



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultat de Química
Departament de Química Inorgànica

“Aspectos medioambientales y biomédicos
de la Química Supramolecular de
azaciclofanos derivados de la piridina y el
pirazol”

Memoria presentada en la Facultad de Química de la
Universidad de Valencia para optar al grado de Doctor en
Química por:

Raquel Belda Vidal

Directores

Dr. D. Enrique García-España Monsonís

Dr. D. José Miguel Llinares Berenguer

D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia y **D. José Miguel Llinares Berenguer**, Profesor Titular del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada “**Aspectos medioambientales y biomédicos de la Química Supramolecular de azaciclofanos derivados de la piridina y el pirazol**”, ha sido realizada bajo su dirección conjuntamente en los Departamentos de Química Orgánica e Inorgánica de la Universidad de Valencia, por la Licenciada **D^a. Raquel Belda Vidal**, y que, encontrándose concluida, autorizan su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

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

Paterna, 18 de Mayo de 2015.

D. Enrique García-España Monsonís

D. José Miguel Llinares Berenguer

D^a **Raquel Belda Vidal**, Licenciada en Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia, presenta esta Memoria, con el título **“Aspectos medioambientales y biomédicos de la Química Supramolecular de azaciclofanos derivados de la piridina y el pirazol”**, en el marco del programa de doctorado “Técnicas Experimentales en Química” con el fin de optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que así conste, firma la presente en Paterna a 18 de Mayo de 2015.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Raquel Belda Vidal', with a large, sweeping flourish at the end.

Fdo: Raquel Belda Vidal

Agradezco a mis directores de tesis el Prof. Enrique García-España Monsonís y Dr. José Miguel Llinares Berenguer por haberme dado la oportunidad de formar parte del grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. Por guiarme durante todos estos años y enseñarme todo lo que saben. Por estar siempre accesibles.

A Conxa, que aunque no es mi directora de tesis, siempre ha estado dispuesta a ayudar con la síntesis.

A todos mis compañeros de grupo, con los que he tenido la suerte de coincidir durante todos estos años. He podido aprender cosas de cada uno de ellos. Por todos vuestros consejos, apoyo, charlas, “pitis” en la escalera, comidas, etc. Gracias! Sé que sin la ayuda de algunos de vosotros esta tesis no hubiese salido adelante.

Al Prof. Stefan Kubik y todo su grupo, por darme la oportunidad de pasar una año en su laboratorio en Alemania. Le agradezco su dedicación y sus consejos en síntesis orgánica. También, les agradezco que me acogieran como una más y por su paciencia con mi alemán.

Al Prof. Gareth Morris y al Dr. Juan Aguilar por acogerme en su grupo de RMN durante tres meses. Les agradezco su dedicación, su interés por los resultados e intentar introducirme en el mundo del RMN. Por sus clases de RMN y paciencia. En parte, hoy no estaría dónde estoy si no fuese gracias a ellos. Por su gran aportación en ideas y conclusiones al capítulo 7.

Al Prof. Jonathan Steed, por dejarme pasar tres meses en su laboratorio y darme todas las facilidades para poder caracterizar los geles del capítulo 7. Le agradezco también su interés, aportación, discusión e interpretación de los resultados.

A los Prof. Antonio Doménech y Prof. Hermas Jiménez por su ayuda y aportación al capítulo 5.

Al SCSIE de la Universidad de Valencia, en especial, a Isabel del servicio de RMN y Sales del servicio de masas por su paciencia y darme todas la facilidades.

A Dr. Alan Kenwright y Catherine Heffernan por su paciencia y su interés por que siga aprendiendo cada día.

A todos mis amigos que durante estos años han estado siempre ahí apoyándome, aunque no supiesen muy bien a qué me dedicaba.

Finalmente me gustaría agradecer a Javi, a mis padres, a mi hermano y a toda mi familia, porque sin su apoyo, paciencia y comprensión no hubiese podido realizar este proyecto. A todos ellos les estoy muy agradecida.

El trabajo recogido en esta Tesis ha sido financiado por el proyecto Ingenio 2010 Consolider, programa Prometeo 2011/008 y los fondos FEDER. Agradezco al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por el disfrute de la beca predoctoral para la Formación de Profesorado Universitario (FPU).

NOTA de la autora.

Esta tesis ha sido posible gracias a diferentes colaboraciones que me gustaría especificar.

Los ligandos **L2-L4** utilizados en el capítulo 5, así como los estudios con estos ligandos, son parte de la tesis doctoral de la Dra. Begoña Verdejo y el Dr. Salvador Blasco.

Las medidas electroquímicas han sido realizadas por el Prof. Antonio Doménech, así como la interpretación de los resultados.

Las medidas de RMN paramagnéticos han sido realizadas e interpretadas por el Prof. Hermas Jiménez.

La medida y resolución del cristal **CS1** y **CS2** han sido realizados por el Dr. Salvador Blasco y las de los cristales **CS2**, **CS3**, **CS4** y **CS5** por Javier Pitarch.

Las medidas de magnetismo y su interpretación han sido realizadas por el Dr. Jesús Ferrando.

La propuesta y adaptación de la secuencia de la espectroscopia z para estudiar los geles fue realizada por el Dr. Juan Aguilar.

Índice general

Índice general	I
Índice de tablas	VII
Índice de figuras	XI
Índice de abreviaturas y acrónimos	XXIII
Publicaciones	XXVII
Capítulo 1: Introducción.....	1
1. 1. Química Supramolecular.....	1
1. 2. Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje: preorganización, complementariedad y cooperatividad.	6
1. 2. 1 Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje.....	6
1. 2. 2. Complementariedad y preorganización.....	7
1. 2. 3. Efecto quelato y cooperatividad.	8
1. 3. Catálisis y transporte.	9
1. 4. Interacciones no covalentes.....	11
1. 4. 1. Interacciones ión-ión, ión dipolo y dipolo-dipolo.	11
1. 4. 2. Enlaces de hidrógeno.....	12

1. 4. 3. Enlace de coordinación.....	13
1. 4. 4. Interacciones π	15
1. 4. 5. Fuerzas de van der Waals.....	17
1. 4. 6. Efecto hidrófobo.....	18
1. 5. Clasificación de receptores supramoleculares.....	19
1. 6. Bibliografía.....	25
Capítulo 2: Objetivos.....	29
Chapter 3: Materials and methods	31
3. 1. Potentiometric measurements.....	31
3. 2. Nuclear Magnetic Resonance measurements.....	32
3. 3. Electrochemistry measurements.....	33
3. 4. C,H,N analysis.....	33
3. 5. X-Ray Analysis.....	34
3. 6. Magnetic susceptibility measurements.....	35
3. 7. Spectrometric measurements.....	35
3. 8. Spectroscopic measurements.....	36
3. 9. Electron paramagnetic resonance measurements.....	36
3. 10. Rheology measurements.....	37
3. 11. Scanning electron microscopy analysis.....	37
3. 12. Wide Angle X-ray scattering measurements.....	38
3. 13. Superoxide dismutase activity assay.....	38
3. 14. Toxicity assays.....	39

3. 15. Chemiluminescence in PNML SOD activity assays.	40
3. 16. Gel sample preparation.	41
3. 17. Tgel determination.	41
3. 18. References.....	42
Chapter 4: Azacyclophanes: Nomenclature and synthesis.....	45
4. 1. Nomenclature of Azacyclophanes	45
4. 2. Synthesis of Azamacrocycles.	46
4. 3. General procedures.....	51
4. 4. Synthesis and characterisation.	53
4. 5. References.....	68
4. 6. Annex.....	69
Capítulo 5: Miméticos enzimáticos de la Cu,Zn Superóxido Dismutasa... ..	81
5. 1. Motivación.	81
5. 2. El oxígeno y sus especies reactivas.....	81
5. 3. Sistemas de defensa.	87
5. 4. Miméticos de la SOD.....	92
5. 5. Estudios de especiación.....	95
5. 5. 1. Comportamiento ácido-base.	95
5. 5. 2. Estudios de especiación con Cobre (II).	97
5. 5. 3. Estudios de especiación con Cinc (II).....	107

5. 5. 4. Estudios de especiación con cobre-cinc y cobre-cinc-imidazol.	111
5. 6. Estudios de la actividad SOD.	123
5. 7. Conclusiones.	132
5. 8. Bibliografía.	134
5. 9. Anexo.	137
 Capítulo 6: Complejos de Cu(II) con un Azamacrociclo [1+1] de 1<i>H</i>-pirazol. fijación de CO₂.	 139
6. 1. Motivación.	139
6. 2. ¿Qué características tiene el anillo de pirazol?	140
6. 3. Estudios de especiación: propiedades ácido-base.	146
6. 4. Estudios de especiación: complejos de Cu(II).	155
6. 4. 1. Estudios en estado sólido.	155
6. 4. 2. ¿Se forman este tipo de complejos en disolución?	164
6. 4. 3. ¿Se puede coordinar un tercer átomo en la cavidad libre del macrociclo?	172
6. 4. 4. Fijación de CO ₂	174
6. 5. Conclusiones.	182
6. 6. Bibliografía	184
6. 7. Anexo	189

Capítulo 7: Cómo mejorar la capacidad de gelación del GMP.....	195
7. 1. Motivación.....	195
7. 2. ¿Cómo se forman los geles de GMP?	195
7. 4. ¿Cuánta poliamina se necesita añadir para formar un gel?.....	204
7. 5. ¿Qué aspecto tienen los geles?.....	211
7. 6. Dinámica de los geles.	216
7. 7. ¿Se puede encontrar alguna evidencia directa de la formación de G-quartets en los geles?	221
7. 8. Otras características y mejoras.	222
7. 9. Conclusiones.....	228
7. 9. Bibliografía.	230
7. 10. Anexo.....	233
Chapter 8: Summary and conclusions.....	245
Publications	257

Índice Tablas

Tabla 5. 1. Especies reactivas del oxígeno.....	83
Tabla 5. 2. Logaritmos de las constantes de protonación y de la basicidad global para los receptores L1-L4 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	96
Tabla 5. 3. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II) con los receptores L1-L4 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.....	98
Tabla 5. 4. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura [Cu(H ₄ L2)(H ₂ O)(ClO ₄)](ClO ₄) ₅ ·3H ₂ O.....	105
Tabla 5. 5. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Zn(II) con los receptores L1-L4 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.....	108
Tabla 5. 6. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II)-Zn(II) con el receptor L1 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.....	112
Tabla 5. 7. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II)-Im con el receptor L1 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	114

Tabla 5. 8. Datos obtenidos a partir de los análisis de ^1H paramagnético de los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L1-Im, en una relación molar 2:1 y 2:1:1, en D_2O a 298 K.....	116
Tabla 5. 9. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Zn(II)-Im con el receptor L1, determinados a 298.1 K en NaClO_4 0.15 M.	120
Tabla 5. 10. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II)-Zn(II)-Im con el receptor L1, determinados a 298.1 K en NaClO_4 0.15 M.....	122
Tabla 5. 11. Datos de la actividad SOD de L1-L4. Potenciales formales asignados al par Cu(II)/Cu(I) y respecto a NHE. Cargas omitidas.....	125
Tabla A. 5. 1. Datos cristalográficos del compuesto $[\text{CuH}_4\text{L}_2(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	138
Tabla 6. 1. Logaritmos de las constantes de protonación y de la basicidad global para los receptores L5 y L6, determinados a 298.1 K en NaClO_4 0.15 M.	147
Tabla 6. 2. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura $[\text{CuL6}](\text{ClO}_4)_2$	156
Tabla 6. 3. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75 \text{H}_2\text{O}$	160
Tabla 6. 4. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))_{0.5}(\text{H}_1\text{L5})_{1.2}]_2(\text{ClO}_4)_3\text{Br}_2 \cdot 4.2 \text{H}_2\text{O}$	163
Tabla 6. 5. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos Cu(II)-L con los receptores L5 y L6, determinados a 298.1 K en NaClO_4 0.15 M.....	165

Tabla 6. 6. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura $[\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$	176
Tabla 6. 7. Algunos ejemplos de la utilización del CO_2	179
Tabla A. 6. 1. Datos cristalográficos de los compuestos: $[\text{CuL6}](\text{ClO}_4)_2$ (CS2), $\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})(\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75\text{H}_2\text{O}$ (CS3), $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))_{0.5}(\text{H}_1\text{L5})_{1.5}]_2 (\text{ClO}_4)_3\text{Br}_2 \cdot 4.2\text{H}_2\text{O}$ (CS4) y $[\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (CS5).	189
Tabla A. 6. 2. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto CS2	190
Tabla A. 6. 3. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto CS3	191
Tabla A. 6. 4. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto CS4	192
Tabla A. 6. 5. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto CS5	193
Tabla 7. 1. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con	205
Tabla 7. 2. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con L6	207
Tabla 7. 3. Relaciones molares óptimas para la formación de geles con cada una de las poliaminas. Valores determinados para G' , G'' y γ ..	209
Tabla 7. 4. Temperaturas T_{gel} determinadas para los geles formados con cada una de las poliaminas con las relaciones molares GMP:L óptimas.	223
Tabla 7. 5. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con L1	224

Tabla A. 7. 1. Logaritmos de las constantes de protonación y de la basicidad global para los receptores L5 – L10 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	233
Tabla A. 7. 2. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con L5	235
Tabla A. 7. 3. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con L8	236
Tabla A. 7. 4. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con L9	237
Tabla A. 7. 5. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con L10	238
Tabla A. 7. 6. Logaritmos de las constantes de protonación para la poliamina L1 , determinados a 298.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	243

Índice Figuras.

Figura 1. 1. Precedentes de la química supramolecular.	3
Figura 1. 2. a) Supermolécula; b) agregado supramolecular.	5
Figura 1. 3. Representación esquemática del proceso de reconocimiento y auto-ensamblaje.	7
Figura 1. 4. Efecto estabilizador de la preorganización.	8
Figura 1. 5. Efecto quelato.	8
Figura 1. 6. Representación esquemática del proceso catalítico.	10
Figura 1. 7. Representación esquemática del proceso de transporte.	10
Figura 1. 8. Representación de las interacciones: a) ión-ión; b) ión-dipolo; c) dipolo-dipolo.	12
Figura 1. 9. Diferentes tipos de enlaces de hidrogeno según la direccionalidad.	12
Figura 1. 10. a) Enlaces de hidrógeno que se forman entre las bases de ADN para formar la doble hélice; b) Estructura cristalina del B-ADN obtenida a partir de un decámero (PDB 1D49).	13
Figura 1. 11. Estructura del grupo hemo.	14
Figura 1. 12. Complejo supramolecular de Fe (II) [2x2].	15

Figura 1. 13. Representación de la interacción atractiva entre dos superficies π : a) cara-cara; b) en forma de T; c) Interacción cara-cara repulsiva entre dos superficies π	15
Figura 1. 14. Apilamiento de bases en el DNA (PDB 1D49).....	16
Figura 1. 15. Interacción catión- π entre un átomo de sodio y un anillo indol.	17
Figura 1. 16. Interacción entre los $[\text{PF}_6]^-$ y los centros de los anillos de tetrazina del 3,6-bis(2'-pitidil)-1,2,4,5-tetrazina.	17
Figura 1. 17. Estructura cristalina de un complejo de inclusión estabilizado mediante fuerzas de van der Waals.	18
Figura 1. 18. Efecto hidrofóbico.....	19
Figura 1. 19. Clasificación receptores supramoleculares.....	20
Figura 1. 20. Complejos: a) hierro-porfirina, b) magnesio-clorina.	21
Figura 1. 21. Azamacrociclo sintetizado por Koga y colaboradores...21	
Figura 1. 22. Algunos de los azamacrociclos [1+1] sintetizados en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.....	23
Figure 4. 1. Cyclam and isocyclam.....	45
Figure 4. 2. Amplification and simplification scheme.....	46
Figure 4. 3. Two different routes to synthesis azamacrocycles.	47
Figure 4. 4. General synthetic route used in the present work.....	49
Figure 4. 5. Synthesis of pyrazole precursor.	49
Figure 4. 6. General synthetic route to enlarged polyamines.....	50

Figura 5. 1. Esquema de la formación y repercusión de las especies ROS en el metabolismo celular. Adaptada de Halliwell <i>et al.</i>	85
Figura 5. 2. a) Enzima Cu, Zn-SOD; b) Esquema centro activo.	89
Figura 5. 3. Esquema de la cavidad activa de la Cu,Zn-SOD. (Adaptada de Valentine <i>et al.</i> , Bioinorganic Chemistry, University Science Books, 1994, cap.5, p302).	89
Figura 5. 4. Ciclo catalítico de la Cu,Zn-SOD. Adaptada de Bertini <i>et al.</i>	91
Figura 5. 5. Miméticos de la Cu,Zn-SOD encontrados en la bibliografía.	93
Figura 5. 6. Esquema de los receptores descritos en este capítulo....	94
Figura 5. 7. Diagramas de distribución de especies para los receptores L1-L4.....	97
Figura 5. 8. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores L1-L4 con Cu(II) en relación molar Cu(II):L 1:1 [Cu(II)] = [L] = 1×10^{-3} M.....	100
Figura 5. 9. a) Espectros UV-vis de una disolución acuosa que contiene Cu(II)-L1, en una relación molar 1:1, recogidos en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-L1 junto con los valores de absorbancia normalizados a 300 (cuadros/rojos) y 600 nm (círculos/azules). [Cu(II)] = [L] = 1×10^{-3} M	102
Figura 5. 10. Estructura cristalina del complejo [Cu(H ₄ L2)(H ₂ O)(ClO ₄)] ⁵⁺	103
Figura 5. 11. a) Red de enlaces de hidrógeno en [Cu(H ₄ L2)(H ₂ O)(ClO ₄)] ⁵⁺ ; b) vista en spacefill.	104

Figura 5. 12. Formación de anillos quelato de seis y cinco miembros en los receptores L1 y L2	106
Figura 5. 13. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores L1-L4 con Cu(II) en relación molar Cu(II):L 2:1 [Cu(II)] = 2×10^{-3} M [L] = 1×10^{-3} M.	107
Figura 5. 14. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores L1-L4 con Zn(II) en relación molar M:L 1:1 [M] = [L] = 1×10^{-3} M.	110
Figura 5. 15. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores L1-L4 con Zn(II) en relación molar Zn(II):L 2:1 [Zn(II)] = 2×10^{-3} M; [L] = 1×10^{-3} M.	111
Figura 5. 16. Diagrama de distribución de especies para el sistema L1 con Cu(II) y Zn(II) en relación molar Cu(II):Zn(II):L 1:1:1 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L] = 1×10^{-3} M.	113
Figura 5. 17. Molécula de imidazol en su forma: catiónica, neutra y aniónica.	114
Figura 5. 18. Diagramas de distribución de especies para el sistema Cu(II)- L1-Im en relación molar Cu(II):L:Im 2:1:1 [Cu(II)] = 2×10^{-3} M; [Im] = [L] = 1×10^{-3} M.	115
Figura 5. 19. Espectros ^1H paramagnético en D_2O a 298K de los sistemas a) Cu(II)- L1 -Im; b) Cu(II)- L1 . [L] = [Im] = 3×10^{-3} M; [Cu(II)] = 6×10^{-3} M.	117
Figura 5. 20. Esquema del sistema $\text{Cu}_2\text{L1(Im)}$	118
Figura 5. 21. Estructura cristalina de un receptor que contiene una unidad de terpiridina y una cadena poliamínica. Los dos átomos de cobre se encuentran unido mediante un anillo imidazolato.	119

Figura 5. 22. Diagramas de distribución de especies para el sistema del receptor L1 con Zn(II)-Im en relación molar Zn(II):L:Im 2:1:1 [Zn(II)] = 2×10^{-3} M; [Im] = [L] = 1×10^{-3} M.	121
Figura 5. 23. Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-Zn(II)-Im con L1 en una relación molar Cu(II):Zn(II):L:Im 1:1:1:1 [Cu] = [Zn] = [Im] = [L] = 1×10^{-3} M.	123
Figura 5. 24. Voltamperograma cíclico del sistema Cu ₂ L1 a pH 7.4, en NaClO ₄ 0.15 M. [L1] = 1×10^{-3} M [Cu(II)] = 2×10^{-3} M. a) sin imidazol; b) ídem. con imidazol. Velocidad de barrido 50 mVs ⁻¹	127
Figura 5. 25. Voltamperograma cíclico en NaClO ₄ 0.15 M de los sistemas: a) CuZn L1 a pH = 7.4 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = 1×10^{-3} M a) sin imidazol; b) CuZn L1 (Im) a pH = 7.4 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = [Im] = 1×10^{-3} M; c) CuZn L1 a pH = 8.4 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = 1×10^{-3} M; d) CuZn L1 a pH = 9.5 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = 1×10^{-3} M. Velocidad de barrido 50 mVs ⁻¹	128
Figura A. 5. 1. a) Espectros UV-vis de disoluciones acuosas que contiene Cu(II):L, en una relación molar 1:1, recogidos en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-L junto con los valores de absorbancia normalizados a 300 (rojo) y 600 nm (verde).	136
Figura 6. 1. Anillo de pirazol.	140
Figura 6. 2. Formas de interacción del pirazol.	141
Figura 6. 3. Espaciadores con dos átomos de N contiguos.	141
Figura 6. 4. Compuestos binucleares conectados a través de los heterociclos pirazol, triazol, oxadiazol y tiodiazol.	142
Figura 6. 5. Complejos binucleares con ligandos de condensación [1+2] derivados del pirazol.	143

Figura 6. 6. Ligandos macrocíclicos de pirazol [2+2] y [2+3] y estructuras cristalinas de sus complejos de Cu(II).	144
Figura 6. 7. Esquema de los receptores descritos en este capítulo..	146
Figura 6. 8. a) Espectros UV-vis de una disolución de L5 en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies de L5 junto con la variación de la absorbancia a 225nm. [L] = 1×10^{-3} M.	150
Figura 6. 9. Diagrama de distribución de especies para L5 junto con el desplazamiento químico que sufren la señales de ^{13}C de los átomos C5 y C9 en función del pH. [L] = 1×10^{-3} M.	151
Figura 6. 10. Secuencia de protonación propuesta para L5 según los datos experimentales obtenidos mediante espectroscopia UV-vis y RMN. Los números en cursiva indican las posiciones relativas.	152
Figura 6. 11. a) Espectros UV-vis de una disolución de L6 en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies de L6 en función del pH junto con la variación de la absorbancia a 261 (rojo) y 267 (azul) nm. [L] = 1×10^{-3} M.....	153
Figura 6. 12. Secuencia de protonación propuesta para L6 según los datos experimentales obtenidos mediante espectroscopia UV-vis. Los números en cursiva indican las posiciones relativas.	154
Figura 6. 13. Estructura cristalina del catión $[\text{CuL6}]^{2+}$	156
Figura 6. 14. Estructura cristalina del catión $[\text{CuL}]^{2+}$	157
Figura 6. 15. a) Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L5}))(\text{H}_{-1}\text{L5})]^{3+}$; b) Representación esquemática del complejo.	158
Figura 6. 16. Red de enlaces de hidrógeno que interconectan dos complejos $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L5}))(\text{H}_{-1}\text{L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75 \text{H}_2\text{O}$	161

