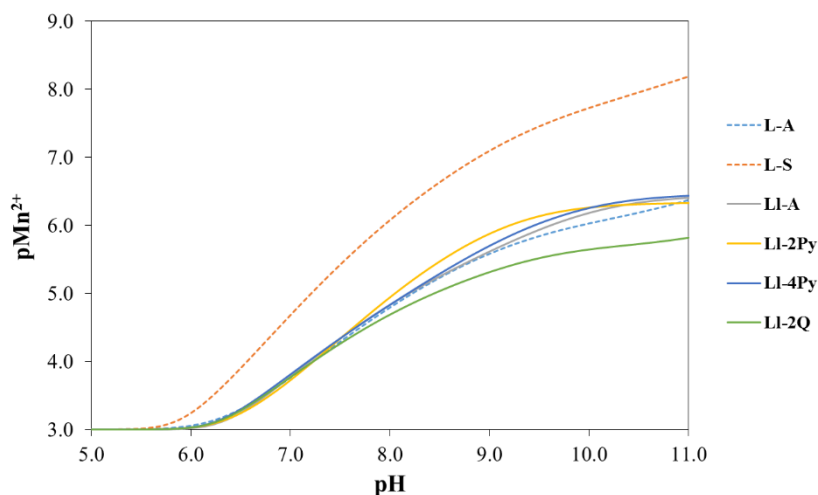


Figura 6.22. Representación del pMn^{2+} frente al pH de los derivados de **L** (líneas discontinuas) y **LI** (líneas sólidas). Calculado a partir de las constantes de estabilidad para una disolución de concentración inicial $[Mn^{2+}] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

6.2.3. Estudios con otros metales de transición

Además de los estudios con cobre y manganeso, en algunos casos también se realizaron medidas potenciométricas con los metales hierro y zinc debido, entre otras cosas, a su relevancia en los sistemas biológicos. El zinc, por ejemplo, es un elemento esencial en la dieta de los humanos, apareciendo en los centros activos de muchas proteínas con una gran variedad de funciones [271]. Además, debido a su baja toxicidad, resulta un buen candidato para el estudio de los complejos en cultivos celulares, como los realizados en el transcurso de esta tesis doctoral para determinar la citotoxicidad de los ligandos libres frente a la de los complejos metálicos. Por estos motivos se determinó la estabilidad de la interacción del Zn^{2+} con cuatro de los ligandos diseñados para interactuar con el ADN. Los resultados se reúnen en la tabla 6.11.

Tabla 6.11. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Zn^{2+} de **L-A**, **LI-A**, **LI-Pir** y **LI-2Q**.

Equilibrio	L-A	LI-A	LI-P	LI-2Q
$L + Zn \rightleftharpoons ZnL^{(a)}$	15.81(4) ^(b,c)	17.9(1)	16.83(5)	17.8(1)
$ZnL + H \rightleftharpoons ZnHL$	4.93(4)	7.4(1)	7.01(3)	6.0(1)
$ZnHL + H \rightleftharpoons ZnH_2L$	—	4.9(1)	4.97(2)	4.85(3)
$ZnL \rightleftharpoons ZnL(OH)$	—	-10.3(1)	—	—

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

La estabilidad de los complejos formados es mayor que en el caso de los complejos de manganeso, pero algo menor que en el caso del cobre. Además cabe destacar aquí que las cinéticas de formación de los complejos de zinc demostraron ser muy lentas en todos los casos, requiriéndose largos tiempos de estabilización para cada punto de la valoración. El compuesto **L-A** presenta, de nuevo, constantes de estabilidad un orden de magnitud menor que su análogo de cadena larga **LI-A**. Además, en el caso de este ligando de cadena corta, **L-A**, se detectaron especies de estequiometría $[ZnL]^{2+}$ y $[ZnHL]^{3+}$, mientras que en el caso de los compuestos con la cadena lateral alargada **LI-A**, **LI-P** y **LI-2Q**, se pudo detectar la especie adicional, $[ZnH_2L]^{4+}$.

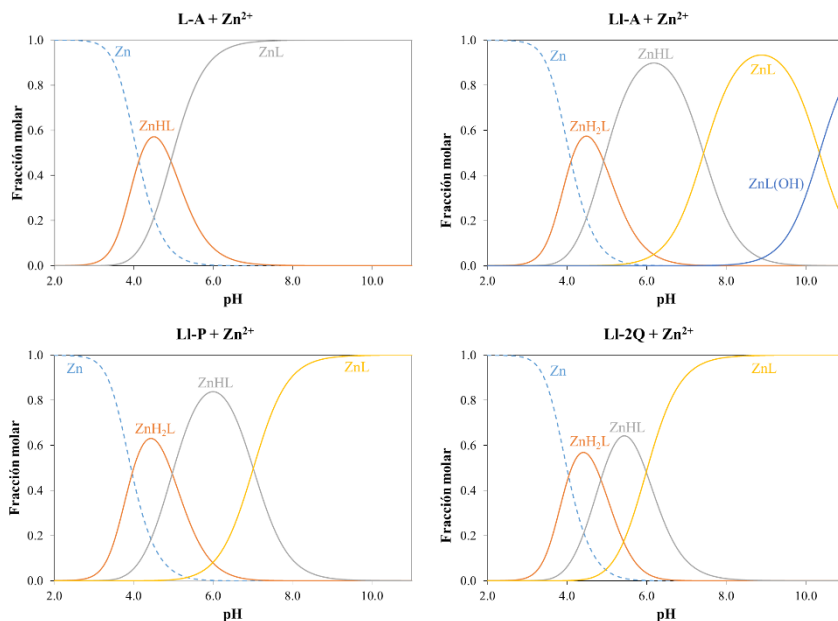


Figura 6.23. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Zn^{2+} – ligando, para los compuestos **L-A**, **LI-A**, **LI-Pir** y **LI-2Q**. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

Como se puede apreciar en los diagramas de distribución de especies (figura 6.23), la especie predominante a pH 7.4 en el caso de **L-A** es el complejo $[\text{ZnL}]^{2+}$, mientras que para los compuestos alargados esta especie coexiste en disolución con la especie monoprotonada $[\text{ZnHL}]^{3+}$. Este hecho tiene implicaciones importantes en la actividad biológica de estos compuestos debido a las diferencias conformacionales entre las especies, como se discutirá con más detalle en el siguiente capítulo.

Los complejos de Zn^{2+} se forman a partir de pH 3, como se aprecia en la figura 6.24. A pHs intermedios la estabilidad de los complejos es similar en todos los casos, pero a pH básico la secuencia de estabilidad tiende a ser **L-A** < **LI-A** \approx **LI-P** < **LI-2Q**. A valores de pH por encima de 10, sin embargo, el ligando **LI-A** es capaz de coordinar el Zn^{2+} en mayor proporción, debido a la formación de una especie hidroxilada.

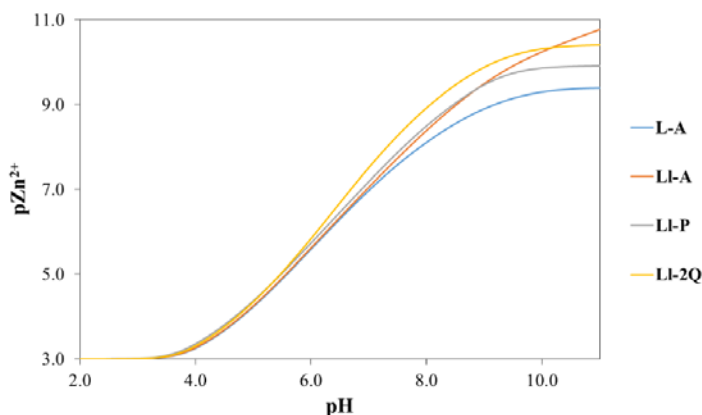


Figura 6.24. Representación del pZn^{2+} frente al pH de los derivados de **L** (líneas discontinuas) y **LI** (líneas sólidas). Calculado a partir de las constantes de estabilidad para una disolución de concentración inicial $[Zn^{2+}] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

El interés por estudiar los complejos de hierro surge del hecho de que este metal se encuentra en el centro activo de la enzima superóxido dismutasa de hierro (FeSOD). Dicha enzima es propia de los parásitos tripanosomátidos y no se encuentra en humanos, lo que la convierte en una diana conveniente en el diseño de nuevos agentes tripanocidas. Por esta razón se midieron las constantes de estabilidad con Fe^{2+} de los dos ligandos que mostraron mayor actividad frente a los parásitos, **LI-2Py** y **LI-4Py**.

Tabla 6.12. Constantes de complejación de Fe^{2+} para los ligandos **LI-2Py** y **LI-4Py** en unidades logarítmicas.

Equilibrio	LI-2Py	LI-4Py
$L + Fe \rightleftharpoons FeL^{(a)}$	14.99(4) ^(b,c)	13.98(5)
$FeL + H \rightleftharpoons FeHL$	6.39(4)	7.07(5)
$FeHL + H \rightleftharpoons FeH_2L$	6.04(4)	—
$FeH_2L + H \rightleftharpoons FeH_3L$	4.89(3)	—
$FeL \rightleftharpoons FeL(OH)$	-10.46(5)	-8.87(8)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Los resultados obtenidos indican que ambos ligandos son capaces de formar complejos suficientemente estables con el hierro, por lo que si llegaran a aproximarse lo suficiente al centro activo de la enzima, sin duda se establecería algún tipo de competición por el metal. Particularmente estables son las especies de hierro del ligando **LI-2Py**, las cuales, como se puede apreciar en el diagrama de distribución de la figura 6.25, se forman incluso a valores de pH muy bajos (pH = 2), estando todo el hierro cuantitativamente complejoado a pH 6.

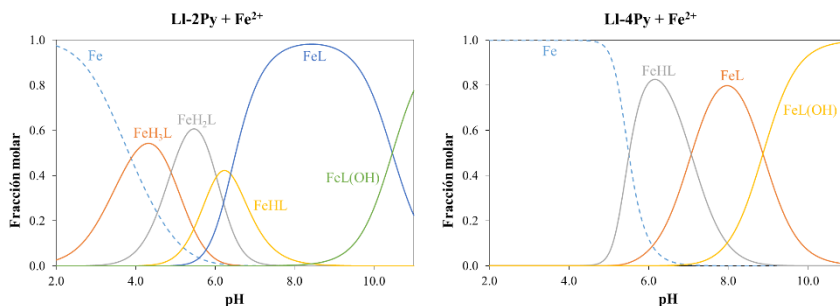


Figura 6.25. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Fe^{2+} – ligando para los compuestos **LI-2Py** y **LI-4Py**. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

La representación del pFe^{2+} frente al pH (figura 6.26) resalta el hecho de que el ligando **LI-2Py** es capaz de formar complejos de Fe^{2+} más estables que el **LI-4Py**, debido probablemente a que la piridina sustituida en la posición 2 es capaz de coordinar al catión metálico, mientras que la sustitución en la posición 4 impide que se forme este enlace.

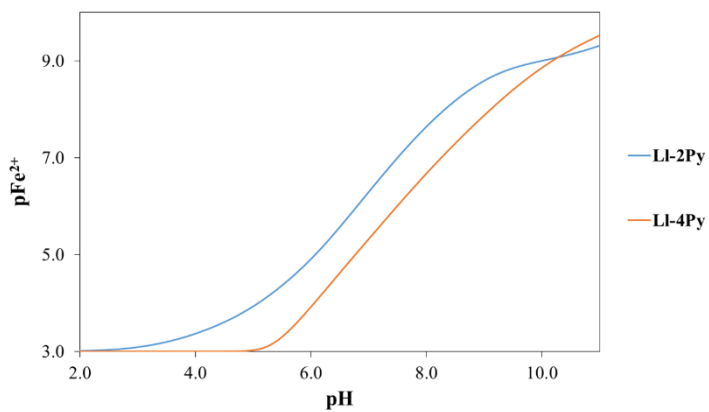


Figura 6.26. Representación del $p\text{Fe}^{2+}$ frente al pH de los derivados de **L** (líneas discontinuas) y **LI** (líneas sólidas). Calculado a partir de las constantes de estabilidad para una disolución de concentración inicial $[\text{Fe}^{2+}] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

6.2.4. Ligandos politópicos

Los ligandos politópicos, por definición, tienen la capacidad de coordinar a más de un catión metálico. Tal es el caso de los compuestos **L-O** y **TPA-L3**, que contienen elementos estructurales que potencialmente les permitiría formar complejos con estequiometrias superiores a 1:1.

En el caso de **L-O**, estudios preliminares realizados en la Universidad de Urbino demostraron que poseía un gran potencial como sensor fluorescente de zinc en agua. Por este motivo, en nuestro grupo de Química Supramolecular, se procedieron a realizar los estudios de especiación con este metal. En la literatura está descrito cómo la unidad de piridil-oxadiazol es capaz de actuar como agente quelante, formando complejos con Zn^{2+} de estequiometría 2:1 y 1:1, dependiendo de la concentración de metal [272]. Teniendo en cuenta este hecho y la presencia del macrociclo, podríamos esperar que se produjeran los tres modos de coordinación que se representan en la figura 6.27 y que dan lugar a tres posibles estequiometrias $\text{Zn}^{2+}:\text{L-O} = 1:1, 3:2 \text{ y } 2:1$.

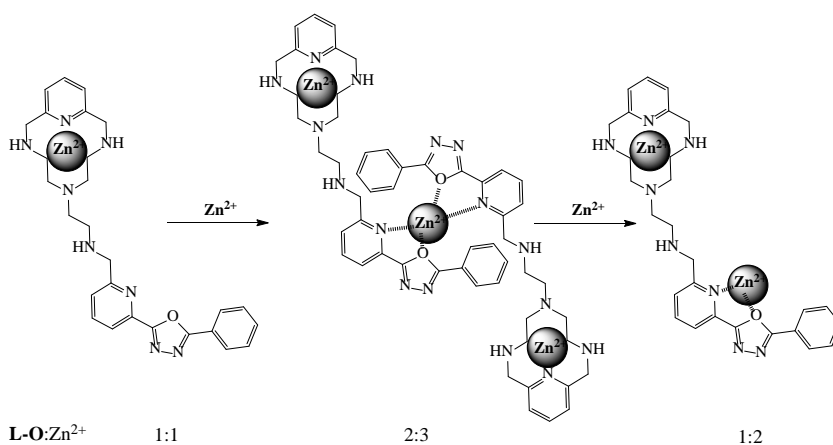


Figura 6.27. Potenciales modos de interacción de **L-O** con Zn^{2+} .

Se realizaron medidas potenciométricas a diferentes relaciones molares de ligando metal, ajustando cada una por separado para después recopilar todos los datos. Éstos se ajustaron adecuadamente a un modelo en el que aparecen dos de los modos de coordinación propuestos. Se detectó la especie 1:1 $[\text{ZnL}]^{2+}$, así como las especies hidroxiladas de los complejos de estequiometría 3:2, $[\text{Zn}_3\text{L}_2(\text{OH})_2]^{4+}$ y $[\text{Zn}_3\text{L}_2(\text{OH})_3]^{3+}$.

Tabla 6.13. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Zn^{2+} con el ligando **L-O**.

Equilibrio	L-O
$\text{L} + \text{Zn} \rightleftharpoons \text{ZnL}^{(a)}$	16.68(3) ^(b,c)
$2\text{L} + 3\text{Zn} \rightleftharpoons \text{Zn}_3\text{L}_2$	40.27(9)
$2\text{L} + 3\text{Zn} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_3\text{L}_2(\text{OH})_2 + 2\text{H}$	24.20(6)
$2\text{L} + 3\text{Zn} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_3\text{L}_2(\text{OH})_3 + 3\text{H}$	13.4(1)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Los diagramas de distribución construidos a diferentes relaciones molares (figura 6.28) demuestran cómo a concentraciones bajas de Zn^{2+} predomina la especie 1:1, a valores de pH intermedios y básicos, mientras que la especie 3:2 sólo es mayoritaria en el intervalo de pH de 4 a 5. Al aumentar la concentración del metal las especies 3:2 empiezan a prevalecer en todo el intervalo de pH.

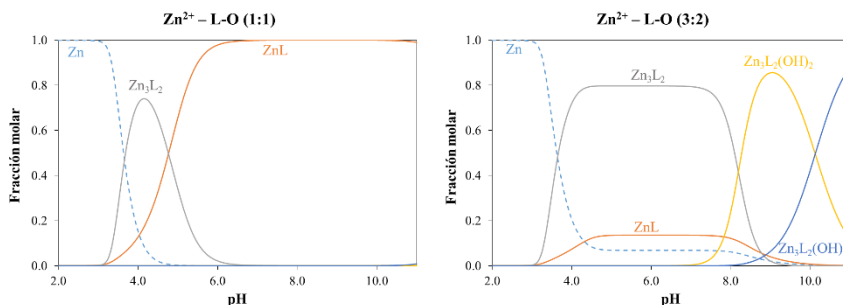


Figura 6.28. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de $\text{Zn}^{2+} - \text{L-O}$ a diferentes relaciones molares. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

Por la evaporación de una disolución de **L-O** con Zn^{2+} en exceso de NaClO_4 se obtuvieron monocristales de color blanco y composición $[\text{Zn}(\text{L-O})](\text{ClO}_4)_2$ aptos para la difracción por rayos X. La estructura obtenida se representa en la figura 6.29, omitiendo los aniones perclorato. El catión Zn^{2+} está coordinado a los cuatro nitrógenos del macrociclo, al nitrógeno de la cadena lateral y al nitrógeno de la piridina de la unidad 2-fenil-5-piridil-[1,3,4]oxadiazol con una geometría de coordinación octaédrica distorsionada. Los ángulos entre átomos adyacentes en la esfera de coordinación varían entre 77.69° y 106.36° . La distancia más corta en la esfera de coordinación es la existente entre el Zn^{2+} y el nitrógeno de la piridina del macrociclo, N1 (2.07 \AA), mientras que las distancias más largas se dan entre el metal y los nitrógenos N2 y N6 (2.25 y 2.26 \AA , respectivamente. Tabla 6.14). Los anillos del grupo 2-fenil-5-piridil-[1,3,4]oxadiazol se encuentran en una disposición alternada, con ángulos diedro de 60.28° entre los anillos de piridina y oxadiazol, y de 21.22° entre el oxadiazol y el fenilo. El anillo de oxadiazol se sitúa sobre la piridina del macrociclo a una distancia de apilamiento de 3.1 \AA .

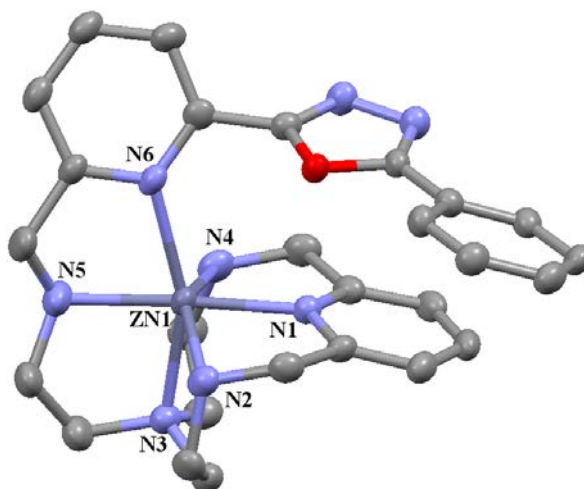


Figura 6.29. Estructura cristalina del catión $[\text{Zn}(\text{L-O})]^{2+}$. Los átomos de hidrógeno y los aniones perclorato no se muestran.

Tabla 6.14. Distancias y ángulos de enlace seleccionados para la estructura $[\text{Zn}(\text{L}-\text{O})](\text{ClO}_4)_2$.

Distancias de enlace (Å)	
Zn(1)–N(1)	2.07
Zn(1)–N(2)	2.25
Zn(1)–N(3)	2.22
Zn(1)–N(4)	2.21
Zn(1)–N(5)	2.12
Zn(1)–N(6)	2.26
Ángulos de enlace (grados)	
N(1)–Zn(1)–N(2)	78.09
N(1)–Zn(1)–N(3)	94.86
N(1)–Zn(1)–N(4)	78.12
N(1)–Zn(1)–N(6)	106.36
N(2)–Zn(1)–N(3)	80.44
N(2)–Zn(1)–N(5)	102.79
N(2)–Zn(1)–N(6)	105.70
N(3)–Zn(1)–N(4)	81.83
N(3)–Zn(1)–N(5)	81.01
N(4)–Zn(1)–N(5)	99.74
N(4)–Zn(1)–N(6)	100.12
N(5)–Zn(1)–N(6)	77.69

En el caso de la poliamina **TPA-L₃** tenemos tres macrociclos capaces cada uno de coordinar a un catión metálico. Para determinar las constantes de afinidad con Mn^{2+} se realizaron medidas potenciométricas con diferentes relaciones molares metal/ligando. Los resultados finales de la interacción con manganeso se muestran en la tabla 6.15. Se han detectado complejos de estequiometría 1:1, 2:1 y 3:1. Los complejos 1:1 presentan un grado de protonación que varía entre 0 y 7. El complejo $[\text{Mn}(\text{TPA}-\text{L}_3)]^{2+}$ tiene una constante de estabilidad algo menor que $[\text{MnL}]^{2+}$ (ver tabla 6.8), sin embargo se protona con mayor facilidad al haber más grupos amino disponibles. Para los complejos 2:1 el máximo grado de protonación lo alcanza la especie triprotonada $[\text{Mn}_2\text{H}_3\text{L}]^{7+}$. Finalmente, la especie de estequiometría 3:1 existe en su forma desprotonada, monoprotonada y bishidroxilada.

Tabla 6.15. Constantes estabilidad, en unidades logarítmicas, para los complejos de Mn^{2+} con **TPA-L₃**.

Equilibrio	TPA-L₃
L + Mn \rightleftharpoons MnL^(a)	9.92(1) ^(b,c)
MnL + H \rightleftharpoons MnHL	9.31(1)
MnHL + H \rightleftharpoons MnH ₂ L	9.38(1)
MnH ₂ L + H \rightleftharpoons MnH ₃ L	8.71(2)
MnH ₃ L + H \rightleftharpoons MnH ₄ L	8.37(2)
MnH ₄ L + H \rightleftharpoons MnH ₅ L	7.67(2)
MnH ₅ L + H \rightleftharpoons MnH ₆ L	7.09(2)
MnH ₆ L + H \rightleftharpoons MnH ₇ L	5.57(2)
L + 2Mn \rightleftharpoons Mn₂L	19.23(1)
Mn ₂ L + H \rightleftharpoons Mn ₂ HL	9.42(7)
Mn ₂ HL + H \rightleftharpoons Mn ₂ H ₂ L	8.26(6)
Mn ₂ H ₂ L + H \rightleftharpoons Mn ₂ H ₃ L	7.44(3)
Mn ₂ L + 2H ₂ O \rightleftharpoons Mn ₂ L(OH) ₂ + 2H	-18.70(6)
L + 3Mn \rightleftharpoons Mn₃L	26.71(7)
Mn ₃ L + H \rightleftharpoons Mn ₃ HL	7.55(6)
Mn ₃ L + 2H ₂ O \rightleftharpoons Mn ₃ L(OH) ₂ + 2H	-18.05(7)

^(a)Cargas omitidas. ^(b)Medidas realizadas a 298(1) K de temperatura y con NaCl 0.15 M como electrolito auxiliar. ^(c)Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

En la figura 6.30 se muestran los diagramas de distribución de especies entre pH 5 y 11, por ser el intervalo en el que aparecen las especies de interés. Como se puede observar a concentraciones equimolares de metal conviven las especies de diferente nuclearidad, sin que prevalezca ninguna claramente. Al existir el doble de metal que de ligando se favorecen claramente las especies binucleares de manganeso, especialmente a pH básico. Finalmente, con una concentración de metal tres veces superior a la de ligando las especies trinucleares se ven claramente favorecidas, predominando en todo el intervalo de pH.

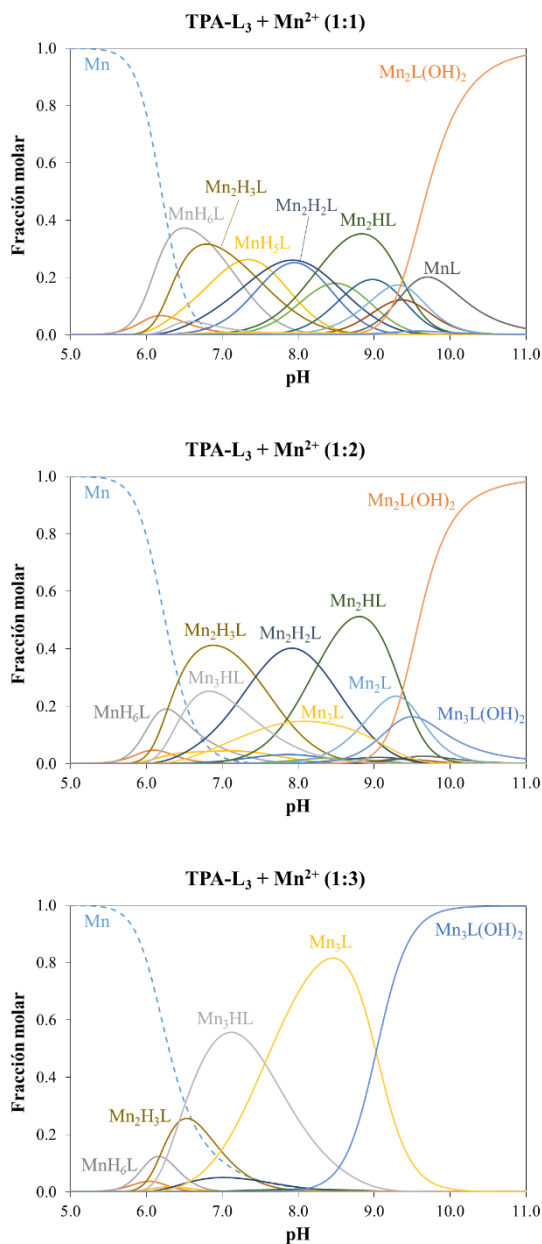


Figura 6.30. Diagramas de distribución de especies para los sistemas de Mn^{2+} – TPA-L₃, a diferentes relaciones molares. La línea discontinua representa la fracción molar de metal libre. Las cargas se han omitido.

La capacidad de los ligandos estudiados para formar complejos estables con diferentes metales de transición es de gran interés, no sólo por su química de coordinación, sino también por sus posibles aplicaciones biomédicas. Como hemos visto en el presente capítulo, el grado de protonación de estos ligandos y de sus complejos metálicos varía en función del pH dando lugar a diferentes especies, algunas de ellas con múltiples cargas positivas. Esta propiedad permite que se generen interacciones con especies cargadas negativamente, lo que nos condujo a realizar los estudios que se presentarán en el siguiente capítulo.

7.

**Interacción con aniones
de interés biológico**

En 1968, C. H. Park y H. E. Simmons publicaron un artículo seminal para lo que después vendría a llamarse química supramolecular de aniones. En su artículo describieron la encapsulación de aniones cloruro en ligandos diazabicycloamónio [273]. Una década después, Jean-Marie Lehn estableció que la química supramolecular de aniones era una verdadera clase de química de coordinación [274]. Desde entonces el interés por esta rama de la química supramolecular ha ido creciendo de manera exponencial llegando a convertirse en un campo en sí mismo, con diversas ramificaciones que inciden en una gran variedad de áreas de la ciencia como la biología, la medicina, la química analítica, así como en muchos aspectos de la nanotecnología. El interés generado por este campo de la química quedó demostrado con la publicación, en 1997, de un libro dedicado exclusivamente a la química supramolecular de aniones (*Anion Coordination Chemistry*, editado por Kristin Bowman-James, Antonio Bianchi y Enrique García-España [275]). Para comprender la relevancia de esta rama de la química cabe destacar que en los procesos biológicos se estima que entre el 70 y el 75% de los sustratos y cofactores involucrados tienen carga negativa [276]. Entre la multitud de ejemplos, por su relevancia y ubicuidad entre los seres vivos, destacan las dos familias estudiadas en esta tesis doctoral: los mononucleótidos y los ácidos nucleicos.

7.1. Interacción con mononucleótidos

Los mononucleótidos son moléculas ubicuas en los sistemas biológicos y, además de ser los componentes básicos de los ácidos nucleicos, desempeñan múltiples funciones fundamentales para la vida. El adenosín trifosfato (ATP) es una de las fuentes de energía bioquímica más importantes, participando en procesos de biosíntesis, fotosíntesis y división celular [277]. También participa en cadenas de transducción de señales extracelulares [278]. El guanosín trifosfato (GTP) está involucrado en la síntesis del ARN y en el ciclo del ácido cítrico [279]. Y la uridina trifosfato (UTP) es un intermedio fundamental en la síntesis de los otros nucleótidos pirimidínicos, entre otras funciones [280].

Todos los procesos bioquímicos en los que participan estas biomoléculas requieren del reconocimiento molecular preciso de un mononucleótido concreto. Esto se consigue mediante interacciones no covalentes altamente específicas, si bien los criterios para esta especificidad no siempre se conocen con exactitud. Como ejemplo, en la figura 7.1 podemos observar la molécula de GTP interaccionando con la proteína transglutaminasa 2. Como se puede observar, la molécula está estabilizada mediante puentes de hidrógeno entre la cadena fosfatada y los grupos guanidino de las argininas Arg476, Arg478 y Arg580. La nucleobase interacciona por apilamiento π con el residuo Phe174. La interacción es selectiva para GTP frente a ATP gracias al residuo Ser482, el cual establece un puente de hidrógeno adicional sólo con el GTP [281].

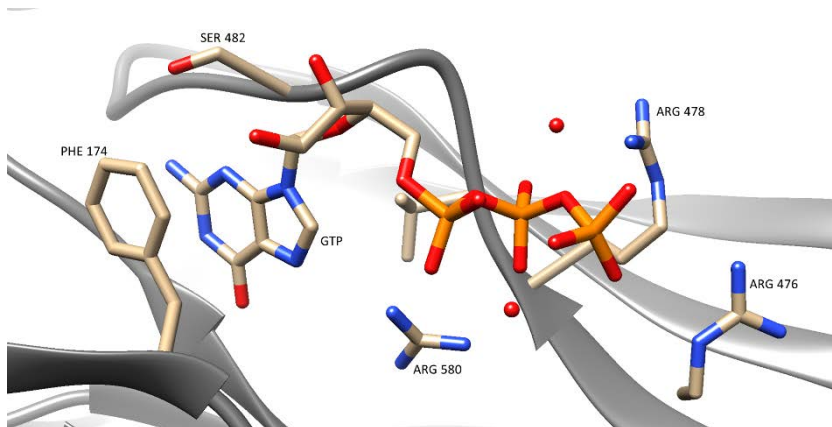


Figura 7.1. Entorno del GTP en la proteína transglutaminasa 2 (PDB ref. 4PYG).

La síntesis de receptores abióticos capaces de formar complejos supramoleculares con los mononucleótidos a través de interacciones no covalentes (apilamiento π , enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas, etc.) es una manera interesante de abordar el estudio del reconocimiento molecular de los mismos [276]. Estos estudios están orientados no sólo a comprender los mecanismos del reconocimiento sino también a la obtención de quimiosensores capaces de detectar selectivamente la presencia de mononucleótidos en agua.

En este marco se sitúa la investigación presentada en este capítulo y que ha sido publicada recientemente [261] (ver Anexo 1, Publicaciones relacionadas). Para llevarla a cabo se han seleccionado los cuatro receptores poliazamacrocíclicos que se muestran en la figura 7.2. Éstos están basados en el esqueleto macrocíclico de **L**, pero difieren en la longitud de la cadena lateral y en el tipo de sustituyente, que puede ser antraceno (óptimo para interacciones de apilamiento π) o piridina (con un átomo aceptor de enlaces de hidrógeno).

Interacción con aniones de interés biológico

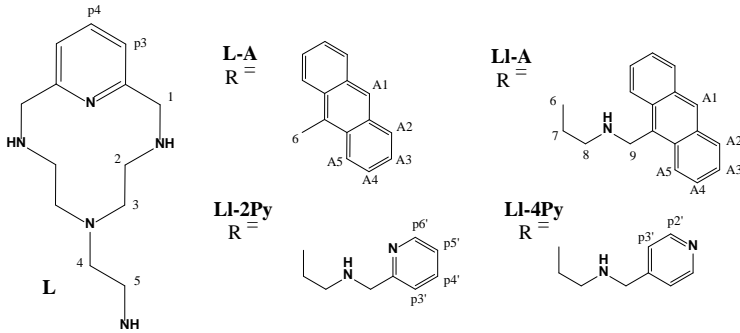


Figura 7.2. Esquema de los receptores estudiados.

Como moléculas diana se eligieron los mononucleótidos representados en la figura 7.3. El ATP, ADP y AMP fueron seleccionados no sólo por su relevancia biológica, sino también para comprender cómo afecta la longitud de la cadena fosfatada a la interacción con el receptor. El GTP y el UTP se eligieron para evaluar las diferencias entre nucleobases púricas y pirimidínicas.

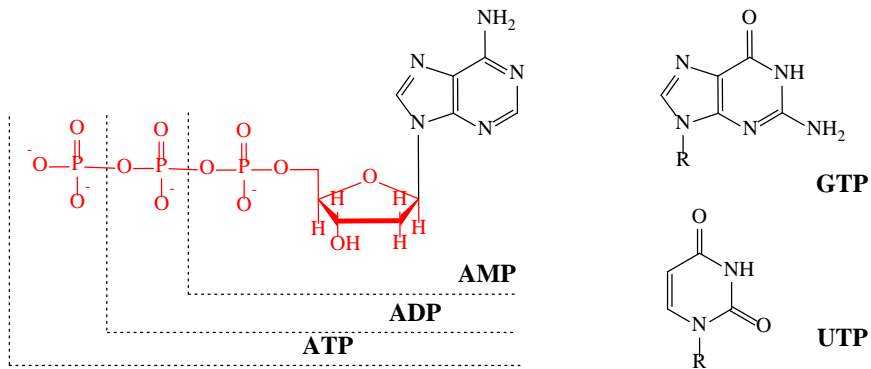


Figura 7.3. Esquema de los polinucleótidos estudiados.

7.1.1. Estudios potenciométricos

La interacción en medio acuoso entre nuestros receptores y los mononucleótidos ha sido estudiada mediante valoraciones potenciométricas. Previamente a estos estudios se evaluaron las propiedades ácido-base de los receptores poliamínicos (descritas en el capítulo 6 de la presente tesis) así como la de los mononucleótidos seleccionados. Entender este comportamiento es importante ya que la interacción receptor-sustrato se favorece principalmente por interacciones de tipo electrostático, entre los grupos amonio positivamente cargados y el esqueleto fosfatado con carga negativa. Además hay que considerar que las nucleobases guanina y uracilo presentan un tautomerismo ceto (forma amida) – enol (forma ácido imídico) (figura 7.4) [282]. A pH's intermedios la forma ceto está muy favorecida, sin embargo a pH's alcalinos el protón del nitrógeno imídico es fácilmente sustraído, dando lugar a la forma enol.

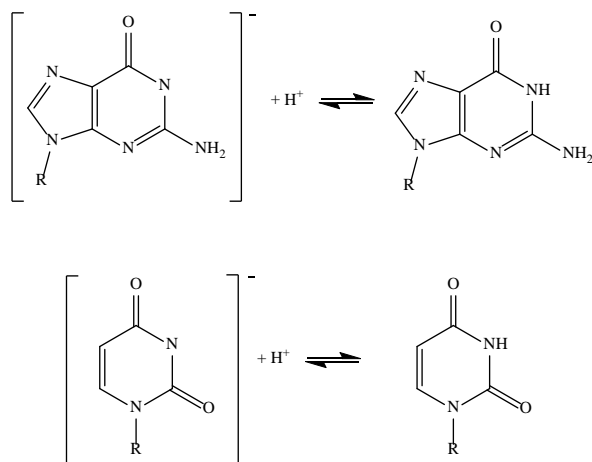


Figura 7.4. Protonación del GTP y UTP.

En las tablas 7.1-4 se recogen los valores obtenidos para la interacción de los cuatro receptores con ATP, ADP y AMP. Como se desprende de estos datos, los receptores forman complejos de estequiometría 1:1 y estabilidad significativa con los mononucleótidos estudiados. **L-A** forma especies de estequiometría $H_xA(\text{ligando})$, con valores de x entre 1 y 6, mientras el compuesto alargado **LI-A** genera especies con x entre 2 y 7. Para los compuestos de piridina, **LI-2Py** y **LI-4Py**, el grado de protonación de los aductos formados varía de 1 a 7 en ambos casos.

Tabla 7.1. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre **L-A** y ATP, ADP y AMP.

Reacción ^a	AMP	ADP	ATP
$A + H + L \rightleftharpoons HAL^b$	13.28(2) ^c	13.57(2)	13.67(3)
$A + 2H + L \rightleftharpoons H_2AL$	22.31(2)	22.69(2)	22.93(2)
$A + 3H + L \rightleftharpoons H_3AL$	29.75(3)	30.58(2)	31.12(2)
$A + 4H + L \rightleftharpoons H_4AL$	36.14(2)	37.14(2)	38.08(2)
$A + 5H + L \rightleftharpoons H_5AL$	40.71(2)	41.72(2)	43.04(3)
$A + 6H + L \rightleftharpoons H_6AL$	43.06(4)	43.88(3)	45.94(3)
$A + HL \rightleftharpoons HAL$	3.48(2)	3.77(2)	3.87(3)
$A + H_2L \rightleftharpoons H_2AL$	3.85(2)	4.23(2)	4.47(2)
$A + H_3L \rightleftharpoons H_3AL$	4.10(3)	4.93(2)	5.47(2)
$HA + H_3L \rightleftharpoons H_4AL$	4.23(2)	4.94(2)	5.65(2)
$H_2A + H_3L \rightleftharpoons H_5AL$	4.93(2)	5.42(2)	6.61(3)
$H_3A + H_3L \rightleftharpoons H_6AL$	–	–	8.28(3)

^aMedidas realizadas a 298(1) K y con NaCl 0.15 M. ^bCargas omitidas. ^cLos valores entre paréntesis son las desviaciones estándar de la última cifra significativa.

Tabla 7.2. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre **Ll-A** y ATP, ADP y AMP.

