

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA INORGÀNICA



TESIS DOCTORAL

“Síntesis y caracterización de compuestos de Cu(II)
con derivados triazólicos. Estudio de su actividad
como potenciales nucleasas químicas”

Javier Hernández Gil
València, 2014

Dña. Sacramento Ferrer Llusar, Profesora Titular del
Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el trabajo presentado por D. Javier Hernández Gil titulado "Síntesis y caracterización de compuestos de Cu(II) con derivados triazólicos. Estudio de su actividad como potenciales nucleasas químicas", en el marco del Programa de Doctorado 310E "Técnicas Experimentales en Química" ha sido realizado bajo mi dirección y asesoramiento en el Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València para optar al título de Doctor en Química.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Burjassot a 9 de Junio de 2014.



Fdo.: Dra. Sacramento Ferrer Llusar

D. Javier Hernández Gil, Licenciado en Ciencias Químicas de la Universitat de València, presenta esta Memoria, con el título "Síntesis y caracterización de compuestos de Cu(II) con derivados triazólicos. Estudio de su actividad como potenciales nucleasas químicas", en el marco del Programa de Doctorado 310E "Técnicas Experimentales en Química" con el fin de optar al grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, firma el presente certificado en Burjassot a 9 de Junio de 2014.

A handwritten signature in blue ink, reading "Javier H", with a large, stylized flourish that loops around the name.

Fdo.: Javier Hernández Gil

*Whatever inspiration is,
it's born from a continuous "I don't know"
(Wisława Szymborska)*

En primer lugar agradecer a la Profesora Sacramento Ferrer que, como directora de la presente *Tesis Doctoral*, me ha guiado, motivado y apoyado durante estos años. Su esfuerzo y supervisión continua han permitido, sin duda, la consecución del trabajo aquí presentado.

Agradezco también al Profesor Santiago Castiñeiras por la medida y resolución de la mayoría de las estructuras cristalinas presentadas en esta memoria. Agradezco también a la Dra. Malva Liu, a la Profesora Carmen Sánchez y a Alejandra Rodríguez por la medida y resolución del resto de estructuras cristalinas incluidas aquí.

Agradezco al Profesor Juan C. Mareque-Rivas su acogida durante mis dos estancias breves en la Universidad de Edimburgo. Un periodo apasionante que me permitió adentrarme en el mundo de la Nanotecnología.

Muchas gracias al Profesor Francisco Lloret por la realización de las medidas de magnetismo y el subsiguiente ajuste. También agradecer a los Profesores Francisco Estevan y Rafael Ballesteros su asesoramiento en los espectros de resonancia magnética nuclear y en la síntesis orgánica de los ligandos, respectivamente. Agradezco también a las Dras. Nuria Cabedo y María Pilar López-Gresa su ayuda en la obtención de los primeros ligandos de esta *Tesis Doctoral*.

Muchas gracias a los Profesores Joaquín Borrás, Lourdes Perelló y Rosa Ortíz por su confianza inicial en mí. Gracias a ellos he podido disfrutar de esta apasionante experiencia. Agradecer a la Profesora Gloria Alzuet todos sus consejos y apoyo. Agradecer también al Profesor Lucas del Castillo y a los Dres. José Luis García, Marta González y Andreea Bodoki toda su ayuda en el capítulo bioinorgánico. Asimismo agradecer a Ninja Ovèjak, Lucija Čoga y Ángela Ribes por su colaboración en la síntesis de compuestos. Gracias a Mar por conseguir que todo sea un poco más fácil en el laboratorio y, a Alejandro Pascual y a Rosa Adam por el buen ambiente en el mismo.

Agradezco también a la Dra. María Sales del S.C.I.E. de la Universitat de València por la realización de los estudios de espectrometría de masas. Muchas gracias a Carmen Maldonado y Nina Gómez Blanco por su ayuda en la síntesis y caracterización de

los *quantum dots*. También agradecer a Anja Bernecker por su ayuda en las medidas de microscopía de fuerza atómica en mi periodo en CIC biomaGUNE.

Agradecer a mi buen amigo Adrián Cambres por su enorme talento para conseguir plasmar en un dibujo cualquiera de nuestras ideas científicas.

Finalmente agradecer a todos aquellos que sin pedir nada a cambio me han dado su amistad estos años y, especialmente, a mi familia por su gran apoyo. Gracias a mis padres por estar siempre que los he necesitado y sacrificarse por darnos la mejor formación posible. Gracias a mi hermana por su infinita psicología y muy especialmente a mis abuelos, por ser un ejemplo el cual seguir. Sin todos vosotros nada sería posible.

Índice de contenidos

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	5
Capítulo I NUEVOS LIGANDOS TRIAZOL	71
Capítulo II COMPLEJOS COBRE-TRIAZOL COMO NUCLEASAS OXIDATIVAS	125
Capítulo III <i>QUANTUM DOTS</i> COMO AGENTES ACTIVANTES DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA DE COMPLEJOS DE COBRE	319
Capítulo IV NUCLEASAS HIDROLÍTICAS	411
CONCLUSIONS and PERSPECTIVES	459
Abreviaturas	471

Contenidos

SUMMARY	1
INTRODUCCIÓN	5
<hr/>	
1 Interacción con el ADN	7
1.1 Estructura del B-ADN	7
1.2 Formas de interacción con el B-ADN	9
2 Nucleasas químicas	15
2.1 Nucleasas (naturales)	15
2.2 Metalonucleasas químicas	17
2.2.1 Corte hidrolítico	19
2.2.2 Corte oxidativo	21
3 Técnicas Bioinorgánicas	28
3.1 Estudios de interacción con el ADN	28
3.1.1 Espectroscopia de fluorescencia	29
3.1.2 Temperatura de <i>fusión</i> del ADN	36
3.1.3 Viscosimetría	40
3.2 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa	43
3.2.1 Fundamento	43
3.2.2 Factores que influyen en la actividad	46
3.2.3 Procedimiento experimental	48
3.2.4 Determinación del mecanismo de acción	53
3.2.5 Estudio de la cinética del corte	56
4 Los ligandos triazol	59
4.1 Formas de coordinación	59
4.2 Ligandos de la Tesis	62
5 Objetivos de la Tesis	63
BIBLIOGRAFÍA	65

Capítulo I: NUEVOS LIGANDOS TRIAZOL 71

I.A Introducción	73
I.B Síntesis y caracterización de los nuevos ligandos triazol	80
I.B.1 Síntesis general	80
I.B.1.1 Ligandos sulfonilo: N y M	80
I.B.1.2 Ligandos acilo (monoacilo y diacilo): (H ₂) P , (H ₂) O , (H ₂) V , (H ₃) diQ , (H ₃) diO y (H ₃) diV	81
I.B.2 Caracterización general	86
I.B.2.1 Tablas resumen	86
I.B.2.2 Espectroscopia infrarroja	95
I.B.3 Estructura cristalina del ligando (H ₂) V	100
I.B.4 Conclusiones	104
SECCIÓN EXPERIMENTAL	106
BIBLIOGRAFÍA	107
ANEXOS I, II, III	109

Capítulo II: COMPLEJOS COBRE-TRIAZOL COMO NUCLEASAS OXIDATIVAS 125

II.A Introducción	129
II.A.1 Nucleasas sintéticas oxidativas “clásicas”	130
II.A.2 Estrategias en el desarrollo de “nuevas” nucleasas sintéticas oxidativas	133
II.A.3 Auto-activación en nucleasas oxidativas	138
II.B Tres compuestos cobre-triazol “sencillos”: síntesis, estructura y estudio bioinorgánico	140
II.B.1 Antecedentes y objetivos	140
II.B.2 Síntesis de los compuestos 1-3	142
II.B.3 Caracterización de 1-3	145
II.B.3.1 Estructura de [Cu(H ₂ P) ₂ (ClO ₄) ₂] (1)	145

II.B.3.2 Estructura de [Cu(H ₂ diQ)(ClO ₄) ₂ ·2CH ₃ OH (2) y de [Cu(H ₂ diO)(NO ₃) ₂ ·2 DMSO (3)	148
II.B.3.3 Espectroscopia infrarroja de 1-3	154
II.B.3.4 Propiedades magnéticas de 2 y 3	156
II.B.4 Estudio de interacción con el ADN de 1 y 2	159
II.B.4.1 Espectroscopia de fluorescencia	160
II.B.4.2 Temperatura de <i>fusión</i> del ADN	163
II.B.4.3 Viscosimetría	164
II.B.5 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa de 1 y 2	166
II.B.6 Conclusiones – Discusión	170
II.C Dos complejos de cobre con dos ligandos naftalen- sulfonil-triazol: diferente nuclearidad y diferente unión al ADN y capacidad de corte	172
II.C.1 Antecedentes y objetivos	172
II.C.2 Síntesis de los compuestos 4 y 5	174
II.C.3 Caracterización de 4 y 5	178
II.C.3.1 Estructura de [Cu(N) ₄ (NO ₃) ₂]·4CH ₃ OH (4)	178
II.C.3.2 Estructura [Cu(M)(μ-acetato) ₂] ₂ ·2(M) (5)	181
II.C.3.3 Espectroscopia infrarroja	185
II.C.3.4 Propiedades magnéticas de 5	189
II.C.4 Estudio de interacción con el ADN de 4 y 5	191
II.C.4.1 Espectroscopia de fluorescencia	194
II.C.4.2 Temperatura de <i>fusión</i> del ADN	197
II.C.4.3 Viscosimetría	199
II.C.5 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa de 4 y 5	200
II.C.5.1 Ensayo de actividad	200
II.C.5.2 Ensayo sobre la influencia de agentes inhibidores en la actividad	202
II.C.6 Conclusiones – Discusión	205

II.D Un complejo de cobre(II) tetranuclear, Cu'-Cu(N-N)₂Cu-Cu', construido a partir de un ligando μ_3-1,2,4-triazolato-μ-carboxilato, como agente capaz de degradar al ADN	208
II.D.1 Antecedentes y objetivos	208
II.D.2 Síntesis del compuesto 6	211
II.D.3 Caracterización de 6	213
II.D.3.1 Estructura de [Cu ₄ (atc) ₂ (dien) ₄ (ClO ₄) ₂](ClO ₄) ₂ · 2H ₂ O (6)	213
II.D.3.2 Espectroscopia infrarroja	219
II.D.3.3 Propiedades magnéticas	222
II.D.4 Estudio de interacción con el ADN de 6	225
II.D.4.1 Espectroscopia de fluorescencia	225
II.D.4.2 Temperatura de <i>fusión</i> del ADN	229
II.D.4.3 Viscosimetría	230
II.D.5 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa de 6	231
II.D.5.1 Ensayo de actividad	231
II.D.5.2 Ensayo sobre la influencia de la fuerza iónica en la actividad nucleasa	233
II.D.5.3 Ensayo sobre la influencia de agentes inhibidores en la actividad	233
II.D.5.4 Estudio cinético	235
II.D.6 Conclusiones - Discusión	237
II.E Interacción con el ADN y actividad nucleasa de dos compuestos con alta nuclearidad: síntesis, estructura y magnetismo	238
II.E.1 Antecedentes y objetivos	238
II.E.2 Síntesis de los compuestos 7 y 8	240
II.E.3 Caracterización de 7 y 8	244
II.E.3.1 Estructura de {[Cu ₄ (HV) ₂ (picolinato) ₂ (NO ₃) ₃ (H ₂ O) ₆](NO ₃) _n } (7)	244

II.E.3.2 Estructura de [Cu ₆ (HdiV) ₂ (ClO ₄) ₆ (H ₂ O) ₁₄](ClO ₄) ₂ ·10H ₂ O (8)	250
II.E.3.3 Espectroscopia infrarroja	255
II.E.3.4 Propiedades magnéticas de 7 y 8	258
II.E.4 Estudio de interacción con el ADN de 7 y 8	262
II.E.4.1 Espectroscopia de fluorescencia	262
II.E.4.2 Temperatura de <i>fusión</i> del ADN	265
II.E.4.3 Viscosimetría	267
II.E.5 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa de 7 y 8	270
II.E.5.1 Ensayo de actividad	270
II.E.5.2 Ensayo sobre la influencia de agentes inhibidores en la actividad	272
II.E.5.3 Estudio cinético	275
II.E.6 Conclusiones – Discusión	278
II.F Conclusiones Capítulo II	280
SECCIÓN EXPERIMENTAL	283
BIBLIOGRAFÍA	288
ANEXOS I, II, III	296
Capítulo III: QUANTUM DOTS COMO AGENTES ACTIVANTES DE LA CAPACIDAD NUCLEASA DE COMPLEJOS DE Cu	319
<hr/>	
III.A Introducción	323
III.A.1 Las nanopartículas	323
III.A.2 Nanopartículas semiconductoras o puntos cuánticos (<i>quantum dots</i> = QDs)	325
III.A.2.1 <i>El efecto cuántico</i>	326
III.A.2.2 Tipos de <i>quantum dots</i>	328
III.A.2.3 Síntesis y biofuncionalización	329
III.A.2.4 Aplicaciones	331

III.B Sinergia entre <i>quantum dots</i> (QD) y el cobre(II)-1,10-fenantrolina en relación a la rotura del ADN	334
III.B.1 Antecedentes y objetivos	334
III.B.2 Síntesis y caracterización de las nanopartículas	336
III.B.3 Estudio de la interacción QD-ADN	340
III.B.3.1 Espectroscopia de fluorescencia	340
III.B.3.2 Electroforesis en gel de agarosa	342
III.B.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)	344
III.B.4 Estudio de la actividad nucleasa del sistema [Cu(phen) ₂] ²⁺ – QD	346
III.B.4.1 Actividad nucleasa <i>en ausencia de luz</i>	346
III.B.4.2 Actividad nucleasa <i>con fotoactivación</i>	348
III.B.5 Conclusiones – Discusión	350
III.C Dos nuevos complejos de cobre(II) con puente μ-guanazol y aminas aromáticas: caracterización y estudio comparativo de su actividad nucleasa en presencia de agentes reductores y <i>quantum dots</i>	352
III.C.1 Antecedentes y objetivos	352
III.C.2 Síntesis de los compuestos 9 y 10	356
III.C.3 Caracterización de 9 y 10	358
III.C.3.1 Estructura de [Cu ₂ (μ -Hdatrz)(phen) ₂ (H ₂ O) ₂ (NO ₃) ₄] (9)	358
III.C.3.2 Estructura de [Cu ₂ (μ -datrz) ₂ (μ -OH ₂)(bipy) ₂](ClO ₄) ₂ (10)	361
III.C.3.3 Espectroscopia infrarroja	365
III.C.3.4 Propiedades magnéticas de 9 y 10	368
III.C.4 Estudio de interacción con el ADN de 9 y 10	375
III.C.4.1 Temperatura de <i>fusión</i> del ADN	376
III.C.4.2 Viscosimetría	378
III.C.4.3 Espectroscopia de fluorescencia	379
III.C.5 Estudio de actividad nucleasa <i>convencional</i>	384
III.C.5.1 Actividad nucleasa	384

III.C.5.2 Mecanismo de acción	385
III.C.6 Estudio de activ. nucleasa en presencia de QD	387
III.C.6.1 Actividad nucleasa	387
III.C.6.2 Mecanismo de corte y función del QD	388
III.C.6.3 Estudio de la actividad nucleasa de otros sistemas $[M(\text{phen})_2]^{n+}$ en presencia de QD	389
III.C.7. Conclusiones – Discusión	391
SECCIÓN EXPERIMENTAL	393
BIBLIOGRAFÍA	400
ANEXOS I, II, III	407
Capítulo IV: NUCLEASAS HIDROLÍTICAS	411
IV.A Introducción	415
IV.A.1 La reacción de hidrólisis del ADN	415
IV.A.2 Hidrólisis catalizada por nucleasas químicas	416
IV.A.2.1 Rotura hidrolítica <i>versus</i> oxidativa	416
IV.A.2.2 Hidrólisis por <i>complejos bimetálicos</i> “sencillos”	417
IV.A.2.3 Hidrólisis por complejos conjugados con agentes de interacción del ADN	419
IV.B Un ligando <i>dinucleante</i> (L) que corta el ADN con un solo M^{n+} o sin ningún M^{n+} (M = metal de transición)	423
IV.B.1 Antecedentes y objetivos	423
IV.B.2 Caracterización de las disoluciones M+L	425
IV.B.2.1 Espectrometría de masas	426
IV.B.2.2 Valoraciones potenciométricas	427
IV.B.3 Estudio de la interacción de los sistemas M+L con CT-ADN	428
IV.B.4 Estudio de la actividad nucleasa de los sistemas M+L con pUC18	431
IV.B.4.1 Sistemas M+L 1:1, <i>sin agente reductor</i>	431
IV.B.4.2 Sistemas M+L 1:1, <i>con agente reductor (asc.)</i>	432

IV.B.4.3 Sistemas M+L 1:1 <i>versus</i> 2:1	434
IV.B.4.4 Sistemas M+L' y M + 2L', (L' = análogo de L <i>mononucleante</i>)	437
IV.B.4.5 Cinética del corte del sistema Co-L	439
IV.B.4.6 Mecanismo de corte del sistema M+L	441
IV.B.5. Conclusiones – Discusión	445
SECCIÓN EXPERIMENTAL	448
BIBLIOGRAFÍA	451
ANEXO	454
CONCLUSIONS and PERSPECTIVES	459
Abreviaturas	471

SUMMARY

The main goal of this PhD thesis concerns the development of artificial metallonucleases based on copper(II)-1,2,4-triazole compounds. In order to do so, we have obtained metal compounds of different nuclearities by reaction of a new family of 1,2,4-triazole ligands with copper(II) salts. The ligands own the characteristic triazole properties upon coordinating to metals and also integrate DNA binding units (aromatic moieties) with the aim of increasing the affinity of the corresponding metal complexes to double strand DNA. We have also chosen the copper(II) ion due to its intrinsic redox and coordination properties. Here we present our conclusions in relation with their structure/activity and also regarding the activating agent employed in the cleaving process (i.e. chemicals or other type).

Furthermore, the triazole ring offers the versatility to bridge several metal centers and obtain unique polinuclear compounds. These compounds can show higher oxidative nuclease activity than their respective mononuclears due to the possible synergy between metallic centres. On the other hand, these compounds also present great interest due to their singular structural features and magnetic properties.

This PhD thesis is divided in five sections: a general introduction and four different chapters. The general introduction includes the main concepts that will be tackled in this manuscript and the other four chapters contain the results obtained along this PhD period. The first chapter contains the synthesis and characterization of the triazole ligands; the other three chapters are divided according to the nature of the activation mechanism used to promote DNA scission: (chapter II) oxidative induced by chemical agents; (chapter III) oxidative induced by nanoparticles and, (chapter IV) hydrolytic.

General Introduction

This main introduction is divided in five sections. *The first one* comprehends an overview about DNA structure and molecular interaction, focusing in the four distinct ways B-DNA can be recognized: major and/or minor groove linking, intercalation between the base pairs, sugar-phosphate backbone binding and, covalent binding or metal-coordination to the bases. *The second part* contains a first approach at chemical nucleases. Here we focus on natural nucleases (enzymes), artificial nucleases (metallonucleases) as well as their two possible mechanism modes of action: hydrolytic and oxidative. *In the third part* we overview in the basics and experimental details of the bioinorganic techniques used along this thesis manuscript to evaluate DNA interaction and cleavage (fluorescence, DNA melting temperature, viscosimetry and gel electrophoresis). *In the fourth part* we firstly introduce the triazole ligands. Here we reason their unique properties as ligands and their versatile coordination modes, making them very appealing for the design of new polynuclear metal complexes with interesting properties. *The last part* includes the main objectives of this Thesis manuscript.

Chapter I

In this first chapter we present the aforementioned family of 1,2,4-triazole ligands derived from the corresponding precursor (3-amino/3,5-diamino-1,2,4-triazole) after integrating the aromatic groups in their structure, as substituent of the triazole ring, *via* sulfonylation or acylation. The chapter is divided in two parts. *In the first one*, we summarize the different strategies to synthesize 3,5-disubstituted-1,2,4-triazoles as well as the possible tautomerism problems associated to the triazole synthesis. *In the second one*, we present the synthesis and full characterization of the eight new ligands. We also include the crystal structure for one derivate, thus confirming the structure of the new triazole.

Chapter II

The chapter II, the main chapter on this thesis manuscript, contains a successful extension of our group's research on the chemistry of copper-triazole nucleases *via* oxidative mechanism in the presence of chemical activating agents. *In the first part of the chapter*, we briefly introduce two well-known examples of oxidative metallonucleases (Fe-bleomycin and copper(II)-bis-1,10-phenanthroline) and then, look at some of the recent strategies used in the literature to optimize the nucleolytic activity of oxidative systems. *In the second and third parts*, we exploit one strategy usually applied in artificial nucleases to enhance DNA affinity: the conjugation with intercalators. We present the synthesis, crystal structure, and spectroscopic and magnetic characterization of five new copper(II)-triazole compounds that combine triazole, sulfonyl/acyl and naphthalene/benzyl fragments. Then, we study their DNA binding and cleavage properties and discuss the consequences both of the inclusion of the aromatic moieties and of the different nuclearity in the DNA affinity and cleavage properties. *In the fourth and fifth parts*, we use an alternative approach to favour DNA cleavage: the formation of multinuclear complexes through several bridging and chelating possibilities offered by the triazole ligands. We present the synthesis and full-characterization of three new multinuclear compounds (two tetranuclear and one hexanuclear). We also study their magnetic properties and provide relevant data for discrete polynuclear compounds featuring different types of triazole bridges. Furthermore, we study their DNA interaction and cleavage properties. These studies show higher DNA binding affinities and greater DNA cleavage activities than the previous compounds.

Chapter III

In this third chapter we survey on one of the fastest moving and most exciting interfaces of nanotechnology: the use of quantum dots (QD) in biology. The chapter is organized in three parts. *In the first one*, we introduce the general concepts about this type of nanoparticles as well as presenting an overview for their synthesis,

biofunctionalization and possible applications. *In the second one*, we use QD to activate Cu(II) complexes towards DNA cleavage. Interestingly, we demonstrate that QD can cooperate and synergize with the prototypical nuclease $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ providing the first example of cooperative DNA cleavage between nanoparticles and a synthetic metallonuclease. *In the third one*, we use the aforementioned properties of triazole to obtain two new dimeric compounds and expand our previous results by combining the advantages of dinuclear copper catalysts with those of hydrogen-bonding ligands and with those of QD. Here, we describe the synthesis, crystal structure, and magnetic properties of both dimers. Then, we study their DNA binding and cleavage properties both in the presence of chemical activants and with QD. We rationalize the functional role of the nanoparticles in this process by different techniques.

Chapter IV

The fourth chapter is devoted to metallonucleases that can efficiently mediate phosphodiester bond cleavage through hydrolytic pathways. The chapter is divided in two parts. *In the first one*, we survey on the comprehension of this mechanism and to the strategies that need to be addressed to obtain more efficient systems. During this revision we realized that the studies on the most active systems were based on the hydrolysis efficiency towards substrate *models* so, and based on our experience in DNA cleavage, we decided to undertake a complete cleavage study of an active system towards plasmid DNA. *In the second one*, we select the *dinucleating* ligand L (L = 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol), which shows high efficiency in *models*, for this purpose. Here, we show that at M:L ratio of 1:1 (M being Co(II) and Fe(III)), L forms very efficient catalysts for cleaving plasmid DNA through the participation of the metal-free site. We also study the DNA binding strength of the ligands L and L' (the corresponding mononuclear) and their complexes. The present study is the first to show that it is possible to enhance the catalytic activity of the metal complex in dinucleating ligands by keeping the second metal binding site vacant as a second sphere feature.

INTRODUCCIÓN

1 INTERACCIÓN CON EL ADN

1.1 Estructura del B-ADN

La estructura básica del ADN está constituida por azúcares de desoxirribosa unidos entre sí a través de una cadena de grupos fosfatos (figura 1a). A su vez, los azúcares están unidos a una de las cuatro bases nitrogenadas que constituyen la información genética de los organismos (guanina, G; adenina, A; citosina, C o timina, T).

La estructura del ADN, propuesta por Watson y Crick hace más de cincuenta años,¹ es uno de los iconos científicos del siglo XX. Su estructura, denominada forma B-ADN, consiste en dos cadenas helicoidales de polidesoxirribonucleótidos que se enrollan hacia la derecha alrededor de un eje central imaginario (figura 1b). En ella, las unidades hidrofílicas azúcar-fosfato quedan expuestas hacia el exterior mientras que las bases hidrófobas permanecen en el interior de la doble hebra e interactúan entre sí mediante enlaces de hidrógeno (A con T y G con C).

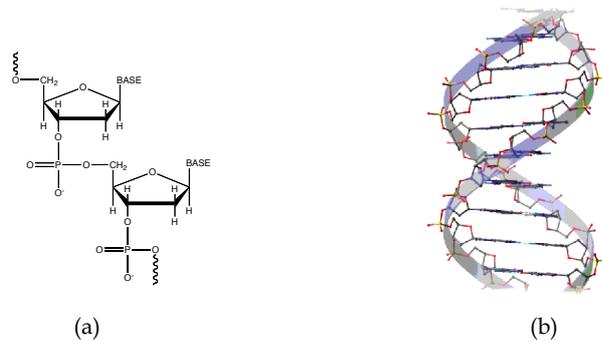


Figura 1. (a) La unidad básica del ADN; (b) estructura del B-ADN.

La geometría de los pares de bases y el antiparalelismo de ambas hebras, necesarios para la formación de los enlaces de hidrógeno, hacen que el punto de unión entre las bases y el esqueleto azúcar-fosfato no se disponga simétricamente con respecto a las bases. Esto provoca que se formen dos surcos en la estructura: uno denominado surco mayor, de 22 Å, y otro denominado surco menor, de 12 Å (figura 2). Estos surcos giran de forma helicoidal, al igual que los esqueletos azúcar-fosfato.

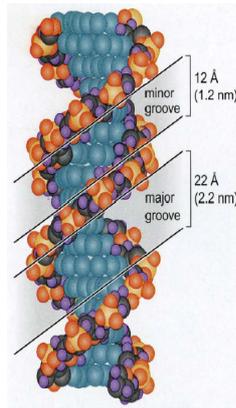


Figura 2. Estructura del B-ADN mostrando la diferencia estructural de los surcos menor y mayor.

La forma B del ADN es la conformación secundaria predominante tanto en disolución acuosa como en la célula. Sin embargo, y bajo determinadas condiciones, el ADN puede formar otro tipo de estructuras tales como la hélice levógira Z-ADN o la hélice dextrógira A-ADN (más corta y compacta).² Asimismo, el ADN puede originar estructuras de un orden superior como cadenas triples y cuádruples (figura 3).³ Se cree que todas estas estructuras pueden jugar un papel biológico relevante.⁴⁻⁶ Por ejemplo, se ha demostrado la formación de estructuras cuádruples en los telómeros humanos.⁶

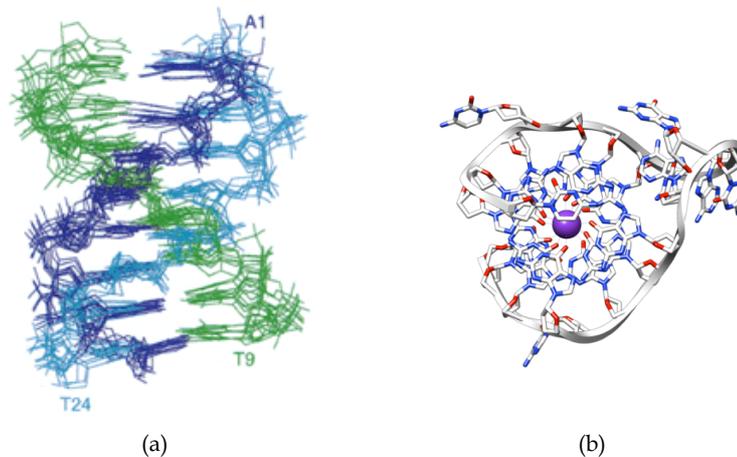


Figura 3. (a) Estructura triple del ADN; (b) estructura cuádruple del ADN.

1.2 Formas de interacción con el B-ADN

La imagen generalizada del ADN como una doble hebra “desnuda” y alargada hasta el infinito no es real. En la práctica, el ADN se encuentra fuertemente enrollado -como un ovillo de lana- y estabilizado por diversas especies catiónicas (fundamentalmente las histonas y, en menor medida, iones metálicos y poliaminas).

Un paso crucial para controlar la estructura del ADN es entender cómo estas moléculas y/o iones interaccionan con la doble hebra. Las moléculas de tamaño relativamente pequeño pueden interaccionar con los ácidos nucleicos de diferentes maneras:⁷⁻⁹

- a) por unión a los surcos (mayor y/o menor);
- b) por intercalación entre los pares de bases;
- c) por unión al esqueleto azúcar-fosfato;
- d) por unión covalente o coordinación metal-base.

Las tres primeras se engloban en el grupo de interacciones *reversibles*. Estas interacciones no enlazantes molécula-ADN se dan en unas condiciones específicas, las cuales, si cambian, pueden provocar la disociación del aducto formado. Por el contrario, la unión covalente o coordinación metal-base precisa la formación de un enlace que una ambas moléculas; dichas interacciones se conocen como *irreversibles* o *enlazantes*.

a) Unión a los surcos (mayor y/o menor)

Los surcos, especialmente el mayor, dejan espacio suficiente para que las moléculas externas puedan contactar con las bases; éste es el fundamento de la interacción del ADN con numerosos agentes capaces de reconocer secuencias de bases. Las moléculas que se unen a los surcos presentan una alta selectividad de reconocimiento de la secuencia de bases del ADN, abarcando en muchos casos entre 8-12 pares de bases, a diferencia de la mayoría de los intercalantes.¹⁰⁻¹⁴

Las fuerzas que intervienen en la unión a los surcos son:⁷⁻⁹

- Efectos hidrófobos-interacciones de van der Waals.
- Interacciones electrostáticas.
- Enlaces de hidrógeno.

Un ejemplo conocido de ligando del surco menor es la netropsina, (figura 4a), molécula constituida por unidades aromáticas unidas a través de enlaces peptídicos, que se aloja de forma específica en el *surco menor* abarcando 6 pares de bases A-T contiguos. Además de las fuerzas hidrófobas y los enlaces de hidrógeno, en la netropsina se producen interacciones entre las cargas positivas terminales y el N-3 de la adenina.¹⁰ Otro ejemplo de agente de unión al surco menor es la distamicina A (figura 4b y c)

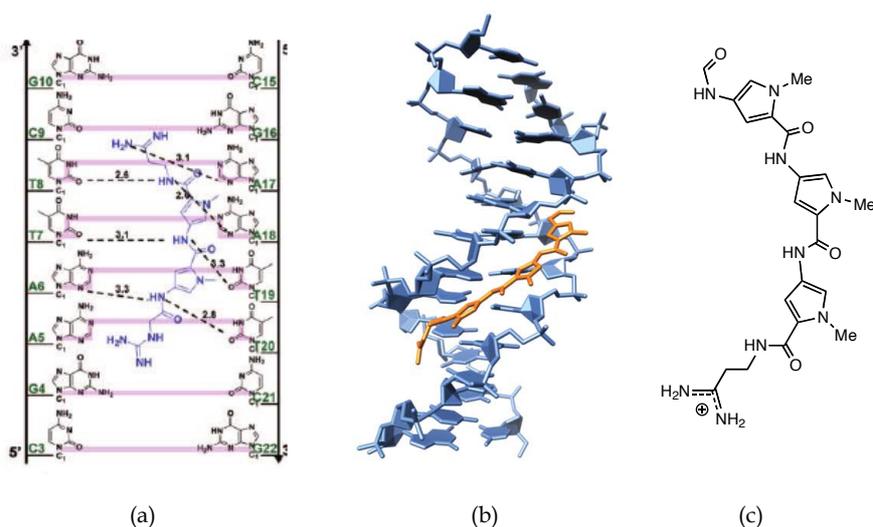


Figura 4. Ejemplo de interacción por el surco menor: (a) con netropsina¹⁰ y, (b) con distamicina A (en naranja); (c) estructura de la distamicina A.¹⁵

Por su parte, el *surco mayor* es el blanco preferente de la unión de proteínas al ADN debido al mayor número de posibilidades que ofrece de formar enlaces de hidrógeno con grupos como el amino de la lisina, el imidazol de la histidina, el hidroxilo de la serina, el carboxamido de la asparragina y glutamina o el carboxilato del glutamato, sin que se produzcan interacciones específicas por esta región. Aminoácidos catiónicos, como la arginina, también pueden formar enlaces de hidrógeno con los oxígenos de los fosfatos y/o enlaces de hidrógeno bifurcados con la guanina.⁷⁻⁹

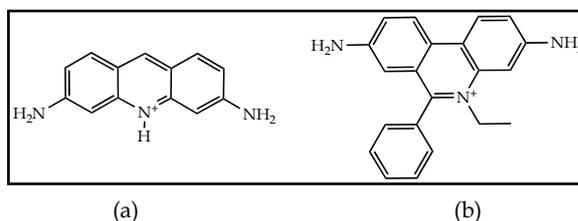
b) Intercalación entre los pares de bases

A principios de los años 60, Lerman y col. descubrieron que la familia de colorantes de la acridina eran capaces de unirse a los ácidos nucleicos, insertándose entre los pares de bases a través de interacciones π - π entre las bases situadas arriba y debajo de ellos.¹⁶

Un intercalante, por regla general, suele ser un compuesto aromático con una superficie óptima aproximada de 39 \AA^2 que puede insertarse entre los pares de bases de un polinucleótido a través de ambos surcos.^{9,17} Una característica estructural común de todos los intercalantes es un sistema aromático π -deficiente de dos o más anillos de seis eslabones que corresponde, aproximadamente, a un par de bases nucleicas. La intercalación se puede producir a través de ambos surcos y las fuerzas que operan son:⁹

- Apilamiento (*stacking*)-fuerzas de van der Waals.
- Enlaces de hidrógeno.
- Interacciones electrostáticas.

La existencia de cargas positivas en el sistema cíclico o en cadenas unidas a él da lugar a *intercalantes catiónicos*, caso de bromuro de etidio o proflavina (esquema 1). El proceso de interacción transcurre a través de dos etapas: (i) una primera interacción electrostática entre los grupos fosfato y el centro positivo y (ii) posterior deslizamiento del intercalante a lo largo de la hélice hasta que encuentra un lugar abierto, provocando el movimiento térmico de los pares de bases y produciéndose la intercalación.⁹



Esquema 1. Primeros intercalantes: (a) Proflavina y (b) Etidio.

Barton y col.¹⁸ han desarrollado una serie de compuestos de rodio y rutenio octaédricos con unidades planares capaces de insertarse entre las bases nitrogenadas. En este enfoque, el metal de transición aporta la carga positiva (figura 5).

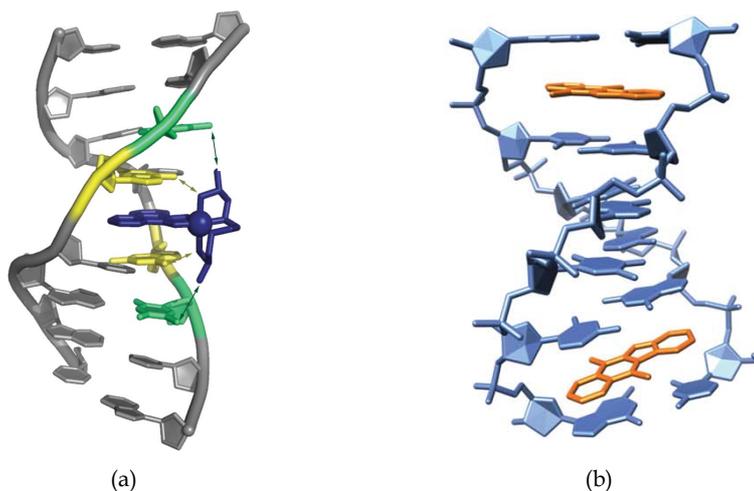
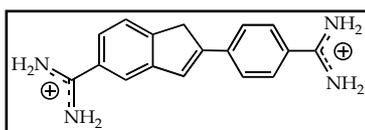


Figura 5. Ejemplo de interacción por intercalación: (a) con el compuesto $\Delta\text{-}\alpha\text{-}[\text{Rh}\{(\text{R,R})\text{-Me}_2\text{trien}\}(\text{phi})\}^{3+}$ donde phi = 9, 10-fenantroquina diimina (en azul oscuro)¹⁸ y, (b) con elipticina (en naranja).¹⁵

Aunque los intercalantes se unen preferentemente a pares G-C y presentan cierta preferencia por los dinucleótidos 5'-pirimidina-purina-3', no presentan generalmente selectividad con relación a la secuencia, mientras que los agentes que se unen al surco son más selectivos debido a que interactúan con un mayor número de pares de bases.

Con relación a la posible competencia entre intercalación y unión al surco, es interesante considerar aquellos compuestos que se pueden unir tanto al surco como comportarse como intercalantes. Por ejemplo, el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, esquema 2) se une al surco menor del ADN en lugares ricos en secuencias A-T, pero también por intercalación en regiones con abundantes secuencias G-C.¹⁹



Esquema 2. Estructura del ligando DAPI.

c) Unión al esqueleto azúcar-fosfato

El ADN es un polianión a consecuencia de la carga negativa de los oxígenos de los fosfatos. Este hecho, *a priori*, le hace blanco de unión a metales “ácidos duros” del grupo I y II. Las proteínas, a través de residuos catiónicos, como por ejemplo los presentes en la arginina, interaccionan con los fosfatos. Estas interacciones, sin embargo, suelen ser el paso previo a reconocimientos por los surcos mayor y/o menor.

Es difícil encontrar en la bibliografía agentes “sintéticos” que actúen sólo a través de interacciones electrostáticas.^{11,20,21} Recientemente, Williams y col. han desarrollado un compuesto de Pt(II) capaz de unirse de forma específica a los grupos fosfato. El compuesto está basado en tres unidades de tetraaminplatino(II) separadas entre sí mediante una cadena alifática de seis átomos de carbono (figura 6). Este grupo espaciador aporta la distancia óptima para que las unidades metálicas interaccionen electrostáticamente con los átomos de oxígeno de los grupos fosfato situados en el exterior del esqueleto del ADN.

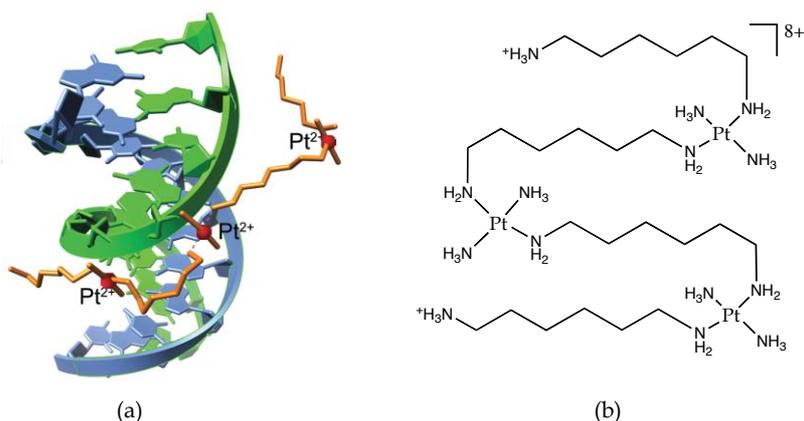


Figura 6. Ejemplo de interacción al esqueleto azúcar-fosfato con el compuesto de Pt(II): (a) Modo de interacción con el ADN y, (b) estructura del compuesto.²¹

d) Unión covalente o coordinación metal-base

Este último tipo de reconocimiento ha permitido el desarrollo de numerosos fármacos, tales como el cis-platino y sus derivados de segunda generación (oxalinplatino, nedaplatino y carboplatino).^{22,23} La mayoría de estos compuestos interactúan a través del átomo N7 de la purina (guanina o adenina) localizada en el surco mayor.

En el caso del cis-platino, la unión al ADN se produce mediante el desplazamiento de los dos cloruros y subsiguiente formación de dos enlaces metal-purina con dos bases adyacentes de la misma hebra. Este compuesto presenta una clara preferencia por G frente a A. El enlace bifuncional causa un retorcimiento en la estructura del ADN cercano a 45° (figura 7).

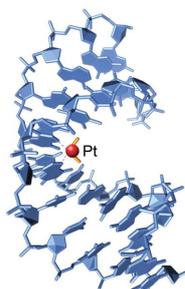


Figura 7. La unión del cis-platino al ADN origina un retorcimiento en la doble hélice.²⁴

Tanto las interacciones covalentes como las no covalentes pueden alterar la estructura y/o la actividad de los ácidos nucleicos. Debido a esto, numerosos compuestos que se unen al ADN han suscitado interés como fármacos antitumorales. Además, los compuestos con afinidad hacia los ácidos nucleicos presentan múltiples aplicaciones como herramientas químicas para el reconocimiento, rotura y marcaje de los ácidos nucleicos. Las líneas de investigación actuales buscan el desarrollo de compuestos que se unan al ADN de manera distinta a los modos clásicos de interacción para evitar la resistencia adquirida a ciertos fármacos y crear distintos espectros de actividad.

La interacción de la nucleasa con el ADN es el paso previo y necesario para el corte. Por este motivo, en la presente memoria se estudiará sistemáticamente la interacción de los compuestos preparados con el ADN.

2 NUCLEASAS QUÍMICAS

El esqueleto fosfodiéster del ADN bajo condiciones fisiológicas es prácticamente inerte respecto a la rotura hidrolítica del enlace P-O.²⁵ Debido a ello, la constante de velocidad de la hidrólisis del diéster de fosfato del ADN no se ha podido medir de forma directa.

Las estimaciones más razonables acerca del corte hidrolítico del ADN se basan en estudios realizados a altas temperaturas sobre modelos sencillos de fosfato. La extrapolación de los datos obtenidos a estas temperaturas a 25 °C da una constante $k = 7 \times 10^{-16} \text{ s}^{-1}$ para el ataque de una molécula de agua sobre el átomo de P de una molécula de ADN.^{26,27} Este valor correspondería a una vida media de 31 millones de años.

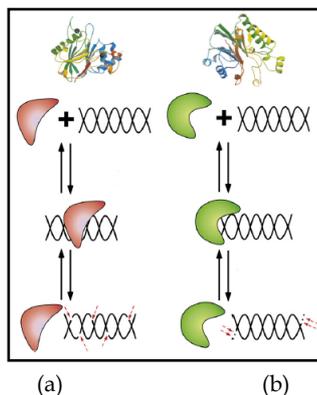
La resistencia a la hidrólisis del ADN se debe, inicialmente, a la repulsión entre su esqueleto, cargado negativamente, y el potencial nucleófilo. Sin embargo, muchos procesos fundamentales se basan en la ruptura/unión de estos ésteres de fosfato. Por ejemplo, el ADN exógeno, una vez reconocido, debe ser destruido; las mutaciones producidas en el ADN endógeno deben ser escindidas y reparadas. Por tanto, mientras que la estabilidad de los ésteres de fosfato es crucial para la vida, también lo es la capacidad de las células de manipular estos enlaces de forma eficiente. La Naturaleza ha logrado esta proeza a través de la evolución de un grupo de enzimas denominadas nucleasas.

2.1 Nucleasas (naturales)

Las nucleasas (naturales) son una clase de enzimas que catalizan la degradación hidrolítica del enlace fosfodiéster de los ácidos nucleicos. Estas enzimas pueden ser divididas en base a la posición en la que cortan a sus sustratos (esquema 3): (i) exonucleasas y, (ii) endonucleasas.

Las exonucleasas sólo son capaces de cortar nucleótidos situados en el extremo 3' y/o 5' de un oligonucleótido; mientras que las endonucleasas cortan nucleótidos situados en el interior de las cadenas. Cabe destacar que algunas de estas enzimas son capaces de

acelerar la reacción de hidrólisis de un enlace específico P-O en factores mayores a 10^{15} respecto a la reacción sin catalizar.^{28,29}



Esquema 3. (a) Endonucleasa y (b) exonucleasa.³⁰

Las enzimas de restricción son endonucleasas que cortan ADN de hebra doble o sencilla en lugares específicos (conocidos como sitios de restricción). EcoRI, la cual es aislada de cepas de *Eschericia coli*, es probablemente la enzima de restricción más usada en Biología Molecular (figura 8). EcoRI está constituida por dos subunidades simétricas, cada una de las cuales contiene un dominio de reconocimiento a una secuencia específica de ADN y un dominio de corte.³¹ EcoRI reconoce de forma específica el hexanucleótido GAATTC debido a los 12 enlaces de hidrógeno formados entre la proteína y las bases nitrogenadas, y emplea un único centro Mg(II) para asistir en la hidrólisis.

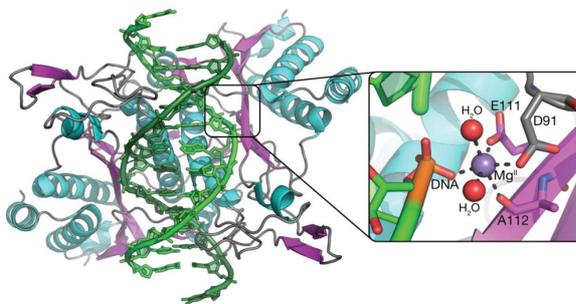
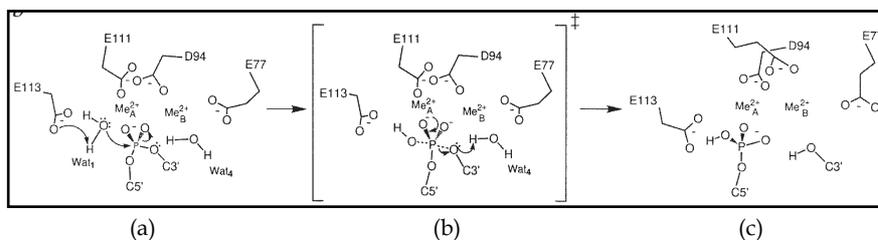


Figura 8. Estructura cristalina de EcoRI. La ampliación muestra el centro activo.³¹

Los centros activos de la mayoría de nucleasas contienen cationes divalentes, tales como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} o Zn^{2+} , los cuales resultan esenciales para la actividad catalítica (esquema 4). De entre todos ellos, el Mg^{2+} es, sin duda, la primera elección de las metalonucleasas naturales como resultado de su gran abundancia natural, inactividad redox, densidad de carga y una velocidad de intercambio de ligando intermedia.³²⁻³⁴



Esquema 4. Mecanismo de acción de una enzima de restricción (BamHI): (a) estado inicial; (b) estado de transición; (c) productos. Me²⁺ A y Me²⁺ B representan centros metálicos, y Wat1 y Wat4 moléculas de agua.³⁵

El ión metálico del centro activo es capaz de promover la hidrólisis del enlace P-O gracias a: mantener una geometría correcta en los centros activos, activar el enlace fosfodiéster, neutralizar la carga del sustrato y facilitar el ataque nucleofílico, estabilizar la carga del estado de transición, y estabilizar el grupo saliente.

Movidos por el hecho de que los centros activos de muchas nucleasas contienen iones metálicos, los investigadores han desarrollado complejos metálicos de bajo peso molecular como agentes miméticos de las nucleasas enzimáticas.

2.2 Metalonucleasas químicas

El desarrollo de metalonucleasas sintéticas capaces de degradar la doble hebra de ADN ha suscitado gran interés por dos motivos:

a) A nivel fundamental, el estudio sistemático con complejos metálicos puede complementar estudios estructurales de rayos-X, espectroscopia, de mutagénesis y/o isotópicos destinados a establecer el mecanismo de acción preciso de las enzimas; además, los complejos metálicos modelo pueden mimetizar una o más características de un

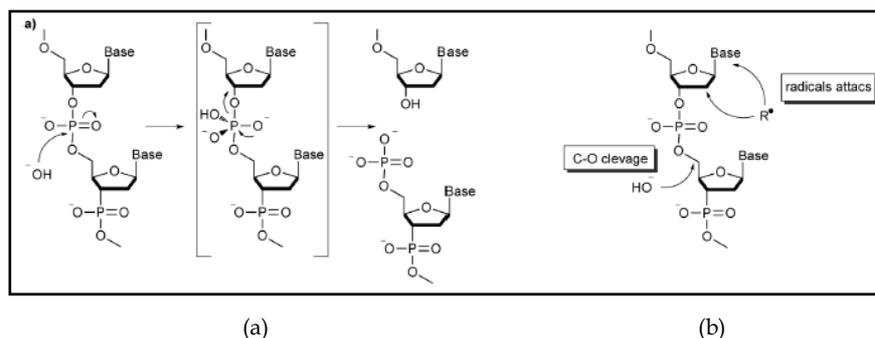
Introducción

centro activo y así permiten investigar la importancia de las características estructurales/químicas en la eficiencia catalítica de las enzimas.

b) Desde el punto de vista de las posibles aplicaciones, estos nuevos agentes pueden ser usados en regulación génica, mapeo de proteínas, estudios de interacción con el ADN y terapia contra diversas enfermedades (por ejemplo como antitumorales).³⁶⁻³⁹

Las nucleasas químicas pueden producir el corte del ADN fundamentalmente mediante dos mecanismos: (a) hidrolítico y/o (b) oxidativo.

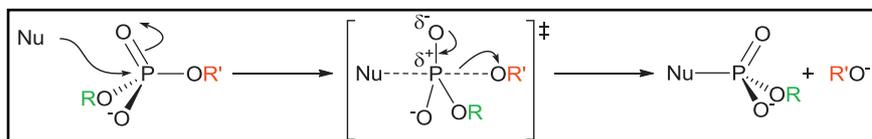
En el mecanismo hidrolítico, al igual que en las enzimas naturales, la metalonucleasa es capaz de romper directamente el enlace fosfodiéster (P-O) de la hebra de ADN. En el mecanismo oxidativo el corte se produce debido a la oxidación de las nucleobases y/o a la abstracción de los átomos de hidrógeno del azúcar (esquema 5). En este segundo mecanismo la metalonucleasa necesita la activación de un agente externo. Tradicionalmente esta activación se consigue mediante la adición de un agente químico externo (reductor u oxidante) o mediante fotoactivación.⁴⁰⁻⁴³



Esquema 5. Rotura de la doble hebra: (a) hidrolítica, (b) oxidativa.⁴⁴

2.2.1 Corte hidrolítico

El mecanismo hidrolítico implica el ataque de un *nucleófilo* sobre el átomo de fósforo del enlace fosfodiéster. Este proceso genera un estado de transición pentacoordinado en el que el nucleófilo y el grupo saliente ocupan posiciones apicales. Tras la salida del grupo saliente, se produce un corte en la hebra (esquema 6).^{45,46}



Esquema 6. Mecanismo propuesto para el corte nucleofílico de un diéster de fosfato (Nu = Nucleófilo).

De iones metálicos a elaborados complejos metálicos

En 1964, Wacker y col.⁴⁷ observaron que los iones Cu(II), Cr(III), Fe(III), Ni(II), Mg(II), Ca(II) y Pb(II) eran capaces de desactivar el ARN del virus del mosaico del tabaco por hidrólisis de los enlaces fosfodiésteres a 65 °C. En un estudio posterior se observó la degradación del ARN de transferencia de la fenilalanina cuando éste era incubado con una disolución de Pb(II). Los autores establecieron que sólo se necesitaba una cantidad catalítica de metal y que el mecanismo de corte debía implicar el ataque nucleofílico de un hidroxilo, unido a un átomo de Pb(II), al enlace fosfodiéster.⁴⁸

El papel catalítico de los iones metálicos no requiere, en principio, ningún ligando. Además, ciertas ventajas que los metales aportan para acelerar el corte de los enlaces fosfato (tales como acidez de Lewis y/o estabilización de la carga negativa) pueden verse afectadas por la presencia de ligandos (especialmente aquellos con carga negativa).^{49,50}

Como señaló Burstyn,⁵¹ las características que debe cumplir un ion metálico para promover la hidrólisis de ésteres de fosfato son: (i) dureza (para unirse a los átomos de oxígeno del fosfato), (ii) acidez de Lewis (para polarizar tanto el grupo fosfato como el nucleófilo) y, (iii) labilidad (para asegurar la actividad catalítica).

La elección de la Naturaleza estuvo limitada a la disponibilidad de los iones metálicos en el medio ambiente; sin embargo, los químicos tenemos la posibilidad de encontrar el metal adecuado en la tabla periódica. Los metales que mejor cumplen estos criterios son, esencialmente, los iones lantánidos trivalentes, Zn(II), Cu(II), Fe(III) y Ce(IV). Los lantánidos no han sido usados por las nucleasas naturales debido a su escasa accesibilidad y su toxicidad; el Cu(II) debió ser descartado debido a su potencial redox; y los otros dos (Zn y Fe) forman parte de los iones metálicos más frecuentes en las enzimas, junto a Ca(II) y Mg(II).

Sin embargo, los iones metálicos libres no resultan candidatos adecuados en la búsqueda de sistemas catalíticos potentes debido a que muestran actividades moderadas-bajas, problemas de solubilidad, toxicidad y, por supuesto, no son específicos. Por tanto, resulta imprescindible la obtención de complejos estables con ligandos óptimos como hidrolasas miméticas de las enzimas (naturales).

En los últimos años se han estudiado un gran número de complejos metálicos como posibles agentes de corte hidrolítico del ADN.^{44,46,52,53} Los sistemas que han resultado más eficientes se pueden dividir en dos grandes grupos: (i) complejos sin grupos funcionales en la estructura de sus ligandos, tales como los compuestos Fe(III)₂-DTB (DTB = 1,1,4,7,7-penta(2'-benzimidazol-2-ilmetil)-triazahexano),⁵⁴ y Cu(II)-[9]aneN₃ ([9]aneN₃ = 1,4,7-triazaciclonona)⁵⁵ y (ii) complejos con funcionalidades adicionales al ión metálico aportadas por los respectivos ligandos, entre los que estarían Fe(III)₂-TPmX-acridine (TPmX-acridine = 5-(acridin-9-yl)-bis{N,N-bis[(2-piridil)metil]amino-metil}-m-benceno),⁵⁶ Zn(II)-bipy-Et₃N⁺ (bipy-Et₃N⁺ = 5,5'-di(1-(trietilammonio)metil)-2,2'-bipiridina)⁵⁷ y Zn(II)₂-L-NH₂ {L-NH₂ = N,N,N',N'-[tetra-(6-amino-piridin-2-ilmetil)-1,3-diamino]-propan-2-ol}.⁵⁸ Por lo general, los últimos son mejores debido a que los grupos funcionales adicionales aumentan la afinidad por el sustrato y/o favorecen el corte.

Los agentes hidrolíticos se estudian con más detalle en el Capítulo IV.

2.2.2 Corte oxidativo

El ADN es un sustrato resistente a la hidrólisis pero sensible a la oxidación. Por ello, complejos de metales de transición, especialmente de cobre y hierro, en su estado de oxidación reducido, destacan como candidatos para actuar como nucleasas oxidativas.

En el mecanismo del corte oxidativo las propiedades redox del centro metálico y del dióxígeno se combinan para formar especies reactivas de oxígeno (ROS, acrónimo inglés de *reactive oxygen species*) y provocan así la rotura de la doble hebra.^{43,52,59}

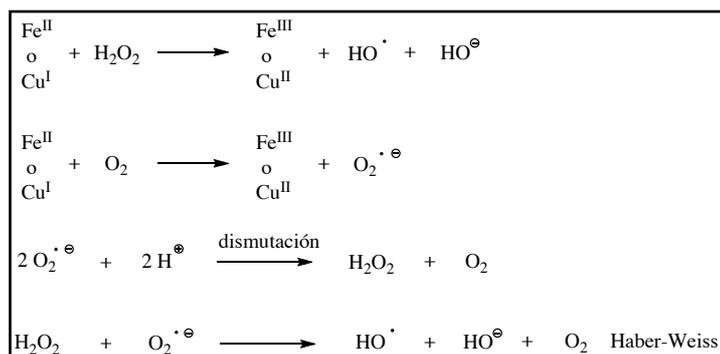
a) Mecanismo

Especies reactivas de oxígeno

La capacidad de corte de las diferentes metalonucleasas está relacionada con su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno. Estas especies son: el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$),⁶⁰ el radical superóxido (O_2^-),⁶¹ el peróxido de hidrógeno (H_2O_2)⁶² y el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$).⁶³

La formación de estas especies se cree que ocurre a través de las reacciones de Fenton y/o de Haber-Weiss (esquema 7). La transferencia de un electrón desde la *forma reducida del metal* al O_2 (o su derivado reducido, el peróxido de hidrógeno) genera los radicales necesarios para producir el corte del ADN. Por ejemplo, el radical hidroxilo posee un potencial redox de 2,8 V lo que, junto a su gran difusibilidad, lo convierte en uno de los radicales más importantes en el corte del ADN.⁶⁴

Un mecanismo más sofisticado, y tan sólo demostrado para complejos mononucleares, implica la formación de una especie conocida como RMOS (acrónimo inglés de *reactive metal-oxo species*) como consecuencia de la coordinación del O_2 y/o del H_2O_2 a un ion ferroso o cuproso.⁶⁵ La coordinación del H_2O_2 al Fe(II) o Cu(I) lleva a la formación de especies $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-OOH}$ o $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-OOH}$ (figura 11), mientras que la coordinación del O_2 al Fe(II) o Cu(I) conduce a la formación de especies $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OO}\cdot$ o $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OO}\cdot$.⁶⁶⁻⁶⁸



Esquema 7. Reacciones redox implicadas en la formación de ROS difusibles por complejos de hierro y/o cobre en presencia de reductor, O₂ y/o H₂O₂.

Estas especies ROS/RMOS reaccionan con los ácidos nucleicos a través de: (i) la abstracción de un átomo de hidrógeno del azúcar, y/o (ii) la modificación de las bases nitrogenadas (esquema 5b).⁶⁹

Abstracción de hidrógeno del azúcar

Un residuo de desoxirribosa en el esqueleto de una hebra de ADN posee siete átomos de hidrógeno susceptibles de sufrir un proceso de abstracción tanto por un agente oxidante como por un radical libre. Estos átomos se designan generalmente como H1', H2', H2'', H3', H4', H5', H5'' (las posiciones 2 y 5 contienen dos átomos de hidrógeno proquirales cada una).

De acuerdo con estructuras de rayos-X (obtenidas de oligonucleótidos de doble hebra con forma B) los hidrógenos 1', 2'' y 4' se sitúan en el surco menor, mientras que los hidrógenos 2' y 3' residen en el surco mayor (figura 9).^{69,70} Con respecto a los hidrógenos 5' y 5'', uno de ellos apunta directamente sobre el surco menor, mientras que el otro está orientado hacia el exterior del esqueleto fosfato y en contacto con el disolvente.

La abstracción de uno de estos siete hidrógenos de la desoxirribosa conduce a una serie de reacciones de eliminación que culminan en la escisión de la doble hebra del ácido nucleico. El esquema 8 muestra un posible mecanismo para la rotura del ADN por abstracción del H del C-1.

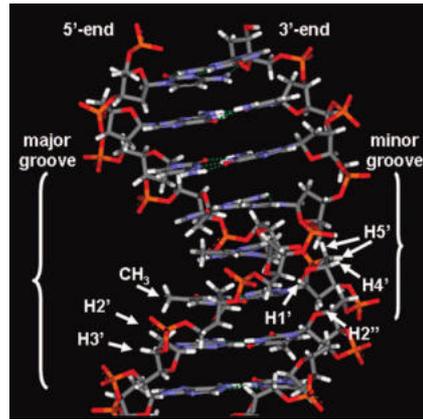
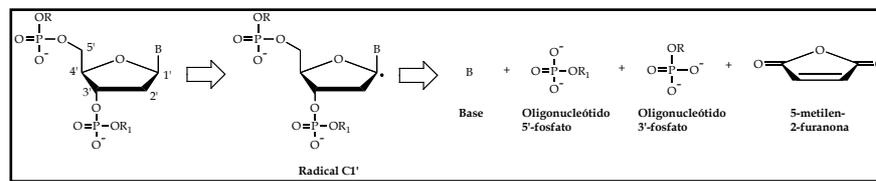


Figura 9. Enlaces C-H susceptibles de abstracción en la forma B del ADN.



Esquema 8. Uno de los mecanismos propuestos para la rotura del ADN por abstracción del H del C-1.⁴³

Modificación de las nucleobases

En general, los metales de transición capaces de abstraer un átomo de hidrógeno de la desoxirribosa, también pueden oxidar a las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos.⁷¹ La figura 10 muestra un posible mecanismo de oxidación.

Otros autores proponen que la oxidación de las bases provoca la formación de sitios abásicos (sin la base nitrogenada) y conduce a la rotura posterior de la doble hebra en condiciones alcalinas o en presencia de luz. Las cuatro bases son susceptibles de sufrir estas modificaciones, aunque entre ellas, la guanina presenta una mayor susceptibilidad a ser alquilada u oxidada.

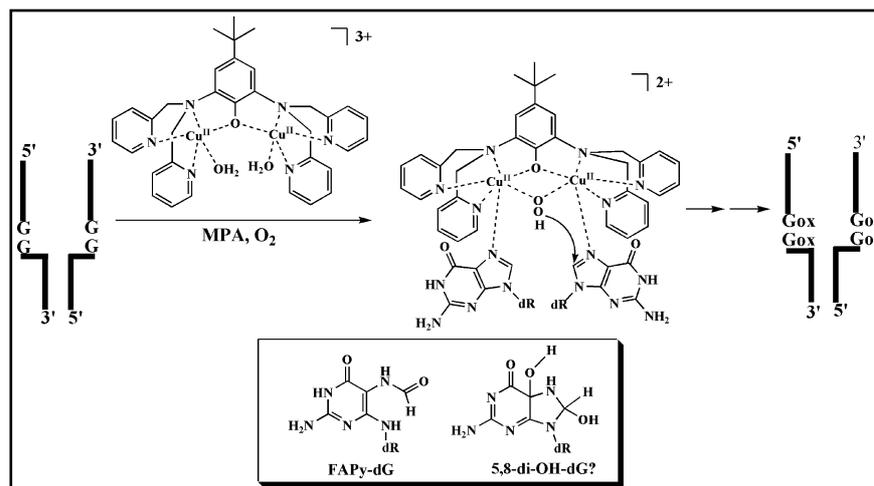


Figura 10. Mecanismo propuesto (y productos mayoritarios) para la rotura del ADN por oxidación de la guanina producido por un compuesto dinuclear de Cu(II).⁷²

b) Activación química

Como se ha comentado previamente, y a diferencia de las nucleasas hidrolíticas, en general, las nucleasas oxidativas necesitan la activación exógena para producir el corte del ADN. La activación puede llevarse a cabo mediante adición de un agente químico externo o fotoactivación.

Recientemente, se han descrito también casos de complejos metálicos capaces de producir corte oxidativo con auto-activación. El mecanismo de acción de estas nucleasas no ha sido estudiado con detalle, pero se ha sugerido que los ligandos que componen estos compuestos podrían estar implicados en la formación de las especies reactivas de oxígeno.^{73,74}

El mecanismo de generación de especies ROS recogido en el esquema 7 requiere la presencia de la especie metálica *en su estado reducido*. Por ello, la estrategia más común de activación consiste en la adición de un *agente reductor* que inicia la formación de especies radicalarias. Los cofactores más empleados en la bibliografía son: ácido ascórbico, agua oxigenada, ácido 3-mercaptopropiónico, glutatión y ditioneol.^{43,75}

La naturaleza del cofactor puede influir en la capacidad de corte de la metalonucleasa.⁷⁶ Otro parámetro a tener en cuenta es la concentración del mismo. Con frecuencia el aumento de la concentración del reductor mejora la producción de ROS y, por tanto, la eficacia de corte de la metalonucleasa. Sin embargo, la proporción metalonucleasa:cofactor debe mantenerse controlada puesto que un gran exceso de cofactor puede inhibir el corte al reducir las especies activas (ROS/RMOS/nucleobases oxidadas) a especies inactivas.⁷⁷

c) Complejos metálicos como nucleasas oxidativas

Los complejos de los metales de transición destacan como candidatos a actuar como nucleasas oxidativas debido a su diversidad estructural y a su reactividad. Como ya se ha mencionado, las propiedades redox del centro metálico y del dióxígeno se combinan para producir especies reactivas de oxígeno que afectan al ADN. Así, se han descrito complejos de metales de Fe, Cu, Ni, Pt, Ru, Rh, V, Cr, Co, Mn, Os y Pd capaces de mediar la oxidación del ADN en presencia de agentes reductores, oxidantes, e incluso sin el concurso de un agente externo.^{69,78-83} Entre los ejemplos más conocidos se encuentran: Fe-BLM (BLM = bleomicina), $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (phen = 1,10-fenantrolina), metaloporfirinas, Ni-azamacrociclos, $[\text{Mn}(\text{salen})]^{3+}$ [salen = N, N'-etilenbis(salicilaldeneaminato)], [Co-cyclam] (cyclam = 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane), $[\text{Rh}(\text{phen})_2(\text{phi})]^{3+}$ (phi = 9, 10-fenantroquinona diimina) y $[\text{Cu}(\text{N9-ABS})(\text{phen})_2] \cdot 3.6\text{H}_2\text{O}$ (N9-ABS = N-(9H-purina-6-il)benzensulfonamida).^{43,84}

En el Capítulo II se realizará un estudio más detallado de alguna de estas nucleasas oxidativas y del desarrollo de sistemas más activos.

d) Fotoactivación

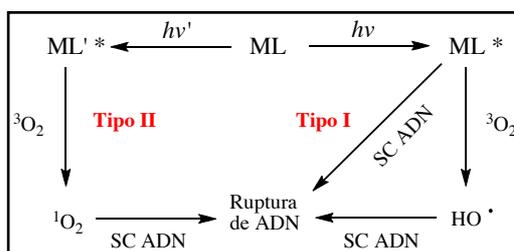
Una forma alternativa de generar especies reactivas con actividad citotóxica consiste en activar el sistema con luz.

En los últimos años se han desarrollado diversos sistemas basados en complejos metálicos capaces de degradar al ADN cuando se les irradia con luz de longitud de onda adecuada.⁸⁵ Los procesos de rotura del ADN mediante fotoactivación son análogos a los descritos

para las nucleasas con activación química en cuanto que producen oxidación de las bases nitrogenadas y/o abstracción de átomos de hidrógeno de la desoxirribosa. Los dos tipos de proceso más comunes que experimenta un compuesto tras fotoactivación son (esquema 9):

(i) Proceso Tipo I: el estado excitado del compuesto (generado tras la irradiación con luz) participa en reacciones químicas basadas en la transferencia de un electrón (o átomo de hidrógeno); las especies resultantes son las causantes del daño al ADN.

(ii) Proceso Tipo II: en estos casos se produce una transferencia de energía del estado triplete del compuesto al oxígeno molecular, lo que conduce a la formación de oxígeno singlete, que es la especie que rompe la doble hebra.



Esquema 9. Los dos tipos de proceso que puede seguir un complejo metálico tras ser fotoactivado.

La fotoactivación es la base de la **terapia fotodinámica** (PDT, acrónimo inglés de *photodynamic therapy*), una modalidad de tratamiento que combina la luz y un fotosensibilizador. Entre los fotosensibilizadores ensayados se encuentran colorantes orgánicos, compuestos aromáticos, metaloporfirinas y complejos de transición.⁸⁵ El buen fotosensibilizador debe mostrar bandas de absorción intensa en la “ventana fototerapéutica” (ca. 620-850 nm).

Los compuestos metálicos, por sus propiedades únicas (gran número de estados electrónicos excitados accesibles y elevada multiplicidad de spin), son candidatos perfectos para aplicaciones en fotomedicina. Además, la actividad nucleolítica fotoinducida presenta efectos más localizados y controlados (no tóxicos en ausencia de luz) que la que requiere activación química. Entre los compuestos fotoactivos estudiados más prometedores se encuentra una familia de

complejos de rutenio (II).⁸⁶ Algunos autores (Chakravarty y col.) han publicado también una serie de complejos ternarios de Cu(II) con ligandos aminoácido del tipo L-metionina o L-lisina y bases nitrogenadas del tipo 1,10-fenantrolina que son capaces de cortar al ADN en presencia de luz.⁸⁷⁻⁹⁰

e) Activación con nanopartículas

El uso de nanomateriales está siendo ampliamente investigado en la actualidad para la manipulación de ácidos nucleicos;⁹¹⁻⁹³ sin embargo, apenas hay estudios sobre la capacidad de las nanopartículas para degradar el ADN.⁹⁴

En el contexto de esta Tesis y movidos por el interés en encontrar nucleasas más eficientes hemos ensayado por primera vez la activación de metalonucleasas mediante nanocristales semiconductores o *quantum dots* (QD). En el Capítulo III describimos el primer ejemplo de cooperatividad en la acción nucleolítica entre QD y complejos de cobre(II).

3 TÉCNICAS BIOINORGÁNICAS

3.1 ESTUDIOS DE INTERACCIÓN CON EL ADN

Durante los últimos años se han realizado numerosos esfuerzos en relación a la síntesis de nuevas moléculas capaces de unirse a los ácidos nucleicos con alta afinidad y especificidad. Los fines son diversos: obtención de nuevos agentes terapéuticos, estudio de la conformación de ácidos nucleicos, desarrollo de nuevas herramientas para nanotecnología...⁹⁵⁻⁹⁷

El modo de interacción de un compuesto con el ADN puede ser establecido a través de técnicas como la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), la cristalografía de rayos-X o el estudio teórico con modelos.⁹⁸ Sin embargo, en la mayoría de casos la información estructural necesaria para la obtención de conclusiones con estas técnicas no está disponible. Por ello el uso de otras técnicas, basadas en la obtención de datos en disolución, ofrece una alternativa real en el estudio de la interacción de las moléculas con el ADN.⁹⁹ Debido al gran interés de este campo, las técnicas que se han desarrollado son numerosas. Entre ellas cabe destacar:⁹⁹

- Fluorescencia
- Espectroscopia ultravioleta
- Viscosimetría
- Electroforesis
- Dicroísmo circular y lineal
- Microscopía de fuerza atómica (AFM)
- Espectrometría de masas

Los estudios de interacción van orientados a establecer los tipos de interacción que tienen lugar entre el ADN y el compuesto. Una combinación racional de métodos puede ayudar a determinar el mecanismo molecular de la unión, a establecer relaciones estructura-actividad y, en última instancia, a diseñar de forma racional nuevos agentes. El presente apartado se centra exclusivamente en las técnicas habitualmente utilizadas por nuestro grupo de investigación.

3.1.1. Espectroscopia de fluorescencia

Fundamento

El estudio de las interacciones ADN-molécula a través de métodos espectroscópicos se basa en el hecho de que tanto los espectros de absorción como los de fluorescencia de la molécula libre se pueden modificar tras la unión a la doble hebra. Dichas variaciones son usadas para seguir el proceso de interacción.

De modo general, se puede afirmar que un compuesto luminiscente es aquel que emite radiación después de haber sido excitado electrónicamente. La fosforescencia tiene lugar cuando un estado excitado experimenta un cruzamiento entre sistemas a un estado de diferente multiplicidad y después sufre un decaimiento por emisión de radiación, mientras que la fluorescencia ocurre cuando no hay cambio de multiplicidad (figura 11).

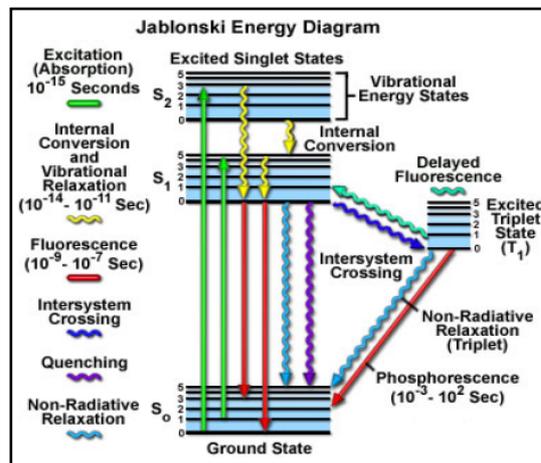


Figura 11. Mecanismos de disipación de la Energía.¹⁰⁰

La técnica aquí empleada se basa en la fluorescencia que emite el intercalador clásico bromuro de etidio (EB, figura 12a) cuando se enlaza con el ADN. Esta molécula presenta una baja intensidad de fluorescencia en estado libre; sin embargo, si se deja interaccionar con el ADN, debido a su poder de intercalación entre cada cuatro o cinco pares de bases, su *rendimiento cuántico de fluorescencia* aumenta

considerablemente y, por tanto, también la intensidad de fluorescencia observada. Este aumento de fluorescencia es consecuencia de la protección estérica que las bases nitrogenadas realizan sobre el intercalante catiónico, evitando la exposición al medio e impidiendo la desactivación de su estado excitado (EB*); aumenta así la vida media del estado excitado. La figura 12b muestra un modelo de intercalación.¹⁰¹⁻¹⁰⁴

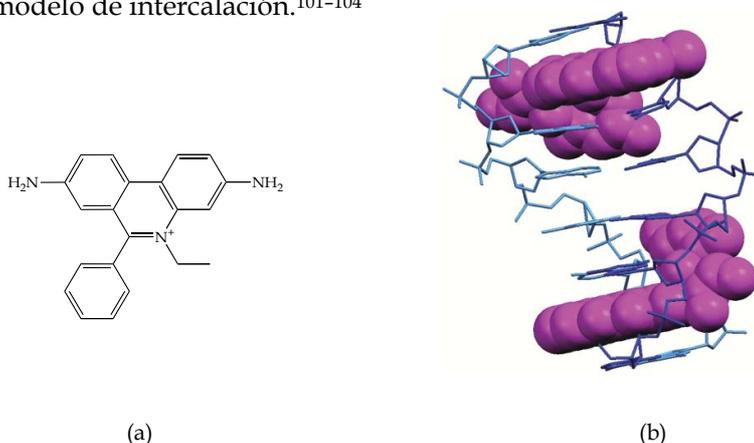


Figura 12. (a) Catión etidio e, (b) imagen de dos moléculas de doxorubicina (otro intercalante) intercaladas en la estructura de un oligonucleótido.¹⁰⁵

Los estudios competitivos con bromuro de etidio permiten investigar la posible interacción de los complejos sintetizados con el ADN. Estos métodos se basan en la adición de una segunda molécula no fluorescente en dicha región (en nuestro caso, el complejo a ensayar) que compita con el EB por la unión al ADN. Una variación (incremento o disminución) de la intensidad de emisión de fluorescencia del EB reflejará el grado de unión de la segunda molécula al ADN.¹⁰¹⁻¹⁰³

El comportamiento general en complejos que interaccionan con el ADN consiste en la disminución de la intensidad del máximo de emisión del aducto ADN-EB al aumentar la concentración de compuesto. Esta disminución indica que el complejo produce una desactivación del estado excitado del fluoróforo ADN-EB. La desactivación del estado excitado y, en consecuencia, la disminución de la intensidad de emisión, puede deberse a que:

- Los complejos compiten con el EB por los sitios de unión del ADN, *desplazando* a éste del interior hidrófobo de la doble hélice.
- Como consecuencia de la interacción del complejo con el ADN, se produce un cambio conformacional en la estructura de la doble hebra, lo que hace que *aumente la exposición* del EB al medio, disminuyendo así su *rendimiento cuántico de fluorescencia*.
- Los complejos interactúan con el EB localizado en los pares de bases del ADN (ninguno de los complejos estudiados en la presente *Tesis Doctoral* interactúan con el EB *libre*).

Se han descrito también casos en los que la interacción ADN-complejo provoca un aumento en la intensidad de emisión del aducto ADN-EB. Este hecho se explica debido a una posible contracción de la doble hélice producida a su vez por una interacción electrostática entre los grupos fosfato del ADN y el complejo.¹⁰⁶

Por tanto, cualquiera de estas dos posibilidades (aumento o disminución de la emisión del aducto ADN-EB) implica la *interacción* de los complejos con el ADN por cualquiera de los mecanismos descritos.

El estudio competitivo de fluorescencia permite, además, cuantificar el grado de interacción entre el complejo y el ADN. Este procedimiento proporciona de manera rápida y fiable una medida de la afinidad relativa entre un compuesto (o una familia de ellos) y el ADN. Para ello, primero se debe obtener el valor de C_{50} del compuesto a estudiar. *El valor de C_{50} corresponde a la concentración de complejo necesaria para disminuir al 50% la fluorescencia inicial del aducto ADN-EB.*

Este valor de C_{50} , inversamente proporcional a la constante de unión ADN-complejo,¹⁰⁷ permite hallar el valor de K_{app} , o *constante de unión aparente* del compuesto, mediante la ecuación 1:¹⁰⁸

$$K_{EB} \times [EB] = K_{app} \times [C_{50}] \quad (\text{ec. 1})$$

donde K_{EB} es la constante de unión aparente del aducto ADN-EB, cuyo valor varía con el pH, y $[EB]$ es la concentración de EB en el

ensayo. $K_{EB} = 3 \times 10^7 \text{ M(bp)}^{-1}$ a $\text{pH} = 6,0$; el cálculo de K_{EB} para otro pH puede hacerse por el método de Strothkamp.¹⁰⁹

Otra forma, también indirecta, de obtener información sobre la capacidad de interacción de una molécula con el ADN consiste en el cálculo de la *constante de Stern-Volmer*, K_{sv} . La ecuación de Stern-Volmer refleja la desactivación dinámica (*dynamic quenching*) de fluorescencia producida en el sistema ADN-EB tras la adición de una segunda molécula (o desactivador):^{102,110}

$$I_{F0}/I_F = 1 + K_+^* \tau_0 [Q] \quad (\text{ec. 2})$$

donde I_{F0} y I_F son la intensidad máxima de fluorescencia en ausencia y presencia de desactivador, respectivamente, K_+^* es la constante cinética de desactivación, τ_0 es el tiempo de vida media (del estado excitado) de fluorescencia en ausencia de desactivador y $[Q]$ la concentración de desactivador. $K_{sv} = K_+^* \tau_0$; por tanto, la ecuación queda:

$$I_{F0}/I_F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{ec. 3})$$

El valor de K_{sv} informa sobre la capacidad de Q de desactivar el estado excitado del bromuro de etidio, proporcionando de forma indirecta información sobre la capacidad de interacción del complejo con el ADN.

Procedimiento experimental

Se pueden realizar dos tipos de experiencias para medir el grado de interacción entre los complejos y el ADN. En ambos casos el ensayo consiste en registrar los espectros de emisión del aducto ADN-EB en ausencia y presencia de distintas concentraciones de complejo. Las medidas de fluorescencia se realizan en un espectrofluorímetro (en la presente *Tesis Doctoral*, modelo JASCO FP-6200). El ADN utilizado es *Calf Thymus* (CT-ADN), o ADN del timo de ternera, tipo XV (en nuestro caso suministrado por Sigma-Aldrich). Los espectros de emisión se registran entre 530-670 nm y la longitud de onda de excitación se establece en 500 nm. Todas las disoluciones se preparan en tampón biológico.

Antes de realizar cualquier experiencia se comprueba que las siguientes disoluciones *control* no presentan espectro de emisión bajo las condiciones experimentales usadas con las disoluciones *problema*:

- Disolución de complejo.
- Disolución complejo-ADN (en ausencia de EB).
- Disolución complejo-EB (en ausencia de ADN).

a) Estudios de desplazamiento (ADN-EB 1:1)

La experiencia se basa en registrar los espectros de emisión del aducto ADN-EB en presencia de distintas concentraciones de complejo y determinar los cambios que se producen en el máximo de intensidad de emisión. La figura 13 muestra los resultados de un ensayo típico.

En el procedimiento experimental de nuestro estudio se preparan una serie de disoluciones ADN-EB-complejo (3 mL de volumen final), que contienen distintas concentraciones de complejo (0, 10, 20, 30, 40 y 50 μM) y una concentración fija de EB y ADN (CT-ADN) de 50 μM , en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0). Las disoluciones madre (*stock*) de EB y CT-ADN se valoran con anterioridad espectrofotométricamente a partir de sus coeficientes de extinción [siendo ϵ_{480} (EB) = $5.680 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ y ϵ_{260} (CT-ADN) = $13.200 \text{ M}(\text{bp})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].

Las muestras ADN-EB se incuban previamente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añade el volumen adecuado de disolución de complejo para conseguir la concentración deseada y, tras 15 minutos, se realizan las medidas de fluorescencia.

Los resultados se presentan en forma de gráfico en el que se muestran superpuestos los espectros de emisión del aducto CT-ADN-EB obtenidos para las distintas concentraciones de complejo ensayadas. Habitualmente también se incluye la representación de Stern-Volmer o cociente I_{F0}/I_F frente a la concentración de complejo (siendo I_{F0} e I_F la intensidad máxima de emisión en ausencia y en presencia de complejo, respectivamente).

El valor de C_{50} (concentración de complejo necesaria para disminuir al 50% la fluorescencia inicial del aducto ADN-EB) se obtiene directamente del gráfico. Sin embargo, si en el rango de concentraciones ensayadas no se llega a producir la reducción del 50% de la intensidad de emisión, el valor C_{50} se puede hallar mediante extrapolación a partir de la recta de Stern-Volmer (ec. 3) para $I_{F0}/I_F = 2$.

$$I_{F0}/I_F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{ec. 3})$$

Este cálculo tiene la limitación de que presupone linealidad en un rango de concentraciones para el que no se dispone de datos experimentales y, por tanto, hay que tomarlo con precaución.

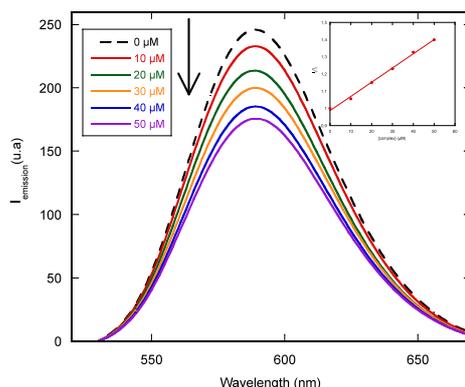


Figura 13. Gráfico típico del primer ensayo de fluorescencia: espectro de emisión ADN-EB en ausencia y en presencia de un compuesto (esta *Tesis Doctoral*, Capítulo II). La flecha muestra el cambio en la intensidad de emisión al aumentar la concentración de complejo. Interior: gráfico de Stern-Volmer.

b) Estudios de desplazamiento con exceso de EB

En la segunda experiencia se realiza una valoración cuantitativa de la disolución ADN-EB, conteniendo un ligero exceso de EB, con la molécula a estudiar. La figura 14 muestra los resultados de un ensayo típico.

Para la realización del ensayo se prepara una disolución CT-ADN-EB (3 mL de volumen), que es 3 μM en CT-ADN y 3,78 μM en EB, en tampón cacodilato (0,1 M, pH 6,0). De forma independiente se prepara una disolución madre (*stock*) de complejo (o compuesto a ensayar) de concentración entre 0,5 y 2 mM (en función de la

solubilidad del mismo), en tampón cacodilato (0,1 M, pH 6,0). De nuevo, es conveniente incubar de forma previa el aducto CT-ADN-EB durante 30 minutos. Se añade la disolución CT-ADN-EB a una cubeta de fluorescencia y se registra su espectro de emisión. A continuación se adiciona una alícuota (2-5 μL) de la disolución madre de complejo y, tras esperar 5 minutos, se registra el espectro de emisión de la mezcla (se debe comprobar que la intensidad de emisión se estabiliza). La adición de alícuotas se repite de forma progresiva hasta alcanzar el 20-40% de la intensidad de emisión inicial.

Los resultados se presentan en forma de gráfico en el que se muestran los valores de intensidad de fluorescencia medidos para cada una de las concentraciones de complejo ensayadas. Es conveniente normalizar los valores de fluorescencia; así, cuando el volumen total añadido de complejo es mayor al 5% del volumen inicial (3 mL), se deben corregir los valores de intensidad de fluorescencia mediante la ecuación 4:

$$F_{\text{corr}} = F_{\text{exp}} \times [(3000 + V) / 3000] \quad (\text{ec. 4})$$

donde F_{corr} y F_{exp} son los valores máximos de fluorescencia corregida y experimental, respectivamente, y V es el volumen de complejo añadido en μL .

El valor de C_{50} se obtiene directamente de la gráfica por interpolación.

Como ya se ha indicado, el valor de la constante de unión aparente, K_{app} , se calcula mediante la ecuación 1. Teniendo en cuenta que $[\text{EB}] = 3,78 \mu\text{M}$, la ecuación 1 quedaría así:

$$K_{\text{app}} = K_{\text{EB}} \times (3,78 / C_{50})$$

donde $K_{\text{EB}} = 3 \times 10^7 \text{ M}(\text{bp})^{-1}$ para $\text{pH} = 6,0$ (si se trabaja a otro pH , la constante se puede calcular siguiendo el método de Strothkamp).¹⁰⁹

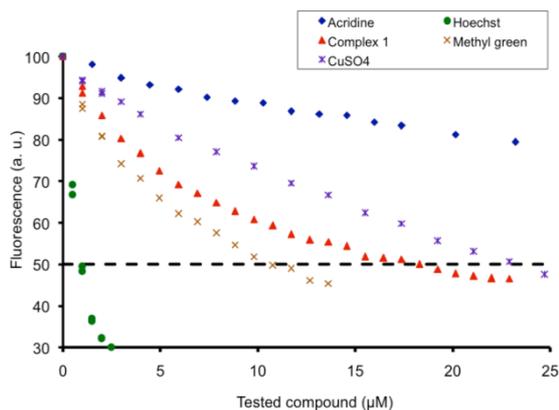


Figura 14. Gráfico típico del segundo ensayo de fluorescencia: desplazamiento competitivo del EB en el aducto CT-ADN-EB con diferentes moléculas (esta *Tesis Doctoral*, Capítulo II).

3.1.2 Temperatura de *fusión* del ADN

Fundamento

La doble hebra del ADN puede separarse mediante un incremento de temperatura para dar dos ácidos nucleicos de una única hebra. Dicho proceso se conoce como *fusión* (*melting*) o desnaturalización térmica del ADN.⁹⁹ La temperatura a la cual el 50% del ácido nucleico existe en estado helicoidal y el 50% en estado de hebra sencilla se conoce como **temperatura de *fusión* o desnaturalización térmica** y se designa como T_m .

La doble hélice del ADN se estabiliza a través de una serie de interacciones entre las que cabe destacar el apareamiento entre los pares de bases a través de puentes de hidrógeno, las interacciones de apilamiento (π -*stacking*) de las bases, y las atracciones electrostáticas entre cationes y grupos fosfato. Si un agente reduce o elimina cualquiera de estas interacciones, la estabilidad disminuye y la T_m es menor. La unión de un compuesto a la doble hebra puede aumentar o disminuir su T_m en función de si la unión la estabiliza o la desestabiliza.

El valor de T_m se puede determinar de forma experimental por dicroísmo circular (DC), resonancia magnética nuclear (RMN), viscosidad, técnicas electroforéticas o calorimetría,¹¹¹ pero, sin lugar a

dudas, la determinación más sencilla, sensible y reproducible es la que se realiza por espectroscopia UV.

Las bases nitrogenadas, cromóforos del ADN, absorben entre 250-280 nm. Se emplea $\lambda = 260$ nm como longitud de onda de referencia para cuantificar ADN con secuencias heterogéneas, como es el caso del CT-ADN. La rotura de la doble hebra produce un aumento de absorción (coeficiente de extinción, ϵ) del ADN conocida como *efecto hipercrómico de los ácidos nucleicos*, que puede explicarse teniendo en cuenta que los enlaces de hidrógeno entre los pares de bases de la doble hélice limitan el comportamiento de resonancia del anillo aromático de las mismas, lo que se traduce en una disminución de la absorbancia UV del ADN nativo. En contraste, en la forma de hebra sencilla las bases están en forma libre y no se forman enlaces de hidrógeno con las bases complementarias, con lo que la absorbancia a 260 nm (A_{260}) máxima resulta aproximadamente un 40% mayor que en la hebra doble. Este efecto hipercrómico es el fundamento de la técnica que se describe aquí.

El proceso de determinación de T_m mediante espectroscopia UV se realiza subiendo la temperatura gradualmente desde 25° a 90° C y midiendo la A_{260} de forma continua. Al representar A_{260} en función de la temperatura se obtiene una curva sigmoideal, que es la curva de *fusión* del ADN (figura 15a). A temperaturas bajas aparece el estado nativo del ADN. En la zona de inflexión de la absorbancia se produce la transición de ADN nativo a ADN desnaturalizado, básicamente por rotura de los enlaces de hidrógeno. El máximo de absorbancia a altas temperaturas corresponde al estado desnaturalizado del ADN. El T_m se obtiene a partir del punto de inflexión (50% doble hebra - 50% hebra sencilla).

En general, *los agentes que interaccionan con el ADN presentan mayor afinidad por la doble hebra que por la sencilla*. De este modo, los agentes que interaccionan con el ADN mediante un proceso de intercalación prefieren la doble hebra a la sencilla porque las bases apareadas proporcionan un “ambiente” adecuado para la intercalación. En el caso de agentes que se unen al surco (mayor y/o menor) esta preferencia hacia la doble hebra se debe a la imposibilidad de unirse a

ADN de hélice sencilla (no tiene surco específico en su estructura). En todos estos casos se provoca una estabilización de la doble hebra y, en consecuencia, se requiere mayor temperatura para separar las dos hebras en presencia del agente que en su ausencia. Esto se traduce en un aumento del T_m (figura 15b). No obstante, también se han descrito moléculas capaces de disminuir el T_m de los ácidos nucleicos. Es el caso de compuestos de platino que interactúan covalentemente con la doble hebra mediante un mecanismo *intra-cadena*.^{112,113} Estos compuestos se enlazan únicamente a una de las dos hebras de la doble hélice, desplazando así el equilibrio entre las dos formas de ADN hacia la derecha. Esto se traduce en un descenso del T_m (figura 15b).

En definitiva, la diferencia entre el T_m del ácido nucleico libre (T_m^0) y el observado en presencia de un complejo (T_m), que se denomina ΔT_m , puede relacionarse con la afinidad que tiene el complejo por el ADN. O, en otros términos, si el complejo estudiado produce un aumento (o disminución) de T_m , se puede sugerir que el complejo interactúa con la doble hebra del ADN (o con la hebra sencilla).

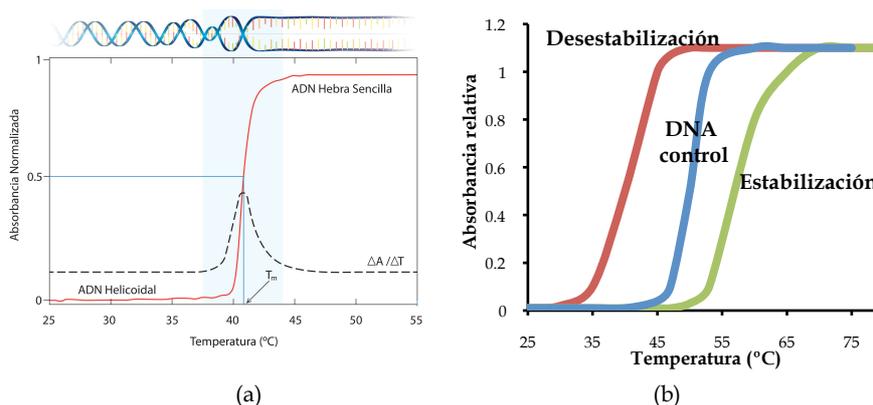


Figura 15. (a) Curva de *fusión* del ADN de una experiencia de desnaturalización térmica (para esta *Tesis Doctoral*, por A. Cambres) y, (b) desplazamiento teórico de la curva de *fusión* por una molécula que estabiliza o desestabiliza la doble hebra del ADN.

Procedimiento experimental

Los experimentos para determinar la temperatura de *fusión* del ADN se han realizado utilizando un espectrofotómetro UV-vis modelo Agilent 8453 equipado con un regulador de temperatura Peltier, modelo Agilent 89090A.

Los experimentos de desnaturalización se llevan a cabo con muestras (volumen final 3 mL) que contienen una concentración fija de CT-ADN (la concentración estándar es 100 μM ; sin embargo, en caso de complejos con baja solubilidad, ésta puede reducirse a 50 μM) y distintas concentraciones de complejo. El tampón utilizado es fosfato 1mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2).

Para determinar la temperatura de *fusión* del ADN, el espectrofotómetro registra los espectros de absorción entre 210 y 1000 nm, y toma un valor de A_{260} para cada temperatura. El equipo se programa para obtener una A_{260} para cada aumento de 1 $^{\circ}\text{C}$ en el intervalo de temperatura de 25-90 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados aparecen en forma de gráfico que representa la absorbancia relativa (A_{260}) en función de la temperatura. El equipo está programado para calcular automáticamente el valor de T_m una vez ha terminado el ensayo.

Los resultados de la experiencia completa se presentan como curvas superpuestas de temperatura de *fusión* para el CT-ADN en ausencia (*control*) y presencia del complejo a diferentes relaciones [CT-ADN]/[complejo] ensayadas. En todos los casos se resta la absorbancia inicial del complejo a 260 nm (por ello se representan *absorbancias relativas o normalizadas*). La figura 16 muestra los resultados de un ensayo realizado en esta *Tesis Doctoral*. Como se ha indicado anteriormente, los valores de T_m se obtienen a partir del punto de inflexión de las diferentes curvas. El valor de ΔT_m se calcula por diferencia: $\Delta T_m = T_{m[\text{CT ADN-complejo}]} - T_m^0$.

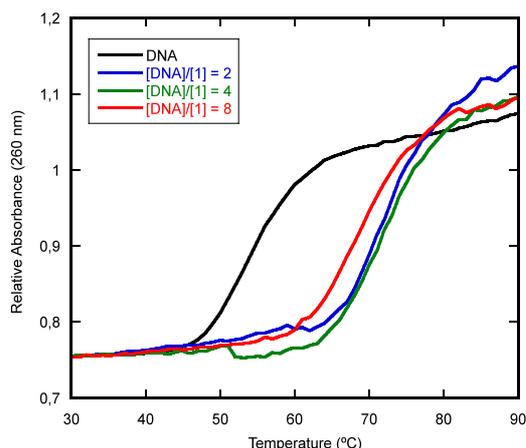


Figura 16. Curvas de temperatura de “fusión” del CT-ADN en ausencia y en presencia de un compuesto de Cu(II), estudiado en la presente *Tesis Doctoral*, a diferentes concentraciones.

3.1.3 Viscosimetría

Fundamento

Las medidas hidrodinámicas son sensibles a los cambios de longitud del ADN; por ello, constituyen uno de los métodos de estudio más directos y menos ambiguos de la forma de unión de las moléculas al ADN en disolución.^{114,115}

La separación entre los pares de bases producida por una inserción (de ca. 3,4 Å, que es el espesor de van der Waals de un anillo aromático) produce un desenrollamiento alrededor del eje de la doble hélice. Si la intercalación se produce en múltiples lugares se produce un alargamiento de la doble hebra y con ello un aumento de la viscosidad. Una intercalación *clásica* a bajas relaciones ligando/ADN ($r < 0,2$) produce un *incremento significativo* de la viscosidad. En contraste, las interacciones a través de los surcos del ADN y/o a través de atracciones electrostáticas causan una *variación menor* de la viscosidad (positiva o negativa) o *ningún cambio* en la misma.⁹

Existe también la posibilidad de que se produzca una intercalación *no clásica o parcial* cuando uno de los sustituyentes del intercalante se aloja en uno de los surcos estableciendo interacciones mediante enlaces de hidrógeno y/o atracciones electrostáticas. Este modo de

interacción provoca a concentraciones bajas de complejo un aumento lineal de la viscosidad relativa. A partir de una determinada concentración de complejo el valor de la viscosidad se estabiliza y ya no cambia (figura 17).

La técnica de determinación de la viscosidad del ADN consiste en medir el tiempo de elución de una disolución con CT-ADN en presencia de distintas concentraciones de complejo. La viscosidad relativa, η/η_0 , se obtiene de la ecuación 5:

$$(\eta/\eta_0) = (t - t_b)/(t_0 - t_b) \quad (\text{ec. 5})$$

donde η y η_0 son la viscosidad de la disolución tampón-CT ADN en presencia y ausencia del compuesto a ensayar, respectivamente, t es el tiempo de elución de la disolución tampón-CT ADN-complejo, t_b es el tiempo de elución de la disolución tampón y t_0 el tiempo de elución de la disolución tampón-CT ADN.

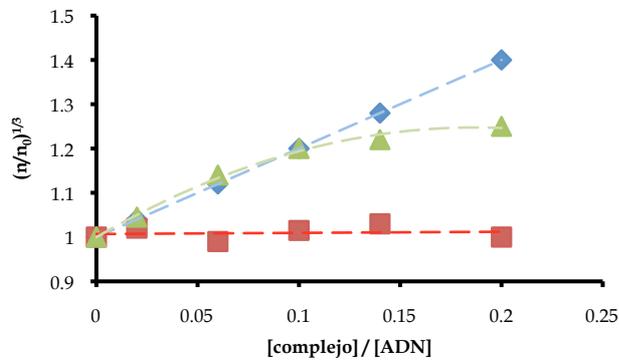


Figure 17. Representación “ideal” de los cambios de viscosidad del ADN producidos por los distintos modos de interacción: (♦) intercalación clásica, (▲) intercalación parcial e (■) interacción por los surcos o electrostática (esta *Tesis Doctoral*).

En función de la tendencia observada al aumentar la relación [complejo]/[ADN] se puede determinar el modo de interacción de la molécula estudiada con el ADN.

Procedimiento experimental

Las medidas de viscosidad se realizan a 25 °C utilizando un viscosímetro de tipo Ubbelodhe sumergido en un baño termostadado.

Se preparan disoluciones de 4 mL que contienen distintas concentraciones de complejo (0, 1, 3, 5, 7 y 10 μM) y una concentración de CT-ADN fijada a 50 μM , en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0).

Los tiempos de elución se toman manualmente con un cronómetro, por triplicado, para cada una de las disoluciones preparadas. Los valores de viscosidad se calculan a partir de la ecuación 5.

Los resultados se presentan con un gráfico de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ frente al cociente [concentración de complejo/concentración de CT-ADN]. La figura 18 muestra los resultados de un ensayo típico. Indica que el compuesto 1 no intercala y que el compuesto 2 experimenta intercalación clásica.

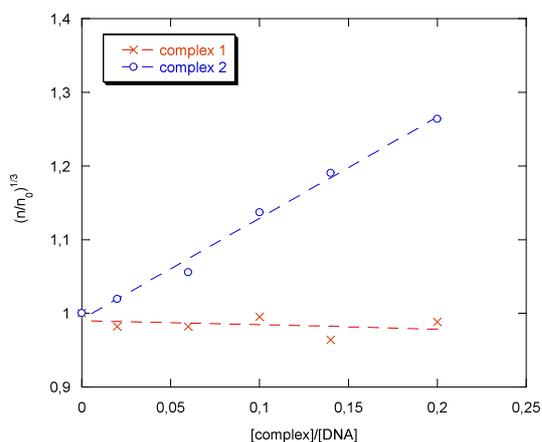


Figura 18. Ensayo de viscosidad para compuestos de la presente *Tesis Doctoral*.

3.2 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD NUCLEASA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

En los últimos años se han empleado diversas técnicas para estudiar la capacidad de los compuestos metálicos para degradar el ADN. De entre todas ellas las más usadas han sido la microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés)^{116,117} y la electroforesis en gel de agarosa.¹¹⁸

La visualización del ADN mediante **AFM** aporta información directa sobre la actividad del compuesto frente a la biomolécula (figura 19). Esta técnica tiene la limitación de que es difícil conseguir la correcta adsorción y posterior secado de la muestra sobre el disco de mica en el que se realizan las medidas y, sobre todo, que necesita un equipo caro. Por ello, y pese a que conduce a buenos resultados experimentales, la electroforesis en gel de agarosa es, sin duda, el método más utilizado para el análisis del ADN.

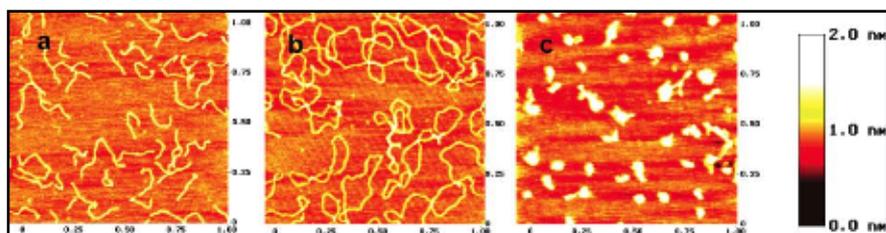


Figura 19. Imágenes representativas de un estudio de actividad nucleasa mediante la técnica AFM. (a) ADN lineal de 550 pb; (b) pBR322 ADN; (c) pBR322 ADN en presencia de $[\text{Co}(\text{ambi})_2(\text{ambi})]^+$ incubado durante 5 horas a 37°C .¹¹⁹

3.2.1 Fundamento

La técnica de electroforesis se basa en la separación de especies, que poseen carga neta, en base a la diferente velocidad con que éstas se desplazan bajo la acción de un campo eléctrico. Si se deja transcurrir un tiempo determinado, las moléculas cargadas positivamente se desplazarán hacia el cátodo (el polo negativo) y aquellas cargadas negativamente se desplazarán hacia el ánodo (el polo positivo), permitiendo así su separación. El uso de esta técnica

sobre muestras que contienen ADN resulta idóneo porque éste es un polianión a pH fisiológico.

El parámetro que determina el comportamiento de una molécula en un campo eléctrico es la *movilidad electroforética*, U , que se define por la ecuación 6, donde E es el campo eléctrico en (en $V \cdot cm$):

$$U = \frac{1}{E} \frac{dX}{dt} \quad (\text{ec. 6})$$

U (con unidades en $cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$) depende de la carga, de la forma y del tamaño de las moléculas, pero no de un modo que se pueda expresar de manera sencilla. Así, por ejemplo, la carga de las moléculas no es fácilmente evaluable, pues depende del medio (pH, fuerza iónica). Además, en disolución las moléculas están rodeadas de un conjunto de iones que constituyen su esfera de solvatación y, bajo la acción del campo eléctrico, se desplaza el conjunto, siendo atraída la esfera de solvatación hacia el polo opuesto que la molécula. No obstante, la ausencia de un tratamiento teórico adecuado no ha impedido el uso de esta técnica.

La electroforesis se puede desarrollar de dos maneras. En la llamada *electroforesis libre*, el campo eléctrico se aplica a disoluciones o suspensiones. Esta modalidad actualmente está en desuso. Su principal problema es que el medio en el que se desarrolla es un fluido, por lo que es poco resolutive al influir factores como la difusión y la convección. Por el contrario, la otra modalidad, la *electroforesis de zona*, es una de las técnicas más utilizadas en Bioquímica por su gran resolución. Aquí el campo eléctrico se aplica a un medio o *soporte* estabilizante, en vez de a un fluido, evitando así sus inconvenientes. La muestra se deposita en una reducida *zona* del soporte, lo que da nombre a esta modalidad.

En la electroforesis de zona, el soporte consiste en un gel constituido por un polímero soluble de peso molecular elevado. Este gel forma un entramado tridimensional (el tamaño del poro del reticulado depende de la concentración de polímero empleada) que no sólo evita la difusión y convección, sino que además participa en el

proceso de separación (tabla 1). Esto permite que las moléculas se separen en función de su tamaño, forma (o flexibilidad) y carga.

Dos tipos de polímeros son los más usados: agarosa y poliácridamida. El gel de agarosa se utiliza para la separación de fragmentos grandes de ADN (desde 500 pb hasta 10 Mb), mientras que el gel de poliácridamida se emplea mayoritariamente para la separación de proteínas, aunque también es útil para fragmentos pequeños de ADN y oligonucleótidos (desde 5pb hasta 500 pb).

En la presente *Tesis Doctoral* se ha escogido la técnica de electroforesis en gel de agarosa para observar la actividad nucleasa de los complejos (figura 20). El plásmido usado, pUC18, inicialmente está superenrollado (forma I). Cuando el complejo corta el plásmido por un único punto se produce ADN circular (forma II), mientras que si el complejo es capaz de cortar las dos cadenas de ADN del plásmido por sitios muy próximos (entre 10 pares de base entre cortes) se produce ADN lineal (forma III). La movilidad de cada una de estas moléculas es distinta; así, en las condiciones de la presente *Tesis Doctoral*, la movilidad de la forma superenrollada es mucho mayor que la de la forma lineal y circular, siendo la movilidad de esta última la menor de todas debido al mayor rozamiento que presenta.

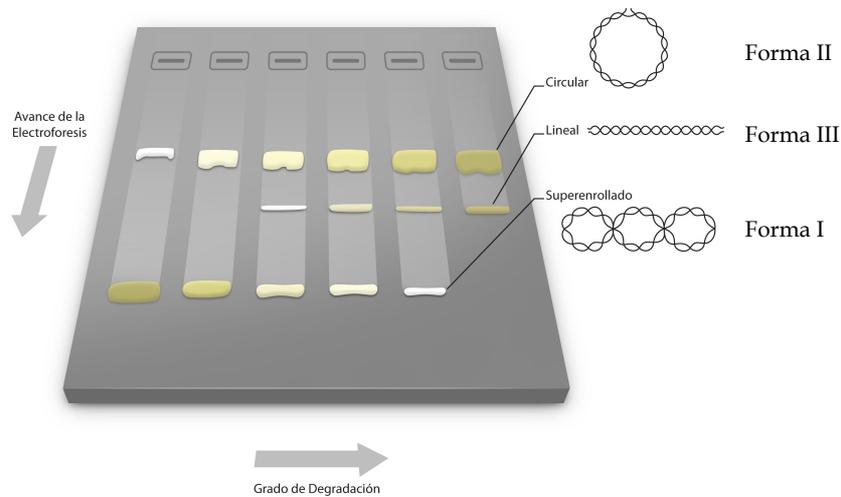


Figura 20. Formas del ADN y grado de avance de las mismas en el gel (adaptación de ⁵² para esta *Tesis*).

Tabla 1. Concentraciones de agarosa o poliacrilamida utilizadas para la separación electroforética de fragmentos lineales de ADN de distintos tamaños.¹¹⁸

agarosa (%)	Intervalo de tamaños separables (Kb)
0,3	5 - 60
0,6	1 - 20
0,7	0,8 - 10,0
0,9	0,5 - 7,0
1,2	0,4 - 6,0
1,5	0,2 - 3,0
2,0	0,1 - 2,0

acrilamida (%)	Intervalo de tamaños separables (bp)
3,5	1.000 - 2.000
5,0	80 - 500
8,0	60 - 400
12,0	40 - 200
15,0	25 - 150
20,0	6 - 100

3.2.2 Factores que influyen en la actividad nucleasa

Como se introdujo en el apartado 1.2 de esta Introducción, los compuestos metálicos son capaces de escindir el ADN mediante dos mecanismos fundamentales: hidrolítico y oxidativo. En el primero de ellos, el complejo es capaz de romper el enlace fosfodiéster de la doble hebra por sí mismo, es decir, en ausencia de un agente activante externo. En el segundo, sin embargo, el complejo precisa la activación exógena para poder producir el corte al ADN.

En general, para el estudio de la actividad nucleasa mediante cualquiera de los mecanismos comentados se deben tener en cuenta los siguientes factores:

- la naturaleza y concentración del complejo;
- la naturaleza y concentración del agente activante (en el caso de sistemas que lo precisen);
- el tampón en el que se realiza la reacción *in vitro*;
- el tiempo y temperatura de la reacción.

El objetivo principal de este tipo de ensayos consiste en encontrar un *rango de concentraciones* para las que el complejo presente una actividad elevada (la solubilidad del complejo es con frecuencia un factor limitante). Para ello, se debe evaluar la actividad del compuesto a diversas concentraciones y escoger así su rango de máxima actividad. En el caso de procesos que requieran la presencia de un agente activante, se procede de la misma forma. Se puede elegir una concentración de complejo e ir variando la cantidad de activante, o al revés. Debe tenerse en cuenta que no siempre concentración y actividad son directamente proporcionales. En algunos casos el aumento de la concentración de complejo y/o activante induce la inhibición de la actividad nucleolítica.¹⁰⁴

El *tampón* utilizado también es un parámetro que puede influir en la reacción. Tanto su naturaleza como el pH escogido pueden afectar de forma directa a la solubilidad del compuesto. Además, para compuestos con posible actividad hidrolítica el pH de estudio es crucial. Este tipo de compuestos generalmente presentan un patrón de actividad gaussiano;¹²⁰ por tanto, si se trabaja en una región de pH alejada del pH de máxima actividad del complejo, éste mostrará una escasa actividad. La tabla 2 recoge alguno de los tampones más comunes utilizados en ensayos biológicos. Se muestran en azul aquéllos que han sido empleados a lo largo de la presente *Tesis Doctoral*.

El *tiempo* y la *temperatura* de la reacción también pueden ser modificados para mejorar el corte del compuesto. Para incubaciones a temperaturas mayores de 37 °C, o tiempos superiores a 60 minutos, resulta conveniente el uso de un TermoCiclador (*ThermalCycler* en inglés). Este aparato evita la condensación de agua que se produce en las tapas de los tubos eppendorf que contienen las muestras y, así, se consigue aumentar la reproducibilidad de los estudios.

Todas las experiencias realizadas en la presente *Tesis Doctoral* a temperaturas mayores de 37 °C o tiempos superiores a 1 hora se han llevado a cabo con un TermoCiclador modelo *Eppendorf Mastercycler*.

Tabla 2. Selección de tampones biológicos de interés (25 °C, 0,1 M).

Tampón	Rango óptimo de pH	pKa (a 20 °C)	pKa (a 25 °C)	pKa (a 37 °C)
MES	5,5-6,7	6,16	6,10	5,97
Bis-Tris	5,8-7,2	n/a	6,50	6,36
PIPES	6,1-7,5	6,80	6,76	6,66
MOPSO	6,2-7,6	n/a	6,90	6,75
BES	6,4-7,8	7,17	7,09	6,90
MOPS	6,5-7,9	7,28	7,20	7,02
TES	6,8-8,2	7,50	7,40	7,16
HEPES	6,8-8,2	7,55	7,48	7,31
DIPSO	7,0-8,2	n/a	7,60	7,35
MOBS	6,9-8,3	n/a	7,60	n/a
TAPSO	7,0-8,2	n/a	7,60	7,39
TRIZMA	7,0-9,0	8,20	8,06	7,72
HEPPSO	7,1-8,5	n/a	7,80	6,66
TEA	7,3-8,3	n/a	7,80	n/a
HEPBS	7,6-9,0	n/a	8,30	n/a
TABS	8,2-9,6	n/a	8,90	n/a
CHES	8,6-10,0	9,55	9,49	9,36
AMP	9,0-10,5	n/a	9,70	n/a
CAPS	9,7-11,1	10,56	10,40	10,02

3.2.3 Procedimiento experimental

En esta *Tesis Doctoral* se ha utilizado plásmido de ADN pUC18 (2.686 pares de bases) adquirido a Roche o Fermentas. Este plásmido es una molécula circular cerrada de doble cadena que contiene más del 90% del ADN total en forma superenrollada, según garantía de la casa suministradora. La concentración de la disolución *stock* del pUC18 de Roche es 0,25 µg/µL (750 µM nucleótidos); la concentración de la disolución *stock* del pUC18 de Fermentas es el doble de concentrada, es decir, 0,5 µg/µL (1500 µM nucleótidos).

La separación electroforética de las distintas formas generadas se efectúa utilizando como *soporte* agarosa al 0,8 % en 150 mL de tampón TBE 0,5x. Este tampón se prepara a partir de una dilución 1:10 del tampón TBE 5x que consiste en una disolución 0,45 M Tris, 0,45 M ácido bórico y 10 mM EDTA. El gel de agarosa se tiñe con EB (se

añaden 2 μL de una disolución *stock* de EB de concentración 10 mg/mL por cada 100 mL de gel) para permitir la visualización posterior de las distintas formas de ADN.

A continuación se detalla el procedimiento experimental seguido en las experiencias.

a) Protocolo general

(La preparación e incubación de las muestras depende del tipo de estudio a realizar y se detallará posteriormente para cada caso).

A cada muestra, una vez preparada (volumen final de 20 μL) e incubada, se le adicionan 4 μL de *tampón de carga* 6x (0,25 % azul de bromofenol + 0,25 % xilencianol + 30 % glicerol). El tampón de carga facilita la inserción de la muestra en los pocillos del gel (glicerol), así como el seguimiento de las moléculas a lo largo del mismo (azul de bromofenol y xilencianol). La mezcla resultante se homogeniza y se *carga* (sólo 15 μL del volumen total de la misma) en el gel de agarosa. A continuación, se aplica sobre el gel una diferencia de potencial de 120 V durante 2 horas para separar las distintas formas de ADN generado. Una vez producida la separación electroforética, el gel se fotografía con un *sistema de captura* (en la presente *Tesis Doctoral* un equipo Gel-printer plus TDI).

La cuantificación de las diferentes formas generadas se efectúa por análisis densitométrico del bromuro de etidio fijado en las mismas (en la presente *Tesis Doctoral* se usó el *programa informático* ImageJ 1.34 s). Debido a que la afinidad del ADN superenrollado por el bromuro de etidio es menor que la de las otras formas, la intensidad de la banda correspondiente a la forma I se corrige por un factor de 1,3. La fracción de cada una de las formas del ADN se calcula dividiendo la intensidad de cada banda entre el total de las intensidades de las bandas de cada carrera.

En todas las experiencias se añade un *marcador*. El marcador se utiliza como patrón para comprobar el tamaño de los fragmentos correspondientes al ADN degradado por el complejo. Se escogió el marcador Lambda ADN/EcoRI + Hind III (figura 21).

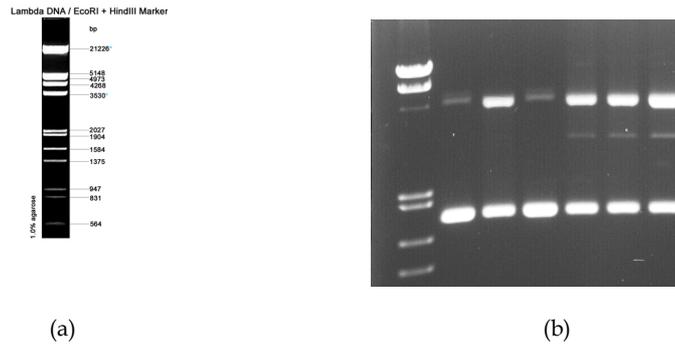


Figura 21. (a) Separación electroforética de los diferentes fragmentos del plásmido Lambda tras ser digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII; (b) imagen de una experiencia típica de electroforesis en gel de agarosa; la primera carrera muestra el marcador Lambda ADN/EcoRI + Hind III (esta *Tesis Doctoral*).

A continuación se detallan los protocolos específicos para el estudio de la actividad nucleasa del compuesto metálico en función del tipo de activación. Cualquiera de los parámetros de la reacción puede ser modificado con el fin de optimizar las condiciones del ensayo y/o conseguir la máxima actividad.

b) Incubación de la muestra sin adición de agente externo

Las muestras (20 μ L de volumen final), constituidas por: 13 μ L del tampón empleado + 6 μ L de complejo o de sal de Cu(II) (*control*) de cada una de las concentraciones a ensayar + 1 μ L de pUC18 (Roche), se incuban durante 60 minutos a 37 $^{\circ}$ C en un baño termostático o en un Termociclador.

Como control se establece:

- Control de ADN: 1 μ L de pUC18 (Roche) + 19 μ L de tampón.

Después de la incubación las muestras se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe "protocolo general".

c) Incubación de la muestra con adición de un agente químico externo

Las muestras (20 μL de volumen final), constituidas por: 7 μL del tampón empleado + 6 μL de complejo o de sal de Cu(II) (*control*) de cada una de las concentraciones a ensayar + 1 μL de pUC18 (Roche) + 6 μL de agente reductor a la concentración optimizada (se suele trabajar con concentraciones en exceso respecto a la concentración de complejo, tipo 1x, 5x,...), se incuban durante 60 minutos a 37 °C en un baño termostataado o en un Termociclador.

Como se indicó anteriormente, la eficacia de corte al ADN puede variar en función del agente químico usado como activante.¹²¹ Por tanto, es conveniente ensayar la actividad del complejo en presencia de diferentes agentes activantes. En las experiencias de esta *Tesis Doctoral* se han utilizado: ascorbato sódico, H_2O_2 o una mezcla de ambos.

Como controles se establecen:

- Control de ADN: 1 μL de pUC18 (Roche) + 19 μL de tampón.
- Control de ADN con agente reductor: 1 μL de pUC18 (Roche) + 13 μL de tampón + 6 μL de agente reductor a la concentración máxima ensayada en la experiencia.

Después de la incubación las muestras se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe “protocolo general”.

d) Incubación de la muestra con fotoactivación

Las muestras (20 μL de volumen final), constituidas por: 13 μL del tampón empleado + 6 μL de complejo o de sal de Cu(II) (*control*) de cada una de las concentraciones a ensayar + 1 μL de pUC18 (Roche), se incuban durante 60 minutos con irradiación.

Para la irradiación la muestra se introduce en el interior de un *fotorreactor*. En esta *Tesis Doctoral* se utilizó un modelo CCP-4V de LuzChem (figura 22) equipado con lámparas del tipo LZC-vis con filtros rojos. Los filtros acotan la longitud de onda que se irradia al

rango 600-700 nm (máximo en 615 nm) (figura 23). En la bibliografía se han descrito también experiencias de fotoactivación con lámparas de tipo UV-A, UV-B, UV-C o visible con filtros naranja.⁸⁹

Como control se establece:

- Control de ADN: 1 μL de pUC18 (Roche) + 19 μL de tampón.

Siguiendo a Chackravarty,⁸⁷ después de los 60 minutos en el fotorreactor, las muestras se sacan del fotorreactor y se incuban otros 60 minutos a 37 °C en oscuridad.

Después de la incubación las muestras se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe "protocolo general".

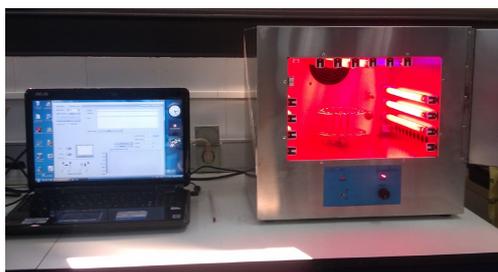


Figura 22. Imagen del fotorreactor CCP-4V.

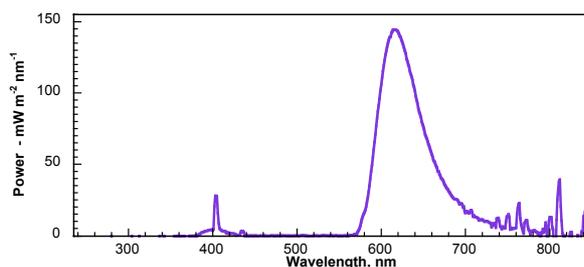


Figura 23. Espectro de emisión de la lámpara LZC-vis con filtro rojo.

e) Incubación de la muestra con nanopartículas

Las muestras se preparan de la siguiente manera (20 μL de volumen final): 11 μL del tampón empleado + 6 μL de complejo o de la sal de Cu(II) (*control*) de cada una de las concentraciones a ensayar + 1 μL de ADN pUC18 (Roche). Tras 5 minutos, se añaden 2 μL de disolución de QD.

A continuación, las muestras se incuban en la oscuridad (cubriéndolas con papel de aluminio) o en el interior del fotorreactor anteriormente descrito, según se desee estudiar la capacidad de corte del sistema complejo-QD en ausencia o en presencia de luz, respectivamente.

Después de la incubación las muestras se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe “protocolo general”.

3.2.4 Determinación del mecanismo de acción

Los dos ensayos más utilizados para poder discriminar entre un mecanismo hidrolítico u oxidativo son: ligación enzimática de los fragmentos de ADN obtenidos y/o identificación de las especies químicas producidas en el proceso de corte.

(a) El ensayo de ligación consiste en incubar una muestra de ADN lineal generado por el complejo y la ligasa T4.^{122,123} En aquellos casos en los que la enzima es capaz de ligar el plásmido se puede afirmar que el proceso de corte del compuesto es hidrolítico debido a que sólo los fragmentos derivados de un proceso hidrolítico pueden ser ligados por esta enzima. Esta experiencia no se ha llevado a cabo en esta *Tesis Doctoral*.

(b) El segundo ensayo, más común, consiste en incubar el compuesto, en las condiciones que es activo, con una batería de **agentes captadores de ROS**, con el fin de evaluar si la presencia de dichos agentes afecta al corte producido por el compuesto. La inhibición de actividad en presencia de un agente captador sugiere la implicación en el proceso de corte del radical captado.

De forma paralela, se puede añadir otro tipo de agentes: **quelantes de Cu(I)** (neocuproína) y/o **especies con afinidad por un determinado surco** (para el menor: Hoechst 33258, Distamicina A; para el mayor: verde de metilo). Estos ensayos aportan información acerca de la participación del Cu(I) en el proceso de corte, y de la posible afinidad del compuesto por un determinado surco del ADN, respectivamente.

Procedimiento experimental

Las muestras (20 μ L de volumen final) se preparan como los apartados anteriores pero añadiendo a la mezcla de reacción un volumen de agente inhibidor que oscila entre 3 y 6 μ L. Es conveniente preincubar la mezcla pUC18+tampón+agente captador durante 5-10 minutos y, después, añadir el complejo (en el caso de que sea necesario se debe añadir en último lugar el agente activante). En la tabla 3 se muestran los diversos agentes en función de la especie que captan y las concentraciones habituales ensayadas. Después de la incubación las muestras se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe “protocolo general”.

Tabla 3. Agentes de inhibición de corte utilizados en esta *Tesis Doctoral* (concentraciones habituales de ensayo).

AGENTES CAPTADORES DE ROS			
•OH (Hidroxilo)	O ₂ ⁻ (superóxido)	O ₂ ²⁻ (peroxo)	¹ O ₂ (singlete)
Formiato sódico (0,4M)	Tiron (10 mM)	Catalasa (10 μ g/mL)	2,2,6,6-tetrametil- piperidona (0,4M)
Yoduro potásico (0,4M)			NaN ₃ (0,4M)
Urea (0,4M)			
D-manitol (0,4M)			
EtOH (0,4M)			
tert-Butanol (0,4M)			
DMSO (0,4M)			
Cu(I)	Surco menor	Surco mayor	
Neocuproína (4x[complejo])	Distamicina A (8 μ M)	Verde de metilo (4,5 μ M)	
	Hoechst 33258 (4 μ M)		

(c) De forma complementaria, cuando existen indicios de que se produce una importante interacción electrostática entre los centros positivos del compuesto y los grupos fosfatos del ADN es conveniente realizar **ensayos con variación de la fuerza iónica**.

Procedimiento experimental

Las muestras (20 μ L de volumen final) se preparan como los apartados anteriores pero añadiendo a la mezcla de reacción cantidades crecientes de NaCl (generalmente en el rango de 0-100 mM). Después de la incubación las muestras se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe "protocolo general". Las conclusiones se extraen al evaluar el grado de inhibición del corte en función del aumento de la fuerza iónica.

(d) Un ensayo complementario para dilucidar si el mecanismo de corte es hidrolítico u oxidativo consiste en el estudio de corte en **condiciones anaeróbicas**. Para ello se realiza una comparación de la actividad nucleolítica del compuesto en presencia y ausencia de O₂.

Método experimental

Todas las disoluciones de trabajo se someten a un burbujeo de argón durante 15 minutos (3 ciclos). A falta de una "caja seca", en este trabajo se introdujo el material necesario (disoluciones, pipetas, tubos eppendorf,...) en una *AtmosBag* llena de argón (figura 24) y se procedió a la preparación de las muestras en su interior. Una vez preparadas, los tubos se sellaron con *Parafilm* y se incubaron en las mismas condiciones utilizadas en atmósfera normal. Después de la incubación las muestras se trataron como se ha descrito bajo el epígrafe "protocolo general".

Los resultados obtenidos se comparan con aquellos realizados en condiciones *aeróbicas*, y se evalúa la influencia del oxígeno en la capacidad de corte del compuesto. Si el compuesto corta por mecanismo hidrolítico las diferencias no deben ser significativas en presencia y en ausencia de oxígeno.

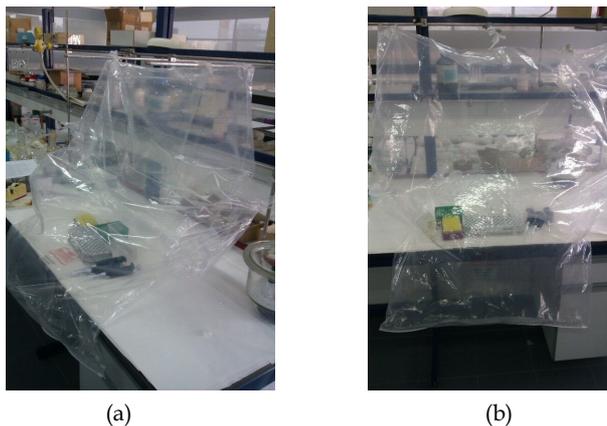


Figura 24. Imagen de una *AtmosBag*: (a) antes y, (b) después de llenarla de argón para proceder a la preparación de las muestras.

3.2.5 Estudio de la cinética del corte

Fundamento

Las macromoléculas de ADN pueden adoptar una forma lineal o una forma circular cerrada. Gran parte del ADN de las bacterias y de los virus, el ADN mitocondrial y el de los plásmidos (pequeñas moléculas de ADN extracromosómico), adoptan formas circulares. El ADN circular puede encontrarse en forma relajada o en forma superenrollada. El pUC18 se considera que contiene un 90% de ADN en forma superenrollada circular.

El proceso de linealización de un plásmido superenrollado de ADN (forma I) sigue una serie de etapas sucesivas. Primero se produce un corte en una de las hebras que lleva a la obtención de una forma circular relajada-abierta (forma II). A continuación, un segundo corte en la hebra complementaria, en un lugar cercano al primer corte, produce ADN lineal (forma III) (ver figura 20). Si la degradación del ADN continúa, se pueden producir fragmentos lineales de distintos tamaños, formándose una estela en el gel conocida como *smearing*.

Estas etapas puede ser descritas mediante las correspondientes ecuaciones cinéticas (esquema 10):



Esquema 10. Etapas consecutivas en la rotura del ADN superenrollado.

La evaluación de estas constantes no es una tarea fácil. El mecanismo de rotura puede ser complejo. Además, es necesario controlar las condiciones de la reacción y extraer resultados de calidad a partir de los geles. Sin embargo, la desaparición de la forma I con el tiempo presenta habitualmente un perfil cinético de pseudo-primer orden que, siguiendo a Cowan,¹²⁴ puede ajustarse bien con la ecuación exponencial:

$$S = S_0 \cdot e^{(-k_s t)} \quad (\text{ec. 7})$$

donde S_0 y S corresponden a la concentración de forma superenrollada (forma I) inicial y a un tiempo t , respectivamente, k_s es la constante de velocidad de pseudo-primer orden, y t el tiempo expresado en minutos.

La resolución de esta ecuación proporciona información sobre la constante de velocidad ($k_s = k_{obs}$) y el tiempo de vida media del plásmido ($t_{1/2} = -\ln 0.5/k_{obs}$), o tiempo que necesita el complejo para degradar el 50% de la forma superenrollada en las condiciones del experimento.