Figura 6. 17. a) Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))_{0.5}(\text{H}_1\text{L5})_{1.5}]^{2.5+}$; b) Representación esquemática de los dos complejos obtenidos.....	162
Figura 6. 18. Gráfico de la variación de $X_{\text{M}}T$ en función de T para el complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75 \text{ H}_2\text{O}$	164
Figura 6. 19. Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-L6, para una relación molar 1:1. $[\text{Cu}(\text{II})] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3}\text{M}$..	166
Figura 6. 20. a) Espectros UV-vis del sistema Cu(II)-L5, en una relación molar 1:1, en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-L5, para una relación molar 1:1, en función del pH junto con la variación de la absorbancia a 376 (azul) y 600 (rojo) nm. $[\text{Cu}(\text{II})] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3}\text{M}$	168
Figura 6. 21. a) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H}_1\text{L5})_2]^{2+}$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 7$. (teórico arriba y experimental abajo); b) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H}_1\text{L5})_2\text{Cl}]^+$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 9$ (teórico arriba y experimental abajo). Relación Cu(II):L 1:1.	169
Figura 6. 22. a) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{ClO}_4)]^+$ (teórico arriba y experimental abajo) en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 9$; b) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CH}_3\text{OH})\text{Br}]^+$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 9$ (teórico arriba y experimental abajo). Relación Cu(II):L 1:1	170
Figura 6. 23. a) Espectros EPR de disoluciones de Cu(II)-L5 a pH: 2.3, 3.8, 5.5, 7.5, 9.5 y 11; b) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-L5, para una relación molar 1:1. $[\text{Cu}(\text{II})] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3}\text{M}$	171

Figura 6. 24. Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-L5, para una relación molar 3:2. [Cu(II)] = 1.5×10^{-3} M; [L] = 1×10^{-3} M.....	173
Figura 6. 25. Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2\text{Cl}_2]^{2+}$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a pH = 7. a) teórico; b) experimental. Relación molar Cu(II):L 3:2.....	174
Figura 6. 26. a) Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$; b) Representación esquemática del complejo; c) Ampliación de la coordinación de la molécula de carbonato.....	175
Figura 6. 27. Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-L5- CO_3^{2-} , para una relación molar 3:2:3. [Cu(II)] = $[\text{CO}_3^{2-}] = 1.5 \times 10^{-3}$ M; [L] = 1×10^{-3} M.....	177
Figura 6. 28. Concentración de CO_2 atmosférico registrado durante los últimos 60 años.....	178
Figura 6. 29. Complejos metálicos capaces de fijar CO_2	182
Figura 6. 30. Estructura cristalina del complejo: a) CuL(carb); b) $\text{Cu}_2\text{L}(\text{CO}_3)$	183
Figura 7. 1. Formación del gel.	196
Figura 7. 2. Apilamiento de G-quartets.	197
Figura 7. 3. Estructura del G-quadruplex obtenida a partir del hexanucleótido d(TG4T) (PDB 244D).	298
Figura 7. 4. Efecto de los ligandos sobre la telomerasa. Figura tomada de la referencia	299
Figura 7. 5. Guanosinas modificadas.	200

Figura 7. 6. Estructura de las poliaminas utilizadas como co-geladores.....	202
Figura 7. 7. Efecto de la adición de la poliamina L10 sobre una disolución de GMP 30 mM a pH 5.....	203
Figura 7. 8. Fotografías de los diferentes tipos de geles.	203
Figura 7. 9. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados con L7 en función de la relación molar GMP:L (3:1 rojo y 4:1 azul).	206
Figura 7. 10. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados con L6 en función de la relación molar GMP:L (3:1 rojo, 4:1 azul, 5:1 verde y 8:1 naranja).....	208
Figura 7. 11. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la flexibilidad de la poliamina. L7 poliamina cíclica (rojo) y L8 análogo lineal (azul).	210
Figura 7. 12. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función del número de grupos amino cargados en la poliamina, L10 (rojo), L9 (azul) y L8 (verde).	213
Figura 7. 13. Imágenes SEM de los geles formados con las poliaminas a) L5 ; b) L9 ; c) L8	213
Figura 7. 14. Imágenes SEM de los geles formados por: a) GMP; b) GMP-L9.	215
Figura 7. 15. Espectro ^1H de L6 , gel GMP:L6 y GMP 30mM en D_2O	216
Figura 7. 16. Evolución de las integrales de los componentes del gel a medida que ocurre el proceso de gelificación, (GMP azul y L rojo). ...	217
Figura 7. 17. Espectro ^1H del gel formado con L8	218

Figura 7. 18. Proceso de transferencia de magnetización.....	219
Figura 7. 19. Secuencia utilizada en los estudios de espectroscopia z.	219
Figura 7. 20. Resultados del z-test con el gel formado con L9	220
Figura 7. 21. Espectros WAXS de los geles. Todos los geles presentan un pico a un valor de 2θ , aproximadamente, 26.5nm.. ..	222
Figura 7. 22. Poliamina L1	222
Figura 7. 23. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria del gel formado con L1 , para una relación GMP:L 1:1.	224
Figura 7. 24. a) Topotecan; b) Fenilefrina.	225
Figura 7. 25. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados con la poliamina L9 sin (rojo) y con (azul) fenilefrina.	226
Figura A. 7. 1. Diagramas de distribución de especies de las poliaminas L5-L10	234
Figura A. 7. 2. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la relación molar GMP:L.	236
Figura A. 7. 3. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria para el gel formado con L8	237
Figura A. 7. 4. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria para el gel formado con L9	238
Figura A. 7. 5. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la relación molar GMP:L.	239
Figura A. 7. 6. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la flexibilidad de la poliamina.....	240

Figura A. 7. 7. Resultados del z-test de los geles formados con a) **L5**;
b) **L6**; c) **L7**241

Figura A. 7. 8. Resultados del z-test de los geles formados con a) **L8**;
b) **L10**.242

Figura A. 7. 9. Diagrama de distribución de especies de **L**..... 244

Índice de Abreviaturas y acrónimos

AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Arg	Arginina
ARN	Ácido ribonucleico
Asp	Aspártico
atm	atmósferas
bs	singulete ancho
Co Q	Coenzima Q
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
CuL	Complejos mononucleares de Cu(II)
Cu ₂ L	Complejos binucleares de Cu(II)
Cu ₂ L	Complejos binucleares de Cu(I)

Cu,Zn-SOD	Superóxido Dismutasa de cobre y cinc
d	doblete
DHP	3,4-Dihidro-2 <i>H</i> -pirano
DIBAL	Hidruro de diisobutilaluminio
DME	1,2-dimetoxietano
ec	ecuación
eq	equation
equiv	equivalents
EPR	Resonancia Paramagnética Electrónica
ESI-MS	Electrospray Ionisation Mass Spectrometry
EtOH	Etanol
GMP	monofosfato 5'-guanosina
GSH	Glutati3n
h	hora
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinactanosulf3nico
His	Histidina
HNE	<i>trans</i> -4-hidroxi-2-nonenal
ICMol	Instituto de Ciencia Molecular

Im	Imidazol
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
m	multiplete
NBT	Azul de nitrotetrazolio
NHE	Electrodo Estándar de Hidrógeno
PhOH	Fenol
PLMN	Leucocitos polimorfonucleares humanos
quin	quintuplete
q	cuarteto/quartet
RMN/NMR	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Especies Reactivas del Oxígeno
s	singulete
SCSIE	Servei Central de Suport a la Investigació Experimental
SEM	Microscopía Electrónica de Barrido
SOD	Superóxido dismutasa
T	Temperatura
t	triplete

Tgel	Temperatura a la cual las fibras de la red del gel se rompen
THF	Tetrahidrofurano
TPA	Acetato de tetradecanoilforbol
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TsCl	Cloruro de tosilo
TSP	Ácido 3-(trimetilsilil)propiónico
UV	Universitat de València
UV-vis	Ultravioleta-visible
WAXS	Dispersión de rayos X de ángulo ancho

Publicaciones

Trabajos publicados de esta tesis:

- R. Belda; S. Blasco; B. Verdejo; H. R. Jiménez; A. Doménech-Carbó; C. Soriano; J. Latorre; C. Terencio; E. García-España. "Homo- and heterobinuclear Cu^{2+} and Zn^{2+} complexes of abiotic cyclhexaazapyridinocyclophanes as SOD mimics." *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 11194. DOI: 10.1039/c3dt32220c

- R. Belda; J. Pitarch-Jarque; C. Soriano; J. M. Llinares; S. Blasco; J. Ferrando-Soria; E. García-España. "Intermolecular Binding Modes in a Novel [1 + 1] Condensation 1*H*-Pyrazole Azamacrocyclic: A Solution and Solid State Study. Evidence for CO_2 Fixation." *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 10795. DOI: 10.1021/ic400645t

Otras publicaciones en las que se ha participado durante la tesis:

- J. Pitarch-Jarque; R. Belda; L. García-España; J. M. Llinares; F. Pan; K. Rissanen; P. Navarro; Enrique García-España. "From isolated 1*H*-pyrazole cryptand anion receptors to hybrid inorganic–organic 1D helical polymeric anion receptors." *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 7761. DOI: 10.1039/C5DT00763A.

- J. Pitarch-Jarque; R. Belda; F. Lloret; J. Ferrando-Soria; P. Navarro; A. Lopera; E. García-España. "3 + 1 = 6 + 2" in Cu(II) coordination

chemistry of 1*H*-pyrazole azacryptands” *Dalton Transactions* **2015**, *44*, 3378. DOI: 10.1039/C4DT03650F.

- A. Schaly; R. Belda; E. García-España; S. Kubik. “Selective Recognition of Sulfate Anions by a Cyclopeptide. Derived Receptor in Aqueous Phosphate Buffer.” *Organic Letters* **2013**, *15*, 6238. DOI: 10.1021/ol4030919

- E. García-España; A. Bianchi; J. González; R. Belda; J. Pitarch. “*Supramolecular Chemistry: from molecules to nanomaterials: 1) Receptors for Nucleotides.*” pp. 111 - 152. John Wiley & Sons, 2012.

- J. Pitarch; M. P. Clares; R. Belda; R. D. Costa; P. Navarro; E. Ortí; C. Soriano; E. García-España. “Zn(II)-coordination and fluorescence studies of a new polyazamacrocyclic incorporating 1*H*-pyrazole and naphthalene units.” *Dalton Transactions*, **2010**, *39*, 7741. DOI: 10.1039/C0DT00204F.

Capítulo 1

Introducción

Las tres temáticas en las que se divide esta tesis están enmarcadas dentro de la química del enlace no covalente o química supramolecular. Por esta razón, en este capítulo de la tesis hemos querido hacer una breve descripción del origen de ésta rama de la química como área independiente y de cuáles son los procesos en los que se basa. También, se ha hecho una pequeña descripción de los diferentes tipos de interacciones no covalentes y de los factores que influyen en el proceso supramolecular. No obstante, para cada una de las diferentes temáticas que se abordan en la tesis se ha hecho una introducción más específica dentro de cada capítulo.

1. 1. Química Supramolecular.

Desde que el hombre tiene uso de razón, se ha preguntado cómo y por qué ocurren las cosas, encontrando en la naturaleza su fuente de inspiración. Ésta es capaz de generar una gran variedad de sistemas que nos permite mantenernos vivos y en equilibrio con el entorno. Por esta razón, muchos científicos han dirigido, y siguen dirigiendo, sus investigaciones a imitar procesos biológicos como son las reacciones catalizadas por enzimas, el transporte de moléculas o la formación de estructuras complejas como ácidos nucleicos o proteínas.

A finales de los años 70, Lehn introdujo el término y concepto de química supramolecular, de la siguiente forma: *“así como existe el campo de la química molecular basado en el enlace covalente, existe el campo de la química supramolecular basado en el enlace no covalente.”*^{1,2} Es decir, la química supramolecular es el campo multidisciplinar que estudia la interacción reversible entre moléculas a través de enlaces no covalentes. Sin embargo, fueron muchos los científicos del siglo XIX y XX de diferentes áreas como químicos, bioquímicos o físicos quienes, con sus logros, participaron en los orígenes de esta nueva área (figura 1. 1). Es por esta razón, que una gran parte de la nomenclatura que se utiliza en la química supramolecular está adaptada de otros campos como la biología o la química de la coordinación.

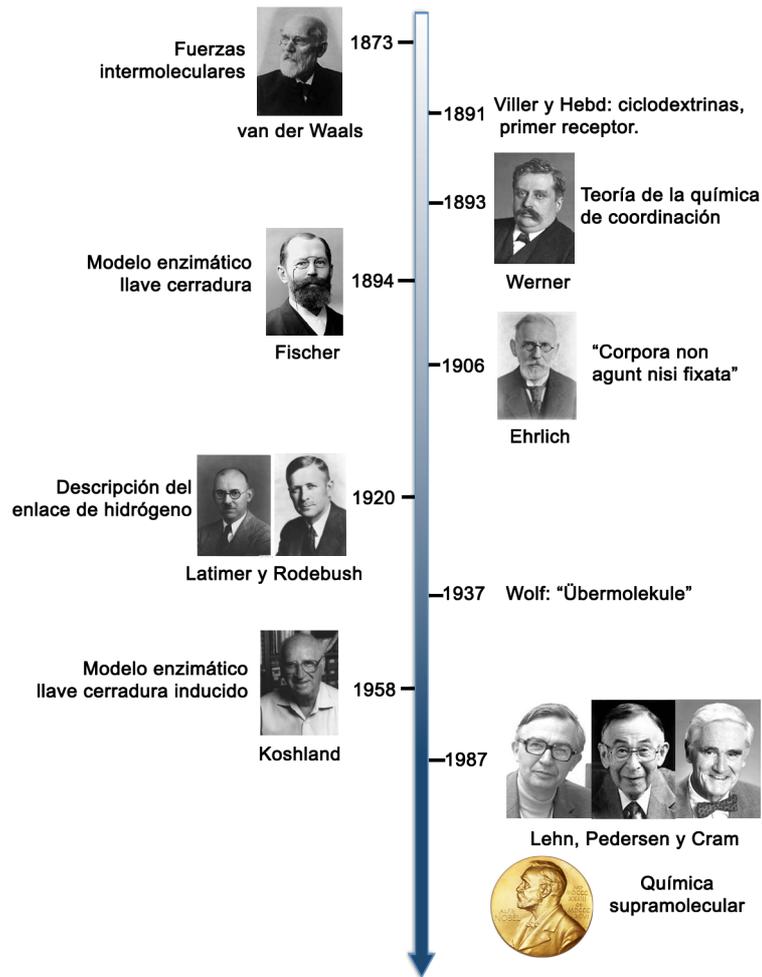


Figura 1. 1. Precedentes de la química supramolecular.

Tal y como se muestra en la cronología de la figura 1. 1, en 1873 van der Waals postuló por primera vez la existencia de fuerzas intermoleculares. Dos décadas después, Villier y Hebd descubrieron las ciclodextrinas,³ moléculas consideradas como los primeros receptores moleculares. Dos años después de este descubrimiento, Werner propuso la teoría de la química de la coordinación,⁴

considerada como uno de los pilares fundamentales de la química supramolecular.

En 1894, el bioquímico alemán Fisher⁵ introdujo el modelo llave-cerradura para ilustrar la interacción específica entre una enzima y un sustrato. Este modelo fue modificado posteriormente en 1958 por Koshland, con el modelo del ajuste inducido, en el que propuso que los enzimas son moléculas flexibles que pueden modificar su conformación estructural al interactuar con el sustrato.⁶ En el periodo transcurrido entre estas dos contribuciones, Elrich sugirió la idea de que los fármacos no actúan en el cuerpo si no existe una fijación⁷ y Latimer y Rodebush describieron los enlaces de hidrogeno.⁸ Sin embargo, no fue hasta finales del siglo pasado cuando se reconoció la química supramolecular como disciplina. Este hecho fue gracias a los trabajos pioneros de Pedersen, Cram y Lehn⁹⁻¹¹ basados en la síntesis de macrociclos, bismacrociclos y criptandos selectivos para el reconocimiento de cationes alcalinos y alcalinotérreos. Por esta contribución, recibieron el premio Nobel de Química en 1987.¹²⁻¹⁴ Posteriormente, este tipo de trabajo se extendió al reconocimiento de moléculas en general, ya sean cationes, aniones o moléculas neutras de cualquier geometría. En la actualidad, es posible crear sofisticadas supermoléculas capaces de mimetizar una función biológica o dispositivos moleculares diseñados para desempeñar una función específica.¹⁵

Sin embargo, es conveniente destacar que el termino de “*übermolekule*” o “supermolécula” fue acuñado 40 años antes (1937) por Wolf.¹⁶ Éste hace referencia a la formación de entidades mayores como consecuencia de la asociación, a través de enlaces no covalentes, de entidades más pequeñas como los ácidos carboxílicos. Este salto temporal, entre los orígenes de la química supramolecular y el

reconocimiento de ésta como tal, puede ser debido principalmente a dos razones. Una de ellas es que muchos de los científicos de la época consideraban que las interacciones de las moléculas con su entorno eran débiles e insignificantes, por tanto, no prestaron demasiada atención a las interacciones no covalentes. Por otra parte, y quizás mucho más importante, es que fue necesario el desarrollo de técnicas experimentales capaces de poder detectar este tipo de interacciones de baja energía.

Como ya se ha descrito anteriormente, este tipo de química está basada en la unión de dos o más moléculas para dar lugar a una entidad mayor. Esta entidad puede ser más o menos compleja y abarca desde organizaciones sencillas a organizaciones más complejas como polímeros o agregados supramoleculares, en el que participa un mayor número de moléculas de igual o diferente naturaleza, y se organizan mediante enlaces no covalentes para dar lugar a estructuras de tamaño nano- o microscópico (figura 1. 2).^{1,13,17}.

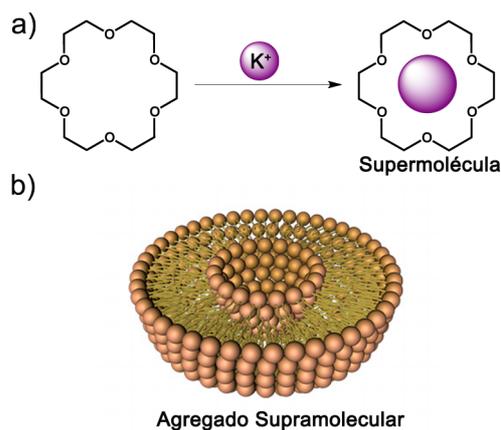


Figura 1. 2. a) Supermolécula;⁹ b) agregado supramolecular.

1. 2. Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje: preorganización, complementariedad y cooperatividad.

1. 2. 1 Reconocimiento molecular y auto-ensamblaje.

El reconocimiento molecular es la unión selectiva y específica de dos o más moléculas a través de interacciones no covalentes. Para que esto ocurra, ambas moléculas deben tener geometría y tamaño complementarios. Este término ya se empleaba en el modelo llave-cerradura, propuesto por Fisher (1894), para explicar la selectividad de un enzima por un determinado sustrato. En éste, tanto receptor como sustrato presentaban una naturaleza estática y rígida. Este modelo fue ampliado más tarde por el modelo enzimático inducido puesto que ambas moléculas pueden ser flexibles pre-organizándose cuando se aproximan.

La información necesaria para que tenga lugar el proceso de reconocimiento y la forma en la que se va a desarrollar está almacenada en las entidades moleculares. Es decir, las moléculas deben disponer de determinados grupos funcionales y en una determinada disposición espacial para que se produzca la interacción.¹⁷

Cuando varias moléculas, con más de un tipo de unión, se unen de forma espontánea para dar lugar a estructuras como las bicapas lipídicas, los geles, los cristales líquidos, etc. se produce el proceso conocido como auto-asociación o auto-ensamblaje. La figura 1. 3 muestra a modo ilustrativo el proceso de reconocimiento y auto-ensamblaje.

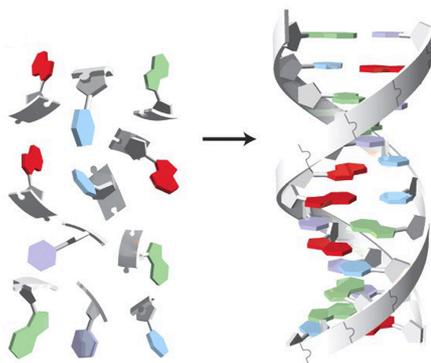


Figura 1. 3. Representación esquemática del proceso de reconocimiento y auto-ensamblaje.

1. 2. 2. Complementariedad y preorganización.

Un factor muy influyente en la afinidad de un receptor por un sustrato es la complementariedad entre receptor y sustrato. Por ejemplo, si una de las moléculas (o parte de una molécula) presenta grupos dadores de enlaces de hidrogeno en su estructura, la otra debe presentar átomos aceptores. O si una molécula presenta carácter básico, la otra debe presentar carácter ácido. Es importante que entre las moléculas se produzcan el mayor número de interacciones atractivas y se minimicen las repulsivas. Por tanto, la disposición espacial y el tipo de átomos, desde el punto de vista electrónico, serán los que definan la afinidad de un receptor por un determinado sustrato.¹⁸

Además de la complementariedad, existe el efecto estabilizador del complejo sustrato-receptor debido a la preorganización de los sitios de unión en el receptor, como ocurre en el conocido *efecto macrocíclico*. El termino fue introducido por Cabbines y Margerum¹⁹ y hace referencia a la mayor estabilidad, desde el punto de vista termodinámico y cinético, de los complejos formados por receptores cíclicos frente a sus

análogos de cadena abierta (figura 1. 4). Este efecto estabilizador es consecuencia de la menor solvatación de los sitios de unión de los receptores cíclicos y al menor coste energético necesario para adoptar una conformación adecuada para interactuar con el sustrato.

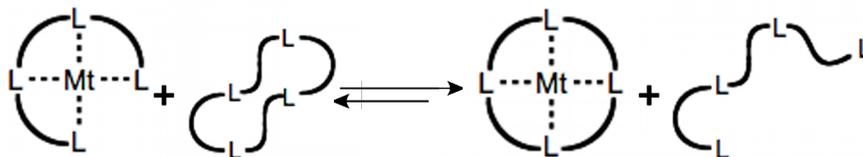


Figura 1. 4. Efecto estabilizador de la preorganización.

1. 2. 3. Efecto quelato y cooperatividad.

El *efecto quelato* fue acuñado por Schwarzenbach en 1940.²⁰ Este hace referencia a la mayor estabilidad, desde el punto de vista cinético y termodinámico, que presentan los complejos formados por receptores que tienen n átomos dadores capaces de interactuar con el sustrato al mismo tiempo frente a los complejos análogos formados por n receptores con un solo átomo dador de igual naturaleza (figura 1. 5). Es importante recalcar que, aunque es un efecto que aumenta la estabilidad del complejo formado, viene determinado por el número de miembros que forman los anillos quelato, siendo los de cinco y seis miembros los que aportan una mayor estabilidad al complejo final.

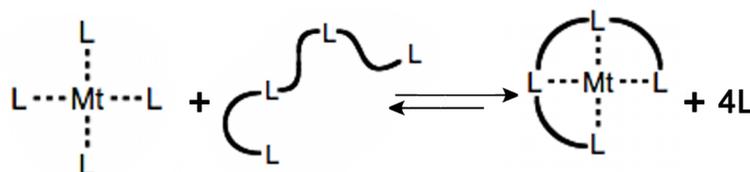


Figura 1. 5. Efecto quelato.

Por su parte, la cooperatividad es el fenómeno que se produce cuando la unión de un sustrato por el receptor influye en la unión de los sustratos posteriores. El caso en el que la unión entre un sustrato

y un receptor favorece la afinidad del receptor por otro sustrato, se conoce como efecto alostérico positivo. La hemoglobina es un ejemplo clásico, su estructura cuaternaria esta formada por dos subunidades α y dos β unidas entre sí mediante un gran número de enlaces no covalentes. La unión de una molécula de O_2 a uno de los grupos hemo provoca cambios conformacionales en el resto de la proteína de forma que favorece la fijación de más moléculas de O_2 en los grupos hemo desocupados.²¹

1. 3. Catálisis y transporte.