Reacción ^a	AMP	ADP	ATP
A + H + L \rightleftharpoons HAL ^b	–	–	–
A + 2H + L \rightleftharpoons H ₂ AL	–	22.1(1)	23.25(3)
A + 3H + L \rightleftharpoons H ₃ AL	30.50(6) ^c	31.10(5)	31.89(4)
A + 4H + L \rightleftharpoons H ₄ AL	38.51(2)	39.46(2)	40.53(2)
A + 5H + L \rightleftharpoons H ₅ AL	45.05(2)	46.03(2)	47.40(3)
A + 6H + L \rightleftharpoons H ₆ AL	50.23(1)	50.93(2)	52.33(3)
A + 7H + L \rightleftharpoons H ₇ AL	53.28(2)	54.04(2)	55.61(3)
A + HL \rightleftharpoons HAL	–	–	–
A + H ₂ L \rightleftharpoons H ₂ AL	–	2.4(1)	3.52(3)
A + H ₃ L \rightleftharpoons H ₃ AL	2.52(6)	3.12(5)	3.91(4)
A + H ₄ L \rightleftharpoons H ₄ AL	3.41(2)	4.36(2)	5.42(2)
HA + H ₄ L \rightleftharpoons H ₅ AL	3.69(2)	4.38(2)	5.52(3)
H ₂ A + H ₄ L \rightleftharpoons H ₆ AL	5.00(1)	5.18(2)	6.45(3)
H ₃ A + H ₄ L \rightleftharpoons H ₇ AL	–	–	8.49(3)

^aMedidas realizadas a 298(1) K y con NaCl 0.15 M. ^bCargas omitidas. ^cLos valores entre paréntesis son las desviaciones estándar de la última cifra significativa.

Tabla 7.3. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre **Ll-2Py** y ATP, ADP y AMP.

Reacción ^a	AMP	ADP	ATP
A + H + L \rightleftharpoons HAL ^b	12.74(3) ^c	13.05(2)	13.39(5)
A + 2H + L \rightleftharpoons H ₂ AL	21.82(2)	22.31(1)	22.89(2)
A + 3H + L \rightleftharpoons H ₃ AL	29.86(2)	30.60(1)	31.39(3)
A + 4H + L \rightleftharpoons H ₄ AL	37.02(1)	38.06(1)	39.38(2)
A + 5H + L \rightleftharpoons H ₅ AL	42.76(1)	43.78(1)	45.49(3)
A + 6H + L \rightleftharpoons H ₆ AL	46.23(2)	47.41(1)	49.63(3)
A + 7H + L \rightleftharpoons H ₇ AL	–	–	51.6(1)
A + HL \rightleftharpoons HAL	3.17(3)	3.48(2)	3.82(5)
A + H ₂ L \rightleftharpoons H ₂ AL	3.30(2)	3.79(1)	4.37(2)
A + H ₃ L \rightleftharpoons H ₃ AL	3.41(2)	4.15(1)	4.94(3)
HA + H ₃ L \rightleftharpoons H ₄ AL	4.31(1)	5.06(1)	6.14(2)
HA + H ₄ L \rightleftharpoons H ₅ AL	4.29(1)	5.02(1)	6.50(2)
H ₂ A + H ₄ L \rightleftharpoons H ₆ AL	3.89(2)	4.55(1)	6.64(3)
H ₃ A + H ₄ L \rightleftharpoons H ₇ AL	–	–	7.36(9)

^aMedidas realizadas a 298(1) K y con NaCl 0.15 M. ^bCargas omitidas. ^cLos valores entre paréntesis son las desviaciones estándar de la última cifra significativa.

Tabla 7.4. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la interacción entre **LI-4Py** y ATP, ADP y AMP.

Reacción ^a	AMP	ADP	ATP
A + H + L ⇌ HAL ^b	–	12.7(1)	13.90(5)
A + 2H + L ⇌ H ₂ AL	22.26(2) ^c	22.30(3)	23.60(3)
A + 3H + L ⇌ H ₃ AL	30.77(1)	31.00(2)	32.30(3)
A + 4H + L ⇌ H ₄ AL	38.03(1)	38.48(2)	40.30(2)
A + 5H + L ⇌ H ₅ AL	43.94(1)	43.89(3)	46.33(3)
A + 6H + L ⇌ H ₆ AL	48.47(1)	47.5(1)	50.76(3)
A + 7H + L ⇌ H ₇ AL	–	–	54.18(3)
A + 8H + L ⇌ H ₈ AL	54.44(4)	–	–
A + HL ⇌ HAL	–	2.40(7)	3.74(5)
A + H ₂ L ⇌ H ₂ AL	2.92(2)	2.90(3)	4.26(3)
A + H ₃ L ⇌ H ₃ AL	3.31(1)	3.49(2)	4.84(3)
A + H ₄ L ⇌ H ₄ AL	–	4.21(1)	6.07(2)
HA + H ₃ L ⇌ H ₄ AL	3.79(1)	4.43(1)	6.06(2)
HA + H ₄ L ⇌ H ₅ AL	3.45(1)	2.99(2)	5.32(3)
H ₂ A + H ₄ L ⇌ H ₆ AL	4.11(2)	–	5.75(3)
H ₂ A + H ₅ L ⇌ H ₇ AL	–	–	5.44(3)

^aMedidas realizadas a 298(1) K y con NaCl 0.15 M. ^bCargas omitidas. ^cLos valores entre paréntesis son las desviaciones estándar de la última cifra significativa.

La formación de los aductos protonados implica equilibrios de protonación en los que participan tanto el receptor como el sustrato y que están generalmente solapados. Por este motivo la manera más inequívoca de comparar las estabilidades relativas de los diferentes sistemas y de establecer el margen de selectividad a diferentes valores de pH es mediante el uso de constantes efectivas (K_{eff}). Estas constantes son calculadas para cada valor de pH como el cociente entre la cantidad total de especies complejadas y la cantidad total de receptor y sustrato libres, independientemente del grado de protonación [283]:

$$K_{eff} = \frac{\sum [H_{i+j}AL]}{\sum [H_iA] \sum [H_jL]}$$

Este método permite comparar diferentes sistemas, siempre que las medidas se hayan realizado bajo las mismas condiciones experimentales. En la figura 7.5 se representan los valores de los logaritmos de las constantes efectivas frente al pH para la interacción de los cuatro receptores estudiados con ATP, ADP y AMP.

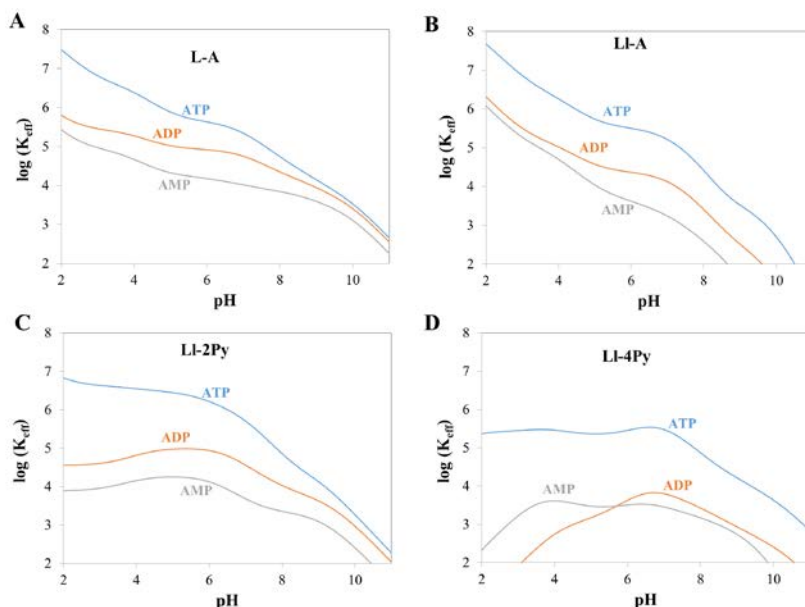


Figura 7.5. Logaritmos de las constantes efectivas frente al pH para la interacción con ATP, ADP y AMP de (A) **L-A**; (B) **LI-A**; (C) **LI-2Py**; y (D) **LI-4Py**. Calculadas para una concentración inicial de 1.0×10^{-3} M.

Las constantes efectivas para todos los receptores se incrementan progresivamente desde pH básico hasta pH 6. A lo largo de este intervalo, mientras los nucleótidos están completamente desprotonados, los receptores pueden protonarse, incrementando su carga positiva, lo cual favorecerá las atracciones electrostáticas. A valores de pH menores los nucleótidos se empiezan a protonar y, por tanto, a reducir sus cargas negativas. En este intervalo se observan dos comportamientos diferentes: mientras las constantes efectivas de los receptores que contienen piridina ya no aumentan, los complejos formados por los ligandos que contienen antraceno siguen aumentando en estabilidad. Este hecho puede asociarse, como discutiremos más adelante, a un apilamiento π - π más eficiente entre la unidad de antraceno y la nucleobase.

Comparando los tres mononucleótidos estudiados en este caso, la secuencia de estabilidad sigue, en general, la serie $ATP > ADP > AMP$. Esta secuencia hace resaltar el hecho de que el número de cargas negativas

en los aniones es uno de los factores más relevantes para modular la magnitud de la interacción. Hay una excepción a esta secuencia en el caso del compuesto **LI-4Py**: a valores de pH ácidos el aducto con AMP es más estable que el de ADP. Esto podría deberse a un emparejamiento particularmente favorable entre el mononucleótido y el receptor, impulsado por la protonación de la adenina y del cual existen ejemplos similares en la literatura [284].

Para poder visualizar la selectividad de los diferentes receptores frente al ATP se ha realizado una representación del porcentaje de ATP complejoado, en una hipotética mezcla equimolar de ligandos y ATP, frente al pH (figura 7.6). Esta simulación está basada en las constantes de basicidad calculadas individualmente para cada receptor, asumiendo que no se forman complejos mixtos. En la figura podemos observar que a valores de pH básicos e intermedios (pH 6-9) la interacción del ATP está favorecida con los ligandos funcionalizados con piridina, frente a los que contienen antraceno. Esta situación se invierte a valores de pH ácidos (pH < 4). Esto nos indica que existen dos modos diferentes de interacción con el ATP dependiendo de si el sustituyente en la cadena lateral es antraceno o piridina: apilamiento π o enlace de hidrógeno, respectivamente. Como se explicará más adelante, la piridina puede establecer un doble enlace de hidrógeno con la nucleobase de adenina, el cual es energéticamente más favorable que la interacción π - π del antraceno. Sin embargo, cuando el nitrógeno N1 de la adenina se protona a valores de pH inferiores a 4, el carácter electrón deficiente de la adenina promueve el apilamiento π entre al antraceno del receptor y la nucleobase.

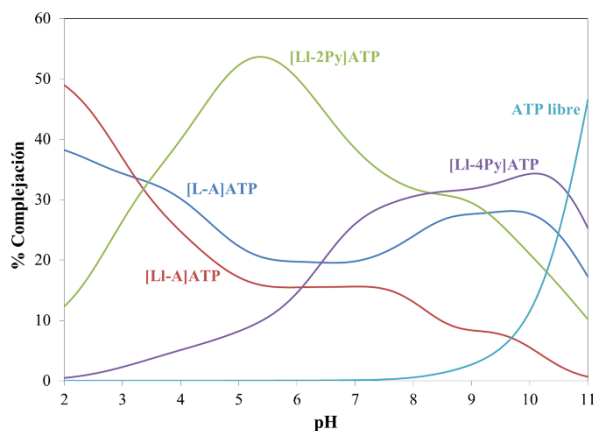


Figura 7.6. Predicción del porcentaje de ATP complejado en función del pH, para una mezcla equimolar de los cuatro receptores y el ATP (concentración 1.0×10^{-3} M para todos los componentes).

En cuanto a las variaciones en la selectividad de los cuatro receptores frente a diferentes tipos de nucleobase, en la figura 7.7 podemos ver la representación de las constantes efectivas (K_{eff}) para la interacción de los receptores estudiados con dos bases púricas, ATP y GTP, y la base pirimidínica UTP. En la figura se aprecia que la selectividad para los receptores basados en antraceno sigue la secuencia $GTP > ATP \gg UTP$. Por otro lado los receptores funcionalizados con piridina tienen una afinidad mucho mayor por el ATP que por el GTP o el UTP, con una secuencia de tipo $ATP \gg GTP > UTP$. Como ya se ha venido discutiendo, estas diferencias en la selectividad se pueden explicar en términos de dos mecanismos de interacción diferentes: apilamiento π entre el antraceno y la nucleobase y enlace de hidrógeno entre la piridina y la adenina. La red de enlaces de hidrógeno sólo puede establecerse si la nucleobase es adenina y no guanina o uracilo.

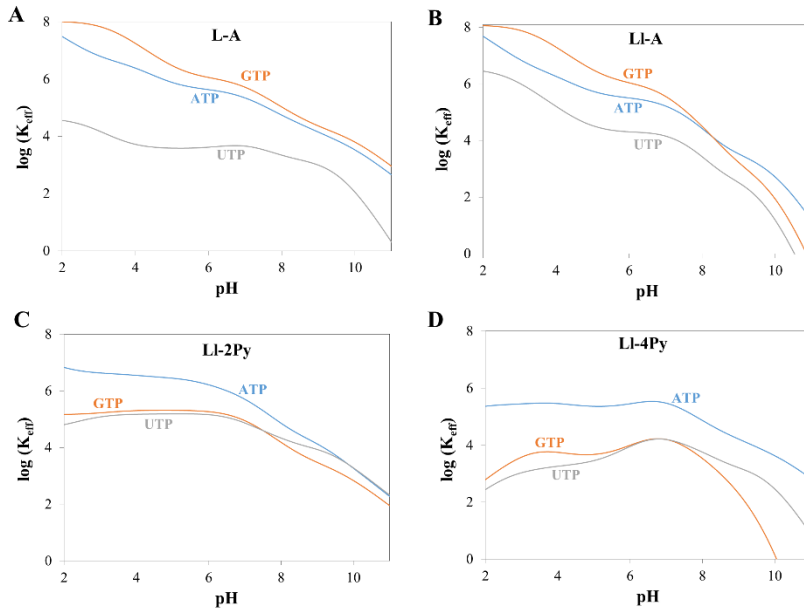


Figura 7.7. Logaritmos de las constantes efectivas frente al pH para la interacción de los receptores poliamínicos con GTP, ATP y UTP calculadas para una concentración inicial de 1.0×10^{-3} M.

El resultado más destacable resulta de la interacción del compuesto **LI-4Py**, el cual es capaz de reconocer ATP sobre GTP y UTP. Esto se aprecia en el diagrama de distribución de especies en función del pH de un sistema conteniendo cantidades equimolares de ligando, ATP, GTP y UTP, representado en la figura 7.8. Se puede apreciar cómo el porcentaje global de ligando unido a ATP predomina sobre todo el intervalo de pH, siendo el complejo **[LI-4Py]ATP** casi la única especie (80-90%).

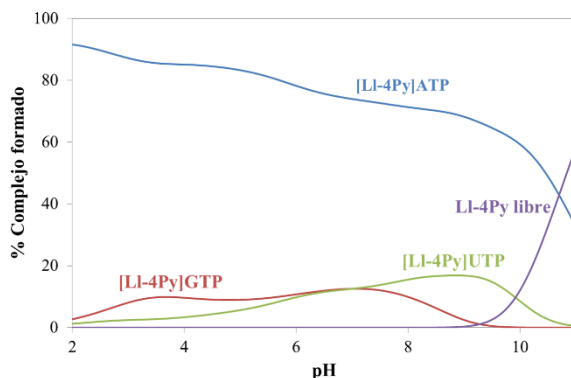


Figura 7.8. Representación de la complejación de mononucleótidos en función del pH para una mezcla equimolar de **LI-4Py**, ATP, GTP y UTP (concentración 1×10^{-3} M en relación 1:1:1:1).

7.1.2. Estudios de resonancia magnética nuclear

Para esclarecer el tipo de interacción que tiene lugar entre los receptores estudiados y los mononucleótidos ATP y GTP se llevaron a cabo estudios de RMN ^1H y ^{31}P . Éstos se realizaron a pH 4.5, para asegurar la correcta solubilización de los compuestos, manteniendo la concentración del receptor constante y añadiendo cantidades crecientes de mononucleótido, hasta un exceso de 1:3.

En la figura 7.9 se muestra la región aromática de los espectros de RMN ^1H en D_2O para los sistemas **L-A**, ATP y **L-A+ATP**. Las señales p3 y p4, correspondientes a los protones localizados en el anillo de piridina del macrociclo (ver figura 7.2) muestran pequeños desplazamientos (< 0.03 ppm), lo que indica que la interacción con el sustrato tiene poca influencia sobre ellos. Por el contrario, las señales A3 y A4, los protones en los extremos del antraceno, sufren un desplazamiento a campo alto de 0.16 ppm, mientras A2 y A5 se desplazan 0.27 ppm. La señal que más se desplaza a campo alto es A1, el protón central del antraceno, con un desplazamiento inducido por el sustrato de 0.43 ppm.

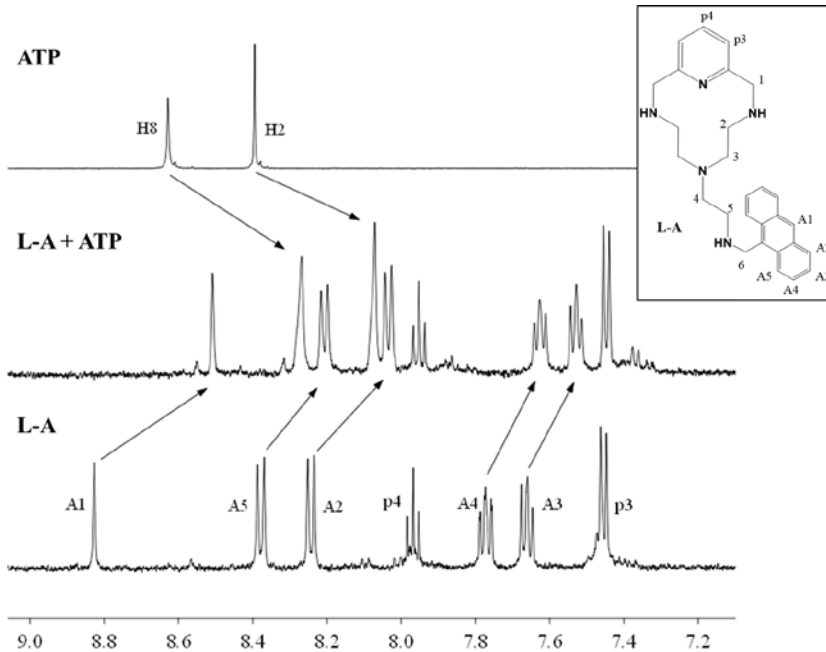


Figura 7.9. Región aromática del espectro de RMN ^1H del ATP (arriba), **L-A** (abajo) y una mezcla de **L-A** + ATP (en medio) a una concentración de 1×10^{-3} M en D_2O y pD 4.5.

La situación descrita antes es similar a la observada en la interacción con GTP del **L-A**, mostrada en la figura 7.10. Las señales de los protones del anillo de piridina muestran desplazamientos despreciables, pero los protones localizados en la unidad de antraceno muestran grandes desplazamientos inducidos por la interacción. Los desplazamientos a campo alto de los protones aromáticos y anoméricos del ATP respaldan también la hipótesis de la interacción mediante apilamiento π - π entre las unidades heteroatómicas del sustrato y receptor.

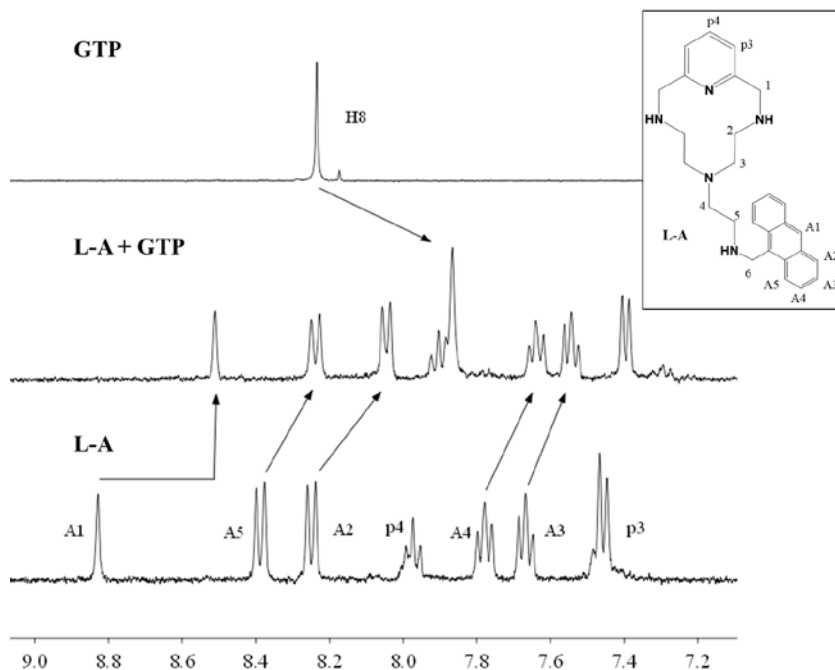


Figura 7.10. Región aromática del espectro de RMN ^1H del GTP (arriba), L-A (abajo) y una mezcla de L-A + GTP (en medio) a una concentración de 1×10^{-3} M en D_2O y pD 4.5.

Una situación diferente se observa en el caso de los receptores basados en piridina, **LI-2Py** y **LI-4Py**. En estos casos no se registraron desplazamientos significativos en las señales aromáticas de los dos anillos de piridina (uno en el macrociclo y otro en la cadena lateral), todos ellos con desplazamientos entre 0.05 y 0.20 ppm. Los cambios más significativos se observaron en el caso del compuesto sustituido con la 4-piridina (figuras 7.11 y 7.12). La señal $p3'$, correspondiente a la piridina de la cadena lateral, se desplaza a campo bajo 0.30 ppm. La otra señal de la piridina, $p2'$, no muestra ningún cambio significativo, y las señales de la piridina del macrociclo se desplazan a campo alto 0.20 ppm. En estos sistemas, las señales aromáticas de los mononucleótidos se desplazan a campo alto, pero con magnitudes mucho menores que las observadas para el compuesto de antraceno. Estos resultados nos sugieren que existe un mecanismo de interacción diferente entre los mononucleótidos y el **LI-4Py**.

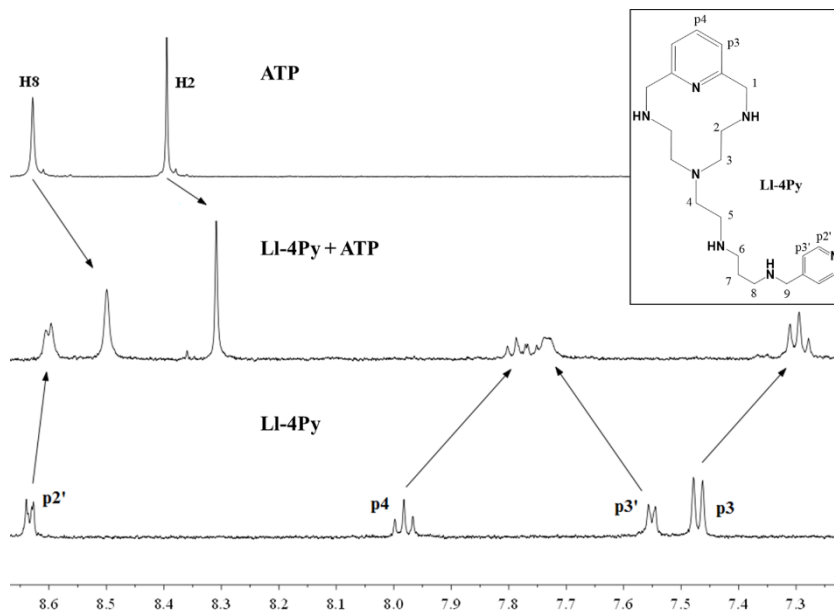


Figura 7.11. Región aromática del espectro de RMN ¹H del ATP (arriba), **LI-4Py** (abajo) y una mezcla de **LI-4Py** + ATP (en medio) a una concentración de 1×10^{-3} M en D₂O y pD 4.5.

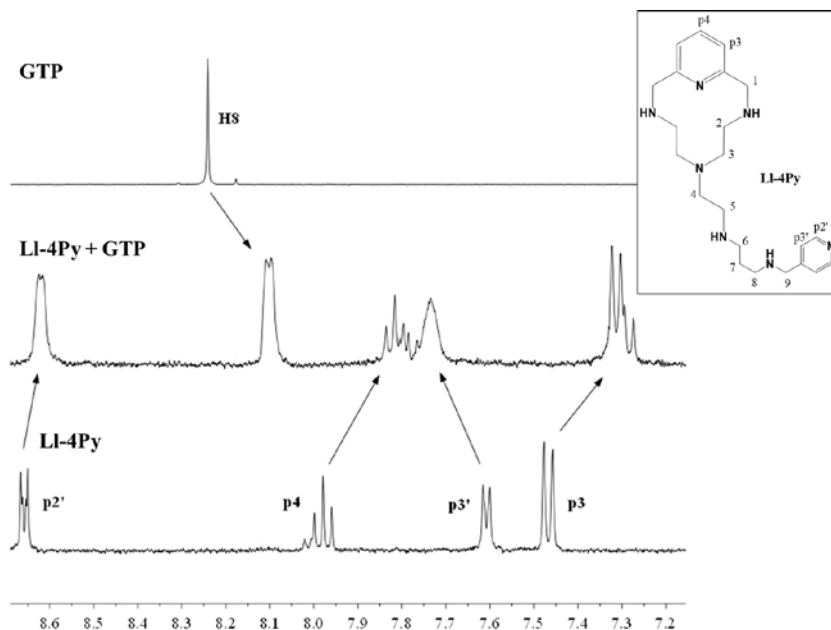


Figura 7.12. Región aromática del espectro de RMN ^1H del GTP (arriba), **LI-4Py** (abajo) y una mezcla de **LI-4Py** + GTP (en medio) a una concentración de 1×10^{-3} M en D_2O y pD 4.5.

La región alifática del espectro de RMN ^1H nos da información adicional acerca del modo de interacción. En el caso de los sistemas **L-A+ATP** y **L-A+GTP**, las señales de los protones 5 y 6 se desplazan a campo alto, mientras que las señales restantes se mueven ligeramente a campo bajo, particularmente la señal del protón 1, o bien no experimentan ningún cambio. En estos dos sistemas, los protones anoméricos de los nucleótidos experimentan desplazamientos a campo alto significativos. Esto refuerza la idea de que la interacción involucra al antraceno de la cadena lateral y a la nucleobase del ATP o del GTP. Para los sistemas **LI-2Py+ATP** y **LI-4Py+ATP** no se observaron desplazamientos de los protones anoméricos, mientras que los protones 1 y 6 se desplazan ligeramente a campo bajo.

También se ha obtenido información complementaria a partir de los espectros de ^{31}P . En estos espectros se aprecia la contribución electrostática de la interacción nucleótido-receptor, evidenciada en el

desplazamiento a campo bajo de las señales ^{31}P de la cadena fosfatada del mononucleótido tras interaccionar con el receptor cargado positivamente. Los desplazamientos de las señales P_γ y P_β fueron intensos, mientras que los de la señal P_α no fueron significativos, como suele ocurrir en sistemas de este tipo [276, 285, 286]. Como ejemplo, en la figura 7.13, se muestran los desplazamientos de las señales de ^{31}P de los sistemas receptor-GTP frente a la relación molar GTP/receptor.

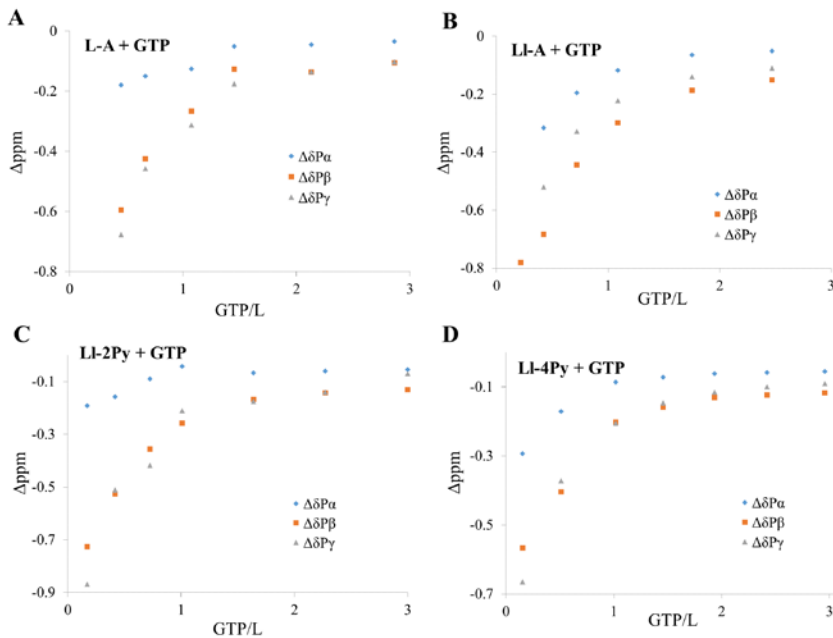


Figura 7.13. Desplazamientos químicos de las señales de ^{31}P del GTP al interaccionar con los receptores estudiados.

7.1.3. Estudios fotoquímicos

La presencia del fluoróforo antraceno en los receptores **L-A** y **LAI-A** ha hecho posible el uso de la espectroscopia de fluorescencia para obtener información adicional acerca de la naturaleza de las especies generadas con los nucleótidos. Todos estos estudios se realizaron en medio tamponado a pH 7, empleando como longitud de onda de excitación el punto isobéptico que aparece en el espectro de absorción de la valoración del receptor con el polinucleótido a 372 nm, para garantizar que no existen variaciones en la energía de excitación durante el experimento. La absorción de todos los nucleótidos a esta longitud de onda es, además, despreciable.

La estequiometría promedio de los complejos supramoleculares se ha determinado mediante el método de la variación continua, también conocido como diagramas de Job [287]. Para esto se representó $\Delta A_f = A_f$ (libre) - A_f (complejado) frente a la proporción de concentraciones $R = \frac{[\text{receptor}]}{([\text{receptor}] + [\text{nucleótido}])}$, en donde A_f es el área de la emisión de la fluorescencia del receptor, libre o complejado al nucleótido, a una concentración total ($[\text{receptor}] + [\text{nucleótido}]$) constante [214]. De los diagramas de Job para estos sistemas, representados en la figura 7.14, se deduce una estequiometría 1:1 para los complejos, ya que la abscisa del máximo es 0.5.

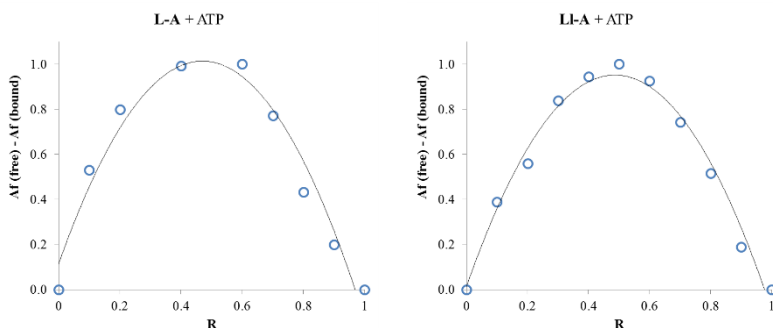


Figura 7.14. Diagramas de Job para la interacción de los receptores fluorescentes con ATP. Los espectros se realizaron en medio tamponado a pH 7 y una concentración total constante $[\text{receptor}] + [\text{ATP}] = 1 \times 10^{-5}$ M.

La selectividad de ambos receptores hacia el ATP y el GTP fue también explorada mediante estudios de fluorescencia. Como ya se discutió en el capítulo 6 de esta tesis doctoral, la intensidad de la emisión de fluorescencia de los ligandos libres se desactiva a medida que el grado de protonación disminuye. Este fenómeno es atribuido a un proceso de transferencia electrónica fotoinducida (efecto PET) desde el par de electrones libre de la amina hacia la unidad aromática en estado excitado. Interesantemente, la emisión de fluorescencia de los receptores cambia drásticamente con la adición de los nucleótidos.

En la figura 7.15 podemos observar las curvas de valoración del receptor **L-A** en presencia de un exceso de ATP o GTP, superpuestas al respectivo diagrama de distribución de especies (el comportamiento del receptor alargado es completamente análogo). Las curvas de valoración obtenidas para los sistemas receptor-ATP (figura 7.15, arriba) tienen una forma de campana, con la emisión desactivada a valores de pH ácidos o muy básicos. El máximo de la emisión se alcanza a valores de pH intermedios y se mantiene hasta pH 8.5, aproximadamente dos unidades de pH después de que el mismo efecto tenga lugar en el ligando libre. Este aumento de la fluorescencia (efecto CHEF, discutido en la introducción de esta tesis) involucra la formación de las especies $[\text{H}_3(\text{L-A})(\text{ATP})]^-$ y $[\text{H}_2(\text{L-A})(\text{ATP})]^{2-}$.

Por el contrario, la interacción con GTP (figura 7.15, abajo) conduce a una atenuación casi total de la emisión de fluorescencia a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado (efecto CHEQ). Este interesante comportamiento permite discriminar fácilmente y a simple vista entre dos disoluciones de ATP y GTP, tal como se aprecia en la fotografía de la figura 7.16.

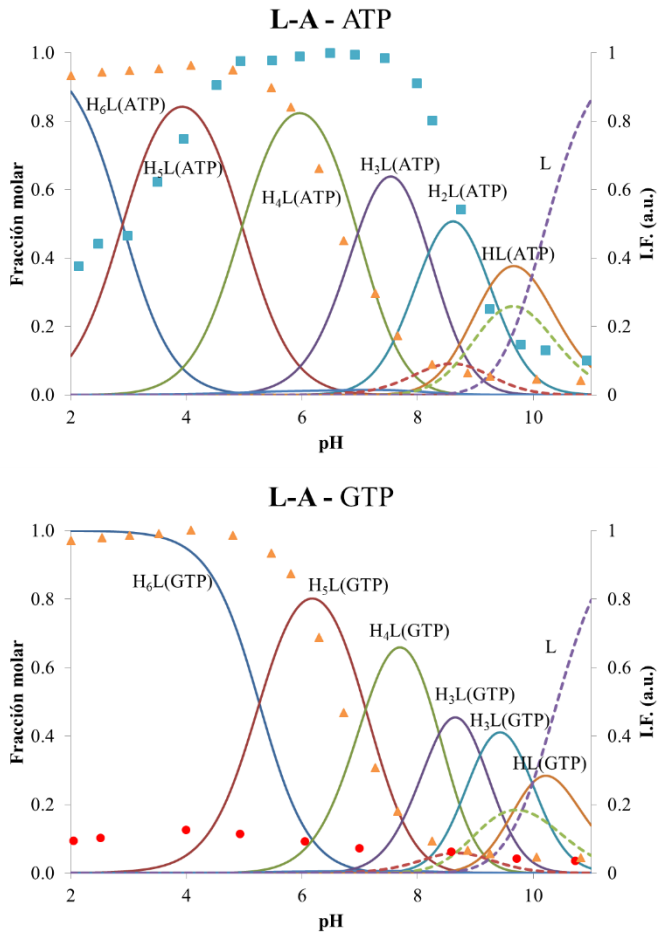


Figura 7.15. Emisión de fluorescencia para la valoración del **L-A** libre (triángulos naranja, ▲) y para los sistemas **L-A – ATP** (arriba, ■) y **L-A – GTP** (abajo, ●). La fracción molar de las distintas especies está representada por las líneas sólidas.

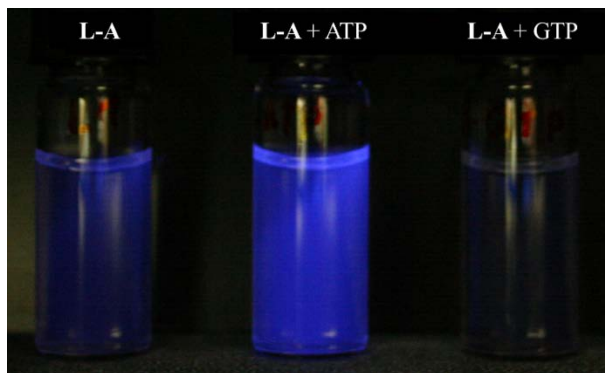


Figura 7.16. Fotografía de tres viales conteniendo, de izquierda a derecha, soluciones de **L-A**, **L-A + ATP** y **L-A + GTP** a pH 7.

Para caracterizar el comportamiento fotoquímico de estos sistemas se procedió a determinar los rendimientos cuánticos de fluorescencia de los dos receptores libres y de sus aductos con ATP o GTP, a diferentes valores de pH. Los resultados, presentados en la tabla 7.5, muestran un incremento de los rendimientos cuánticos al añadir cantidades crecientes de ATP, así como un desplazamiento de 5 nm al rojo del máximo de emisión. Para los ligandos libres no fue posible medir los rendimientos cuánticos a valores de pH por encima de 7 debido a su escasa fluorescencia. Sin embargo, al añadir ATP, los rendimientos cuánticos siguen siendo altos ($> 60\%$) a un pH de 7.5. Por el contrario, los rendimientos cuánticos de los complejos $[\mathbf{L-A}]GTP$ son bajos ($< 6\%$) para todos los valores de pH medidos.

Se determinaron también los tiempos de vida de fluorescencia de las distintas especies en disolución a diferentes valores de pH. En el caso de la interacción con ATP la desactivación de la fluorescencia fue ajustada adecuadamente a una monoexponencial con tiempos de vida entre 15 y 19 ns. Para la interacción con GTP la cinética de la desactivación se ajustó a un perfil biexponencial, el cual puede ser atribuido a la interacción de las formas tautoméricas ceto-enólicas del GTP con el receptor. La deconvolución de las trazas de desactivación dio como resultado tiempos de vida de 2 a 4 y de 6 a 10 ns para las componentes de vida corta y larga, respectivamente. Estos valores son mucho menores que las desactivaciones monoexponenciales observadas para los ligandos libres, que están entre 10 y 16 ns.

Tabla 7.5. Rendimientos cuánticos y tiempos de vida de fluorescencia de los receptores **L-A** y **LI-A** libres y complejados con ATP y GTP.