Los parámetros que se obtienen del estudio cinético ($k_{obs} / t_{1/2}$) permiten realizar un estudio comparativo de la eficiencia de las distintas nucleasas, pero siempre con la limitación de que estos valores dependen mucho de las condiciones experimentales y de que la información obtenida de las electroforesis es aproximada.

A continuación se detalla el procedimiento experimental seguido en este trabajo para estudiar la cinética de la reacción de corte.

Método experimental

Se prepara una mezcla de reacción "madre" (*stock*) que contiene: pUC18 + tampón + una concentración de complejo previamente elegida + agente activante (cuando procede). La mezcla se incuba a una determinada temperatura, y se van extrayendo alícuotas de 20 μL a diferentes tiempos (ejemplo: 5, 10, 15, 20,... min). A cada alícuota se le añade 4 μL de tampón de carga que contiene EDTA (0,25 % azul de bromofenol, 0,25 % xilencianol, 30 % glicerol y 10 mM EDTA) e inmediatamente se introduce en un baño de hielo a 0 °C. De esta manera (EDTA + baño de hielo) se para la reacción. Se extraen tantas alícuotas como puntos experimentales se desea obtener (mínimo entre 7 y 10). Todas las muestras se cargan simultáneamente en el gel y se tratan como se ha descrito bajo el epígrafe "protocolo general".

La constante de velocidad se obtiene mediante ajuste de los puntos experimentales a la ecuación exponencial decreciente de primer orden anteriormente (ecuación 7) mencionada utilizando el programa Excel.

4 LOS LIGANDO TRIAZOL

Los 1,2,4-triazoles son una familia de compuestos muy conocida por sus numerosas aplicaciones como fungicidas y herbicidas.¹²⁵⁻¹²⁷ Además, se han descrito numerosos compuestos con anillos triazol que presentan propiedades biológicas y farmacéuticas y que, por esta razón pueden actuar como analgésicos, antibacterianos, antivirales o agentes antitumorales.¹²⁸⁻¹³⁰

Desde el punto de vista de la química de coordinación, el interés por los derivados 1,2,4-triazólicos sustituidos y no sustituidos está relacionado con tres propiedades:¹³¹⁻¹³⁴

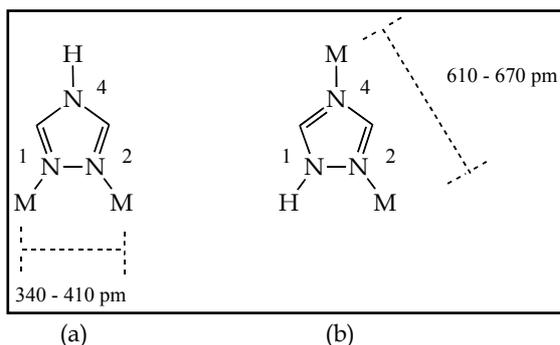
- La posición de los átomos dadores en el anillo de 5 miembros, que les hace especialmente proclives a actuar como puente entre iones metálicos de transición; este puente puede presentar diferentes geometrías en función de los átomos dadores del ligando y de las características del metal.
- Su geometría similar a la de los imidazoles, ampliamente repartidos en la naturaleza, que permite utilizar los triazoles en modelos de centros activos de metaloenzimas o de otros procesos naturales.
- Su fuerza como ligandos, que se encuentra en el rango justo para formar compuestos con transición de espín con Fe(II) y Co(III). Esta biestabilidad les hace potencialmente útiles en nanotecnología.¹³⁵⁻¹³⁷

4.1 Formas de coordinación

Los ligandos 1,2,4-triazol son muy versátiles y sus complejos presentan gran diversidad de estructuras. Los complejos metal-triazol *mononucleares* son raros, especialmente en el caso de los metales de la primera serie de transición. Si no hay impedimentos estéricos, se prefiere la forma de coordinación *bidentada puente*. Para los iones triazolato la coordinación *tridentada* es frecuente.¹³¹

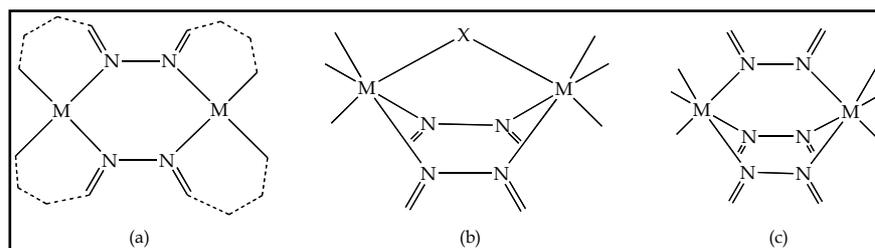
Concretamente, los 1,2,4-triazoles pueden actuar como ligandos *puente* por una de estas tres modalidades:¹³¹

1. A través de los nitrógenos N1,N2. El puente aproxima a los iones metálicos a una distancia de ca. 4 Å (esquema 11a).



Esquema 11. Sistemas puente (a) $\mu_{1,2}$ 1,2,4-triazol y (b) $\mu_{2,4}$ 1,2,4-triazol.

Cuando los triazoles se coordinan a través de los nitrógenos N1,N2 (esquema 12) pueden actuar formando un *puente doble* (con dos ligandos 1,2,4-triazol) (esquema 12a) o un *puente triple*. En este último caso existen varias posibilidades: se pueden combinar dos puentes N1,N2-1,2,4-triazol con un tercer puente formado por aniones pequeños (Cl^- , F^- , NCS^- , OH^-) o por H_2O (esquema 12b), o formarse tres puentes N1,N2-1,2,4-triazol (esquema 12c).



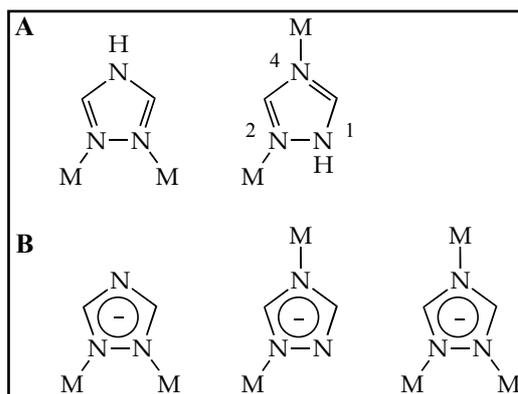
Esquema 12. Diferentes sistemas puente N1,N2.

Los triazoles con sustituyentes quelantes en posiciones 3 y 5 forman puentes dobles planares. Por otro lado, en aquellos derivados con la posición N4 bloqueada por un sustituyente sólo los modos de coordinación monodentado a través de N1 o bidentado a través de N1,N2 son posibles.

2. A través de los nitrógenos N2,N4. En este caso los centros metálicos quedan separados por una distancia de ca. 6.5 Å (esquema 11b). Este tipo de coordinación genera estructuras bidimensionales en capas.

3. A través de los nitrógenos N1,N2,N4 cuando el triazol se encuentra en forma aniónica. Este tipo de coordinación origina también sistemas planares en los que el triazolato actúa de puente entre tres centros metálicos. El sistema puente en este caso es una combinación de los dos tipos de puente del esquema 11.

El esquema 13 resume las cinco formas habituales de coordinación:



Esquema 13. Formas de coordinación del anillo 1,2,4-triazol/ato: (A) $\mu_{1,2}$ y $\mu_{2,4}$ 1,2,4-triazol y (B) $\mu_{1,2}$, $\mu_{2,4}$ y $\mu_{1,2,4}$ 1,2,4-triazolato.¹³³

4.2 Ligandos de la Tesis

Los tipos de coordinación anteriormente descritos proporcionan infinitas posibilidades para el diseño y preparación de las más diversas arquitecturas. Por ello, los ligandos 1,2,4-triazol se vienen utilizando para preparar no sólo compuestos de coordinación metálicos con estructuras específicas sino también complejos con transición de espín y materiales de coordinación poliméricos (especialmente desde el desarrollo de los “Metal-Organic Frameworks” o MOFs).¹³³ Estas áreas de la investigación química son, de hecho, de gran actualidad. Además, estos ligandos N-dadores han encontrado aplicaciones en muchos otros campos tales como los nanomateriales, el reconocimiento aniónico y la química biológica, entre otros.¹³³

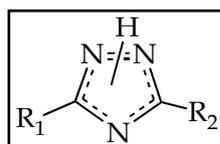
En este contexto, nuestro grupo, con experiencia en la química de los triazoles¹³⁸⁻¹⁴² y en el estudio de la actividad nucleasa de compuestos de Cu(II),^{84,143-145} ha iniciado recientemente el estudio de la rotura del ADN por complejos Cu(II)-triazol. Dos compuestos monoméricos del ligando 5-amino-3-pyridin-2-yl-1,2,4-triazol¹³⁹ y un compuesto dímero del ligando 3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol¹⁴⁰ mostraron actividad nucleasa. En este trabajo se pretende ir más allá y obtener una familia de compuestos de Cu(II) basadas en ligandos triazol que sean eficaces como nucleasas.

Una estrategia usual para conseguir cierto control sobre el comportamiento de coordinación en sistemas “pequeños” ricos en heteroátomos como los 1,2,4-triazoles consiste en introducir *sustituyentes quelantes*.¹³² Aquí se diseñarán y prepararán 1,2,4-triazoles 3-sustituídos y 3,5-disustituídos que presenten átomos dadores (O de carbonilo/carboxilo, O sulfonilo) en posiciones adecuadas para formar anillos quelatos con los átomos de nitrógeno triazólicos. Asimismo, con el fin de favorecer la interacción de los complejos con el ADN, en los sustituyentes del 1,2,4-triazol se incorporarán anillos aromáticos, planares, que posibiliten la intercalación entre las bases del biopolímero.^{84,143,146}

5 OBJETIVOS DE LA TESIS

El objetivo general del presente trabajo es obtener sistemas con actividad nucleasa basados en complejos de Cu(II) con ligandos 1,2,4-triazol. Para ello se sintetizarán una serie de derivados de los precursores 3-amino-1,2,4-triazol y 3,5-diamino-1,2,4-triazol, con sustituyentes aromáticos para facilitar la interacción con el ADN (condición necesaria para la rotura de la cadena). Se elige el Cu(II) debido a su química redox intrínseca^{43,44} y a sus posibilidades de coordinación. En segunda instancia se pretende extraer conclusiones sobre la relación estructura-actividad y sobre las condiciones (i.e. activantes, químicos o de otro tipo) que favorecen/mejoran la acción nucleolítica.

Además, el anillo triazol, por su capacidad de servir de puente entre centros metálicos, propicia la formación de especies *polinucleares* que, por un lado, pueden presentar mayor capacidad nucleasa oxidativa⁴³ y, por otra, resultar de interés por su singularidad estructural o por sus propiedades magnéticas.¹³⁵⁻¹³⁷



Esquema 14. 1,2,4-triazol sustituido en posiciones 3 y 5.

Con esta finalidad se han llevado a cabo las siguientes tareas:

1. Síntesis de derivados acilo y sulfonilo del 3-amino/3,5-diamino-1,2,4-triazol con sustituyentes aromáticos o heteroaromáticos.
2. Síntesis de complejos de Cu (II) con los ligandos sintetizados.
3. Síntesis de sistemas ternarios de Cu(II) con ligandos 1,2,4-triazol y bases aromáticas.
4. Caracterización estructural y espectroscópica de los ligandos sintetizados y de los complejos de Cu(II) obtenidos. Caracterización magnética de las especies polinucleares.
5. Estudio de la forma de interacción de los complejos con el ADN en disolución mediante técnicas de fluorescencia, de desnaturalización térmica del ADN y de viscosimetría.
6. Evaluación de la actividad nucleasa de los complejos con la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Estudio del mecanismo de acción de los complejos con actividad significativa a través de ensayos con distintos agentes inhibidores. Estudio cinético del corte en los sistemas más activos.
7. Estudio de la activación de la capacidad nucleasa mediante la combinación de complejos de Cu(II) con *quantum dots* (QDs) o puntos cuánticos. Determinación del mecanismo de la activación.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- (2) Peretó, J.; Sendra, R.; Pamblanco, M.; Bañó, C. *Fundamentos de Bioquímica*; València, U. de, Ed.; Valencia, 2007.
- (3) Murat, P.; Singh, Y.; Defrancq, E. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5293.
- (4) Waller, Z. A. E.; Sewitz, S. A.; Hsu, S.-T. D.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12628.
- (5) Hsu, S.-T. D.; Varnai, P.; Bugaut, A.; Reszka, A. P.; Neidle, S.; Balasubramanian, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13399.
- (6) Reed, J. E.; Neidle, S.; Vilar, R. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 4366.
- (7) Hannon, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280.
- (8) Nakamoto, K.; Tsuboi, M.; Strahan, G. D. *Drug-DNA interactions structures and spectra*; Wiley, Ed.; New York, 2008.
- (9) Lorente, A.; Fernández, J. *An. Quím.* **2008**, *104*, 280.
- (10) Nguyen, B.; Neidle, S.; Wilson, W. D. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 11.
- (11) Ma, Q.; Akiyama, Y.; Xu, Z.; Konishi, K.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2013.
- (12) Dong, Q.; Stellwagen, E.; Stellwagen, N. C. *Biochemistry* **2009**, *48*, 1047.
- (13) Arya, D. P.; Willis, B. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12398.
- (14) Kim, S. K.; Nordén, B. *FEBS Lett.* **1993**, *315*, 61.
- (15) Boer, D. R.; Canals, A.; Coll, M. *Dalton Trans.* **2009**, 399.
- (16) Lerman, L. S. *J. Mol. Biol.* **1961**, *3*, 18.
- (17) Biver, T.; Secco, F.; Venturini, M. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 1163.
- (18) Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 7345, 4565.
- (19) Larsen, T. A.; Goodsell, D. S.; Cascio, D.; Grzeskowiak, K.; Dickerson, R. E. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **1989**, *7*, 477.
- (20) Harris, A.; Qu, Y.; Farrell, N. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 1196.
- (21) Komeda, S.; Moulaei, T.; Woods, K. K.; Chikuma, M.; Farrell, N. P.; Williams, L. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 16092.
- (22) Lippert, B. *Cisplatin: Chemistry and Biochemistry of a Leading Anti-Cancer Drugs*; Willey-VCH, Ed.; Weinheim, Germany, 1999.
- (23) Reedijk, J. *Chem. Commun.* **1996**, 801.
- (24) Ohndorf, U. M.; Rould, M. A.; He, Q.; Pabo, C. O.; Lippard, S. J. *Nature* **1999**, *399*, 708.
- (25) Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4052.
- (26) Lad, C.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 5607.
- (27) Wolfenden, R.; Ridgway, C.; Young, G. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 833.

- (28) Mildvan, A. S. *Proteins* **1997**, 29, 401.
- (29) Wolfenden, R. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3379.
- (30) Miyoshi, D.; Sugimoto, N. *Biochimie* **2008**, 90, 1040.
- (31) McClarin, J.; Frederick, C.; Wang, B.; Greene, P.; Boyer, H.; Grable, J.; Rosenberg, J. *Science (80-)*. **1986**, 234, 1526.
- (32) Dudev, T.; Lim, C. *Chem. Rev.* **2003**, 103, 773.
- (33) Desai, N. A.; Shankar, V. *FEMS Microbiol. Rev.* **2003**, 26, 457.
- (34) Mitić, N.; Smith, S. J.; Neves, A.; Guddat, L. W.; Gahan, L. R.; Schenk, G. *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3338.
- (35) Viadiu, H.; Aggarwal, A. K. *Nat. Struct. Biol.* **1998**, 5, 910.
- (36) Balaban, N. *Science (80-)*. **1998**, 280, 438.
- (37) Chen, C.-A.; Cowan, J. A. *Chem. Commun. (Camb)*. **2002**, 1, 196.
- (38) Loganathan, R.; Ramakrishnan, S.; Suresh, E.; Palaniandavar, M.; Riyasdeen, A.; Akbarsha, M. A. *Dalton Trans.* **2014**.
- (39) Rajarajeswari, C.; Loganathan, R.; Palaniandavar, M.; Suresh, E.; Riyasdeen, A.; Akbarsha, M. A. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 8347.
- (40) Armitage, B. *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1171.
- (41) Cowan, J. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5, 634.
- (42) Morrow, J. R.; Iranzo, O. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 192.
- (43) Jiang, Q.; Xiao, N.; Shi, P.; Zhu, Y.; Guo, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, 251, 1951.
- (44) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, 48, 5545.
- (45) Zenkova, M. A.; Beloglazova, N. G. *Nucleic Acids and Molecular Biology: Artificial Nucleases*; Springer.; Berlin, 2004; pp. 189-222.
- (46) Desbouis, D.; Troitsky, I. P.; Belousoff, M. J.; Spiccia, L.; Graham, B. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 897.
- (47) Huff, J. W.; Sastry, K. S.; Wacker, W. E. C.; Gordon, M. P. *Biochem.* **1964**, 3, 501.
- (48) Butzow, J. J.; Eichhorn, G. L. *Biopolymers* **1965**, 3, 95.
- (49) Komiyama, M.; Shiiba, T.; Kodama, T.; Takeda, N.; Sumaoka, J.; Yashiro, M. *Chem. Lett.* **1994**, 23, 1025.
- (50) Takasaki, B. K.; Chin, J. J. *Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 1121.
- (51) Hegg, E. L.; Burstyn, J. N. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, 173, 133.
- (52) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 2540.
- (53) Liu, C.; Wang, L. *Dalton Trans.* **2009**, 227.
- (54) Liu, C.; Yu, S.; Li, D.; Liao, Z.; Sun, X.; Xu, H. *Inorg. Chem.* **2002**, 41, 913.
- (55) Deal, K. A.; Hengge, A. C.; Burstyn, J. N. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1713.
- (56) Chen, X.; Fan, J.; Peng, X.; Wang, J.; Sun, S.; Zhang, R.; Wu, T.; Zhang, F.; Liu, J.; Wang, F.; Ma, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 4139.

- (57) An, Y.; Lin, Y.-Y.; Wang, H.; Sun, H.-Z.; Tong, M.-L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *Dalton Trans.* **2007**, 1250.
- (58) Feng, G.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, *45*, 7056.
- (59) Steinreiber, J.; Ward, T. R. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252*, 751.
- (60) Halliwell, B.; Aruoma, O. I. *FEBS Lett.* **1991**, *281*, 9.
- (61) Dix, T. A.; Hess, K. M.; Medina, M. A.; Sullivan, R. W.; Tilly, S. L.; Webb, T. L. *Biochemistry* **1996**, *35*, 4578.
- (62) Richterich, P.; Lakey, N. D.; Lee, H.-M.-; Mao, J.; Smith, D.; Church, G. M. *Nucl. Acids Res.* **1995**, *23*, 4922.
- (63) Yamamoto, K.; Inoue, S.; Yamazaki, A.; Yoshinaga, T.; Kawanishi, S. *Chem. Res. Toxicol.* **1989**, *2*, 234.
- (64) West, J. D.; Marnett, L. J. *Chem. Res. Toxicol.* **2006**, *19*, 173.
- (65) Pitié, M.; Pratviel, G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1018.
- (66) Burger, R. M. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1153.
- (67) Claussen, C. A.; Long, E. C. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2797.
- (68) Neidig, M. L.; Solomon, E. I. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 5843.
- (69) Pogozelski, W. K.; Tullius, T. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089.
- (70) Pratviel, G.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34*, 746.
- (71) Thorp, H. H. *Adv. Inorg. Chem.* **1995**, *43*, 127.
- (72) Li, L.; Murthy, N. N.; Telser, J.; Zakharov, L. N.; Yap, G. P. A.; Rheingold, A. L.; Karlin, K. D.; Rokita, S. E. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 7144.
- (73) Maheswari, P. U.; Roy, S.; den Dulk, H.; Barends, S.; van Wezel, G.; Kozlevcar, B.; Gamez, P.; Reedijk, J. J. *Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 710.
- (74) Ghosh, K.; Kumar, P.; Mohan, V.; Singh, U. P.; Kasiri, S.; Mandal, S. S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3343.
- (75) Jin, Y.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8408.
- (76) Humphreys, K. J.; Karlin, K. D.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6009.
- (77) Jackson, B. A.; Barton, J. K. *Biochemistry* **2000**, *39*, 6176.
- (78) Burrows, C. J.; Muller, J. G. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1109.
- (79) Costas, M.; Mehn, M. P.; Jensen, M. P.; Que, L. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 939.
- (80) Parkin, G. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 699.
- (81) Wu, A. J.; Penner-Hahn, J. E.; Pecoraro, V. L. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 903.
- (82) Crans, D. C.; Smee, J. J.; Gaidamauskas, E.; Yang, L. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 849.
- (83) Mírca, L. M.; Ottenwaelder, X.; Stack, T. D. P. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 1013.
- (84) García-Giménez, J. L.; González-Alvarez, M.; Liu-González, M.; Macías, B.; Borrás, J.; Alzuet, G. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 923.
- (85) Detty, M. R.; Gibson, S. L.; Wagner, S. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3897.

- (86) DeRosa, M. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233-234, 351.
- (87) Dhar, S.; Senapati, D.; Das, P. K.; Chattopadhyay, P.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 12118.
- (88) Patra, A. K.; Dhar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Chem. Commun.* **2003**, 1562.
- (89) Chakravarty, A. R. *J. Chem. Sci.* **2006**, 118, 443.
- (90) Lahiri, D.; Bhowmick, T.; Pathak, B.; Shameema, O.; Patra, A. K.; Ramakumar, S.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chem.* **2009**, 48, 339.
- (91) Gao, J.; Gu, H.; Xu, B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 1097.
- (92) Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 47, 7602.
- (93) Doane, T. L.; Burda, C. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 2885.
- (94) Bonomi, R.; Selvestrel, F.; Lombardo, V.; Sissi, C.; Polizzi, S.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 15744.
- (95) Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.* **1994**, 27, 295.
- (96) Pyle, A. M.; Barton, J. K.; Lippard, S. J. *Progress in Inorganic Chemistry*; Wiley, Ed.; New York, 1990; p. 413.
- (97) Demeunynck, M. C.; Bailly, W. D. *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes*; Wiley-VCH, Ed.; Weinheim, Germany, 2002.
- (98) Richards, A. D.; Rodger, A. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 471.
- (99) Wilson, W.; Tanius, F.; Fernández-Saiz, M.; Rigl, C. *Drug-DNA Interaction Protocols*; Fox, K. R., Ed.; Human Press: Totowa, NJ, 1997; pp. 219-240.
- (100) Diagrama de Jablonski www.olympusmicro.com/primer.
- (101) Baguley, B. C.; Le Bret, M. *Biochemistry* **1984**, 23, 937.
- (102) Lakowicz, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, 12, 4161.
- (103) Douthart, R. J.; Burnett, J. P.; Beasley, F. W.; Frank, B. H. *Biochemistry* **1973**, 12, 214.
- (104) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 246, 501.
- (105) Frederick, C. A.; Williams, L. D.; Ughetto, G.; Van der Marel, G. A.; Van Boom, J. H.; Rich, A.; Wang, A. H. J. *Biochemistry* **1990**, 29, 2538.
- (106) Zhou, C.-Y.; Xi, X.-L.; Yang, P. *Biochem.* **2007**, 72, 37.
- (107) Morgan, A. R.; Lee, J. S.; Pulleyblank, D. E.; Murray, N. L.; Evans, D. H. *Nucleic Acids Res.* **1979**, 7, 547.
- (108) Jenkins, T. C.; Parrick, J.; Porssa, M. *Anti-Cancer Drug Des.* **1994**, 9, 477.
- (109) Strothkamp, K. G.; Strothkamp, R. E. *J. Chem. Educ.* **1994**, 71, 77.
- (110) Stern, O.; Volmer, M. Z. *Phys.* **1919**, 20, 183.
- (111) Saenger, W. in *Principles of Nucleic Acid Structure*; Canton, C. R., Ed.; Springer-V.; New York, 1984; p. Chapter 6.
- (112) Takahara, P. M.; Rosenzweig, A. C.; Frederick, C. A.; Lippard, S. J. *Nature* **1995**, 377, 649.
- (113) Crothers, D. M. *Biopolymers* **1971**, 10, 2147.

- (114) Liu, J.; Zhang, H.; Chen, C.; Deng, H.; Lu, T.; Ji, L. *Dalt. Trans.* **2003**, 114.
- (115) Dalton, S. R.; Glazier, S.; Leung, B.; Win, S.; Megatuluski, C.; Burgmayer, S. *J. N. J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1133.
- (116) Coury, J. E.; McFail-Isom, L.; Williams, L. D.; Bottomley, L. A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, *93*, 12283.
- (117) Coury, J. E.; Anderson, J. R.; McFail-Isom, L.; Williams, L. D.; Bottomley, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 3792.
- (118) García-Segura, J. M.; Gavilanes, J. G.; Pozo, A. M. del; Montero, F.; Oñaderra, M.; Vivanco, F. *Técnicas instrumentales de análisis en Bioquímica*; Ed. Síntes.; Madrid, 1996.
- (119) Gómez-Segura, J.; Prieto, M. J.; Font-Bardia, M.; Solans, X.; Moreno, V. *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 10031.
- (120) Sheng, X.; Lu, X.-M.; Chen, Y.-T.; Lu, G.-Y.; Zhang, J.-J.; Shao, Y.; Liu, F.; Xu, Q. *Chemistry* **2007**, *13*, 9703.
- (121) Vaal, J. M.; Mechant, K.; Rill, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 3383.
- (122) Wang, J.-T.; Xia, Q.; Zheng, X.-H.; Chen, H.-Y.; Chao, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 2128.
- (123) He, J.; Hu, P.; Wang, Y.-J.; Tong, M.-L.; Sun, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. *Dalton Trans.* **2008**, 3207.
- (124) Joyner, J. C.; Reichfield, J.; Cowan, J. a. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15613.
- (125) Guillon, R.; Pagniez, F.; Picot, C.; Hédou, D.; Tonnerre, A.; Chosson, E.; Duflos, M.; Besson, T.; Logé, C.; Le Pape, P. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 288.
- (126) Tatsumi, Y.; Nagashima, M.; Shibanushi, T.; Iwata, A.; Kangawa, Y.; Inui, F.; Siu, W. J. J.; Pillai, R.; Nishiyama, Y. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 2405.
- (127) Tamura, K.; Kumagai, N.; Shibasaki, M. *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 3272.
- (128) Barton, D.; Ollis, W. D. *Comprehensive Organic Chemistry*; Pergamon P.; Oxford, U.K., 1979; p. vol. 4.
- (129) Suresh Kumar, G. V.; Rajendraprasad, Y.; Mallikarjuna, B. P.; Chandrashekar, S. M.; Kistayya, C. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 2063.
- (130) Padmavathi, V.; Sudhakar Reddy, G.; Padmaja, A.; Kondaiah, P.; Ali-Shazia. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 2106.
- (131) Haasnoot, J. G. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 131.
- (132) Beckmann, U.; Brooker, S. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 17.
- (133) Aromí, G.; Barrios, L. A.; Roubeau, O.; Gamez, P. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 485.
- (134) Real, J. A.; Gaspar, A. B.; Niel, V.; Muñoz, M. C. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 121.
- (135) Kitchen, J. A.; White, N. G.; Boyd, M.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Boyd, P. D. W.; Brooker, S. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 6670.
- (136) Levchenko, G.; Bukin, G. V.; Terekhov, S. A.; Gaspar, A. B.; Martínez, V.; Muñoz, M. C.; Real, J. A. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8176.

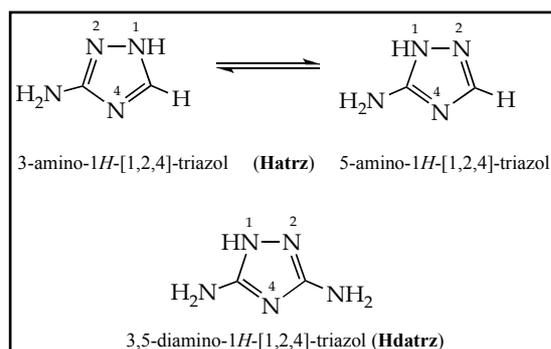
- (137) Davesne, V.; Gruber, M.; Miyamachi, T.; Da Costa, V.; Boukari, S.; Scheurer, F.; Joly, L.; Ohresser, P.; Otero, E.; Choueikani, F.; Gaspar, A. B.; Real, J. A.; Wulfhekel, W.; Bowen, M.; Beaurepaire, E. *J. Chem. Phys.* **2013**, *139*, 074708.
- (138) Ferrer, S.; Lloret, F.; Bertomeu, I.; Alzuet, G.; Borrás, J.; García-Granda, S.; Liu-González, M.; Haasnoot, J. G. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5821.
- (139) Ferrer, S.; Ballesteros, R.; Sambartolomé, A.; González, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Liu, M. J. *Inorg. Biochem.* **2004**, *98*, 1436.
- (140) Aznar, E. *Proyecto fin de Carrera*; Burjassot (Valencia), Spain, 2005.
- (141) Ferrer, S.; Aznar, E.; Lloret, F.; Castiñeiras, A.; Liu-González, M.; Borrás, J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 372.
- (142) Ferrer, S.; Lloret, F.; Pardo, E.; Clemente-Juan, J. M.; Liu-González, M.; García-Granda, S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 985.
- (143) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Castiñeiras, A.; Liu-Gonzalez, M.; Borrás, J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7178.
- (144) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; González-Alvarez, M.; Liu-González, M.; Castiñeiras, A.; Borrás, J. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 243.
- (145) González-Álvarez, M.; Pascual-Álvarez, A.; del Castillo Agudo, L.; Castiñeiras, A.; Liu-González, M.; Borrás, J.; Alzuet-Piña, G. *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 10244.
- (146) Silva, P. P.; Guerra, W.; Dos Santos, G. C.; Fernandes, N. G.; Silveira, J. N.; da Costa Ferreira, A. M.; Bortolotto, T.; Terenzi, H.; Bortoluzzi, A. J.; Neves, A.; Pereira-Maia, E. C. *J. Inorg. Biochem.* **2014**, *132*, 67.

CAPÍTULO I
NUEVOS LIGANDOS TRIAZOL

I.A INTRODUCCIÓN

I.A.1 Objetivos

El objetivo general de este Capítulo es sintetizar una familia de derivados del 3-amino/3,5-diamino-1,2,4-triazol (Hatrz/Hdatrz; esquema I.1) con sustituyentes sulfonilo o acilo en posiciones 3 y/ó 5, que, además, contengan anillos aromáticos para favorecer la intercalación (a través de interacciones de apilamiento π - π) con las bases nitrogenadas del ADN.¹⁻³



Esquema I.1. Estructura del 5-amino-triazol (Hatrz) y del 3,5-diamino-triazol (Hdatrz).

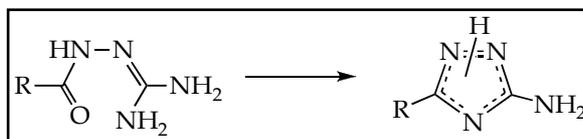
I.A.2 Estrategias de síntesis

La bibliografía recoge dos procedimientos generales: (a) ciclocondensación de amidoguanidinas,⁴ y (b) síntesis en un paso a partir del amino-triazol/diamino-triazol con el cloruro de sulfonilo o de acilo correspondiente.^{5,6} Se ha descrito también un procedimiento alternativo: (c) síntesis solvotermal a partir de organonitrilos en presencia de cobre.⁷

I.A.2.1 Ciclocondensación de amidoguanidinas

El esquema I.2 visualiza en qué consiste la síntesis. Este método tiene la limitación de que requiere la síntesis previa de la amidoguanidina pertinente. Además, el uso de altas temperaturas, así como el requerimiento de una base fuerte, complican el desarrollo de la síntesis y conducen frecuentemente a rendimientos bajos.

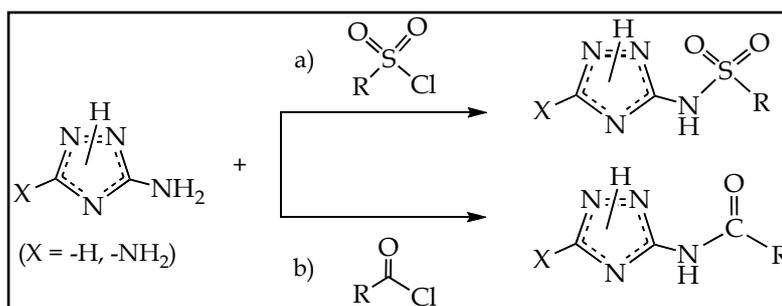
Dolzhenko y col. han descrito recientemente una variante que, partiendo de (hetero)arilamidoguanidinas, permite la obtención de 3(5)-amino-5(3)-(hetero)aril-1,2,4-triazoles de forma pura, cuantitativa y sin requerimiento de base o catalizador.⁴



Esquema I.2. Ciclocondensación de amidoguanidinas para dar 1,2,4-triazoles.

I.A.2.2 Síntesis, en un paso, a partir del amino-triazol/diamino-triazol por tratamiento con el cloruro de sulfonilo o de acilo correspondiente

Este procedimiento, descrito originalmente por Van den Bos,⁸ se basa en hacer reaccionar el amino-triazol o diamino-triazol con el cloruro de acilo correspondiente (esquema I.3b). Se trata de un método sencillo, pero conduce frecuentemente a la formación de mezclas de productos mono, di e incluso triacilados.

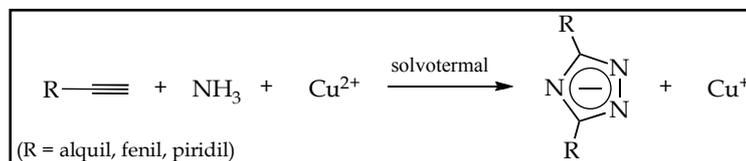


Esquema I.3. Esquema teórico de la síntesis de los ligandos.

Borrás y col.⁹ han empleado un procedimiento análogo para la obtención de derivados sulfonamida a partir de cloruros de sulfonilo (esquema I.3a). La reacción con triazoles presenta el problema de que la sulfonilación puede producirse, *a priori*, tanto sobre un nitrógeno del triazol como sobre el grupo amino exocíclico (ver más adelante).

I.A.2.3 Síntesis solvotermal a partir de organonitrilos

Con un enfoque completamente distinto, Chen y col. han desarrollado una síntesis solvotermal en un sólo paso capaz de formar 1,2,4-triazoles disustituídos en posiciones 3 y 5 a partir de derivados organonitrilos (alquil, fenil o piridil), amoníaco y sales de Cu(II) (esquema I.4).⁷

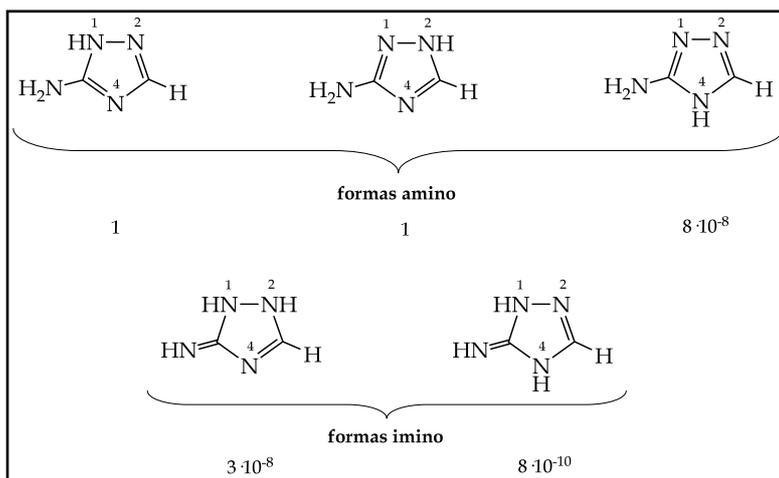


Esquema I.4. Formación de 1,2,4-triazoles 3,5-disustituídos por reacción solvotermal.

Este procedimiento ha permitido a los autores obtener diferentes polímeros de coordinación con topologías de red bi y tridimensionales.

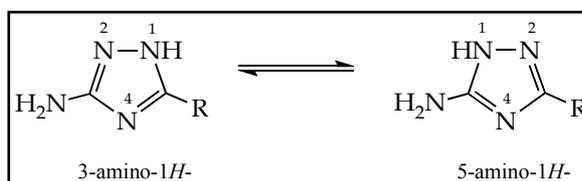
I.A.3 Tautomería

Los amino-triazoles son sistemas heterocíclicos con tautomería tanto anular como amino-imino (esquema I.5).¹⁰ Para el 3-amino-1,2,4-triazol (Hatz), diversos estudios semiempíricos demuestran que, entre todas las formas posibles, los tautómeros 3-amino-1*H*-[1,2,4]triazol y 5-amino-1*H*-[1,2,4]triazol son los más estables y uniformemente distribuidos (esquema I.1). Las otras formas resultan más improbables y, por tanto, es difícil que se presenten. El tautómero 5-amino-1*H* debe ser el dominante debido a su mayor momento bipolar.¹¹ Estos estudios están de acuerdo con el trabajo de Lopyrev y col. en el que se confirma, mediante difracción de rayos-X, que el cristal de Hatz está formado por el tautómero 5-amino-1*H*.¹²



Esquema I.5. Posibles tautómeros del Hantzsch (probabilidad relativa según cálculos teóricos).¹²

En el caso de derivados amino-triazol disustituidos en posiciones 3 y 5 (esquema I.6), la influencia de las propiedades electrónicas de los sustituyentes afecta al equilibrio entre las formas 3-amino y 5-amino. A modo general, se puede concluir que para derivados 3,5-disustituidos no simétricos la forma más estable es aquella en la cual el grupo electrón aceptor se encuentra sustituido en posición 3 y el grupo electrón dador en posición 5. Sin embargo, se ha publicado un cristal del compuesto 3-amino-5-fenil-1,2,4-triazol que contiene simultáneamente los dos tautómeros 3-amino-1H y 5-amino-1H.⁴ Por último cabe indicar que la coordinación a centros metálicos a través de N1 y N2 puede estabilizar el tautómero 4H.¹³

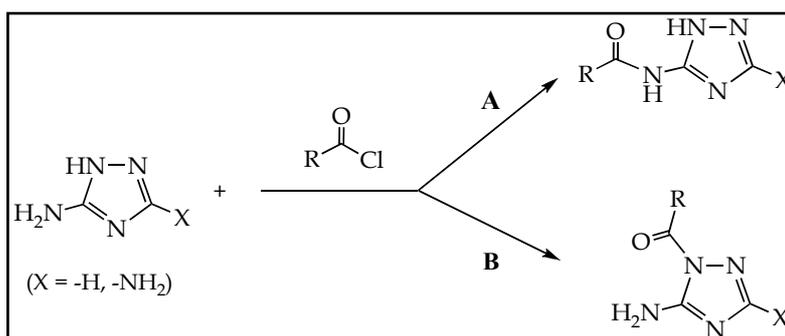


Esquema I.6. Posible tautomería para los derivados disustituidos del 3-amino-5(R)-1,2,4-triazol.

En las síntesis orgánicas la tautomería es un factor muy importante a tener en cuenta ya que, frecuentemente, el tautómero menos abundante es el más reactivo y, por ello, no es inusual la obtención de productos finales en forma de mezcla.¹⁴

I.A.4 Antecedentes

Los dos reactivos de partida del presente trabajo, el 5-amino-triazol (Hatz) y su homólogo 3,5-diamino-triazol (Hdatrz) (esquema I.1), además de la tautomería mencionada, presentan varias posiciones susceptibles de acilación y/o sulfonilación: el(los) grupo(s) NH_2 exocíclico(s) y los dos átomos de nitrógeno anulares $N1$ y $N2$. El nitrógeno $N4$ ofrece una resistencia significativa a ser acilado o sulfonado.¹⁵ Por ello, y como se ha mencionado anteriormente, la acilación/sulfonación de 3,5-diamino-1,2,4-triazoles no sustituidos puede conducir frecuentemente a la formación de mezclas (esquema I.7).



Esquema I.7. Estructuras isoméricas de los dos derivados monoacilados, **A** y **B**, del 3-amino-1,2,4-triazol.¹⁶

Así por ejemplo, Rzeszotarka y col. han estudiado ampliamente la acilación con cloruros de acilo de 3-amino-1,2,4-triazoles sustituidos en posición 5 con la posibilidad de dar lugar tanto al producto 3-acetilamino (**A**) como el isómero acilado en el anillo (**B**) (esquema I.7).¹⁶ La elucidación estructural de los compuestos obtenidos en estas reacciones de acilación se realizó utilizando técnicas de HPLC, GC-MS y espectroscopía ^1H NMR y FT-IR. Concluyeron que los procedimientos de monoacetilación anular convencional con cloruro de acetilo no son regioselectivos y que producen una mezcla de isómeros. Además, la diacetilación tradicional alternativa con anhídrido acético bajo reflujo originó una mezcla de derivados mono- y tri-acetilados.¹⁶

En el mismo sentido, Chernyshev y col. han mostrado mediante espectros ^1H NMR e IR que, dependiendo de las condiciones de reacción, la acilación del 3,5-diamino-triazol puede conducir tanto a la acilación del anillo en N1 como a la de los grupos amino NH_2 exocíclicos.⁶ El mismo autor indica que durante los intentos de obtención de los derivados *diacilo* se obtuvieron mezclas de productos. Este resultado podría explicarse suponiendo la formación de especies intermedias lábiles con posterior migración de grupos acilo de una posición a otra.⁶

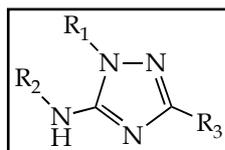
Pese a estas limitaciones, nuestro grupo de investigación ha conseguido obtener de forma pura varios derivados acilamino-1,2,4-triazol (3-acetilamino-1,2,4-triazol; 3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol y 3-acetilamino-5-amino-1,2,4-triazol) por tratamiento con cloruro de acilo a través de condiciones muy controladas.^{8,17-19} Por esta razón, se ha escogido esta metodología para la síntesis de los ligandos de la presente *Tesis Doctoral*. El procedimiento ha resultado exitoso cuando R (esquema I.7) es un grupo fenilo o naftilo; sin embargo, cuando R = piridilo se obtienen los ligandos protonados. Para soslayar este efecto indeseado hemos introducido aquí la siguiente variante de síntesis o procedimiento (d): reacción directa del éster de arilo con el diamino-triazol en ausencia de disolvente en un horno de bolas. Así se obtuvieron los ligandos **H₂V** y **H₃diV** (ver más adelante).

En la siguiente sección se describe la síntesis y caracterización de los ocho ligandos que se encuentran enumerados en la tabla I.1. Los ligandos sintetizados se han organizado con fines descriptivos en dos grupos: derivados **sulfonilo** y derivados **acilo**.

Dado el problema de isomería y mezclas que plantean estos sistemas y a que, según nuestra propia experiencia, la caracterización espectroscópica no es inequívoca, sólo se incluyen aquí, de entre los ligandos preparados, aquéllos que han podido obtenerse puros y que han podido caracterizarse por difracción de rayos-X de monocristal [bien del ligando, o bien de un compuesto de ese ligando con Cu(II)].*

*Una excepción la constituye el ligando **H₂O** (Hanatz), que no ha permitido obtener cristales de tamaño adecuado, y que se ha caracterizado por comparación con los datos del ligando **H₃diO** (Hdnctz).

Tabla I.1. Ligandos sintetizados.



Derivados sulfonilo	R ₁	R ₂	R ₃
anstrz (N)		-H	-H
danstrz (M)		-H	-NH ₂

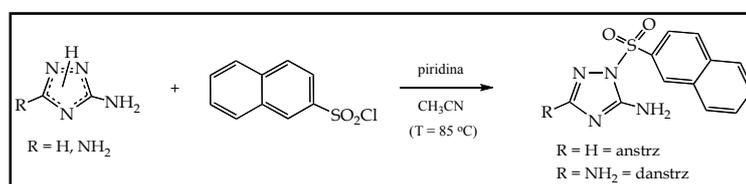
Derivados acilo	R ₁	R ₂	R ₃
Hbattrz (H ₂ P)	-H		-H
Hanattrz (H ₂ O)	-H		-NH ₂
Hdbtrz (H ₃ diQ)	-H		
Hdnctrz (H ₃ diO)	-H		
Hapitrz (H ₂ V)	-H		-NH ₂
Hdpitrz (H ₃ diV)	-H		

I.B SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS NUEVOS LIGANDOS TRIAZOL

I.B.1 Síntesis general

I.B.1.1 Ligandos sulfonilo: N y M

Los ligandos 5-amino-*N*1-(naftalen-3-sulfonil)-1,2,4-triazol (anstrz, **N**) y 3,5-diamino-*N*1-(naftalen-3-sulfonil)-1,2,4-triazol (danstrz, **M**) se prepararon según el procedimiento estándar de obtención de sulfonamidas (esquema I.3a).⁹ Sin embargo, en las condiciones que se describen a continuación, la sulfonilación se produjo sobre el nitrógeno *N*1 del anillo triazol y no sobre el grupo amino exocíclico. Por tanto, la reacción de la síntesis es la que se indica en el esquema siguiente (Esquema I.8):



Esquema I.8. Esquema experimental de la síntesis de los ligandos sulfonilo.

A continuación se detalla de forma conjunta la síntesis de ambos ligandos:

Se suspendió 5-amino-1,2,4-triazol (60 mmol, 5,04 g) (para **N**) o 3,5-diamino-1,2,4-triazol (60 mmol, 5,95 g) (para **M**) en 100 mL de acetonitrilo seco. Se adicionó piridina (60 mmol, 4,85 mL, $\rho=0,978$ g/mL) y seguidamente se añadió cloruro de 2-naftalensulfonilo (60 mmol, 13,5 g) poco a poco durante 20 minutos manteniendo la temperatura a 55 °C. Una vez concluida la adición, la mezcla se calentó durante 16 horas a 85 °C.

Posteriormente, se enfrió la mezcla durante 1 hora en un baño de hielo y el sólido obtenido, de color blanco (**N**) o amarillo (**M**), se filtró y se lavó con agua y cloroformo frío en ambos casos. Ambos productos son estables a la luz y al aire.

En el caso del ligando **N** se obtuvieron 14,2 g (86 % rendimiento); en el del ligando **M** 12,2 g (70 % rendimiento).

I.B.1.2 Ligandos acilo (monoacilo y diacilo): H₂P, H₂O, H₂V, H₃diQ, H₃diO y H₃diV

Para la síntesis de los derivados acilo se siguieron dos procedimientos:

- (A) Reacción directa del precursor triazol con el cloruro de acilo correspondiente en acetonitrilo y piridina (esquema I.9).
- (B) Reacción directa del precursor triazol con el picolinato de etilo en ausencia de disolvente (esquema I.10).

Los ligandos obtenidos por el método **A** fueron:

- 3-bencilamino-1,2,4-triazol (Hbatrz, **H₂P**).
- 3-amino-5-naftalencarbonilamino-1,2,4-triazol (Hanatz, **H₂O**).
- 3,5-di(bencilamino)-1,2,4-triazol (Hdbtrz, **H₃diQ**).
- 3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol (Hdnctrz, **H₃diO**).

Los ligandos obtenidos por el método **B** fueron:

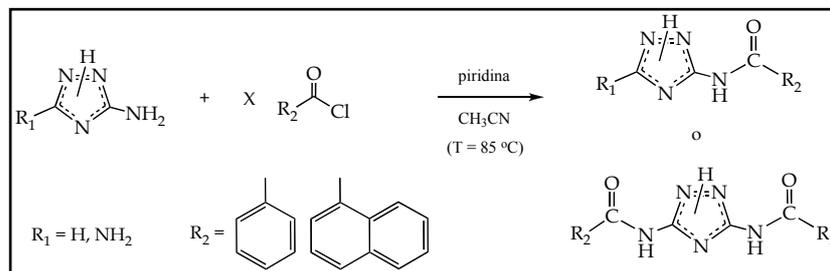
- 5-amino-3-picolinamido-1,2,4-triazol (Hapitrz, **H₂V**).
- 3,5-bis(picolinamido)-1,2,4-triazol (Hdpitrz, **H₃diV**).

Cabe destacar que, en contraste con la síntesis de los ligandos sulfonilo (apartado I.B.1.1), todas las reacciones de acilación se produjeron sobre el grupo exocíclico -NH₂.

Los ligandos preparados en este apartado se han agrupado en función del método de síntesis empleado.

I.B.1.2.1 Reacción directa del precursor triazol con el cloruro de acilo correspondiente en acetonitrilo y piridina

El esquema de la síntesis es el siguiente:



Esquema I.9. Esquema experimental de la síntesis de ligandos acilo según procedimiento A.

(i) Síntesis de los derivados H_2P y H_2O

Se suspendió 5-amino-1,2,4-triazol (120 mmol, 10,0 g) (para H_2P) o 3,5-diamino-1,2,4-triazol (60,6 mmol, 6,0 g) (para H_2O) en 200 mL de acetonitrilo seco. Se adicionó piridina (180 mmol, 14,5 mL, $\rho=0,978$ g/mL) (H_2P) o (62 mmol, 5 mL, $\rho=0,978$ g/mL) (H_2O). Seguidamente se añadió cloruro de benzoilo (130 mmol, 15 mL, $\rho = 1,119$ g/mL) (H_2P) o cloruro de naftoilo (60,6 mmol, 11,55 g, $\rho=1,211$ g/mL) (H_2O), poco a poco durante 20 minutos manteniendo la temperatura a 55 °C. Una vez concluida la adición, la mezcla se calentó durante 18 horas a 85 °C.

Posteriormente, se enfrió la mezcla durante 1 hora en un baño de hielo y el sólido obtenido, de color blanco en el caso de H_2P y amarillo caso de H_2O , se filtró y se lavó sucesivamente con agua, etanol y cloroformo frío. Los sólidos son estables a la luz y al aire. En el caso del ligando H_2P se obtuvieron 19,1 g (85 % rendimiento); en el del ligando H_2O 9,5 g (62 % rendimiento).

Cabe reseñar que no se ha podido aislar el ligando monoacilado 3-amino-5-bencilamino-1,2,4-triazol (H_2Q) puro; siempre se obtuvieron mezclas de derivado monoacilado y diacilado. Por este motivo este ligando no se estudia en este trabajo.

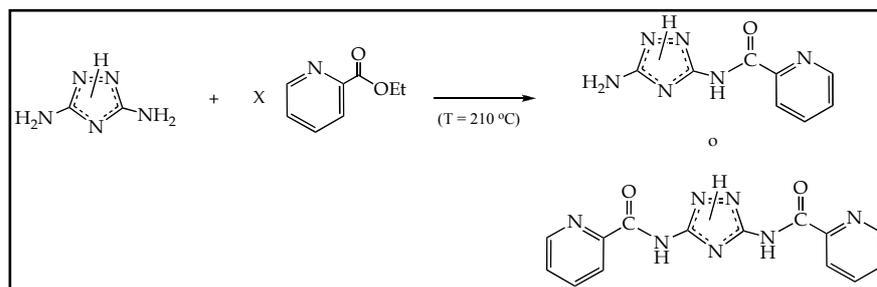
(ii) Síntesis de los derivados H_3diQ y H_3diO

Se suspendió 3,5-diamino-1,2,4-triazol (5,1 mmol, 0,5 g) en 75 mL de acetonitrilo seco (para H_3diQ) / 3,5-diamino-1,2,4-triazol (40,4 mmol, 4,0 g) en 300 mL de acetonitrilo seco (para H_3diO). Se adicionó piridina (10,2 mmol, 0,8 mL, $\rho=0,978$ g/mL) (H_3diQ) o (84,8 mmol, 7,0 mL, $\rho=0,978$ g/mL) (H_3diO). Seguidamente se añadió cloruro de benzoilo (10,1 mmol, 1,2 mL, $\rho = 1,119$ g/mL) (H_3diQ) o cloruro de naftoilo (84,8 mmol, 16,2 g, $\rho=1,211$ g/mL) (H_3diO) poco a poco durante 20 minutos manteniendo la temperatura a 55 °C. Una vez concluida la adición, la mezcla se calentó durante 18 horas a 85 °C.

Posteriormente, se enfrió la mezcla durante 1 hora en un baño de hielo y el sólido obtenido, de color blanco en el caso de H_3diQ y amarillo caso H_3diO , se filtró y se lavó con agua, etanol y cloroformo frío. Los sólidos son estables a la luz y al aire. En el caso del ligando H_3diQ se obtuvieron 0,7 g (46 % rendimiento); en el del ligando H_3diO 13,5 g (82 % rendimiento).

I.B.1.2.2 Reacción directa con el picolinato de etilo en ausencia de disolvente

El esquema de la síntesis es el siguiente:



Esquema I.10. Esquema experimental de la síntesis de ligandos acilo según procedimiento B.

(i) Síntesis del derivado H_2V

Se mezcló (suspendió) 3,5-diamino-1,2,4-triazol (41,4 mmol, 4,10 g) con 2-picolinato de etilo (46,3 mmol, 6,3 mL, $\rho = 1,12$ g/mL) en un balón de reacción. Éste se acopló a un horno de bolas y la mezcla se calentó de forma progresiva hasta llegar a 210 °C. Una vez alcanzada

dicha temperatura, se observó la fusión del 3,5-diamino-1,2,4-triazol ($T_{\text{fus}} = 202\text{-}205\text{ }^{\circ}\text{C}$), y la subsecuente obtención de una mezcla líquida de color amarillo claro.

Se mantuvo constante la temperatura durante 60 minutos. Transcurrido ese tiempo, se formó un sólido de color amarillo en el horno de bolas. Seguidamente, se conectó el vacío y se aumentó la temperatura hasta $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos, eliminándose así el exceso de 2-picolinato de etilo por evaporación.

A continuación, se enfrió la mezcla y el sólido obtenido, de color amarillo claro, se recogió y se lavó con etanol y acetona fría. El sólido es estable a la luz y el aire (7,3 g obtenidos, 86 % de rendimiento).

50 mg del ligando se recrystalizaron con *ca.* 40 mL de metanol hirviendo. Tras 1 día aparecieron cristales válidos para difracción de rayo-X, cuya estructura corresponde al 5-amino-3-picolinamido-1,2,4-triazol (**H₂V**).

(ii) Síntesis del derivado H₃diV

Se mezcló (suspendió) 3,5-diamino-1,2,4-triazol (10,1 mmol, 1,0 g) con 2-picolinato de etilo (50,5 mmol, 6,8 mL, $\rho = 1,12\text{ g/mL}$) en un balón de reacción. Éste se acopló a un horno de bolas y la mezcla se calentó lentamente hasta llegar a $210\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez alcanzada dicha temperatura, se observó la fusión del 3,5-diamino-1,2,4-triazol ($T_{\text{fus}} = 202\text{-}205\text{ }^{\circ}\text{C}$), y la subsecuente obtención de una mezcla líquida de color amarillo oscuro.

Se mantuvo constante la temperatura durante 4 horas (no se observó la aparición de ningún sólido). La mezcla se fue oscureciendo progresivamente hasta adquirir una coloración marrón oscura (casi negra). Seguidamente, se conectó el vacío y se aumentó la temperatura hasta $220\text{ }^{\circ}\text{C}$. La mezcla líquida se mantuvo a esta temperatura durante 60 minutos, eliminándose así la mayor parte del exceso de 2-picolinato de etilo por evaporación.

Con el enfriamiento de la mezcla se produjo la progresiva solidificación de la misma. Para conseguir la completa eliminación del

exceso de 2-picolinato de etilo, al sólido recogido se le adicionó 50 mL de acetato de etilo y la suspensión se mantuvo en agitación durante 30 minutos a T= 50 °C en un balón de reacción. Tras filtración se obtuvo como producto final un sólido de color marrón oscuro, identificado como ligando 3,5-bis(picolinamido)-1,2,4-triazol (**H₃diV**). El sólido es estable a la luz y el aire (1,6 g obtenidos, 51 % de rendimiento).

50 mg del sólido marrón se disolvieron en aproximadamente 25 mL de metanol hirviendo. Tras 1 día aparecieron agujas cristalinas, pero de tamaño insuficiente para permitir el estudio de difracción de rayo-X de monocristal.

I.B.2 Caracterización general

I.B.2.1 Tablas resumen

La caracterización de los ligandos sulfonilo y acilo se realizó mediante Análisis Elemental (N, C, H y S), resonancia magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , espectroscopia IR, espectrometría de masas utilizando la técnica de bombardeo con átomos rápidos en modo positivo (FAB⁺-MS), y ensayos de solubilidad en agua, metanol, etanol, DMFA y DMSO (ver detalles de las técnicas en la sección experimental de este Capítulo).

La discusión sobre los espectros IR se incluye en el apartado I.B.2.2.

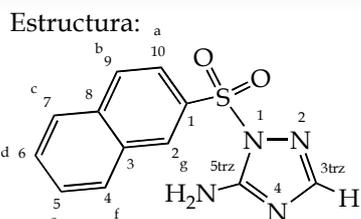
En los espectros de FAB⁺-MS se utilizó como disolvente metanol o DMSO, según la solubilidad. La especie [L-H]⁺ se observó para todos los ligandos como pico molecular.

En general, los ligandos sintetizados son insolubles en agua pero parcialmente solubles en etanol o metanol, a excepción de los ligandos con grupo naftaleno, que sólo son solubles en DMFA o DMSO. La introducción del grupo piridina en lugar del fenilo o naftilo mejoró la solubilidad del ligando resultante.

El ligando **H₂V** pudo ser caracterizado mediante difracción de rayos-X de monocristal (ver apartado I.B.3).

Las tablas siguientes resumen los datos de caracterización de cada uno de los ligandos sintetizados.

5-amino-N1-(naftalen-3-ilsulfonil)-1,2,4-triazol (N)



Aspecto: sólido blanco

Fórmula empírica: $C_{12}H_{10}N_4SO_2$

Rendimiento síntesis: 86 %

Análisis Elemental Calculado para $C_{12}H_{10}N_4SO_2$ (274,30): N: 20,43; C: 52,54; S: 11,69; H: 3,67. Encontrado: N: 20,07; C: 52,60; S: 11,59; H: 3,84

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): [$\nu(N-H) + \nu(arC-H)$] 3465 m, 3302 w, 3227 w, 3112 m; [$\delta(N-H) + \nu(C=N)_{\text{anillo}} + \nu(C=C)_{\text{anillo}}$] 1693 sh, 1651 vs, 1571 m, 1521 s; [$\nu(SO_2)_{\text{asym}}$] 1383 s; [$\nu(SO_2)_{\text{sym}}$] 1179 vs

Espectro de masas, modo FAB⁺ (metanol) (m/z): 275 [M + H]⁺

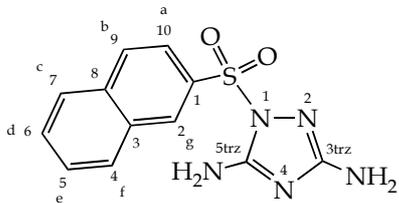
RMN ¹H (300 MHz) (dms_o-d₆, δ /ppm): 8,8 (s, 1H, H-g); 8,3 (d, 1H, J = 7,9 Hz, naft); 8,2 (d, 1H, J = 8,8 Hz, naft); 8,1 (d, 1H, J = 8,0 Hz, naft); 7,9 (dd, 1H, J = 6,8 y 2,0 Hz, naft); 7,8-7,7 (m, 2H, naft); 7,6 (s, 1H, H-3trz); 7,4 (s, 2H, NH₂)

RMN ¹³C (75 MHz) (dms_o-d₆, δ /ppm): 152,6 (1C, C-5trz); 135,1-133,1-131,3-130,1-130,1-129,6-129,6-128,1-127,9-121,5 (10C, naft). Carbono C-3trz no observado

Solubilidad: agua (baja); etanol (baja); metanol (baja); DMF (soluble); DMSO (soluble)

3,5-diamino-N1-(naftalen-3-ilsulfonil)-1,2,4-triazol (M)

Estructura:



Aspecto: sólido amarillo

Fórmula empírica: C₁₂H₁₁N₅SO₂

Rendimiento síntesis: 70 %

Análisis Elemental Calculado para C₁₂H₁₁N₅SO₂ (289,31): N: 24,21; C: 49,82; S: 11,08; H: 3,83. Encontrado: N: 24,10; C: 49,92; S: 11,14; H: 3,81

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν (N-H) + ν (arC-H)] 3472 m, 3376 m, 3339 sh, 3180 m; [δ (N-H) + ν (C=N)_{anillo} + ν (C=C)_{anillo}] 1632 vs, 1571 s, 1452 s; [ν (SO₂)_{asym}] 1368 s; [ν (SO₂)_{sym}] 1187-1164 d-s

Espectro de masas, modo FAB⁺ (DMSO) (m/z): 290 [M + H]⁺

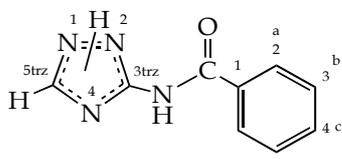
RMN ¹H (300 MHz) (dmsó-d₆, δ /ppm): 8,6 (s, 1H, H-g); 8,2 (d, 1H, J = 7,9 Hz, naft); 8,2 (d, 1H, J = 8,9 Hz, naft); 8,1 (d, 1H, J = 7,9 Hz, naft); 7,8-7,7 (m, 3H, naft); 7,2 (s, 2H, NH₂); 5,7 (s, 2H, NH₂)

RMN ¹³C (300 MHz) (dmsó-d₆, δ /ppm): 163,5 (1C, C-5trz); 134,9 (1C, C-3trz); 133,3-133,1-129,7-129,7-129,6-129,4-129,3-128,0-127,9-121,8 (10C, naft)

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (insoluble); metanol (insoluble); DMF (soluble); DMSO (soluble)

3-bencilamino-1,2,4-triazol (H₂P)

Estructura:



Aspecto: sólido blanco

Fórmula empírica: C₉H₈N₄O

Rendimiento síntesis: 85 %

Análisis Elemental Calculado para C₉H₈N₄O (188,19): N: 29,77; C: 57,44; H: 4,28. Encontrado: N: 29,90; C: 57,40; H: 4,38

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν (N-H) + ν (arC-H)] 3472-3430 b-m, 3273 s; [ν (C=O)] 1662 s; [δ (N-H) + ν (C=N)_{anillo} + ν (C=C)_{anillo}] 1598 s, 1554 m, 1486 m

Espectro de masas, modo FAB⁺ (metanol) (m/z): 189 [M + H]⁺

RMN ¹H (300 MHz) (dmsó-d₆, δ /ppm): 13,6 (bs, 1H, NH-triazol); 11,9 (bs, 1H, NH-amida); 8,0 (d, 2H, J = 6,9 Hz, H-a fenilo); 7,9 (bs, 1H, H-5trz); 7,6 (m, 1H, H-c fenilo); 7,5 (m, 1H, H-b fenilo)

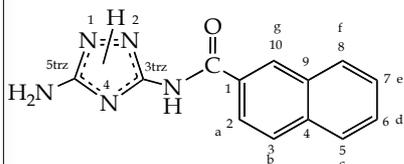
RMN ¹³C (300 MHz) (dmsó-d₆, δ /ppm):* 165,4 (1C, C-carbonilo); 132,3 (1C, C-4 fenilo); 128,4 (1C, C-2 fenilo); 128,0 (1C, C-3 fenilo). Carbonos C-1 fenilo, C-3 triazol y C-5 triazol no observados

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (soluble en caliente); metanol (soluble en caliente); DMF (soluble); DMSO (soluble)

* Los espectros RMN de ¹H y ¹³C indican la existencia de un único tautómero. Hemos asumido que en disolución está presente el mismo tautómero que en la estructura cristalina del complejo [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (1), esto es, el "N¹-H" (según figura arriba).

3-amino-5-naftalencarbonilamino-1,2,4-triazol (H₂O)

Estructura:



Aspecto: sólido amarillo

Fórmula empírica: C₁₃H₁₁N₅O

Rendimiento síntesis: 62 %

Análisis Elemental Calculado para C₁₃H₁₁N₅O (253,26): N: 27,65; C: 61,65; H: 4,38. Encontrado: N: 26,70; C: 62,22; H: 4,39

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν (N-H) + ν (arC-H)] 3426 m, 3329 w, 3276 m, 3059 m; [ν (C=O)] 1657 s; [δ (N-H) + ν (C=N)_{anillo} + ν (C=C)_{anillo}] 1627 m, 1592 vs, 1446-1449 d m

Espectro de masas, modo FAB⁺ (DMSO) (m/z): 254 [M + H]⁺

RMN ¹H (300 MHz) (dmsó-d₆, δ /ppm): 12,1 (bs, 1H, NH-triazol); 11,0 (bs, 1H, NH-amida); 8,6 (s, 1H, H-g); 8,1-8,0 (m, 4H, naftaleno); 7,6-7,5 (m, 2H, naftanelo); 5,7 (s, 2H, NH₂)

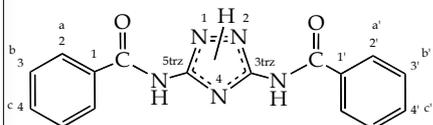
RMN ¹³C (300 MHz) (dmsó-d₆, δ /ppm):* 165,4 (1C, C-carbonilo); 134,4-132,0-130,7-129,1-129,0-128,5-127,9-127,6-126,8-124,3 (10C, C-naftaleno). Carbonos C-3 triazol y C-5 triazol no observados

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (insoluble); metanol (insoluble); DMF (soluble); DMSO (soluble)

* Los espectros RMN de ¹H y ¹³C indican que en disolución sólo existe un tautómero, pero no podemos concluir cual de los dos más probables ("N₁H" o "N₂H") es el que está presente, ya que no disponemos de estructura cristalina que contenga el ligando H₂O. Sí permiten descartar la acilación anular sobre N(1) o N(2) por la ausencia de dos señales diferenciadas para los grupos NH₂ (ver espectro ¹H RMN de M).

3,5-di(bencilamino)-1,2,4-triazol (H₃diQ)

Estructura:



Aspecto: sólido blanco

Fórmula empírica: C₁₆H₁₃N₅O₂

Rendimiento síntesis: 46 %

Análisis Elemental Calculado para C₁₆H₁₃N₅O₂ (307,31): N: 22,79;
C: 62,53; H: 4,26. Encontrado: N: 23,01; C: 62,12; H: 4,30

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν(N-H) + ν(arC-H)] 3441 s, 3298 m, 3102 w; [ν(C=O)] 1698-1669 d-s; [δ(N-H) + ν(C=N)_{anillo} + ν(C=C)_{anillo}] 1634 w, 1586 vs, 1553 w, 1423 w, 1370-1327 d-s

Espectro de masas, modo FAB⁺ (DMSO) (m/z): 308 [M + H]⁺

RMN ¹H (300 MHz) (dmso-d₆, δ/ppm): 10,9 (s, 1H, NH-triazol); 8,1 (d, 2H, J = 7,1 Hz, H-a o H-a'), 7,9 (d, 2H, J = 7,1 Hz, H-a o H-a'), 7,8 (bs, 1H, fenilo), 7,7-7,4 (m, 5H, fenilo). H (NH_{amido}) no observados.

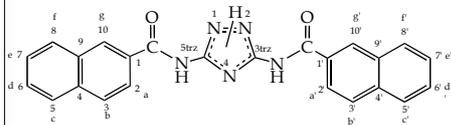
RMN ¹³C (300 MHz) (dmso-d₆, δ/ppm):* 1671 (1C, C-carbonilo); 164,9 (1C, C-carbonilo'); 157,7 (1C, C-5 triazol); 155,5 (1C, C-3 triazol); 133,6-132,8-132,0-131,9-130,7-128,3-128,0-127,9 (8C, 2 fenilos)

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (insoluble); metanol (insoluble); DMF (soluble); DMSO (soluble)

*El análisis de los espectros RMN de ¹H y ¹³C indica que la presencia del hidrógeno sobre N(1) o N(2) rompe la simetría de la molécula, de forma que las señales de los dos sustituyentes del triazol aparecen duplicadas. La estructura cristalina de [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH] (2) (ver más adelante) muestra el ligando desprotonado sobre el anillo; por tanto, no podemos concluir cuál es el tautómero presente en disolución.

3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol (H₃diO)

Estructura:



Aspecto: sólido amarillo

Fórmula empírica: C₂₄H₁₇N₅O₂

Rendimiento síntesis: 82 %

Análisis Elemental Calculado para C₂₄H₁₇N₅O₂ (407,42): N: 17,19; C: 70,75; H: 4,21. Encontrado: N: 15,93; C: 70,90; H: 4,07

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν(N-H) + ν(arC-H)] 3441 s, 3275 m, 3060 w; [ν(C=O)] 1690-1675 d-vs; [δ(N-H) + ν(C=N)_{ring} + ν(C=C)_{ring}] 1632 m, 1588 vs, 1535 s, 1417 w, 1370-1325 d-s

Espectro de masas, modo FAB⁺ (DMSO) (m/z): 408 [M + H]⁺

RMN ¹H (300 MHz) (dmsó-d₆, δ/ppm): 12,2 (bs, 1H, NH-amida'); 11,5 (bs, 1H, NH-amida); 11,1 (s, 1H, NH-triazol); 8,9 (s, 1H, H-g o H-g'); 8,6 (s, 1H, H-g o H-g'); 8,2-7,9 y 7,7-7,6 (m, 12H, 2 naftalenos)

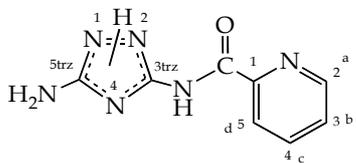
RMN ¹³C (300 MHz) (dmsó-d₆, δ/ppm):* 167,0 (1C, C-carbonilo'); 165,0 (1C, C-carbonilo); 134,6-134,4-132,5-131,9-131,5-130,9-129,4-129,3-129,0-128,7-128,6-127,9-127,8-127,5-127,3-126,9-126,7-126,2-124,4-123,9 (20C, C- 2 naftalenos). Carbonos C-3trz y C-5trz no observados

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (insoluble); metanol (insoluble); DMF (parcialmente soluble); DMSO (parcialmente soluble)

*El análisis de los espectros RMN de ¹H y ¹³C indica que la presencia del hidrógeno sobre N(1) o N(2) rompe la simetría de la molécula, de forma que las señales de los dos sustituyentes del triazol aparecen duplicadas. La estructura cristalina de [Cu(H₂diO)(NO₃)₂·2DMSO (3) (ver más adelante) muestra el ligando desprotonado sobre el anillo; por tanto, no podemos concluir cuál es el tautómero presente en disolución.

5-amino-3-picolinamido -1,2,4-triazol (H₂V)

Estructura:



Aspecto: sólido amarillo pálido

Fórmula empírica: C₈H₈N₆O

Rendimiento síntesis: 86 %

Análisis Elemental Calculado para C₈H₈N₆O (204,19): N: 41,16; C: 47,06; H: 3,95. Encontrado: N: 41,23; C: 47,30; H: 3,97

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν(N-H) + ν(arC-H)] 3428 s; 3323-3253 d-m; [ν(C=O)] 1683 s; [δ(N-H) + ν(C=N)_{anillo} + ν(C=C)_{anillo}] 1651 m, 1622 s, 1576 s, 1486 w, 1411 m

Espectro de masas, modo FAB⁺ (metanol) (m/z): 205 [M + H]⁺

RMN ¹H (300 MHz) (dmsó-d₆, δ/ppm): 11,8 (bs, 1H, NH-amida); 10,2 (s, 1H, NH-triazol); 8,7 (m, 1H, H-a piridina); 8,1 (m, 1H, H-d piridina); 8,0 (m, 1H, H-c piridina); 7,7 (m, 1H, H-b piridina)

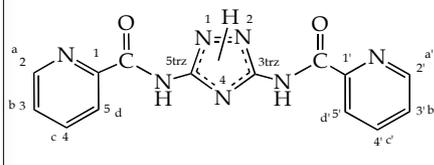
RMN ¹³C (300 MHz) (dmsó-d₆, δ/ppm):* 162,1 (1C, C-carbonilo); 149,0-138,6-127,5-122,7 (4C, C-2,C-3,C-4,C-5 piridina). Carbonos C-1piridina, C-3trz y C-5trz no observados

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (parcialmente soluble); metanol (parcialmente soluble); DMF (soluble); DMSO (soluble)

* Los espectros RMN de ¹H y ¹³C indican la existencia de un único tautómero. En la estructura cristalina del complejo {[Cu₄(HV)₂(picolinato)₂(NO₃)₃(H₂O)₆](NO₃)_n} (7) (ver más adelante) el ligando está desprotonado sobre el grupo amido y el tautómero presente es el "N¹-H".

3,5-bis(picolinamido)-1,2,4-triazol (H₃diV)

Estructura:



Aspecto: sólido marrón pálido

Fórmula empírica: C₁₄H₁₁N₇O₂

Rendimiento síntesis: 51 %

Análisis Elemental Calculado para C₁₄H₁₁N₇O₂ (309,28): N: 31,70; C: 54,37; H: 3,58. Encontrado: N: 31,67; C: 54,01; H: 3,52

Bandas FT-IR seleccionadas (pastilla de KBr) $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm⁻¹): [ν(N-H) + ν(arC-H)] 3367-3353 d-m, 3180 b, 3066 w [ν(C=O)] 1703-1689 d-s; [δ(N-H) + ν(C=N)_{anillo} + ν(C=C)_{anillo}] 1557 vs, 1448 m, 1415 s

Espectro de masas, modo FAB⁺ (metanol) (m/z): 310 [M + H]⁺

RMN ¹H (300 MHz) (dmsó-d₆, δ/ppm): 13,6 (bs, 1H, NH-amida'); 11,6 (bs, 1H, NH-amida); 10,6 (bs, 1H, NH-triazol); 8,7 (d, 1H, J = 4,2 Hz, H-a piridina); 8,1 (m, 2H, H-d y H-c piridina); 7,7 (m, 1H, H-b piridina);

RMN ¹³C (300 MHz) (dmsó-d₆, δ/ppm):* 162,8 (1C, C-carbonilo); 148,7-138,1-127,4-122,5 (4C, C-2, C-3, C-4, C-5 piridina). Carbonos C-piridina, C-3 triazol y C-5 triazol no observados

Solubilidad: agua (insoluble); etanol (parcialmente soluble); metanol (parcialmente soluble); DMF (soluble); DMSO (soluble)

* Los espectros RMN de ¹H y ¹³C indican la existencia de un único tautómero. En la estructura cristalina del complejo [Cu₆(HdiV)₂(ClO₄)₆(H₂O)₁₄](ClO₄)₂·10H₂O (**8**) (ver más adelante) el ligando ha perdido los dos protones amido y el tautómero presente es el N⁴-H.

I.B.2.2 Espectroscopia infrarroja

I.B.2.2.1 Espectroscopia infrarroja de los ligandos sulfonilo

La asignación de los espectros IR de los ligandos **N** y **M** se ha realizado en base a datos obtenidos de la bibliografía, por comparación con los espectros del 3-amino-1,2,4-triazol (Hatz) y 3,5-diamino-1,2,4-triazol (Hdatz), ya estudiados con detalle previamente,²⁰ y a la luz de las estructuras cristalinas de los complejos (ver Capítulo II apartado II.C.3).

Las figuras de los espectros IR del Hatz, Hdatz y de los dos ligandos sulfonilo **N** y **M** se adjuntan en el Anexo I. La tabla I.7 resume la asignación de las bandas IR más destacadas. Los dos ligandos, pese a diferenciarse tan sólo en un grupo -NH₂, presentan IR muy diferentes.

En el rango 3500-3200 cm⁻¹ muestran señales correspondientes a las vibraciones $\nu(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$ de los grupos amino exocíclicos. Dichas bandas se presentan a frecuencias más altas que en los precursores; este desplazamiento sugiere que los grupos -NH₂ de los nuevos ligandos se encuentran menos asociados que en el Hatz y el Hdatz. Entre 3200 y 3000 cm⁻¹ se observan bandas (para **N** a 3112 cm⁻¹ y para **M** a 3180 cm⁻¹) que pueden atribuirse a las vibraciones $\nu(\text{arC-H})$ del anillo aromático naftaleno; aparecen a frecuencias algo más altas de lo habitual,²¹ pero similares a las descritas para otros derivados aril-sulfonilo.²²

En la zona 1650-1440 cm⁻¹ ambos ligandos presentan un conjunto de picos característicos del anillo triazol y de los grupos amino, asignables a las vibraciones $\nu(\text{C=N})$, $\gamma(\text{CNH})$ y $\delta(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$. También se incluirían en esta región los modos $\nu(\text{C=C})$ del anillo naftaleno.

Las vibraciones de tensión asimétrica del grupo sulfonilo se aprecian a 1383 cm⁻¹ en el espectro de **N**, y a 1386 cm⁻¹ en el de **M**; las de tensión simétrica, a 1179 cm⁻¹ para **N**, y a 1187-1164 cm⁻¹, en forma de doblete, para **M**.

La región de *la huella dactilar* (1250-900 cm⁻¹), englobaría las vibraciones menos energéticas del triazol, del naftaleno y las $\nu(\text{S-N})$ del grupo sulfonilo. Por último, en la zona 900-650 cm⁻¹ se presentarían los modos $\delta_{\text{oop}}(\text{arC-H})$ del naftaleno.

Tabla I.7. Asignación de bandas IR para los **ligandos sulfonilo** y los respectivos precursores.*

Ligando	$\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$			
	$[\nu(\text{N-H})_{\text{NH}} \text{ +/o } \text{NH}_2 \text{ +/o } \nu(\text{arC-H})]$	$[\delta(\text{N-H})_{\text{NH}} \text{ +/o } \text{NH}_2 \text{ + } \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} \text{ + } \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{sym}}$
Hatz	3425 m; 3331 sh	1642 s; 1593 w; 1536 m; 1427 w; 1374 vw	--	--
Hdatrz	3398 m; 3371 sh; 3309 m; 3235 w	1626 vs; 1584-1563 d, s; 1487 s; 1416 s; 1354 w	--	--
N	3465 m; 3302 w; 3227 w; 3112 m	1693 sh; 1651 vs; 1571 m; 1521 s	1383 s	1179 vs
M	3472 m; 3376 m; 3339 sh; 3180 m	1632 vs; 1571 s; 1452 s	1368 s	1187-1164 d, s

* *vs*: muy fuerte; *s*: fuerte; *m*: media; *w*: débil; *vw*: muy débil; *d*: doblete; *b*: ancha; *sh*: hombro; ν_{asym} : vib. de tensión asimétrica; ν_{sym} : vib. de tensión simétrica.

I.B.2.2.2 Espectroscopia infrarroja de los ligandos acilo

La asignación de las bandas IR de los ligandos acilo se ha realizado, como en el caso de los ligando sulfonilo, por comparación con los espectros IR de los respectivos reactivos precursores (Hatz para **H₂P**; Hdatrz para **H₂O**, **H₂V**, **H₃diQ**, **H₃diO** y **H₃diV**), a partir de los datos de la bibliografía sobre ligandos relacionados,¹⁷ y teniendo en cuenta las estructuras cristalinas de los compuestos de los ligandos referidas en este capítulo (ver Capítulo II apartados II.b y II.E).

Las figuras de los espectros IR de todos los ligandos acilo se adjuntan en el apartado *Anexo*. Incluimos también en este apartado el estudio del ligando comercial relacionado estructuralmente H₂atc (ácido 5-amino-1,2,4-triazol-3-carboxílico) por ser uno de los ligandos de esta *Tesis Doctoral*. La tabla I.8 recoge la asignación de las bandas IR más significativas de los seis ligandos.

En la región 3500-3200 cm⁻¹ se observan las señales características de las vibraciones $\nu(\text{N-H})$ de los grupos amino y amido. Como en el caso de los ligandos sulfonilo, en los ligandos acilo (excepto para el ligando **H₃diV**) estas bandas aparecen a valores de $\tilde{\nu}$ más altos que en los precursores amino-triazol y diamino-triazol, posiblemente porque los grupos N-H se encuentran más libres. Las bandas de menor frecuencia las presenta el H₂atc, cuyas moléculas deben encontrarse ampliamente asociadas por puentes de hidrógeno.

Entre 3200 y 3000 cm⁻¹ aparecen las vibraciones de tensión $\nu(\text{arC-H})$ de los anillos aromáticos fenilo (**H₂P**, **H₃diQ**) / naftaleno (**H₂O**, **H₃diO**) / piridina (**H₂V**, **H₃diV**) y, además, en el caso del ligando **H₂P**, la vibración $\nu(\text{arC}_{\text{triazol-H}})$. A diferencia de lo observado para los ligandos sulfonilo, en los ligandos acilo estas bandas se presentan a las frecuencias esperadas.

En el intervalo 1740-1650 cm⁻¹ aparecen los máximos correspondientes a la vibración $\nu(\text{C=O})$ del ligando carboxílico (en el H₂atc), o *amida I* [$\nu(\text{C=O})$] en los seis ligandos acilo (*acilamida*). Cabe mencionar que los tres ligandos monoacilados presentan una única banda intensa a 1662 cm⁻¹ (**H₂P**), a 1657 cm⁻¹ (**H₂O**), o a 1685 cm⁻¹ (**H₂V**), mientras que los ligandos diacilados presentan un doblete

intenso a 1698-1669 cm^{-1} (**H₃diQ**), a 1690-1675 cm^{-1} (**H₃diO**), o a 1703-1689 cm^{-1} (**H₃diV**). Este desdoblamiento de señales, que se observa también en los espectros RMN de ^1H y ^{13}C de estos ligandos, es un indicio de que los dos sustituyentes del anillo (en este caso los dos grupos carbonilo) no son equivalentes. La rotura de simetría se produce por la existencia de tautomería, ya que el hidrógeno N-H_{trz} puede estar sobre el nitrógeno N(1) o sobre el nitrógeno N(2) (ver apartado I.A.3).

En relación con este grupo de bandas, cabe reseñar que en los ligandos monoacilados la vibración *amida I* [$\nu(\text{C}=\text{O})$] aparece a frecuencias menores que en los ligandos diacilados. Esta diferencia es posiblemente consecuencia de la mayor conjugación presente en los ligandos monoacilados en comparación con los diacilados, aunque también podría deberse a la diferente red de puentes de hidrógeno.

En el intervalo 1650 y 1300 cm^{-1} , todos los ligandos presentan un conjunto de picos intensos atribuibles a las vibraciones de deformación de los grupos amino y a las de tensión C=N y C=C de los anillos. El conjunto de señales clasificadas como *amida II* [$\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{N-C}=\text{O})_{\text{sym}}$] también aparecen en esta región (1630-1510 cm^{-1}).²¹

Por último, la zona de *la huella dactilar* (1250-900 cm^{-1}), sin importancia práctica, engloba las vibraciones menos energéticas de los anillos triazol y fenilo (**H₂P**, **H₃diQ**) / triazol y naftaleno (**H₂O**, **H₃diO**) o triazol y piridina (**H₂V**, **H₃diV**), entre otras. En la región 900-650 cm^{-1} se observan las vibraciones de deformación de los anillos aromáticos (fenilo, naftaleno, o piridina) tales como las δ_{oop} (arC-H) y $\gamma(\text{C-N-C})$.

Tabla I.8. Asignación de bandas IR para los **ligandos acilo** y los respectivos precursores.*

Ligando	$\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$		
	$[\nu(\text{N-H})_{\text{NH} +/\text{o NH}_2} +/\text{o } \nu(\text{arC-H})]$	$\nu(\text{C=O})$	$[\delta(\text{N-H})_{\text{NH} +/\text{o NH}_2} + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]$
Hatz	3425 m; 3331 sh	--	1642 s; 1593 w; 1536 m; 1427 w; 1374 vw
Hdatrz	3398 m; 3371 sh; 3309 m; 3235 w	--	1626 vs; 1584, 1563 d, s; 1487 s; 1354 w
H₂atc	3332 w; 3287w; 3038 b, m	1713 sh; 1694-1668 d, vs	1624 s; 1566 m; 1508 m; 1419 sh; 1374 vs
H₂P	3472-3430 b. m; 3273 s	1662 s	1598 s; 1554 m; 1486 m
H₂O	3426 m; 3329 w; 3276 m; 3059 m	1657 s	1627 m; 1592 vs; 1446-1449 d, m
H₂V	3428 s; 3323-3253 d, m	1683 s	1651 m; 1622 m; 1576 s; 1486 w; 1411m
H₃diQ	3441 s; 3298 m; 3102 w	1698-1669 d, s	1634 w; 1586 vs; 1533 w; 1423 w; 1370-1327 d, s
H₃diO	3441 s; 3275 m; 3060 w	1690-1675 d, vs	1632 m; 1588 vs; 1535 s; 1417 w; 1370- 1325 d, s
H₃diV	3367-3352 d, m; 3180 b; 3066 w	1703-1689 d, s	1557 vs; 1448 m; 1415 s

* vs: muy fuerte; s: fuerte; m: media; w: débil; vw: muy débil; d: doblete; b: ancha; sh: hombro; ν_{asym} : vib. de tensión asimétrica; ν_{sym} : vib. de tensión simétrica.

I.B.3 Estructura cristalina del ligando H_2V^*

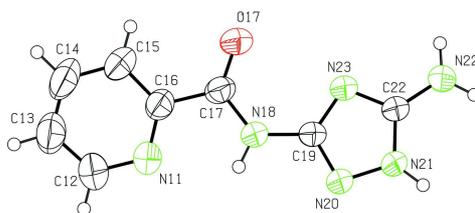
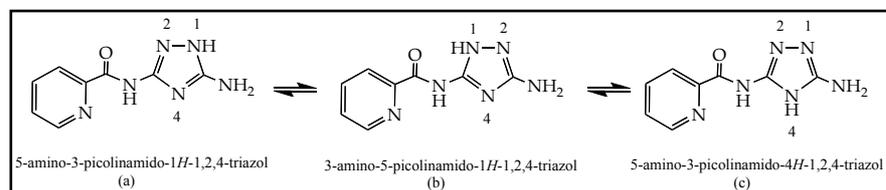


Figura I.6. El ligando H_2V .

Como se ha indicado anteriormente (apartado I.B.1.2.2), el ligando H_2V se ha obtenido por reacción directa del 3,5-diamino-1,2,4-triazol con un ligero exceso de 2-picolinato de etilo en un horno de bolas a 210 °C, y posterior recristalización del producto amarillo resultante en metanol caliente. Tras 1-2 días se obtienen cristales amarillos de forma octaédrica, adecuados para el estudio de rayos-X de monocristal.

La reacción del 3,5-diamino-1,2,4-triazol con agentes de acilación puede conducir a mezclas de productos mono, di e incluso triacetilados.^{6,8} La estructura de los cristales amarillos ha mostrado que el procedimiento de síntesis aquí descrito conduce a la formación de una muestra pura de ligando H_2V [5-amino-3-picolinamido-1*H*-1,2,4-triazol = 5-amino-3-(piridin-2-il-acetamido)-1,2,4-triazol] (figura I.6). Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.



Esquema I.11. Tautómeros del ligando H_2V .

*Los resultados que se presentan en I.B.3 han sido objeto de la siguiente publicación: Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Ballesteros, R.; Castiñeiras, A. *Acta Cryst.* **2013**, E69, o227-0228.

El ligando **H₂V** puede existir en diferentes formas tautoméricas (esquema I.11). El estudio de rayos-X indica que el tautómero presente en el sólido es el 5-amino-3-picolinamido-1*H*-1,2,4-triazol [figura (a)], es decir, el H del anillo de triazol se encuentra sobre el nitrógeno diazínico contiguo al grupo amino, N(21).

Las dimensiones moleculares del ligando, tales como la distancia de enlace C=O [1,227(3) Å] y el ángulo de enlace NCO del grupo amida [127,40(17)°], se pueden considerar normales. La tabla I.9 recoge distancias y ángulos de enlace seleccionados. La estructura de **H₂V** es aproximadamente planar, si bien los anillos de piridina y triazol están ligeramente inclinados uno respecto al otro formando un ángulo diedro de 15.6(1)°.

Desde el punto de vista de la química de coordinación, el ligando **H₂V**, con dos posiciones ionizables, puede presentar entre 5 y 7 átomos dadores, según el grado de desprotonación, ofreciendo la posibilidad de formar con iones metálicos varios anillos quelato. Además, en derivados similares se ha observado que el anillo de piridina puede girar sobre el enlace sencillo C(16)-C(17) y hacer que el ligando adopte diferentes conformaciones.^{23,24} Todas estas características confieren a **H₂V** una gran versatilidad.

En la red cristalina, las moléculas de **H₂V** están conectadas a través de un sistema de enlaces de hidrógeno (ver tabla I.10). En el plano definido por la unidad **H₂V** cada molécula se une a otras dos moléculas a través de 4+4 enlaces de hidrógeno. Entre ellos destacan los formados por los pares O17^{*1}··H-N22 y O17··H-N22^{*2} (O17^{*1} y N22^{*2} representan átomos de moléculas vecinas), los cuales generan cintas de moléculas apareadas (ver figura I.7). Además, cada molécula está conectada a una tercera molécula perteneciente a una cinta diferente (prácticamente perpendicular), a través del par de enlaces de hidrógeno N20··H-N18^{*3} y N20^{*3}··H-N18 (^{*1}, ^{*2}, ^{*3} hacen referencia a las operaciones de simetría indicadas en la tabla I.10). El conjunto resultante es una estructura 3D supramolecular (figura I.8).

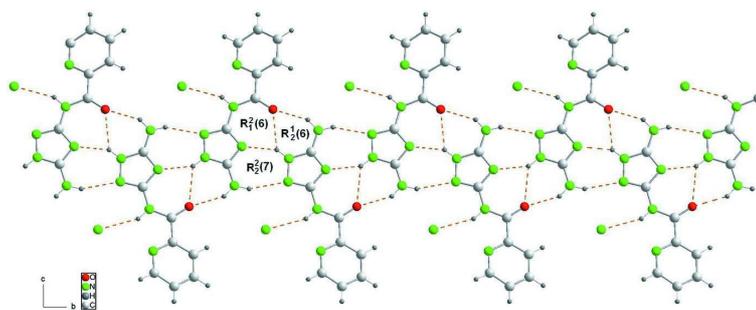


Figura I.7. Enlaces de H entre moléculas de H_2V (vista a lo largo del plano [100]). Los enlaces de H se muestran como líneas discontinuas de color naranja.

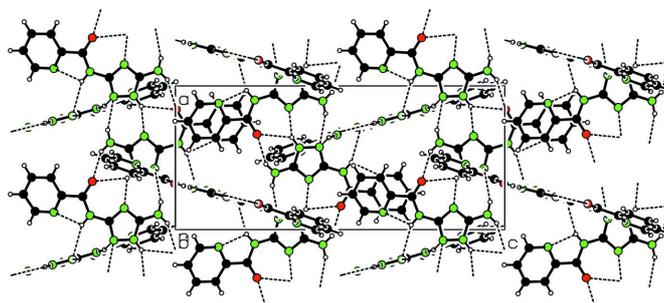


Figura I.8. Vista del contenido de la celda unidad del ligando H_2V en proyección sobre el eje b . Los enlaces de hidrógeno se muestran como líneas discontinuas.

Tabla I.9. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para el ligando **H₂V** con las esds entre paréntesis.

O(17)-C(17)	1.227(3)	N(18)-C(17)	1.351(3)
N(21)-C(22)	1.329(2)	N(18)-C(19)	1.392(2)
N(21)-N(20)	1.378(2)	N(18)-H(18)	0.8600
N(21)-H(21)	0.8600	N(22)-C(22)	1.341(2)
N(20)-C(19)	1.312(3)	N(22)-H(22A)	0.8600
N(23)-C(22)	1.335(2)	N(22)-H(22B)	0.8600
N(23)-C(19)	1.348(2)		
C(17)-N(18)-C(19)	127.40(17)	O(17)-C(17)-C(16)	122.0(2)
N(18)-C(17)-C(16)	114.33(19)	O(17)-C(17)-N(18)	123.63(19)

Tabla I.10. Enlaces de hidrógeno para el ligando **H₂V**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(21)-H(21)...N(23)#1	0,86	2,01	2,787	149,0
N(21)-H(21)...O(17)#1	0,86	2,41	3,061	132,7
N(18)-H(18)...N(20)#2	0,86	2,45	3,254	155,5
N(22)-H(22A)...O(17)#1	0,86	2,08	2,860	149,9
N(22)-H(22B)...N(20)#3	0,86	2,26	3,068	156,9

Código de simetría: #1 -x+1/2,y-1/2,-z+1/4 #2 -y,-x,-z+1/2
#3 -x+1/2,y+1/2,-z+1/4

I.B.4 Conclusiones

Se ha diseñado una familia de ligandos basada en los precursores 3-amino-1,2,4-triazol y 3,5-diamino-1,2,4-triazol a los que se ha incorporado anillos aromáticos (fenilo, naftilo o piridina), mediante sulfonilación o acilación. Con estos derivados se pretende obtener complejos metálicos capaces de interaccionar adecuadamente con el ADN.

Los resultados detallados de este Capítulo pueden resumirse como sigue:

1. Se han sintetizado dos nuevos ligandos sulfonil-triazol: **N** y **M**. La sulfonación se ha producido, inesperadamente, sobre el nitrógeno anular del triazol.

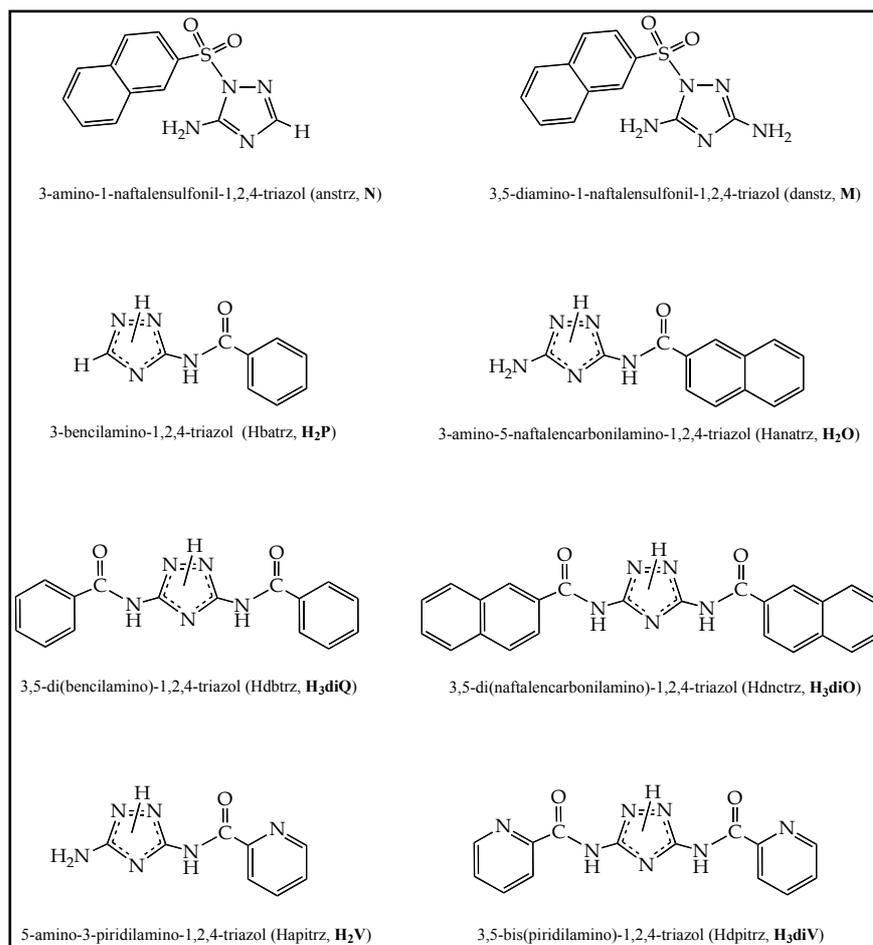
2. Se han sintetizado seis nuevos ligandos carbonilamido-triazol: **H₂P**, **H₂O** y **H₂V** (tres ligandos monoacilo); **H₃diQ**, **H₃diO** y **H₃diV** (tres ligandos diacilo). La acilación se ha producido sobre el/los nitrógeno(s) exocíclico(s).

3. Los ligandos sintetizados se han caracterizado mediante Análisis Elemental, espectrometría de masas (FAB⁺), resonancia magnética nuclear de ¹H y ¹³C, y espectroscopia IR.

4. En general, los ligandos sintetizados presentan baja solubilidad, sobre todo los que contienen grupo(s) naftaleno. La sustitución del anillo aromático fenilo/naftilo por piridina ha permitido mejorar la solubilidad del ligando.

5. El estudio de difracción de rayos-X de monocristal del ligando **H₂V** ha permitido confirmar la posición de acilación sobre el grupo amino exocíclico.

En el esquema I.15 se muestran los ligandos obtenidos, su nomenclatura y las abreviaturas que se utilizarán en el trabajo.



Esquema I.15. Ligandos obtenidos.

Los ligandos sintetizados se han ensayado frente a disoluciones de diferentes sales de Cu(II) con objeto de obtener los correspondientes compuestos de coordinación. Los compuestos de Cu(II) cuya estructura cristalina ha podido ser determinada por difracción de rayos-X son los que se describen en los capítulos II y III de esta *Tesis Doctoral*.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Reactivos y disolventes

Todos los reactivos y disolventes que se han utilizado para la síntesis de los ligandos triazol han sido productos puros suministrados por las casas comerciales Merck, Panreac, Roche y Sigma-Aldrich.

Técnicas de caracterización

Análisis elemental

El porcentaje de C, H, N y S ha sido determinado con el analizador elemental CE Instruments EA modelo 1110 CHNS del *S.C.S.I.E* de la Universitat de València, así como el analizador elemental Thermo Finnigan modelo Flash EA1112 del Instituto de Investigación Química y Ambiental, *CSIC*, Barcelona. Este último además ha permitido la obtención del porcentaje de Cl de determinadas muestras.

Espectrometría de masas

Los espectros de masas de los ligandos se registraron en un equipo VG Analytical, Micromass Instruments (Espectrómetro de masas de alta resolución con cromatógrafo de gases) del *S.C.S.I.E* de la Universitat de València. Se utilizó la técnica FAB (bombardeo con átomos rápidos), modo positivo (FAB⁺), para ionizar la muestra. Los ligandos **N**, **H₂P**, **H₂V** y **H₃diV** fueron disueltos en metanol, y los ligandos **M**, **H₂O**, **H₃diO** y **H₃diQ** en DMSO.

Resonancia magnética nuclear

Los espectros RMN de ¹H y ¹³C se registraron en un espectrómetro advance DRX 300 Bruker de 300 MHz, excepto el ligando 3-amino-5-naftalencarbonilamino-1,2,4-triazol (**H₂O**) que fue obtenido en un espectrómetro DPX 500 Bruker de 500 MHz. Todos los ligandos se disolvieron en DMSO-*d*₆. Los desplazamientos químicos se tomaron utilizando como referencia la señal del disolvente deuterado.

Espectroscopia infrarroja

Los espectros infrarrojos se han obtenido en dos espectrofotómetros: Mattson Satellite FTIR y Perkin-Elmer RXI FTIR, en la región entre 4.000 y 400 cm⁻¹. Como diluyente para preparar las muestras, en forma de pastilla, se ha utilizado KBr.

Difracción de rayos-X

Los monocristales del ligando **H₂V** ha sido medido con un difractor Nonius Kappa-CCD, en la Universitat de València. Los detalles de la toma de datos y refinamiento de las estructuras se indican en el Anexo.

BIBLIOGRAFÍA

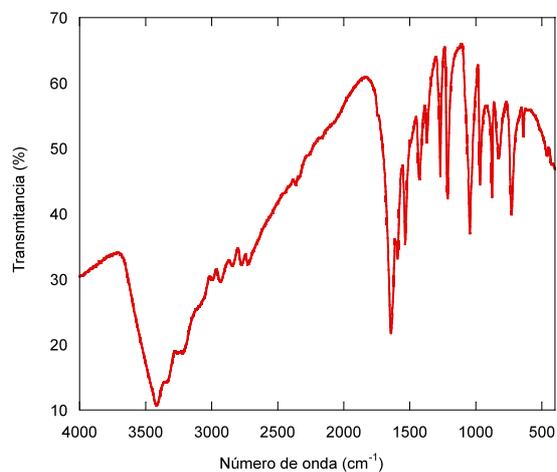
- (1) García-Giménez, J. L.; González-Alvarez, M.; Liu-González, M.; Macías, B.; Borrás, J.; Alzuet, G. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 923.
- (2) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; González-Alvarez, M.; Liu-González, M.; Castiñeiras, A.; Borrás, J. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 243.
- (3) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Castiñeiras, A.; Liu-Gonzalez, M.; Borrás, J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7178.
- (4) Dolzhenko, A. V. A. V.; Pastorin, G.; Chui, W. K. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 2124.
- (5) Chernyshev, V. M.; Gaidukova, G. V.; Zemlyakov, N. D.; Taranushich, V. A. *Russ. J. Appl. Chem.* **2005**, *78*, 776.
- (6) Chernyshev, V. M.; Rakitov, V. A.; Taranushich, V. A.; Blinov, V. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2005**, *41*, 1139.
- (7) Zhang, J.-P.; Lin, Y.-Y.; Huang, X.-C.; Chen, X.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5495.
- (8) Van den Bos, B. G. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **1960**, *79*, 836.
- (9) Gutierrez, L.; Alzuet, G.; Real, J. A.; Cano, J.; Borrás, J.; Castiñeiras, A. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 3608.
- (10) Pagacz-Kostrzewa, M.; Bronisz, R.; Wierzejewska, M. *Chem. Phys. Lett.* **2009**, *473*, 238.
- (11) Parchment, O. G.; Hillier, I. H.; Green, D. V. S.; Burton, N. A.; Morley, J. O.; Schaefer, H. F. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1992**, 1681.
- (12) Makarskii, V.; Zubkov, B.; Lopyrev, V.; Voronkov, M. *Chem. Abstr.* **1977**, *87*, 67696w.
- (13) Haasnoot, J. G. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 131.
- (14) Claramunt Vallespí, R. M.; Elguero Bertolini, J. Una aproximación a la tautomería de los heterociclos aromáticos. *Anales de la Real Sociedad Española de Química*, 2006, 30-39.
- (15) Fidler, Z. N.; Shibanova, E. F.; Makerov, P. V.; Kalikhman, I. D.; Shulunova, A. M.; Sarapulova, G. I.; Klyba, L. V.; Vitkovskii, V. Y.; Chipanina, N. N.; Lopyrev, V. A.; Voronkov, M. G. *Chem. Heterocycl. Compd.* **1980**, *16*, 1079.
- (16) Dzygiel, A.; Masiukiewicz, E.; Rzeszotarska, B. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1383.
- (17) Ferrer, S.; van Koningsbruggen, P. J.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Lezama, L.; Arif, A. M.; Miller, J. S. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, 4269.
- (18) Ferrer, S.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Müller, E.; Biagini Cingi, M.; Lanfranchi, M.; Manotti Lanfredi, A. M.; Ribas, J. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1859.
- (19) Ferrer, S.; Lloret, F.; Bertomeu, I.; Alzuet, G.; Borrás, J.; García-Granda, S.; Liu-González, M.; Haasnoot, J. G. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 5821.

- (20) Kumar, V. K.; Keresztury, G.; Sundius, T.; Xavier, R. J. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2005**, *61*, 261.
- (21) Herrera, A.; Martínez, R.; Söllhuber, M. *Métodos Espectroscópicos en Química Orgánica; Síntesis*; Barcelona, 1999.
- (22) Hadzi, D.; Shorblizak, M. *J. Chem. Soc.* **1957**, 843.
- (23) Faulmann, C.; van Koningsbruggen, P. J.; de Graaff, R. A. G.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1990**, *46*, 2357.
- (24) Ouakkaf, A.; Berrah, F.; Bouacida, S.; Roisnel, T. *Acta Crystallogr. Sect. E. Struct. Rep. Online* **2011**, *67*, o1171.

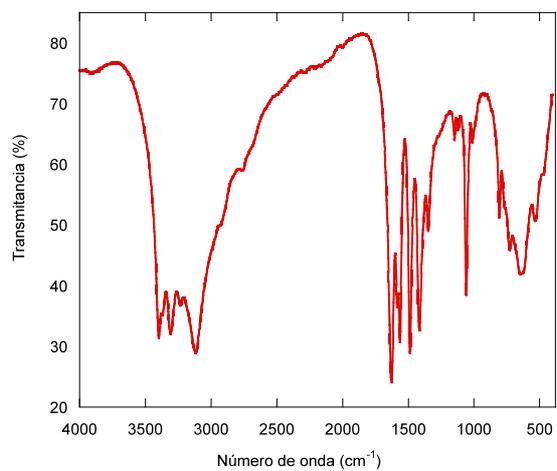
ANEXOS

Anexo I. Espectros infrarrojos (KBr)

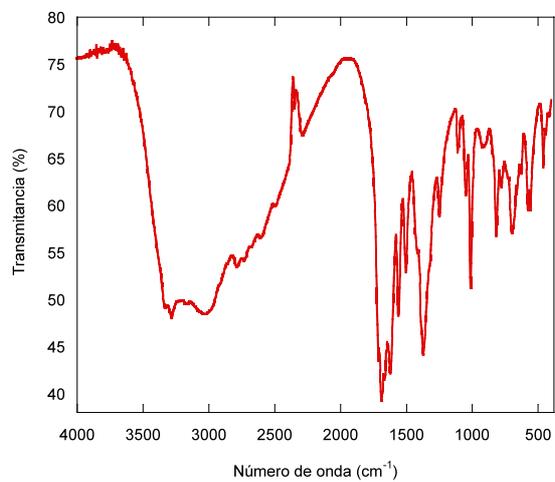
3-amino-1,2,4-triazol (Hatz)



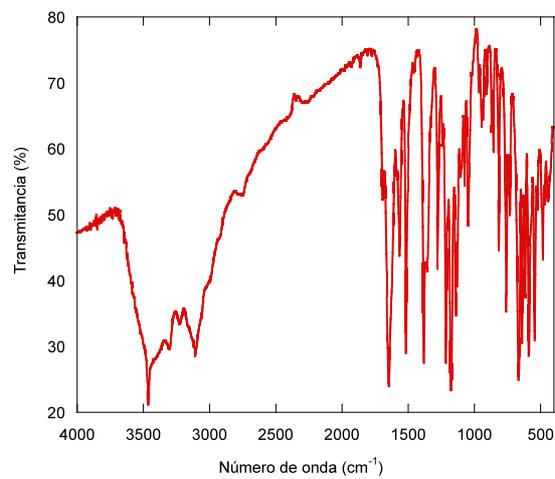
3,5-diamino-1,2,4-triazol (Hdatrz)



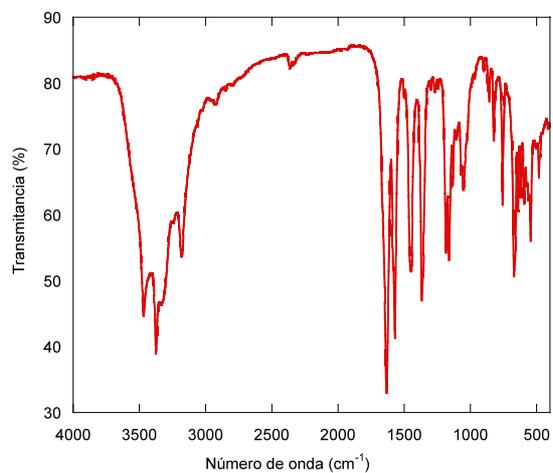
Ácido 3-amino-5-carboxílico-1,2,4-triazol (H₂atc)



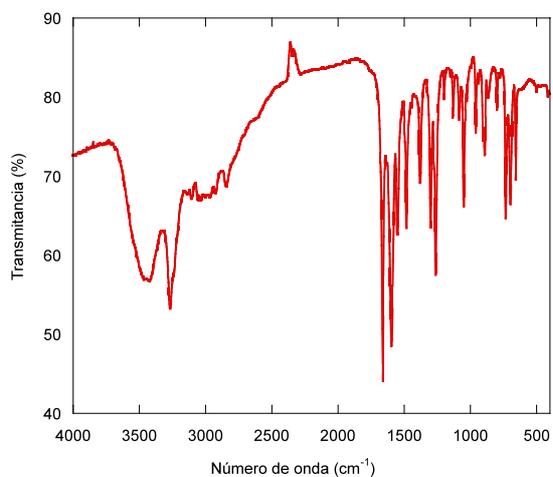
3-amino-1-naftalensulfonil-1,2,4-triazol (anstrz, N)



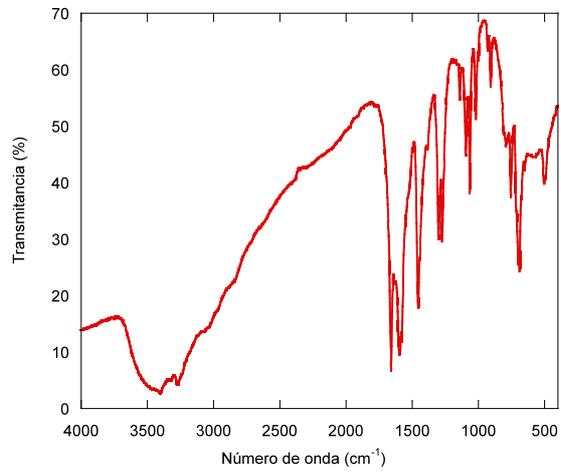
3,5-diamino-1-naftalensulfonil-1,2,4-triazol (danstrz, M)



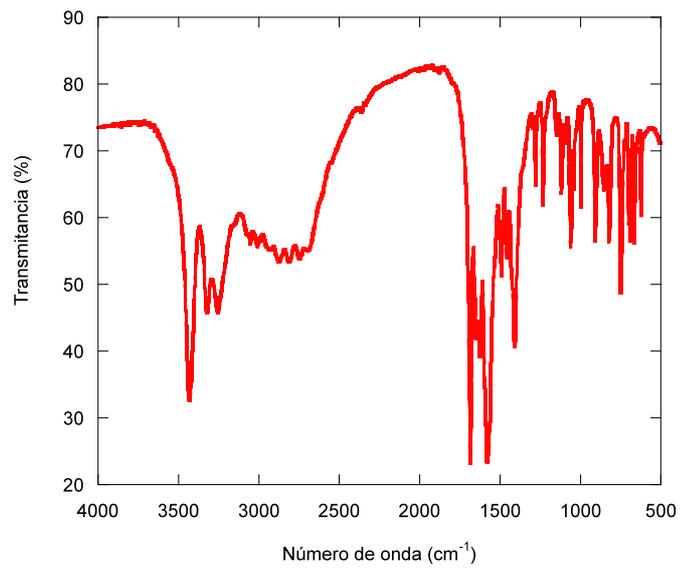
3-bencilamino-1,2,4-triazol (Hbatrz, H₂P)



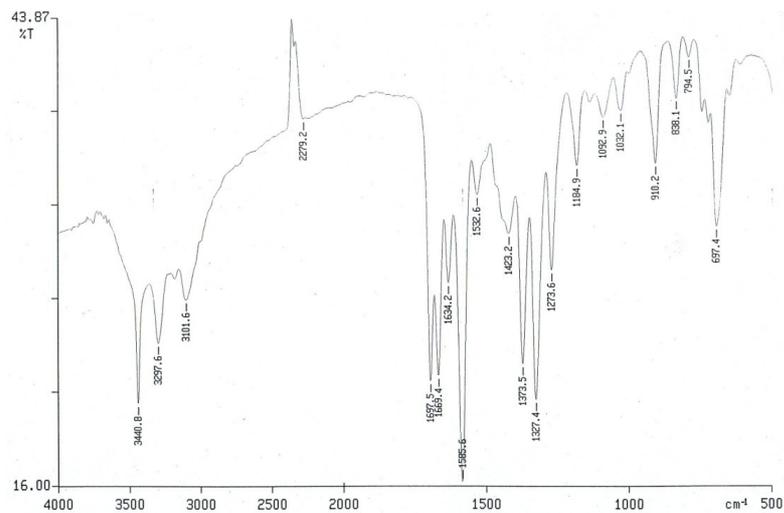
3-amino-5-naftalencarbonilamino-1,2,4-triazol (Hanatz, H₂O)



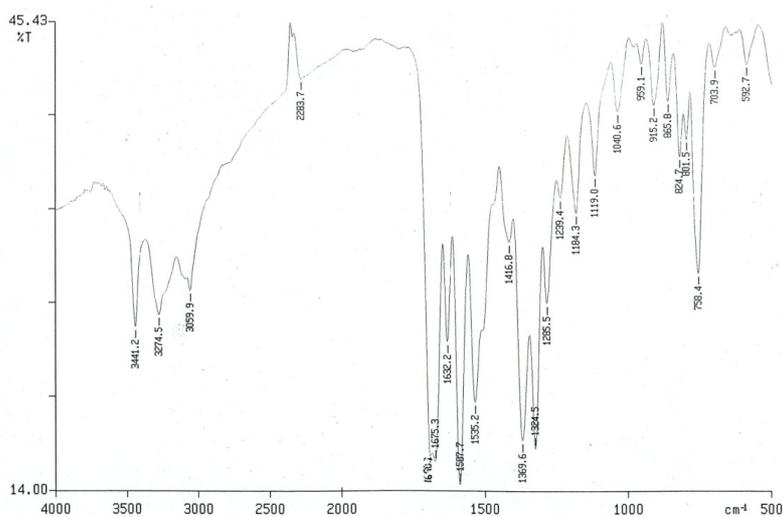
5-amino-3-picolinamido-1,2,4-triazol (Hapitz, H₂V)



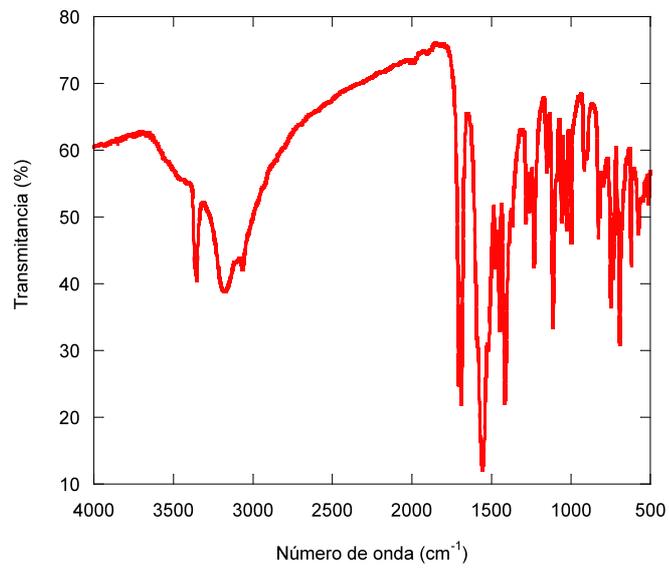
3,5-di(bencilamino)-1,2,4-triazol (Hdbtrz, H₃diQ)



3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol (Hdnctrz, H₃diO)

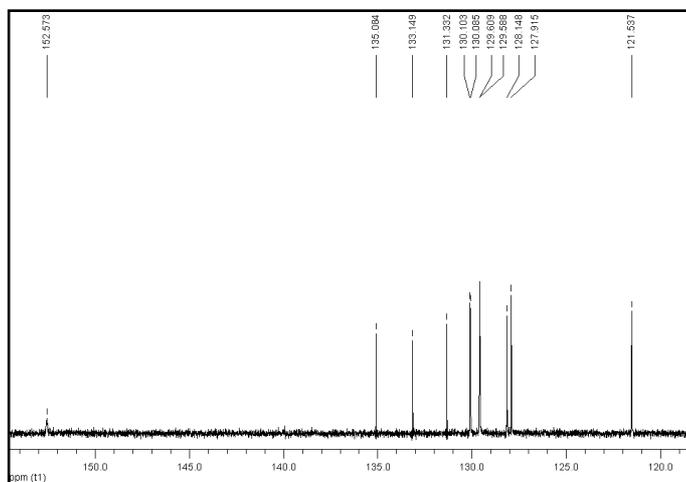
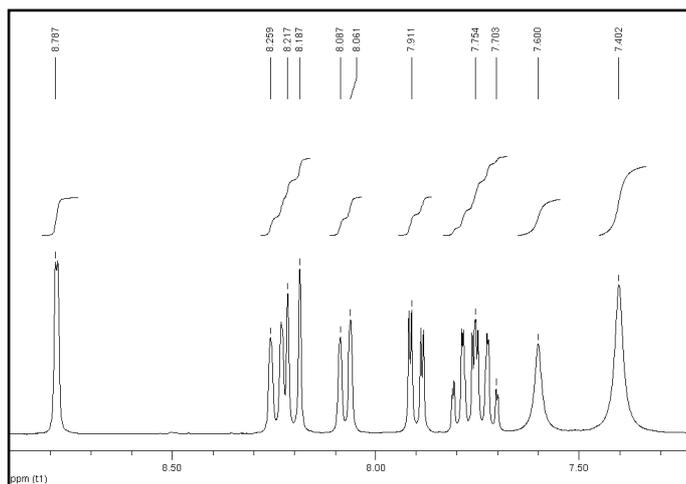
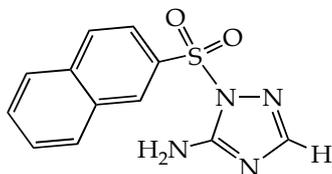


3,5-di(picolinamido)-1,2,4-triazol (Hdpitrz, H₃diV)

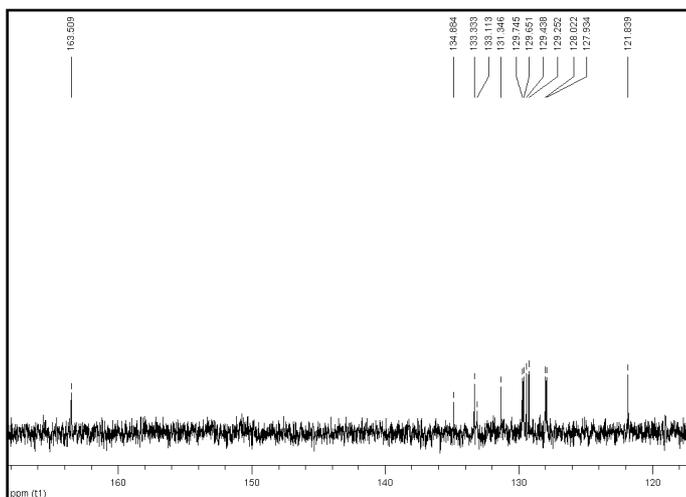
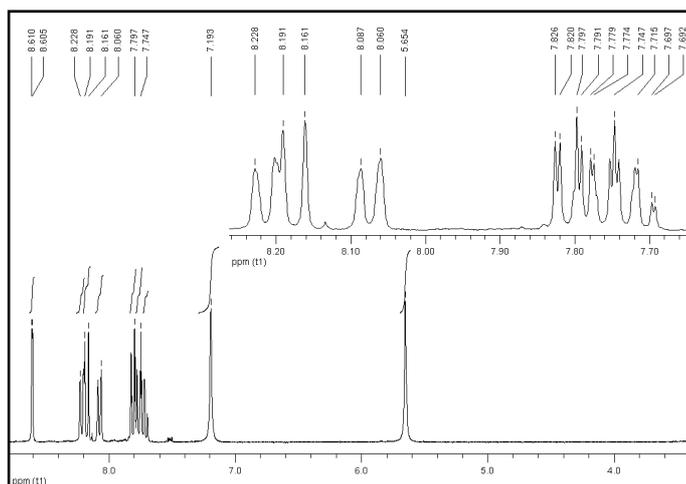
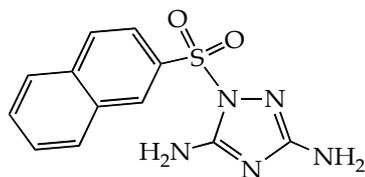


Anexo II. Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C)

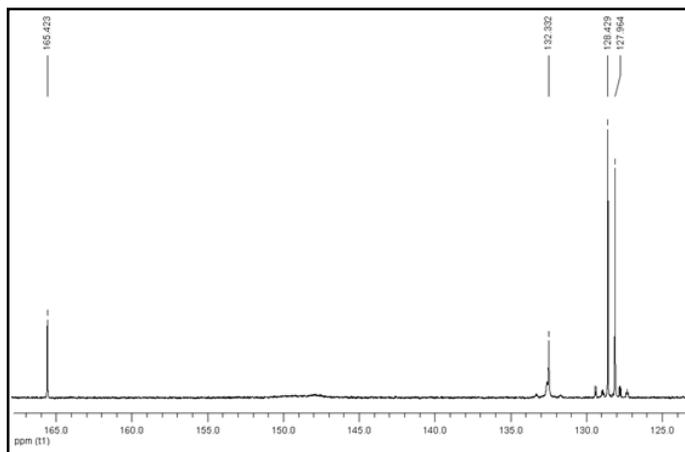
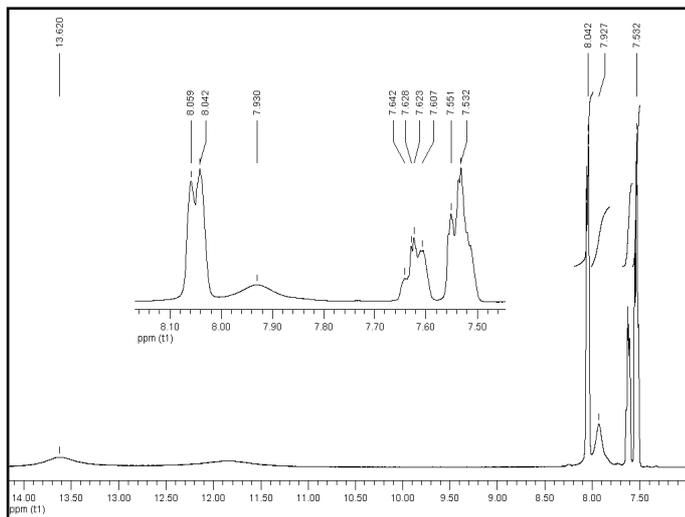
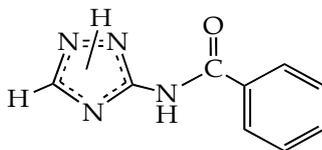
3-amino-1-naftansulfonil-1,2,4-triazol (anstrz, N):



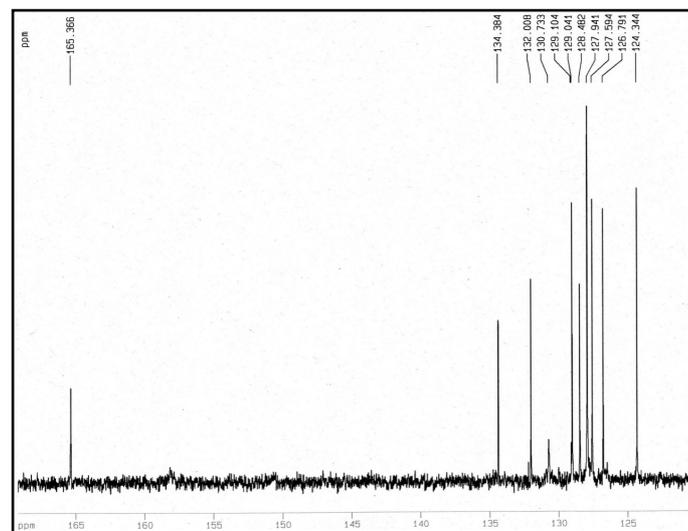
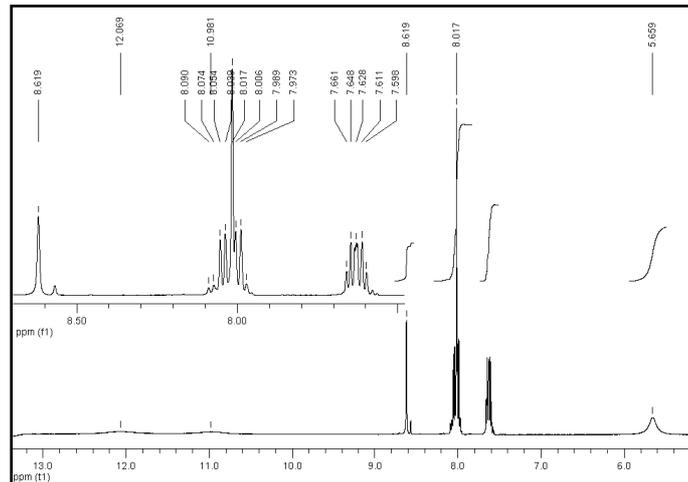
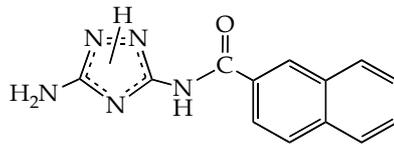
3,5-diamino-1-naftalensulfonil-1,2,4-triazol (danstrz, M):

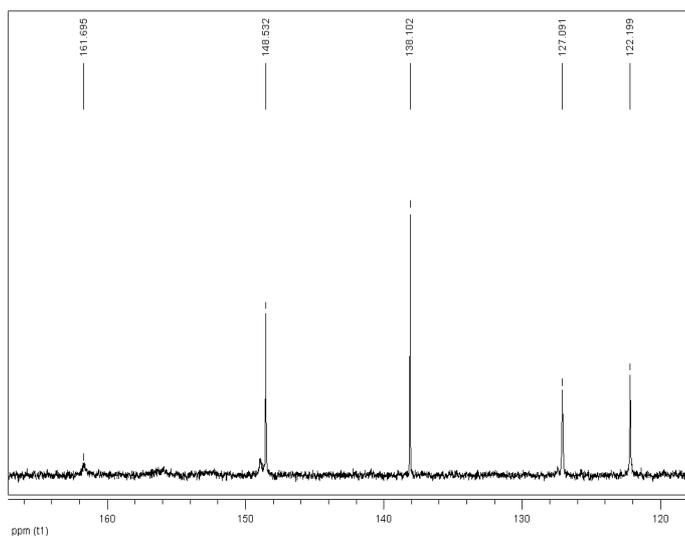
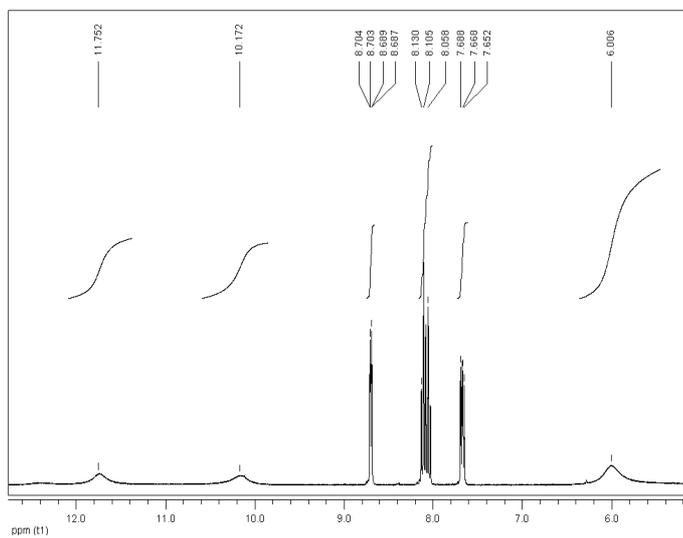
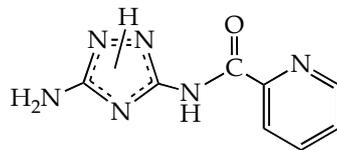


3-bencilamino-1,2,4-triazol (Hbatrz, H₂P)

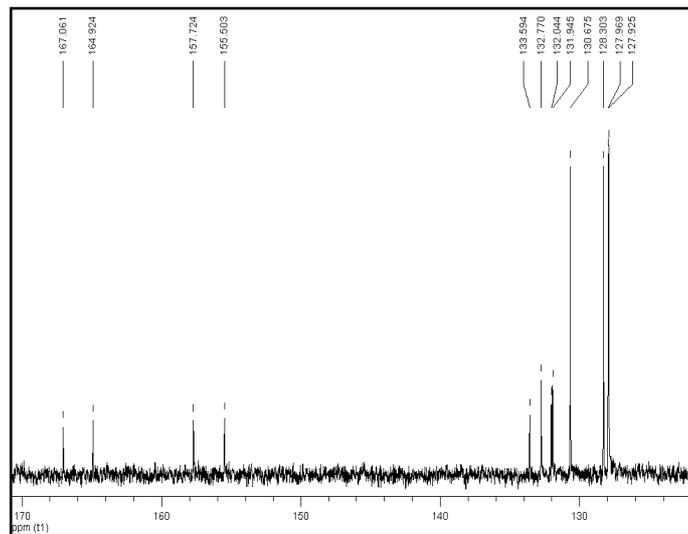
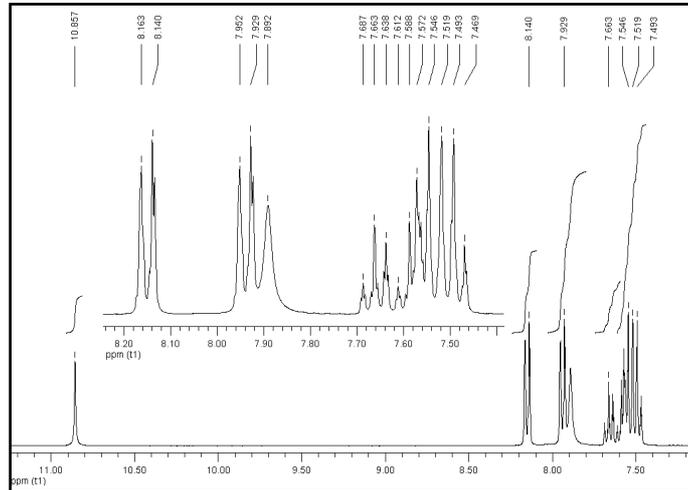
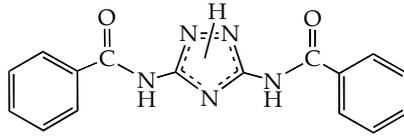


3-amino-5-naftalencarbonilamino-1,2,4-triazol (Hanatz, H₂O)

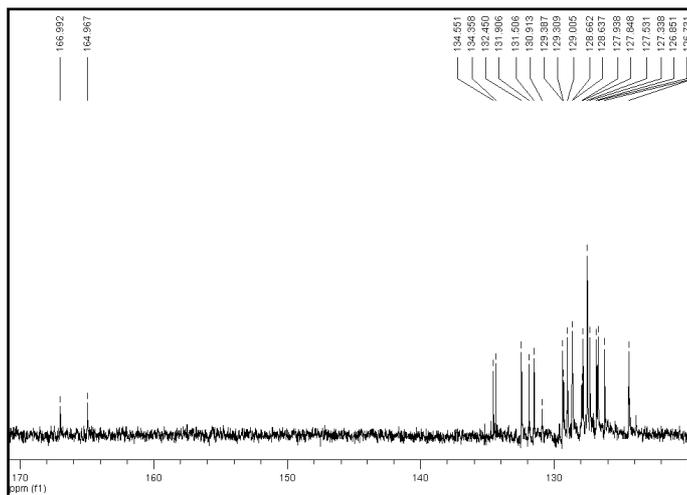
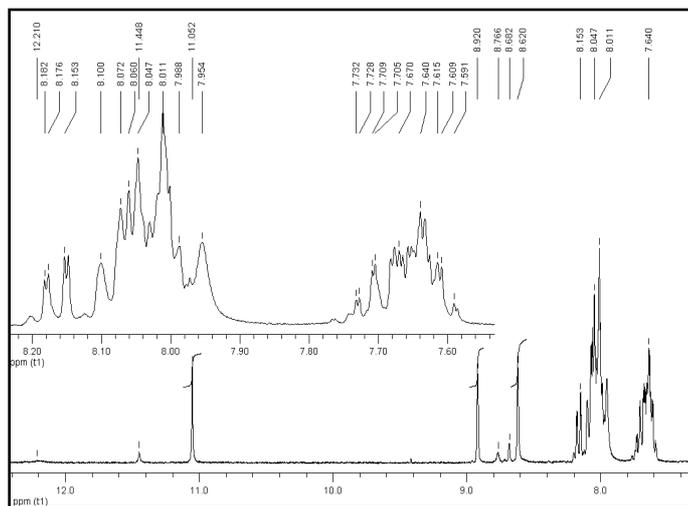
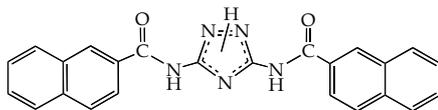


5-amino-3-picolinamido -1,2,4-triazol (Hapitrz, H₂V)

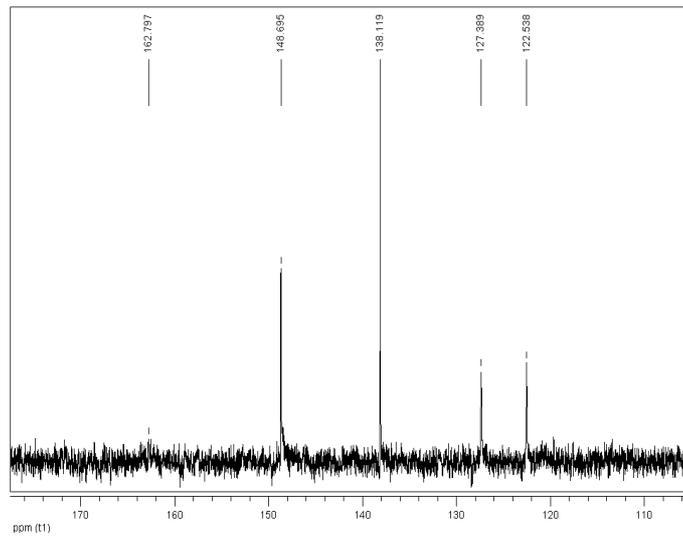
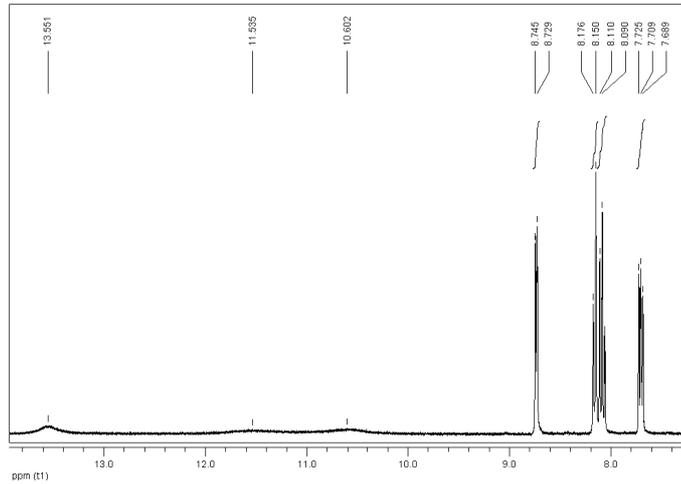
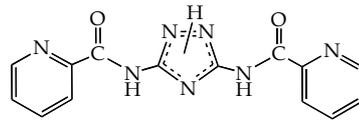
3,5-di(bencilamido)-1,2,4-triazol (Hdbtrz, H₃diQ)



3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol (Hdnctrz, H₃diO)



3,5-di(picolinamido)-1,2,4-triazol (Hdpitrz, H₃diV)



Anexo III. Estudio de Rayos-X del ligando 5-amino-3-picolinamido-1,2,4-triazol (H_2V)

Detalles experimentales cristalográficos del monocristal H_2V

Compound	5-amino-3-picolinamido -1,2,4-triazol (H_2V)
Empirical formula	C8 H8 N6 O
Formula weight	204.20
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Tetragonal, P 41 21 2
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α (°)
	β (°)
	γ (°)
Volume (Å ³)	2001.69(17)
Z, Calculated density (mg/m ³)	8, 1.355
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.815
F(000)	848
Crystal size (mm)	0.15 x 0.09 x 0.05
θ range for data collection (deg)	2.33 to 27.49
Limiting indices	-12<=h<=12
	-8<=k<=8
	-28<=l<=27
Reflections collected/unique	4484 / 2302
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2302 / 0 / 137
Goodness-of-fit on F ²	0.998
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$] (R_1 , ωR_2)	0.0428, 0.0957
R indices (all data) (R_1 , ωR_2)	0.0882, 0.1150
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.130 and -0.129

Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura de H₂V

A colorless prismatic crystal of "N-(5-amino-1H-1,2,4-triazol-3-yl)picolinamide" was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at room temperature, using a Bruker Nonius Kappa CCD 2000 diffractometer on FR591/MoK(alpha). The data were processed with COLLECT [I] and DENZO-SMN [II]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [III] and refined by full-matrix least-squares techniques against F^2 using SHELXL-97 [III]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. Hydrogen atoms were located in difference map and included as fixed contributions riding on attached atoms with isotropic thermal parameters 1.2 times those of their carrier atoms. The Flack X parameter (absolute structure parameter) was calculated to be 0.02(2) for the present structure and 0.98(2) for the inverted structure, thus providing strong evidence that the absolute structure has been assigned correctly [IV]. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from PLATON [VI].