Además del proceso de reconocimiento molecular pueden ocurrir otros dos procesos. Estos son el transporte y la catálisis. Muchas veces son procesos selectivos, aunque no se requiere que necesariamente lo sean.

Un buen catalizador se caracteriza por su eficacia y selectividad. Es decir, debe aumentar la velocidad de la reacción varios ordenes de magnitud respecto a la reacción sin catalizar y evitar el mayor número de reacciones secundarias. Por tanto, teniendo en cuenta la definición de reconocimiento supramolecular, se pueden diseñar catalizadores selectivos y eficaces.

La catálisis conlleva un primer proceso de reconocimiento del sustrato para formar el complejo supramolecular y la posterior transformación del sustrato en productos. El ejemplo más utilizado para visualizar el proceso de transformación química lo encontramos en las enzimas, que al interaccionar con el sustrato, éste sufre una transformación química para dar lugar a los productos. Finalmente se produce la disociación del complejo (figura 1. 6).

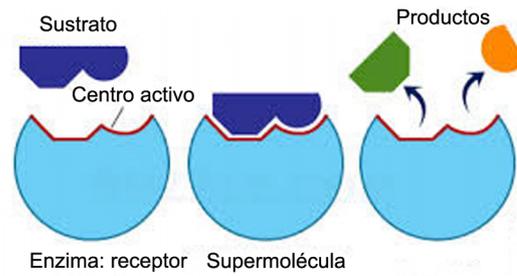


Figura 1. 6. Representación esquemática del proceso catalítico.

Por otro lado, el transporte es uno de los procesos fundamentales en biología. Muchas moléculas no son capaces de atravesar membranas. Sin embargo, el complejo sustrato-receptor que forma con las moléculas conocidas como portadores o *carriers* si les permite atravesarlas.

El proceso consiste en una primera etapa de reconocimiento del sustrato y formación del complejo sustrato-receptor. Se produce la difusión del complejo a través de la membrana y una vez ha pasado a la otra parte, se produce la disociación del complejo y la retrodifusión del receptor (figura 1. 7).¹

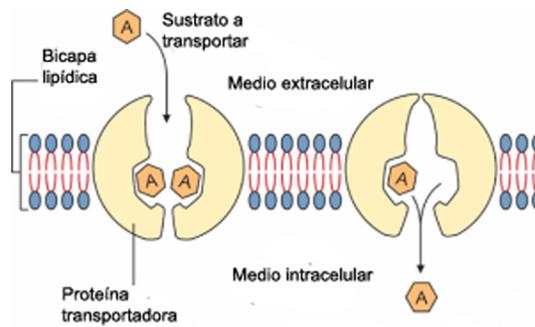


Figura 1. 7. Representación esquemática del proceso de transporte.

1. 4. Interacciones no covalentes.

Como ya se ha indicado previamente, las especies supramoleculares son el resultado de la unión de dos o más moléculas como consecuencia de una suma de diferentes interacciones intermoleculares, tanto atractivas como repulsivas. Éstas pueden ser direccionales, como los enlaces de hidrogeno y las interacciones π - π , o no direccionales, como las interacciones ión-ión o las fuerzas de van der Waals. En el siguiente apartado se describen algunas de las interacciones más comunes que se producen dentro del campo de la química supramolecular.

1. 4. 1. Interacciones ión-ión, ión dipolo y dipolo-dipolo.

Estas interacciones son el resultado de una atracción o repulsión electrostática entre dos iones cargados o moléculas que presentan un momento dipolar.

En el caso de las interacciones ión-ión, la atracción se produce entre un ión cargado positivamente y un ión cargado negativamente (figura 1. 8a). Un ejemplo de su importancia la podemos encontrar en las proteínas con grupos funcionales cargados en las cadenas laterales, ya que la interacción entre éstos (tanto atractiva como repulsivas) afecta o regula la conformación de la estructura secundaria y terciaria de la proteína.

Las interacciones ión-dipolo ocurren entre un ión y una molécula neutra que posee un momento dipolar que puede ser permanente o temporal (figura 1. 8b). Uno de los ejemplo más conocidos es el de la interacción de un ión alcalino con un éter corona.

Finalmente, las interacciones dipolo-dipolo se producen entre dos moléculas neutras que poseen momento dipolar (figura 1. 8c).²² Este tipo de interacciones son las responsables de las orientaciones de

cadenas hidrocarbonadas que se agregan para formar micelas o bicapas lipídicas.

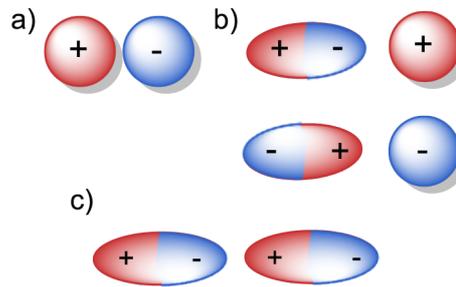


Figura 1. 8. Representación de las interacciones: a) ión-ión; b) ión-dipolo; c) dipolo-dipolo.

1. 4. 2. Enlaces de hidrógeno.

El enlace de hidrógeno es considerado como una interacción dipolo-dipolo particular en la que existe una interacción atractiva entre un átomo de hidrógeno de una molécula X-H, donde el átomo X es más electronegativo que H, y un átomo electrón-atrayente aceptor de enlaces de hidrogeno (A). En la figura 1. 9 se muestran diferentes tipos de enlaces de hidrógeno según la direccionalidad.

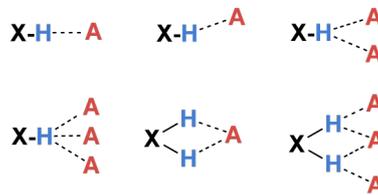


Figura 1. 9. Diferentes tipos de enlaces de hidrogeno según la direccionalidad.

Es importante destacar el rol de los enlaces de hidrógeno en multitud de procesos en el campo de la biología. Un ejemplo lo encontramos en la conformación tridimensional de doble hélice del

ADN, descubierta por Watson y Crick,²³ en la que las dos hebras se enlazan mediante múltiples enlaces de hidrógeno entre las bases nucleicas,²⁴ ayudando a la estabilización de la conformación B-ADN (figura 1. 10).

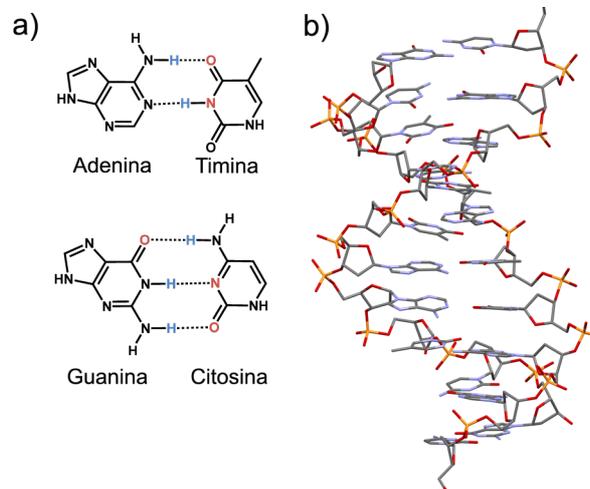


Figura 1. 10. a) Enlaces de hidrógeno que se forman entre las bases de ADN para formar la doble hélice; b) Estructura cristalina del B-ADN obtenida a partir de un decámero (PDB 1D49).

1. 4. 3. Enlace de coordinación.

Sus características se describen en la teoría de coordinación de Werner.⁴ En ésta se establece que los metales poseen una primera valencia ionizable y una segunda no ionizable. La segunda valencia puede ser completada por grupos neutros o iónicos, que se ordenan según una geometría definida alrededor del átomo central. A diferencia del enlace covalente, en el que cada uno de los átomos aporta un electrón al enlace, en éste participan dos electrones de un mismo átomo (dador) llamado ligando y los orbitales vacíos de un átomo metálico (aceptor).

El enlace de coordinación ha jugado un papel esencial en el desarrollo de la química supramolecular puesto que permite, al igual que los enlaces de hidrogeno, la formación de una gran variedad de agregados supramoleculares con un amplio abanico de aplicaciones.²⁵⁻²⁷ En la figura 1. 11 se muestra uno de los muchos ejemplos de enlaces de coordinación presentes en la biología. En ella se ilustra el grupo prostético hemo que se encuentra en algunas proteínas como la hemoglobina. Está constituido por cuatro anillos de pirrol y un átomo de Fe(II) situado en la cavidad central. Éste forma cuatro enlaces de coordinación con los átomos de N de los anillos de pirrol, de forma que se encuentran todos los átomos en el mismo plano. Un quinto átomo de N, perteneciente a un residuo de histidina, se coordina al Fe(II) por uno de los lados del plano.



Figura 1. 11. Estructura del grupo hemo.

Otro ejemplo, pero esta vez dirigido a la nanotecnología, es el que se representa en la figura 1. 12.²⁸ En este caso, se utiliza los enlaces de coordinación para construir materiales y dispositivos a escala molecular para el almacenamiento de información a partir de compuestos con transición de espín. El sistema, formado por cuatro átomos de Fe(II) coordinados cada uno de ellos a seis átomos de N de las unidades de pirimidina y bipyridina, es capaz de sufrir una transición de espín provocado por un cambio de presión, luz o temperatura.

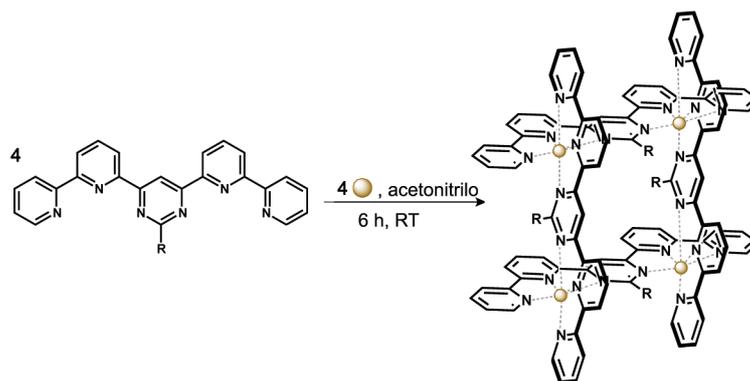


Figura 1. 12. Complejo supramolecular de Fe (II) [2x2].²⁸

1. 4. 4. Interacciones π .

Las interacciones π - π son aquellas que ocurren entre dos sistemas π , pudiendo ser atractivas o repulsivas. Las disposiciones que adoptan las superficies para una interacción atractiva son: cara-cara, en la que uno de las superficies está ligeramente desplazada con respecto a la otra, y la de forma de T (figuras 1. 13a y 1. 13b). Cuando los dos sistemas π se encuentran en una disposición cara-cara, las nubes de electrones se repelen y dan lugar a una interacción π - π repulsiva (figura 1. 13c).

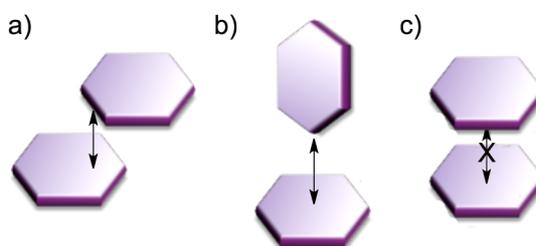


Figura 1. 13. Representación de la interacción atractiva entre dos superficies π : a) cara-cara; b) en forma de T; c) Interacción cara-cara repulsiva entre dos superficies π .

Un buen ejemplo para explicar las interacciones π - π es, una vez más, la molécula de ADN, en la que existen interacciones π - π entre las bases nucleicas al disponerse unas sobre otras, de forma que contribuyen a la estabilización de la estructura de doble hélice (figura 1. 14).²⁹

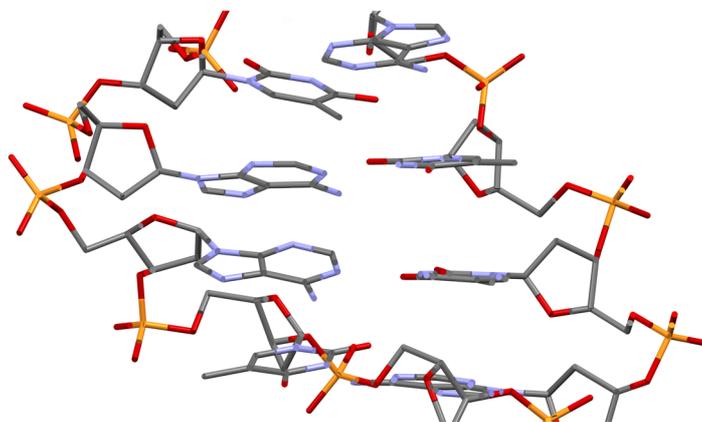


Figura 1. 14. Apilamiento de bases en el DNA (PDB 1D49).

Por otro lado, las interacciones catión- π son consideradas electrostáticas, con parte de componente de polarización. Es decir, los anillos aromáticos como el benceno poseen regiones cargadas negativamente debido a su momento cuadrupolar permanente y por tanto, pueden experimentar interacciones atractivas con cationes metálicos u orgánicos. Desde 1997, se ha demostrado que una gran variedad de receptores sintéticos pueden establecer interacciones catión- π , como es el caso de los ciclofanos o los éteres lariat en el reconocimiento molecular.³⁰⁻³² En la figura 1. 15 se muestra un ejemplo de interacción catión- π . En concreto, se trata de un éter lariat, en el que el ion Na^+ situado en la cavidad macrocíclica establece una interacción catión- π con el anillo aromático indol del brazo del éter lariat.

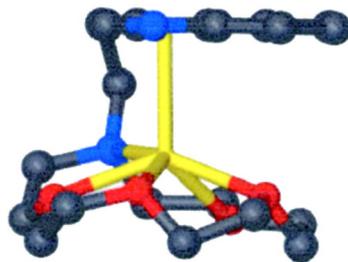


Figura 1. 15. Interacción cation- π entre un átomo de sodio y un anillo indol.³¹

También, existe la posibilidad de que se produzcan interacciones de tipo anión- π . Estas ocurren entre las superficies deficientes de electrones debido a la presencia de átomos electronegativos en el anillo, como es el caso del hexafluorobenceno, y un anión. En la figura 1. 16 se muestra un ejemplo de este tipo de interacción entre el anión hexafluorofosfato y los anillos de tetrazina.

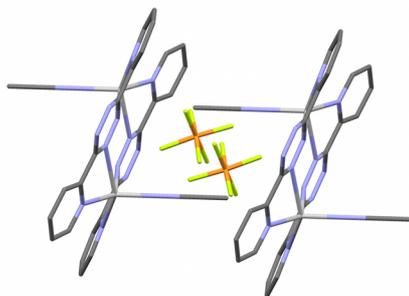


Figura 1. 16. Interacción entre los [PF₆]⁻ y los centros de los anillos de tetrazina del 3,6-bis(2'-pitidil)-1,2,4,5-tetrazina.³³

1. 4. 5. Fuerzas de van der Waals.

Son interacciones electrostáticas no direccionales que derivan de la polarización de una nube de electrones próximas a un núcleo adyacente. Su intensidad disminuye rápidamente con la distancia y es proporcional al área de contacto. Es un tipo de interacción aditiva al

resto de interacciones que se producen en la supermolécula de forma que contribuye a la energía global de interacción.

Las fuerzas de van der Waals son importantes en la inclusión de compuestos dentro de una red cristalina o cavidades moleculares como los calixarenos como el que se muestra en la figura 1. 17.

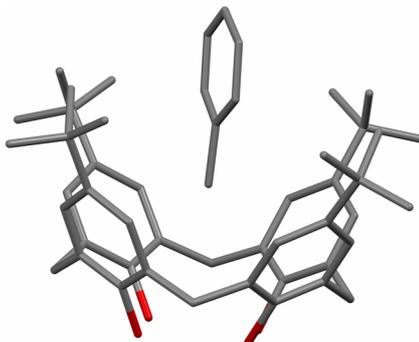


Figura 1. 17. Estructura cristalina de un complejo de inclusión estabilizado mediante fuerzas de van der Waals.³⁴

1. 4. 6. Efecto hidrófobo.

Es el efecto que se produce como consecuencia de la exclusión de moléculas de agua por parte de la asociación de moléculas apolares, tal y como se muestra en la figura 1. 18. Este efecto juega un papel muy importante en la creación y mantenimiento de estructuras proteicas y ácidos nucleicos, así como en el mantenimiento de las bicapas fosfolípidicas de las membranas celulares. Es también un efecto muy importante en el reconocimiento de moléculas orgánicas por calixarenos o ciclofanos en medio acuoso.³⁵

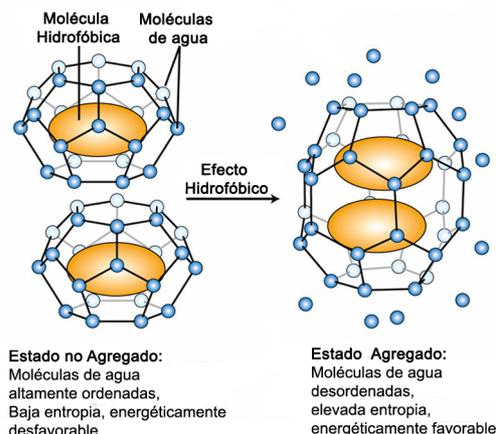


Figura 1. 18. Efecto hidrofóbico.

1. 5. Clasificación de receptores supramoleculares.

Durante las últimas décadas, el campo de la química supramolecular se ha expandido rápidamente, ampliando sus fronteras hacia la nanotecnología, cristales líquidos, geles, catálisis, etc. Como consecuencia, la variedad de receptores supramoleculares se ha incrementado de forma notable, por lo que es difícil hacer una clasificación global. Así pues, existe una clasificación de los compuestos supramoleculares en función del tipo de interacción con el sustrato, su estructura y la naturaleza y distribución en el espacio de los heteroátomos.^{36,37}

En este caso, hemos escogido una clasificación de los receptores agrupándolos en función de si son de cadena abierta, cíclicos o la combinación de ambos (figura 1. 19). A su vez, dentro de cada grupo, se pueden dividir en función de otro aspecto como es la naturaleza de los heteroátomos. Por ejemplo, aquellos receptores cíclicos sencillos que tienen como heteroátomos oxígenos tipo éter, pertenecen a la familia de los éteres corona, pero si en cambio tienen por

heteroátomos nitrógenos, entonces pertenecen a la familia de los azamacrociclos. Si a los éteres corona se le añade una cadena lineal en una de sus partes, entonces son conocidos como los éteres lariat, y si contiene al menos un anillo aromático en la estructura macrocíclica se consideran pertenecientes a la familia de los ciclofanos.

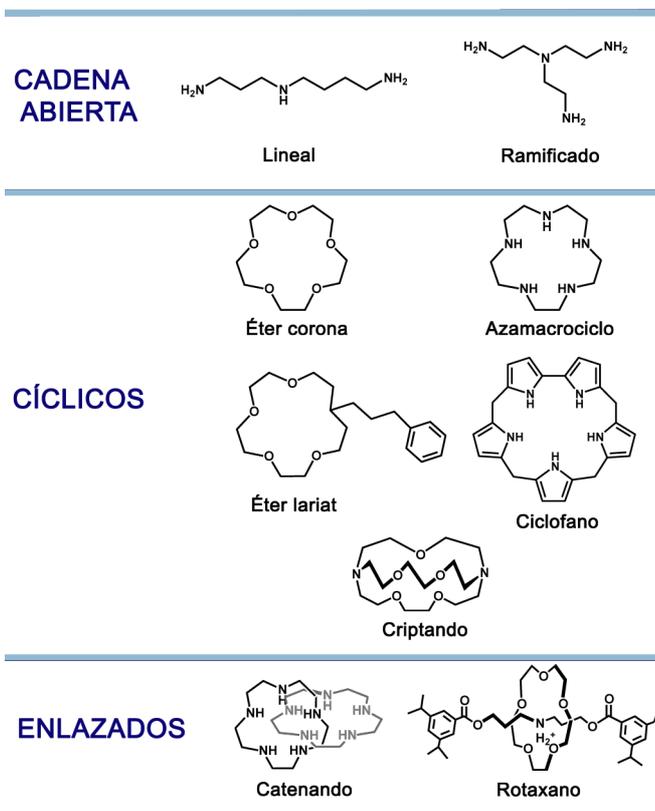


Figura 1. 19. Clasificación receptores supramoleculares.

En la presente tesis, hemos utilizado receptores pertenecientes a la familia de los azaciclofanos, es decir, ligandos cíclicos que contienen átomos de nitrógeno dadores y anillos aromáticos.

Este tipo de receptores, están asociados a muchos sistemas biológicos en forma de complejos metálicos como el complejo magnesio-clorina de la clorofila o hierro-porfirina del grupo hemo (figura 1. 20).

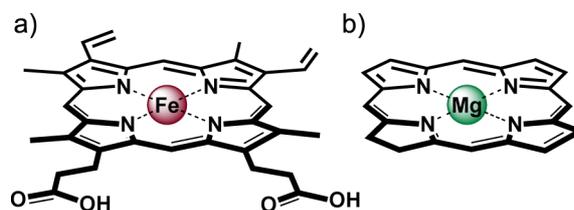


Figura 1. 20. Complejos: a) hierro-porfirina; b) magnesio-clorina.

Tomando como ejemplo algunos de estos sistemas, los químicos de la segunda mitad del siglo XX, enfocaron sus esfuerzos hacia la síntesis de azamacrociclos como modelos para entender sus propiedades químicas o ser utilizados como miméticos de sistema biológicos.

Aunque se realizaron con éxito numerosas síntesis de diversos azamacrociclos, no fue hasta 1980 cuando Koga y colaboradores³⁸ demostraron que el azaciclofano que se muestra en la figura 1. 21, en su forma protonada, era capaz de interaccionar con moléculas apolares, tanto en disolución acuosa como en estado sólido. Este trabajo fue clave para el desarrollo de los azaciclofanos como receptores sintéticos.

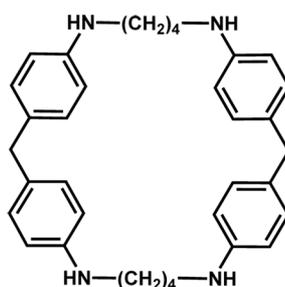


Figura 1. 21. Azamacrociclo sintetizado por Koga y colaboradores.

Si se analiza la estructura de la molécula, la presencia de átomos de nitrógeno en la cavidad macrocíclica confiere a este tipo de receptores propiedades interesantes como son la solubilidad en agua y el control del número de centros de interacción en función del pH del medio. La cadena poliamínica del receptor le aporta un carácter ambivalente, de forma que le permite interaccionar con cationes, con aniones o con moléculas neutras dependiendo del grado de protonación de sus grupos amino y el número de pares electrónicos solitarios disponibles. Si se compararan con sus análogos de tipo éter corona, que contienen oxígenos como átomos dadores, la presencia de los átomos de nitrógeno favorece la formación de complejos con algunos metales de transición puesto que, según el principio de Pearson, los nitrógenos son bases más blandas que los oxígenos y prefieren la interacción con ácidos más blandos como el cobre, cobalto, níquel, cinc o hierro. Este aspecto es importante desde el punto de vista de la síntesis de miméticos enzimáticos, ya que, algunos de estos metales forman parte del centro activo de muchos de los enzimas.

El grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia lleva trabajando en receptores poliamínicos y su interacción con metales y aniones de interés biomédico y medioambiental desde sus inicios en 1985. Durante estos años, se ha sintetizado una gran familia de receptores poliamínicos cíclicos [1+1],³⁹⁻⁴⁶ formados por una cadena poliamínica y un espaciador aromático, como el benceno o la piridina (figura 1. 22). La introducción de anillos aromáticos en los azamacrociclos aporta rigidez al receptor al mismo tiempo que un posible punto de unión para el reconocimiento de sustratos. Por su parte, las poliaminas son compuestos que se pueden modificar químicamente con relativa facilidad. Estos dos aspectos nos permiten

crear una gran abanico de receptores en los que se puede variar el tamaño, la flexibilidad y el número de átomos dadores.

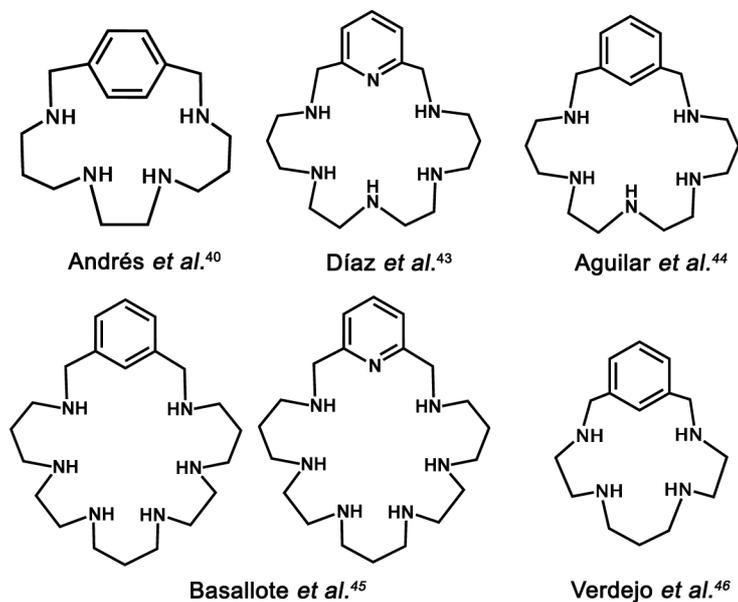


Figura 1. 22. Algunos de los azamacrociclos [1+1] sintetizados en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

En la presente memoria hemos utilizado este tipo de receptores para conseguir los tres objetivos que se plantean en los capítulos siguientes. En los dos primeros casos (Capítulos 5 y 6) hemos utilizados ligandos macrocíclicos, formados por cadenas poliamínicas y, como espaciadores aromáticos, anillos de piridina o pirazol, mientras que, en el capítulo 7 hemos utilizado ligandos macrocíclicos y sus análogos lineales. En la figura 1. 23 se muestran, todos los ligandos utilizados en la tesis.

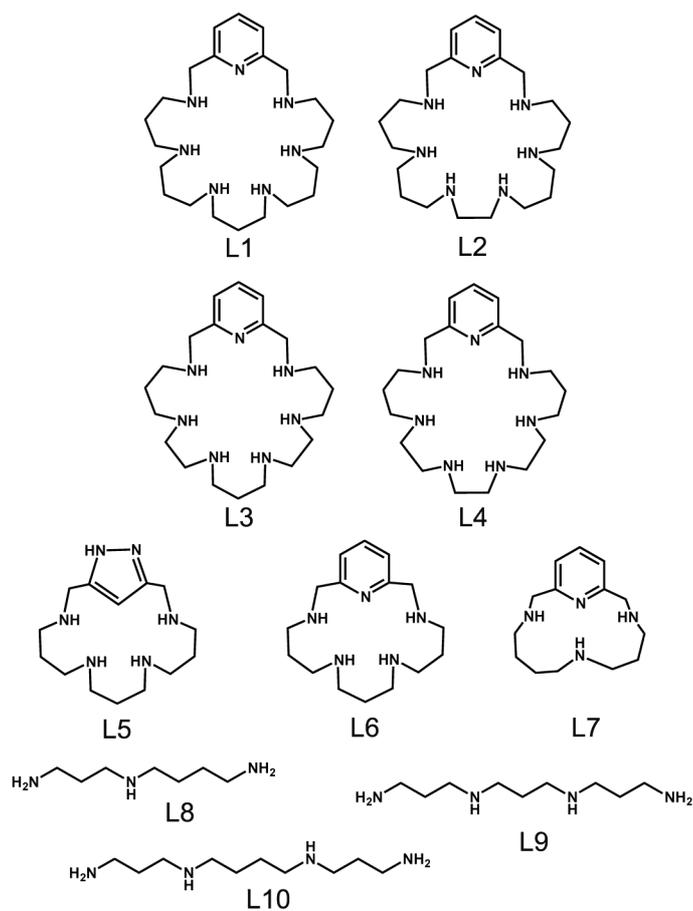


Figura 1. 23. Ligandos utilizados en la tesis.

Puesto que la nomenclatura IUPAC resulta poco manejable a la hora de describir los resultados, hemos optado por utilizar una nomenclatura convencional como L y la asignación de uno de los números en función de la aparición a lo largo de la tesis.

1. 6. Bibliografía

- (1) Lehn, J. M. *Supramolecular Chemistry*; VCH: Weinheim, 1995.
- (2) Lehn, J. M. *Pure and Applied Chemistry* **1978**, *50*, 871.
- (3) Villiers, A. H., C. R. *Seances Academie des Siences* **1891**, *112*.
- (4) Werner, A. *Zeitschrift für Anorganische Chemie* **1893**, *3*, 267.
- (5) Fisher, E. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **1894**, *27*.
- (6) Koshland, D. E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1958**, *44*, 98.
- (7) Ehrlich, P. *Studies in Immunity*; Wiley, New York, 1906.
- (8) Latimer, W. M.; Rodebush, W. H. *Journal of the American Chemical Society* **1920**, *42*, 1419.
- (9) Pedersen, C. J. *Journal of the American Chemical Society* **1967**, *89*, 7017.
- (10) Dietrich, B.; Lehn, J. M.; Sauvage, J. P.; Blanzat, J. *Tetrahedron* **1973**, *29*, 1629.
- (11) Cram, D. J.; Kaneda, T.; Helgeson, R. C.; Lein, G. M. *Journal of the American Chemical Society* **1979**, *101*, 6752.
- (12) Pedersen, C. J. *Angewandte Chemie-International Edition* **1988**, *27*, 1021.
- (13) Lehn, J. M. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1988**, *27*, 89.
- (14) Cram, D. J. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1988**, *27*, 1009.

- (15) Schneider, H. J.; Yatsimirsky, A. K. *Chemical Society Reviews* **2008**, *37*, 263.
- (16) Wolf, K. L.; Frahm, H.; Harms, H. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **1937**, *Abt. B 36*.
- (17) Lehn, J. M. *Science* **1993**, *260*, 1762.
- (18) Cram, D. J. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1986**, *25*, 1039.
- (19) Cabbines.Dk; Margerum, D. W. *Journal of the American Chemical Society* **1969**, *91*, 6540.
- (20) Schwarzenbach, G. *Helvetica Chimica Acta* **1952**, *35*, 2344.
- (21) Peretó, J.; Sendra, R.; Pamblanco, M.; Bañó, C. *Fonaments de Bioquímica*; Universitat de València, 1998.
- (22) Beer, P. D.; Gale, P. A.; Smith, D. K. *Supramolecular Chemistry*; Oxford Chemistry Primers, 1999.
- (23) Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, *171*, 737.
- (24) Pranata, J.; Wierschke, S. G.; Jorgensen, W. L. *Journal of the American Chemical Society* **1991**, *113*, 2810.
- (25) Leininger, S.; Olenyuk, B.; Stang, P. J. *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 853.
- (26) Saalfrank, R. W.; Maid, H.; Scheurer, A. *Angewandte Chemie-International Edition* **2008**, *47*, 8794.
- (27) Ariga, K.; Ito, H.; Hill, J. P.; Tsukube, H. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41*, 5800.

- (28) Breuning, E.; Ruben, M.; Lehn, J. M.; Renz, F.; García, Y.; Ksenofontov, V.; Gutlich, P.; Wegelius, E.; Rissanen, K. *Angewandte Chemie-International Edition* **2000**, *39*, 2504.
- (29) Kool, E. T. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2001**, *30*, 1.
- (30) Ma, J. C.; Dougherty, D. A. *Chemical Reviews* **1997**, *97*, 1303.
- (31) Hu, J. X.; Barbour, L. J.; Gokel, G. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 5121.
- (32) Hu, J. X.; Barbour, L. J.; Ferdani, R.; Gokel, G. W. *Chemical Communications* **2002**, 1806.
- (33) Schottel, B. L.; Chifotides, H. T.; Shatruk, M.; Chouai, A.; Perez, L. M.; Bacsá, J.; Dunbar, K. R. *Journal of the American Chemical Society* **2006**, *128*, 5895.
- (34) Enright, G. D.; Brouwer, E. B.; Udachin, K. A.; Ratcliffe, C. I.; Ripmeester, J. A. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* **2002**, *58*, 1032.
- (35) Southall, N. T.; Dill, K. A.; Haymet, A. D. J. *Journal of Physical Chemistry B* **2002**, *106*, 521.
- (36) Weber, E.; Vogtle, F. *Inorganica Chimica Acta-Letters* **1980**, *45*, L65.
- (37) Weber, E.; Josel, H.-P. *Journal of Inclusion Phenomena* **1983**, *1*, 79.
- (38) Odashima, K.; Itai, A.; Iitaka, Y.; Koga, K. *Journal of the American Chemical Society* **1980**, *102*, 2504.
- (39) Andrés, A.; Burguete, M. I.; García-España, E.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Soriano, C. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* **1993**, 749.

- (40) Andrés, A.; Bazzicaluppi, C.; Bianchi, A.; García-España, E.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Ramirez, J. A. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1994**, 2995.
- (41) Bencini, A.; Burguete, M. I.; García-España, E.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Soriano, C. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 4749.
- (42) Aguilar, J. A.; García-España, E.; Guerrero, J. A.; Luis, S. V.; Llinares, J. M.; Ramirez, J. A.; Soriano, C. *Inorganica Chimica Acta* **1996**, *246*, 287.
- (43) Díaz, P.; Basallote, M. G.; Manez, M. A.; García-España, E.; Gil, L.; Latorre, J.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Luis, S. V. *Dalton Transactions* **2003**, 1186.
- (44) Aguilar, J.; Basallote, M. G.; Gil, L.; Hernández, J. C.; Mañez, M. A.; García-España, E.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Dalton Transactions* **2004**, 94.
- (45) Basallote, M. G.; Doménech, A.; Ferrer, A.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Mañez, M. A.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorganica Chimica Acta* **2006**, *359*, 2004.
- (46) Verdejo, B.; Basallote, M. G.; Ferrer, A.; Mañez, M. A.; Hernandez, J. C.; Chadim, M.; Hodacova, J.; Llinares, J. M.; Soriano, C.; García-España, E. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2008**, 1497.

Capítulo 2

Objetivos.

El trabajo recopilado durante estos años se ha dividido en tres partes con sus respectivos objetivos. No obstante, todo el trabajo está englobado dentro de la rama de la química que se fundamenta en las interacciones no covalentes o química supramolecular y tiene en común, el uso de receptores o ligandos poliamínicos. Por tanto, a estos tres objetivos se debe añadir la síntesis y caracterización de los ligandos. A continuación se describen los cuatros objetivos principales del trabajo.

2. 1. Síntesis y caracterización de ligandos poliamínicos. (Capítulo 4)

Para el desarrollo de los trabajos hemos sintetizado y caracterizado un familia de ligandos poliamínicos. Estos ligandos, [1+1], están formados por una cadena poliamínica unida a un espaciador aromático. Como espaciador aromático se han utilizado unidades de piridina o pirazol y las cadenas poliamínicas varían en el número de grupos amino y el número de átomos de carbono que los separa.

2. 2. Miméticos enzimáticos de la Cu,Zn Superóxido dismutasa. (Capítulo 5)

El objetivo de esta parte del trabajo es el estudio de la formación de complejos binucleares de Cu(II) y Zn(II) con ligandos poliamínicos y su

capacidad para dismutar al anion superóxido como miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD.

2. 3. Complejos de Cu(II) con un Azamacrociclo [1+1] de 1*H*-pirazol. Fijación de CO₂. (Capítulo 6)

En este capítulo de tesis se describe por, primera vez, el comportamiento y las propiedades de los complejos de Cu(II) que forma un nuevo ligando poliamínico [1+1] en el que se ha incorporado el anillo de pirazol como espaciador aromático.¹

La introducción del anillo de pirazol en este tipo de ligandos, aporta propiedades muy diferentes a las de sus análogos con anillos de piridina o benceno. Éste es capaz de formar complejos metálicos de Cu(II) muy diferentes a los de su análogo de piridina con posibles aplicaciones medioambientales. El estudio de su formación y propiedades, en estado sólido y disolución, son los principales objetivos de este capítulo.

2. 4. Aumento de la eficacia de gelación del GMP. (Capítulo 7)

El principal objetivo que se plantea en esta parte del trabajo es aumentar la eficacia del 5'-guanosina monofosfato (GMP) como gelador. Es decir, formar geles a temperatura ambiente y a concentraciones de GMP inferiores a las que generalmente se necesitan. La primera razón es porque permitirá ampliar su intervalo de aplicaciones y la segunda es por la relación estructural que guardan los geles con el genoma de las células eucariotas.

Chapter 3

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the European Doctorate.

Atención: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del Doctorado Europeo.

Material and methods.

3. 1. Potentiometric measurements.

Potentiometric studies were carried out using a potentiometer controlled by a Pentium Dual-Core E5300 personal computer.¹ The burette control and data acquisition were performed with the computer program PASAT.²

The glass electrode was calibrated previously to each titration. The calibration was done as a hydrogen-ion concentration probe by titration of standardized amounts of HCl with CO₂-free NaOH solution. The equivalent point was determined by the Gran's method,^{3,4} which gives the standard potential, E° , and the ionic product of water ($pK_w = 13.73(1)$). A Wilhelm bridge filled with 0.5 M NaCl was used to separate the glass electrode (Crison 52 50 Ag/AgCl) and the reference electrode (Crison 52 40 Ag/AgCl in 0.5 M NaCl solution).

Potentiometric titrations were carried out at 298.1 ± 0.1 K using NaClO₄ 0.15 M as supporting electrolyte and under an Ar atmosphere. The pH range investigated was 2.5-11.0 and the metal ions and ligands concentrations ranged from 1×10^{-3} to 5×10^{-3} M with M:L molar ratios varying from 2 : 1 to 1 : 2. Known concentrations of metal solutions were used to perform the titrations (Cu(ClO₄)₂ · 6H₂O 0.1075 M and Zn(ClO₄)₂ 0.0997 M).

HYPERQUAD program was used to fit the protonation and stability constants.⁵ The different titration curves for each system were treated as separated curves. When more than one model fits the experimental data, the most reliable chemical model was chosen by performing *F* tests at the 0.05 confidence level.^{6,7} Finally, the sets of data were merged together and treated simultaneously to give the final stability constants. HySS programme was used to plot the distribution diagrams of species.⁸

3. 2. Nuclear Magnetic Resonance measurements.

Appropriate deuterated solvents were used to acquire the NMR experiments. Synthetic compounds were characterised by NMR using a Bruker Advance DPX 300 MHz and Bruker Advance DPX 400 MHz spectrometers (SCSIE, UV) operating at 299.95 MHz and 399.95 MHz for ¹H and at 75.43 MHz and 100.58 MHz for ¹³C, respectively. Mnova NMR 9.0 software was used for data processing and visualisation.

Tert-butyl alcohol was used as a reference standard for the NMR titration studies (**L5** receptor, chapter 6) ($\delta = 1.24$ ppm for ¹H and $\delta = 70.36$ ppm for ¹³C). Adjustments to the desired pH were done using drops of DCl or NaOD solutions. The pD was calculated from the measured pH values using the correlation, $\text{pH} = \text{pD} - 0.4$.⁹

The paramagnetic NMR measurements were acquired using a Bruker Avance 400 spectrometer (SCSIE, UV). 1D-spectra were recorded in D₂O with solvent signal presaturation during part of the relaxation delay.¹⁰ Sample concentrations of Cu₂**L1** and Cu₂**L1**(Im) systems were 3×10^{-3} M. Longitudinal relaxation times (*T*₁) values were calculated from the inversion-recovery equation and transversal relaxation times were obtained measuring the line broadening of the

isotropically shifted signals at half-height through the equation $T_2^{-1} = \pi\Delta\nu_{1/2}$.¹¹

Gel measurements were carried out with a 400 MHz Varian Inova instrument (NMR group, University of Manchester). Samples were prepared in D₂O, using DCl and NaOD to fix the pH, and TSP was used as a chemical shift reference. Spectra processing were performed using the standard instrument software Vnmr6.1C.

3. 3. Electrochemistry measurements.

Cu(II)-L and Cu(II)-Zn(II)-L systems were studied by cyclic voltammetry in the 3.4-10.0 pH range. Concentrations of L solutions were *ca.* 1×10^{-3} M and 0.15 M NaClO₄ solution was used as a supporting electrolyte. pH required value was adjusted by adding the appropriate amounts of HClO₄ and/or NaOH.

Voltammograms were obtained under argon atmosphere in a three-electrode cell with: glassy carbon working electrodes, platinum wire auxiliary electrode and AgCl (3 M NaCl)/Ag reference electrode, using a CH I660 equipment (available in Dr. A. Doménech laboratory at the Analytical Department, UV).

3. 4. C,H,N analysis.

C,H,N elemental analysis of synthesised compounds were done in a EA1108 CHNS-O Carlo-Elba equipment (SCSIE, UV).

3. 5. X-Ray Analysis.

$[\text{CuH}_4\text{L2}(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (**CS1**) were obtained by slow evaporation of solutions containing **L2** and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in a 1:1 Cu(II):L molar ratio at pH 4.

$[\text{CuL6}](\text{ClO}_4)_2$ (**CS2**). Crystals of **CS2** were obtained by slow evaporation of an aqueous solution containing $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{L6} \cdot 4\text{HBr} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ at pH 8 with an excess of NaClO_4 in a 1:1 molar ratio. Anal Calcd. for: $\text{C}_{16}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{CuN}_5\text{O}_8$: C, 34.78; H, 5.29; N, 12.68. Found: C, 34.9; H, 5.6; N, 12.7.

$[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75\text{H}_2\text{O}$ (**CS3**). Crystals of **CS3** were grown by slow evaporation of aqueous solutions containing $\text{L5} \cdot 4\text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1:1 mole ratio at pH 9 in an open vessel. After several days, blue crystals of **CS3** suitable for X-ray diffraction were obtained. Anal Calcd. for: $\text{C}_{28}\text{H}_{62.5}\text{Cl}_3\text{Cu}_2\text{N}_{12}\text{O}_{15.75}$: C, 31.94; H, 5.98; N, 15.96. Found: C, 31.8; H, 6.1; N, 15.8.

$[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))_{0.5}(\text{H}_1\text{L5})_{1.5}]_2 (\text{ClO}_4)_3\text{Br}_2 \cdot 4.2\text{H}_2\text{O}$ (**CS4**). Crystals of **CS4** were obtained as those of **CS3** but at initial pH of 10. Anal Calcd. for: Anal Calcd. for $\text{C}_{56}\text{H}_{117.4}\text{Br}_2\text{Cl}_3\text{Cu}_4\text{N}_{24}\text{O}_{16.2}$: C, 35.27; H, 6.20; N, 17.63. Found: C, 35.5; H, 6.2; N, 17.6.

$[\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**CS5**). Crystals of **CS5** were grown by slow evaporation of aqueous solutions containing $\text{L5} \cdot 4\text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$ and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 2:3 mole ratio at pH 9 in an open vessel. After several days, blue crystals suitable for X-ray diffraction were obtained. Anal Calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{72}\text{Cl}_2\text{Cu}_3\text{N}_{12}\text{O}_{20}$: C, 29.75; H, 6.20; N, 14.35. Found: C, 29.8; H, 6.3; N, 14.3.

Single crystals of **CS1** and **CS2** were measured in an Enraf Nonius Kappa CCD diffractometer (SCSIE, UV) using MoKa radiation at 293 K and 120 K respectively and single crystals of **CS3**, **CS4** and **CS5**

were measured in an Oxford diffraction Supernova diffractometer (ICMol, UV) using MoK α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) at 293 K and 120 K respectively.

Structures were solved by direct methods using SIR97¹² and refined by full-matrix least-squares on all F² using SHELXL97^{13,14} with the WinGX suite.¹⁵ The non-hydrogen atoms were refined anisotropically and hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined using a riding model. Tables A. 5. 1 and A. 6. 1 summarizes crystal data and final refinement parameters. Hydrogen bonds have been analyzed with SHELXL97.^{13,14} Molecular drawings were produced with the MERCURY program.¹⁶

3. 6. Magnetic susceptibility measurements.

Magnetic susceptibility measurements on polycrystalline samples of compound [Cu₂(H(H-1L5))(H-1L5)](ClO₄)₃·3.75H₂O were carried out in the 1.9-300.0 K temperature range with a Quantum Design SQUID magnetometer (ICMol, UV) under an applied magnetic field of 5000 G. The experimental data were corrected for the diamagnetic contributions of the constituent atoms and the sample holder as well as for the temperature-independent paramagnetism of the Cu(II) ion ($60 \times 10^{-6} \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$).

3. 7. Spectrometric measurements.

Synthesized compounds were characterized by mass spectrometry in an ESQUIRE 3000 PLUS Ion Trap mass spectrometer (SCSIE, UV) attached to an AGILENT 1100 (HPLC-MS) high-performance liquid chromatograph.

HR-ESI mass spectra of solutions (water/methanol 50/50 vol/vol) containing **L5** and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 1:1 and 2:3 molar ratio were acquired in the positive ion mode using a Triple TOF 5600 hybrid quadrupole time-of-flight (TOF) mass spectrometer (SCSIE, UV). N_2 was used as a curtain and nebulizing gas. The experiments were performed at a voltage of 5300 V and GS1 and GS2 (35 psi) ion source gas at 723.15 K. The AB SCIEX Peak View software was used for the analysis of the data.

3. 8. Spectroscopic measurements.

Spectra of the samples containing the ligand and the complexes in 1:1, 2:2 and 3:2 (Cu(II):L) molar ratio (1×10^{-3} M) were recorded in an Agilent 8453 spectrometer UV-vis at 293.15 K. pH values were adjusted using HCl and NaOH concentrated solution.

3. 9. Electron paramagnetic resonance measurements.

EPR spectra of Cu(II):**L5** system, in 1:1 molar ratio, were recorded at pH 2.3, 3.8, 5.5, 7.5, 9.5 and 11 in water: Ethylene glycol (30%) ($[\text{Cu}(\text{II})] = 1 \times 10^{-3}$ M). The pH values of solutions were adjusted with HCl and NaOH concentrated solutions.

X-band EPR spectra ($\nu = 9.47$ GHz) of the frozen-matrix aqueous solutions were recorded in non-saturating conditions on a Bruker ER 200 D spectrometer (ICMol, UV) equipped with a helium cryostat at 77 K.

3. 10. Rheology measurements.