Sistema	pH	$t_{1/2}$ (ns) ^a	Especie ^b	Φ_F ^c
L-A	3.9	14.1	L-AH₃	0.60
L-A	6.0	13.2	L-AH_{3/2}	0.49
LI-A	4.1	15.7	LI-AH₄	0.58
LI-A	6.0	9.8	LI-AH₃	0.45
L-A + ATP	3.9	15.5	[L-A]ATPH ₅	0.46
L-A + ATP	6.0	18.1	[L-A]ATPH ₄	0.68
L-A + ATP	7.5	18.1	[L-A]ATPH ₃	0.66
LI-A + ATP	4.1	17.7	[LI-A]ATPH ₆	0.51
LI-A + ATP	5.9	19.6	[LI-A]ATPH ₅	0.65
LI-A + ATP	7.6	19.6	[LI-A]ATPH ₄	0.62
L-A + GTP	3.0	$\tau_1=2.4$ (0.62) $\tau_2=8.3$ (0.38)	[L-A]GTPH ₆	0.06
L-A + GTP	6.2	$\tau_1=2.5$ (0.44) $\tau_2=6.4$ (0.56)	[L-A]GTPH ₅	0.04
L-A + GTP	7.7	$\tau_1=2.6$ (0.25) $\tau_2=5.3$ (0.75)	[L-A]GTPH ₄	0.04
LI-A + GTP	3.0	$\tau_1=4.3$ (0.75) $\tau_2=10.3$ (0.25)	[LI-A]GTPH ₇	0.06
LI-A + GTP	6.4	$\tau_1=5.9$ (0.92) $\tau_2=17.3$ (0.08)	[LI-A]GTPH ₆	0.06
LI-A + GTP	7.4	$\tau_1=3.3$ (0.53) $\tau_2=8.0$ (0.47)	[LI-A]GTPH ₅	0.06

^aEl número en paréntesis corresponde con el factor pre-exponencial. ^bCargas omitidas. ^cValores absolutos.

Adicionalmente, se realizaron valoraciones espectrofluorimétricas del receptor **L-A** con cantidades crecientes del mononucleótido para calcular las constantes de estabilidad. Los datos obtenidos se ajustaron a un modelo de interacción 1:1 mediante el programa de ajuste de mínimos cuadrados no lineal descrito en el capítulo 4 de esta tesis [208]. Los resultados obtenidos para la interacción de **L-A** con ATP y GTP fueron $\log K_{[\text{L-A}]\text{ATP}} = 5.3(1)$ y $\log K_{[\text{L-A}]\text{GTP}} = 5.6(2)$. Estos valores coinciden perfectamente con los obtenidos mediante la técnica de potenciometría para ese valor de pH (5.3 y 5.7, respectivamente).

7.1.4. Estudios teóricos

Los estudios teóricos de estos sistemas fueron realizados en colaboración con el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de las Islas Baleares. En este apartado presentaremos las conclusiones más relevantes de este trabajo.

Como ya se ha discutido en los apartados anteriores, los receptores que contienen antraceno, **L-A** y **LI-A**, tienen mayor afinidad por el GTP que por ATP, y mucha menos afinidad por el UTP. Por el contrario, los receptores basados en piridina, **LI-2Py** y **LI-4Py**, tienen mayor afinidad por el ATP que por GTP y UTP. Dado que la principal diferencia entre ambos tipos de receptores consiste en el tipo de unidad aromática enlazada a la cadena lateral, se consideró interesante modelizar la interacción entre las dos unidades aromáticas, antraceno y piridina, tanto con adenina como con guanina. En la figura 7.17 se muestran las estructuras optimizadas (sin restricciones de simetría) obtenidas para los complejos π - π de antraceno. La estructura calculada para el complejo antraceno-guanina tiene una mayor afinidad que aquellas de adenina o uracilo, lo cual está en concordancia con los datos experimentales.

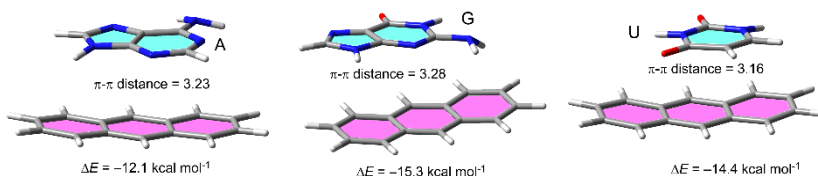


Figura 7.17. Estructuras optimizadas (BP86-D3/def2-TZVPD) de los complejos π - π de antraceno con las nucleobases. Distancias dadas en Å.

Los mismos cálculos se realizaron para el anillo de piridina. Las estructuras obtenidas para los complejos π - π se representan en la figura 7.18. En este caso las energías de interacción de los complejos de adenina y guanina son similares ($\Delta\Delta E < 1 \text{ kcal mol}^{-1}$), siendo el complejo con

uracilo el menos favorecido. Experimentalmente, sin embargo, el receptor tiene mayor afinidad por la adenina que por la guanina y parece interactuar a través de un modo diferente al apilamiento π . Por este motivo se exploró también la posibilidad de formar dos enlaces de hidrógeno con la adenina. La energía de esta interacción (a la derecha de la figura 7.18) es 1 kcal mol^{-1} más estable que la del complejo π - π con guanina. Ni la guanina ni el uracilo pueden formar este tipo de enlaces de hidrógeno. Estos resultados respaldan la evidencia experimental presentada anteriormente y la hipótesis de los diferentes modos de interacción.

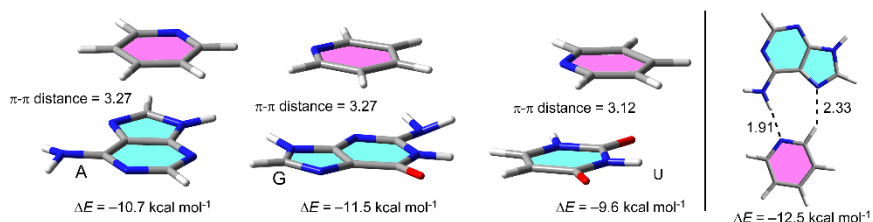


Figura 7.18. Izquierda: estructuras optimizadas (BP86-D3/def2-TZVPD) de los complejos π - π de piridina con las nucleobases. Derecha: estructura optimizada del complejo con adenina, mostrando el doble enlace de hidrógeno. Distancias dadas en Å.

Al extender estos estudios a la interacción de las moléculas completas, tanto de receptor como de los trifosfatos de adenina y guanina, se llegaron a conclusiones similares. En todos los casos se observó la interacción electrostática entre el trifosfato de la nucleobase y los grupos amonio de los receptores. También se observaron otro tipo de interacciones capaces de modular la estabilidad, como apilamiento π para el receptor **LI-A** y enlaces de hidrógeno en el caso del **LI-2Py**. Sin embargo para el receptor **LI-4Py**, la posición *para* está ocupada por un nitrógeno, lo que dificulta la formación de los dos enlaces de hidrógeno intramoleculares, los cuales no se observan en la minimización.

Para ilustrar el buen ajuste entre receptor y sustrato, en la figura 7.19 se muestra como ejemplo la representación CPK del complejo **LI-A** con el GTP. En ella se aprecia que el grupo trifosfato está estabilizado por

la parte poliamínica del receptor, mientras que el anillo de guanina está perfectamente apilado sobre la unidad de antraceno.

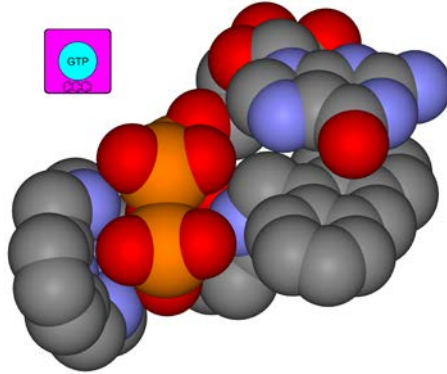


Figura 7.19. Representación del modelo optimizado para la interacción del **LI-A** con GTP.

7.2 Interacción con ácidos nucleicos monohebra

Dando un paso más en la complejidad de los sistemas estudiados y con el objetivo de verificar si las observaciones hechas en el apartado anterior se extienden también a sistemas poliméricos, pasamos en este capítulo a exponer los resultados obtenidos para la interacción de uno de los receptores con ácidos nucleicos monohebra, que son las cadenas o polímeros lineales de los mononucleótidos.

Si bien la mayoría de moléculas de ADN que se encuentran en la naturaleza son de doble hebra, en el caso de los cromosomas humanos los extremos 3' del ADN terminan en pequeñas secuencias monohebra llamadas telómeros [288], las cuales se han asociado al envejecimiento celular y cuya disfunción puede estar involucrada en el desarrollo de tumores [289]. También existen virus cuyo genoma consiste en ADN monohebra (virus del Grupo II) [290]. Y si bien en un principio este tipo de virus se consideró minoritario, estudios recientes parecen indicar que éste sea el grupo de virus más importante en los océanos [291].

Al contrario que las moléculas de ADN, en la mayoría de los casos las moléculas de ARN en la naturaleza consisten de una hebra sencilla plegada sobre sí misma. Por todos estos motivos el estudio de pequeñas moléculas capaces de interactuar con secuencias de polinucleótidos de hebra sencilla es de gran importancia, y desde la perspectiva de la química supramolecular, como ya se discutió en el apartado 1.2.2 de la introducción, las poliaminas son candidatos ideales para establecer interacciones no covalentes con estos polímeros.

Para llevar a cabo estos estudios se han seleccionado, como sustrato, cuatro secuencias de polinucleótidos: poli-A, poli-G, poli-C y poli-U. Mientras que como modelo de receptor se ha seleccionado el compuesto **L-A**.

7.2.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis

Para obtener información que nos permitiera dilucidar el modo de interacción se llevaron a cabo valoraciones espectrofotométricas del receptor con las secuencias de polinucleótidos seleccionadas. Los cambios observados en el espectro UV-Vis del receptor al añadir cantidades crecientes de polinucleótido se pueden clasificar en dos grupos, dependiendo de si el polinucleótido está conformado por nucleobases púricas (adenina y guanina) o pirimidínicas (citosina y uracilo). En el caso de los polinucleótidos con bases púricas, poli-A y poli-G, se observó un efecto hipocrómico junto con un desplazamiento batocrómico de 4 y 7 nm para el poli-A y poli-G, respectivamente (figura 7.20). Este comportamiento es característico de las interacciones por apilamiento π - π [292, 293, 294]. A medida que se incrementaba la cantidad de polinucleótido añadido se observó también un desplazamiento de la línea base del espectro por encima de 450 nm, lo cual puede ser atribuido a la formación de agregados insolubles [295]. Este comportamiento es mucho más acusado en el caso de la secuencia poly G. Por este motivo es difícil asignar puntos isobésticos de manera inequívoca.

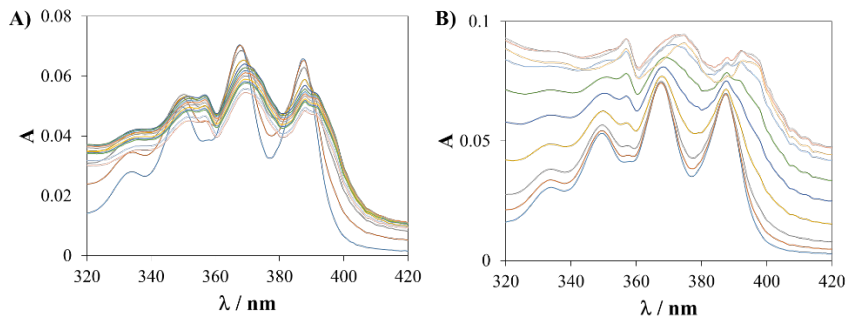


Figura 7.20. Espectros de absorción del L-A con cantidades crecientes (de 0 a 5 equivalentes) de A) poli-A y B) poli-G.

Hay que tener en cuenta que, en las condiciones en las que se realizaron estos experimentos (pH neutro y temperatura ambiente), se ha establecido que la secuencia poli-A existe en disolución como una hélice monohebra y flexible de bases apiladas [296]. Esta conformación podría permitir la intercalación de la unidad aromática plana de antraceno del receptor, de manera similar al modo de interacción ya descrito para otras moléculas [292], y que explicarían el perfil de absorción observado. Por otra parte la conformación de la secuencia poli-G ha sido descrita como una estructura paralela de cuartetos de guanina o G-cuadruplex [297], la cual también permitiría que las interacciones por apilamiento entre las bases tuviera lugar.

Un comportamiento diferente se observó en la interacción del receptor con los polinucleótidos basados en pirimidinas. En estos casos los espectros de UV-Vis muestran solo una pequeña disminución de la absorción del cromóforo de antraceno, ningún desplazamiento del máximo de absorción y una línea base bien definida a lo largo de toda la valoración (figura 7.21). Este comportamiento parece indicar un tipo de interacción puramente electrostática. Ha sido reportado que el poli-U no posee ninguna estructura específica a temperatura ambiente, indicando la ausencia de interacciones de apilamiento entre las bases de uridina, lo que conduce a una conformación enrollada al azar [298].

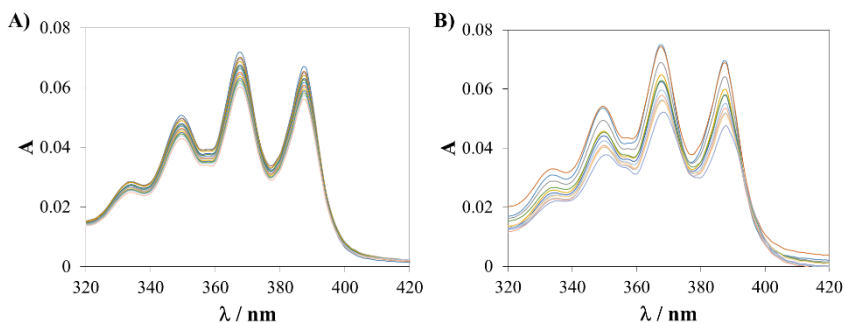


Figura 7.21. Espectros de absorción del L-A con cantidades crecientes (de 0 a 5 equivalentes) de (A) poli-C y (B) poli-U.

Estos datos están en buena concordancia con los resultados presentados en el apartado anterior respecto a la interacción de este receptor con los mononucleótidos, en los que había una preferencia en la interacción con los mononucleótidos de bases púricas (GTP > ATP >> UTP) debido a las interacciones de apilamiento π .

7.2.2. Espectroscopia emisión de fluorescencia

La intensa emisión de fluorescencia del receptor **L-A**, con una longitud de onda de excitación de 367 nm, nos permitió seguir las valoraciones mediante esta técnica, ya que los polinucleótidos no absorben luz a longitudes de onda por encima de los 300 nm. La adición de los cuatro polinucleótidos monohebra estudiados volvió a dar lugar a dos patrones de emisión de fluorescencia diferentes. Al valorar el receptor con los polinucleótidos conformados por bases púricas, poli-A y poli-G, se produjo primero una disminución de la fluorescencia, seguida luego de un aumento sustancial de la intensidad de la misma (figura 7.22). Este comportamiento bifásico ya ha sido descrito con anterioridad para otros sistemas [258, 299] y sugiere la existencia de dos modos de interacción diferentes: cuando la proporción [polinucleótido]/[receptor] es baja, el gran exceso de moléculas de ligando forman complejos externos alrededor de las pocas hebras de polinucleótido mediante la atracción electrostática que se establece con la cadena fosfatada. Esta interacción da lugar a la disminución de la fluorescencia. Cuando la proporción [polinucleótido]/[receptor] sobrepasa un cierto punto, comienza a haber suficientes pares de bases para que tenga lugar el fenómeno de la intercalación, el cual da como resultado un incremento de la fluorescencia debido a la inmovilización de los fluoróforos dentro del espacio hidrofóbico creado entre las bases apiladas.

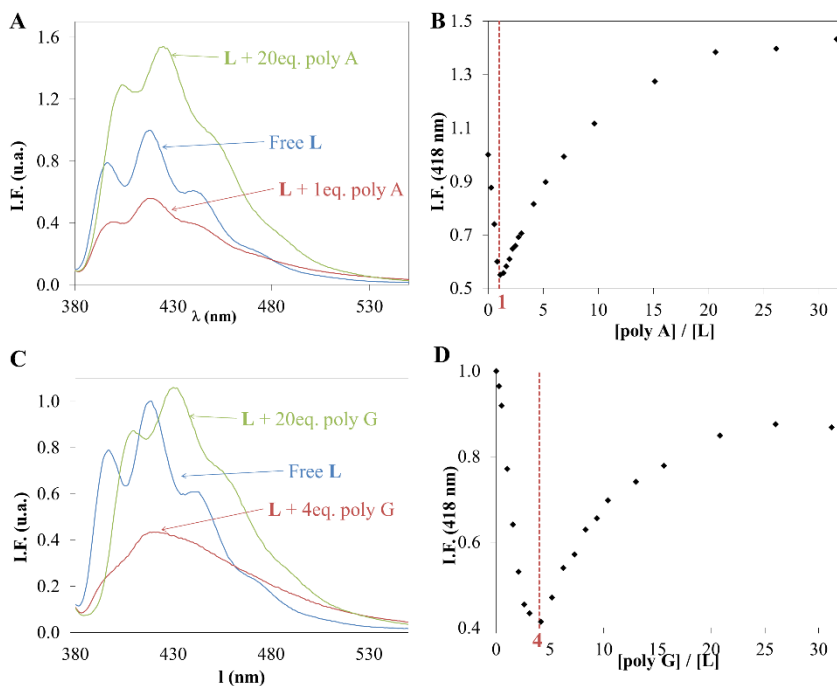


Figura 7.22. Espectros de emisión de fluorescencia y curvas de valoración para una disolución de **L-A** (20 μM , $\lambda_{\text{exc}} = 367 \text{ nm}$) con (A, B) poli-A y (B, C) poli-G. La línea roja discontinua indica el punto de inversión en los cambios de la emisión.

En el caso de la monohebra poli A, el cambio en la tendencia de la emisión tiene lugar cuando se alcanza una proporción $[\text{poli-A}]/[\text{receptor}]$ de 1:1. A partir de entonces la fluorescencia aumenta hasta un 140% respecto a la emisión del ligando libre (figura 7.22.A y B). En el caso de poli G, la fluorescencia se desactiva parcialmente, quedando una banda sin estructura cuando se alcanza una proporción 4:1 de $[\text{poli-G}]/[\text{receptor}]$. A partir de este momento la emisión aumenta hasta recobrar su intensidad y estructura original (figura 7.22.C y D). Este comportamiento podría estar apuntando hacia la formación de estructuras de tipo cuarteto de guanina en la disolución. Tanto en el caso de la valoración con poli-A como con poli-G, el máximo de la emisión se desplaza al rojo 8 nm, lo que indica la estabilización del estado excitado del fluoróforo al formarse el complejo.

Por el contrario, los cambios observados en la emisión de fluorescencia durante la valoración con los polinucleótidos pirimidínicos, poli-C y poli-U, son despreciables. No se observó ningún cambio importante en la intensidad de la emisión ni tampoco un desplazamiento de la longitud de onda del máximo (figura 7.23). Este comportamiento, de nuevo, apoya la hipótesis de que el modo de interacción por intercalación sólo tiene lugar en los polinucleótidos basados en nucleobases púricas, poli-A y poli-G.

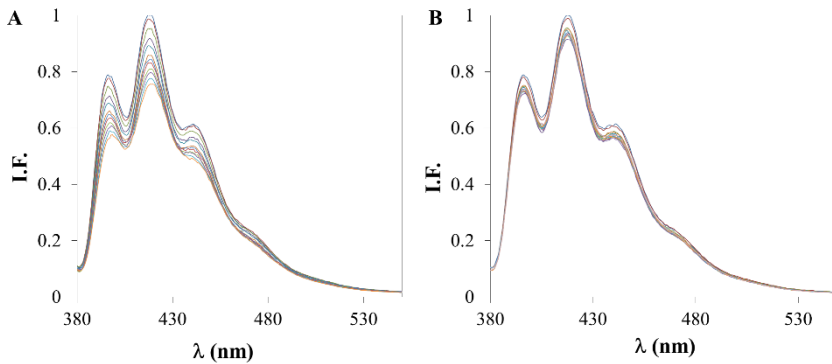


Figura 7.23. Espectros de emisión de fluorescencia del L-A ($20 \mu\text{M}$, $\lambda_{\text{exc}} = 367 \text{ nm}$) con cantidades crecientes de (A) poli-U y (B) poli-C.

7.3 Interacción con ácidos nucleicos de doble hebra

Avanzando, de nuevo, en la complejidad de los sistemas estudiados, se pasó a estudiar la interacción de nuestros receptores con ácidos nucleicos con estructuras de doble hebra. Para estos estudios se seleccionaron cuatro polinucleótidos de cadena doble. Tres de ellos son secuencias sintéticas: poli-A–poli-U, como modelo de ARN, caracterizado por una estructura de hélice- α con un surco menor ancho y llano y un surco mayor estrecho y profundo (que suele ser el sitio de unión preferido para moléculas pequeñas) [248, 300]; poli-(dAT)₂, con una conformación de doble hélice dextrógira (forma B) que contiene un surco menor estrecho y un surco mayor ancho y poco profundo; y poli-(dGC)₂, también con forma B, pero con los grupos amino de la guanina sobresaliendo por el exterior del surco menor [221]. El cuarto polinucleótido seleccionado para los estudios ha sido el ADN de timo de ternera (ctADN, por sus siglas en inglés), con una secuencia de bases heterogénea y una conformación clásica de doble hélice B. Esta estructura de ADN se representa en la figura 7.24, para ilustrar los motivos estructurales a los que hemos hecho referencia.

En los dos primeros apartados de este capítulo se intentará dilucidar, mediante estudios espectrofluorimétricos, el modo de interacción y la afinidad del ligando **L-A** con las distintas secuencias de polinucleótidos de doble hebra. En el tercer apartado se expondrá cómo influyen en esta interacción los cambios conformacionales, inducidos en este ligando por cambios en el pH o por la presencia de cationes metálicos.

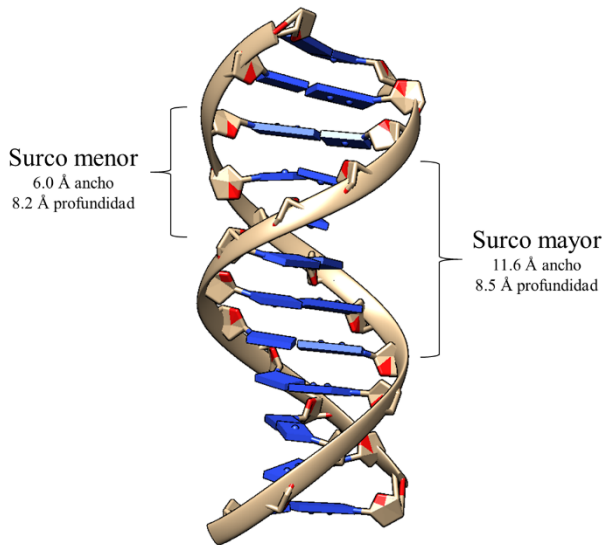


Figura 7.24. Elementos estructurales del ADN en la conformación B (PDB ref. 1S2R).

7.3.1. Espectroscopia de absorción UV-Vis

Se realizaron valoraciones mediante la adición de pequeñas cantidades de polinucleótido a una disolución del ligando. Los cambios registrados en el espectro UV-Vis se representan en la figura 7.25 y pueden resumirse en una fuerte disminución de la banda de absorción del cromóforo de antraceno acompañada de un desplazamiento batocrómico. Los puntos isobésticos observados sugieren la presencia de dos especies capaces de absorber luz a esas longitudes de onda, que se corresponderían con el ligando libre y unido al polinucleótido. Estos cambios espectrales observados son consistentes con un modo de interacción mediante la intercalación del cromóforo de antraceno entre los pares de bases, dando lugar a fuertes interacciones entre los estados electrónicos de ambos [293, 294]. Este modo de interacción ya ha sido descrito en la literatura para otros derivados del antraceno [301].

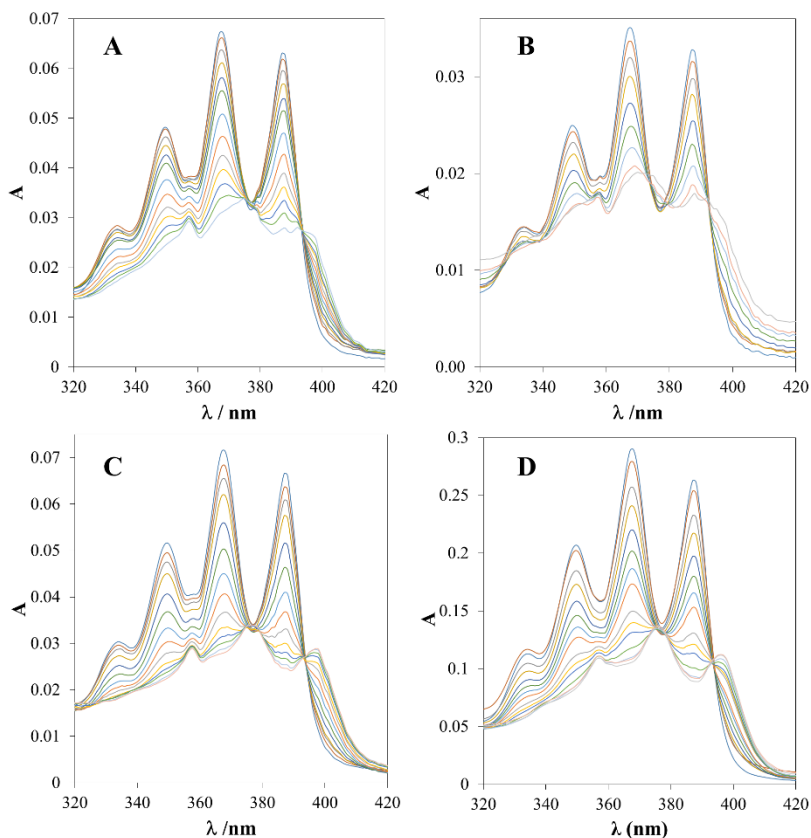


Figura 7.25. Espectros de absorción del **L-A** en presencia de cantidades crecientes (0-5 eq.) de (A) poli-A-poli-U ($[L-A]_0 = 20 \mu M$); (B) poli-(dAT)₂ ($[L-A]_0 = 10 \mu M$); (C) poli-(dGC)₂ ($[L-A]_0 = 20 \mu M$); (D) ctADN ($[L]_0 = 50 \mu M$).

En la tabla 7.6 se presentan los valores de la magnitud del hipocromismo y de los desplazamientos batocrómicos observados, junto con los valores de las constantes de estabilidad (**K**) y el número de pares de bases ocluidos por cada molécula de ligando (**N**), calculados a partir de estos espectros de absorción.

Tabla 7.6. Efecto hipocrómico (%H), desplazamiento del máximo de absorción ($\Delta \lambda_{\max}$), número de pares de bases ocluidos por cada molécula de ligando unida (N) y constantes de estabilidad (K). Valores calculados a partir de la valoración por UV-Vis a pH 7 (tampón cacodilato 50 mM).

	%H ^a	$\Delta \lambda_{\max}$ (nm) ^b	N ^c	log K ^d
poli-A–poli-U	0.59	+9	3.9	5.9
poli-(dAT) ₂	0.41	+7	1.2	5.7
poli-(dGC) ₂	0.58	+9	2.2	5.9
ctADN	0.63	+8	2.6	6.1

^a %H = $100 \cdot [\text{Abs}(\mathbf{L}_{\text{libre}} \text{ a } \lambda_{\max 367 \text{ nm}}) - \text{Abs}(\mathbf{L}_{\text{unido}} \text{ a } \lambda_{\max 367 \text{ nm}})] / \text{Abs}(\mathbf{L}_{\text{libre}} \text{ a } \lambda_{\max 367 \text{ nm}})$. ^b Desplazamiento = $\lambda_{\max}(\text{complejo}) - \lambda_{\max 367 \text{ nm}}(\mathbf{L})$. ^c Proporción N = total pares de base / $\mathbf{L}_{\text{unido}}$. ^d Valores de K y N obtenidos del ajuste de los datos de la valoración a un modelo de equilibrio simple para una interacción no competitiva [228].

La magnitud del hipocromismo y de los desplazamientos batocrómicos es similar en los casos del ribonucleótido poli-A–poli-U, el poli-(dGC)₂ y el ctADN, mientras que son menores en el caso del poli-(dAT)₂. Como ya se ha mencionado, este último polinucleótido presenta una estructura secundaria con un surco menor estrecho y profundo, con mayor densidad de carga, lo que lo hace que ligandos pequeños interaccionen de manera más favorable con el surco menor [73, 302]. De acuerdo con los valores de las constantes, **L-A** muestra una afinidad similar hacia todos los polinucleótidos estudiados (del orden de 10^6 M^{-1}), como cabría esperar dado que la afinidad total viene determinada principalmente por las fuertes interacciones electrostáticas. La selectividad, por otra parte, requiere sólo de pequeñas contribuciones energéticas [32]. En cualquier caso, el valor de K es ligeramente menor en la interacción con poli-(dAT)₂. Este hecho, sumado a un valor de N menor que el requerido para un proceso de intercalación ($N > 2$, de acuerdo con el principio de exclusión del vecino próximo [73]) indica de nuevo que la interacción con el surco sea el modo de interacción preferido entre el ligando y el poli-(dAT)₂, mientras que la intercalación parece ser más eficiente en el caso de los otros polinucleótidos estudiados.

7.3.2. Espectroscopia de emisión de fluorescencia

Al interactuar con los diferentes polinucleótidos de doble hebra estudiados la emisión de fluorescencia del ligando **L-A** muestra un comportamiento interesante y diferente en cada uno de los casos. Como se puede observar en la figura 7.26.A, la valoración con el ribonucleótido poli-A–poli-U produce una disminución del 55% en la emisión de la fluorescencia, con un desplazamiento del máximo de 14 nm hacia mayores longitudes de onda. Por el contrario la valoración con el poli-(dAT)₂ produce un aumento de la fluorescencia, con un desplazamiento del máximo de 13 nm hacia el rojo (figura 7.26.B). La valoración con poli-(dGC)₂ (figura 7.26.C) da lugar a una desactivación casi total (superior al 90%) de la emisión, sin ningún desplazamiento del máximo de la banda de emisión. Y, finalmente, la valoración con ctADN, con su secuencia de bases heterogénea (con 42% de pares de bases G/C, según el proveedor y la referencia [303]) da como resultado un comportamiento promedio, con una disminución de la emisión del 75% y un desplazamiento al rojo de 11 nm (figura 7.26.D).

Cabe destacar aquí que la banda a 432 nm del ligando se “activa” (estado ON), con un aumento del 40% en la intensidad de emisión, al interactuar con poli-(dAT)₂. Mientras que la misma banda de emisión se “desactiva” (estado OFF), con una reducción del 90% de la intensidad de emisión, cuando el ligando se une al poli-(dGC)₂. Consideramos que estos dos comportamientos, perfectamente diferenciados, abren la posibilidad de utilizar este ligando como una sonda selectiva para secuencias de ADN [304].

Interacción con aniones de interés biológico

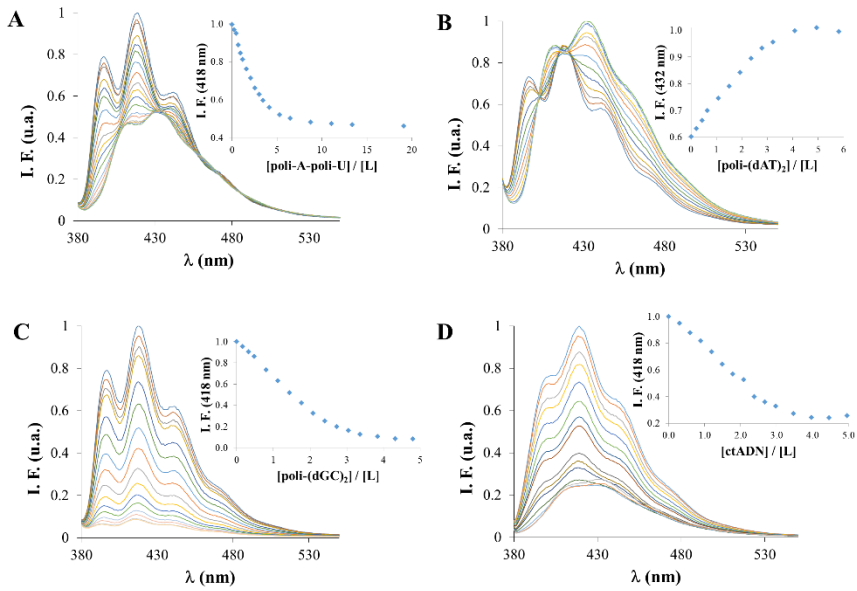


Figura 7.26. Espectros de emisión de fluorescencia y curvas de valoración de L-A con (A) poli-A-poli-U; (B) poli-(dAT)₂; (C) poli-(dGC)₂ y (D) ctADN.

7.4 Modulación de la interacción. Efecto alostérico

Como ya se ha discutido en el apartado 1.3 de la introducción a esta tesis doctoral, los ligandos de tipo escorpiando pueden adoptar dos tipos de conformaciones dependiendo del grado de protonación: una conformación abierta a pH 5, favorecida por las repulsiones electrostáticas entre los grupos amonio del macrociclo y de la cadena lateral; y una conformación cerrada a pH 7.4, estabilizada por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular y por el apilamiento π entre los anillos aromáticos. En el caso de las especies ML^{2+} , también se espera que estén en la conformación cerrada, con al menos uno de los átomos de nitrógeno de la cadena lateral completando la esfera de coordinación del catión metálico, como muestran los datos cristalográficos.

En base a estos resultados, se procedió a verificar que estos cambios conformacionales tienen lugar en los nuevos compuestos sintetizados, y a investigar cómo estas reorganizaciones moleculares, impulsadas por cambios en el pH o por la presencia de cationes metálicos, podrían influir en la afinidad y selectividad de estos ligandos por los polinucleótidos de doble hebra. Con este objetivo se realizaron estudios de RMN y UV-Vis de los ligandos a diferentes valores de pH en presencia/ausencia de cationes metálicos. A continuación se repitieron las valoraciones con ADN, realizadas con el ligando libre, para los complejos metálicos así como para el ligando a distintos valores de pH. Además, para ampliar la evidencia sobre el modo de interacción y la capacidad de modular la misma, estos estudios se complementaron con otras técnicas, tales como la desnaturalización térmica, el dicroísmo circular, la viscosimetría y el desplazamiento de un indicador fluorescente. Estas técnicas y los resultados obtenidos se irán detallando a continuación.

7.4.1. Movimientos moleculares

Una de las características de los compuestos de tipo escorpiando es su capacidad para generar movimientos en su estructura molecular asociados a los procesos de protonación y de formación de complejos metálicos (discutidos en el capítulo 6) en los que la cadena lateral se acerca o aleja del macrociclo.

Un cambio en el pH provoca la formación o rotura de enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que impulsa al compuesto a cambiar su conformación. En el caso de los compuestos en los que la cadena lateral ha sido funcionalizada con un grupo aromático, la aparición de interacciones de tipo $\pi-\pi$ entre esta unidad aromática y la piridina del macrociclo también puede favorecer energéticamente la conformación cerrada tal como se discutió en el apartado 1.3 de la introducción (ver figura 1.45) [198]. En la figura 7.27 se ilustra la hipótesis de cómo tendría lugar este proceso para el ligando **L-A**. A continuación procederemos a verificarla.

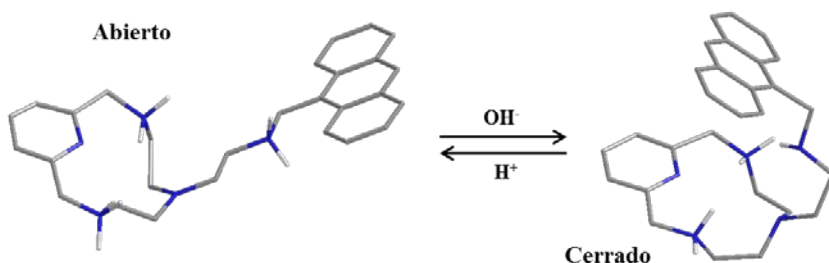


Figura 7.27. Representación del proceso de reorganización molecular del compuesto **L-A**. Sólo se muestran los protones de los átomos dadores.

Para determinar si este cambio conformacional estaba teniendo lugar en nuestros compuestos se registraron los espectros ^1H RMN del compuesto **L-A** a distintos valores de pH. Los resultados mostraron que al pasar de pH 5.0 a 8.0, lo que correspondería con la desprotonación de $[\text{H}_3\text{L-A}]^{3+}$ para dar $[\text{H}_2\text{L-A}]^{2+}$, hay un desplazamiento a campo alto de

todas las señales aromáticas, tanto del antraceno como de la piridina (figura 7.28). Esto es un indicio de que el apilamiento π - π está teniendo lugar.

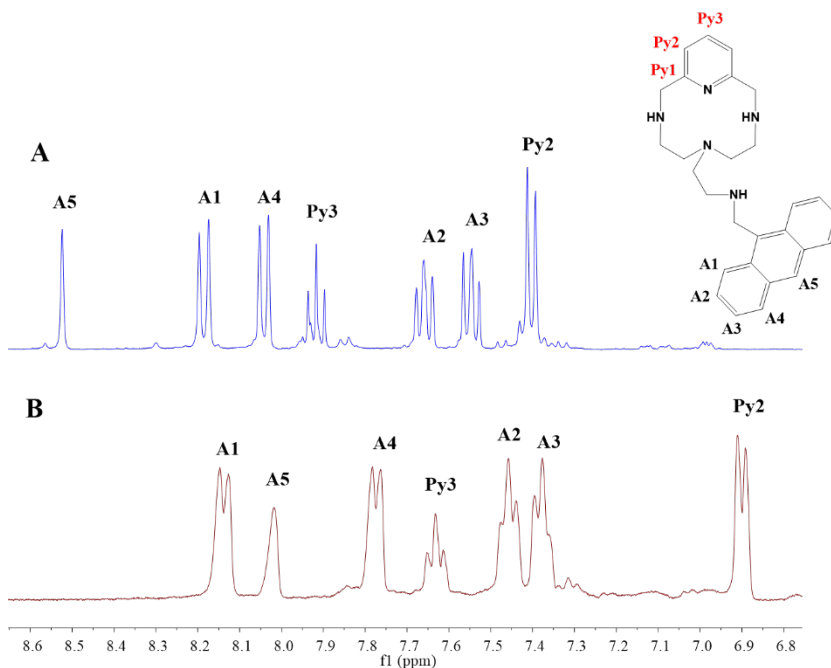


Figura 7.28. Región aromática del espectro de RMN ¹H del compuesto L-A a (A) pD 5.0 y (B) pD 8.0.