Bibliografía

Toma de datos, resolución y refinamiento de las estructuras. Gráficos

- [I] Nonius (2000). COLLECT, Nonius BV, Delft. The Netherlands.
- [II] Z. Otwinowski and W. Minor (1997). *Methods in Enzimology*, Vol. 276, *Macromolecular Crystallography, Part A*, edited by C. W. Cortes Jr. & R. M. Sweet, pp 307-326. New York: Academic Press.
- [III] G.M. Sheldrick (2008). *Acta Cryst. A*64, 112-122.
- [IV] H.D. Flack (1983). *Acta Cryst. A*39, 876-881.
- [V] A. J. C. Wilson (1995). *International Tables for Crystallography*. Vol. C, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- [VI] A.L. Spek (2003). *J. Appl. Cryst.*, 36, 7-13.

CAPÍTULO II

COMPLEJOS COBRE-TRIAZOL
COMO NUCLEASAS OXIDATIVAS

La química de coordinación de los ligandos 1,2,4-triazol ha sido ampliamente investigada para el diseño y síntesis de compuestos de coordinación con nuevas propiedades magnéticas, ópticas, de transición de espín, etc.¹⁻³

El interés por estos ligandos radica en su versatilidad para conectar centros metálicos de diversas formas.⁴⁻¹⁴ Sin embargo, el uso de sistemas triazol como agentes capaces de interactuar y/o romper el ADN constituye un área aún poco explorada.

Su potencial uso en la construcción de metalonucleasas se basa en tres aspectos:¹ (i) su similitud con los imidazoles (ampliamente repartidos en la Naturaleza) permite obtener sistemas análogos a los encontrados en los centros activos de las metaloenzimas; (ii) la posición de sus átomos dadores en el anillo de 5 miembros favorece su papel como ligando puente entre iones metálicos de transición; (iii) su facilidad para incorporar sustituyentes con grupos funcionales de interés (i.e. anillos aromáticos, grupos hidrofóbicos/hidrofílicos,...) los habilita como precursores en la síntesis de ligandos polivalentes.

Pese a las muchas oportunidades que ofrecen estos sistemas, se han publicado pocos trabajos que exploren sus posibilidades en el campo de las metalonucleasas. Destaca el complejo dinuclear $[\text{Cu}_2\text{L}_1(\mu\text{-SO}_4)](\text{PF}_6)_2$ $\{\text{L}_1 = 3,5\text{-bis}[\text{bis}(\text{piridina-2-ilmetil})\text{amino}]\text{metil-4-amino-1,2,4-triazol}\}$, descrito por Yan y col., capaz de generar cortes sencillos y dobles en la doble hebra del ADN tanto en condiciones aeróbicas como en anaeróbicas.¹⁵ Asimismo, Dallavelle y col. han estudiado un par de complejos mononucleares con ligandos triazol $[\text{L}_2 = 4\text{-amino-3-(2-piridil)-5-tioxo-1,2,4-triazol}]$ y $[\text{L}_3 = 4\text{-amino-5-metiltio-3-(2-piridil)-1,2,4-triazol}]$ y cobre con actividad antiproliferativa frente a células neoplásticas.¹⁶

En este contexto, durante los últimos años nuestro grupo de investigación ha desarrollado una serie de metalonucleasas de cobre con ligandos triazol 3,5-disustituídos. Los compuestos mononucleares $[\text{Cu}(\text{Hapt})(\text{H}_2\text{O})_2(\text{SO}_4)]$ y $[\text{Cu}(\text{Hapt})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)]\text{NO}_3$ (Hapt = 5-amino-3-piridil-1,2,4-triazol),¹⁷ y el dinuclear $[\text{Cu}(\text{daat})(\text{ClO}_4)(\text{CH}_3\text{OH})_2]$ (Hdaat = 3,5-diamino-1,2,4-triazol)¹⁸

mostraron actividad nucleasa y constituyen los primeros resultados de esta línea de trabajo.

El objetivo del presente Capítulo es obtener una familia de complejos de cobre(II) con ligandos 1,2,4-triazol capaces de interaccionar con el ADN y actuar así como nucleasa sintéticas efectivas. En segunda instancia se pretende extraer conclusiones sobre la relación estructura-actividad.

En la Introducción de este Capítulo II (apartado II.A) se recogen dos ejemplos de sistemas nucleasa con conocida actividad así como las *estrategias* más recientes empleadas por los distintos autores para el desarrollo de *nuevas* (más eficientes) nucleasas sintéticas oxidativas.

En los apartados II.B y II.C se estudia el resultado de incluir sustituyentes aromáticos en la estructura básica del anillo triazol. Se mostrará que, aunque la incorporación de un grupo aromático puede conducir a una mejor interacción con el ADN, esta mejoría no siempre produce un aumento de la actividad nucleolítica.

En los apartados II.D y II.E se pone de manifiesto la comentada facilidad del sistema triazol para actuar como ligando puente entre centros metálicos, y su repercusión en las propiedades bioinorgánicas. Las especies polinucleares, *a priori*, presentan ventajas con respecto a las mononucleares: posibilidad de formar especies reactivas sin necesidad de un *equivalente* extra de complejo, aumento de carga positiva y con ello de la afinidad por el ADN, potencial cooperatividad entre centros metálicos,... Además, se describe la obtención de especies polinucleares inusuales con interés en la química de coordinación.

II.A INTRODUCCIÓN

Como se comentó en la introducción general de esta *Tesis Doctoral*, los **complejos de los metales de transición** destacan como candidatos a actuar como nucleasas artificiales oxidativas debido a su diversidad estructural y a su reactividad. Este tipo de nucleasas combinan las propiedades redox del centro metálico y del dioxígeno **para generar especies reactivas de oxígeno (ROS)** capaces de producir la rotura oxidativa del ADN mediante la eliminación de átomos de H del azúcar y/o la oxidación de las nucleobases.

Un factor limitante de estos sistemas lo constituye la *distancia* del ADN a la cual se generan las especies ROS. Por ejemplo, el radical $\cdot\text{OH}$, extremadamente reactivo, necesita generarse en la proximidad de su diana de acción o, de lo contrario, puede reaccionar con otro tipo de sustratos. Así, el sistema $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{EDTA})]^{2-}$, estudiado por Tullius y col.,¹⁹ produce un gran número de radicales hidroxilo en presencia de H_2O_2 ; sin embargo, el sistema resulta inactivo frente al corte del ADN (incluso a altas concentraciones de metal) debido a que posee una baja afinidad por el polianión (nucleasa y ADN cargados negativamente).

Por ello, en los últimos años los químicos bioinorgánicos han tratado de desarrollar sistemas capaces de interactuar con el ADN de una forma más efectiva pero sin alterar las propiedades redox del centro metálico. A continuación se describen dos de los sistemas más estudiados y se resumen algunas estrategias utilizadas en la bibliografía para mejorar la eficacia nucleolítica de los compuestos metálicos.

II.A.1 Nucleasas sintéticas oxidativas “clásicas”

II.A.1.1 Fe-bleomicina

El sistema **Fe-BLM** (BLM = bleomicina) es uno de los sistemas más ampliamente estudiado en la bibliografía. Las bleomicinas, aisladas de las bacterias *Streptomyces verticillus* hace más de 40 años,²⁰ son una familia de antibióticos naturales glicopeptídicos con conocida actividad antitumoral.

El fármaco se administra en ausencia de metal y se compone predominantemente de dos formas (figura II.1): 60% de la forma BLM A₂ y 30% de la forma BLM B₂. La naturaleza del cofactor metálico *in vivo* (Fe o Cu) es difícil de conocer, aunque el Fe parece ser la opción más probable.^{21,22} La actividad citotóxica de las BLMs proviene del corte oxidativo del ADN en presencia de un metal con actividad redox (Fe^{II/III}), O₂ y un agente reductor.

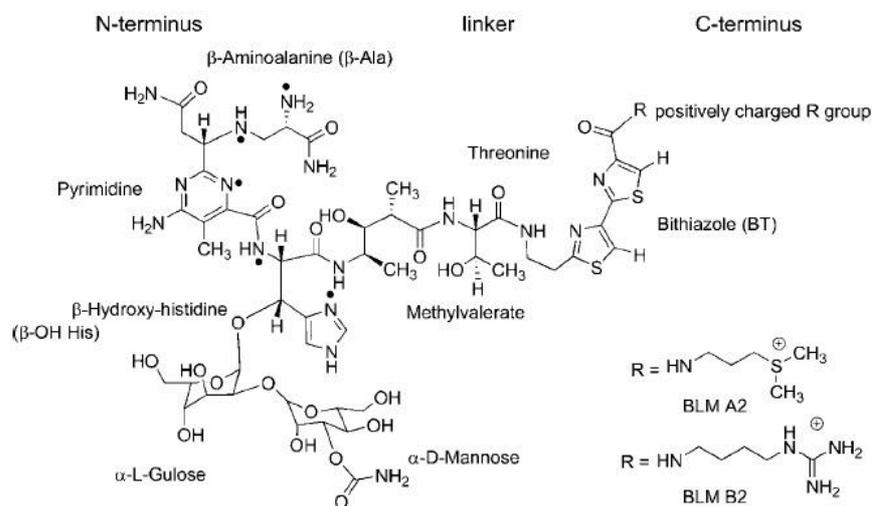


Figura II.1. Estructura de la bleomicina. Los diferentes tipos de bleomicina varían con el grupo R. Los átomos de nitrógeno implicados en la coordinación al ion metálico están indicados con un punto (\bullet).

Sin embargo, y pese a ser uno de los sistemas más estudiado durante los últimos 40 años, diversos factores como la naturaleza de las especies activas, el lugar de unión al ADN y el mecanismo de corte siguen aún bajo debate.

Por ejemplo, aún no se conoce con total seguridad la especie activa que produce el corte del ADN. Hasta el momento, la especie BLM-Fe^{III}-OOH es la última especie activa que ha podido ser detectada. Esta especie puede ser generada mediante dos caminos (esquema II.1):

- (i) En el primero se da una sucesión coordinada de eventos: reducción inicial (mediada por el agente reductor) a BLM-Fe^{II}; unión al O₂; formación de un intermedio Fe^{III}-superóxido y; generación de BLM-Fe^{III}-OOH.
- (ii) En el segundo el compuesto BLM-Fe^{III} se une al H₂O₂ y, posteriormente se pierde un protón.

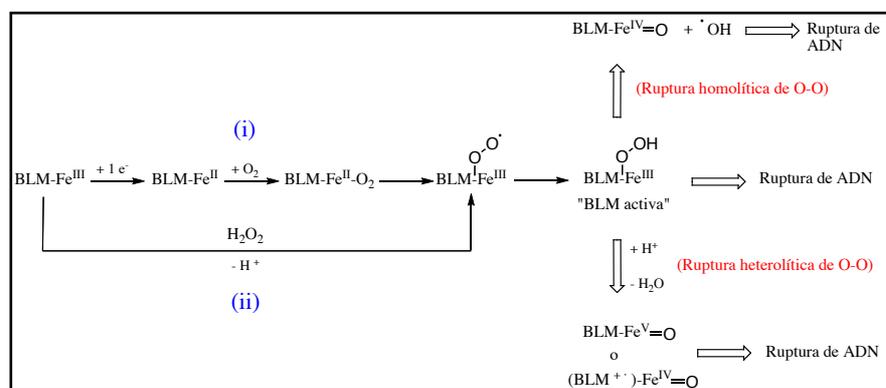


Figura II.1. Mecanismos propuestos para la activación del sistema BLM-Fe^{II} (adaptado de ²³).

Otro tema de debate se centra en su diana de unión al ADN. Las secuencias 5'-GC-3' o 5'-GT-3' parecen ser los sitios de unión más comunes del sistema Fe-BLM, sin embargo, se ha demostrado que otras secuencias tipo 5'-GA-3' y 5'-AT-3' también pueden sufrir cortes de forma eficiente.²⁴⁻²⁶

II.A.1.2 [Cu(phen)₂]²⁺

La exploración de **compuestos de cobre como nucleasas químicas** está muy bien documentada debido a que poseen un potencial redox accesible para sistemas biológicos y una elevada afinidad por las nucleobases.²⁷ Entre ellos, el ejemplo más conocido y mejor estudiado es el sistema [Cu(phen)₂]²⁺ (phen = 1,10-fenantrolina), ampliamente usado como agente para marcar (*footprinting*) el ADN y el ARN.²⁸⁻³⁰

La actividad de corte del ADN promovida por este sistema y usando H₂O₂ como cofactor, fue documentada por Sigman y col. en 1979.³¹ La metalonucleasa produce principalmente cortes sencillos del ADN a través de la oxidación de los grupos azúcares. Dos tipos de complejos son capaces de mediar estas reacciones: [Cu^I(phen)]⁺ y [Cu^I(phen)₂]⁺, aunque el segundo es claramente más eficiente.^{29,32-36}

Estudios cinéticos demuestran que la actividad nucleasa del sistema [Cu^{II}(phen)₂]²⁺ ocurre a través de un mecanismo ordenado: el sistema [Cu^{II}(phen)₂]²⁺ en presencia de un agente reductor se reduce a [Cu^I(phen)₂]⁺, el cual se une de forma reversible al ADN formando un complejo phen-Cu(I)-ADN. A su vez, este complejo es oxidado por oxígeno molecular o peróxido de hidrógeno, endógeno o exógeno, dando lugar a especies activas cobre-oxígeno que atacan al ADN y producen la rotura de la doble hebra.³⁷

Estudios de interacción (dicroísmo circular, viscosimetría, espectroscopia UV-visible y ensayos con agentes de interacción específicos) revelan que la interacción con el ADN se produce a través del surco menor y mediante una intercalación parcial entre las bases nitrogenadas (este tema se discutirá con mayor detalle en el Capítulo III apartado III.C).³⁸

Sin embargo, y a pesar del amplio estudio realizado sobre este sistema, la naturaleza exacta de las especies reactivas implicadas en el proceso de ruptura del ADN no se conoce con exactitud. La única conclusión sobre la que no hay duda es que el radical hidroxilo (al menos en su forma libre y difusible) no es responsable del corte de la doble hebra.^{39,40}

Uno de los problemas que presenta esta nucleasa es la baja afinidad del $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})]^{2+}$ por el segundo equivalente de fenantrolina. Diversos grupos han tratado de mejorar el sistema mediante la unión de dos unidades phen. El mejor diseño de entre los descritos es el que utiliza el ligando Clip-phen, estudiado por Meunier y col.,^{41,42} que consta de dos unidades phen enlazadas covalentemente mediante un agente espaciador. La posición y naturaleza de este grupo espaciador tienen una gran influencia en la reactividad. De hecho, entre las diferentes alternativas probadas, el ligando con puente serinol entre los carbonos C3 de las dos unidades phen (conocido como 3-Clip-phen), es el que se ha mostrado más activo. Este compuesto en presencia de agente reductor y aire es capaz de cortar plásmido ΦX174 ADN con una eficiencia unas 60 veces mayor que el sistema $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$.

II.A.2 Estrategias en el desarrollo de “nuevas” nucleasas sintéticas oxidativas

Las revisiones más actuales del tema coinciden en que el diseño de una metalonucleasa eficiente debe perseguir dos objetivos fundamentales: **gran afinidad por el ADN y elevada capacidad quelante del metal**. La primera propiedad garantiza que las especies ROS generadas permanezcan próximas a la doble hebra; la segunda asegura la unión del metal y posterior activación del dioxígeno. Sin embargo, cualquier cambio estructural y/o químico de un sistema activo, por pequeño que sea, puede conducir a la disminución de su actividad nucleolítica.

Introduciremos a continuación tres de las modificaciones que se han venido realizando para mejorar la interacción con el ADN.

II.A.2.1 Agentes que contienen ligandos con carga positiva

El cambio más sencillo se basa en la incorporación de residuos amino en la estructura de la nucleasa. Estos grupos, protonados a pH fisiológico, garantizan la interacción electrostática con el polianión de ADN.

En este sentido, Cowan y col.⁴³ han estudiado el corte producido por dos sistemas análogos, [GGH-Cu]⁻ y [KGHK-Cu]⁺, cuya diferencia radica fundamentalmente en la carga neta. Los autores encontraron que ambos compuestos cortan el ADN mediante un mecanismo oxidativo (el estudio en condiciones hidrolíticas no muestra actividad), y que el sistema [KGHK-Cu]⁺ es más activo que el compuesto [GGH-Cu]⁻ (figura II.2). Los autores razonan esta diferencia en base al mayor poder de interacción del sistema [KGHK-Cu]⁺ (cargado positivamente) con respecto al sistema [GGH-Cu]⁻ (cargado negativamente).

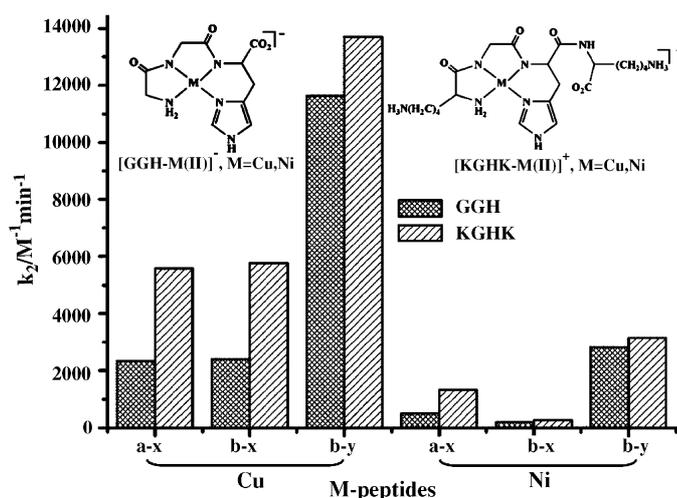


Figura II.2. Capacidad de corte del ADN por dos sistemas péptido-metal (basado en ⁴³).

II.A.2.2 Agentes polinucleares

Otra forma de aumentar la carga positiva del complejo consiste en utilizar sistemas multinucleares. Así, los **complejos de cobre polinucleares** han sido objeto de una amplia investigación debido a que ofrecen las ventajas anteriormente mencionadas respecto a sus análogos mononucleares: no necesitan un *equivalente* extra de complejo, facilitan la interacción electrostática,...⁴⁴

Estas características han sido estudiadas por Karlin y col.⁴⁵ Uno de sus ejemplos más notables es un compuesto trinuclear de Cu(II) que posee dos tipos de centros metálicos (figura II.3). El compuesto trinuclear es capaz de degradar el ADN en presencia de un agente reductor y O₂ mientras que los dos análogos mononucleares, utilizados como controles, no. Este resultado indica que el reconocimiento y posterior reactividad del compuesto trinuclear dependen de que los tres centros metálicos estén ubicados en un mismo compuesto.

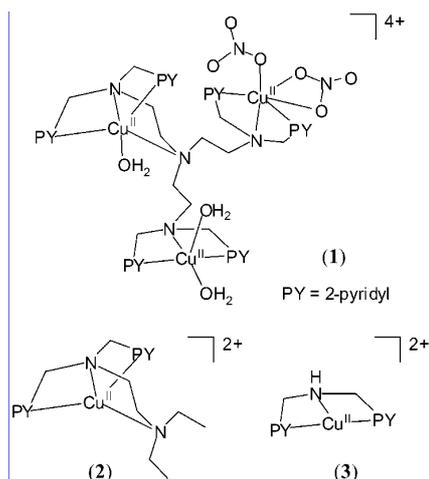


Figura II.3. Ejemplo del complejo trinuclear (1) y de sus análogos mononucleares (2 y 3) desarrollados por Karlin y col.⁴⁵

Guo y col. han obtenido resultados similares.²⁷ Por ejemplo, el complejo Cu₃-L [L = *N,N,N',N',N'',N''*-hexa(2-piridil)-1,3,5-tris(aminometil)benceno] es capaz de degradar plásmido pBR322 a sus formas II y III mientras que el sistema mononuclear control [Cu-DPA (DPA = 2,2'-dipiridilamina)] no. La comparación de la actividad nucleasa, a concentraciones equivalentes de cobre, revela que el sistema Cu₃-L es considerablemente más activo que su derivado mononuclear Cu-DPA. Los autores también sugieren que la mayor atracción electrostática del sistema trinuclear puede ayudar en este aumento de actividad observado.

En este sentido, Borrás y col. han diseñado un sistema trinuclear con tres átomos de cobre dispuestos de forma lineal y conectados mediante un doble puente hidroxilo + carboxilato.⁴⁶ A una concentración 18 μM , el compuesto $[\text{Cu}_3(\text{L})_2(\text{HCOO})_2(\text{OH})_2]_\infty$ [siendo HL = (N-piridil-2-metil)benzenosulfonamida] es capaz de degradar el ADN de forma más efectiva que la sal de cobre (72 μM) en presencia de un exceso de H_2O_2 :Asc. Este resultado, de nuevo, sugiere el efecto cooperativo entre los centros metálicos del compuesto aislado (figura II.4).

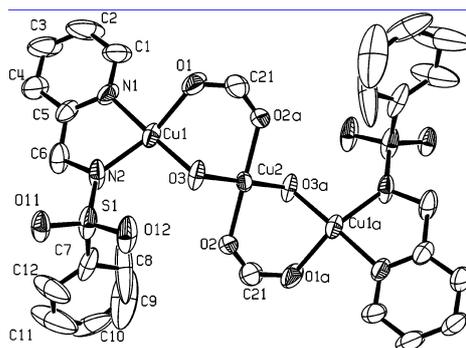


Figura II.4. Estructura del compuesto trinuclear obtenido por Borrás y col.⁴⁶

II.A.2.3 Agentes que contienen grupos con afinidad conocida por el ADN

Otra alternativa para mejorar la interacción del ADN se basa en la conjugación de una molécula con afinidad conocida por la doble hebra con la estructura del ligando. La estrategia más lógica, desarrollada por primera vez por el grupo de J. Barton,⁴⁷ consiste en la incorporación de una superficie aromática capaz de intercalarse entre los pares de bases de la doble hélice.

Chakravarty y col. han estudiado la capacidad nucleasa de complejos ternarios de Cu(II) de tipo CuLL' en los que L es un aminoácido y L' un ligando aromático (dppz = dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina, dpq = dipirido[3,2-d:2'3'-f]quinoxalina y phen = 1,10-fenantrolina).⁴⁸⁻⁵⁰ Su estudio muestra que la actividad de corte aumenta conforme aumenta el carácter aromático de L' (actividad: dppz > dpq > phen). Los autores concluyen que en este tipo de

sistemas una mayor aromaticidad conduce a una mejor interacción de la nucleasa con el ADN y, por último, a un aumento de la actividad nucleolítica.

En este contexto, Roelfes y col. han publicado la síntesis de dos derivados $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-N}_4\text{Py}$ -acridina (figura II.5).⁵¹ El N_4Py [*N,N*-bis(2-piridil)-*N*-bis(2-piridil)metilamina] actúa como modelo del ligando BLM mientras que la acridina es un conocido *intercalante*. Los dos derivados sólo varían en la posición de sustitución del derivado acridina. En el primero, el grupo 9-aminoacridina se encuentra en la posición 5 del anillo de isoftalamida (sustitución 1,3,5), y en el segundo el grupo 9-aminoacridina se encuentra en la posición 2 del anillo central (sustitución 1,2,3).

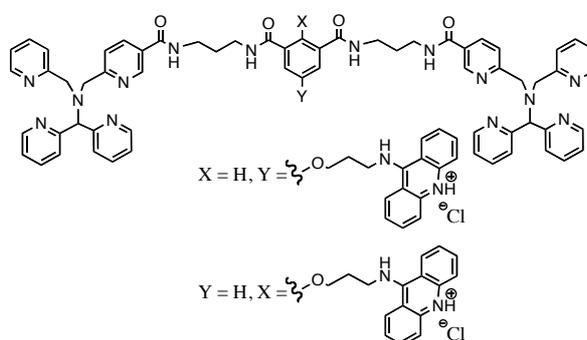


Figura II.5. Estructura de los dos ligandos $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-N}_4\text{Py}$ -acridina (Roelfes y col.⁵¹).

El estudio de su actividad nucleasa ofrece diferentes resultados para cada derivado, siendo el derivado en posición 2 el más activo ($t_{1/2} \approx 10$ min para el derivado en posición 2 frente a $t_{1/2} \approx 25$ min para el derivado en posición 5). Además, sólo el derivado en posición 2 muestra un patrón de corte doble del ADN (*especificidad*).

Los autores afirman que estas diferencias observadas entre los dos derivados están relacionadas con la posición relativa del grupo 9-aminoacridina con respecto a las unidades $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-N}_4\text{Py}$. Cuando el derivado en posición 5 intercala en el ADN, las dos unidades centrales de Fe quedan alejadas de la doble hebra, reduciéndose así la posibilidad de corte, mientras que en el caso del derivado 2, los centros de Fe apuntan directamente hacia el ADN, facilitando la

oxidación del ion metálico y posterior corte de la doble hebra. Este resultado es importante a la hora de recalcar que no siempre la adición de una unidad con conocida afinidad al ADN aporta una mejora en el sistema y que, además, la correcta disposición del grupo conjugado resulta importante.

El uso de agentes intercalantes se encuentra limitado cuando se desea un reconocimiento específico de una secuencia de ADN; por ello, otra alternativa se basa en la conjugación del ligando con unidades de reconocida especificidad por el ADN. En este grupo destacan compuestos con derivados del Hoechst 33258 [i.e el sistema Mn-TMPyP-Hoechst,⁵² siendo TMPyP = meso-tetrakis-(1-metilpiridinio-4-il)porfirina] y la Cu-phen-Hoechst⁵³ o de la distamicina (i.e el sistema Fe-EDTA-distamicina⁵² y la Cu-phen-distamicina⁵³), capaces de interactuar de forma específica con secuencias A-T. De nuevo, la conjugación con estas moléculas puede conducir a la disminución de la actividad con respecto al sistema inicial. Así, el sistema Cu-salen-distamicina {H₂salen = 2,2' [etano-1,2-diilbis(nitrilometilidino)]difeno] muestra una disminución radical de la actividad nucleolítica con respecto al Cu-salen.⁵³

II.A.3 Auto-activación en nucleasas oxidativas

Recientemente ha surgido una clase nueva de nucleasas oxidativas que son capaces de degradar el ADN sin el concurso de un cofactor químico (reductor/oxidante).

El primer ejemplo de este tipo, descrito por Reedijk, Gámez y col.,⁵⁴ es un compuesto Cu^{II}-pirimol capaz de degradar el ADN tanto en presencia como en ausencia de agente reductor (figura II.6). Una concentración de 10 μM de este compuesto es capaz de convertir hasta el 75 % de plásmido ΦX174 superenrollado a su forma circular relajada a 37 °C. Los autores afirman que el mecanismo debe ser oxidativo debido a que la prueba con la ligasa T4 es negativa y la actividad no es inhibida en presencia de agentes captadores de radicales oxígeno; además, sugieren un mecanismo de corte auto-activado (*self-activating*), presumiblemente iniciado por la intercalación del ligando pirimol planar entre las bases nitrogenadas

y la subsiguiente reducción de Cu^{2+} a Cu^+ .

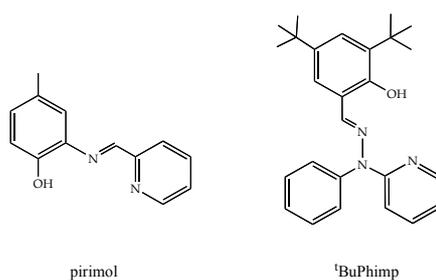


Figura II.6. Ligandos desarrollados por Gámez⁵⁴ y Ghosh.⁵⁵

Ghosh y col. también han sintetizado un compuesto mononuclear, el Cu-tBuPhimp ($\text{Cu-tBuPhimp} = (\text{E})\text{-2,4-di-tert-butil-6-}[[\text{fenil(piridin-2-il)hidrazono]metil]fenol}$), que degrada el ADN sin necesidad de agente activante (figura II.6).⁵⁵ Según los autores, el ligando podría estar implicado en el proceso redox que conduce a la formación de las especies ROS.

II.B TRES COMPUESTOS COBRE-TRIAZOL “SENCILLOS”: SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y ESTUDIO BIOINORGÁNICO

II.B.1 Antecedentes y objetivos

Como se ha comentado en la Introducción de la presente *Tesis Doctoral*, una estrategia usual para conseguir cierto control sobre el comportamiento de coordinación en sistemas pequeños ricos en heteroátomos (como los 1,2,4-triazoles) consiste en introducir **sustituyentes quelantes**.² Se han descrito derivados con sustituyentes *N*-dadores monosustituídos, como el ligando 3-piridin-2-il-1,2,4-triazolato (pt),^{56,57} o disustituídos, como el ligando 3,5-bis(piridin-2-il)-1,2,4-triazol (bpt)^{58,59} o el ligando 4-amino-3,5-bis(aminometil)-1,2,4-triazol (aamt).^{60,61} Los tres ligandos mencionados, formadores de anillos quelatos de 5 miembros, generan compuestos dinucleares de cobre(II). Con el ligando pt se han obtenido compuestos con puentes 1,2,4-triazol asimétricos,⁵⁷ y con los otros dos geometrías regulares.^{58,60}

Otro derivado relacionado, pero con sustituyentes *O*-dadores, es el 3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol (Hdaat), estudiado por nuestro grupo.⁶² Los sustituyentes en posiciones 3 y 5 presentan átomos de oxígeno carbonilo en posiciones adecuadas para formar anillos quelatos de 6 miembros. El primer compuesto obtenido con este ligando, [Cu(daat)(ClO₄)(CH₃OH)]₂, es un dímero simétrico de cobre(II) con actividad nucleolítica (ver Introducción).¹⁸

En este Capítulo se pretende preparar compuestos de Cu(II) a partir de una serie de ligandos análogos al 3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol, pero con sustituyentes aromáticos (fenilo o naftilo) para estudiar de qué modo la inclusión de estos grupos modifica las propiedades biológicas del sistema.

Por reacción de los ligandos 3-bencilamino-1,2,4-triazol (**H₂P**), 3,5-di(bencilamino)-1,2,4-triazol (**H₃diQ**) y 3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol (**H₃diO**) (sintetizados en el Capítulo I) con sales de cobre(II), se han aislado tres nuevos compuestos, uno mononuclear [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (**1**) y dos dinucleares, [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH] (**2**) y [Cu(H₃diO)(NO₃)₂·2DMSO] (**3**). Se describe aquí su síntesis y su caracterización espectroscópica y estructural. A continuación se presenta el estudio de interacción y actividad nucleasa de los dos compuestos con solubilidad adecuada (**1** y **2**). Por último, se discuten las consecuencias de incluir estos grupos aromáticos en la estructura de las metalonucleasas.

II.B.2 Síntesis de los compuestos 1-3

Se han aislado y caracterizado tres compuestos de cobre(II) a partir de los ligandos 3-bencilamino-1,2,4-triazol (**H₂P**), 3,5-di(bencilamino)-1,2,4-triazol (**H₃diQ**) y 3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol (**H₃diO**), respectivamente. Los ligandos se prepararon para esta *Tesis Doctoral*. La síntesis y caracterización de los mismos se describe en la sección I.B.1.2 del Capítulo I.

II.B.2.1 Síntesis de [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (1)

Se disolvieron 0,198 g (1 mmol) de H₂P en 40 mL de metanol a 85°C en un sistema de reflujo. Sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 0,189 g (0,5 mmol) de Cu(ClO₄)₂·6H₂O en 10 mL de metanol. La disolución mezcla, de color azul celeste, se mantuvo en agitación durante 15 minutos. A continuación se filtró en caliente para eliminar posibles impurezas y se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristizador cubierto con Parafilm. (La relación de reactivos es, por tanto, H₂P/Cu(II) = 1:0,5). Tras aproximadamente un mes se observaron cristales prismáticos azules, los cuales se filtraron y se lavaron con metanol frío. (Rendimiento aproximado de la síntesis: *ca.* 0,160 g (*ca.* 50%). Si la filtración se efectúa a temperatura ambiente se produce una precipitación en masa y se obtiene el mismo compuesto pero en forma de sólido microcristalino con un rendimiento mayor. Rendimiento: *ca.* 0,224 g (*ca.* 70 %). Análisis Elemental (realizado sobre monocristales): Calculado para C₁₈H₁₆Cl₂CuN₈O₁₀ (638,82): C: 33,84; H: 2,52; N: 17,54. Encontrado: C: 33,73; H: 2,51; N: 17,29. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}(\text{cm}^{-1})$: [$\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})$] 3500b,w, 3274 s; [$\nu(\text{C=O})$] 1624-1610d,s; [$\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}}$] 1573m, 1479m, 1371m; [$\nu(\text{ClO}_4)$] 1147m-1090vs-1029s; 903m. ESI-MS+ (H₂O): 711,1 {[Cu(H₃P)(H₂P)(ClO₄)₂], DMF}⁺; 686,9 {[Cu(HP)(H₂P)], 2DMF}⁺; 537,8 [Cu(H₂P)₂(ClO₄)]⁺. UV-vis (DMF): *ca.* 650 nm (CuN₂O₂+O₂').

II.B.2.2 Síntesis de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)]_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ (**2**)

A una disolución de 0,371 g (1 mmol) de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de metanol se le añadieron 0,203 g de ligando H_3diQ suspendidos en 20 mL de metanol, consiguiéndose la completa disolución del ligando tras agitación a temperatura ambiente. La disolución resultante, de color verde hierba, se filtró para eliminar posibles impurezas y se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristalizador cubierto con Parafilm. Tras aproximadamente 15 días se observaron cristales prismáticos de color azul. El estudio de rayos-X de uno de ellos reveló que corresponden al compuesto **2**.

Al cabo de dos días, a partir del líquido de filtrado, de color también verde, se formaron otros cristales prismáticos, de color marrón oscuro y morfología distinta a la de los anteriores. El análisis del espectro IR de estos cristales marrones confirmó que se trata de un compuesto diferente a **2**, pero todavía no se dispone de un estudio de rayos-X que confirme la estructura.

Para evitar obtener mezclas de ambos tipos de cristales, se repitió la síntesis inicial y, en cuanto aparecieron los cristales azules, se procedió a aislarlos por filtración. Los cristales se lavaron con metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Por último, cuando el segundo líquido de filtrado, de color verde pálido, estaba próximo a sequedad, se formó un tercer tipo de cristales, fusiformes, de color verde. Uno de estos cristales se ha sometido ya a estudios de difracción de rayos-X, el cual ha revelado que la estructura corresponde al compuesto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{Q})_2(\text{ClO}_4)_2]$. Este compuesto, que contiene el ligando monoacilo 3-amino-5-benzamido-1,2,4-triazol (H_2Q), no se incluye en el presente trabajo.

El rendimiento de la síntesis de **2** es, por todo lo anteriormente expuesto, bajo (aproximadamente del 5%). La síntesis aquí descrita ha podido ser reproducida, al menos, tres veces. Análisis Elemental (realizado sobre monocristales azules): Calculado para $\text{C}_{34}\text{H}_{34}\text{Cl}_2\text{Cu}_2\text{N}_{10}\text{O}_{14}$ (1004,69): C: 40,45; H: 3,41; N: 13,94. Encontrado: C: 40,45; H: 3,37; N: 13,98. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): [$\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})$] 3471b,m, 3300sh; [$\nu(\text{C=O})$] 1624sh; 1607s;

$[\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]$ 1572vs, 1498-1479d,m, 1396w;
 $[\nu(\text{ClO}_4)]$ 1141s, 1121-1090d,s; 898vw. ESI-MS+ (H_2O): 1158,9
 $\{[\text{Cu}(\text{H}_3\text{diQ})(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)]_2, 3\text{DMF}\}^+$; 1083,2
 $\{[\text{Cu}(\text{H}_3\text{diQ})(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)]_2, 2\text{DMF}\}^+$; 836,2 $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{diQ})_2(\text{ClO}_4)]^+$. UV-
 vis (DMF): *ca.* 670 nm ($\text{CuN}_2\text{O}_2+\text{O}'$).

II.B.2.3 Síntesis de $[\text{Cu}(\text{H}_3\text{diO})(\text{NO}_3)]_2 \cdot 2 \text{DMSO}$ (3)

Se disolvieron 0,407 g (1 mmol) de H_3diO en 10 mL de DMSO a temperatura ambiente. Sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 0,484 g (2 mmol) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 25 mL de metanol. La disolución mezcla, de color verde, se filtró para eliminar posibles impurezas y se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristizador cubierto con Parafilm. (La relación de reactivos es, por tanto, $\text{H}_3\text{diO}/\text{Cu}(\text{II}) = 1:2$). A los dos días aparecieron cristales prismáticos, de color verde, válidos para difracción de rayos-X.

Los cristales se filtraron, se lavaron con metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. (Rendimiento aproximado de la síntesis: *ca.* 0,860 g (*ca.* 70%). Análisis Elemental: Calculado para $\text{C}_{52}\text{H}_{46}\text{Cu}_2\text{N}_{12}\text{O}_{12}\text{S}_2$ (1222,22): C: 51,10; H: 3,72; N: 13,75; S: 5,25. Encontrado: C: 51,32; H: 3,72; N: 13,74; S: 5,26. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): $[\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})]$ 3441b,m, 3265sh; 3058w; $[\nu(\text{C=O})]$ 1633sh; 1605s; $[\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]$ 1596vs, 1507w; 1481-1464d,m, 1396w; $[\nu(\text{NO}_3)]$ 1385s; 1296m. ESI-MS+ (H_2O): 1083,5 $\{[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diO})(\text{NO}_3)]_2, \text{H}_3\text{O}^+\}^+$; 999,3 $\{[\text{Cu}(\text{H}_3\text{diO})(\text{H}_2\text{diO})(\text{NO}_3)]\}^+$; 470,0 $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diO})]_2^{2+}$. UV-vis (DMF): *ca.* 660 nm ($\text{CuN}_2\text{O}_2+\text{O}'$).

II.B.3 Caracterización de 1-3

II.B.3.1 Estructura de rayos-X de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})_2(\text{ClO}_4)_2]$ (**1**)

El cristal está constituido por unidades monoméricas discretas $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})_2(\text{ClO}_4)_2]$. En la figura II.7 se muestra la estructura del compuesto **1** con la numeración detallada de los átomos. Las distancias y ángulos de enlace de interés se presentan en la tabla II.1. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

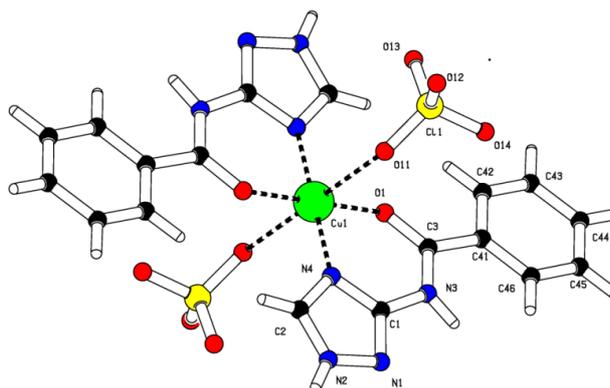


Figura II.7. La unidad mononuclear de **1**.

El ión $\text{Cu}(\text{II})$, en el centro de inversión, se encuentra coordinado ecuatorialmente a dos ligandos H_2P y en posiciones axiales a dos aniones perclorato relacionados cristalográficamente. Cada ligando H_2P actúa como ligando quelato bidentado, uniéndose al catión metálico a través del átomo de nitrógeno N(4) triazólico y del átomo de oxígeno O(1) del grupo acilamido. Este modo de coordinación ha sido previamente observado para el ligando **Haat** (3-acetilamino-1,2,4-triazol).¹ El cromóforo resultante es, por tanto, $\text{CuN}_2\text{O}_2+\text{O}_2'$.

Las distancias ecuatoriales del ión metálico a N(4) y O(1) (1,940 y 1,963 Å, respectivamente) son del mismo orden que las observadas en estructuras similares.⁶³ En posiciones apicales, los aniones perclorato se encuentran a una distancia Cu(1)-O(11) de 2,482 Å, que puede considerarse de semicoordinación.

El anillo quelato, de seis miembros, presenta un ángulo de mordida (*bite*) de $89,63^\circ$. El ligando actúa como tal sin desprotonación. El tautómero presente en la estructura contiene el átomo de hidrógeno sobre N(2). El H_2P no es totalmente planar; los planos de los anillos triazol y fenilo forman un ángulo diedro de $10,39^\circ$. La inclusión del anillo fenilo hace que se rompa la conjugación del ligando.

El anión perclorato está inclinado sobre el plano basal de coordinación, formando con éste ángulos que oscilan entre $83,81^\circ$ y $96,19^\circ$.

Las unidades monoméricas están asociadas mediante fuertes enlaces de hidrógeno en las tres dimensiones dando lugar a una estructura supramolecular (tabla II.2). Las interacciones de apilamiento son muy débiles y sólo se aprecian entre algunos anillos fenilo y triazol.

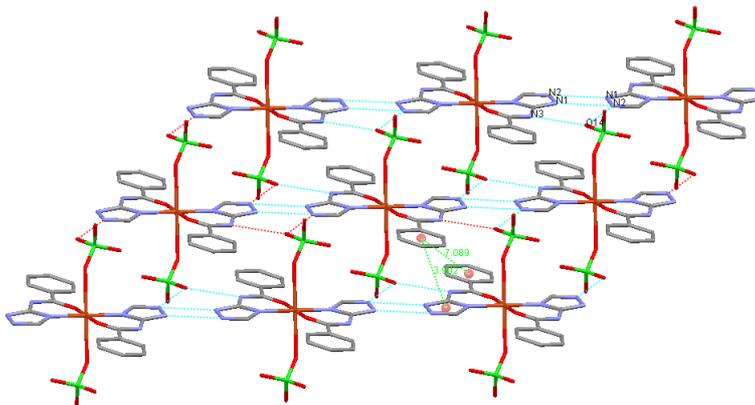


Figura II.8. Red cristalina de **1**: enlaces de hidrógeno destacados y algunas interacciones de apilamiento.

Tabla II.1. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para el compuesto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})_2(\text{ClO}_4)_2]$ (1) con las esds entre paréntesis.

Cu(1)-N(4)	1,940(2)
Cu(1)-O(1)	1,963(2)
Cu(1)-O(11)	2,482(2)
N(4)#1-Cu(1)-O(1)#1	89,63(10)
N(4)-Cu(1)-O(11)	91,27(10)
O(1)-Cu(1)-O(11)	96,19(10)
N(4)-Cu(1)-O(1)#1	90,37(10)
N(4)-Cu(1)-N(4)#1	180,00
O(1)-Cu(1)-O(1)#1	180,00
O(11)-Cu(1)-O(11)#1	180,00

Código de simetría: (#1) -x, -y+1, -z+1

Tabla II.2. Enlaces de hidrógeno para el compuesto $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})_2(\text{ClO}_4)_2]$ (1) con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(2)-H(2)...N(1)#1	0,860(3)	2,463(3)	2,959(4)	117,44(21)
N(2)#1-H(2)#1...N(1)	0,860(3)	2,463(3)	2,959(4)	117,44(21)
O(14)...H(3)-N(3)#2	0,889(3)	2,075(3)	2,949(4)	167,55(20)
O(14)...H(2)-N(2)	0,860(3)	2,213(4)	3,036(5)	160,21(22)

Código de simetría: (#) -x, -y, -z (#2) -x, -y, -z+1

II.B.3.2 Estructura de rayos-X de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)]_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$ (**2**) y de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diO})(\text{NO}_3)]_2 \cdot 2\text{DMSO}$ (**3**)

Los complejos **2** y **3** están constituidos por las unidades diméricas discretas $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)]_2$ y $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diO})(\text{NO}_3)]_2$, respectivamente, más dos moléculas de disolvente de cristalización (metanol en **2**; dimetilsulfóxido en **3**). Las figuras II.9 y II.10 muestran la estructura cristalina de cada unidad y el etiquetado de los átomos. En la estructura del compuesto **3** uno de los grupos naftaleno se encuentra desordenado; en la figura II.10 se visualiza sólo una de las dos posiciones de los átomos de dicho naftaleno para mayor claridad. Las distancias y ángulos de enlace seleccionados, en relación al entorno del Cu(II), se recogen conjuntamente en la tabla II.3. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de las estructuras se adjuntan en la sección Anexo III.

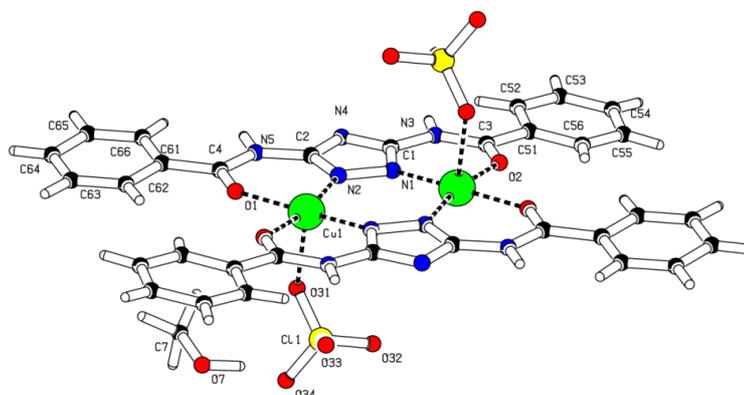


Figura II.9. La unidad dimérica de **2** (incluye una molécula de metanol de cristalización).

En ambos compuestos la unidad dinuclear presenta un centro de inversión en el punto medio del vector $\text{Cu} \cdots \text{Cu}'$. Los dos átomos de cobre están unidos a través de dos ligandos puente $N1, N2$ -1,2,4-triazolato. Los dos ligandos se encuentran desprotonados por pérdida del hidrógeno N-H del anillo triazol. En el complejo **2** la distancia Cu-Cu' es de 3,891(2) Å; en el compuesto **3** es de 3,845(2) Å. Ambas distancias son comparables a la encontrada en el compuesto análogo $[\text{Cu}(\text{daat})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]_2$ (Hdaat = 3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol).⁶²

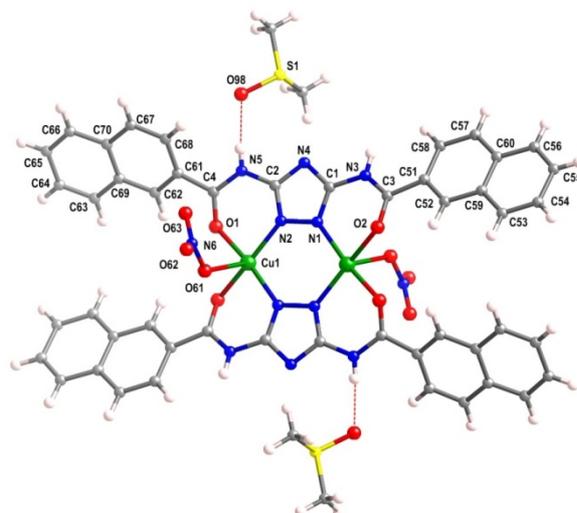


Figura II.10. La unidad dimérica de **3** con las dos moléculas de DMSO de cristalización.

Tanto en **2** como en **3** los iones Cu(II) de cada unidad dimérica presentan un entorno pentacoordinado en forma de pirámide de base cuadrada, con índices de trigonalidad de Addison y col. próximos a 0 [$\tau = 0,008$ (**2**), $\tau = 0,040$ (**3**)].⁶² En ambos complejos los ligandos [H_2diQ^- (**2**), H_2diO^- (**3**)] actúan como quelato bidentado respecto a cada Cu(II) a través de los átomos de nitrógeno triazol [N(1), N(2)] y de los átomos de oxígeno carbonilo [O(1), O(2)]. Los dos complejos presentan las cuatro distancias ecuatoriales (2 Cu-N y 2 Cu-O) similares [d_{promedio} Cu-N = 1,938(2) Å, Cu-O = 1,957(2) Å (**2**); d_{promedio} Cu-N = 1,942(2) Å, Cu-O = 1,951(2) Å (**3**)]. Las posiciones axiales están ocupadas a distancias de semicoordinación por un átomo de oxígeno de un anión perclorato [Cu(1)-O(31) = 2,429(2) Å (**2**)], o por un átomo de oxígeno de un anión nitrato [Cu(1)-O(61) = 2,355(2) Å (**3**)].

En cuanto a los ángulos de coordinación, tanto los ecuatoriales como los axiales se desvían significativamente del ángulo ideal de 90°, oscilando entre 82,43 y 101,86° (**2**), y entre 83,46 y 101,16° (**3**).

De relevancia para las propiedades magnéticas, el sistema puente Cu-(N-N)₂-Cu' es planar en ambos casos, al igual que en los dímeros análogos con doble puente triazol recogidos por Slangen y col.⁵⁷ y Ferrer y col.⁶² Se observa que los dos ángulos Cu-N(1)-N(2) del

puente son similares tanto en **2** (130, 130°) como en **3** (128, 130°). Es decir, el sistema puente es simétrico. Los dos pares de ángulos son comparables a los que presenta el compuesto relacionado [Cu(daat)(NO₃)(H₂O)]₂ (128, 129°);⁶² los ángulos N(1)-Cu-N(2) son también similares [100° (**2**), 101° (**3**)] al dímero anterior de referencia (103°).

La principal diferencia entre los complejos **2** y **3**, aparte de los oxoaniones apicales, estriba en que **2** es casi planar mientras que en **3** los planos de los grupos naftaleno están claramente desplazados del plano formado por los dos anillos triazol y los dos átomos de cobre. Así, en el complejo **2** el ángulo diedro formado por el plano [trz-Cu-Cu'-trz'] y el plano de cada grupo fenilo es *ca.* 5 ó 7°, mientras que para el compuesto **3** el plano [trz-Cu-Cu'-trz'] y el plano de cada grupo naftaleno forman ángulos diedros de *ca.* 25 ó 37° (Figura II.11).

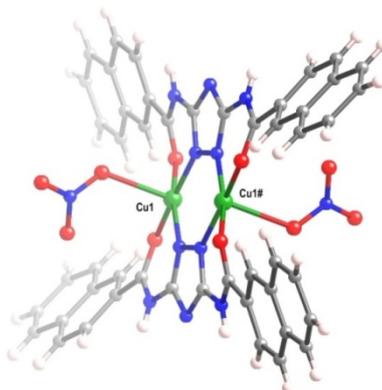


Figura II.11. Vista en perspectiva de la unidad dimérica de **3** mostrando la no planaridad del ligando (sustituyentes naftaleno *inclinados* con respecto al plano de su triazol en sentido opuesto).

Tabla II.3. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para los compuestos [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH (**2**) y [Cu(H₂diO)(NO₃)₂·2DMSO (**3**) con las esds entre paréntesis.

2		3	
Cu(1)··Cu(1)#1	3,891(2)	Cu(1)··Cu(1)#1	3,845(2)
Cu(1)-N(1)	1,935(2)	Cu(1)-N(2)	1,9416(15)
Cu(1)-O(2)	1,960(2)	Cu(1)-O(1)	1,9439(13)
Cu(1)-O(1)#1	1,953(2)	Cu(1)-O(2)#1	1,9589(13)
Cu(1)-N(2)#1	1,940(2)	Cu(1)-N(1)#1	1,9424(15)
Cu(1)-O(31)	2,429(2)	Cu(1)-O(61)	2,3547(14)
N(1)-Cu(1)-O(2)	88,57(9)	N(2)-Cu(1)-O(1)	88,36(6)
N(1)-Cu(1)-N(2)#1	99,46(9)	N(2)-Cu(1)-N(1)#1	101,16(6)
N(1)-Cu(1)-O(1)#1	169,39(9)	N(2)-Cu(1)-O(2)#1	165,53(6)
N(1)-Cu(1)-O(31)	101,86(9)	N(2)-Cu(1)-O(61)	107,15(6)
O(2)-Cu(1)-N(2)#1	169,00(9)	O(1)-Cu(1)-N(1)#1	168,19(6)
O(2)-Cu(1)-O(1)#1	82,43(9)	O(1)-Cu(1)-O(2)#1	83,46(5)
O(2)-Cu(1)-O(31)	99,26(9)	O(1)-Cu(1)-O(61)	93,19(5)
N(2)#1-Cu(1)-O(1)#1	88,78(9)	N(1)#1-Cu(1)-O(2)#1	85,74(6)
N(2)#1-Cu(1)-O(31)	86,53(9)	N(1)#1-Cu(1)-O(61)	90,67(6)
O(1)-Cu(1)-O(31)	85,20(9)	O(2)#1-Cu(1)-O(61)	85,28(5)
Cu(1)-N(1)-N(2)	130,19(9)	Cu(1)-N(2)-N(1)	128,35(6)
Cu(1)-N(2)#1-N(1)#1	129,81(9)	Cu(1)-N(1)#1-N(2)#1	130,00(6)

Código de simetría: (#1) -x, -y, -z

En el compuesto **2**, el análisis de la red de enlaces de hidrógeno muestra que la estructura cristalina está constituida en realidad por *cadena*s de dímeros (figura II.12). En la cadena, la unión entre unidades diméricas se realiza a través de los enlaces de hidrógeno N(3)...O(33)# y N(3)#...O(33), siendo O(33) un átomo de oxígeno del perclorato. Cada molécula de metanol se enlaza a uno de los dos ligandos del dímero mediante dos enlaces de hidrógeno. La figura II.12 muestra también algunas de las interacciones de apilamiento, muy débiles, que se establecen entre unidades de dos cadenas diferentes.

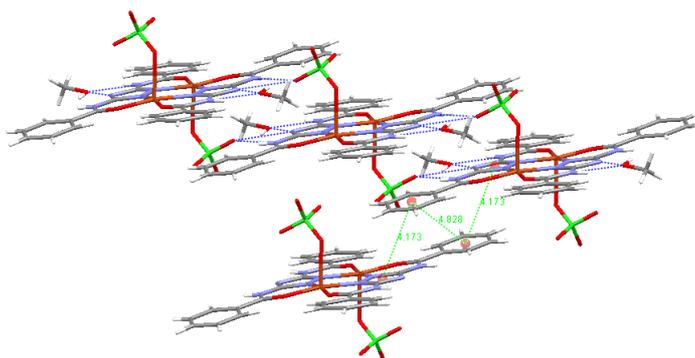


Figura II.12. Fragmento de una cadena de **2** con las moléculas de metanol de cristalización y las conexiones entre unidades diméricas por enlaces de hidrógeno. También se muestran interacciones de apilamiento entre anillos de dos unidades de cadenas diferentes.

Tabla II.4. Enlaces de hidrógeno seleccionados para el compuesto [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH (**2**) con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(3)-H(3)...O(33)#	0,843(19)	2,106(19)	2,890(2)	154,46(2)
N(5)-H(5)...O(7)#	0,899(19)	1,940(19)	2,767(2)	152,16(2)

Código de simetría: (#) -x, -y, -z

La red cristalina del compuesto **3** está también formada por *cadena*s (figura II.13). De forma análoga a la estructura anterior, la conexión entre las unidades de la cadena se produce por enlaces de hidrógeno $N(3) \cdots O(61)\#$ y $N(3)\# \cdots O(61)$, siendo O(61) uno de los oxígenos del nitrato. Las moléculas de DMSO de cristalización interaccionan con la unidad dimérica a través de un fuerte enlace de hidrógeno que se establece entre el oxígeno O(98) del DMSO y el nitrógeno amido N(5) de uno de los ligandos. La figura II.13 muestra una vista de una de las cadenas (plano ac).

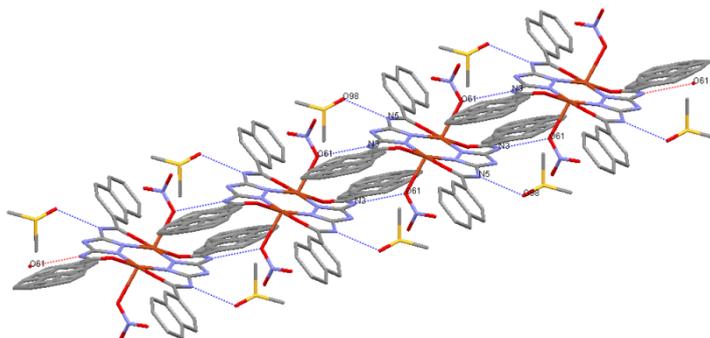


Figura II.13. Fragmento de una cadena de **3** con las moléculas de DMSO de cristalización y las conexiones entre unidades diméricas por enlaces de hidrógeno. Se muestra también el *desorden* de uno de los grupos naftaleno.

Tabla II.5. Enlaces de hidrógeno para el compuesto $[Cu(H_2diO)(NO_3)]_2 \cdot 2DMSO$ (**3**) con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(3)-H(3)...O(61)#	0,840(19)	2,19(2)	2,995(2)	159,5(18)
N(5)-H(5)...O(98)#	0,790(18)	1,952(18)	2,739(2)	174,9(19)

Código de simetría: (#) $-x,-y,-z$.

II.B.3.3 Espectroscopia infrarroja

En la tabla II.6 se muestran las bandas IR más significativas de los complejos de los ligandos acilo (**H₂P**, **H₃diQ** y **H₃diO**). Se incluyen también las bandas de los correspondientes ligandos, ya descritas previamente, para facilitar la comparación (ver figuras de los espectros en el Anexo I).

En la región 3500-3000 cm⁻¹ todos los complejos exhiben bandas de diferente intensidad atribuibles a las vibraciones $\nu(\text{N-H})_{\text{NH}}$ +/o $\nu(\text{arC-H})$ (ver asignaciones en la tabla II.6). El complejo **2** presenta una banda ancha de intensidad media a 3471 cm⁻¹ que debe incluir las vibraciones de tensión $\nu(\text{O-H})$ del metanol de cristalización. Finalmente, cabe mencionar que para el compuesto **3** se observa una señal débil aunque claramente definida a 2919 cm⁻¹, asignable al modo $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$ del DMSO de cristalización

En relación a las bandas con mayor valor diagnóstico, en el espectro del complejo **1** se observa un desplazamiento significativo de las señales de carbonilo y de triazol en relación a las del ligando **H₂P** (ca. $\Delta \approx -40$ cm⁻¹ y $\Delta \approx -25$ cm⁻¹, respectivamente). Este hecho estaría de acuerdo con la coordinación a través del oxígeno del carbonilo y del nitrógeno N(4) del triazol. Puesto que el ligando no se encuentra desprotonado, estos cambios en las vibraciones estarían relacionados con el cambio en el sistema de conjugación del ligando, casi planar, al producirse la interacción con el metal.

Por otra parte, los dos dímeros, **2** y **3**, presentan patrones de IR similares. En ambos casos se observan desplazamientos importantes de las bandas de *amida I* [$\nu(\text{C=O})$] y del triazol, como cabría esperar por la coordinación de los ligandos a través de los dos átomos de oxígeno de los carbonilos y de los dos átomos de nitrógeno del puente N(1)-N(2) diazínico del triazol. Los cambios son aquí más acusados que en el compuesto **1**, como cabría esperar de la mayor denticidad de los anillos triazol y de que éstos se presentan desprotonados por la pérdida de su protón N-H ácido (ver estructuras en sección anterior). Desplazamientos de este orden ya se han descrito para el compuesto análogo [Cu(daat)(NO₃)₂].⁶²

Tabla II.6. Asignación de bandas IR para los complejos de los ligandos acilo: [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (**1**), [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH] (**2**) y [Cu(H₂diO)(NO₃)₂·2DMSO] (**3**), así como para los respectivos ligandos.*

Compuesto	$\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$			
	[$\nu(\text{O-H})$ +/o $\nu(\text{N-H})_{\text{NH +/o NH}_2}$ +/o $\nu(\text{arC-H})$]	$\nu(\text{C=O})$	[$\delta(\text{N-H})_{\text{NH +/o NH}_2}$ + $\nu(\text{C=N})_{\text{anillo}}$ + $\nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}$]	ν (anion)
H₂P	3472-3430 b, m; 3273 s	1662 s	1598 s; 1554 m; 1486 m	--
Comp. 1	3500 b, w; 3274 s	1624-1610 d, s	1573 m; 1479 m; 1371 m	ν_3 : 1147 m-1090 vs-1029 s ^a ν_4 : 903 m
H₃diQ	3441 s; 3298 m; 3102 w	1698-1669 d, s	1634 w; 1586 vs; 1533 w; 1423 w; 1370-1327 d, s	--
Comp. 2	3471 b, m; 3300 sh	1624 sh; 1607 s	1572 vs; 1498-1479 d, m; 1396 w	ν_3 : 1141s-1121-1090d,s; 1053 s ^a ν_4 : 898 vw
H₃diO	3441 s; 3298 m; 3102 w	1698-1669 d, s	1634 w; 1586 vs; 1533 w; 1423 w; 1370-1327 d, s	--
Comp. 3	3441 b, m; 3265 sh; 3058 w ^b	1633 sh; 1605 s	1596 vs; 1507 w; 1481-1464 d, m	ν (NO ₂) _{asym} : 1385 s ν (NO ₂) _{sym} : 1296 m

* vs: muy fuerte; s: fuerte; m: media; w: débil; vw: muy débil; d: doblete; b: ancha; sh: hombro; ν_{asym} : vib. tensión asimétrica; ν_{sym} : vib. tensión simétrica;

^a banda estructurada;

^b también observadas: 2919 w, 1020 m / cm⁻¹, asignadas a $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$ y $\nu(\text{S=O})$, respectivamente, del DMSO de cristalización.

En cuanto a los aniones, en el complejo **1** las bandas características del ligando ClO_4^- , muy parecidas a las del perclorato iónico,⁶⁴ sugieren coordinación monodentada y débil del anión, como se confirma a través de la estructura cristalina. En el complejo **2** se aprecia una banda ancha y estructurada correspondiente a la vibración ν_3 del perclorato. Esta señal aparece a valores de $\tilde{\nu}$ muy similares a los del perclorato del complejo **1**, sugiriendo que la forma de coordinación debe ser comparable. Las respectivas estructuras cristalinas muestran de hecho que las distancias Cu(II)-OCIO_3 son prácticamente iguales (en torno a 2,4 Å) para ambos complejos. En el dímero **3** las bandas correspondiente al nitrato, observadas a 1385 y 1296 cm^{-1} , se atribuyen a los modos $\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$ y $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$, respectivamente. Estos valores están también muy próximos a los de la sal iónica⁶⁴ y reflejarían una semicoordinación (distancia experimental $\text{Cu(II)-ONO}_2 = 2,43$ Å).

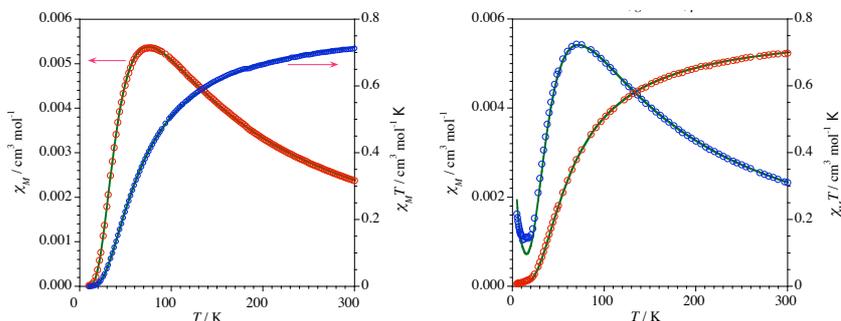
Por último, cabe reseñar que en el complejo **2** la banda a 1607 cm^{-1} debe también contener la vibración $\delta(\text{O-H})$ del metanol de cristalización. En el complejo **3** las bandas a 2919 y 1020 cm^{-1} se atribuyen al DMSO de cristalización, y se asignan a las vibraciones $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3\text{-H}})$ y $\nu(\text{S=O})$, respectivamente.

II.B.3.3 Propiedades magnéticas de **2** y **3**

La figura III.14 muestra el comportamiento magnético de **2** y **3** en la forma de $\chi_{\text{M}}T/\chi_{\text{M}}$ vs T , siendo χ_{M} la susceptibilidad magnética por cada dos iones Cu(II) . Los detalles de las medidas se indican en la sección experimental de este Capítulo.

Los valores de $\chi_{\text{M}}T$ a 300 K son 0.71 (**2**)/ 0.70 (**3**) $\text{cm}^3 \text{K mol}^{-1}$ por dos Cu(II) [0.36 (**2**)/ 0.35 (**3**) $\text{cm}^3 \text{K mol}^{-1}$ (**3**) por cada Cu(II)], respectivamente. En ambos compuestos, al bajar la temperatura $\chi_{\text{M}}T$ decrece continuamente aproximándose a cero a alrededor de 18K. La curva de χ_{M} presenta un máximo a aproximadamente 75 (**2**) / 70 (**3**) K. Este comportamiento es característico de una interacción antiferromagnética entre los dos Cu(II) , con un estado basal singlete. En el caso del compuesto **3** a temperaturas por debajo de 18 K se

observa una *cola* que sugiere la presencia de una impureza mononuclear paramagnética.



Figuras II.14. Curvas de $\chi_M T / \chi_M$ vs T para **2** (izquierda) y **3** (derecha) (χ_M es la susceptibilidad magnética por unidad dinuclear).

Los datos magnéticos se han interpretado, teniendo en cuenta la naturaleza dinuclear del complejo, con el Hamiltoniano de espín:

$$\mathbf{H} = -J \mathbf{S}_1 \mathbf{S}_2 \quad (\text{ec. II.1})$$

Partiendo de este Hamiltoniano, el comportamiento magnético del compuesto **3** puede ser descrito mediante la siguiente ecuación de Bleaney-Bowers en la que se ha introducido un término adicional para tener en cuenta la impureza paramagnética [de un posible compuesto mononuclear de Cu(II)], y poder conseguir así un ajuste satisfactorio a temperaturas bajas (ecuación II.2):^{65,66}

$$\chi_M = (1 - \rho) \frac{2N\beta^2 g^2}{kT} \left[\frac{1}{3 + \exp(-\frac{J}{kT})} \right] + \rho \frac{N\beta^2 g^2}{4kT} \quad (\text{ec. II.2})$$

en la que todos los términos tienen su significado habitual y ρ es el porcentaje de impureza mononuclear paramagnética.

Del ajuste de los datos y asumiendo que los factores g son todos idénticos, se obtiene que:

$$g = 2,07 \text{ y } J = -83.6 \text{ cm}^{-1} \text{ (2)}$$

$$g = 2,06 \text{ y } J = -81.8 \text{ cm}^{-1}, \rho = 1.2\% \text{ (3)}$$

Los valores de J de los dímeros **2** y **3**, análogos, se encuentran en el rango medio de los valores descritos para compuestos con doble puente triazol de la bibliografía.⁶² Además, estos valores comparan bien con los obtenidos para el compuesto $[\text{Cu}(\text{daat})(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})]_2$,^{18,62} como cabía esperar por la similitud del sistema puente.

Se han registrado los espectros EPR sobre muestras policristalinas de los compuestos **2** y **3** a varias temperaturas. No se incluyen aquí porque debido a su complejidad requieren un estudio detallado que excede el objeto de este trabajo.

II.B.4 Estudio de interacción con el ADN de **1** y **2**

Las técnicas ensayadas en este apartado van orientadas a establecer el tipo de interacción que tiene lugar entre ADN y el compuesto. Una combinación racional de métodos puede ayudar a determinar el mecanismo molecular de la unión, a establecer relaciones estructura-actividad y, en última instancia, a diseñar de forma racional nuevos agentes.⁶⁷⁻⁶⁹

Los estudios de interacción que se van a describir se han llevado a cabo para los complejos **1** y **2**. Con el complejo **3** no se pudieron realizar debido a los problemas de solubilidad que presenta este compuesto en agua.

Los estudios sobre **1** se han realizado en disolución acuosa, con tampón cacodilato y un 5% de DMF. En el caso de **2**, por problemas de solubilidad, se ha utilizado el tampón PIPES y un 15% de DMF. Nótese que el dímero análogo de la bibliografía, $[\text{Cu}(\text{daat})(\text{ClO}_4)(\text{CH}_3\text{OH})_2]$ (Hdaat = 3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol), pudo ensayarse en medio 100% acuoso.¹⁸ Se confirma así que la sustitución de un metilo por un fenilo o por un naftilo reduce progresivamente la solubilidad no sólo del ligando sino del complejo resultante.

La **estabilidad** de los complejos **1** y **2** en disolución fue ensayada por espectrometría de masas-electrospray en modo positivo (ESI-MS⁺), utilizando la mezcla disolvente de los ensayos bioinorgánicos.

En el espectro de masas del complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})_2(\text{ClO}_4)_2]$ (**1**) se identifican tres señales con $m/z = 711,1$; 686,9 (pico base) y 537,8, que se atribuyen a las especies $\{[\text{Cu}(\text{H}_3\text{P})(\text{H}_2\text{P})(\text{ClO}_4)_2], \text{DMF}\}^+$, $\{[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})(\text{HP})], 2\text{DMF}\}^+$ y $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{P})_2(\text{ClO}_4)]^+$, respectivamente.

El complejo $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}]$ (**2**) presenta tres señales a $m/z = 1158,9$; 1083,2 y 836,2, correspondientes a $\{[\text{Cu}(\text{H}_3\text{diQ})(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)_2], 3 \text{DMF}\}^+$, $\{[\text{Cu}(\text{H}_3\text{diQ})(\text{H}_2\text{diQ})(\text{ClO}_4)_2], 2 \text{DMF}\}^+$ y $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{diQ})_2(\text{ClO}_4)]^+$, respectivamente. También se observa una señal a $m/z = 370,1$, que se asigna a la especie $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{diQ})]_2^{2+}$.

Estos resultados confirman que ambos complejos permanecen estables en disolución.

II.B.4.1 Espectroscopia de fluorescencia

La experiencia consiste en registrar los espectros de emisión del aducto CT ADN-EB en presencia de distintas concentraciones de complejo, y determinar los cambios que se producen en el máximo de intensidad de emisión, siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 1.3.1.1 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Antes de realizar la experiencia se ensayaron las siguientes disoluciones *control* en las mismas condiciones que las disoluciones *problema*: disolución de complejo; disolución de complejo + CT ADN; disolución de complejo + EB (sin CT ADN). Las dos primeras no mostraron fluorescencia apreciable y la tercera no mostró cambios en relación a la disolución de EB (sin complejo).

En las figuras II.13 y II.14 se presentan los espectros de emisión del aducto ADN-EB obtenidos en ausencia y presencia de diversas concentraciones de complejo (0-50 μM). Se incluyen también los gráficos de Stern-Volmer, en los que se representa el cociente I_{F0}/I_F frente a concentración de complejo, siendo I_{F0} e I_F el máximo de intensidad de emisión en ausencia y en presencia de complejo, respectivamente.

Los dos complejos estudiados presentan un patrón común: disminuyen la intensidad del máximo de emisión del aducto ADN-EB al aumentar la concentración de complejo. Este comportamiento es el habitual en compuestos que interaccionan con el ADN.^{70,71}

Con el fin de semi-cuantificar las observaciones anteriores, se calculó la constante de desactivación, K_{sv} , por medio de las representaciones de Stern-Volmer que se muestran en el interior de las figuras II.13 y II.14. Los dos complejos presentan gráficas de Stern-Volmer lineales, ajustándose bien su comportamiento a la ecuación:

$$I_{F0}/I_F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{ec. II.3})$$

Los resultados sugieren que los complejos desactivan el aducto ADN-EB mediante un proceso *dinámico*.⁷² En la tabla II.7 se muestran los valores K_{sv} obtenidos.

Tabla II.7. Constantes para los complejos 1 y 2.

Complejo	K_{sv} ($\times 10^3$ M ⁻¹)	K_{app} ($\times 10^6$ M ⁻¹)
1	6,2	3,1
2	3,1	1,6

También se calculó la *constante de unión aparente* definida por la expresión:

$$K_{EB} \times [EB] = K_{app} [\text{complejo}] \quad (\text{ec. II.4})$$

donde: $K_{EB} = 1.0 \times 10^{-7}$ M⁻¹; $[EB] = 50$ μ M y $[\text{complejo}] = C_{50} =$ concentración de complejo a la cual $I_{F0}/I_F = 2$.

Los valores de K_{sv} y K_{app} para **1** y **2** son del mismo orden que los descritos para otros complejos de Cu(II) de la bibliografía que interaccionan con el ADN.⁷³

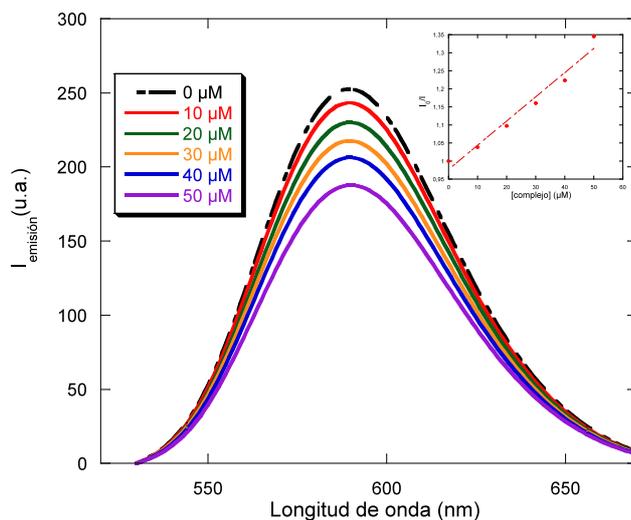


Figura II.13. Espectro de emisión del bromuro de etidio y CT ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **1**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF. **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejo (I) frente a la concentración de **1** [ajuste lineal: $y = 0,977 + 0,007x$ ($R^2 = 0,968$)].

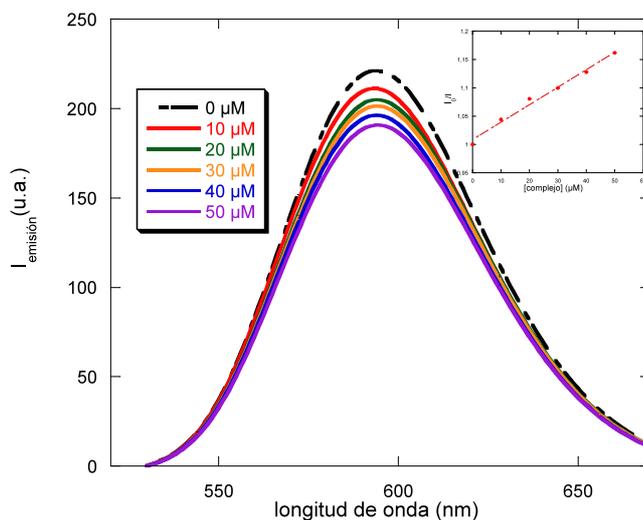


Figura II.14. Espectro de emisión del bromuro de etidio y CT ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **2**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en la disolución mezcla (pH = 6,4): 25% tampón PIPES 5mM + 15% DMF + 60 %H₂O. **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejo (I) frente a la concentración de **2** [ajuste lineal: $y = 1,009 + 0,003x$ ($R^2 = 0,987$)].

II.B.4.2 Temperatura de fusión del ADN

El experimento consiste en registrar la absorbancia a 260 nm de una disolución de CT ADN-compuesto que contiene una concentración fija de ADN y una concentración variable de complejo, en el rango de temperaturas 25-90 °C, tal y como se describe en la sección 1.3.1.2 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Las curvas de temperatura de *fusión* experimentales son habitualmente sigmoides. A temperaturas bajas aparece el estado nativo del ADN. En la zona de inflexión de la absorbancia se produce la transición de ADN nativo a ADN desnaturalizado, por rotura de los enlaces de hidrógeno. El máximo de absorbancia a altas temperaturas corresponde al estado desnaturalizado del ADN. El T_m se obtiene a partir del punto de inflexión (50% doble hebra- 50% hebra sencilla). Con estos datos se calcula el valor de ΔT_m [$\Delta T_m = T_{m[\text{CT ADN-complejo}]} - T_m^0$].

En la figuras II.15 se presenta la curva de temperatura de *fusión* para el CT ADN en presencia de **1**. Se ha restado la absorbancia del complejo a 260 nm (por ello se representan *absorbancias normalizadas*).

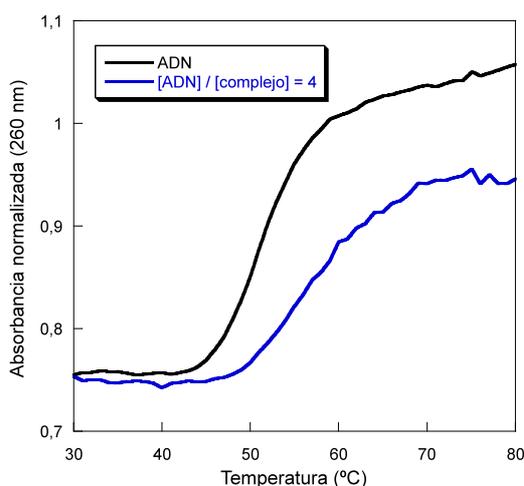


Figura II.15. Curvas de temperatura de *fusión* del CT ADN (100 μM) en ausencia (negro) y en presencia de **1** (25 μM , azul) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2) conteniendo un 5% DMF. **Leyenda:** relación [ADN]/[complejo **1**].

Para la relación $[\text{ADN}]/[\text{complejo } \mathbf{1}] = 4$ se obtiene un valor de ΔT_m de 9,6 °C, que puede considerarse *medio* para compuestos que interaccionan con el ADN.^{74,75} La disminución de la absorbancia a temperaturas altas en presencia del compuesto se ha observado para otros complejos de cobre(II) (ver más adelante, apartado II.E.4).

No se incluye aquí el estudio de T_m de los dos compuestos dímeros **2** y **3** porque durante el proceso de calentamiento se observó turbidez para todas las relaciones $[\text{ADN}]/[\text{complejo}]$ ensayadas.

II.B.4.3 Viscosimetría

Las medidas hidrodinámicas son sensibles a los cambios de longitud del ADN; por ello, constituyen uno de los métodos más decisivos y menos ambiguos para estudiar la forma de unión de las moléculas al ADN en disolución.^{76,77}

La técnica de determinación de la viscosidad del ADN consiste en medir el tiempo de elución de una disolución CT ADN en presencia de distintas concentraciones de complejo. La experiencia se realizó según se detalla en la sección 1.3.1.3 de la Introducción general y se detalla en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran como una representación gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ frente al cociente: $[\text{complejo}]/[\text{CT ADN}]$. Los resultados para ambos compuestos se incluyen en la figura II.16. Las líneas con trazos discontinuos son guías de tendencia.

Una observación de la tendencia en la variación de la viscosidad relativa muestra que el compuesto mononuclear **1** no produce cambios significativos; por tanto, se puede concluir que no intercala. La variación correspondiente al compuesto **2** corresponde a una intercalación clásica, con un aumento lineal significativo de la viscosidad relativa (de 1 a 1,21 para relaciones de $[\text{complejo}]/[\text{ADN}] = 0,2$). Como dato de referencia, se puede mencionar que un intercalante clásico como el bromuro de etidio mostró un cambio de viscosidad de 1 a 1,17 para relaciones de 0,2 (aunque en un ensayo efectuado en condiciones distintas a las de este trabajo).^{76,77} La capacidad intercalante del compuesto **2** se puede explicar por la planaridad de la estructura y la presencia de los anillos de fenilo.

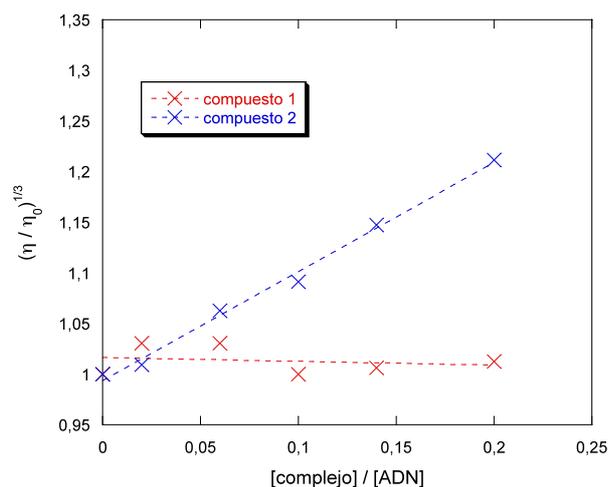


Figura II.16. Ensayo de viscosidad para **1** y **2**. [CT ADN] = 50 μM en presencia de 1, 3, 5, 7 y 10 μM de compuesto [**1**: en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF; **2**: en la disolución mezcla (pH = 6,4): 25% tampón PIPES 5mM + 15% DMF + 60 %H₂O].

II.B.4.4 Resumen estudios de interacción

Las conclusiones de los resultados de interacción, limitadas por los problemas de solubilidad, se detallan a continuación:

El compuesto mononuclear **1** presenta una K_{SV} ($6,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) y un ΔT_m ($\sim 9 \text{ }^\circ\text{C}$) medios y, según el ensayo de viscosimetría, no intercala. Por tanto, la interacción con el CT ADN debe producirse a través de los surcos. El compuesto mononuclear **1** contiene varias átomos formadores de enlaces de hidrógeno (un grupo amino del guanazol no está sustituido) y prefiere asociarse a las bases de esta forma a establecer otro tipo de interacción.

El dímero **2** presenta una eficacia de desactivación del estado excitado del aducto CT ADN-EB baja ($K_{SV} = 3,1 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$) pero produce una intercalación clásica importante. Jenkins, en el monográfico "Drug-ADN interaction protocols",⁷⁸ tras determinar los valores de C_{50} para varias especies concluye que los intercalantes clásicos presentan valores mucho más altos que las moléculas que enlazan a los surcos, y explica estos resultados por la diferente cinética de los mecanismos de intercalación (más lentos) y de

interacción por los surcos (más rápidos).^{79,80} El compuesto **2** presentaría un comportamiento de este tipo. Su estructura es básicamente planar (tras la pérdida de los aniones axiales) y presenta cuatro grupos fenilo que permitirían interacciones de apilamiento (π -stacking) con las bases.

Como ya se ha indicado, no se ha podido realizar ningún ensayo de interacción con el compuesto **3** debido a problemas de solubilidad en disolución acuosa, provocados por la presencia de los grupos naftaleno.

II.B.5 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa de 1 y 2

La técnica de electroforesis en gel de agarosa se ha utilizado en nuestros ensayos para observar la digestión del ADN por diferentes concentraciones de complejo. Estas electroforesis en gel de agarosa se efectuaron según el protocolo general descrito en la sección 1.3.2 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los ensayos de actividad del complejo **1** se realizaron con tampón cacodilato 0,1 M (pH=6,0), con 5% de DMF y usando como reductor el par ascorbato/H₂O₂ 25x (12,5x ascorbato + 12,5x H₂O₂).

La figura II.17 muestra que, en estas condiciones, el ligando **H₂P** no es capaz de cortar el ADN por sí mismo ni en ausencia ni en presencia de agente activante. Asimismo, el complejo **1** no presenta ninguna actividad nucleasa si no se adiciona agente reductor.

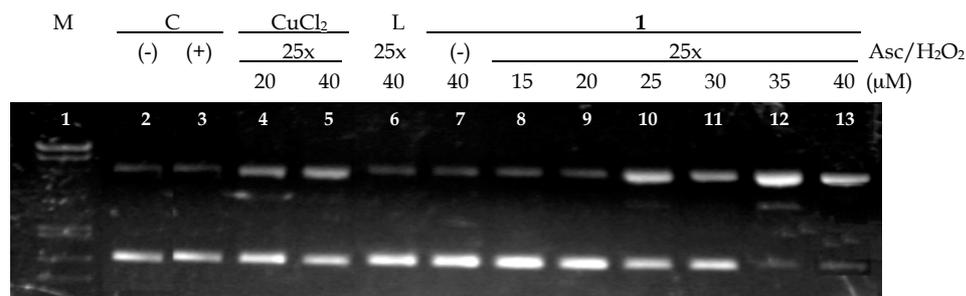


Figura II.17. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN (37,5 μM) producido por CuCl₂, H₂P y el compuesto **1**, en presencia de ascorbato/H₂O₂ (25x de exceso), incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF durante 1 h a 37 °C. M corresponde al marcador y C corresponde a los controles de ADN.

El compuesto **1** comienza a degradar el ADN a partir de concentraciones 25 μM y en presencia de una concentración de reductor 25x, pero la escisión es sólo significativa a partir de concentraciones altas (35-40 μM). A concentración 40 μM (carrera 13) el compuesto presenta mayor actividad nucleasa que la sal de cobre (carrera 5). Sin embargo, como todavía no se observa una cantidad apreciable de forma lineal, hay que concluir que la capacidad nucleasa del compuesto es mínima y no procede continuar con el estudio de inhibidores.

Los estudios de interacción de **1** con el ADN indicaban una interacción por los surcos de la doble hélice (sección II.B.4). La casi ausencia de actividad nucleasa mostrada en los ensayos de electroforesis podría estar relacionada con la gran estabilidad del complejo, que no favorecería el ciclo redox requerido para el mecanismo oxidativo.⁸¹

Debido a problemas de precipitación con tampón cacodilato, para el compuesto **2** se ensayaron otros sistemas tampón: Tris-HCl (pH = 7,1), MOPS (pH=7,0), fosfato (pH=7,2) y PIPES (pH=6,4). El compuesto pudo finalmente solubilizarse en la mezcla siguiente: 15% DMF + 60% H₂O + 25% PIPES 5mM, con un pH final de 6,4. Los ensayos de actividad nucleasa se realizaron en estas condiciones, y utilizando como reductor ascorbato o la mezcla ascorbato/H₂O₂ a 300x en ambos casos.

De la figura II.18a se deriva que, como en los casos anteriores, el ligando **H₃diQ** no es capaz de cortar el ADN ni en ausencia ni en presencia de agente activante. De la misma forma, el complejo **2** no manifiesta ninguna actividad nucleasa en ausencia de agente reductor.

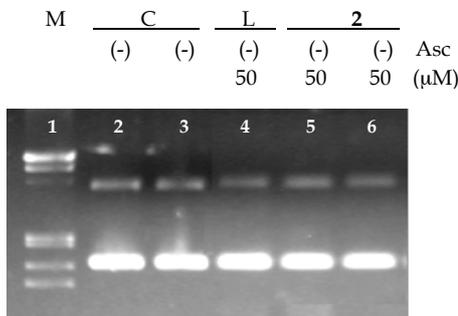


Figura II.18a. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN ($37,5 \mu\text{M}$) producido por **H₃diQ** y el compuesto **2**, en ausencia de agente activante, incubado en la mezcla 15% DMF + 60% H₂O + 25% PIPES 5mM (con un pH final de 6,4) durante 1 h a 37 °C. C corresponde a los controles de ADN.

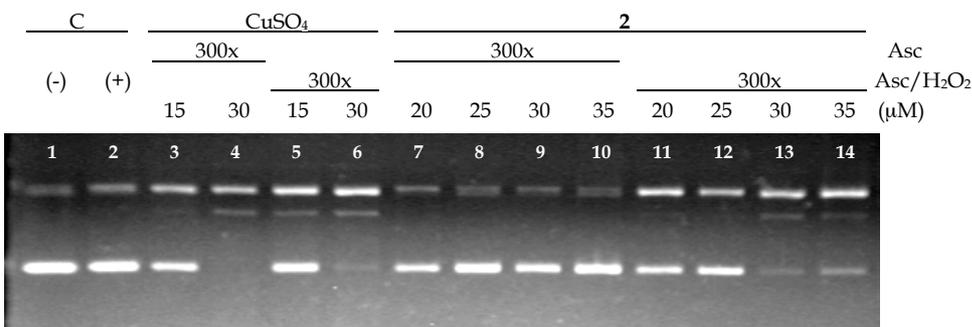


Figura II.18b. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN ($37,5 \mu\text{M}$) producido por CuSO₄, **H₃diQ** y el compuesto **2**, en presencia de ascorbato/H₂O₂ (300x de exceso), incubado en la mezcla 15% DMF + 60% H₂O + 25% PIPES 5mM (con un pH final de 6,4) durante 1 h a 37 °C. C corresponde a los controles de ADN.

El compuesto **2** empieza a mostrar ligera actividad nucleasa a concentraciones $20 \mu\text{M}$ (figura II.18b, carrera 11) y, actividad nucleasa significativa a concentraciones $30 \mu\text{M}$ (carrera 13); en ambos casos, en presencia de concentraciones elevadas de la mezcla de reductores (ascorbato/H₂O₂, 300x). Cuando se utiliza como reductor sólo el ascorbato no se observa ninguna actividad nucleasa (carreras 7-10).

Por otra parte, una comparación de las carreras 6 y 13 indica que la capacidad de escisión del ADN del complejo es prácticamente la misma que la de la sal de cobre, a pesar de que se trata de un dímero y de que, por tanto, contiene doble concentración de iones cobre. Dada la limitada actividad nucleasa de **2**, no se ha considerado de interés el subsiguiente estudio de inhibidores.

La escasa actividad del complejo **2** podría estar relacionada, como se argumentó para el complejo **1**, con la gran estabilidad del complejo, que no favorecería el ciclo redox requerido para el mecanismo oxidativo, pero contrasta con los resultados de los ensayos de interacción (sección II.B.4), que reflejaban una intercalación clásica importante para el compuesto **2**, y con resultados previos obtenidos para el dímero análogo $[\text{Cu}(\text{daat})(\text{ClO}_4)(\text{CH}_3\text{OH})]_2$.¹⁸ Este último, que no intercalaba, mostró mayor actividad nucleasa que **2** a concentraciones inferiores (18 μM) y con mucha menor cantidad de agente activante (ascorbato/ H_2O_2 , 10x). Se puede explicar la falta de intercalación en este caso por la presencia de grupos metilo, no planares; en el caso del compuesto **2**, el cambio de los grupos metilo por grupos fenilo favorece la intercalación. Es más difícil explicar la diferencia de actividad entre ambos compuestos. Sí queda de manifiesto que la intercalación no conduce necesariamente a un aumento de actividad nucleolítica.

II.B.6 Conclusiones – Discusión

El estudio inorgánico y bioinorgánico nos conduce a las siguientes conclusiones:

1. A partir de los ligandos **H₂P**, **H₃diQ** y **H₃diO** se han aislado y caracterizado tres nuevos complejos de Cu(II): el compuesto monómero [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (**1**) y los compuestos dímeros [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH] (**2**) y [Cu(H₃diO)(NO₃)₂·2DMSO] (**3**).

2. La estructura cristalina del compuesto **1** muestra que es un compuesto mononuclear, situación poco frecuente en un triazol con las dos posiciones *N1,N2* disponibles para la coordinación. El ligando se comporta como bidentado quelato a través de los átomos dadores *N4* y *O_{carbonilo}*.

3. La estructura cristalina de los compuestos **2** y **3** corresponde a la del dímero esperado. En ambos casos el ligando coordina de forma puente a través de los átomos *N1,N2* y como bis(quelato) usando los átomos *O_{carbonilo}*. La principal diferencia entre las dos estructuras reside en la planaridad: los dos sustituyentes fenilo de **2** se encuentran en el plano del triazol, mientras que en **3** los dos sustituyentes naftaleno están claramente inclinados respecto al plano del triazol.

4. Los compuestos dímeros **2** y **3** presentan acoplamiento antiferromagnético, con constantes de intercambio $J(\mathbf{2}) = -81,8 \text{ cm}^{-1}$ y $J(\mathbf{3}) = -83,6 \text{ cm}^{-1}$, que entran en el rango de los valores esperados para dímeros con doble puente *N1-N2* triazol.

5. La introducción de los grupos fenilo (**1** y **2**) y naftilo (**3**) ocasiona problemas de solubilidad en medio acuoso tanto de ligandos como de complejos, lo que, a su vez, ha condicionado el posterior estudio bioinorgánico.

6. Los estudios de interacción con el ADN sólo han podido realizarse para los compuestos **1** y **2**. El monómero **1** presenta una K_{app} ($3,1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) y un ΔT_m ($\sim 9 \text{ }^\circ\text{C}$) medios y, según el ensayo de viscosimetría no intercala, mientras que el dímero **2** muestra una K_{app} ($1,6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) menor pero intercala siguiendo un mecanismo clásico (el estudio de T_m no se ha podido realizar por problemas de solubilidad). Se concluye que la interacción de **1** con el ADN se produce a través de los surcos y la de **2** mediante intercalación.

7. La actividad nucleolítica de los complejos **1** y **2** es muy limitada a pesar de que interaccionan significativamente con el ADN.

II.C DOS COMPLEJOS DE COBRE CON DOS LIGANDOS NAFTALEN-SULFONIL-TRIAZOL: DIFERENTE NUCLEARIDAD Y DIFERENTE UNIÓN AL ADN Y CAPACIDAD DE CORTE*

II.C.1 Antecedentes y objetivos

Como se ha comentado en el apartado II.A.2 del presente Capítulo, la planaridad del ligando y/o la presencia de sistemas aromáticos son factores que favorecen la intercalación; sin embargo, el diseño de estos sistemas, tal y como se ha demostrado en el apartado II.B, no es trivial.^{82,83} A menudo, la conjugación de un grupo con capacidad de intercalación no produce el resultado esperado, ya que la ventaja derivada del aumento de afinidad hacia el ADN puede anularse por

* Los resultados que se presentan a continuación han sido objeto de la siguiente publicación: Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Cabedo, N.; López-Gresa, M. P.; Castiñeiras, A.; Lloret, F. J. *Inorg. Biochem.* **2013**, *125*, 50-63.

la posición incorrecta del grupo reactivo.⁸⁴⁻⁸⁶ La naturaleza del intercalador es también importante como han mostrado varios grupos de autores, entre ellos, Barton y col.⁴⁷ y Burstyn y col.⁸⁷

En este sentido, Kumbhar y col. han preparado complejos de cobre(II) con ligandos fenantrolina-naftaleno capaces de intercalar, romper el plásmido pBR322 de ADN y ser activos y selectivos frente a células cancerígenas.⁸⁸ En uno de sus últimos estudios, Kandaswamy y col. han mostrado que la conjugación y extensión de una unidad aromática en una serie de complejos macrocíclicos de Zn(II) produce considerables cambios en el modo de unión al ADN. Estos autores concluyen que las interacciones de apilamiento exhibidas por un complejo con un sustituyente naftaleno son las responsables de su mayor poder de intercalación y eficiencia de corte al ADN; además la unidad naftaleno parece facilitar el transporte del complejo a través de la membrana celular.⁸⁹⁻⁹³

En este apartado usamos dos ligandos triazol obtenidos en el Capítulo I (apartado I.B.1.1): 5-amino-*N*1-(naftalensulfonil)-1,2,4-triazol (**N**) y 3,5-diamino-*N*1-(naftalensulfonil)-1,2,4-triazol (**M**). Ambos ligandos combinan las unidades triazol, sulfonilo y naftaleno. La unidad naftaleno, integrada en la estructura *via* sulfonilación, pretender favorecer la intercalación de los compuestos en el ADN. El grupo sulfonilo está relacionado con el grupo sulfonamido, el cual está presente en una amplia familia de metalonucleasas diseñadas por Borrás y col.^{75,90,94,95}

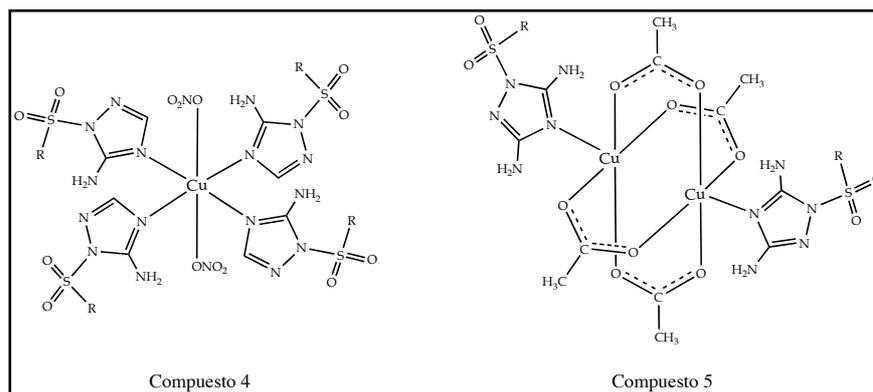
Por reacción de estos dos ligandos con sales de cobre(II) se han aislado dos nuevos complejos: uno mononuclear con **N**, [Cu(**N**)₄(NO₃)₂] · 4CH₃OH (**4**), y otro dinuclear con **M**, [Cu(**M**)(μ-acetato)₂]₂ · 2**M** (**5**). Los dos nuevos complejos han sido caracterizados. Las propiedades estructurales y magnéticas de **5** han sido analizadas en el contexto de complejos relacionados con ligandos acetato. Finalmente, se han discutido las consecuencias tanto de la inclusión de una unidad aromática como de la diferente nuclearidad en la afinidad al ADN y las propiedades de corte.

II.C.2 Síntesis de los compuestos 4 y 5

Los compuestos que se describen en este apartado, $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{CH}_3\text{OH}$ (**4**) y $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2 \cdot 2(\text{M})$ (**5**), se sintetizaron a partir de los ligandos 5-amino-*N*1-(naftalensulfonil)-1,2,4-triazol (**N**) y 3,5-diamino-*N*1-(naftalensulfonil)-1,2,4-triazol (**M**). Estos ligandos sulfonilo se prepararon por primera vez para esta *Tesis Doctoral* mediante reacción directa del correspondiente precursor triazol [3-amino-1,2,4-triazol (**N**) / 3,5-diamino-1,2,4-triazol (**M**)] con el cloruro de 2-naftalensulfonilo. El procedimiento experimental se detalla en la sección I.B.1.1. del Capítulo I.

Como se introdujo en el Capítulo I, frecuentemente, la síntesis de ligandos triazol con cloruros de acilo lleva a mezclas de productos mono, di, y triacilados (la acilación se puede producir tanto sobre los grupos amino exocíclicos como sobre el átomo de nitrógeno endocíclico del anillo triazol).⁹⁶⁻⁹⁹ En las condiciones empleadas en esta *Tesis Doctoral*, la sulfonación se produjo sobre el nitrógeno *N*1 del anillo triazol y sólo se obtuvieron derivados mono-sulfonilados (incluso con cloruro de sulfonilo en exceso), probablemente debido al impedimento estérico del sustituyente naftaleno.

En ausencia de monocristales de ligando válidos para su estudio por difracción de rayos-X, las estructuras cristalinas de los complejos **4** y **5** han permitido disponer de la estructura molecular de los ligandos **N** y **M**. Los resultados de rayos-X confirman que la sulfonilación de los dos ligandos ha ocurrido a través del nitrógeno *N*1 del anillo de triazol (esquema II.2). Las estructuras de **4** y **5** también evidencian la geometría *doblada* de los dos ligandos debido a la disposición espacial del grupo sulfonilo. Esto hace que los planos de los anillos triazol y naftaleno sean prácticamente perpendiculares uno respecto al otro (figuras II.19-II.21).



Esquema II.2. Esquema ChemDraw de los compuestos 4 y 5.

Como se detalló en la Introducción general de la presente *Tesis Doctoral*, los ligandos 1,2,4-triazol sustituidos en posición 3/5 son muy versátiles.¹⁻³ Sin embargo, la incorporación de un sustituyente sobre *N1* reduce las posibilidades de coordinación al eliminar la opción de actuar como ligando puente a través de las posiciones *N1,N2*. Esto conduce a que el ligando se comporte como un sistema imidazol. De forma simultánea el ligando pierde su átomo de H ionizable en el anillo. Además, en el caso concreto de los derivados **N** y **M**, los anillos de triazol interactúan por el átomo dador *N4* debido a que la otra posición de coordinación del anillo, *N2*, está impedida estéricamente por el voluminoso sustituyente contiguo.¹

En conclusión, la coordinación de los ligandos **N** y **M** se encuentra limitada a la forma monodentada a través del átomo *N4*: para **4** *N4* es *N(1)* y *N(6)*, y para **5** *N4* es *N(11)* y *N(21)*. Cabe destacar que los grupos amino no participan en la coordinación de ninguno de los dos compuestos aquí presentados (ver sección II.C.3). Sin embargo, aunque los ligandos **N** y **M** sólo difieren en un grupo amino adicional (presente en **M**), su solubilidad es distinta y, como se presenta a continuación, han producido complejos muy diferentes.

A continuación se detalla la síntesis de los compuestos **4** y **5**.

II.C.2.1 Síntesis de $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{CH}_3\text{OH}$ (4)

Se disolvieron 0,272 g (1 mmol) del ligando **N** en 30 mL de metanol que contenían 1 mL de NH_3 35%, todos los reactivos a temperatura ambiente. Sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 0,233 g (1 mmol) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de metanol (por tanto, la relación estequiométrica de los reactivos es $\text{N}/\text{Cu}(\text{II}) = 1:1$). Inmediatamente se formó un precipitado azul-verdoso que se filtró tras 10 minutos de agitación continua. La disolución resultante, de color azul pálido, se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristalizador cubierto con Parafilm. Tras aproximadamente 5 días aparecieron monocristales prismáticos de color azul. Rendimiento: *ca.* 0,35 g (*ca.* 25 %). Los cristales de **4** sólo fueron analizados por rayos-X de monocristal. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): [$\nu(\text{O}-\text{H}) + \nu(\text{N}-\text{H}) + \nu(\text{arC}-\text{H})$] 3437m, 3295w, 3221w, 3146m; [$\delta(\text{N}-\text{H}) + \nu(\text{C}=\text{N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C}=\text{C})_{\text{anillo}}$] 1642vs, 1550m; [$\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}$] 1384s; [$\nu(\text{SO}_2)_{\text{sym}}$] 1176vs; [$\nu(\text{NO}_3)$] 1320m. UV-vis (en DMF): λ_{max} (nm) [ϵ_{max}] ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 790 [250], 272 [21200]. Espectro de masa modo ESI⁺ (H_2O -DMF) (m/z): 611.1 $\{[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)] + \text{H}^+\}^{2+}$. Medidas de conductividad (H_2O :DMF 2:1): 156 ($\Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$).

II.C.2.2 Síntesis de $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2 \cdot 2(\text{M})$ (5)

Se disolvieron 0,200 g (0,69 mmol) del ligando **M** en 3 mL de DMSO a temperatura ambiente. Sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 0,138 g (0,69 mmol) de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 6 mL de etanol (por tanto, la relación estequiométrica de los reactivos es $\text{M}/\text{Cu}(\text{II}) = 1:1$). A la disolución mezcla, de color verde intenso, se le adicionaron otros 14 mL de etanol (la proporción final de disolventes fue etanol/DMSO = 0,85 : 0,15). Se filtró para eliminar posibles impurezas y se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristalizador cubierto con Parafilm. Tras aproximadamente 15 días se observaron maclas cristalinas, de color verde, de las que pudo separarse un fragmento prismático válido para difracción de rayos-X. El resto de agregados cristalinos se filtraron, se lavaron con etanol y se dejaron secar a temperatura ambiente. Rendimiento: *ca.* 0,63 g (*ca.* 60 %). Análisis Elemental: Calculado para $\text{C}_{56}\text{H}_{56}\text{Cu}_2\text{N}_{20}\text{O}_{16}\text{S}_4$ (1520,52): C: 44,23; H: 3,71; N: 18,42; S: 8,44. Encontrado: C: 44,64; H:

4,12; N: 17,93, S: 8,09. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): $[\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H}) + \nu(\text{arC-H})]$ 3440w, 3387w, 3336w, 3186w; $[\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]$ 1631vs, 1580s, 1445s; $[\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}]$ 1378s; $[\nu(\text{SO}_2)_{\text{sym}}]$ 1185-1161d-s; $[\nu(\text{CH}_3\text{COO})_{\text{asym}}]$ 1378s; $[\nu(\text{CH}_3\text{COO})_{\text{sym}}]$ 1442s. UV-vis (en DMF): λ_{\max} (nm) $[\epsilon_{\max}]$ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 685 [370], 313 [14900], 272 [31600]. Espectro de masa modo ESI⁺ (H_2O -DMF) (m/z): 611,1 $\{[\text{Cu}(\text{M})_4(\text{NO}_3)] + \text{H}^+\}^{2+}$. Medidas de conductividad (H_2O :DMF 2:1): 160 ($\Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$).

II.C.3 Caracterización de 4 y 5

II.C.3.1 Estructura de rayos-X de $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{CH}_3\text{OH}$ (4)

La estructura cristalina de **4** está constituida por unidades mononucleares $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2]$ y cuatro moléculas de metanol de cristalización por unidad (figura II.19a; para etiquetado completo ver figura II.19b). Las distancias y ángulos de enlace seleccionados se recogen en la tabla II.8. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

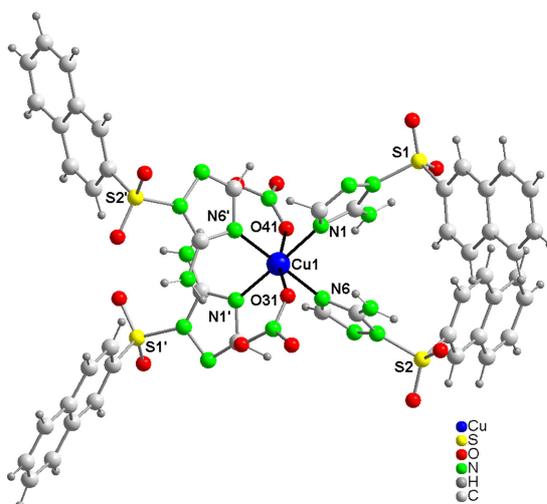


Figura II.19a. La unidad mononuclear de **4**.

La unidad presenta un eje binario, que contiene los átomos Cu y O(41) (un átomo de oxígeno de uno de los nitratos), de tal modo que la rotación de 180° a su alrededor genera toda la molécula. El eje binario origina 4 nitratos con una ocupación de 0,5 para cada átomo de nitrógeno y oxígeno, de forma que, en total, existen dos nitratos por átomo de cobre. Por claridad, las figuras sólo incluyen una posición para cada nitrato.

En **4** el ión Cu(II) está hexacoordinado a cuatro átomos de nitrógeno N_4 pertenecientes a cuatro ligandos **N**, en el plano ecuatorial, y a dos átomos de oxígeno correspondientes a dos iones

nitrate monodentados, en el plano axial, resultando un cromóforo CuN_4O_2 . Las distancias Cu-N [1,990(2) y 2,032(2) Å], son las habituales en complejos de ligandos triazol.¹ Las distancias apicales Cu-O [2,380(3) y 2,453(3) Å] son más largas que las basales, como cabría esperar por el efecto Jahn-Teller del Cu(II). En el entorno de coordinación, los ángulos oscilan entre 80,65(10)° y 91,54(6)°; es decir, excepto por la tetragonalidad, el octaedro alrededor del ión metálico se puede considerar sólo ligeramente distorsionado. El Cu(II) se encuentra desplazado únicamente 0,018(4) Å del plano basal formado por los 4 nitrógenos N4. Los dos anillos triazol se aproximan al Cu(II) formando entre ellos un ángulo diedro de 61,28(0,09)° (distancia entre centroides de 4,66 Å). Los dos grupos naftaleno se alejan del Cu(II) formando ángulos con el plano basal que contiene el Cu(II) de 58,16 y 56,24°, respectivamente.

La estructura cristalina de **4** ha permitido obtener información más concreta sobre la estructura del ligando. Así, para cada uno de los dos ligandos independientes simétricamente, el plano del anillo triazol y el plano de su grupo naftaleno forman ángulos diedros de 80,80(0,07)° en uno de los ligandos, y de 89,06(0,07)° en el otro.

En el cristal, la estructura de **4** presenta importantes interacciones de apilamiento entre los anillos naftaleno, siendo las más intensas: $d(\text{naf}_1\text{-naf}_1) = 3,700$ Å, $d(\text{naf}_1\text{-naf}_2) = 3,725$ Å y $d(\text{naf}_2\text{-naf}_2) = 3,650$ Å, los valores de β oscilan entre 16 y 23° (figura II.20).

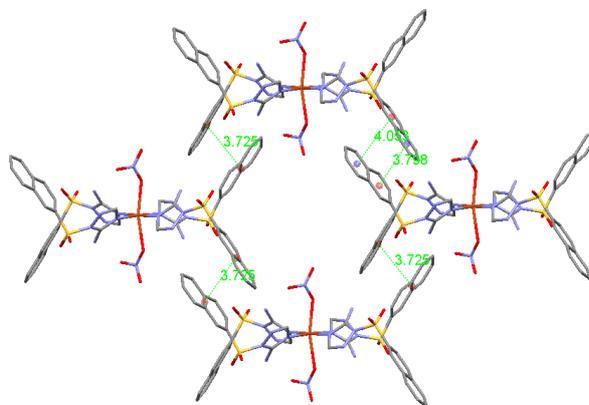


Figura II.20. Vista parcial del empaquetamiento de **4**; se muestran interacciones de apilamiento.

Debido a la presencia de grupos -NH₂ exocíclicos y de moléculas de metanol de cristalización hay una importante red de enlaces de hidrógeno. En la sección Anexos se incluye la tabla con los enlaces de hidrógeno más importantes.

Tabla II.8. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para el compuesto [Cu(N)₄(NO₃)₂] \cdot 4 CH₃OH (**4**) con las esds entre paréntesis.

Cu(1)-N(6)	1,990(2)	S(1)-N(3)	1,692(2)
Cu(1)-N(1)	2,032(2)	S(1)-O(11)	1,420(2)
Cu(1)-O(31)	2,380(3)	S(1)-O(12)	1,422(2)
Cu(1)-O(41)	2,453(3)	S(1)-C(11)	1,743(2)
N(1)-Cu(1)-N(6)	91,54(6)	O(11)-S(1)-O(12)	119,95(13)
N(1)-Cu(1)-N(6)#1	88,51(6)	O(11)-S(1)-N(3)	107,65(12)
N(1)-Cu(1)-O(31)	80,65(10)	O(11)-S(1)-C(11)	109,81(11)
N(1)-Cu(1)-O(41)	88,90(10)	O(12)-S(1)-N(3)	103,32(11)
N(6)-Cu(1)-O(31)	90,82(10)	O(12)-S(1)-C(11)	111,51(13)
N(6)-Cu(1)-O(41)	80,98(10)	N(3)-S(1)-C(11)	102,94(11)
N(1)-Cu(1)-N(1)#1	176,45(10)		
N(6)-Cu(1)-N(6)#1	178,45(11)		
O(31)-Cu(1)-O(41)	166,57(10)		

Código de simetría: (#1) $-x, y, -z+1/2$

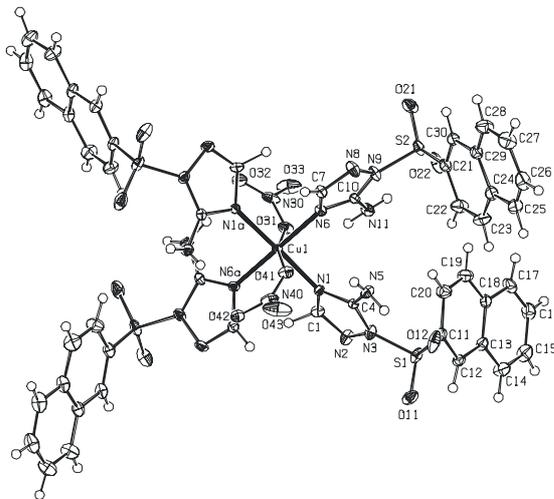


Figura II.19b. La unidad mononuclear de **4** con el etiquetado de los átomos.

II.C.3.2 Estructura de rayos-X de $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2 \cdot 2(\text{M})$ (5)

El estudio de difracción de rayos-X revela que el compuesto **5** está constituido por unidades diméricas $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2$ y dos ligandos **M** de cristalización por unidad. Las distancias y ángulos de enlace seleccionados, relacionados con el entorno de los iones $\text{Cu}(\text{II})$, se recogen en la tabla II.9. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

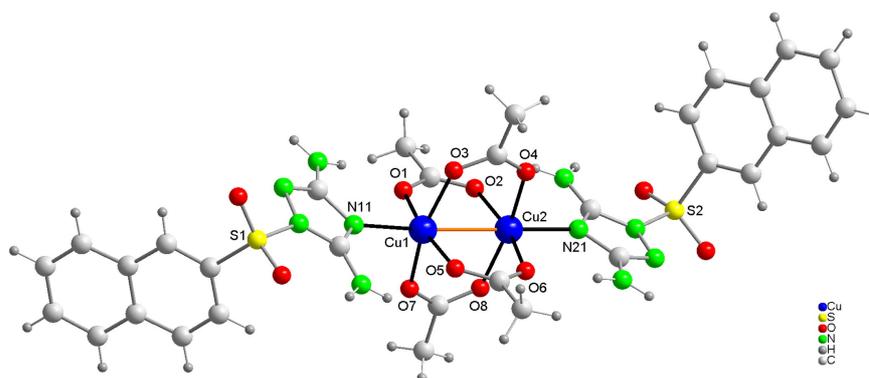


Figura II.21a. La unidad dinuclear de **5** (ver II.21b para etiquetado completo).

Como se aprecia en la figura II.21, cuatro aniones $\mu\text{-acetato}$ se coordinan de forma bidentada-puente a dos centros metálicos dando lugar a una estructura característica conocida como rueda de paletas (*paddle wheel*).^{100,101} Cada $\text{Cu}(\text{II})$ queda así enlazado a cuatro oxígenos carboxilato en posiciones ecuatoriales, a distancias Cu-O que oscilan entre 1,952(4) y 1,997(3) Å. La posición apical está ocupada por un ligando **M** monodentado. Esta distancia Cu-N_{trz} es diferente para cada cobre [$\text{Cu}(1)\text{-N}(11) = 2,179(4)$ Å y $\text{Cu}(2)\text{-N}(21) = 2,167(4)$ Å]. El cromóforo resultante es $\text{NO}_4\text{Cu}\cdots\text{CuO}_4\text{N}$, con el ligando **M** completando el entorno de pirámide tetragonal del átomo de cobre y contribuyendo a su desplazamiento fuera del plano formado por los cuatro oxígenos de los aniones acetato, a distancias de -0,2262(2) Å para el $\text{Cu}(1)$ y de 0,218(2) Å para el $\text{Cu}(2)$.

En **5**, como ocurre con el compuesto mononuclear **4**, la interacción del ligando **M** con el metal se produce a través de la posición N4 pero, a diferencia del ligando **N**, en **5** quedan libres dos grupos amino que establecen fuertes enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares.

La distancia Cu(1)-Cu(2), de 2,667(8) Å, es ligeramente más alta que la descrita para el compuesto dimérico diacetato de cobre(II) dihidrato (2,64 Å).^{65,66,102} Los ángulos N_{trz}-Cu(1)-Cu(2), muy próximos a la linealidad, son 176,33(11)° y 179,81(12)°, para N(11)-Cu(1)-Cu(2) y N(21)-Cu(2)-Cu(1), respectivamente. Esta conformación del dímero ha sido previamente observada en complejos análogos, obtenidos a partir de la sal Cu(AcO)₂ y ligandos *N*-dadores como piridinas, pirazinas, pirimidinas, pirazoles e imidazoles.^{66,103-107} Hay también cuatro ejemplos publicados con derivados de 1,2,4-triazoles¹⁰⁸⁻¹¹¹ y uno con un ligando derivado del 1,2,3-triazol.^{112,113} En este sentido, Lansolat-Matras y col. señalan que el anión acetato (OAc) induce el efecto plantilla *paddle wheel μ-mode* en el estado sólido.^{100,101} En el complejo **5**, a diferencia de lo observado en la mayoría de estos acetatos, los dos cobres no están relacionados por un centro de inversión debido a la presencia de los dos ligandos **M** de cristalización.

La estructura cristalina de **5** ha permitido visualizar la estructura del nuevo ligando **M**. Como en el caso del ligando **N**, en el ligando que nos ocupa la sulfonilación del diamino-triazol se ha producido sobre el nitrógeno N1 anular y no sobre el grupo amino NH₂ exocíclico. Las distancias y ángulos de enlace relacionadas con este sustituyente se recogen en forma de tabla en la sección Anexos. La conformación del ligando **M** está condicionada por la geometría del grupo sulfonilo. Para los ligandos **M** coordinados al cobre, el ángulo diedro promedio entre los planos definidos por el triazol y el naftaleno es de 88° [88,29(0,15) y 87,35(0,14)°]; en los ligandos **M** de cristalización, este mismo ángulo diedro es ligeramente menor: 79° [80,03(0,15) y 78,44(0,14)°]. En el ligando **M** el ángulo diedro promedio es de 85°. Para todos los sulfonil triazoles aquí preparados podemos concluir, pues, que los planos del triazol y el naftaleno se aproximan a la perpendicularidad.

Como se ha introducido previamente, los grupos amino libres de **M** establecen fuertes enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares. A destacar los intensos enlaces de hidrógeno entre los grupos amino y los oxígenos acetato y, específicamente los enlaces N(35)··O(3) [$d(D...A) = 2,956(5) \text{ \AA}$] y N(45)··O(8)* [$d(D...A) = 2,937(5) \text{ \AA}$; (*): x,y-1,z] que enlazan la unidad dimérica con el ligando de cristalización. Los enlaces de hidrógeno más relevantes se muestran en la figura II.22 y se incluyen en forma de tabla en la sección Anexos.

En la red del complejo **5** también se aprecian interacciones de apilamiento, las más intensas entre anillos triazol-triazol (con distancias entre centroides de 3,599 a 3,610 \AA). El conjunto resultante, una estructura supramolecular en capas alternas (parte metálica/parte orgánica), puede considerarse un híbrido orgánico-inorgánico (ver figura II.23).

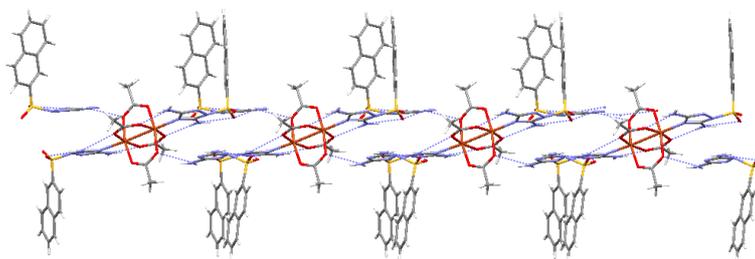


Figura II.22. Una de las cadenas de la red cristalina de **5**. Se muestran las moléculas de ligando de cristalización y los enlaces de hidrógeno que las conectan a las unidades dinucleares.

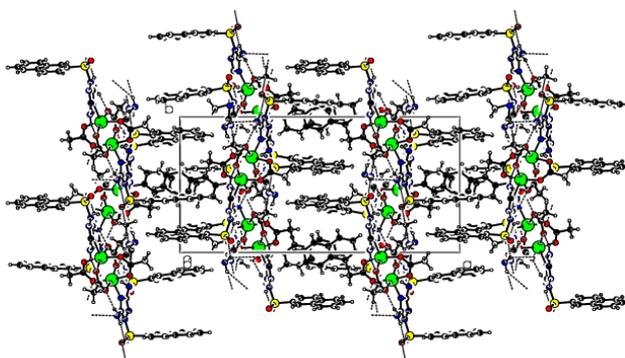


Figura II.23. Vista del empaquetamiento de **5**: capas alternas orgánica-inorgánica que generan un MOF.