Rheology experiments were performed using a TA Instrument Advanced Rheometer 2000 (Soft matter centre, University of Durham). A parallel-rough-plate geometry (40 mm) was used with a gap of 1 mm and 1 mL sample in each case. Samples were prepared pouring the melted gels into a 40 mm cylindrical block and leaving for 15 minutes to gel formation. Oscillatory stress sweep measurements were performed over a range of 0.01-10000 Pa with a constant frequency value of 1 Hz.

Rheometer was controlled by Rheology Advantage Instrument control (v5.8.2) programme and the analysis of the data was carried on by Rheology Advantage Data Analysis (v5.7.0) programme.

3. 11. Scanning electron microscopy analysis.

Gels morphology were explored with a S-4800 (HITACHI) scanning electronic microscope (SCSIE, UV) with a spotlight of field emission (FEG) with a resolution of 1.4 nm at 1 kV. Pictures of samples were taken at 8000 μm work distance and using a current emission of 10100 nA. Images were acquired with QUANTAX 400 programme.

Samples for SEM were prepared using critical point drying. This method allows to dry wet samples without collapsing or deforming the structure. In order to carry out the procedure, water was replaced by ethanol and then, ethanol was replaced with liquid CO_2 operating at critical point of CO_2 (approx 32 $^\circ\text{C}$ and 72 atm.). Finally samples were sputter-coated with Au/Pd.

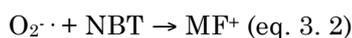
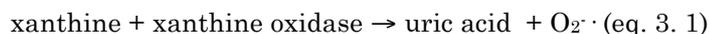
3. 12. Wide Angle X-ray scattering measurements.

WAXS measurements were performed on a Bruker GADDS D8 WAXS machine (Research Equipment, University of Durham), with cross-coupled Gobel mirrors and pin-hole collimation for point focus geometry, using a sealed tube X-ray source operated at 30 kV and 10 mA to produce Cu K α radiation of wavelength 1.54 Å. The WAXS camera was fitted with a Hi-star 2D detector (effective pixel size 100 μ m).

3. 13. Superoxide dismutase activity assay.

Superoxide dismutase activity of the Cu₂L, CuZnL, CuL(Im) and CuZnL(Im) systems was tested according to a modification of the xanthine/xanthine oxidase nitroblue tetrazolium assay.¹⁷⁻¹⁹ The assay was performed at pH 7.4 (50 mM HEPES buffer) in an Agilent 8453 spectrometer UV-vis at 293.15 K.

Reduction of xanthine into uric acid by xanthine oxidase provides a source of superoxide. Nitroblue tetrazolium (NBT) acts as superoxide detecting agent through its reduction to blue formazane (MF⁺). Therefore, kinetics of reduction reaction of NBT to MF⁺ was monitored through the absorbance changes at 560 nm.



In the presence of metal complexes, a competition reaction for the superoxide anion will take place at the same time.



If the tested complex has the ability to disproportionate the superoxide anion to molecular oxygen and hydrogen peroxide, the superoxide concentration will decrease and as a consequence of the formation MF^+ . This fact will be reflected in the absorbance recorded at 560 nm.

The effect of the Cu(II) complexes on the NBT reduction rates was evaluated by adding 100 μL of each complexes solution (0.05-100 μM in TRIS) to 800 μL of NBT (2.24 mM) and xanthine (1.8 mM) mixture in HEPES. The reaction was started by addition 100 μL of xanthine oxidase (1/20 v/v in HEPES) and the absorbance was monitored during 2 minutes.

The IC_{50} value was obtained fixing the complexes and the blank threefold kinetic data by version 0.3 superSod program.²⁰ The catalytic constant was estimated from the IC_{50} value using the following equation:

$$k_{cat} = k_{NBT} \cdot [NBT] / IC_{50} \text{ (eq. 3. 5)}$$

where, $k_{NBT} = 5.94 \pm 0.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}$.

3. 14. Toxicity assays.

The possible cytotoxicity of the complexes tested in the SOD assay was determined by means of the trypan blue dye exclusion assay.²¹ Several aliquots of Polymorphonuclear Leukocytes (PMNL) suspension were exposed to 1 μM of a solution of the complex tested. After 15 minutes of incubation, the dye was applied and the viable cells were counted and compared with a blank that contained the buffer used.

3. 15. Chemiluminescence in PNML SOD activity assays.

Superoxide dismutase activity of the Cu₂L, CuZnL, CuL(Im) and CuZnL(Im) systems was also tested by measuring the inhibition of the luminescence of polymorphonuclear leukocytes (Pharmacology department, UV).^{22,23} The basis of the assay are similar to the NBT assays. Leukocytes were used as a source of superoxide anion and luminol as a detecting agent.

TPA stimulates leukocytes to produce superoxide anion. Luminol is oxidised by superoxide into an excited intermediate product. The decay of it, to a lower energy level, is responsible for the emission of photons of light that are measured with a standard luminometer. If the tested complex has the ability to dismutate the superoxide anion the superoxide concentration will decrease and, as a consequence the luminescence.

The SOD activity of the Cu(II) complexes was evaluated in HBSS buffer (pH=7.4) mixing 2.5 µL of each complexes solution (1-1000 µM), 2.5 µL of luminol (1 mM), 250 µL of PMNL suspension (2.5 x 10⁶ cells/mL) and 10 µL of TPA (25 µM).

Luminescence inhibition was calculated using the equation 3. 6

$$I_i = \frac{C - P_i}{C - B} \quad \text{eq 3. 6}$$

Where C, B and P_i refer to the arithmetic values obtained for control (no TPA and Cu(II) complex were added), Blank (no complex was added) and complex to be tested.

3. 16. Gel sample preparation.

Gel formation was carried out weighting the appropriated amount of hydrobromide/chloride polyamine salt in a vial and adding 1mL of a 30 mM of guanosine 5'-monophosphate disodium salt solution. The pH was fixed to 5 adding concentrate HCl and NaOH solutions. Then it was sonicated and heated until the solid becomes in to a solution. The sample was cooled at room temperature and was tested for gelation by "*inversion test*".

3. 17. Tgel determination.

Tgel was determined by the "*drop ball method*". A glass ball weighting 256 mg was placed over the gel surface (2mL) and was heated gradually (1 °C per 5 min) in a water bath. Once the ball falls into the bottom of the test tube, the temperature was read as dissociation gel temperature (*Tgel*).

3. 18. References.

- (1) García-España, E.; Ballester, M. J.; Lloret, F.; Moratal, J. M.; Faus, J.; Bianchi, A. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transaction* **1988**, 101.
- (2) Fontanelli, M.; Micheloni, M. Castellón, Spain, 1990.
- (3) Gran, G. *Analyst* **1952**, *77*, 661.
- (4) Rossotti, F. J.; Rossotti, H. *Journal of Chemical Education* **1965**, *42*, 375.
- (5) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739.
- (6) Bologni, L.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Inorganica Chimica Acta-Articles* **1983**, *69*, 71.
- (7) Hamilton, W. C. *Statistics in physical science. Estimation, hypothesis testing, and least squares*; New York: Ronald Pres, 1964.
- (8) Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, *184*, 311.
- (9) Covington, A.; Paabo, M.; Robinson, R. A.; Bates, R. G. *Analytical Chemistry* **1968**, *40*, 700.
- (10) Inubushi, T.; Becker, E. D. *Journal of Magnetic Resonance* **1983**, *51*, 128.
- (11) Vold, R. L.; Waugh, J. S.; Klein, M. P.; Phelps, D. E. *Journal of Chemical Physics* **1968**, *48*, 3831.
- (12) Altomare, A.; Burla, M. C.; Camalli, M.; Cascarano, G. L.; Giacovazzo, C.; Guagliardi, A.; Moliterni, A. G. G.; Polidori, G.; Spagna, R. *Journal of Applied Crystallography* **1999**, *32*, 115.
- (13) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallographica Section A* **2008**, *64*, 112.

- (14) Sheldrick, G. M. Institut für Anorganische Chemie der Universität, Göttingen, Germany 1993.
- (15) Farrugia, L. J. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography 1999.
- (16) Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; E. Pidcock; Rodriguez-Monge, L.; Taylor, R.; Streek, J. v. d.; Wood, P. A. 2008.
- (17) Zhou, J. Y.; Prognon, P. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2006**, *40*, 1143.
- (18) Oberley, L. W.; Spitz, D. R. *Handbook of Methods of Oxygen Radicals Research*; CRC Press, Boca Raton, USA, 1986.
- (19) Beaucham, C.; Fridovic, I. *Analytical Biochemistry* **1971**, *44*, 276.
- (20) Blasco, S.; Supersod v 0.3 ed. 2010.
- (21) Knoll-Kohler, E.; Stiebel, J. *European Journal Oral Sciences* **2002**, *110*, 296.
- (22) Halstensen, A.; Haneberg, B.; Glette, J.; Sandberg, S.; Solberg, C. O. *Journal of Immunological Methods* **1986**, *88*, 121.
- (23) Ginsburg, I.; Misgav, R.; Gibbs, D. F.; Varani, J.; Kohen, R. *Inflammation* **1993**, *17*, 227.

Chapter 4

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the European Doctorate.

Atención: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del Doctorado Europeo.

Azacyclophanes: Nomenclature and Synthesis.

4. 1. Nomenclature of Azacyclophanes.

The nomenclature of the supramolecular receptors is, often, difficult and complex. Several times, scientists had used shorthand names or abbreviations to name them, but it can be ambiguous as is shown in figure 4. 1. The term [14]aneN₄, is used to name the macrocycle cyclam, where [14] makes reference to the number of atoms that constitutes the macrocycle, *ane* to the fact that the molecule is saturated and N₄ to the number and type of donor atoms. Nonetheless, this term does not differentiate between isomers and is also used to name its isomer isocyclam.

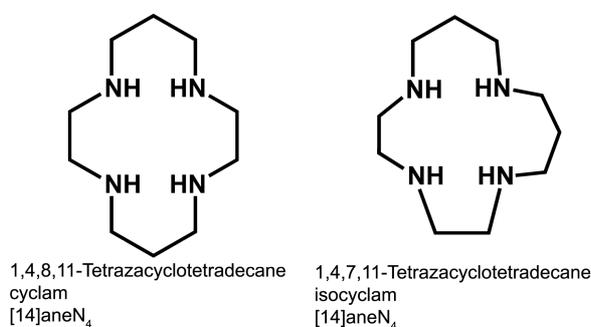


Figure 4. 1. Cyclam and isocyclam.

Therefore, the IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) has created a series of rules to name cyclophanes¹ in a simplified form (figure 4. 2).¹ Each aromatic ring is considered to be a single atom, called superatom, and the macrocycle is reduced to a relatively simple aliphatic skeleton, which is named replacing the ending *-ne* by *-phane*. The superatom positions are then indicated taking into account the ring position and named as a prefix, using the corresponding arene name by replacing the ending *-e* by *-a* (e.g bencena, pyridina).

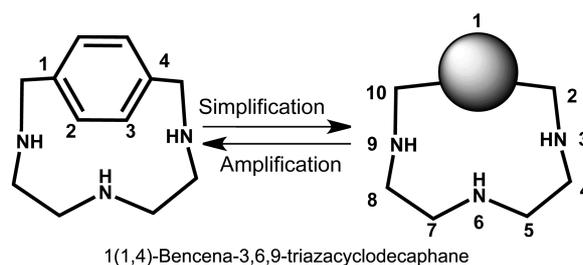


Figure 4. 2. Amplification and simplification scheme.

For these reasons, the UPAC rules to name cyclophanes has been used to name both final and intermediated compounds of the present work.

4. 2. Synthesis of azamacrocycles.

Azamacrocycles synthesis usually involves an intermolecular reaction between at least two molecular moieties each of which contains appropriate reactive groups. There are many different routes to achieve the cyclisation (figure 4. 2), but they can be arranged

¹ Cyclophane refers to a macrocycle which, at least contains an aromatic ring and an aliphatic chain of one carbon.

into two main categories: (a) direct synthesis by conventional organic reactions and (b) metal ion-promoted reactions.²⁻⁵

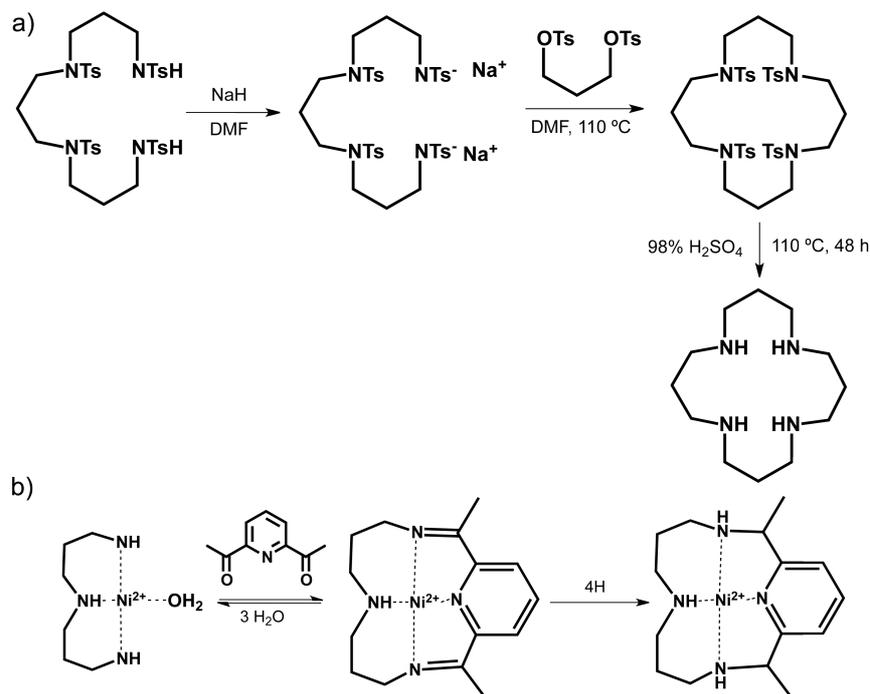


Figure 4. 3. Two different routes to synthesis azamacrocycles.

Richman and Atkins⁶ proposed, in 1974, one of the most employed organic routes to synthesise azamacrocycles (figure 4. 3a). The method uses converted primary amines into sulphonamides to close the ring with a complementary reactant. The tosyl group increases the acidity of the primary amino groups so that can be easily deprotonated to form more reactive species, while protects the secondary amino groups from further reactions. The cyclisation takes place through nucleophilic substitution between the deprotonated tosylamine and a complementary reactant with good leaving groups. The removal of tosyl groups requires drastic conditions.

In case of metal ion-promoted or template effect, the cyclisation takes place through Schiff base condensation of a polyamine-metal complex and a carbonyl group such as a keton or a carbaldehyde group. A typical template cyclisation is shown in the scheme of figure 4. 3b. The Ni(II)-polyamine complex adopts a square-planar geometry with the three amino groups and a molecule of water, which is then replaced by the N atom of the pyridine. This fact brings the carbonyl groups close to the primary amino groups and the reaction takes place. The resultant imine groups can be converted into amino groups using conventional reducers such as NaBH₄ or H₂ in presence of a catalyst.

The macrocycles of this work have been obtained using a modified Richman-Atkins procedure.⁸ The general synthetic route is shown in figure 4. 4 and comprises three steps: (1) protection of the amino groups, (2) cyclisation, where the protected primary amines are linked to an aromatic spacer, and (3) removal of the protective groups. The protection of the amino groups is performed adding drop-wise a tosyl chloride solution in THF over a basic solution that contains the desired polyamine. The tosylated precursor reacts with the corresponding bis(bromomethyl) or bis(chloromethyl) arene in dry acetonitrile under an argon atmosphere and in the presence of base to give the macrocycle. In the present work we have used as spacer 1*H*-3,5-bis-(chloromethyl)pyrazole or 2,6-bis(bromomethyl)pyridine rings, which confer rigidity and play a special role in the coordination modes of the substrates. Hot concentrated sulphuric acid (98%) was used originally to remove the protecting groups, but the drastic conditions suffer from a decrease in yields. Nowadays is more used a mixture of HBr/acetic acid and phenol⁷ to obtain the polyazamacrocycle as hydrobromide salt.

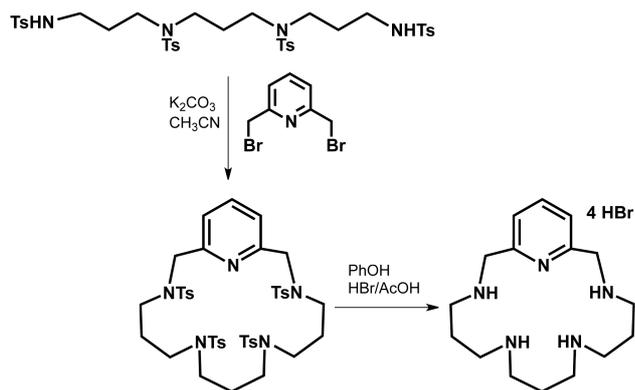


Figure 4. 4. General synthetic route used in the present work.

In the case of the macrocyclic receptor that contains a pyrazole unit, some previous modifications must be done in the pyrazole precursor before the cyclisation reaction takes place. *1H*-3,5-bis-(chlorometil)pyrazole was prepared from *1H*-3,5-pyrazoledicarboxylate in a three step procedure. The esterification in ethanol is the first step, followed by reduction with di(isobutyl)aluminium (DIBAL) to obtain the diol and then treatment with thionyl chloride.⁹ To avoid side reactions in the cyclisation process, it was necessary to protect the nucleophilic NH group of pyrazole by reaction with 3,4-dihydropyran in CH_2Cl_2 (figure 4. 5).¹⁰

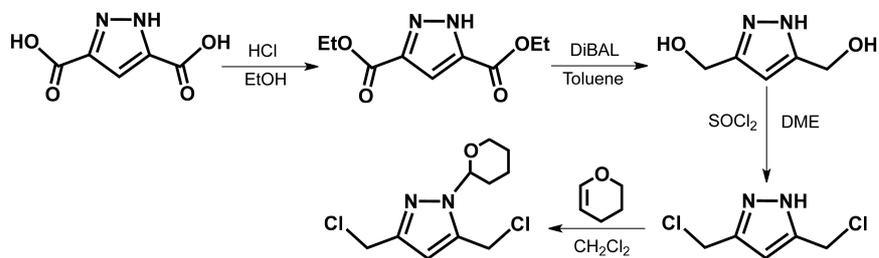


Figure 4. 5. Synthesis of pyrazole precursor.

Furthermore, to synthesise azacyclophanes with more amino groups and larger cavity, like in case of **L1**, the polyamine precursor

was enlarged with N-(3-bromopropyl)phthalimide in the presence of K_2CO_3 . Then, the phthalimide groups were removed with hydrazine monohydrate and the terminal primary amines were protected again with tosyl group prior the cyclisation reaction (figure 4. 6).

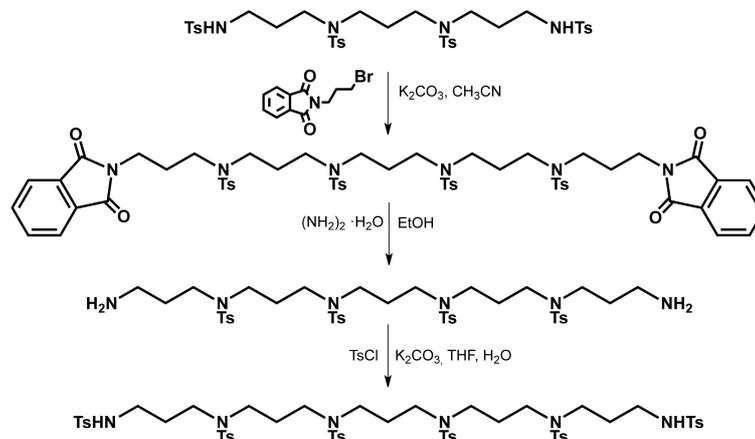


Figure 4. 6. General synthetic route to enlarged polyamines.

4. 3. General procedures.

4. 3. 1. Amino group protection with tosyl group.

The commercial polyamine (53.1 mmol) dissolved in 400 mL of THF and K_2CO_3 (3 equiv. per amino group) dissolved in 100 mL of water were placed in a round-bottom flask provided with mechanical stirring. Then, a solution of *p*-tolylsulfonyl chloride (1.2 equiv. per amino group) in 100 mL of THF was dropwise added over 1 h. The solution was kept under stirring for one day. The organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness. The residue was suspended in ethanol and refluxed during two hours. The white solid was filtrated and washed exhaustively with ethanol.

4. 3. 2. Cyclisation.

The protected polyamine (3.29 mmol) and K_2CO_3 (32.9 mmol) were suspended in CH_3CN (250 mL). The corresponding aromatic spacer (3.29 mmol) dissolved in 150 mL of CH_3CN was added dropwise over 2 h to the mixture. The suspension was refluxed for further 20 h and then filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness. Purification was achieved by column chromatography (silica gel, chloroform/acetone = 25/1)

4. 3. 3. Removal of tosyl and tetrahydropyran-2-yl groups.

The cyclic polyamine (1.19 mmol) and phenol (10 equiv. per protective group) were suspended in HBr-AcOH 33% (250 mL). The mixture was stirred at 90 °C for 12 h and then cooled. The resulting residue was filtered off and washed several times with dry ethanol to give the product as its hydrobromide salt.

4. 3. 4. Lengthening of lineal polyamine.

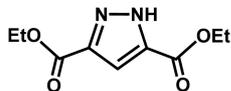
The tosylated amine (22.3 mmol), K_2CO_3 (254.5 mmol), and N-(3-bromopropyl)phthalimide (63.6 mmol) were suspended in 300 mL of refluxing CH_3CN . After refluxing for 48 h, the mixture was filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness and the residue suspended in refluxing ethanol. Then, it was filtered to give the product as a white solid.

4. 3. 5. Removal of phthalimide groups.

The polyamine (6.7 mmol) and hydrazine monohydrate 85% (60.3 mmol) were dissolved in THF (300 mL) and heated during 24 h. The mixture was cooled and the resulting solid filtered off. After adding 50 mL of water, the solution was vacuum evaporated to dryness, to give a solid residue. The solid was dissolved in CH_2Cl_2 and the solution was dried with anhydrous Na_2SO_4 . Finally, the solution was vacuum evaporated to dryness to obtain the product as a white solid.

4. 4 Synthesis and characterisation.

4. 4. 1. Pyrazole precursor.



Diethyl-1*H*-pyrazole-3,5-dicarboxylate.

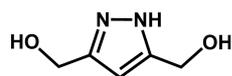
3,5-Pyrazoledicarboxylic acid monohydrate (15 g, 8.6 mmol) was solved in 300 mL of a hydrogen chloride solution in ethanol (1.25 M) and stirred during 48 h at room temperature. Then the mixture was evaporated to dryness and saturated aqueous solution of NaHCO₃ solution was added to the crude and brought to pH 8. The product was extracted with CHCl₃ and the organic phase was dried over Na₂SO₄. The removal of the solvent gives the product as a white solid.

Yield: 80%

Melting point: 53-54°C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.23 (s, 1H), 4.32 (q, *J* = 7 Hz, 4H), 1.26 (t, *J* = 7 Hz, 6H).

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 111.5, 61.4, 14.4.

**3,5-Bis(hydroxymethyl)-1*H*-pyrazole.**

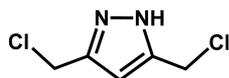
A solution of diethyl-1*H*-pyrazole-3,5-dicarboxylate (10.0 mmol) in anhydrous toluene (15 mL) was added dropwise to a 1.2 M toluene solution of diisobutylaluminum hydride cooled at -78°C and nitrogen atmosphere. Once the addition is completed, the mixture was stirred for 12 h at room temperature. The mixture was then cooled at 0 °C and 50 mL of methanol was added and stirred until a grey solid appears. The grey solid was extracted with a Soxhlet in methanol during 7 days and the resulting oil was crystallized in ethyl acetate to obtain the product as a white solid.