Los espectros de RMN de L-A a diferentes valores de pH conducen a conclusiones similares. Al pasar de pH 6.0 a 7.7, coincidiendo con la primera desprotonación del ligando, se observa un desplazamiento a campo alto de todas las señales aromáticas. Sin embargo, este desplazamiento es mucho más pronunciado a pH 9, cuando L-A ha perdido dos protones.

Se obtuvo evidencia adicional de este cambio conformacional a través de los espectros de UV-Vis. En el intervalo de pH en el que el apilamiento entre el antraceno y la piridina tiene lugar, la banda de absorción a 253 nm experimenta un efecto batocrómico y una disminución de la intensidad (figura 7.29A). Este comportamiento es típico de procesos de apilamiento π - π , sin embargo, para descartar que los cambios

observados fueran producidos por otro tipo de fenómeno, se repitió el experimento utilizando la poliamina precursora **LI**, la cual es estructuralmente similar pero carece de unidad aromática en la cadena lateral y no puede, por tanto, producirse ningún apilamiento π - π intramolecular. Como se puede observar en la figura 7.29B, no se observó ni hipocromismo ni desplazamiento batocrómico. Por el contrario, el único efecto fue un ligero aumento de la absorbancia.

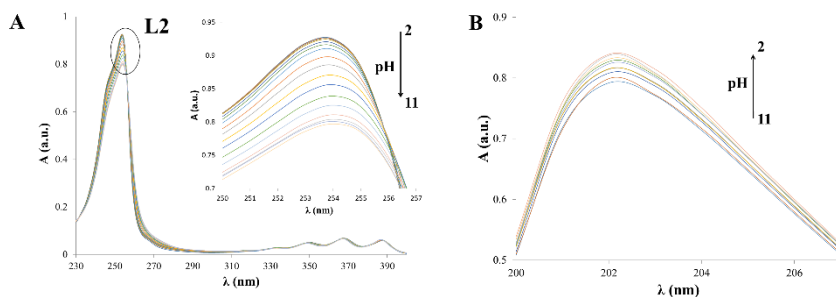


Figura 7.29. Dependencia con el pH de la absorción de (A) **LI-A** y (B) **LI**.

Con estos datos espectroscópicos se calculó un valor de pK de 6.75(1), 7.30(1) y 7.02(1) para **L-A**, **LI-A** y **LI-Pir**, respectivamente. Estos valores están en concordancia con los obtenidos por ^1H RMN y representan el valor de pH medio al que tiene lugar la reorganización molecular, cambiando de una conformación abierta a una cerrada.

También se investigó la posibilidad de utilizar cationes metálicos para generar reorganizaciones moleculares. En este caso, como ya se discutió en la introducción, el macrociclo coordina al metal, mientras que la cadena lateral flexible, que contiene también átomos dadores, puede o bien plegarse para coordinar el metal a través de éstos, o alejarse de él debido a las repulsiones electrostáticas que se generan al protonarse los grupos amino. De nuevo, se empleó la información espectroscópica de la interacción de los ligandos con cobre y zinc a diferentes valores de pH para determinar el pK al que tiene lugar la transición abierto-cerrado. Estos valores se presentan en la tabla 7.7, junto con los descritos antes para los ligandos libres. Cabe destacar que los valores obtenidos en presencia de los metales son menores que los calculados para el ligando libre, lo cual

indica que la presencia del catión metálico fuerza al ligando a adquirir la conformación cerrada, en la que el átomo dador de la cadena lateral puede coordinar al metal. De hecho, a pH 7.0, todos los complejos metálicos estudiados deberían haber adoptado la conformación cerrada.

Tabla 7.7. Valores de pK para los cambios conformacionales inducidos por un gradiente de pH o por la presencia de cationes metálicos.

	Ligando libre	Cu²⁺	Zn²⁺
L-A	6.75(1)	3.03(1)	4.62(1)
LI-A	7.30(1)	5.37(1)	6.00(4)
LI-Pir	7.02(1)	4.70(1)	6.30(1)

7.4.2. Estudios eselectroscópicos con ML²⁺ y polinucleótidos de doble hebra

Al valorar una disolución del complejo [Cu(L-A)]²⁺ con los polinucleótidos de doble hebra, el espectro UV-Vis muestra un comportamiento diferente al del ligando libre. Como ejemplos, en la figura 7.30 podemos ver los cambios registrados para la valoración con poli-A–poli-U y ctADN, tanto para el ligando libre (figuras A y C) como para el complejo de Cu²⁺ (figuras B y D). Es evidente como, en el caso del complejo, el hipocromismo es mucho menor y el desplazamiento batocrómico no es significativo. Estos resultados parecen apuntar al hecho de que la intercalación no sea tan efectiva en el caso de los complejos de Cu²⁺, posiblemente debido a que el antraceno, en la conformación cerrada del ligando, esté estéricamente más impedido para intercalar entre los pares de bases.

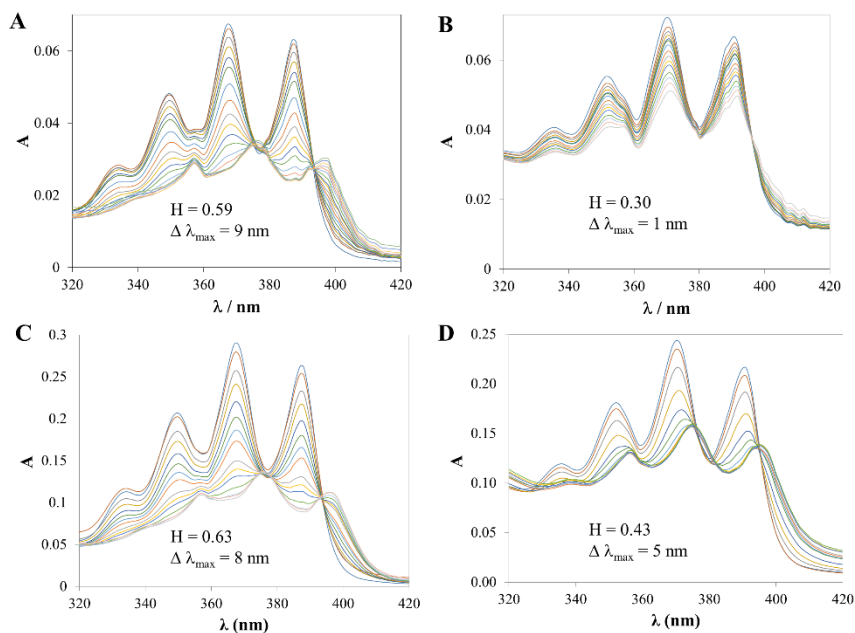


Figura 7.30. Espectros UV-Vis para la valoración de (A) L-A con poli-A–poli-U; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con poli-A–poli-U; (C) L-A con ctADN y (D) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con ctADN.

Estas diferencias son aún más acusadas en el caso de los espectros de emisión de fluorescencia. En los dos casos representados en la figura 7.31, valorando con poli-A–poli-U y ctADN, el comportamiento fue distinto al del ligando libre, siendo la disminución de la fluorescencia mucho menor y el desplazamiento en la longitud de onda del máximo despreciable.

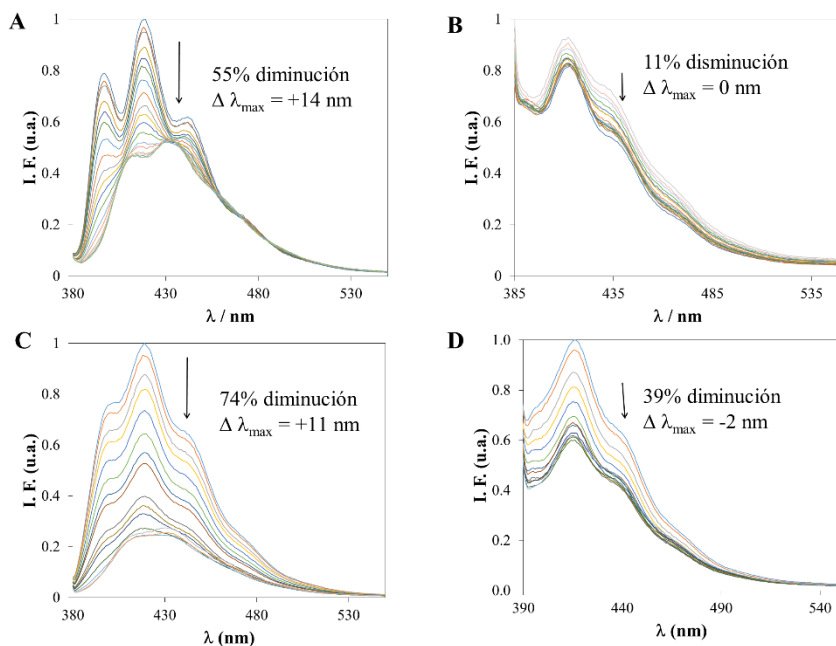


Figura 7.31. Espectros de emisión e fluorescencia para la valoración de (A) **L-A** con poli-A–poli-U; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con poli-A–poli-U; (C) **L-A** con ctADN y (D) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ con ctADN. Las flechas indican el sentido de los cambios observados.

Como ya se mencionó en el apartado 7.3, la variación de la fluorescencia del ligando al ser valorado con poli-(dAT)₂ es diferente al resto de poliucleótidos, dando lugar a un aumento de la banda de fluorescencia con un fuerte desplazamiento al rojo. Al repetir esta valoración con el complejo de cobre, se observa también un aumento de la fluorescencia, pero esta vez con un ligero desplazamiento al azul de 2 nm (figura 7.32).

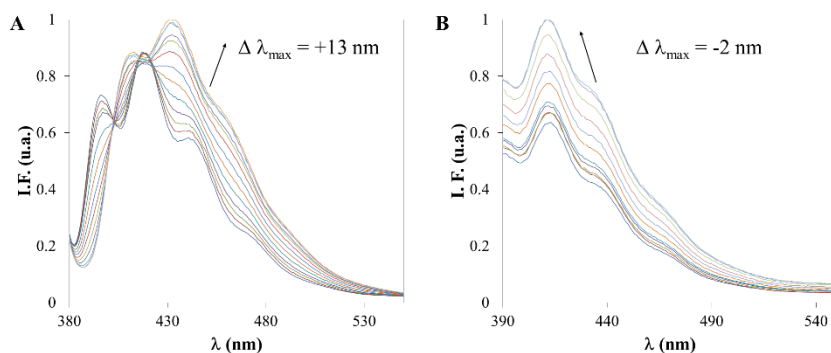


Figura 7.32. Espectros de emisión e fluorescencia para la valoración con poli-(dAT)₂ de (A) **L-A**; (B) **[Cu(L-A)]²⁺**. Las flechas indican el sentido de los cambios observados.

Si bien la espectroscopia de fluorescencia no es un método óptimo para la determinación del modo de interacción de un ligando con el ADN, dado que las variaciones en la emisión de fluorescencia se deben a cambios en el ambiente del residuo de antraceno, al observar las diferencias entre el ligando libre y su complejo de Cu²⁺ es posible asumir que ambos están interaccionando de maneras diferentes con el polinucleótido.

Para recapitular los datos obtenidos, en la tabla 7.8 se presentan los valores del porcentaje de hipocromismo y de desplazamiento batocrómico para la interacción de **L-A** y sus complejos de cobre con las distintas secuencias estudiadas.

Tabla 7.8. Efecto hipocrómico (%H) y desplazamiento del máximo de absorción (Δλ_{max}) para **L-A** y **[Cu(L-A)]²⁺**.

	L-A			[Cu(L-A)]²⁺		
	%H ^a	Δλ _{max} UV-Vis ^b	Δλ _{max} Fluor	%H	Δλ _{max} (nm) UV-Vis	Δλ _{max} (nm) Fluor
poli-A-pol-U	59	+9	+14	39	1	0
poli-(dAT) ₂	40	+9	+13	45	+5	-2
ctADN	63	+8	+11	43	+5	-2

^a %H = 100 · [Abs(L_{libre} a λ_{max} 367 nm) - Abs(L_{unido} a λ_{max} 367 nm)] / Abs(L_{libre} a λ_{max} 367 nm). ^b Desplazamiento = λ_{max}(complejo) - λ_{max} 367 nm(L). ^c Proporción N = total pares de base / L_{unido}. ^d Valores de K y N obtenidos del ajuste de los datos de la valoración a un modelo de equilibrio simple para una interacción no competitiva [228].

Estos experimentos se realizaron también con otros ligandos conteniendo unidades inercalantes, concretamente el **LI-A** y el **LI-P**, tanto con Zn^{2+} como con Cu^{2+} . Los resultados obtenidos son análogos a los aquí presentados.

7.4.3. Desnaturalizaciones térmicas

Para valorar la magnitud de la estabilización de la doble hélice por la interacción con el ligando **L-A** a diferentes valores de pH, se llevaron a cabo experimentos de desnaturalización con los polinucleótidos de doble hebra a pH 5 y 7.4 con diferentes proporciones molares $[\text{L-A}]/[\text{polinucleótido}]$. Los resultados se presentan en la tabla 7.9. Lo primero que se observa es un mayor incremento en la temperatura de fusión para los valores de pH bajos como resultado de un mayor número de cargas positivas en el ligando y, posiblemente, también a un proceso de intercalación más eficiente cuando el ligando se encuentra en su conformación abierta. Esta hipótesis, sin embargo, no se puede comprobar mediante este método, ya que no proporciona evidencia inequívoca para distinguir la intercalación de otros modos de interacción.

En cuanto a las diferencias entre los distintos polinucleótidos, los valores de ΔT_m son, en general, mayores para las secuencias de ADN que para el modelo de ARN, si bien las diferencias no se pueden considerar suficientemente grandes como para hablar de selectividad.

Al realizar los experimentos con el complejo $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ se obtuvieron resultados muy interesantes (tabla 7.9) ya que los valores de la estabilización fueron menores que los del ligando libre. Esta evidencia refuerza la hipótesis de la modulación de la interacción del ligando mediante los cambios conformacionales inducidos por el metal.

Tabla 7.9. Variación de las temperaturas de fusión (ΔT_m) determinadas como la diferencia entre el polinucleótido libre ($\sim 1.5 \times 10^{-5}$ M) y el polinucleótido en presencia de ligando/complejo metálico a diferentes relaciones molares y pHs.

pH	L-A			
	5.0		7.4	
	N° medio de protones ^a			
r ^b	0.1	0.5	0.1	0.5
ΔT_m poli-A–poli-U	11.7	N.E.	1.7	10.4
ΔT_m poli-(dAT) ₂	10.1	27.1	6.3	14.5
ΔT_m poli-(dGC) ₂	17.7	26.1	5.1	12.6

pH	[Cu(L-A)] ²⁺			
	5.0		7.4	
	r			
r	0.1	0.5	0.1	0.5
ΔT_m Poly A-poly U	1.4	9.5	1.2	4.5
ΔT_m poly (dAT) ₂	4.0	11.5	1.0	5.1

^aCalculados a partir de las constantes de protonación. ^br = [L] / [polinucleótido]. ^cValores de ΔT_m en °C, los errores se estiman en $\pm 1^\circ\text{C}$

7.4.4. Dicroísmo circular

Gracias al entorno asimétrico proporcionado por la doble hélice del ADN, se ha podido obtener evidencia adicional sobre la interacción de los ligandos mediante estudios de dicroísmo circular (DC). En general, los intercalantes unidos a la doble hélice muestran bandas de DC inducido, gracias a la quiralidad derivada de la helicidad del ADN [305]. Para evaluar la capacidad intercalante de los compuestos con unidades aromáticas policíclicas, antraceno y pireno, se registraron los espectros de DC del **L-A** y **LI-P**, así como de sus complejos de Cu^{2+} , en presencia de un exceso de ctADN. Adicionalmente y como control negativo de intercalación, se realizó el mismo experimento con el compuesto **LI**, que

comparte la misma estructura básica que los otros compuestos pero carece de unidad intercalante.

Como se puede apreciar en la figura 7.33, el espectro de DC del ctADN, en su forma B, se caracteriza por una banda positiva a 280 nm y otra banda negativa a 245 nm. Al añadir los compuestos intercalantes se observa una fuerte disminución de la banda a 280 nm, así como la aparición de una banda de DC inducido a 260 nm. Cabe destacar que esta nueva banda de DC inducido se corresponde con la banda de absorción de los compuestos, lo que es consistente con la conclusión de que la banda se origina por la intercalación de cromóforo no quiral entre los pares de bases de la doble hélice [306, 307, 308, 309]. Cabe destacar que esta banda a 260 nm no se forma en el caso de los complejos $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$ y $[\text{Cu}(\text{LI-P})]^{2+}$, evidenciando nuevamente que los complejos en la conformación cerrada podrían ser menos adecuados para el modo de unión por intercalación.

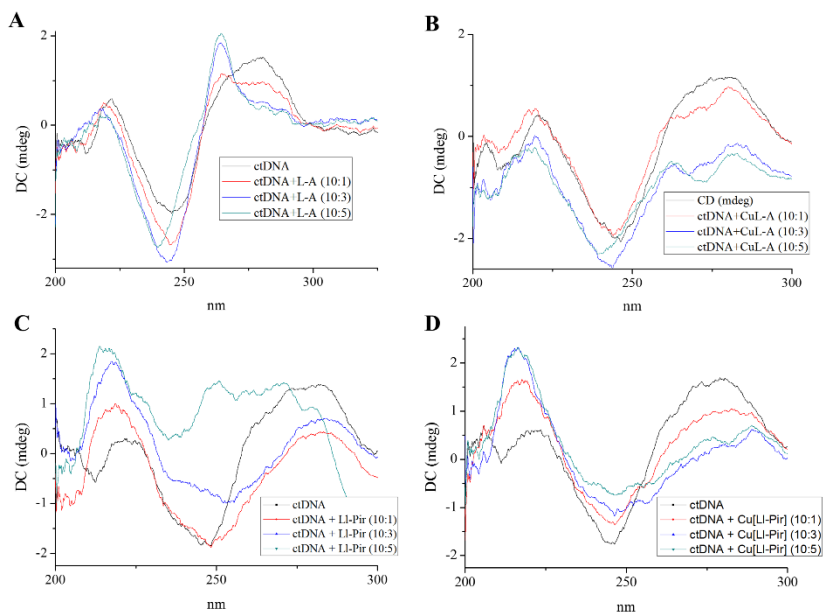


Figura 7.33. Espectros de DC de disoluciones de ctADN (30 μM) con cantidades crecientes de (A) L-A; (B) $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$; (C) L-P y (D) $[\text{Cu}(\text{LI-P})]^{2+}$. Relaciones molares pares de bases/ligando 10:0, 10:1, 10:3 y 10:5.

Además, al añadir cantidades crecientes del compuesto **LI**, (figura 7.34) los espectros de DC del ctADN no muestran ninguna disminución de la banda de DC a 280 nm, ni tampoco la formación de nuevas bandas de DC inducido. Esto es una prueba de que los ligandos estudiados interaccionan con el ADN a través de las unidades aromáticas de antraceno o pireno de la cadena lateral.

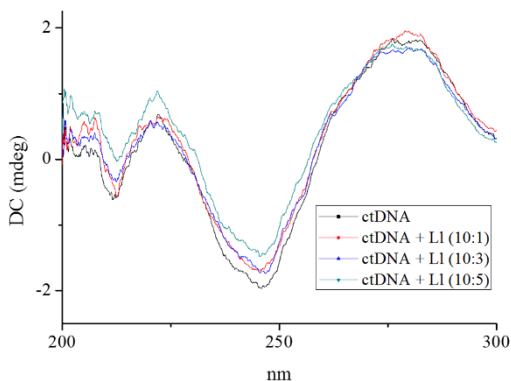


Figura 7.34. Espectros de DC de disoluciones de ctADN (30 μM) con cantidades crecientes de **LI**. Relaciones molares pares de bases/ligando 10:0, 10:1, 10:3 y 10:5.

7.4.5. Desplazamiento del indicador fluorescente

Más evidencias acerca del modo de interacción por intercalación de los ligandos con unidades aromáticas y de la posible modulación mediante cambios conformacionales inducidos por la presencia de metales se han obtenido mediante ensayos de desplazamiento de un indicador fluorescente. En este caso, el indicador seleccionado fue el bromuro de etidio (BrEt), el cual, como ya se mencionó en los capítulos 1 y 4 de esta tesis doctoral, es un reconocido intercalante del ADN. El BrEt en

disolución acuosa es poco fluorescente, sin embargo su intensidad de emisión se multiplica por 20 al intercalar en el ADN. Las moléculas capaces de competir con el BrEt por las posiciones entre los pares de bases del ADN lo desplazarán, lo que se verá reflejado en una disminución de la fluorescencia.

Al añadir los ligandos con unidades aromáticas (**L-A**, **LI-A** y **LI-P**) a una disolución conteniendo BrEt unido al ADN se registró un descenso en la fluorescencia, mientras que al añadir el ligando sin unidad aromática en la misma proporción, **LI**, no se observó ningún cambio significativo (figura 7.35). Dado que el grado de reducción de la fluorescencia puede relacionarse directamente con el grado de la interacción, estos experimentos parecen indicar que el compuesto que contiene pireno, **LI-P**, es un intercalante más eficiente que los derivados de antraceno **L-A** o **LI-A**.

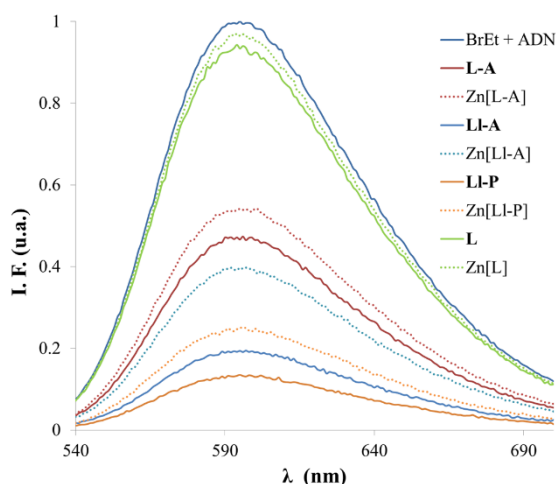


Figura 7.35. Espectros de fluorescencia para los ensayos de desplazamiento de BrEt. La proporción molar **ligando**:BrEt fue de 1:1, con $[\text{BrEt}] = [\text{ligando}] = 10 \text{ mM}$ y $[\text{ctADN}] = 30 \text{ mM}$. La curva superior (azul) se corresponde al BrEt + ctADN sin ligando. El resto de líneas sólidas se corresponden con los ligandos libres y las líneas discontinuas a los complejos de Zn^{2+} .

Es interesante observar que los mismos experimentos realizados con los complejos de Zn^{2+} muestran, en todos los casos, menores desplazamientos del bromuro de etidio. Cuando los experimentos se realizaron con el complejo de **L** con Zn^{2+} no se observaron diferencias significativas respecto al ligando libre.

7.4.6. Viscosimetría

Otra estrategia simple y directa para dilucidar el modo preferencial de interacción de un ligando con el ADN es a través de medidas de viscosidad. Los compuestos capaces de intercalar provocan un gran aumento en la longitud de las hebras de ADN, lo que da como resultado un aumento en la viscosidad de las disoluciones. Por el contrario, los ligandos que interaccionan con el surco del ADN no generan este alargamiento de la doble hélice y, por tanto, no aumentan la viscosidad [310]. Las medidas de viscosidad realizadas muestran un incremento en la viscosidad de las disoluciones de ADN al adicionar cantidades crecientes de los compuestos con unidades aromáticas policíclicas (**L-A** y **LI-P**). Cuando la disolución de ADN se trató con los complejos de Zn^{2+} este comportamiento se vio reducido, demostrando nuevamente que los cambios conformacionales inducidos por la formación del complejo afectaba la capacidad intercalante de estos ligandos. Usando nuevamente el compuesto sin unidad aromática, **LI**, como control negativo, se observó que la viscosidad no aumentaba, lo que verifica que al no tener unidad intercalante el compuesto interacciona con el surco de ADN. Como ejemplo, en la figura 7.36 se representan los cambios registrados en la viscosidad para disoluciones de ADN tratadas con los compuestos **LI-P**, $[Zn(LI-P)]^{2+}$ y **LI**.

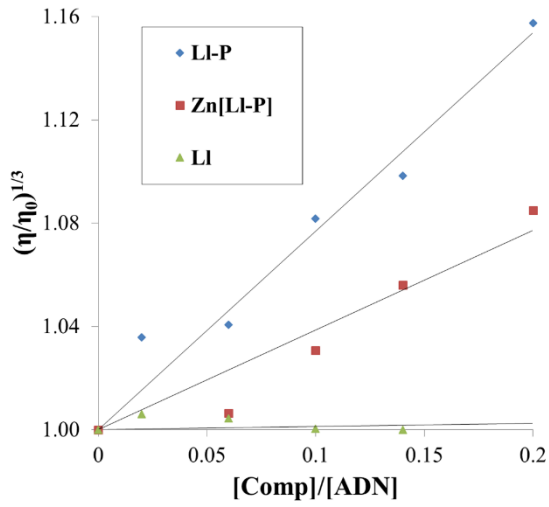


Figura 7.36. Viscosidades relativas de una disolución de ctADN con cantidades crecientes de **LI-P** (azul), $[\text{Zn}(\text{LI-P})]^{2+}$ (rojo) y **LI** (verde).

7.5 Actividad biológica y modulación de la citotoxicidad

Como se ha discutido en la introducción de esta tesis, existen moléculas intercalantes que se emplean como fármacos antitumorales, ya que son capaces de inhibir la síntesis de los ácidos nucleicos [311, 312]. Por este motivo se decidió estudiar la actividad antiproliferativa de los compuestos **L-A**, **LI-A** y **LI-P** en colaboración con el grupo de Biología Molecular del Epitelio en Inflamación y Cáncer, en el Instituto de Investigación Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Joan XXIII de Tarragona. La citotoxicidad de estos ligandos se comparó con la de los compuestos de partida, sin unidades intercalantes **L** y **LI**. Además, dado que los resultados antes expuestos indican que los cationes metálicos pueden inducir cambios conformacionales que influyen en la capacidad intercalante de los compuestos, se decidió analizar también si este efecto se reproducía *in vitro* en diferentes líneas celulares.

Con estos objetivos en mente, y utilizando ensayos de MTT (ver capítulo 4, “Material y métodos”), se evaluó la viabilidad celular en cultivos de líneas celulares de tumores de vejiga humana T24, 253J y UMUC-3. Los resultados indicaron que los ligandos con unidades intercalantes eran unas 20 veces más tóxicos que **L** y **LI** ($IC_{50} > 100 \mu M$), que no tienen capacidad de intercalar. Este hecho sugiere que las unidades intercalantes de los compuestos **L-A**, **LI-A** y **LI-P**, tienen una gran influencia en sus efectos citotóxicos.

Estos estudios de citotoxicidad se ampliaron a otras líneas celulares, incluyendo algunas no tumorigénicas y otras resistentes al fármaco de referencia doxorubicina. Existe un gran interés en encontrar nuevos compuestos que puedan sustituir a la doxorubicina, no sólo por los problemas de resistencia, sino también por sus efectos adversos (cardiotoxicidad) [313, 314]. Los resultados se muestran en la tabla 7.10. Como se puede observar, los valores de la concentración inhibitoria media (IC_{50}) son similares para todas las líneas celulares investigadas y están en el intervalo de concentraciones de 3 a 12 μM . Lo más destacable es que

siguen siendo activos incluso para la línea tumoral resistente a la doxorubicina.

Tabla 7.10. Valores de IC₅₀ (μM) para los compuestos **L-A**, **LI-A** y **LI-P**.

	L-A	LI-A	LI-P	DOXO
RT4	7,1	5,0	7,2	
SW800	3,6	4,5	4,2	
J82	4,0	4,4	9,1	
VmCub3	4,1	7,4	3,4	
SCaBER	4,1	4,8	4,0	
MCF7	6,9	7,2	4,8	
<u>NonTumorigenic</u>				
THP-1	5.5	2.1	3.2	
THP-1 + PMA	6.8	8.3	7.3	
3T3/balbc	3,9	3,3	3,8	
<u>Doxo resistant</u>				
T24	5.7	6.1	4.7	< 0.01
H69AR	10.8	10.2	11.8	> 1000
H69	6.1	7.8	7.2	0.03

Para complementar estos estudios de citotoxicidad se enviaron muestras del compuesto **LI-P** al Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (NCI) para ser evaluado en un panel de 60 líneas celulares representativas de diferentes tipos de cáncer. Los resultados mostraron que el compuesto tiene un efecto similar en todas las líneas celulares ensayadas, con valores de IC₅₀ en el intervalo micromolar, en buen acuerdo con los resultados comentados antes.

Al estudiar los complejos metálicos, tanto de Cu²⁺ como de Zn²⁺ se encontraron grandes diferencias en la citotoxicidad. Los valores de IC₅₀ pasaron de ~3–12 μM, para los ligandos libres, a valores por encima de 100 μM para los complejos metálicos (figura 7.37). Esto sugiere que los

cambios conformacionales inducidos por el metal tienen una influencia sobre los efectos citotóxicos en las células. Además, se demostró que los cationes metálicos eran capaces de bloquear la citotoxicidad al añadirlos sobre un cultivo de células que llevaban siendo tratadas durante 24 horas con los ligandos libres. La hipótesis que podría explicar este comportamiento es que los compuestos en la conformación cerrada tienen las unidades aromáticas en una disposición que les dificulta intercalarse en el ADN.

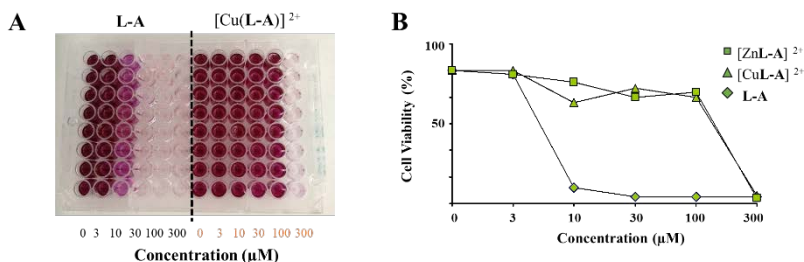


Figura 7.37. (A) Fotografía de una placa de 96 pocillos de células T24 después de su tratamiento con 0-300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de **L-A** libre o del complejo $[\text{Cu}(\text{L-A})]^{2+}$. (B) Diagrama de la viabilidad celular, incluyendo los resultados para el complejo de zinc $[\text{Zn}(\text{L-A})]^{2+}$.

Gracias a la intensa fluorescencia intrínseca de los ligandos, fue posible capturar imágenes de las células tratadas con **LI-A** y el complejo $[\text{Zn}(\text{LI-A})]^{2+}$ mediante microscopía de fluorescencia (figura 7.38). En estas imágenes se puede observar cómo la fluorescencia del compuesto colocaliza con las células, evidenciando que es capaz de traspasar la membrana celular. En el caso del compuesto libre las células tratadas a una concentración de 5 μM están sanas, mientras que a 10 μM sólo se observan fragmentos de células. Por el contrario, células tratadas con el complejo $[\text{Zn}(\text{LI-A})]^{2+}$ a 10 μM siguen teniendo una morfología normal. Estos resultados sugieren que la interacción de los cationes metálicos con los ligandos estudiados, con el consecuente cambio en la estructura de los mismos, es capaz de modular, al menos parcialmente, sus efectos citotóxicos en las células.

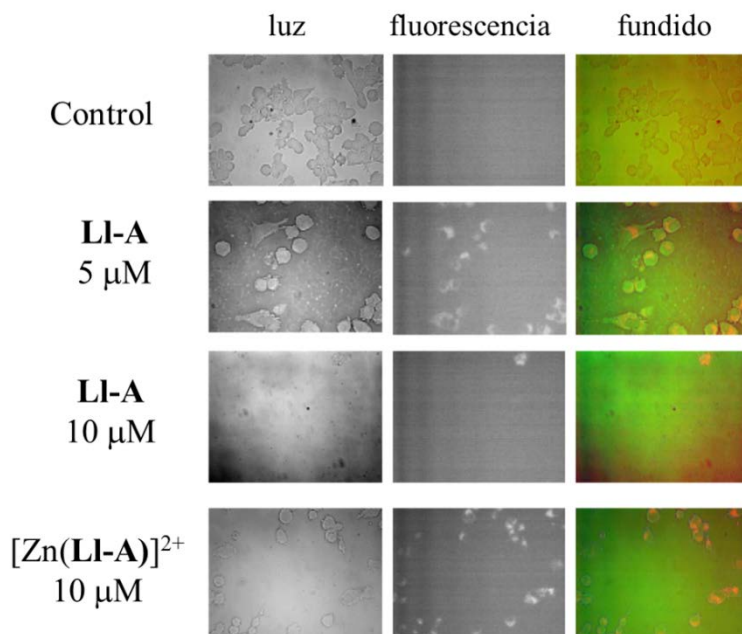


Figura 7.38. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células UMUC3 tratadas durante 16 horas con **LI-A** o su complejo metálico $[\text{Zn}(\text{LI-A})]^{2+}$ a la concentración indicada.

El siguiente paso en la investigación de la actividad biológica de estos compuestos consistió en averiguar el mecanismo por el cual acceden al interior de las células. Para realizar estos estudios se eligió como modelo el compuesto **LI-P** y en primer lugar se verificó que, al igual que **LI-A** mostrado antes, era capaz de penetrar la membrana celular. Como se puede apreciar en las imágenes de microscopía confocal de células tratadas durante 4 horas con una disolución 10 μM del compuesto (figura 7.39), este parece penetrar en las células y acumularse principalmente en el citoplasma, aunque también se aprecia algo de fluorescencia en el interior del núcleo, donde puede interactuar con el ADN. Hay que tener en cuenta que, según se deduce de los estudios de fluorescencia presentados antes, la interacción del compuesto con ADN conduce a una desactivación parcial de la fluorescencia, lo que podría explicar la menor intensidad de la emisión en el núcleo (ver figura 7.31 del apartado anterior).

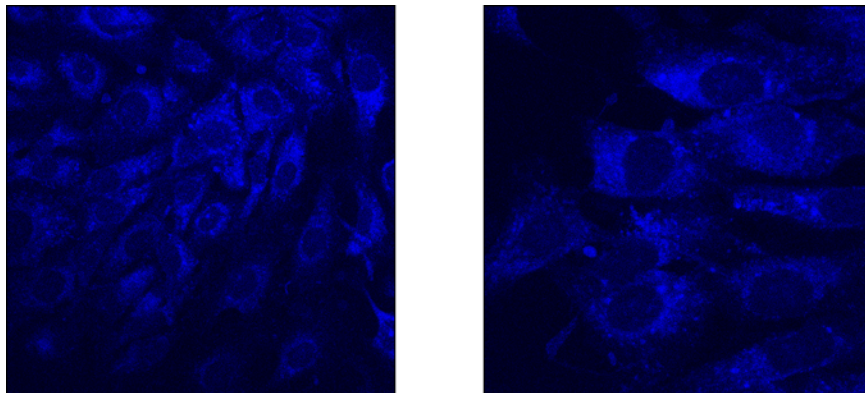


Figura. 7.39. Imágenes de microscopía confocal de células tratadas durante 4 horas con **LI-P** 10 μ M.

Una vez verificado que el compuesto es capaz de traspasar la membrana celular se procedió a determinar si lo hacían a través de un mecanismo de transporte pasivo (difusión) o activo (en contra de gradiente) [315]. Para verificar este aspecto, en colaboración con el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de las Islas Baleares, se realizó primero un ensayo de permeabilidad de membrana artificial paralela (PAMPA, por sus siglas en inglés) [316], el cual reveló que ninguno de los compuestos atraviesa la membrana por difusión pasiva.

A continuación se llevó a cabo un experimento de inhibición del transporte activo [317], el cual mide la dependencia del transporte con la temperatura (ver capítulo 4, “Materiales y métodos”). Como se aprecia en la figura 7.40, el ensayo dio resultados positivos, confirmando que los compuestos penetran la membrana celular por un mecanismo de transporte activo.

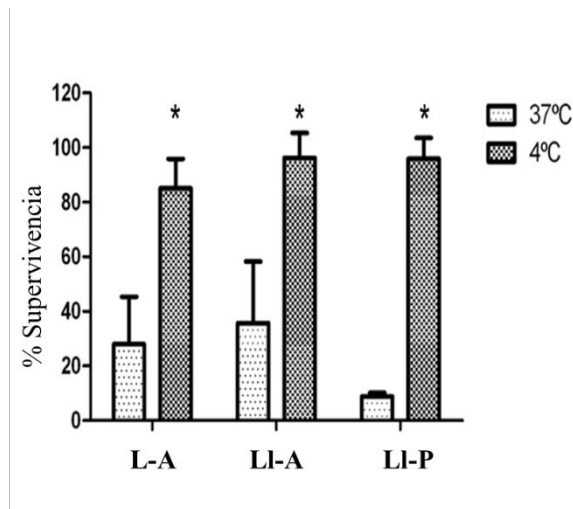


Figura. 7.40. Porcentaje de supervivencia de células T24 tratadas con los compuestos durante 2 horas a 37°C y 4°C.

Con estos resultados se planteó la hipótesis de que los compuestos utilizaran el mismo mecanismo de transporte que las poliaminas naturales, denominado de manera general Sistema de Transporte de Poliaminas (PTS) [318]. Sin embargo, estudios de competición utilizando las poliaminas naturales putrescina, espermina y espermidina dieron resultados negativos. Los compuestos estudiados, por tanto, son capaces de traspasar la membrana celular, pero lo hacen mediante un sistema de transporte activo diferente al de las poliaminas naturales.

El último paso en los estudios biológicos llevados a cabo fue la determinación del mecanismo de acción de los compuestos. Para ello primero se verificó si la muerte celular inducida por los compuestos se producía por apoptosis (muerte celular programada) o por otra vía. La primera evidencia al respecto se obtuvo de la observación directa, por microscopía, de la morfología de las células. Como se aprecia en la figura 7.41, las células tratadas muestran intensos cambios en su morfología: roturas de membrana y lo que parece ser la formación de cuerpos apoptóticos.