Tabla II.9. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para el grupo el compuesto [Cu(M)(μ-acetato)₂]₂·2(M) (**5**) con las esds entre paréntesis.

Cu(1)-Cu(2)	2,6672(8)	Cu(2)-N(21)	2,167(4)
Cu(1)-N(11)	2,179(4)	Cu(2)-O(2)	1,986(3)
Cu(1)-O(1)	1,955(3)	Cu(2)-O(4)	1,960(3)
Cu(1)-O(3)	1,997(3)	Cu(2)-O(6)	1,988(4)
Cu(1)-O(5)	1,958(3)	Cu(2)-O(8)	1,967(3)
Cu(1)-O(7)	1,952(4)		
N(11)-Cu(1)-O(7)	98,76(15)	O(2)-Cu(2)-O(8)	89,81(14)
N(11)-Cu(1)-O(1)	97,71(15)	O(2)-Cu(2)-Cu(1)	85,53(10)
N(11)-Cu(1)-O(5)	93,52(14)	O(3)-Cu(1)-O(5)	87,98(14)
N(11)-Cu(1)-O(3)	96,33(14)	O(3)-Cu(1)-Cu(2)	80,09(9)
N(21)-Cu(2)-O(4)	92,77(15)	O(4)-Cu(2)-O(6)	89,49(17)
N(21)-Cu(2)-O(8)	97,93(15)	O(4)-Cu(2)-Cu(1)	87,25(10)
N(21)-Cu(2)-O(2)	94,29(14)	O(5)-Cu(1)-O(7)	90,06(16)
N(21)-Cu(2)-O(6)	100,55(14)	O(5)-Cu(1)-Cu(2)	87,19(10)
O(1)-Cu(1)-O(3)	89,41(15)	O(6)-Cu(2)-Cu(1)	79,63(10)
O(1)-Cu(1)-O(7)	89,59(17)	O(6)-Cu(2)-O(8)	87,30(16)
O(1)-Cu(1)-Cu(2)	81,51(10)	O(7)-Cu(1)-Cu(2)	84,84(10)
O(2)-Cu(2)-O(4)	90,67(16)	O(8)-Cu(2)-Cu(1)	82,05(10)

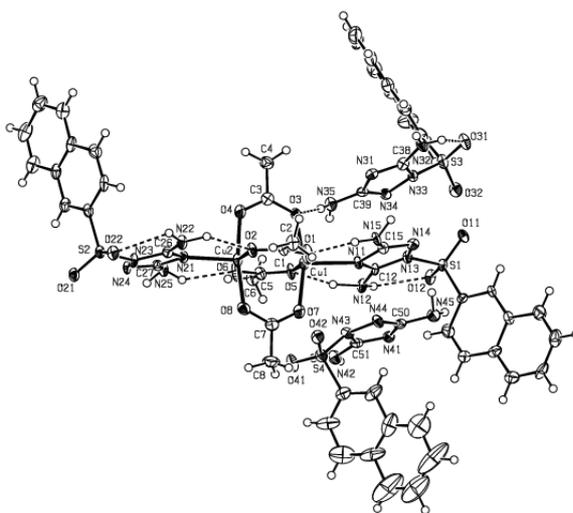


Figura II.21b. La unidad dimérica de **5** con el etiquetado de los átomos. Se muestran los enlaces de hidrógeno *intramoleculares* y el enlace de hidrógeno que conecta la unidad dinuclear con el ligando de cristalización (o *cocrystal*).

II.C.3.3 Espectroscopia infrarroja

En la tabla II.10 se muestran las bandas de IR más significativas para los complejos **4** y **5**, así como las bandas correspondientes a los ligandos sulfonil-triazol de partida para facilitar la comparación (ver figuras de los espectros en el Anexo I).

En la región 3450-3100 cm^{-1} , para ambos complejos se observan bandas claras de intensidad media-baja atribuibles a las vibraciones $\nu(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$ de los grupos amino exocíclicos. A frecuencias altas, el complejo **4** presenta una señal más definida (a 3437 cm^{-1}) que el complejo **5**, probablemente porque incluye también la vibración de tensión O-H del metanol de cristalización [$\nu(\text{O-H})$]. Entre 3100 y 3000 cm^{-1} se continúan observando las bandas propias de las vibraciones $\nu(\text{C-H})$ de C-sp² aromáticos.

Tanto para el complejo **4** como para el **5**, las señales asociadas a las vibraciones [$\nu(\text{C=N})$, $\gamma(\text{CNH})$] del anillo triazol, junto a las vibraciones de deformación del grupo amino [$\delta(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$], apenas se ven modificadas con respecto a las señales del ligando libre, apareciendo a 1642 y 1550 cm^{-1} , en **4**, y a 1631, 1580 y 1445 cm^{-1} , en **5**. El escaso desplazamiento es indicativo de que la coordinación a través del átomo N4 apenas afecta al esqueleto triazol. Nótese que, en el caso de **4**, hay una disminución de $\tilde{\nu}$ de 10 cm^{-1} (de 1541 a 1542 cm^{-1}), mientras que, en el caso de **5** la señal del triazol no sufre ningún cambio. Esta pequeña diferencia de comportamiento entre los dos compuestos puede entenderse a partir de la estructura cristalina: en **4** la distancia Cu-N4 (2,03 Å) es más corta que en **5** (2,17 Å); además, en esta última estructura se incluyen también dos ligandos de cristalización (que, por tanto, no estarían modificados por la coordinación).

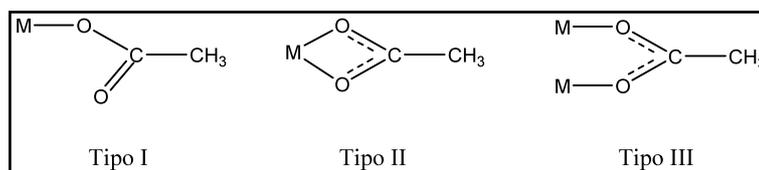
Al igual que sucede para las bandas del triazol, tampoco se observan desplazamientos significativos en las bandas del grupo sulfonilo, lo que indica la no coordinación de este grupo al centro metálico. Esta conclusión está de acuerdo con la estructura cristalina.

Los cambios más importantes entre el espectro de cada complejo y el de su correspondiente ligando se deben, de hecho, a la entrada de

los aniones. En el caso del complejo **4**, las señales correspondientes al grupo nitrato se observan a 1407-1384 cm^{-1} [para $\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$], en forma de doblete de intensidad fuerte, y a 1320 cm^{-1} [para $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$]. Estas frecuencias están de acuerdo con lo esperado para nitratos monodentados.⁶⁴ Cabe mencionar que el máximo a 1384 cm^{-1} ya estaba presente en el espectro del ligando libre [para el que se asignó a la vibración $\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}$]. Si se comparan los espectros del ligando y del complejo se observa, sin embargo, que en el complejo esta señal es mucho más intensa y ancha, indicando que engloba nuevas vibraciones; es decir, incluiría los modos $\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}$ del ligando y los $\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$ del anión.

Para el complejo **5**, las bandas a 1583 cm^{-1} y 1442 cm^{-1} se atribuyen a las vibraciones de tensión del acetato $\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$ y $\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$, respectivamente. Como sucedía en el complejo anterior, también en este caso se produce una superposición de bandas de los grupos del ligando y de los aniones. En este caso las dos señales del acetato aparecen combinadas con las correspondientes a las vibraciones de tensión de los anillos y de deformación de los grupos amino. Como consecuencia, en el espectro del complejo las bandas correspondientes aparecen ligeramente desplazadas pero claramente intensificadas con respecto a las mismas bandas en el espectro del ligando libre.

En relación a las frecuencias de estas dos bandas, Deacon y Phillips, tras examinar los espectros IR de numerosos acetatos con estructura cristalina conocida, concluyen que el valor de Δ [$\Delta = \nu(\text{COO})_{\text{asym}} - \nu(\text{COO})_{\text{sym}}$] es un indicio del modo de coordinación del anión acetato (esquema II.3):¹¹⁴



Esquema II.3. Modos de coordinación del grupo acetato.

Tabla II.10. Asignación de bandas IR para los complejos de los ligandos sulfonilo: [Cu(N)₄(NO₃)₂].4CH₃OH (**4**) y [Cu(M)(μ-acetato)₂].2(M) (**5**), así como para los respectivos ligandos.*

Compuesto	$\tilde{\nu}_{\max} / \text{cm}^{-1}$				
	[$\nu(\text{O-H})$ +/o $\nu(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$ +/o $\nu(\text{arC-H})$]	[$\delta(\text{N-H})_{\text{NH}}$ +/o NH_2 + $\nu(\text{C=N})_{\text{anillo}}$ + $\nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}$]	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{sym}}$	ν (anion)
N	3465 m; 3302 w; 3227 w; 3112 m	1693 sh; 1651 vs; 1571 m; 1521 s	1383 s	1179 vs	--
Comp. 4	3437 m; 3295 w; 3221 w; 3146 m	1642 vs; 1550 m	1384 s ^a	1176 vs	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$: 1407-1384 d, s ^a $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$: 1320 m $\nu(\text{NO})$: 1070m
M	3472 m; 3376 m; 3339 sh; 3180 m	1632 vs; 1571 s; 1452 s	1368 s	1187-1164 d, s	--
Comp. 5	3440 w; 3387 w; 3336 w; 3186 w	1631 vs; 1580 s ^b ; 1445 s ^b	1378 s	1185, 1161 d,s	$\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$: 1583 s ^b $\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$: 1445 s ^b

* *vs*: muy fuerte; *s*: fuerte; *m*: media; *w*: débil; *vw*: muy débil; *d*: doblete; *b*: ancha; *sh*: hombro; ν_{asym} : vib. de tensión asimétrica; ν_{sym} : vib. de tensión simétrica.

^a Contiene $\nu(\text{SO}_2)_{\text{asym}}$ y $\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$.

^b Contiene $\nu(\text{C=N})_{\text{anillo}}$ del anillo triazol y $\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$.

1. El acetato iónico presenta valores de Δ de 164 cm^{-1} .
2. Los complejos unidentados (estructura tipo I) exhiben los valores de Δ más altos: $\Delta = 228\text{-}298 \text{ cm}^{-1}$.
3. Los complejos quelatos (bidentados) (estructura tipo II) presentan valores de Δ significativamente menores a los de los compuestos iónicos: $\Delta = 42\text{-}77 \text{ cm}^{-1}$.
4. Por último, cuando el acetato actúa de puente entre dos centros metálicos (estructura tipo III), los valores Δ son apreciablemente mayores que los de los quelatos (bidentados) y próximos a los valores de compuestos iónicos: $\Delta = 140\text{-}169 \text{ cm}^{-1}$.

La correlación que se deduce sería: $\Delta_{\text{II}} < \Delta_{\text{iónico}} \leq \Delta_{\text{III}} < \Delta_{\text{I}}$. En el complejo **5**, el valor de Δ es de 141 cm^{-1} , lo que sugiere que el acetato actúa como bidentado puente entre dos iones cobre. Este dato de IR ha sido corroborado por la estructura cristalina del compuesto.

II.C.3.4 Propiedades magnéticas de 5

La figura II.24 muestra el comportamiento magnético de 5 en forma de χ_M frente a T , siendo χ_M la susceptibilidad magnética por cada dos iones Cu(II).

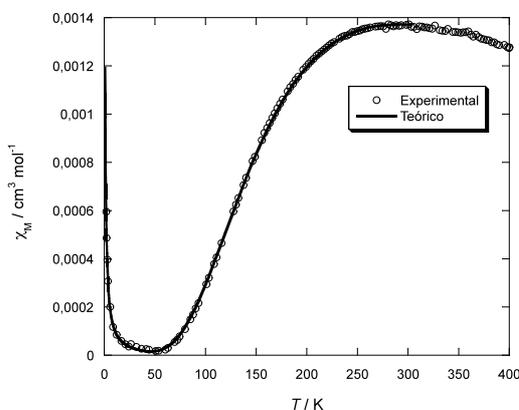


Figura II.24. Curva de χ_M frente a T para el complejo 5 (siendo χ_M la susceptibilidad magnética por unidad dinuclear).

La representación, característica de centros Cu(II) fuertemente acoplados, muestra un máximo de χ_M a aproximadamente 280 K y una disminución progresiva de este valor conforme disminuye la temperatura. Este comportamiento es típico de sistemas antiferromagnéticos discretos, y está de acuerdo con el comportamiento observado para otros complejos tetraacetato con la estructura *paddle wheel*.^{100,101} Por debajo de ≈ 50 K se observa una *cola*, probablemente debida a una pequeña impureza paramagnética.

Los datos magnéticos de 5 se ajustaron a la ecuación teórica derivada del Hamiltoniano de espín:

$$\mathbf{H} = -J\mathbf{S}_1\mathbf{S}_2 \quad (\text{ec. II.1})$$

donde J es la constante de acoplamiento magnético y \mathbf{S}_1 y \mathbf{S}_2 son los estados de espín (nótese que algunos autores usan la expresión: $\mathbf{H} = -2J\mathbf{S}_1\mathbf{S}_2$ y, por tanto, representan la diferencia de energía entre estados como $-2J$ en vez de $-J$).

Partiendo de este Hamiltoniano, el comportamiento magnético puede ser descrito mediante la siguiente ecuación de Bleaney-Bowers en la que se ha introducido un término adicional para tener en cuenta la impureza paramagnética [de un posible compuesto mononuclear de Cu(II)], y poder conseguir así un ajuste satisfactorio a temperaturas bajas (ecuación II.2):^{65,66,102,115}

$$\chi_M = (1 - \rho) \frac{2N\beta^2 g^2}{kT} \left[\frac{1}{3 + \exp\left(-\frac{J}{kT}\right)} \right] + \rho \frac{N\beta^2 g^2}{4kT} \quad (\text{ec. II.2})$$

En la ecuación todos los términos tienen su significado habitual y ρ es el porcentaje de impureza mononuclear paramagnética.

El mejor ajuste de los datos experimentales se obtuvo con los siguientes parámetros:

$$J = -324 (1) \text{ cm}^{-1}; \quad g = 2,07 (1); \quad \rho = 0,3 \%$$

Como se deriva de los parámetros obtenidos, el estado basal $S = 0$ aparece a 324 cm^{-1} ($-J$) por debajo del estado excitado $S = 1$. El sistema $S = 1$ surge de la interacción entre los dos iones Cu(II) a través del sistema conjugado de los carboxilatos (el llamado mecanismo de *superintercambio*).¹⁰⁶ En **5**, el entorno de coordinación del ión Cu(II) exhibe la típica elongación axial debida al efecto Jahn-Teller, lo que deja el orbital $d_{x^2-y^2}$ del cobre orientado a lo largo de los enlaces ecuatoriales, más cortos, actuando así como orbital magnético. Este orbital participa en el solapamiento directo σ - σ con los ligandos acetato implicados en el mecanismo de *superintercambio*. El resultado es un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los dos iones Cu(II).^{66,103-106,116} El valor de J calculado para **5** se encuentra en el rango alto de los valores descritos para carboxilatos.^{66,103-107,116} De hecho, la constante de acoplamiento hallada para el dímero de acetato de cobre *clásico* es $J = -296 \text{ cm}^{-1}$ o $J = -298 \text{ cm}^{-1}$.⁶⁵ No obstante, el valor de **5** es similar al publicado para el compuesto análogo $[\text{Cu}_2(\text{L})_2(\text{acetato})_4] \cdot 4\text{CH}_3\text{CN}$ ($\text{L} =$ ligando 1,2,3-triazol).^{112,113} Aunque en este último ejemplo la unidad triazol no está coordinada, la σ -

donación del ligando axial es similar a la del compuesto **5** y, consecuentemente, ambos compuestos muestran valores de J comparables.¹⁰⁶

La caracterización magnética de **5** se ha completado con el estudio de EPR (banda X) de una muestra policristalina, en el rango de temperaturas 4-300 K. El espectro EPR de **5** a temperatura ambiente es silencioso, lo cual está de acuerdo con la presencia de dos cobres fuertemente acoplados (máximo observado a 280 K en la curva experimental de χ_M frente T). Por debajo de ≈ 50 K se aprecia una señal a 3000 G, cuya intensidad aumenta al bajar la temperatura. Esta señal debe corresponder a la impureza paramagnética también detectada en la curva de magnetismo. En la bibliografía se han documentado, sin embargo, espectros bien definidos a 77 K para dímeros carboxilato similares.^{66,106,107}

II.C.4 Estudio de interacción con el ADN de **4** y **5**

Debido a la limitada solubilidad de los complejos en agua, las propiedades bioinorgánicas de los compuestos **4** y **5** se estudiaron en tampones acuosos conteniendo un 5% de DMF.

La estabilidad del compuesto $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{CH}_3\text{OH}$ (**4**) en estas condiciones fue ensayada por espectrometría de masas. En el espectro de masas modo positivo (ESI-MS⁺) se observa una señal correspondiente a la especie $\{[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)] + \text{H}^+\}^{2+}$; este resultado sugiere que la entidad mononuclear permanece en disolución.

En el caso del compuesto $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2 \cdot 2(\text{M})$ (**5**) los estudios de espectrometría de masas no fueron concluyentes ni en modo ESI-MS⁺ ni en modo FAB-MS⁺. Por este motivo se realizaron dos estudios adicionales: de EPR en disolución y de conductividad. El espectro EPR en disolución (a 100 K, disolución acuosa conteniendo un 5 % de DMF) es silencioso. Las medidas de conductividad (en H₂O:DMF, proporción 2:1), sugieren un comportamiento intermedio entre electrolito tipo 1:1 y tipo 1:2 (ver apartado II.C.2.2.2). Estas dos últimas pruebas evidencian que la unidad dinuclear es estable en disolución, y que al menos 2-3 aniones acetato permanecen unidos a los centros de cobre.

El estudio de las propiedades de unión al ADN se realizó por las siguientes técnicas: fluorescencia, temperatura de desnaturalización y viscosimetría. Con objeto de proporcionar un contexto a los resultados experimentales se ha preparado la tabla II.11, que incluye datos experimentales de K_{app} , ΔT_m y viscosimetría para una serie de compuestos: los dos complejos estudiados aquí, cinco compuestos cuyo modo de interacción con el ADN es conocido (acridina, bromuro de etidio, Hoechst 33258, verde de metilo y sulfato de cobre), la especie $[Cu(phen)_2]^{2+}$, dos complejos de la bibliografía que contienen ligandos con grupos naftaleno, y un complejo de cobre estudiado también en la presente *Tesis Doctoral* (ver más adelante sección II.D.4 de este Capítulo).

Tabla II.11. Parámetros experimentales de ensayos de interacción con el ADN (viscosimetría, desnaturalización térmica y espectroscopia de fluorescencia) para compuestos seleccionados.

Modo de interacción	Compuesto ^a	Viscosimetría ^b (η/η_0) ^{1/3}	ΔT_m (°C) ^c	K_{app} (M ⁻¹) ^d	Ref.
Intercaladores clásicos	Acridina	sin dato	7*	1,5×10 ⁶	119, 171
	Bromuro de etidio	1,23	4-8*	3×10 ⁷	88, 171
Intercalador <i>parcial</i>	[Cu(phen) ₂ Cl ₂]	1,20	9	6,5×10 ⁶	Ver ^e
	[Cu(M)(μ-acetato)₂]₂·2(M) (5)	1,16	16	2,6×10⁷	esta Tesis
	[Cu(acac)(nip)](NO ₃)	1,15	9	4,0×10 ⁶	88
	[Cu(nip) ₂](NO ₃) ₂	1,13	13	6,6×10 ⁶	88
	[Cu ₄ (atc) ₂ (dien) ₄ (ClO ₄) ₂](ClO ₄) ₂ ·2H ₂ O (6)	1,06	18	6,2×10 ⁶	esta Tesis
	[Cu(N)₄(NO₃)₂]₄·4CH₃OH (4)	1,02	≈ 3	2,2×10⁷	esta Tesis
	[Cu(μ -Ade)(TolSO ₃)(phen)] ₂ ·2H ₂ O	1,00	22	sin dato	74, 75
Agente de unión electrostática	CuSO ₄	1,00	sin dato	4,9×10 ⁶	74, 171
Agentes de unión a los surcos	Hoechst 33258	sin dato	>25*	1,2×10 ⁸	119, 171
	Verde de metilo	sin dato	sin dato	1,0×10 ⁷	171

^a phen = 1,10-fenantrolina; acac = acetilacetato; nip = 2-(naftalen)-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina;

H₂atc = ácido 5-amino-1,2,4-triazol-3-carboxílico; dien = dietilenetriamina; HAde = adenina; TolSO₃⁻ = anion toluenesulfonato.

^b CT ADN, (η/η_0)^{1/3} valor para: [compuesto]/[CT-ADN] = 0,1.

^c CT ADN, excepto para los compuestos parados con un *, los cuales fueron estudiados con poli(dA) · poli(dT).

^d obtenido a partir de la ecuación: $K_{EB} [EB] = [C_{50}] K_{app}$.

^e Ver Capítulo III (apartado III.C) de la presente *Tesis Doctoral*.

II.C.4.1 Espectroscopia de fluorescencia

La obtención de las constantes de unión aparentes (K_{app}) de **4** y **5** se realizó por el método de desplazamiento descrito en la sección 1.3.1.1. de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo. El ensayo consiste en registrar los espectros de emisión del aducto CT ADN-EB en presencia de distintas concentraciones de complejo (disoluciones *problema*), y determinar los cambios que se producen en el máximo de intensidad de emisión del aducto.

Como paso previo se ensayaron las siguientes disoluciones *control* en las mismas condiciones que las disoluciones *problema*: disolución de complejo; disolución de complejo + ADN; disolución de complejo + EB (sin ADN). Las dos primeras no mostraron fluorescencia apreciable y la tercera no mostró cambios en relación a la disolución de EB (sin complejo).

Las figuras II.25 y II.26 muestran los espectros de emisión del aducto CT ADN-EB obtenidos en ausencia y presencia de diversas concentraciones de complejo (0-50 μM). Se incluyen también los gráficos de Stern-Volmer, en los que se representa el cociente I_{F0}/I_F frente a la concentración de complejo, siendo I_{F0} e I_F el máximo de intensidad de emisión en ausencia y en presencia de complejo, respectivamente.

Las figuras II.25 y II.26 muestran que ambos complejos producen una reducción en la intensidad de emisión del EB, lo que indica que se produce interacción con el ADN.

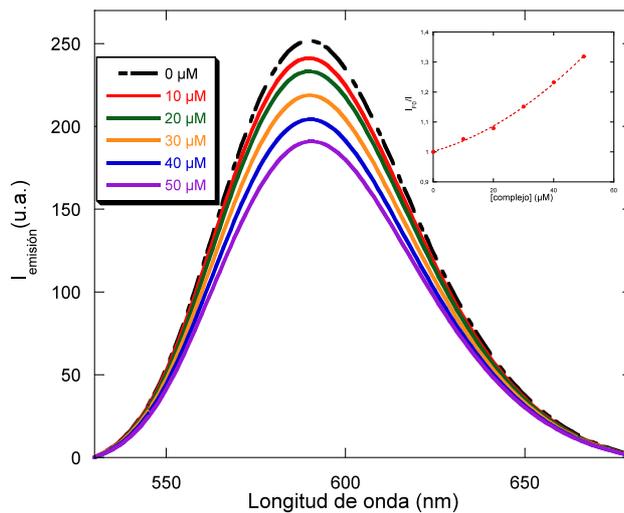


Figura II.25. Espectro de emisión del bromuro de etidio y CT ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **4**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF. **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejo (I) frente a la concentración de **4** [ajuste polinomial: $y = 1,002 + 0,003x + 7,1 \times 10^{-5}x^2$ ($R^2 = 0,998$)].

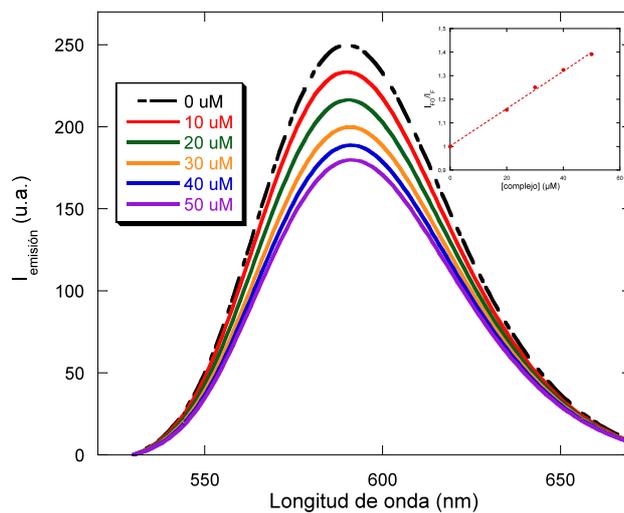


Figura II.26. Espectro de emisión del bromuro de etidio y CT ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **5**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF. **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejo (I) frente a la concentración de **5** [ajuste lineal: $y = 1,002 + 0,008x$ ($R^2 = 0,997$)].

Como se muestra en el cuadro interior de las figuras II.25 y II.26, la desactivación del sistema ADN-EB por el compuesto **5** se ajusta a la ecuación clásica de Stern-Volmer, pero la del compuesto **4** no exhibe una tendencia lineal. Por esta razón se llevó a cabo un ensayo de fluorescencia alternativo (figura II.27). Se trata de una valoración cuantitativa que mide la concentración de agente necesaria para reducir al 50% la fluorescencia de una disolución de ADN-EB (valor de C_{50}), tal y como se detalla en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo. Los valores de C_{50} para **4** y **5** se han obtenido con este segundo enfoque, más preciso.

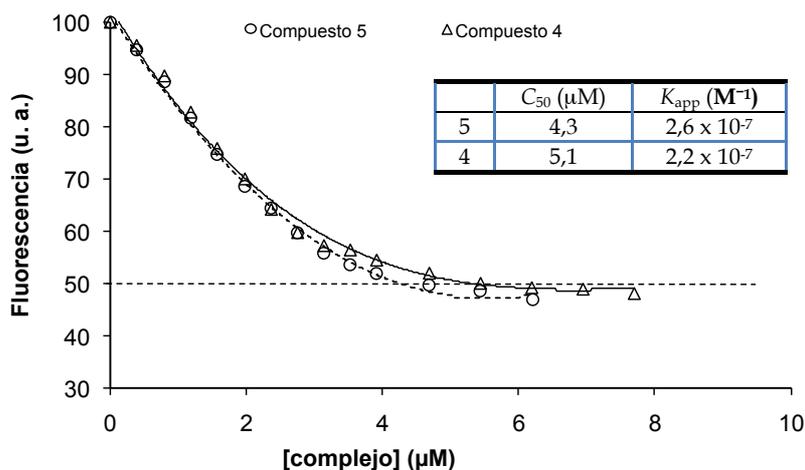


Figura II.27 Ensayo de desplazamiento competitivo del EB del aducto ADN-EB por el complejo **4** y el complejo **5**. Condiciones: CT ADN = 3 μM , EB = 3,78 μM ; tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0).

Las constantes de unión aparentes (K_{app}) de los compuestos se han calculado a partir de la siguiente ecuación:

$$K_{app} = K_{EB} \times [EB] / C_{50} \quad (\text{ec. II.4})$$

en la que $K_{EB} = 3,0 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, y $[EB] = 50 \mu\text{M}$. Los resultados se recogen en la tabla II.11. Los valores de K_{app} para **4** y **5**, ambos en torno a $\sim 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, pueden ser considerados *medio-altos* para complejos de cobre (los compuestos de la tabla II.15 se encuentran en el rango

$\sim 10^{-8}$ y $\sim 10^{-6}$ M⁻¹). La bibliografía recoge valores de $\sim 10^{-5}$ M⁻¹ para compuestos de Zn(II) con ligandos conteniendo grupos naftaleno.¹¹⁷

II.C.4.2 Temperatura de *fusión* del ADN

La interacción de los complejos con el ADN puede estabilizar la doble hebra de ADN y por tanto aumentar el valor de T_m del ADN.^{78,118,119} El estudio consiste en registrar la absorbancia a 260 nm de una muestra de ADN en ausencia y presencia de complejo en el rango de temperaturas 25-90 °C, tal y como se detalla en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Las figuras II.28 y II.29 muestran las curvas de temperatura de *fusión* experimentales para ambos compuestos. En todos los casos se ha restado la absorbancia del complejo a 260 nm (por ello se representan *absorbancias normalizadas*).

Para el complejo **4** se observa un ΔT_m del CT ADN de $\sim 3^\circ$ C para una relación [ADN]/[complejo] = 4. El ensayo sugiere una interacción ADN-complejo débil. La disminución de absorbancia a temperaturas altas en presencia de complejo, inusual pero ya observada para el compuesto **1**, se discutirá más adelante.

En el caso del complejo dinuclear **5** los cambios que se observan son significativos. A una relación [ADN]/[complejo] = 5 el ΔT_m es de $\sim 16^\circ$ C. En comparación con los valores de la bibliografía, estos ΔT_m son altos e indicativos de una interacción importante.^{74,75}

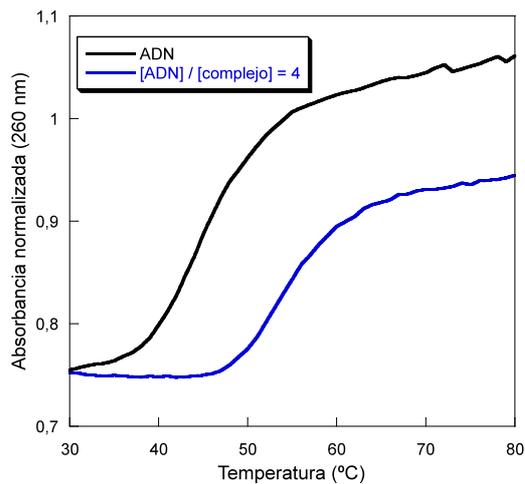


Figure II.28. Curva de temperatura de fusión del CT ADN (100 μ M) en ausencia (negro) y en presencia de **4** (25 μ M, azul) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2) conteniendo un 5% DMF. **Leyenda:** relación [ADN]/[complejo **4**].

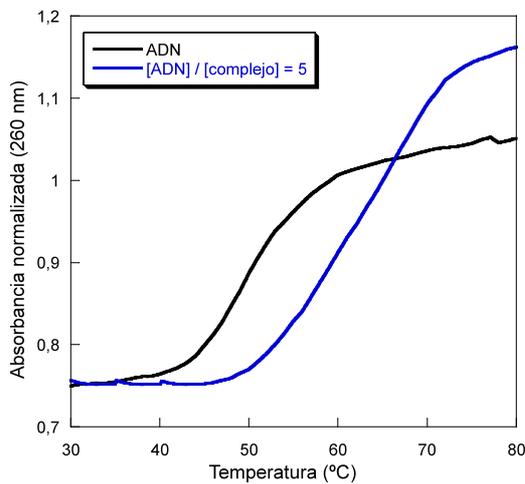


Figure II.29. Curva de temperatura de fusión del CT ADN (100 μ M) en ausencia (negro) y en presencia de **5** (20 μ M, azul) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2) conteniendo un 5% DMF. **Leyenda:** relación [ADN]/[complejo **5**].

II.C.4.3 Viscosimetría

Los ensayos se realizaron según se detalla en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran como una representación gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, donde η es la viscosidad de la disolución tampón-ADN-complejo y η_0 es la viscosidad de la disolución tampón-ADN, frente a relaciones crecientes $[\text{complejo}]/[\text{ADN}]$. Los efectos producidos en el CT ADN por **4** y **5** se muestran en la figura II.30.

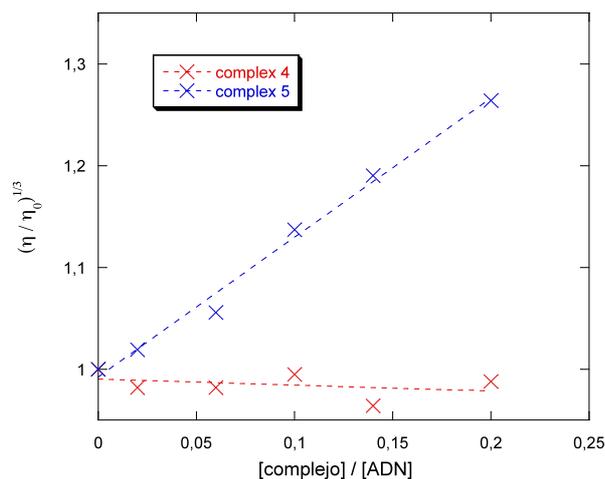


Figure II.30. Ensayo de viscosidad para **4** y **5**. [CT ADN] = 50 μM en presencia de 1, 3, 5, 7 y 10 μM de compuesto **4/5** en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) con 5% DMF.

Los resultados revelan, de nuevo, el diferente comportamiento de los dos compuestos. No hay cambio apreciable en la viscosidad relativa del ADN en presencia de cantidades crecientes de **4**; esto indica que **4** no interacciona mediante intercalación. En cambio, la viscosidad relativa del ADN aumenta conforme aumenta la concentración de **5**, lo que sugiere que el complejo **5** se une al ADN mediante intercalación (presumiblemente) de los anillos naftaleno del ligando. El compuesto **4**, con cuatro grupos naftaleno en su estructura, no intercala, probablemente debido al impedimento estérico producido entre los ligandos.

II.C.5 Estudio de actividad nucleasa en electroforesis mediante gel de agarosa de 4 y 5

II.C.5.1 Ensayo de actividad

La capacidad de corte del ADN de los dos complejos se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los complejos se incubaron a diferentes concentraciones con plásmido superenrollado tipo pUC18 en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) conteniendo un 5%/10% de DMF a 37 °C durante 1 hora. Los ensayos se realizaron según el protocolo general descrito en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Las figuras II.31 y II.32 muestran las electroforesis resultantes del corte producido por los complejos **4** y **5**, respectivamente.

Como se observa en la figura II.31, en 5% de DMF el compuesto mononuclear **4** es capaz de mediar la conversión de ADN superenrollado en circular abierto a una concentración de 20 µM pero con una gran cantidad de activante: 300x ascorbato/H₂O₂ (150+150; esto es, 300 veces la concentración de cobre). Cuando la concentración aumenta a 30 µM, el compuesto **4** produce la conversión total del ADN superenrollado a las formas circular abierta y lineal, e incluso se aprecia la formación de fragmentos más pequeños que generan una estela en el gel (carreras 4-6). En 10% DMF, **4** produce la rotura total del ADN superenrollado a concentraciones menores (25 µM; carreras 7-8). Si se compara el corte de **4** con el producido por cantidades equimolares de la sal de cobre en las mismas condiciones, se detecta que el complejo es ligeramente más activo que la disolución de sal de cobre (carreras 3 y 6).

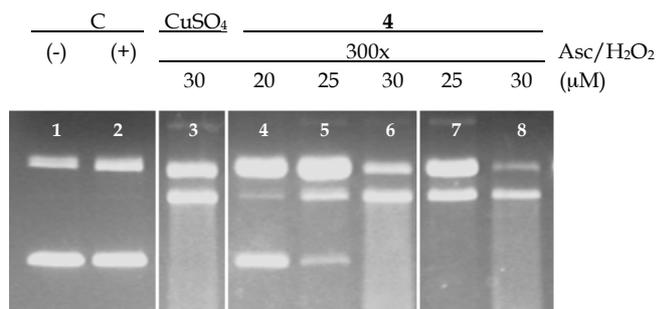


Figura II.31. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por CuSO₄ y el compuesto **4**, en presencia de ascorbato/H₂O₂ (300x de exceso), incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) conteniendo 5% DMF (carreras 1-6) / 10% DMF (carreras 7 y 8), durante 1 h a 37 °C. C corresponde a los controles de ADN.

La figura II.32 revela que el compuesto **5** degrada el ADN de forma eficiente con pequeñas cantidades de agente reductor. En presencia de un de exceso de ascorbato (25x), una concentración 25 μM de **5** transforma completamente el ADN superenrollado en formas circular + lineal, y 35 μM de **5** origina la casi total degradación del ADN (carreras 6-8). Además, la actividad del complejo es claramente superior a la de concentraciones equimolares de la sal de cobre (comparar carreras 3 y 7). Teniendo en cuenta que el compuesto **5** es un dímero, la comparación también puede realizarse entre la carrera 3 (30 μM de CuSO₄) y la carrera 4 (15 μM de **5** = 30 μM en cobre); en este caso, aunque el grado de corte es aparentemente similar, el complejo ya consigue generar forma lineal.

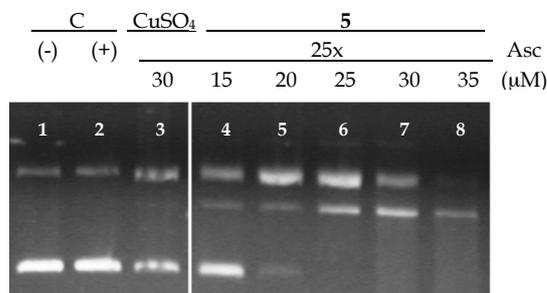


Figura II.32. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por CuSO₄ y el compuesto **5**, en presencia de ascorbato (25x de exceso), incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF durante 1 h a 37 °C. C corresponde a los controles de ADN.

II.C.5.2 Ensayo sobre la influencia de agentes inhibidores en la actividad nucleasa de 4 y 5

El patrón de corte de ambos compuestos parece reflejar una rotura aleatoria del esqueleto de ADN. Además, el requerimiento de agente reductor para mostrar actividad nucleasa sugiere que la actividad nucleolítica de **4** y **5** es de naturaleza oxidativa. Con el fin de profundizar en este mecanismo oxidativo, se estudió la implicación de las diferentes especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante estudios de inhibición del corte en presencia de agentes captadores de las mismas. El procedimiento experimental se detalla en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran en las figuras II.33 y II.34 para **4** y **5**, respectivamente.

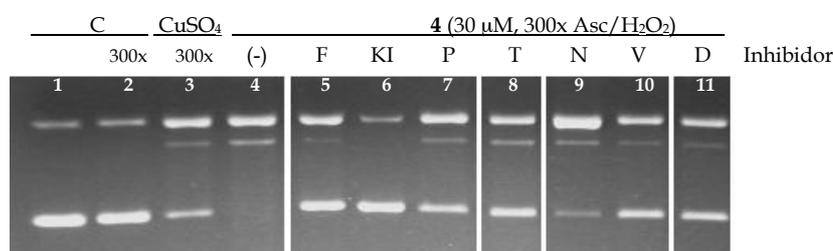


Figura II.33. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por el compuesto **4** (30 μM) en presencia de inhibidores/agentes de interacción con los surcos, incubado en tampón cacodilato (0,1 M pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF durante 1 h a 37 °C. C = controles pUC18 sin/con reductor; CuSO₄ con reductor; F = formiato sódico; KI = yoduro potásico; P = 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; T = Tiron; N = neocuproína; V = verde de metilo; D = distamicina A.

La figura II.33 muestra que la adición de formiato sódico, yoduro potásico, 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona y Tiron inhiben la actividad de **4**; por tanto, las especies $\cdot\text{OH}$, $^1\text{O}_2$ and O_2^- deben estar implicadas en el proceso de ruptura del ADN (comparar carreras 4 con carreras 5-8). Además, la reacción es inhibida en presencia del agente quelante de Cu(I) neocuproína (carreras 4 y 9), como era de esperar para un mecanismo oxidativo que implica al ion cobre(II). Finalmente, para clarificar otros aspectos del mecanismo también se investigaron los agentes afines a los surcos distamicina A (surco menor) y verde de metilo (surco mayor). Ambos agentes disminuyen considerablemente el corte producido por **4** (carreras 10 y 11), indicando que el complejo

4 debe unirse a través de ambos surcos. Esta conclusión está de acuerdo con la obtenida a partir de los estudios de interacción previos, los cuales sugerían una unión de **4** a la *superficie* del ADN.

El mismo estudio de inhibición fue realizado para el complejo **5** (figura II.34). Los experimentos con agentes captadores de $\cdot\text{OH}$ no fueron concluyentes, pero **5** presenta resultados similares a **4** en relación a los agentes captadores de $^1\text{O}_2$, O_2^- y a la neocuproína (comparar carreras 4 y carreras 5-8). Con agentes de unión a los surcos, el comportamiento de los dos compuestos es claramente diferente. En el caso del complejo **5** no hay una inhibición significativa del corte ni en presencia de distamicina A ni en presencia de verde de metilo (ensayo no mostrado). Los experimentos de interacción indicaban que el complejo **5** intercala entre los pares de bases de la doble hebra; el experimento con los agentes de unión a los surcos sugiere ahora que la intercalación de **5** debe producirse aún en presencia de éstos.

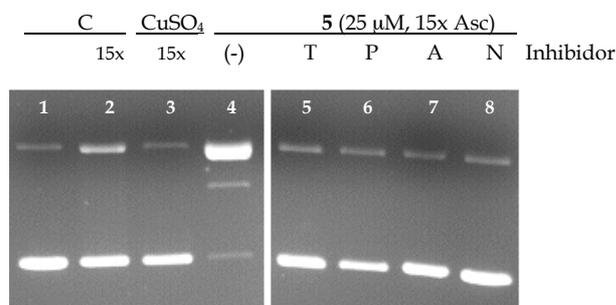


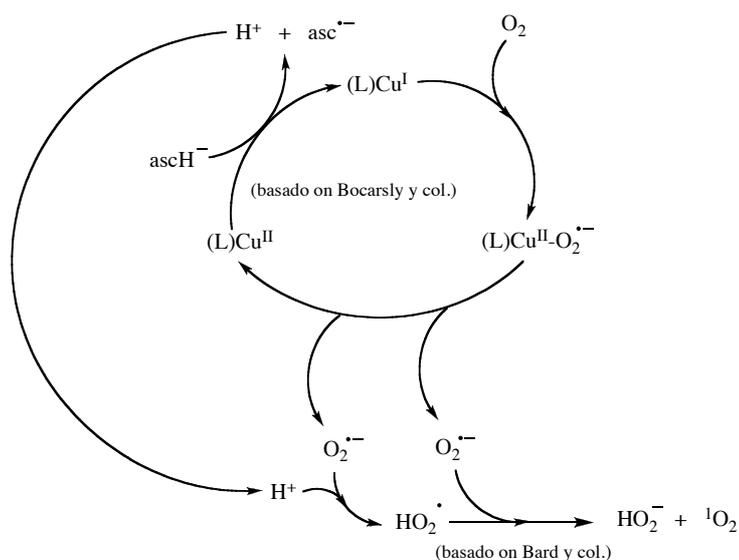
Figura II.34. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por el compuesto **5** (25 μM) en presencia de inhibidores, incubado en tampón cacodilato (0,1 M pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF durante 1 h a 37 °C. C = control pUC18 con/sin ascorbato; CuSO₄ con ascorbato; T = Tiron; P = 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; A = azida sódica; N = neocuproína.

II.C.5.3. Resumen de las propiedades de interacción con el ADN y rotura de 4 y 5 (tabla II.11)

El compuesto **4** produce una estabilización muy baja de la doble hebra y no intercala, si bien su K_{app} es mayor que la K_{app} de la acridina, un conocido agente de intercalación.¹²³ Estos datos indican que **4** interacciona con el ADN pero por el esqueleto de azúcar-fosfato o por los surcos, mediante atracciones electrostáticas o enlaces de hidrógeno (también indica que un valor alto de K_{app} no puede considerarse una prueba de intercalación). La (en conjunto) moderada interacción de **4** con el ADN lleva a una limitada actividad nucleasa. El ensayo con agentes inhibidores confirma el carácter oxidativo del mecanismo de acción y muestra que no hay una unión específica del compuesto a uno u otro surco.

El compuesto **5** es un buen agente intercalante, comparable a la $[Cu(phen)_2]^{2+}$ ¹²⁰ y a otros compuestos cobre-naftaleno de la bibliografía (por lo menos en lo que respecta a la variación de viscosimetría del ADN).⁸⁸ Además, **5** produce un aumento considerable del T_m , mayor incluso al documentado para agentes intercalantes puros como la acridina¹¹⁹ o el bromuro de etidio.⁸⁸ Estos resultados tomados conjuntamente sugieren que la interacción de **5** con el ADN no se produce únicamente por intercalación.^{78,119} Como era de esperar, la K_{app} de **5** es alta (aunque sólo ligeramente mayor que la del compuesto **4**). Además, los ensayos de inhibición no muestran cambio significativo de actividad nucleasa en presencia de agentes de unión a los surcos; esta información permite descartar la posible interacción a través de los surcos. Probablemente la pérdida de algún ligando acetato del complejo en disolución produce especies con carga positiva y se favorece la interacción electrostática del compuesto con el ADN.⁸⁵

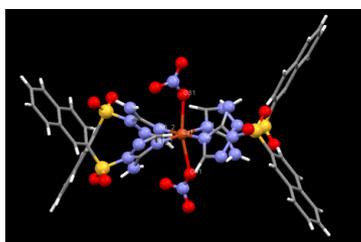
En suma, la gran afinidad de **5** por la doble hebra conduce a una actividad nucleasa notable, por vía oxidativa. El esquema II.4 incluye un posible mecanismo para la generación de las especies reactivas implicadas en el corte del ADN.^{121,122}



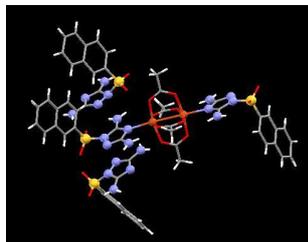
Esquema II.4. Mecanismo propuesto para la generación de ROS (basado en Bard y Bocarsly).^{121,122}

II.C.6 Conclusiones – Discusión

A continuación se resumen las conclusiones extraídas del estudio inorgánico y bioinorgánico de los compuestos **4** y **5**:



Compuesto **4**



Compuesto **5**

1. Se han ensayado dos nuevos ligandos derivados del 3,5-diamino-1,2,4-triazol, **N** y **M**, en los que se ha incorporado un grupo naftaleno mediante sulfonilación para facilitar la intercalación en el ADN. El grupo sulfonilo *dobla* el ligando. Por reacción con sales de Cu(II) se han logrado aislar dos compuestos distintos de Cu(II), **4** y **5**.

2. La estructura cristalina de $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2] \cdot 4\text{CH}_3\text{OH}$ (**4**) está formada por unidades *mononucleares* en las que el ión Cu(II) está enlazado ecuatorialmente a cuatro ligandos N monodentados que coordinan a través del átomo N4-triazol.

3. La estructura cristalina de $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2 \cdot 2(\text{M})$ (**5**) está constituida por unidades *dinucleares* y moléculas **M** de cristalización. En la unidad dinuclear los dos iones Cu(II) se enlazan mediante cuatro aniones μ -acetato en forma de *paddle wheel* (o rueda de paletas); los ligandos **M** coordinan en la posición axial a través del átomo N4-triazol. La distancia $\text{Cu} \cdots \text{Cu}'$ es de 2,667(1) Å. Como resultado de fuertes interacciones de apilamiento e intensos enlaces de hidrógeno se genera un MOF (estructura supramolecular con capas metálica-orgánica alternas).

4. En el compuesto dímero **5** los dos cobres presentan un fuerte acoplamiento antiferromagnético [$J = -324(1) \text{ cm}^{-1}$]. El espectro EPR (banda X) es silencioso a temperatura ambiente.

5. En relación a los estudios de interacción, **4** presenta valores de K_{app} medio-altos ($2,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), produce una ligera estabilización de la doble hebra ($\Delta T_m \sim 3 \text{ }^\circ\text{C}$) y no intercala. El compuesto **5** presenta valores similares de K_{app} ($2,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), produce un gran aumento del T_m ($16 \text{ }^\circ\text{C}$) e intercala.

En el caso del monómero **4**, con cuatro ligandos monodentados, el impedimento estérico establecido entre los 4 fragmentos naftaleno impide la intercalación. En el caso del dímero **5**, los puentes μ -acetato mantienen los dos centros metálicos separados, con lo que los ligandos **M** axiales se encuentran lo suficientemente alejados para permitir que los grupos naftaleno puedan intercalarse. Probablemente la interacción de **5** con el ADN se ve reforzada por atracciones electrostáticas.

6. Ambos compuestos son capaces de cortar el ADN en presencia de agentes activantes por mecanismo oxidativo. El compuesto **4** es capaz de escindir completamente el ADN superenrollado a formas circular y lineal a una concentración de 30 μM (con 300x ascorbato). El compuesto **5**, mucho más activo, produce el mismo grado de degradación del pUC18 a 25 μM (y con tan sólo 25x ascorbato).

La actividad nucleasa de los dos compuestos se correlaciona bien con su afinidad por el ADN, esto es, el compuesto **5** interacciona mejor con el ADN que el compuesto **4** y es una nucleasa más eficiente. En resumen, el nuevo ligando **M** ha permitido la obtención de un nuevo agente de Cu(II) que interacciona fuertemente con ADN y se comporta como una buena metalonucleasa.

**II.D UN COMPLEJO DE COBRE(II)
TETRANUCLEAR DE TIPO $\text{Cu}'\text{-Cu(N-N)}_2\text{Cu-Cu}'$,
CONSTRUIDO A PARTIR DE UN LIGANDO
 μ_3 -1,2,4-TRIAZOLATO- μ -CARBOXILATO,
COMO AGENTE CAPAZ DE DEGRADAR EL
ADN***

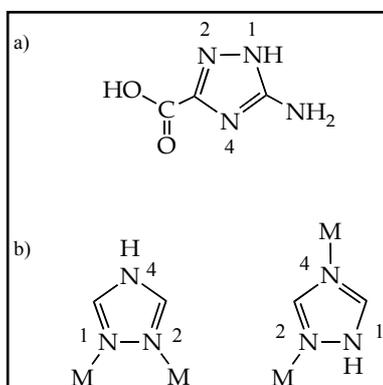
II.D.1 Antecedentes y objetivos

Los compuestos polinucleares, como se ha introducido en el apartado II.A.2 de este Capítulo, han adquirido gran interés en el campo de las metalonucleasas desde que Karlin y col. mostraran que la nuclearidad es un factor clave en el mecanismo de rotura oxidativo,

*Los resultados que se presentan a continuación han sido objeto de la siguiente publicación: Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Castiñeiras, A.; Lloret, F. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 9809-9819.

ya que la posible cooperatividad entre los centros metálicos puede facilitar la formación del intermedio activo.^{45,123} Así, recientemente se han descrito una serie complejos de cobre dinucleares y trinucleares capaces de actuar como potentes agentes de corte del ADN,^{27,75,124-126} entre ellos, el complejo dinuclear de cobre(II)-triazol con fórmula $[\text{Cu}_2\text{L1}(\mu\text{-SO}_4)](\text{PF}_6)_2$, en el que L1 es el ligando 3,5-bis[bis(piridin-2-ilmetil)amino)metil]-4-amino-1,2,4-triazol.¹⁵

En este contexto seleccionamos el ligando **H₂atc** (**H₂atc** = ácido 5-amino-1,2,4-triazol-3-carboxílico) (Esquema II.5a), por presentar varias posibilidades de coordinación (especialmente en su forma aniónica, atc²⁻) y por su capacidad para formar compuestos polinucleares. A partir de este ligando y en presencia del co-ligando dien (dien = dietilentriammina), se ha conseguido aislar un compuesto *tetranuclear* inusual, soluble en medio acuoso, que se describe y estudia a lo largo del presente apartado.



Esquema II.5. (a) El ligando H₂atc; (b) sistemas *punte* $\mu_{1,2}$ y $\mu_{2,4}$ 1,2,4-triazol.

Los compuestos de coordinación de Cu(II) **tetranucleares** muestran una gran variedad estructural. La clásica revisión de Haasnoot,¹ la realizada por Brooker y col.,² y la más reciente de Gámez y col.³ revelan que los compuestos tetranucleares de cobre con ligandos 1,2,4-triazol son muy escasos, pudiéndose clasificar en cuatro grupos: (i) tetraédricos, (ii) rectangulares, (iii) de tipo *mariposa*, y (iv) de tipo “1+2+1”.

(i) Del primer grupo tan sólo se ha descrito un *clúster* atípico: el complejo $[\text{Cu}(\text{HL}2)(\text{H}_2\text{O})]_4(\text{NO}_3)_4$ ($\text{HL}2 = 3\text{-(piridin-2-il)-5-(pirazin-2-il)-1,2,4-triazol}$), en el que los iones cobre presentan un entorno **tetraédrico**.¹²⁷ En este caso el papel estructural que desempeña el heterociclo no es relevante, en contraste con lo que sucede con los compuestos *cubano* construidos a partir de ligandos μ -oxo, μ -alcoxo o μ -halógeno.¹²⁸⁻¹³⁴

(ii) Se han referido unos pocos compuestos **rectangulares**, que pueden ser considerados como *dímeros* de unidades dinucleares ($\text{Cu}_2 \cdots \text{Cu}_2$). Entre ellos se encuentran los compuestos $[\text{Cu}_2\text{Cu}^{\text{II}}_2(\text{L}3)_4(\text{pic})_2]$ y $[\text{Cu}_4(\text{L}3)_4]$ ($\text{L}3 = 3,5\text{-bis-(piridin-2-il)-1,2,4-triazol}$, $\text{Hpic} = \text{ácido picolínico}$), ambos obtenidos mediante síntesis hidrotermal.^{135,136} El último es el bloque tetramérico de una estructura supramolecular; los cuatro centros metálicos del bloque definen un quasi-rectángulo ($\text{Cu}1 \cdots \text{Cu}2 = 4,325 \text{ \AA}$, $\text{Cu}1\text{-Cu}2\text{A} = 5,972 \text{ \AA}$, $\text{Cu}2 \cdots \text{Cu}1 \cdots \text{Cu}2\text{A} = 90,7^\circ$). Otro ejemplo lo constituye el compuesto rectangular $[\text{Cu}_4(\text{L}4)_4(\text{OH})_2(\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)$ ($\text{HL}4 = 3,5\text{-diamino-1,2,4-triazol} = \text{guanazol}$), que exhibe dos tipos de puente $\text{Cu} \cdots \text{Cu}$;¹³⁷ en uno interviene sólo un puente el triazol y, en el otro, el puente triazol junto a un puente $\mu\text{-OH}$.

(iii) En la bibliografía también pueden encontrarse algunas estructuras **con forma de mariposa**. Esta organización consiste en dos triángulos fusionados con un grupo oxo o hidroxilo en el centro y, habitualmente, con ligandos puente carboxilato adicionales. Los dos iones metálicos centrales forman el *cuerpo* de la mariposa y los dos iones metálicos externos constituyen las *alas*.³ Los complejos $[\text{Cu}_4(\text{OH})_2(\text{L}5)_2(\text{piv})_6]$ y $[\text{Cu}_4(\text{OH})_2(\text{L}6)_2(\text{piv})_6]$ ($\text{L}5 = 4\text{-amino-3,5-dimetil-1,2,4-triazol}$, $\text{L}6 = 4\text{-t-butil-1,2,4-triazol}$, $\text{Hpiv} = \text{ácido piválico}$) se englobarían en esta tercera categoría.¹³⁸

(iv) Por último, y de forma muy reciente, Brooker y col. han publicado un compuesto tetranuclear de $\text{Cu}(\text{II})$, $[\text{Cu}^{\text{II}}_4(\text{L}1)_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{BF}_4)_2](\text{BF}_4)_6 \cdot \text{CH}_3\text{CN}$ ($\text{L}1 = \text{ver arriba}$),¹³⁹ que contiene una disposición **"1+2+1"** de los centros metálicos novedosa ($\text{Cu} \cdots \text{Cu}_2 \cdots \text{Cu}$ *versus* $\text{Cu}_2 \cdots \text{Cu}_2$).

El compuesto que vamos a describir aquí (**6**) constituye, que nosotros sepamos, el segundo ejemplo de compuesto de cobre(II) tetranuclear de tipo “1+2+1” (grupo iv).¹³⁶ Contiene un grupo Cu₄ planar. La planaridad viene impuesta por el ligando μ₃-triazolato, que aporta un puente “corto” (diatómico) y otro “largo” (triatómico). Cabe destacar que con sistemas puente parecidos (1,2,4-triazoles no sustituidos en N4) tan sólo se habían descrito *polímeros*, debido a que el puente N2,N4-triazol habitualmente conduce a estructuras bidimensionales (en forma de capas o 2D) (Esquema II.5b).^{135,140-142}

En este apartado se estudia la síntesis, estructura y caracterización tanto espectroscópica como magnética del compuesto tetranuclear **6**. Posteriormente, se evalúa su interacción con el ADN y su capacidad para actuar como nucleasa química.

II.D.2 Síntesis del compuesto



La síntesis del compuesto **6** se realizó a partir del ligando H₂atc (ácido 5-amino-1,2,4-triazol-3-carboxílico), que es un reactivo comercial.

La pequeña molécula H₂atc (esquema II.5a) presenta baja solubilidad en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos habituales. Esta característica puede ser la causa de que se hayan publicado muy pocos complejos metálicos de este ligando: dos monómeros de Cd {[Cd(Hatc)₂(H₂O)₂]¹⁴³ [Cd(H₂atc)₄](NH₄)₂]¹⁴⁴} y algunos polímeros de Dy, Ba y Sr.^{145,146} El compuesto tetranuclear **6** se obtuvo por desprotonación del ligando H₂atc con NaOH seguida de adición de dietilentriamina (dien) y posterior acomplejación con Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O. A continuación se detalla la síntesis:

Se suspendieron 0,137 g (1 mmol) de H₂atc en una disolución acuosa de NaOH (40 mg, 1 mmol, en 2 mL). Transcurridos varios minutos de agitación se observó la disolución parcial del ligando H₂atc. A continuación se añadieron 40 mL de agua y 0,21 mL de dien (dietilentriamina) (2 mmol, ρ= 0,95 g/mL), con lo que el H₂atc se disolvió completamente. Se adicionaron entonces 0,700 g (2 mmol) de Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O. Se formó una disolución de color azul oscuro, que se

mantuvo bajo agitación. Transcurridos aproximadamente 15 minutos se generó una ligera turbidez. El escaso precipitado formado (azul claro) se eliminó por filtración. La disolución azul oscura resultante se dejó reposar a 4°C en cristizador cubierto con Parafilm. (La relación de reactivos es, por tanto, $\text{H}_2\text{atc}/\text{NaOH}/\text{dien}/\text{Cu(II)} = 1:1:2:2$). Tras aproximadamente 12 meses se observaron cristales lenticulares de color azul intenso, que se separaron por filtración y se secaron a temperatura ambiente. Uno de los cristales resultó apto para estudio de difracción de rayos-X. (Rendimiento aproximado de la síntesis: *ca.* 1,5 g, *ca.* 80%).

Si la disolución azul oscura se deja evaporar lentamente a temperatura ambiente, se obtiene entonces un producto microcristalino tras aproximadamente 1,5-2 meses que corresponde al compuesto **6**. (Rendimiento en estas condiciones: *ca.* 1,7 g, *ca.* 90%).

Análisis Elemental (realizado sobre los monocristales): Calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{60}\text{Cl}_4\text{Cu}_4\text{N}_{20}\text{O}_{22}$ (1352,86): C: 19,53; H: 4,77; N: 20,71. Encontrado: C: 19,78; H: 4,70; N: 21,02. Datos de FT-IR (KBr) seleccionados: $\tilde{\nu}_{\text{max}}$ (cm^{-1}): [$\nu(\text{O-H}) + \nu(\text{N-H})$] 3530w, 3351–3300d-s, 3170w, 3090w; [$\nu(\text{COO})$] 1631s, 1601sh; [$\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}$] 1593sh, 1526sh, 1510sh; [$\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$] 1469s; [$\nu(\text{ClO}_4)$] 1141sh, 1093vs, 1050sh, 1021sh. UV-vis (sólido): λ_{max} (nm): 610; UV-vis (en H_2O): λ_{max} (nm) [ϵ_{max}] ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 615 [225], 246 [15200]. Medidas de conductividad (H_2O , 10^{-3} M): 380 ($\Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$); en las mismas condiciones experimentales el electrolito control $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: 343 ($\Omega^{-1} \text{cm}^2 \text{mol}^{-1}$).

II.D.3 Caracterización de 6

II.D.3.1 Estructura de rayos-X de

$[\text{Cu}_4(\text{atc})_2(\text{dien})_4(\text{ClO}_4)_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6)

La estructura cristalina de **6** está constituida por cationes tetranucleares $[\text{Cu}_4(\text{atc})_2(\text{dien})_4(\text{ClO}_4)_2]^{2+}$, dos aniones perclorato y dos moléculas de agua de cristalización por catión. La figura II.35 muestra dicho catión. Los ángulos y distancias de enlace seleccionados se indican en la tabla II.13. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

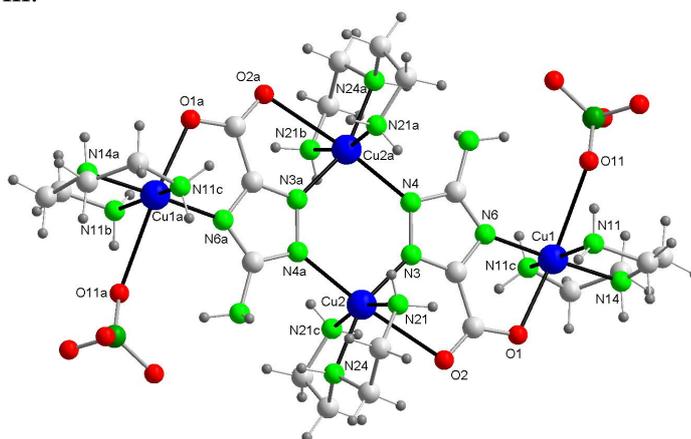


Figura II.35a. El catión tetranuclear de **6** con el etiquetado de los átomos. Códigos de simetría, *a*: -*x*, *y*, -*z*; *b*: -*x*, -*y*, -*z*; *c*: *x*, -*y*, *z*.

Desde el punto de vista cristalográfico, la estructura, muy simétrica, presenta un plano de simetría que contiene los átomos N(14)_{dien}-Cu(1)-N(6)-C(2)-N(3)_{triazol}-Cu(2). Los iones perclorato coordinados se encuentran en posiciones especiales; su geometría viene impuesta por un *pseudo* plano de simetría que contiene el enlace Cl(1)-O(13), de forma que los átomos del anión ocupan dos posiciones diferentes con un factor de ocupación de 0,50 para cada una. Los iones perclorato que se encuentran fuera de la esfera de coordinación están desordenados; sus átomos de oxígeno presentan dos orientaciones diferentes relacionadas también por un *pseudo* plano de simetría y con un factor de ocupación de 0,50 para cada una. Para

mayor claridad, en las figuras sólo se representa una de las dos posiciones.

El catión complejo puede describirse como un tetrámero $\text{Cu}' \cdots \text{Cu}(\text{N-N})_2\text{Cu} \cdots \text{Cu}'$, con dos tipos de centros metálicos, Cu y Cu', doblemente conectados por puentes $\mu\text{-N2,N4}$ -triazolato [en esta estructura: $\mu\text{-N(3),N(6)}$ -triazolato] y $\mu\text{-O,O'}$ -carboxilato; los dos centros Cu equivalentes están unidos por un doble puente $\mu\text{-N1,N2}$ -triazolato [aquí, $\mu\text{-N(3),N(4)}$ -triazolato]. Como ya se ha mencionado, el compuesto **6** es el segundo ejemplo de la bibliografía de un compuesto tetranuclear "1+2+1" de Cu(II) constituido por unidades *discretas* (esto es, no polimérico). Presumiblemente el co-ligando dien evita que se forme una red tridimensional, como es habitual en los compuestos en los que se presenta el modo de coordinación N1,N2,N4 del triazol (ver compuestos similares pero que forman cadenas en referencias^{135,140-142}).

Dos iones cobre relacionados por un centro de inversión, Cu(2) y Cu(2a), y enlazados por un doble puente diazínico N1,N2-triazol forman la unidad *dimérica* central. Estos dos iones cobre se hallan conectados a un tercer y cuarto ión cobre *solitarios* a través de dos sistemas puente, el anillo triazolato tridentado (de 3 átomos) y el sustituyente carboxilato bidentado (de 4 átomos). El ligando H₂atc, didesprotonado por pérdida del protón del anillo triazol y del protón del ácido carboxílico (atc²⁻), actúa como ligando bis(quelato) pentadentado.

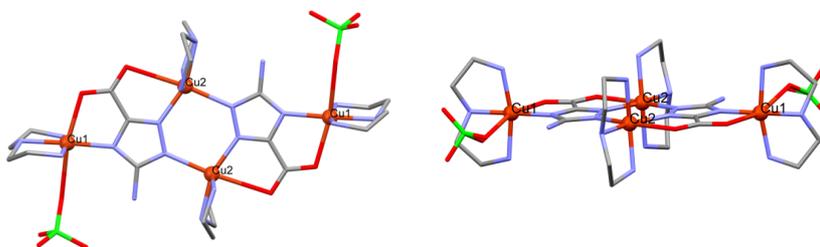


Figura II.36. Vistas esquemáticas del catión tetranuclear "1+2+1" de **6**: (izda.) los sistemas puente de los centros metálicos; (dcha.) el plano Cu₄.

Los cobres centrales, Cu(2) y Cu(2a), presentan un entorno octaédrico (idéntico por simetría) muy distorsionado. Cada cobre se encuentra coordinado por dos átomos de N diazínicos de dos triazoles distintos, los tres átomos de N de la triamina quelante dien y uno de los dos átomos de O del grupo carboxilato. Ya se ha indicado que la unión entre los 2 iones cobre se realiza mediante un puente doble N1,N2-triazol.

En los dímeros relacionados de la bibliografía lo habitual es que las dos distancias Cu-N sean similares y con valores en el rango 1,94-2,01 Å {ver en esta Tesis las estructuras [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH (2) y [Cu(H₂diO)(NO₃)₂·2DMSO (3)}.^{57,62} Sin embargo, en este caso el puente es *asimétrico*, con una distancia Cu(2)-N(3) corta [1,995(4) Å] y una Cu(2)-N(4a) más larga [2,215(4) Å]. La asimetría del puente se refleja también en los ángulos Cu(2)-N(3)-N(4) y Cu(2)-N(4a)-N(3a), con valores de 134,63 (19) y 124,74 (19)°, respectivamente. La distancia Cu(2)-Cu(2a), de 4,059(2) Å, sí entra en el intervalo esperado para los sistemas Cu-(N-N)₂-Cu' simétricos. Por lo que se refiere a las tres distancias Cu-N_{dien}, todas ellas son cortas y casi iguales [2,034(4), 2,034(4) y 2,032(5) Å]; por último, la distancia Cu-O_{carboxilato}, mucho más larga [2,673 (4) Å], es propia de una semicoordinación. Por tanto, atendiendo a las distancias en el octaedro, puede considerarse que el plano basal del Cu(2) está formado por los tres átomos N del ligando dien y el átomo N(3) del anillo, y que las posiciones axiales las ocupan el átomo N(4) del anillo y el átomo O(2) carboxilato. El cromóforo resultante sería CuNN'₃+N+O. El centro Cu(2) está desplazado 0,383 Å del plano definido por los cuatro átomos dadores basales.

Los ángulos de coordinación también se alejan del valor ideal de 90° y oscilan entre 83,24(15) y 97,04(12)°, en el plano ecuatorial, y 73,46(15) y 101,35(19)°, para las posiciones apicales. La distorsión en los ángulos viene determinada por la formación de tres anillos quelato. La circunstancia de que una de las interacciones con el puente se realice en posición axial es inusual y relevante para el estudio del intercambio magnético entre los centros Cu(2) y Cu(2a).

El poliedro de coordinación del centro metálico periférico es también un octaedro distorsionado (figura II.36). De forma similar al Cu(2), el Cu(1) está coordinado ecuatorialmente a los tres átomos de N del ligando dien terminal y al átomo de N *único* (no diazínico) N(6) del anillo triazol, con distancias en el rango 1,992(4)-2,008(4) Å. En posición apical se encuentra el otro átomo de O del carboxilato bidentado a 2,290(4) Å. Completa el octaedro el átomo de O del perclorato O(11), que se aproxima al Cu(II) a una distancia de semicoordinación de 2,723(7) Å. El cromóforo de Cu(1) puede, pues, esquematizarse como CuN₃N+O+O'. Los ángulos de coordinación oscilan entre 84,37(12) y 95,49(12)°, en el plano basal; y 71,2(2) y 103,07(16)°, en las posiciones axiales. Los dos ángulos de mordida (*bite*) que forma el grupo carboxilato difieren ligeramente: el que forma con el Cu del dímero es de 73,46(15)°; el que forma con el Cu exterior es de 78,65(16)°.

La distancia Cu(1)-Cu(2) es de 5,6859(8) Å. Todo el catión es planar, debido a la simetría de la estructura, si se exceptúan los átomos [N(11),C(11),C(12)]_{dien}, [N(21),C(22),C(23)]_{dien} y tres de los cuatro átomos de oxígeno de los percloratos. El plano basal del centro metálico periférico [definido por N(6),N(11),N(11c),N(14)] y el plano definido por el sistema puente "Cu(2)(N-N)₂Cu(2a)" son mutuamente perpendiculares (figura II.36).

En la estructura cristalina, las unidades tetranucleares se unen por múltiples enlaces de hidrógeno, que se pueden agrupar en: (i) intramoleculares; (ii) intermoleculares que originan *cadena de tetrámeros*, con distancias Cu(1)··Cu(1)' de 5,420 Å; e (iii) intermoleculares que enlazan las cadenas (figura II.37). El resultado puede considerarse una red MOF que contiene capas paralelas al plano (-2 0 1) (figura II.38). En la sección Anexos se incluye también la tabla con los enlaces de hidrógeno más importantes.

Cabe señalar, como se mencionó arriba, que el papel del co-ligando dien es importante porque aparentemente evita la polimerización característica del modo puente N1,N2,N4 de los triazolatos. Se ha observado una situación similar para el compuesto $\{[\text{Cu}_3(\text{tcz})_2(\text{dien})(\text{H}_2\text{O})_2](\text{H}_2\text{O})_3\}_\infty$ (tcz=3,5-bis(carboxilato)-1,2,4-

triazolato); en este caso los autores sugieren que la formación de cadenas en vez de estructuras 3D se debe a la dien terminal.¹⁴⁷

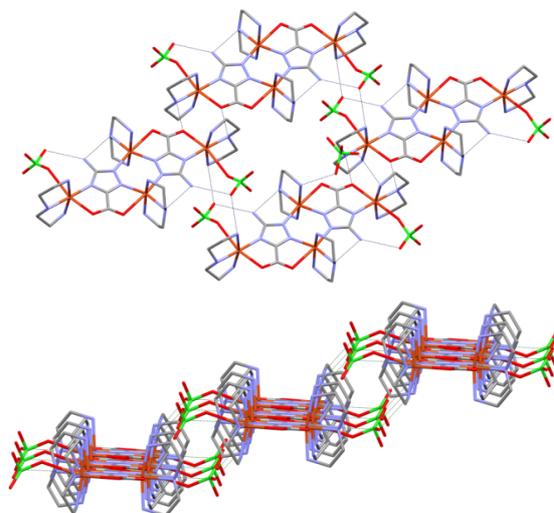


Figura II.37. Empaquetamiento de **6**: (arriba) enlaces de hidrógeno seleccionados: intramoleculares, *inter*-unidades tetranucleares e *inter*-cadenas; (abajo) detalle de la unión de cadenas de unidades tetranucleares a través de enlaces de hidrógeno en los que intervienen los aniones perclorato.

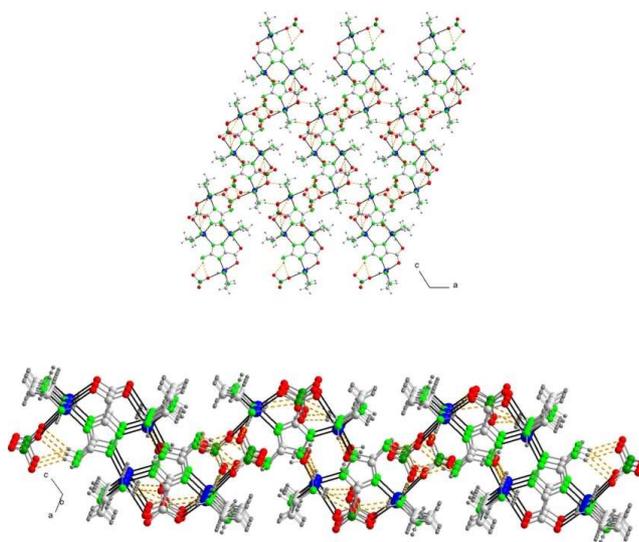


Figura II.38. Empaquetamiento de **6**: (arriba) enlaces de hidrógeno en el plano *bc*; (abajo) apilamiento de capas de tetrámeros.

Tabla II.13. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para el compuesto $[\text{Cu}_4(\text{atc})_2(\text{dien})_4(\text{ClO}_4)_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) con las esds entre paréntesis.

Cu(1)-N(14)	1,992(4)	Cu(2)-N(3)	1,995(4)
Cu(1)-N(11)	2,003(4)	Cu(2)-N(24)	2,032(5)
Cu(1)-N(11)#1	2,003(4)	Cu(2)-N(21)#1	2,034(4)
Cu(1)-N(6)	2,008(4)	Cu(2)-N(21)	2,034(4)
Cu(1)-O(1)	2,290(4)	Cu(2)-N(4)#2	2,215(5)
Cu(1)-O(11)	2,723(7)	Cu(2)-O(2)	2,673(4)
Cu(1)-Cu(2)	5,6859(8)	Cu(2)-Cu(2)#2	4,0591(12)
N(14)-Cu(1)-N(11)	84,37(12)	N(3)-Cu(2)-N(21)#1	94,08(15)
N(14)-Cu(1)-N(11)#1	84,37(12)	N(24)-Cu(2)-N(21)#1	83,24(15)
N(11)-Cu(1)-N(6)	95,49(12)	N(3)-Cu(2)-N(21)	94,08(15)
N(11)#1-Cu(1)-N(6)	95,49(12)	N(24)-Cu(2)-N(21)	83,24(15)
N(11)-Cu(1)-O(1)	95,69(18)	N(24)-Cu(2)-N(4)#2	101,35(19)
N(11)#1-Cu(1)-O(1)	95,69(18)	N(21)#1-Cu(2)-N(4)#2	97,04(12)
N(6)-Cu(1)-O(1)	78,65(16)	N(21)-Cu(2)-N(4)#2	97,03(12)
N(14)-Cu(1)-O(11)	87,0(2)	N(3)-Cu(2)-O(2)	73,46(15)
N(11)-Cu(1)-O(11)	71,2(2)	N(24)-Cu(2)-O(2)	84,56(17)
N(11)#1-Cu(1)-O(11)	99,2(2)	N(21)#1-Cu(2)-O(2)	83,57(12)
N(6)-Cu(1)-O(11)	91,3(2)	N(21)-Cu(2)-O(2)	83,57(12)
Código de simetría: (#1) $x, -y, z$ (#2) $-x, -y, -z$			

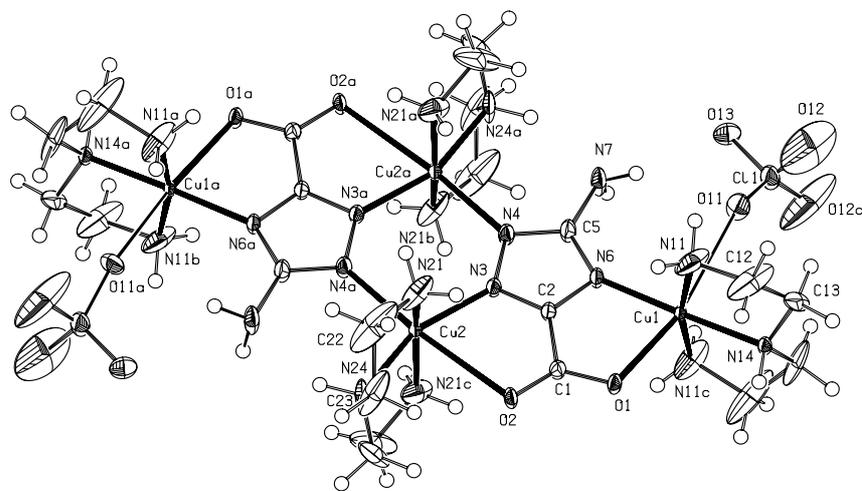


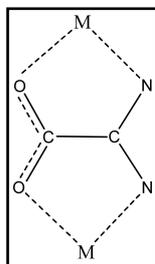
Figura II.35b. Gráfico del compuesto **6** con el etiquetado completo de los átomos.

II.D.3.2 Espectroscopia infrarroja

En la tabla II.14 se muestran las bandas IR más significativas del complejo tetranuclear, así como las bandas correspondientes al ligando triazol H_2atc para facilitar la comparación (ver figuras de los espectros en el Anexo I).

En la región $3500-3000\text{ cm}^{-1}$, el complejo exhibe bandas de diferente intensidad atribuibles a las vibraciones $\nu(N-H)_{NH_2}$. El complejo **6** muestra asimismo una señal débil a 3530 cm^{-1} como consecuencia de la vibración $\nu(O-H)$ del agua de cristalización. En el IR la presencia del ligando dien (dietilentiamina) se detecta claramente por la presencia de un doblete a $2930-2880\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a la vibración de tensión $C_{sp^3}-H$.

Por lo que se refiere a las bandas de mayor valor diagnóstico, el complejo **6** con respecto al ligando H_2atc muestra importantes desplazamientos a menores frecuencias de las señales correspondientes a $\nu(C=O)$ y $\nu(N=N)$. Los cambios se explican porque, como revela la estructura cristalina de **6** (ver sección I.B.3), el ligando se encuentra doblemente desprotonado (en el grupo carboxílico y en el anillo triazol), el anillo triazol actúa como ligando puente tridentado, y el grupo carboxilato interactúa con el metal de forma bidentada. El esquema II.6 representa este modo de coordinación especial del carboxilato que, con los átomos de nitrógeno del triazol, forma dos anillos quelatos de 5 miembros.



Esquema II.6. Modo de coordinación del grupo carboxilato en el complejo **6**.

La asignación de las bandas $\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$ y $\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$ se ha realizado siguiendo a Deacon y Phillips. La segunda banda englobaría también vibraciones de deformación $\delta(\text{N-H})$ del grupo amino y de tensión $\nu(\text{N=N})$ del anillo. En relación al otro anión, la banda característica del ClO_4^- , correspondiente a la vibración ν_3 , se presenta intensa, *estructurada*, y con valores de ν próximos a los de los percloratos iónicos,⁶⁴ lo que estaría de acuerdo con la presencia de aniones perclorato débilmente coordinados (o semicoordinados: $d(\text{Cu-O}) = 2,7 \text{ \AA}$) y de aniones perclorato no coordinados.

Tabla II.14. Asignación de bandas IR para el complejo $[\text{Cu}_4(\text{atc})_2(\text{dien})_4(\text{ClO}_4)_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) y su ligando triazol (H_2atc).*

Compuesto	$\tilde{\nu}_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$			
	[$\nu(\text{O-H})$ +/o $\nu(\text{N-H})_{\text{NH +/o NH}_2}$ +/o $\nu(\text{arC-H})$]	$\nu(\text{C=O})$	[$\delta(\text{N-H})_{\text{NH +/o NH}_2}$ + $\nu(\text{C=N})_{\text{anillo}}$ + $\nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}$]	ν (anion)
H₂atc	3332 w; 3287w; 3038 b, m	1713 sh; 1694-1668 d, vs	1624 s; 1566 m; 1508 m; 1419 sh; 1374 vs	--
Comp. 6	3530 w; 3351-3300 d, s; 3170 w; 3090 w ^a	$\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$: 1631 s; 1601 sh $\nu(\text{COO})_{\text{sym}}$: 1469 s ^b	1526 sh; 1510 sh; 1593 sh; 1469 s ^{b,c}	$\nu_3+\nu_4$: 1141 sh-1093-vs- 1050sh-1021sh ^c

* *vs*: muy fuerte; *s*: fuerte; *m*: media; *w*: débil; *vw*: muy débil; *d*: doblete; *b*: ancha; *sh*: hombro; ν_{asym} : vib. de tensión asimétrica; ν_{sym} : vib. de tensión simétrica.

^a También observada en este rango: 2930-2880 d, m / cm^{-1} , asignada a $\nu(\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H})$ de la dien (dietilentriamina).

^b Contiene $\nu(\text{COO})_{\text{asym}}$ y $\nu(\text{C=N})_{\text{triazol}}$.

^c Banda estructurada.

II.D.3.3 Propiedades magnéticas

La figura II.39 muestra el comportamiento magnético de **6** en forma de $\chi_M T$ vs T , siendo χ_M la susceptibilidad magnética por cada 4 iones Cu(II).

A temperatura ambiente el valor de $\chi_M T$ se aproxima a $1,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{K mol}^{-1}$ por cuatro Cu(II) [esto es, *ca.* $0,4 \text{ cm}^3 \cdot \text{K mol}^{-1}$ por Cu(II)]. No se observa ningún máximo en la curva de χ_M . Al bajar la temperatura, $\chi_M T$ decrece hasta formar una pequeña meseta de *ca.* $8 \text{ cm}^3 \cdot \text{K mol}^{-1}$ a temperaturas entre 10 y 5 K. Este valor se aproxima al esperado para dos Cu(II) aislados con un estado basal $S = \frac{1}{2}$ y un valor de g razonable. Por debajo de esta temperatura, $\chi_M T$ decrece de forma continua hasta llegar a un valor de $0,7 \text{ cm}^3 \cdot \text{K mol}^{-1}$. Este comportamiento está de acuerdo con la presencia de dos centros Cu(II) *acoplados* con un acoplamiento antiferromagnético moderado-bajo más dos iones Cu(II) *débilmente acoplados* con una interacción antiferromagnética muy baja (y, por tanto, casi *solitarios*).

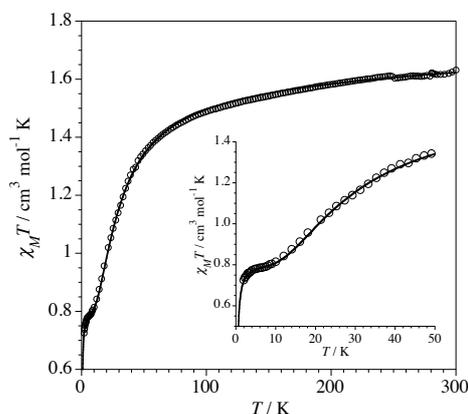
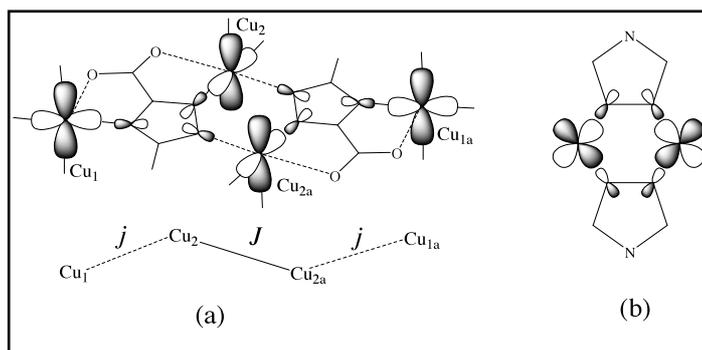


Figura II.39. Curva $\chi_M T$ vs T para el complejo **6** (siendo χ_M la susceptibilidad magnética por unidad tetranuclear). Datos Experimentales (○) y calculados (línea sólida).

Los datos magnéticos se han interpretado teniendo en cuenta la estructura tetranuclear del complejo. El esquema II.7 muestra los orbitales magnéticos implicados en el *superintercambio* magnético.



Esquema II.7. Orbitales magnéticos del compuesto **6** implicados en el *superintercambio* magnético.

El sistema se puede describir mediante el siguiente Hamiltoniano de espín:

$$\mathbf{H} = -J\mathbf{S}_2\mathbf{S}_{2a} - j(\mathbf{S}_1\mathbf{S}_2 + \mathbf{S}_{2a}\mathbf{S}_{1a}) \quad (\text{ec. II.5})$$

El tratamiento de los datos magnéticos mediante el programa MAGPAK¹⁴⁸ permitió la obtención de los parámetros J , j y g . En el proceso de ajuste se asumió que los cuatro iones Cu(II) presentan idéntico valor de g . El mejor ajuste se consiguió con los siguientes parámetros:

$$g = 2,10(1) \quad J = -34,1(2) \text{ cm}^{-1} \quad j = -5,50(3) \text{ cm}^{-1}$$

En general, el acoplamiento magnético entre dos iones Cu(II) a través de un doble puente $N1,N2$ -triazol mediante la vía de intercambio en el plano sigma (ver esquema II.7b) es grande (valores de J próximos a -200 cm^{-1}).^{57,60,62} Sin embargo, en el caso de la situación orbital inversa mostrada en el esquema II.7a el solapamiento entre los orbitales magnéticos es mucho menor debido a su semi-ortogonalidad y, por tanto, debe esperarse un acoplamiento magnético mucho más pequeño. Además, en el compuesto **6** la baja simetría del sistema de puente también dificulta la adecuada superposición. El resultado es un acoplamiento antiferromagnético Cu(2)-Cu(2a) *débil* ($J = -34 \text{ cm}^{-1}$). El compuesto de tipo "1+2+1" sintetizado por Brooker y col. presenta un valor aún más bajo de J [$J = -6,8(8) \text{ cm}^{-1}$, $g = 2,17(5)$] para los dos cobres centrales;¹³⁹ y, aparentemente, sus dos cobres externos están tan completamente

aislados que no se necesitó ningún valor de j para reproducir los datos magnéticos experimentales.

Para dímeros de Cu(II) con puentes *N1,N2-triazol* se ha extraído una relación empírica entre el valor de J y los ángulos del puente Cu-N-N⁶⁰/N-Cu-N.⁶² Siguiendo esta correlación, el valor de J de **6** debería ser bajo, tal y como se ha observado experimentalmente. Con respecto al muy bajo valor de j , no existen datos de puentes (N-C-N)_{triazol} comparables que permitan realizar una discusión apropiada.¹⁴⁹ Hay que señalar que en el caso del puente (N-C-N)_{imidazol}, aunque sí se dispone de más datos, no se ha podido establecer una correlación sencilla estructura-magnetismo.¹⁵⁰

La caracterización magnética de **6** se ha completado con un estudio de EPR sobre muestra policristalina. La figura II.40 muestra los espectros EPR de **6**, a varias temperaturas (en el rango 10-300 K), obtenidos operando en la banda X.

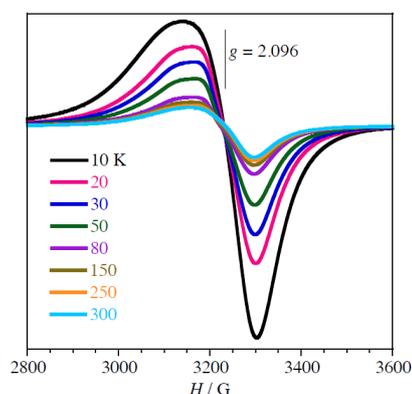


Figura II.40. Espectro de EPR para el complejo **6** a diferentes temperaturas (muestra policristalina).

Para todas las temperaturas, el espectro es quasi-isotrópico ($g \approx 2,1$) o ligeramente axial. Al bajar la temperatura la señal se vuelve más intensa, comportamiento que está de acuerdo con la curva de χ_M .

Se realizó también un estudio comparativo del espectro EPR del compuesto **6** en estado sólido y en disolución acuosa (a 80 K). La figura II.41 indica que la entidad tetranuclear de **6** permanece estable en disolución acuosa.

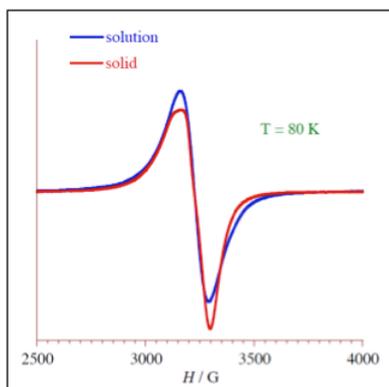


Figura II.41. Espectro EPR de **6** en estado sólido y en disolución acuosa a 80 K.

II.D.4 Estudio de interacción con el ADN de **6**

El complejo **6** presenta una elevada solubilidad en agua, lo cual permite un estudio adecuado de interacción con el ADN en tampones biológicos. El estudio de estabilidad de **6** en disolución se realizó mediante diversas técnicas. El análisis ESI-MS de **6** no fue concluyente ni a baja ni a alta resolución; sin embargo, los espectros UV-vis y EPR (a 80 K) de **6** en disolución, que son coincidentes (figura II.41), así como las medidas de conductividad, que indican comportamiento próximo al de un electrolito 1:2, evidencian que la entidad tetranuclear de **6** permanece como tal en disolución acuosa.

La interacción del compuesto **6** con el ADN se estudió mediante las técnicas de fluorescencia, desnaturalización térmica y viscosimetría. En general, como se ha venido indicando, la afinidad hacia el ADN está gobernada por uno o más factores que incluyen interacciones electrostáticas con el esqueleto azúcar-fosfato, intercalación y/o enlaces de hidrógeno.⁴³

II.D.4.1 Espectroscopia de fluorescencia

El estudio consiste en registrar los espectros de emisión del aducto ADN-EB en presencia de distintas concentraciones de complejo (disoluciones *problema*) con el fin de determinar los cambios que se producen en el máximo de intensidad de emisión del aducto. Para la realización de este ensayo se siguió el procedimiento descrito en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Como paso previo se ensayaron las siguientes disoluciones *control* en las mismas condiciones que las disoluciones *problema*: disolución de complejo; disolución de complejo + ADN; disolución de complejo + EB (sin ADN). Las dos primeras no mostraron fluorescencia apreciable y la tercera no mostró cambios en relación a la disolución de EB (sin complejo).

En la figura II.42 se presentan los espectros de emisión del aducto ADN-EB obtenidos en ausencia y presencia de diversas concentraciones de complejo (0-50 μM). A medida que aumenta la concentración de **6** va disminuyendo la intensidad de emisión del aducto ADN-EB, aunque sin alcanzar el nivel basal. Este comportamiento indica un desplazamiento parcial del EB de las moléculas de ADN debido a la interacción del complejo con la biomolécula.^{70,71}

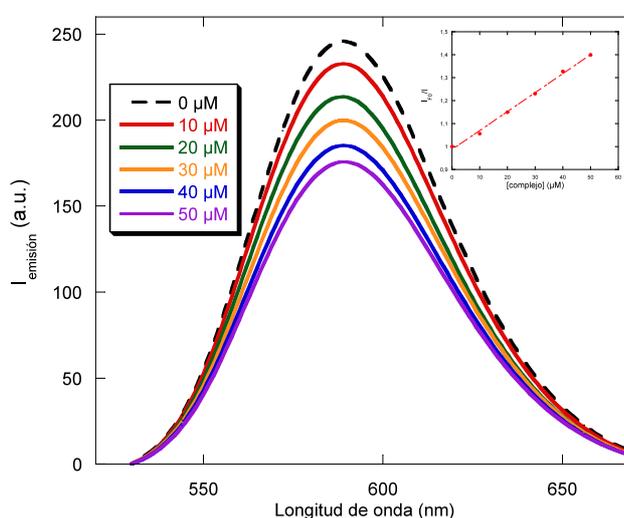


Figura II.42. Espectro de emisión del ADN-EB en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **6**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0). **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejo (I) frente a la concentración de **6** [ajuste lineal: $y = 0,987 + 0,008x$ ($R^2 = 0,998$)].

Con el fin de semi-cuantificar las observaciones anteriores, se calculó la constante de desactivación, K_{sv} , por medio de la representación de Stern-Volmer que se muestra en el interior de la figura II.42. La reducción de intensidad de emisión del aducto por el compuesto **6** se ajusta bien a la ecuación:

$$I_{F0}/I_F = 1 + K_{sv} [Q] \quad (\text{ec. II. 3})$$

es decir, tiene un comportamiento lineal ($R^2 = 0,996$). El valor de la constante del compuesto **6**, calculada a partir de la ecuación, resultó ser: $K_{sv} = 8,2 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$.

Otra forma de expresar el grado de afinidad de una molécula hacia el ADN es mediante determinación de la constante de unión aparente, K_{app} , a través del método de valoración cuantitativa que mide la concentración de compuesto necesaria para disminuir hasta el 50% la intensidad de emisión del aducto ADN-EB inicial (valor de C_{50}), tal y como se detalla en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo. En la figura II.43 se recogen los resultados de este ensayo. El valor de C_{50} es, de forma aproximada, inversamente proporcional al valor de la constante de unión. Así, la K_{app} se calcula con la ecuación II.4:¹⁵¹

$$K_{EB} \times [EB] = K_{app} \times [C_{50}] \quad (\text{ec. II.4})$$

en la que: $K_{EB} = 3,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, calculada en la presente *Tesis Doctoral*, para $\text{pH} = 6,0$,¹⁵² y $[EB] = 3,78 \mu\text{M}$. El valor de la constante obtenida así fue: $K_{app} = 2,07 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

Con el fin de establecer la magnitud *relativa* de la K_{app} del compuesto **6**, se realizaron ensayos paralelos de referencia con compuestos seleccionados: el intercalador acridina, el agente de unión específica al surco menor Hoechst 33258, el de unión al surco mayor verde de metilo y el sulfato de cobre(II).

La figura II.43 ilustra el diferente grado de afinidad por el ADN de cada compuesto en las mismas condiciones en que se ensayó el compuesto tetranuclear **6**. Los correspondientes valores de C_{50} y K_{app} se incluyen en la tabla II.15. De la tabla II.15 se deduce que la acridina presenta un valor alto de C_{50} (y, por tanto, una K_{app} baja), como ha

sido documentado para otros agentes intercalantes;^{153,154} que el Hoechst 33258 es el agente más efectivo a la hora de desplazar el bromuro de etidio, con un valor de C_{50} tan bajo como $0,97 \mu\text{M}$; y que el compuesto **6**, el verde de metilo y el CuSO_4 tienen valores de K_{app} más bajos que el Hoechst pero también importantes.

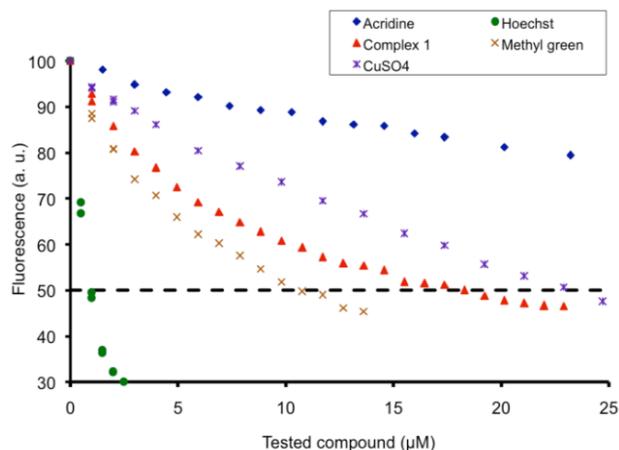


Figura II.43. Estudios de desplazamiento competitivos del EB del ADN-EB para: acridina, Hoechst 33258, verde de metilo, CuSO_4 y el complejo **6** {[CT ADN] = $3 \mu\text{M}$; [EB] = $3.78 \mu\text{M}$ en tampón cacodilato $0,1 \text{ M}$ (pH= $6,0$)}.

Tabla II.15. Valores de K_{app} para el compuesto **6** y los otros agentes de la figura II.43.

Compuesto	$C_{50} (\mu\text{M})$	$K_{\text{app}}[\text{M}(\text{bp})^{-1}]$
Hoechst 33258	0,97	$1,17 \times 10^8$
Verde de metilo	10,93	$1,04 \times 10^7$
Complejo 6	18,30	$6,20 \times 10^6$
CuSO_4	23,15	$4,90 \times 10^6$
Acridina	75,85	$1,50 \times 10^6$

II.D.4.2 Temperatura de fusión del ADN

El proceso de determinación de T_m mediante espectroscopia UV se realizó midiendo de forma continua la absorbancia a 260 nm de una muestra de CT ADN en ausencia y/o presencia de complejo **6** mientras se incrementa gradualmente la temperatura en el rango 25-90 °C, tal y como se describe en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

En la figura II.44 se presentan las curvas de temperatura de fusión del CT ADN en presencia de diferentes proporciones de **6**. En todos los casos se ha restado la absorbancia del complejo a 260 nm (por ello se representan *absorbancias normalizadas*).

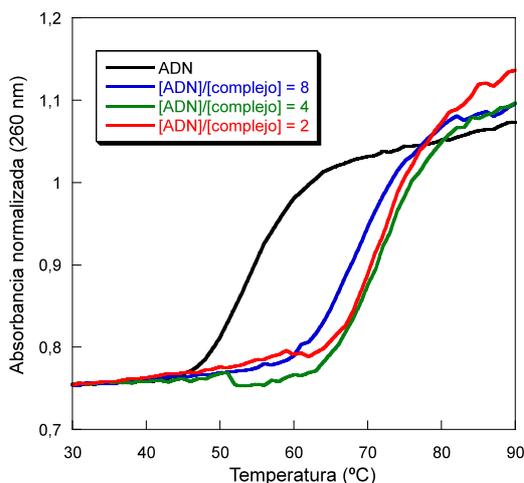


Figura II.44. Curva de temperatura de fusión del CT ADN (100 μM) en ausencia (negro) y en presencia de **6** (12 μM , azul), (25 μM , verde) y (50 μM , azul) en tampón fosfato 1 mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2). **Legenda:** relación [ADN]/[complejo **6**].

Los estudios de T_m se realizaron bajo condiciones de saturación completa (esto es, a relaciones [CT ADN]/[complejo] de 2 a 8) y a baja fuerza iónica (tampón fosfato 1 mM - NaCl 2 mM) para que las transiciones de fusión pudieran ser detectadas a temperaturas moderadas. Como se extrae de la figura II.44, el complejo tetranuclear produce un claro aumento de la temperatura de fusión del ADN ($\Delta T_m = 18,3$ °C para [ADN]/[complejo] = 4). En comparación con valores de la bibliografía, este ΔT_m es alto e indicativo de una interacción

importante. Así por ejemplo, Mao y col. han referido valores de ΔT_m entre 9,4 y 3,3 °C para compuestos de cobre(II) con ligandos 2,2-dipiridil que contienen extremos guanidinio/amonio (catiónicos).¹⁵⁵ Por tanto, el complejo **6** muestra una gran afinidad por el ADN.

II.D.4.3 Viscosimetría

Las medidas hidrodinámicas son sensibles a los cambios de longitud del ADN; por ello, constituyen uno de los métodos más decisivos y menos ambiguos para estudiar la forma de unión de las moléculas al ADN en disolución.^{76,77} Los ensayos se realizaron según se detalla en la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se expresan como una representación gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, donde η es la viscosidad de la disolución tampón-ADN-complejo y η_0 es la viscosidad de la disolución tampón-ADN, frente a relaciones crecientes $[\text{complejo}]/[\text{ADN}]$ (figura II.45).

La presencia del compuesto tetranuclear **6** apenas modifica la viscosidad relativa del CT ADN [$(\eta/\eta_0)^{1/3}$ varía de 1 a 1,05 para una relación de 0,2]. Este resultado sugiere que la interacción del complejo con el ADN no se produce por intercalación clásica, como era de esperar por carecer de anillos aromáticos.¹⁵⁶

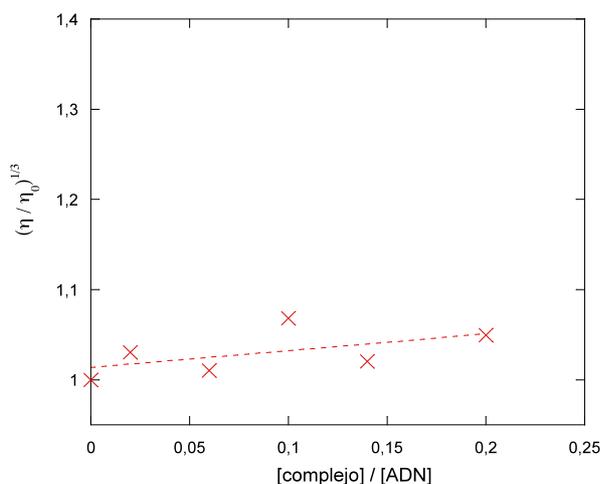


Figura II.45. Ensayo de viscosidad para **6**. [CT ADN] = 50 μM en presencia de 1, 3, 5, 7 y 10 μM de compuesto **6** en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0).

II.D.4.4 Conclusiones de los estudios de interacción

El compuesto **6** produce una desactivación del estado excitado del aducto ADN-EB significativo ($K_{app} = 6,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), presenta ΔT_m altos ($\sim 18 \text{ }^\circ\text{C}$) y no intercala. De estos ensayos se deduce que **6** interacciona fuertemente con el CT ADN y, considerando que el complejo es catiónico, posiblemente lo hace a través de interacciones electrostáticas con el esqueleto azúcar-fosfato [el ensayo con inhibidores (ver próxima sección) permite descartar la interacción por los surcos].

II.D.5 Estudio de actividad nucleasa en electroforesis mediante gel de agarosa de **6**

II.D.5.1 Ensayo de actividad

La digestión del ADN por el complejo **6** se estudió mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Las electroforesis se realizaron según el procedimiento general descrito en la Introducción general de esta *Tesis Doctoral* y en la sección experimental de este Capítulo.

La figura II.46 muestra el resultado de la separación por electroforesis del corte inducido por el complejo **6** en el plásmido pUC18. Los dos co-ligandos, **H₂atc** y **dien**, no son capaces de escindir el ADN por sí mismos, ni en ausencia ni en presencia de activantes; el compuesto **6** tampoco manifestó actividad nucleasa sin la adición de un agente químico externo (ensayos no mostrados).

En la figura II.46 se pone de manifiesto que el compuesto **6** empieza a cortar el ADN a concentraciones bajas. A una concentración de $20 \text{ } \mu\text{M}$ y en presencia de ascorbato ($[\text{ascorbato}] = 2,5 \times [\mathbf{6}] = 0,625 \times [\text{Cu}]$) y dioxígeno, el compuesto **6** degrada prácticamente toda la forma superenrollada (8%) a circular (89%) y lineal (3%) (carrera 10). A $40 \text{ } \mu\text{M}$, el compuesto es capaz ya de degradar la forma superenrollada de manera completa para producir formas circular (80 %) y lineal (20%) (carrera 11). Estos resultados indican que el compuesto **6** es de hecho una nucleasa química potente.

En paralelo se realizaron experimentos control. Si se comparan cantidades equimolares de **6** (10 μM) y de sal de cobre (10 μM), se observa que el complejo es una nucleasa más efectiva (carreras 5 y 9) que el CuSO_4 ; si la comparación se hace para cantidades equivalentes de Cu(II) , se aprecia mayor degradación del ADN por parte de la sal (carreras 7 y 9). Este hecho, que podría estar relacionado con la falta de posiciones de coordinación lábiles sobre los Cu(II) centrales, excluye un posible efecto cooperativo entre los diferentes centros metálicos de **6**.

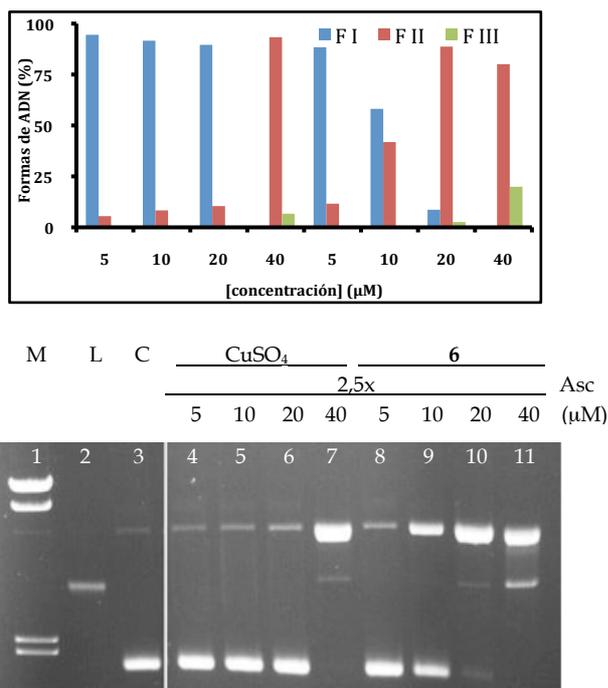


Figura II.46. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN (37,5 μM) por el CuSO_4 y el compuesto **6**, en presencia de ascorbato (2,5x de exceso), incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) durante 1 h a 37 °C. M: marcador; L: ADN lineal control; C: ADN control. (Abajo) Imagen del gel. (Arriba) Gráfico que representa la concentración relativa de las formas superenrollada (F I), circular (F II) y lineal (F III) para la sal de Cu(II) (izquierda) y el complejo **6** (derecha).

II.D.5.2 Ensayo sobre la influencia de la fuerza iónica en la actividad nucleasa

La influencia de las propiedades electrostáticas del compuesto **6** en la actividad nucleasa se analizó mediante la adición de cantidades crecientes de NaCl (0-300 mM) en el medio de reacción. El procedimiento experimental se detalla en la Introducción general de y en la sección experimental de este Capítulo. Los resultados del ensayo se muestran en la figura II.47.

Se observa que la actividad de **6** disminuye progresivamente al aumentar la concentración de NaCl. El comportamiento es el esperado. Al aumentar la cantidad de sal, aumenta el grado de neutralización de las cargas negativas del ADN y, con ello, disminuye la atracción electrostática entre el complejo catiónico **6** y los grupos fosfato de la doble hebra. Este resultado evidencia de nuevo la contribución de las interacciones electrostáticas en el proceso de unión al ADN del complejo **6**.

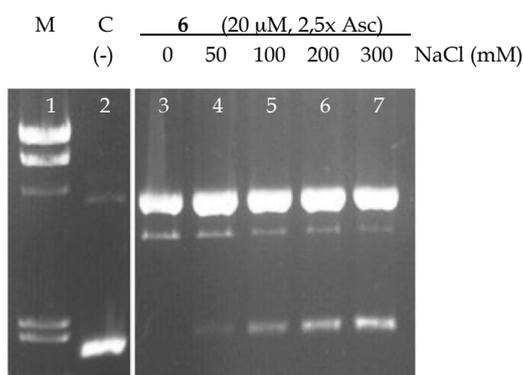


Figura II.47. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) por el compuesto **6** en presencia de fuerza iónica (NaCl) variable, incubado en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0) durante 1 h a 37 °C. M: marcador; C: ADN control.

II.D.5.3 Ensayo sobre la influencia de agentes inhibidores

El compuesto **6** debe actuar como nucleasa a través de un mecanismo oxidativo porque requiere agentes reductores. Con objeto de profundizar en los aspectos mecanísticos, se realizaron ensayos de actividad en presencia de agentes captadores de especies oxoactivas

(ROS). El procedimiento se detalla en la Introducción general de esta *Tesis Doctoral* y en la sección experimental de este Capítulo.

El resultado de la correspondiente electroforesis se muestra en la figura II.48. Se produce inhibición de la actividad nucleasa de **6** en las experiencias con yoduro potásico (carrera 6), 2,2,6,6-tetrametilpiperidona (carrera 7) y Tiron (carrera 8). Con estas observaciones se confirma la naturaleza oxidativa del proceso de rotura y se deduce que el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y el radical superóxido (O_2^-) se encuentran implicados en el mecanismo. Además, el ensayo con neocuproína (carrera 9), que inhibe claramente el corte, permite afirmar que el Cu(I) interviene en el proceso redox, como cabía esperar.

Por último, la figura II.48. muestra también que los agentes de interacción con los surcos, distamicina A y verde de metilo, no disminuyen la capacidad de escisión de **6** (carreras 10 y 11). Por tanto, se descarta la interacción del complejo con el ADN a través de los surcos, y se puede afirmar que la interacción entre **6** y el biopolímero se realiza básicamente mediante atracciones electrostáticas (ver apartado II.D.4.4.).

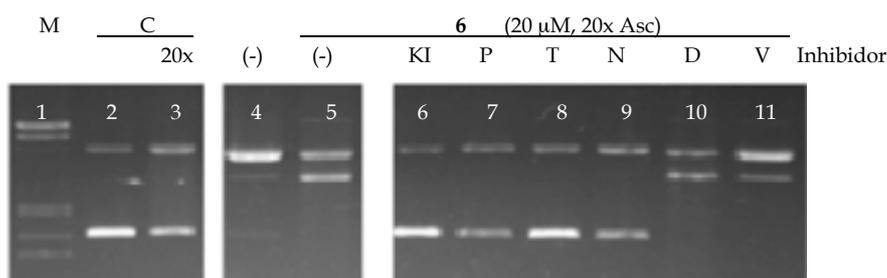


Figura II.48. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) por el compuesto **6** (20 μM) en presencia de inhibidores y agentes de unión a los surcos, incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6.0) durante 1 h a 37 °C. M = marcador; C = controles pUC18 con/sin reductor; KI = yoduro potásico; P = 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; T = Tiron; N = neocuproína; D = distamicina A; V = verde de metilo

II.D.5.4 Estudio cinético

Con el fin de completar el estudio de actividad nucleasa del compuesto **6**, se realizó un estudio cinético siguiendo el protocolo descrito en la Introducción general y detallado en la sección experimental de este Capítulo.

Las condiciones del experimento se escogieron cuidadosamente (concentración de complejo **6**, de agente reductor (ascorbato)...), a fin de observar la aparición/desaparición gradual de cada forma de ADN y de evitar la degradación total (*smearing*). La electroforesis correspondiente se presenta en la figura II.49. En la misma figura se muestra el gráfico con las cantidades relativas de las distintas formas del pUC18 en función del tiempo, obtenidas por cuantificación de las bandas de la electroforesis.

La degradación de la forma superenrollada a forma circular varía exponencialmente con el tiempo siguiendo una cinética de *pseudo*-primer orden, que puede ajustarse a la ecuación propuesta por Cowan y col. (ec. II.6) para obtener la constante aparente de velocidad:¹⁵⁷

$$S = S_0 \cdot e^{(-k_{\text{obs}} t)} \quad (\text{ec. II.6})$$

donde S_0 y S corresponden a la cantidad de forma superenrollada inicial y de forma superenrollada a un tiempo t , respectivamente, y k_{obs} es la constante velocidad de *pseudo*-primer orden o constante de velocidad *aparente* (generalmente expresada en min^{-1}).

El valor obtenido para **6** es $k_{\text{obs}} \approx 0,126 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,996$), que corresponde a un tiempo de vida media de 5,5 min para la forma superenrollada. Estos parámetros cinéticos (para una concentración de complejo 5 μM , muy baja) confirman la gran eficiencia nucleolítica de este sencillo compuesto de Cu(II).

Debe mencionarse que, en las mismas condiciones experimentales (idéntica cantidad de ascorbato por cobre), la sal de Cu(II) no produce corte alguno (figura II.50).

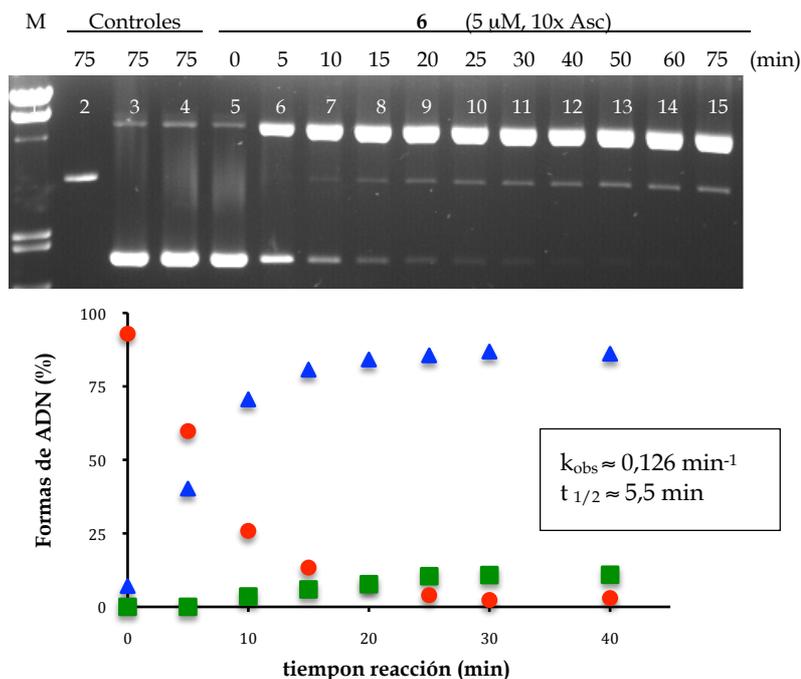


Figura II.49. Cinética de corte del pUC18 (37,5 μ M) promovido por el compuesto 6 (5 μ M), incubado en tampón Tris (50 mM pH = 7,2) durante 75 min a 37 °C. (Arriba) electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los productos de reacción a diferentes tiempos; carreras 1-4: Marcador; ADN lineal; ADN pUC18 y ADN pUC18 + ascorbato. (Abajo) variación de la concentración en función del tiempo de las formas superenrollada (●) circular (▲) y lineal (■); (cuadro insertado) ajuste lineal de los datos.

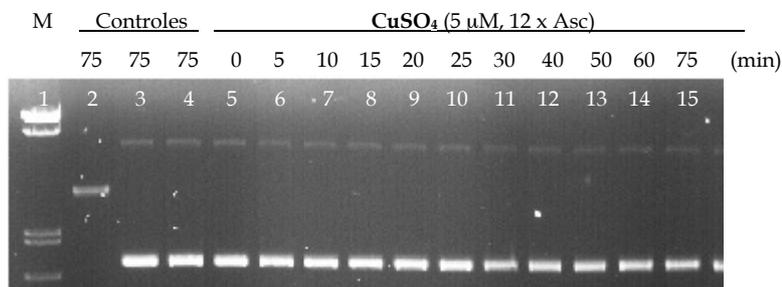


Figura II.50. Cinética de corte del pUC18 (37,5 μ M) promovido por el CuSO₄ (5 μ M), incubado en tampón Tris (50 mM pH = 7,2) durante 75 min a 37 °C. Carreras 1-4: Marcador; ADN lineal; ADN pUC18 y ADN pUC18 + ascorbato.

II.D.6 Conclusiones - Discusión

Las conclusiones que se extraen del estudio inorgánico y bioinorgánico del compuesto **6** son las siguientes:

1. Se ha sintetizado y caracterizado un compuesto *tetranuclear* de Cu(II) de tipo "1+2+1", discreto, a partir del ligando triazolato **atc**²⁻. El ligando actúa como pentadentado bis(quelato). El complejo contiene dos Cu(II) centrales, unidos por un puente doble N1,N2-triazolato, y dos Cu(II) periféricos, unidos a los centrales por puentes N2,N4-triazolato y O,O'-carboxilato.

2. El estudio magnético indica que **6** exhibe un acoplamiento antiferromagnético atípicamente débil (aunque predecible) entre los dos cobres centrales, unidos a través del puente doble N1,N2 ($J = -34,1(2) \text{ cm}^{-1}$), y un acoplamiento antiferromagnético muy débil entre cada cobre periférico y uno de los dos cobres centrales a través del puente N,C,N ($j = -5,50(3) \text{ cm}^{-1}$).

3. La adecuada solubilidad en agua de **6** ha permitido el estudio bioinorgánico completo. El complejo muestra una gran afinidad por el ADN: presenta una K_{app} media-alta ($6,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), produce un gran incremento del T_m ($\sim 18 \text{ }^\circ\text{C}$) y no intercala. La interacción de **6** con la doble hebra se produce a través de interacciones electrostáticas entre el catión complejo y los grupos fosfato del ADN.

4. El compuesto es capaz de degradar de forma eficiente y rápida el ADN mediante un mecanismo oxidativo en presencia de bajas concentraciones de reductor. Aunque no se ha detectado efecto cooperativo entre los diversos centros metálicos, **6** muestra una gran reactividad frente al ADN, presumiblemente iniciada por una atracción hacia el esqueleto fosfato y seguida por un ataque no específico a la doble hebra en múltiples posiciones.

En suma, la introducción de varios centros metálicos en la nucleasa es una forma eficaz de aumentar la interacción con el ADN y, con ello, de mejorar la eficiencia nucleolítica del mismo. En el apartado siguiente se continúa desarrollando esta estrategia.

II.E INTERACCIÓN CON EL ADN Y ACTIVIDAD NUCLEASA DE DOS COMPUESTOS CON ALTA NUCLEARIDAD. SÍNTESIS, ESTRUCTURA Y MAGNETISMO*

II.E.1 Antecedentes y objetivos

La versatilidad de los triazoles para actuar de puente entre centros metálicos ha sido ampliamente explorada para producir estructuras *supramoleculares* con diferentes funcionalidades,¹ y también para obtener complejos polinucleares *discretos* de interés en magnetoquímica, como modelos de imanes moleculares, o en bioinorgánica, como modelos de sistemas biológicos.^{1,2}

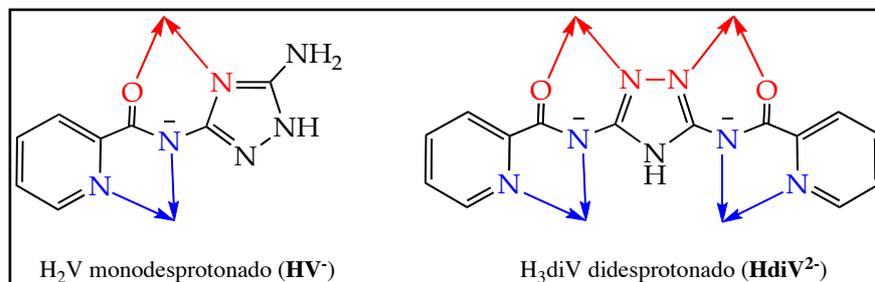
*Parte de los resultados que se presentan a continuación han sido objeto de la siguiente publicación: Hernández-Gil, J.; Ovèjak, N.; Ferrer, S.; Lloret, F.; Castiñeiras, A. *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 2289-2291.

Como ligandos de partida en las distintas áreas de investigación, los derivados del anillo 1,2,4-triazol pueden organizarse en tres categorías: (i) aquéllos que sólo contienen un anillo; (ii) aquéllos que contienen dos anillos unidos por un grupo espaciador; y (iii) aquéllos que tienen el anillo más otros grupos funcionales.¹ El conocido ligando 3,5-bis(piridin-2-il)-1,2,4-triazol (abreviado como Hpytz o Hbpt)^{58,158} o sus derivados más cercanos^{1-3,139,159-161} se englobarían en esta última categoría. Recientemente, Chen y col. han preparado mediante síntesis hidrotermal una serie de estructuras poliméricas formadas por unidades [Cu^I(pytz)], que exhiben conformaciones muy variadas (i.e., silla molecular, cremallera, cadena en *zigzag* o cadena helicoidal) como resultado de los diferentes modos de coordinación del ligando (ver esquema II.10 más adelante).^{135,136} Desde un enfoque diferente, Brooker y col. han descrito ligandos triazol con sustituyentes piridina de gran denticidad (bis-tridentados y bis-tetradentados), que les han permitido obtener complejos dinucleares y tetranucleares inusuales.¹³⁹ Estos autores han mostrado también que usando derivados dipiridilo bis-bidentados, y bajo condiciones de síntesis apropiadas (con co-ligandos seleccionados), se pueden aislar sistemas trinucleares,¹⁶⁰ tetranucleares e incluso octanucleares.¹⁶¹

En los apartados anteriores hemos estudiado varios compuestos polinucleares con diferente actividad nucleasa. El compuesto tetranuclear **6** resultó ser muy activo, posiblemente como resultado de una óptima interacción con el ADN. Ahora exploramos la química de coordinación de dos nuevos ligandos, *a priori dinucleantes*, con el mismo sustituyente sobre el anillo triazol: el 5-amino-3-(piridin-2-il-acetamido)-1,2,4-triazol = 5-amino-3-picolinamido-1,2,4-triazol (**H₂V**), ligando *mono-acilo*, y el el 3,5-bis(piridin-2-il-acetamido)-1,2,4-triazol = 3,5-bis(picolinamido)-1,2,4-triazol (**H₃diV**), su análogo *di-acilo*.

Ambos ligandos, **H₂V** y **H₃diV**, sintetizados para este trabajo mediante reacción directa entre el guanazol y el 2-picolinato de etilo en un horno de bolas (Capítulo I), mantienen la estructura básica de los ligandos anteriores **H₂Q** y **H₃diQ**, pero con la piridina en vez del grupo fenilo como sustituyente aromático. El cambio conlleva dos consecuencias importantes: (i) los ligandos **H₂V** y **H₃diV** presentan mayor solubilidad que **H₂Q** y **H₃diQ** (al menos son solubles en

metanol); (ii) tras desprotonación del/de los grupo(s) acetamido, ambos ligandos amplían drásticamente sus posibilidades de coordinación; así, el ligando HV^- ofrece seis átomos dadores y la posibilidad de formar dos anillos quelato para enlazar al metal; el ligando HdiV^{2-} , ocho átomos dadores y cuatro posibles anillos quelato (esquema II.8).



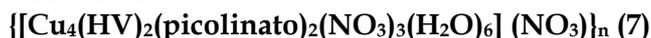
Esquema II.8. Posibilidades de coordinación de los ligandos HV^- y HdiV^{2-} .

Estos ligandos han permitido la obtención de dos compuestos con elevada nuclearidad: uno tetranuclear (7) y otro hexanuclear (8). En este apartado se describe su síntesis y su caracterización estructural, espectroscópica y magnética. A continuación se estudia su afinidad por el ADN y su potencial nucleolítico, con el fin de establecer la influencia de la polinuclearidad en las propiedades de interacción con el ADN y en la subsiguiente actividad nucleasa.

II.E.2 Síntesis de los compuestos 7 y 8

Como se ha indicado, la síntesis de los compuestos 7 y 8 se realizó a partir de los nuevos ligandos 5-amino-3-picolinamido-1,2,4-triazol (H_2V) y 3,5-bis(picolinamido)-1,2,4-triazol (H_3diV), cuya obtención y caracterización se detalla en el apartado I.B.1.2 del Capítulo I. Ambos ligandos son insolubles en agua pero moderadamente solubles en metanol y etanol.

II.E.2.1 Síntesis de



(i) Procedimiento A

Se suspendieron 0,102 g (0,5 mmol) de ligando $\text{H}_2\text{V} \cdot \text{HCl}^*$ en 30 mL de metanol. Sobre esta suspensión se añadió gota a gota una disolución formada por 0,115 g (0,5 mmol) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ disueltos en la mínima cantidad posible de metanol (2,5 mL), con lo que se consiguió la disolución de ligando (la relación estequiométrica de los reactivos es $\text{Cu(II):H}_2\text{V} = 1:1$). Después de 1 hora de agitación se observó una turbidez verde. El sólido formado se eliminó por filtración. A partir de la disolución verde resultante se formaron monocristales prismáticos verdes de 7 transcurridas 2-3 semanas.

El estudio preliminar de rayos-X mostró que el compuesto formado (7) contenía ligando HV^- y ligando **picolinato**; es decir, se había producido la hidrólisis del derivado triazol. La síntesis de este compuesto ternario (7) pudo reproducirse mezclando ligando H_2V (en lugar de $\text{H}_2\text{V} \cdot \text{HCl}$) y ácido picolínico (ver procedimiento B a continuación).

(ii) Procedimiento B

Se suspendieron 0,051 g (0,25 mmol) de ligando H_2V en 20 mL de metanol. Sobre la suspensión se añadió gota a gota y con continua agitación una disolución de 0,230 g (1 mmol) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ en 5 mL de metanol. A la disolución verde resultante se le adicionó gota a gota una disolución de 0,092 g (0,75 mmol) de ácido picolínico en 10 mL de metanol, observándose una intensificación en el color (la relación estequiométrica de los reactivos es $\text{Cu(II):H}_2\text{V}:\text{ácido picolínico} = 1:0,25:0,75$). Tras 20 minutos de agitación se realizó una filtración de seguridad. La disolución verde esmeralda se dejó reposar en un cristalizador cubierto con Parafilm. Tras 4-5 semanas se obtuvieron monocristales prismáticos de color verde de 7 que se

*Ligando obtenido por el procedimiento "convencional", en acetonitrilo a partir del cloruro de acilo, y aislado como clorhidrato.

separaron por filtración, se lavaron con metanol frío y se secaron al aire sobre papel de filtro. Rendimiento: *ca.* 0,13 g, *ca.* 40%. Análisis Elemental: Calculado para $C_{28}H_{34}Cu_4N_{18}O_{24}$ (1260,89): C: 26,7; H: 2,7; N: 20,0. Encontrado: C: 24,4; H: 2,7; N: 18,6. Datos de FT-IR (KBr) seleccionados: $\tilde{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): [$\nu(O-H)$ + $\nu(N-H)$] 3530w, 3351–3300d-s, 3170w, 3090w; [$\nu(COO)$] 1631s, 1601sh; [$\delta(N-H)$ + $\nu(C=N)_{anillo}$ + $\nu(C=C)_{anillo}$] 1593sh, 1526sh, 1510sh; [$\nu(COO)_{sym}$] 1469s; [$\nu(ClO_4)$] 1141sh, 1093vs, 1050sh, 1021sh. UV-vis (sólido): λ_{max} (nm): 610; UV-vis (en H_2O): λ_{max} (nm) [ϵ_{max}] ($M^{-1} cm^{-1}$): 615 [225], 246 [15200]. Medidas de conductividad (H_2O , $10^{-3} M$): 380 ($\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$); en las mismas condiciones experimentales el electrolito control $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$: 343 ($\Omega^{-1} cm^2 mol^{-1}$).

II.E.2.2 Síntesis de $[Cu_6(HdiV)_2(ClO_4)_6(H_2O)_{14}](ClO_4)_2 \cdot 10H_2O$ (**8**)

El ligando H_3diV es insoluble en agua y sólo moderadamente soluble en metanol. La adición de una disolución de perclorato de cobre a una disolución metanólica caliente del ligando en relación 2:1 produjo un precipitado verde pálido abundante. En cambio, con un gran exceso de sal de cobre (6:1) sólo se formó un poco de precipitado, que se eliminó por filtración. La disolución resultante se dejó evaporar. Tras un par de meses, cuando ésta se encontraba casi a sequedad, aparecieron monocristales prismáticos grandes azul mar del compuesto **8**. Presumiblemente, los numerosos aniones perclorato son los responsables de la solubilidad de **8** en agua.

Procedimiento experimental

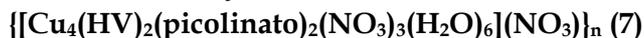
Se disolvieron 0,050 g (0,16 mmol) de ligando H_3diV en 30 mL de metanol caliente. Sobre esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 0,360 g (0,97 mmol) de $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en 10 mL de metanol (la relación estequiométrica de los reactivos es $Cu(II):H_3diV = 6:1$).