Yield: 50%

Melting point: 94-96°C

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 6.35 (s, 1H), 4.64 (s, 4H).

¹³C NMR (300 MHz, D₂O): δ 149.4, 104.4, 57.1.

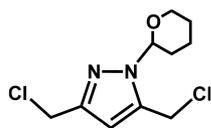
**3,5-Bis(chloromethyl)-1*H*-pyrazole.**

1 g (7.8 mmol) of 3,5-Bis(hydroxymethyl)-1*H*-pyrazole was suspended in 15 mL of 1,2-dimethoxyethane and 2 equivalents per hydroxyl group of thionyl chloride were added. After stirring overnight, the acidic solution was neutralized with NaHCO₃ and the product was extracted with CHCl₃. The organic phase was dried over Na₂SO₄ and the residue crystallized from hexane.

Yield: 57%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.92 (bs, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.62 (s, 4H).

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 145.2, 104.2, 37.0.

**3,5-bis(chloromethyl)-1-(tetrahydropyran-2-yl)1H-pyrazole.**

The 3,5-bis(chloromethyl)-1H-pyrazole (9.83, 49 mmol) hydrochloride salt was suspended in 500 mL of dichloromethane, and 9.22 g (110 mmols) of 1,2-dihydropyran was added. The stirred suspension turned clear after 1 h. After additional stirring overnight the mixture was extracted with a solution of saturated NaHCO₃ and the organic phase was dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated and the residue crystallized from light petroleum to give the product as colourless needles.

Yield: 78%

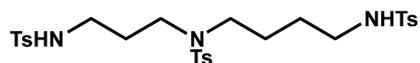
ESI-MS observed m/z 248; calcd for [M + H]⁺ 248.

Melting point: 81°C

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.41 (s, 1H), 5.46 (dd, $J = 9$ Hz, $J = 2$ Hz, 1H), 4.68 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.58 (s, 2H), 4.08-3.96 (m, 1H), 3.74-3.61 (m, 1H), 2.49-2.30 (m, 1H), 2.15-1.95 (m, 2H), 1.81-1.47 (m, 3H).

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 148, 139.4, 107.2, 84.9, 67.5, 38.6, 34.2, 29.1, 24.5, 22.1.

4. 4. 2. Polyamine precursors.

**1,5-tri-(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,10-triazadecane**

Yield: 70 %

Melting point: it is an oil.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.73(d, 4H, $J = 8\text{Hz}$), 7.72 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.62 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.29 (d, 6H, $J = 8$ Hz), 5.38 (t, 1H, $J = 6$ Hz), 4.98 (t, 1H, $J = 7$ Hz), 3.11 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 3.05-2.85 (m, 6H), 2.42 (s, 9H), 1.74 (m, 2H), 1.50 (m, 4H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 143.7, 143.5, 143.5, 137.1, 137.0, 136.0, 129.9, 129.9, 127.2, 127.2, 49.0, 46.23, 42.7, 40.2, 29.4, 26.6, 26.0, 21.6.

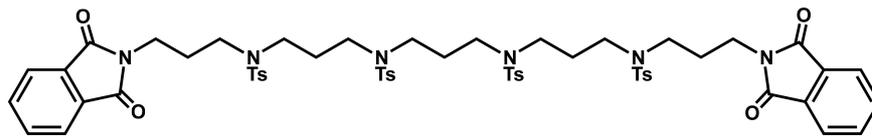
**1,5,9,13-tetra-(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13-tetrazatridecane**

Yield: 89 %

Melting point: 128-130°C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, 4H, $J = 8\text{Hz}$), 7.62 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.32-7.26 (m, 8H), 5.39 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 3.13 (t, 4H, $J = 8$ Hz), 3.08 (t, 4H, $J = 8$ Hz), 2.98 (td, 4H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 6\text{Hz}$), 2.42 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.91-1.69 (m, 6H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 143.8, 143.5, 136.9, 135.7, 130.0, 129.9, 127.3, 127.1, 47.5, 46.6, 40.3, 29.5, 28.7, 21.6.

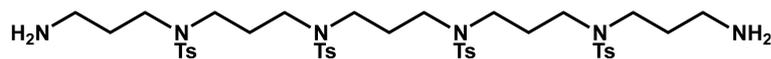


1,19-Phthalimido-4,8,12,16-tetrakis (*p*-tolylsulfonyl)-4,8,12,16-tetraazanonadecane

Yield: 46 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.80-7.78 (m, 4H), 7.69-7.66 (m, 4H), 7.64-7.58 (m, 8H), 7.29-7.22 (m, 8H), 3.64 (t, 4H, $J=7$ Hz), 3.13-3.09 (m, 16H), 2.39 (s, 6H), 2.37 (s, 6H), 1.86-1.81 (m, 10H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 168.50, 134.35, 132.44, 130.20, 127.55, 123.64, 47.1, 21.9.



4,8,12,16-Tetrakis (*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaazaheneicosane

Yield: 76 %

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.62-7.70 (m, 8H) 7.25-7.30 (m, 8H), 3.11-3.13 (m, 16H), 2.73 (t, 4H, $J=7$ Hz), 2.40 (s, 6H), 2.38 (s, 6H), 2.18 (s, 1H), 1.66-1.90 (m, 10H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): 143.7, 143.6, 135.9, 130.2, 130.0, 127.3, 47.2, 47.0, 38.9, 31.8, 21.7.

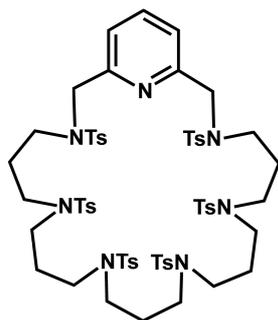


1,5,9,13,17,21-Hexakis (*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaazaheneicosane

Yield: 89%

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): 7.71-7.61 (m, 12H), 7.31-7.23 (m, 12H), 5.44 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 3.12-3.10 (m, 16H), 2.95-2.93 (m, 4H), 2.41 (s, 9H), 2.38 (s, 9H) 1.78-1.91 (m, 10H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): 143.8, 137.0, 135.6, 130.1, 129.9, 127.3, 47.7, 47.6, 47.5, 40.4, 29.6, 29.2, 21.0

4. 4. 3. Protected cyclic polyamines.**1,5,9,13,17,21-Hexakis (*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaaza[23]-2,6-pyridina cyclotetracosaphane.**

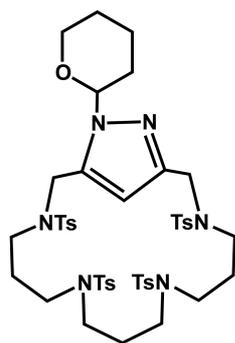
Yield: 98%

ESI-MS observed 1329.7 *m/z*; calcd for [M+H]⁺ 1329.7.

Melting point: 124.7-125.1°C.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.65-7.54 (m, 15H), 7.36-7.27 (m, 12H), 4.30 (s, 4H), 3.23-2.94 (m, 20H), 2.40 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 2.38 (s, 6H), 1.94-1.66 (m, 10H).

¹³C NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 156.7, 143.6, 130.1, 130.0, 127.5, 127.4, 127.4, 47.8, 47.7, 29.9, 28.9, 21.7.



1-(3,5-pyrazolacyclohexadecaphane)-2-(4-toluenesulfonyl)tetrahydropyran.

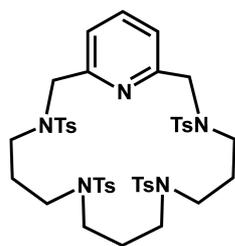
Yield: 34%

ESI-MS observed m/z ; 1003.4 calcd for $[M+Na]^+$ 1003.3.

Melting point: 78-80°C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.73-7.63 (m, 8H), 7.40-7.28 (m, 8H), 6.27 (s, 1H), 5.58 (dd, 1H, $J_1 = 10$ Hz, $J_2 = 2$), 4.40 (d, 1H, $J = 15$ Hz), 4.27 (d, 1H, $J = 15$ Hz), 4.12 (d, 1H, $J = 7$ Hz), 4.07 (d, 1H, $J = 7$ Hz), 3.92-3.83 (m, 1H), 3.78-3.68 (m, 1H), 3.23-2.84 (m, 12H), 2.47 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.39-2.37 (m, 2H), 1.88-1.42 (m, 10H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 148.9, 144.3, 143.5, 138.5, 135.7, 134.6, 130.2, 129.9, 127.5, 127.4, 127.3, 100.1, 84.4, 68.4, 48.3, 48.2, 47.9, 47.8, 47.5, 30.1, 29.7, 29.6, 21.7.



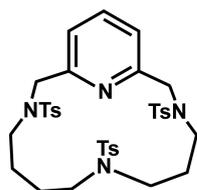
3,7,11,15-Tetraza-3,7,11,15-*p*-tolylsulfonyl-1-(2,6)-pyridinacyclohexadecaphane.

Yield: 88%

Melting point: 157-160°C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.62 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.42-7.28 (m, 11H), 4.19 (s, 4H), 3.18 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 2.98 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 2.83 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 2.46 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 1.61 (quin, 4H, $J = 7$ Hz), 1.09 (quin, 2H, $J = 7$ Hz).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 144.1, 143.9, 138.3, 135.5, 130.3, 130.2, 127.6, 127.5, 54.4, 48.9, 48.8, 48.6, 30.4, 30.2, 21.5, 21.4.



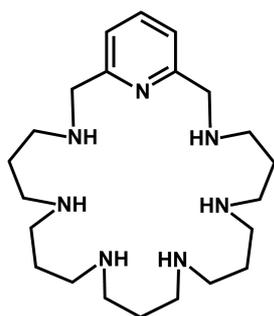
**3,7,12-Triaza-3,7,12-*p*-tolylsulfonyl-1-(2,6)-
pyridinacyclotridecaphane.**

Yield: 89%

Melting point: 151.6-152.9°C.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.76-7.69 (m, 5H), 7.59-7.53 (m, 3H), 7.48 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 7.33 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.32 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7.27 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 4.33 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.27-3.19 (m, 2H), 3.11 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2.80 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2.63 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2.44 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 1.59-1.54 (m, 2H), 1.32-1.30 (m, 2H), 1.17-1.14 (m, 2H).

^{13}C NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 157.0, 143.6, 137.9, 136.1, 130.0, 129.9, 128.8, 127.4, 127.3, 123.2, 55.5, 55.3, 50.5, 49.8, 48.6, 48.5, 29.6, 26.9, 26.5, 21.7, 21.6.

4. 4. 4. Cyclic polyamines.**3,7,11,15,19,23-hexaaza-1-(2,6)-pyridina cyclotetracosaphane hexahydrobromide. L1·6HBr**

Yield: 62%

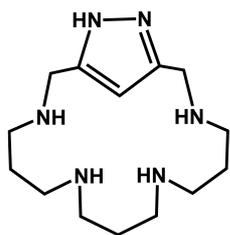
Anal. Calcd for $C_{22}H_{55}N_7 \cdot 6HBr \cdot 3H_2O$: C, 27.9; H, 5.9; N, 10.4. Found: C, 27.8; H, 5.7; N, 10.2.

ESI-MS observed m/z 405.4; calcd for $[M]^+$ 405.4.

Melting point: decompose at 274°C

1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 7.93 (t, $J = 8$ Hz, 1H), 7.46 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 4.49 (s, 4H), 3.35-3.26 (m, 20H), 2.38-2.16 (m, 10H).

^{13}C NMR (300 MHz, D_2O): δ 150.8, 139.6, 123.1, 51.2, 44.9, 44.6, 44.1, 23.1, 22.6, 21.7.



**3,7,11,15-Tetraza-1-(3,5)-pyrazolacyclohexadecaphane
tetrahydrobromide. L5·4HBr**

Yield: 65%

Anal. Calcd for $C_{14}H_{28}N_6 \cdot 4HBr \cdot H_2O$: C, 27.18; H, 5.54; N, 13.59.

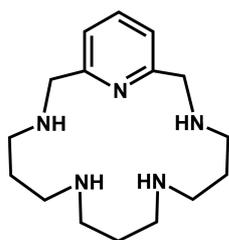
Found: C, 27.0; H, 5.5; N, 13.6.

ESI-MS observed m/z 281.24; calcd for $[M + H]^+$ 281.24.

Melting point: 250-257°C.

1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.84 (s, 1H), 4.42 (s, 4H), 3.23-3.17 (m, 12H), 2.15-2.07 (m, 6H).

^{13}C NMR (300 MHz, D_2O): δ 138.9, 109.9, 43.8, 43.5, 43.4, 22.0, 21.9.



**3,7,11,15-tetraza-1-(2,6)-pyridinacyclohexadecaphane
tetrahydrobromide. L6·4HBr**

Yield: 65%

Anal. Calcd for $C_{16}H_{29}N_5 \cdot 4HBr \cdot 2H_2O$: C, 29.51; H, 5.73; N, 10.76.

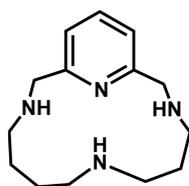
Found: C, 29.4; H, 5.7; N, 10.6.

ESI-MS observed m/z 292.2; calcd for $[M + H]^+$ 292.2.

Melting point: decomposes at 250°C

1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 7.92 (t, 1H, $J = 7$ Hz), 7.47 (d, 2H, $J = 7$ Hz), 4.53 (s, 4H), 3.31-3.39 (m, 12H), 2.15-2.30 (m, 6H).

^{13}C NMR: δ 150.2, 139.5, 122.9, 50.5, 44.4, 42.1, 41.9, 22.1, 19.3



**3,7,12-triaza-1-(2,6)-pyridinacyclotridecaphane
trihydrobromide. L7·3HBr**

Yield: 98%

Anal. Calcd for $C_{14}H_{24}N_4(HBr)_3$: C, 34.4; H, 5.6; N, 11.5. Found: C, 34.0; H, 5.2; N, 10.6.

ESI-MS observed 248.5 m/z ; calcd for $[M]^+$ 248.2

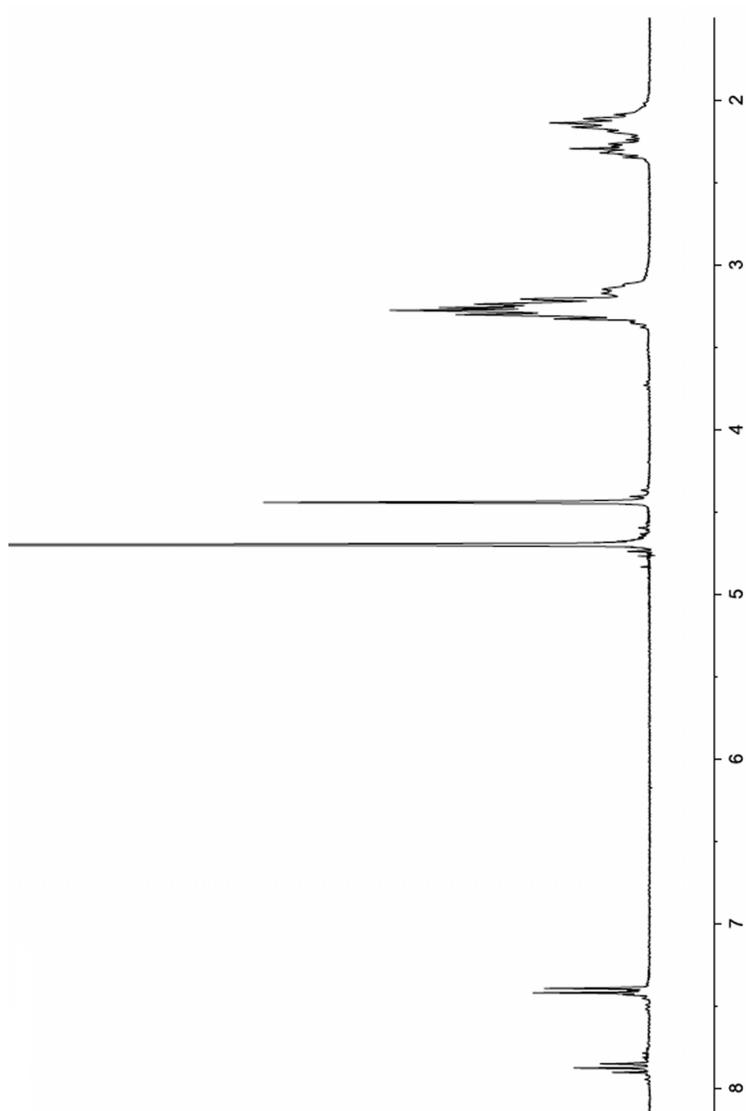
Melting point: 279 °C.

1H NMR (D_2O , 300 MHz): δ 8.03 (t, 1H, $J = 7$ Hz), 7.60 (d, 2H, $J = 7$ Hz), 4.56 (s, 2H), 4.53 (s, 2H), 3.36 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 3.29 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 3.28 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 3.18 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2.28 (quin, 2H, $J = 7$ Hz), 2.28 (quin, 2H, $J = 7$ Hz), 1.94 (quin, 2H, $J = 7$ Hz), 1.92 (quin, 2H, $J = 7$ Hz).

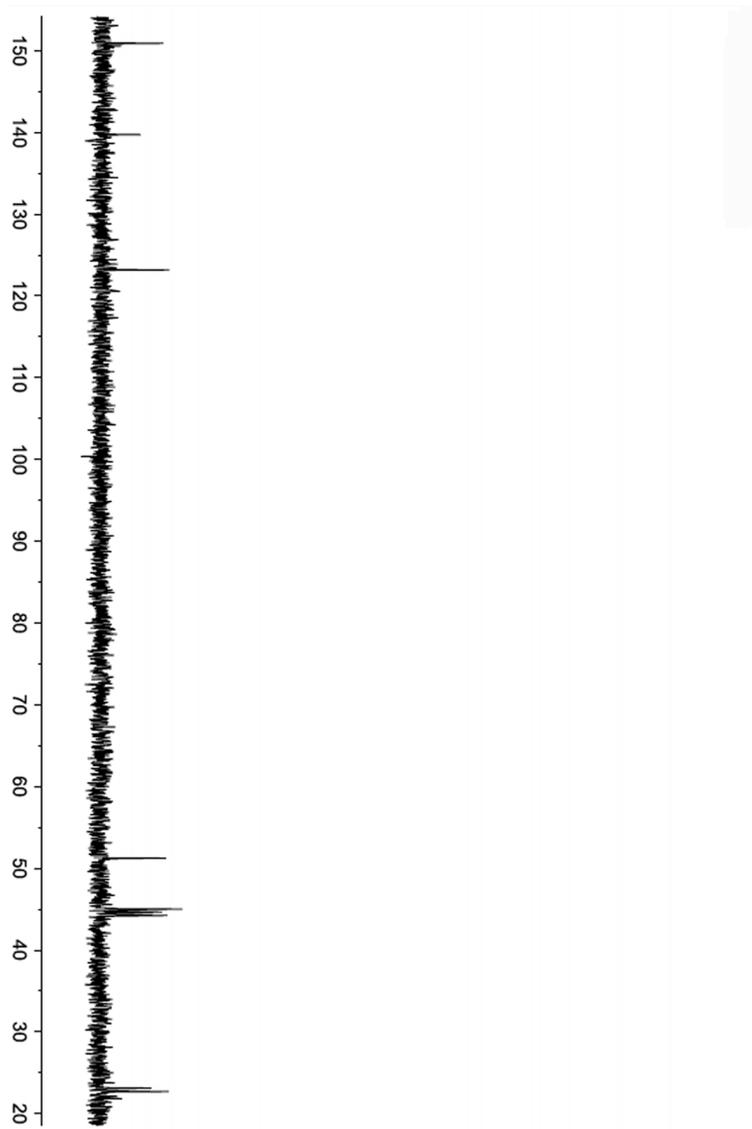
^{13}C NMR (D_2O , 300 MHz): 150.8, 150.7, 140.2, 124.9, 50.2, 50.1, 45.8, 44.2, 44.1, 42.3, 21.9, 21.4, 21.3.

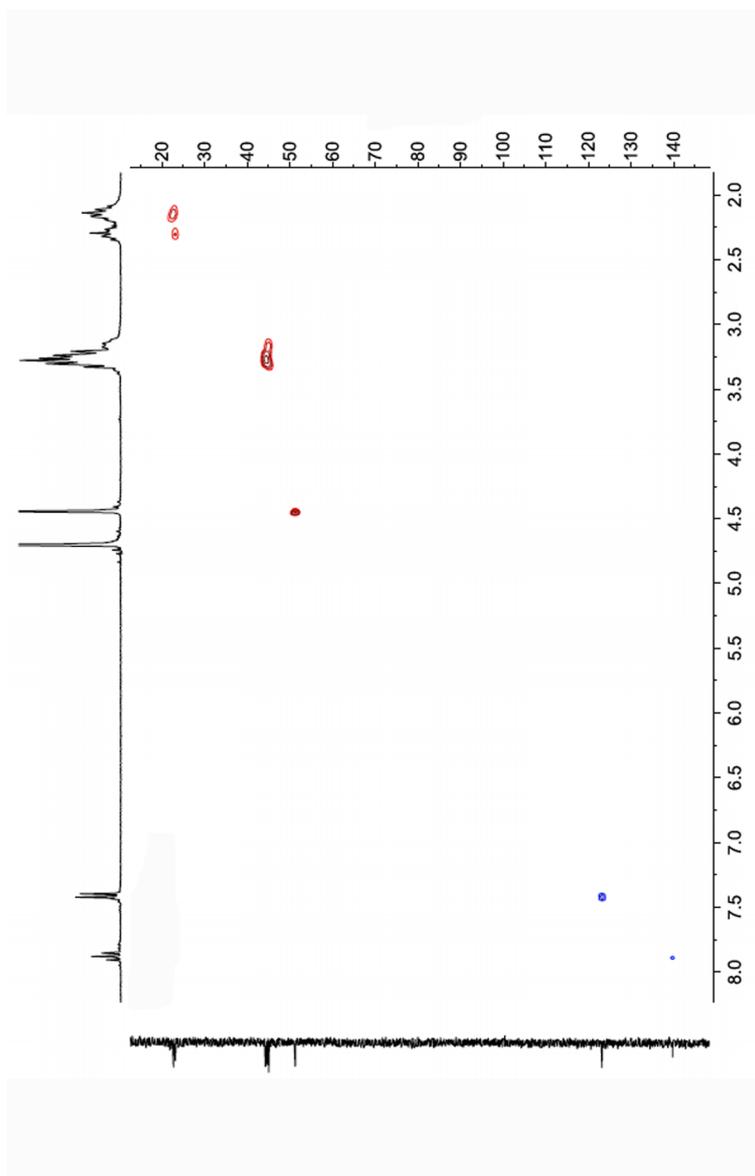
4. 5. References.