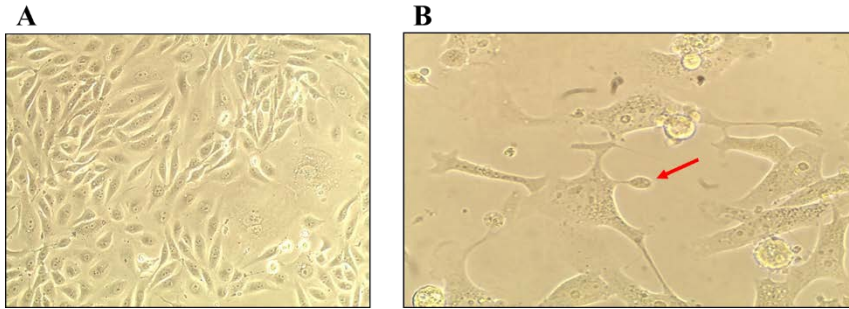


Figura 7.41. (A) Células 253J sin tratar (control). (B) Células incubadas con el compuesto **LI-P** 10 μM (la flecha indica la formación de un cuerpo apoptótico).

Otros estudios aportaron más evidencias respecto a la activación del mecanismo de apoptosis en las células tratadas, como por ejemplo la comprobación de la externalización de la fosfatidil serina por citometría de flujo. Finalmente los resultados se confirmaron al verificar por Western blot la activación de la Caspasa-3, la proteína clave en la ejecución de la apoptosis (figura 7.42) [319]. Además, como se aprecia en la figura, el grado de activación depende de la concentración de compuesto.

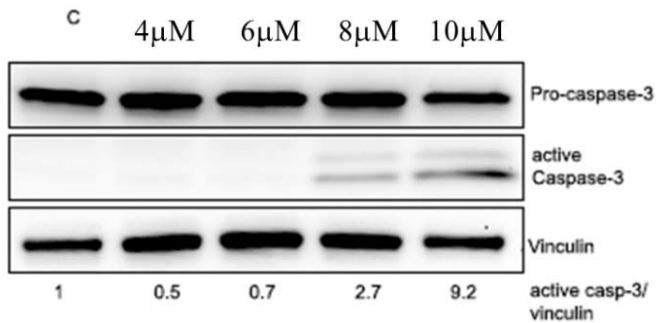


Figura 7.42. Western blot de células T24 incubadas con e compuesto **LI-P** a diferentes concentraciones.

La primera hipótesis sobre el mecanismo de acción de los compuestos parece indicar que provocan la apoptosis debido a la interacción con el ADN. Esta hipótesis está sustentada en Western blots que resultaron positivos respecto a la fosforilación de la serina15 de la proteína P53, la cual sirve como señal en la célula para indicar que existe daño en el ADN e iniciar su reparación o, en caso de que no sea posible, conducir a la apoptosis [320].

Sin embargo, los últimos estudios realizados, y aun no finalizados, parecen indicar que el daño al ADN no es el único mecanismo de acción de estos compuestos. A través de estudios de microscopía confocal utilizando marcadores fluorescentes específicos (figura 7.43) se observa un colapso del citoesqueleto celular [321]. Esto condujo a plantear la hipótesis de que los compuestos estudiados son también capaces de provocar la polimerización de la tubulina, de manera similar a algunos fármacos anticancerígenos como el paclitaxel (Taxol) [322, 323].

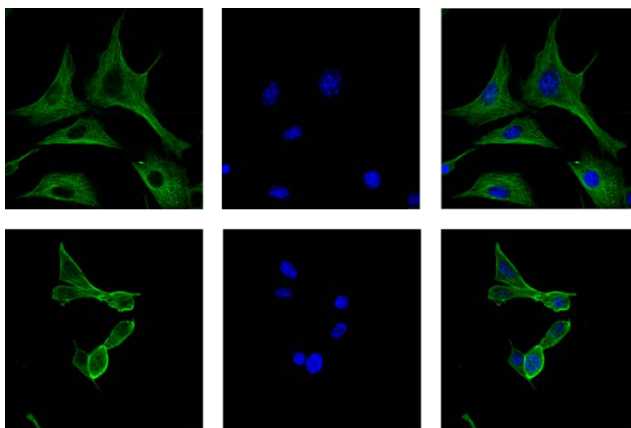


Figura 7.43. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células tratadas con un tinte fluorescente selectivo de la tubulina. Arriba: células control. Abajo: célula incubadas con el compuesto.

Finalmente, se han realizado estudios sobre la actividad antitumoral en ratones. Estos estudios preliminares, que se muestran en la figura 7.44, indican que los tumores en ratones tratados con **LI-P** reducen su tamaño en comparación a los ratones control.

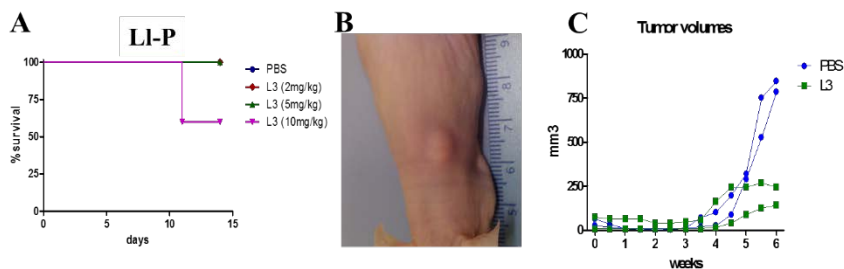


Figura 7.44. (A) Estudios dosis-toxicidad. 5 ratones por grupo y 4 dosis separadas por intervalos de tres o cuatro días. (B) Tumores generados por inyección intradérmica 1×10^6 células de cáncer de vejiga en ratones inmunosuprimidos. (C) Evolución del volumen del tumor en ratones control (azul) y ratones tratados con **LI-P** (verde).

En este capítulo hemos podido observar, por tanto, como los compuestos polamínicos de tipo escorpiando sintetizados interaccionan con distintos aniones de interés biológico. Los compuestos funcionalizados con unidades aromáticas tienen, además, la capacidad para intercalarse eficientemente entre los pares de bases del ADN lo que les confiere una importante actividad biológica. El hecho de que los compuestos son capaces de traspasar las membranas celulares refuerza la actividad de los compuestos. Esta actividad es causada no sólo por el daño inducido en el ADN, sino también por la polimerización que provocan en la tubulina. Todo este daño conduce a las células a una muerte por apoptosis. Interesantemente, la citotoxicidad puede ser modulada mediante la presencia/ausencia de cationes metálicos, probablemente debido a los cambios conformacionales que se generan en los compuestos de tipo escorpiando, los cuales modifican la capacidad de los compuestos de intercalarse de manera eficiente en el ADN.

Como veremos en los siguientes capítulos, estos compuestos y sus complejos metálicos pueden tener también otras aplicaciones biológicas.

8.
Miméticos de la
superóxido dismutasa

Miméticos de la superóxido dismutasa

En el capítulo 6 de esta tesis doctoral se discutió la capacidad de los nuevos ligandos sintetizados para formar complejos estables con Mn^{2+} . En este capítulo se presentarán los estudios realizados con estos complejos metálicos para evaluar su actividad como miméticos de la superóxido dismutasa de manganeso (MnSOD).

Los complejos con otros metales de transición con actividad redox, como por ejemplo el Cu^{2+} , podrían tener también actividad SOD. Sin embargo, en estudios preliminares con concentraciones de hasta $20\ \mu\text{M}$, no se observó una inhibición de la producción de superóxido que superara el 50%, (por tanto, $\text{IC}_{50} > 20\ \mu\text{M}$). Este hecho, sumado a la toxicidad *in vivo* del cobre, nos ha llevado a centrar nuestros esfuerzos en estudiar únicamente los complejos de Mn^{2+} .

El interés en estudiar los compuestos de tipo escorpiando como miméticos de la MnSOD nace de las similitudes estructurales detectadas entre el centro activo de la enzima y los complejos de manganeso de estos ligandos [270]. Los primeros estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación dieron lugar a resultados excepcionales (discutidos en el capítulo 1, “Introducción”), como por ejemplo con el complejo $[\text{Mn}(\text{L-4Q})]^{2+}$, que con una constante catalítica de $k_{cat} = 1.5 \times 10^7\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ es uno de los compuestos más activos encontrados en la bibliografía [168].

Hasta la fecha, la gran mayoría de compuestos reportados por nuestro grupo se corresponden con derivados de **L**. En el año 2011, al iniciarse los estudios para la presente tesis doctoral, el Dr. Salvador Blasco concluía su propia tesis [237] en la que se publicaban resultados de la actividad SOD de diversos derivados de **L**, incluyendo el primer dato sobre la actividad del compuesto alargado **LI**. Sorprendentemente, este compuesto resultó ser uno de los más activos ($k_{cat} = 5.2 \times 10^6\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Estos resultados nos motivaron para preparar nuevos compuestos derivados de **LI**, así como a ampliar la familia de los derivados de **L**, y a estudiar su actividad como miméticos de la MnSOD. También se incluyen los resultados del ligando tripodal **TPA-L₃** con Mn^{2+} en diferentes relaciones molares.

8.1. Electroquímica

El comportamiento electroquímico de los complejos de Mn^{2+} de una serie de ligandos fue estudiado a pH 7.4, utilizando NaCl como electrolito. En general lo que se observó fue un proceso reversible de oxidación por un electrón, tal como se puede apreciar por los picos anódico (A1) y catódico (C1) que aparecen alrededor de +0.5 V vs. Ag/AgCl en la figura 8.1, en la cual se representan los voltamperogramas cíclicos de los compuestos funcionalizados con piridina **LI-2Py** y **LI-4Py**. En este caso, la relación entre la corriente del pico catódico y la corriente del pico anódico es cercana a la unidad, sin embargo decrece al incrementar la velocidad de barrido, lo que nos indica que al proceso de oxidación inicial A1 le sigue una disociación parcial del Mn^{3+} generado electroquímicamente. Esta hipótesis explicaría la aparición de una señal catódica adicional cerca de -0.5 V (C2), la cual se podría atribuir a la reducción del acuocomplejo de Mn^{3+} proveniente del proceso de disociación propuesto.

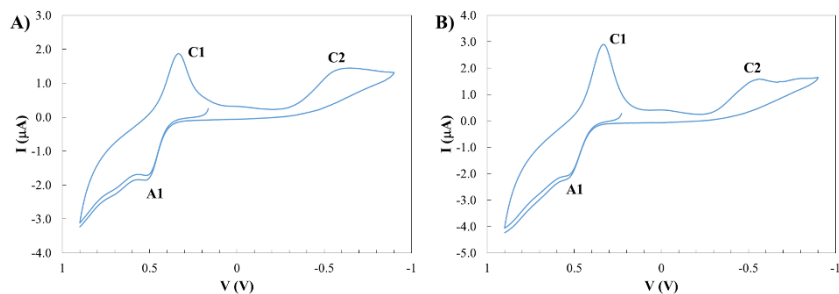


Figura 8.1. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Mn^{2+} con (A) **LI-2Py** y (B) **LI-4Py**. Velocidad de barrido 10 mV/s.

En el caso de los dos compuestos funcionalizados con antraceno, **L-A** y **LI-A**, se observa un comportamiento similar (figura 8.2). Sin embargo la relación de la corriente de los picos anódico y catódico se aleja

más de la unidad, a la vez que aumenta la intensidad del pico asociado a la reducción del acuocomplejo, lo que nos indica que el proceso de disociación de la especie Mn^{3+} es mayor en el caso de estos ligandos.

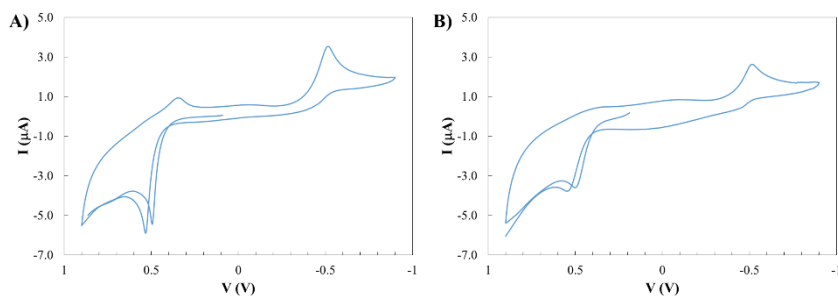


Figura 8.2. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Mn^{2+} con (A) L-A y (B) LI-A. Velocidad de barrido 10 mV/s.

En el caso del compuesto **TPA-L₃** se investigó el comportamiento electroquímico con diferentes equivalentes de manganeso. En los tres casos estudiados, con 1, 2 y 3 equivalentes de Mn^{2+} , el comportamiento detectado fue similar y equivalente al descrito antes para los otros compuestos (figura 8.3).

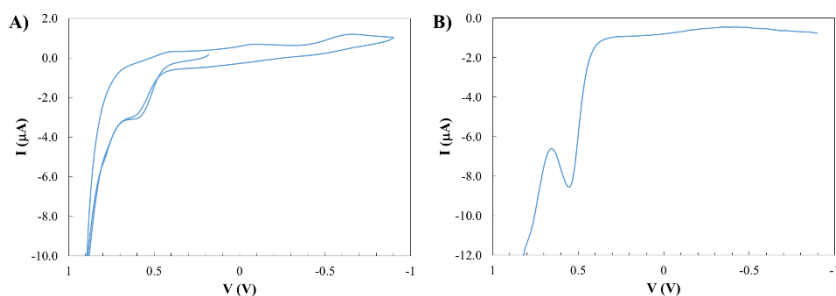


Figura 8.3. (A) Voltamperograma cíclico del sistema de Mn^{2+} con **TPA-L₃**. Velocidad de barrido 10 mV/s. (B) Voltametría de onda cuadrada.

El caso del compuesto **L-S**, funcionalizado con el grupo 2-hidroxifenilo, es particular ya que, como se aprecia en la figura 8.4, el par A1/C1 es seguido por un segundo par a valores de potencial más positivos.

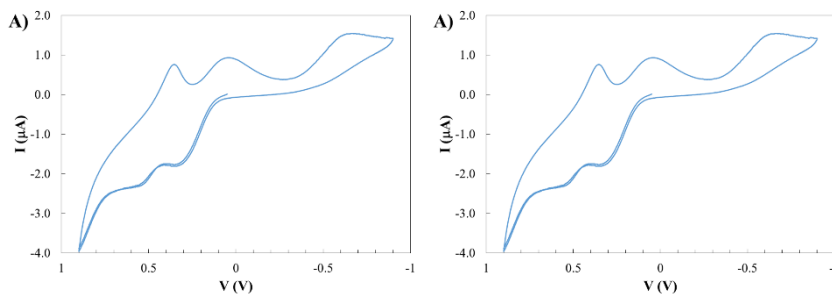


Figura 8.4. (A) Voltamperograma cíclico del sistema de Mn^{2+} con **L-S**. Velocidad de barrido 10 mV/s. (B) Voltametría de onda cuadrada.

En todos los complejos estudiados, los potenciales formales para el par $Mn(III)/Mn(II)$ están dentro del intervalo óptimo para la actividad SOD (tabla 8.2). Son, sin embargo, mayores que el potencial ideal para la oxidación y reducción del superóxido (+360 mV vs. electrodo estándar de hidrógeno), estando más bien cerca del límite superior de +860 mV. Pero esto podría ser una ventaja para los miméticos enzimáticos ya que, como se ha descrito en la literatura, potenciales mayores pueden ser necesarios para alcanzar mayor selectividad por el superóxido, evitando la oxidación del Mn^{2+} por otras especies oxidantes presentes en el medio biológico, como el óxido nítrico, peroxinitrito, peróxido de hidrógeno, hipoclorito u oxígeno [324].

8.2. Estudios cinéticos

En la tabla 8.2 se muestran los resultados obtenidos para la actividad SOD de los complejos metálicos estudiados, evaluada mediante el método indirecto de McCord-Fridovich [235, 236, 237], utilizando NBT como indicador. También se muestran los datos del potencial formal descritos en el apartado anterior. Para facilitar la comparación y el análisis, se incluyen los valores del Mn^{2+} libre, de la enzima MnSOD nativa y de algunos de los miméticos de la SOD que destacan en la literatura.

Tabla 8.2. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Mn^{2+} .

Compuesto	IC_{50} (μM) ^a	k_{cat} ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	E' (mV) ^c
L-A	0.4(1) ^b	8.2	+768
Ll-A	0.4(1)	4.8	+760
Ll-2Py	0.4(2)	6.5	+736
Ll-4Py	0.3(2)	8.6	+843
L-S	0.3(1)	8.6	+752
TPA-L₃ (Mn²⁺)	0.2(1)	16.3	+740
TPA-L₃ (2Mn²⁺)	0.20(4)	15.2	+760
TPA-L₃ (3Mn²⁺)	0.13(4)	22.4	+772
MnSO ₄	3.6(5)	0.80	+1500
MnSOD		100	+310
L-4Q^c	0.30(1)	15.0	+680
M40403 ^d		20.0	+740

^a Resultados obtenidos mediante el método McCord-Fridovich, a pH 7.4 y utilizando NBT como indicador. ^b El valor entre paréntesis representa el error de la última cifra significativa. ^c Valores obtenidos de la referencia [168]. ^d Valores obtenidos de la referencia [165]. ^e En relación a un electrodo estándar de hidrógeno.

Los datos obtenidos se utilizaron para refinar el valor de la IC_{50} que mejor se adaptara al modelo propuesto, mediante un ajuste de mínimos cuadrados no lineal utilizando el programa supersod v.0.6 [239]. En la figura 8.5 se muestra, como ejemplo, la representación del porcentaje de inhibición del NBT frente a la concentración de compuesto estudiado (el complejo de **L-A** con Mn^{2+} , en este caso). Los dos marcadores, círculos y

triángulos, representan dos conjuntos de datos diferentes, y la línea continua el ajuste generado por el programa.

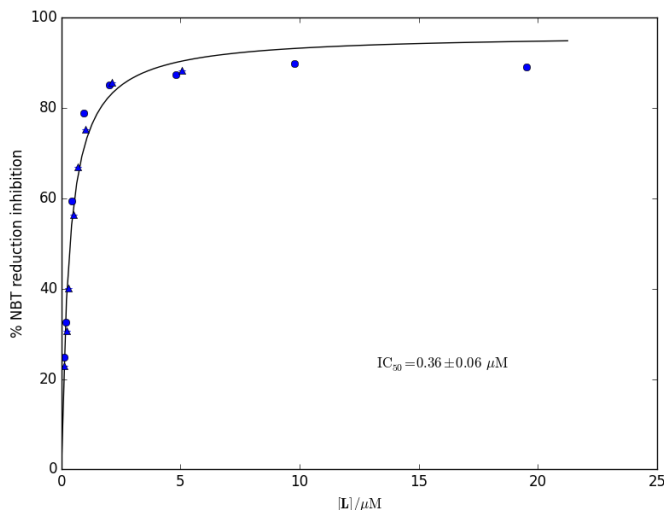


Figura 8.5. Porcentaje de inhibición de NBT frente a la concentración de compuesto.

Según los resultados de la tabla 8.2, no parece haber una diferencia sustancial entre la actividad de los escorpiandos con la cadena corta y los de cadena alargada. Tampoco la presencia de un átomo de oxígeno coordinante, en el caso del **L-S**, parece modificar mucho la actividad (si bien la estabilidad termodinámica del complejo ha aumentado, como se discutió en el capítulo 6). Sin embargo, sí se aprecia un aumento significativo de la actividad en los complejos del ligando tripodal **TPA-L₃**. La constante catalítica del complejo con un equivalente de Mn^{2+} es el doble que la de los otros compuestos estudiados. La entrada de un segundo catión metálico no parece afectar la actividad SOD, pero al entrar el tercer metal se vuelve a observar un aumento en el valor de la constante.

Una hipótesis para explicar la mayor actividad de los complejos del compuesto **TPA-L₃** se basa en el hecho de que a pH 7.4 el grupo trifenilamino se encuentra protonado. Es posible pensar que este hecho pueda facilitar la transferencia de protones al sustrato, además de generar

atracciones electrostáticas con el radical superóxido, cargado negativamente.

Respecto al potencial formal no parece que haya una correlación entre el mismo y la actividad de los complejos, si bien es difícil establecer una comparación ya que en todos los casos el potencial redox es similar. Sí es reseñable el hecho de que el compuesto **LI-A** que, según los estudios de voltamperometría cíclica era más propenso a disociar el Mn^{3+} , es justamente el compuesto con menor actividad SOD.

8.3. Actividad biológica

Se han realizado estudios preliminares con un modelo de bacterias para determinar la actividad SOD de los complejos de Mn^{2+} de los ligandos sintetizados en sistemas vivos. Para ello, se han utilizado dos cepas de *E coli*, una salvaje (AB1157) y una cepa con deficiencia de la enzima SOD (PN134) cultivadas en un medio mínimo (M9CA). El ensayo consistió en seguir el crecimiento de la cepa SOD-deficiente en ausencia (control) y presencia de diferentes concentraciones de compuesto.

Como se ha comentado antes, el Mn^{2+} libre tiene también actividad SOD ($k_{cat} = 8.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Para descartar en este experimento que la actividad registrada sea producida por el Mn^{2+} que se haya podido disociar del complejo, se procedió también a evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Mn^{2+} sobre el crecimiento de las bacterias.

En la figura 8.6 se representa el crecimiento de las bacterias, medido por turbidimetría siguiendo la absorbancia a 620 nm. El crecimiento se muestra a diferentes horas, en tanto por uno en relación a la cepa salvaje (wt). A continuación tenemos la cepa SOD-deficiente (PN) sin tratar y la misma cepa PN tratada con diferentes concentraciones (μM) de Mn^{2+} y de los complejos $[\text{Mn}(\text{L-A})]^{2+}$ y $[\text{Mn}(\text{LI-A})]^{2+}$. Como se puede observar, para todas las concentraciones ensayadas los complejos metálicos ejercen un efecto protector sobre la cepa SOD-deficiente. Este efecto que producen los complejos es mayor que el ejercido por el metal libre para concentraciones menores a $5 \mu\text{M}$, y persiste incluso en la concentración más baja ensayada, de $0.1 \mu\text{M}$. Los perfiles de crecimiento de las cepas tratadas con los complejos metálicos tienen forma de campana, con un máximo de protección a $5 \mu\text{M}$ y disminuyendo a concentraciones más bajas (por el efecto de la dilución) y a concentraciones más altas (probablemente debido a la toxicidad de los compuestos).

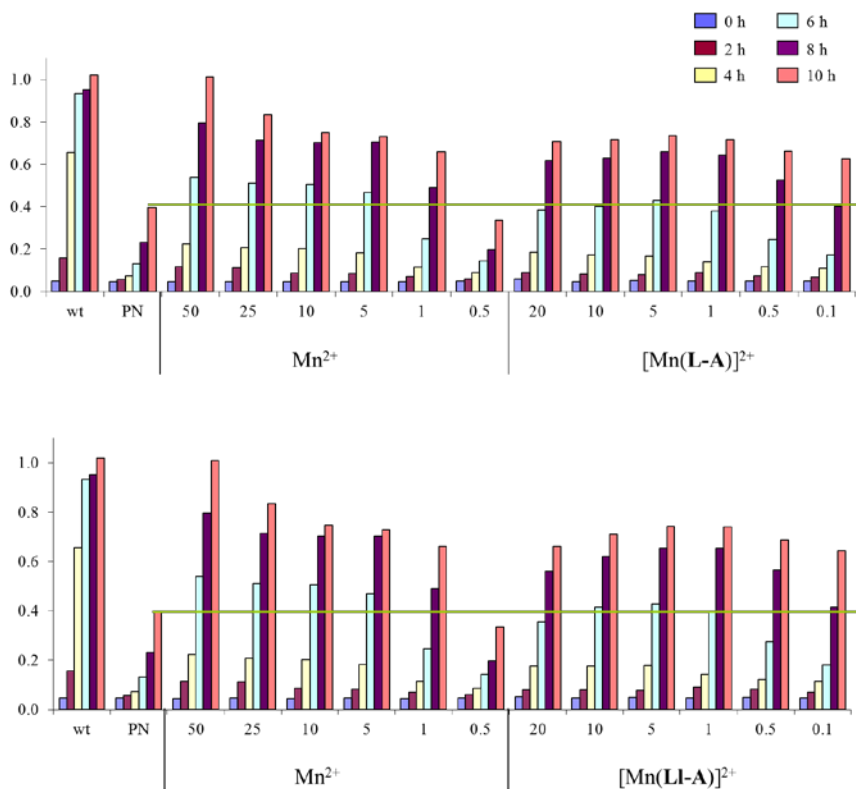


Figura 8.6. Ensayos de crecimiento de las cepas de *E. coli* tratadas con Mn^{2+} y con los complejos $[Mn(L-A)]^{2+}$ (arriba) y $[Mn(LI-A)]^{2+}$ (abajo).

Estos ensayos se repitieron con los complejos de manganeso de **LI-2Py** y **LI-4Py**. Los resultados obtenidos (figura 8.7) son positivos y análogos a los descritos antes. La diferencia está en que, para estos compuestos, el crecimiento de las cepas no disminuye al aumentar la concentración, probablemente debido a que estos compuestos son menos tóxicos que los funcionalizados con unidades aromáticas.

De los cuatro complejos ensayados, el que mayor actividad protectora ha ejercido sobre las bacterias ha sido el del compuesto **LI-4Py**. Interesantemente, este complejo es el que presentó mayor actividad SOD en los estudios cinéticos (ver tabla 8.2).

Miméticos de la superóxido dismutasa

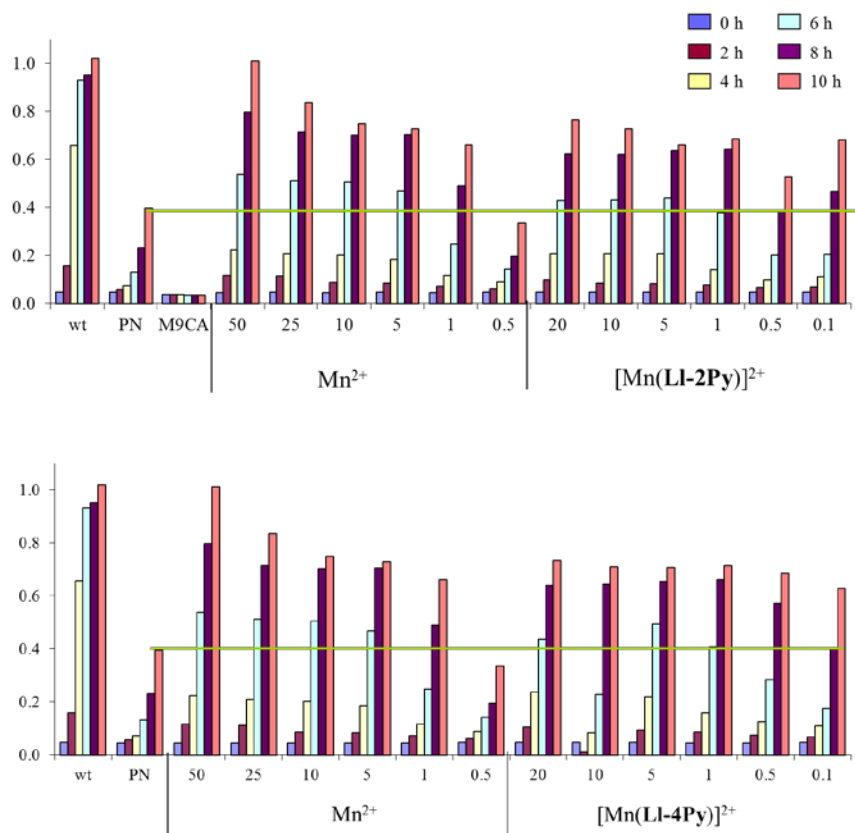


Figura 8.7. Ensayos de crecimiento de las cepas de *E. coli* tratadas con Mn^{2+} y con los complejos $[Mn(LI-2Py)]^{2+}$ (arriba) y $[Mn(LI-4Py)]^{2+}$ (abajo).

También se realizaron estudios preliminares, a una sola concentración, sobre la actividad biológica de los complejos de manganeso de **L-S** y **TPA-L₃** (figura 8.8). En el caso de **L-S**, el crecimiento de la cepa SOD-deficiente tratada con una dosis 10 μM del complejo de Mn^{2+} no fue estadísticamente diferente que el crecimiento de la cepa sin tratar (control), por lo que no se ha seguido adelante con los ensayos. Los complejos de **TPA-L₃** con 1, 2 y 3 equivalentes de Mn^{2+} , a pesar de tener unas constantes catalíticas muy elevadas en los experimentos cinéticos in vitro, no aumentaron el crecimiento de las bacterias tratadas sino que, por el contrario lo inhibieron. Esto apunta

a que este compuesto tiene una elevada toxicidad, por lo que tampoco se ha seguido avanzando en su estudio como miméticos de la SOD.

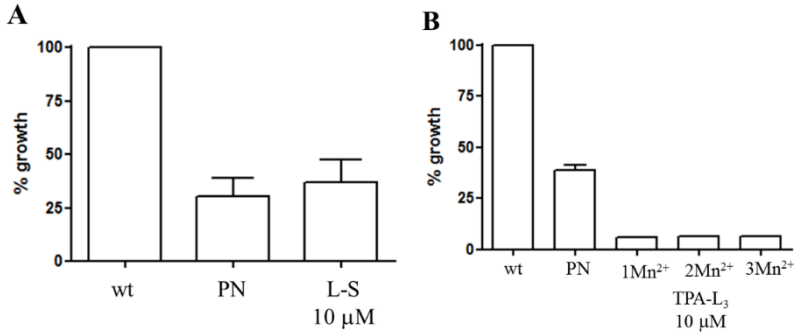


Figura 8.8. Ensayos de crecimiento de las cepas de *E. coli* tratadas con los complejos de Mn²⁺ de L-S (A) y TPA-L₃ (B).

9.
Actividad
antiparasitaria

Actividad antiparasitaria

En colaboración con el grupo de Parasitología Molecular, del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, dirigido por el profesor Manuel Sánchez Moreno, se evaluó la capacidad de los compuestos sintetizados para actuar como efectivos agentes tripanocidas frente a dos enfermedades olvidadas: el mal de Chagas (o tripanosomiasis americana) y la leishmaniasis. La sinergia surgida de la colaboración entre nuestro grupo de Química Supramolecular en la Universidad de Valencia y el grupo de Parasitología Molecular en la Universidad de Granada ha conducido a la obtención de resultados prometedores en el marco de la presente Tesis Doctoral, que han dado lugar a la publicación de dos artículos científicos [260, 325] así como una patente [326]. A continuación presentamos los principales resultados surgidos de esta colaboración.

9.1. Actividad antiparasitaria

9.1.1. Actividad antichagásica

Actividad *in vitro* e *in vivo*

Se llevaron a cabo estudios *in vitro* para determinar la actividad de seis de los compuestos sintetizados frente a las formas extracelulares (epimastigota y tripomastigota) e intracelulares (amastigota) de *T. cruzi*, de la manera descrita en el capítulo 4, “Material y métodos”. También se probaron los compuestos frente a tripomastigotas sanguíneas, ya que es esta forma, junto con la amastigota, la responsable de la fase crónica de la enfermedad. Los resultados obtenidos se presentan como valores de IC₅₀

en la tabla 9.1, incluyendo los de la droga de referencia benznidazol. También se muestran los valores obtenidos para la toxicidad frente a células Vero y los índices de selectividad ($SI = [IC_{50}, \text{células Vero}] / [IC_{50}, \text{parásito}]$). Los valores entre paréntesis representan el número de veces que la SI del compuesto supera a la del benznidazol y su valor se utiliza para evaluar el potencial *in vitro* de los compuestos frente a la droga de referencia. Como se aprecia en los resultados todos los compuestos estudiados mostraron actividad frente a las distintas formas del parásito y, en la mayoría de los casos, esta actividad es mayor que la del benznidazol. Además resultaron ser menos tóxicos frente a células Vero. Sin embargo, analizando los índices de selectividad resulta evidente que el compuesto más prometedor es **LI-4Py** y, por este motivo, los siguientes estudios se centraron en este compuesto. Interesantemente, al repetir estos estudios con los complejos de Mn^{2+} de los mismos ligandos se observó un efecto mucho menor. Esto puede atribuirse al efecto protector que ejercen los complejos de Mn^{2+} de estos ligandos frente a los radicales generados por el metabolismo oxidativo.

Tabla 9.1. Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad (SI) frente a las formas extracelular e intracelular de *Trypanosoma cruzi*^a.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^b		IC ₅₀ (μM) Células Vero ^c	SI ^d	
	Epimastigota	Amastigota		Epimastigota	Amastigota
Benznidazol	16 ± 1	23 ± 5	13.6 ± 0.9	0.8	0.6
L-A	16 ± 2	13 ± 2	214 ± 15	13 (16)	16 (27)
L-P	3.2 ± 0.3	4.2 ± 0.3	83 ± 5	26 (33)	20 (33)
LI-A	18.0 ± 0.5	14 ± 1	131 ± 13	7 (9)	9 (15)
LI-2Q	16 ± 1	8.4 ± 0.7	88 ± 6	6 (8)	10 (17)
LI-4Py	3.3 ± 0.2	2.8 ± 0.5	98 ± 7	30 (38)	35 (58)
LI-P	29 ± 2	25 ± 3	84 ± 10	3 (4)	3 (5)

^aLos resultados son promedios de cuatro determinaciones diferentes.

^bIC₅₀ = concentración necesaria para obtener un 50% de inhibición, calculado por análisis de regresión lineal de los valores obtenidos a las concentraciones de trabajo (1-100 μM).

^cFrente a células Vero después de 72h de cultivo.

^dÍndice de selectividad = IC₅₀(células Vero)/IC₅₀(forma intracelular o extracelular del parásito). En paréntesis: número de veces que el SI del compuesto excede al de la droga de referencia.

Los estudios de la actividad *in vivo* se realizaron utilizando ratones BALB/c infectados con *T. cruzi*, de la manera descrita en el capítulo 4. En estos ensayos el compuesto **LI-4Py** mostró una gran actividad, con una

reducción de la parasitemia superior al 80% al terminar la fase aguda de la infección. Debido a la excepcionalidad de este resultado, los ratones se mantuvieron hasta 120 días después de la infección (fase crónica) para realizar un ensayo de inmunosupresión y verificar la reactivación de la parasitemia. En el caso de los ratones control la reactivación fue del 100%, mientras que en ratones tratados con **LI-4Py** ésta fue sólo del 50%.

Estudios de excreción de metabolitos

Después de tratar los parásitos con el compuesto cabeza de serie, **LI-4Py**, se analizó la excreción de los metabolitos mediante espectroscopía de RMN de protón. Los resultados indican una gran alteración de los catabolitos excretados a la dosis empleada. Se observó una fuerte disminución de succinato, lactato y alanina (28.4, 39.7 y 22.1%, respectivamente). Es interesante resaltar que la reducción en succinato puede ser relacionada con una disfunción de la mitocondria, debido al estrés oxidativo producido por una hipotética inhibición de la enzima FeSOD, presente en las mitocondrias del parásito.

Alteraciones ultraestructurales

La actividad del compuesto **LI-4Py** debería llevar asociada un daño en la morfología de los parásitos. Para verificarlo se utilizó la técnica de microscopía de transmisión electrónica (TEM) para estudiar las formas epimastigota de *T. cruzi* tratadas con el compuesto (figura 9.1). Como era de esperar se observaron importantes alteraciones morfológicas en comparación a las células control: desorganización de la membrana plasmática, enormes vacuolas dentro de las células, mitocondria inflamada y expandida. El núcleo también apareció inflamado, con vacuolas y menor densidad electrónica. Se encontraron pocos ribosomas y discontinuidades en los microtúbulos a lo largo del citoplasma.

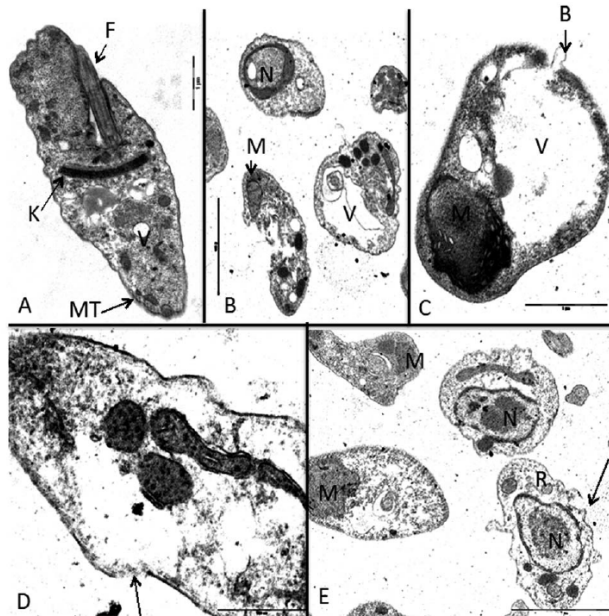


Figura 9.1. Imagen TEM mostrando las alteraciones ultraestructurales en epimastigotes de *T. cruzi* tratados con compuestos de tipo escorpiando. (A) Parásitos control. (B), (C) y (D) tratados con otros compuestos de tipo escorpiando. (D) Parásitos tratados con el compuesto **LI-4Py** a la concentración IC_{25} . N = nucleo, M = mitocondria, G = glicosomas, MT = microtúbulos, V = vacuolas, R = reservona, K = kinetoplasto y F = flagelo.

9.1.2. Actividad leishmanicida

Actividad *in vitro*

De igual forma, se realizaron ensayos para evaluar la actividad *in vitro* de seis de los compuestos sintetizados frente a tres especies de leishmania: *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*, en las formas extra e intracelular del parásito. Los ensayos intracelulares se llevaron a cabo infectando células de macrófagos con promastigotes, los cuales se transformaron en amastigotes al cabo de 1 día. En la tabla 9.2 se muestran los valores de IC₅₀ obtenidos después de 72 h de exposición a los compuestos. También se calcularon los valores para la toxicidad frente a macrófagos J774.2 después de 72 h de cultivo. Los resultados para el medicamento de referencia, glucantime, se incluyen para su comparación. Se encontró que la actividad leishmanicida contra las formas intracelulares de los parásitos es mayor para los compuestos ensayados que para la droga de referencia. Los compuestos que ofrecieron los mejores resultados fueron **LI-4Py** y **LI-2Q**. Sin embargo, el compuesto **LI-2Q** resultó ser bastante tóxico frente a células de mamífero, por lo que no se consideró para los siguientes estudios. El compuesto **LI-4Py**, por el contrario, resultó ser 10 veces menos tóxico que el glucantime, la droga de referencia, dando lugar a índices de selectividad ($SI = [IC_{50}, \text{células Vero}] / [IC_{50}, \text{parásito}]$) de 36(78) en *L. infantum*, 137(100) *L. braziliensis* y 33(61) contra *L. donovani*. El número en paréntesis refleja el número de veces que el SI del compuesto excede al SI de la droga de referencia. Cabe destacar aquí la interesante concordancia entre estos estudios y los realizados sobre la enfermedad de Chagas, ya que en ambos casos el compuesto **LI-4Py** resultó ser el más efectivo.