Inmediatamente se formó un precipitado verde claro.* La mezcla se agitó durante aproximadamente 20 minutos y después se filtró. La disolución resultante de color verde se dejó enfriar y evaporar a temperatura ambiente en un cristizador cubierto con Parafilm. Después de aproximadamente 2 meses se obtuvieron monocristales prismáticos de color azul mar. Los cristales se filtraron, se lavaron con metanol y se secaron al aire sobre papel de filtro. Rendimiento: 0,11 g (ca. 30 %). Análisis Elemental (realizado sobre monocristales): Calculado para $C_{28}H_{66}Cu_6N_{14}O_{60}Cl_8$ (2223,78): C: 8,82; H: 2,99; N: 15,12. Encontrado: C: 9,02; H: 2,73; N: 15,42. Datos de FT-IR (KBr) seleccionados: $\tilde{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): [$\nu(O-H) + \nu(N-H)$] 3464m, 3220m, 3100w; [$\nu(C=O)$] 1617m; [$\delta(N-H) + \nu(C=N)_{anillo} + \nu(C=C)_{anillo}$] 1589s, 1545s, 1486m, 1402s; [$\nu(ClO_4)$] 1067sh-1054vs-1034sh. UV-vis (sólido): λ_{max} (nm): 630, 575 sh; UV-vis (en H_2O): λ_{max} (nm) [ϵ_{max}] ($M^{-1} cm^{-1}$): 635 [220].

*Información relativa al precipitado verde pálido separado durante la síntesis: Rendimiento: 0.030 g. Fórmula propuesta (compuesto dinuclear): $[Cu(H_2diV)(ClO_4)]_2 \cdot 8H_2O$. Análisis Elemental: Calc. para $Cu_2C_{28}H_{36}N_{14}O_{20}Cl_2$ (1086.7): C: 30.95; H: 3.34; N: 18.05. Enc.: C: 30.83; H: 2.89; N: 17.89. Datos de FT-IR (KBr) seleccionados: $\tilde{\nu}_{max}$ (cm^{-1}): [$\nu(O-H) + \nu(N-H) + \nu(arC-H)$] 3443 b-m, 3088 w; [$\nu(C=O)$] 1614 vw; [$\delta(N-H) + \nu(N-C=O) + \nu(C=N)_{anillo} + \nu(C=C)_{anillo}$] 1584 s, 1562 s, 1461 s, 1401 m; [$\nu(ClO_4)$] 1093 s, 1054 s.

II.E.3 Caracterización de 7 y 8

II.E.3.1 Estructura de rayos-X de



La estructura del compuesto 7 puede describirse como un polímero formado por cadenas de tetrámeros, constituidos, a su vez, por parejas de dímeros acoplados. La figura II.51a muestra una porción de la cadena con dos tetrámeros. Las distancias y ángulos de enlace seleccionados se presentan en la tabla II.16 (ver etiquetado completo de átomos en figura II.51b). Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

El polímero es catiónico. Cada unidad tetramérica contiene 4 iones Cu(II), dos ligandos triazol monodesprotonados (HV^-), dos ligandos **picolinato**, tres aniones nitrato coordinados y seis moléculas de agua de coordinación. Un nitrato iónico por tetrámero neutraliza la carga de la cadena.

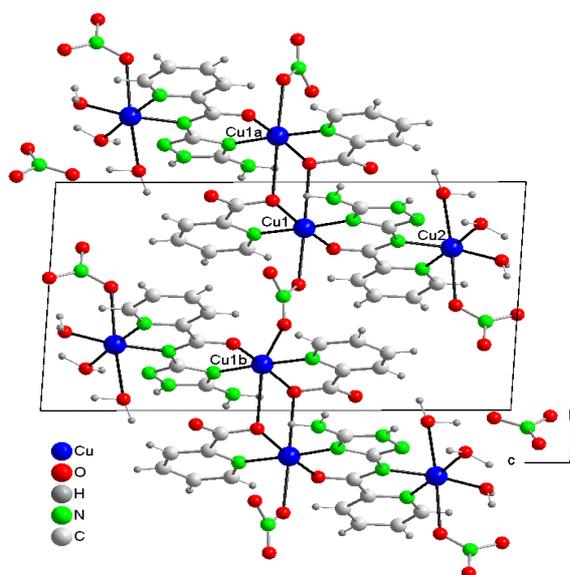


Figura II.51a. Vista parcial de una cadena de 7. Se muestra la unidad tetramérica contenida en la celda unidad.

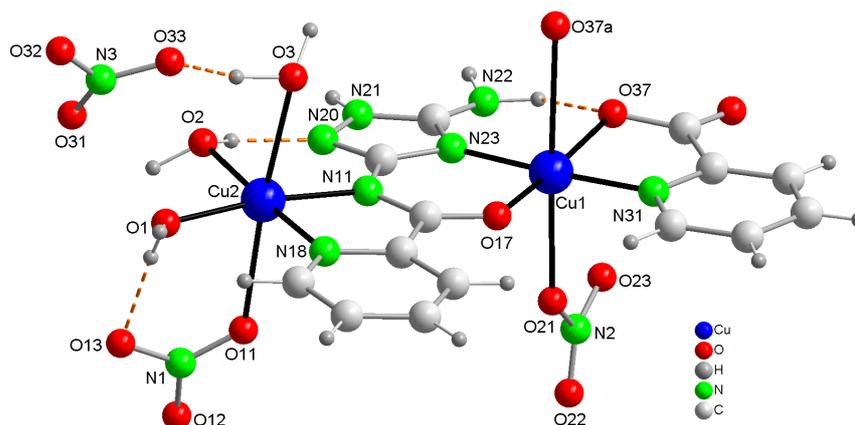
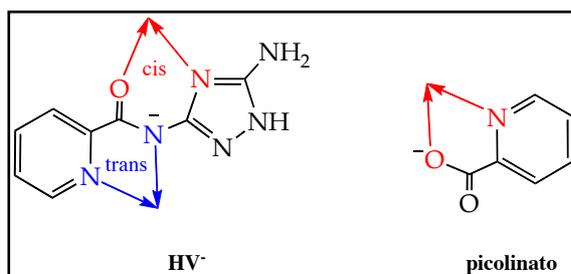


Figura II.52. Representación de la unidad asimétrica de **7** con etiquetado parcial de los átomos.

La *unidad asimétrica* (figura II.52) está integrada por dos átomos de cobre simétricamente independientes, Cu(1) y Cu(2), enlazados a través de un ligando HV^- y separados por una distancia Cu(1)-Cu(2) de 5.3705(9) Å. El ligando HV^- , monodesprotonado por pérdida del protón sobre N(11) (grupo amido), forma un anillo quelato de seis miembros con Cu(1) (átomos dadores N,O) y otro de cinco miembros con Cu(2) (átomos dadores N,N); por tanto, coordina como ligando tetradentado bis(quelante) en modo *cis-trans* y actúa de puente entre los dos centros metálicos. El ligando picolinato, también monoaniónico, se enlaza sólo al Cu(1), comportándose como bidentado quelante (átomos dadores N,O) (ver esquema II.9).

Ambos centros metálicos, Cu(1) y Cu(2), presentan entorno octaédrico distorsionado. Cu(1), el cobre más interno, está doblemente quelado en sus posiciones ecuatoriales por los átomos O-carbonilo y N4-triazol del ligando HV^- , y por los átomos N-piridina y O-carboxilato [O(37)] del ligando **picolinato**. Sus posiciones axiales las completan el átomo de oxígeno de un nitrato puente [átomo central N(2)] y el átomo de oxígeno de un carboxilato vecino [O(37a)], este último a una distancia larga, 2.909(1) Å, que puede calificarse de semi-coordinación. Cu(2), el cobre más periférico, en el plano ecuatorial está quelado por los átomos N-piridina y N-amida de un ligando HV^- ; las otras dos posiciones basales están ocupadas por los

átomos de oxígeno de dos moléculas de agua. En posición axial se encuentran un anión nitrato monodentado o terminal [átomo central N(1)] y una molécula de agua. El ligando aquo apical participa en un enlace de hidrógeno con el nitrato iónico [átomo central N(3)]. Se observan además varios enlaces de hidrógeno intramoleculares entre las moléculas de agua y el grupo amino exocíclico del triazol, como dadores, y los átomos de oxígeno nitrato y carboxilato, como aceptores (figura II.52).



Esquema II.9. Modo de unión de los dos ligandos en 7 (ambos monodesprotonados).

La unidad dimérica descrita se conecta con dos dímeros vecinos (uno por arriba; otro por abajo), a lo largo del eje "b", a través de puentes alternos O-carboxilato (monoatómico) y O,O'-nitrato (triatómico), con distancias Cu(1)-Cu(1a) = 3.762(1) Å [a: 1-x, 2-y, 1-z] y Cu(1)-Cu(1b) = 6.716(1) Å [b: 2-x, 1-y, 1-z]. Teniendo en cuenta la figura II.51 y la diferencia entre las dos distancias Cu1-Cu1', la estructura de 7 puede considerarse una cadena de tetrámeros (Cu2a,Cu1a,Cu1,Cu2, ver figura II.51b) conectados a lo largo del eje "b" por medio de ligandos nitrato bidentados.

La *unidad tetramérica* resulta del apareamiento entre dímeros a través de la doble interacción axial Cu(1a)-O(37) y Cu(1)-O(37a), con una distancia Cu(1)-Cu(1a), ya mencionada, de 3,762(1) Å. Nótese que el mismo átomo de oxígeno O-carboxilato [O(37a)] que coordina en posición basal al Cu(1) de un dímero, interacciona axialmente con el Cu(1a) del dímero vecino; es decir, el grupo carboxilato actúa de puente monoatómico. La unión entre tetrámeros se realiza a través del puente nitrato, con una distancia Cu(1)-Cu(1b) de 6,716(1) Å (ver arriba).

En el cristal, cada cadena de tetrámeros se enlaza con otra cadena a través de varios enlaces de hidrógeno intermoleculares, entre ellos, los establecidos por los pares de átomos N(22)-O(38c), N(22)-O(37c), N(22c)-O(38) y N(22c)-O(37) [c: -x+2, -y+2, -z+1] (ver Anexo, Tabla A.4), para generar una red supramolecular (MOF o *metal-organic framework*) (figuras II.53 y II.54).

Finalmente, cabe mencionar la presencia en el polímero de tres tipos de iones nitrato: nitrato monodentado terminal, nitrato bidentado puente y nitrato iónico o no coordinado. El nitrato puente, cuyo átomo central [N(2)] ocupa un centro de simetría, y el nitrato iónico [N(3)], que está en una posición especial, se encuentran desordenados y sus átomos han sido refinados con una ocupación del 50%.

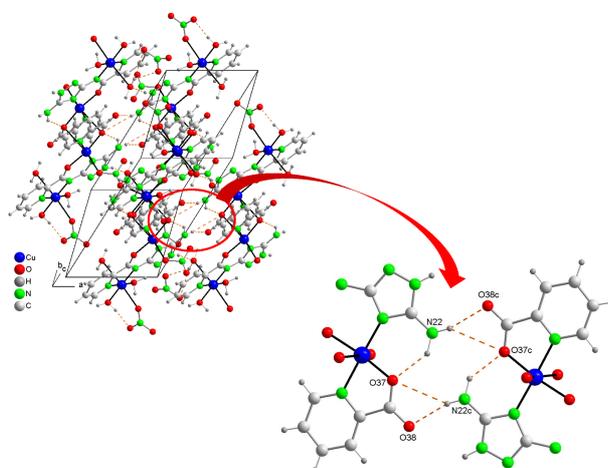


Figura II.53. Detalle de la unión entre dos cadenas a través de enlaces de hidrógeno en el cristal de 7.

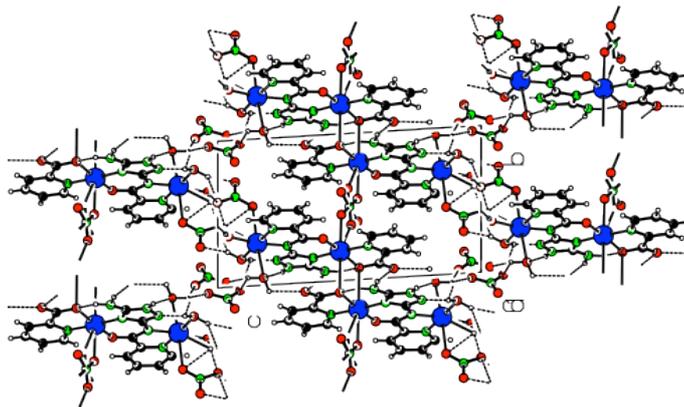


Figura II.54. Vista del empaquetamiento de las cadenas de tetrámeros en 7 para generar un MOF.

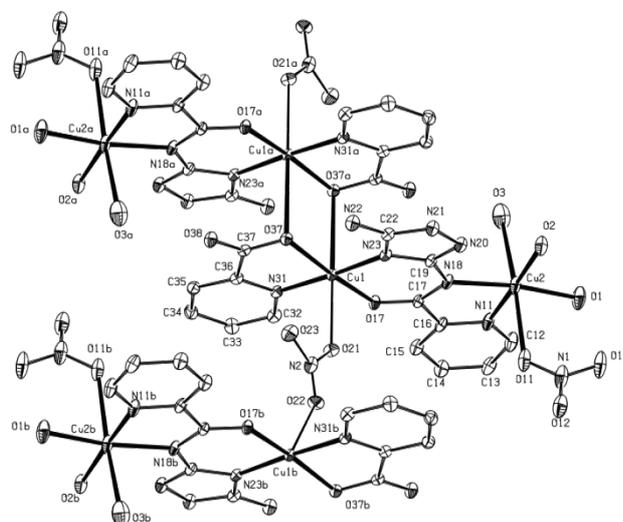


Figura II.51a. Gráfico del compuesto 7 con el etiquetado completo de los átomos.

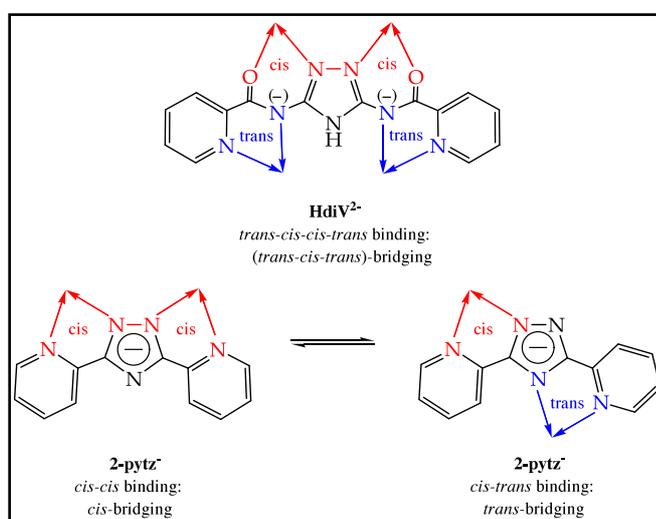
Tabla II.16. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para **7** (esds entre paréntesis).

Cu(1)-Cu(1)#1	3,7620(11)	O(37)-Cu(1)-N(31)	82,34(14)
Cu(1)-O(17)	1,943(3)	O(17)-Cu(1)-O(21)	81,54(18)
Cu(1)-N(23)	1,952(4)	O(37)-Cu(1)-N(21)	107,65(18)
Cu(1)-O(37)	1,970(3)	O(2)-Cu(2)-O(1)	88,40(16)
Cu(1)-N(31)	1,975(4)	N(11)-Cu(2)-O(1)	91,71(16)
Cu(1)-O(21)	2,350(6)	O(2)-Cu(2)-N(18)	98,44(15)
Cu(1)-O(22)#2	1,946(4)	N(11)-Cu(2)-N(18)	81,76(16)
Cu(1)-O(37)#1	2,909(3)	O(1)-Cu(2)-N(18)	171,92(18)
Cu(2)-O(2)	1,946(4)	O(2)-Cu(2)-O(11)	97,32(15)
Cu(2)-N(11)	1,961(4)	N(18)-Cu(2)-O(11)	90,97(14)
Cu(2)-O(1)	1,981(4)	O(2)-Cu(2)-O(3)	90,98(16)
Cu(2)-N(18)	2,022(4)	N(11)-Cu(2)-O(3)	85,06(17)
Cu(2)-O(11)	2,505(5)	O(1)-Cu(2)-O(3)	95,58(18)
O(17)-Cu(1)-N(23)	89,02(14)	N(18)-Cu(2)-O(3)	88,62(15)
N(23)-Cu(1)-O(37)	95,24(14)	O(11)-Cu(2)-O(3)	171,66(13)
O(17)-Cu(1)-N(31)	93,10(14)		

Operaciones de simetría: #1 -x+1,-y+2,-z+1 #2 -x+2,-y+1,-z+1

En el compuesto **8** el ligando **H₃diV** se encuentra desprotonado sobre las dos posiciones acetamido [N(18),N(28)], y mantiene el átomo de hidrógeno del anillo triazol [N(3)]. Es decir, el ligando está presente como **HdiV²⁻**.

Los dos iones Cu(II) centrales están unidos por un puente doble $\mu_{1,2}$ -triazol. Este tipo de puente es normal para triazoles 3,5-disustituídos (modo de enlace *cis-cis*/modo puente *cis*) (esquema II.10). Los cuatro iones Cu(II) periféricos, quelados en *trans*, se conectan a los iones Cu(II) centrales a través de un puente doble "NCN + NCO" que involucra tanto al anillo triazol como al sustituyente (modo de enlace *trans-cis*/modo puente *trans*). Por tanto, y siguiendo la descripción de Chen y col.,^{135,136} cada ligando **HdiV²⁻** actúa como puente entre cuatro iones Cu(II) en modo *trans-cis-trans*.



Esquema II.10. Formas de enlazar y de actuar como puente del ligando **HdiV²⁻** y del ligando análogo **2-pytz⁻** (según la descripción de Chen y col.).^{135,136}

Una característica del clúster Cu₆ de **8** es que es casi planar. Los 6 centros metálicos se encuentran aproximadamente en el mismo plano, con desviaciones del plano {Cu(2),Cu(2a),Cu(3),Cu(3a)} de +0.302 Å para Cu(1) y de -0,302 Å para Cu(1a) (ver figura II.56). Esta peculiaridad está relacionada con la relativa planaridad del ligando HdiV²⁻, si bien los anillos de piridina, externos, se separan ligeramente del plano {Cu(N-N)₂Cu'}, formando con él ángulos

diedros de $\pm 9,5^\circ$ y $\pm 16,9^\circ$ (las piridinas forman entre sí ángulos de $\pm 21,7^\circ$). Este clase de planaridad, impuesta por los sustituyentes del ligando, también se observó en el compuesto de Cu(II) tetranuclear "1+2+1" anteriormente descrito (6).

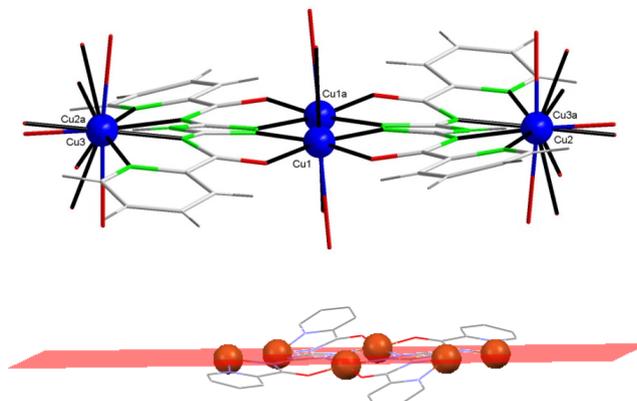


Figura II.56. Vistas de **8** mostrando el plano Cu₆.

En el compuesto **8** los átomos centrales Cu(1) y Cu(1a) presentan, en principio, entorno de pirámide de base cuadrada con cromóforo CuN₂O₂+O. La figura II.55 muestra cómo los átomos Cu(1) y Cu(1a), simétricamente relacionados, están coordinados ecuatorialmente por dos átomos de nitrógeno, N(1) y N(2), de dos anillos triazol (a 1,96 Å en ambos casos) y por dos átomos de oxígeno carbonilo, O(17) y O(27), de dos ligandos HdiV²⁻ diferentes (a 1,92 y 1,95 Å). Un átomo de oxígeno de una molécula de agua, O(1), establece una débil interacción en posición apical (a 2,43 Å). Además, un anión perclorato, Cl(1), se aproxima al plano {Cu(N–N)₂Cu'} para situarse en la sexta posición de coordinación a una distancia Cu(1)-O(11) de 2,81 Å.

Los cuatro átomos periféricos, Cu(2), Cu(2a), Cu(3) y Cu(3a), exhiben geometría octaédrica con cromóforo CuN₂O₂+O+O' (4+1+1). Las posiciones ecuatoriales están ocupadas por un átomo de nitrógeno de piridina y un átomo de nitrógeno acetamido de un ligando HdiV²⁻ (a distancias 1,98-2,04 Å) y por dos átomos de oxígeno de dos moléculas de agua [O(2) y O(3) en Cu(2); O(5) y O(7) en Cu(3); a distancias 1,98-2,01 Å]. En posición apical se encuentra un átomo de

oxígeno de otra molécula de agua, [O(4) y O(6), a distancias 2,27- 2,33 Å). Por último, se produce un débil contacto con un átomo de oxígeno de un anión perclorato [O(21)/Cl(2) y O(31)/Cl(3)] a distancias largas (2,52 y 2,58 Å).

Obviamente el catión hexanuclear de **8** presenta toda una gama de distancias Cu··Cu', unas concernientes a los cobres centrales: $d(\text{Cu1} \cdots \text{Cu1a}) = 3,83 \text{ \AA}$, $d(\text{Cu3} \cdots \text{Cu1}) = 5,37 \text{ \AA}$ y $d(\text{Cu2a} \cdots \text{Cu1a}) = 5,35 \text{ \AA}$; y otras que involucran a los cobres periféricos: $d(\text{Cu3} \cdots \text{Cu2a}) = 5,87 \text{ \AA}$, $d(\text{Cu3} \cdots \text{Cu2}) = 10,50 \text{ \AA}$ y $d(\text{Cu3} \cdots \text{Cu3a}) = 12,05 \text{ \AA}$.

En la red cristalina el anión perclorato Cl(1) forma dos enlaces de hidrógeno, uno con la molécula de agua coordinada en posición apical al átomo Cu(1a) [$d(\text{O14} \cdots \text{O1}) = 3,03 \text{ \AA}$] y otro con la molécula de agua ecuatorialmente coordinada al cobre periférico Cu(2)* (*: de una unidad hexanuclear vecina) [$d(\text{O13} \cdots \text{O3}^*) = 2,76 \text{ \AA}$], con lo que conecta dos unidades (figura II.57). Finalmente, el anión perclorato [Cl(4)], no coordinante, sirve de unión entre dos unidades diferentes a través de enlaces de hidrógeno establecidos con moléculas de agua coordinadas/semicoordinadas pertenecientes a dos unidades Cu₆ diferentes [$d(\text{O5} \cdots \text{O43}) = 2,95 \text{ \AA}$ y [$d(\text{O41} \cdots \text{O4}^*) = 2,90 \text{ \AA}$]. De este modo se genera una red supramolecular.

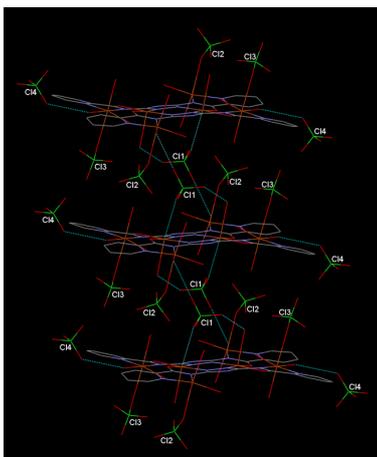


Figura II.57. Vista del empaquetamiento de **8**: conexiones entre unidades hexanucleares y situación de los 4 tipos de aniones perclorato simétricamente independientes.

Tabla II.17. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para **8** (esds entre paréntesis).

Cu(1)-O(17)	1.923(5)	Cu(2)-N(18)	2.028(5)
Cu(1)-O(27)	1.954(5)	Cu(2)-O(4)	2.332(8)
Cu(1)-N(2)	1.957(6)	Cu(2)-O(21)	2.519(7)
Cu(1)-N(1)	1.963(6)	Cu(3)-N(21)	1.978(6)
Cu(1)-O(1)	2.428(8)	Cu(3)-O(5)	1.989(6)
Cu(1)-O(11)	2.809(9)	Cu(3)-O(7)	1.991(5)
Cu(2)-N(11)	1.985(7)	Cu(3)-N(28)	2.035(6)
Cu(2)-O(2)	1.984(6)	Cu(3)-O(6)	2.269(7)
Cu(2)-O(3)	1.995(6)	Cu(3)-O(31)	2.577(7)
O(27)-Cu(1)-N(2)	86.8(2)	N(11)-Cu(2)-O(4)	103.3(3)
O(17)-Cu(1)-N(1)	87.0(2)	N(18)-Cu(2)-O(4)	88.1(3)
O(27)-Cu(1)-N(1)	169.1(2)	N(11)-Cu(2)-O(21)	83.6(3)
N(2)-Cu(1)-N(1)	102.8(2)	N(18)-Cu(2)-O(21)	102.7(2)
N(2)-Cu(1)-O(1)	94.4(3)	N(21)-Cu(3)-O(5)	94.3(3)
N(1)-Cu(1)-O(1)	94.9(3)	N(21)-Cu(3)-N(28)	82.7(3)
N(2)-Cu(1)-O(11)	85.3(3)	O(7)-Cu(3)-N(28)	95.2(2)
N(1)-Cu(1)-O(11)	79.9(3)	N(21)-Cu(3)-O(6)	98.6(3)
N(11)-Cu(2)-O(3)	93.5(3)	N(21)-Cu(3)-O(31)	88.8(3)
N(11)-Cu(2)-N(18)	82.0(2)	N(28)-Cu(3)-O(31)	97.8(3)
O(2)-Cu(2)-N(18)	95.9(2)	N(28)-Cu(3)-O(6)	94.8(3)

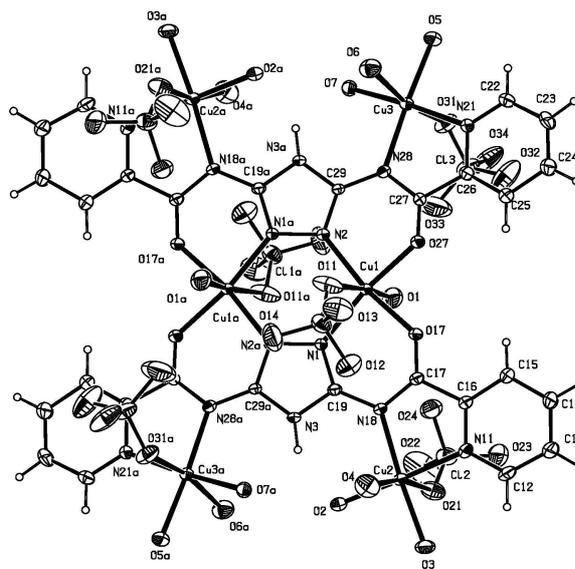


Figura II.55b. Gráfico del compuesto **8** con el etiquetado completo de los átomos.

II.E.3.3 Espectroscopia infrarroja

En la tabla II.18 se muestran las bandas IR más significativas de los complejos **7** y **8** (ver figuras de los espectros en el Anexo I). Se incluyen también las bandas de los correspondientes ligandos (**H₂V** y picolinato sódico en **7**, **H₃diV** en **8**), para facilitar la interpretación.

En la región 3500-3000 cm⁻¹ se observan cambios apreciables respecto a los espectros de los correspondientes ligandos.

En el caso del complejo **7** desaparecen las bandas intensas y agudas observadas para el ligando **H₂V** entre 3400-3300 cm⁻¹ (asignadas a las vibraciones $\nu(\text{N-H})_{\text{NH}/\text{NH}_2}$), como resultado de la desprotonación del ligando en el grupo acetamido (y coordinación a través de su átomo de nitrógeno) y de la implicación de los otros grupos NH en la red de enlaces de hidrógeno.

Por lo que se refiere a las bandas de mayor valor diagnóstico, el compuesto **7** presenta una banda aguda fuerte a 1669 cm⁻¹ y un doblete bien definido a 1588-1568 cm⁻¹ de similar intensidad. Son varios los grupos del compuesto que pueden originar señales en esta zona, entre ellos, el grupo carbonilo de amida desprotonada del ligando **HV⁻**, el grupo carboxilato del picolinato y los grupos C=N de los anillos. Tentativamente, la banda de frecuencia más alta (1669 cm⁻¹) podría asignarse a la vibración $\nu(\text{C=O})$ del ligando **HV⁻** y el doblete (1588-1568 cm⁻¹) a la vibración $\nu(\text{OCO})$ del grupo picolinato. El resto de vibraciones podrían estar englobadas en la fuerte banda centrada a 1386 cm⁻¹ que incluye la vibración $\nu_{\text{asym}}(\text{NO}_2)$ de los nitratos.

En relación al anión, en el espectro de **7** la señal más intensa con diferencia es la anteriormente mencionada. Se trata de una señal estructurada, con un pico a 1386 cm⁻¹ muy fuerte y un hombro a 1358 cm⁻¹, que contendría las vibraciones $\nu_{\text{asym}}(\text{NO}_2)$ de los grupos nitrato. Se observa además una señal de intensidad media a 1185 cm⁻¹ que podría atribuirse a la vibración $\nu_{\text{sym}}(\text{NO}_2)$ de los grupos nitrato. Nótese que la estructura contiene tres tipos de ión nitrato: iónico, monodentado y bidentado puente. Nakamoto⁶⁴ ya indica que es difícil diferenciar estas estructuras por espectroscopia vibracional porque la simetría del grupo nitrato difiere muy poco entre unas y otras. Por tanto, no se ha profundizado más en la asignación.

El IR del compuesto hexanuclear **8** también presenta diferencias importantes con respecto al espectro IR del ligando libre. En la primera zona del espectro se observa que el doblete agudo presente en **H₃diV** a 3367-3352 cm⁻¹ desaparece y es sustituido por una banda ancha centrada a 3464 cm⁻¹. El cambio puede atribuirse a la pérdida de los dos protones NH de acetamida para dar el anion **HdiV²⁻**, que es la forma del ligando presente en el compuesto. Por otro lado, la amplitud de la banda en el compuesto estaría de acuerdo con la presencia de muchas moléculas de H₂O de coordinación y de cristalización en la estructura cristalina del mismo.

Por lo que respecta a las señales de la parte más significativa del espectro, el doblete fuerte a 1701-1668 cm⁻¹, correspondiente a la vibración $\nu(\text{C}=\text{O})$ del grupo acetamida del ligando, se desplaza claramente a frecuencias más bajas en **8** (1613 sh, 1581-1567 d, s) como resultado de la desprotonación de la acetamida y de la coordinación a través del oxígeno de este grupo. Cambios de este orden se han descrito ya en la bibliografía para otros sistemas con ligandos triazol.⁶² Además, la banda del ligando a 1559 cm⁻¹, muy fuerte y estructurada, aparece en el complejo a menores frecuencias (1461 cm⁻¹) y con menor intensidad. Este cambio sugiere que la banda del ligando incluye las vibraciones $\delta(\text{N-H})$ de amida; al no estar éstas presentes en el compuesto **8**, la banda correspondiente exhibe menor intensidad.

Por último, en cuanto al anión, se aprecia una banda muy fuerte y compuesta, con máximos a 1145, 1114 y 1089 cm⁻¹, que debe englobar las vibraciones ν_3 de los distintos aniones perclorato (iónico y semi-coordinado) presentes en la estructura⁶⁴ La débil banda que se observa a 770 cm⁻¹ se puede asignar a la vibración ν_4 del anión.

Tabla II.18. Asignación de bandas IR para los complejos $\{[\text{Cu}_4(\text{HV})_2(\text{picolinato})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_n\}$ (**7**) y $[\text{Cu}_6(\text{HdiV})_2(\text{ClO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{14}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (**8**), así como para sus respectivos ligandos.*

Compuesto	$\tilde{\nu}_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$			
	$[\nu(\text{O-H}) + / \text{o}$ $\nu(\text{N-H})_{\text{NH} + / \text{o NH}_2} + / \text{o}$ $\nu(\text{arC-H})]$	$\nu(\text{C=O})_{\text{traz}} +$ $\nu(\text{COO-})_{\text{pic}}$	$[\delta(\text{N-H})_{\text{NH} + / \text{o NH}_2} +$ $\nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]$	ν (anion)
H₂V	3428 s; 3323-3253 d, m	1683 s	1651-1622 d, m; 1576 s; 1486 w; 1411 m	--
Picolinato sódico	3112 b; 2955 s; 2944 s; 2927 s	1666-1642 d, m ^a	1607-1585-1555 t,s; 1463-1439d,m; 1409-1350-1370 d, s	--
Comp. 7	3373 w; 3329 w	1669 (s)	1588-1568 d, s; 1416 m	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}} + \nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$ 1386 vs-1358 sh ^b
H₃diV	3367-3352 d, m; 3180 b; 3066 w	1703-1689 d, s	1557 vs; 1448 m; 1415 s	--
Comp. 8	3464 b, s; 3220 m; 3100 w	1613 sh, 1589-1566 d, s	1486 s; 1402 s	ν_3 : 1145-1114-1089 vs ^b ν_4 : 770 w

* *vs*: muy fuerte; *s*: fuerte; *m*: media; *w*: débil; *vw*: muy débil; *d*: doblete; *b*: ancha; *sh*: hombro; ν_{asym} : vib. de tensión asimétrica; ν_{sym} : vib. de tensión simétrica.

^a Vibración presente únicamente en el picolinato sódico y en el compuesto 7. ^b Banda estructurada.

II.E.3.4 Propiedades Magnéticas de 7 y 8

La figura II.58 muestra el comportamiento magnético del complejo tetranuclear $\{[\text{Cu}_4(\text{HV})_2(\text{picolinato})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_n\}$ (**7**) en forma de $\chi_M T$ vs T , siendo χ_M la susceptibilidad magnética por cada 4 iones Cu(II).

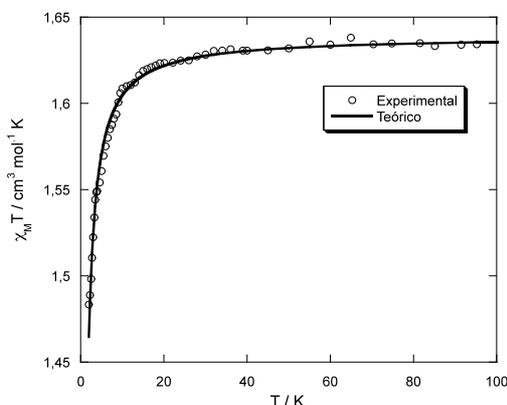


Figura II.58. Curva de $\chi_M T$ frente a la T para el complejo **7** (valores por unidad de Cu_4).

A temperatura ambiente el valor de $\chi_M T$ es $1,63 \text{ cm}^3 \text{ K/mol}$, valor próximo al esperado para cuatro iones Cu(II) independientes con $S = \frac{1}{2}$ y $g=2,0$. No se observa ningún máximo en la curva de χ_M . Al bajar la temperatura, $\chi_M T$ decrece muy poco hasta temperaturas de ca. 20 K, por debajo de las cuales se produce una caída abrupta hasta llegar a un valor de $1,45 \text{ cm}^3 \cdot \text{K mol}^{-1}$ a 2 K. Este comportamiento sugiere la presencia de centros Cu(II) *acoplados* con un acoplamiento antiferromagnético muy débil (del orden del observado para interacciones intermoleculares).

Los datos magnéticos se han interpretado teniendo en cuenta la estructura tetranuclear del complejo en la que existen dos tipos de centros Cu(II) (figura II.59). Si se considera la unidad tetranuclear de la izquierda de la figura, puede considerarse que Cu(2) y Cu(1) están acoplados a través del ligando-puente triazol (J_1) y que esta unidad dimérica interacciona con otra unidad dimérica, Cu(1a)-Cu(2a), a través del puente nitrato que conecta Cu(1) y Cu(1a) (J_2). También puede tomarse como unidad tetranuclear la representada en la

derecha. En este caso Cu(1) y Cu(2), acoplados a través del ligando-
puente triazol (J_1), interaccionarían con otra unidad dimérica a través
del doble puente monoatómico carboxilato, O(37) y O(37b), que
enlaza Cu(1) y Cu(1b) (J_2). El esquema central resume las dos posibles
vías de intercambio magnético.

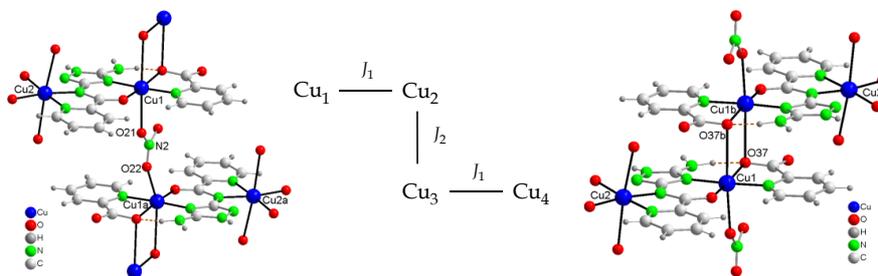


Figura II.59. Dos vistas distintas (izda., dcha.) del clúster Cu_4 de 7 y esquema (centro) de las dos posibles vías de intercambio magnético.

Así, los datos magnéticos se ajustaron usando el siguiente Hamiltoniano:

$$\mathbf{H} = -J_1 (\mathbf{S}_1\mathbf{S}_2 + \mathbf{S}_3\mathbf{S}_4) - J_2 (\mathbf{S}_2\mathbf{S}_3) \quad (\text{ec. II.7})$$

Se realizaron tres ajustes distintos asumiendo $g_1=g_2=g_3=g_4$. Los valores que mejor reproducen los datos experimentales son:

$$(a) \quad J_1 = -0.33(1) \text{ cm}^{-1} \quad J_2 = -0.49(1) \text{ cm}^{-1} \quad g = 2.09(1)$$

$$(b) \quad J_1 = -0.54(1) \text{ cm}^{-1} \quad J_2 = 0 \text{ cm}^{-1} \quad g = 2.09(1)$$

$$(c) \quad J_1 = 0 \text{ cm}^{-1} \quad J_2 = -1.01(1) \text{ cm}^{-1} \quad g = 2.09(1)$$

Cualquiera de las tres posibilidades indica un acoplamiento antiferromagnético entre los distintos centros Cu(II) extremadamente débil. La interacción a través de la vía que representa la constante J_2 (entre unidades díméricas) era predecible que fuera prácticamente nula, pues conecta a iones Cu(II) a través de posiciones de coordinación apicales y, por tanto, el solapamiento entre los orbitales magnéticos no está favorecido. Sin embargo, la interacción a través del ligando puente triazol (comparable a un puente carboxilato en modo *anti-syn*), debería ser mayor (J del orden de 10-15 cm^{-1} , según la bibliografía)¹⁻³

(ver compuesto **8** más adelante). La debilidad de esta interacción podría estar relacionada con la desviación de la coplanaridad de los planos ecuatoriales de los dos centros Cu(II) implicados, Cu(1) y Cu(2).

La figura II.60 muestra el comportamiento magnético del compuesto hexanuclear $[\text{Cu}_6(\text{HdiV})_2(\text{ClO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{14}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (**8**) en forma de $\chi_M T$ frente a la temperatura, siendo χ_M la susceptibilidad magnética por cada 6 iones Cu(II).

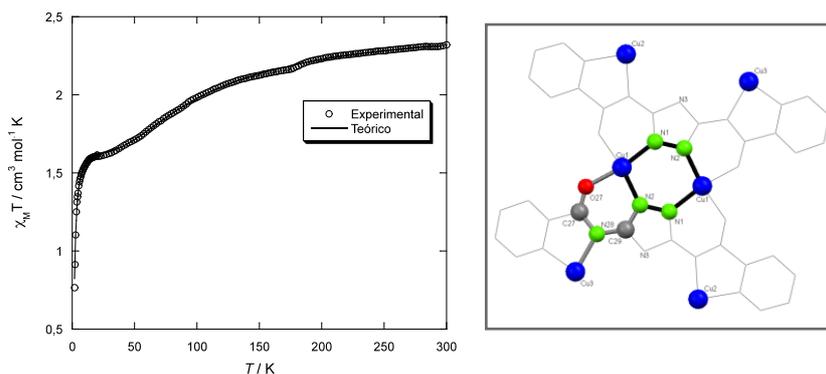


Figura II.60. (Izda.) Curva $\chi_M T$ frente a T para el complejo **8** (valores por unidad Cu_6). (Dcha.) Esquema del hexámero (las bolas rojas representan los iones Cu(II)).

A temperatura ambiente el valor de $\chi_M T$ es de $2,31 \text{ cm}^3 \cdot \text{K}/\text{mol}$, valor próximo al esperado para seis iones Cu(II) independientes, con $S = 1/2$. Al enfriar, el producto $\chi_M T$ decrece hasta alcanzar un *plateau* (o meseta) (en el rango de 30-15 K) con valor de $1,61 \text{ cm}^3 \cdot \text{K}/\text{mol}$, que corresponde a cuatro iones Cu(II) independientes. Por debajo de 15 K, el valor de $\chi_M T$ decrece abruptamente hasta alcanzar un valor de $0,75 \text{ cm}^3 \cdot \text{K}/\text{mol}$ a 2 K.

A la vista de la estructura (figura II.60, dcha.), este comportamiento puede ser explicado en término de dos etapas. Primera: la región comprendida entre 300 y 30 K revela la presencia de una interacción antiferromagnética moderada-fuerte dentro de la "unidad dimérica central", es decir, entre los dos átomos centrales Cu(1)-Cu(1a), unidos mediante un doble puente $N1-N2$ triazol. Este tipo de puente se ha visto ampliamente que conduce a un

acoplamiento antiferromagnético.^{2,58,139,158-160,167} Segunda: a temperaturas más bajas (15-2 K) tiene lugar un intercambio antiferromagnético más débil que implica las parejas: Cu(1)-Cu(2), Cu(1)-Cu(3), Cu(1a)-Cu(2a) y Cu(1a)-Cu(3a). Se produciría a través del puente doble "NCN+NCO", es decir, en modo *trans* (conformación *anti-syn*).¹⁶⁸⁻¹⁷⁰

Teniendo en cuenta todas estas características, el tratamiento de los datos se realizó con el siguiente Hamiltoniano (ecuación II.8):

$$\mathbf{H} = -J_1 \mathbf{S}_1 \mathbf{S}_{1a} - J_2 (\mathbf{S}_1 \mathbf{S}_2 + \mathbf{S}_1 \mathbf{S}_3 + \mathbf{S}_{1a} \mathbf{S}_{2a} + \mathbf{S}_{1a} \mathbf{S}_{3a}) \quad (\text{ec. II.8})$$

Los parámetros que permitieron el mejor ajuste de los datos experimentales son:^{*}

$$J_1 = -113,2(3) \text{ cm}^{-1} \quad J_2 = -17,1(1) \text{ cm}^{-1} \quad g = 2,11(1)$$

El valor de las constantes es comparable al de las constantes de acoplamiento descritas para sistemas puente análogos.^{1,3,58,120,158,171} Nótese que el valor de J_2 es claramente superior al valor obtenido para J_1 en el compuesto **7**, a pesar de la similitud del sistema puente.

* Estos valores difieren de los que aparecen en nuestra publicación *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 2289-2291. La publicación contiene una errata, de la que damos fe aquí, originada por un error en el cambio de unidades de K a cm^{-1} .

II.E.4 Estudio de interacción con el ADN de 7 y 8

La solubilidad en agua de ambos compuestos ha permitido el estudio de interacción, en disolución, con el ADN.

Con el fin de establecer si las entidades polinucleares son estables en disolución acuosa se realizó el correspondiente estudio por espectrometría de masas (modo positivo), pero los resultados no fueron concluyentes.

Los espectros UV-vis realizados sobre muestras policristalinas y en disolución acuosa muestran el mismo máximo en la región visible [compuesto 7: 610 nm (sólido) y 615 nm (en agua); compuesto 8: 630 nm (sólido) y 635 nm (en agua)]. Además, en el ensayo de conductividad realizado para el compuesto 7, la disolución presenta un valor similar al del electrolito control de tipo 1:2 [$380 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para 7 y $343 \Omega^{-1} \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ para $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]. Este resultado sugiere rotura de la cadena y disociación de los aniones nitrato, con permanencia de la especie tetranuclear.

Los anteriores resultados junto con el hecho de que en ambos compuestos, 7 y 8, los iones cobre(II) están fuertemente quelados, permiten suponer que en cierta extensión las unidades tetranuclear y hexanuclear, respectivamente, deben estar presentes en disolución.

Con este supuesto de estabilidad se ha realizado el estudio de las propiedades de unión con el ADN por las siguientes técnicas: viscosimetría, temperatura de desnaturalización y fluorescencia.

II.E.4.1 Espectroscopia de fluorescencia

Se han registrado los espectros de emisión del aducto ADN-EB en presencia de distintas concentraciones de complejo (disoluciones *problema*), y se han determinado los cambios que se producen en el máximo de intensidad de emisión del aducto, siguiendo el procedimiento que se describe en la sección 1.3.1.1. de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Como paso previo se ensayaron las siguientes disoluciones *control* en las mismas condiciones que las disoluciones *problema*: disolución de complejo; disolución de complejo + ADN; disolución de complejo

+ EB (sin ADN). Las dos primeras no mostraron fluorescencia apreciable y la tercera no mostró cambios en relación a la disolución de EB (sin complejo).

En las figura II.61 y II.62 se presentan los espectros de emisión del aducto CT ADN-EB-complejo (concentraciones 0-50 μM). Se incluye también el gráfico de Stern-Volmer, en el que se representa el cociente I_{F0}/I_F frente a la concentración de complejo, siendo I_{F0} e I_F el máximo de intensidad de emisión en ausencia y en presencia de complejo, respectivamente.

Ambos complejos producen una acusada reducción en la intensidad de emisión del EB, lo que indica una fuerte interacción de los mismos con el ADN. Las representaciones de I_0/I frente a la concentración de 7/8 (figuras interiores II.61 y II.62) no exhiben tendencia lineal para ninguno de los dos complejos; por tanto, no se pudo obtener K_{SV} (constante de Stern-Volmer).

Sin embargo, como ambos compuestos sí consiguen reducir al 50% la intensidad de emisión del aducto ADN-EB en el rango de concentraciones estudiado, se pudo calcular el valor C_{50} (concentración necesaria de compuesto para reducir a la mitad la intensidad de emisión del aducto ADN-EB) mediante ajuste polinomial y subsiguiente cálculo para $y = I_0/I = 2$. Se obtuvieron así los siguientes valores de C_{50} : 23,4 μM (7) y 11,5 μM (8).

Con estos valores de C_{50} se halló el valor de K_{app} (constante aparente) mediante la expresión:

$$K_{app} = K_{EB} \times [EB] / C_{50} \quad (\text{ec. II.4})$$

donde $K_{EB} = 3,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ a $\text{pH} = 6,0$, y $[EB] = 50 \mu\text{M}$.

Los resultados fueron: K_{app} (7) = $6,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y K_{app} (8) = $1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. Estos valores pueden considerarse muy altos, comparables a los de los agentes de unión a los surcos Hoechst 33258 ($1,2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) y verde de metilo ($1,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$)¹⁷¹ (ver tabla comparativa II.20 al final de este Capítulo).

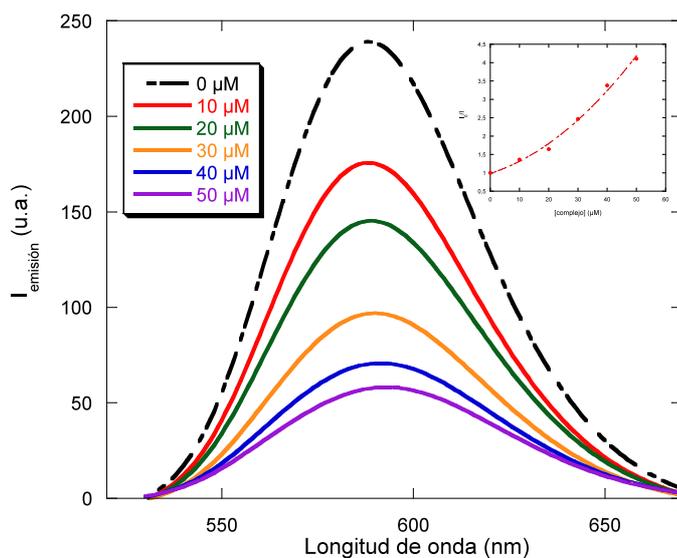


Figura II.61. Espectro de emisión del bromuro de etidio y CT ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **7**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0). **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejos (I) frente a la concentración de **7** [ajuste polinómico: $y = 0,984 + 0,025x + 0,0008x^2$ ($R^2 = 0,993$)].

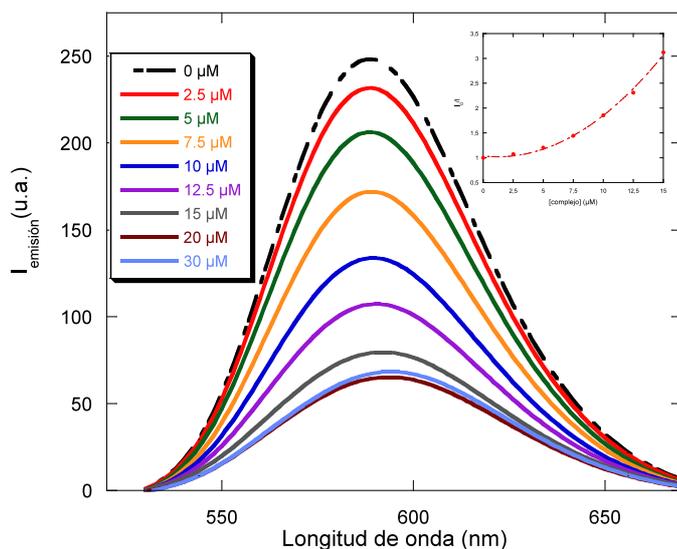


Figura II.62. Espectro de emisión del bromuro de etidio y CT ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de **8**. [CT ADN] = [EB] = 50 μM en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0). **Inset:** Representación de Stern-Volmer de la relación de intensidades (I_0/I) en ausencia (I_0) y presencia de complejos (I) frente a la concentración de **8** [ajuste polinómico: $y = 1,035 - 0,026x + 0,011x^2$ ($R^2 = 0,996$)].

II.E.4.2 Temperatura de fusión del ADN

Para el estudio de temperatura de fusión del ADN se registró la absorbancia a 260 nm de una disolución de ADN-compuesto que contiene una concentración fija de ADN y una concentración variable de compuesto, en el rango de temperatura 25-90 °C, tal y como se describe en la sección 1.3.1.2. de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Las figuras II.63 y II.64 muestran las curvas de temperatura de “fusión” experimentales para el ADN en presencia de cada uno de los dos compuestos estudiados. En todos los casos se ha restado la absorbancia del complejo a 260 nm (por ello se representan *absorbancias normalizadas*).

Ambos compuestos aumentan la temperatura de *fusión* del ADN, siendo el ΔT_m mayor a mayor proporción de complejo. En concreto, el complejo **7** presenta el valor de $\Delta T_m = 8$ °C para una relación $[\text{ADN}]/[\text{compuesto}] = 4$. Este valor sugiere una estabilización de la doble hebra *moderada* en relación a otros valores de la bibliografía.^{74,75} Por su parte, el compuesto **8** produce cambios más acusados, con un valor de $\Delta T_m = 13$ °C para la misma relación $[\text{ADN}]/[\text{compuesto}] = 4$. Este valor puede considerarse medio-alto y sería indicativo de una *fuerte* estabilización de la doble hélice.^{74,75}

En la experiencia con el complejo **8** se observa que en el último tramo de temperatura las curvas no son coincidentes, esto es, hay una disminución de la absorbancia a medida que aumenta la concentración de complejo. Schindler y col. han descrito una situación similar al estudiar los cambios de T_m producidos en el CT ADN por diferentes policationes.¹⁷² Los autores argumentan que esta disminución en la absorbancia se debe a la existencia de microrregiones en la doble hebra con gran afinidad por el compuesto ensayado que no llegan a desnaturalizarse.

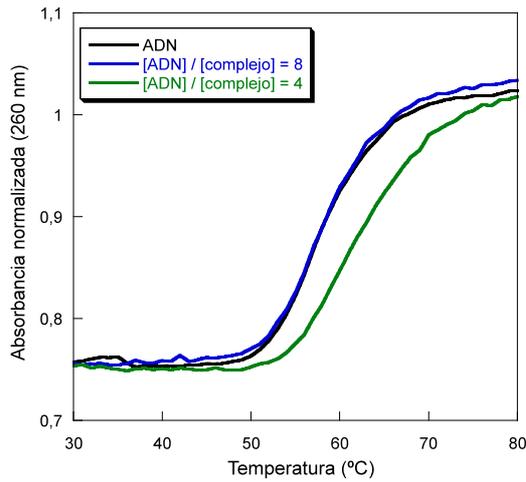


Figura II.63. Curva de temperatura de fusión del CT ADN (100 μM) en ausencia (negro) y en presencia de 7 (12,5 μM , azul) y (25 μM , verde) en 1 mM tampón fosfato, pH = 7,2, 2 mM NaCl. **Leyenda:** relación [ADN]/[7].

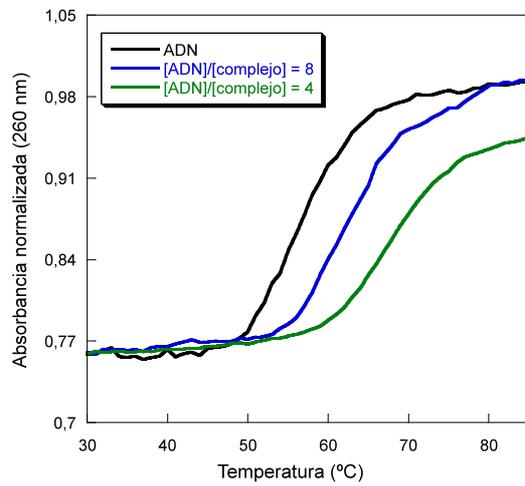


Figura II.64. Curva de temperatura de fusión del CT ADN (100 μM) en ausencia (negro) y en presencia de 8 (12,5 μM , azul) y (25 μM , verde) en 1 mM tampón fosfato, pH = 7,2, 2 mM NaCl. **Leyenda:** relación [ADN]/[8].

II.E.4.3 Viscosimetría

Las medidas de viscosidad son uno de los métodos más directos para estudiar la forma de unión de las moléculas al ADN en disolución. Las medidas de viscosimetría se realizaron según se detalla en la sección 1.3.1.3. de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran como una representación gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, donde η es la viscosidad de la disolución tampón-ADN-complejo y η_0 es la viscosidad de la disolución tampón-ADN, frente a relaciones crecientes $[\text{complejo}]/[\text{ADN}]$. Los efectos producidos en el ADN por diferentes concentraciones de los complejos **7** y **8** se indican en las figuras II.65 y II.66, respectivamente.

Los cambios de viscosidad relativa producidos por los compuestos polinucleares **7** y **8** se pueden considerar *no* significativos. Por tanto, se puede concluir que ninguno de los dos interacciona con el CT ADN por intercalación.

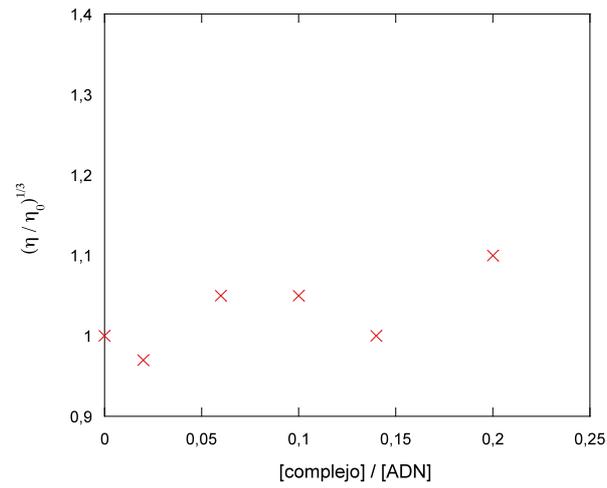


Figura II.65. Ensayo de viscosidad para **7**. [CT ADN] = 50 μ M en presencia de 1, 3, 5, 7 y 10 μ M de compuesto **7** en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0).

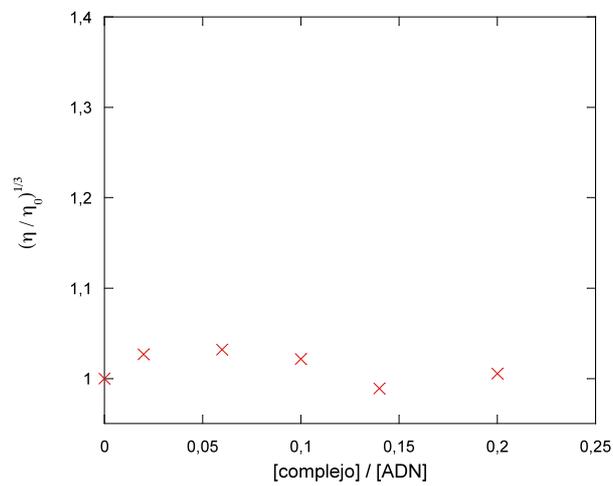


Figura II.66. Ensayo de viscosidad para **8**. [CT ADN] = 50 μ M en presencia de 1, 3, 5, 7 y 10 μ M de compuesto **8** en tampón cacodilato 0,1 M (pH = 6,0).

II.E.4.4 Conclusiones de los estudios de interacción

La tabla II.19 recoge los resultados de los estudios de interacción.

El compuesto **7** presenta una constante K_{app} alta ($6,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), produce un aumento medio de la temperatura de "fusión" del ADN ($\Delta T_m = 8 \text{ }^\circ\text{C}$) y, según el ensayo de viscosimetría, no intercala.

Por su parte, el compuesto **8** presenta una constante K_{app} muy alta ($1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), el ΔT_m es medio-alto ($\Delta T_m = 15 \text{ }^\circ\text{C}$) y no intercala.

Se puede concluir que los dos compuestos presentan una gran afinidad por el ADN. Ambos compuestos se combinan con el ADN de forma similar, probablemente mediante interacciones electrostáticas con los grupos fosfato. La extraordinaria afinidad del compuesto hexanuclear **8**, mayor que la del compuesto tetranuclear **7**, podría explicarse por la presencia de un gran número de centros con carga positiva.

Tabla II.19. Resultados experimentales de los ensayos de interacción con el ADN (espectroscopia de fluorescencia, temperatura de desnaturalización y viscosimetría) y de corte (ver próximo apartado) para los compuestos **7** y **8**.

Compuesto	C_{50} (μM)	K_{app}^a (M^{-1})	Viscosimetría ^b (η/η_0) ^{1/3}	ΔT_m^c ($^\circ\text{C}$)	k_{obs}^d (min^{-1})
7	23,4	$6,4 \times 10^7$	1,05	8	0,011
8	11,5	$1,3 \times 10^8$	1,02	15	0,033

^a obtenido a partir de la ecuación: $K_{EB} [EB] = [C_{50}] K_{app}$

^b CT ADN, (η/η_0)^{1/3} valor para: [compuesto] / [CT ADN] = 0,1

^c CT ADN

^d ver estudio cinético en apartado II.E.5.3

II.E.5 Estudio de actividad nucleasa mediante electroforesis en gel de agarosa de 7 y 8

II.E.5.1 Ensayo de actividad

Con el fin de evaluar la capacidad de corte hacia el ADN de los dos complejos, se incubó un plásmido superenrollado de pUC18 ADN con diferentes concentraciones de 7 y 8 en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) a 37 °C durante 1 hora. Las electroforesis en gel de agarosa se efectuaron según el protocolo general descrito en la sección 1.3.2. de la Introducción general y detallado en la sección experimental de este Capítulo..

Las figuras II.67 y II.68 muestran el resultado de las separaciones por gel de electroforesis del corte del plásmido pUC18 inducido por los complejos 7 y 8, respectivamente.

Los respectivos ligandos, H₂V y H₃diV, no son capaces de cortar el ADN por sí mismos ni en ausencia ni en presencia de activante (ensayos no mostrados). Asimismo, ninguno de los dos compuestos presenta actividad nucleasa si no se adiciona agente reductor (ensayos no mostrados).

Como se observa en la figura II.67, a partir de concentraciones 15 µM y *con sólo* 1x ascorbato (carrera 11) el complejo 7 empieza a cortar significativamente el ADN superenrollado (SC), con generación de ADN circular (N) y algo de lineal (L) (nótese que se aprecia forma lineal aunque aún quedan cantidades importantes de forma superenrollada). A partir de 20 µM (con 1x ascorbato) se produce la casi total conversión de la forma SC en N+L (carrera 12).

Los ensayos se repitieron con las mismas concentraciones de complejo pero añadiendo mayor proporción de agente activante (5x ascorbato). Con estas cantidades el patrón de rotura es similar; a concentraciones 15 y 20 µM ya se observa la formación de una considerable cantidad de ADN lineal si bien no llega a desaparecer completamente la forma superenrollada (carreras 15 y 16). Este tipo de corte (i.e.: coexistencia de las tres formas SC, N y L) sugiere una cierta *especificidad* de corte por determinadas regiones del plásmido.^{51,173}

La comparación con la sal de cobre indica que a concentraciones equimolares el complejo **7** es mucho más activo que el Cu(II) (carreras 3 y 12, 6 y 16). Si comparamos concentraciones equivalentes de Cu(II), la sal de Cu(II) produce corte comparable al de **7** pero sin mostrar la *especificidad* a que hemos aludido anteriormente (carreras 5 y 12, 8 y 16).

En conclusión, el compuesto **7** es una eficiente nucleasa, presumiblemente por mecanismo oxidativo porque requiere la adición de ascorbato para su actividad. Su mecanismo de acción se estudia en el siguiente apartado.

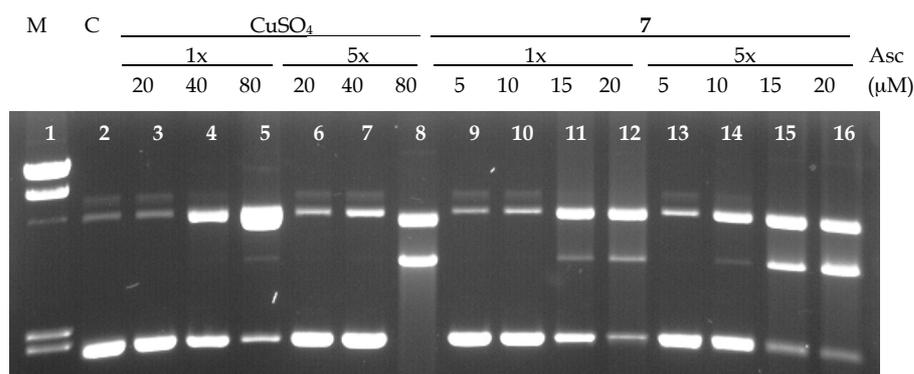


Figura II.67. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN ($37,5 \mu\text{M}$) producido por CuSO₄ y el compuesto **7**, en presencia de ascorbato (1x y 5x de exceso), incubado en tampón cacodilato ($0,1 \text{ M}$, $\text{pH} = 6,0$) durante 1 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. M corresponde al marcador y C corresponde al control de ADN.

En todos los estudios de actividad nucleasa descritos en este Capítulo los compuestos se ensayan a concentraciones variables, con una concentración fija de agente activante que se ha optimizado previamente.

Sin embargo, en el estudio de actividad nucleasa del compuesto **8** que se va a describir a continuación, los ensayos se han realizado con una concentración fija de complejo y cantidades variables de reductor. Esto se debe a que concentraciones de **8** $\geq 15 \mu\text{M}$ producen retención del SC ADN en los pocillos del gel y, por tanto, se impide la migración completa del ADN. Para evitar este problema solamente se han realizado ensayos con concentraciones de 5 y $10 \mu\text{M}$.

La figura II.68 revela que a concentraciones *tan bajas* como 5 μM (con 12x ascorbato) el compuesto **8** empieza a cortar significativamente el SC ADN con generación de formas circular y lineal (carrera 6). A partir de 10 μM (con 24x ascorbato) todo el ADN superenrollado inicial ha sido degradado por la nucleasa (carrera 13). Además, el estudio con diferentes excesos de agente activante indica que a partir de cantidades comprendidas entre 12x-18x de ascorbato el grado de corte es ya independiente de la cantidad de reductor (i.e.: se produce una saturación).

Por otra parte, la comparación con la sal de cobre indica que la actividad del complejo es claramente mayor a la de cantidades equimolares de la sal de cobre (comparar carreras 3 y 9, 4 y 14), aunque no se produce efecto cooperativo (carreras 4 y 5).

Como se observaba para el compuesto **7**, la figura II.68 muestra la coexistencia de las tres formas SC, N y L en una misma carrera, sugiriendo así que **8** también debe poseer cierta especificidad en sus propiedades nucleolíticas.

Como conclusión, el compuesto **8** es una potente nucleasa y actúa presumiblemente por mecanismo oxidativo.

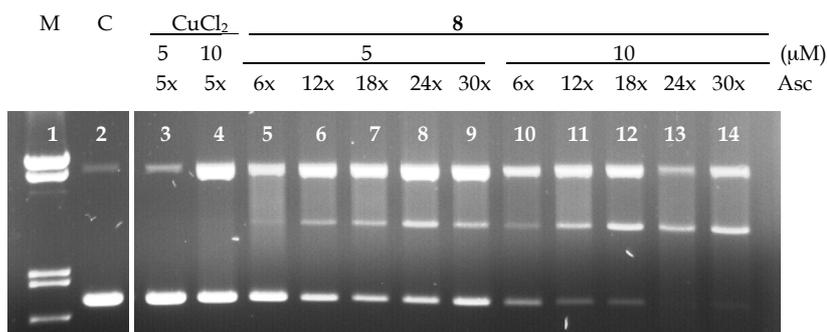


Figura II.68. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN (37,5 μM) producido por CuCl₂ y el compuesto **8**, en presencia de ascorbato (5x, 6x, 12x, 18x, 24x y 30x de exceso), incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) durante 1 h a 37 °C. M corresponde al marcador y C corresponde al control de ADN.

II.E.5.2 Ensayo sobre la influencia de agentes inhibidores en la actividad

El requerimiento de agente reductor por los compuestos **7** y **8** para presentar actividad nucleasa sugiere que el mecanismo de corte debe ser de naturaleza oxidativa. Con objeto de profundizar sobre este mecanismo oxidativo se realizaron ensayos de inhibición con especies captadoras de ROS (*reactive oxygen species*). También se investigaron las propiedades nucleolíticas de **7** y **8** en presencia de agentes de unión a los surcos. El procedimiento experimental se explica en el punto V de la sección 1.3.2. de la Introducción general y se detalla en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran en las figuras II.69 y II.70 para **7** y **8**, respectivamente. Según la figura II.69 la adición de formiato sódico (captador de $\cdot\text{OH}$) inhibe parcialmente, y la azida sódica (captador de $^1\text{O}_2$) completamente, la actividad de **7**. Sin embargo, el DMSO (otro captador de $\cdot\text{OH}$) y la 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (otro captador de $^1\text{O}_2$), no inhiben en absoluto el corte de **7**. En el caso del compuesto **8** (figura II.70) los resultados son análogos si bien se puede considerar que el formiato sódico no inhibe la actividad de **8**. Es decir, los ensayos con inhibidores dan resultados contradictorios y, por tanto, no pueden considerarse informativos sobre las especies implicadas en el proceso.

Por lo que respecta al estudio con los agentes afines a los surcos, Hoechst 33258 (surco menor) y verde de metilo (surco mayor), los resultados sí son esclarecedores. Ninguno de los dos agentes produce disminución significativa del corte, ni en el caso de **7** ni en el caso de **8** (carreras 8 y 9 en ambas electroforesis). Estos ensayos, junto con los estudios de interacción anteriormente descritos, permiten concluir que tanto **7** como **8** se unen al ADN mediante interacciones electrostáticas *externas*.

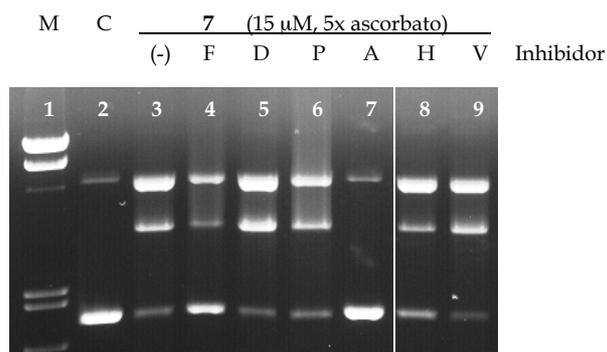


Figura II.69. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) producido por el compuesto 7 (15 μ M) en presencia de distintos agentes, incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) durante 1 h a 37 °C. M = marcador; C = control pUC18; F = formiato sódico (0,5 mM); D = DMSO; P = 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; A = azida sódica; H = Hoechst 33258; V = verde de metilo.

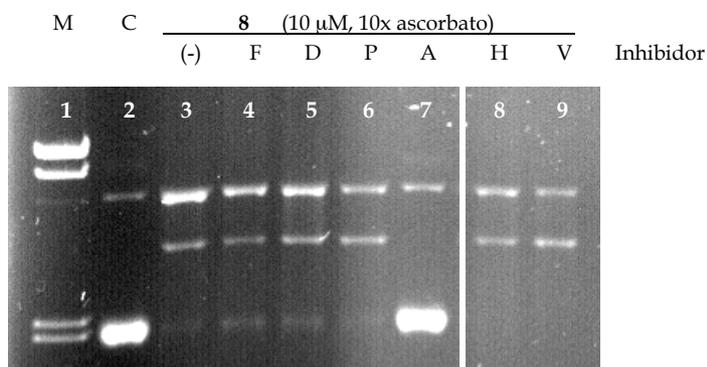


Figura II.70. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) producido por el compuesto 8 (10 μ M) en presencia de distintos agentes, incubado en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) durante 1 h a 37 °C. M = marcador; C = control pUC18; F = formiato sódico (0,5 mM); D = DMSO; P = 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; A = azida sódica; H = Hoechst 33258; V = verde de metilo.

II.E.5.3 Estudio cinético

Con objeto de completar la información anterior sobre las propiedades nucleolíticas de los compuestos **7** y **8**, se realizó un estudio cinético siguiendo el protocolo general descrito en el punto VII de la sección 1.3.2. de la introducción general de esta *Tesis Doctoral* y detallado en la sección experimental de este Capítulo.

Para ello se incubó con pUC18 a tiempos variables una determinada concentración de complejo y de reductor (ascorbato), elegidas cuidadosamente para producir un corte gradual. Las figuras II.71 y II.72 muestran las electroforesis obtenidas para los compuestos **7** y **8**, junto con el gráfico que incluye la cuantificación de las distintas formas. En ambos casos la desaparición de la forma superenrollada sigue una cinética de *pseudo*-primer orden que puede ajustarse al modelo cinético propuesto por Cowan y col. para obtener la constante de velocidad:¹⁵⁷

$$S = S_0 \cdot e^{(-k_{\text{obs}} t)} \quad (\text{ec. II.6})$$

donde S_0 y S corresponden a la cantidad de forma superenrollada inicial y de forma superenrollada a un tiempo t , respectivamente, y k_{obs} es la constante velocidad de *pseudo*-primer orden o constante de velocidad aparente (generalmente expresada en min^{-1}).

Se obtuvieron así las correspondientes constantes de velocidad aparente: $k_{\text{obs}} \approx 0,011 \text{min}^{-1}$ ($R^2 = 0,978$) (**7**) y $k_{\text{obs}} \approx 0,033 \text{min}^{-1}$ ($R^2 = 0,974$) (**8**), que corresponden a un tiempo de vida media de la forma superenrollada de: $t_{1/2} \approx 30 \text{min}$ (**7**) y $t_{1/2} \approx 10 \text{min}$ (**8**). Estos valores, comparados con los obtenidos aquí para el compuesto tetranuclear $[\text{Cu}_4(\text{atc})_2(\text{dien})_4(\text{ClO}_4)_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (**6**) [$k_{\text{obs}} \approx 0,126 \text{min}^{-1}$, $t_{1/2} \approx 5 \text{min}$], se pueden considerar bajos. Por tanto, podemos concluir que los compuestos **7** y **8** son nucleasas potentes pero con una cinética de corte lenta.

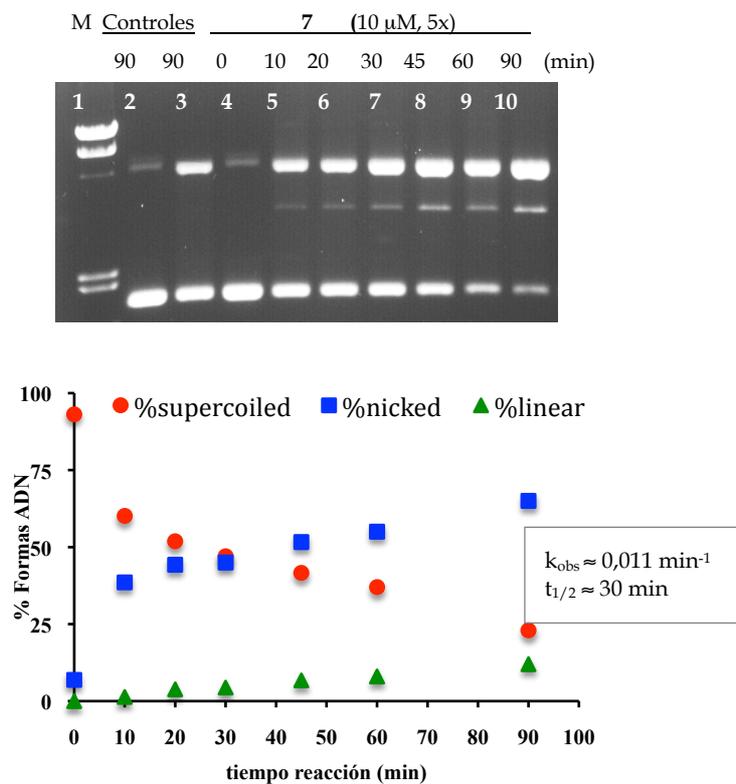


Figura II.71. Cinética de corte del pUC18 (37,5 μ M) promovido por el compuesto 7 (10 μ M), incubado en tampón cacodilato (0,1M, pH = 6,0) durante 90 min a 37 °C. (**Arriba**) electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los productos de reacción a diferentes tiempos; carreras 1-3: Marcador; ADN pUC18 y ADN pUC18 + ascorbato. (**Abajo**) variación de la concentración en función del tiempo de las formas superenrollada (●) circular (■) y lineal (▲); (**cuadro insertado**) ajuste lineal de los datos.

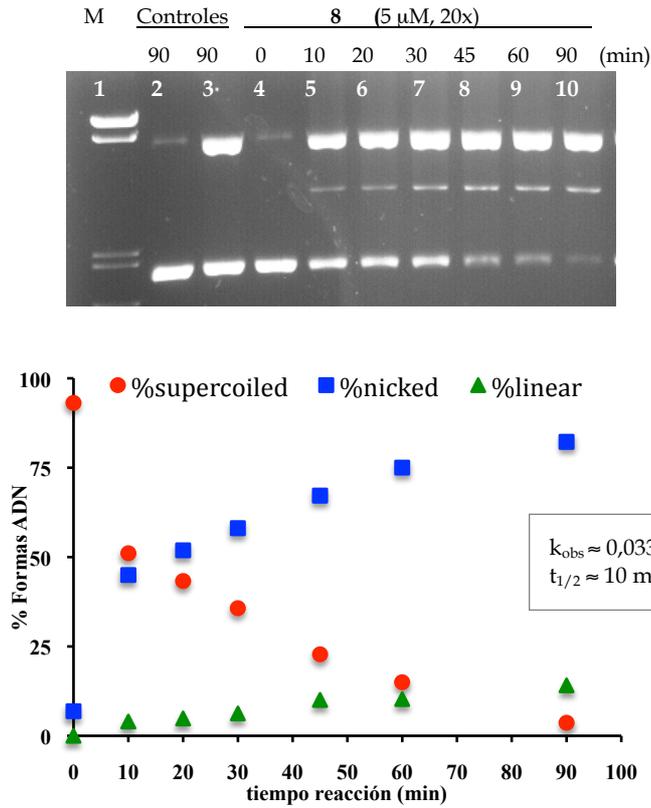


Figura II.72. Cinética de corte del pUC18 (37,5 μM) promovido por el compuesto **8** (5 μM), incubado en tampón cacodilato (0,1M, pH = 6,0) durante 90 min a 37 °C. (**Arriba**) electroforesis en gel de agarosa (0,8%) de los productos de reacción a diferentes tiempos; carreras 1-3: Marcador; ADN pUC18 y ADN pUC18 + ascorbato. (**Abajo**) variación de la concentración en función del tiempo de las formas superenrollada (●) circular (■) y lineal (▲); (**cuadro insertado**) ajuste lineal de los datos.

II.E.6 Conclusiones – Discusión

Las conclusiones del estudio inorgánico y bioinorgánico de los compuestos **7** y **8** se resumen a continuación:

1. Los ligandos poli-quelantes **H₂V** y **H₃diV** (sintetizados en el Capítulo I) han permitido aislar dos nuevos compuestos de Cu(II) con inusual nuclearidad: el polímero ternario $\{[\text{Cu}_4(\text{HV})_2(\text{picolinato})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6] (\text{NO}_3)_n\}_n$ (**7**) y el compuesto binario $[\text{Cu}_6(\text{HdiV})_2(\text{ClO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{14}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (**8**).

2. La estructura cristalina de **7** está formada por cadenas de unidades *tetraméricas* (formadas a su vez por pares de dímeros) unidas por puentes nitrato. Cada tetrámero contiene dos ligandos **HV**- bis-quelantes y dos ligandos picolinato. Los dos cobres de la entidad dimérica presentan un acoplamiento antiferromagnético muy débil.

3. La estructura cristalina de **8** contiene un clúster Cu_6 único, de tipo “1+1+2+1+1”. En la unidad *hexanuclear* los seis iones Cu(II) se encuentran enlazados por dos ligandos **HdiV**²⁻ tetra-quelantes. Por lo que se refiere a las propiedades magnéticas, el compuesto presenta dos tipos de centros Cu(II) y dos constantes de acoplamiento antiferromagnético claramente distinguibles, $J_1 = -113,2(3) \text{ cm}^{-1}$ y $J_2 = -17,1(1) \text{ cm}^{-1}$.

4. La adecuada solubilidad de ambos compuestos en agua ha permitido realizar los estudios biológicos en tampón acuoso. Los estudios de interacción indican que ninguno de los dos compuestos intercala en el ADN, si bien producen una estabilización significativa de la doble hebra en el ensayo de ΔT_m (8 °C para **7**, 15 °C para **8**) y exhiben valores altos de K_{app} en los ensayos de fluorescencia ($6,4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ para **7**, $1,3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ para **8**). Por tanto, se puede considerar que tienen gran afinidad por el ADN, en virtud de atracciones electrostáticas, presumiblemente favorecidas por la presencia de múltiples centros con carga positiva.

5. Los estudios de degradación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa indican que ambos compuestos son potentes nucleasas oxidativas, ya que a concentraciones 15 μM (7) y 10 μM (8), en presencia de un ligero exceso de ascorbato, son capaces de degradar casi completamente la forma superenrollada a formas circular y lineal. La coexistencia de las tres formas SC, N y L sugiere una cierta especificidad en el corte. La cinética de corte es más lenta que la observada para el compuesto tetranuclear 6.

La clave de la buena actividad de estas dos especies polinucleares puede residir en la presencia simultánea de varios centros de Cu(II), si bien no se observa fenómeno cooperativo entre ellos.

CONCLUSIONES CAPÍTULO II

En la tabla II.20 se resumen los resultados de interacción y de estudio de la actividad nucleasa de los compuestos de Cu(II) con derivados triazólicos que constituyen el objeto de este Capítulo. Del análisis conjunto se extraen las siguientes conclusiones:

1. Los ligandos se sintetizaron a partir del anillo *triazol* con objeto de obtener especies polinucleares, y con sustituyentes *aromáticos* (fenilo o naftilo) con el fin de favorecer la intercalación. Se obtuvieron con estos ligandos los compuestos de Cu(II) **1-8**. De entre todos ellos, sólo **2** y **5** intercalan en la doble hebra de ADN. En el caso de **5** la intercalación se explica por la presencia de grupos naftaleno. El compuesto **4** también contiene grupos naftaleno, pero la disposición de éstos (es un monómero) provoca impedimento estérico y el compuesto no intercala. Por otro lado, el compuesto **3** contiene también grupos naftaleno pero la insolubilidad resultante es tal que el compuesto no puede ensayarse en tampón acuoso. En el caso del compuesto **2**, análogo a **3** pero con grupos fenilo, el compuesto resulta moderadamente soluble, la estructura en conjunto es relativamente planar, y los grupos aromáticos están suficientemente alejados del centro metálico, por lo que el compuesto intercala.

2. Con objeto de subsanar los problemas de solubilidad se prepararon, en una segunda etapa, ligandos con anillo *triazol* y sustituyentes *heteroaromáticos* (grupos piridina) que aportaran mayor polaridad al sistema. Los compuestos de Cu(II) que se obtuvieron en este caso no son "los análogos a los anteriores pero más solubles", como se pretendía, sino compuestos más solubles pero de mayor nuclearidad. Al estar los grupos aromáticos enlazados al centro metálico el conjunto no intercala pero, en cambio, aumenta su afinidad por el ADN debido a atracciones electrostáticas. Así, el compuesto hexanuclear **8** presenta, en conjunto, una extraordinaria afinidad por el ADN, comparable a la del Hoechst 33258.

3. El análisis de la tabla también revela que no existe una correlación directa entre el valor de ΔT_m y K_{app} . Los compuestos con el mayor ΔT_m no presentan los valores más altos de K_{app} , y viceversa, si bien el compuesto **8** y el Hoechst 33258 presentan valores elevados de ambos parámetros.

4. Todos los compuestos aquí descritos requieren activación externa (reductor) para manifestar propiedades de nucleasa, es decir, actúan por mecanismo oxidativo, como se ha confirmado mediante los correspondientes estudios de inhibición con los captadores de ROS.

5. En la serie de compuestos estudiados, al aumentar la nuclearidad aumenta, de forma general, la afinidad por el ADN y la eficiencia como nucleasa, entendiéndose por ello que el compuesto requiere menor concentración y/o menor cantidad de activante para degradar el 90% de la forma superenrollada del pUC18 a forma circular más forma lineal.

Tras estos resultados se plantearon varias estrategias para conseguir sistemas más activos:

(i) preparación de compuestos con nuevos ligandos, con anillos triazol y sustituyentes heteroaromáticos pero con el heteroátomo en posición tal que evite la quelación del metal para forzar otro tipo de interacción con el ADN (i.e.: intercalación);

(ii) ensayos con sistemas ternarios que combinen un ligando triazol con un ligando intercalante como la 1,10-fenantrolina;

(iii) activación de la nucleasa mediante otro sistema distinto al agente químico, como la fotoactivación y/o la activación por *quantum dots*).

En los próximos Capítulos se describirán nuestros resultados con las estrategias (ii) y (iii).

Tabla II.20. Resultados experimentales de los ensayos de interacción con el ADN y de corte para los compuestos de este Capítulo.

Compuesto	Nuclearidad	Viscosimetría ^a (η/η_0) ^{1/3}	ΔT_m ^b (°C)	$K_{app}(M^{-1})^c$	[C] ₉₀ ^d (μM)	Ref. / Capt.
[Cu(H ₂ P) ₂ (ClO ₄) ₂] (1)	mononuclear	1,00	9,6	3,1×10 ⁶	40 (25x, Asc/H ₂ O ₂)	II.B
[Cu(diQ)(ClO ₄) ₂ ·2CH ₃ OH] (2)	dinuclear	1,12	<i>e</i>	1,6×10 ⁶	30 (300x, Asc/H ₂ O ₂)	II.B
[Cu(diO)(NO ₃) ₂ ·2DMSO] (3)	dinuclear	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	II.B
[Cu(N) ₄ (NO ₃) ₂]·4CH ₃ OH (4)	mononuclear	1,02	≈3	2,2×10 ⁷	25 (300x, Asc/H ₂ O ₂)	II.C
[Cu(M)(μ -OAc) ₂] ₂ ·2(M) (5)	dinuclear	1,16	16	2,5×10 ⁷	20 (25x, Asc)	II.C
[Cu ₄ (atc) ₂ (dien) ₄ (ClO ₄) ₂](ClO ₄) ₂ ·2H ₂ O (6)	tetranuclear	1,06	18	6,2×10 ⁶	20 (2,5x, Asc)	II.D
{[Cu ₄ (HV) ₂ (picolinato) ₂ (NO ₃) ₃ (H ₂ O) ₆](NO ₃) _n } _n (7)	tetranuclear	1,05	8	6,4×10 ⁷	15 (5x, Asc)	II.E
[Cu ₆ (HdiV) ₂ (ClO ₄) ₆ (H ₂ O) ₁₄](ClO ₄) ₂ ·10H ₂ O (8)	hexanuclear	1,02	15	1,3×10 ⁸	10 (12x, Asc)	II.E

^a CT ADN, (η/η_0)^{1/3} valor para: [compuesto] / [CT-ADN] = 0,1

^b CT ADN, excepto * con poli(dA) poli(dT)

^c obtenido a partir de la ecuación: $K_{EB} [EB] = [C_{50}] K_{app}$

^d condiciones para degradar el 90% de la forma SC ADN

^e dato no disponibles debido a problemas de solubilidad

^f dato no disponible en la bibliografía

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales y Reactivos

Los ligandos **H₂P**, **H₃diQ**, **H₃diO**, **N**, **M**, **H₂V** y **H₃diV** fueron sintetizados tal y como se ha detallado en el Capítulo I de la presente Tesis Doctoral. El ligando **H₂atc**, utilizado en el apartado II.D, fue suministrado por Panreac (Panreac Química S.A.U., Barcelona, España).

El resto de reactivos químicos utilizados eran de alto grado de calidad, y fueron comprados de casas comerciales y usados tal y como se recibieron. *Reactivos biológicos*: Plásmido pUC18 (0,5 µg/µL, 1500 µM en nucleótidos) en TE (Tris 10 mM and EDTA 1 mM, pH = 8,0) comprado a Fermentas o Plásmido pUC18 (0,25 µg/µL, 750 µM en nucleótidos) en TE (Tris 10 mM and EDTA 1 mM, pH = 8,0) suministrado por Roche. Calf Thymus (CT-DNA), tipo XV, fue obtenido de Sigma.

Instrumentos y Métodos

El porcentaje de C, H y N fue determinado con un analizador elemental CE Instrument EA modelo 1110 CHNS del S.C.S.I.E de la Universidad de València. Los espectros infrarrojos se obtuvieron en los espectrofotómetros Mattson Satellite FTIR y Perkin-Elmer FTIR en la región entre 4.000 y 400 cm⁻¹. Como diluyente para preparar las muestras, en forma de pastilla, se ha utilizado KBr. Los espectros UV-vis en disolución se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV-vis Agilent 8453, los espectros UV-vis en sólido con un espectrofotómetro T90 Plus equipado con una esfera de integración IS19-1. Los espectros de masas del complejo mediante la técnica de Electrospray en modo positivo (ESI⁺) se realizaron en el S.C.S.I.E de la Universidad de València. Para los espectros de baja resolución ESI-MS se utilizó un equipo Bruker Esquire 3000 plus LC-MS, mientras que para los espectros de alta resolución ESI-MS un equipo ABS Giex Triple TOF 5600. Las muestras fueron disueltas en el mismo medio en el cual se realizaron las pruebas bioinorgánicas. Las medidas de susceptibilidad magnética con variación de temperatura se realizaron sobre monocristales triturados usando un susceptómetro Quantum Interference Design (SQUID) en el rango de temperatura 1,9-400 K. Las correcciones diamagnéticas de los átomos se estimaron a partir de las constantes de Pascal. Los espectros de resonancia paramagnética electrónica se realizaron en un espectrómetro Bruker ELEXSYS operando en la banda-X (frecuencia: 9,5 GHz, longitud de onda: 3,2 cm, campo H₀: 3.400 Gauss) en el rango de temperaturas de 10-300 K. Los espectros de resonancia paramagnética electrónica se realizaron en un espectrómetro Bruker ELEXSYS operando en la banda-X (frecuencia: 9,5 GHz, longitud de onda: 3,2 cm, campo H₀: 3.400 Gauss) en el rango de temperaturas de 10-300 K. Los monocristales de los complejos **1** y **2** han sido medidos en un difractómetro Nonius Kappa-CCD, en la Universitat de València. El monocristal **3** ha sido medido con un difractómetro Oxford Diffraction XCALIBURE, en la Universidad T.U., Braunschweig (Alemania). Los monocristales **4-8** han sido medidos con un difractómetro Bruker X8 KappaAPEXII, en

la Universidad de Santiago de Compostela. Los detalles de la toma de datos y refinamiento de las estructuras se indican en el Anexo.

Técnicas para el estudio de la interacción de los complejos con el ADN

Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente. Se utilizó el bromuro de etidio (EB) como referencia para determinar las propiedades de unión al ADN (Calf-Thymus ADN Tipo XV, CT ADN) de los complejos **1**, **2**, y **4-8**. Se prepararon distintas disoluciones DNA-Complejo-EB (volumen final de 3 mL), que contenían distintas concentraciones de complejo (0, 10, 20, 30, 40 y 50 μM) y donde la concentración de EB y de CT DNA era de 50 μM en tampón acuoso [los compuestos **1**, **4** y **5** en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0) conteniendo un 5% DMF, los compuestos **6**, **7** y **8** en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0), y el complejo **2** en 25% tampón PIPES 5 mM + 15% DMF + 60% H₂O]. Los espectros de emisión se registraron entre 530-670 nm y la longitud de onda de excitación se estableció en 500 nm. Los resultados se presentan en forma de gráficos de Stern-Volmer, donde se representa el cociente de I_0/I_F frente a la concentración de complejo (donde I_0 es el máximo de intensidad de emisión en ausencia de complejo e I_F es el máximo de intensidad de emisión para cada una de las disoluciones que contienen complejo).

Además, para los complejos **4**, **5** y **6** se realizaron estudios de desplazamiento competitivos. Los experimentos consistieron en la adición de alícuotas de los diferentes complejos en una disolución 3 μM CT-DNA ($\epsilon_{260} = 13,200 \text{ M}(\text{bp})^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 3,78 μM EB en tampón acuoso [los compuestos **4** y **5** en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) conteniendo un 5% DMF, y el compuesto **6** en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0)] hasta que la fluorescencia inicial disminuyó al 50 %. Las disoluciones stock de los complejos fueron preparados en el mismo tampón a una concentración 0,5 mM. Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron a 500 y 595 nm, respectivamente. Las constantes de unión aparentes se calcularon a partir de la ecuación:

$$K_{\text{app}} = K_{\text{EB}} \times (3.78/C_{50})$$

En donde $K_{\text{EB}} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Este valor de K_{EB} (a pH = 6,0) se calculó mediante el procedimiento descrito en la bibliografía.^{78,152}

Temperatura de fusión del ADN

Los experimentos para determinar la temperatura de fusión del DNA (temperatura a la cual el 50% de la molécula de DNA está desnaturalizada, T_m), se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-vis Agilent 8453 equipado con un regulador de temperatura Peltier Agilent 89090A.

Para determinar la temperatura de fusión del DNA se registraron los espectros de absorción entre 210 y 1000 nm de muestras que contenían CT-DNA (100 μM) en ausencia o presencia de los compuestos **1**, **4-8** (se usaron diferentes proporciones [CT-

DNA]/[complejo] en cada caso. Para los compuestos **1** y **4** la relación fue de 4; para el compuesto **5** de 5; para el compuesto **6** de 2, 4 y 8; para el compuesto **7** de 4 y 8; y para el compuesto **8** de 4 y 8) en tampón fosfato 1mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2). Los parámetros se programaron para obtener una medida de absorbancia tras el aumento de 1° C en el intervalo de temperatura de 25-90° C.

Los resultados aparecen en forma de gráfico que representa la absorbancia relativa (260 nm) frente a la temperatura. El valor de T_m es calculado por el software del ordenador.

Viscosimetría

Las medidas de viscosidad se realizaron a 25 °C utilizando un viscosímetro Ubbelodhe semi-micro sumergido en un baño termostatzado Julabo ME16G.

Se prepararon disoluciones de 4 mL que contenían distintas concentraciones de los complejos **1**, **2**, y **4-8** (0, 1, 3, 5, 7 y 10 μ M) y una concentración de CT DNA fijada a 50 μ M en tampón acuoso [los compuestos **1**, **4** y **5** en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0) conteniendo un 5% DMF, los compuestos **6**, **7** y **8** en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0), y el complejo **2** en 25% tampón PIPES 5 mM + 15% DMF + 60% H₂O]. Los tiempos de elución se tomaron por triplicado para cada una de las disoluciones preparadas. Los valores de viscosidad se calcularon a partir de la expresión $\eta = t - t_b$, donde t es el tiempo de elución para cada una de las disoluciones preparadas y t_b es el tiempo de elución del tampón. Los resultados se representan en una gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ frente al cociente de la concentración de complejo y la concentración de CT DNA (η es la viscosidad de la disolución de CT DNA- complejo, y η_0 es la viscosidad de la disolución de CT DNA, en ausencia de complejo).

Técnicas para el estudio de la actividad nucleasa

Electroforesis en gel de agarosa

A lo largo del presente Capítulo se ha recogido el estudio de actividad nucleasa de los compuesto **1**, **2**, y **4-8**. En todos los casos, la habilidad de corte de los complejos se examinó mediante la conversión de pUC18 ADN superenrollado (Forma I) en las formas circular (Forma II) y lineal (Forma III) usando la técnica de electroforesis en gel de agarosa para separar los diferentes productos de corte. Las disoluciones de los complejos de cobre(II) fueron preparadas antes de cada ensayo y mediante la disolución del producto cristalino en el tampón biológico empleado.

Procedimiento general para determinar la actividad nucleasa

Las disoluciones madre del agentes activante (ascorbato sódico y/o H₂O₂) fueron preparadas antes de cada ensayo.

El protocolo general de los ensayos consistió en incubar durante 60 minutos a 37 °C, una mezcla de 20 μ L de volumen final constituida por: 7 μ L de tampón acuoso, 6 μ L de complejo o de sal de Cu(II) (para obtener las concentraciones finales deseadas), 6

μL de agente reductor a una concentración en exceso respecto a la concentración relativa de cobre y 0,5 μL de ADN pUC18 (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM nucleótidos, Fermentas) o 1 μL de ADN pUC18 (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 750 μM nucleótidos, Roche). En concreto tanto las concentraciones de complejo, como las de agente reductor como el tampón utilizado para cada caso concreto se resumen a continuación:

- 15-40 μM complejo 1 + 25x ascorbato/ H_2O_2 en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0) conteniendo un 5% DMF.
- 20-35 μM complejo 2 + 300x ascorbato/ H_2O_2 en tampón PIPES 5 mM + 15% DMF + 60% H_2O .
- 20-30 μM complejo 4 + 300x ascorbato/ H_2O_2 en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0) conteniendo un 5% DMF.
- 15-30 μM complejo 5 + 25x ascorbato en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0) conteniendo un 5% DMF.
- 5-40 μM complejo 6 + 2,5x ascorbato en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0).
- 5-20 μM complejo 7 + 1x y 5x ascorbato en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0).
- 5-10 μM complejo 8 + 6x, 12x, 18x, 24x y 30x ascorbato en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0).

Después de la incubación, la reacción se detuvo mediante la adición de una disolución (tampón de carga, 4 μL) compuesta de azul de bromofenol (0,25%), xilencianol (0,25%), glicerol (30%), y EDTA (250 mM). A continuación, las muestras se cargaron en un gel de agarosa (0,8 %) en tampón TBE 0,5x (0,045 M Tris, 0,045 M ácido bórico y 1 mM EDTA) que contenía una concentración de 2 $\mu\text{L}/100$ mL de una disolución madre de bromuro de etidio de (10 mg/mL). Las muestras se separaron en el gel tras aplicar una corriente de 120 V durante 2 h. Las bandas se fotografiaron mediante una cámara UVIDoc HD2 (UVItec Cambridge).

Las proporciones relativas de las diferentes formas del plásmido fueron cuantificadas mediante el programa ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Un factor de corrección de 1,31 fue utilizado para compensar la menor afinidad de la forma I por el bromuro de etidio. La proporción de cada ADN fue calculada dividiendo la intensidad de cada banda por el total de las intensidades de todas las bandas en una misma carrera.⁵¹

Procedimiento general para determinar el mecanismo de acción de los complejos

Los estudios de mecanismo se realizaron para los compuestos 4-8.

El procedimiento general consiste en incubar durante 60 minutos a 37 °C una mezcla de 20 μL que contiene: 1 μL plásmido pUC18, 6 μL de complejo, 6 μL de agente reductor (en las concentraciones que presenta actividad nucleasa), y un volumen de agente inhibidor para que las concentraciones finales sean: 2,2,6,6-tetrametil-4-

piperidona 0.4 M, ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencendisulfónico (Tiron) 10 mM, yoduro potásico 0.4 M, Formiato sódico 0,4 M, azidas sódica 0,4M. También se ensayo la inhibición en presencia de neocuproína [a una concentración 4x exceso a la equivalente de Cu(II)], un quelante de Cu(I) y de verde de metilo 1.25 µg/mL, un agente del surco mayor, y de distamicina A (12 µM) o Hoechst 33258 (5 µM), un agente del surco menor. Posteriormente a la incubación, las muestras fueron tratadas como en la determinación de la actividad nucleasa.

Para el compuesto **6** además, se investigó la contribución de las interacciones electroestáticas en el corte de ADN. Los ensayos se realizaron como se describe en la determinación de la actividad nucleasa pero en presencia de fuerza iónica en el medio de reacción. Se prepararon muestras con un incremento en la concentración de NaCl de 0 a 400 mM.

Procedimiento general para establecer la cinética de reacción de los complejos

Para los compuestos con mayor actividad nucleasa, **6-8**, se realizó un estudio cinético del corte de ADN. Las muestras de reacción fueron incubadas según se ha detallado anteriormente y detenidas a cada uno de los tiempos deseados mediante la adición de tampón de carga y posterior incubación en hielo. Las condiciones utilizadas en cada caso fueron las siguientes:

- Para el complejo **6**: 5 µM complejo más 10x Ascorbato.
- Para el complejo **7**: 10 µM complejo más 5x Ascorbato.
- Para el complejo **8**: 5 µM complejo más 20x Ascorbato.

Los datos fueron ajustados a una reacción de primer orden definida por la ecuación que se presenta a continuación, donde S corresponde a la concentración de la forma superenrollada a un t determinado, S₀ corresponde a la concentración inicial y *k_{obs}* corresponde a la constante observada de primer orden de la ruptura de ADN de la forma I a la forma II. La constante observada fue expresada en min⁻¹.

$$S = S_0 \exp(-k_{obs} t)$$

Todos los resultados aquí presentados se han realizado como mínimo por triplicado.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Haasnoot, J. G. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200-202, 131.
- (2) Klingele, M.; Brooker, S. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, 241, 119.
- (3) Aromí, G.; Barrios, L. A.; Roubeau, O.; Gamez, P. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, 255, 485.
- (4) Yang, E.-C.; Liu, Z.-Y.; Shi, X.-J.; Liang, Q.-Q.; Zhao, X.-J. *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 7969.
- (5) Yang, E.-C.; Yang, Y.-L.; Liu, Z.-Y.; Liu, K.-S.; Wu, X.-Y.; Zhao, X.-J. *CrystEngComm* **2011**, 13, 2667.
- (6) Seo, J.; Whang, D.; Lee, H.; Jun, S.; Oh, J.; Jeon, Y.; Kim, K. *Nature* **2000**, 404, 982.
- (7) Ouellette, W.; Yu, M. H.; O'Connor, C. J.; Hagrman, D.; Zubieta, J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 3497.
- (8) Ouellette, W.; Prosvirin, A. V.; Chieffo, V.; Dunbar, K. R.; Hudson, B.; Zubieta, J. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 9346.
- (9) Ding, B.; Yi, L.; Cheng, P.; Liao, D.-Z.; Yan, S.-P. *Inorg. Chem.* **2006**, 45, 5799.
- (10) Li, J.-R.; Yu, Q.; Sañudo, E. C.; Tao, Y.; Bu, X.-H. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 2602.
- (11) Garcia, Y.; Bravic, G.; Gieck, C.; Chasseau, D.; Tremel, W.; Gülich, P. *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 9723.
- (12) Legrand, V.; Pillet, S.; Souhassou, M.; Lugan, N.; Lecomte, C. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 13921.
- (13) Liu, Y.-Y.; Huang, Y.-Q.; Shi, W.; Cheng, P.; Liao, D.-Z.; Yan, S.-P. *Cryst. Growth Des.* **2007**, 7, 1483.
- (14) Wang, X.-Y.; Wang, L.; Wang, Z.-M.; Su, G.; Gao, S. *Chem. Mater.* **2005**, 17, 6369.
- (15) Li, D.-D.; Tian, J.-L.; Gu, W.; Liu, X.; Yan, S.-P. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, 104, 171.
- (16) Dallavalle, F.; Gaccioli, F.; Franchi-Gazzola, R.; Lanfranchi, M.; Marchiò, L.; Pellinghelli, M. A.; Tegoni, M. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, 92, 95.
- (17) Ferrer, S.; Ballesteros, R.; Sambartolomé, A.; González, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Liu, M. *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 1436.
- (18) Aznar, E. *Proyecto fin de Carrera*; Burjassot (Valencia), Spain, 2005.
- (19) Pogożelski, W. K.; McNeese, T. J.; Tullius, T. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 6428.
- (20) Umezawa, H.; Maeda, K.; Takeuchi, T.; Okami, Y. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **1966**, 19, 200.
- (21) Petering, D. H.; Byrnes, R. W.; Antholine, W. E. *Chem. Biol. Interact.* **1990**, 73, 133.
- (22) Byrnes, R. W.; Templin, J.; Sem, D.; Lyman, S.; Petering, D. H. *Cancer Res.* **1990**, 50, 5275.

- (23) Pitié, M.; Pratviel, G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1018.
- (24) Burger, R. M. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1153.
- (25) Akiyama, Y.; Ma, Q.; Edgar, E.; Laikhter, A.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 9650.
- (26) Ma, Q.; Akiyama, Y.; Xu, Z.; Konishi, K.; Hecht, S. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2013.
- (27) Tu, C.; Shao, Y.; Gan, N.; Xu, Q.; Guo, Z. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 4761.
- (28) Milne, L.; Xu, Y.; Perrin, D. M.; Sigman, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 3136.
- (29) Chen, C. B.; Milne, L.; Landgraf, R.; Perrin, D. M.; Sigman, D. S. *Chembiochem* **2001**, *2*, 735.
- (30) Perrin, D. M.; Chen, C. -h. B.; Xu, Y.; Pearson, L.; Sigman, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5746.
- (31) Sigman, D. S.; Graham, D. R.; Aurora, V. D.; Stern, M.; Mistry, C. H. E. *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 12269.
- (32) Pratviel, G.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1995**, *34*, 746.
- (33) Pogożelski, W. K.; Tullius, T. D. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1089.
- (34) Breen, A. P.; Murphy, J. A. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18*, 1033.
- (35) Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.
- (36) Sigman, D. S. *Acc. Chem. Res.* **1986**, *19*, 180.
- (37) Thederahn, T. B.; Kuwabara, M. D.; Larsen, T. A.; Sigman, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4941.
- (38) Kuwabara, M.; Yoon, C.; Goyne, T.; Thederahn, T.; Sigman, D. S. *Biochemistry* **1986**, *25*, 7401.
- (39) Marshall, L. E.; Graham, D. R.; Reich, K. A.; Sigman, D. S. *Biochemistry* **1981**, *20*, 244.
- (40) Johnson, G. R. A.; Nazhat, N. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 1990.
- (41) Pitié, M.; Sudres, B.; Meunier, B. *Chem. Commun.* **1998**, 2597.
- (42) Pitié, M.; Boldron, C.; Gornitzka, H.; Hemmert, C.; Donnadiou, B.; Meunier, B. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003**, *2003*, 528.
- (43) Jin, Y.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8408.
- (44) Zhang, Q.; Zhang, F.; Wang, W.; Wang, X. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 1344.
- (45) Humphreys, K. J.; Karlin, K. D.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 8055.
- (46) González-Alvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Macías, B.; Castiñeiras, a. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 2992.
- (47) Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 7345, 4565.
- (48) Dhar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8876.

- (49) Patra, A. K.; Dhar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Dalton Trans.* **2005**, 896.
- (50) Patra, A. K.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 233.
- (51) Megens, R. P.; van den Berg, T. a; de Bruijn, a D.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Chemistry* **2009**, *15*, 1723.
- (52) Frau, S.; Bernadou, J.; Meunier, B. *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 222.
- (53) Chen, C. H. B.; Mazumder, A.; Constant, J. F.; Sigman, D. S. *Bioconjug. Chem.* **1993**, *4*, 69.
- (54) Maheswari, P. U.; Roy, S.; den Dulk, H.; Barends, S.; van Wezel, G.; Kozlevcar, B.; Gamez, P.; Reedijk, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 710.
- (55) Ghosh, K.; Kumar, P.; Mohan, V.; Singh, U. P.; Kasiri, S.; Mandal, S. S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3343.
- (56) Slangen, P. M.; van Koningsbruggen, P. J.; Haasnoot, J. G.; Jansen, J.; Gorter, S.; Reedijk, J.; Kooijman, H.; Smeets, W. J. J.; Spek, A. L. *Inorganica Chim. Acta* **1993**, *212*, 289.
- (57) Slangen, P. M.; van Koningsbruggen, P. J.; Goubitz, K.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1121.
- (58) Prins, R.; Birker, P. J. M. W. L.; Haasnoot, J. G.; Verschoor, G. C.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 4128.
- (59) Bencini, A.; Gatteschi, D.; Zanchini, C.; Haasnoot, J. G.; Prins, R.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1985**, *24*, 2812.
- (60) Koomen-Van Oudenniel, W. M. E.; De Graaff, R. A. G.; Haasnoot, J. G.; Prins, R.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1989**, *28*, 1128.
- (61) Fettouhi, M.; Ouahab, L.; Grandjean, D.; Mousdis, G.; Delhaes, P. *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1992**, *48*, 1920.
- (62) Ferrer, S.; van Koningsbruggen, P. J.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Lezama, L.; Arif, A. M.; Miller, J. S. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1999**, 4269.
- (63) Cingi, M. B.; Lanfranchi, M.; Manotti Lanfredi, A. M.; Ferrer, S.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *Inorganica Chim. Acta* **1993**, *209*, 219.
- (64) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*; Wiley.; New York, 1997; p. 5th ed.
- (65) Guedel, H. U.; Stebler, A.; Furrer, A. *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 1021.
- (66) Galván-Tejada, N.; Bernès, S.; Castillo-Blum, S. E.; Nöth, H.; Vicente, R.; Barba-Behrens, N. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 339.
- (67) Pyle, A. M.; Barton, J. K.; Lippard, S. J. *Progress in Inorganic Chemistry*; Wiley, Ed.; New York, 1990; p. 413.
- (68) Banerjee, A. R.; Jaeger, J. A.; Turner, D. H. *Biochemistry* **1993**, *32*, 153.
- (69) Burrows, C. J.; Rokita, S. E. *Acc. Chem. Res.* **1994**, *27*, 295.
- (70) Mahadevan, S.; Palaniandavar, M. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 3927.

- (71) Selvakumar, B.; Rajendiran, V.; Uma Maheswari, P.; Stoeckli-Evans, H.; Palaniandavar, M. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, *100*, 316.
- (72) Lakowicz, J. R.; Weber, G. *Biochemistry* **1973**, *12*, 4171.
- (73) Liu, J.; Zhang, T.; Lu, T.; Qu, L.; Zhou, H.; Zhang, Q.; Ji, L. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 269.
- (74) García-Giménez, J. L. *Tesis Doctoral*; Universita.; Burjassot, 2007.
- (75) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Castiñeiras, A.; Liu-Gonzalez, M.; Borrás, J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7178.
- (76) Liu, J.; Zhang, H.; Chen, C.; Deng, H.; Lu, T.; Ji, L. *Dalt. Trans.* **2003**, 114.
- (77) Dalton, S. R.; Glazier, S.; Leung, B.; Win, S.; Megatuluski, C.; Burgmayer, S. *J. N. J. Biol. Inorg. Chem.* **2008**, *13*, 1133.
- (78) Wilson, W.; Tanious, F.; Fernández-Saiz, M.; Rigl, C. *Drug-DNA Interaction Protocols*; Fox, K. R., Ed.; Human Press: Totowa, NJ, 1997; pp. 219–240.
- (79) Hannon, M. J. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 280.
- (80) Lorente, A.; Fernández, J. *An. Quím.* **2008**, *104*, 280.
- (81) Jiang, Q.; Xiao, N.; Shi, P.; Zhu, Y.; Guo, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1951.
- (82) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 2540.
- (83) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, *48*, 5545.
- (84) Boseggia, E.; Gatos, M.; Lucatello, L.; Mancin, F.; Moro, S.; Palumbo, M.; Sissi, C.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Zagotto, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4543.
- (85) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; González-Alvarez, M.; Liu-González, M.; Castiñeiras, A.; Borrás, J. *J. Inorg. Biochem.* **2009**, *103*, 243.
- (86) Silva, P. P.; Guerra, W.; Silveira, J. N.; Ferreira, A. M. da C.; Bortolotto, T.; Fischer, F. L.; Terenzi, H.; Neves, A.; Pereira-Maia, E. C. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 6414.
- (87) Tseng, T.-S. A.; Burstyn, J. N. *Chem. Commun. (Camb)*. **2008**, 6209.
- (88) Bhat, S. S.; Kumbhar, A. A.; Heptullah, H.; Khan, A. A.; Gobre, V. V.; Gejji, S. P.; Puranik, V. G. *Inorg. Chem.* **2010**, *50*, 545.
- (89) Reisner, E.; Arion, V. B.; Guedes da Silva, M. F. C.; Lichtenecker, R.; Eichinger, A.; Keppler, B. K.; Kukushkin, V. Y.; Pombeiro, A. J. L. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 7083.
- (90) Macías, B.; Villa, M. V.; Sanz, F.; Borrás, J.; González-Alvarez, M.; Alzuet, G. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1441.
- (91) Ramakrishnan, S.; Rajendiran, V.; Palaniandavar, M.; Periasamy, V. S.; Srinag, B. S.; Krishnamurthy, H.; Akbarsha, M. A. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1309.
- (92) Splith, K.; Hu, W.; Schatzschneider, U.; Gust, R.; Ott, I.; Onambele, L. A.; Prokop, A.; Neundorf, I. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1288.

- (93) Ramakrishnan, S.; Shakthipriya, D.; Suresh, E.; Periasamy, V. S.; Akbarsha, M. A.; Palaniandavar, M. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 6458.
- (94) Macías, B.; Villa, M. V.; Gómez, B.; Borrás, J.; Alzuet, G.; González-Alvarez, M.; Castiñeiras, A. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 444.
- (95) Borrás, J.; Alzuet, G.; González-Alvarez, M.; García-Giménez, J. L.; Macías, B.; Liu-González, M. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 822.
- (96) Van den Bos, B. G. *Recl. des Trav. Chim. des Pays-Bas* **1960**, *79*, 836.
- (97) Dzygiel, A.; Masiukiewicz, E.; Rzeszotarska, B. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1383.
- (98) Chernyshev, V. M.; Rakitov, V. A.; Taranushich, V. A.; Blinov, V. V. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2005**, *41*, 1139.
- (99) Chernyshev, V. M.; Gaidukova, G. V.; Zemlyakov, N. D.; Taranushich, V. A. *Russ. J. Appl. Chem.* **2005**, *78*, 776.
- (100) Lansalot-Matras, C.; Bonnette, F.; Mignard, E.; Lavastre, O. *J. Organomet. Chem.* **2008**, *693*, 393.
- (101) Aakeröy, C. B.; Scott, B. M. T.; Smith, M. M.; Urbina, J. F.; Desper, J. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 4052.
- (102) Kahn, O. *Molecular Magnetism*; VCH.; 1993; p. 106.
- (103) Figgis, B. N.; Martin, R. L. *J. Chem. Soc.* **1956**, 3837.
- (104) Gregson, A. K.; Martin, R. L.; Mitra, S. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1971**, *320*, 473.
- (105) Melník, M. *Coord. Chem. Rev.* **1982**, *42*, 259.
- (106) Agterberg, F. P. W.; ProvóKluit, H. A. J.; Driessen, W. L.; Reedijk, J.; Oevering, H.; Buijs, W.; Veldman, N.; Lakin, M. T.; Spek, A. L. *Inorganica Chim. Acta* **1998**, *267*, 183.
- (107) Kögerler, P.; Williams, P. A. M.; Parajón-Costa, B. S.; Baran, E. J.; Lezama, L.; Rojo, T.; Müller, A. *Inorganica Chim. Acta* **1998**, *268*, 239.
- (108) Liu, J. C.; Zhuang, J. C.; You, X. Z.; Xuebao, W. H. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2000**, *16*, 27.
- (109) Liu, Y. Y.; Ding, B.; Huang, Y. Q.; Wang, H. S.; Cheng, P.; Xuebao, W. H. *Chin. J. Inorg. Chem.* **2006**, *22*, 1495.
- (110) Youm, K.-T.; Kang, H. C.; Lee, G.; Woo, H. K.; Park, Y. J.; Lee, N.; Ko, J.; Jun, M.-J. *Polyhedron* **2006**, *25*, 2318.
- (111) Govor, E. V.; Lysenko, A. B.; Rusanov, E. B.; Chernega, A. N.; Krautscheid, H.; Domasevitch, K. V. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **2010**, *636*, 209.
- (112) Ross, P. K.; Allendorf, M. D.; Solomon, E. I. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4009.
- (113) Guha, P. M.; Phan, H.; Kinyon, J. S.; Brotherton, W. S.; Sreenath, K.; Simmons, J. T.; Wang, Z.; Clark, R. J.; Dalal, N. S.; Shatruk, M.; Zhu, L. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 3465.
- (114) Deacon, G. *Coord. Chem. Rev.* **1980**, *33*, 227.

- (115) Bleaney, B.; Bowers, K. D. *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **1952**, *214*, 451.
- (116) Neels, A.; Stoekli-Evans, H.; Escuer, A.; Vicente, R. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 1946.
- (117) Anbu, S.; Kamalraj, S.; Varghese, B.; Muthumary, J.; Kandaswamy, M. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 5580.
- (118) Tselepi-Kalouli, E.; Katsaros, N. *J. Inorg. Biochem.* **1989**, *37*, 271.
- (119) Wilson, W. D.; Ratmeyer, L.; Zhao, M.; Strekowski, L.; Boykin, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4098.
- (120) Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Castiñeiras, A.; Liu-González, M.; Lloret, F.; Ribes, A.; Coga, L.; Bernecker, A.; Mareque-Rivas, J. C. *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 578.
- (121) Mayeda, E. A.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 4023.
- (122) Detmer, C. A.; Pamatong, F. V.; Bocarsly, J. R. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 6292.
- (123) Humphreys, K. J.; Karlin, K. D.; Rokita, S. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6009.
- (124) Bales, B. C.; Pitié, M.; Meunier, B.; Greenberg, M. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9062.
- (125) Zhao, Y.; Zhu, J.; He, W.; Yang, Z.; Zhu, Y.; Li, Y.; Zhang, J.; Guo, Z. *Chemistry* **2006**, *12*, 6621.
- (126) Anbu, S.; Kandaswamy, M.; Kamalraj, S.; Muthumarry, J.; Varghese, B. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7310.
- (127) Prins, R.; de Graaff, R. A. G.; Haasnoot, J. G.; Vader, C.; Reedijk, J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1986**, 1430.
- (128) Ten Hoedt, R. W. M.; Hulsbergen, F. B.; Verschoor, G. C.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1982**, *21*, 2369.
- (129) Isele, K.; Franz, P.; Ambrus, C.; Bernardinelli, G.; Decurtins, S.; Williams, A. F. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 3896.
- (130) Mukherjee, A.; Raghunathan, R.; Saha, M. K.; Nethaji, M.; Ramasesha, S.; Chakravarty, A. R. *Chemistry* **2005**, *11*, 3087.
- (131) Tercero, J.; Ruiz, E.; Alvarez, S.; Rodríguez-Forteza, A.; Alemany, P. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 2729.
- (132) Abarca, B.; Ballesteros, R.; Chadlaoui, M.; de Arellano, C. R.; Real, J. A. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 4574.
- (133) Banerjee, A.; Singh, R.; Mondal, P.; Colacio, E.; Rajak, K. K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *2010*, 790.
- (134) Van Albada, G. A.; Ghazzali, M.; Al-Farhan, K.; Reedijk, J. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 1149.
- (135) Zhang, J.-P.; Lin, Y.-Y.; Huang, X.-C.; Chen, X.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 5495.
- (136) Zhang, J.-P.; Lin, Y.-Y.; Huang, X.-C.; Chen, X.-M. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 1258.
- (137) Ray, A.; Mitra, S.; Rosair, G. M. *Inorg. Chem. Commun.* **2008**, *11*, 1256.

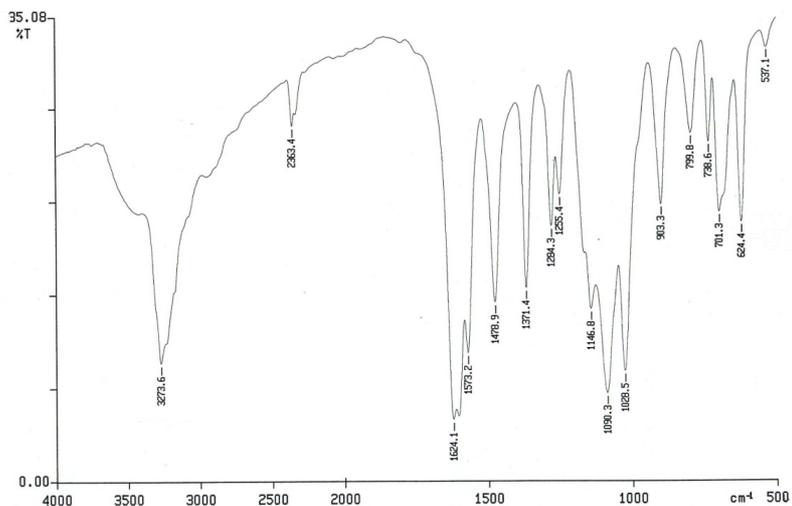
- (138) Zhou, J.-H.; Cheng, R.-M.; Song, Y.; Li, Y.-Z.; Yu, Z.; Chen, X.-T.; Xue, Z.-L.; You, X.-Z. *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 8011.
- (139) Olguín, J.; Kalisz, M.; Clérac, R.; Brooker, S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 5058.
- (140) Zhong, D.-C.; Lu, W.-G.; Jiang, L.; Feng, X.-L.; Lu, T.-B. *Cryst. Growth Des.* **2010**, *10*, 739.
- (141) Chen, D.; Liu, Y.-J.; Lin, Y.-Y.; Zhang, J.-P.; Chen, X.-M. *CrystEngComm* **2011**, *13*, 3827.
- (142) Zhu, A.-X.; Xu, Q.-Q.; Liu, F.-Y.; Qi, X.-L. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **2011**, *637*, 502.
- (143) Wang, J.; Li, W.; Xiao, H. Z. *Krist. NCS* **2011**, *226*, 163.
- (144) Siddiqui, K. A.; Mehrotra, G. K.; Narvi, S. S.; Butcher, R. J. *Inorg. Chem. Commun.* **2011**, *14*, 814.
- (145) Sun, Y.-G.; Xiong, G.; Guo, M.-Y.; Ding, F.; Wang, L.; Gao, E.-J.; Zhu, M.-C.; Verpoort, F. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **2010**, n/a.
- (146) You-Cun, C.; Jun-Jun, X.; Kuai-Bing, W.; Yan, W. *Chinese J. Struct. Chem.* **2011**, *30*, 799.
- (147) Van Koningsbruggen, P. J.; van Hal, J. W.; Müller, E.; de Graaff, R. A. G.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1993**, 1371.
- (148) Borrás-Almenar, J. J.; Clemente-Juan, J. M.; Coronado, E.; Tsukerblat, B. S. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22*, 985.
- (149) Engelfriet, D. W.; Den Brinker, W.; Verschoor, G. C.; Gorter, S. *Acta Crystallogr. Sect. B Struct. Crystallogr. Cryst. Chem.* **1979**, *35*, 2922.
- (150) Plass, W.; Pohlmann, A.; Subramanian, P. S.; Srinivas, D. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **2002**, *628*, 1377.
- (151) Carter, M. T.; Rodriguez, M.; Bard, A. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8901.
- (152) Strothkamp, K. G.; Stothkamp, R. E. *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 77.
- (153) Jenkins, T. C.; Parrick, J.; Porssa, M. *Anti-Cancer Drug Des.* **1994**, *9*, 477.
- (154) Kellett, A.; O'Connor, M.; McCann, M.; McNamara, M.; Lynch, P.; Rosair, G.; McKee, V.; Creaven, B.; Walsh, M.; McClean, S.; Foltyn, A.; O'Shea, D.; Howe, O.; Devereux, M. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 1024.
- (155) He, J.; Hu, P.; Wang, Y.-J.; Tong, M.-L.; Sun, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. *Dalton Trans.* **2008**, 3207.
- (156) Mahadevan, S.; Palaniandavar, M. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 693.
- (157) Joyner, J. C.; Reichfield, J.; Cowan, J. a. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15613.
- (158) Van Koningsbruggen, P. J.; Gatteschi, D.; de Graaff, R. A. G.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Zanchini, C. *Inorg. Chem.* **1995**, *34*, 5175.
- (159) Beckmann, U.; Brooker, S. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 17.
- (160) Kitchen, J. A.; Jameson, G. N. L.; Milway, V. A.; Tallon, J. L.; Brooker, S. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 7637.
- (161) White, N. G.; Kitchen, J. A.; Joule, J. A.; Brooker, S. *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, *48*, 6229.
- (162) Interface, The Cambridge Structural Database.

- (163) Lider, E. V.; Peresykina, E. V.; Smolentsev, A. I.; Elokhina, V. N.; Yaroshenko, T. I.; Virovets, A. V.; Ikorskii, V. N.; Lavrenova, L. G. *Polyhedron* **2007**, *26*, 1612.
- (164) Ackermann, J.; Meyer, F.; Pritzkow, H. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemier Anorg. und Allg. Chemie* **2004**, *630*, 2627.
- (165) Speed, S.; Vicente, R.; Aravena, D.; Ruiz, E.; Roubeau, O.; Teat, S. J.; El Fallah, M. S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 6842.
- (166) Li, X.; Cheng, D.; Lin, J.; Li, Z.; Zheng, Y. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 2853.
- (167) Ferrer, S.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Müller, E.; Biagini Cingi, M.; Lanfranchi, M.; Manotti Lanfredi, A. M.; Ribas, J. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 1859.
- (168) Mulay, E. A.; Eds, L. N. *Theory and Applications of Molecular Paramagnetism*; John Wiley.; New York, 1976.
- (169) Colacio, E.; Ghazi, M.; Kivekäs, R.; Moreno, J. M. *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 2882.
- (170) King, P.; Clérac, R.; Anson, C. E.; Coulon, C.; Powell, A. K. *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 3492.
- (171) Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Castiñeiras, A.; Lloret, F. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 9809.
- (172) Schindler, T.; Nordmeier, E. *Polymer (Guildf)*. **1999**, *40*, 7019.
- (173) Van den Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 180.