- (1) Powell, W. H. *Pure and Applied Chemistry* **1998**, *70*, 1513.
- (2) Nelson, S. M. *Pure and Applied Chemistry* **1980**, *52*, 2461.
- (3) Curtis, N. F. *Journal of the Chemical Society* **1960**, 4409.
- (4) Karn, J. L.; Busch, D. H. *Nature* **1966**, *211*, 160.
- (5) Thompson, M. C.; Busch, D. H. *Journal of the American Chemical Society* **1964**, *86*, 3651.
- (6) Richman, J. E.; Atkins, T. J. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, *96*, 2268.
- (7) Snyder, H. R.; Heckert, R. E. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, *74*, 2006.
- (8) Bencini, A.; Burguete, M. I.; García-España, E.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Soriano, C. *Journal of Organic Chemistry* **1993**, *58*, 4749.
- (9) Iturrino, L.; Navarro, P.; Rodríguez-Franco, M. I.; Contreras, M.; Escario, J. A.; Martínez, A.; Pardo, M. D. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1987**, *22*, 445.
- (10) Roder, J. C.; Meyer, F.; Pritzkow, H. *Organometallics* **2001**, *20*, 811.

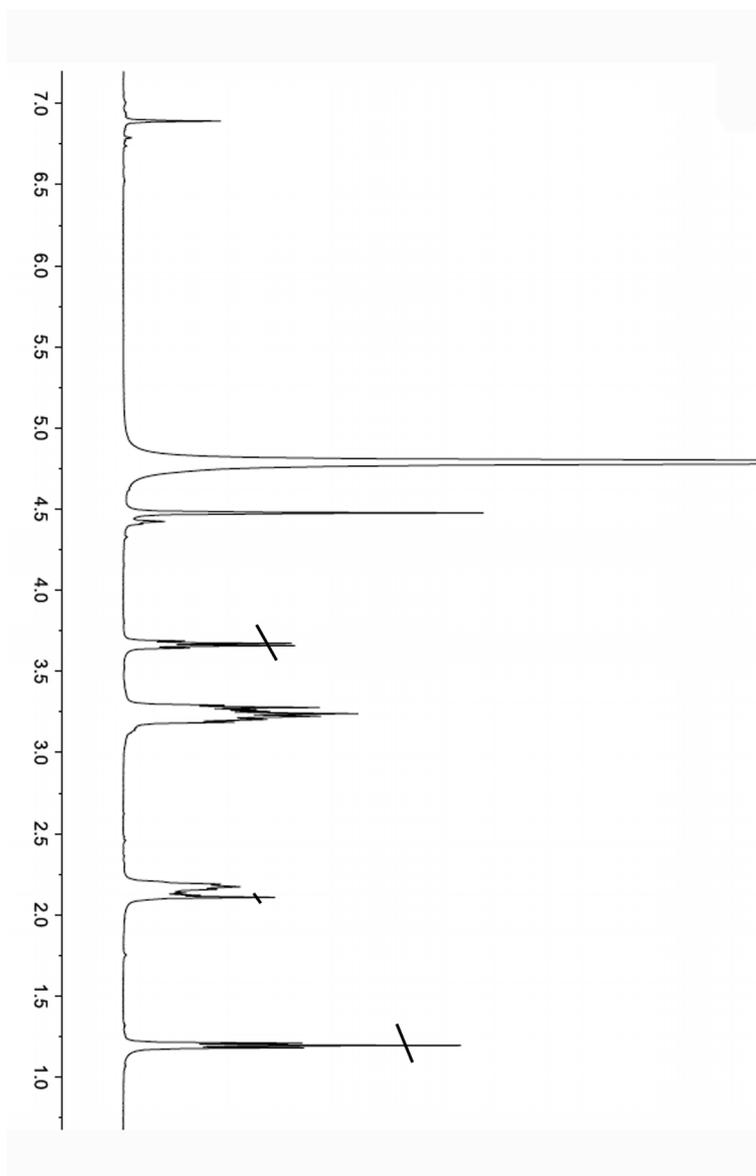
Annex 4. 1. ^1H spectra of L1, in D_2O .

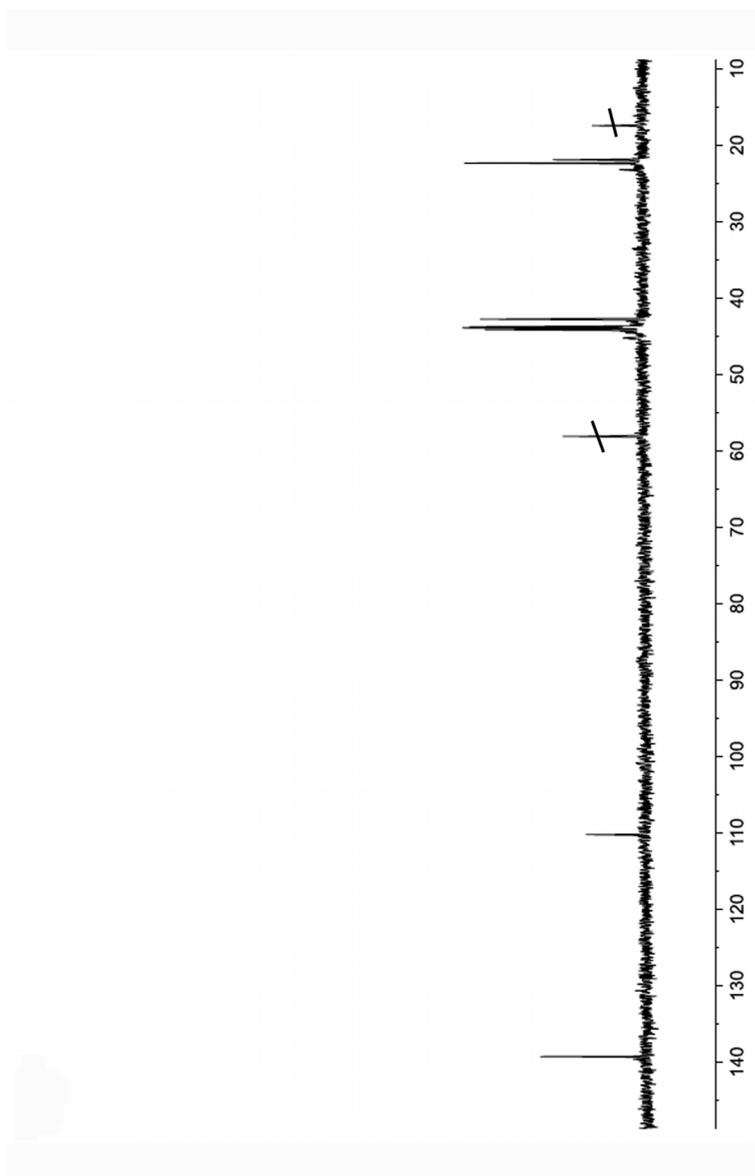
Annex 4. 2. ^{13}C spectra of L1 in D_2O .

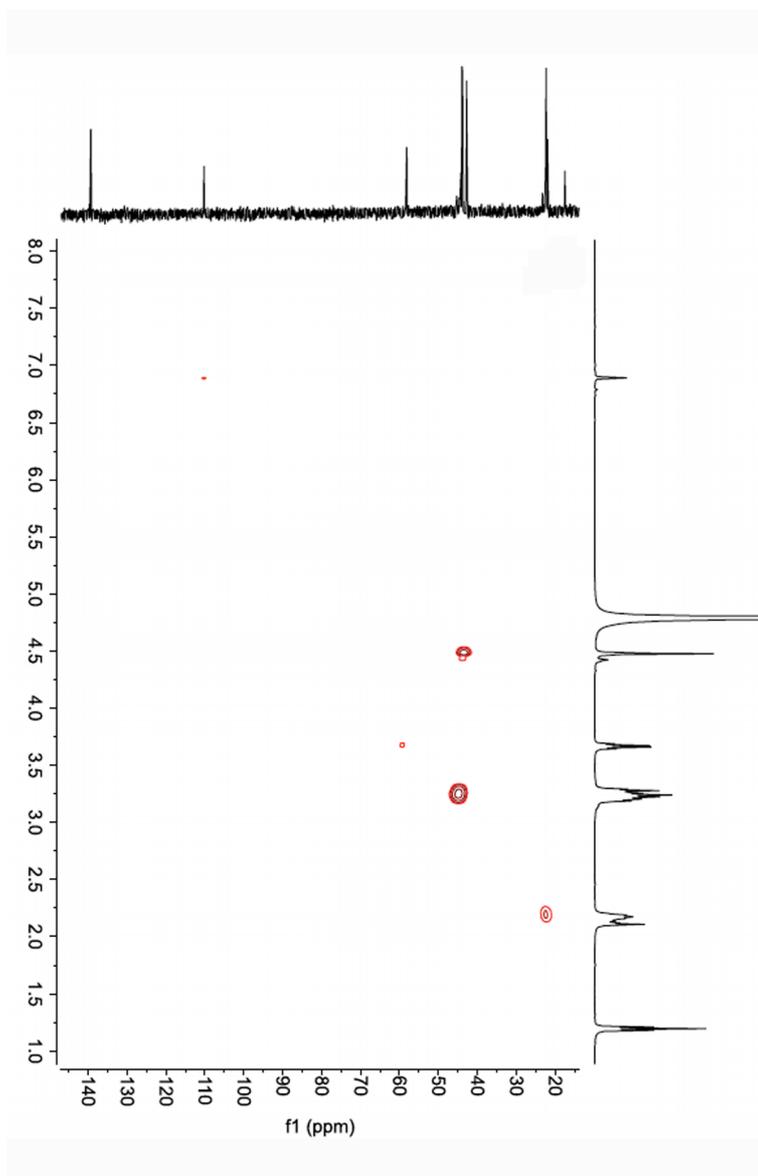


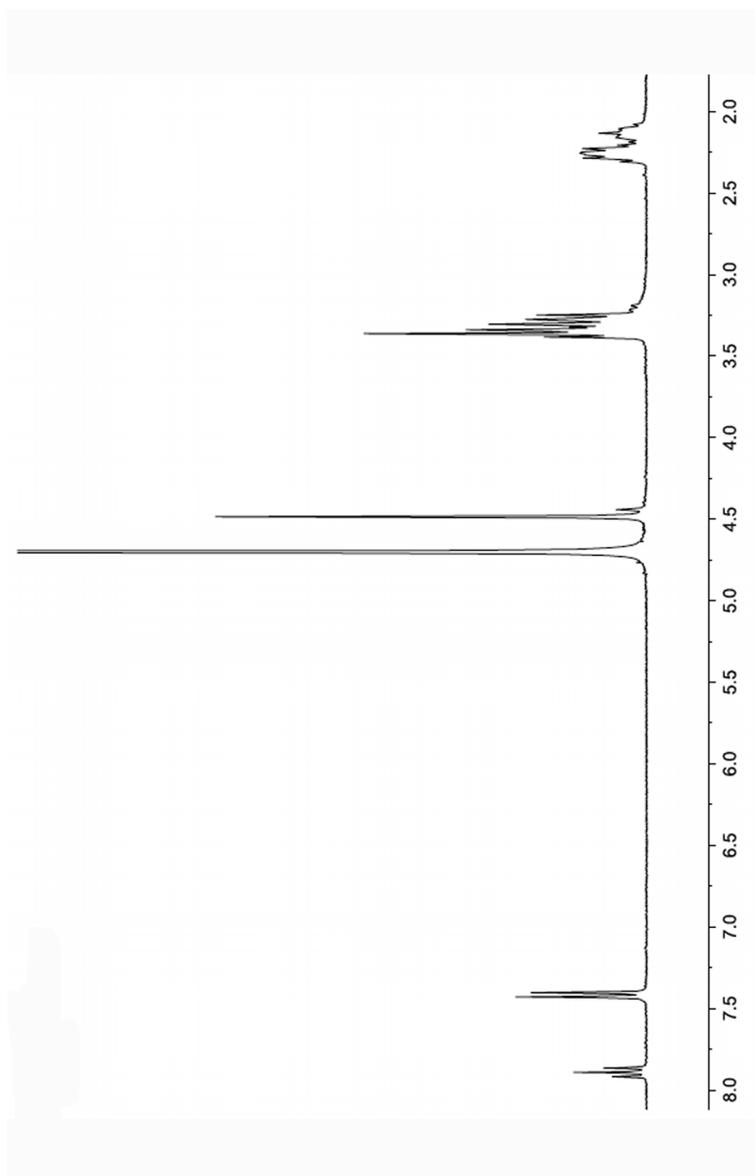
Annex 4. 3. ^1H - ^{13}C -HSQC spectra of L1 in D_2O .

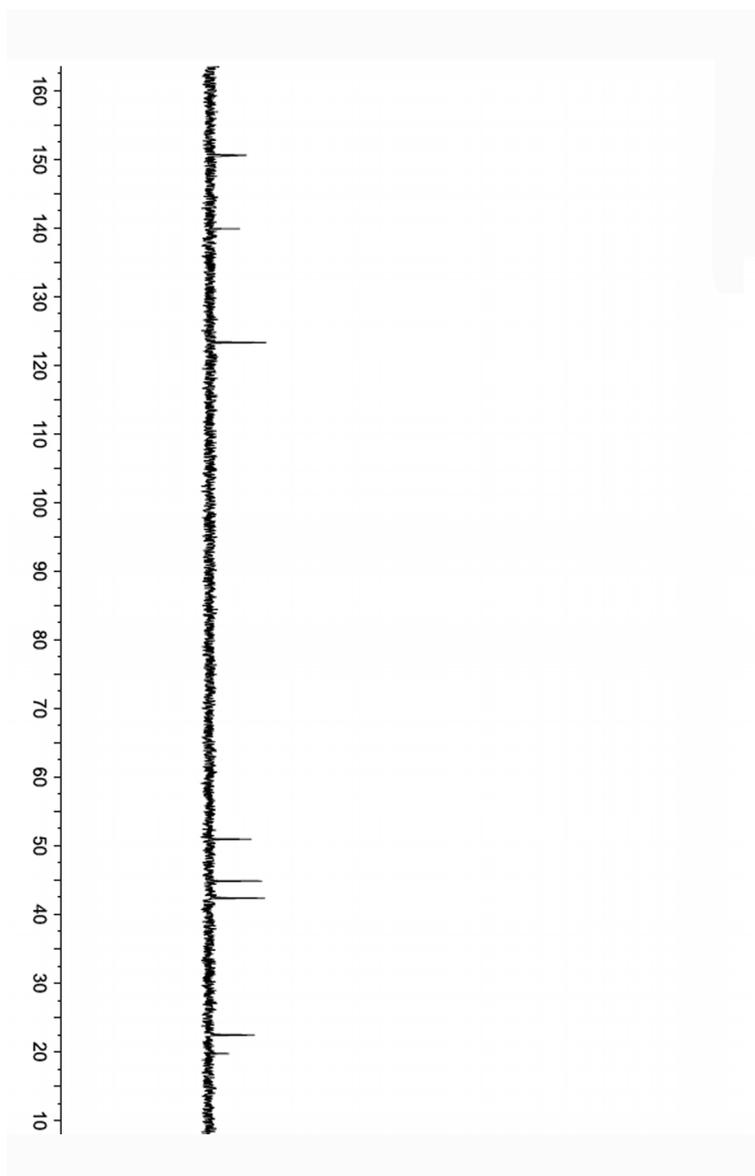
Annex 4. 4. ^1H spectra of L5 in D_2O .

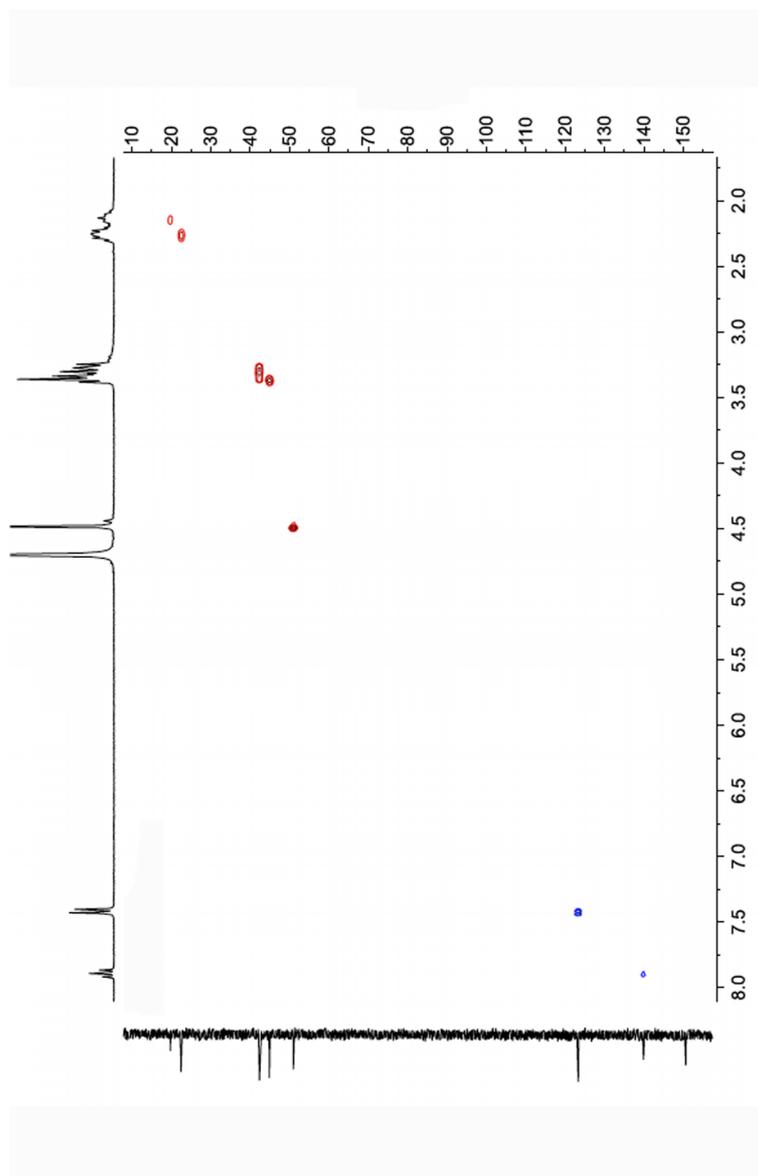


Annex 4. 5. ^{13}C spectra of L5 in D_2O .

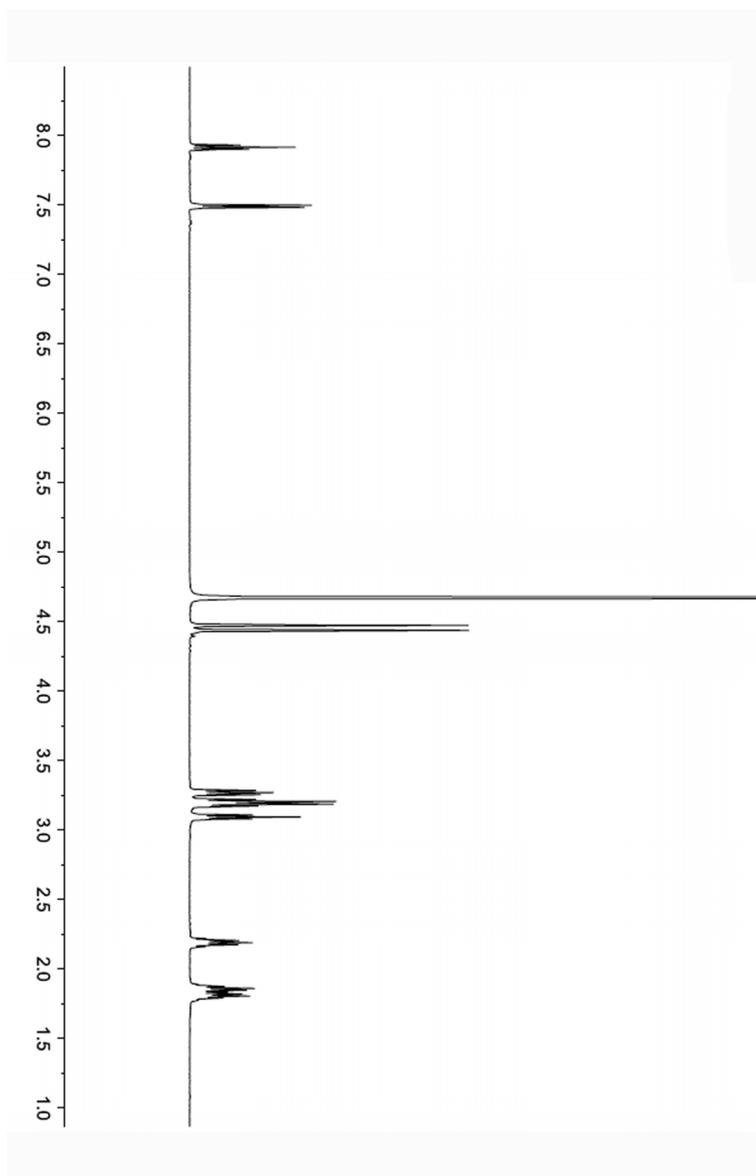
Annex 4. 6. ^1H - ^{13}C -HSQC spectra of L5 in D_2O .

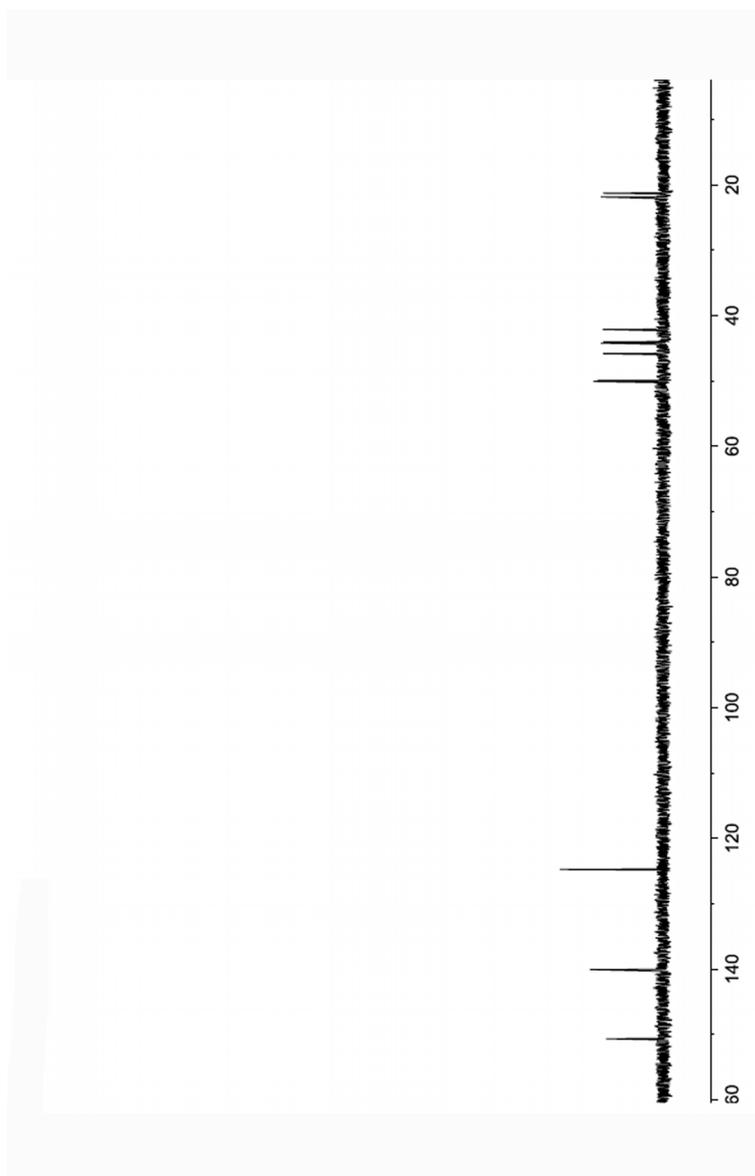
Annex. 4. 7. ^1H spectra of L6 in D_2O .