Tabla 9.2. Actividad *in vitro*, toxicidad e índice de selectividad (SI) frente a las formas extracelular e intracelular de *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani*^a.

Compuesto	IC ₅₀ µM ^b						Toxicidad en macrófagos	
	<i>Leishmania infantum</i>		<i>Leishmania braziliensis</i>		<i>Leishmania donovani</i>		Amastigota	IC ₅₀ (µM)
	Promastigota	Amastigota	Promastigota	Amastigota	Promastigota	Amastigota		
Glucatine®	18.0±3.1	24.2±2.6	25.6±1.6	30.4±6.1	27.4±3.8	31.4±4.1		15.2±1.3
L-A	57.3±3.2	23.0±3.7	32.9±4.3	15.0±2.3	49.5±5.1	19.5±2.3		181.3±10.7
L-P	12.1±1.0	8.6±0.9	15.6±0.8	14.1±1.3	13.5±1.5	10.7±0.8		92.4±6.8
LI-A	25.4±3.1	23.8±2.4	25.2±3.5	20.6±1.7	23.4±3.0	16.9±0.9		144.9±12.4
LI-2Py	15.6±0.7	13.7±1.3	23.2±3.4	15.3±1.6	14.0±1.3	12.5±1.0		117.3±9.8
LI-2Q	9.5±0.7	9.0±0.8	17.5±2.3	14.6±1.1	7.4±0.5	6.9±0.2		97.4±8.1
LI-4Py	4.8±0.3	3.0±0.1	1.7±0.2	2.8±0.4	8.4±0.3	4.6±0.7		140.0±11.3

^aLos resultados son promedios de cuatro determinaciones diferentes. ^bIC₅₀ = concentración necesaria para obtener un 50% de inhibición, calculado por análisis de regresión lineal de los valores obtenidos a las concentraciones de trabajo (1-100 µM).

Estudios de excreción de metabolitos

Los productos finales de excreción de los promastigotes de las especies *L. infantum*, *L. braziliensis* y *L. donovani* se identificaron cualitativa y cuantitativamente mediante espectros de RMN de protón. Los espectros obtenidos se compararon con los de promastigotes control. La variación en la señales indica que la producción de succinato, el catabolito clave en el metabolismo de la glucosa, es fuertemente inhibida por **LI-4Py** en el caso de *L. donovani*. En *L. braziliensis* y *L. infantum* no se observó ninguna reducción del pico de succinato, pero sí se observaron variaciones en la producción de acetato. En general, los cambios observados en estos y otros metabolitos indican una alteración substancial del metabolismo de la glucosa en las tres especies debida a la interacción con el compuesto.

Alteraciones ultraestructurales

Estudios de la estructura de los promastigotes de las tres especies de leishmania mediante la técnica TEM revelaron importantes alteraciones morfológicas respecto a las células control. Lo primero que se observó fue un gran porcentaje de muerte entre las células tratadas con **LI-4Py**, así como muchas otras características anormales, incluyendo vacuolización, desintegración de citoplasma celular y ruptura de los parásitos. Muchos parásitos mostraron una inflamación importante de la mitocondria. Los mayores cambios se observaron con la especie *L. donovani*, en concordancia con los estudios de excreción de metabolitos. En el caso de esta especie, además de los cambios ya descritos, se observó menor viabilidad de promastigotes, con sus contenidos citoplasmáticos mostrando poca densidad electrónica. De hecho sólo se observaron los ribosomas y glicosomas.

9.2. Propiedades farmacocinéticas

Los compuestos estudiados como antiparasitarios se sometieron a una evaluación *in silico* de sus propiedades farmacocinéticas. Para determinar si el compuesto es apto para ser administrado por vía oral se han analizado los descriptores de Lipinski. Esta regla empírica establece que los compuestos con mayores probabilidades de ser oralmente asimilables deben tener un coeficiente de reparto octanol/agua, clogP , inferior a 5; un peso molecular inferior a $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; un número de aceptores de enlaces de hidrógeno (AEH) inferior a 10 y un número de dadores de enlaces de hidrógeno (DEH) inferior a 5 [156]. Para la evaluación se eligieron las especies predominantes a pH 7.4. Los descriptores cumplen los criterios exigidos en la mayoría de los casos, salvo para los valores de clogP calculados para los compuestos **L-P** y **LI-A** los cuales, debido a los grupo aromáticos policíclicos, son demasiado hidrofóbicos.

Además de analizar los predictores de Lipinski, la estructura de los compuestos se sometió a un análisis *in silico* de sus propiedades de administración, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad. Este análisis se realizó mediante una aplicación web que permite comparar la estructura de los compuestos con una base de datos con más de 200,000 entradas obtenidas de la literatura. De este análisis cabe destacar que los valores predichos para la penetración de la barrera hematoencefálica (BBB) y la absorción del intestino humano (HIA) son positivos en todos los casos. La permeabilidad en células Caco-2 (hepitelio colorectal humano) es negativo para todos los compuestos, pero el valor de la probabilidad de la predicción es moderado. Respecto a la predicción de la toxicidad, tanto el test de AMES (medida del potencial mutagénico) como el efecto carcinogénico dan negativo para todos los compuestos.

Tanto los descriptores moleculares de Lipinski como las propiedades farmacocinéticas predichas de los compuestos estudiados se presentan en la tabla 9.3.

Tabla 9.3. Biodisponibilidad oral y propiedades ADMET.

	L-A		L-P		L-I-A		L-I-2Py		L-I-2Q		L-I-4Py	
	resultado	prob. (%)	resultado	prob. (%)	resultado	prob. (%)	resultado	prob. (%)	resultado	prob. (%)	resultado	prob. (%)
Descriptores moleculares de Lipinski												
AEH (≤ 10)	3		3		3		4		4		4	
DEH (≤ 5)	3		3		4		4		4		4	
clogP (≤ 5)	4.86		5.32		5.4		1.58		2.96		1.52	
M _w (≤ 500)	441.62		465.64		499.73		400.59		450.65		400.59	
n-EROT (≤ 10)	5		5		9		9		9		9	
BBB	+	87.9	+	87.9	+	67.6	+	67.6	+	67.6	+	67.7
HIA	+	72.2	+	72.2	+	74.1	+	74.1	+	74.1	+	74.1
Caco-2	-	61.6	-	61.6	-	65.9	-	65.9	-	65.9	-	65.9
Metabolismo												
CYP450 2C9 substrato	NS	90.2	NS	90.2	NS	89.8	NS	89.8	NS	89.8	NS	89.8
CYP450 2D6 substrato	S	63.1	S	63.1	S	55.9	S	55.9	S	55.9	S	55.9
CYP450 3A4 substrato	NS	77.0	NS	77.0	NS	73.5	NS	73.5	NS	73.5	NS	73.5
CYP450 1A2 inhibidor	NI	89.5	NI	89.5	NI	91.8	NI	91.8	NI	91.8	NI	91.8
CYP450 2C9 inhibidor	NI	96.0	NI	96.0	NI	95.4	NI	95.4	NI	95.4	NI	95.4
CYP450 2D6 inhibidor	NI	69.5	NI	69.5	NI	51.0	NI	51.0	NI	51.0	NI	51.0
CYP450 2C19 inhibidor	NI	95.1	NI	95.1	NI	96.7	NI	96.7	NI	96.7	NI	96.7
CYP450 3A4 inhibidor	NI	90.0	NI	90.0	NI	93.7	NI	93.7	NI	93.7	NI	93.7
Toxicidad												
AMES toxicidad	-	68.6	-	68.6	-	66.4	-	66.4	-	66.4	-	66.4
carcinogenesis	-	93.2	-	93.2	-	93.9	-	93.9	-	93.9	-	93.9

n-EROT, número de enlaces rotatorios; AEH, número de aceptores de enlace de hidrógeno; DEH, número de donadores de enlace de hidrógeno; clogP, logaritmo del coeficiente de repartición octanol/agua; M_w, peso molecular; BBB, barrera hematoencefálica; HIA, absorción en intestino humano; S, substrato; NS, no substrato; NI, inhibidor; NI, no inhibidor.

9.3. Estudios teóricos sobre la inhibición de la FeSOD

Como ya se discutió en el capítulo 1, “Introducción”, una de las dianas terapéuticas de los agentes tripanocidas es la superóxido dismutasa de hierro (FeSOD). Este es uno de los motivos por los que se investigó la afinidad de estos compuestos quelantes por el hierro. Como ya se observó en el capítulo 6, los complejos con Fe^{2+} muestran una estabilidad reseñable. Por lo tanto, cabría esperar que si los ligandos se aproximan lo suficiente al centro activo de la FeSOD se establezca una competición con los residuos del centro activo para capturar al ion metálico. Este hecho podría explicar la actividad antiparasitaria discutida en los apartados anteriores.

Para entender mejor los mecanismos de la interacción entre los compuestos estudiados y la enzima FeSOD se llevaron a cabo estudios de dinámica molecular en los que se colocó el compuesto más activo, **LI-4Py**, en contacto con la proteína FeSOD de *T. cruzi* (PDB ref. 2GPC), siguiendo la metodología discutida en el capítulo 4. Después de una etapa de equilibrio a 300 K se realizó una dinámica molecular de 10 ns. Para terminar se eligieron las cinco conformaciones de mínima energía de la trayectoria y se minimizaron, esta vez eliminando todas las restricciones.

La FeSOD de *T. cruzi* es una proteína dimérica con seis regiones helicoidales y tres de tipo hoja beta antiparalelas [153]. El sustrato se acerca al centro activo a través de un túnel de acceso en el que los residuos H31 e Y35 sirven como “puerta de entrada”, restringiendo el acceso de pequeñas moléculas al centro activo. El catión metálico está coordinado por los residuos H27, H75, D160, H164 y una molécula de agua (o anión hidróxido, dependiendo del pH) con una geometría de bipirámide trigonal (figura 9.2). Una red de enlaces de hidrógeno desde la puerta de acceso hasta la molécula de agua unida al metal facilita el intercambio de protones entre el centro activo y el exterior de la proteína [327].

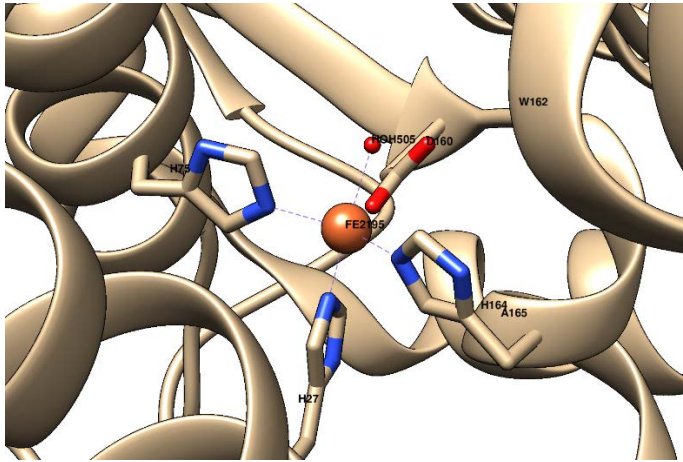


Figura 9.2. Centro activo de la FeSOD de *T. Cruzi* (PDB ref. 2GPC) [153].

Los estudios de dinámica molecular con el compuesto **LI-4Py** mostraron que se producen cambios importantes en el entorno del centro activo. El compuesto desplazó los aminoácidos que conforman la puerta de acceso, H31 e Y35, y establece puentes de hidrógeno con estos residuos. El macrociclo del ligando se orienta hacia el exterior, mientras que la cadena lateral, con el residuo de 4-piridina, se extiende apuntando al centro metálico. Si bien no se observó una interacción directa con el metal, sí se producen grandes cambios en la red de enlaces de hidrógeno alrededor del centro activo, a la vez que se desplaza la hélice 1 (ver figura 9.3A). Esta manera de interactuar no sólo distorsiona la conformación de la proteína, sino que además cambia el potencial electroquímico del metal y provoca una oclusión del túnel de acceso al centro activo, impidiendo que el sustrato se acerque al mismo (figura 9.3B).

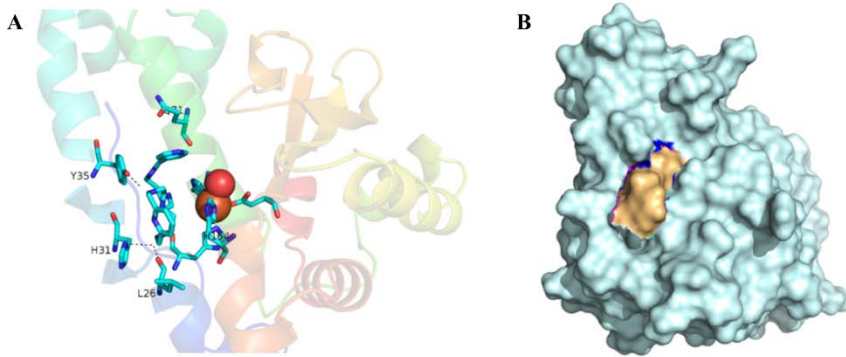


Figura 9.3. (A) Red de enlaces de hidrógeno entre el ligando **LI-4Py** y la FeSOD de *T. Cruzi*. (B) Superficie accesible al disolvente mostrando la oclusión del túnel de acceso al centro activo de la enzima debido a la interacción con **LI-4Py** (naranja).

10.

Conclusiones

Conclusiones

10.1. Síntesis

En el apartado de síntesis se han logrado sintetizar y caracterizar con éxito once nuevos ligandos poliamínicos. De éstos, cuatro son derivados de la poliamina **L**, sintetizados mediante la funcionalización de la cadena lateral con grupos aromáticos. Los nuevos ligandos de esta familia son **L-A**, **L-P** y **L-S**. Además, en colaboración con la Universidad de Urbino, se ha sintetizado el compuesto **L-O**. Se ha ampliado también la familia de los derivados del compuesto alargado **LI** con seis nuevos ligandos: **LI-A**, **LI-P**, **LI-2Py**, **LI-4Py**, **LI-2Q** y **LI-Acr**. Finalmente, y continuando con la estrategia desarrollada en nuestro grupo para preparar ligandos politópicos, se ha sintetizado la poliamina **TPA-L₃**.

Respecto a las estrategias de síntesis, se ha contribuido a desarrollar una nueva ruta sintética alternativa a la reacción de base de Schiff para la funcionalización del precursor **LI**. Esta estrategia está basada en la reacción de una amina primaria con el haluro de arilo correspondiente.

10.2. Comportamiento ácido-base y formación de complejos metálicos

10.2.1. Propiedades ácido-base

Se han podido determinar las constantes de protonación de todos los ligandos sintetizados. Esto se ha conseguido, principalmente, mediante medidas potenciométricas, pero también a través de datos espectroscópicos. La especiación en disolución acuosa se ha completado con la construcción de los correspondientes diagramas de distribución para cada uno de los compuestos. Cabe resaltar el esfuerzo realizado para determinar las constantes de protonación de compuestos relativamente insolubles en agua, como el **L-Pir**, así como el del compuesto **TPA-L₃**, con diez constantes de protonación.

Se han obtenido constantes de basicidad altas para las aminas secundarias. En ningún caso se pudo detectar la protonación de la amina terciaria ni de la piridina del macrociclo. Sí fue posible calcular las constantes de protonación de la piridina de la cadena lateral, pero únicamente en el caso en el que la sustitución era en la posición 2. También se detectó la protonación de los sustituyentes 2-quinolina, 9-acridina y trifenilamina.

Además, haciendo uso de técnicas espectroscópicas y de RMN se han podido proponer algunas de las secuencias de protonación de los compuestos sintetizados.

10.2.2. Formación de complejos metálicos

Se han realizado estudios de especiación de la mayoría de los ligandos sintetizados con Cu^{2+} y Mn^{2+} . Los resultados demuestran que los ligandos son capaces de formar complejos muy estables con Cu^{2+} , con constantes de afinidad del orden de 18 a 23 unidades logarítmicas, lo cual es de gran interés de cara a las posibles aplicaciones biomédicas de los complejos de cobre. También los complejos de Mn^{2+} demostraron ser relativamente estables, con constantes que, en la mayoría de casos, se encuentran en el intervalo de 8 a 10 unidades logarítmicas. Cabe aquí destacar el progreso logrado en el ámbito de la estabilidad de los complejos de manganeso mediante la estrategia de introducir átomos coordinantes diferentes al nitrógeno, como es el caso del compuesto **L-S**, con el cual es capaz de formar un complejo de Mn^{2+} con una constante de estabilidad casi tres órdenes de magnitud superior a la de los otros compuestos.

También se han determinado las constantes de asociación con Zn^{2+} para cuatro de los compuestos sintetizados, los cuales dan lugar a complejos muy estables, con constantes del orden de 16 a 18 unidades logarítmicas.

Finalmente, se han realizado los estudios de especiación con Fe^{2+} con los dos ligandos que mostraron una mayor actividad antiparastaria, **LI-2Py** y **LI-4Py**. En ambos casos se formaron complejos muy estables, estando el hierro cuantitativamente complejado a valores de pH superiores a 6. La mayor constante de asociación del complejo $[\text{FeL}]^{2+}$ se observó, como cabría esperar, para el ligando potencialmente heptacoordinante, **LI-2Py**, con un valor de $\log K = 14.99$. Si bien el otro ligando tiene una constante de asociación con hierro solo un orden de magnitud menor.

De manera general, los ligandos alargados tienen constantes de asociación mayores que los de cadena corta, lo que indica la participación del segundo nitrógeno de la cadena lateral en la coordinación del metal. Una excepción a esta regla es el compuesto **L-S** el cual, gracias a la presencia del oxígeno del fenolato, da lugar a complejos más estables que el resto de ligandos estudiados, incluso más que los potencialmente heptacoordinantes.

En el caso de los compuesto politópicos, se observó la formación de complejos con nuclearidad mayor a uno. Concretamente, los estudios de la interacción de **L-O** con Zn^{2+} revelaron la formación de especies de estequiometrías 1:1 y 3:2.

El compuesto **TPA-L₃** forma complejos estables con Mn^{2+} de estequiometría 1:1, 2:1 y 3:1. A relaciones molares bajas coexisten en disolución especies de todas las estequiometrías, pero al aumentar la concentración del metal prevalecen las especies de estequiometría 3:1.

Los cambios conformacionales asociados a los procesos de protonación y de complejación de cationes metálicos han sido estudiados y caracterizados mediante técnicas de RMN y espectroscopía UV-Vis. Se ha podido observar que los compuestos transitan entre una conformación cerrada, con la cadena lateral próxima al macrociclo, y una conformación abierta, en la que la cadena lateral se aleja del mismo. Las fuerzas que dan lugar a este movimiento molecular son, en el caso del ligando libre, los puentes de hidrógeno que se establecen entre los grupos amonio del macrociclo y el/los grupo/s amino de la cadena lateral, así como las interacciones por apilamiento $\pi-\pi$ entre el sustituyente aromático y la piridina del macrociclo. En el caso de los complejos metálicos, la necesidad de cubrir la esfera de coordinación del metal desplaza el equilibrio hacia la conformación cerrada.

10.3. Interacción con aniones de interés biológico

10.3.1. Interacción con mononucleótidos

Se determinaron las constantes de estabilidad de cuatro de los receptores sintetizados, **L-A**, **LI-A**, **LI-2Py** y **LI-4Py** con ATP, ADP, AMP, GTP y UTP. Se demostró que estos compuestos de tipo escorpiando son capaces de formar complejos estables de estequiometría 1:1 en agua. Estas interacciones sustrato-receptor están basadas en dos tipos de interacciones no covalentes, apilamiento π - π y enlaces de hidrógeno. La extensión e influencia de cada una depende del grupo aromático en la cadena lateral. Los receptores funcionalizados con antraceno, **L-A** y **LI-A**, mostraron una mayor selectividad por el GTP, lo que permite la discriminación de esta nucleobase frente al ATP y UTP, sustentado en la mayor capacidad de la guanina para formar complejos π - π con el antraceno. Además, estos receptores reflejan una fuerte disminución de la fluorescencia en la presencia de GTP a lo largo de todo el intervalo de pH, mientras que la intensidad de la fluorescencia aumenta significativamente en presencia de ATP entre pH 4.0 y 8.0. Esta diferencia importante en el comportamiento fotoluminiscente de los receptores **L-A** y **LI-A** los convierte en sensores eficientes para distinguir selectivamente GTP de ATP.

Por otro lado, los compuestos basados en piridina, **LI-2Py** y **LI-4Py**, mostraron una mayor afinidad por el ATP frente a los otros nucleótidos. La interacción con ATP de **LI-2Py** está reforzada por dos enlaces de hidrógeno entre la piridina de la cadena lateral y la base de adenina.

10.3.2. Interacción con ácidos nucleicos monohebra

La interacción del compuesto **L-A** frente a los ácidos nucleicos de cadena sencilla poli-A, poli-G, poli-C y poli-U, se estudió mediante técnicas espectroscópicas. Los datos obtenidos revelan una preferencia del receptor por los ácidos nucleicos compuestos por basas púricas, principalmente poli-G, frente a los polímeros de bases pirimidínicas, poli-C y poli-U. Este hecho está en buena concordancia con las conclusiones antes expuestas respecto a la interacción de este receptor con los mononucleótidos, en los que había una preferencia en la interacción con los mononucleótidos de bases púricas (GTP > ATP >> UTP) debido a las interacciones de apilamiento π .

Estudios de emisión de fluorescencia, además de reforzar esta conclusión, apuntan hacia un mecanismo diferente en la interacción del compuesto con poli-A y poli-G. Los resultados preliminares parecen indicar que la interacción con este último podría involucrar la formación de estructuras de tipo G-quadruplex.

10.3.3. Interacción con ácidos nucleicos de doble hebra

Se realizaron estudios sobre la interacción del compuesto **L-A** con cuatro polinucleótidos de cadena doble: poli-A–poli-U, poli-(dAT)₂, poli-(dGC)₂, y ctDNA. Los estudios espectroscópicos llevados a cabo apuntan a un tipo de interacción mediante la intercalación del cromóforo de antraceno entre los pares de bases, exceptuando el caso del poli-(dAT)₂ el cual, debido a su estructura secundaria, parece favorecer la interacción a través del surco. Las constantes de afinidad calculadas fueron similares para todos los polinucleótidos estudiados (del orden de 10^6 M^{-1}). Los cambios observados en la fluorescencia de **L-A** al interaccionar con los diferentes polinucleótidos de doble hebra fueron diferentes en cada caso. Este llamativo comportamiento abre la posibilidad de utilizar el compuesto **L-A** como un sensor fluorescente. Especialmente interesante resulta el

hecho de que la banda de emisión del ligando a 432 nm aumenta sensiblemente (> 40%) su intensidad (estado ON) al interactuar con poli-(dAT)₂. Mientras que la misma banda de emisión se desactiva (estado OFF), con una reducción del 90% de la intensidad de emisión, cuando el ligando se une al poli-(dGC)₂. Estos dos comportamientos tan diferentes abren la posibilidad de utilizar este ligando como una sonda fluorescente selectiva para secuencias de ADN.

10.3.4. Efecto alostérico

Los estudios sobre la interacción con ácidos nucleicos de los ligandos **L-A**, **LI-A** y **LI-Pir** en presencia de cationes metálicos muestran que es posible alterar el modo de interacción de los compuestos de tipo escorpiando a través de los cambios conformacionales inducidos por la presencia del metal.

Las medidas de temperatura de desnaturalización a diferentes valores de pH también dieron como resultado una mayor estabilización de las secuencias de ADN y ARN a valores de pH bajos, cuando el compuesto **L-A** se encuentra en la conformación abierta. Este hecho parece apuntar a que el cambio conformacional inducido por el gradiente de protón pueda tener una influencia en la intensidad o el modo de la interacción, si bien el efecto también podría ser explicado en base al mayor número de cargas positivas en el compuesto.

Se acumuló un gran número de evidencias experimentales sobre la alteración del modo de interacción a través de distintas técnicas. Todo parece indicar que los compuestos de tipo escorpiando con unidades aromáticas policíclicas intercalan eficientemente en la doble hebra del ADN, pero que este proceso de intercalación se ve impedido o dificultado cuando el compuesto adquiere la conformación cerrada, debido probablemente al impedimento estérico al que se ve sujeta la unidad intercalante en la conformación cerrada.

Especialmente interesante resulta el hecho de que esta modulación de la interacción se traslade a la actividad citotóxica de los compuestos, la cual pasa de ser muy elevada, con valores de IC_{50} en torno a $5 \mu\text{M}$ para el ligando libre, a ser baja, con IC_{50} alrededor de $100 \mu\text{M}$ para el complejo metálico. Y, más aun, se comprobó que los efectos citotóxicos que estos compuestos intercalantes tienen sobre un cultivo celular se pueden detener al añadir Zn^{2+} al medio de cultivo.

La técnica de microscopía de fluorescencia ha permitido observar la co-localización de los ligandos con unidades aromáticas dentro de las células. Los estudios preliminares indican que los compuestos penetran la membrana celular a través de un mecanismo de transporte activo distinto del PTS. Una vez dentro de las células, los compuestos causan la muerte por apoptosis, posiblemente debido al daño inducido en el ADN y a la polimerización de la tubulina. Estudios preliminares con ratones inmunodeprimidos, a los que se les ha inducido un tumor, indican que el tratamiento de los animales con dosis no letales de **LI-P** permite reducir el tamaño de los tumores.

10.4. Actividad como miméticos de la superóxido dismutasa

Se caracterizó el comportamiento electroquímico de los complejos de Mn^{2+} de seis de los ligandos sintetizados, pudiéndose deducir las reacciones que tienen lugar en disolución acuosa durante el proceso de oxidación y reducción del par $\text{Mn}^{2+}/\text{Mn}^{3+}$. Los potenciales formales detectados están, en todos los casos, dentro del intervalo adecuado para los miméticos de la SOD.

Los resultados de las medidas cinéticas, llevadas a cabo a través del método indirecto del NBT, son positivos en todos los casos, dando lugar a constantes catalíticas entre $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $22 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estos valores son mayores que los del Mn^{2+} libre, lo que indica que la complejación del metal por el ligando es fundamental para explicar la elevada actividad. Los datos parecen indicar que no hay grandes diferencias entre la actividad de los escorpiandos de cadena corta y los de cadena alargada. Tampoco la presencia de un átomo de oxígeno coordinante, en la caso del **L-S**, parece modificar substancialmente la actividad.

Particularmente interesante es el resultado obtenido para la actividad SOD del compuesto **TPA-L₃** con tres equivalentes de Mn^{2+} , del cual se han obtenido uno de los mejores resultados publicados hasta la fecha para miméticos de la SOD. Atribuimos este buen resultado, a la presencia de una carga positiva en la unidad de trifenilamina.

Estudios con cepas de *E. coli* deficientes de SOD demostraron que los complejos de manganeso de los compuestos **L-A**, **LI-A**, **LI-2Py** y **LI-4Py** ejercen una acción protectora, potenciando el crecimiento de las bacterias en mayor medida que el Mn^{2+} libre. El complejo de manganeso de **L-S** no demostró ser activo a una dosis de $10 \mu\text{M}$ en este experimento *in vitro*, mientras que los complejos de **TPA-L₃** inhibieron el crecimiento de las bacterias.

10.5. Actividad antiparasitaria

La capacidad de los compuestos sintetizados para actuar como agentes tripanocidas frente a la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis fue evaluada por el grupo de Parasitología Molecular, del Departamento de Parasitología de la Universidad de Granada, dirigido por el profesor Manuel Sánchez Moreno. Todos los compuestos estudiados (un total de seis) fueron activos frente a las distintas formas de los parásitos y, en la mayoría de los casos, esta actividad fue mayor que la de las drogas de referencia. El compuesto más prometedor, tanto en la enfermedad de Chagas como en la leishmaniasis fue el **LI-4Py**. Estudios preliminares parecen indicar que el mecanismo de acción de estos compuestos es a través de la inhibición de la enzima FeSOD del parásito. Este aspecto ha sido respaldado mediante estudios de modelización molecular.

Para todos los compuestos estudiados se han analizado los descriptores de Lipinski, los cuales permiten evaluar si el compuesto será apto para ser administrado por vía oral. Todos los compuestos analizados cumplieron con los requisitos, con la excepción de **L-P** y **LI-A** los cuales fallan en unos de los parámetros analizados debido a su mayor hidrofobicidad. Las predicciones sobre las propiedades farmacocinéticas (administración, metabolismo y excreción) de los compuestos también son positivas.

Bibliografía

-
- ¹ Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry* (Lippincott Williams & Wilkins, **2008**).
- ² Asimov, I. *Breve Historia de la Química* (Alianza Editorial, **1975**).
- ³ Babor, J. A.; Ibarz, J. *Química General Moderna* (Editorial Marín, S. A., **1965**).
- ⁴ Wermuth, C. G. *The Practice of Medicinal Chemistry* (Academic Press, **1996**).
- ⁵ Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022–1037.
- ⁶ Smith, D. K. *J. Chem. Ed.* **2005**, 82, 393–400.
- ⁷ Ansarian, H. R.; Derakhshan, M.; Takafuji, M.; Ihara, H. *Med. Hypotheses*. **2008**, 71, 881–885.
- ⁸ Lehn, J.-M. *Science*. **1993**, 260, 1762–1763.
- ⁹ Lehn, J.-M. *Science*. **1985**, 227, 849–856.
- ¹⁰ Faulkner, S.; Kenwright, A. M. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Volume 7 (Ed. P. A. Gale y J. W. Steed. John Wiley & Sons, Ltd., **2012**).
- ¹¹ Werner, A. *Zeitschr. Anorg. Chem.* **1893**, 3, 267–330.
- ¹² Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- ¹³ Ehrlich, P. *Studies on immunity* (Wiley, **1906**).
- ¹⁴ Wolf, K. L.; Frahm, H.; Harms, H. Z. *Phys. Chem., Abt. B.* **1937**, 36, 237–287.
- ¹⁵ Moore, C.; Pressman, B. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, 15, 562–567.
- ¹⁶ Chapell, J. B.; Crofts, A. R. *Biochem. J.* **1965**, 95, 393–402.
- ¹⁷ Graven, S. N.; Lardy, H. A.; Johnson, D.; Rutter, A. *Biochemistry*. **1966**, 5, 1729–1735.
- ¹⁸ Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017–7036.
- ¹⁹ Dietrich, B.; Lehn, J.-M.; Sauvage, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2885–2888.
- ²⁰ Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871–892.
- ²¹ Cram, D. J.; Kaneda, T.; Helgeson, R. C.; Lein, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6752–6754.
- ²² Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives* (VCH, **1995**).
- ²³ *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials* (Eds. P. A. Gale y J. W. Steed, John Wiley & Sons, Ltd., **2012**).
- ²⁴ Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry* (Ed. John Wiley & Sons, Ltd., **2000**).
- ²⁵ Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525–5534.
- ²⁶ Wheeler, S. E.; Bloom, J. W. G. *J. Phys. Chem. A.* **2014**, 118, 6133–6147.
- ²⁷ Janiak, C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 3885–3896.

-
- ²⁸ Meyer, E. E.; Rosenberg, K. J.; Israelachvili, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 15739–15746.
- ²⁹ Rekharsky, M.; Inoue, Y. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Volume 1 (Ed. P. A. Gale and J. W. Steed. John Wiley & Sons, Ltd., **2012**).
- ³⁰ Whitesides, G. M.; Lipomi, D. J. *Faraday Discuss.* **2009**, 143, 373–384.
- ³¹ Cram, D. J. *Science.* **1988**, 240, 760–767.
- ³² Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 263–277.
- ³³ Cram, D. J.; Lein, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3657–3658.
- ³⁴ Dyason, J. C.; von Itzstein, M. *Aust. J. Chem.* **2001**, 54, 663–670.
- ³⁵ Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Laver, W. G. *Nature.* **1983**, 303, 41–44.
- ³⁶ Li, Q.; Qi, J.; Wu, Y.; Kiyota, H.; Tanaka, K.; Suhara, Y.; Ohru, H.; Suzuki, Y.; Vavricka, C. J.; Gao, G.F. *J. Virol.* **2013**, 87, 10016–10024.
- ³⁷ Ortiz Mellet, C.; García Fernández, J. M.; Benito, J. M. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*. (Ed. Hans-Jörg Schneider, RSC Publishing, **2013**).
- ³⁸ Philp, D.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1154–1196.
- ³⁹ Lehn, J.-M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, 99, 4763–4768.
- ⁴⁰ Whitesides, G. M.; Grzybowski, B. *Science.* **2002**, 295, 2418–2421.
- ⁴¹ Roco, M. C. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14, 337–346.
- ⁴² Hartgerink, J. D.; Clark, T. D.; Ghadiri, M. R. *Chem. Eur. J.* **1998**, 4, 1367–1372.
- ⁴³ Fernández-López, S.; Kim, H.-S.; Choi, E. C.; Delgado, M.; Granja, J. R.; Khasanov, A.; Kraehenbuehl, K.; Long, G.; Weinberger, D. A.; Wilcoxon, K. M.; Ghadiri, M. R. *Nature.* **2001**, 412, 452–456.
- ⁴⁴ Cloninger, M. J.; Bilgiçer, B.; Li, L.; Mangold, S. L.; Phillips, S. T.; Wolfenden, M. L. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Volume 1 (Ed. P. A. Gale y J. W. Steed. John Wiley & Sons, Ltd., **2012**).
- ⁴⁵ Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 2754–2794.
- ⁴⁶ Muñoz, A.; Sigwalt, D.; Illescas, B. M.; Luczkowiak, J.; Rodríguez-Pérez, L.; Nierengarten, I.; Holler, M.; Remy, J.-S.; Buffet, K.; Vincent, S. P.; Rojo, J.; Delgado, R.; Nierengarten, J.-F.; Martín, N. *Nat. Chem.* **2015**, DOI: 10.1038/NCHEM.2387.
- ⁴⁷ Sabesan, S.; Duus, J. O.; Neira S.; Domaille, P.; Kelm, S.; Paulson, J. C.; Bock, K. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 8363–8375.
- ⁴⁸ Mammen, M.; Dahmann, G.; Whitesides, G. M. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4179–4190.
- ⁴⁹ Woster, P. M.; Casero, R. A. *Polyamine Drug Discovery* (RSC Publishing, **2012**).
- ⁵⁰ Pegg, E. A. *Chem. Res. Toxicol.* **2013**, 26, 1782–1800.
- ⁵¹ Oshima, T. *Amino Acids.* **2007**, 33, 367–372.
- ⁵² Battaglia, V.; DeStefano Shields, C. *Amino Acids.* **2014**, 46, 511–519.
- ⁵³ Poulin, R.; Casero, R. A.; Soulet, D. *Amino Acids.* **2012**, 42, 711–723.
- ⁵⁴ Nowotarski, S. L.; Woster, P. M.; Casero, R. A. *Expert Rev. Mol. Med.* **2013**, 15, 1–21.

- ⁵⁵ Gerner, E. W.; Meyskens, F. L. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, *4*, 781–792.
- ⁵⁶ Yoshida, M.; Kashiwagi, K.; Shigemasa, A.; Taniguchi, S.; Yamamoto, K.; Makinoshima, H.; Ishishama, A.; Igarashi, K. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 46008–46013.
- ⁵⁷ Saini, P.; Eyler, D. E.; Green, R.; Dever, T. E. *Nature*. **2009**, 459, 118–121.
- ⁵⁸ Lopatin, A. N.; Nichols, G. C. *Nature*. **1994**, *372*, 366–369.
- ⁵⁹ N'soukpoé-Kossi, C. N.; Ouameur, A. A.; Thomas, T.; Shirahata, A.; Thomas, T. J.; Tajmir-Riahi, H. A. *Biomacromolecules*. **2008**, *9*, 2712–2718.
- ⁶⁰ Woods, K. K.; Maehigashi, T.; Howerton, S. B.; Sines, C. C.; Tannenbaum, S.; Williams, L. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15330–15331.
- ⁶¹ Westhof, E.; Dumas, P.; Moras, D. *Acta Crystallogr., Sect. A*. **1988**, *44*, 112–123.
- ⁶² Tabor, C. W.; Tabor, H. *Microbiol. Rev.* **1985**, *49*, 81–99.
- ⁶³ Tabor, C. W.; Rosenthal, S. M. *Pharmacol. Exp. Ther.* **1956**, 116, 139–155.
- ⁶⁴ García-España, E.; Piantanida, I.; Schneider, H.-J. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*. (Editado por Hans-Jörg Schneider, RSC Publishing, **2013**).
- ⁶⁵ Neidle, S. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 291–309.
- ⁶⁶ Khan, G. S.; Shah, A.; Rehman, Z.-U.; Barker, D. J. *Photochem. Photobiol. B*. **2012**, *115*, 105–118.
- ⁶⁷ Kopka, M. L.; Yoon, C.; Goodsell, D.; Pjura, P.; Dickerson, R. E. *J. Mol. Biol.* **1985**, *183*, 553–563.
- ⁶⁸ Butcher, S. E.; Pyle, A. M. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1302–1311.
- ⁶⁹ Comarmond, M. B.; Giege, R.; Thierry, J. C.; Moras, D.; Fischer, J. *Acta Crystallogr., Sect. B*. **1986**, *42*, 272–280.
- ⁷⁰ Freisz, S.; Lang, K.; Micura, R.; Dumas, P.; Ennifar, E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 4110–4113.
- ⁷¹ Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18–30.
- ⁷² Pritchard, N. J.; Blake, A.; Peacocke, A. R. *Nature*. **1966**, 212, 1360–1361.
- ⁷³ Hannon, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280–295.
- ⁷⁴ Rescifina, A.; Zagni, C.; Varrica, M. G.; Pistarà, V. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *74*, 95–115.
- ⁷⁵ Maehigashi, T.; Persil, O.; Hud, N. V.; Williams, L. D. *To be published*. DOI:10.2210/pdb3ft6/pdb.
- ⁷⁶ Pigram, W. J.; Fuller, W.; Hamilton, L. D. *Nature*. **1972**, 235, 17–19.
- ⁷⁷ Quigley, G. J.; Wang, A. H.; Ughetto, G.; van der Marel, G.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, *77*, 7204–7208.
- ⁷⁸ Todd, A. K.; Adams, A.; Thorpe, J. H.; Denny, W. A.; Wakelin, L. P. G.; Cardin, C. J. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 536–540.
- ⁷⁹ Bjorkman, S.; Elisson, L. O.; Gabrielsson, J. *J. Pharm. Pharmacol.* **1989**, *41*, 160–163.
- ⁸⁰ Gao, Y.-G.; Robinson, H.; Wijsman, E. R.; Van Der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Wang, A. H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 1496–1497.
- ⁸¹ Liu, H.-K.; Sadler, P. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 349–359.
- ⁸² Jennette, K. W.; Lippard, S. J.; Vassiliades, G. A.; Bauer, W. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1974**, *71*, 3839–3843.
- ⁸³ Erkkilä, K. E.; Odom, D. T.; Barton, J. K. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2777–2295.