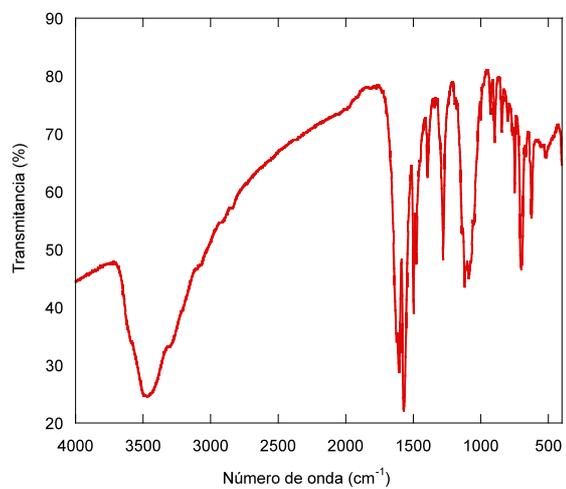
ANEXOS

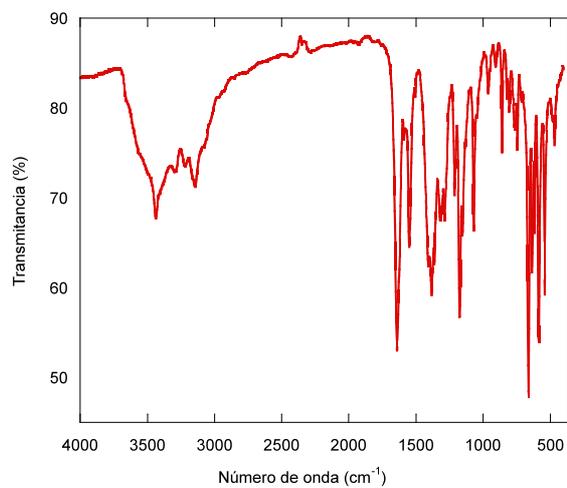
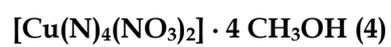
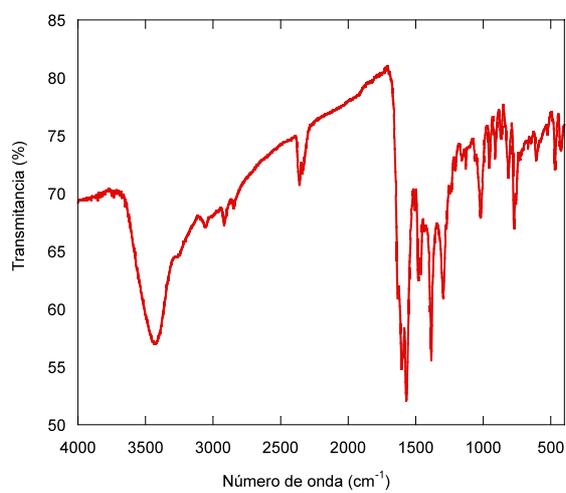
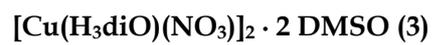
Anexo I. Espectros infrarrojos (KBr)

[Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (1)

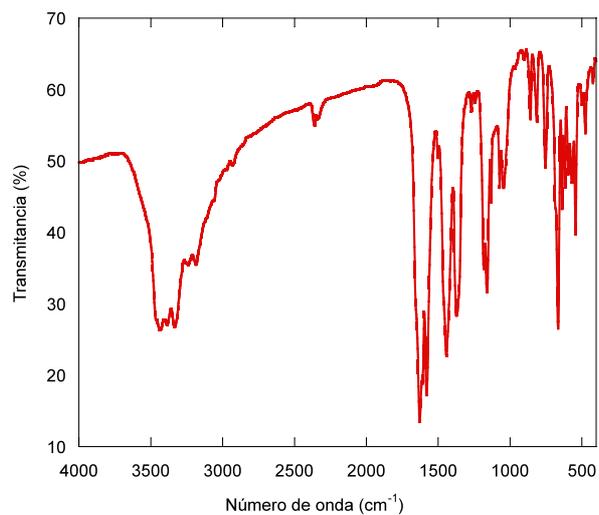


[Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH] (2)

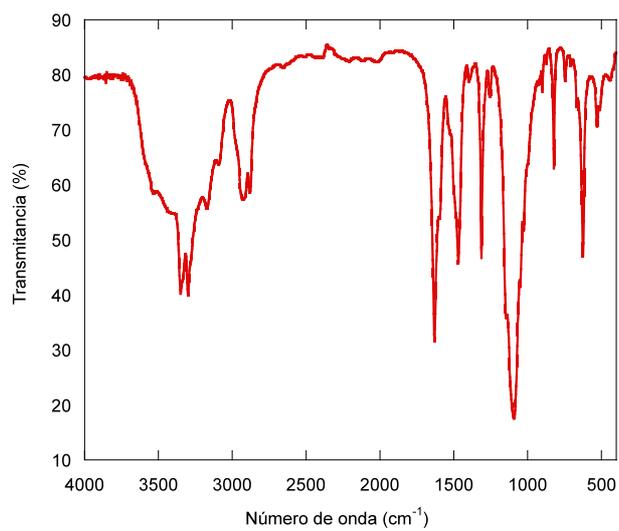


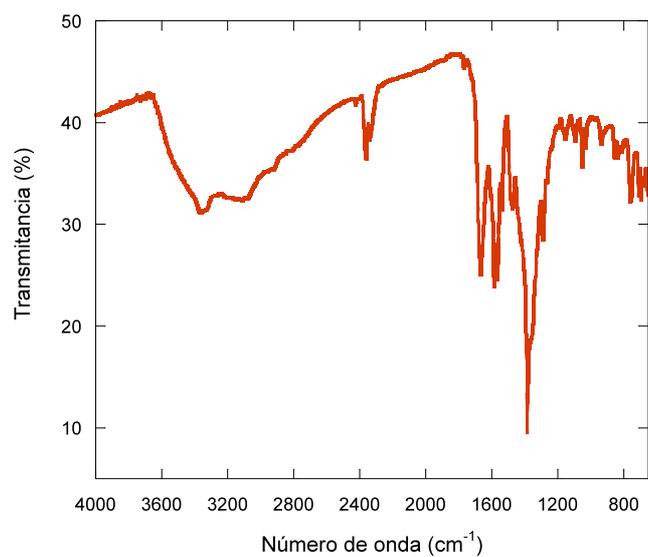
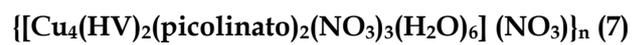


[Cu(M)(μ-acetato)₂]₂·2(M) (5)

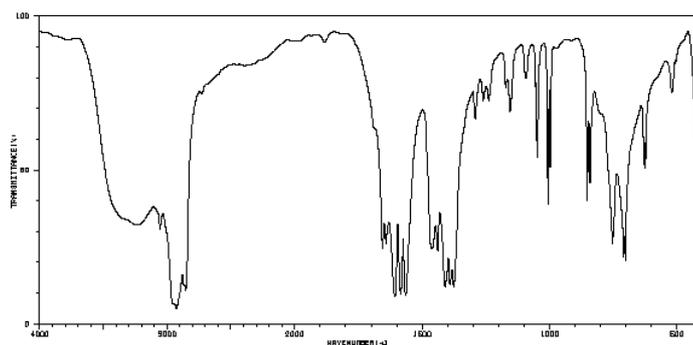


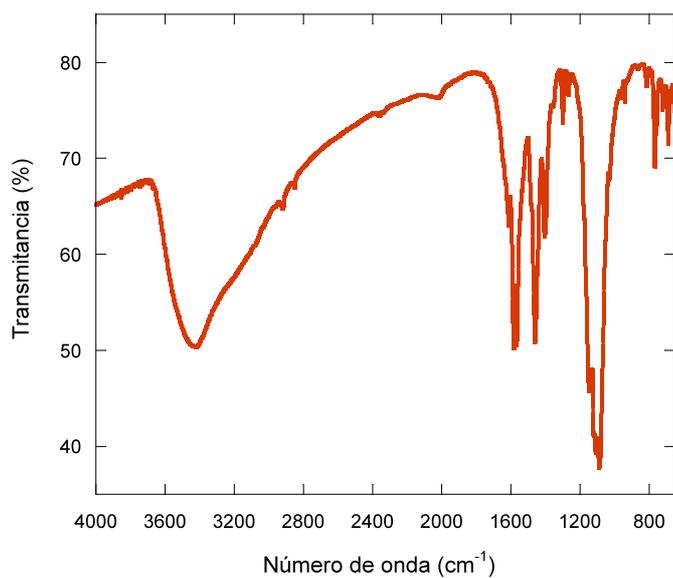
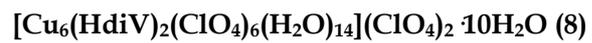
[Cu₄(atc)₂(dien)₄(ClO₄)₂](ClO₄)₂·2H₂O (6)



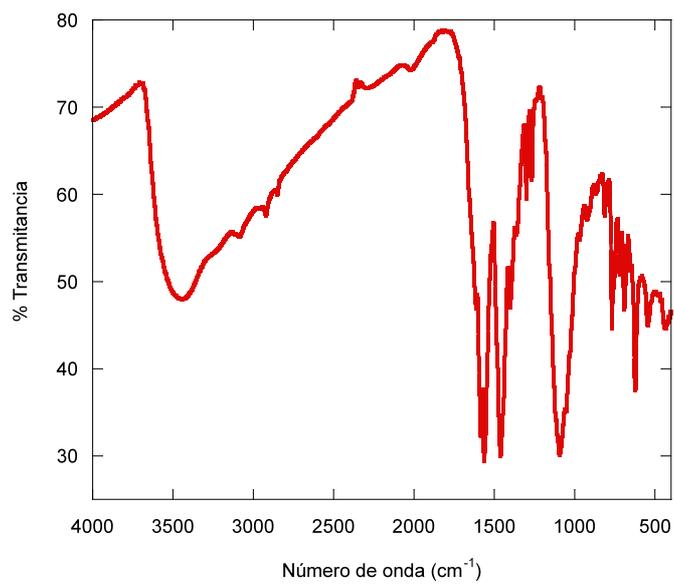


Picolinato sódico (figura extraída de *Spectral Database for Organic Compounds* - SDBS, Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)).





Precipitado verde pálido separado durante la síntesis de **8**



Anexo II. Tablas adicionales del estudio de Rayos-X

Tabla A.1. Enlaces de hidrógeno para el compuesto $[\text{Cu}(\text{N})_4(\text{NO}_3)_2] \cdot 4 \text{CH}_3\text{OH}$ (**4**) con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(5)-H(5A)...O(42)#1	0,88	2,08	2,820(4)	140,8
N(5)-H(5A)...O(41)	0,88	2,33	2,969(4)	129,7
N(5)-H(5B)...O(61)#2	0,88	2,29	2,956(3)	132,8
N(5)-H(5B)...O(12)	0,88	2,22	2,842(3)	127,4
N(11)- H(11A)...O(32)#1	0,88	2,04	2,799(4)	143,7
N(11)-H(11A)...O(31)	0,88	2,28	2,944(4)	132,1
N(11)- H(11A)...O(31)#1	0,88	2,84	3,314(4)	115,5
N(11)-H(11B)...O(51)	0,88	2,12	2,851(3)	140,2
N(11)-H(11B)...O(22)	0,88	2,22	2,851(3)	128,0
O(51)-H(51)...O(61)	0,88	1,90	2,820(3)	156,9

Código de simetría: (#1) $-x, y, -z+1/2$ (#2) $-x+1/2, y-1/2, -z+1/2$

Tabla A.2. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para el grupo sulfonilo del compuesto $[\text{Cu}(\text{M})(\mu\text{-acetato})_2]_2 \cdot 2(\text{M})$ (5) con las esds entre paréntesis.

Naftaleno-C16		Naftaleno-C28	
S(1)-N(13)	1,660(4)	S(2)-N(23)	1,675(4)
S(1)-O(11)	1,412(3)	S(2)-O(21)	1,421(3)
S(1)-O(12)	1,442(3)	S(2)-O(22)	1,431(3)
S(1)-C(16)	1,753(5)	S(2)-C(28)	1,746(5)
O(11)-S(1)-O(12)	120,3(2)	O(21)-S(2)-O(22)	121,1(2)
O(11)-S(1)-N(13)	107,4(2)	O(21)-S(2)-N(23)	105,6(2)
O(11)-S(1)-C(16)	108,7(2)	O(21)-S(2)-C(28)	109,9(2)
O(12)-S(1)-N(13)	104,3(2)	O(22)-S(2)-N(23)	104,8(2)
O(12)-S(1)-C(16)	110,2(2)	O(22)-S(2)-C(28)	109,1(2)
N(13)-S(1)-C(16)	104,7(2)	N(23)-S(2)-C(28)	105,1(2)
Naftaleno-C40		Naftaleno-C52	
S(3)-N(33)	1,663(4)	S(4)-N(43)	1,672(4)
S(3)-O(31)	1,434(4)	S(4)-O(41)	1,428(4)
S(3)-O(32)	1,432(4)	S(4)-O(42)	1,415(3)
S(3)-C(40)	1,735(5)	S(4)-C(52)	1,760(5)
O(31)-S(3)-O(32)	120,8(2)	O(41)-S(4)-O(42)	120,7(2)
O(31)-S(3)-N(33)	104,4(2)	O(41)-S(4)-N(43)	105,3(2)
O(31)-S(3)-C(40)	109,7(2)	O(41)-S(4)-C(52)	108,1(3)
O(32)-S(3)-N(33)	107,7(2)	O(42)-S(4)-N(43)	106,7(2)
O(32)-S(3)-C(40)	108,3(3)	O(42)-S(4)-C(52)	110,1(2)
N(33)-S(3)-C(40)	104,7(2)	N(43)-S(4)-C(52)	104,6(2)

Tabla A.3. Relación de enlaces de hidrógeno (distancias (Å) y ángulos (°) del compuesto [Cu(M)(μ-acetato)₂]₂·2(M) (5) con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(12)-H(12A)...O(5)	0,88	2,27	2,950(5)	134,4
N(12)-H(12B)...O(12)	0,88	2,24	2,877(5)	128,9
N(12)-H(12B)...O(44)	0,88	2,49	3,230(6)	142,8
N(15)-H(15B)...O(1)	0,88	1,97	2,799(5)	156,0
N(15)-H(15A)...O(24)#1	0,88	2,05	2,874(5)	156,5
N(22)-H(22B)...O(22)	0,88	2,29	2,924(5)	128,5
N(22)-H(22B)...N(34)#2	0,88	2,51	3,237(6)	140,9
N(22)-H(22A)...O(2)	0,88	2,15	2,904(5)	144,0
N(22)-H(22A)...O(32)#2	0,88	2,46	3,048(5)	125,1
N(25)-H(25A)...N(14)#3	0,88	2,15	2,940(6)	149,8
N(25)-H(25B)...O(6)	0,88	2,04	2,858(5)	154,5
N(32)-H(32A)...N(41)#4	0,88	2,11	2,988(6)	171,3
N(32)-H(32B)...O(31)	0,88	2,16	2,791(6)	127,8
N(35)-H(35A)...O(22)#5	0,88	2,20	3,000(5)	151,2
N(35)-H(35B)...O(3)	0,88	2,14	2,956(5)	154,5
N(42)-H(42B)...O(41)	0,88	2,25	2,865(6)	127,2
N(42)-H(42A)...O(31)#6	0,88	2,12	2,990(6)	170,0
N(45)-H(45A)...O(12)	0,88	2,23	3,022(5)	149,9
N(45)-H(45B)...O(8)#5	0,88	2,13	2,937(5)	152,8

Código de simetría: (#1) $-x+1/2, y-1/2, z+1/2$ (#2) $x, y+1, z$
 (#3) $-x+1/2, y+1/2, z-1/2$ (#4) $-x+1/2, y+1/2, z+1/2$
 (#5) $x, y-1, z$ (#6) $-x+1/2, y-1/2, z-1/2$

Tabla A.4. Relación de enlaces de hidrógeno (distancias (Å) y ángulos (°) del compuesto $[\text{Cu}_4(\text{atc})_2(\text{dien})_4(\text{ClO}_4)_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6) con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(7)-H(7A)...O(13)	0,92	2,39	3,016(7)	124,8
N(7)-H(7A)...O(11)	0,92	2,40	3,230(9)	149,9
N(7)-H(7A)...O(11)#1	0,92	2,64	3,230(9)	122,5
N(7)-H(7B)...O(12)#3	0,91	2,37	3,192(6)	150,8
N(11)-H(11A)...O(13)#4	0,92	2,27	3,013(5)	137,3
N(11)-H(11A)...O(11)	0,92	2,33	2,812(9)	11,7
N(11)-H(11B)...O(21)#5	0,92	2,11	2,930(9)	148,5
N(11)-H(11B)...O(24)#6	0,92	2,46	3,366(9)	166,8
N(21)-H(21A)...O(22)#5	0,90	2,03	2,845(9)	149,5
N(21)-H(21A)...O(24)#6	0,90	2,28	3,181(8)	173,9
N(21)-H(21B)...O(3)#7	0,90	2,30	3,118(6)	150,8
O(3)-H(3A)...O(22)#5	0,83	2,18	2,931(9)	149,6
O(3)-H(3A)...O(22)#6	0,83	2,18	2,931(9)	149,6
O(3)-H(3B)...O(12)#8	1,03	2,29	3,185(10)	144,2
O(3)-H(3B)...O(12)#4	1,03	2,29	3,185(10)	144,2

Código de simetría: (#1) $x, -y, z$ (#2) $-x, -y, -z$
 (#3) $-x+1/2, y-1/2, -z+1$ (#4) $-x+1/2, -y+1/2, -z+1$
 (#5) $x-1/2, y+1/2, z$ (#6) $x-1/2, -y+1/2, z$
 (#7) $-x, -y+1, -z$ (#8) $-x+1/2, y+1/2, -z+1$

Tabla A.5. Relación de enlaces de hidrógeno (distancias (Å) y ángulos (°) del compuesto 7 con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
O(1)-H(1A)...O(11)	0,85	2,49	3,023(6)	121,8
O(1)-H(1A)...O(13)	0,85	1,88	2,719(7)	171,3
O(1)-H(1A)...N(1)	0,85	2,51	3,276(8)	150,3
O(1)-H(1B)...O(13)#1	0,85	2,57	3,422(6)	179,5
O(2)-H(2A)...O(12)#2	0,98	1,77	2,723(5)	163,9
O(2)-H(2A)...O(13)#2	0,98	2,50	3,224(6)	130,3
O(2)-H(2A)...N(1)#2	0,98	2,46	3,393(6)	158,6
O(2)-H(2B)...N(20)	0,98	1,76	2,623(5)	144,9
O(2)-H(2B)...O(32)#3	0,98	2,59	3,120(11)	114,4
O(3)-H(3A)...O(33)	1,01	2,10	2,906(14)	135,4
O(3)-H(3B)...O(38)#4	0,98	2,26	2,810(6)	114,7
N(21)-H(21)...O(3)#5	0,88	1,94	2,810(6)	167,3
N(22)-H(22A)...O(38)#6	0,90	2,10	2,966(5)	162,7
N(22)-H(22B)...O(37)	0,97	1,99	2,811(5)	140,9

Código de simetría: (#1) -x+1, -y+1, -z (#2) -x+2, -y+1, -z
 (#3) -x+1, -y+2, -z (#4) -x+1, -y+2, -z+1
 (#5) x+1, y, z (#6) -x+2, -y+2, -z+1

Tabla A.6. Relación de enlaces de hidrógeno (distancias (Å) y ángulos (°) del compuesto **8** con las esds entre paréntesis.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	< (DHA)
N(3)-H(3)...O(2)	0.90	2.03	2.785(8)	140.8
N(3)-H(3)...O(7)#1	0.90	2.29	2.810(8)	116.7
O1 - O14#1			3.032(14)	
O2 - O52#4			2.676(12)	
O2 - O53#4			2.681(13)	
O3 - O54#2			2.727(13)	
O3 - O13#3			2.755(11)	
O3 - O21			2.915(10)	
O4 - O41#2			2.899(11)	
O4 - O42#2			3.055(10)	
O4 - O54#4			2.942(15)	
O5 - O55#5			2.720(13)	
O5 - O31			2.995(10)	
O5 - O43#5			2.951(07)	
O5 - O51#5			2.748(11)	
O6 - O55#5			2.828(14)	
O7 - O51#8			2.698(11)	
O7 - O31			3.041(09)	
O7 - O34#9			2.857(12)	
O55 - O44			3.073(12)	
Código de simetría:				
	(#1) -x+2, -y, -z		(#2) -x+1, -y+1, -z	
	(#3) x-1, y, z		(#4) x, y, z-1	
	(#5) x+1, y, z		(#8) -x+1, -y, -z+1	
	(#9) -x+2, -y, -z+1			

Anexo III. Estudio de Rayos-X de los compuestos 1-8**Detalles experimentales cristalográficos del monocristal
[Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (1)**

Compound	1
Empirical formula	C ₉ H ₈ Cl Cu _{0.5} N ₄ O ₅
Formula weight	319.41
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Triclinic, P-1
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α(°)
	β(°)
	γ(°)
Volume (Å ³)	581.32(10)
Z, Calculated density (mg/m ³)	2, 1.825
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.588
F(000)	323
Crystal size (mm)	0.9 x 0.8 x 0.6
θ range for data collection (deg)	2.52 to 27.49
Limiting indices	-9<=h<=10
	-11<=k<=11
	-11<=l<=11
Reflections collected/unique	3969 / 2610
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2610 / 0 / 178
Goodness-of-fit on F ²	0.924
Final R indices [I>2σ(I)] (R ₁ , ωR ₂)	0.0466, 0.1216
R indices (all data) (R ₁ , ωR ₂)	0.0759, 0.1391
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.479 and -0.439

**Detalles experimentales cristalográficos de los monocristales
[Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH (2) y [Cu(H₂diO)(NO₃)₂·2DMSO (3)**

Compound	2	3
Empirical formula	C ₃₄ H ₃₂ Cl ₂ Cu ₂ N ₁₀ O ₁₄	C ₁₃ H ₁₁ Cu _{0.50} N ₃ O ₃ S _{0.50}
Formula weight	1002.7	305.05
Temperature (K)	150	103(2)
Wavelength (Å)	0.71073	0.71073
Crystal system, space group	Triclinic, P-1	Triclinic, P-1
Unit cell dimensions	a(Å) 8.1950(4) b(Å) 9.1620(3) c(Å) 13.6020(8) α(°) 81.025(3) β(°) 74.2640(19) γ(°) 83.485(3)	8.7112(6) 8.9441(7) 16.0257(12) 95.730(6) 92.139(6) 94.426(6)
Volume (Å ³)	968.24(8)	1237.40(16)
Z, Calculated density (mg/m ³)	1, 1.720	4, 1.637
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.320	1.024
F(000)	510.0	626
Crystal size (mm)	0.19 x 0.17 x 0.04	0.10 x 0.10 x 0.04
θ range for data collection (deg)	2.52 to 27.51	2.30 to 28.28
Limiting indices	-11 ≤ h ≤ 10 -11 ≤ k ≤ 11 -21 ≤ l ≤ 17	-11 ≤ h ≤ 11 -11 ≤ k ≤ 11 -21 ≤ l ≤ 21
Reflections collected/unique	4449/3564	31011/6143
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3564 / 0 / 281	6143 / 449 / 412
Goodness-of-fit on F ²	0.991	0.814
Final R indices [I > 2σ(I)] (R ₁ , ωR ₂)	0.0407,	0.0334, 0.0522
R indices (all data) (R ₁ , ωR ₂)	0.0567, 0.1370	0.0646, 0.0547
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.703 and -0.792	0.800 and -0.476

Detalles experimentales cristalográficos del monocristal [Cu(N)₄(NO₃)₂].4CH₃OH (4)

Compound	4
Empirical formula	C ₅₂ H ₅₆ Cu N ₁₈ O ₁₈ S ₄
Formula weight	1412.93
Temperature (K)	100(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Monoclinic, C 2/c
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α(°)
	β(°)
	γ(°)
Volume (Å ³)	6042.0(4)
Z, Calculated density (mg/m ³)	4, 1.553
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.588
F(000)	2924
Crystal size (mm)	0.34 x 0.26 x 0.22
θ range for data collection (deg)	1.29 to 28.39
Limiting indices	-30<=h<=30
	-22<=k<=22
	-26<=l<=25
Reflections collected/unique	29040 / 7545
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	7545 / 0 / 453
Goodness-of-fit on F ²	1.056
Final R indices [I>2σ(I)] (R ₁ , ωR ₂)	0.0349, 0.0903
R indices (all data) (R ₁ , ωR ₂)	0.0368, 0.0913
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.838 and -0.515

**Detalles experimentales cristalográficos del monocristal
[Cu(M)(μ -acetato)₂]₂·2(nsdatrz) (5)**

Compound	5
Empirical formula	C ₅₆ H ₅₆ Cu ₂ N ₂₀ O ₁₆ S ₄
Formula weight	1520.53
Temperature (K)	100(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Orthorhombic, P n a 21
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α (°)
	β (°)
	γ (°)
Volume (Å ³)	6910.2(4)
Z, Calculated density (mg/m ³)	4, 1.462
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.815
F(000)	3128
Crystal size (mm)	0.19 x 0.15 x 0.04
θ range for data collection (deg)	1.52 to 26.41
Limiting indices	0 \leq h \leq 33
	0 \leq k \leq 16
	-24 \leq l \leq 22
Reflections collected/unique	32227 / 13765
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	13765 / 1 / 884
Goodness-of-fit on F ²	1.018
Final R indices [I $>$ 2 σ (I)] (R ₁ , ω R ₂)	0.0539, 0.1020
R indices (all data) (R ₁ , ω R ₂)	0.0849, 0.1102
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.650 and -0.449

Detalles experimentales cristalográficos del monocristal
[Cu₄(atc)₂(dien)₄(ClO₄)₂](ClO₄)₂ · 2H₂O (6)

Compound	6
Empirical formula	C ₂₂ H ₅₆ Cl ₄ Cu ₄ N ₂₀ O ₂₄
Formula weight	1380.83
Temperature (K)	100(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Monoclinic, C 2/m
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α(°)
	β(°)
	γ(°)
Volume (Å ³)	2471.25(10)
Z, Calculated density (mg/m ³)	2, 1.856
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	2.015
F(000)	1408
Crystal size (mm)	0.30 x 0.21 x 0.01
θ range for data collection (deg)	1.69 to 27.10
Limiting indices	-30 ≤ h ≤ 17
	0 ≤ k ≤ 10
	-18 ≤ l ≤ 18
Reflections collected/unique	32844 / 2922
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	2922 / 0 / 211
Goodness-of-fit on F ²	1.111
Final R indices [I > 2σ(I)] (R ₁ , ωR ₂)	0.0514, 0.1464
R indices (all data) (R ₁ , ωR ₂)	0.0594, 0.1526
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	1.055 and -1.301

**Detalles experimentales cristalográficos del monocristal
 $\{[\text{Cu}_4(\text{HV})_2(\text{picolinato})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6](\text{NO}_3)_n\}$ (7)**

Compound	7
Empirical formula	$\text{C}_{28} \text{H}_{34} \text{Cu}_4 \text{N}_{18} \text{O}_{24}$
Formula weight	1260.89
Temperature (K)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Triclinic, P -1
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α (°)
	β (°)
	γ (°)
Volume (Å ³)	1106.04(19)
Z, Calculated density (mg m ⁻³)	1, 1.893
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	2.007
F(000)	636
Crystal size (mm)	0.32 x 0.13 x 0.07
θ range for data collection (deg)	1.43 to 27.52
Limiting indices	-9<=h<=9 -12<=k<=12 0<=l<=20
Reflections collected/unique	26752 / 4334
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	4334 / 0 / 331
Goodness-of-fit on F ²	1.066
Final R indices [$I > 2\sigma(I)$] (R_1 , ωR_2)	0.0679, 0.1784
R indices (all data) (R_1 , ωR_2)	0.0844, 0.1921
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	2.851 and -3.172

Detalles experimentales cristalográficos del monocristal
[Cu₆(HdiV)₂(ClO₄)₆(H₂O)₁₄](ClO₄)₂ · 10H₂O (8)

Compound	8
Empirical formula	C ₂₈ H ₆₆ Cl ₈ Cu ₆ N ₁₄ O ₆₀
Formula weight	2223.79
Temperature (K)	298(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system, space group	Triclinic, P -1
Unit cell dimensions	a(Å)
	b(Å)
	c(Å)
	α(°)
	β(°)
	γ(°)
Volume (Å ³)	1915.52(9)
Z, Calculated density (mg m ⁻³)	1, 1.928
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	2.041
F(000)	1122
Crystal size (mm)	0.15 x 0.11 x 0.07
θ range for data collection (deg)	1.43 to 27.52
Limiting indices	-13 ≤ h ≤ 13
	-14 ≤ k ≤ 17
	-17 ≤ l ≤ 20
Reflections collected/unique	13807 / 8744
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data / restraints / parameters	8744/0/456
Goodness-of-fit on F ²	1.144
Final R indices [I > 2σ(I)] (R ₁ , ωR ₂)	0.0940, 0.2984
R indices (all data) (R ₁ , ωR ₂)	0.1333, 0.3329
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	3.026 and -1.887

Toma de datos. Resolución y refinamiento de las estructuras

[Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (1) and [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂ · 2CH₃OH (2)

A blue prism crystals of [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (1) / a blue prism crystals of [Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂ · 2CH₃OH (2) was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 293 K (1) / 150(5) K (2), using a Nonius Kappa-CCD diffractometer. Graphite monochromated MoK(α) radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) was used throughout. Data collection strategy was calculated with the program Collect [I]. Data reduction and cell refinement were performed with the programs HKL Denzo and Scalepack [II]. The crystal structure was solved by direct Methods, using the program SIR-97 [III]. Anisotropic least-squares refinement was carried out with SHELXL-97 [IV]. All non hydrogen atoms were anisotropically refined. Some Hydrogen atoms were located in a difference Fourier map and the remaining ones located geometrically. The crystallographic atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Geometrical calculations were made with PARST [VI]. Molecular graphics from PLATON [VII].

[Cu(H₂diO)(NO₃)₂ · 2 DMSO (3)

A blue prism of [Cu(H₂diO)(NO₃)₂ · 2DMSO was mounted on a fine-focus sealed tube and used for data collection. Crystal data were collected at 103(2) K, using a Oxford Diffraction KM4/Xcalibur device. Graphite monochromated MoK(α) radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) was used throughout. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [VIII] and refined by full-matrix least-squares techniques against F² using SHELXL-97 [IV]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all non-hydrogen atoms. One of the naphthalene groups was disordered over (50% each). Hydrogen atoms bonded to carbon were placed geometrically and the O-H and N-H hydrogen atoms were initially positioned at sites determined from difference maps, but the positional parameters of all H atoms were included as fixed contributions. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from CRYSTALMAKER [IX].

[Cu(N)₄(NO₃)₂] · 4CH₃OH (4)

A blue prismatic crystal of [Cu(N)₄(NO₃)₂] · 4MeOH was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 100.0(1) K, using a Bruker X8 KappaAPEXII diffractometer. Graphite monochromated MoK(α) radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) was used throughout. The data were processed with APEX2 [X] and corrected for absorption using SADABS (transmission factors: 1.000 - 0.846) [XI]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [VIII] and refined by full-matrix least-squares techniques against F² using SHELXL-97 [IV]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. NO₃ appeared to occur in two positions related by a pseudo-

mirror plane. From the refined multiplicities of the F and F* atoms the occupancy factors for the two orientations were fixed at 0.5. The structure was refined as a racemic twin with components 0.48, 0.52(9) [XII]. Hydrogen atoms were located in difference maps and included as fixed contributions riding on attached atoms with isotropic thermal parameters 1.2 times those of their carrier atoms. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from PLATON [VII] and SCHAKAL [XIII].

[Cu(M)(μ -acetato)₂]₂·2(M) (5)

A blue plate crystal of [Cu(M)(μ -acetato)₂]₂·2(nsdatrz) was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 100.0(1) K, using a Bruker X8 KappaAPEXII diffractometer. Graphite monochromated MoK(α) radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) was used throughout. The data were processed with APEX2 [X] and corrected for absorption using SADABS (transmissions factors: 1.000 - 0.758) [XI]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [VIII] and refined by full-matrix least-squares techniques against F² using SHELXL-97 [IV]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. Hydrogen atoms bonded to carbon were placed geometrically and the N-H hydrogen atoms were initially positioned at sites determined from difference maps, but the positional parameters of all H atoms were included as fixed contributions riding on attached atoms with isotropic thermal parameters 1.2 times those of their carrier atoms. The Flack "x" parameter (absolute structure parameter) was calculated to be 0.04(1) for the present structure and 0.96(1) for the inverted structure, thus providing strong evidence that the absolute structure has been assigned correctly. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from PLATON [VII] and SCHAKAL [XIII].

[Cu₄(atc)₂(dien)₄(ClO₄)₂](ClO₄)₂·2H₂O (6)

A blue plate crystal of [Cu₄(atc)₂(dien)₄(ClO₄)₂](ClO₄)₂·2H₂O was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 100.0(1) K, using a Bruker X8 KappaAPEXII diffractometer. Graphite monochromated MoK(α) radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) was used throughout. The data were processed with APEX2 [X] and corrected for absorption using SADABS (transmissions factors: 1.000 - 0.595) [XI]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [VIII] and refined by full-matrix least-squares techniques against F² using SHELXL-97 [IV]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. The geometry of the ClO₄ ligand is imposed by a pseudo-mirror plane that contains the Cl1-O13 bond with 0.5 occupancy for each atom. The ClO₄ anion appeared to occur in two positions related by a pseudo-mirror plane. From the refined multiplicities of the O and O* atoms the occupancy factors for the two

orientations are found to be 0.50 each. Hydrogen atoms bonded to carbon were placed geometrically and the O-H and N-H hydrogen atoms were initially positioned at sites determined from difference maps, but the positional parameters of all H atoms were included as fixed contributions riding on attached atoms with isotropic thermal parameters 1.2 times those of their carrier atoms. The contribution of the density of the disordered solvent molecules was subtracted from the measured structure factors with use of the SQUEEZE option. Subsequent refinement then converged with R factors and parameter errors significantly better than for all attempts to model the solvent disorder. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from PLATON [VII] and SCHAKAL [XIII].

{[Cu₄(HV)₂(picolinato)₂(NO₃)₃(H₂O)₆] (NO₃)_n} (7)

A green plate crystal of {[Cu₄(HV)₂(picolinato)₂(NO₃)₃(H₂O)₆] (NO₃)_n} was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 100(2) K, using a Bruker X8 KappaAPEXII diffractometer. Graphite monochromated MoK(alpha) radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) was used throughout. The data were processed with APEX2 [X] and corrected for absorption using SADABS (transmission factors: 1.000 - 0.796) [XI]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [VIII] and refined by full-matrix least-squares techniques against F^2 using SHELXL-97 [IV]. A disordered nitrate ion with the central N(2) atom located on a center of symmetry was assumed to occupy two alternative orientations inclined at an angle of $60(2)^\circ$, hence oxygen and N atoms given occupancy of 0.5. Atoms of the disordered nitrate anion N(3) were refined with anisotropic displacement parameters and an occupancy of 0.5 for all the atoms. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. Final refinement (SHELXL-2013) included the displacement-coefficient restraints ISOR of 0.005 for N3 and O31 to prevent these atoms becoming 'non-positive definite'. Hydrogen atoms were located in difference maps and included as fixed contributions riding on attached atoms with isotropic thermal parameters 1.2 times those of their carrier atoms. The large discrepancy between the R and wR values is due to the high thermal vibration present in nitrate groups. The low accuracy of the structure refinement derives from the weak diffracting power of the crystals. Nevertheless, the final results can be considered satisfactory from the chemical point of view. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001. The lowest and highest peaks in the final difference Fourier map are located close to the O(31) and Cu(2) atoms at distances of 0.69 and 1.04 Å, respectively. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from PLATON [VII] and DIAMOND [XIV].

[Cu₆(HdiV)₂(ClO₄)₆(H₂O)₁₄](ClO₄)₂ · 10H₂O (8)

A sea-blue prismatic crystal of [Cu₆(HdiV)₂(ClO₄)₆(H₂O)₁₄](ClO₄)₂ · 10H₂O was mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 298(2) K, using a Bruker SMART CCD 1000 diffractometer. Graphite monochromated MoK(α) radiation (λ = 0.71073 Å) was used throughout. The data were processed with SAINT [XV] and corrected for absorption using SADABS (transmission factors: 1.000 - 0.7494) [XI]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [VIII] and refined by full-matrix least-squares techniques against F² using SHELXL-97 [IV]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for nonhydrogen atoms. Atoms in the ClO₄⁻ ions and crystallization water molecules which showed very high thermal motion refined isotropically. Hydrogen atoms were placed geometrically and positional parameters were refined using a riding model. The H atoms of water molecules were not located. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [V]. Molecular graphics from PLATON [VII] and DIAMOND [XIV].

Bibliografía**Toma de datos, resolución y refinamiento de las estructuras.****Gráficos**

- [I] COLLECT, Nonius BV, 1997-2000.
- [II] DENZO-SCALEPACK Otwinowski, Z. & Minor, W., "Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode ", *Methods in Enzymology, Volume 276: Macromolecular Crystallography, part A*, p.307-326, 1997, Carter, C. W. Jr. & Sweet, R. M., Eds., Academic Press.
- [III] SIR97 - Altomare A., Burla M.C., Camalli M., Cascarano G.L., Giacovazzo C. , Guagliardi A., Moliterni A.G.G., Polidori G., Spagna R. (1999) *J. Appl. Cryst.* 32, 115-119.
- [IV] G. M. Sheldrick (1997). SHELXL-97. Program for the Refinement of Crystal Structures. University of Goettingen, Germany.
- [V] A. J. C. Wilson (1995). *International Tables for Crystallography. Vol. C*, Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands.
- [VI] PARST - (a) Nardelli, M. *Comput. Chem.* 1983, 7, 95-97. (b) Nardelli, M. J. *Appl. Crystallogr.* 1995, 28, 659.
- [VII] A. L. Spek (2003). PLATON. A Multipurpose Crystallographic Tool. Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
- [VIII] G. M. Sheldrick (1990). *Acta Cryst.* A46, 467-473.

- [IX] CRYSTALMAKER® for Windows, version 2.1.2.5, 2009, CrystalMaker Software Limited.
- [X] Bruker (2005). APEX2 Software, Bruker AXS Inc. V2.0-1, Madison, Wisconsin, USA.
- [XI] G. M. Sheldrick (1997). SADABS. Program for Empirical Absorption Correction of Area Detector Data. University of Goettingen, Germany.
- [XII] Flack, H. D. & Schwarzenbach, D. (1988). Acta Cryst. A44, 499-506.
- [XIII] E. Keller (1997). SCHAKAL-97. A computer program for the graphic representation of molecular and crystallographic models. University of Freiburg i. Br., Germany.
- [XIV] K. Brandenburg, H. Putz (2004). DIAMOND 3.x, Crystal Impact GbR, Bonn, Germany. ([URL://www.crystalimpact.com/diamond](http://www.crystalimpact.com/diamond)).
- [XV] Bruker (1997). SMART and SAINT. Area Detector Control and Integration Software, Bruker Analytical X-ray Instruments Inc., Madison, Wisconsin, USA.

CAPÍTULO III

QUANTUM DOTS COMO AGENTES
ACTIVANTES DE LA ACTIVIDAD
NUCLEASA DE COMPLEJOS
DE COBRE

Como se abordó en la INTRODUCCIÓN, las metalonucleasas sintéticas son capaces de degradar el ADN mediante dos mecanismos: hidrolítico y oxidativo. Las nucleasas hidrolíticas promueven la hidrólisis del enlace fosfato *per se* (en el capítulo IV se profundizará más sobre este modo de acción), mientras que la mayoría de las nucleasas oxidativas necesitan la adición de un agente químico externo (generalmente un agente reductor) que *active* el compuesto e inicie el proceso de corte (Capítulo II).

En los últimos años se han venido buscando mecanismos de activación diferentes que suplan las limitaciones presentadas por estos agentes químicos, entre ellas, la activación no selectiva del compuesto o la formación no controlada de especies radicalarias. Recientemente, Chakravarty y col. han mostrado también que una selección adecuada de ligandos permite obtener complejos metálicos capaces de producir el corte oxidativo del ADN sin el concurso de agentes reductores en presencia de luz.¹⁻³

En este contexto de búsqueda de nuevas formas de mejorar la eficiencia de las metalonucleasas oxidativas, el presente Capítulo explora el uso de nanopartículas inorgánicas como agentes coadyuvantes alternativos. Fruto de los resultados es una nueva línea de investigación que aborda el efecto de combinar nucleasas de Cu(II) y nanocristales semiconductores (QDs) para el corte del ADN.

En este Capítulo se introducen en primer lugar conceptos básicos sobre nanopartículas y nanocristales semiconductores o *quantum dots*. A continuación se recogen los primeros resultados obtenidos al combinar la nucleasa prototipo de Cu(II), la especie $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, con QDs. En el último apartado se expande el estudio a dos nuevos complejos ternarios de Cu(II) con un ligando triazol en su estructura.

III.A INTRODUCCIÓN

III.A.1 Las nanopartículas

Las nanopartículas son, en general, partículas con una o más dimensiones comprendidas entre 1 y 100 nm. Esta clasificación, aún siendo arbitraria, está bien establecida en la comunidad científica debido a que cubre el rango en el que determinadas propiedades de los materiales se vuelven dependientes del tamaño. La figura III.1 muestra una serie de partículas en la nanoescala.

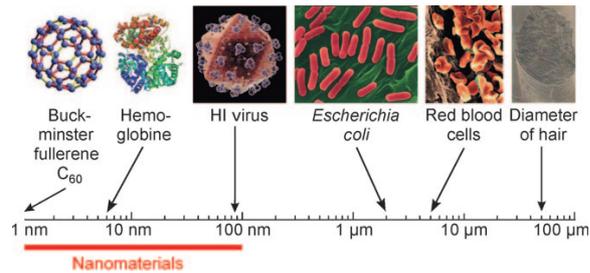


Figura III.1. Intervalo de longitudes en el que se engloba la *nanoescala*.⁴

Las **propiedades** que presentan las nanopartículas difieren frecuentemente de las que presentan sus sólidos macroscópicos. En una primera aproximación, estas diferencias se pueden agrupar en tres categorías:

- Propiedades derivadas del *tamaño de la partícula*: son propiedades directamente relacionadas con sus reducidas dimensiones. Por ejemplo, pueden formar capas ópticamente transparentes,^{5,6} son suficientemente pequeñas para ser absorbidas por células vivas,^{7,8}...
- Propiedades derivadas de la *superficie de la partícula*: son propiedades que también presenta el material macroscópico, pero que sólo son determinantes en las nanopartículas debido a su mayor proporción superficie-volumen. Así, por ejemplo, en catálisis esta circunstancia hace que el número de centros catalíticamente activos en la superficie sea mayor que el de centros inactivos alojados en el interior, con lo que la actividad catalítica

del nanomaterial es superior a la del correspondiente sólido macroscópico.^{9,10}

- Propiedades derivadas del *efecto cuántico de la partícula*: el fenómeno por el cual la estructura electrónica de la nanopartícula (y con ella la brecha de energía HOMO - LUMO en un semiconductor) depende directamente de su tamaño se conoce como *efecto cuántico*. Es debido a la transición de molécula o átomo con niveles de energía definidos a sólido con bandas de energía. Ejemplos de estas propiedades son las características ópticas únicas de las nanopartículas de oro,¹¹ o el color y la fotoluminiscencia de las nanopartículas semiconductoras.¹²

En un principio las investigaciones se centraron en nanopartículas constituidas por un único material. Durante la década de 1990 se pasó a la síntesis de nanopartículas multicapas con la idea de mejorar las propiedades de dichos materiales, adoptándose así la terminología de corazón/coraza (*core/shell* en inglés).¹³⁻¹⁵ Las nanopartículas corazón/coraza están constituidas por un material interno (corazón) y por un material externo diferente (coraza). Estos materiales pueden ser de tipo: inorgánico/inorgánico, inorgánico/orgánico, orgánico/inorgánico y orgánico/orgánico. De entre todas estas clases, las nanopartículas corazón/coraza de tipo inorgánico/inorgánico son las más estudiadas.

La incorporación de una *coraza* aporta nuevas propiedades a la nanopartícula:

- mayor estabilidad frente a la oxidación,
- facilidad en el control de la liberación del material interno,
- reducción del consumo de material interno,
- posibilidad de modificar la superficie y/o incremento de su funcionalidad.

En el presente Capítulo nos centraremos en nanopartículas corazón/coraza de tipo inorgánico/inorgánico y, más concretamente, en nanopartículas semiconductoras, también conocidas como puntos cuánticos (QD, por *quantum dot* en inglés).

III.A.2 Nanopartículas semiconductoras o puntos cuánticos (*quantum dots* = QDs)

Los puntos cuánticos, QDs, son nanocristales semiconductores de elementos de los grupos IIB-VIA o IIIA-VA, con dimensiones generalmente en el rango 1 - 10 nm y, por tanto, suficientemente pequeños para exhibir *efectos cuánticos*.^{12,16} Son semiconductores cuyas propiedades electrónicas están directamente relacionadas con el tamaño y la forma del cristal individual; estas propiedades, a su vez, pueden ser controladas de forma precisa con las condiciones de la síntesis (duración, temperatura y reactivos).^{16,17}

Como se mencionó en el apartado anterior, uno de los *efectos cuánticos* es la absorción y emisión de luz dependientes del tamaño. Esta particularidad es una de las características de los QDs (figura III.2).

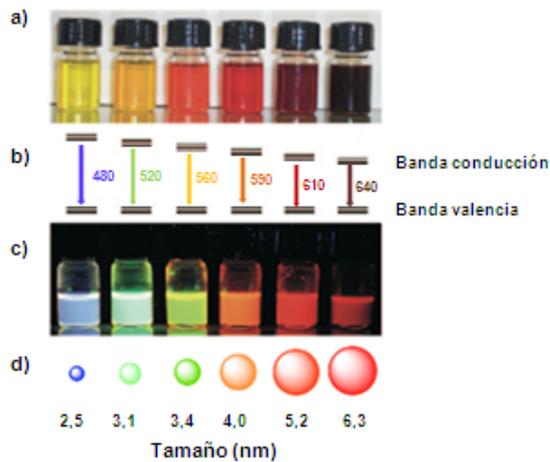


Figura III.2. Nanopartículas semiconductoras (QDs) de CdSe de diferentes tamaños (adaptado de ^{4,18}):

(a) disoluciones (tolueno) en presencia de luz visible (**color**); (b) diagrama de las brechas de energía (E_g) entre las bandas de conducción y valencia; (c) emisión de luz de las disoluciones (tolueno) tras excitación con luz ultravioleta (**fotoluminiscencia**); (d) tamaño de las nanopartículas.

III.A.2.1 El efecto cuántico

Los electrones se encuentran en orbitales moleculares discretos en el caso de moléculas individuales, y en bandas deslocalizadas en el caso de los sólidos. ¿Hasta qué punto una molécula es lo suficientemente grande para que comience a comportarse como si tuviera bandas deslocalizadas en lugar de orbitales moleculares localizados? En el caso de los semiconductores, tanto la teoría como la experimentación nos indican que la respuesta es de aproximadamente 1 a 10 nm. La brecha entre las bandas (*energy gap*) del semiconductor cambia sustancialmente con el tamaño en el intervalo de 1 a 10 nm. Como resultado, el *color* y la *fotoluminiscencia* de la nanopartícula semiconductor dependen del tamaño de la nanopartícula semiconductor (figura III.3). Este comportamiento sorprendente es lo que se conoce como *efecto cuántico*.¹² Y las partículas semiconductores con diámetros en este intervalo de diámetros se conocen como puntos cuánticos o *quantum dots*.

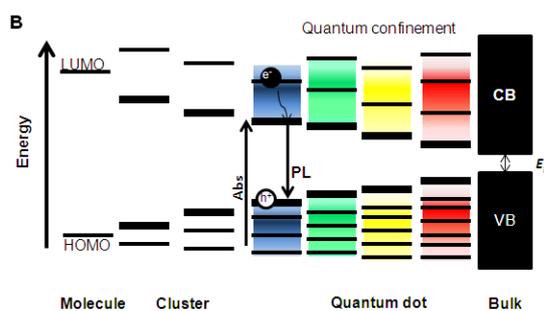


Figura III.3. Esquema de la densidad de estados en una molécula, un *cluster*, un *quantum dot* y un semiconductor macroscópico. La brecha de energía entre las bandas de valencia y conducción (E_g) para un semiconductor es, en general, menor de 4 eV (mayor que la de los conductores y menor que la de los aislantes).¹⁹

La consecuencia más importante del *efecto cuántico* es precisamente que la brecha de energía, E_g , **depende del tamaño de la partícula**.²⁰⁻²² Este hecho permite que el espacio entre las bandas y, por tanto, las propiedades electrónicas dependientes de la misma, puedan ser ajustados modificando el tamaño de los nanocrisales.

Uno de los efectos más espectaculares es la variación del *color*: conforme la partícula se hace más pequeña el espacio de banda se hace más grande y, como resultado, el *color* de la disolución del QD (absorción de luz visible) cambia (figuras III.2a, III.3 y III.4a).

Algunos semiconductores pueden emitir luz cuando se iluminan mediante fotones de mayor energía que el espacio de banda. Este proceso se conoce como *fotoluminiscencia*: un electrón de la banda de valencia absorbe un fotón y es promovido a la banda de conducción, dejando un hueco en la banda valencia; si el electrón excitado cae después de nuevo en el hueco, puede emitir un fotón con una energía igual a E_g . En el caso de los puntos cuánticos, el espacio de banda puede ajustarse mediante el tamaño de los cristales y, de este modo, es posible obtener todos los colores del arco iris a partir de un material único (figura III.2c, III.3 y III.4b).

La figura III.4 muestra cómo las longitudes de onda de absorción y fluorescencia son moduladas por el tamaño de la nanopartícula. Este fenómeno tiene gran aplicación en imaginología médica.

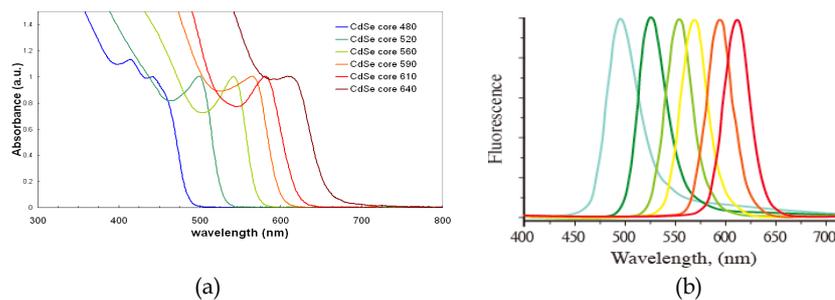


Figura III.4. Esquema de las diferentes longitudes de absorción (a) y emisión (b) que se pueden conseguir con una nanopartícula de CdSe de diferentes tamaños.

III.A.2.2 Tipos de *quantum dots*

Los semiconductores corazón/coraza se clasifican en función de los E_g , o brechas de energía entre sus bandas de valencia y conducción, en tres grupos (figura III.5):

- **Tipo I:** Nanopartículas con una energía E_g del material de la corteza mayor que la del material del corazón. Ejemplos de este tipo son los formados por: CdSe/CdS, CdSe/ZnS y/o CdTe/CdS.²³⁻²⁶
- **Tipo I reverso:** Este grupo es lo contrario al tipo I. La E_g del material de la coraza es menor que la del material del corazón. Ejemplos: CdS/CdSe y ZnS/CdSe.^{27,28}
- **Tipo II:** Este grupo está formado por nanopartículas que tienen las bandas de valencia y de conducción del corazón y la coraza escalonadas entre sí. Ejemplos: CdTe/CdSe, ZnTe/CdS, PbSe/CdSe, y CdS/ZnSe.²⁹⁻³²

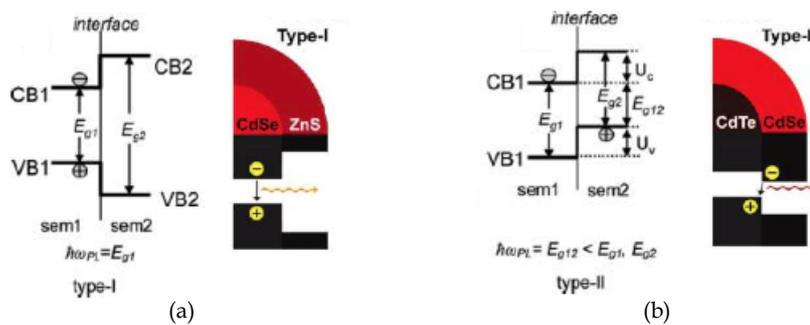


Figura III.5. Esquema de composición de un material semiconductor/semiconductor de tipo I (a) y tipo II (b) (sem1= material corazón, sem2= material coraza).

Unos grupos y otros se diferencian en la estabilidad de la nanopartícula y en las propiedades ópticas.

III.A.2.3 Síntesis y biofuncionalización

Desde que Efros y Ekimov³³ obtuvieran por primera vez, en 1982, nanocristales y microcristales con precursores semiconductores, numerosos grupos de investigación han desarrollado una amplia variedad de métodos sintéticos para la preparación de QDs en diferentes medios. Sin embargo, no fue hasta 1993 cuando Bawendi y col. realizaron el gran avance en la síntesis de QDs al introducir un método sintético capaz de obtener nanopartículas semiconductoras muy cristalinas y con una distribución de tamaño entre 5-10%.³⁴

De forma intuitiva, el proceso de síntesis de los QDs puede explicarse como sigue. Si se quiere formar CdS, se puede mezclar $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ y Na_2S en agua, pero precipitarán cristales grandes de CdS. Sin embargo, si se agrega primero al agua un polímero con carga negativa (como un polifosfato) el Cd^{2+} se asociará con el polímero como lo harían pequeñas “bolas de carne” en el polímero “espagueti”. En este caso, cuando se añade el S^{2-} las partículas de CdS crecen, pero se evita que se formen cristales grandes. Las condiciones de reacción tienen que ser adecuadas para producir nanocristales con forma y tamaño uniformes.

Concretamente, la síntesis de los QDs utilizados en este trabajo (corazón/coraza: CdSe/ZnS) consta de tres etapas (figura III.6):

(i) En primer lugar se añade un polímero con carga negativa (TOPO u óxido de trioctilfosfina) a una disolución de Cd^{2+} . De esta forma se obtiene un intermedio metal-polímero con los iones Cd^{2+} asociados al polímero de TOPO.

(ii) En la segunda etapa se añade un precursor de Se^{2-} (TOP-Se) mediante “inyección directa en caliente”. Se obtienen así las nanopartícula *corazón* deseadas.

(iii) La misma estrategia, pero combinada con otros precursores organometálicos, permite recubrir el corazón inicial con una capa de un material semiconductor distinto que constituirá la *coraza*.

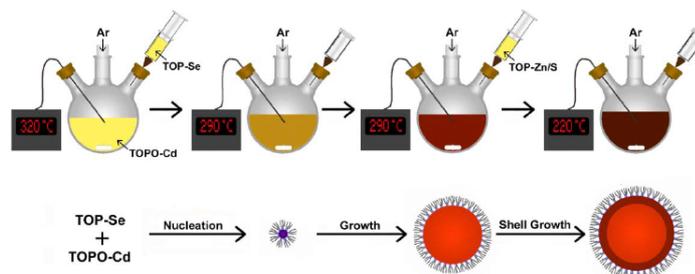


Figura III.6. Esquema de síntesis de nanopartículas corazón/coraza mediante el método de “inyección-caliente” desarrollado por Bawendi y col.³⁴

Como resultado, las nanopartículas están cubiertas por una monocapa de ligandos orgánicos (TOP/TOPO) y son solubles en disolventes apolares (figura III.6).

Para aplicaciones biológicas se necesita convertir estos QDs, hidrofóbicos, en QDs hidrofílicos. La biocompatibilidad se puede conseguir mediante una de estas tres vías (figura III.7):³⁵⁻³⁷

(i) **Intercambio de ligando:** Alivisatos y col. fueron el primer grupo en usar esta estrategia³⁸⁻⁴¹ en la que los ligandos iniciales (TOP/TOPO) se sustituyen por ligandos bifuncionales. Estos últimos presentan, en un extremo, un grupo coordinante capaz de unirse a la superficie inorgánica del QD y, en el otro extremo, un grupo hidrofílico que permite solubilizar la nanopartícula en agua.

(ii) **Formación de una corteza inorgánica:** Este procedimiento implica la formación de una corteza con un polímero de sílice funcionalizado con grupos polares. De esta forma se aísla el QD hidrofóbico y los grupos polares del exterior solubilizan la nanopartícula.^{42,43}

(iii) **Encapsulación en una micela orgánica:** Este enfoque consiste en la adición de moléculas anfifílicas a la nanopartícula. La parte hidrofóbica de las mismas interacciona con las moléculas de TOP/TOPO de los QDs, y la parte polar se orienta hacia el exterior. De este modo se forma una micela que solubiliza al QD. Los ligandos originales permanecen retenidos en la superficie interna del QD y, por tanto, las nanopartículas mantienen las propiedades ópticas previas al proceso de solubilización.^{44,45}

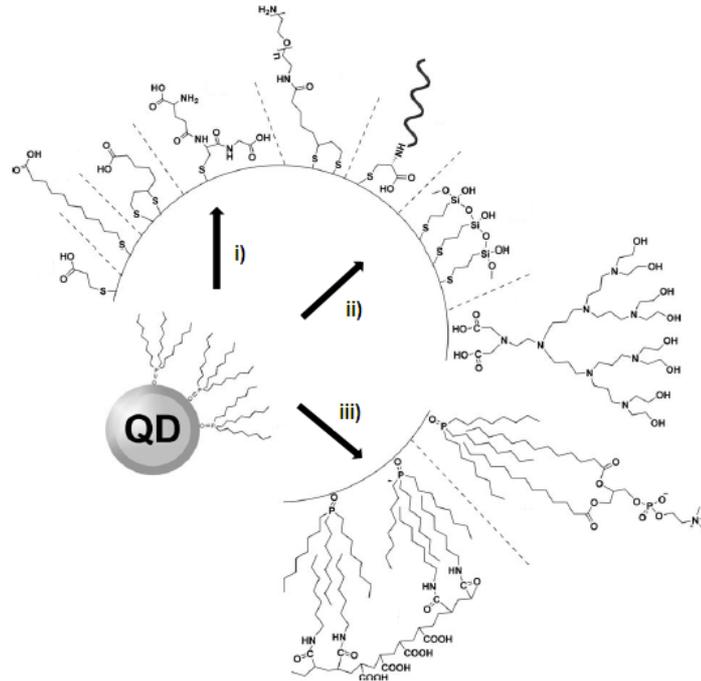


Figura III.7. Estrategias para solubilizar en agua las nanopartículas hidrófobas (adaptado de ⁴⁶).

Como resultado del proceso de solubilización, la nanopartícula puede presentar un gran número de grupos funcionales en su exterior. Estos nuevos puntos de anclaje *permiten su posterior conjugación con biomoléculas de interés* (oligonucleótidos, péptidos, anticuerpos, complejos metálicos,...).

III.A.2.4 Aplicaciones

Una de las interfaces más excitantes de la nanotecnología es el uso de quantum dots en Biología y Medicina. Los QDs son muy brillantes, muy estables, y lo suficientemente pequeños para ser incorporados por las células, incluso después de ser recubiertos con una capa biocompatible.

De forma detallada, las propiedades de los QDs que les confieren interés bioinorgánico son:³⁶

- (i) rendimientos cuánticos altos (los QDs de CdSe/ZnS presentan valores de 0,65 - 0,85 en el espectro visible);
- (ii) coeficientes de extinción molar muy altos (aproximadamente entre 10 y 100 veces mayores que los de las moléculas orgánicas);
- (iii) absorciones amplias (por debajo de la primera banda de excitación presentan un continuo de absorción, ver figura III.4a);
- (iv) espectros de emisión definidos (ver figura III.4b); y
- (v) estabilidad frente a la degradación fotoquímica.

Estas propiedades ópticas los hacen idóneos para aplicaciones biológicas (tanto *in vivo* como *in vitro*) en las que los fluoróforos tradicionales, basados en moléculas orgánicas, presentan claras deficiencias. Pero, sin duda, las dos propiedades que los hacen mejor que sus rivales orgánicos son:

- (a) la capacidad de modificar la fotoluminiscencia en función del tamaño de la nanopartícula; y
- (b) su amplio espectro de excitación, característica que permite, por ejemplo, la excitación de una mezcla de diversos QDs con una única longitud de onda.

Además, la posibilidad de obtener QDs solubles en agua y unidos a biomoléculas específicas los convierte en candidatos para uso en marcaje celular, imagen de tejidos, biosensores y terapia fotodinámica.^{21,47-54}

El mayor inconveniente del uso intensivo de QDs en Medicina está relacionado con su posible citotoxicidad.⁵⁵⁻⁶¹ Ciertos autores consideran que las nanopartículas pueden ser tóxicas. Como mecanismos de la toxicidad se postulan la posible liberación de iones Cd(II) tras oxidación o iluminación, la toxicidad intrínseca de los ligandos que recubren la superficie, y/o la formación de radicales libres tras la interacción de los QDs con los componentes intracelulares. Sin embargo, la pregunta: ¿son los QDs tóxicos? quizá debería ser reemplazada por: ¿a qué dosis los QDs de CdSe con un tamaño de 5 nm que están estabilizados con ácido mercaptoacético y conjugados con un anticuerpo de Herceptina son tóxicos en células HeLa?⁶²

En los últimos años, como alternativa a los QDs *típicos*, de Cd, se están estudiando materiales semiconductores de elementos de los grupos III-A y V-A tales como InP, InGaP o CuInS₂. Pese a que estos materiales presentan mayores dificultades de síntesis, y a que sus propiedades fotoluminiscentes no son aún comparables a las de materiales tipo CdSe, casi con seguridad estos nuevos sistemas reemplazarán a los QDs de Cd en el futuro.

III.B SINERGIA ENTRE *QUANTUM DOTS* (QD) Y EL COBRE(II)-1,10-FENANTROLINA EN RELACIÓN A LA ROTURA DEL ADN*

III.B.1 Antecedentes y objetivos

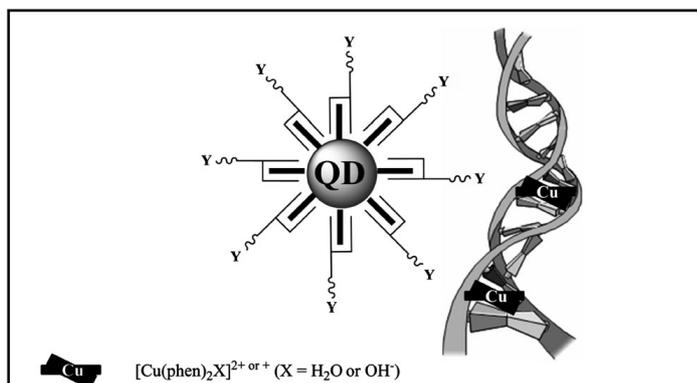
Pese a que el uso de nanomateriales ofrece nuevas oportunidades para la manipulación de los ácidos nucleicos, hay pocos estudios en la bibliografía sobre la capacidad de los QDs para degradar el ADN.⁶³ Por otra parte, el estudio del efecto que los nanomateriales ejercen sobre el ADN tiene interés para evaluar su potencial toxicidad (tanto deseada como no deseada). Se ha descrito algún caso de ruptura del ADN por nanopartículas pero siempre producida tras irradiación con luz ultravioleta.⁶⁴⁻⁶⁸ Un trabajo reciente ha mostrado que determinados nanocristales

* Los resultados que se presentan a continuación han sido objeto de la siguiente publicación: Hernández-Gil, J.; Ferrer Llusar, S.; Maldonado, C. R.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2955–2957.

semiconductores comerciales pueden provocar cierto grado de corte del ADN incluso en la oscuridad;⁶⁹ aunque este resultado es importante a la hora de señalar un posible mecanismo de toxicidad, los QDs en cuestión presentan una eficacia de corte del ADN muy baja.

En el presente Capítulo se desea examinar el uso conjunto de QDs y complejos de cobre(II) para la degradación del ADN. En concreto, se pretende estudiar si la combinación de complejos de Cu(II) con QDs que no interaccionen con el ADN de forma competitiva puede producir la activación de los primeros frente a la ruptura de la doble hebra.

Con el fin de indagar sobre la viabilidad de esta dirección se han preparado QDs de tipo CdSe-ZnS (en realidad, micelas de QDs decoradas con grupos funcionales amino y metoxi), y se ha estudiado la actividad de la nucleasa oxidativa de referencia, la especie $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, en presencia de esos QDs⁷⁰⁻⁷⁴ (esquema III.1).



Esquema III.1. Componentes del sistema de corte del ADN aquí estudiado. QD = micelas de QD conteniendo una mezcla 1:1 de los fosfolípidos DSPE-PEG(2000) Amino y PEG(2000) PE.

III.B.2 Síntesis y caracterización de las nanopartículas

III.B.2.1 Síntesis de las nanopartículas

La obtención de nanopartículas de QD solubles en agua se realizó en dos etapas:^{44,75,76}

- i) Síntesis de QDs de CdSe/ZnS hidrofóbicos.
- ii) Posterior encapsulación de estos QDs en el corazón de una micela formada por fosfolípidos.

A continuación se detallan ambas etapas:

III.B.2.1.1 Síntesis de QD de CdSe-ZnS hidrofóbicos

Los QDs de CdSe/ZnS se sintetizaron y purificaron siguiendo procedimientos descritos en la bibliografía, y basados en la síntesis original de Bawendi y col.:⁷⁷⁻⁷⁹

Se introdujeron en un matraz de fondo redondo con tres bocas 0,013 g (0,1 mmol) de CdO y 0,254 g (0,9 mmol) de ácido esteárico, y la mezcla se calentó a 225 °C bajo agitación y en atmósfera inerte de N₂. Una vez la mezcla estuvo completamente disuelta se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 3 g (7,8 mmol) de TOPO (óxido de tri-n-octilfosfina) y 1 g (4,1 mmol) de HDA (hexadecilamina) y la mezcla se calentó a 225 °C bajo agitación vigorosa y en atmósfera inerte de N₂. A esta temperatura se inyectó rápidamente 1 mL de una disolución de TPB-Se (seleniuro de tri-n-butilfosfina, 1M) en el matraz. Después de la inyección la temperatura se ajustó a aproximadamente 200 °C para favorecer el crecimiento de los nanocristales. Tras alcanzar el tamaño deseado (determinado por espectroscopia UV/vis y fluorescencia) la temperatura se bajó a 100 °C para detener el crecimiento.

A continuación, la disolución se calentó a 210 °C. Una vez alcanzada esta temperatura se inyectaron lentamente 0,5 mL de una disolución stock de ZnS en el matraz. La temperatura se fijó a 100 °C y la mezcla se agitó durante 2 horas. Después, se enfrió a temperatura ambiente.

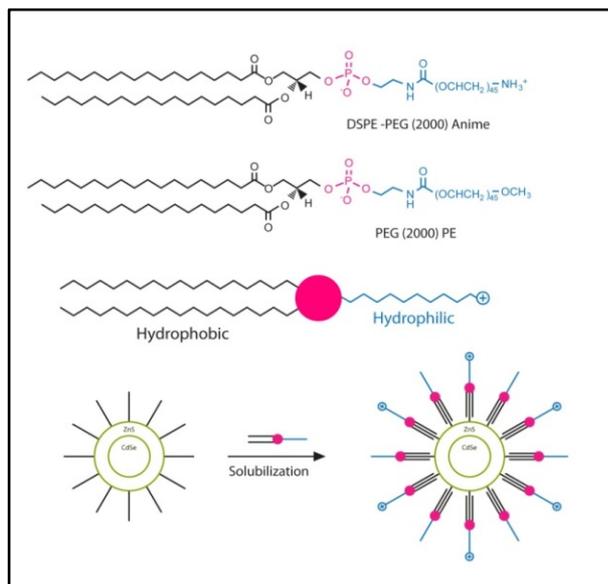
Los nanocristales se dispersaron en cloroformo y se precipitaron mediante la adición de metanol. La suspensión se centrifugó y el sobrenadante fue eliminado. Este procedimiento se repitió 2 veces más. El precipitado resultante se secó bajo corriente de N₂ a temperatura ambiente. El producto final es un sólido marrón (0,650 g).

III.B.2.1.2 Síntesis de micelas de QD CdSe/ZnS

Los QDs de CdSe/ZnS se solubilizaron mediante la formación de una micela orgánica, siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (esquema III.2):^{44,75,76}

Se disolvieron 1,4 mg de CdSe/ZnS QDs hidrofóbicos en 150 μ L de cloroformo ([QD] = 6,7 μ M). De forma paralela, se disolvieron 1 mg (0,4 μ mol) de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilen glicol)-2000] y 1 mg (0,4 μ mol) de 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilen glicol)-2000] en 150 μ L de cloroformo. A continuación, se combinaron ambas disoluciones, de QD y fosfolípidos, en un matraz de fondo redondo de 5 mL. El matraz se dejó abierto a temperatura ambiente durante toda la noche para permitir la evaporación del disolvente. Al día siguiente, el matraz se acopló a un rotavapor y se dejó a vacío durante 1 h con el fin de eliminar las trazas de cloroformo. Posteriormente, el matraz se calentó en un baño de agua a 80 °C durante 30 s, y se añadieron rápidamente 800 μ L de agua desionizada. La adición de agua forma una suspensión que contiene QD hidrofóbicos y QD encapsulados en las micelas de fosfolípidos.

La mezcla se filtró para eliminar los agregados insolubles de QD (tamaño del poro del filtro 0,45 μ m), y posteriormente se centrifugó (92000 rpm durante 45 min). El sobrenadante se descartó (contiene fosfolípidos utilizados en exceso) y el precipitado se redisolvió en agua. Este procedimiento se repitió 2 veces más. El producto final es una disolución acuosa de QDs. La concentración de la misma se calculó por UV-vis.



Esquema III.2. Esquema de la formación de micelas de QD (modificado de ⁴⁷).

III.B.2.2 Caracterización de las nanopartículas

Las imágenes obtenidas mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se muestran en la figura III.8. El estudio muestra que los QD de CdSe/ZnS tienen un diámetro medio de 5,2 nm (4,0 nm de corazón, compuesto de CdSe, y 0,6 nm de grosor de coraza, compuesta de ZnS).

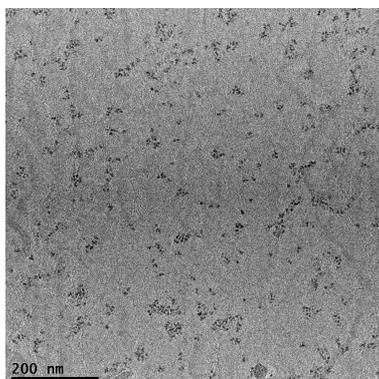


Figura III.8. Imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de los QD sintetizados para este apartado.

Las nanopartículas se caracterizaron también mediante espectroscopia UV-vis y de fluorescencia. Los espectros de absorción y emisión de las nanopartículas (figura III.9) indican que los QDs sintetizados tienen su primera banda de absorción a 620 nm, y un pico de emisión de fluorescencia a 645 nm.

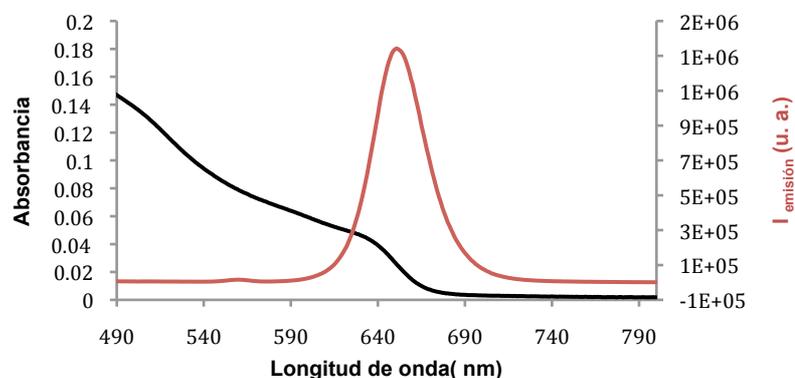


Figura III.9. Espectros de absorción (línea negra) y emisión (línea roja) de los QDs sintetizados.

III.B.2.3 Síntesis y caracterización del complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$

El compuesto $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Cl})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fue sintetizado a partir de un procedimiento descrito en la bibliografía,⁸⁰ de la siguiente forma:

A una disolución de 0,57 g (3,3 mmol) de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de metanol se le añadieron 1,20 g (6,7 mmol) de 1,10-fenantrolina disueltos en 10 mL de metanol, obteniéndose una suspensión de color verde. Tras 30 minutos de agitación, el precipitado se separó por filtración y posteriormente se redisolvió en 25 mL de una mezcla $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 1:1 a 60 °C. La disolución verde-azulada resultante se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristalizador, cubierta con Parafilm. Al cabo de una semana se formaron cristales prismáticos de color verde-azulado que se aislaron mediante filtración. Masa obtenida: 1,1 g, rendimiento: 55 %. Análisis calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{CuN}_4\text{O}_5\text{Cl}_2$ (584,94 g/mol): C: 49,28, N: 9,58, H: 4,48. Encontrado: C: 49,21, N: 9,50, H: 4,15.

III.B.3 Estudio de la interacción QD - ADN

La interacción entre las nanopartículas solubles en agua y el ADN se estudió mediante tres técnicas: espectroscopia de fluorescencia, electroforesis en gel de agarosa y microscopía de fuerza atómica (AFM). A continuación se detallan los resultados obtenidos.

III.B.3.1 Espectroscopia de fluorescencia

Debido a que las nanopartículas son fluorescentes, se desarrolló un ensayo consistente en evaluar los cambios en el espectro de emisión de una disolución de micelas de QDs tras la adición de una serie de alícuotas de una disolución de CT-ADN. Los detalles experimentales se describen en la sección experimental de este Capítulo.

En la figura III.10 se presenta el espectro de emisión del QD en presencia de concentraciones crecientes de ADN. Se incluye también el gráfico de Stern-Volmer, en el que se representa el cociente I_{F0}/I_F frente a la concentración de ADN, siendo I_{F0} e I_F el máximo de intensidad de emisión en ausencia y en presencia de ADN, respectivamente.

Como se observa en la figura III.10, el ADN disminuye la intensidad de emisión de fluorescencia de la disolución de las nanopartículas. Esta tendencia ya fue observada con anterioridad para nanopartículas de CdS.⁸¹ La disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia indica la formación de un aducto entre el biopolímero y la nanopartícula.

Con el fin de cuantificar el proceso se realizó la representación de Stern-Volmer del sistema. A bajas concentraciones de ADN la gráfica es lineal ($R^2 = 0,994$), con un valor de K_{SV} de $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

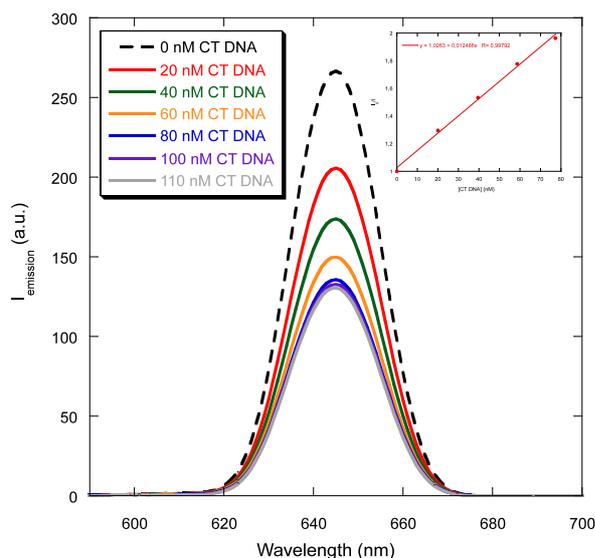


Figura III.10. Espectro de emisión del QD en ausencia (línea discontinua) y en presencia (líneas continuas) de CT-ADN. La flecha muestra el cambio en intensidad al aumentar la concentración de CT-ADN. Imagen interior: gráfica de Stern-Volmer. Condiciones: [QD] = 600 nM, [CT-ADN] = 0-110 nM; tampon cacodilato (0,1 M, pH = 6,0), $\lambda_{\text{excitación}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{emisión}} = 590\text{--}700 \text{ nm}$.

Este valor, muy alto, es del orden de 10^3 superior a los valores descritos para compuestos metálicos o moléculas orgánicas con gran afinidad hacia el ADN (ver capítulo II). Por tanto, la interacción entre este tipo de micelas-QD y el ADN es muy fuerte.

Como uno de los fosfolípidos utilizados para solubiliar los QDs posee un grupo amino terminal (esquema III.2) es previsible que se produzcan interacciones electrostáticas entre la superficie de la nanopartícula (cargada positivamente) y el esqueleto fosforilado del ADN (cargado negativamente). Estas interacciones no serían, por tanto, específicas.^{82,83}

III.B.3.2 Electroforesis en gel de agarosa

Mediante esta técnica se realizaron dos experiencias diferentes para evaluar la interacción QD-ADN. Los detalles experimentales se describen en la sección experimental de este Capítulo.

El primer estudio consiste en incubar ADN de tipo pUC18 (a concentración constante de 37,5 μM) con micelas QD (en un rango de concentración de 0 a 750 nM). La muestra se carga después en el gel de agarosa y se procede a la separación de las distintas formas de ADN como en un ensayo normal de actividad nucleasa.

Los resultados se muestran en la figura III.11. Para concentraciones mayores a 50 nM (carreras 5-9) la cantidad de ADN presente en la banda de SC ADN (Forma I) disminuye progresivamente, observándose la aparición de una estela. En el mismo estudio se incuban las muestras correspondientes a las carreras 3-9 pero *en presencia de fuerza iónica* (50 mM NaCl). La estela producida por los QD en estas condiciones se reduce (carreras 11-16).

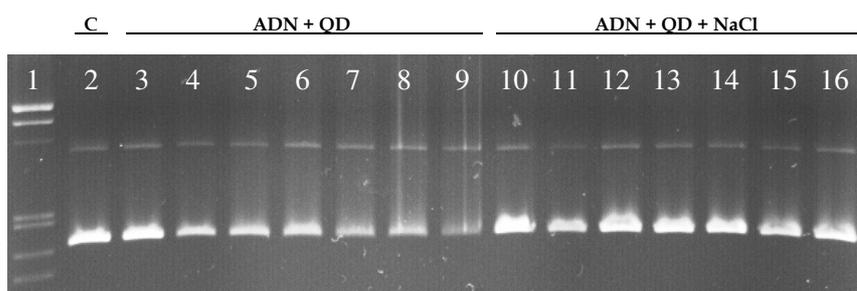


Figura III.11. Estudio de interacción QD-ADN mediante electroforesis en gel de agarosa de pUC18 ADN (37,5 μM) a temperatura ambiente en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) y en oscuridad. Carrera 1: Marcador; carrera 2: ADN control; carrera 3-9: ADN + QD (25, 50, 75, 100, 125, 187,5, 250 nM); carrera 10: ADN control; carrera 11-16: ADN + QD (75, 150, 225, 300, 375, 562,5, 750 nM) en presencia de 50 mM NaCl.

Con el fin de estudiar si la estela observada era consecuencia de la interacción electrostática entre la nanopartícula y el ADN o era debida a la degradación del plásmido, se realizó un segundo experimento.

Se incuban dos muestras de ADN pUC18 (37,5 μ M) con 600 nM QD cada una. La primera muestra se carga directamente en el gel de agarosa. La segunda se pasa por un *kit* de purificación de ADN antes de cargarse en el gel. Este *kit* posee una membrana de fibras de vidrio con una elevada afinidad hacia el polianión. De esta forma se consigue separar el ADN de otras partículas presentes en la mezcla.

La figura III.12 muestra el resultado del experimento. El ADN purificado (carrera 5), presumiblemente desprovisto de QDs, presenta un patrón idéntico al ADN control (carrera 3). El ADN no purificado (carrera 4), con los QDs, muestra una estela similar a la observada en la figura III.11. La menor concentración de ADN en la carrera 5 (respecto a la carrera 3) se debe a las posibles pérdidas de ADN producidas en el proceso de purificación.

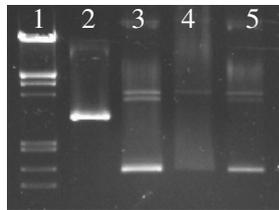


Figura III.12. Ensayo de recuperación de ADN incubado previamente con QD. Electroforesis en gel de agarosa de pUC18 (37,5 μ M) a temperatura ambiente en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) y en oscuridad. Carrera 1: marcador; carrera 2: control de ADN lineal; carrera 3: control de pUC18 ADN; carrera 4: ADN + 600 nM QD; carrera 5: ADN + 600 nM QD, después de pasar la muestra por un kit de purificación de ADN.

De este experimento se concluye que la estela de ADN observada en presencia de QD en el primer ensayo (figura III.11) *no* es debida al corte de la doble hebra. La recuperación del ADN tras el ensayo de purificación indica que en estas condiciones *los QDs no cortan el ADN de forma significativa*.

Los dos experimentos anteriores, el de fuerza iónica y el de purificación, sugieren que la estela se debe a *un equilibrio dinámico* entre el QD y las formas libre y unida del ADN (equilibrio 1). Por una parte, el ADN SC unido por fuerzas electrostáticas a la nanopartícula se queda retenido en el pocillo del gel de agarosa

debido al tamaño de la nanopartícula. Por otra, el ADN libre (no unido al QD) puede entrar en el gel sin dificultad, provocando que se desplace el equilibrio **1** hacia la izquierda y, por tanto, que más ADN SC libre entre en el gel. El equilibrio dinámico hace que el ADN SC entre en el gel gradualmente, lo que explicaría la aparición de una estela de ADN (un *continuo*) en vez de una banda discreta (todo el ADN entra a la vez).



Este tipo de interacción también se ha observado entre proteínas y ADN. De hecho, algunos autores han propuesto que existe cierta analogía entre la unión QD-ADN y proteínas-ADN ^{81,83,84}.

III.B.3.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

Por último, con el fin de “visualizar” la interacción entre la nanopartícula diseñada y el ADN se utilizó la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM, del acrónimo en inglés). De nuevo, los detalles experimentales se describen en la sección experimental de este Capítulo. Las figuras III.13 y III.14 muestran el resultado de este ensayo.

Las concentraciones del experimento son pUC18 ADN 6,25 μM y QD 5 nM. En la figura III.13 se presentan los controles de ADN (a) y QD (b). Ambos controles muestran las imágenes esperadas: en el control de la izquierda se observa la forma superenrollada del ADN pUC18 (forma I); en el de la derecha se aprecia la forma esférica de las nanopartículas.

La figura III.14 muestra la imagen obtenida cuando se incuban de forma conjunta QD y ADN pUC18. Se puede observar cómo prácticamente todos los QDs están interaccionando con el ADN. Hay zonas con nanopartículas unidas a una sola molécula de pUC18 ADN, y zonas con agregados formados por varios QD y varias moléculas de ADN. Este tipo de “superestructuras” formadas por QD y ADN se distinguen bien en la zona central.

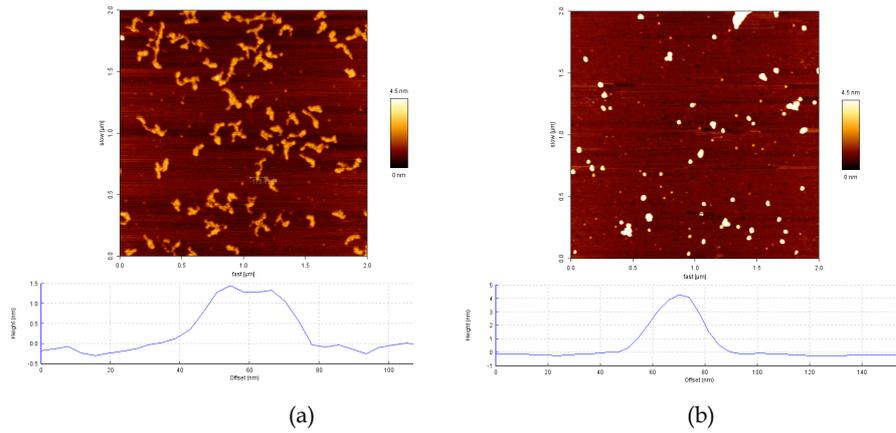


Figura III.13. Imágenes control de AFM para pUC18 ADN (a) y micelas de QD (b).

La imagen corrobora la gran afinidad de la nanopartícula por la doble hélice, previamente puesta de manifiesto con las técnicas de fluorescencia y electroforesis.

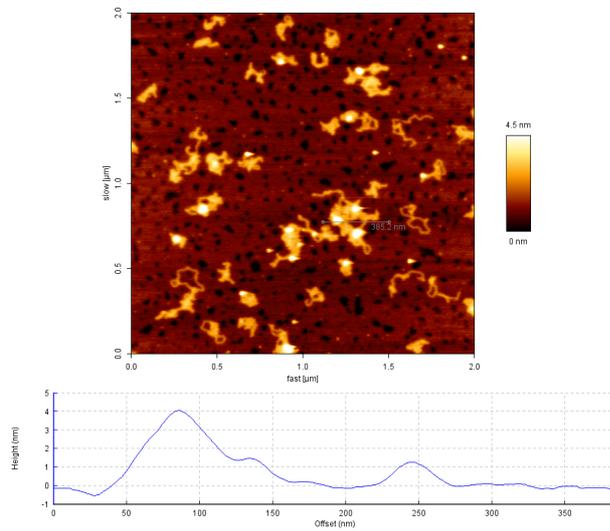


Figura III.14. Imagen de AFM para una muestra con pUC18 ADN + QD incubada a 37 °C durante 2 h.

III.B.4 Estudio de la actividad nucleasa del sistema [Cu(phen)₂]²⁺ - QD

Una vez confirmada la interacción QD-ADN se pasó a estudiar la actividad nucleasa del sistema formado por complejo de cobre(II) más QD mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica se ha utilizado en nuestros ensayos para observar la digestión del ADN por el sistema [Cu(phen)₂]²⁺ - QD, tal y como se describe en la sección experimental de este Capítulo.

Las figuras III.15-III.18 muestran el resultado de las separaciones electroforéticas del corte del plásmido pUC18 inducido por el sistema [Cu(phen)₂]²⁺ - QD.

Se realizaron dos tipos de ensayos: (i) en ausencia de luz (i.e., en la oscuridad), y (ii) con fotoactivación. Para mayor claridad, las carreras de las electroforesis que se van a mostrar se han marcado así: (A) con QD, (B) con [Cu(phen)₂]²⁺, y (A+B) con QD y [Cu(phen)₂]²⁺.

III.B.4.1 Actividad nucleasa en ausencia de luz

La figura III.15 (incluye electroforesis y su correspondiente cuantificación) recoge los resultados del estudio:

- El corte producido por el QD (100 nM) es despreciable (carrera A), como ya se evidenció en la sección anterior.
- El complejo de Cu(II) (2-80 μM) en ausencia de activantes produce cierto corte *per se* (carreras B). La banda correspondiente a la forma circular (forma II) se vuelve más intensa al aumentar la concentración de complejo. Sin embargo, la actividad nucleolítica se puede considerar baja, ya que una concentración 80 μM de complejo sólo genera un 39% de forma II.
- Cuando el QD (100 nM) y el complejo de Cu(II) (2-80 μM) se incuban conjuntamente el corte del ADN aumenta considerablemente (carreras A+B). Así, en presencia de QD, una concentración 5 μM de complejo de Cu(II) es capaz de degradar el 85% de la forma superenrollada (forma I) a forma circular (forma II).

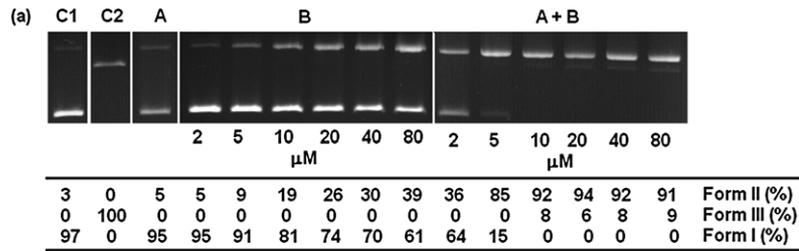


Figura III.15. Estudio representativo de corte del pUC18 en la oscuridad. 25 °C, 5 h incubación, tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0), A: con 100 nM QD, B: con 2-80 μM complejo de cobre(II), A + B: incubados conjuntamente, C1: control de ADN, C2: control de ADN lineal. (Arriba): electroforesis; (abajo): cuantificación de las bandas.

Paralelamente se realizó un estudio cinético, también en la oscuridad, para evaluar la variación de la actividad nucleasa con el tiempo de incubación (0-24 h) de la mezcla QD (75 nM) más complejo de Cu(II) (10 μM). Los detalles experimentales se recogen en la sección experimental de este Capítulo. Los resultados se muestran en la figura III.16.

El ensayo revela que el complejo de Cu(II) en ausencia de nanopartícula tras 24h de incubación sólo es capaz de producir un 30% de forma II (carrera B). En cambio, cuando el compuesto de Cu(II) se combina con QD es capaz de transformar completamente la forma I en formas II y III con únicamente 4 h de incubación (carreras A+B).

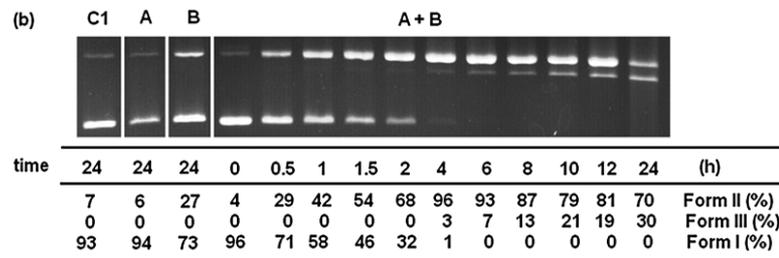


Figura III.16. Estudio cinético de corte del pUC18 en la oscuridad. 25 °C, tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0), A: con 75 nM QD, B: con 10 μM complejo de cobre(II), A+B: incubados conjuntamente, con diferentes tiempos de incubación (0-24 h), C1: control de ADN. (Arriba): electroforesis; (abajo): cuantificación de las bandas.

Las electroforesis anteriores ponen claramente de manifiesto que la adición de QD aumenta de forma importante el corte producido por la metalonucleasa. Este estudio constituye la primera demostración de sinergia entre QDs y complejos metálicos frente a la ruptura de ADN.

Aunque es arriesgado comparar la actividad de diferentes metalonucleasas debido a que las condiciones experimentales y el ADN empleado en cada estudio son diferentes, se podría afirmar que la cooperatividad observada entre el complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y el QD convierte al sistema en uno de los más activos en las condiciones ensayadas [ausencia de luz y de agente reductor, baja temperatura (25 °C), pH 6,0, y concentraciones 10 μM de complejo].⁸⁵⁻⁸⁹

III.B.4.2 Actividad nucleasa con fotoactivación

En estudios previos, Mareque y col. demostraron que en presencia de luz los QDs pueden promover la reducción de complejos de Cu(II) y Pt(IV) a sus especies reducidas de Cu(I) y Pt(II), respectivamente, a través de reacciones de transferencia de electrones inducidas por la luz.^{90,91} Con este precedente, se investigó el efecto de la luz roja sobre el sistema "QD + metalonucleasa".

Para ello, se repitió el ensayo del apartado anterior pero irradiando las muestras con luz roja ($\lambda > 600 \text{ nm}$) en el interior de un fotorreactor CCP-4V, tal y como se describe en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran en la figura III.17. Por comparación con la figura III.15 se puede concluir que:

- El corte del ADN producido por el QD aumenta ligeramente bajo irradiación (carrera A).
- La actividad de nucleolítica del complejo de Cu(II) sin QD es similar en ausencia y en presencia de luz (carreras B).
- La mezcla QD + complejo de Cu(II), produce, de nuevo, un aumento importante del corte con respecto al que producen los

componentes del sistema por separado (carreras A+B). Pero, además, la actividad nucleasa observada bajo activación es claramente mayor que la observada en ausencia de luz.

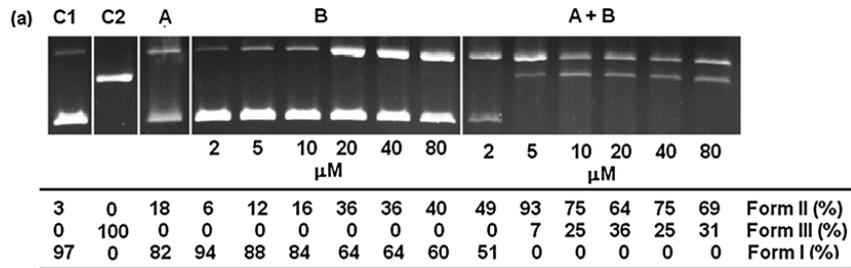


Figura III.17. Estudio representativo de corte del pUC18 en presencia de luz (> 600 nm). 25 °C, 5 h incubación, tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0). A: con 100 nM QD, B: con 2-80 μM complejo de cobre(II), A + B: incubados conjuntamente, C1: control de ADN, C2: control de ADN lineal. (Arriba): electroforesis; (abajo): cuantificación de las bandas.

Se realizó también un *estudio cinético* del sistema en estas condiciones de irradiación (ver detalles en la sección experimental de este Capítulo). El resultado se muestra en la figura III.18.

La figura III.18 (comparar con la figura III.16) refleja el corte producido por el sistema “QD + nucleasa de Cu(II)” cuando la mezcla se incuba con el ADN a diferentes tiempos bajo fotoactivación. Se observa claramente mayor grado de corte cuando las muestras se exponen a la luz.

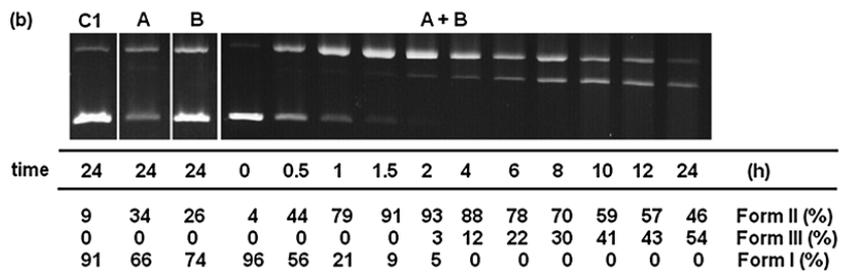


Figura III.18. Estudio cinético de corte del pUC18 en presencia de luz (> 600 nm). 25 °C, tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0), A: con 75 nM QD, B: con 10 μM complejo de cobre(II), A+B: incubados conjuntamente, con diferentes tiempos de incubación (0-24 h), C1: control de ADN. (Arriba): electroforesis; (abajo): cuantificación de las bandas.

Este aumento de actividad podría estar relacionado con la formación de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ promovida por el QD y luz. La reacción de reducción del $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ a $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ sería factible considerando que el E^{red} del complejo es +0,14 V⁹² y el del QD (CdSe) excitado (E_{CB}) es *ca.* - 1,0 V.⁹³

III.B.5 Conclusiones - Discusión

En este Capítulo se ha explorado el efecto de combinar nanopartículas semiconductoras (QDs) y complejos de Cu(II) en la interacción/degradación de los ácidos nucleicos.

1. En primer lugar se han sintetizado nanopartículas semiconductoras de tipo corazón/coraza: CdSe/ZnS. Los nanocristales, inicialmente hidrofóbicos, se han hecho solubles en agua mediante encapsulación en una micela de fosfolípidos. Las nanopartículas se han caracterizado a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM), espectroscopia UV-visible y fluorescencia.

2. A continuación se ha investigado la interacción QD-ADN mediante ensayos de fluorescencia con ADN CT, y de electroforesis en gel de agarosa y microscopía de fuerza atómica (AFM) con plásmido pUC18. Los estudios de fluorescencia revelan que las nanopartículas diseñadas presentan una elevada afinidad por los ácidos nucleicos ($K_{\text{SV}} = 1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Además, la visualización “directa” de la interacción por AFM refleja la formación de “superestructuras” o agregados en los que las nanopartículas esféricas parecen envueltas por hebras de ADN. Por otro lado, el estudio de electroforesis en gel de agarosa de la mezcla QD + pUC18 indica que su actividad nucleolítica es despreciable.

3. Por último, el estudio por electroforesis del corte del plásmido pUC18 por el sistema “QD + $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ ” muestra que, si bien ambos agentes por separado presentan una eficacia nucleolítica limitada, incubados conjuntamente se comportan como una potente nucleasa. Esta sinergia o potenciación es más pronunciada

cuando se irradia la mezcla con luz roja que cuando se incuba en la oscuridad.

Como conclusión, en este Capítulo se ha presentado el *primer ejemplo de cooperatividad entre QDs y complejos metálicos* frente a la ruptura de ADN. Combinaciones similares podrían proporcionar nuevos agentes de corte más eficientes y/o específicos con posibles aplicaciones en campos como la Biotecnología (i.e. nuevos enzimas de restricción) y/o la Medicina (i.e. nuevos agentes de terapia fotodinámica).

Desde otro punto de vista, nuestro resultado también indica que complejos metálicos simples pueden modificar la citotoxicidad del QD. Nadeau y col. ya sugirieron que determinados metabolitos con grupos redox (como la dopamina) son capaces de modificar las propiedades citotóxicas que presentan algunos QDs en presencia de luz.⁹⁴ Sin duda, todos estos aspectos deben ser considerados a la hora de evaluar y/o minimizar los posibles riesgos que presentan las nanopartículas tanto en el campo de la salud como en el del medio ambiente.

III.C DOS NUEVOS COMPLEJOS DE COBRE(II) CON PUENTE μ -GUANAZOL Y AMINAS AROMÁTICAS: CARACTERIZACIÓN Y ESTUDIO COMPARATIVO DE SU ACTIVIDAD NUCLEASA EN PRESENCIA DE AGENTES REDUCTORES Y QUANTUM DOTS*

III.C.1 Antecedentes y objetivos

En el estudio anterior se ha demostrado que las nanopartículas semiconductoras pueden activar el corte del ADN por el sistema $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$.⁹⁵ Como continuación de estos resultados, en este apartado se investiga si los QDs son también capaces de activar un compuesto diferente a la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y, con ello, revelar nuevas pistas sobre el posible papel o mecanismo de acción de estas nanopartículas.

Con este propósito y desde nuestra experiencia en la química de los triazoles se han preparado dos nuevas metalonucleasas basadas en sistemas ternarios triazol-amina aromática. Se han elegido como ligandos el guanazol (un triazol sencillo) para que actúe de puente y permita la obtención de compuestos dinucleares, y la 1,10-fenantrolina/2,2'-bipiridina para favorecer la interacción con el ADN.

*Los resultados que se presentan a continuación han sido objeto de la siguiente publicación: Hernández-Gil, J.; Ferrer, S.; Castiñeriras, A.; Liu-González, M.; Lloret, F.; Ribes, Á.; Čoga, L.; Bernecker, A.; Mareque-Rivas, J. C. *Inorg. Chem.* **2014**, 53, 578-593.

III.C.1.1 Sistemas Cu-phen-L

La capacidad de corte del ADN del compuesto $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en presencia de un agente reductor fue descrita por primera vez por Sigman y col. en 1979. El mecanismo, oxidativo, implica una sucesión de eventos redox en los que intervienen especies activas "cobre-oxo".⁹⁶ Una de las características más sorprendentes de la reacción es la especificidad del sistema por el ligando phen y el absoluto requerimiento del ion cobre.⁹⁶ Se cree que la especie responsable del corte del ADN es el complejo $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2]^+$, que es significativamente más reactivo que la especie $[\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})]^+$, y que la unión de la segunda unidad de fenantrolina se encuentra desfavorecida limitando así sus propiedades como nucleasa.⁹⁷

Diversos grupos de investigación han desarrollado ligandos que presentan dos unidades phen unidas covalentemente, entre ellos, los ligandos 2-clip-phen y 3-clip-phen, que permiten mantener la estequiometría phen:Cu 2:1 a bajas concentraciones.⁹⁸⁻¹⁰⁴ Los estudios de actividad nucleasa han mostrado que los complejos de cobre con estos ligandos tienen mayor actividad que el propio $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, si bien en el mecanismo de acción de estos compuestos intervienen especies ROS diferentes a las del mecanismo de la nucleasa original.^{99,100}

Por otro lado, como se explica en varios Capítulos de esta *Tesis Doctoral* (II, IV), el uso de agentes *bimetálicos* es una estrategia sencilla, y efectiva, para aumentar tanto la capacidad de escisión como la afinidad de la metalonucleasa por el ADN. Algunos de los sistemas más activos de la bibliografía son complejos dinucleares formados por ligandos que contienen *un grupo espaciador*. Esta última característica garantiza la distancia adecuada entre los centros metálicos y favorece la cooperatividad entre ellos.¹⁰⁵

Un diseño alternativo de agentes catalíticos bimetálicos (ver Capítulo IV) consiste en *el ensamblaje de complejos mediante ligandos puente para dar dímeros*.¹⁰⁵ Aunque se han documentado y evaluado diferentes compuestos ternarios Cu(II)-phen-L como nucleasas, sólo unos pocos están constituidos por especies dinucleares.¹⁰⁶⁻¹¹² Entre los ejemplos más recientes de éstos se encuentran: (a) los

compuestos dinucleares $[\text{Cu}_2(\mu\text{-terph})(1,10\text{-phen})_4](\text{terph})$ (H_2terph = ácido tereftálico)^{106,107} y $[\text{Cu}_2(\mu\text{-oda})(\text{phen})_4](\text{ClO}_4)_2$ (H_2oda = ácido octanodioico),¹⁰⁸ que contienen cuatro ligandos phen; (b) una pareja de compuestos con un catión común $[\text{Cu}_2(\mu\text{-CH}_3\text{COO})(\mu\text{-H}_2\text{O})(\mu\text{-OH})(\text{phen})_2]^{2+}$, en los que las unidades di-cobre(II) bis(phen) están triplemente unidas por una molécula de agua, un anión hidroxilo y un anión acetato;^{110,111} y (c) el dímero $[\text{Cu}(\mu\text{-ade})(\text{tolSO}_3)(\text{phen})_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [Hade = adenina, tolSO_3 = anión toluensulfonato].¹¹² En los casos (b) y (c) se ha sugerido que los cambios conformacionales requeridos para la reducción de Cu(II) a Cu(I) se ven comprometidos debido a la rigidez del sistema puente construido.

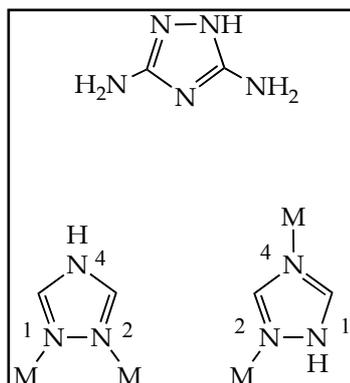
En este Capítulo, en vez de introducir un grupo espaciador flexible capaz de alojar dos unidades phen en un mismo cobre, se ha diseñado un sistema capaz de albergar dos fragmentos *mono*(phen)-Cu^{II} a través de un un puente sencillo μ -triazol. El ligando **guanazol** (guanazol = **3,5-diamino-1,2,4-triazol** = **Hdatrz**) permite obtener dos centros de cobre con posiciones de coordinación lábiles. Simultáneamente se ha preparado un compuesto ternario análogo con bipy (bipy = 2,2'-bipiridina) a efectos de comparación (si bien el compuesto dinuclear resultante contiene un sistema puente diferente).

III.C.1.2 El guanazol

La molécula de guanazol es un ligando versátil. Sin embargo, y a pesar de que se han documentado una gran variedad de compuestos con ligandos 1,2,4-triazol 3,5-disustituidos,¹¹³⁻¹¹⁵ son muy pocas las estructuras descritas con guanazol; de ellas, sólo ocho corresponden a complejos de Cu(II).¹¹⁶⁻¹¹⁹

El ligando guanazol/ato puede actuar como ligando puente de centros metálicos de diferentes formas. A través de reacciones hidrotermales, Yao y col. han obtenido hasta cinco tipos de compuestos de Cd en función del modo de coordinación (esquema III.4): (a) bidentado puente-N1,N2, (b) bidentado puente-N2,N4, (c) tridentado puente-N1,N2,N4 (con desprotonación sobre el átomo N4), (d) tridentado puente-N1,N2,N(amino), y (e) tetradentado

punteo-*N1,N2,N4,N*(amino). Los compuestos de cobre(II) obtenidos por síntesis convencional (no hidrotermal) siempre presentan el modo puente-*N1,N2* bidentado.¹²⁰



Esquema III.4. Guanazol = Hdatrz (arriba); modos de coordinación $\mu_{1,2}$ 1,2,4-triazol y $\mu_{2,4}$ 1,2,4-triazol (abajo).

En este trabajo la reacción del guanazol con el co-ligando 1,10-fenantrolina ha permitido aislar por primera vez un compuesto dinuclear discreto con un único (*sencillo*) puente-*N2,N4*.

III.C.1.3 Objetivos

En este apartado del Capítulo se aborda:

- La síntesis y caracterización de dos nuevos complejos de cobre ternarios dinucleares: el compuesto $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4] = [(\text{Cu}(\text{phen})(\text{H}_2\text{O})(\text{NO}_3)_2)_2(\mu\text{-N2,N4-Hdatrz})]$ (**9**), que contiene un ligando triazol como único puente y dos ligandos quelatos phen, y el compuesto $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2 = [(\text{Cu}(\text{bipy}))_2(\mu\text{-N1,N2-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)](\text{ClO}_4)_2$ (**10**), un compuesto similar pero que contiene como co-ligando bipyridina y un puente guanazolato doble.

- El estudio de la interacción y actividad nucleasa de los compuestos **9** y **10** y su comparación con el agente de Sigman, la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$.

- El estudio de actividad nucleasa de los compuestos **9** y **10** en presencia de QDs para determinar si son también activados por las nanopartículas.

III.C.2 Síntesis de los compuestos **9** y **10**

Los ligandos utilizados para la síntesis de los compuestos **9** y **10** (el guanazol y las aminas aromáticas 1,10-fenantrolina y 2,2'-bipiridina) son reactivos comerciales.

A continuación se detalla la síntesis de los complejos **9** y **10**. El compuesto $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Cl})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ fue sintetizado tal y como se detalla en el apartado III.B.2.3 de este mismo Capítulo.

III.C.2.1 Síntesis de $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$ (**9**)

A una disolución de 1,148 g (5 mmol) de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de agua se le añadieron 0,248 g (2,5 mmol) de Hdatrz disueltos en 5 mL de agua, obteniéndose una disolución verde sobre la que se añadió gota a gota una suspensión de 0,993 g (5 mmol) de 1,10-fenantrolina en 10 mL de agua (la relación de reactivos inicial fue, por tanto, Hdatrz/1,10-fenantrolina/Cu(II) = 0,5:1:1). Inmediatamente se formó una turbidez. La suspensión se mantuvo en agitación durante dos horas. El precipitado verde negruzco formado se separó por filtración; la disolución verde oscuro resultante se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristalizador cubierto con Parafilm. Tras aproximadamente un mes aparecieron unos pocos cristales grandes, prismáticos, prácticamente negros (verde negruzco), no aptos para difracción de rayos-X de monocristal, que se separaron por filtración. Transcurridos aproximadamente 2 meses, a partir de esta segunda disolución se formaron otros cristales prismáticos, más pequeños, de color verde, que corresponden a **9**. Los cristales se aislaron por filtración, se lavaron con agua y se secaron a temperatura ambiente.

Rendimiento (referido a los cristales verdes correspondientes a **9**): *ca.* 0,65 g (*ca.* 30 %). Análisis Elemental: Calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{25}\text{Cu}_2\text{N}_{13}\text{O}_{14}$ (870,67): C: 35,87; H: 2,89; N: 20,91. Encontrado:

C: 35,74; H: 2,87; N: 20,81. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): [$\nu(\text{O-H})_{\text{H}_2\text{O}}$ + $\nu(\text{N-H})_{\text{NH,NH}_2}$] 3318m; [$\delta(\text{N-H})_{\text{NH,NH}_2}$ + $\nu(\text{C=N})_{\text{ring}}$]_{guanazol} 1640m + 1585w; [$\nu(\text{C=N})_{\text{ring}}$]_{phen} 1519m + 1496w + 1427sh; [$\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$] 1385vs; [$\nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$] 1312m; [$\delta_{\text{oop}}(\text{arC-H})$]_{phen} 852m + 721m. UV-vis (sólido): λ_{\max} (nm): 680; UV-vis (H_2O): λ_{\max} (nm) [ϵ_{\max}] ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 654 [255]. Los resultados del análisis elemental y los espectros IR de los cristales negruzcos y de los cristales verdes son muy parecidos pero no idénticos.

III.C.2.2 Síntesis de $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (10)

A una disolución de 0,370 g (1 mmol) de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 20 mL de agua se le añadieron poco a poco 0,156 g (1 mmol) de 2,2'-bipiridina suspendidos en 20 mL de agua. A continuación, a la mezcla se le añadió lentamente una disolución de 0,020 g (0,25 mmol) de Hdatrz en 5 mL de agua, y se mantuvo todo en agitación durante dos horas (la relación inicial de reactivos es, por tanto, Hdatrz/bipiridina/ $\text{Cu}(\text{II}) = 0,25:1:1$). Se formó un precipitado azul claro que se eliminó por filtración. La disolución resultante, de color verde oscuro, se dejó reposar a temperatura ambiente en un cristizador cubierto con Parafilm. Tras un día se observaron cristales prismáticos, de color verde oscuro, válidos para difracción de rayos-X de monocristal. Los cristales se filtraron, se lavaron con metanol y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Rendimiento (sobre los cristales verdes, correspondientes a 10): ca. 0.03 g (ca. 14 %). Análisis Elemental (realizado sobre monocristales): Calculado para $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_9\text{Cl}_2$ (852,57): C: 33,81; H: 3,07; N: 23,00. Encontrado: C: 33,60; H: 3,12; N: 23,15. Datos de FT-IR seleccionados (KBr): $\tilde{\nu}_{\max}$ (cm^{-1}): [$\nu(\text{O-H})_{\text{H}_2\text{O}}$ + $\nu(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$] 3386b,s; [$\delta(\text{N-H})_{\text{NH}_2}$ + $\nu(\text{C=N})_{\text{ring}}$ +] 1656sh + 1618m + 1561m + 1509-1499d,m + 1447m; [$\nu_a(\text{ClO}_4)$] 1121vs + 1090s; [$\nu_s(\text{ClO}_4)$] 769w. UV-vis (sólido): λ_{\max} (nm): 580; UV-vis (H_2O): λ_{\max} (nm) [ϵ_{\max}] ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$): 650 [285]. El espectro IR del precipitado azul claro indica que corresponde a un compuesto binario Cu-bipy- ClO_4^- .

III.C.3 Caracterización de 9 y 10

III.C.3.1 Estructura de rayos-X de

$[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$ (9)

La red de 9 está constituida por unidades dinucleares discretas neutras. La figura III.19 muestra la estructura cristalina del dímero con el esquema (parcial) de etiquetado (para etiquetado completo ver la sección Anexos, figura S1). La tabla III.1 recoge distancias y ángulos de enlace seleccionados. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

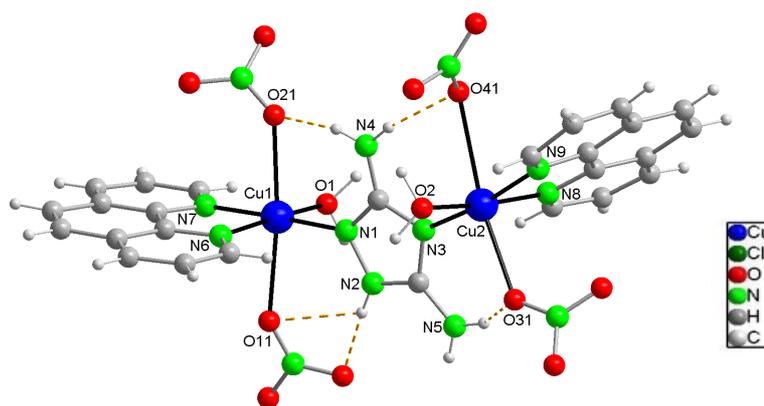


Figura III.19. Vista de la estructura de 9 (se muestran los enlaces de hidrógeno intramoleculares).

En la unidad dinuclear dos átomos de cobre cristalográficamente independientes están unidos por un ligando $\mu\text{-}N(1),N(3)$ -guanazol (puente tipo $\mu\text{-}N2,N4$), con una distancia $\text{Cu} \cdots \text{Cu}'$ de 6,132(3) Å. El ligando triazol se encuentra en forma *neutra*. Ambos iones cobre presentan un entorno de coordinación octaédrico distorsionado tetragonalmente. Cada centro metálico está quelado por una phen en posiciones ecuatoriales; las otras dos posiciones ecuatoriales están ocupadas por un átomo de nitrógeno del triazol [con distancias de enlace de 2,005(2) y 2,010(2) Å] y por un átomo de oxígeno de una molécula de agua (a 1,954(2) Å y 1,967(2) Å). Las cuatro posiciones axiales están ocupadas por los ligandos nitrato monodentados a distancias de semicoordinación

[entre 2,404(3) y 2,692(3) Å]. Por tanto, ambos cromóforos pueden ser descritos como $\text{CuN}_3\text{O}+\text{O}'_2$.

Los ángulos Cu-N-C en el puente triazol son de 136,4(2) y 129,0(2)°. Los planos definidos por las dos moléculas de fenantrolina forman un ángulo diedro de 40,8(1)°; este valor es comparable al encontrado para las dos unidades fenantrolina en la estructura del compuesto $[\text{Cu}(\text{phen})_2](\text{ClO}_4)_2$ (49,9°).¹²¹ A su vez, en **9**, cada molécula de fenantrolina forma un ángulo diedro con el anillo triazol central de 79,6(1)/84,2(1)°; esto hace que los dos ligandos de cada ión cobre (phen-Hdatrz) sean casi perpendiculares entre sí.

En la red cristalina de **9** fuertes enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares ayudan a estabilizar las unidades dinucleares (tabla III.2). La figura III.20 muestra una vista parcial del empaquetamiento del compuesto **9**. La interconexión entre unidades diméricas se produce a través de enlaces de hidrógeno y de interacciones de apilamiento (*stacking*) entre las moléculas de fenantrolina. Las distancias anillo-anillo más cortas se encuentran en el rango 3,7-3,9 Å.

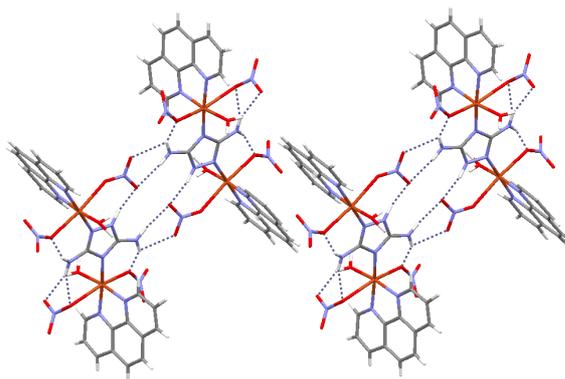


Figure III.20. Vista del empaquetamiento de **9** (detalle de enlaces de hidrógeno intermoleculares y de interacciones de apilamiento).

Por último, cabe mencionar que en la bibliografía no existen análogos ternarios con derivados triazol y fenantrolina, pero sí con ligandos pirazol/ato (pz) y fenantrolina. Entre éstos, que contienen *doble* puente bis(pirazolato) o *doble* puente pirazolato+cloruro,

estarían los compuestos: $[\text{Cu}_2(\mu\text{-pz})_2(\text{H}_2\text{O})(\text{phen})_2(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$ y $[\text{Cu}_2(\mu\text{-pz})_2(\text{phen})_2(\text{NO}_3)_2]$, descritos por Tokii y col.,¹²² así como $[\text{Cu}_2(\mu\text{-pz})_2(\text{phen})_2\text{Cl}_2] \cdot 2(\text{C}_2\text{H}_5\text{OH})$ y $[\text{Cu}_2(\mu\text{-pz})(\mu\text{-Cl})(\text{phen})_2\text{Cl}_2] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, descritos por Spodine y col.¹²³ También se han publicado dos compuestos ternarios conteniendo *un* puente imidazolato y *cuatro* moléculas de phen: el compuesto $[\text{Cu}_2(\mu\text{-imi})(\text{phen})_4](\text{BF}_4)_3 \cdot 2\text{CH}_3\text{OH}$, por Patel y col.,¹²⁴ y el compuesto $[\text{Cu}_2(\mu\text{-imi})(\text{phen})_4](\text{NO}_3)_3$, por Morehouse y col.¹²⁵

Tabla III.1. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para **9**.

Cu(1)-O(1)	1,954(2)	Cu(2)-O(2)	1,967(3)
Cu(1)-N(6)	1,994(2)	Cu(2)-N(8)	2,011(3)
Cu(1)-N(7)	2,005(2)	Cu(2)-N(3)	2,010(2)
Cu(1)-N(1)	2,005(2)	Cu(2)-N(9)	2,027(3)
Cu(1)-O(21)	2,422(2)	Cu(2)-O(31)	2,404(3)
Cu(1)-O(11)	2,492(3)	Cu(2)-O(41)	2,692(3)
Cu(1)-Cu(2)	3,317(3)		
O(1)-Cu(1)-N(7)	91,94(10)	O(2)-Cu(2)-N(3)	90,85(11)
N(6)-Cu(1)-N(7)	82,63(9)	N(8)-Cu(2)-N(3)	96,12(9)
O(1)-Cu(1)-N(1)	91,50(11)	O(2)-Cu(2)-N(9)	90,56(11)
N(6)-Cu(1)-N(1)	93,86(10)	N(8)-Cu(2)-N(9)	82,05(10)
O(1)-Cu(1)-O(21)	91,29(11)	O(2)-Cu(2)-O(31)	91,04(14)
N(6)-Cu(1)-O(21)	93,01(9)	N(8)-Cu(2)-O(31)	91,78(12)
N(7)-Cu(1)-O(21)	87,17(8)	N(3)-Cu(2)-O(31)	96,26(9)
N(1)-Cu(1)-O(21)	93,69(9)	N(9)-Cu(2)-O(31)	91,58(9)
N(6)-Cu(1)-O(11)	84,22(13)	N(8)-Cu(2)-O(41)	89,81(8)
N(7)-Cu(1)-O(11)	86,82(10)	N(3)-Cu(2)-O(41)	97,25(8)

Tabla III.2. Enlaces de hidrógeno seleccionados [distancias (Å) y ángulos (°) de enlace] para **9**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1A)...O(42)#1	0,96	2,29	2,810(4)	113,2
O(1)-H(1B)...O(23)#2	0,96	1,99	2,696(4)	128,7
O(2)-H(2A)...O(32)#3	0,96	1,78	2,718(4)	164,9
O(2)-H(2B)...O(42)	0,96	1,99	2,806(4)	141,6
N(2)-H(2)...O(13)	0,86	1,92	2,780(4)	174,1
N(4)-H(42)...O(41)	0,86	2,05	2,884(4)	164,0
N(5)-H(5B)...O(31)	0,86	2,04	2,812(5)	148,3

Código de simetría: #1 $x+1,y,z$ #2 $-x+1,-y,-z+1$ #3 $-x,-y,-z$

III.C.3.2 Estructura de rayos-X de [Cu₂(μ-datrz)₂(μ-OH₂)(bipy)₂](ClO₄)₂ (10)

La estructura cristalina de **10** está compuesta por cationes dinucleares y dos aniones perclorato por catión. La figura III.21 muestra la estructura de **10** con su esquema (parcial) de numeración (para etiquetado completo ver la sección Anexos, figura S2). La tabla III.3 recoge distancias y ángulos de enlace seleccionados. Los detalles acerca de la toma de datos, resolución y refinamiento de la estructura se adjuntan en la sección Anexo III.

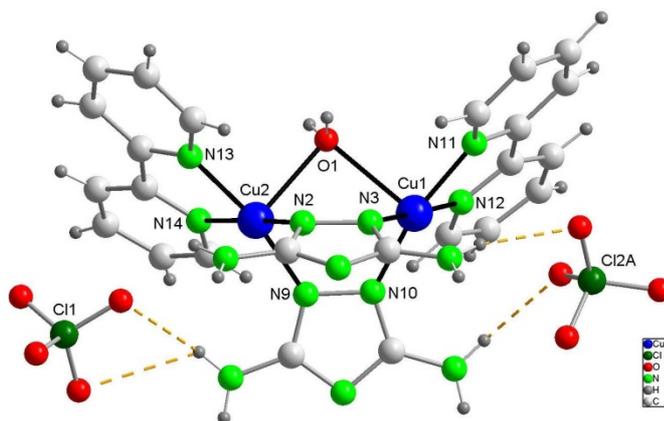


Figura III.21. Vista de la estructura de **10** (incluye los enlaces de hidrógeno que conectan los aniones perclorato con la unidad dinuclear).

En la unidad dinuclear los dos centros de cobre, cristalográficamente independientes, están unidos por tres puentes, dos ligandos μ-*N1,N2*-triazolato y una molécula μ-OH₂, con lo que la distancia Cu··Cu' resultante es corta [3,317(1) Å]. El ligando guanazol está presente en su forma aniónica (por tanto, como *guanazolato* = datrz). Ambos iones Cu(II) exhiben un entorno de coordinación de pirámide de base cuadrada distorsionada, con dos átomos de N triazol y dos átomos de N bipyridina en posiciones ecuatoriales, y un átomo de oxígeno de una molécula de agua [O(1)] en posición apical. Los cromóforos pueden ser descritos, por tanto, como CuN₄+O'.

Si tenemos en cuenta el sistema puente, **10** se puede comparar con el compuesto de la bibliografía $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{H}_2\text{O})_4(\text{SO}_4)](\text{SO}_4) \cdot 3.5\text{H}_2\text{O}$ (**A**).¹²⁶ Las diferencias principales entre ambos compuestos son la presencia de dos ligandos quelantes bipyridina (**10**) en vez de moléculas de agua (**A**) en posiciones ecuatoriales y el carácter aniónico del guanazol puente (**10**). Además, las distancias Cu-N(triazol) observadas en **10** [entre 1,949(3) y 1,991(4) Å] son más cortas que las habituales en compuestos dinucleares de Cu(II) con puentes N1,N2-triazol. Estas distancias son incluso ligeramente menores que las encontradas en el compuesto **A**;^{113-119,126} la desprotonación del ligando guanazol en **10** debe estar relacionada con esta característica.

Los iones Cu(1) y Cu(2) están desplazados 0,0924 Å y -0,1400 Å, respectivamente, de sus correspondientes planos ecuatoriales. Los dos planos ecuatoriales son prácticamente perpendiculares: el ángulo diedro entre ambos es de 84,7(1)°.

Las dos distancias Cu-O(1) son ligeramente distintas [Cu(1)-O(1) = 2,486(2) Å y Cu(2)-O(1) = 2,356(3) Å]. El ángulo Cu(1)-O(1)-Cu(2) es de 86,41(8)°. La distancia Cu··Cu' [indicada anteriormente: 3,317(1) Å] es significativamente menor que la típica para compuestos de cobre(II) con doble puente triazol [4,085(1) - 3,854(6) Å],^{127,128} como cabía esperar porque el grupo $\mu\text{-OH}_2$ hace que el sistema puente se pliegue. Además, esta distancia es de nuevo algo menor que la distancia Cu··Cu' del compuesto **A** [3,495(1) Å], presumiblemente por el carácter aniónico del triazolato. En el sistema puente de **10** los ángulos Cu-N-N [de 118,2(2) a 120,8(2)°] también difieren claramente de los de los dímeros habituales, pero son similares a los del compuesto **A** [119,9(3) y 123,3(3)°].

El compuesto **10** es, junto al compuesto **A**, uno de los pocos ejemplos de compuestos dinucleares con dos puentes $\mu\text{-triazol}$ y un puente $\mu\text{-OH}_2$ y, consecuentemente, con un fragmento {Cu-(N-N)₂-Cu} claramente *no planar*. Otro ejemplo es el compuesto dinuclear de cadmio $[\text{Cd}_2(\text{deatrz})_2(\text{H}_2\text{O})\text{Br}_4]$ (deatrz=3,5-dietil-4-amino-1,2,4-triazol).¹²⁹

Tabla III.3. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para **10**.

Cu(1)-N(10)	1,948(3)	Cu(2)-N(9)	1,960(3)
Cu(1)-N(3)	1,991(3)	Cu(2)-N(2)	1,979(3)
Cu(1)-N(11)	1,999(3)	Cu(2)-N(14)	2,011(3)
Cu(1)-N(12)	2,007(3)	Cu(2)-N(13)	2,016(3)
Cu(1)-O(1)	2,486(2)	Cu(2)-O(1)	2,356(3)
Cu(1)-Cu(2)	3,3165(6)		
N(10)-Cu(1)-N(3)	88,70(14)	N(9)-Cu(2)-N(14)	94,04(14)
N(10)-Cu(1)-N(11)	167,82(13)	N(2)-Cu(2)-N(14)	173,00(14)
N(3)-Cu(1)-N(11)	97,47(13)	N(9)-Cu(2)-N(13)	168,84(13)
N(10)-Cu(1)-N(12)	93,14(14)	N(2)-Cu(2)-N(13)	95,48(14)
N(3)-Cu(1)-N(12)	178,07(13)	N(14)-Cu(2)-N(13)	80,65(14)
N(11)-Cu(1)-N(12)	80,61(14)	N(9)-Cu(2)-O(1)	98,08(11)
N(10)-Cu(1)-O(1)	96,42(11)	N(2)-Cu(2)-O(1)	88,69(11)
N(3)-Cu(1)-O(1)	87,04(11)	N(14)-Cu(2)-O(1)	97,27(11)
N(11)-Cu(1)-O(1)	94,39(11)	N(13)-Cu(2)-O(1)	92,35(12)
N(12)-Cu(1)-O(1)	93,33(11)	Cu(2)-O(1)-Cu(1)	86,41(8)
N(9)-Cu(2)-N(2)	88,75(13)		

La figura III.22 muestra una vista parcial del empaquetamiento cristalino de **10**. Como se ha comentado, el puente μ -OH₂ dobla la estructura. En cada unidad dimérica los planos definidos por las dos moléculas de bipyridina forman un ángulo diedro de 64,0(1)^o; los dos ligandos guanazol definen un ángulo diedro de 73,2(1)^o. Se puede considerar que la estructura carece de interacciones de apilamiento significativas. Sin embargo, sí presenta una red de enlaces de hidrógeno importante (tabla III.4).

Las unidades diméricas se conectan básicamente a través de intensos enlaces de hidrógeno establecidos entre la molécula puente μ -OH₂ de una unidad dimérica y el átomo de nitrógeno N(4) del triazol de una unidad contigua [$d(D \cdots A) = 2,824(4)$ Å], dando lugar a cadenas. A su vez, estas cadenas se unen a otras través de enlaces de hidrógeno dobles entre las parejas de átomos N(7) \cdots H-N(8)* y N(8) \cdots H-N(7)* (* indica que pertenecen a ligandos triazol vecinos), generando así capas (figura III.22). Por último, las capas se enlazan unas con otras mediante enlaces de hidrógeno adicionales en los que están implicados aniones perclorato, resultando un entramado 3D supramolecular.

Como ocurría con el compuesto **9**, en la bibliografía no se han descrito compuestos ternarios de bipyridina comparables al compuesto **10**, con puente triazol, pero sí con ligandos pirazol, tetrazol o imidazol; entre ellos: $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Mepz})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{bipy})_2](\text{NO}_3)_2$ (Tokii y col.),¹²² $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Phtetraz})_2(\text{Phtetraz})_2(\text{bipy})_2]$ (Chen y col.),¹³⁰ y $[\text{Cu}_2(\mu\text{-imi})(\text{bipy})_4](\text{ClO}_4)_3 \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ (Patel y col.).¹²⁴

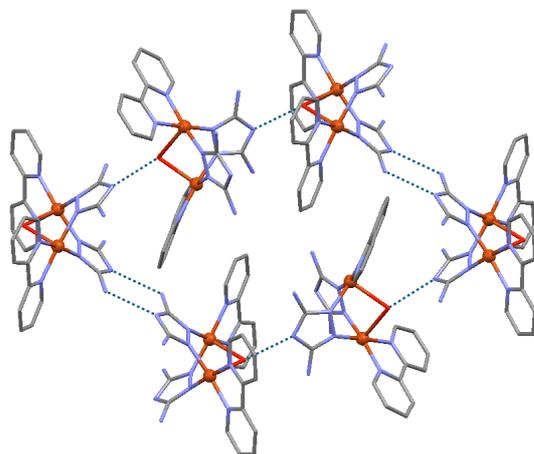


Figure III.22. Vista del empaquetamiento de **10** (se muestran enlaces de hidrógeno intermoleculares).

Tabla III.4. Enlaces de hidrógeno seleccionados [distancias (Å) y ángulos (°)] para **10**.

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1W)...O(24)#1	0,85	2,06	2,872(4)	159,6
O(1)-H(2W)...N(4)#2	0,76	2,09	2,824(4)	161,3
N(1)-H(1A)...O(13)#3	0,94	2,61	3,480(6)	153,2
N(5)-H(5A)...O(21)	0,86	2,23	3,049(6)	157,9
N(5)-H(5B)...O(24)#4	0,86	2,24	3,088(5)	168,9
N(6)-H(6A)...O(22)	0,86	2,32	3,128(8)	157,4
N(6)-H(6B)...O(12)#5	0,86	2,46	3,316(6)	175,0
N(8)-H(8A)...O(13)#3	0,86	2,42	3,196(6)	149,6
N(8)-H(8A)...O(12)#3	0,86	2,67	3,229(6)	123,7
N(8)-H(8B)...N(7)#6	0,86	2,11	2,940(5)	161,5

Códigos de simetría: #1 $-x+1, y-1/2, -z+1/2$ #2 $x, y-3/2, z+1/2$

#3 $-x, y-1/2, -z+1/2$ #4 $-x+1, -y-1, -z$ #5 $x, -y-1/2, z-1/2$ #6 $-x, -y-1, -z$

III.C.3.3 Espectroscopia infrarroja

En la tabla III.5 se muestran las bandas IR más significativas de los dos compuestos ternarios (ver figuras de los espectros en el Anexo II). Las asignaciones se han realizado por comparación con las bandas IR de los ligandos (guanazol y fenantrolina/bipiridina) y de los compuestos binarios $[\text{Cu}(\text{bipy})_2(\text{ClO}_4)_2] \cdot x\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}(\text{phen})_2(\text{Cl})_2] \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sintetizados para este trabajo.*

En la región $3500\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ el guanazol presenta varias bandas agudas, bien definidas, atribuibles a las vibraciones $\nu(\text{N-H})$ de los grupos amino endocíclico y exocíclicos. En el IR de los complejos **9** y **10** se observa una banda ancha, estructurada, centrada a 3318 cm^{-1} (**9**) y 3386 cm^{-1} (**10**), respectivamente, que englobaría además de las vibraciones $\nu(\text{N-H})$, las vibraciones $\nu(\text{O-H})$ de las moléculas de agua coordinada, presentes en la estructura de ambos compuestos. La mayor frecuencia observada para la señal del compuesto **10** podría estar relacionada con la existencia de la molécula de agua *punte*.