- ⁸⁴ Chu, Y.; Hoffman, D. W.; Iverson, B. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 3499–3508.
- ⁸⁵ Lowe, G.; Droz, A. S.; Park, J. J.; Weaver, G. W. *Bioorg. Chem.* **1999**, 27, 477–486.
- ⁸⁶ Choi, J.; Majima, T. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5893–5909.
- ⁸⁷ Edwards, M. L.; Prakash, N. J.; Stemerick, D. M.; Sunkara, S. P.; Bitonti, A. J.; Davis, G. F.; Dumont, J. A.; Bey, P. *J. Med. Chem.* **1990**, 33, 1369–1375.
- ⁸⁸ Matsui, I.; Pegg, A. E. *Biochim. Biophys. Acta.* **1980**, 633, 87–94.
- ⁸⁹ Frydman, B.; Blokhin, A. V.; Brumel, S.; Wilding, G.; Maxuitenko, Y.; Sarkar, A.; Bhattacharya, S.; Church, D.; Reddy, V. K.; Kink, J. A.; Marton, L. J.; Valasinas, A.; Basu, H. S. *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4586–4600.
- ⁹⁰ Stewart, K. D.; Gray, T. A.; J. Phy. Org. Chem. **1992**, 5, 461–466.
- ⁹¹ Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. *Principles and methods in supramolecular chemistry* (Wiley, **2000**).
- ⁹² Chand, D. K.; Schneider, H.-J.; Aguilar, J. A.; Escartí, F.; García-España, E. *Inorg. Chim. Acta.* **2000**, 316, 71–78.
- ⁹³ Aguilar, J. A.; García-España, E.; Guerrero, J.; Luis, S. V.; Llinares, J. M.; Ramírez, J. A.; Soriano, C. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1995**, 2237–2238.
- ⁹⁴ Aguilar, J. A.; García-España, E.; Guerrero, J.; Luis, S. V.; Llinares, J. M.; Ramírez, J. A.; Soriano, C. *Inorg. Chim. Acta.* **1996**, 287–294.
- ⁹⁵ Lomadze, N.; Schneider, H.-J.; Albelda, M. T.; García-España, E.; Verdejo, B. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 1755–1759.
- ⁹⁶ Pavlov, V.; Lin, P. K. T.; Rodilla, V. *Chem.-Biol. Interact.* **2001**, 137, 15–24
- ⁹⁷ Gentry, A. C.; Pitts, S. L.; Jablonsky, M. J.; Bailly, C.; Graves, D. E.; Osheroff, N. *Biochemistry*, **2011**, 50, 3240–3249.
- ⁹⁸ Zhang, L. H.; Xi, Z.; Chattopadhyaya, J. *Medicinal chemistry of nucleic acids* (John Wiley & Sons, Inc. **2011**).
- ⁹⁹ Fico, R. M.; Chen, T. K.; Canellakis, E. S. *Science.* **1977**, 198, 53–56.
- ¹⁰⁰ Hansen, J. B.; Koch, T.; Buchardt, O.; Nielsen, P. E.; Norden, B.; Wirth, M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 509–511.
- ¹⁰¹ Wang, Q.; Lönnberg, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10716–10728.
- ¹⁰² Liu, Q.; Zhang, J.; Wang, M. Q.; Zhang, D. W.; Lu, Q. S.; Huang, Y.; Lin, H. H.; Yu, X. Q. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5302–5308.
- ¹⁰³ Yan, H.; Li, A.; Guo, Z.; Lu, Z.; Wang, F.; Wu, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 801–808.
- ¹⁰⁴ Huang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, J.; Zhang, D.-W.; Lu, Q.-S.; Liu, J.-L.; Chen, S.-Y.; Lin, H.-H.; Yu, X.-Q. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2278–2285.
- ¹⁰⁵ Kikuta, E.; Katsube, N.; Kimura, E. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, 4, 431–440.
- ¹⁰⁶ Ellis, L. T.; Perkins, D. F.; Turner, P.; Hambley, T. W. *Dalton Trans.* **2003**, 2728–2736.
- ¹⁰⁷ Li, K.; Fernandez-Saiz, M.; Rigil, C. T.; Kumar, A.; Rangunathan, K. G.; McConnaghie, A. W.; Boykin, D. W.; Schneider, H.-J.; Wilson, W. D. *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, 5, 1157–1172.
- ¹⁰⁸ Fernandez-Saiz, M.; Schneider, H.-J.; Sartorius, J.; Wilson, W. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4739–4745.

- ¹⁰⁹ Chand, D. K.; Schneider, H.-J.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Ciattini, S.; Valtancoli, B. *Chem. Eur. J.* **2000**, *6*, 4001–4008.
- ¹¹⁰ Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *43*, 496–505.
- ¹¹¹ Schneider, H.-J. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*. (Ed. Hans-Jörg Schneider, RSC Publishing, **2013**).
- ¹¹² Bell, T. W.; Hext, N. M. *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 589–598.
- ¹¹³ Czarnik, A. W. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 302–308.
- ¹¹⁴ Fabbrizzi, L.; Poggi, A. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, *24*, 197–202.
- ¹¹⁵ Xie, X. S. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29*, 598–606.
- ¹¹⁶ Valeur, B.; Leray, I. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *205*, 3–40.
- ¹¹⁷ de Silva, A. P.; Gunaratne, H. Q. N.; Gunnlaugsson, T.; Huxley, A. J. M.; McCoy, C. P.; Rademacher, J. T.; Rice, T. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1515–1566.
- ¹¹⁸ He, H. R.; Mortellaro, M. A.; Leiner, M. J. P.; Fraatz, R. J.; Tusa, J. K. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 549–555.
- ¹¹⁹ Qi, X.; Jun, E. J.; Xu, L.; Kim, S.-J.; Hong, J. S. J.; Yoon, Y. J.; Yoon, J. J. *Org. Chem.* **2006**, *71*, 2881–2884.
- ¹²⁰ Goswami, S.; Sen, D.; Das, N. K.; Hazra, G. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 5563–5566.
- ¹²¹ Zhou, X.; Yu, B.; Guo, Y.; Tang, X.; Zhang, H.; Liu, W. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 4002–4007.
- ¹²² Huston, M. E.; Akkaya, E. U.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8735–8737.
- ¹²³ Fenniri, H.; Hosseini, M. W.; Lehn, J.-M. *Helv. Chim. Acta.* **1997**, *80*, 786–803.
- ¹²⁴ Albelda, M. T.; Aguilar, J.; Alves, S.; Aucejo, R.; Díaz, P.; Lodeiro, C.; Lima, J. C.; García-España, E.; Pina, F.; Soriano, C. *Helv. Chim. Acta.* **2003**, *86*, 3118–3135.
- ¹²⁵ Howe-Grant, M. S.; Lippard, S. J. *Biochemistry.* **1979**, *18*, 5762–5769.
- ¹²⁶ James, T. D.; Linnane, P.; Shinkai, S. *Chem. Commun.* **1996**, 281–288.
- ¹²⁷ Cai, Z. P.; Hagan, A. K.; Wang, M. M.; Flitsch, S. L.; Liu, L.; Voglmeir, J. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5179–5186.
- ¹²⁸ Florea, M.; Nau, W. M.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 9338–9342.
- ¹²⁹ Xu, M.; Han, J.-M.; Zhang, Y.; Yang, X.; Zang, L. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 11779–11781.
- ¹³⁰ Liu, Y.; Tang, Y.; Barashkov, N. N.; Irgibaeva, I. S.; Lam, J. W. Y.; Hu, R.; Birimzhanova, D.; Yu, Y.; Tang, B. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13951–13953.
- ¹³¹ McLaurin, E. J.; Greytak, A. B.; Bawendi, M. G.; Nocera, D. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12994–13001.
- ¹³² De Santis, G.; Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Poggi, A.; Taglietti, A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 202–204.
- ¹³³ Akkaya, E. U.; Huston, M. E.; Czarnik, A. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 3590–3593.
- ¹³⁴ Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Mascheroni, S.; Poggi, A.; Sacchi, D.; Zema, M. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 6129–6136.
- ¹³⁵ Butterfield, N. J. *Geobiology.* **2009**, *7*, 1–7.

- ¹³⁶ Ivanović-Burmazović, I.; Filipović, M. R. *Adv. Inorg. Chem.* **2012**, 64, 53–95.
- ¹³⁷ Gilbert, D. L. *Oxygen and Living Processes: An Interdisciplinary Approach* (Springer Verlag, **1981**).
- ¹³⁸ Fridovich, I. *Science.* **1978**, 201, 875–880.
- ¹³⁹ Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Biochem. J.* **1984**, 219, 1–14.
- ¹⁴⁰ Hill, H. A. O. *Philos. Trans. R. Soc. Londond Ser. B.* **1981**, 294, 119–128.
- ¹⁴¹ Vallet, M.; Faus, J.; García-España, E.; Moratal, J. *Introducción a la Química Bioinorgánica* (Editorial Síntesis, **2003**).
- ¹⁴² Raha, S.; Robinson, B. H. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 502–508.
- ¹⁴³ Iranzo, O. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 73–87.
- ¹⁴⁴ Editorial. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, 59, 139–142.
- ¹⁴⁵ Batinić-Haberle, I.; Rebouças, J. S.; Spasojević, I. *Antioxid. Redox Signaling.* **2010**, 13, 877–918.
- ¹⁴⁶ Imlay, J. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 755–776.
- ¹⁴⁷ Miriyala, S.; Spasojevic, I.; Tovmasyan, A.; Salvemini, D.; Vujaskovic, Z.; St. Clair, D.; Batinic-Haberle, I. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, 1822, 794–814.
- ¹⁴⁸ Borgstahl, G. E.; Parge, H. E.; Hickey, M. J.; Beyer Jr., W. F.; Hallewell, R. A.; Tainer, J. A. *Cell.* **1992**, 71, 107–107.
- ¹⁴⁹ Calderone, V.; Casini, A.; Mangani, S.; Messori, L.; Orioli, P.L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 1267–1269.
- ¹⁵⁰ Wuerges, J.; Lee, J.-W.; Yim, Y.-I.; Yim, H.-S.; Kang, S.-O.; Djinovic Carugo, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 8569–8574.
- ¹⁵¹ Oberley, L. W.; Oberley, T. D.; Buettner, G. R. *Med. Hypotheses.* **1980**, 6, 249–268.
- ¹⁵² Murphy, M. P.; Smith, R. A. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, 47, 629–656.
- ¹⁵³ Bachega, J. F. R. M.; Navarro, V. A. S.; Bleicher, L.; Bortoleto-Bugs, R. K.; Dive, D.; Hoffmann, P.; Viscogliosi E.; Garratt, R. C. *Proteins.* **2009**, 77, 26–37.
- ¹⁵⁴ Barnese, K.; Gralla, E. B.; Cabelli, D. E.; Valentine, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4604–4606.
- ¹⁵⁵ Riley, D. P. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2773–2587.
- ¹⁵⁶ Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3–26.
- ¹⁵⁷ Baudry, M.; Etienne, S.; Bruce, A.; Palucki, M.; Jacobsen, E.; Malfroy, B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 192, 964–968.
- ¹⁵⁸ EUKARION, Inc. U.S. Patent US5696109, **1997**.
- ¹⁵⁹ Pasternack, R. F.; Banth, A.; Pasternack, J. M.; Johnson, C. S. *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 15, 261–267.
- ¹⁶⁰ Koppenol, W. H.; Levine, F.; Hatmaker, T. L.; Epp, J.; Rush, J. D. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 251, 594–599.
- ¹⁶¹ Deroche, A.; Morgenstern-Badarau, I.; Cesario, M.; Guilhem, J.; Keita, B.; Nadjo, L.; Houee-Levin, C. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 4567–4573.
- ¹⁶² Rush, J. D.; Maskos, Z.; Koppenol, W. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **1991**, 289, 97–102.
- ¹⁶³ Weiss, R. H.; Riley, D. P. *Drugs Future.* **1996**, 21, 383–389.
- ¹⁶⁴ Salvemini, D. PCT Int. Appl. WO 98/58636, **1998**.

- ¹⁶⁵ Salvemini, D.; Wang, Z.-Q.; Zweier, J. L.; Samouliov, A.; Macarthur, H.; Misko, T. P.; Currie, M. G.; Cuzzocrea, S.; Sikorski, J. A.; Riley, D. P. *Science*. **1999**, 286, 304–306.
- ¹⁶⁶ Li, Q.-X.; Luo, Q.-H.; Li, Y.-Z.; Pan, Z.-Q.; Shen, M.-C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 4447–4456.
- ¹⁶⁷ Failli, P.; Bani, D.; Bencini, A.; Cantore, M.; Di Cesare Mannelli, L.; Ghelardini, C.; Giorgi, C.; Innocenti, M.; Rugi, F.; Spepi, A.; Udisti, R.; Valtancoli, B. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7273–7283.
- ¹⁶⁸ Clares, M. P.; Serena, C.; Blasco, S.; Nebot, A.; del Castillo, L.; Soriano, C.; Domènech, A.; Virginia Sánchez-Sánchez, A.; Soler-Calero, L.; Mullor, J. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 143, 1–8.
- ¹⁶⁹ Drugs for Neglected Diseases initiative. <http://www.dndi.org>
- ¹⁷⁰ *Control of the leishmaniasis*. World Health Organization. Technical Report Series 949, **2010**.
- ¹⁷¹ Piacenza, L.; Zago, M. P.; Peluffo, G.; Alvarez, M. N.; Basombrio, M. A.; Radi, R. *Int. J. Parasitol.* **2009**, 39, 1455–1464.
- ¹⁷² Sanz, A. M.; Gómez-Contreras, P.; Navarro, P.; Sánchez-Moreno, M.; Boutaleb-Charki, S.; Campuzano, J.; Pardo, M.; Osuna, A.; Cano, C.; Yunta, M. *J. R. J. Med. Chem.* **2008**, 51, 1962–1966.
- ¹⁷³ Sánchez-Moreno, M.; Sanz, A. M.; Gómez-Contreras, F.; Navarro, P.; Marín, C.; Ramírez-Macías, I.; Rosales, M. J.; Olmo, F.; García-Aranda, I.; Campayo, L.; Cano, M. C.; Arrebola, F.; Yunta, M. *J. R. J. Med. Chem.* **2011**, 54, 970–979.
- ¹⁷⁴ Olmo, F.; Rotger, C.; Ramírez-Macías, I.; Martínez, L.; Marín, C.; Carreras, L.; Urbanová, K.; Vega, M.; Chaves-Lemaur, G.; Sampedro, A.; Rosales, M. J.; Sánchez-Moreno, M.; Costa, A. *J. Med. Chem.* **2014**, 57, 987–999.
- ¹⁷⁵ Sánchez-Moreno, M.; Marín, C.; Navarro, P.; Lamarque, L.; García-España, E.; Miranda, C.; Huertas, O.; Olmo, F.; Gómez-Contreras, F.; Pitarch, J.; Arrebola, F. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 4231–4243.
- ¹⁷⁶ Olmo, F.; Marín, C.; Clares, M. P.; Blasco, S.; Albelda, M. T.; Soriano, C.; Gutiérrez-Sánchez, R.; Arrebola-Vargas, F.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 70, 189–198.
- ¹⁷⁷ Nwaka, S.; Hudson, A. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, 5, 941–955.
- ¹⁷⁸ Bu, Z.; Callaway, D. J. E. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2011**, 83, 163–221.
- ¹⁷⁹ Monod, J.; Wyman, J.; Changeux, J.-P. *J. Mol. Biol.* **1965**, 12, 88–118.
- ¹⁸⁰ Huang, Z.; Mou, L.; Shen, Q.; Lu, S.; Li, C.; Liu, X.; Wang, G.; Li, S.; Geng, L.; Liu, Y.; Wu, J.; Chen, G.; Zhang, J. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42, 510–516.
- ¹⁸¹ Reyes-Caballero, H.; Campanello, G. C.; Giedroc, D. P. *Biophys. Chem.* **2011**, 156, 103–114.
- ¹⁸² Traore, D.A.K.; El Ghazouani, A.; Ilango, S.; Dupuy, J.; Jacquamet, L.; Ferrer, J.-L.; Caux-Thang, C.; Duarte, V.; Latour, J. M. *Mol. Microbiol.* **2006**, 61, 1211–1219.
- ¹⁸³ Fan, H. Y.; Morgan, S.-A.; Brechum, K. E.; Chen, Y.-Y.; Jaikaran, A. S. I.; Woolley, G. A. *Biochemistry.* **2011**, 50, 1226–1237.
- ¹⁸⁴ Sánchez, M. I.; Mosquera, J.; Vásquez, M. E.; Mascareñas, J. L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53, 9917–9921.

- ¹⁸⁵ Onoda, A.; Arai, N.; Shimazu, N.; Yamamoto, H.; Yamamura, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16535–16540.
- ¹⁸⁶ Muraoka, T.; Kinabra, K.; Aida, T. *Nature*. **2006**, 440, 512–515.
- ¹⁸⁷ Ikeda, T.; Yoshida, K.; Schneider, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1453–1454.
- ¹⁸⁸ Lomadze, N.; Gogritchiani, E.; Schneider, H.-J.; Albelda, M. T.; Aguilar, J.; García-España, E.; Luis, S. V. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 7801–7803.
- ¹⁸⁹ Chang, C. K.; Traylor, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 5810–5811.
- ¹⁹⁰ Bowman, K.; Riley, D. P.; Busch, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 5036–5038.
- ¹⁹¹ Lotz, T. J.; Kaden, T. A. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 15–16.
- ¹⁹² Pallavicini, P. S.; Perotti, A.; Poggi, A.; Seghi, B.; Fabbrizzi, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5139–5144.
- ¹⁹³ Fabbrizzi, L.; Licchelli, M.; Pallavicini, P.; Parodi, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, 37, 800–802.
- ¹⁹⁴ Guerra, K. P.; Delgado, R.; Drew, M. G. B.; Félix, V. *Dalton Trans.* **2006**, 4124–4133.
- ¹⁹⁵ Siegfied, L.; Honecker, M.; Schlageter, A.; Kaden, T. A. *Dalton Trans.* **2003**, 3939–3948.
- ¹⁹⁶ Fabbrizzi, L.; Foti, F.; Licchelli, M.; Maccarini, P. M.; Sacchi, D.; Zema, M. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 4965–4972.
- ¹⁹⁷ Organo, V. G.; Filatov, A. S.; Quartararo, J. S.; Friedman, Z. M.; Rybak-Akimova, E. V. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 8456–8468.
- ¹⁹⁸ Verdejo, B.; Ferrer, A.; Blasco, S.; Castillo, C. E.; González, J.; Latorre, J.; Máñez, M. A.; García Basallote, M.; Soriano, C.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5707–5719.
- ¹⁹⁹ Blasco, S.; Verdejo, B.; Clares, M. P.; Castillo, C. E.; Algarra, A. G.; Latorre, J.; Máñez, M. A.; García Basallote, M.; Soriano, C.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 7016–7027.
- ²⁰⁰ Blasco, S.; Verdejo, B.; Bazzicalupi, C.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Soriano, C.; García-España, E. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, DOI: 10.1039/c4ob02092h.
- ²⁰¹ *International Union of Pure and Applied Chemistry. Organic Chemistry Division. Commission on Nomenclature of Organic Chemistry. A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations* (Ed. R. Panico, W. H. Powell, J.-C. Richer, Oxford: Blackwell Scientific Publications, **1993**).
- ²⁰² *Cyclophanes* (Ed. Philip Keehn, Elsevier, **2012**).
- ²⁰³ Powell, W. H. *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 1513–1545.
- ²⁰⁴ Favre, H. A.; Hellwinkel, D.; Powell, W. H.; Smith, H. A.; Tsay, S. S.-C. *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 809–834.
- ²⁰⁵ Fontanelli, M.; Micheloni, M. *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes. Peñíscola, Spain.* **1990**.
- ²⁰⁶ Gran, G. *Acta Chem. Scand.* **1950**, 4, 559–577.
- ²⁰⁷ Gran, G. *Analyst.* **1952**, 77, 661–671.
- ²⁰⁸ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta.* **1996**; 43, 1739–1753.
- ²⁰⁹ Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195–1200.

- ²¹⁰ Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311–318.
- ²¹¹ Job, P. *Compt. Rend.* **1925**, 180, 928–930.
- ²¹² MacCarthy, P. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 2165.
- ²¹³ Kuchelmeister, H. Y.; Schmuck, C. *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 5311–5318.
- ²¹⁴ Baudoin, O.; Gonnet, F.; Teulade-Fichou, M.-P.; Vigneron, J.-P.; Tabet, J.-C.; Lehn, J.-M. *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 2762–2771.
- ²¹⁵ Thomas, R. *Experientia.* **1951**, 7, 261–263.
- ²¹⁶ Mergny, J.-L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides.* **2003**, 13, 515–537.
- ²¹⁷ Kumar, C. V.; Punzalan, E. H. A.; Tan, W. B. *Tetrahedron.* **2000**, 56, 7027–7040.
- ²¹⁸ Duff, M. R.; Mudhivarthi, V. K.; Kumar, C. V. *J. Phys. Chem. B.* **2009**, 113, 1710–1721.
- ²¹⁹ Sartorius, J.; Schneider, H.-J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1997**, 2, 2319–2317.
- ²²⁰ Sornosa-Ten, A.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Budimir, A.; Piantanida, I. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, 8, 2567–2574.
- ²²¹ Xi, H.; Davis, E.; Ranjan, N.; Xue, L.; Hyde-Volpe, D.; Arya, D. P. *Biochemistry.* **2011**, 50, 9088–9113.
- ²²² Morgan, A. R.; Lee, J. S.; Pulleyblanck, D. E.; Murray, N. L.; Evans, D. H. *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 547–569.
- ²²³ Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, 16, 4842–4845.
- ²²⁴ Scatchard, G.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660–672.
- ²²⁵ McGhee, J. D.; von Hippel, P. H. *J. Mol. Biol.* **1974**, 86, 469–489.
- ²²⁶ Wolfe, A.; Shimer, G. H.; Meehan, T. *Biochemistry.* **1987**, 26, 6392.
- ²²⁷ Rodger, A.; Nordén, B. *Circular Dichroism and Linear Dichroism.* Oxford University Press, Oxford, UK, **1997**.
- ²²⁸ Stootman, F. H.; Fisher, D. M.; Rodger, A.; Aldrich-Wright, J. R. *The Analyst.* **2006**, 131, 1145–1151.
- ²²⁹ van Dijk, L.; Bobbert, P. A.; Spano, F. C. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, 114, 817–825.
- ²³⁰ Berova, N.; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 914–931.
- ²³¹ Nordén, B.; Kubista, M.; Kuruscev, T. Q. *Rev. Biophys.* **1992**, 25, 51–171.
- ²³² Cohen, G.; Eisenberg, H. *Biopolymers.* **1969**, 8, 45–55.
- ²³³ Grueso, E.; Prado-Gotor, R. *Chemical Physics.* **2010**, 373, 186–192.
- ²³⁴ Glasoe, P. K.; Long, F. A. *J. Phys. Chem.* **1960**, 64, 188–189.
- ²³⁵ Beauchamp, C.; Fridovich, I. *Anal. Biochem.* **1971**, 44, 276–287.
- ²³⁶ Oberley, L. W.; Spitz, D. R. *Method. Enzymol.* **1984**, 105, 457–464.
- ²³⁷ Blasco, S. *Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como Miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia, **2011**.
- ²³⁸ Hodges, G. R.; Young, M. J.; Paul, T.; Ingold, K.U. *Free Radical Bio. Med.* **2000**, 29, 434–441.
- ²³⁹ Blasco, Salvador. *Supersod v.0.6.* Beerware. **2015**.

- ²⁴⁰ Martini, M.; Albelda, M. T.; Inclán, M.; Valle-Algarra, F. M.; García-España, E.; Doménech-Carbó, A. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, 720-721, 24–33.
- ²⁴¹ Ahlrichs, R.; Bär, M.; Hacer, M.; Horn, H.; Kçmel, C. *Chem. Phys. Lett.* **1989**, 162, 165–169.
- ²⁴² Schäfer, A.; Klamt, A.; Sattel, D.; Lohrenz, J. C. W.; Eckert, F. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 2187–2193.
- ²⁴³ Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E.; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M. J.; Cui, G.; Roe, D. R.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 11*. **2010**, University of California, San Francisco.
- ²⁴⁴ Wang, J.; Wang, W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. *J. Mol. Graphics Modell.* **2006**, 25, 247–260.
- ²⁴⁵ Mosmann, T. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55–63.
- ²⁴⁶ Cheng, F.; Li, W.; Zhou, Y.; Shen, J.; Wu, Z.; Liu, G.; Lee, P. W.; Tang, Y. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**, 52, 3099–3105.
- ²⁴⁷ Verdejo, B. *Química Supramolecular de Piridinofanos sintéticos*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia; **2007**.
- ²⁴⁸ González, J. *Química de coordinación aniónica y catiónica de nuevos poliazareceptores politópicos*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia, **2013**.
- ²⁴⁹ Clares, M. P. *Química de coordinación catiónica y aniónica de azareceptores de tipo Lariat éter*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia, **2011**.
- ²⁵⁰ González, J.; Llinares, J. M.; Belda, R.; Pitarch, J.; Soriano, C.; Tejero, R.; Verdejo, B.; García-España, E. *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 2367–2376.
- ²⁵¹ Sureshbabu, V. V.; Narendra, N. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.4. Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*. Ed. Andrew B. Hughes (Wiley-VCH, **2011**).
- ²⁵² Wuts, P. G. M.; Greene, T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Chemistry*. (Wiley & Sons, **2007**).
- ²⁵³ Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 2268–2270.
- ²⁵⁴ Gabriel, S. *Ber.* **1887**, 20, 2224–2236.
- ²⁵⁵ Ing, H. R.; Manske, R. H. F. *J. Chem. Soc.* **1926**, 2348–2351.
- ²⁵⁶ Haskell, B. E.; Bowlus, S. B. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 159–160.
- ²⁵⁷ Schiff, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1864**, 131, 118–119.
- ²⁵⁸ Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Biver, T.; Boggioni, A.; Bonacchi, S.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Gratteri, P.; Marchal Ingraín, A.; Secco, F.; Sissi, C.; Valtancoli, B.; Venturini, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 184 – 196.
- ²⁵⁹ Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9644–9656.

- ²⁶⁰ Olmo, F.; Clares, M. P.; Marín, C.; González, J.; Inclán, M.; Soriano, C.; Urbanová, K.; Tejero, R.; Rosales, M. J.; Krauth-Siegel, R. L.; Sánchez-Moreno, M.; García-España, E. *RSC Adv.* **2014**, 4, 65108–65120.
- ²⁶¹ Inclán, M.; Albelda, M. T.; Carbonell, E.; Blasco, S.; Bauzá, A.; Frontera, A.; García-España, E. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 3730–3741.
- ²⁶² Rodríguez Carrión, I. *DNA Recognition by Intercalator Ligands Based on Macrocyclic Polyamines*; trabajo de fin de carrera. Universidad de Valencia; **2013**.
- ²⁶³ Bencini, A.; Bianchi, A.; García-España, E.; Micheloni, M.; Ramírez, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 188, 97–156.
- ²⁶⁴ Sarnesky, J. E.; Surprenant, H. L.; Molen, F. K.; Reiley, C. N. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 2116–2124.
- ²⁶⁵ Kimura, E.; Koike, T.; Uenishi, K.; Hediger, M.; Kuramoto, M.; Joko, S.; Arai, Y.; Kodama, M.; Iitakae, Y. *Inorg. Chem.* **1987**, 26, 2975–2983.
- ²⁶⁶ Marína, C.; Clares, M. P.; Ramírez-Macías, I.; Blasco, S.; Olmo, F.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Rosales, M. J.; Gomez-Herrera, D.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 62, 466–477.
- ²⁶⁷ Albelda, M. T.; García-España, E.; Jiménez, H. R.; Llinares, J. M.; Soriano, C.; Sornosa-Ten, A.; Verdejo, B. *Dalton Trans.* **2006**, 4474–4481.
- ²⁶⁸ Sornosa-Ten, A.; Humbert, N.; Verdejo, B.; Llinares, J. M.; Elhabiri, M.; Jezierska, J.; Soriano, C.; Kozłowski, H.; Albrecht-Gary, A.-M.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 8985–8997.
- ²⁶⁹ Albert, A.; Goldacre, R.; Phillips, J. *J. Chem. Soc.* **1948**, 2240–2249.
- ²⁷⁰ Clares, M. P.; Blasco, S.; Inclán, M.; del Castillo Agudo, L.; Verdejo, B.; Soriano, C.; Doménech, A.; Latorre, J.; García-España, E. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5988–5990.
- ²⁷¹ Tubek, S.; Grzanka, P.; Tubek, I. *Biol. Trace Elem. Res.* **2008**, 121, 1–8.
- ²⁷² Li, A.-F.; Ruan, Y.-B.; Jiang, Q.-Q.; He, W.-B.; Jiang, Y.-B. *Chem. Eur. J.* **2010**, 16, 5794–5802.
- ²⁷³ Park, C. H.; Simmons, H. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2431–2432.
- ²⁷⁴ Lehn, J.-M.; Sonveaux, E.; Willard, A. K.; *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4914–4916.
- ²⁷⁵ Bowman-James, K.; Bianchi, A.; García-España, E. *Anion Coordination Chemistry* (Wiley-VCH, **2012**).
- ²⁷⁶ Kubik, S. *Anion Coordination Chemistry*. (Editado por Kristin Bowman-James, Antonio Bianchi y Enrique García-España. Wiley-VCH, **2012**)
- ²⁷⁷ Maruyama, K. *J. Hist. Biol.* **1991**, 24, 145–154.
- ²⁷⁸ Gourine, A. V.; Llaudet, E.; Dale, N.; Spyer, K. M. *Nature.* **2005**, 436, 108–111.
- ²⁷⁹ Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molecular Biology of the Cell, 5th ed.* (Garland Science, **2007**).
- ²⁸⁰ Lecca, D.; Ceruti, S. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 75, 1869–1881.
- ²⁸¹ Jang, T. H.; Lee, D. S.; Choi, K.; Jeong, E. M.; Kim, I. G.; Kim, Y. W.; Chun, J. N.; Jeon, J. H.; Park, H. H. *Plos One.* **2014**, 9, e107005–e107005.
- ²⁸² Garrett, R. H.; Grisham, C. M. *Biochemistry, 5th ed.* (Cengage, **2013**).

- ²⁸³ Albelda, M. T.; Bernardo, M. A.; García-España, E.; Godino-Salido, M. L.; Luis, S. V.; Melo, M. J.; Pina, F.; Soriano, C. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **1999**, 2545–2549
- ²⁸⁴ Arranz-Mascaro, P.; Bazzicalupi, C.; Bianchi, A.; Giorgi, C.; Godino-Salido, M. L.; Gutiérrez-Valero, M. D.; Lopez-Garzo, R.; Valtancoli, B. *New J.Chem.* **2011**, 35, 1883–1891
- ²⁸⁵ Hargrove, A. E.; Nieto, S.; Zhang, T.; Sessler, J. L.; Anslyn, E. V. *Chem.Rev.* **2011**, 111, 6603–6782.
- ²⁸⁶ Albelda, M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Luis, S. V. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, 2, 816–820.
- ²⁸⁷ Job, P. *Compt. Rend.* **1925**, 180, 928–930.
- ²⁸⁸ Phan, A. T.; Mergny, J.-L. *Nucleic Acids Res.* **2002**, 30, 4618–4625.
- ²⁸⁹ Neidle, S. *FEBS J.* **2010**, 277, 1118–1125.
- ²⁹⁰ Sinsheimer, R. L. *J. Mol. Biol.* **1959**, 1, 43–53.
- ²⁹¹ Angly, F.E.; Felts, B.; Breitbart, M.; Salamon, P.; Edwards, R. A.; Carlson, C.; et al. *PLoS Biol.* **2006**, 4, e368.
- ²⁹² Yadav, R. C.; Kumar, G. S.; Bhadra, K.; Giri, P.; Sinha, R.; Pal, S.; Maiti, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 164–175.
- ²⁹³ Pyle, A. M.; Rehmann, J. P.; Meshoyrer, R.; Kumar, C. V.; Turro, N. J.; Barton, J. K. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 3051–3058.
- ²⁹⁴ Long, E. C.; Barton, J. K. *Acc. Chem. Res.* **1990**, 23, 271–273.
- ²⁹⁵ Zinchenko, A. A.; Chen, N.; Murata, S. J. *Synth. Org. Chem., Jpn.* **2006**, 64, 1122–1131.
- ²⁹⁶ Holcomb, D. N.; Tinoco, I., Jr. *Biopolymers.* **1965**, 3, 121.
- ²⁹⁷ Gottarelli, G.; Palmieri, P.; Spada, G. P. *Gazz. Chim. Ital.* **1990**, 120, 101–107.
- ²⁹⁸ Kankia, B. I. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 131, 5101–5107.
- ²⁹⁹ Malojčić, G.; Piantanida, I.; Marinić, M.; Žinić, M.; Marjanović, M.; Kralj, M.; Pavelić, K.; Schneider, H.-J. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 4373–4381.
- ³⁰⁰ Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry*, WH Freeman and Co., San Francisco, **1980**, vol. 3, 1109.
- ³⁰¹ Tan, W. B.; Bhambhani, A.; Duff, M. R.; Rodger, A.; Kumar, C. *V. Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 20–30.
- ³⁰² Kahne, D. *Chem. Biol.* **1995**, 2, 7–12.
- ³⁰³ Printz, M. P.; Von Hippel, P. H. *Porc. Acad. Nat. Sci.* **1965**, 53, 363–370.
- ³⁰⁴ Pina, F.; Bernardo, M. A.; García-España, E. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 10, 2143–2157.
- ³⁰⁵ Lyng, R.; Haerd, T.; Norden, B. *Biopolymers* **1987**, 26, 1327–1345.
- ³⁰⁶ Modukuru, N. K.; Snow, K. J.; Perrin, B. S., Jr.; Bhambhani, A.; Duff, M.; Kumar, C. V. *J. Photochem. Photobiol. A* **2006**, 177, 43–54.
- ³⁰⁷ Duff, M. R.; Tan, W. B.; Bhambhani, A.; Perrin, B. S., Jr.; Thota, J.; Rodger, A.; Kumar, C. V. *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 20693–20701.
- ³⁰⁸ Rodger, A.; Taylor, S.; Adlam, G.; Blagbrough, I. S.; Haworth, I. S. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 861–872.
- ³⁰⁹ Haq, I.; Jenkins, T. C.; Chowdhry, B. Z.; Ren, J.; Chaires, J. B. *Methods Enzymol.* **2000**, 323, 373–405.

-
- ³¹⁰ Suh, D.; Chaires, J. B. *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, 3, 723–728.
- ³¹¹ J. W. Lown. *Chem. Soc. Rev.* **1993**, 22, 165–176.
- ³¹² Lee, C. C.; Gillies, E. R.; Fox, M. E.; Guillaudeu, S. J.; Fréchet, J. M. J.; Dy, E. E.; Szoka, F. C. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **2006**, 103, 16649–16654.
- ³¹³ Angsutararux, P.; Luanpitpong, S.; Issaragrisil, S. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, ID 795602.
- ³¹⁴ Vejpongsa, P.; Yeh, E. T. H. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2014**, 64, 938–945.
- ³¹⁵ Bressloff, P. C.; Newby, J. M. *Rev. Mod. Phys.* **2013**, 85, 135–196.
- ³¹⁶ Avdeef, A.; Bendels, S.; Di, L.; Faller, B.; Kansy, M.; Sugano, K.; Yamauchi, Y. *J. Pharm. Sci.* **2007**, 96, 2893–2909.
- ³¹⁷ Albers, R. W. *Annu. Rev. Biochem.* **1967**, 36, 727–756.
- ³¹⁸ Seiler, N.; Dezeure, F. *Int. J. Biochem.* **1990**, 22, 211–218.
- ³¹⁹ Porter, A. G.; Jänicke, R. U. *Cell Death Differ.* **1999**, 6, 99–104.
- ³²⁰ Ashcroft, M.; Kubbutat, M. H. G.; Vousden, K. H. *Mol. Cell Biol.* **1999**, 19, 1751–1758.
- ³²¹ Aon, M. A.; Cortassa, S. *Front. Physiol.* **2015**, 5, 1–10.
- ³²² Morrisette, N. *EC.* **2015**, 14, 1–12.
- ³²³ Barbuti, A. M.; Chen, Z.-S. *Cancers.* **2015**, 7, 2360–2371.
- ³²⁴ Muscoli, C.; Cuzzocrea, S.; Ridley, D. P.; Zweier, J. L.; Thiemermann, C.; Wang, Z.-Q.; Salvemini, D.; *Br. J. Pharmacol.* **2003**, 140, 445–460.
- ³²⁵ Marín, C.; Inclán, M.; Ramírez-Macías, I.; Albelda, M. T.; Cañas, R.; Clares, M. P.; González-García, J.; Rosales, M. J.; Urbanova, K.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M. *RSC Adv.* **2015**, aceptada para su publicación.
- ³²⁶ Clares, M. P.; Blasco, S.; Soriano, C.; García-España, E.; Verdejo, B.; Inclán, M.; González, J.; Sanchez, M.; Marín, C.; Olmo, F. “*Compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando y su uso como antiparasitarios*”. P201132035. España, **2011**.
- ³²⁷ Hunter, T.; Ikebukuro, K.; Bannister, W. H.; Bannister, J. V.; Hunter, G. J. *Biochemistry.* **1997**, 36, 4925–4933.

Anexos

Anexo 1.- Publicaciones relacionadas

Artículos:

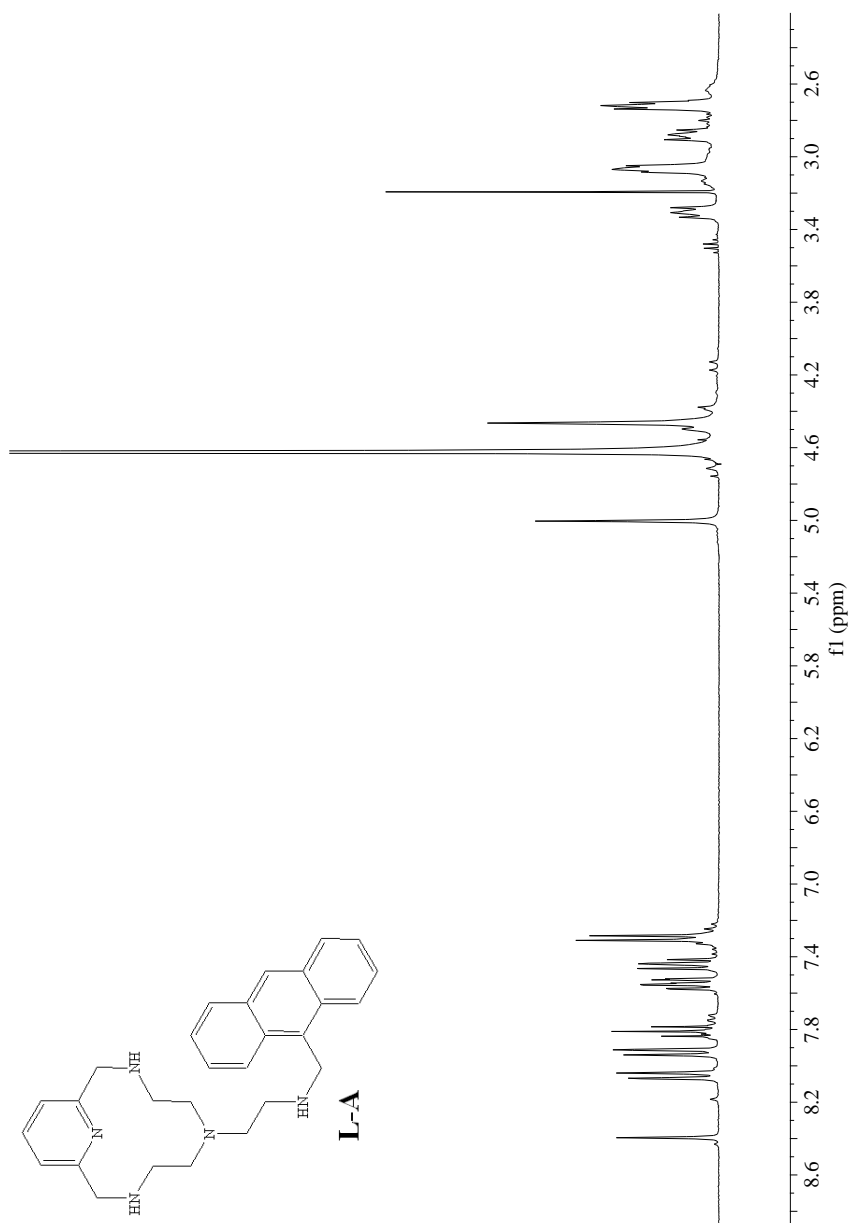
1. Fernandes, T. S.; Vilela, R. S.; Valdo, A. K.; Martins, F. T.; García-España, E.; Inclán, M.; Cano, J.; Julve, M.; Stumpf, H. O.; Cangussu, D. “*Dicopper(II) metallacyclophanes with N,N'-2,6-pyridinebis(oxamate): Solution Study, Synthesis, Crystal Structures, and Magnetic Properties*”. *Inorg. Chem.* **2015**, Submitted.
2. Marín, C.; Inclán, M.; Ramírez-Macías, I.; Albelda, M. T.; Cañas, R.; Clares, M. P.; González-García, J.; Rosales, M. J.; Urbanova, K.; García-España, E.; Sánchez-Moreno, M. “*In vitro antileishmanial activity of aza-scorpianid macrocycles. Inhibition of the antioxidant enzyme iron superoxide dismutase*”. *RSC Adv.* **2015**, accepted for publication.
3. Olmo, F.; Clares, M. P.; Marín, C.; González, J.; Inclán, M.; Soriano, C.; Urbanová, K.; Tejero, R.; Rosales, M. J.; Krauth-Siegel, R. L.; Sánchez-Moreno, M.; García-España, E. “*Synthetic single and double aza-scorpianid macrocycles acting as inhibitors of the antioxidant enzymes iron superoxide dismutase and trypanothione reductase in Trypanosoma cruzi with promising results in a murine model*”. *RSC Adv.* **2014**, 4, 65108–65120.
4. Martini, M.; Albelda, M. T.; Inclán, M.; Valle-Algarra, F. M.; García-España, E.; Doménech-Carbó, A. “*Voltammetry of microparticles, scanning electrochemical microscopy and scanning tunneling microscopy applied to the study of dsDNA binding and damage by scorpianid-like polyamine receptors*”. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, 720-721, 24-33.
5. Inclán, M.; Albelda, M. T.; Carbonell, E.; Blasco, S.; Bauzá, A.; Frontera, A.; García-España, E. “*Molecular Recognition of Nucleotides in Water by Scorpianid-Type Receptors Based on Nucleobase Discrimination*”. *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 3730–3741.
6. Fortea-Pérez, F. R.; Vallejo, J.; Inclán, M.; Déniz, M.; Pasán, J.; García-España, E.; Julve, M. “*Solution and solid state studies with the bis-oxalato building block [Cr(pyim)(C₂O₄)₂]- [pyim = 2-(2'-pyridyl)imidazole]*”. *J. Coord. Chem.* **2013**, 66, 3349-3364.

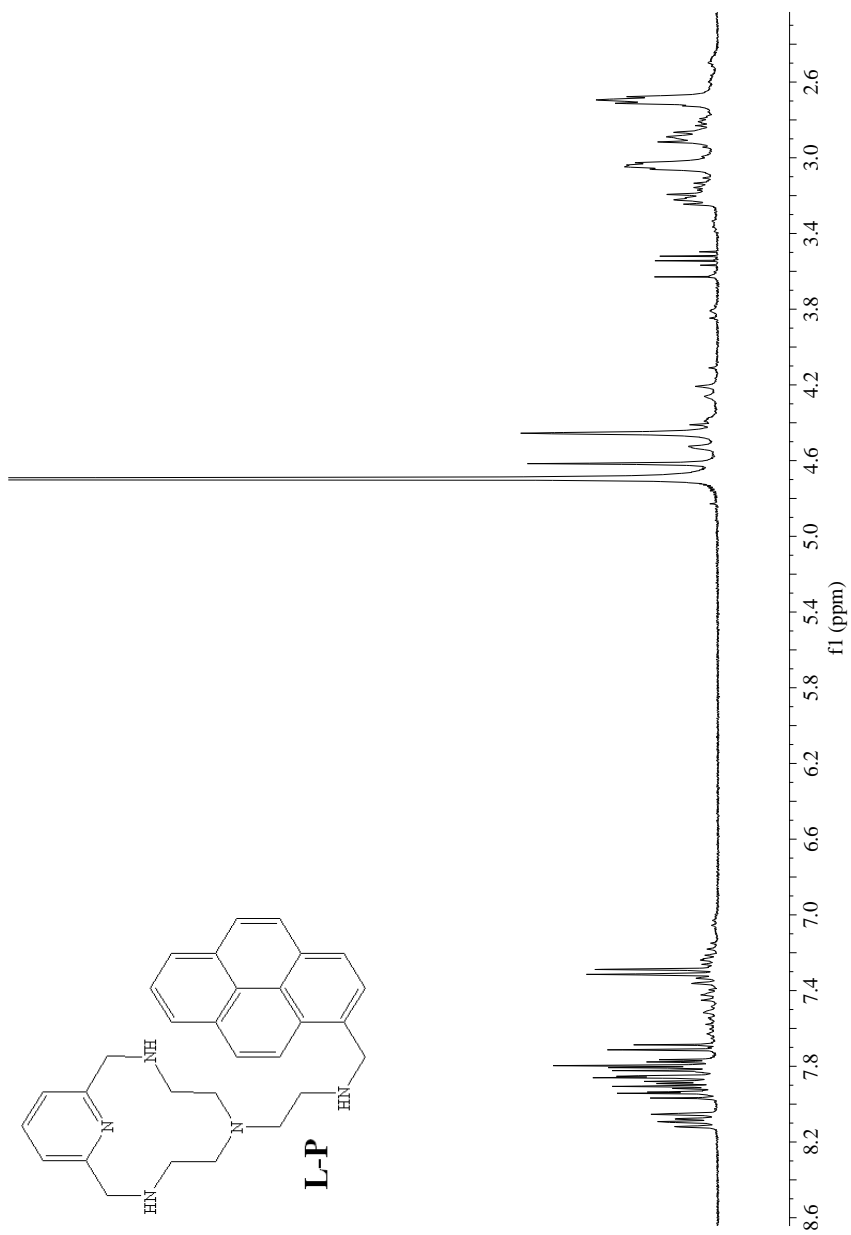
7. Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. “*Modulation of DNA binding by reversible metal-controlled molecular reorganizations of scorpiand-like ligands*”. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134 (23), 9644–9656.
8. Clares, M. P.; Blasco, S.; Inclán, M.; del Castillo, L.; Verdejo, B.; Soriano, C.; Doménech, A.; Latorre, J.; García-España, E. “*Manganese(II) complexes of scorpiand-like azamacrocycles as MnSOD mimics*”. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 5988.

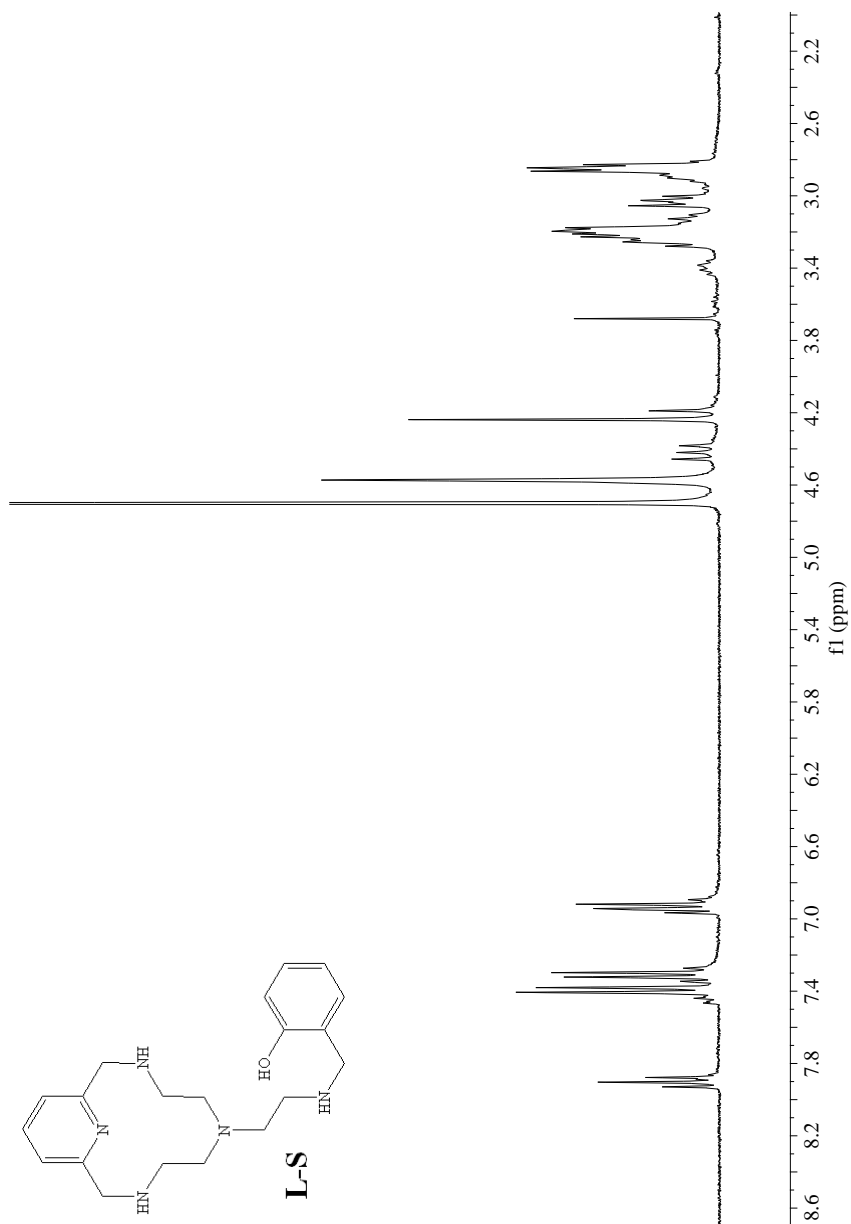
Patentes:

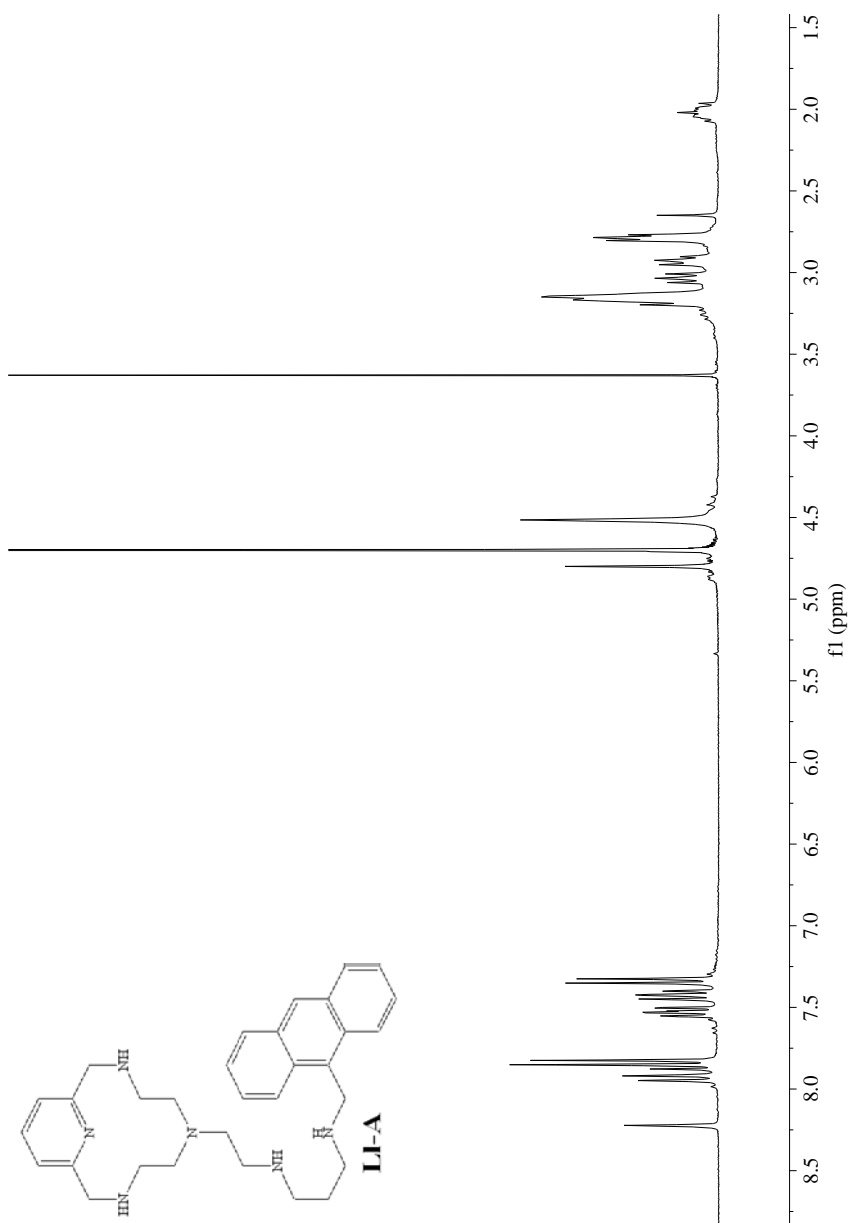
1. Clares, M. P.; Blasco, S.; Soriano, C.; García-España, E.; Verdejo, B.; Inclán, M.; González, J.; Sanchez, M.; Marín, C.; Olmo, F. “*Compuestos macrocíclicos de tipo escorpiando y su uso como antiparasitarios*”. P201132035. España, **2011**.

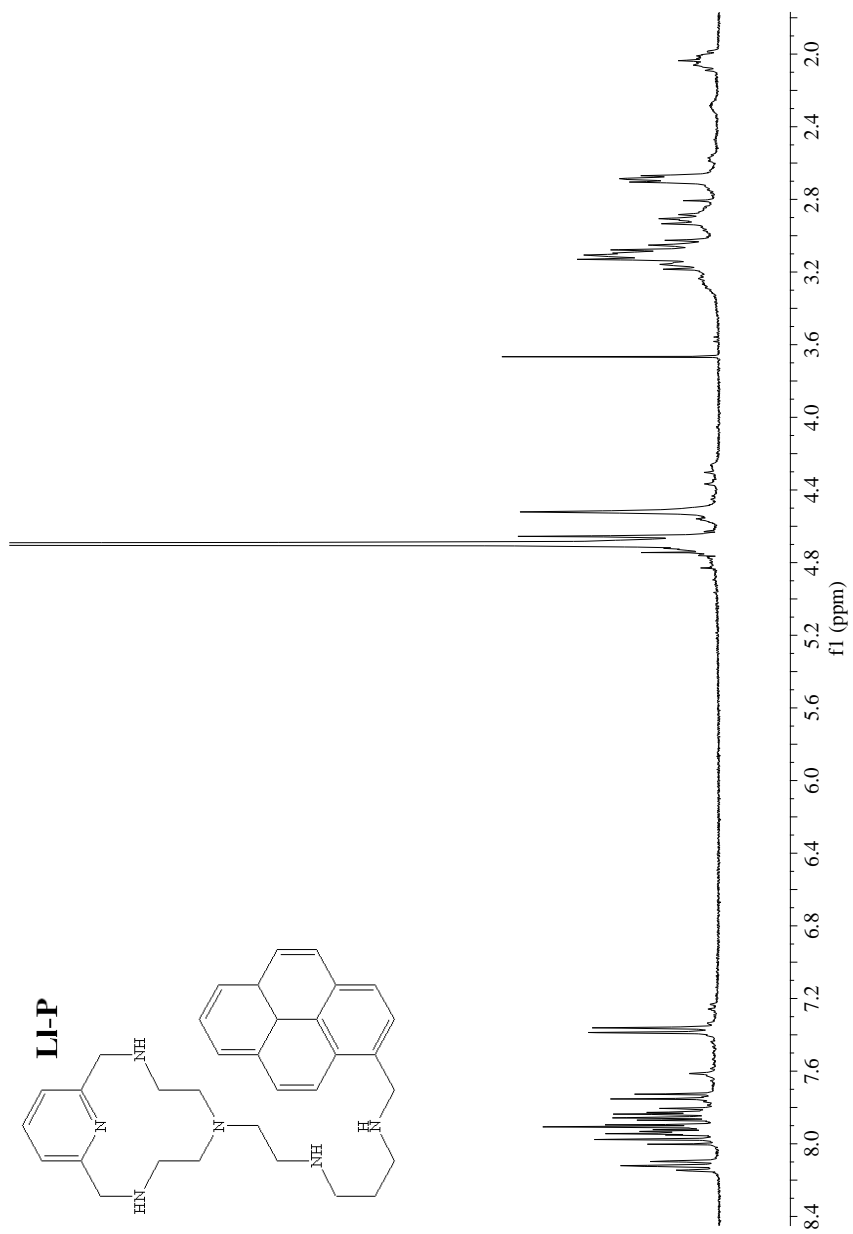
Anexo 2.- Espectros de RMN ^1H

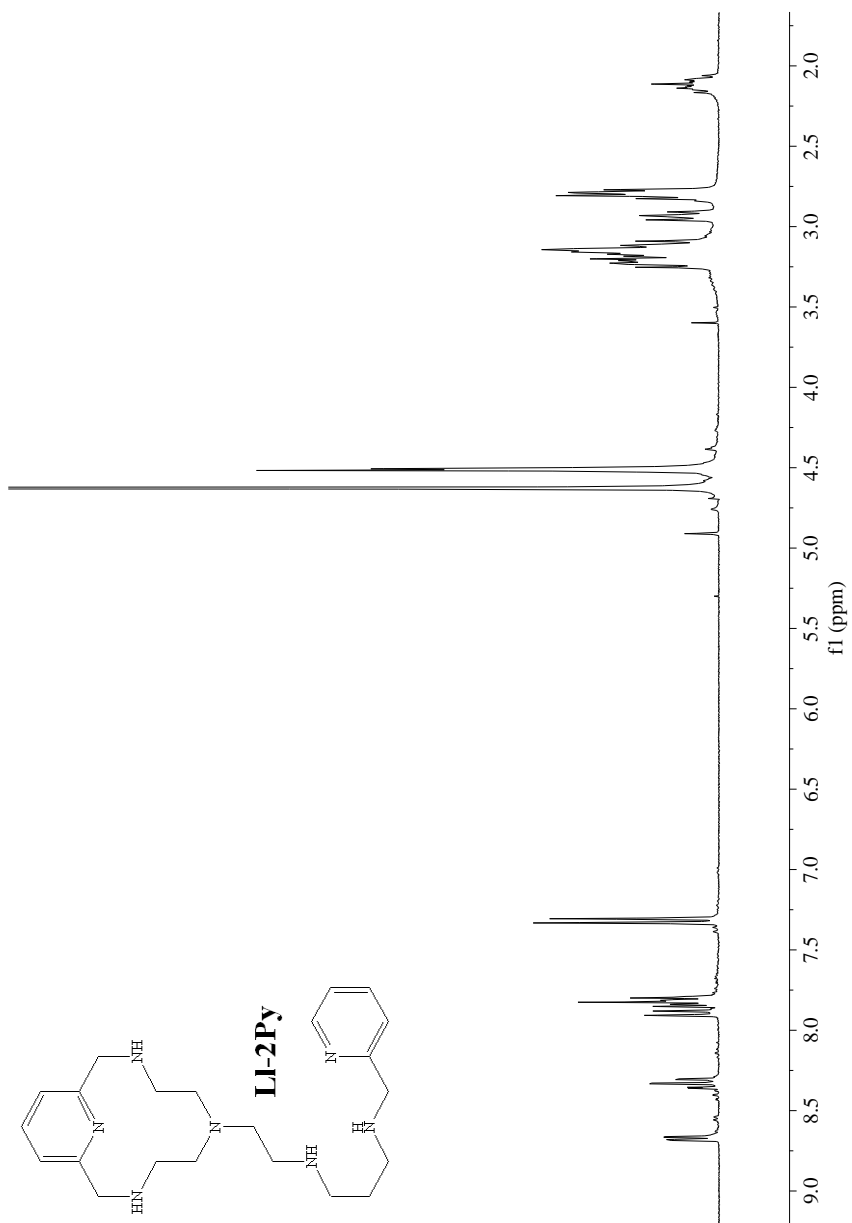


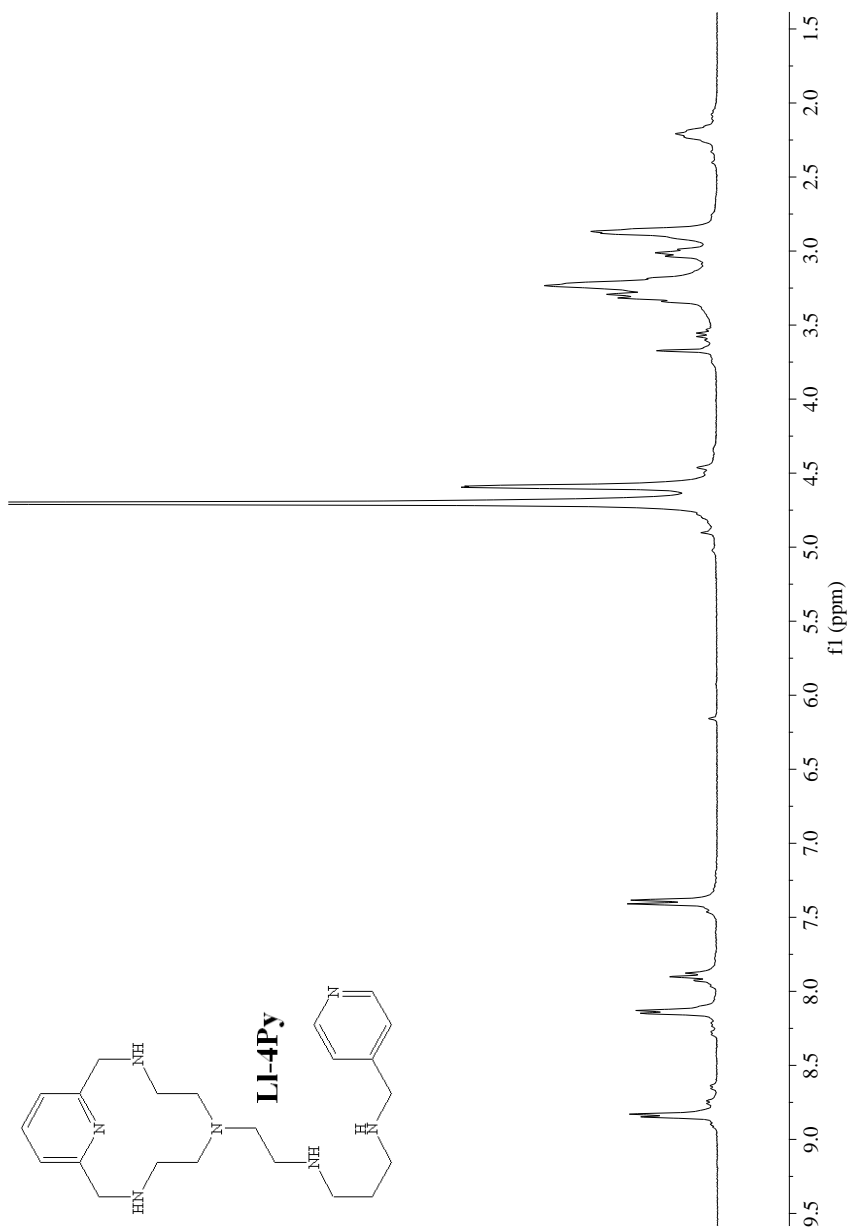


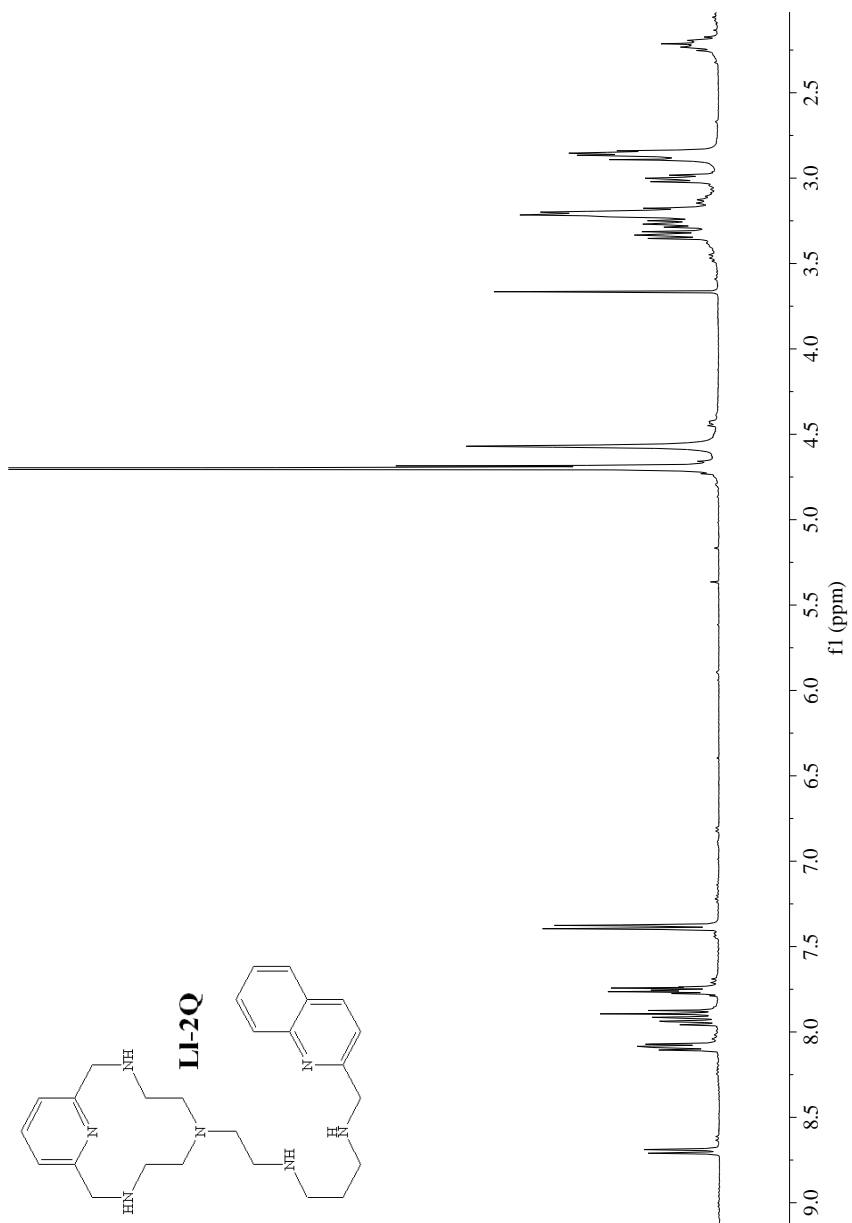


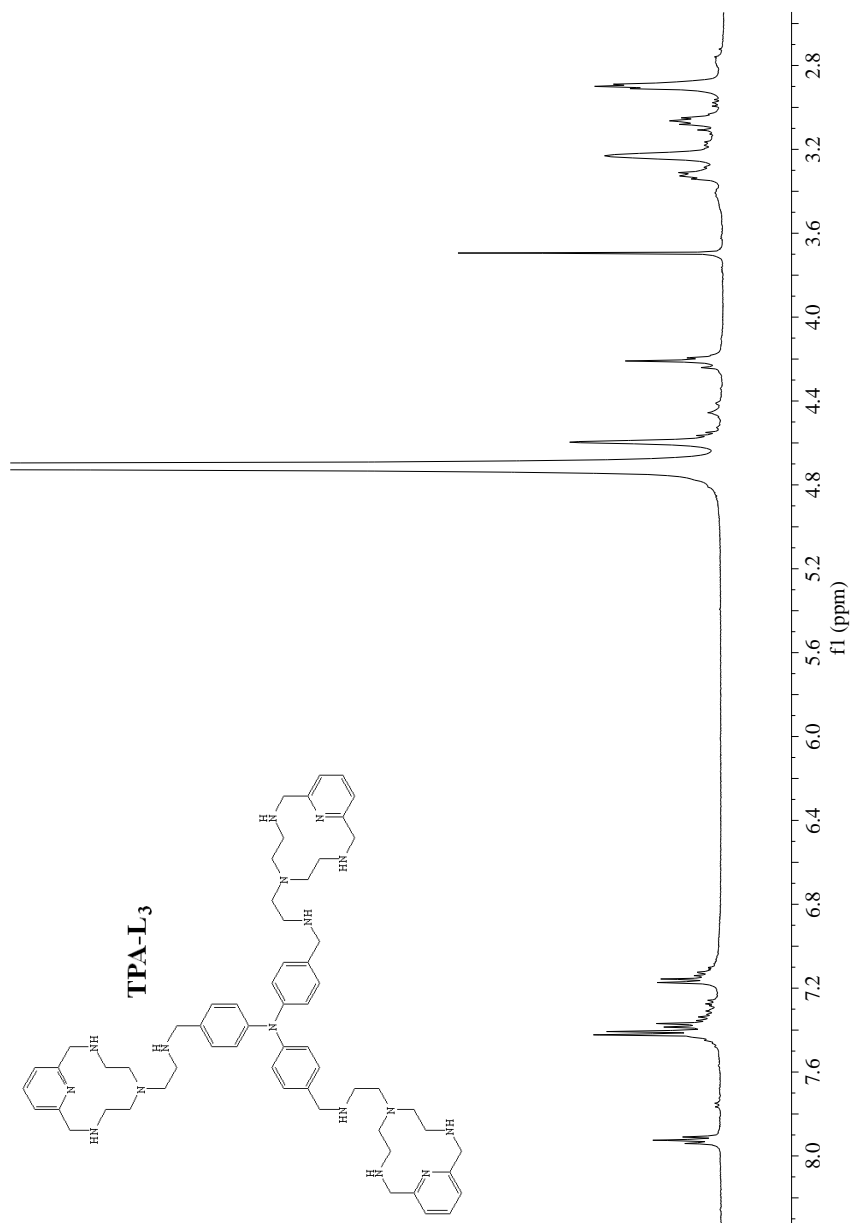


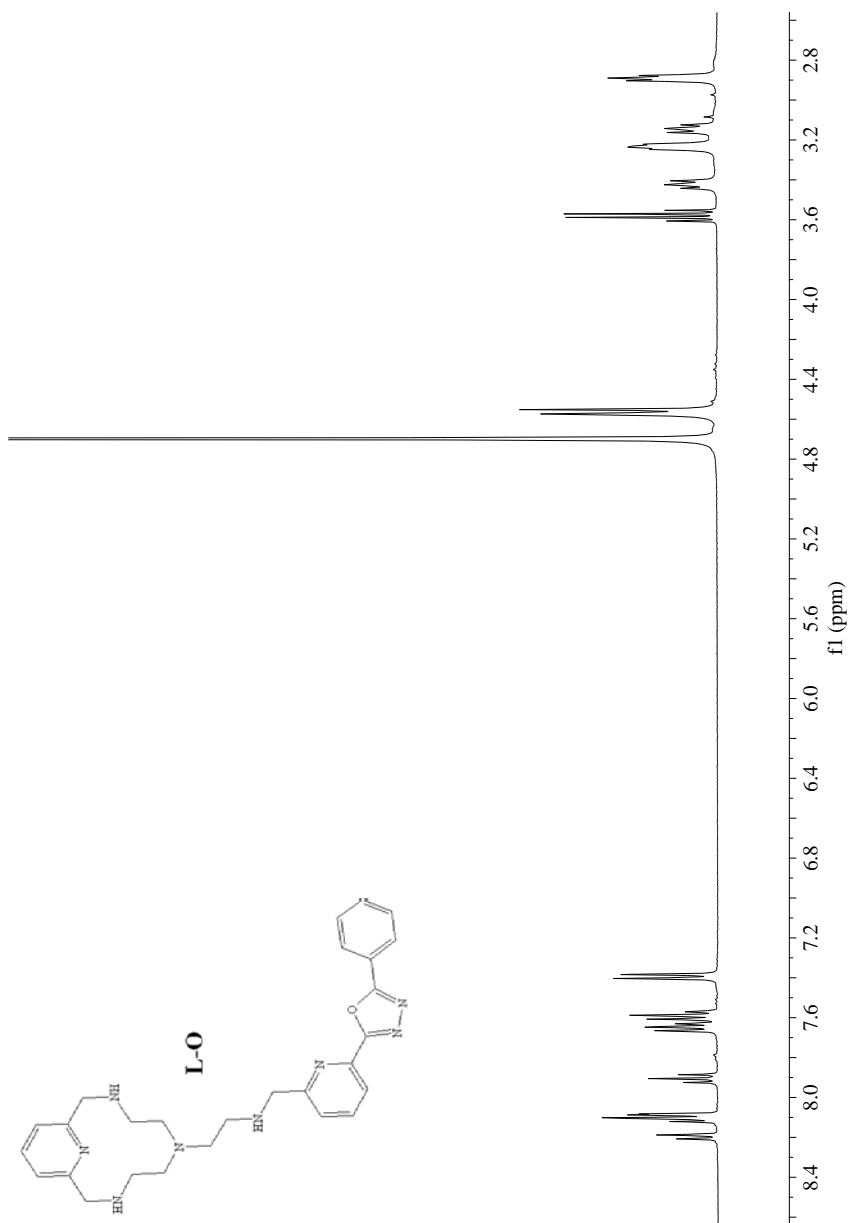












Anexos

Anexo 3.- Datos cristalográficos de [Cu(L-A)](ClO₄)₂

Refinamiento de la estructura

Fórmula empírica	C ₂₈ H ₃₃ Cl ₂ CuN ₅ O ₈
Mw	702.04
Tamaño del cristal, mm	0.21 × 0.12 × 0.07
Sistema cristalino	orthorhombic
Grupo espacial	P c a 2 ₁
<i>a</i> , Å	31.246(9)
<i>b</i> , Å	10.807(2)
<i>c</i> , Å	35.036(7)
<i>V</i> , Å ³	11831(4)
Z	4
<i>d</i> _{calcd} , g/cm ³	1.575
<i>μ</i> , mm ⁻¹	0.979
Reflecciones recolectadas	39044
Reflecciones únicas	19870
Parámetros	1531
Restricciones	236
<i>R</i> 1 (<i>F</i> ² > 2σ(<i>F</i> ²))	0.1197
<i>wR</i> 2 (todas refls)	0.2260
GOF (todas refls)	0.767

Distancias y ángulos de enlace seleccionados

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (grados)	
Cu(1)–N(1)	1.90(3)	N(1)–Cu(1)–N(2)	83.6(10)
Cu(1)–N(2)	2.06(2)	N(1)–Cu(1)–N(4)	83.1(13)
Cu(1)–N(3)	2.12(2)	N(1)–Cu(1)–N(5)	142.3(10)
Cu(1)–N(4)	2.01(3)	N(2)–Cu(1)–N(3)	85.0(7)
Cu(1)–N(5)	2.07(2)	N(2)–Cu(1)–N(5)	100.8(8)
		N(3)–Cu(1)–N(4)	86.8(11)
		N(3)–Cu(1)–N(5)	84.4(8)

Anexos