Por lo que se refiere a las bandas de mayor valor diagnóstico, el IR del compuesto **9** presenta, por una parte, una banda fuerte estructurada a 1640 cm^{-1} , debida a la presencia del grupo guanazol coordinado, que incluiría las vibraciones $\nu(\text{C=N})$ del anillo y $\delta(\text{N-H})$ y, por otra, un doblete a $1520,1495\text{ cm}^{-1}$ asignable a las vibraciones de anillo de la fenantrolina. También se observa claramente a modo de hombro (a 1427 cm^{-1}) de la banda del anión nitrato, otra banda de anillo de la fenantrolina.

En el caso del compuesto **10** la asignación de las bandas a cada ligando es ambigua. El compuesto binario correspondiente, Cu-bipy, presenta un doblete ($1600,1578\text{ cm}^{-1}$) y un triplete ($1496,1474,1446\text{ cm}^{-1}$), ambos intensos, debidos a las vibraciones $\nu(\text{C=N})$ y $\nu(\text{C=C})$ del anillo. Por otro lado, el espectro IR del guanazol muestra una señal muy fuerte a 1626 cm^{-1} y un doblete intenso ($1584,1543\text{ cm}^{-1}$), que incluirían las vibraciones $\delta(\text{N-H})$ y

*El compuesto binario de bipy se sintetizó aquí para registrar el IR.

$\nu(\text{C}=\text{N})$ del anillo. En esta zona, en el IR de **10** se observan varias bandas entre 1618 y 1447 cm^{-1} que podrían atribuirse indistintamente a uno u otro ligando. Sin embargo, la banda centrada a 1618 cm^{-1} es una banda más ancha, fuerte y estructurada que la de los precursores, indicando con ello que englobaría vibraciones tanto del guanazol como de la biperidina. Por tanto, puede considerarse como indicativa de la formación del compuesto ternario.

En cuanto a las señales de los aniones, para el complejo **9** se aprecia una banda muy fuerte a 1385 cm^{-1} y una fuerte a 1312 cm^{-1} características de los modos $\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$ y $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$, respectivamente, del grupo nitrato. Estos valores están muy próximos a los de la sal iónica¹³¹ y sugieren una semicoordinación, confirmada por la estructura de rayos-X (distancia exp. Cu(II)-ONO_2 en el rango 2,4 - 2,7 Å). En el espectro del complejo **10** aparece una banda muy intensa, desdoblada, a 1121,1090 cm^{-1} , que englobaría las vibraciones $\nu_3+\nu_4$ del anión perclorato, y otra débil a 769 cm^{-1} , que correspondería a la vibración ν_5 . Estos valores, de nuevo muy parecidos a los de la sal iónica,¹³¹ estarían de acuerdo con el papel de contracción del perclorato en la estructura de **10**.

Tabla III.5. Asignación de bandas IR para el guanazol (Hdatrz) y los complejos $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$ (**9**) y $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**10**).*

Compuesto	$\tilde{\nu}_{\text{max}} / \text{cm}^{-1}$		
	$[\nu(\text{O-H}) +/\text{o}$ $\nu(\text{N-H})_{\text{NH} +/\text{o} \text{NH}_2}]$	$[\delta(\text{N-H})_{\text{NH} +/\text{o} \text{NH}_2} + \nu(\text{C=N})_{\text{anillo}}]_{\text{guanazol}} +$ $[\nu(\text{C=N})_{\text{anillo}} + \nu(\text{C=C})_{\text{anillo}}]_{\text{phen,bipy}}$	ν (anion)
Hdatrz	3398 m; 3371 sh; 3309 m; 3235 w	1626 vs; 1584, 1563 d, s; 1487 s; 1354 w	
9 ^a	3318 m	1640 s; 1585 w; 1519 m; 1496 w; 1427 sh	$\nu(\text{NO}_2)_{\text{asym}}$: 1385 vs $\nu(\text{NO}_2)_{\text{sym}}$: 1312 s
10 ^b	3386 b, s	1656 sh; 1618 m; 1561 m; 1509-1449 d, m; 1447 m	$\nu_3 + \nu_4(\text{ClO}_4)$: 1121-1090 d, vs $\nu_5(\text{ClO}_4)$: 769 w

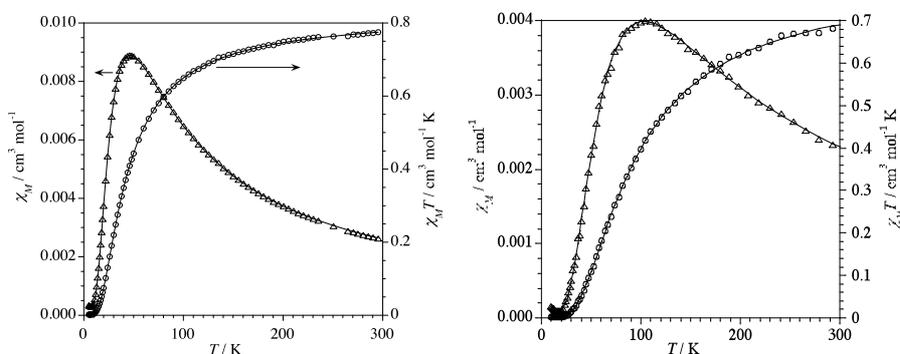
* vs: muy fuerte; s: fuerte; m: media; w: débil; vw: muy débil; d: doblete; b: ancha; sh: hombro;

^a: contiene Hdatrz;

^b: contiene datrz⁻.

III.C.3.4 Propiedades magnéticas de **9** y **10**

La figura III.23 muestra la dependencia con la temperatura de los valores de $\chi_M T$ y χ_M para los compuestos **9** y **10**. Los detalles de las medidas se indican en la sección experimental de este Capítulo.



Figuras III.23. Curvas de $\chi_M T / \chi_M$ vs T para **9** (izquierda) y **10** (derecha) (χ_M es la susceptibilidad magnética por unidad dinuclear) ($\Delta = \chi_M$, $\circ = \chi_M T$ y línea continua = calculado).

A temperatura ambiente ambos compuestos presentan valores de $\chi_M T$ próximos a los esperados para dos iones Cu(II) aislados. Los valores de χ_M aumentan conforme la temperatura disminuye hasta alcanzar un máximo próximo a 50 K (**9**) / 100 K (**10**) y luego caen a temperaturas más bajas. Este máximo en χ_M es característico de compuestos dinucleares de Cu(II) con acoplamiento antiferromagnético moderado-débil. Las dos curvas $\chi_M T$ exhiben primero un descenso suave y después un descenso más pronunciado, tal y como se espera de un acoplamiento antiferromagnético con estado fundamental $S = 0$. Por debajo de 15 K (**9**) / 25 K (**10**) se observa una "cola", atribuible a la presencia de una pequeña cantidad de impurezas paramagnéticas. Los datos magnéticos de **9** y **10** se ajustaron con la ecuación teórica derivada del Hamiltoniano isotrópico (ecuación III.1):

$$\mathbf{H} = -J\mathbf{S}_1\mathbf{S}_2 \quad (\text{ec. III.1})$$

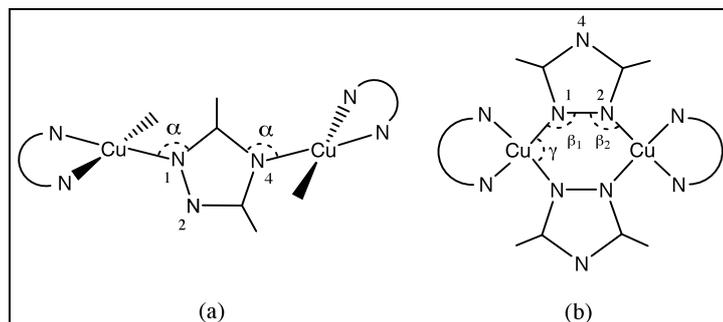
Asumiendo que los factores g para ambos Cu(II) son idénticos, el mejor ajuste se obtuvo con los parámetros J y g que se indican en la

tabla III.6. Para **9** la pureza paramagnética se consideró despreciable; para **10** se calculó un valor de $\rho = 0,35\%$.

Tabla III.6. Parámetros magnéticos para los compuestos **9** y **10**.

Compuesto	J (cm ⁻¹)	g
[Cu ₂ (μ-Hdatrz)(phen) ₂ (H ₂ O) ₂ (NO ₃) ₄] (9)	- 52,1	2,10
[Cu ₂ (μ-datrz) ₂ (μ-OH ₂)(bipy) ₂](ClO ₄) ₂ (10)	- 115,0	2,09

Las *propiedades magnéticas* de **9** presentan un interés evidente debido a la ausencia de datos magnéticos para dímeros Cu··Cu' "discretos" (no poliméricos) con un puente NCN-triazol (N2,N4-triazol). Como se ha indicado anteriormente, en **9** los iones Cu(II) exhiben una coordinación octaédrica distorsionada tetragonalmente (4+2), con el orbital magnético $d_{x^2-y^2}$ dirigido hacia los átomos de nitrógeno del triazol (N_{triazol}) y de la fenantrolina (N_{phen}). En primera aproximación, la vía σ de *superintercambio* depende de los ángulos de enlace formados por los átomos de nitrógeno del puente triazol ($\alpha_1 = \text{Cu}_1\text{-N}_{\text{trz}}\text{-C}_{\text{trz}}$ y $\alpha_2 = \text{Cu}_2\text{-N}_{\text{trz}}\text{-C}_{\text{trz}}$) (esquema III.5).¹³²



Esquema III.5. Sistemas puente triazol en los compuestos **9** (a) y **10** (b).

A diferencia de la ausencia de complejos dinucleares de cobre(II) con puente NCN-triazol, la bibliografía contiene abundantes ejemplos con puente NCN-imidazol^{124,125,132-137} y unos pocos con puente NCN-tetrazol,¹³⁸ para los que se ha determinado el parámetro de

intercambio magnético, J . Diferentes autores han intentado encontrar una correlación magneto-estructural para cada tipo de puente. En el caso de los sistemas *tetrazol*, Colacio y col. establecieron que un factor determinante del acoplamiento antiferromagnético es el valor del ángulo $\text{Cu-N}_{\text{tetraz}}\text{-C}_{\text{tetraz}}$ (α), esto es, cuanto mayor es el ángulo Cu-N-C , mayor es la interacción antiferromagnética.¹³⁸ Por otra lado, Plass y col.,¹³² y más recientemente García-España y col.,¹³⁹ después de analizar una extensa familia de compuestos con ligandos puente *imidazol*, concluyeron que no existe una relación magneto-estructural sencilla entre los parámetros geométricos y J , dado que J depende del ligando puente pero también de los otros co-ligandos, con valores de $-J$ que oscilan entre 34 y 88 cm^{-1} .^{132-137,139,140} En concreto, García-España y col. indicaron que, además del ángulo α , diversos parámetros como las distancias de enlace $\text{Cu-N}_{\text{imidazol}}$, los átomos dadores de los ligandos periféricos y el valor del parámetro de distorsión τ (en el caso de centros de cobre pentacoordinados) pueden influir en el intercambio magnético y contribuir a la interacción global.

Con objeto de proporcionar contexto al compuesto **9**, la tabla III.7 recoge los valores de J y α para una serie de complejos estrechamente relacionados (**a-e**). La lista evidencia que los ángulos Cu-N-C no explican por sí solos la magnitud del intercambio magnético, pero sugiere que el valor de J del compuesto **9** puede ser considerado como *medio* en el contexto de los compuestos con puentes *NCN*.

Como conclusión, resulta evidente que se necesitan más datos cristalográficos y magnéticos para entender de forma correcta el mecanismo del *superintercambio* magnético en este tipo de dímeros, y poder así clarificar la influencia de las propiedades electrónicas de cada tipo de puente (*NCN-tetrazol*, *imidazol* o *triazol*) en el valor del acoplamiento antiferromagnético.

Tabla III.7. Ángulos del puente y constante de acoplamiento antiferromagnético para dímeros de Cu(II) con puentes NCN (ver esquema III.5).

Compuesto ^a	$\alpha = \text{Cu-N}_{\text{ring}}-\text{C}_{\text{ring}}$ ($^{\circ}$)	$-J$ (cm^{-1})	Ref.
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-tetrz})(\text{tren})_2](\text{ClO}_4)_3$ (a)	131, 131	31	134
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-mim})(\text{dien})_2](\text{ClO}_4)_3$ (b)	132, 133	75	128
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-im})(\text{dien})_2](\text{ClO}_4)_3$ (c)	125, 126	64	128
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-bim})(\text{dien})_2](\text{ClO}_4)_3$ (d)	123, 124	37	128
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-imi})(\text{phen})_4](\text{NO}_3)_3$ (e)	124, 126	24	121
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$ (9)	129, 136	52	<i>t. w.</i>

^atetrz = ligando tetrazol; tren = tris(2-aminoetil)amina; mim, im, bim e imi corresponden a ligandos imidazol; dien = dietilentriamina; phen = 1,10-fenantrolina, *t.w.* = esta Tesis.

Las *propiedades magnéticas* del compuesto **10**, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$, son diferentes a las del compuesto **9** porque los dos átomos de Cu(II) están unidos por tres puentes, dos N-N y uno $\mu\text{-OH}_2$ (esquema III.5). A partir de la estructura del cristal se puede considerar que, como en el compuesto **9**, el intercambio magnético ocurre a través de los orbitales $d_{x^2-y^2}$ de los iones Cu(II), que se solapan con los orbitales σ de los átomos de nitrógeno triazol, situados en posiciones ecuatoriales. Se puede esperar también que la interacción de intercambio a través del enlace axial (es decir, del puente $\mu\text{-OH}_2$) tenga una contribución pequeña debido a la baja densidad electrónica de los átomos de cobre sobre el orbital d_{z^2} .

Desde el punto de vista magnético, el compuesto **10** se podría comparar con los complejos de cobre(II) con puente doble $\mu\text{-N1,N2}$ -triazol. No obstante, en la mayoría de esos complejos la unidad $[\text{Cu}_2\text{L}_2]$ es planar y, como ya se ha comentado en la discusión de su estructura cristalina, el compuesto **10** es un dímero de cobre(II) *plegado*.

La tabla III.8 incluye los parámetros estructurales implicados en el sistema puente y los valores de J para los únicos dos compuestos descritos con anillo $[\text{Cu}(\text{N-N})_2\text{Cu}']$ *doblado*: el compuesto **10** y el compuesto **A** de la bibliografía.¹²⁶ En ambos casos el acoplamiento antiferromagnético es menor que en los compuestos análogos con sistemas $[\text{Cu}_2\text{L}_2]$ planares simétricos (*ca.* -200 cm^{-1}),¹²⁶⁻¹²⁸ probablemente debido a que el plegamiento del sistema puente provoca un menor solapamiento entre los orbitales magnéticos de los centros metálicos y los orbitales σ del ligando. Aún así, el intercambio magnético de **10** es algo más intenso que el del compuesto de la bibliografía. Esta diferencia podría explicarse por la desprotonación del guanazol en **10**, lo que conduce a unas distancias de enlace Cu-N más cortas y, con ello, a un mayor solapamiento de los orbitales magnéticos.

La figura III.24 muestra los *espectros EPR* (banda X) sobre muestras policristalinas de **9** (a) y **10** (b) registrados a varias temperaturas (ver detalles de las medidas en la sección experimental de este Capítulo).

A temperatura ambiente los espectros muestran una señal axial-quasi isotrópica cuya intensidad va disminuyendo con la temperatura, como cabe esperar para dímeros de Cu(II) con acoplamiento antiferromagnético [$g_{\text{medio}} \sim 2,10$ a 100 K (**9**) y $g_{\text{medio}} \sim 2,11$ a 100 K (**10**)]. En ambos casos, a bajas temperaturas ($T \leq 15\text{K}$ en **9**; $T \leq 50 \text{ K}$ en **10**) aparece otra señal, débil, correspondiente a las impurezas paramagnéticas.

Los espectros EPR están de acuerdo, por tanto, con las propiedades magnéticas.

Tabla III.8. Parámetros magnéticos y estructurales para compuestos dinucleares de Cu(II) con puente bis(*N*1,*N*2-triazol) y anillo {Cu–N–N}₂ *plegado* (para etiquetado ver esquema III.5).

Compuesto ^a	$\gamma = \text{N-Cu-N}$ (<i>av.</i>) (°)	$\beta_1 = \text{Cu}_1\text{-N}_1\text{-N}_2$ (<i>av.</i>) (°)	$\beta_2 = \text{Cu}_2\text{-N}_2\text{-N}_1$ (<i>av.</i>) (°)	Cu··Cu' (Å)	- <i>J</i> (cm ⁻¹)	Ref.
[Cu ₂ (μ-Hdatrz) ₂ (μ-OH ₂)(H ₂ O) ₄ (SO ₄)](SO ₄) (A)	92,4	122,2	120,8	3,495	94	122
[Cu ₂ (μ-datrz) ₂ (μ-OH ₂)(bipy) ₂](ClO ₄) ₂ (10)	88,7	119,9	118,1	3,317	115	<i>t. w.</i>
[Cu(μ-bpt)(CF ₃ SO ₃)(H ₂ O)] ₂ ^b	90,2	134,7	135,0	4,085	236	137

^a Hdatrz = guanazol; bipy = biperidina, bpt = 3,5-bis(piridin-2-il)-1,2,4-triazolato, *av.* = valores promedio, *t. w.* = esta Tesis.

^b Este compuesto tiene un anillo {Cu–N–N}₂ planar y presenta uno de los valores de *J* más altos; se incluye aquí para proporcionar datos de referencia.

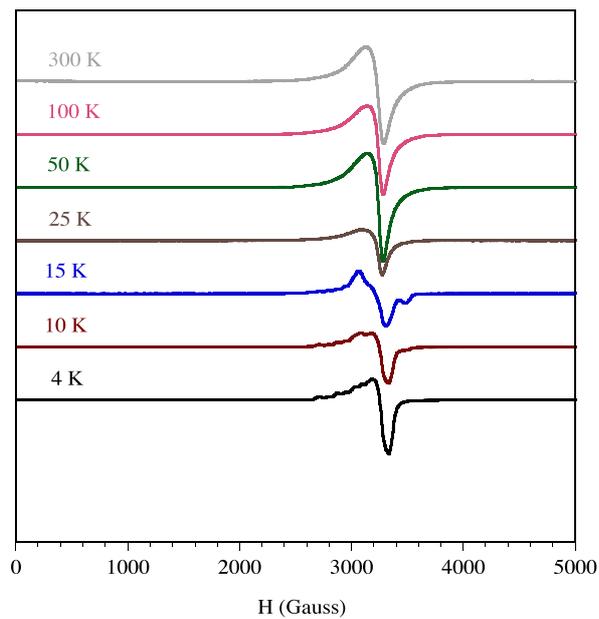


Figura III.24a

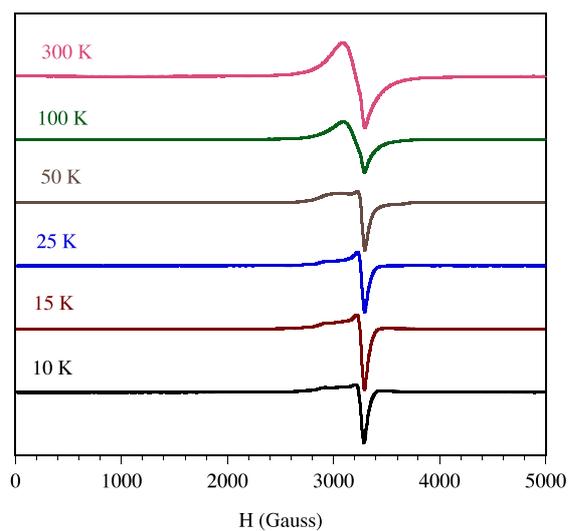


Figura III.24b

Figura III.24a,b. Espectro EPR (banda X) para los complejos 9 (arriba) y 10 (abajo) a diferentes temperaturas.

III.C.4 Estudio de interacción con el ADN de **9** y **10**

Una vez completado la caracterización inorgánica, se procedió a comparar la interacción con el ADN de **9**, **10** y el complejo de referencia $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$.

Como paso previo a los ensayos de interacción, se estudió la estabilidad de los compuestos **9** y **10** en disolución mediante el análisis por espectrometría de masas utilizando la técnica de electrospray (modo positivo). El procedimiento experimental se detalla en la sección experimental de este Capítulo.

El espectro de masas del complejo **9** muestra un pico a $m/z = 708$ asignable a la especie $\{[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{NO}_3)_2]\text{-H}\}^+$, lo que indica que el complejo está presente en disolución como catión dinuclear. Además, la envolvente isotópica del pico, analizada de forma inequívoca debido a la existencia de los isótopos $^{63/65}\text{Cu}$, está de acuerdo con la presencia de dos átomos de cobre y la fórmula empírica correspondiente, $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{Cu}_2\text{N}_{11}\text{O}_6$.

Para el compuesto **10**, el pico a $m/z = 652$, que presenta también la envolvente isotópica esperada para dos átomos de cobre, puede ser atribuido a la especie $\{[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-H}_2\text{O})(\text{bipy})_2]\text{-H}\}^+$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{Cu}_2\text{N}_{14}\text{O}_1$), confirmando así la existencia del catión dinuclear en disolución.

El estudio de interacción se realizó mediante las tres técnicas habituales: fluorescencia, viscosimetría y temperatura de desnaturalización térmica del ADN por espectrofotometría. Los resultados, resumidos en la tabla III.8, se discuten en los próximos apartados.

Tabla III.8. Parámetros experimentales de los estudios de interacción con el CT-ADN (viscosimetría, desnaturalización térmica y fluorescencia) para los compuestos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$.

Compuesto	Viscosimetría ^a (η/η_0) ^{1/3}	ΔT_m (°C) ^b	C_{50} (μM) ^c	K_{app} (M^{-1}) ^d
$[\text{Cu}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$	1,20	9	17,5	$6,5 \times 10^6$
9	1,23	20	41,0	$2,8 \times 10^6$
10	1,00	5	111,3	$1,0 \times 10^6$

^a CT-DNA, valor de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ para: $[\text{compuesto}] / [\text{CT-DNA}] = 0.1$.

^b $[\text{CT-DNA}]/[\text{complejo}] = 4$.

^c C_{50} = concentración necesaria para reducir la fluorescencia al 50%.

^d Valor obtenido de la ecuación: $K_{\text{EB}} [\text{EB}] = [C_{50}] K_{\text{app}}$.

III.C.4.1 Temperatura de fusión del ADN

Como se ha explicado en el Capítulo II, la interacción de complejos metálicos con el ADN puede producir una estabilización en la doble y por tanto aumentar el valor de T_m del ADN. El estudio consiste en registrar la absorbancia a 260 nm de una disolución ADN-compuesto que contiene una concentración fija de ADN y una concentración variable de compuesto, en el rango de temperaturas 25-90 °C, tal y como se detalla en el apartado 1.3.1.2 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

La figura III.25 muestra los desplazamientos de la temperatura de fusión (T_m) como resultado de la asociación de cada uno de los tres compuestos con el CT ADN. En todos los casos se ha restado la absorbancia del complejo a 260 nm (por ello se representan *absorbancias normalizadas*).

El ΔT_m producido por **9** es muy alto; es, incluso, notablemente superior al producido por la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (20 °C frente a 9 °C). Esta observación implica que la estabilización de la doble hélice producida por **9** es más pronunciada. Para el compuesto **10** se observa un ΔT_m de sólo 5 °C, valor muy bajo en relación a los valores habituales de la bibliografía,^{112,141} lo que sugiere una interacción complejo-CT ADN débil.

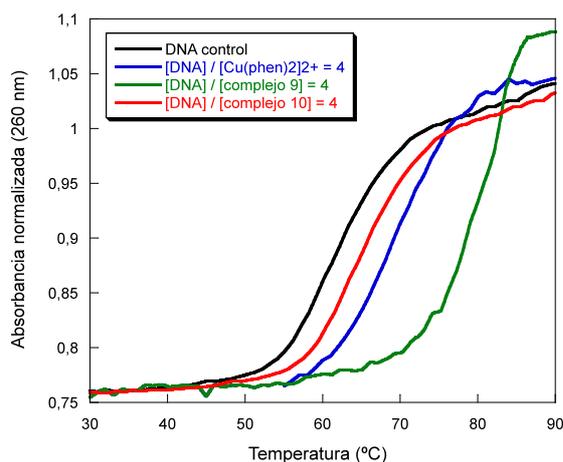


Figura III.25. Estudio de temperatura de fusión del CT-ADN (100 μM): (línea negra) en ausencia de complejo; (línea roja) con complejo **10** (25 μM); (línea azul) con $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (25 μM); (línea verde) con complejo **9** (25 μM) [1 mM tampón fosfato, $I = 2$ mM NaCl (pH = 7,2)].

La literatura muestra que *intercaladores* clásicos como el bromuro de etidio aumentan de forma moderada el valor de T_m de la doble hebra (7,2 $^\circ\text{C}$);^{142,143} también que, *agentes de unión a los surcos* clásicos, como el Hoechst 33258 o la distamicina (o los heterociclos aromáticos relacionados), cargados positivamente, interaccionan de forma electrostática con los surcos, estabilizando así secuencias de ADN y produciendo un aumento considerable del T_m (>25 o 21 $^\circ\text{C}$, respectivamente).^{142,143} El gran ΔT_m observado para **9** sugiere que ambos procesos de interacción, intercalación y unión al surco podrían tener lugar en este caso de forma simultánea.

III.C.4.2 Viscosimetría

La bibliografía enseña que los intercaladores, pero no los agentes de unión a los surcos, producen un aumento en la viscosidad del ADN, por lo que se investigó a continuación el cambio de viscosidad producido por los tres compuestos. El estudio de viscosimetría se realizó según se detalla en el apartado 1.3.1.3 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados se muestran como una representación gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$, donde η es la viscosidad de la disolución tampón-ADN-complejo y η_0 es la viscosidad de la disolución tampón-ADN, frente a relaciones $[\text{complejo}]/[\text{ADN}]$ crecientes. Los efectos producidos en el ADN por diferentes concentraciones de los complejos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ se recogen en la figura III.26.

El estudio de viscosimetría (figura III.26) muestra que el compuesto **9** y la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ se comportan de forma similar: ambos provocan un aumento comparable en la viscosidad del CT-ADN conforme aumenta la relación complejo:ADN, tanto en magnitud como en tendencia. En cambio, el compuesto **10** no produce variación de la viscosidad. Por tanto, las medidas de viscosidad indican que **9** actúa como intercalante (en un grado parecido al de la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$) y que **10** no intercala.

Considerando los resultados de los dos ensayos de forma conjunta se puede concluir que la asociación de **9** con el ADN combina intercalación y unión a los surcos a través de interacciones electrostáticas y/o enlaces de hidrógeno.

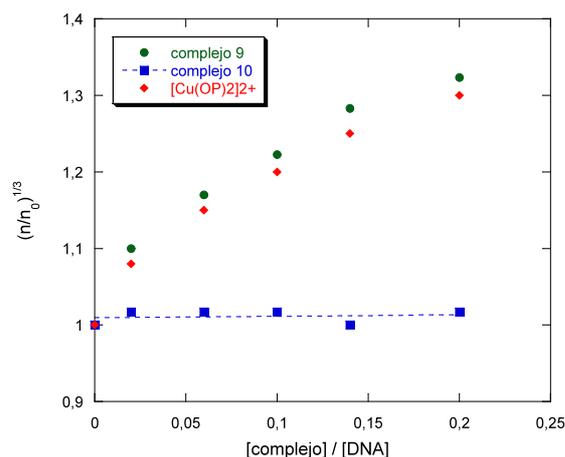
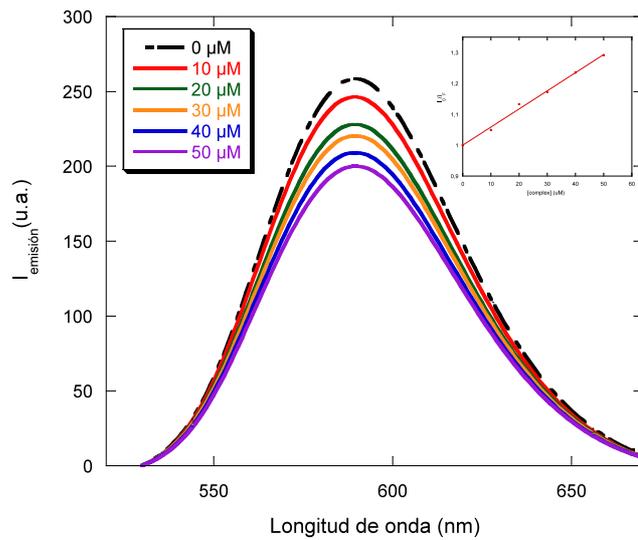


Figura III.26. Ensayo de viscosimetría para los complejos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. Condiciones: CT-ADN $50 \mu\text{M}$, en presencia de 1, 3, 5, 7 and $10 \mu\text{M}$ de complejo $[0,1 \text{ M}$ tampón cacodilato, $\text{pH} = 6,0$].

III.C.4.3 Espectroscopia de fluorescencia

La interacción de los tres compuestos con el CT-ADN se investigó también mediante ensayos de fluorescencia evaluando la intensidad de la emisión de fluorescencia del sistema EB-ADN con la adición de los compuestos. Como ya se ha venido indicando, si el complejo es capaz de desplazar al EB intercalado, la intensidad de emisión a 595 nm se reduce. Se realizaron dos estudios diferentes, siguiendo el procedimiento que se describe en el apartado 1.3.1.1 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo:

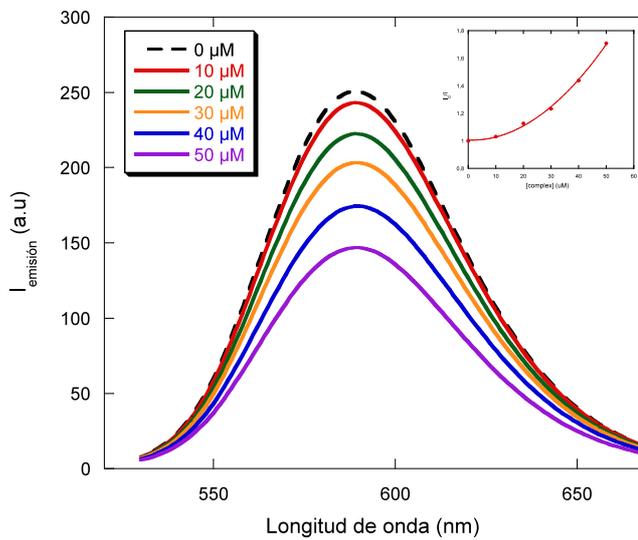
(i) En el primero de ellos, cantidades variables del complejo se añaden a una disolución de ADN tratada previamente con bromuro de etidio (EB) (concentraciones fija). La figura III.27 muestra los resultados para cada uno de los compuestos.



Complejo 9

$$K_{SV} = 5.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

Figura III.27a



$[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$

Figura III.27b

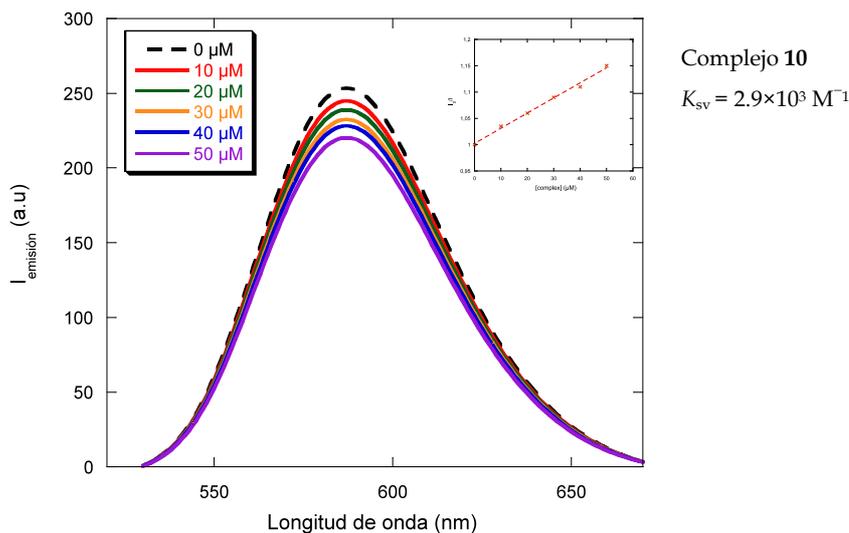


Figura III.27c

Figura III.27a,b,c. Espectro de emisión del EB unido al CT-ADN en ausencia (línea discontinua) y en presencia (línea continua) de: (a) complejo **9**, (b) $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y (c) complejo **10**. **Interior:** Gráfica de Stern-Volmer. Condiciones: $[\text{CT-DNA}] = [\text{EB}] = 50 \mu\text{M}$ $[0,1 \text{ M tampón cacodilato, pH} = 6,0]$.

Los tres compuestos producen un desplazamiento *parcial* del EB del ADN. En el caso de **9** y **10** la disminución de fluorescencia respecto a la concentración de complejo sigue la ecuación de Stern-Volmer $\{I_0/I = 1 + K_{sv} [Q]\}$, lo que ha permitido determinar la correspondiente constante de *quenching* (o inhibición) K_{sv} a partir de la pendiente. Los valores obtenidos, $K_{sv} = 5,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para **9** y $2,9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ para **10**, confirman que **9** tiene mayor afinidad que **10** por el ADN. En el caso de la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ el comportamiento no es lineal (ver gráfica interior), y no se ha determinado la constante.

(ii) En el segundo experimento se realiza una valoración consistente en determinar la concentración de complejo necesaria para reducir al 50% (C_{50}) la fluorescencia de emisión de una disolución de EB-ADN (figura III.28). Como ya se indicó en el la Introducción de esta Tesis Doctoral este parámetro permite calcular la constante de unión aparente, K_{app} , mediante la expresión $\{K_{EB} \times [\text{EB}] = K_{app} \times [\text{complejo}]\}$:¹⁴²⁻¹⁴⁴

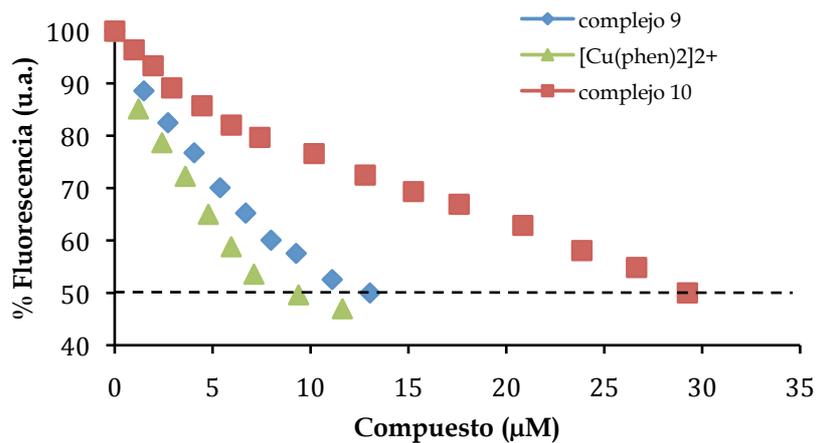


Figura III.28. Estudio de desplazamiento competitivo del EB del sistema EB-ADN por los complejos **9**, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y **10**. Condiciones: CT-DNA 3 μM , EB = 3.78 μM [0,1 M tampón cacodilato, pH = 6,0].

En la figura se aprecia que los valores de C_{50} del compuesto **9** y de la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ son claramente inferiores a los del compuesto **10** y, por tanto, las constantes de unión de **9** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ significativamente mayores que la de **10** (tabla III.8). Este experimento confirma una vez más la mayor afinidad de los dos compuestos de fenantrolina por el ADN.

III.C.4.4 Conclusiones de los estudios de interacción

En base a los estudios realizados (datos recogidos en la tabla III.8), se puede concluir que el compuesto **9** y la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ presentan mayor afinidad hacia el ADN que el compuesto **10**.

El compuesto **9** intercala de un modo similar a la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (ambos provocan un aumento comparable en la viscosidad del CT-ADN). Los ensayos de actividad nucleasa con agentes específicos de los surcos (ver más adelante) indican que ambos compuestos interaccionan por el surco menor. Sin embargo, **9** produce un incremento en el T_m mucho mayor (20 °C para **9** frente a 9 °C para $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$). Por tanto, la interacción de los dos compuestos con el ADN es diferente. En el compuesto **9**, las atracciones electrostáticas con el esqueleto de azúcar-fosfato deben estar más favorecidas que en el caso de la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ como resultado de la existencia de dos centros metálicos. Además, no se debe descartar la posible formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos amino del μ -guanazol y los átomos aceptores de los surcos del ADN.¹⁴⁵

El compuesto **10** pese a no intercalar (no provoca aumento en la viscosidad del CT-ADN) produce una ligera estabilización de la doble hebra (5 °C) y posee una K_{app} media-alta.¹⁴⁶ Esto implica que la interacción con el ADN se produce por otros mecanismos distintos a la intercalación tales como interacciones electrostáticas y/o enlaces de hidrógeno a través de los surcos, ya que se trata de un compuesto dinuclear y posee dos ligandos μ -guanazol capaces de establecer enlaces de hidrógeno con los surcos del ADN.

III.C.5 Estudio de actividad nucleasa *convencional*

III.C.5.1 Actividad nucleasa en ausencia y en presencia de agentes reductores

A continuación se estudió la actividad nucleasa de los compuestos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2\text{Cl}_2]$ mediante electroforesis en gel de agarosa a *diferentes temperaturas* de relevancia biológica.¹⁴⁷⁻¹⁵⁰ El corte del ADN se siguió mediante la transformación de pUC18 superenrollado (Forma I) a circular (Forma II) y lineal (Forma III), tal y como se detalla en el apartado 1.3.2 de la Introducción general. Las figuras III.29 y III.30 recogen los resultados obtenidos.

a) En ausencia de agente activante (y en condiciones aeróbicas), a 35 °C, ninguno de los tres compuestos estudiados produce corte significativo (figura III.29). Sin embargo, al aumentar la temperatura el compuesto **9** presenta ya cierta actividad nucleasa (comparar carreras a 35 y 50 °C).*

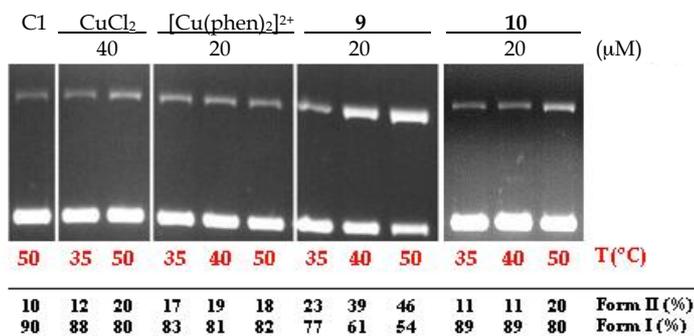


Figura III.29. Ensayo representativo de corte del plásmido pUC18 ADN (37,5 μM) tratado con CuCl_2 , $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, complejo **9** y complejo **10** a diferentes temperaturas (35, 40 and 50 °C) [tampón 50 mM Tris-HCl, pH = 7.2, 2 h]. C1 corresponde al ADN control.

*El hecho de que la actividad de **9** aumente sustancialmente cuando la temperatura aumenta de 35 a 50 °C sugiere que, como otros compuestos de Cu(II), este complejo puede ser capaz de cortar el ADN por mecanismo hidrolítico.

b) En presencia de una pequeña cantidad de MPA (ácido mercaptopropiónico) como agente reductor (0,5x en exceso = 10 μM) (figura III.30), el compuesto **9** y la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ cortan apreciablemente. Nótese que el compuesto **9** produce mayor conversión de la forma I a forma II que la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en las mismas condiciones de reacción. Esta actividad nucleolítica promovida por activación química es también dependiente de la temperatura, ya que a 50 $^{\circ}\text{C}$ el compuesto **9** origina aproximadamente un 60% de forma circular (la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, sólo un 35%).

El compuesto **10** no produce corte significativo del pUC18 ni con MPA ni con H_2O_2 en todo el rango de temperaturas ensayado. Este comportamiento es similar al de otros compuestos ternarios de bipyridina de la bibliografía,¹⁴⁶ que también carecen de actividad nucleasa.

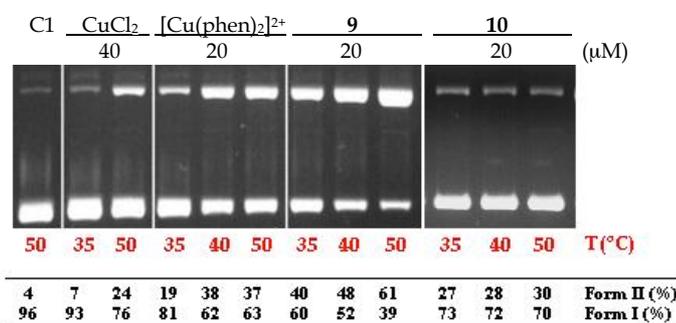


Figure III.30. Ensayo representativo de corte del plásmido pUC18 ADN (37,5 μM) tratado con CuCl_2 , $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y los complejos **9** y **10**, a diferentes temperaturas (35, 40 and 50 $^{\circ}\text{C}$) en presencia de MPA (0,5x de exceso) [tampón 50 mMTris-HCl, pH = 7.2, 2 h]. C1 corresponde al ADN control.

III.C.5.2 Mecanismo de acción

Seguidamente se realizó una aproximación al mecanismo de acción del compuesto **9** y la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ mediante estudio de la actividad nucleasa en presencia de *agentes captadores de ROS*. El procedimiento experimental se explica en el apartado 1.3.2 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

Los resultados sugieren (ensayo no mostrado) que para ambos compuestos al menos una especie ROS ($\cdot\text{OH}$, O_2^- y/o $^1\text{O}_2$) está implicada en el proceso de escisión. En un ensayo adicional con neocuproína se confirmó la participación del Cu(I) en el proceso. Por tanto, el mecanismo de corte debe ser fundamentalmente oxidativo.

En relación a la posible *interacción* de la nucleasa con los surcos del ADN, la bibliografía indica que en la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ una unidad de phen intercala mientras que la segunda se aloja en el surco menor; el surco menor, por tanto, constituiría el sitio de unión y ataque de esta nucleasa química. El compuesto **9** y la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ se incubaron aquí en presencia de Hoechst 33258 (agente del surco menor) y de verde de metilo (agente del surco mayor). La figura III.31 muestra que el corte no se ve alterado por el verde de metilo pero que el agente del surco menor Hoechst 33258 inhibe el corte de los dos complejos, aunque en menor grado el del compuesto **9**. Esta experiencia apunta que el surco menor es el sitio de unión del ADN para ambas nucleasas, aunque con menor especificidad para **9**. Probablemente, el compuesto **9** establece interacciones electrostáticas inespecíficas con los fosfatos externos (y tal vez también interacciones por enlaces de hidrógeno) cuando el surco menor se encuentra unido al agente.

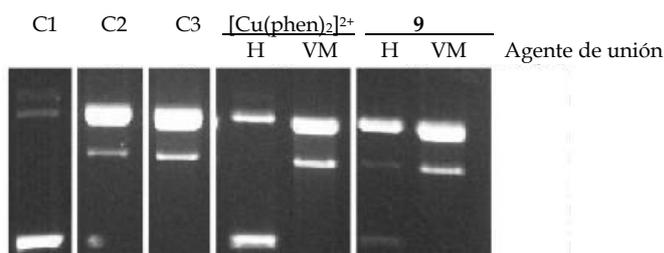


Figure III.31. Efecto de los agentes de unión a los surcos: Hoechst 33258 (H, 40 μM) o verde de metilo (VM, 20 μM) en el corte del ADN superenrollado por el complejo **9** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, donde [pUC18 DNA] = 37,5 μM , [MPA] = 20 μM durante 120 min a 35 $^\circ\text{C}$ [tampón 50 mM Tris-HCl buffer pH = 7,2]. C1 corresponde al ADN control. C2 corresponde al corte del $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en ausencia de agente inhibidor. C3 corresponde al corte del complejo **9** en ausencia de agente inhibidor. (MPA: ácido mercaptopropiónico).

III.C.6 Estudio actividad nucleasa en presencia de QD

III.C.6.1 Actividad nucleasa

En una segunda fase, se investigó la posible sinergia/activación de los compuestos **9** y **10** por el mismo tipo de QDs previamente ensayados con la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (apartado III.B) ^{44,75,76,95}. Los QDs usados en este experimento fueron sintetizados como se ha descrito anteriormente (apartado III.B.2.1) y consisten en nanopartículas hidrofóbicas del tipo corazón /coraza (CdSe / ZnS) encapsulados en micelas solubles de fosfolípidos (esquema III.2).

El estudio se hizo incubando el compuesto *problema* más el QD a diferentes temperaturas (20-50 °C) con el pUC18 durante 2 h. La degradación del ADN se evaluó a continuación mediante electroforesis en gel de agarosa, según el procedimiento experimental descrito en el apartado 1.3.2 de la Introducción general.

La electroforesis de la figura III.32 muestra los resultados obtenidos para el compuesto **9**, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$. Se observa que **el compuesto 9 se activa fuertemente en presencia de QD** (comparar figuras III.30 y III.32): cantidades 20 μM de compuesto **9** combinadas con cantidades extremadamente pequeñas de QD (**15 nM**) son capaces de generar ADN lineal a temperaturas bajas (20 °C). Además, el ADN lineal es gradualmente degradado en fragmentos de tamaño cada vez más bajo, originando estelas en el gel de agarosa a temperaturas fisiológicamente relevantes. El grado de corte de **9** en presencia de QD es mayor que el producido por la misma cantidad de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en presencia de QD; es más, las diferencias entre la actividad de **9** y de la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ son más acusadas en presencia de QD que en presencia de activante químico. De nuevo, la activación por QD es dependiente de la temperatura.

El resultado más sorprendente de este ensayo, sin embargo, es que **el compuesto 10**, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$, inactivo sin y con activantes químicos incluso a temperaturas altas, **en presencia de cantidades 15 nM de QD exhibe actividad nucleasa** (comparar figuras III.30 y III.32). Como ocurre para el compuesto **9**, la activación es dependiente de la temperatura. Así, por ejemplo, a 40 °C el

compuesto **10** ha convertido completamente el ADN superenrollado en circular y lineal. Bajo esas condiciones el QD no produce corte significativo del ADN y, a concentraciones más altas de la nanopartícula, la migración del ADN no se observa por la formación de aductos QD - ADN, que son retenidos en los pocillos.

Concluyendo, el QD es capaz no sólo de potenciar una metalonucleasa {la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y el compuesto **9**} sino también de transformar en activo un compuesto de Cu(II) que no corta *per se* ni con activación *convencional* (compuesto **10**).

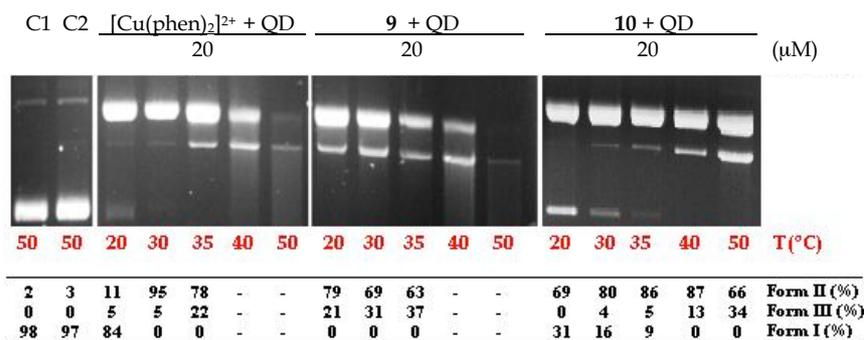


Figure III.32. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN ($37,5 \mu\text{M}$) tratado con $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y los complejos **9** y **10**, a diferentes temperaturas (20, 30, 35, 40 and 50°C) en presencia de QD (15 nM) durante 2 h [tampón 50 mM Tris-HCl, pH = 7.2]. C1 : control ADN, C2: control ADN + QD.

III.C.6.2 Mecanismo de corte y función del QD

El estudio del mecanismo de ruptura e influencia de los QD en el mismo se realizó según el protocolo descrito en la sección experimental de este Capítulo. La figura III.33 recoge el resultado del mismo.

En presencia de QD (figura III.33), los estudios de actividad nucleasa con agentes captadores de especies reactivas de oxígeno (ROS) muestran un efecto claramente inhibitor de la especie Tiron (captador de iones O_2^-), indicando así que el corte producido en estas condiciones se produce por un mecanismo oxidativo. Además, la neocuproína inhibe la degradación del ADN, lo que apunta al Cu(I) como especie intermedia en el proceso de rotura oxidativa del ADN.

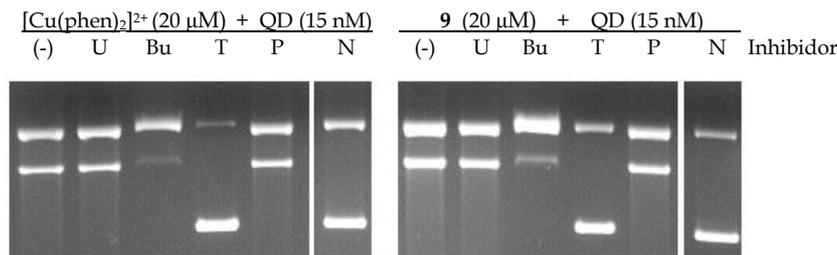


Figure III.33. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por la [Cu(phen)₂]²⁺ o el complejo 9 (20 μM) y 15 nM QD, en presencia de inhibidores, incubado en tampón Tris-HCl (50 mM, pH = 7,2) durante 2 h a 37 °C. U = urea; Bu = t-BuOH; T = Tiron; P = 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona; N = neocuproína.

III.C.6.3 Estudio de la actividad nucleasa de otros sistemas

[M(phen)₂]ⁿ⁺ en presencia de QD

Con objeto de profundizar en el mecanismo de activación del QD se llevó a cabo un último ensayo complementario.

Diversos autores afirman que la actividad del [Cu(phen)₂]²⁺ depende del Cu(II).⁹⁷ Con este precedente, en una última experiencia se incubaron mezclas de una disolución de phen con una disolución de M(II,III) [M = Cu(II), Co(II), Ni(II), Zn(II) o Fe(III)] en una proporción phen / Mⁿ⁺ igual a 2:1, en diferentes condiciones: (i) sin agente activante, (ii) con MPA (ácido mercaptopropiónico), (iii) con ascorbato, y (iv) con QD. Los detalles de esta experiencia se recogen en la sección experimental de este Capítulo. La figura III.34 recoge los resultados.

La figura muestra que el QD únicamente activa el sistema [Cu(phen)₂]²⁺. En resumen, el QD es capaz de inducir la ruptura del ADN en presencia del compuesto de Cu(II) inactivo 10, pero no en presencia de especies [M(phen)₂]²⁺ si Mⁿ⁺ no es Cu(II).

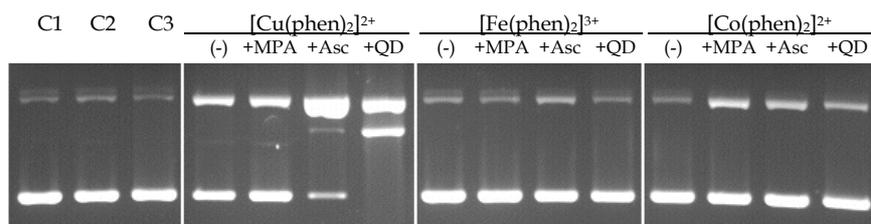


Figure III.34. Ensayo representativo de corte del pUC18 ADN (37,5 μ M) tratado con diferentes complejos [M(phen)₂]ⁿ⁺ (Mⁿ⁺ = Cu(II), Fe(III) or Co(II)), a 35 °C en ausencia de un agente activante, o en presencia de MPA (0,5x en exceso), ascorbato (0,5x en exceso) y/o QD (15 nM) durante 2 h [tampón 50 mM Tris-HCl= 7.2]. C1: ADN control, C2: DNA + phen (40 μ M) y C3 a DNA + QD (15 nM). MPA = ácido mercaptopropiónico, asc = ácido ascórbico.

Una primera hipótesis sobre la función de los QDs en estos sistemas es que, las nanopartículas, como las histonas, en contacto con el ADN producen un *cambio conformacional* que aumenta las posiciones de unión ofrecidas a las nucleasas (esto es, el número de unidades nucleasa que entrarían en contacto con la doble hélice sería mayor).^{81-83,151} Las imágenes AFM del plásmido pUC18 tras la adición de QD (ver apartado III.B.3) muestran claramente la unión de los QDs a la doble hélice. El análisis de la sección del aducto QD - ADN sugiere que el ADN se enrolla alrededor de las nanopartículas proporcionando así evidencia experimental a la idea de que los QDs actúan como las mencionadas proteínas. De esta manera, el compuesto **10**, con baja afinidad por el ADN, en presencia de QDs ubicaría sus centros Cu(II) en posición idónea para producir el corte oxidativo. Además, los ensayos con inhibidores sugieren también que el QD puede participar como *agente reductor* favoreciendo la generación de especies reactivas de oxígeno y de especies intermedias de Cu(I). Se pretenden realizar ensayos adicionales que confirmen la implicación del QD en la catálisis redox.

En definitiva, con estos resultados proponemos que el papel del QD a la hora de promover la ruptura del ADN por las metalonucleasas de Cu(II) es múltiple y combina *efectos estructurales* y *redox*. Comparado con otros agentes activantes como el MPA o el H₂O₂, que se necesitan en concentraciones micromolares y sólo contribuyen a la generación de ROS, el QD parece ser más eficiente y versátil, requiriendo sólo concentraciones nanomolares.

III.C.7 Conclusiones - Discusión

Los resultados de este Capítulo pueden resumirse como sigue:

1. Se han preparado y caracterizado estructuralmente dos compuestos ternarios de Cu(II) con guanazol y aminas aromáticas: el compuesto $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$ (**9**) y el compuesto $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**10**), ambos dinucleares, con uno y dos puentes guanazol/ato, respectivamente.

2. El compuesto **9**, con dos centros Cu(II) unidos por un único puente, representa el primer ejemplo de un complejo *discreto* Cu-(NCN-triazol)-Cu'. Esta característica ha permitido calcular por primera vez la constante de acoplamiento antiferromagnético para este tipo de puente: $J(\mu_{2,4}\text{-trz}) = -52 \text{ cm}^{-1}$. El compuesto **10**, con un sistema puente Cu-(N-N)₂-Cu' *no planar*, exhibe una constante de intercambio antiferromagnético alta: $J(\mu_{1,2}\text{-trz}) = -115 \text{ cm}^{-1}$.

3. Se han evaluado las propiedades de interacción y corte con el ADN de ambos compuestos y se han comparado con las de la nucleasa $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$:

3.1 La actividad nucleasa del compuesto dicobre-bis(phen) (**9**) es ligeramente mayor que la del sistema $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. La intercalación en **9** es comparable a la observada para la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ pero, probablemente, la posibilidad de formar enlaces de hidrógeno y la presencia de dos centros positivos en **9** permite una mejor interacción con el ADN.

Estos resultados muestran que dos unidades de $\{\text{Cu}(\text{phen})\}$ conectadas adecuadamente pueden ser tan eficientes como una de $\{\text{Cu}(\text{phen})_2\}$.^{70,71,96,99,100}

3.2 El compuesto dicobre-bis(bipy) (**10**) muestra una débil interacción con el ADN y, subsecuentemente, escasa actividad nucleasa, con y sin agentes activantes convencionales.

4. Se ha evaluado la actividad nucleasa de los tres compuestos en presencia de QD. En los tres casos la presencia de QD produce un aumento dramático en las propiedades nucleolíticas. Esta activación es especialmente llamativa en el caso del compuesto **10**, con poca afinidad por el ADN e inactivo, que se convierte en una nucleasa eficiente.

El QD actuaría como una plataforma inorgánica a la que se une el ADN de forma no específica, de tal manera que la doble hebra se enrolla sobre la superficie curva de la nanopartícula, quedando así más expuesta al ataque de la nucleasa (ver figura III.35).^{82,83} El QD debe participar también en la generación de especies redox activas actuando como un agente reductor.

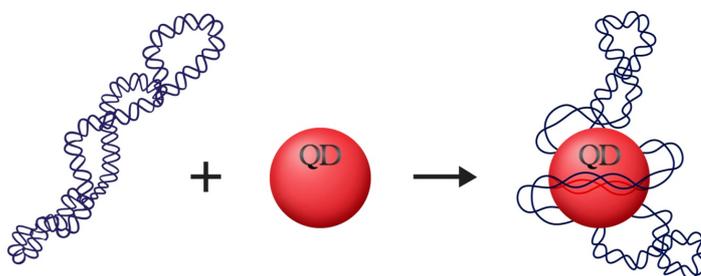


Figura III.35. Hipotética forma de interacción QD - ADN.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales y Reactivos

Las sales de cobre, guanazol, 1,10-fenantrolina, óxido de cadmio, óxido de tri-n-octil-fosfina, tri-n-butilfosfina, hexadecilamina, dietilzinc (1M en hexano), hexametildisilazano, cloruro de níquel(II), N-hidroxisuccinimida y N-N-bis(carboximetil)-L-lisina fueron suministrados por Sigma. 1-Etil-3-[3'-(dimetilamino)propil]carbodiimida fue suministrado por Ademtech. Ácido esteárico fue comprado de Fluka. Selenio en polvo fue suministrado por Alfa Aesar. 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] (PEG(2000)PE) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG(2000)Amine) fueron comprados a Avanti Lipids, Inc.

El resto de reactivos químicos utilizados eran de alto grado de pureza, y fueron comprados de casas comerciales y usados tal y como se recibieron. *Reactivos biológicos*: Plásmido pUC18 (0,5 µg/µL, 750 µM en nucleótidos) en TE (Tris 10 mM and EDTA 1 mM, pH = 8,0) fue comprado a Fermentas. Calf Thymus (CT-DNA), tipo XV, fue obtenido de Sigma.

Instrumentos y Métodos

El porcentaje de C, H y N fue determinado con un analizador elemental CE Instrument EA modelo 1110 CHNS del S.C.S.I.E de la Universidad de València. Los espectros infrarrojos se obtuvieron en un espectrofotómetro Mattson Satellite FTIR en la región entre 4.000 y 400 cm⁻¹. Como diluyente para preparar las muestras, en forma de pastilla, se ha utilizado KBr. Los espectros de masas del complejo mediante la técnica de Electrospray en modo positivo (ESI⁺) se realizaron en el S.C.S.I.E de la Universidad de València. Para los espectros de baja resolución ESI-MS se utilizó un equipo Bruker Esquire 3000 plus LC-MS, mientras que para los espectros de alta resolución ESI-MS un equipo ABS Giex Triple TOF 5600. Las medidas de susceptibilidad magnética con variación de temperatura se realizaron sobre monocristales triturados usando un susceptómetro Quantum Interference Design (SQUID) en el rango de temperatura 1,9-300 K. Las correcciones diamagnéticas de los átomos se estimaron a partir de las constantes de Pascal. Los espectros de resonancia paramagnética electrónica se realizaron en un espectrómetro Bruker ELEXSYS operando en la banda-X (frecuencia: 9,5 GHz, longitud de onda: 3,2 cm, campo H₀: 3.400 Gauss) en el rango de temperaturas de 10-300 K. Los estudios de microscopía de transmisión electrónica (TEM en inglés) fueron realizados en un microscopio electrónico del tipo JEOL JEM-2011 a 200 kV. Las muestras fueron preparadas mediante la deposición de una gota de la disolución de nanocristal en un *grid* de cobre recubierto con una película ultrafina de carbono. Tras la completa evaporación del disolvente se procedió a la medida. Los monocristales de los complejos **9** y **10** han sido medidos con un difractor Bruker X8 KappaAPEXII, en la Universidad de Santiago de Compostela. Los detalles de la toma de datos y refinamiento de las estructuras se indican en el Anexo.

Técnicas para el estudio de la interacción de QDs con el ADN

Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente. El experimento consistió en la adición de alícuotas de una disolución de CT-ADN sobre una disolución de trabajo de QD (600 nM) en tampón cacodilato (0,1 M, pH 6,0). Después de cada adición, se registró la emisión de fluorescencia del QD en el intervalo 580-700 nm mediante la excitación de la disolución a 400 nm.

Electroforesis en gel de agarosa

El estudio se basó en la incubación de muestras pUC18 ADN - QD a concentraciones fijas de ADN (37,5 μ M) y concentraciones variables de QD (0-250 nM) en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0). Paralelamente se prepararon las mismas muestras en presencia de NaCl (50 mM). A continuación se añadió a cada muestra una disolución (tampón de carga, 4 μ L) compuesta de azul de bromofenol (0,25%), xilencianol (0,25%), glicerol (30%), y EDTA (250 mM). A continuación, las muestras se cargaron en un gel de agarosa (0,8 %) en tampón TBE 0,5x (0,045 M Tris, 0,045 M ácido bórico y 1 mM EDTA) que contenía una concentración de 2 μ L/100 mL de una disolución madre de bromuro de etidio de (10 mg/mL). Las muestras se separaron en el gel tras aplicar una corriente de 120 V durante 2 h. Las bandas se fotografiaron mediante una cámara UVIdoc HD2 (UVItec Cambridge).

Para el estudio de recuperación se preparó una muestra pUC18 ADN - QD a una concentración de 37,5 μ M de ADN y de 200 nM de QD. Tras la incubación, la muestra se dividió en dos: una se cargó directamente en el gel de agarosa tras previa adición del tampón de carga (0,8 %) y la otra se pasó por un kit de purificación de ADN (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostics, Germany) y posteriormente se trató igual que la primera muestra.

Microscopía de Fuerza Atómica (AFM en inglés)

Las medidas de AFM fueron realizadas en un microscopio JPK Nanowizard II AFM y se utilizaron cantilavos Nanoworld FM. Los aductos ADN - QD fueron preparados mediante la mezcla de 1 μ L de pUC18 DNA (0,25 μ g/ μ L), 2 μ L de una disolución 600 nM de QD, y 237 μ L de tampón (50 mM HEPES, pH 7,2), obteniendo un volumen final de 240 μ L. Los aductos ADN - QD - complejo fueron preparados mediante la mezcla de 1 μ L de pUC18 DNA (0,25 μ g/ μ L), 2 μ L de QD (600 nM), 4 μ L del compuesto 9 (0,25 mM disolución stock), y 233 μ L de tampón (50 mM HEPES, pH 7,2), obteniendo un volumen final de 240 μ L. El control de ADN consistió en 1 μ L de pUC18 DNA (0,25 μ g/ μ L) y 239 μ L de tampón HEPES, y el control de QD consistió en 2 μ L de QD (600 nM) y 238 μ L de tampón HEPES. A continuación, todas las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 2 h mediante el uso de un Termociclador. Para la inmovilización de la muestra, 30 μ L de las disoluciones descritas anteriormente se

añadieron a una superficie de mica funcionalizada previamente con una disolución 0,5 μM de (3-aminopropil)trietoxisilano (APTES) durante 30 min con el fin de aumentar la afinidad de la muestra por la superficie de mica. Las muestras fueron incubadas durante 5 min en la superficie de mica, y posteriormente se lavó dicha superficie con 300 μL de agua nanopura por triplicado (sin llegar a secar la superficie). Posteriormente, las muestras se dejaron en agua nanopura durante 30 min y a continuación se quitó toda el agua nanopura con una pipeta y se secó la superficie con una corriente de Ar. La adquisición de las medidas se realizó en aire y se utilizó el modo de contacto intermitente con una velocidad de medida de 0,5–1 Hz.

Técnicas para el estudio de la interacción de los complejos con el ADN

Fluorescencia

Los espectros de fluorescencia se registraron con un espectrofluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente. Se utilizó bromuro de etidio (EB) como referencia para determinar las propiedades de unión al DNA (Calf-Thymus DNA Tipo XV, CT-DNA) de los complejos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. Se prepararon distintas disoluciones DNA-Complejo-EB (volumen final de 3 mL), que contenían distintas concentraciones de complejo (0, 10, 20, 30, 40 y 50 μM) y donde la concentración de EB y de CT DNA era de 50 μM en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0). Los espectros de emisión se registraron entre 530-670 nm y la longitud de onda de excitación se estableció en 500 nm. Los resultados se presentan en forma de gráficos de Stern-Volmer, donde se representa el cociente de I_0/I_F frente a la concentración de complejo (donde I_0 es el máximo de intensidad de emisión en ausencia de complejo e I_F es el máximo de intensidad de emisión para cada una de las disoluciones que contienen complejo).

Para los estudios de desplazamiento competitivos, los experimentos se realizaron mediante la adición de alícuotas de los diferentes complejos en una disolución 3 μM CT-DNA ($\epsilon_{260} = 13,200 \text{ M}(\text{bp})^{-1} \text{ cm}^{-1}$) y 3,78 μM EB en tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) hasta que la fluorescencia inicial disminuyó al 50 %. Las disoluciones stock de los complejos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ fueron preparados en el mismo tampón a una concentración 0,5 mM. Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron a 500 y 595 nm, respectivamente. Las constantes de unión aparentes se calcularon a partir de la ecuación:

$$K_{\text{app}} = K_{\text{EB}} \times (3.78/C_{50})$$

En donde $K_{\text{EB}} = 3 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Este valor de K_{EB} (a pH = 6,0) se calculó mediante el procedimiento descrito en la bibliografía.³⁰

Temperatura de fusión del DNA

Los experimentos para determinar la temperatura de fusión del DNA (temperatura a la cual el 50% de la molécula de DNA está desnaturalizada, T_m), se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-vis Agilent 8453 equipado con un regulador de temperatura Peltier Agilent 89090A.

Para determinar la temperatura de fusión del DNA se registraron los espectros de absorción entre 210 y 1000 nm de muestras que contenían CT-DNA (100 μ M) en ausencia o presencia de los compuestos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (se usaron proporciones $[\text{CT-DNA}]/[\text{complejo}] = 4$) en tampón fosfato 1mM, NaCl 2 mM (pH = 7,2). Los parámetros se programaron para obtener una medida de absorbancia tras el aumento de 1° C en el intervalo de temperatura de 25-90° C.

Los resultados aparecen en forma de gráfico que representa la absorbancia relativa (260 nm) frente a la temperatura. El valor de T_m es calculado por el software del ordenador.

Viscosimetría

Las medidas de viscosidad se realizaron a 25 °C utilizando un viscosímetro Ubbelodhe semi-micro sumergido en un baño termostatzado Julabo ME16G.

Se prepararon disoluciones de 4 mL que contenían distintas concentraciones de los complejos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ (0, 1, 3, 5, 7 y 10 μ M) y una concentración de CT DNA fijada a 50 μ M en tampón cacodilato (0,1 M, pH= 6,0). Los tiempos de elución se tomaron por triplicado para cada una de las disoluciones preparadas. Los valores de viscosidad se calcularon a partir de la expresión $\eta = t - t_b$, donde t es el tiempo de elución para cada una de las disoluciones preparadas y t_b es el tiempo de elución del tampón. Los resultados se representan en una gráfica de $(\eta/\eta_0)^{1/3}$ frente al cociente de la concentración de complejo y la concentración de CT DNA (η es la viscosidad de la disolución de CT DNA-complejo, y η_0 es la viscosidad de la disolución de CT DNA, en ausencia de complejo).

Técnicas para el estudio de la actividad nucleasa

Electroforesis en gel de agarosa

En el **apartado III.B** de este Capítulo se ha recogido el estudio de actividad nucleasa del compuesto $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y QD en ausencia y presencia de luz. En ambos casos, la habilidad de corte de los complejos se examinó mediante la conversión de pUC18 ADN superenrollado (Forma I) en las formas circular (Forma II) y lineal (Forma III) usando la técnica de electroforesis en gel de agarosa para separar los diferentes productos de corte. Las disoluciones del complejo de cobre(II) fueron preparadas antes de cada ensayo y mediante la disolución del producto cristalino en el tampón biológico empleado.

Para estudiar la activación de las nanopartículas a la $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en ausencia de luz, las reacciones se realizaron mediante la mezcla de volúmenes adecuados de una disolución stock de 200 μM de $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, 0,5 μL de una disolución de pUC18 DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM en nucleótidos), y cantidades adecuadas de tampón cacodilato (0,1 M, pH = 6,0) para completar un volumen de 18 μL . Después de 5 minutos de incubación, una disolución de micelas QDs fue añadida para conseguir la concentración deseada de complejo y QD (volumen total 20 μL). A continuación, las muestras fueron incubadas a 20 $^\circ\text{C}$ y en ausencia de luz.

Para los estudios en presencia de luz, las reacciones se prepararon de la misma manera y a continuación se introdujeron en un fotoreactor de tipo CCP-4V (Luzchem Research) provisto de 10 lámparas LZC-vis con filtros rojos (impiden que pase la luz por debajo de 600 nm).

La reacción en cada uno de los experimentos (ausencia y/o presencia de luz) se detuvo mediante la adición de una disolución (tampón de carga, 4 μL) compuesta de azul de bromofenol (0,25%), xilencianol (0,25%), glicerol (30%), y EDTA (250 mM). A continuación, las muestras se cargaron en un gel de agarosa (0,8 %) en tampón TBE 0,5x (0,045 M Tris, 0,045 M ácido bórico y 1 mM EDTA) que contenía una concentración de 2 $\mu\text{L}/100\text{ mL}$ de una disolución madre de bromuro de etidio de (10 mg/mL). Las muestras se separaron en el gel tras aplicar una corriente de 120 V durante 2 h. Las bandas se fotografiaron mediante una cámara UVIDOC HD2 (UVItec Cambridge).

Las proporciones relativas de las diferentes formas del plásmido fueron cuantificadas mediante el programa ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Un factor de corrección de 1,31 fue utilizado para compensar la menor afinidad de la forma I por el bromuro de etidio.¹⁵² La proporción de cada ADN fue calculada dividiendo la intensidad de cada banda por el total de las intensidades de todas las bandas en una misma carrera.

Para el estudio cinético del corte de ADN por el complejo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ y el QD (concentraciones 10 μM y 75 nM respectivamente) las muestras de reacción fueron incubadas según se ha detallado anteriormente y detenidas a cada uno de los tiempos deseados mediante la adición de tampón de carga y posterior incubación en hielo. Los datos fueron ajustados a una reacción de primer orden definida por la ecuación que se presenta a continuación, donde S corresponde a la concentración de la forma superenrollada a un t determinado, S_0 corresponde a la concentración inicial y k_{obs} corresponde a la constante observada de primer orden de la ruptura de ADN de la forma I a la forma II. La constante observada fue expresada en min^{-1} .

$$S = S_0 \exp(-k_{\text{obs}} t)$$

En el **apartado III.C** de este Capítulo se ha recogido el estudio de actividad nucleasa de los compuestos **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en tres diferentes condiciones. De nuevo, la habilidad de corte de los complejos se examinó mediante la conversión de pUC18 ADN superenrollado (Forma I) en las formas circular (Forma II) y lineal (Forma III) usando la técnica de electroforesis en gel de agarosa para separar los

diferentes productos de corte. Las disoluciones de los complejos de cobre(II) fueron preparados antes de cada ensayo y mediante la disolución de producto cristalino en el tampón biológico empleado en cada ensayo.

(i) Para comparar la actividad nucleasa de los complejos en ausencia de un agente activante, las reacciones se realizaron mediante la mezcla de 6 μL de una disolución de complejo (o CuCl_2 como control), 0,5 μL de pUC18 DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM pares de bases) y 13,5 μL de tampón (50 mM Tris-HCl, pH = 7,2), obteniendo un volumen total de 20 μL (concentraciones finales: 20 μM para **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, 40 μM para CuCl_2). A continuación, las muestras se incubaron a tres temperaturas diferentes (35, 40 y 50 $^\circ\text{C}$) durante 2 h mediante el uso de un Termociclador.

(ii) Para comparar la actividad nucleasa de los complejos en presencia de un agente activante, las reacciones se realizaron mediante la mezcla de 6 μL de una disolución de complejo (o CuCl_2 como control), 0,5 μL de pUC18 DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM pares de bases), 6 μL de MPA (ácido mercaptopropiónico) en una concentración 0,5 veces relativa a la concentración de cobre, y 7,5 μL de tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,2), obteniendo un volumen total de 20 μL (concentraciones finales: 20 μM para **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, 40 μM para CuCl_2). A continuación, las muestras se incubaron a tres temperaturas diferentes (35, 40 y 50 $^\circ\text{C}$) durante 2 h mediante el uso de un Termociclador.

(iii) Para comparar la posible sinergia entre los QDs y los complejos de cobre, las reacciones se realizaron mediante la mezcla de 6 μL de una disolución de complejo, 0,5 μL de pUC18 DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM pares de bases), y 11,5 μL de tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,2). Después de 5 minutos, una disolución de QD fue añadida para alcanzar la concentración deseada de QD, obteniendo un volumen total de 20 μL (concentraciones finales: 20 μM para **9**, **10** y $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$). A continuación, las muestras se incubaron en un rango de temperaturas (desde 20 a 50 $^\circ\text{C}$) durante 2 h mediante el uso de un Termociclador.

A continuación se procedió para cada tipo de experimento como se ha detallado anteriormente en el caso de las muestras del apartado III.B.

Para estudiar el posible efecto del ion metálico en la activación del sistema complejo-QD, algunos derivados metal-bis-fenantrolina se formaron *in situ* y se ensayaron. Las reacciones se realizaron mediante la mezcla de 6 μL de una disolución de la sal metálica correspondiente [$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$] y 6 μL de fenantrolina en una proporción metal a ligando de 1:2. Tras 10 minutos, 0,5 μL de una disolución de pUC18 DNA (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM pares de bases) y cantidades apropiadas de tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,2) fueron añadidas. A continuación, una disolución de agente activante (MPA, ascorbato o QD) fue añadida para alcanzar las concentraciones finales de metal y agente activante, alcanzando un volumen final de 20 μL (concentraciones finales: 20 μM para $[\text{M}(\text{phen})_2]^{n+}$, 10 μM para MPA, 10 μM para ascorbato, y 15 nM para QD). Las muestras fueron incubadas a 37 $^\circ\text{C}$ durante 2 horas en un Termociclador y tratadas como se ha descrito previamente.

Con el fin de investigar la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS en

inglés) en los productos de corte generados en presencia de MPA y por los posibles sitios de interacción entre los complejos y el ADN, diferentes agentes captadores de especies ROS y agentes de unión a los surcos se añadieron a las mezclas de reacción. Los agentes captadores utilizados fueron KI (0,4 M), Tiron (10 mM), y DABCO (0,4 M). Además, se empleó un agente quelante de cobre(I), neocuproína (100 μ M), junto a los agentes de unión a los surcos Hoechst 33258 (40 μ M) y Verde de metilo (20 μ M). Las muestras se trataron tal y como se describe anteriormente en presencia de MPA.

Con el fin de investigar la presencia de agentes ROS durante el proceso de corte del ADN en presencia de QD, diversos agentes captadores de ROS fueron añadidos a las mezclas de reacción. Los agentes captadores utilizados fueron urea (0,5 mM), t-BuOH (4 μ L), Tiron (10 mM) y 2,2,6,6-tetrametil-4-piperidona (0,5 mM). Además, se ensayó la adición de neocuproína (100 μ M). Las muestras fueron tratadas tal y como se describe en presencia de QD.

Todos los resultados presentados en este Capítulo han sido realizados como mínimo por triplicado.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Dhar, S.; Senapati, D.; Das, P. K.; Chattopadhyay, P.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12118.
- (2) Patra, A. K.; Dhar, S.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R. *Chem. Commun.* **2003**, 1562.
- (3) Lahiri, D.; Bhowmick, T.; Pathak, B.; Shameema, O.; Patra, A. K.; Ramakumar, S.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 339.
- (4) Goesmann, H.; Feldmann, C. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 1362.
- (5) Althues, H.; Henle, J.; Kaskel, S. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 1454.
- (6) Ajayan, P. M.; Schadler, L. S.; Braun, P. V. *Nanocomposite Science and Technology*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.
- (7) Biju, V.; Itoh, T.; Ishikawa, M. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 3031.
- (8) Gao, J.; Gu, H.; Xu, B. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 1097.
- (9) Diallo, A. K.; Ornelas, C.; Salmon, L.; Ruiz Aranzaes, J.; Astruc, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 8644.
- (10) Bhattacharjee, S.; Dotzauer, D. M.; Bruening, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 3601.
- (11) Edwards, P. P.; Thomas, J. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 5480.
- (12) Parak, W. J.; Manna, L.; Simmel, F. C.; Gerion, S.; Alivisatos, P. *Quantum Dots in Nanoparticles*; Wiley-VCH; Weinheim, Germany, 2004; p. 4.
- (13) Hoener, C. F.; Allan, K. A.; Bard, A. J.; Campion, A.; Fox, M. A.; Mallouk, T. E.; Webber, S. E.; White, J. M. *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 3812.
- (14) Honma, I.; Sano, T.; Komiyama, H. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6692.
- (15) Zhou, H. S.; Sasahara, H.; Honma, I.; Komiyama, H.; Haus, J. W. *Chem. Mater.* **1994**, *6*, 1534.
- (16) Alivisatos, A. P. *Science (80-.)*. **1996**, *271*, 933.
- (17) Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentolila, L. a; Tsay, J. M.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, a M.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. *Science* **2005**, *307*, 538.
- (18) Ghosh Chaudhuri, R.; Paria, S. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 2373.
- (19) Arguinzoniz, A. G.; Ruggiero, E.; Habtemariam, A.; Hernández-Gil, J.; Salassa, L.; Mareque-Rivas, J. C. *Part. Part. Syst. Character.* **2014**, *31*, 46.
- (20) Kambhampati, P. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1.
- (21) Smith, A. M.; Nie, S. *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 190.
- (22) Klostranec, J. M.; Chan, W. C. W. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1953.
- (23) Peng, X.; Schlamp, M. C.; Kadavanich, A. V.; Alivisatos, A. P. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 7019.
- (24) Hao, E.; Sun, H.; Zhou, Z.; Liu, J.; Yang, B.; Shen, J. *Chem. Mater.* **1999**, *11*, 3096.

- (25) Chen, X.; Lou, Y.; Samia, A. C.; Burda, C. *Nano Lett.* **2003**, *3*, 799.
- (26) Hines, M. A.; Guyot-Sionnest, P. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 468.
- (27) Kortan, A. R.; Hull, R.; Opila, R. L.; Bawendi, M. G.; Steigerwald, M. L.; Carroll, P. J.; Brus, L. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1327.
- (28) Tian, Y.; Newton, T.; Kotov, N. A.; Guldi, D. M.; Fendler, J. H. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 8927.
- (29) Kim, S.; Fisher, B.; Eisler, H.-J.; Bawendi, M. J. *Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11466.
- (30) Ivanov, S. A.; Piryatinski, A.; Nanda, J.; Tretiak, S.; Zavadil, K. R.; Wallace, W. O.; Werder, D.; Klimov, V. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11708.
- (31) Schöps, O.; Le Thomas, N.; Woggon, U.; Artemyev, M. V. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2074.
- (32) Xie, R.; Zhong, X.; Basché, T. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 2741.
- (33) Efros, A. L. *Sov. Phys. Semicond.* **1982**, *16*, 772.
- (34) Murray, C. B.; Norris, D. J.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8706.
- (35) Medintz, I. L.; Uyeda, H. T.; Goldman, E. R.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 435.
- (36) Resch-Genger, U.; Grabolle, M.; Cavaliere-Jaricot, S.; Nitschke, R.; Nann, T. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 763.
- (37) Smith, A. M.; Duan, H.; Mohs, A. M.; Nie, S. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 1226.
- (38) Chan, W. C. *Science (80-)*. **1998**, *281*, 2016.
- (39) Mattoussi, H.; Mauro, J. M.; Goldman, E. R.; Anderson, G. P.; Sundar, V. C.; Mikulec, F. V.; Bawendi, M. G. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 12142.
- (40) Goldman, E. R.; Balighian, E. D.; Mattoussi, H.; Kuno, M. K.; Mauro, J. M.; Tran, P. T.; Anderson, G. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 6378.
- (41) Uyeda, H. T.; Medintz, I. L.; Jaiswal, J. K.; Simon, S. M.; Mattoussi, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3870.
- (42) Bruchez Jr., M. *Science (80-)*. **1998**, *281*, 2013.
- (43) Gerion, D.; Pinaud, F.; Williams, S. C.; Parak, W. J.; Zanchet, D.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 8861.
- (44) Dubertret, B.; Skourides, P.; Norris, D. J.; Noireaux, V.; Brivanlou, A. H.; Libchaber, A. *Science* **2002**, *298*, 1759.
- (45) Pellegrino, T.; Manna, L.; Kudera, S.; Liedl, T.; Koktysh, D.; Rogach, A. L.; Keller, S.; Rädler, J.; Natile, G.; Parak, W. J. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 703.
- (46) Gill, R.; Zayats, M.; Willner, I. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, *47*, 7602.
- (47) Schladt, T. D.; Schneider, K.; Schild, H.; Tremel, W. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 6315.
- (48) Jamieson, T.; Bakhshi, R.; Petrova, D.; Pocock, R.; Imani, M.; Seifalian, A. M. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4717.

- (49) Maria Gonzalez-Perez, J.; Matilla-Hernandez, A.; Maldonado, C. R.; Salassa, L.; Gomez-Blanco, N.; Mareque-Rivas, J. C. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2668.
- (50) Chen, K.; Li, Z.-B.; Wang, H.; Cai, W.; Chen, X. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2008**, *35*, 2235.
- (51) Maldonado, C. R.; Gómez-Blanco, N.; Jauregui-Osoro, M.; Brunton, V. G.; Yate, L.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun. (Camb)*. **2013**, *49*, 3985.
- (52) Burks, P. T.; Ostrowski, A. D.; Mikhailovsky, A. A.; Chan, E. M.; Wagenknecht, P. S.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13266.
- (53) Neuman, D.; Ostrowski, A. D.; Mikhailovsky, A. A.; Absalonson, R. O.; Strouse, G. F.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 168.
- (54) Neuman, D.; Ostrowski, A. D.; Absalonson, R. O.; Strouse, G. F.; Ford, P. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 4146.
- (55) Zhang, Y.; He, J.; Wang, P.-N.; Chen, J.-Y.; Lu, Z.-J.; Lu, D.-R.; Guo, J.; Wang, C.-C.; Yang, W.-L. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 13396.
- (56) Hoshino, A.; Fujioka, K.; Oku, T.; Suga, M.; Sasaki, Y. F.; Ohta, T.; Yasuhara, M.; Suzuki, K.; Yamamoto, K. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 2163.
- (57) Ma, J.; Chen, J.-Y.; Guo, J.; Wang, C. C.; Yang, W. L.; Xu, L.; Wang, P. N. *Nanotechnology* **2006**, *17*, 2083.
- (58) Lewinski, N.; Colvin, V.; Drezek, R. *Small* **2008**, *4*, 26.
- (59) Derfus, A. M.; Chan, W. C. W.; Bhatia, S. N. *Nano Lett.* **2004**, *4*, 11.
- (60) Kirchner, C.; Liedl, T.; Kudera, S.; Pellegrino, T.; Muñoz Javier, A.; Gaub, H. E.; Stölzle, S.; Fertig, N.; Parak, W. J. *Nano Lett.* **2005**, *5*, 331.
- (61) Selvan, S. T.; Tan, T. T.; Ying, J. Y. *Adv. Mater.* **2005**, *17*, 1620.
- (62) Tsoi, K. M.; Dai, Q.; Alman, B. A.; Chan, W. C. W. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *46*, 662.
- (63) Bonomi, R.; Selvestrel, F.; Lombardo, V.; Sissi, C.; Polizzi, S.; Mancin, F.; Tonellato, U.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15744.
- (64) Hsu, M.-H.; Josephrajan, T.; Yeh, C.-S.; Shieh, D.-B.; Su, W.-C.; Hwu, J. R. *Bioconjug. Chem.* **2007**, *18*, 1709.
- (65) Yamakoshi, Y. N.; Yagami, T.; Sueyoshi, S.; Miyata, N. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 7236.
- (66) Yamakoshi, Y.; Sueyoshi, S.; Fukuhara, K.; Miyata, N.; Masumizu, T.; Kohno, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12363.
- (67) Ikeda, A.; Hatano, T.; Kawaguchi, M.; Shinkai, S.; Suenaga, H. *Chem. Commun.* **1999**, 1403.
- (68) Ikeda, A.; Sato, T.; Kitamura, K.; Nishiguchi, K.; Sasaki, Y.; Kikuchi, J.; Ogawa, T.; Yogo, K.; Takeya, T. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 2907.
- (69) Green, M.; Howman, E. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 121.
- (70) Sigman, D. S.; Bruice, T. W.; Mazumder, A.; Sutton, C. L. *Acc. Chem. Res.* **1993**, *26*, 98.

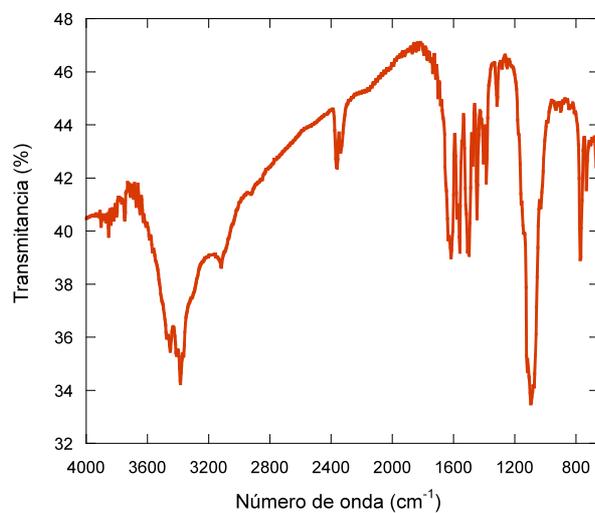
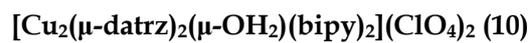
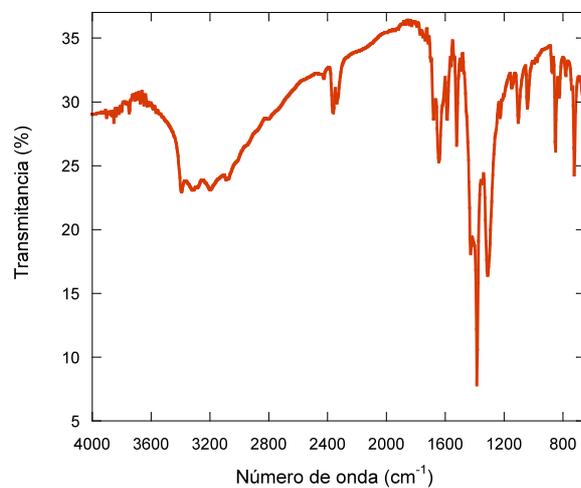
- (71) Chen, C. B.; Milne, L.; Landgraf, R.; Perrin, D. M.; Sigman, D. S. *ChemBiochem* **2001**, *2*, 735.
- (72) Kuwabara, M.; Yoon, C.; Goyne, T.; Thederahn, T.; Sigman, D. S. *Biochemistry* **1986**, *25*, 7401.
- (73) Perrin, D. M.; Chen, C. -h. B.; Xu, Y.; Pearson, L.; Sigman, D. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 5746.
- (74) Milne, L.; Xu, Y.; Perrin, D. M.; Sigman, D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 3136.
- (75) Carion, O.; Mahler, B.; Pons, T.; Dubertret, B. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2383.
- (76) Barr, T. A.; Krembuszewski, M.; Gupta, M.; Gray, D.; Mareque-Rivas, J. C. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6*, 1572.
- (77) Qu, L.; Peng, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2049.
- (78) Jin, T.; Fujii, F.; Yamada, E.; Nodasaka, Y.; Kinjo, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9288.
- (79) Jin, T.; Fujii, F.; Sakata, H.; Tamura, M.; Kinjo, M. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 4300.
- (80) Hathaway, B. J.; Procter, I. M.; Slade, R. C.; Tomlinson, A. A. G. *J. Chem. Soc. A Inorganic, Phys. Theor.* **1969**, 2219.
- (81) Mahtab, R.; Harden, H. H.; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 14.
- (82) Mahtab, R.; Rogers, J. P.; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9099.
- (83) Mahtab, R.; Rogers, J. P.; Singleton, C. P.; Murphy, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7028.
- (84) Mahtab, R.; Sealey, S. M.; Hunyadi, S. E.; Kinard, B.; Ray, T.; Murphy, C. J. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 559.
- (85) He, J.; Hu, P.; Wang, Y.-J.; Tong, M.-L.; Sun, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. *Dalton Trans.* **2008**, 3207.
- (86) Itoh, T.; Hisada, H.; Sumiya, T.; Hosono, M.; Usui, Y.; Fujii, Y. *Chem. Commun.* **1997**, 677.
- (87) Sheng, X.; Lu, X.-M.; Chen, Y.-T.; Lu, G.-Y.; Zhang, J.-J.; Shao, Y.; Liu, F.; Xu, Q. *Chemistry* **2007**, *13*, 9703.
- (88) Kobayashi, T.; Tobita, S.; Kobayashi, M.; Imajyo, T.; Chikira, M.; Yashiro, M.; Fujii, Y. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, *101*, 348.
- (89) Ramakrishnan, S.; Rajendiran, V.; Palaniandavar, M.; Periasamy, V. S.; Srinag, B. S.; Krishnamurthy, H.; Akbarsha, M. A. *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 1309.
- (90) Touceda-Varela, A.; Stevenson, E. I.; Galve-Gasi3n, J. A.; Dryden, D. T. F.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun. (Camb)*. **2008**, 1998.
- (91) Blanco, N. G.; Maldonado, C. R.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun. (Camb)*. **2009**, 5257.
- (92) Hattori, S.; Wada, Y.; Yanagida, S.; Fukuzumi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9648.

- (93) Robel, I.; Subramanian, V.; Kuno, M.; Kamat, P. V. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2385.
- (94) Cooper, D. R.; Dimitrijevic, N. M.; Nadeau, J. L. *Nanoscale* **2010**, *2*, 114.
- (95) Hernandez-Gil, J.; Llusar, S. F.; Maldonado, C. R.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem Commun* **2011**, *47*, 2955.
- (96) Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.
- (97) Vaal, J. M.; Mechant, K.; Rill, R. L. *Nucleic Acids Res.* **1991**, *19*, 3383.
- (98) Pitié, M.; Donnadiou, B.; Meunier, B. *Inorg. Chem.* **1998**, *37*, 3486.
- (99) Pitié, M.; Sudres, B.; Meunier, B. *Chem. Commun.* **1998**, 2597.
- (100) Pitié, M.; Burrows, C. J.; Meunier, B. *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 4856.
- (101) Pitié, M.; Pratviel, G. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1018.
- (102) Yao, Y.; Perkovic, M. W.; Rillema, D. P.; Woods, C. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 3956.
- (103) Hirai, M.; Shinozuka, K.; Sawai, H.; Ogawa, S. *Chem. Lett.* **1992**, *21*, 2023.
- (104) Bianco, S.; Musetti, C.; Waldeck, A.; Sparapani, S.; Seitz, J. D.; Krapcho, A. P.; Palumbo, M.; Sissi, C. *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 5833.
- (105) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, *48*, 5545.
- (106) Kellett, A.; O'Connor, M.; McCann, M.; McNamara, M.; Lynch, P.; Rosair, G.; McKee, V.; Creaven, B.; Walsh, M.; McClean, S.; Foltyn, A.; O'Shea, D.; Howe, O.; Devereux, M. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 1024.
- (107) Prisecaru, A.; Devereux, M.; Barron, N.; McCann, M.; Colleran, J.; Casey, A.; McKee, V.; Kellett, A. *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, *48*, 6906.
- (108) Kellett, A.; O'Connor, M.; McCann, M.; Howe, O.; Casey, A.; McCarron, P.; Kavanagh, K.; McNamara, M.; Kennedy, S.; May, D. D.; Skell, P. S.; O'Shea, D.; Devereux, M. *Medchemcomm* **2011**, *2*, 579.
- (109) Kellett, A.; Howe, O.; O'Connor, M.; McCann, M.; Creaven, B. S.; McClean, S.; Foltyn-Arfa Kia, A.; Casey, A.; Devereux, M. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *53*, 564.
- (110) Anbu, S.; Kandaswamy, M.; Kamalraj, S.; Muthumarry, J.; Varghese, B. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7310.
- (111) Roy, M.; Dhar, S.; Maity, B.; Chakravarty, A. R. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *375*, 173.
- (112) García-Giménez, J. L.; Alzuet, G.; Gonzalez-Alvarez, M.; Castiñeiras, A.; Liu-Gonzalez, M.; Borrás, J. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7178.
- (113) Haasnoot, J. G. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 131.
- (114) Klingele, M.; Brooker, S. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 119.
- (115) Aromí, G.; Barrios, L. a.; Roubeau, O.; Gamez, P. *Coord. Chem. Rev.* **2011**, *255*, 485.
- (116) Zhang, R.-B.; Zhang, J.; Li, Z.-J.; Cheng, J.-K.; Qin, Y.-Y.; Yao, Y.-G. *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 3735.

- (117) Zhai, Q.-G.; Lu, C.-Z.; Chen, S.-M.; Xu, X.-J.; Yang, W.-B. *Inorg. Chem. Commun.* **2006**, *9*, 819.
- (118) Ray, A.; Mitra, S.; Rosair, G. M. *Inorg. Chem. Commun.* **2008**, *11*, 1256.
- (119) Ferrer, S.; Lloret, F.; Pardo, E.; Clemente-Juan, J. M.; Liu-González, M.; García-Granda, S. *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 985.
- (120) Interface, The Cambridge Structural Database.
- (121) Healy, P. C.; Engelhardt, L. M.; Patrick, V. A.; White, A. H. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1985**, 2541.
- (122) Matsushima, H.; Hamada, H.; Watanabe, K.; Koikawa, M.; Tokii, T. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1999**, 971.
- (123) Spodine, E.; Atria, A. M.; Valenzuela, J.; Jalocha, J.; Manzur, J.; García, A. M.; Garland, M. T.; Peña, O.; Saillard, J.-Y. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1999**, 3029.
- (124) Patel, R. N.; Singh, N.; Shukla, K. K.; Gundla, V. L. N.; Chauhan, U. K. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 651.
- (125) Morehouse, S. M. *Inorganica Chim. Acta* **1996**, *243*, 327.
- (126) Aznar, E.; Ferrer, S.; Borrás, J.; Lloret, F.; Liu-González, M.; Rodríguez-Prieto, H.; García-Granda, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2006**, *2006*, 5115.
- (127) Slangen, P. M.; van Koningsbruggen, P. J.; Goubitz, K.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 1121.
- (128) Ferrer, S.; van Koningsbruggen, P. J.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Kooijman, H.; Spek, A. L.; Lezama, L.; Arif, A. M.; Miller, J. S. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1999**, 4269.
- (129) Yi, L.; Ding, B.; Zhao, B.; Cheng, P.; Liao, D.-Z.; Yan, S.-P.; Jiang, Z.-H. *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 33.
- (130) Shao, Z.-H.; Luo, J.; Cai, R.-F.; Zhou, X.-G.; Weng, L.-H.; Chen, Z.-X. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2004**, *60*, m225.
- (131) Nakamoto, K. *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds: Part B: Applications in Coordination, Organometallic and Bioinorganic Chemistry*; Wiley.; New York, 1997; p. 5th ed.
- (132) Plass, W.; Pohlmann, A.; Subramanian, P. S.; Srinivas, D. *Zeitschrift für Anorg. und Allg. Chemie* **2002**, *628*, 1377.
- (133) Haddad, M. S.; Duesler, E. N.; Hendrickson, D. N. *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 141.
- (134) Haddad, M. S.; Hendrickson, D. N. *Inorg. Chem.* **1978**, *17*, 2622.
- (135) Kolks, G.; Lippard, S. J.; Waszczak, J. V.; Lilienthal, H. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 717.
- (136) Kolks, G.; Lippard, S. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5804.
- (137) Drew, M. G. B.; Martin Nelson, S.; Reedijk, J. *Inorganica Chim. Acta* **1982**, *64*, L189.
- (138) Mota, A. J.; Rodríguez-Diéguez, A.; Palacios, M. A.; Herrera, J. M.; Luneau, D.; Colacio, E. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 8986.

- (139) Verdejo, B.; Blasco, S.; García-España, E.; Lloret, F.; Gaviña, P.; Soriano, C.; Tatay, S.; Jiménez, H. R.; Doménech, A.; Latorre, J. *Dalton Trans.* **2007**, 4726.
- (140) Strothkamp, K. G.; Lippard, S. J. *Acc. Chem. Res.* **1982**, *15*, 318.
- (141) García-Giménez, J. L. *Tesis Doctoral*; Universita.; Burjassot, 2007.
- (142) Wilson, W.; Tanius, F.; Fernández-Saiz, M.; Rigl, C. Human Press: Totowa, NJ, 1997; pp. 219-240.
- (143) Wilson, W. D.; Ratmeyer, L.; Zhao, M.; Strekowski, L.; Boykin, D. *Biochemistry* **1993**, *32*, 4098.
- (144) Strothkamp, K. G.; Stothkamp, R. E. *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 77.
- (145) Nguyen, B.; Neidle, S.; Wilson, W. D. *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 11.
- (146) Dhar, S.; Reddy, P. A. N.; Nethaji, M.; Mahadevan, S.; Saha, M. K.; Chakravarty, A. R. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 3469.
- (147) Hegg, E. L.; Burstyn, J. N. *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 7474.
- (148) Ichikawa, K.; Tarnai, M.; Uddin, M. K.; Nakata, K.; Sato, S. *J. Inorg. Biochem.* **2002**, *91*, 437.
- (149) Korupoju, S. R.; Mangayarkarasi, N.; Zacharias, P. S.; Mizuthani, J.; Nishihara, H. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 4099.
- (150) Tseng, T.-S. A.; Burstyn, J. N. *Chem. Commun. (Camb)*. **2008**, 6209.
- (151) Richards, A. D.; Rodger, A. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 471.
- (152) Van den Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 180.

Anexo II. Espectros infrarrojos (KBr)



Anexo III. Estudio de Rayos-X de los compuestos 9 y 10

Detalles experimentales cristalográficos de los monocristales
 [Cu₂(μ-Hdatrz)(phen)₂(H₂O)₂(NO₃)₄] (9) y
 [Cu₂(μ-datrz)₂(μ-OH₂)(bipy)₂](ClO₄)₂ (10)

Compound	9	10
Empirical formula	C ₂₆ H ₂₅ Cu ₂ N ₁₃ O ₁₄	C ₂₄ H ₂₆ Cl ₂ Cu ₂ N ₁₄ O ₉
Formula weight	870.67	852.57
Temperature (K)	293(2)	293(2)
Wavelength (Å)	0.71069	0.71073
Crystal system, space group	Triclinic, P-1	Monoclinic, P 2 ₁ /c
Unit cell dimensions	a(Å) 10.725(5) b(Å) 12.310(5) c(Å) 14.278(5) α(°) 103.673(5) β(°) 102.037(5) γ(°) 108.806(5)	16.2221(7) 13.9144(7) 15.4530(5) 90 109.799(2) 90
Volume (Å ³)	1648.7(12)	3281.9
Z, Calculated density (mg/m ³)	2, 1.754	4, 1.726
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	1.381	1.533
F(000)	884	1728
Crystal size (mm)	0.32 x 0.25 x 0.20	0.05 x 0.03 x 0.03
θ range for data collection (deg)	1.54 to 25.98	1.33 to 27.44
Limiting indices	-12 ≤ h ≤ 13 -15 ≤ k ≤ 15 -17 ≤ l ≤ 17	-21 ≤ h ≤ 21 -17 ≤ k ≤ 16 -20 ≤ l ≤ 20
Reflections collected/unique	9696/6476	12830/7425
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	6476/0/496	7425 / 0 / 479
Goodness-of-fit on F ²	1.078	1.083
Final R indices [I > 2σ(I)] (R ₁ , ωR ₂)	0.0603, 0.1631	0.0500, 0.1347
R indices (all data) (R ₁ , ωR ₂)	0.0921, 0.2029	0.0801, 0.1618
Largest diff. peak and hole (e.Å ⁻³)	0.642 and -0.825	0.878 and -0.625

Toma de datos. Resolución y refinamiento de las estructuras
[Cu₂(μ-Hdatrz)(phen)₂(H₂O)₂(NO₃)₄] (9) y
[Cu₂(μ-datrz)₂(μ-OH₂)(bipy)₂](ClO₄)₂ (10)

A green prismatic crystal of **1** and dark-green crystal of **2** were mounted on a glass fiber and used for data collection. Crystal data were collected at 293(2) K, using a Bruker X8 Kappa APEXII diffractometer. Graphite monochromated MoK(α) radiation ($\lambda = 0.71073$ Å) was used throughout. The data were processed with APEX2 [I]. The structure was solved by direct methods using the program SHELXS-97 [II] and refined by full-matrix least-squares techniques against F^2 using SHELXL-97 [II]. Positional and anisotropic atomic displacement parameters were refined for all nonhydrogen atoms. Hydrogen atoms attached to carbon and nitrogen atoms were placed in geometrically idealized positions and refined using a riding model. Hydrogen atoms on water molecules were located from difference Fourier maps and were also refined using a riding model. Some problem of disorder in the NO₃ (**1**) / ClO₄ (**2**) groups gave rise to rather high U_{eq}. Criteria of a satisfactory complete analysis were the ratios of "rms" shift to standard deviation less than 0.001 and no significant features in final difference maps. Atomic scattering factors from "International Tables for Crystallography" [III]. Molecular graphics from DIAMOND [IV]. The details of crystallographic data and structure refinements parameters for complexes **1** and **2** are summarized in Table 1. Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) File No. 901545 (**1**) and File No. 912352 (**2**) contain the supplementary crystallographic data for this paper. These data can be obtained free of charge from The CCDC at www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif. Crystallographic literature revision was performed with the help of CSD-Conquest [V].

Bibliografía

Toma de datos, resolución y refinamiento de las estructuras.
Gráficos

- [I] Bruker APEX2. Bruker AXS, 2010.
[II] Sheldrick, G. M. Acta Crystallogr., Sect. A 2008, 64, 112–122.
[III] Wilson, A. J. C. International Tables for Crystallography; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1995.
[IV] Brandenburg, K.; Putz, H. DIAMOND. Crystal Impact GbR 2004.
[V] Cambridge Crystallographic Data Centre.
<http://www.ccdc.cam.ac.uk/pages/Home.aspx>.

CAPÍTULO IV

NUCLEASAS HIDROLÍTICAS

Durante los últimos años los químicos han mostrado un gran interés en el diseño de las denominadas “nucleasas hidrolíticas sintéticas”. El término se aplica a sistemas capaces de degradar ésteres fosfato y, de esta forma, emular la actividad de las enzimas hidrolasas o “nucleasas hidrolíticas naturales”.

En este Capítulo se pretende profundizar en torno a este modo de corte del ADN. En la Introducción de este Capítulo IV (apartado IV.A) se detallan los *factores* claves que controlan la eficiencia catalítica del mecanismo de ruptura hidrolítico así como las *estrategias* abordadas en la bibliografía para el diseño de sistemas activos.

A continuación, en el apartado IV.B se estudia el corte producido por un compuesto de un ligando dinucleante a un *plásmido* de ADN. El ligando se ha escogido por la probada actividad hidrolítica de sus complejos frente a *sustratos modelo* de ésteres fosfato.

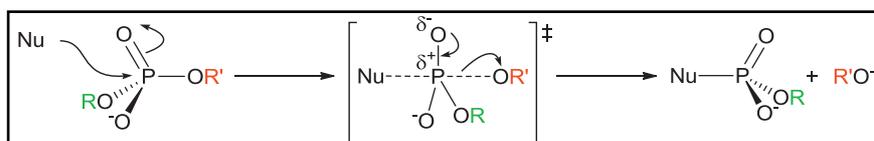
IV.A INTRODUCCIÓN

IV.A.1 La reacción de hidrólisis del ADN

Los ésteres fosfato, en particular los mono y diésteres, son ubicuos en la Naturaleza y pueden encontrarse en el material genético, en coenzimas, en las reservas de energía y como intermedios en multitud de transformaciones Bioquímicas.¹ Una característica importante de estos compuestos, y fundamental para su papel biológico, es su baja reactividad en condiciones fisiológicas.²

Debido a ello, la constante de velocidad de hidrólisis del diéster fosfato del ADN no se ha podido medir de forma directa; la estimación más real sobre la reactividad del enlace fosfato del ADN hacia la hidrólisis espontánea (ataque de una molécula de agua al átomo de fósforo) corresponde a una vida media de 31 millones de años.³

La hidrólisis de un éster fosfato del ADN es, en esencia, una *reacción de sustitución* sobre el átomo de fósforo: un *nucleófilo* (i.e. un grupo hidroxilo) ataca el átomo de fósforo del enlace fosfodiéster y, tras la formación de un estado de transición pentacoordinado y posterior salida del grupo saliente, se produce un corte en la hebra (Esquema IV.1).



Esquema IV.1. Mecanismo propuesto para el corte nucleofílico de un diéster fosfato (Nu = Nucleófilo).

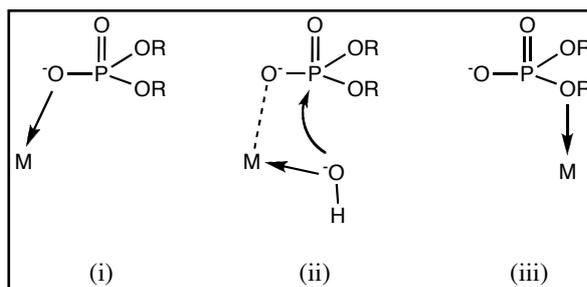
Esta hidrólisis se caracteriza por un incremento de la carga negativa del grupo fosfato y, por tanto, la reacción puede beneficiarse de una *catálisis electrofílica*. De hecho, es de sobra conocido el efecto de aceleración inducido por los iones metálicos en el corte hidrolítico de ésteres fosfato,⁴⁻⁶ así como el papel esencial que juegan los iones metálicos o las cadenas de aminoácidos cargadas positivamente en el proceso de catálisis de los centros activos de las nucleasas.⁷⁻¹²

A modo general, los *iones metálicos* pueden facilitar el corte hidrolítico del enlace P-O fosfodiéster mediante (esquema IV.2):

(i) Activación electrostática del *grupo fosfato* para el ataque nucleofílico. Esto incluye la estabilización del estado de transición.

(ii) Activación intramolecular del *nucleófilo* (una molécula de agua unida a un metal es más ácida, y asegura una mayor concentración de anión hidróxido a pH neutro).

(iii) Activación del *grupo saliente* (la coordinación con el oxígeno del alcohol disminuye el pK_a del grupo saliente).



Esquema IV.2. Formas de activación de la hidrólisis por iones metálicos.

IV.A.2 Hidrólisis catalizada por nucleasas químicas

IV.A.2.1 Rotura hidrolítica *versus* oxidativa

El ADN es un sustrato *resistente a la hidrólisis* pero relativamente *sensible al corte oxidativo*. Por esta razón se hace necesario un estudio detallado del mecanismo de acción de las nucleasas artificiales cuando contienen iones metálicos de conocida actividad redox. Es el caso de los iones Cu(II) y Fe(III) que, bajo condiciones adecuadas, pueden cortar el ADN mediante un mecanismo oxidativo.¹³⁻¹⁵ Este proceso es generalmente tan eficiente que siempre compite con el corte hidrolítico.

Como se detalló en el Capítulo II, una nucleasa oxidativa necesita la activación previa de un cofactor (reductor/oxidante) y oxígeno molecular para generar especies reactivas de oxígeno, que son las responsables de promover el corte de la doble hebra. Por ello, de forma general, las pruebas para evidenciar un mecanismo *hidrolítico* son:¹⁶

(i) El sistema muestra actividad nucleasa en ausencia de un agente activante.

(ii) La actividad nucleasa del sistema no se inhibe en presencia de agentes captadores de radicales oxígeno.

(iii) La actividad nucleasa del sistema no se inhibe en condiciones anaeróbicas.

Estas evidencias se pueden reforzar mediante dos ensayos complementarios:

(iv) Ensayo de ligación de los productos de corte mediante la enzima ligasa T4 (ver la introducción general de esta *Tesis*).

(v) Identificación química de los productos generados mediante las correspondientes técnicas analíticas.

IV.A.2.2 Hidrólisis por complejos bimetálicos “sencillos”

El papel catalítico de los iones metálicos según el esquema IV.2 no requiere, en principio, ningún ligando o agente acomplejante. De hecho, si tenemos en cuenta que las dos propiedades más importantes ejercidas por un ión metálico en el mecanismo de corte son su acidez de Lewis y la estabilización de la carga negativa, en principio, los ligandos (especialmente aquellos cargados negativamente) deberían disminuir la actividad de los iones metálicos.

Sin embargo, *los iones libres* no son sistemas catalíticos adecuados debido a que presentan actividades moderadas/bajas, problemas de toxicidad y solubilidad y, además, no son específicos en el corte.

Por tanto, el diseño de complejos metálicos que potencien la actividad del metal resulta esencial. Las estrategias adoptadas en la bibliografía para aumentar dicha actividad se han centrado tanto en la mejora de su afinidad por el ADN como de su capacidad hidrolítica.

Los mejores resultados se han obtenido con **sistemas dinucleares**. En la bibliografía se ha descrito que algunos de los sistemas bimetálicos más activos contienen ligandos capaces de permitir interacciones cooperativas entre los iones metálicos y el sustrato mediante activaciones de tipo ácido de Lewis.

Entre estos sistemas destaca un complejo de Fe(III) y un *derivado "dinucleante"*: el 1,1,4,7,7-penta(2'-benzimidazol-2-il-metil)-triazheptano (DTPB), sintetizado por Liu y col. en 2002 (figura IV.1).¹⁷ El complejo, para el que se ha propuesto la estructura $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu\text{-O})(\mu\text{-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$, a concentraciones de 100 μM corta el plásmido pBR322 ADN a una $k_{\text{cat}} = 2,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (37 °C y pH = 7,0). Este valor corresponde a una vida media de 5 minutos, lo que le sitúa entre los sistemas hidrolíticos más eficientes hasta el momento.¹⁸ Además, el complejo muestra una constante de afinidad por el ADN importante ($1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), presumiblemente debido a las cargas positivas aportadas por los dos centros metálicos de la estructura. La comparación con otros complejos dinucleares indica que el puente $\mu\text{-oxo}$ y la presencia del ligando lábil BF_4^- juegan un papel importante en su reactividad: el primer factor asegura la distancia intermetálica adecuada, mientras que el segundo genera posiciones libres de coordinación que permiten la interacción con el sustrato.

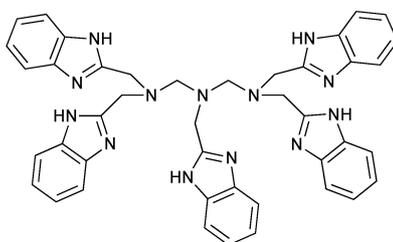


Figura IV.1. Ligando "dinucleante" DTPB, diseñado por Liu y col.¹⁷

Una estrategia diferente para obtener sistemas dinucleares se basa en la formación de complejos con *ligandos puente*. La figura IV.2 muestra un ejemplo reciente de esta clase de compuestos. Se trata de un complejo dinuclear de Cu(II), descrito de forma independiente por los grupos de Kandaswamy¹⁹ y Chakravarty,²⁰ constituido por dos fenantrolinas, dos iones Cu(II) y tres ligandos puente: una molécula de agua, un anión hidróxido, y un anión acetato.

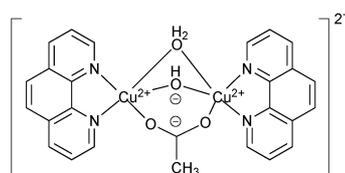


Figura IV.2. Complejo dinuclear de Cu(II) con actividad nucleasa hidrolítica, descrito por Kandaswamy¹⁹ y Chakravarty.²⁰

El compuesto corta el plásmido pUC19 ADN de forma hidrolítica (el test de la ligasa T4 es positivo) a una concentración 80 μM con una gran eficiencia ($k_{\text{cat}} = 5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, pH 7,2 y 37 °C). Un problema de estos sistemas con centros metálicos unidos por ligandos puente es su posible disociación en disolución; de hecho, en presencia de un sustrato modelo de fosfato [BNPP, bis(4-nitrofenil)fosfato] este compuesto cristaliza en su forma monómera con el fosfato unido al ión metálico.²⁰

IV.A.2.3 Hidrólisis por complejos conjugados con agentes de interacción del ADN

La segunda estrategia para aumentar la actividad de corte de un agente hidrolítico consiste en **la incorporación de un ligando con conocida afinidad hacia la doble hebra**. De esta forma se mejora el factor limitante de este tipo de sistemas: la interacción nucleasa-ADN.²¹ Resumiremos a continuación los tres grupos de compuestos más destacados.

IV.A.2.3.1 Con agentes intercaladores

La estrategia más obvia consiste en la inclusión de grupos con capacidad intercalante en la estructura del ADN. Sin embargo, el diseño de estos sistemas no es trivial y, en muchos casos, la conjugación con un intercalador no produce una mejora en la actividad del sistema.

Así, Tonellato y col.²² han estudiado la actividad de una serie de complejos Zn(II)-tach-antraquinona (tach = cis-1,3,5-triaminociclohexano) en los que el tach está enlazado a la antraquinona con distintos espaciadores alquilo de diferente longitud

(figura IV.3). De todos ellos, sólo el sistema conjugado con un espaciador C_8 muestra una actividad superior (15 veces) al sistema $Zn(II)$ -tach, sin agente intercalante. Este resultado indica que la ventaja obtenida por el aumento de afinidad al ADN puede cancelarse, a su vez, por la posición incorrecta del centro catalítico a la hora de producir el corte sobre el ADN.

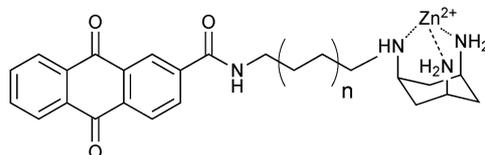


Figura IV.3. Nucleasa artificial que aprovecha la incorporación de un intercalador, descrita por Tonellato y col.²²

En teoría, el uso de un agente bimetálico que, además, contenga ligandos intercaladores debería conducir a sistemas muy activos.²³ Recientemente, Peng, Wang y col. han diseñado un complejo dinuclear de $Fe(III)$ con dos moléculas de acridina (figura IV.4).²⁴

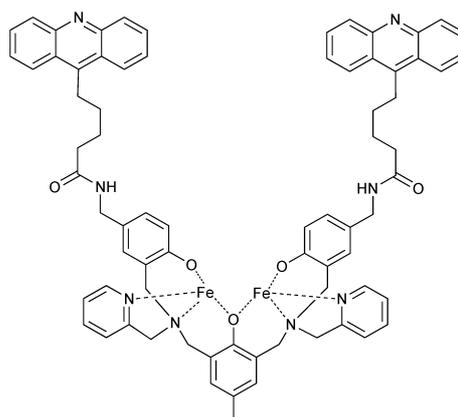


Figura IV.4. Complejo bis- $Fe(III)$ conjugado con dos intercaladores acridina, sintetizado por Peng y Wang.²⁴

El compuesto corta a una concentración de 54 μM con una constante de velocidad de $6,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (37 °C, pH 7). Este valor corresponde a una vida media de menos de dos minutos. Por tanto, este sistema es otro de los agentes artificiales más reactivos descritos hasta la fecha. El compuesto presenta una actividad 400 veces mayor que la del análogo sin los dos grupos acridina, y 14 veces mayor que la del análogo con un grupo acridina.²⁵ La gran actividad es atribuida a su gran afinidad por el ADN, ya que presenta una constante de unión de $7,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.

IV.A.2.3.2 Con agentes que presentan carga positiva

La presencia de cargas positivas en la metalonucleasa aumenta la afinidad hacia el ADN, que es un polianión.

Recientemente, Mao y col.²⁶ han estudiado el efecto de incluir un grupo alquilamonio (carga positiva) sobre las posiciones 5 y 5' de un complejo de Zn(II)-bipiridina (figura IV.5). Se han ensayado sistemas con grupos etilamonio y con grupos butilamonio. El derivado con grupos etilamonio muestra una mayor actividad nucleasa, y es capaz de degradar plásmido de ADN con una constante de velocidad de $3,8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (50 μM complejo, 37 °C y pH 7,2).

En base a la estructura cristalina del compuesto, los autores sugieren que la disposición de los dos grupos amonio cuaternario permite la interacción con los grupos fosfato contiguos al grupo fosfato que interacciona con el centro metálico (figura IV.5).

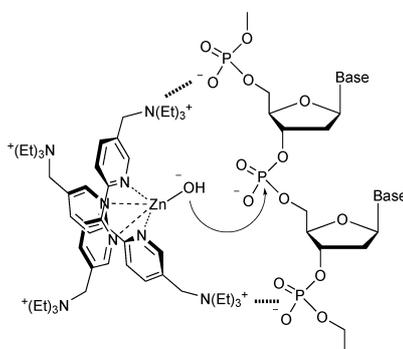


Figura IV.5. Modo de interacción propuesto para el sistema Zn(II)-bipy-Et₃N⁺, descrito por Mao y col.²⁶

IV.A.2.3.3 Con agentes que contienen grupos que se unen al surco menor y/o a las nucleobases

Otro enfoque consiste en conjugar el ligando con moléculas que presenten conocida afinidad por el surco menor. En este sentido, Mao y col. han desarrollado un complejo de cobre(II)-bipiridina decorado con diferentes nucleobases (Figura IV.6).²⁷ El derivado con la nucleobase timidina es el más activo; es capaz de cortar el plásmido de ADN con una constante de velocidad de $1,1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ (37 °C y pH 7.5). Este valor supone una velocidad 80 superior a la del derivado sin nucleobase [Cu(bipy)Cl₂]. El compuesto de la figura IV.6 ostenta el *récord* actual de actividad de corte hidrolítico. La naturaleza hidrolítica del corte se ha confirmado con experimentos con agentes captadores de radicales y con el ensayo de la ligasa T4.

Los datos obtenidos de estudios de dicroísmo circular, de ensayos competitivos con otros agentes de unión al ADN, y de modelaje molecular sugieren que los complejos se unen al surco menor del ADN. Las nucleobases se insertan en el interior del surco, y el ión metálico queda posicionado hacia fuera del esqueleto de fosfato. Esta orientación, que permite la correcta interacción entre el ión metálico y el fosfato, debe ser la clave de la gran reactividad observada.

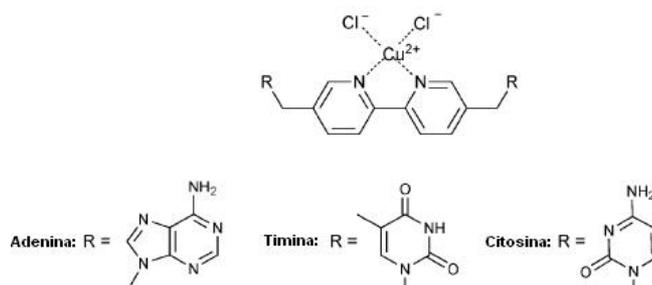
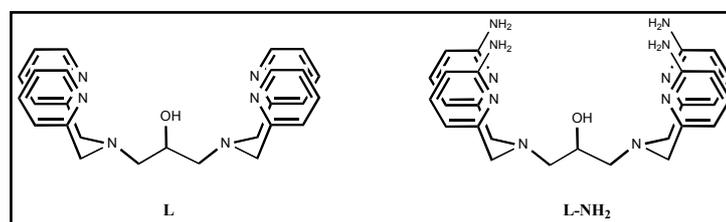


Figura IV.6. Complejos de Cu(II) derivados de la bipyridina, diseñados por Mao y col.²⁷

IV.B UN LIGANDO DINUCLEANTE QUE CORTA EL ADN CON UN SOLO M^{n+} O SIN NINGÚN M^{n+} (M = METAL DE TRANSICIÓN)*

IV.B.1 Antecedentes y objetivos

Entre los sistemas bimetalicos más activos a que nos hemos referido en el apartado IV.A.2.2. de la introducción destacan aquellos construidos con dos unidades quelantes unidas por un grupo 2-propanol.²⁸⁻³¹ Entre estos últimos se encuentran los formados con los ligandos L {L = 1,3-bis[bis(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol} y L-NH₂, su análogo con grupos amino (Esquema IV.3).



Esquema IV.3. Ligandos L y L-NH₂. L es el ligando con el que se ha realizado el estudio descrito en este capítulo.

* Los resultados que se presentan a continuación han sido objeto de la siguiente publicación: J. Hernández-Gil, S. Ferrer, E. Salvador, J. Calvo, E. García-España, J. C. Mareque-Rivas, *Chem. Comm.* **2013**, 49, 3655-57.

En base a la clasificación realizada anteriormente, L se encuentra situado en el grupo de ligandos “*dinucleantes*” con un grupo funcional actuando como conector entre dos centros metálicos. Además, L posee cuatro grupos piridina que pueden aportar una funcionalidad adicional al ligando a la hora de promover la hidrólisis de los ésteres fosfato.

La actividad nucleasa del compuesto dinuclear Zn_2-L y del análogo Zn_2-L-NH_2 ha sido ampliamente estudiada *con sustratos modelo* del ARN [bis(2,4-dinitrofenil)fosfato (BNPP), dinucleótidos de ARN (NpN) o con el 2-hidroxipropil-4-nitrofenilfosfato (HPNPP)].³²⁻³⁸ Ambos compuestos de Zn(II) han mostrado una elevada capacidad hidrolítica. Se ha comprobado también que $L-NH_2$ es capaz de promover el corte de estos sustratos combinado con otros iones metálicos tales como Cu(II), Ni(II) y Co(II).³⁷ El corte hidrolítico de estos compuestos modelo libera el anion 4-nitrofenol, el cual, debido a su intensa absorbancia a 400 nm ($\epsilon_{480} = 18.700 M^{-1} \cdot cm^{-1}$) permite fácilmente el seguimiento de la actividad nucleolítica mediante espectroscopia UV-visible.³⁹

No existen, sin embargo, estudios de esta actividad *frente a plásmidos* de ADN. De hecho, una revisión cuidadosa revela que la mayoría de los estudios de la bibliografía sobre nucleasas hidrolíticas se basan en el corte de sustratos modelo.^{18,28} Por otro lado, se han descrito ejemplos para los que el compuesto, activo frente a modelos, no lo es frente al plásmido;^{27,40-43} este hecho estaría relacionado con la imposibilidad de interaccionar adecuadamente con el ADN o el ARN.

Por todo esto, y basándonos en nuestra experiencia, hemos abordado en este capítulo el estudio de la *actividad nucleasa* de los complejos del ligando L **frente a plásmido** pUC18 ADN, mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa. Además, hemos completado el estudio con *ensayos de interacción con un sustrato real*, CT ADN, mediante fluorescencia. Finalmente, y dada la influencia de la naturaleza del metal en las propiedades catalíticas,¹³ se ha testado la actividad con varios cationes metálicos: Co(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II) y Ni(II).

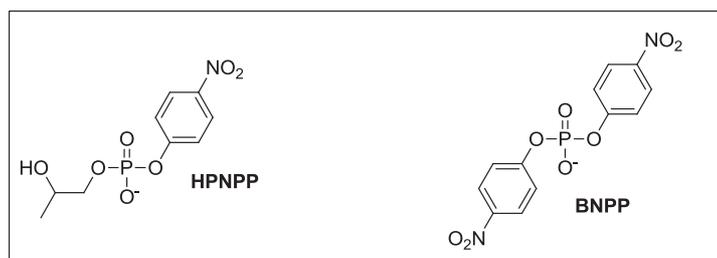
IV.B.2 Caracterización de las disoluciones M+L

Los ligandos estudiados L y L' (ver más adelante) fueron sintetizados en el laboratorio del profesor Mareque-Rivas, según métodos descritos en la bibliografía.^{36,44}

Los sistemas ensayados se prepararon mezclando cantidades adecuadas de $M(\text{NO}_3)_n$ ($n = 2,3$) [M siendo Co(II), Fe(III), Cu(II), Zn(II) o Ni(II)] en agua, con disolución de L (o L') en metanol, en proporciones molares 1:1 ó 2:1. El pH de la disolución se fijó mediante el uso de un tampón (50 mM HEPES, pH 7,0).

En el estudio de interacción y corte con el ADN la primera cuestión que se nos plantea es qué especies están presentes en la disolución mezcla.

En la bibliografía existen diversos trabajos que evidencian *la naturaleza dinucleante de L*. Por ejemplo, Yashiro y col.,³² basándose en estudios de ^1H RMN, concluyen que una disolución acuosa de una mezcla 2:1 de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ y L conduce de forma prácticamente cuantitativa a un complejo dinuclear de zinc. Posteriormente Kinoshita y col.³⁵ describen la estructura cristalina de $[\text{Zn}_2\text{L}] \cdot \text{PNPP}^+$ (HPNPP es un modelo de ésteres fosfato, esquema IV.4) y $[\text{Zn}_2\text{L}] \cdot (\text{OAc})^{2+}$, y confirman la estructura del complejo dinuclear, con los dos iones metálicos unidos a dos átomos de nitrógeno y a un átomo de oxígeno del grupo alcóxido del propio ligando, el cual actúa como un ligando puente. También se han descrito diferentes estructuras dinucleares con Cu(II) y Fe(II): $[\text{Cu}_2(\text{L})(\text{OAc})]^{2+}$, $[\text{Cu}_2\text{L}_2(\text{OAc})]^{2+}$ y $[\text{Cu}_2(\text{L}_3)(\text{OAc})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$, con L2 y L3 siendo ligandos dinucleares análogos a L, y $[\text{Fe}_2(\text{L}_4(\text{OOCAr}))]^{2+}$ y $[\text{Fe}_2(\text{L}_4(\text{OOCAr})_2)]^+$ siendo L4 un derivado de L y OOCAr un carboxilato de un compuesto aromático.⁴⁵ Por último, también existe una estructura dinuclear para el Co(II): $[\text{Co}_2\text{L}] \cdot \text{BNPP}^{2+}$, en la que BNPP es otro modelo de éster fosfato.⁴⁶



Esquema IV.4. Estructura de los sustratos modelo HPNPP y BNPP.

Estos trabajos confirman la naturaleza dinucleante del ligando L. Sin embargo, la posibilidad de que se formen especies mononucleares a relaciones bajas M+L es un tema apenas explorado.

Las pruebas que se describen a continuación tienen como objetivo demostrar que el ligando L a relaciones 1:1 de M+L forma especies *mononucleares*.

IV.B.2.1 Espectrometría de masas mediante la técnica de electrospray

Los espectros ESI-MS de las disoluciones M+L se obtuvieron según el procedimiento experimental descrito en la sección experimental de este Capítulo. En la tabla IV.1 se recopilan los valores teóricos y experimentales de los picos más significativos.

Tabla IV.1. Análisis de ESI-MS (modo positivo) de mezclas M+L en proporción 1:1 *.

Complejo	Asignación	m/z calc.	m/z exp.	Precisión (ppm)
Co+L (1:1)	[CoL] ²⁺	259,5901	259,5909	3,12
Zn+L (1:1)	[ZnL] ²⁺	259,0881	259,0875	2,32
Cu+L (1:1)	[CuL] ²⁺	258,5883	258,5874	3,15
Ni+L (1:1)	[NiL] ²⁺	256,0912	256,0920	3,13

* Los datos del sistema Fe(III)+L no se incluyen aquí porque no son concluyentes.

La tabla IV.1 pone de manifiesto que cuando se mezcla el metal con el ligando en proporción 1:1 se forma la especie mononuclear [ML]²⁺ aunque el ligando sea dinucleante.

IV.B.2.2 Valoraciones potenciométricas

Existe un precedente en la bibliografía para el sistema Zn+L. Así, Ciavatta y col., al realizar el estudio potenciométrico del sistema Zn+L con mezclas 1:1 y 2:1, demostraron la formación de especies mononucleares con mezclas 1:1 y de especies dinucleares con mezclas 2:1.⁴⁷

En el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio análogo con el sistema Co+L con objeto de mostrar si la conclusión sobre el sistema Zn-L puede ser extrapolado a otros metales de transición y confirmar de este modo las conclusiones obtenidas en el estudio de masas anterior.

El procedimiento experimental del estudio potenciométrico del sistema Co-L se detalla en la sección experimental de este Capítulo. Los resultados se recogen en la tabla IV.2 en forma de constantes de estabilidad. El correspondiente diagrama de distribución se representa en la figura IV.7.

La figura IV.7 muestra que al mezclar $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ y L en proporción 1:1 la especie predominante en disolución es la mononuclear (CoL), mientras que a proporciones 2:1 la especie predominante es la dinuclear.

Tabla IV.2. Constantes de estabilidad (como $\log K$) para el sistema Co-L, determinadas en Et_4NClO_4 0,15 M a 298,1 K.

Reacción ^a	$\log K_i$
$\text{M} + \text{L} + 2\text{H} = \text{MH}_2\text{L}$	18,16(9)
$\text{M} + \text{L} + \text{H} = \text{MHL}$	14,90(8)
$\text{M} + \text{L} = \text{ML}$	10,37(9)
$\text{M} + \text{L} = \text{MH}_1\text{L} + \text{H}$	1,9(1)
$2\text{M} + \text{L} = \text{M}_2\text{H}_1\text{L} + \text{H}$	10,0(1)
$2\text{M} + \text{L} = \text{M}_2\text{H}_2\text{L} + 2\text{H}$	1,2(1)

M = Co(II)

^a se omiten las cargas.

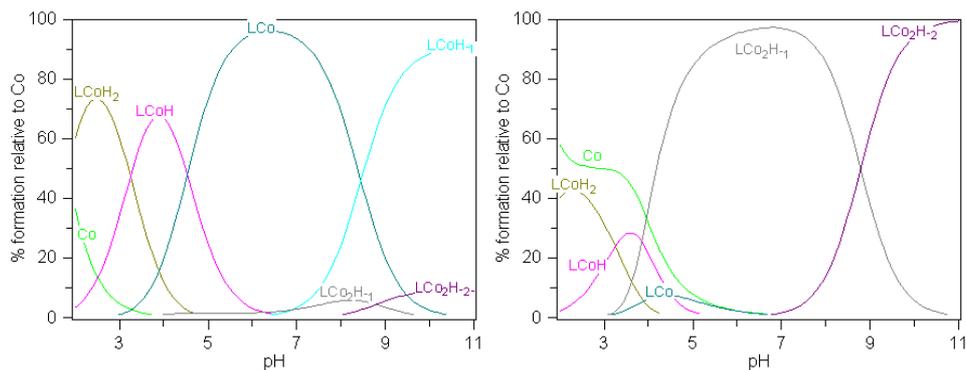


Figura IV.7. Diagrama de distribución para las especies Co-L basadas en las valoraciones potenciométricas: mezclas 1:1 (izquierda), mezclas 2:1 (derecha).

Este resultado estaría de acuerdo con el resultado previamente obtenido por Ciavatta y col.⁴⁷ para el sistema Zn(II):L.

Por tanto, tanto el estudio ESI como la valoración potenciométrica permiten concluir que con el presente ligando, y dependiendo de la proporción usada (1:1 ó 2:1), la mezcla contendrá la especie mononuclear (M-L) o la especie dinuclear (M₂-L), respectivamente.

Esta conclusión es importante para explicar los resultados que se describen en los siguientes apartados.

IV.B.3 Estudio de la interacción de los sistemas M+L con CT-ADN

Se estudió también la interacción de los complejos formados al mezclar disoluciones de M [siendo M = Co(II), Fe(III) y Zn(II)] y disoluciones de L, en proporciones M+L de 1:1 y 2:1, con CT-ADN, mediante la técnica de espectroscopia de fluorescencia.

Los detalles del procedimiento se incluyen en la sección experimental. Las experiencias se realizaron a 25 °C y pH = 7,0 mantenido con tampón HEPES (50 mM). Cabe mencionar que, aunque los sistemas cortan el ADN sin activante (como veremos en el siguiente apartado), la velocidad de corte (en estas condiciones) es lo suficientemente baja para permitir este estudio.

La figura IV.8 muestra los resultados de los ensayos competitivos de desplazamiento del bromuro de etidio para L, M-L y M₂-L. Se observa que, tanto el ligando como los complejos, disminuyen la intensidad del máximo de emisión del aducto CT-ADN-EB al aumentar la concentración de complejo (o de ligando). Este hallazgo implica que todos los sistemas interaccionan con el CT ADN.

Como se ha visto en la Introducción general, esta técnica permite la determinación de la K_{app} a partir del valor de C_{50} . Los valores aquí calculados se resumen en la tabla IV.3.

El ensayo de fluorescencia permite establecer dos conclusiones preliminares:

- Las especies dinucleares M₂-L presentan mayor afinidad que las respectivas mononucleares M-L.
- Las especies de Fe(III) presentan mayor afinidad que las análogas de Co(II) y de Zn(II) y, todas las especies M-L y M₂-L, mayor afinidad que el ligando.

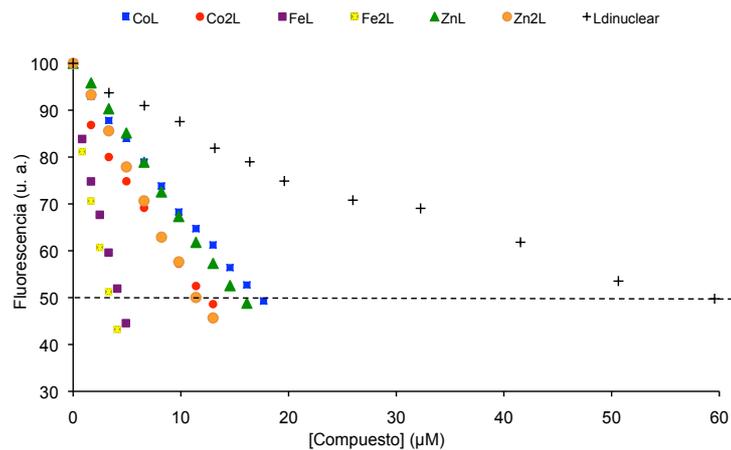


Figura IV.8. Estudios competitivos con CT-ADN de desplazamiento de bromuro de etidio para L, M-L y M₂-L.

Tabla IV.3. Constantes de unión aparentes al ADN (K_{app}) para el ligando L y sus correspondientes complejos metálicos (50 mM HEPES, pH=7,0).

Compuesto	C_{50} (μM)	K_{app} (M^{-1})
Fe ₂ -L	3,5	$1,0 \times 10^7$
Fe-L	4,0	$9,0 \times 10^6$
Co ₂ -L	12,0	$3,0 \times 10^6$
Co-L	17,0	$2,1 \times 10^6$
Zn ₂ -L	11,5	$3,1 \times 10^6$
Zn-L	15,5	$2,3 \times 10^6$
L	60,0	$6,0 \times 10^5$

Los anteriores resultados estarían de acuerdo con un mecanismo de interacción electrostática con el ADN favorecido al aumentar la carga positiva del complejo.

IV.B.4 Estudio de la actividad nucleasa de los sistemas M+L con pUC18

Tras el estudio preliminar de especiación y de interacción con el ADN se procedió al estudio propiamente dicho de actividad nucleasa. Los ensayos se realizaron en diferentes condiciones (secciones IV.B.4.1 a IV.B.4.7), tal como se describe en la sección experimental de este Capítulo.

IV.B.4.1 Sistemas M+L 1:1, *sin agente reductor*

En primer lugar se estudió la actividad nucleasa de los sistemas M-L [M = Fe(III), Co(II), Cu(II), Zn(II) or Ni(II)] incubándolos con pUC18 en medio tamponado (50 mM HEPES, pH 7,0) sin agente activante y en la oscuridad. Se realizó un estudio simultáneo con la [Cu(phen)₂]²⁺ como metalonucleasa de referencia, y un control con la disolución del ligando. Los productos generados por el corte se examinaron mediante electroforesis en gel de agarosa (figura IV.9).

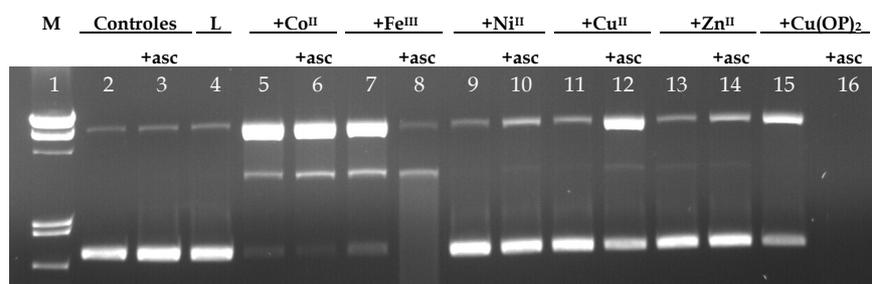


Figura IV.9. Ensayo de corte del pUC18 (37,5 μ M) **sin/con reductor** (ascorbato = asc, 40 μ M), producido por el sistema M-L (40 μ M:40 μ M) incubado en tampón HEPES (50 mM, pH = 7,0) durante 2 h a 37 °C.

Las carreras 5 y 7 muestran que las mezclas Fe-L y Co-L, tras 2 h de incubación a 37 °C, producen degradación prácticamente completa de la forma superenrollada del pUC18 a formas circular y lineal. En el mismo experimento, la nucleasa $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ sólo produce un ligero corte del SC ADN a forma circular. En contraste con los sistemas Fe-L y Co-L, en ausencia de agente activante los sistemas análogos con Cu, Zn y Ni no presentan actividad nucleasa apreciable. El ligando a pH 7,0 (ver más adelante) tampoco produce escisión del pUC18.

IV.B.4.2 Sistemas M+L 1:1, con agente reductor (ascorbato)

Los sistemas anteriores se ensayaron también bajo las mismas condiciones pero *con la adición de ascorbato* (en la misma concentración que la mezcla M-L, esto es, 40 μM). Paralelamente se hicieron ensayos control con disoluciones que contenían sólo la sal metálica $[(\text{M}(\text{NO}_3)_n)$ ($n = 2,3$)], en la misma concentración (40 μM , 1x), con y sin ascorbato (ensayo no mostrado). Ninguna sal mostró propiedades nucleolíticas significativas en las condiciones del ensayo.

Los resultados con las disoluciones M-L se muestran en la figura figura IV.9 (ver página anterior). En el caso del sistema Co-L la adición de ascorbato no produce un aumento apreciable del corte (carreras 5, 6). Para el sistema Fe-L se produce una casi completa degradación de la forma SC a forma lineal, pudiéndose incluso apreciar una estela (*smearing*) en el gel (carreras 7, 8). El sistema Cu-L experimenta activación, con rotura parcial del SC ADN a ADN lineal (carreras 11, 12). En el caso de las especies Ni-L y Zn-L, el efecto del ascorbato es despreciable (carreras 9, 10 y 13, 14). Finalmente, el catión $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ en presencia de agente reductor produce la completa degradación del ADN (carreras 15, 16), como era de esperar por ser el prototipo de las nucleasas oxidativas.

Con el sistema Co-L se llevaron a cabo ensayos similares con otros agentes activantes como H_2O_2 o glutatión, pero no se observaron diferencias significativas con respecto al ensayo con ascorbato.

Resumiendo, los sistemas Co-L y Fe-L son nucleasas muy eficientes con y sin ascorbato; los sistemas Ni-L y Zn-L no producen

corte del ADN en ningún caso; el sistema Cu-L requiere un cofactor para ser activo. Por tanto, desde el punto de vista de la activación con ascorbato, se observan dos conductas diferenciadas: la del grupo M = Co(II), Ni(II) y Zn(II), sistemas que no son activados por el reductor, y la del grupo M = Fe(III) y Cu(II), sistemas que son claramente activados. Cualitativamente, los resultados del ensayo de actividad nucleasa de las disoluciones M-L se pueden esquematizar de la siguiente manera:

- sin ascorbato:
 $\text{Fe(III)} \approx \text{Co(II)} \gg [\text{Cu(phen)}_2]^{2+} > \text{Cu(II)} \approx \text{Zn(II)} \approx \text{Ni(II)} \approx 0$
- con ascorbato (1x):
 $[\text{Cu(phen)}_2]^{2+} > \text{Fe(III)} \approx \text{Co(II)} \gg \text{Cu(II)} > \text{Zn(II)} \approx \text{Ni(II)} \approx 0$

La necesidad de ascorbato para la actividad nucleolítica sugiere que el complejo Cu-L debe actuar por un mecanismo básicamente oxidativo. La naturaleza oxidativa/hidrolítica del sistema con Co(II) o Fe(III) se analizará con más profundidad en secciones posteriores.

Por último, cabe destacar que la ausencia de corte que muestra el sistema Zn-L frente al pUC18 contrasta claramente con la actividad hidrolítica de los complejos $\text{Zn}_2\text{-L}$ y $\text{Zn}_2\text{-L-NH}_2$ frente a sustratos modelo de ARN descrita ampliamente en la bibliografía.^{32-34,36-38} Esta diferencia de actividad puede explicarse considerando que el ADN tiene unos requerimientos diferentes y es un sustrato generalmente más inerte a la hidrólisis que los modelos de ARN.

IV.B.4.3 Sistemas M+L 1:1 versus 2:1, sin agente reductor

Los estudios potenciométricos y de ESI-MS indican que, dependiendo de la proporción M+L utilizada, 1:1 ó 2:1, la disolución mezcla resultante contiene predominantemente especies mononucleares (M-L) o dinucleares (M_2 -L), respectivamente. Con el fin de comparar la actividad del sistema dinuclear con la del mononuclear se realizaron dos tipos de ensayos de corte del pUC18.

(i) En primer lugar se estudió la capacidad de corte de distintas mezclas Co+L, unas conteniendo proporciones Co+L 1:1 y otras 2:1. Concretamente, se ensayaron disoluciones Co+L de 5:5 a 80:80 (μ M) y de 10:5 a 160:80 (μ M) (equivalen a $[CoL] = 5-80$ y $[Co_2L] = 5-80$, respectivamente).

La figura IV.10a muestra la rotura del ADN por los sistemas Co-L (carreras 7-11) y Co_2 -L (carreras 12-16). El experimento revela que el corte aumenta con la concentración hasta alcanzar un máximo para 1:1 [40μ M Co(II) + 40μ M L, carrera 10], y otro para 2:1 [80μ M Co(II) + 40μ M L, carrera 15]. En la figura IV.10b se incluye el perfil del histograma con la cuantificación del corte.

La conclusión del experimento es que, en principio, el sistema dinuclear no es más activo que el sistema mononuclear ya que, en ambos casos, el máximo de actividad corresponde a una concentración de complejo de 40μ M (M-L, M_2 -L). El resultado sugiere incluso que sólo se requiere *un M^{n+} por L* para conseguir la máxima actividad.

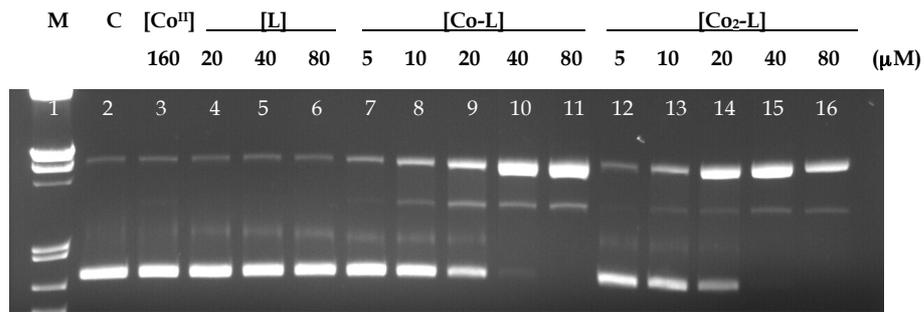


Figura IV.10a. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) producido por CoL y Co₂L a diferentes concentraciones, incubado en tampón HEPES (50 mM, pH = 7,0) durante 2 h a 37 °C. C: ADN control.

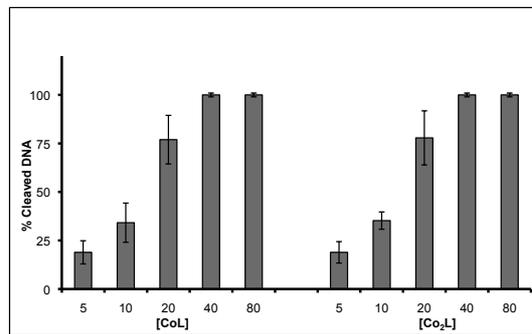


Figura IV.10b. Histograma obtenido por cuantificación⁴⁸ de la electroforesis de la figura IV.10a.

(ii) Para confirmar la conclusión anterior se realizó un ensayo alternativo en el que se mantuvo *fija la concentración de L* (40 μ M) y se mezcló con *cantidades variables de Co(II)*.

La figura IV.11a muestra que la actividad de corte del ADN del sistema Co-L aumenta al aumentar la concentración de metal hasta alcanzar un máximo para la proporción 1:1 (carrera 6), con quizá una ligera disminución de la actividad cuando se sigue aumentando la concentración del metal. En la figura IV.11b se muestra la “curva de saturación” obtenida por cuantificación de las bandas del ensayo electroforético.

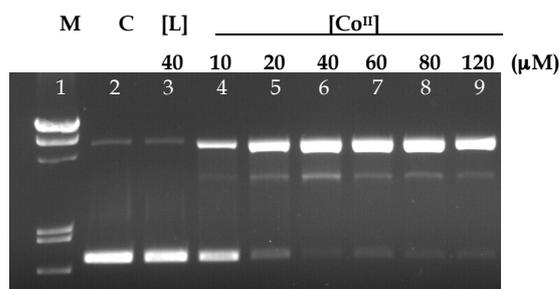


Figura IV.11a. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por L (40 μM) a diferentes concentraciones de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, incubado en tampón HEPES (50 mM, pH=7,0) durante 2 h a 37 °C. C: ADN control.

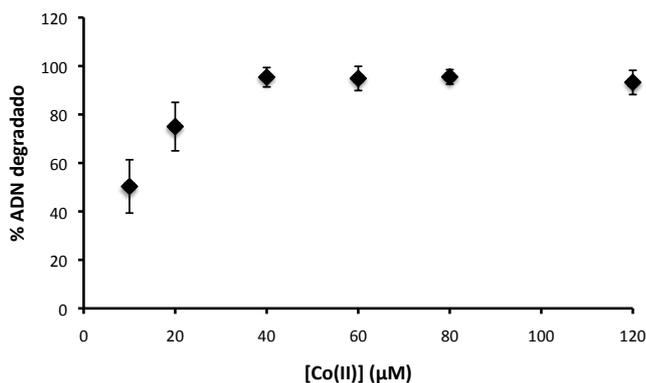


Figura IV.11b. Variación del corte de pUC18 con la concentración de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, para una concentración constante de L (40 μM), referida a la experiencia de la figura IV.11a.

Los mismos experimentos (i + ii) fueron realizados con Fe(III). El sistema Fe+L exhibe un patrón similar, también con saturación de la actividad para una proporción 1:1 (ver Anexo, figuras IV.A.1 y IV.A.2).

Resumiendo, las experiencias de las secciones i y ii permiten afirmar que:

Las especies mononucleares M-L son al menos tan activas como las análogas dinucleares $\text{M}_2\text{-L}$ respecto al corte del pUC18.

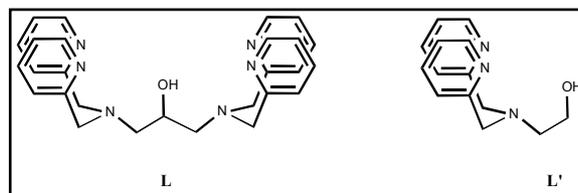
La conclusión anterior indica también que no existe sinergia entre los dos centros metálicos del complejo $\text{M}_2\text{-L}$.

IV.B.4.4 Sistemas $M+L'$ y $M + 2L'$ (L' = análogo de L pero mononucleante), sin agente reductor

Como se ha discutido previamente en la introducción, el uso de ligandos dinucleantes es una estrategia ampliamente utilizada para conseguir nucleasas eficientes. Sin embargo, en la bibliografía existen pocos estudios sobre la función de las posiciones de unión de un ligando cuando éstas no se encuentran implicadas en la coordinación directa a un centro metálico. En algunos casos estos sitios *libres*, sin metal, pueden permitir interacciones de segunda esfera de coordinación con el sustrato y/o una molécula de agua, y promover así la hidrólisis del enlace fosfato de forma más eficiente. En este sentido, algunos trabajos recientes han puesto en entredicho el mecanismo de corte promovido por dos centros metálicos en las metalonucleasas naturales,^{49,50} y defienden la importancia de las interacciones de segunda esfera de coordinación con determinados residuos del centro activo.

Con estos precedentes, la ausencia de cooperatividad entre los dos centros metálicos, junto con la ligera disminución de actividad para relaciones $M+L$ mayores de 1:1, llevan a plantearse el papel del segundo *brazo coordinante* del ligando L en la actividad nucleasa.

(i) Para contestar esta cuestión se efectuó un ensayo con el ligando L' [$L' = [\text{bis}(\text{piridin-2-ilmetil})\text{amino}]-2\text{-propanol}$], constituido por una unidad bis(piridin-2-metil)amino (bpa) unida a un etanol, en vez de dos unidades bpa unidas a través del conector 2-propanol (esquema IV.5).



Esquema IV.5. Ligandos L y L' estudiados en este apartado.

La experiencia se realizó en las mismas condiciones y con las mismas concentraciones que el ensayo anterior (sección IV.B.4.3.ii). El análisis de la electroforesis con L' (figura IV.12) y su comparación con la anterior electroforesis con L (figura IV.11a), revela que *el sistema Co-L es mucho más activo que el sistema Co-L'*: la mezcla 40 μM Co + 40 μM L' (carrera 6, figura IV.12) solo produce una transformación parcial de SC ADN a circular, mientras que la mezcla 40 μM Co + 40 μM L (carrera 6, figura IV.11a) degrada completamente el SC ADN a las formas circular y lineal.

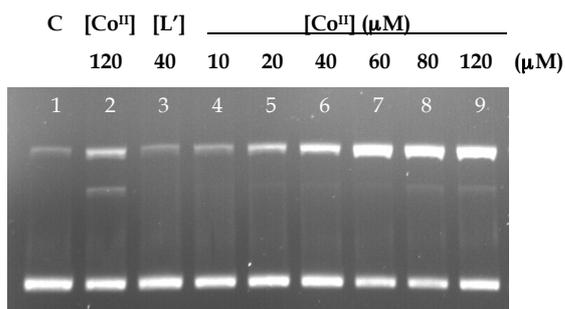


Figure IV.12. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por L' (40 μM) a diferentes concentraciones de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, incubado en tampón HEPES (50 mM, pH=7,0) durante 2 h a 37 °C. C: ADN control.

(ii) Se realizó además un ensayo complementario (resultados no mostrados) en el que se añadió un segundo equivalente de L' a los sistemas M+L'. El corte del ADN producido por el sistema M+2L' no aumenta con respecto al producido por el sistema M+L'. Por tanto, se puede concluir que la actividad nucleasa requiere que los dos *sitios* coordinantes estén unidos a través del adecuado espaciador (el grupo 2-propanol).

(iii) Finalmente, se llevó a cabo un tercer ensayo, esta vez de interacción, del sistema M+L' [M = Co(II), Fe(III) y Zn(II)] con el CT ADN mediante la técnica de fluorescencia (ver Anexo, figuras IV.A.3 y tabla IV.A.4). Los resultados del ensayo muestran que todos los sistemas M-L' disminuyen la intensidad de fluorescencia del sistema CT-ADN-EB, pero los correspondientes valores de K_{app} son inferiores a los obtenidos para los sistemas análogos M-L y M₂-L.

Los estudios anteriores indican que:

- Los complejos M-L son más activos como nucleasas que los análogos M-L'.
- Los complejos M-L interaccionan con el ADN mejor que los análogos M-L', aunque menos fuertemente que los correspondientes complejos M₂-L.
- Los complejos M-L son igual o ligeramente más activos que los correspondientes M₂-L.

Estos resultados nos llevan a formular la siguiente hipótesis:

El segundo *sitio* de unión al centro metálico de L (segunda unidad bpa), vacante en las especies M-L, además de aumentar la afinidad del complejo por el ADN, debe participar en el mecanismo de escisión del ADN.

IV.B.4.5 Cinética de corte del sistema Co-L, sin agente reductor

La figura IV.10a (sección IV.B.4.3) muestra que la actividad nucleolítica del sistema Co-L aumenta al aumentar la concentración de complejo, y que este efecto se *satura* a una concentración cercana a 40 μM . Tomando como referencia esta concentración, se realizó el estudio cinético de la degradación del pUC18. Los detalles experimentales se incluyen en la sección experimental de este Capítulo.

La figura IV.13 (arriba) muestra el grado de corte producido por el sistema Co-L en función del tiempo de reacción. El paso de la forma superenrollada a las formas circular y lineal varía exponencialmente con el tiempo de reacción (figura IV.13, abajo), dando una cinética de *pseudo*-primer orden. La constante de velocidad calculada es: $k_{obs} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ (cuadro insertado).

Este valor de k_{obs} es comparable al obtenido por Liu y col. para el sistema Fe(III)-DTPB ($k_{obs} = 2,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$),¹⁷ y al referido a Mao y col. para dos complejos de Cu(II) con ligandos bipyridina conjugados con grupos guanidinio o amonio ($k_{obs} = 2,4$ y $4,0 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$),^{42,43} y supone un

aumento de la velocidad de la reacción sin catalizar del orden de 10^9 veces más alta.

La constante de velocidad del sistema Co-L (ausencia de activante), $k_{obs} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, es comparable a la de las nucleasas hidrolíticas más efectivas descritas hasta el momento.

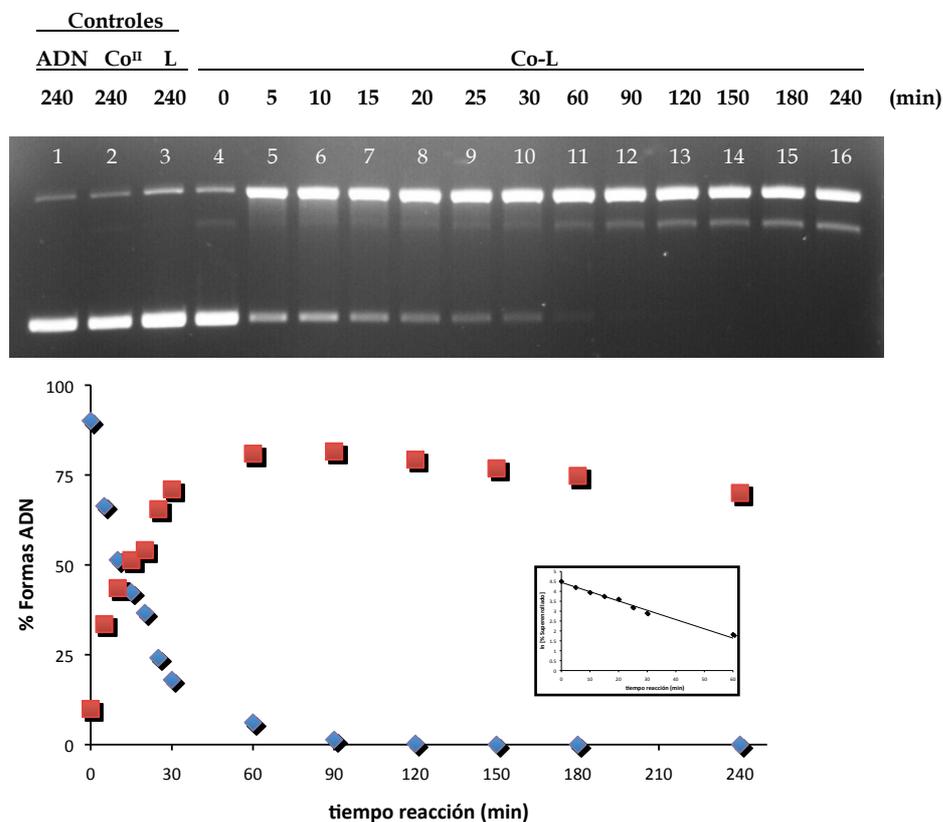


Figura IV.13. Cinética de corte del pUC18 ($37,5 \mu\text{M}$) promovido por Co-L ($40 \mu\text{M}$), incubado en tampón HEPES (50 mM , $\text{pH}=7,0$) durante 2 h a $37 \text{ }^\circ\text{C}$: (**arriba**) electroforesis en gel de agarosa ($0,8\%$) de los productos de reacción a diferentes tiempos; carreras 1-3: controles de ADN (pUC18), Co(II) ($40 \mu\text{M}$) y L ($40 \mu\text{M}$); (**abajo**) variación de la concentración en función del tiempo de las formas superenrollada (◆) y circular (■); (**cuadro insertado**) ajuste lineal de los datos según la ecuación 8 del apartado 3.5.2 de la Introducción general.

IV.B.4.6 Mecanismo de corte del sistema M+L

La aproximación al mecanismo de corte se ha realizado mediante los tres experimentos que se describen a continuación. El procedimiento experimental se efectuó como se detalla en el apartado 3.2.4 de la Introducción general y en la sección experimental de este Capítulo.

(i) Estudio del corte *en función de la fuerza iónica* (fijada con NaCl)

Los ensayos de fluorescencia (ver sección IV.B.3) sugieren que en la unión de los sistemas M-L y M₂-L al ADN hay una importante contribución electrostática. Para apoyar esta conclusión se realizó un estudio de la *dependencia de la fuerza iónica* de la actividad nucleasa de los sistemas Co-L y Fe-L mediante la adición de cantidades crecientes de NaCl a la mezcla de reacción.

Los resultados del estudio muestran que la actividad de corte disminuye de hecho al aumentar la fuerza iónica del medio (figura IV.14), lo que implica que los complejos M-L, cargados positivamente, compiten con el NaCl por las posiciones aniónicas de los enlaces fosfodiéster, confirmándose así la importancia de las atracciones electrostáticas en la interacción del complejo con el ADN. La disminución de la actividad es menos acusada en el caso del compuesto Fe-L que en el del Co-L, probablemente por la mayor carga positiva del primero (comparar las carreras 3 con 4 y 8 con 9).

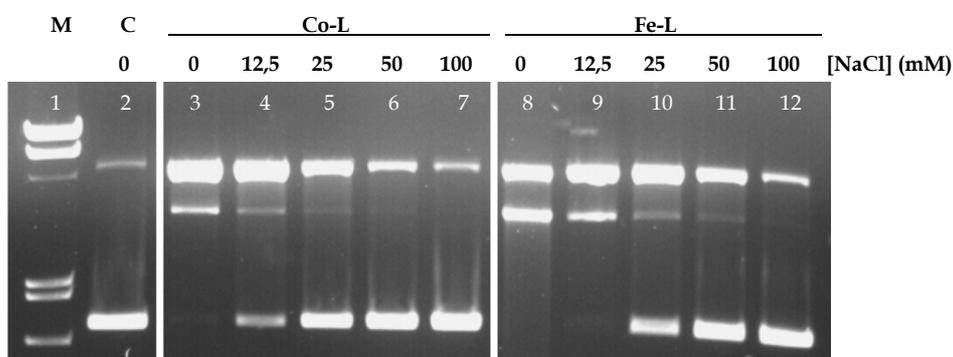


Figura IV.14. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) producido por los sistemas Co-L y Fe-L (40 μ M) en presencia de fuerza iónica (NaCl), incubado en tampón HEPES (50 mM, pH=7,0) durante 2 h a 37 °C. C: ADN control.

(ii) Estudio del corte *en función del pH*

La actividad de las nucleasas naturales y de las nucleasas hidrolíticas artificiales varía con el pH. Los ensayos anteriores se han realizado a pH 7,0. Con objeto de profundizar en el mecanismo del sistema se ensayó también la actividad del ligando y la de los sistemas más activos, Co-L y Co₂-L, en el rango de pH 5,5-8,0. Los resultados se muestran en la figura IV.15.

Inesperadamente, el ligando L *per se*, es decir, en ausencia de metal, y sin activante, exhibe actividad nucleasa importante por debajo de pH 7,0. Esta capacidad de L para cortar el ADN a pH 5,5 es incluso comparable a la que presentan muchos complejos metálicos a pH más altos, incluyendo la [Cu(phen)₂]²⁺.

También inesperadamente, los complejos M-L [M=Co(II), Fe(III); resultados para el Fe no mostrados aquí] muestran mayor eficiencia a pH = 5,5-7,0 que a pH = 8,0. Estos resultados contrastan con los descritos en la bibliografía, ya que, aunque algunas nucleasas naturales cortan a pH ácido, la mayoría de las nucleasas sintéticas son incapaces de hacerlo.⁵¹

Por esta dependencia del pH concluimos que el poder catalítico de estos sistemas debe residir en la forma protonada de alguno de sus grupos. Esta hipótesis sería compatible con los valores de pK_a de los protones unidos a los nitrógenos del ligando L: pK_{a1} = 3,15; pK_{a2} = 3,80; pK_{a3} = 5,2 y pK_{a4} = 6,32.⁴⁷

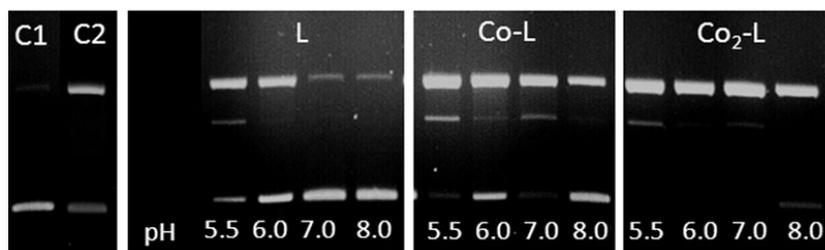


Figura IV.15. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 ADN (37,5 μM) producido por L, CoL y Co₂L (40 μM) a diferentes pHs, incubado durante 2 h a 37 °C. C1 = control de ADN, C2 = ADN + [Cu(phen)₂]²⁺ (40 μM) a pH 7. Tampones utilizados: pH 5.5 (50 mM MES), pH 6 (50 mM cacodilato), pH 7 y 8 (50 mM HEPES).

Finalmente, se han descrito muy pocos casos de ligandos capaces de cortar ésteres fosfato en agua por sí mismos. Entre ellos se encontrarían ciertos ligandos tripodales y dímeros de ciclodextrina capaces de cortar sustratos modelos de ADN, y ciertas poliaminas macrocíclicas que cortan el ADN pero sólo a concentraciones milimolares.^{52,53}

(iii) Estudio del corte *en presencia de agentes captadores de ROS y de agentes de unión a los surcos*, sin agente reductor

En el apartado IV.D.1 se mostró que los complejos Co-L y Fe-L se comportan como nucleasas eficientes sin necesidad de activante. Este hecho, junto con los antecedentes a que nos hemos ido refiriendo, apunta que el proceso de corte es de *naturaleza hidrolítica*.

Para establecer si, al menos parcialmente, también hay especies reactivas de oxígeno (ROS) implicadas en la actividad catalítica de los complejos Co-L y Fe-L, se llevaron a cabo ensayos de corte en presencia de agentes captadores de oxígeno singlete (NaN₃) y de radicales hidroxilo (formiato sódico y L-Histidina). Los sistemas se incubaron asimismo en presencia de agentes de unión al surco menor (Hoechst 33258) y al surco mayor (verde de metilo). Las correspondientes electroforesis se muestran en la figura IV.16.

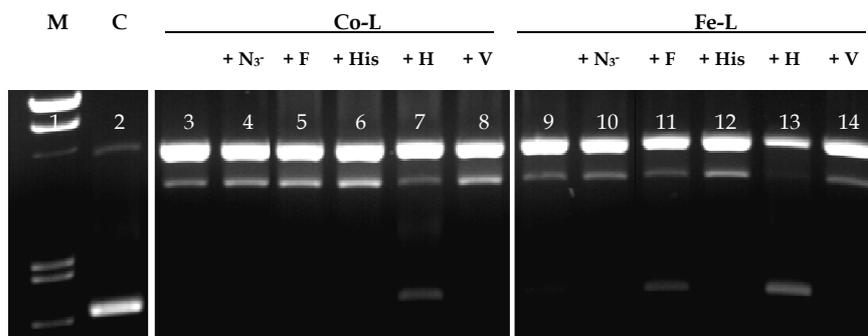


Figura IV.16. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por Co-L y Fe-L (40 μM) en presencia de diferentes agentes, incubado en tampón HEPES (50 mM, pH=7,0) durante 2 h a 37 °C. C = control pUC18; N₃ = azida sódica (0,5 mM); F = formiato sódico (0,5 mM); His = L-Histidina (0,5 mM); H = Hoechst 33258 (20 μM); V = verde de metilo (5 μM). C: ADN control; carreras 3 y 9: control en ausencia de agente.

En relación al ensayo con las *especies de unión a los surcos*, los dos complejos se comportan de forma parecida. En presencia de verde de metilo la actividad nucleolítica no se inhibe apreciablemente (comparar carreras 3 con 8 y 9 con 14), mientras que en presencia de Hoechst el corte de plásmido se reduce significativamente (comparar carreras 3 con 7 y 9 con 13). Estos resultados indican que para los dos sistemas M-L la aproximación que conduce a la rotura del ADN se produce preferentemente por el surco menor. La conclusión estaría de acuerdo con la naturaleza electrostática de la interacción, sugerida por los ensayos de fluorescencia y las electroforesis a distinta fuerza iónica descritos anteriormente.

Con respecto a los *agentes captadores de ROS*, en el caso del complejo Co-L no se produce inhibición en ningún caso, lo que descarta la implicación de especies reactivas de oxígeno, al menos en su forma libre y difusible. Por tanto, el mecanismo de corte debe ser esencialmente hidrolítico, lo que explicaría que la adición de ascorbato no produzca activación en el sistema (sección IV.B.4.2). En el caso del complejo Fe-L se detecta en cambio una ligera activación en presencia de formiato sódico. La observación sugiere que el mecanismo de corte es predominantemente hidrolítico pero con cierta contribución oxidativa. Además, como se indicó anteriormente (sección IV.B.4.2), el sistema Fe-L se activa fuertemente en presencia de ascorbato; esto supondría que en estas condiciones el mecanismo oxidativo se vuelve importante.

IV.B.5 Conclusiones - Discusión

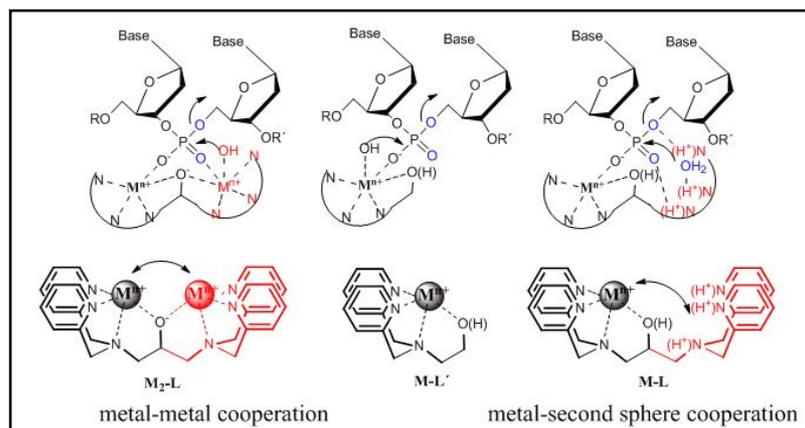
En este Capítulo la experiencia adquirida en las técnicas de estudio de las nucleasas oxidativas se ha aplicado al estudio de un sistema hidrolítico. Así, se ha investigado por primera vez la actividad nucleasa del sistema M+L {L = 1,3-bis[bis(piridin-2-ilmetil)amino]propan-2-ol} sobre plásmidos de ADN. L, un ligando dinucleante con un espaciador 2-propanol, se escogió por la probada capacidad hidrolítica de los complejos M₂-L [M= Zn(II) y Co(II)] frente a *sustratos modelo* de los ácidos nucleicos. Los resultados más relevantes se resumen como sigue:

1. El estudio con los cationes metálicos Co(II), Cu(II), Fe(III), Zn(II) y Ni(II) revela que los sistemas Co+L y Fe+L son nucleasas eficientes *sin necesidad de ningún agente activante* (químico y/o fotoactivación); el sistema Cu+L requiere un cofactor (ascorbato) para ser activo; los sistemas Ni+L y Zn+L no producen corte del ADN en ningún caso. Los sistemas más eficientes, Co+L y Fe+L, se han estudiado aquí en mayor profundidad.
2. El estudio potenciométrico del sistema Co+L muestra que L forma especies *dinucleares* M₂-L cuando la mezcla M+L se realiza en proporción 2:1, y complejos *mononucleares* M-L cuando la mezcla M+L se realiza en proporción 1:1.
3. La eficiencia como nucleasas de los sistemas Co+L y Fe+L se ha ensayado en diferentes proporciones M:L. Los resultados de las electroforesis muestran que el sistema 1:1 (M-L) es igual o más activo que el sistema 2:1 (M₂-L). Bajo las mismas condiciones se han estudiado también los complejos metálicos del ligando mononucleante análogo L' {L' = [bis(piridin-2-ilmetil)amino]-2-propanol}, y se ha observado que las especies M-L' son considerablemente menos activas que las análogas M-L.
4. El estudio cinético del sistema Co-L ha permitido calcular el valor de la constante de velocidad, $k_{\text{obs}} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Este valor, muy alto, permite incluir el sistema entre las nucleasas (sin activante) más efectivas descritas hasta el momento.

5. Los estudios del mecanismo de acción indican que el sistema Co-L es una nucleasa hidrolítica y que el sistema Fe-L es una nucleasa predominantemente hidrolítica con contribución oxidativa. Ambas nucleasas interactúan de forma electrostática con el ADN, preferentemente por el surco menor. Los sistemas M_2 -L presentan mayor afinidad que los análogos M-L, lo que estaría de acuerdo con el carácter electrostático de la interacción.

6. Sorprendentemente, el ligando L, en ausencia de metal y de activante, es capaz de cortar el pUC18 por debajo de pH 7. Son escasos (y muy recientes) los ejemplos de ligandos con esta capacidad descritos en la bibliografía.

Las conclusiones de los puntos 2 y 3 sugieren que el segundo *brazo* coordinante de L debe jugar un papel fundamental en el mecanismo de catálisis de la metalonucleasa M-L (esquema IV.6). Cuando la segunda unidad bpa del L no está coordinada al ion metálico, el ligando posee una amina terciaria, dos piridinas y un grupo hidroxilo capaces de promover interacciones tanto con el nucleófilo (OH^- ?) como con los grupos ésteres fosfato del sustrato. De esta forma, la posición vacante de coordinación del ligando actuaría como segunda esfera de coordinación del metal. Estas conclusiones sugieren un nuevo paradigma de interacciones cooperativas en los ligandos dinucleantes.



Esquema IV.6. Complejos metálicos estudiados y posibles interacciones cooperativas en la ruptura del ADN, siendo L y L' los ligandos mostrados en los esquemas IV.3 y IV.5.

Durante los últimos años se han seguido diversas estrategias para inducir interacciones de segunda esfera de coordinación en catálisis.⁵⁴⁻⁵⁸ En este sentido, el presente estudio muestra que es posible aumentar la actividad catalítica de un L dinucleante manteniendo vacante el segundo sitio de unión al metal, que participaría como segunda esfera de coordinación. Estos resultados pueden ser de utilidad a la hora de diseñar catalizadores biomiméticos de otras transformaciones con importancia biológica y tecnológica.

Por último, debe hacerse constar que la falta de actividad del sistema Zn+L frente al *plásmido* pUC18 observada en este trabajo contrasta con los resultados descritos por diversos autores sobre *sustratos modelo*. Resulta evidente que en la rotura del ADN intervienen más factores que en la rotura de un simple compuesto modelo y, por tanto, hay que tomar las extrapolaciones de modelo a sustrato real con precaución.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales y Métodos

Materiales

Todos los reactivos y disolventes que se han utilizado para la realización de este trabajo han sido productos puros suministrados por las casas comerciales Alfa Aesar, Panreac, Fermentas y Sigma-Aldrich.

Las sales metálicas, los tampones HEPES, cacodilato, MES, azida sódica, L-Histidina, formiato sódico y Hoechst 33258 fueron distribuidos por Sigma Aldrich. Cloruro sódico y yoduro potásico fueron suministrados por Panreac. Verde de metilo fue comprado a Alfa Aesar. Plásmido pUC18 ADN (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en 10 mM Tris-HCl (pH = 7,6) y 1 mM EDTA fue suministrado por Fermentas. Los ligandos L {1,3-bis[bis(piridin-2-ilmethyl)amino]propan-2-ol} y L' [bis(piridin-2-ilmethyl)amino]propan-2-ol} fueron suministrados por el prof. J. C. Mareque-Rivas y sintetizados por métodos descritos previamente.

Métodos

Estudios de corte del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa

La capacidad de corte de los diferentes complejos metálicos se ha evaluado siguiendo la degradación de la forma superenrollada de un plásmido de pUC18 (forma I) a las formas circular abierto (Forma II) y lineal (Forma III) mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa.

Las disoluciones de las sales metálicas fueron preparadas frescas antes de cada experimento. En un ensayo típico, las mezclas de reacción se prepararon mediante la adición de la cantidad adecuada de una disolución de la sal metálica (disuelta en agua) y de una disolución de ligando (disuelto en metanol). Después de 10 minutos, 0,5 μL de pUC18 ADN (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1500 μM nucleótidos) y cantidades adecuadas de una disolución de tampón se añadieron para completar el volumen final de 20 μL . A continuación, las muestras se incubaron a 37 °C durante 2 h en un Termociclador. El porcentaje final de MeOH fue inferior al 5 % y la concentración final de ADN fue de 37,5 μM in nucleótidos en todos los casos.

La reacción se detuvo mediante la adición de una disolución (tampón de carga, 4 μL) compuesta de azul de bromofenol (0,25%), xilenecianol (0,25%), glicerol (30%), y EDTA (250 mM). A continuación, las muestras se cargaron en un gel de agarosa (0,8 %) en tampón TBE 0,5x (0,045 M Tris, 0,045 M ácido bórico y 1 mM EDTA) que contenía una concentración de 2 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$ de una disolución madre de bromuro de etidio de (10 mg/mL). Las muestras se separaron en el gel tras aplicar una corriente de 120 V durante 2 h. Las bandas se fotografiaron mediante una cámara UVIDOC HD2 (UVItec Cambridge).

Las proporciones relativas de las diferentes formas del plásmido fueron cuantificadas mediante el programa ImageJ 1.34s (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Un factor de corrección de 1,31 fue utilizado para compensar la menor afinidad de la forma I por el bromuro de etidio.⁵⁹ La proporción de cada ADN fue calculada dividiendo la intensidad de cada banda por el total de las intensidades de todas las bandas en una misma carrera.

El procedimiento general para determinar el mecanismo de acción general de los complejos consistió en la adición de diferentes agentes inhibidores a la mezcla de reacción. Los agentes utilizados fueron: azida sódica (0,5 mM), formiato sódico (0,5 mM), L-Histidina (0,5 mM), yoduro potásico (0,5 mM), verde de metilo (5 μ M) y Hoechst 33258 (20 μ M). Las muestras fueron tratadas como se describió anteriormente.

Para el estudio cinético del corte de ADN por el complejo CoL (40 μ M) las muestras de reacción fueron detenidas a cada uno de los tiempos deseados mediante la adición de tampón de carga y posterior incubación en hielo. Los datos fueron ajustados a una reacción de primer orden definida por la ecuación 1, donde S corresponde a la concentración de la forma superenrollada a un t determinado, S_0 corresponde a la concentración inicial y k_{obs} corresponde a la constante observada de primer orden de la ruptura de ADN de la forma I a la forma II. La constante observada fue expresada en min^{-1} .

$$S = S_0 \exp(-k_{obs} t)$$

Con el fin de investigar la contribución de las interacciones electrostáticas en el corte del plásmido de ADN por los complejos CoL y FeL, los ensayos de corte se realizaron de forma normal pero añadiendo a la disolución cantidades crecientes de fuerza iónica mediante la adición de NaCl (desde 0 hasta 100 mM).

Los experimentos anaeróbicos se realizaron en una "bolsa inerte" (*glove box* en inglés) y bajo atmósfera de argón. A todas las disoluciones madre se les realizó cinco ciclos de Ar antes de introducir las en la "bolsa inerte". Las mezclas de reacción se prepararon mediante la adición de las cantidades adecuadas de las disoluciones madre en los tubos eppendorf, los cuales a continuación fueron sellados e incubados a 37 °C. El resto de condiciones fueron las mismas que los experimentos realizados en condiciones aeróbicas.

Todos los resultados presentados fueron realizados al menos por triplicado.

Estudios de interacción competitivos mediante fluorescencia

Los estudios competitivos de desplazamiento de bromuro de etidio fueron realizados mediante la determinación de la intensidad de emisión de bromuro de etidio (EB) en un fluorímetro JASCO FP-6200 a temperatura ambiente. Los experimentos se realizaron mediante la adición de alícuotas de los diferentes complejos en una disolución de EB (3,78 μ M) y CT-DNA (3 μ M CT-DNA ($\epsilon_{260} = 13.200 \text{ M}(\text{bp})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) en tampón HEPES (50 mM, pH 7,0) hasta que la fluorescencia inicial disminuyó al 50 %.

Los diferentes complejos se prepararon previamente tras la mezcla de L (o L') y $M(\text{NO}_3)_2$ ($M = \text{Co(II)}, \text{Fe(III)}$ o Zn(II)) en las proporciones molares de 2:1 (o 1:1) en agua Milli-Q durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las longitudes de onda de excitación y emisión se fijaron a 500 y 595 nm respectivamente. Las constantes de unión aparentes se calcularon mediante la ecuación 2, donde $K_{\text{EB}} = 9,5 \times 10^6 \text{ M (bp)}^{-1}$ y C_{50} es la concentración de complejo necesaria para disminuir al 50 % la fluorescencia inicial del aducto EB-CT ADN. Todos los valores de fluorescencia se normalizaron a una fluorescencia relativa del 100%.

$$K_{\text{app}} = K_{\text{EB}} \times (3,78/C_{50})$$

Espectrometría de alta resolución ESI-MS

Los espectros de masas mediante la técnica electrospray de alta resolución (HR-ESI-MS) fueron realizados mediante un equipo Waters LCT Premier XE (Waters, Milford, MA, USA) con un modo de detección positivo *W*-optics. Los espectros de masas fueron obtenidos mediante la inyección directa de las muestras. Los parámetros se optimizaron para obtener la mejor relación señal/ruido (voltaje del capilar 1 kV, voltaje del cono 15 V, flujo del gas de desolvatación 600 L h^{-1} , flujo del gas en el cono 50 L h^{-1} , temperatura de desolvatación $220 \text{ }^\circ\text{C}$, temperatura de la fuente $80 \text{ }^\circ\text{C}$ y flujo $20 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$). 30 espectros fueron adquiridos para obtener medidas representativas. El instrumento fue calibrado en el rango m/z de 200-1.000 antes de cada medida mediante el uso de una disolución patrón de NaI ($1 \mu\text{M}$). El análisis de los datos se realizó mediante el programa informático Masslynx versión 4.1 (Waters, Milford, MA, USA).

Potenciometrías

Las valoraciones potenciométricas fueron realizadas a $298,1 \pm 0,1 \text{ K}$ usando como electrolito NEt_4ClO_4 ($0,15 \text{ M}$). El procedimiento experimental (bureta, celda, agitador, microcomputadora, etc.) ha sido descrito anteriormente. La adquisición de datos fue realizado con el programa PASAT.⁶⁰ El electrodo de referencia fue un electrodo de Ag/AgI en una disolución saturada de KCl. La concentración de iones $[\text{H}^+]$ fue calculada mediante una valoración de una disolución de NaOH (y libre de CO_2) con una disolución patrón de HCl y la determinación del punto de equivalencia se calculó mediante el método de Gran,^{61,62} el cual permite obtener el potencial standard (E_0') y la constante de protonación del agua [$\text{pK}_w = 13,73(1)$].

Previamente a la determinación de las constantes de estabilidad de Co(II) , se realizó una valoración para calcular los valores de las constantes de protonación de L. Los valores obtenidos estuvieron de acuerdo con los descritos en la bibliografía.⁴⁷ Para obtener las constantes de estabilidad del sistema Co-L, se realizaron valoraciones de disoluciones de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (10^{-3} M) y L en proporciones molares de 1:1 y 2:1, acidificadas con HCl con una disolución de NaOH. El programa HYPERQUAD⁶³ fue utilizado para calcular las constantes de protonación y estabilidad. Los datos fueron unidos y tratados simultáneamente para dar las constantes de estabilidad finales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Wolfenden, R. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3379.
- (2) Williams, N. H.; Takasaki, B.; Wall, M.; Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1999**, *32*, 485.
- (3) Schroeder, G. K.; Lad, C.; Wyman, P.; Williams, N. H.; Wolfenden, R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4052.
- (4) Vichard, C.; Kaden, T. A. *Inorganica Chim. Acta* **2002**, *337*, 173.
- (5) Chin, J. *Acc. Chem. Res.* **1991**, *24*, 145.
- (6) Sargeson, A. M. *Prog. Inorg. Chem.* **1990**, *38*, 201.
- (7) Weston, J. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2151.
- (8) Lowther, W. T.; Matthews, B. W. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4581.
- (9) Jedrzejewski, M. J.; Setlow, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 607.
- (10) Cowan, J. A. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1067.
- (11) Wilcox, D. E. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2435.
- (12) Sträter, N.; Lipscomb, W. N.; Klabunde, T.; Krebs, B. *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1996**, *35*, 2024.
- (13) Jiang, Q.; Xiao, N.; Shi, P.; Zhu, Y.; Guo, Z. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1951.
- (14) Sigman, D. S.; Mazumder, A.; Perrin, D. M. *Chem. Rev.* **1993**, *93*, 2295.
- (15) Joyner, J. C.; Reichfield, J.; Cowan, J. a. J. *Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15613.
- (16) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P. *Chem. Commun. (Camb)*. **2012**, *48*, 5545.
- (17) Liu, C.; Yu, S.; Li, D.; Liao, Z.; Sun, X.; Xu, H. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 913.
- (18) Mancin, F.; Scrimin, P.; Tecilla, P.; Tonellato, U. *Chem. Commun. (Camb)*. **2005**, 2540.
- (19) Anbu, S.; Kandaswamy, M.; Kamalraj, S.; Muthumarry, J.; Varghese, B. *Dalton Trans.* **2011**, *40*, 7310.
- (20) Roy, M.; Dhar, S.; Maity, B.; Chakravarty, A. R. *Inorganica Chim. Acta* **2011**, *375*, 173.
- (21) Sreedhara, A.; Freed, J. D.; Cowan, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8814.
- (22) Boseggia, E.; Gatos, M.; Lucatello, L.; Mancin, F.; Moro, S.; Palumbo, M.; Sissi, C.; Tecilla, P.; Tonellato, U.; Zagotto, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4543.
- (23) Sissi, C.; Rossi, P.; Felluga, F.; Formaggio, F.; Palumbo, M.; Tecilla, P.; Toniolo, C.; Scrimin, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3169.
- (24) Chen, X.; Fan, J.; Peng, X.; Wang, J.; Sun, S.; Zhang, R.; Wu, T.; Zhang, F.; Liu, J.; Wang, F.; Ma, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4139.
- (25) Chen, X.-Q.; Peng, X.-J.; Wang, J.-Y.; Wang, Y.; Wu, S.; Zhang, L.-Z.; Wu, T.; Wu, Y.-K. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, *2007*, 5400.
- (26) An, Y.; Lin, Y.-Y.; Wang, H.; Sun, H.-Z.; Tong, M.-L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *Dalton Trans.* **2007**, 1250.

- (27) Wang, J.-T.; Xia, Q.; Zheng, X.-H.; Chen, H.-Y.; Chao, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. *Dalton Trans.* **2010**, 39, 2128.
- (28) Desbouis, D.; Troitsky, I. P.; Belousoff, M. J.; Spiccia, L.; Graham, B. *Coord. Chem. Rev.* **2012**, 256, 897.
- (29) Koike, T.; Kimura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 8935.
- (30) Gajda, T.; Jancsó, A.; Mikkola, S.; Lönnberg, H.; Sirges, H. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, 1757.
- (31) Iranzo, O.; Kovalevsky, A. Y.; Morrow, J. R.; Richard, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1988.
- (32) Yashiro, M.; Kaneiwa, H.; Onaka, K.; Komiyama, M. *Dalton Trans.* **2004**, 605.
- (33) Yashiro, M.; Ishikubo, A.; Komiyama, M. *Chem. Commun.* **1997**, 83.
- (34) Yashiro, M.; Ishikubo, A.; Komiyama, M. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1793.
- (35) Kinoshita, E.; Takahashi, M.; Takeda, H.; Shiro, M.; Koike, T. *Dalton Trans.* **2004**, 1189.
- (36) Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Chem. Commun. (Camb)*. **2006**, 1845.
- (37) Linjalahti, H.; Feng, G.; Mareque-Rivas, J. C.; Mikkola, S.; Williams, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4232.
- (38) Feng, G.; Natale, D.; Prabakaran, R.; Mareque-Rivas, J. C.; Williams, N. H. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2006**, 45, 7056.
- (39) Jones, D. R.; Lindoy, L. F.; Sargeson, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 7327.
- (40) Sheng, X.; Lu, X.-M.; Chen, Y.-T.; Lu, G.-Y.; Zhang, J.-J.; Shao, Y.; Liu, F.; Xu, Q. *Chemistry* **2007**, 13, 9703.
- (41) An, Y.; Liu, S.-D.; Deng, S.-Y.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 1586.
- (42) He, J.; Hu, P.; Wang, Y.-J.; Tong, M.-L.; Sun, H.; Mao, Z.-W.; Ji, L.-N. *Dalton Trans.* **2008**, 3207.
- (43) An, Y.; Tong, M.-L.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *Dalton Trans.* **2006**, 2066.
- (44) Groves, J. T.; Kady, I. O. *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 3868.
- (45) Siluvai, G. S.; Murthy, N. N. *Polyhedron* **2009**, 28, 2149.
- (46) Siluvai, G. S.; Murthy, N. N. *Inorganica Chim. Acta* **2009**, 362, 3119.
- (47) Ciavatta, L.; Mareque, J. C.; Natale, D.; Salvatore, F. *Ann. Chim.* **2006**, 96, 317.
- (48) Wayne Rasband, National Institutes of Health.
- (49) Dupureur, C. M. *Metallomics* **2010**, 2, 609.
- (50) Dupureur, C. M. *Curr. Chem. Biol.* **2008**, 2, 159.
- (51) Zhao, M.; Wang, H.-L.; Zhang, L.; Zhao, C.; Ji, L.-N.; Mao, Z.-W. *Chem. Commun. (Camb)*. **2011**, 47, 7344.

- (52) Sigman, D. S.; Graham, D. R.; Aurora, V. D.; Stern, M.; Mistry, C. H. E.; Sigman, D. S.; Graham, D. R.; Aurora, V. D.; Stern, A. M.; Aurora, D. J. *Biol. Chem.* **1979**, 254, 12269.
- (53) Sigman, D. S.; Bruice, T. W.; Mazumder, A.; Sutton, C. L. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 98.
- (54) Natale, D.; Mareque-Rivas, J. C. *Chem. Commun. (Camb)*. **2008**, 425.
- (55) Stone, K. L.; Borovik, A. S. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 114.
- (56) Park, Y. J.; Sickerman, N. S.; Ziller, J. W.; Borovik, A. S. *Chem. Commun. (Camb)*. **2010**, 46, 2584.
- (57) Hart, J. S.; White, F. J.; Love, J. B. *Chem. Commun. (Camb)*. **2011**, 47, 5711.
- (58) Moore, C. M.; Szymczak, N. K. *Dalton Trans.* **2012**, 41, 7886.
- (59) Van den Berg, T. A.; Feringa, B. L.; Roelfes, G. *Chem. Commun. (Camb)*. **2007**, 180.
- (60) Fontanelli, M.; Micheloni, M. In *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes*; Diputación de Castellón: Castellón, Spain, 1990.
- (61) Gran, G. *Analyst* **1952**, 77, 661.
- (62) Rossotti, F. J. C.; Rossotti, H. J. *Chem. Educ.* **1965**, 42, 375.
- (63) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, 43, 1739.

ANEXO

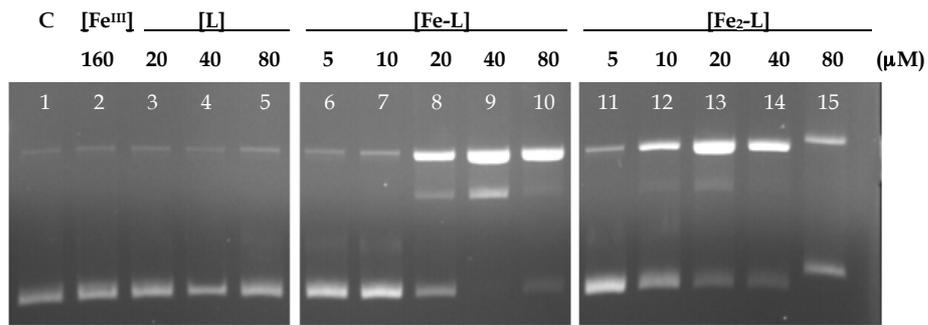


Figura IV.A1. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por FeL y Fe₂L a diferentes concentraciones, incubado en tampón HEPES (50 mM, pH = 7,0) durante 2 h a 37 °C. C: control.

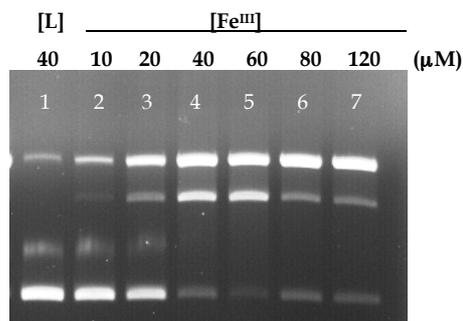


Figura IV.A2a. Ensayo representativo del corte del plásmido pUC18 (37,5 μM) producido por L (40 μM) a diferentes concentraciones de Fe(NO₃)₃, incubado en tampón HEPES (50 mM, pH=7,0) durante 2 h a 37 °C.

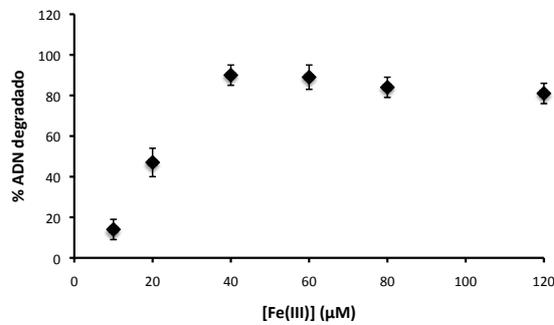


Figura IV.A2b. Variación del corte del pUC18 con la [Fe(NO₃)₃], para una concentración constante de L (40 μM), referida a la experiencia de la figura A2a.

Tablas IV.A1. Cuantificación de las bandas (basado en al menos tres estudios independientes) de los estudios de corte del pUC18 (37.5 μ M nucleótidos) producido por M-L (40 μ M) (**arriba**); M-L' (40 μ M) (**medio**) y M-L' (40 μ M M y 80 μ M L') (**abajo**), incubado en tampón HEPES (50 mM, pH = 7.0) durante 2 h y 37 °C; asc = ascorbato (40 μ M).

	% Formas ADN		
	superenrollado	circular	lineal
L	95 \pm 3	5 \pm 1	0 \pm 0
CoL	5 \pm 6	71 \pm 8	24 \pm 9
CoL + asc	4 \pm 5	68 \pm 10	27 \pm 9
FeL	11 \pm 6	62 \pm 6	28 \pm 9
FeL + asc	estela (degradación total)		
NiL	92 \pm 3	8 \pm 3	0 \pm 0
NiL + asc	82 \pm 10	16 \pm 8	2 \pm 4
CuL	90 \pm 8	10 \pm 6	0 \pm 0
CuL + asc	49 \pm 11	51 \pm 12	0 \pm 0
ZnL	89 \pm 3	10 \pm 2	1 \pm 1
ZnL + asc	80 \pm 15	20 \pm 10	0 \pm 0

	% Formas ADN		
	superenrollado	circular	lineal
L'	94 \pm 2	6 \pm 3	0 \pm 0
CoL'	88 \pm 2	12 \pm 2	0 \pm 0
CoL' + asc	69 \pm 2	31 \pm 3	0 \pm 0
FeL'	66 \pm 5	34 \pm 6	0 \pm 0
FeL' + asc	63 \pm 8	37 \pm 8	0 \pm 0
NiL'	93 \pm 2	7 \pm 2	0 \pm 0
NiL' + asc	92 \pm 2	8 \pm 2	0 \pm 0
CuL'	87 \pm 3	13 \pm 3	0 \pm 0
CuL' + asc	25 \pm 2	74 \pm 3	0 \pm 0
ZnL'	91 \pm 3	9 \pm 3	0 \pm 0
ZnL' + asc	65 \pm 10	35 \pm 11	0 \pm 0

	% Formas ADN		
	superenrollado	circular	lineal
L'	97 \pm 2	3 \pm 2	0 \pm 0
CoL'	90 \pm 3	10 \pm 3	0 \pm 0
CoL' + asc	68 \pm 16	32 \pm 16	0 \pm 0
FeL'	94 \pm 4	6 \pm 4	0 \pm 0
FeL' + asc	70 \pm 10	30 \pm 10	0 \pm 0
NiL'	96 \pm 3	4 \pm 1	0 \pm 0
NiL' + asc	96 \pm 3	4 \pm 2	0 \pm 0
CuL'	90 \pm 4	10 \pm 2	0 \pm 0
CuL' + asc	27 \pm 6	71 \pm 5	2 \pm 1
ZnL'	95 \pm 3	5 \pm 1	0 \pm 0
ZnL' + asc	75 \pm 13	25 \pm 15	0 \pm 0

Tabla IV.A2. Cuantificación de las bandas (basado en al menos tres estudios independientes) de los estudios de corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) producido por L (40 μ M) a diferentes concentraciones de $M(NO_3)_n$ [$M = Co(II), Fe(III), n = 2, 3$], incubado en tampón HEPES (50 mM, pH=7,0) durante 2 h a 37 °C. La figura IV.10a muestra un ejemplo característico para el ensayo con Co.

		% Formas ADN			
		superenrollado	circular	lineal	circular + lineal
[Co]	10	50 \pm 30	38 \pm 7	12 \pm 7	50 \pm 11
	20	16 \pm 11	61 \pm 6	14 \pm 5	75 \pm 10
	40	5 \pm 2	71 \pm 4	24 \pm 4	95 \pm 4
	60	5 \pm 1	82 \pm 4	13 \pm 6	95 \pm 5
	80	4 \pm 1	83 \pm 3	13 \pm 2	96 \pm 3
	120	7 \pm 1	85 \pm 5	8 \pm 5	93 \pm 5
[Fe]	10	86 \pm 1	14 \pm 5	0 \pm 0	14 \pm 5
	20	53 \pm 4	28 \pm 9	19 \pm 5	47 \pm 7
	40	18 \pm 4	44 \pm 8	46 \pm 8	90 \pm 6
	60	10 \pm 6	45 \pm 2	44 \pm 3	89 \pm 6
	80	16 \pm 10	54 \pm 4	30 \pm 6	84 \pm 5
	120	19 \pm 4	56 \pm 4	25 \pm 5	81 \pm 5

Tabla IV.A3. Cuantificación de las bandas (basado en al menos tres estudios independientes) de los estudios de corte del plásmido pUC18 (37,5 μ M) producido por L, Co-L, Co₂-L, Fe-L y Fe₂-L (40 μ M) a diferentes pHs, incubado durante 2 h a 37 °C. Las tampones empleados fueron: pH 5,5 (50 mM MES), pH 6 (50 mM cacodilato), pH 7 y 8 (50 mM HEPES). La figura IV.15 muestra un ejemplo característico.

		% Formas ADN		
		superenrollado	circular	lineal
L				
	pH = 5,5	40 \pm 4	50 \pm 7	10 \pm 4
	pH = 6,0	63 \pm 4	35 \pm 5	1 \pm 1
	pH = 7,0	90 \pm 1	10 \pm 1	0 \pm 0
	pH = 8,0	91 \pm 1	9 \pm 1	0 \pm 0
CoL				
	pH = 5,5	12 \pm 4	74 \pm 14	14 \pm 10
	pH = 6,0	33 \pm 11	60 \pm 14	8 \pm 3
	pH = 7,0	14 \pm 3	68 \pm 10	18 \pm 6
	pH = 8,0	69 \pm 2	29 \pm 1	2 \pm 1
Co₂L				
	pH = 5,5	2 \pm 1	80 \pm 3	18 \pm 4
	pH = 6,0	2 \pm 1	97 \pm 1	2 \pm 1
	pH = 7,0	1 \pm 0	86 \pm 5	13 \pm 4
	pH = 8,0	48 \pm 8	50 \pm 8	2 \pm 1
FeL				
	pH = 5,5	0 \pm 0	57 \pm 11	43 \pm 11
	pH = 6,0	0 \pm 0	46 \pm 16	54 \pm 16
	pH = 7,0	0 \pm 0	46 \pm 4	54 \pm 5
	pH = 8,0	60 \pm 10	38 \pm 9	3 \pm 1
Fe₂L				
	pH = 5,5	0 \pm 0	71 \pm 16	29 \pm 16
	pH = 6,0	0 \pm 0	50 \pm 3	50 \pm 3
	pH = 7,0	4 \pm 5	73 \pm 14	23 \pm 19
	pH = 8,0	49 \pm 4	51 \pm 4	0 \pm 0

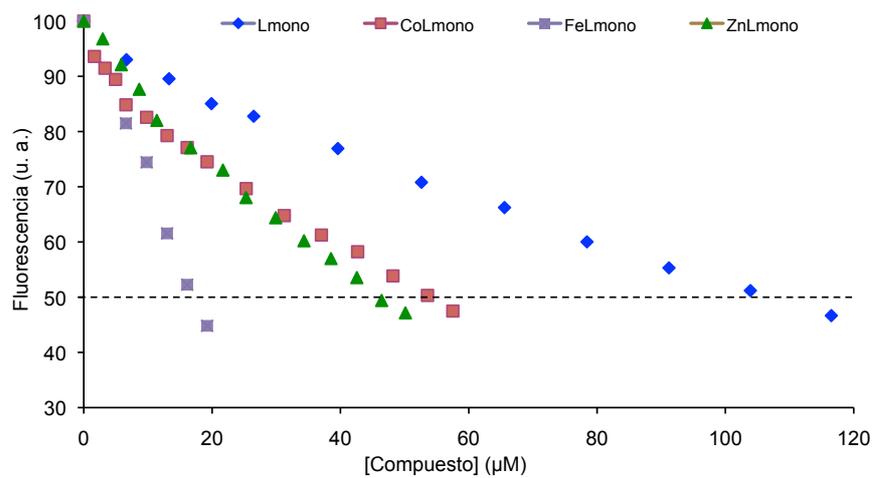


Figura IV.A.3. Estudios competitivos de desplazamiento de bromuro de etidio para L' y M'-L con CT-DNA.

Tabla IV.A.4. Constantes de unión aparentes al ADN (K_{app}) para el ligando L' y sus correspondientes complejos metálicos (50 mM HEPES, pH=7,0).

Compuesto	C_{50} (µM)	K_{app} (M^{-1})
Fe-L'	17,0	$2,1 \times 10^6$
Co-L'	53,0	$6,8 \times 10^5$
Zn-L'	46,0	$7,8 \times 10^5$
L'	104,0	$3,5 \times 10^5$

CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

The work presented in this manuscript summarises the efforts devoted, during this PhD period, to expand our group's research on the chemistry of copper-triazole nucleases. In this sense, we have obtained and fully characterized a family of copper(II) compounds containing 3-mono/3,5-disubstituted-1,2,4-triazoles. The magnetic characteristics of multimeric compounds have also been studied. Then, the DNA binding and nuclease properties of the water-soluble compounds have been studied. Finally, the consequences both of the inclusion of the aromatic moiety and of the different nuclearity in the DNA affinity and cleavage properties have been discussed.

Furthermore, we include the results obtained in two research areas previously unexplored in our group: nanoparticles and artificial hydrolases. On the one hand, nanomaterials potentially provide new opportunities for nucleic acid manipulation; however, there were very few studies on DNA cleaving nanoparticles when we decided to exploit quantum dots (QD) to activate Cu(II) complexes for DNA cleavage. On the other hand, we selected a well-known hydrolytic ligand L (L = 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol) to study in detail its cleavage capacity towards *plasmid* DNA instead of DNA/RNA substrate *models*.

The conclusions obtained along this PhD thesis are included in their respective chapters and summarized below.

New triazole ligands (Chapter I)

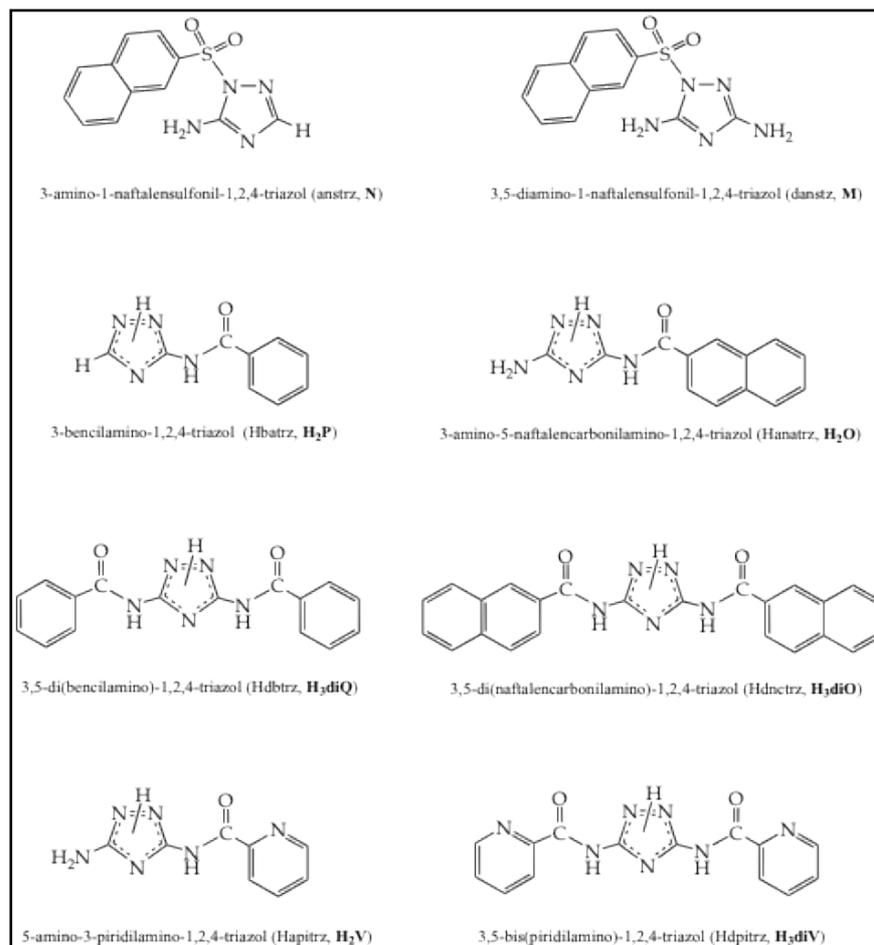
We have designed a serie of new 1,2,4-triazole ligands derived from the corresponding precursor (3-amino/3,5-diamino-1,2,4-triazole) with sulfonyl or acyl substituents, which contain aromatic rings in their structures, in order to obtain metal compounds able to interact with DNA.

For the synthesis we have followed two approaches: (i) with the first one we have obtained two sulfonyl-triazole (**N** and **M**) and four acyl-triazole derivates (**H₂P**, **H₂O**, **H₃diQ** and **H₃diO**) by direct reaction of the triazole precursor with the corresponding sulfonyl/acyl chloride in acetonitrile; (ii) with the second approach, developed for the first time in this thesis, we have prepared two new

ligands (**H₂V** and **H₃diV**) by direct reaction of 3,5-diamino-1,2,4-triazole with ethyl 2-picolinate (in different ratios), in the absence of solvent with the use of a glass oven. This new procedure enables to obtain 3,5-disubstituted-1,2,4-triazoles in a simpler and cleaner form.

Scheme 1 shows the eight new triazole ligands synthesized in this work. They have been fully characterized by several analytical techniques (¹H and ¹³C NMR, IR spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis). Furthermore, we have confirmed the structure of the **H₂V** derivative by X-ray crystallography. In relation to the (i) methodology, we found that the acylation is produced on the exocyclic amino group(s), and the sulfonylation on the *N*1-triazole endocyclic atom. These results confirm that, depending on the reaction conditions, both positions, *N*1-ring and NH₂ groups, can be reactive, as reported earlier in the literature.

Among these ligands, **H₂V** and **H₃diV** share the basic triazole structure of **H₂Q/H₂O** or **H₃diQ/H₃diO**, but bearing the pyridine substituent instead of the phenyl or naphthyl one. This difference entails two important consequences: (a) **H₂V** and **H₃diV** are more soluble (both are reasonably soluble in methanol); (b) their coordinating possibilities are significantly enlarged; indeed, **HV** offers six donor atoms and two chelating rings for metal coordination, and **HdiV**²⁻ eight donor atoms and four chelating rings. This last feature has allowed us to obtain two unique polinuclear Cu(II) compounds (tetranuclear and hexanuclear), which are discussed below.



Scheme 1. Ligands obtained in this PhD thesis.

Copper(II)-triazole compounds as oxidative nucleases (Chapter II)

A series of new copper(II)-triazole coordination compounds, based on the ligands synthesized in the first chapter, have been isolated and fully characterized.

As a demonstration of the triazole versatility, they exhibit different nuclearities: two are mononuclear (**1** and **4**), three are dinuclear (**2**, **3** and **5**), two are tetranuclear (**6** and **7**) and one is hexanuclear (**8**).

Although the acyl ligands were expected to afford a family of Cu-(N-N)₂-Cu' dimers, comparable to analogous previously reported compounds, this result was only achieved with the ligands **H₂diQ** ([Cu(H₂diQ)(ClO₄)₂·2CH₃OH, compound **2**) and **H₂diO** ([Cu(H₃diO)(NO₃)₂·2DMSO, compound **3**). In both cases, the ligand coordinates through a bis-chelate bridging-mode. The main difference between both dinuclear compounds relies on the planarity: in **2**, the two phenyl substituents are coplanar with respect to the triazol plane, whereas in **3** the two naphthalene groups are clearly bended. As for the ligand **H₂P**, it led to the isolation of a mononuclear compound [Cu(H₂P)₂(ClO₄)₂] (**1**), in which the ligand acts as chelating bidentate through N₄ and O_{carbonile} atoms. **2** and **3** present antiferromagnetic exchange. The *J* parameter for **2** (*J* = -81,8 cm⁻¹) and **3** (*J* = -83,6 cm⁻¹) are in the normal range for compounds bearing a double-triazole bridge.

The sulfonyl ligands, **N** and **M**, cannot bridge through the N1,N2-binding mode due to the presence of a substituent on N1. This fact reduces drastically the coordination possibilities of the ligand to the monodentate way through the N4 atom, yielding the compounds [Cu(**N**)₄(NO₃)₂]·4CH₃OH (**4**) and [Cu(**M**)(μ-acetato)₂]₂·2**M** (**5**). Compound **5**, a dinuclear acetate compound of the paddle-wheel type, constitutes a MOF (metal-organic framework) as a result of strong stacking interactions and intense H-bonds. It also exhibits a very strong antiferromagnetic coupling (*J* = -324,0 cm⁻¹).

Our assays with the commercial, easy but little studied, H₂atc ligand (5-amino-1,2,4-triazole-3-carboxylic acid), produced a novel tetranuclear compound [Cu₄(atc)₂(dien)₄(ClO₄)₂](ClO₄)₂·2H₂O (**6**). **6** represents the second example of a discrete "1 + 2 + 1" tetranuclear copper(II) μ₃-triazolate compound. It contains two copper centres linked by a double diazinic bridge, each of which is further connected to a third and fourth copper centres through the triply bridging triazolato ring and the bidentate carboxilato group of the atc²⁻ ligands. The magnetic study indicates that **6** exhibits an unusually (although predictable) weak antiferromagnetic coupling between the two central bis(N1,N2)-bridged coppers centres (*J* = -34,1 cm⁻¹), and a very weak antiferromagnetic coupling, through the N2,C,N4-bridge,

between each peripheral copper and one of the two central copper centres ($j = -5,5 \text{ cm}^{-1}$).

The high denticity of the ligands **H₂V** and **H₃diV** gave one tetranuclear $\{[\text{Cu}_4(\text{HV})_2(\text{picolinato})_2(\text{NO}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_6] (\text{NO}_3)_n\}$ (**7**) and one hexanuclear $[\text{Cu}_6(\text{HdiV})_2(\text{ClO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{14}](\text{ClO}_4)_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (**8**) compound, respectively.

The crystal structure of **7** consists of a polymer formed by chains of tetrameric units of copper(II) ions. The tetrameric units, which in turn can be described as pairs of coupled dimers, are linked in the chain by bridging nitrate ligands. Each tetrameric entity contains two **HV**-bis(chelating) ligands and two picolinato ligands. The magnetic study reveals a poor antiferromagnetic interaction between the copper(II) centres.

The tetrachelating triazole **H₃diV** ligand by reaction with an excess of copper(II) salt has afforded the novel hexanuclear compound **8**, which contains a "1+1+2+1+1" almost planar Cu_6 cluster never reported before, with two types of Cu(II) centers. It exhibits well-defined magnetic behavior consisting of two different antiferromagnetic interactions ($J_1 = -113,2 \text{ cm}^{-1}$ and $J_2 = -17,1 \text{ cm}^{-1}$).

From the bioinorganic point of view, table 1 summarizes the results obtained in this chapter.

In relation to the *DNA binding study*, the above mentioned triazole ligands were designed to favour DNA interaction. Only compounds **2** and **5** intercalate into the double strand polymer. The intercalation process in **5** can be reasoned by the presence of the naphthalene groups. The compound **4** also contains naphthalene substituents but their arrangement (it is a monomer with 4 ligands per copper) induces a sterical hindrance which avoids its intercalation. In the case of compound **2**, which contains phenyl groups, the overall structure is almost planar and the compound does intercalate. Compound **3**, structurally related to **3** but with naphthalene groups, is insoluble and the bioinorganic study could not be performed. With respect to **7** and **8**, their heteroaromatic substituents are involved in metal coordination so intercalation is not possible; however, they are

reasonably soluble, and their DNA affinity is increased due to electrostatic interactions, as is also observed for **6**. The hexanuclear compound **8** presents a high affinity towards DNA, similar to that of the well-known agent Hoechst 33258.

Table 1 also reveals that there is not a direct correlation between ΔT_m and K_{app} values, if compound **8** and Hoechst 33258 present high values for both parameters.

As for the *nuclease activity*, all the compounds included in this chapter require external activation (reducing agent) to exhibit nuclease properties. So, they are metallonucleases of the oxidative type. In general, within this family of compounds: (a) intercalation does not guarantee a good nuclease activity; (b) the increase in the nuclearity enhances the DNA affinity and the DNA cleavage efficiency.

Taking into account these results, future work will focus on:

(a) Preparation, by the methodology set up in this PhD thesis, of new 1,2,4-triazole ligands related to the previous ones, which include the following modifications: (i) change of the pyridine ring by larger heteroaromatic units, to strengthen their DNA binding potential; and (ii) change of the N donor atom position in the heteroaromatic ring to modify the nucleating capabilities.

(b) Synthesis of new polinuclear species based on those ligands.

(c) Giving one step forward: study of the cytotoxicity activity of the most active, soluble, systems in different cancer cell lines.

Table 1. Summary of the DNA interaction and cleavage studies for compounds 1-8 (see chapter II).

Compound	Nuclearity	Viscosimetry ^a (η/η_0) ^{1/3}	ΔT_m ^b (°C)	$K_{app}(M^{-1})^c$	[C] ₉₀ ^d (μM)
[Cu(H ₂ P) ₂ (ClO ₄) ₂] (1)	mononuclear	1.00	9.6	3.1×10 ⁶	40 (25x, Asc/H ₂ O ₂)
[Cu(diQ)(ClO ₄) ₂ ·2CH ₃ OH] (2)	dinuclear	1.12	<i>e</i>	1.6×10 ⁶	30 (300x, Asc/H ₂ O ₂)
[Cu(diO)(NO ₃) ₂ ·2DMSO] (3)	dinuclear	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>e</i>
[Cu(N) ₄ (NO ₃) ₂]·4CH ₃ OH (4)	mononuclear	1.02	≈3	2.2×10 ⁷	25 (300x, Asc/H ₂ O ₂)
[Cu(M)(μ -OAc) ₂ ·2(M)] (5)	dinuclear	1.16	16	2.5×10 ⁷	20 (25x, Asc)
[Cu ₄ (atc) ₂ (dien) ₄ (ClO ₄) ₂](ClO ₄) ₂ ·2H ₂ O (6)	tetranuclear	1.06	18	6.2×10 ⁶	20 (2.5x, Asc)
{[Cu ₄ (HV) ₂ (picolinato) ₂ (NO ₃) ₃ (H ₂ O) ₆](NO ₃) _n } (7)	tetranuclear	1.05	8	6.4×10 ⁷	15 (5x, Asc)
[Cu ₆ (HdiV) ₂ (ClO ₄) ₆ (H ₂ O) ₁₄](ClO ₄) ₂ ·10H ₂ O (8)	hexanuclear	1.02	15	1.3×10 ⁸	10 (12x, Asc)

^a CT ADN, (η/η_0)^{1/3} value for: [compound] / [CT-ADN] = 0,1

^b CT ADN

^c obtained by means of equation: $K_{EB} [EB] = [C_{50}] K_{app}$

^d conditions to cleave 90% of SC ADN form

^e data no available due to solubility problems

Synergy between quantum dots (QDs) and copper(II) complexes towards DNA cleavage (Chapter III)

In this chapter we have explored the effect of combining semiconductor nanoparticles (QDs) and Cu(II) complexes for DNA interaction/degradation.

In the section III.B we firstly studied the interaction of QD to pUC18 by different techniques: fluorescence assays reveal that QD presents high affinity to nucleic acids ($K_{SV} = 1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$); AFM enables us to “direct” visualize the interaction and shows that DNA wraps around the QD core, leading to the formation of aggregates or “superstructures” between nucleic acids and nanoparticles; electrophoretic studies demonstrate that QD, acting alone, possesses negligible cleavage activity to DNA. However, when QD are combined with a well-know nuclease, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$, we found strong synergy between them towards effecting DNA cleavage in the dark and when irradiated with red light.

The following section (III.C) is an extension of the previous results from our experience in copper(II)-triazole compounds and oxidative nucleases. Two novel ternary dicopper complexes with guanazole/ate bridges and aromatic amines were synthesized and characterized. The first one, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-Hdatrz})(\text{phen})_2(\text{H}_2\text{O})_2(\text{NO}_3)_4]$ (**9**), represents the first example of a genuine discrete *N2,N4*-triazole-dicopper complex. This has offered the possibility of calculating the magnetic exchange parameter, $J(\mu_{2,4}\text{-triazole}) = -52,1 \text{ cm}^{-1}$, for a couple of Cu(II) centres antiferromagnetically linked through a *NCN*-triazol bridge. The second one, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-datrz})_2(\mu\text{-OH}_2)(\text{bipy})_2](\text{ClO}_4)_2$ (**10**), is the second case of a folded $[\text{Cu}(\text{N1-N2})_2\text{-Cu}]$ bridging system and exhibits a higher antiferromagnetic coupling, $J(\mu_{1,2}\text{-triazole}) = -115,0 \text{ cm}^{-1}$.

Compound **9** binds *via* intercalation and shows higher affinity for DNA than **10**, as expected. In the presence of conventional activating agents (micromolar concentrations), **9** produces significant oxidative DNA cleavage, whereas **10** is inactive. However, in the presence of nanomolar concentrations of water-soluble QDs-filled micelles, both systems are highly efficient at cleaving DNA.

Our studies suggest that there must be multiple roles of the QDs toward promoting DNA cleavage by the copper metallonucleases; they probably combine structural with redox effects.

Overall, we have developed two compounds in which different strategies are successfully associated to yield efficient DNA cleavage by an oxidative mechanism: (1) a bimetallic framework, (2) hydrogen-bonding features and (3) a redox-active protein-like curved nanostructure (QDs). Studies to clarify the redox function of QDs in this process are currently being undertaken.

This new bionanotechnology approach to enhance the activity of coordination complexes for DNA cleavage is simple and potentially extendable to other redox-active metal complexes.

Artificial hydrolases (Chapter IV)

In this Chapter we have taken advantage of our experience on the study of oxidative nucleases to undertake a complete analysis of a hydrolytic system. Here, we have investigated for the first time the cleavage capacity of the system M+L {L = 1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol}, with L being a dinucleating ligand and M classical transition metal (II,III) cations, towards *plasmid* DNA.

The present results show that the Co(II)-L and the Fe(III)-L systems are powerful nucleases with and without ascorbate; the Ni(II)-L and the Zn(II)-L systems do not produce DNA cleavage in any case, and the Cu(II)-L system requires co-reactant to be active. Kinetic data of DNA cleavage by Co-L at pH = 7 and 37 °C fit to a saturation kinetic profile with a k_{obs} of $1,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. This rate of acceleration over the uncatalyzed reaction ($>10^9$ -fold) places this complex among the most powerful synthetic nucleases created without external activants.

The electrophoretic results also indicate that the catalytic activity of the system 1:1 (M-L) is similar or even higher than that of the corresponding 2:1 (M₂-L) system. The study probes that it is possible to enhance the activity of the metal complex in dinucleating ligands

Conclusions and Perspectives

by keeping the second metal binding site vacant as a second coordination sphere.

Our future work in this field will focus, on the one hand, in understanding the mechanism (hydrolytic/oxidative) of the process by performing the experiment of T4 ligase; on the other, in designing new dinucleating ligands structurally related to L which incorporate additional hydrogen-bond donor groups.

Abreviaturas

Ligandos "nuevos"

N o anstrz	5-amino-N1-(naftalen-3-sulfonil)-1,2,4-triazol
M o danstrz	3,5-diamino-N1-(naftalen-3-sulfonil)-1,2,4-triazol
H₂O o Hanatrz	3-amino-5-naftalencarbonilamino-1,2,4-triazol
H₂P o Hbatrz	3-bencilamino-1,2,4-triazol
H₃diO o Hdnctrz	3,5-di(naftalencarbonilamino)-1,2,4-triazol
H₃diQ o Hdbtrz	3,5-di(bencilamino)-1,2,4-triazol
H₂V o Hapitrz	3-amino-5-piridilamino-1,2,4-triazol
H₃diV o Hdpirtrz	3,5-di(piridilamino)-1,2,4-triazol

Otras abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Asc	Ascorbato
CT-ADN	Ácido desoxirribonucleico del timo de la ternera (<i>calf thymus</i>)
DABCO	1,4-diazabicyclo [2,2,2] octano
Dien	dietilentriamina o 1,4,7-triazaheptano
DMF	N-N'-Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dppz	Dipirido[3,2-a:2',3'-c]fenazina
Dpq	Dipirido[3,2-d:2'3'-f]quinoxalina
EB	Ethidium bromide
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético

EPR	Resonancia paramagnética electrónica
Esds	Desviación estándar
ESI	Ionización por Electrospray
FAB	Bombardeo con átomos rápidos
Hatz	3-amino-1,2,4-triazol
H ₂ atc	ácido 5-amino-1,2,4-triazol-3-carboxílico
Hdaatz	3,5-diacetilamino-1,2,4-triazol
Hdatz	3,5-diamino-1,2,4-triazol o guanazol
HEPES	Ácido piperazin-4-(2-hidroxietil)-1-etanosulfónico
H ₂ salen	2,2'[etano-1,2-diilbis(nitrilometilidino)]difeno
IR	Infrarrojo
Mr	Masa molecular
OP o phen	1,10-fenantrolina
PIPES	Ácido piperazin-N,N'-bis(2-etanosulfónico)
pUC18	Plásmido ADN tipo pUC18
R	Rendimiento
RMOS	Especies reactivas metal-oxígeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TMPyP	meso-tetrakis-(1-metil-piridinio-4-il)porfirina
Tris	Tris(hidroximetil)-aminometano

LIST OF PUBLICATIONS

1st Publication:

**Synergy between quantum dots and 1,10-phenanthroline-copper(II)
complex towards cleaving DNA**

Javier Hernández-Gil, Sacramento Ferrer Llusar,*
Carmen Rodríguez Maldonado, Juan Carlos Mareque-Rivas*

Chem. Commun., **2011**, 47, 2955–2957

Synergy between quantum dots and 1,10-phenanthroline–copper(II) complex towards cleaving DNA†Javier Hernández-Gil,^b Sacramento Ferrer Llusar,^{a,b} Carmen R. Maldonado^a and Juan C. Mareque-Rivas^{a*}Received 30th September 2010, Accepted 20th December 2010
DOI: 10.1039/c0cc04163g**We have found that the DNA cleaving activity of quantum dots and 1,10-phenanthroline–Cu(II) complex is significantly enhanced when they are combined.**

DNA/RNA cleavage is a fundamental reaction in gene regulation and in important processes like programmed cell death, prevention of autoimmune disorders and gene therapy.¹ Thus, the development of synthetic nucleases attracts considerable interest,² both as model systems and as tools for manipulating genetic material for biotechnological and medical applications.^{2,3} An important requirement is to control and increase the activity of these catalysts under physiological conditions, which continues to be challenging. For synthetic metallo-nucleases this problem has been tackled mainly through modifying the metal and its first coordination sphere or by seeking cooperation of more than one metal ion^{2,3} or between metals and functionally important groups.^{4,5} Although nano-materials potentially provide new opportunities for nucleic acid manipulation, so far there are very few examples of DNA cleaving nanoparticles.⁶ Understandably, the effect that nano-materials have on DNA is also important in assessing potential mechanisms for wanted and unwanted toxicity of nanomaterials. In most cases nanoparticle-induced DNA cleavage occurs only upon irradiation with UV light.^{7,8} A recent study has reported that some of the commercially available semiconductor nanocrystals (quantum dots, QDs) can cause some DNA nicking even under dark conditions.⁹ Although this discovery was important in highlighting a potential source of QD toxicity, these QDs were poor DNA cleaving agents. Here we report, however, that when QDs and a common copper(II) complex with relatively low nucleolytic efficiencies are combined, cleavage of DNA becomes much higher.

Copper(II) complexes can induce cleavage of nucleic acids in both oxidative and hydrolytic ways. Most oxidative DNA cleavage reactions with Cu(II) complexes require addition of reducing agents.¹⁰ However, it has been recently shown that careful selection of ligands can lead to Cu(II) complexes which oxidatively cleave DNA without reducing agents in the presence of light.¹¹ We reasoned that it would be possible to exploit QDs to activate Cu(II) complexes for DNA cleavage. Specifically, we considered that combining QDs and Cu(II) complexes which would interact with the DNA non competitively, would upon irradiation with light generate DNA nicking Cu(II) complexes. Moreover, in the nucleosome core particles histone–DNA complexes are stabilized by different types of interactions with the phosphate backbone.¹² The spherical shape and protein-like size of QDs could enable QD–DNA adducts to mimic this; in which case the surface groups could be utilized also to activate the phosphodiester bonds for hydrolytic attack.

To explore the feasibility of such an approach, we studied the DNA cleavage ability of QDs micelles decorated with amino and methoxy groups combined with the Cu(II) complex of 1,10-phenanthroline (Cu : phen: 1 : 2; Fig. 1), a prototypical artificial nuclease widely applied as footprinting reagent for DNA, RNA, and important cellular processes.^{13,14}

To synthesize water-soluble QDs we applied a method which is based on encapsulation of hydrophobic CdSe–ZnS QDs in the hydrophobic core of phospholipid micelles (ESI†).¹⁵

To assess if the QD micelles cleave DNA, different concentrations of QD micelles were incubated with supercoiled (SC) pUC18 DNA and the mixtures were studied by gel electrophoresis (Fig. S1, ESI†). Incubation with QD at > 50 nM led to some smearing of the band due to SC DNA (form I). The smearing is reduced in the presence of salt (e.g. 50 mM NaCl). When the DNA was recovered from the QD : DNA mixture using a DNA recovery kit and loaded onto a gel, the band due to SC DNA was similar to that of the DNA control, which suggests smearing is not due to DNA degradation (Fig. S2, ESI†). The smearing most likely arises from a dynamic equilibrium between free SC DNA and SC DNA : QD adducts, which due to their larger size and charge neutralization migrate less or remain in the gel wells; similar observations have been reported when proteins bind DNA.

^a EaSiCHEM School of Chemistry, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom EH9 3JJ.

E-mail: juan.mareque@ed.ac.uk; Fax: +44-131-650-4743;

Tel: +44-131-650-4750

^b Departament de Química Inorgànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 46100- Burjassot, Valencia, Spain.

E-mail: sacramento.ferrer@uv.es; Fax: +34-96-354-4960;

Tel: +34-96-354-4521

† Electronic supplementary information (ESI) available: Full experimental details and additional characterization data. See DOI: 10.1039/c0cc04163g

2nd Publication:

**A Unique Discrete Tetranuclear Cu'-Cu(N-N)₂Cu-Cu' Copper(II)
Complex, Built from a μ_3 -1,2,4-Triazolato- μ -carboxylato Ligand, as
an Effective DNA Cleavage Agent**

Javier Hernández-Gil, Sacramento Ferrer,*

Alfonso Castiñeiras, Francisco Lloret

Inorg. Chem., **2012**, *51*, 9809-9819

A Unique Discrete Tetranuclear Cu'–Cu(N-N)₂Cu–Cu' Copper(II) Complex, Built from a μ_3 -1,2,4-Triazolato- μ -carboxylato Ligand, as an Effective DNA Cleavage Agent

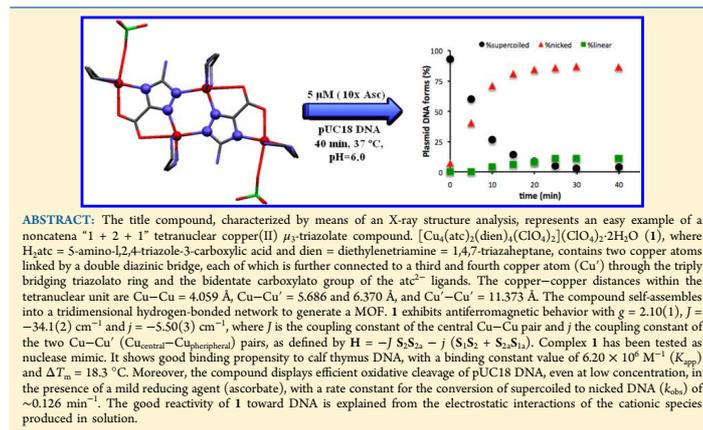
Javier Hernández-Gil,[†] Sacramento Ferrer,^{*†} Alfonso Castiñeiras,[‡] and Francesc Lloret[§]

[†]Departament de Química Inorgànica, Universitat de València, Vicent Andrés Estellés s/n, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

[‡]Departamento de Química Inorgànica, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario Sur, E-15782 Santiago de Compostela, Spain

[§]Institut de Ciència Molecular, Universitat de València, Catedràtic José Beltrán 2, 46980-Paterna, Valencia, Spain

Supporting Information



INTRODUCTION

The design of small compounds able of catalyzing DNA scission at physiological conditions is of great interest for biotechnological applications and the development of novel therapeutic agents. Transition-metal complexes (especially of essential iron and copper) in their reduced oxidation state can promote the formation of free radicals through Haber–Weiss or Fenton reactions that can oxidize several biomolecules.^{1–3} Based on this property, much effort has been undertaken by different groups to prepare complexes of transition metals capable of binding and breaking the DNA double helix. Several well-known and best-characterized nucleolytic agents are $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (EDTA = ethylenediaminetetraacetic acid),^{4a}

$[\text{Cu}(\text{OP})_2]^+$ (OP = 1,10-phenanthroline),^{4b} Fe-BLM (BLM = bleomycin),^{4c} Ni-peptides,^{4d} and metal-salen [salen = N,N' -ethylene-bis(salicylideneamino)]^{4e}. The intrinsic redox properties of Cu(II) have allowed the obtention of a series of copper complexes that induce DNA cleavage through an oxidative mechanism from a wide diversity of ligands including triazole derivatives.^{1,5,6} Our group described the nuclease ability of two copper-triazole compounds of the same ligand, $[\text{Cu}(\text{Hapt})]^{2+}$ and $[\text{Cu}(\text{Hapt})_2]^{2+}$ (Hapt = 5-amino-3-pyridyl-1,2,4-triazole), which showed different activity and differences in the ROS

Received: June 1, 2012
Published: August 31, 2012

3rd Publication:

N-(5-Amino-1H -1,2,4-triazol-3-yl)pyridine-2-carboxamide

Javier Hernández-Gil, Sacramento Ferrer,
Rafael Ballesteros, Alfonso Castiñeiras*

Acta Cryst., **2013**, E69, o227–o228

Acta Crystallographica Section E

Structure Reports

Online

ISSN 1600-5368

***N*-(5-Amino-1*H*-1,2,4-triazol-3-yl)-pyridine-2-carboxamide**Javier Hernández-Gil,^a Sacramento Ferrer,^a Rafael Ballesteros^b and Alfonso Castiñeiras^{c,*}

^aDepartament de Química Inorgànica, Universitat de València, Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain, ^bDepartament de Química Orgànica, Universitat de València, Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain, and ^cDepartament de Química Inorgànica, Universitat de Santiago de Compostela, Campus vida, Santiago de Compostela, Galicia, 15782, Spain
Correspondence e-mail: alfonso.castineiras@usc.es

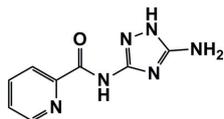
Received 18 December 2012; accepted 2 January 2013

Key indicators: single-crystal X-ray study; *T* = 293 K; mean $\sigma(\text{C}-\text{C})$ = 0.004 Å; *R* factor = 0.038; w*R* factor = 0.107; data-to-parameter ratio = 10.3.

The title compound, C₈H₈N₆O, was obtained by the reaction of 3,5-diamino-1,2,4-triazole with ethyl 2-picolinate in a glass oven. The dihedral angles formed between the plane of the amide group and the pyridine and triazole rings are 11.8 (3) and 5.8 (3)°, respectively. In the crystal, an extensive system of classical N—H...N and N—H...O hydrogen bonds generate an infinite three-dimensional network.

Related literature

For background to triazole derivatives, see: Aromi *et al.* (2011); Olguin *et al.* (2012). For related triazole structures, see: Allouch *et al.* (2008); Ouakkaf *et al.* (2011). For structures of metal complexes with related triazoles, see: Ferrer *et al.* (2004, 2012). For the synthesis of triazoles, see: Chernyshev *et al.* (2005). For hydrogen-bond motifs, see: Bernstein *et al.* (1995).



Experimental

Crystal data

C₈H₈N₆O
M_r = 204.20
Tetragonal, *P*4₂12
a = 9.5480 (5) Å
c = 21.9570 (9) Å
V = 2001.69 (17) Å³

Z = 8
Mo *K*α radiation
 μ = 0.10 mm⁻¹
T = 293 K
0.15 × 0.09 × 0.05 mm

Data collection

Nonius KappaCCD diffractometer
4484 measured reflections
1407 independent reflections
*R*_{int} = 0.048

Refinement

$R[F^2 > 2\sigma(F^2)]$ = 0.038
 $wR(F^2)$ = 0.107
S = 1.07
1407 reflections
137 parameters
H-atom parameters constrained
 $\Delta\rho_{\text{max}}$ = 0.12 e Å⁻³
 $\Delta\rho_{\text{min}}$ = -0.13 e Å⁻³

Table 1

Hydrogen-bond geometry (Å, °).

<i>D</i> — <i>H</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> — <i>H</i>	<i>H</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> ... <i>A</i>	<i>D</i> — <i>H</i> ... <i>A</i>
N21—H21...N23 ^b	0.86	2.02	2.788 (3)	149
N21—H21...O17 ^b	0.86	2.41	3.061 (3)	133
N18—H18...N20 ^b	0.86	2.45	3.253 (3)	155
N22—H22A...O17 ^b	0.86	2.08	2.860 (3)	150
N22—H22B...N20 ^b	0.86	2.26	3.068 (3)	157

Symmetry codes: (i) $-x + \frac{1}{2}, y - \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$; (ii) $-y, -x, -z + \frac{1}{2}$; (iii) $-x + \frac{1}{2}, y + \frac{1}{2}, -z + \frac{1}{2}$.

Data collection: *COLLECT* (Nonius, 1998); cell refinement: *DENZO* and *SCALEPACK* (Otwinowski & Minor, 1997); data reduction: *DENZO* and *SCALEPACK*; program(s) used to solve structure: *SHELXS97* (Sheldrick, 2008); program(s) used to refine structure: *SHELXL97* (Sheldrick, 2008); molecular graphics: *PLATON* (Spek, 2009) and *DIAMOND* (Brandenburg & Putz, 2006); software used to prepare material for publication: *publCIF* (Westrip, 2010).

This work was supported by the Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, Spain) (project CTQ2007-63690/BQU) and by the Ministerio de Ciencia e Innovación and FEDER-EC (project MAT2010-15594). JHG acknowledges a PhD grant (project CTQ2007-63690/BQU, MEC, Spain). Technical support (X-ray measurements at S.C.S.I.E., University of Valencia) from M. Liu-González is gratefully acknowledged.

Supplementary data and figures for this paper are available from the IUCr electronic archives (Reference: GK2547).

References

- Allouch, F., Zouari, F., Chabchoub, F. & Salem, M. (2008). *Acta Cryst.* **E64**, o684.
Aromi, G., Barrios, L., Roubeau, O. & Gómez, P. (2011). *Coord. Chem. Rev.* **255**, 485–546.
Bernstein, J., Davis, R. E., Shimon, L. & Chang, N.-L. (1995). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **34**, 1555–1573.
Brandenburg, K. & Putz, H. (2006). *DIAMOND*. Crystal Impact GbR, Bonn, Germany.
Chernyshev, V. M., Rakitov, V. A., Taranushich, V. A. & Blinov, V. V. (2005). *Chem. Heterocycl. Compd.* **41**, 1139–1146.
Ferrer, S., Ballesteros, R., Sambartolomé, A., González, M., Alzuet, M. G., Borrás, J. & Liu, M. (2004). *J. Inorg. Biochem.* **98**, 1436–1446.
Ferrer, S., Lirol, F., Pardo, E., Clemente-Juan, J. M., Liu-González, M. & García-Granda, S. (2012). *Inorg. Chem.* **51**, 985–1001.
Nonius (1998). *COLLECT*. Nonius BV, Delft, The Netherlands.
Olguin, J., Kalisz, J. M., Clé, R. & Brooker, S. (2012). *Inorg. Chem.* **51**, 5058–5069.
Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). *Methods in Enzymology*, Vol. 276, *Macromolecular Crystallography*, Part A, edited by C. W. Cortes Jr & R. M. Sweet, pp 307–326. New York: Academic Press.

4th Publication:

**A novel hexanuclear Cu(II) complex built from a simple tetra-
chelating triazole ligand: synthesis, structure and magnetism**

Javier Hernández-Gil, Nina Ovèjak, Sacramento Ferrer,*
Francisco Lloret, Alfonso Castiñeiras

Inorg. Chem., **2013**, 52, 2289-2291

Novel Hexanuclear Copper(II) Complex Built from a Simple Tetrachelating Triazole Ligand: Synthesis, Structure, and Magnetism

J. Hernández-Gil,[†] N. Oveják,[†] S. Ferrer,^{*†} F. Lloret,[‡] and A. Castiñeiras[§][†]Departament de Química Inorgànica and [‡]Institut de Ciència Molecular, Universitat de València, València, Spain[§]Departamento de Química Inorgànica, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Supporting Information

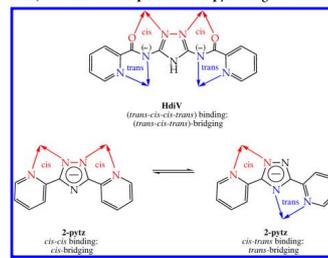
ABSTRACT: A new easy symmetric 3,5-disubstituted 1,2,4-triazole ligand (H₂diV) by reaction with an excess of copper(II) salt has afforded a novel hexanuclear complex (Cu/HdiV ratio of 6:2) through a bis(trans-cis-cis-trans) binding mode, exhibiting two types of Cu^{II} centers and two clearly distinguishable antiferromagnetic *J*₁ (−234 cm^{−1}) and *J*₂ (−35 cm^{−1}) coupling constants.

The versatility of triazoles to bridge metal centers in different ways is an area currently being explored to produce supramolecular structures with different potential functionalities, such as magnetic, optic, and electrochemical or simply as a starting point in crystal engineering.¹ On the other hand, the triazole systems afford discrete polymeric complexes of interest to gain understanding on the mechanisms of biological systems and the nature of magnetic cooperativity.^{1,2} The discrete polynuclear metal clusters are indeed ideal candidates for the investigation on the properties of molecule-based magnets.^{1–3}

The 1,2,4-triazole-based ligands are commonly organized in three categories, namely, those containing a sole coordinative ring, those comprising two rings bridged by a spacer, and those having two or more functional groups. The last category is well represented by the 3,5-bis(pyridine-2-yl)-1,2,4-triazole ligand (known as Hpytz or Hbpt) or its close derivatives.^{1,2} Recently, Chen et al. have prepared, by hydrothermal synthesis, a series of polymeric structures based on the [Cu(2-pytz)] building block, which exhibited different conformations (i.e., molecular chairs, zippers, and zigzag and helical chains) as a result of the different binding modes of the ligand (Scheme 1, bottom).⁵ From a different approach, Brooker et al. have reported triazole-based ligands containing pyridine pendant arms that showed enhanced denticity (i.e., bis-terdentate and bis-tetradentate binding), thus yielding unusual dinuclear and tetranuclear complexes.²² Brooker et al. have also shown that using bis-bidentate dipyriddy derivatives, under appropriate synthesis conditions (with selected coligands), trinuclear,²⁴ tetranuclear, and even octanuclear²⁶ systems can be isolated.

Our group has been developing 3-substituted or 3,5-disubstituted 1,2,4-triazole ligands with the aim of obtaining, by reaction with copper(II) salts, models of multicopper enzymes⁶ or compounds with nuclease properties.⁷ The first step in the DNA scission process is DNA binding and the presence of multiple positively charged metallic centers has been proven to increase the affinity of the nuclease by the double helix,

Scheme 1. Bridging Mode of the Dideprotonated HdiV (this work) and the Monodeprotonated 2-pytz^{5D} Ligands



given the anionic nature of this biopolymer.⁸ We have recently reported a tetranuclear and some binuclear triazole copper(II) complexes, which showed efficient DNA cleavage properties.⁷

In this context, a new potentially dinucleating ligand was designed and prepared: 3,5-bis(pyridine-2-yl-acetamido)-1,2,4-triazole = 3,5-bis(picolinamido)-1,2,4-triazole (hereafter shortened to H₂diV). The synthesis was performed by a one-pot reaction of guanazole with ethyl 2-picolinate in a glass oven.⁹ The H₂diV ligand is similar to the Hpytz/Hbpt ligand. The difference between both compounds lies in the acetamido linker that connects the pyridine and triazole rings in H₂diV. Accordingly, this new derivative, through deprotonation at both acetamido groups (HdiV form), offers eight donor atoms and four chelating rings for metal coordination (Scheme 1, top).

The H₂diV ligand is insoluble in water and only moderately soluble in methanol. The addition of a copper perchlorate solution to a hot methanolic solution of the ligand in a 2:1 ratio yielded abundant pale-green precipitate. Instead, a high excess of copper salt (6:1) produced only some precipitate, which was removed by filtration. The resulting solution was allowed to evaporate. After a couple of months, from an almost dry solution, big sea-blue single crystals of compound 1 appeared.¹⁰ Presumably, the high amount of perchlorate anions of the

Received: December 19, 2012
Published: February 18, 2013

5th Publication:

**A dinucleating ligand which promotes DNA cleavage with one and
without a transition metal ion**

Javier Hernández-Gil, Sacramento Ferrer,* Elena Salvador,
Javier Calvo, Enrique García-España, Juan Carlos Mareque-Rivas*

Chem. Commun., **2013**, 49, 3655-3657

A dinucleating ligand which promotes DNA cleavage with one and without a transition metal ion†

Cite this: *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 3655

Received 19th December 2012,
Accepted 13th March 2013

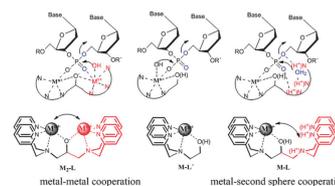
DOI: 10.1039/c3cc39067e

www.rsc.org/chemcomm

The dinucleating ligand L (1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol) combined with metal ions efficiently cleaves DNA when M:L is 1:1 (M = Co(II) or Fe(II)) at pH 5.5–7.0, with free L being more active at acidic pH than when bound to Zn(II), Cu(II) or Ni(II) at neutral pH.

Phosphodiester linkages, in particular those that join the nucleotides of DNA, are extremely resistant to hydrolysis.¹ Because efficient cleavage of these bonds can ultimately lead to the development of new products and tools for the diagnosis and treatment of diseases, hence the study of DNA cleavage attracts considerable interest.^{2–5} Metal ions possess ideal properties to carry out this chemistry, therefore, they are important functional elements of natural and artificial nucleases.^{1a,2–10}

Since the active sites of many natural nucleases have more than one metal ion, two-metal ion mechanisms enjoy a lot of support.³ Inspired by the structures of dinuclear metallo-nucleases, many recent studies have focused on the synthesis of dinuclear (and polynuclear) metal complexes. It has been shown that by using certain ligands, the dinuclear complexes are more active than their mononuclear counterparts in both oxidative and hydrolytic DNA cleavages.^{3–9} Some of the most active bimetallic systems are those in which the ligand structure places the metal ions in a way that it promotes cooperative interactions with the substrate (either *via* double Lewis acid activation, or Lewis acid activation coupled with provision of a metal-bound hydroxide nucleophile). The incorporation of a 2-propanol linker between two metal-binding units appears to be a particularly good strategy for achieving reactive systems.^{3a,6} Different authors^{7–9} have shown that the ligand L (1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-ol) (Scheme 1) can



Scheme 1 Metal complexes used and plausible cooperative interactions for DNA cleavage.

support effective cooperation of two metals towards binding and hydrolysis of phosphate diesters. Although several M_2L complexes have been structurally characterised,^{8,11} by performing potentiometric pH titrations at a range of M:L ratios it has been found that, like other dinucleating ligands, L forms mononuclear complexes when the M:L ratio is 1:1.¹² Here we show that at this M:L ratio Co(II) and Fe(II) form very efficient catalysts for cleaving plasmid DNA through the participation of the metal-free bis(pyridin-2-ylmethyl)amino (bpa) site. This result provides a new paradigm for developing efficient biomimetic catalysts using dinucleating ligands. We also report the striking observation that metal-free L cleaves plasmid DNA at acidic pH with an efficiency which compares well with that of many metal complexes.

Previous studies have shown that the catalytic activity of transition metal ion complexes towards DNA scission generally depends on the nature of the metal ion, with complexes of Cu(II) usually being the most active catalysts, so we screened several late first-row transition metal ions for activity. Notably, of the $M(II)$ complexes studied in this work, Co-L is the most efficient catalyst (Fig. 1(a)). Despite the fact that Co(II) can substitute for Zn(II) in many metalloenzyme catalyzed reactions *in vitro* and has a similar charge density and ionization potential,¹³ few reports exist on the efficiency of Co(II) complexes as metallo-nucleases. The capacity of Co-L to promote conversion of supercoiled DNA (SC, Form I) to both circular relaxed (OC, Form II) and linear (L, Form III) DNA in the

^a Departament de Química Inorgànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de València, 46100-Burjassot, Valencia, Spain. E-mail: sacramento.ferrer@uv.es; Fax: +34-96-354-4960; Tel: +34-96-354-4521

^b Departament de Química, Inorgànica, Universitat de València, Institut de Ciència Molecular, Edificio de Institutos de Paterna Apdo 22085, 46071, Valencia, Spain

^c Cooperative Centre for Research in Biomaterials (CIC biomAGUNE),

20009 San Sebastián, Spain. E-mail: jmareque@cicbiomague.es;

Fax: +34 943 005301; Tel: +34 943 005313

^d Iberbasque, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbao, Spain

† Electronic supplementary information (ESI) available: Details of experimental procedures and additional experimental data. See DOI: 10.1039/c3cc39067e

6th Publication:

Two copper complexes from two novel naphthalene-sulfonyl-triazole ligands: Different nuclearity and different DNA binding and cleavage capabilities

Javier Hernández-Gil, Sacramento Ferrer,* Nuria Cabedo,
María Pilar López-Gresa, Alfonso Castiñeiras, Francisco Lloret

J. Inorg. Biochem., **2013**, 125, 50-63



Two copper complexes from two novel naphthalene-sulfonyl-triazole ligands: Different nuclearity and different DNA binding and cleavage capabilities



Javier Hernández-Gil ^a, Sacramento Ferrer ^{a,*}, Nuria Cabedo ^b, María Pilar López-Gresa ^c, Alfonso Castiñeiras ^d, Francesc Lloret ^e

^a Departament de Química Inorgànica, Universitat de València, 46100-Burjassot, Valencia, Spain

^b Centro de Ecología Química Agrícola, Instituto Agroforestal del Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, 46022 Valencia, Spain

^c Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC - UPV, Ciudad Politécnica de la Innovación, 46022 Valencia, Spain

^d Departamento de Química Inorgánica, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

^e Institut de Ciència Molecular, Universitat de València, 46980-Paterna, Valencia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 October 2012
Received in revised form 12 April 2013
Accepted 12 April 2013
Available online 24 April 2013

Keywords:

1,2,4-Triazole ligands
Cu(II)-triazole complexes
Paddle wheel type copper acetate compound
DNA interaction
Nuclease activity

ABSTRACT

Two novel naphthalene-sulfonyl-triazole ligands, 5-amino-N1-(naphthalen-3-ylsulfonyl)-1,2,4-triazole (anstrz) and 3,5-diamino-N1-(naphthalen-3-ylsulfonyl)-1,2,4-triazole (danstrz), purposely designed to interact with DNA, have been prepared for the first time and then fully characterized by ¹H, ¹³C NMR, and IR spectroscopy, mass spectrometry and elemental analysis. The crystal structures of two copper complexes of these derivatives, i.e. [Cu(anstrz)₂(NO₃)₂·4CH₃OH (**1**), mononuclear, and [Cu(danstrz)(μ-OAc)₂·2(danstrz) (OAc = acetate) (**2**), dinuclear, have been determined by single-crystal X-ray diffraction. In both cases the ligand coordinates in a monodentate fashion via the N4 nitrogen atom of the triazole ring. Compound **2**, an example of paddle wheel type copper acetate, presents a Cu–Cu' distance of 2.667(1) Å. As a result of strong stacking interactions and intense H-bonds, the structure of **2** constitutes a MOF (metal-organic framework). Besides, this dinuclear compound exhibits a very strong antiferromagnetic coupling ($J = -324 \text{ cm}^{-1}$) and a silent X-band EPR at room temperature. The affinity toward DNA of **1** and **2** has been examined by fluorescence emission spectroscopy, thermal denaturation and viscosimetry assays. The apparent binding constant (K_{app}) values of $2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for **1** and $2.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ for **2** suggest important DNA interaction. The dinuclear compound (**2**) intercalates and produces a high change in the T_m . Both compounds promote DNA scission in the presence of H₂O₂/ascorbate (**1**) or ascorbate (**2**) through oxidative mechanism. The possible reasons for the higher DNA affinity and the more efficient DNA cleavage displayed by compound **2** in relation to compound **1** are discussed.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The rational design of species capable of interacting with DNA in a specific way, in order to produce a controlled chemical cleavage, is an area of great interest due to its potential application as tools to manipulate the genetic material and as agents in chemotherapy. Transition metal complexes have been widely exploited for these purposes, not only because of their unique spectral and electrochemical signatures, but also because by changing the ligand environment the DNA binding and cleaving ability of a metal complex can be tuned [1–6]. Copper being a bio-essential transition metal ion, its complexes have been frequently used to obtain DNA cleavage agents in view of their biologically accessible redox potential and their relatively high affinity for nucleobases. Usually Cu(II) complexes under the

proper conditions produce DNA scission by an oxidative pathway [1–4,7–10].

The ligand plays a crucial role in the design of the metallonucleases. The reactivity of the artificial nuclease is strongly enhanced when its structure comprises groups with high DNA affinity. Strategies which have shown to be effective to reach such goal are [1–3]: (i) the use of bi-metallic agents, (ii) the introduction of functional groups positively charged, and (iii) the conjugation with DNA binding units such as groove binders or intercalators. Last feature taken into account, the planarity of the ligand and/or the presence of aromatic systems are factors that favor the intercalation; the design of these systems, however, is not trivial [1,2]. Sometimes the conjugation with an intercalator does not produce the results expected, since the advantage derived by the increased DNA affinity is canceled by the incorrect positioning of the reactive group [11–13]. The nature of the intercalator is also important; in this sense, J.K. Barton et al. and Burstyn et al., among other authors, have reported substantial differences in its reactivity [14,15]. As recent effort in this direction,

* Corresponding author. Tel.: +34 3544521; fax: +34 3544960.
E-mail address: Sacramento.Ferrer@uv.es (S. Ferrer).

7th Publication:

Two Novel Ternary Dicopper(II) μ -Guanazole Complexes with Aromatic Amines Strongly Activated by Quantum Dots for DNA Cleavage

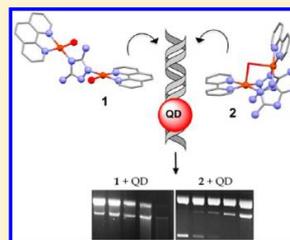
Javier Hernández-Gil, Sacramento Ferrer,* Alfonso Castiñeiras, Malva Liu-González, Francesc Lloret, Ángela Ribes, Lucija Čoga, Anja Bernecker, Juan C. Mareque-Rivas

Inorg. Chem., **2014**, *53*, 578-593

Two Novel Ternary Dicopper(II) μ -Guanazole Complexes with Aromatic Amines Strongly Activated by Quantum Dots for DNA CleavageJavier Hernández-Gil,^{†,○} Sacramento Ferrer,^{*,†} Alfonso Castiñeiras,[‡] Malva Liu-González,[§] Francesc Lloret,^{||} Ángela Ribes,[†] Lucija Čoga,[†] Anja Bernecker,[⊥] and Juan C. Mareque-Rivas^{*,⊥,#,∇}[†]Departament de Química Inorgànica, Universitat de València, Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, Spain[‡]Departamento de Química Inorgànica, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario Sur, E-15782 Santiago de Compostela, Spain[§]S.C.S.I.E., Universitat de València, Dr. Moliner 50, 46100 Burjassot, Valencia, Spain^{||}Institut de Ciència Molecular, Universitat de València, Catedràtic José Beltrán n° 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain[⊥]Cooperative Centre for Research in Biomaterials (CIC biomaGUNE), 20009 San Sebastián, Spain[#]IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, 48011 Bilbao, Spain[∇]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad del País Vasco, 48940 Leioa, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Two novel (μ -guanazole)-bridged binuclear copper(II) complexes with 1,10-phenanthroline (phen) or 2,2'-bipyridine (bipy), [Cu₂(μ -N2,N4-Hdatrz)(phen)₂(H₂O)(NO₃)₄] (**1**) and [Cu₂(μ -N1,N2-datrz)₂(μ -OH₂)(bipy)]-(ClO₄)₂ (**2**) (Hdatrz = 3,5-diamino-1,2,4-triazole = guanazole), have been prepared and characterized by X-ray diffraction, spectroscopy, and susceptibility measurements. Compounds **1** and **2** differ in the aromatic amine, which acts as a coligand, and in the Cu–Cu'-bridging system. Compound **1**, which contains two mono-bridged copper ions, represents the first example of a discrete Cu–(NCN-trz)–Cu' complex. Compound **2**, with two triply bridged copper ions, is one of the few compounds featuring a Cu–[(NN-trz) + (O-aquo)]–Cu' unit. Both compounds display antiferromagnetic coupling but of different magnitude: J ($\mu_{2,4}$ -triazole) = -52 cm⁻¹ for **1** and J ($\mu_{1,2}$ -triazolate) = -115 cm⁻¹ for **2**. The DNA binding and cleavage properties of the two compounds have been investigated. Fluorescence, viscosimetry, and thermal denaturation studies reveal that both complexes have high affinity for DNA (**1** > **2**) and that only **1** acts as an intercalator. In the presence of a reducing agent like 3-mercaptopropionic acid, **1** produces significant oxidative DNA cleavage, whereas **2** is inactive. However, in the presence of very small quantities of micelles filled with core-shell CdSe-ZnS quantum dots (15 nM), **1** and **2** are considerably more active and become highly efficient nucleases as a result of the different possible mechanisms for promoting cooperative catalysis (metal–metal, metal–hydrogen bonding, metal–intercalation, and metal–nanoparticle). Electrophoresis DNA-cleavage inhibition experiments, X-ray photoelectron spectroscopy studies, and fluorescence ethidium bromide displacement assays reveal that in these novel nucleases the QDs act as redox-active protein-like nanoparticle structures that bind to the DNA and deliver electrons to the copper(II) centers for the generation of Cu(I) and reactive oxygen species.



INTRODUCTION

In recent years, different types of inorganic nanoparticles (iNPs) with unique physicochemical properties have emerged.^{1–4} Among these, quantum dots (QDs) have proved to be very versatile, finding applications in electroluminescent displays,⁵ quantum computing,⁶ photovoltaics,⁷ solar cells,⁸ solid-state lighting,⁹ transistors,¹⁰ and biological imaging.^{11,12} The useful physicochemical properties of QDs include their broad excitation bands with very high extinction coefficients and narrow emission bands that can be tuned across a region of the visible or near-infrared spectrum by varying the size and composition of the QD with high photostability. For biological imaging applications, QDs are now excellent alternatives to organic chromophores.^{11,12} In catalysis-

involving redox processes, QDs have also become the focus of increasing interest by showing the capacity to deliver multiple electrons upon irradiation with light.^{13,14}

In addition to interesting properties arising from the semiconductor nanocrystal, it has been reported that the surface of water-soluble QDs can readily adsorb oligonucleotides and various serum albumins.^{15,16} Moreover, recent observations suggest that there may be functional similarities between NPs and proteins,^{17–20} given that they can have similar sizes, shapes, and surface functional groups. In this context, some studies

Received: October 31, 2013

Published: December 12, 2013