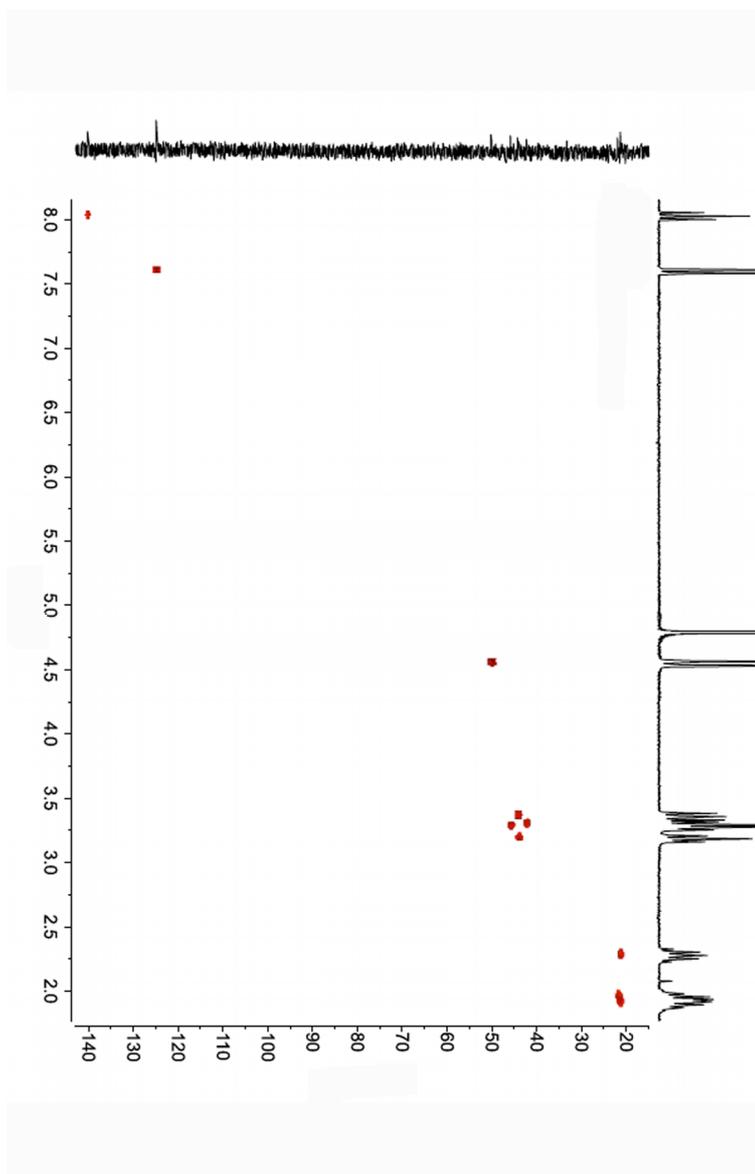
Annex 4. 8. ^{13}C spectra of L6 in D_2O .

Annex 4. 9. ^1H - ^{13}C -HSQC spectra of L6 in D_2O .

Annex 4. 10. ^1H spectra of L7 in D_2O .



Annex 4. 11. ^{13}C spectra of L7 in D_2O .

Annex 4. 12. ^1H - ^{13}C -HSQC spectra of L7 in D_2O .

Capítulo 5

Miméticos enzimáticos de la Cu, Zn Superóxido Dismutasa

5. 1. Motivación.

El objetivo de esta parte del trabajo es el estudio de complejos homo- y heterobinucleares de Cu(II) y Zn(II) con ligandos poliamínicos para ensayar su capacidad de dismutar al anion superóxido como miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD.

5. 2. El oxígeno y sus especies reactivas.

El oxígeno es uno de los elementos más abundantes, constituyendo aproximadamente el 50% en peso de la atmósfera, hidrosfera y litosfera. Los organismos aeróbicos lo utilizan como fuente de energía para realizar sus procesos vitales, lo que le convierte en una de las moléculas más importantes para la vida. Todo el O₂ atmosférico es de origen biológico y se obtiene a través del proceso de fotosíntesis. Los organismos fotosintéticos utilizan la energía solar para transformar el dióxido de carbono y el agua en compuestos orgánicos necesarios para su supervivencia.

Sin embargo, la exposición prolongada a una atmósfera oxigenada, supone un peligro para los organismos vivos, ya que da lugar a reacciones incontrolables de oxidación con efectos nocivos. Por tanto, se puede decir que la molécula de dioxígeno es, al mismo tiempo, esencial y tóxica para la vida.¹ El dioxígeno presenta una reactividad particular, ya que la velocidad de las reacciones en las que interviene es bastante dispar, pudiendo ser prácticamente instantáneas o bien ser extremadamente lentas. Su configuración electrónica $((\sigma_{2s})^2 (\sigma_{2s}^*)^2 (\sigma_{2p})^2 (\pi_{2p})^4 (\pi_{2p}^*)^2)$ se caracteriza por tener dos electrones desapareados en los orbitales π^* . Sus valores de energía de ionización y entalpía de disociación indican que la molécula es poco sensible tanto a un proceso oxidativo como disociativo. Por tanto, su reactividad viene determinada por su tendencia a aceptar densidad electrónica y reducirse.^{2,3}

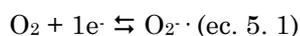
Por su parte, la gran mayoría de moléculas orgánicas, tienen todos sus electrones de valencia apareados en el estado fundamental. En estas condiciones, la transferencia electrónica desde dichas moléculas a la molécula de dioxígeno está prohibida por el espín. Esta inercia es de vital importancia, dado que permite el desarrollo de la vida en una atmósfera oxigenada. Sin embargo, los radicales libres e iones de los metales de transición no están sometidos a dicha restricción, de forma que reaccionan rápidamente con el oxígeno, convirtiéndolo en una especie muy reactiva.

La reducción completa de una molécula de O_2 a agua requiere cuatro electrones y ocurre a través de varios intermedios como el anion superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas especies (tabla 5. 1) son conocidas como especies reactivas del oxígeno (o ROS, por sus siglas en inglés) y son consideradas potencialmente dañinas para los organismos vivos.¹

Tabla 5. 1. Especies reactivas del oxígeno.

Radicales	No radicales
Superóxido, $O_2^{\cdot -}$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Hidroxilo, HO^{\cdot}	Ácido hipocloroso, $HClO$
Peroxilos, RO_2^{\cdot}	Ozono, O_3
Alcoxilos, RO^{\cdot}	Oxígeno singlete, $O_2 (^1\Delta_g)$
Hidroperoxilos, HO_2^{\cdot}	

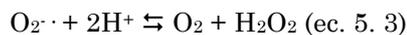
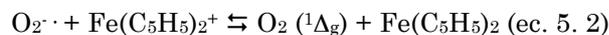
La adición de un electrón a la molécula de oxígeno da lugar al anion superóxido $O_2^{\cdot -}$ (ec. 5. 1). Su generación proviene de diversas fuentes. En algunos casos, se genera de forma accidental al reaccionar la molécula de O_2 con determinadas moléculas presentes en el organismo de los seres vivos, como la adrenalina, dopamina o componentes de la cadena respiratoria. Pero también se puede generar de forma intencionada como es el caso de los fagocitos, que protegen a los seres vivos de organismos extraños y generan grandes cantidades de $O_2^{\cdot -}$ como parte del proceso de eliminación.



La mayor ocupación de los orbitales π^* del anion superóxido, debilita el enlace O-O, aumentando su longitud y haciéndolo más reactivo que el oxígeno molecular. Por ser un radical con un electrón desapareado, posee un espín $\frac{1}{2}$, de forma que la reacción con la materia orgánica está cinéticamente impedida.

En medio aprótico, el anión superóxido, se comporta como un reductor suave, generando O_2 en estado singlete (ec. 5. 2). En cambio, en medio prótico, el anión superóxido dismuta dando lugar a la

formación de una molécula de dióxígeno y otra de peróxido de hidrogeno (ec. 5. 3). En este medio, el anión superóxido se protona fácilmente con la adición de un ácido prótico ($pK_a = 4.77$). Su forma protonada, $HO_2\cdot$ (ec. 5. 4), resulta ser un oxidante fuerte e inestable frente a la dismutación.²



Como ya se ha descrito anteriormente, el anion superóxido no reacciona con la materia orgánica diamagnética debido a su estructura electrónica. Sin embargo, no toda la materia de los organismos aeróbicos cumple estos requisitos y el anión superóxido puede reaccionar de forma directa e indirecta, puesto que es el precursor de potentes especies reactivas. A continuación se describe brevemente algunas de las reacciones y el impacto de éstas en el metabolismo celular tal y como se muestra en la figura 5. 1.

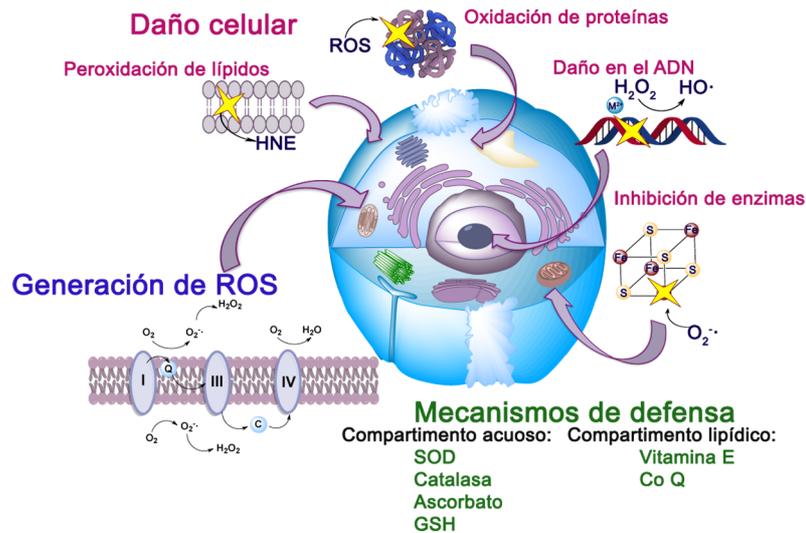
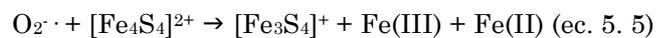


Figura 5. 1. Esquema de la formación y repercusión de las especies ROS en el metabolismo celular. Adaptada de Halliwell *et al.*³

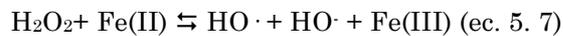
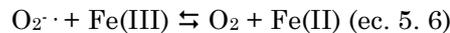
- Reactividad frente a metales de transición.

El carácter reductor del anión superóxido, le permite ceder electrones a metales de transición. Esta reacción puede tener consecuencias drásticas en la célula, ya que muchas de las reacciones enzimáticas precisan de un metal de transición como cofactor para poder desempeñar su función. A finales de la década de los 90, estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que el anion superóxido es el responsable de la inhibición de enzimas como la aconitasa u otros tipos de hidrolasas (ec. 5. 5). El centro activo, formado por un clúster de $[Fe_4S_4]^{2+}$, es atacado por el anion superóxido produciendo la liberación de Fe(II) y Fe(III).^{4,5}



Además, la reacción con los metales de transición de las enzimas se puede considerar como una fuente de radicales OH; potente agente

oxidante. En presencia de Fe(III) libre, éste se oxida a oxígeno molecular y el Fe(II) generado cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en OH· y OH· como se muestra en las ecuaciones ec. 5. 6 y ec. 5. 7.

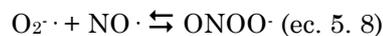


- Reactividad frente a lípidos.

Una clase de moléculas particularmente susceptible de ser oxidada son los lípidos polisaturados. La peroxidación de lípidos, no sólo produce daños en la integridad y función de la membrana celular, sino que a su vez genera una gran variedad de aldehídos y cetonas tóxicas, como la *trans*-4-hidroxi-2-nonenal o HNE, considerado como uno de los causantes de enfermedades neurodegenerativas, diabetes o diferentes tipos de cáncer.³

- Reactividad frente al radical NO·.

La reacción que experimenta con el radical NO· (ec. 5. 8) es extremadamente rápida.¹ El radical NO· tiene como función relajar las paredes arteriales con el fin de disminuir la presión sanguínea, por tanto, la presencia de O₂^{··} provoca hipertensión y espasmos.⁶

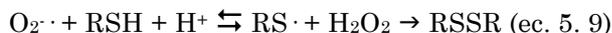


Por su parte, el peroxinitrito generado en los vasos sanguíneos puede agravar la arterioesclerosis y producir la peroxidación de lipoproteínas de baja densidad.

- Reactividad frente a proteínas.

También, el anión superóxido es el responsable de la modificación conformacional de algunas proteínas. Reacciona con el grupo

sulfhidrilo, oxidándolo a disulfuro⁶ (ec. 5. 9) y oxida a los grupos funcionales de las cadenas laterales de los aminoácidos⁷ produciendo, como consecuencia, cambios conformacionales en la proteína que afectan a la activación o inactivación de las enzimas.

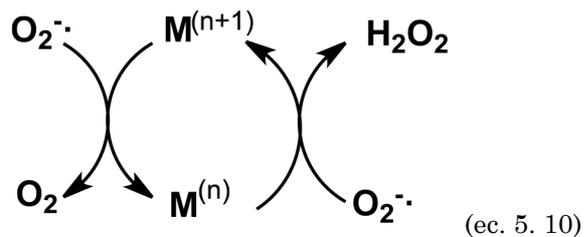


- Reactividad frente a los ácidos nucleicos.

Especies como $\text{OH}\cdot$, $\text{RO}\cdot$, O_2 (singlete), generadas como consecuencia de la transformación del anión superóxido, son las responsables de la alteración de las bases, roturas de las hebras o la formación de aductos fenólicos en los ácidos nucleicos.^{3,6,8-10}

5. 3. Sistemas de defensa.

Aunque, el anion superóxido es capaz de dismutarse a una velocidad considerable ($4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), esta velocidad no es suficiente como para mantener las concentraciones de anión superóxido suficientemente bajas e impedir que se produzcan daños celulares en una atmosfera oxigenada. Para su supervivencia, los organismos disponen de mecanismos de defensa capaces de minimizar la producción de anion superóxido y del resto de especies ROS. Entre ellos, cabe destacar la familia de enzimas superoxido dismutasa (SOD) por el papel que desempeña en la catálisis de la dismutación del anión superóxido, incrementando notablemente su velocidad de dismutación ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), de forma que el proceso pasa a estar solamente limitado por la difusión del anion superóxido.^{11,12} Su centro activo está formado por un metal electroactivo, capaz de catalizar la reacción de dismutación (ec. 5. 10).



Dependiendo del tipo de átomo metálico en el centro activo de la enzima, podemos diferenciar varios tipos de SOD. Los metales más habituales son el Cu(II), Mn(II) y Fe(II), aunque también existe SOD con Ni(II).¹³ Los seres humanos presentan tres tipos de SOD: SOD1, SOD2 y SOD3. El centro activo de la SOD1 y la SOD3 está formado por cobre y cinc. La primera de ellas se encuentra en el citoplasma, mientras que la segunda en el espacio extracelular. La SOD2, tiene un átomo de manganeso en su centro activo y se encuentra principalmente en las mitocondrias. En el trabajo que se presenta en este capítulo, nos centraremos en la superóxido dismutasa de cobre y cinc (Cu,Zn-SOD).

Las enzimas Cu,Zn-SOD son, mayoritariamente, especies de naturaleza dímica con una masa molecular de unos 32 kDa constituidas por dos subunidades idénticas. Cada subunidad contiene un ion cobre y un ion cinc. La estructura dímica es muy estable y a ello contribuyen tanto los iones metálicos como las diferentes interacciones hidrófobas entre ambas subunidades. Gracias a la difracción de rayos X de cristales de superóxido dismutasa, de diferentes orígenes, se ha podido determinar las estructuras de su forma oxidada (Cu²⁺,Zn²⁺-SOD) (figura 5. 2a) y reducida (Cu⁺,Zn²⁺-SOD).

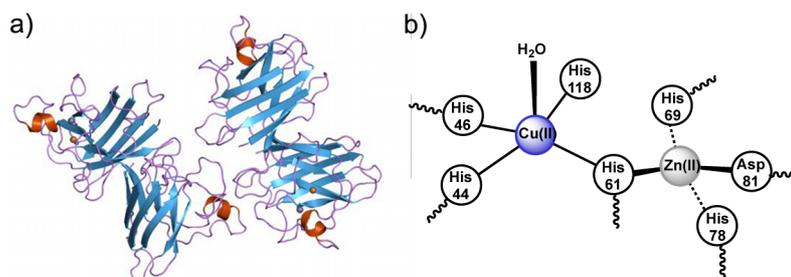


Figura 5. 2. a) Enzima Cu,Zn-SOD; b) Esquema centro activo.

Cada subunidad presenta ocho cadenas de hoja- β antiparalelas plegadas en forma de barril cilíndrico. El centro activo, fuera del barril- β , se encuentra en una cavidad cónica de unos 15 Å de profundidad (figura 5. 3). La parte ancha (~12 Å) del canal, se va estrechando de forma que en la proximidades del cobre el diámetro es de unos 3 Å, tamaño muy adecuado para el anion superóxido. El canal que conduce al centro activo, está formado por restos de aminoácidos cargados, que generan un gradiente de potencial favoreciendo la entrada del anion superóxido. En el borde de la cavidad y a una distancia de 6 Å del centro metálico, se encuentra un resto de Arg-141 que desempeña un papel importante en el ciclo catalítico.

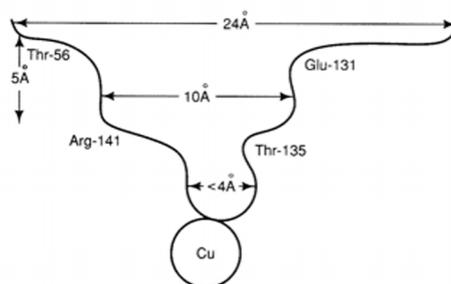


Figura 5. 3. Esquema de la cavidad activa de la Cu,Zn-SOD. (Adaptada de Valentine *et al.*, *Bioinorganic Chemistry*, University Science Books, 1994, cap.5, p302).

Es importante resaltar que el diseño de la cavidad y la disposición de los aminoácidos permiten el acceso al ion metálico sólo desde la parte abierta de la cavidad, por lo que la posición de coordinación de la molécula de agua es accesible al sustrato y a los inhibidores.

En su forma oxidada, el átomo de cobre se encuentra coordinado a cuatro histidinas (His-44, 46, 61 y 118) y débilmente a una molécula de agua en la posición axial, adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada distorsionada. El cinc queda completamente enterrado en la proteína coordinado a tres histidinas (His-61, 69 y 78) y a un grupo carboxilato monodentado de Asp-81, adoptando una geometría tetraédrica casi regular (figura 5. 2b). Se piensa que el átomo de cinc desempeña un papel meramente estructural, puesto que se han realizado estudios en los que se ha sustituido éste por átomos de Co(II), Cu(II), Cd(II) o Hg(II) y solamente se ha visto una pequeña pérdida de su actividad catalítica. Los dos centros metálicos se encuentran unidos a través de los nitrógenos N δ y N ϵ del anillo de imidazol del resto de His-61 a modo de ligando puente.

En su forma reducida, la molécula de agua se desplaza y el puente imidazolato que une los dos átomos metálicos del centro activo, se protona y se rompe el enlace. El Cu(I) se coordina a tres histidinas (His-44, 46, y 118) y adopta una geometría triangular plana. En cambio, el cinc mantiene su coordinación durante todo el proceso catalítico.²

El mecanismo general aceptado para la dismutación del anion superóxido por la enzima Cu,Zn-SOD, fue propuesto por Trainer *et al.*¹⁴ en 1983 (figura 5. 4), basándose en estructuras cristalinas de la forma oxidada de la enzima Cu,Zn-SOD procedentes de eritrocitos bovinos y un exhaustivo estudio espectroscópico.

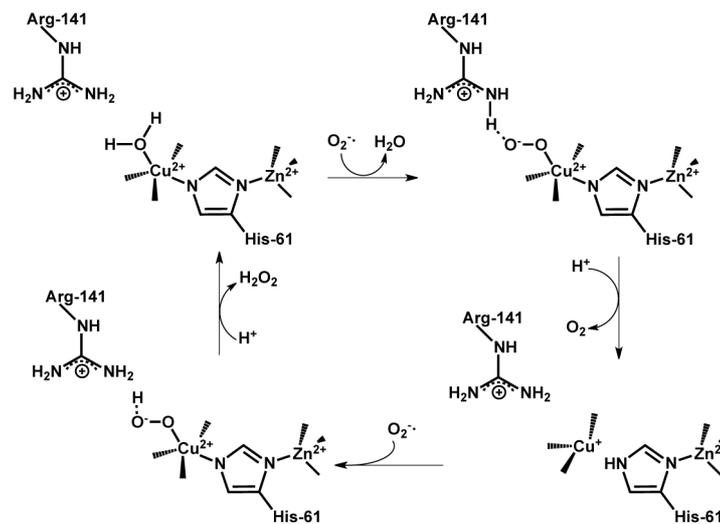


Figura 5. 4. Ciclo catalítico de la Cu,Zn-SOD. Adaptada de Bertini *et. al.* ¹⁵

Los restos de aminoácidos cargados positivamente aceleran la entrada del anión superóxido hacia el centro catalítico de Cu(II). Una primera molécula de O₂^{·-} se une al Cu(II) desplazando la molécula de agua de la posición axial débilmente coordinada. El resto del aminoácido Arg-141, cargado positivamente, ayuda a estabilizar la unión del O₂^{·-} al Cu(II) mediante enlaces de hidrógeno. En la segunda etapa, se produce la transferencia electrónica donde el O₂^{·-} reduce el Cu(II) a Cu(I) y él se oxida a O₂. Durante el proceso, se produce la protonación de la His-61, con la disociación del átomo de cobre y liberación de la molécula de O₂.

En la siguiente etapa, una segunda molécula de O₂^{·-} se une en la posición vacante del Cu(I), de forma que uno de los átomos del anion forma enlace de hidrógeno con el HNe2 de la His61 y el otro átomo de oxígeno forma enlace de hidrógeno con la Arg-141. El centro de Cu(I) transfiere un electrón al sustrato coordinado, el cual acepta también

el protón HNe2 de His6, generándose un grupo hidroperóxido coordinado a Cu(II). Mediante la reconstrucción del puente imidazolato entre los dos átomos metálicos y la aceptación de un nuevo protón por el hidroperóxido, cedido por una molécula de agua de la cavidad, una molécula de peróxido de hidrógeno sale de la cavidad activa y se regenera la forma oxidada del enzima para iniciar un nuevo ciclo.

5. 4. Miméticos de la SOD.

Cuando existe un desequilibrio entre la cantidad de especies ROS generadas y la capacidad de la enzima superóxido dismutasa en transformarlas en otras especies no dañinas, se produce lo que se conoce como estrés oxidativo y el daño en proteínas, ADN y lípidos.¹⁶ Con el fin de subsanar la deficiencia de SOD se pensó, en un primer momento, en introducir SOD suplementaria en el organismo, pero debido a su elevado peso molecular, no es capaz de atravesar las membranas celulares y por tanto, sólo puede ofrecer protección extracelular. Además, existen otros motivos por los que esta opción no resulta viable como son la inmunogenicidad, los tiempos de vida cortos o el coste. Por estas razones, los científicos han enfocado su interés en la síntesis de compuestos de bajo peso molecular que sean capaces de dismutar el anión superóxido. En la figura 5. 5 se muestran algunos de los complejos de Cu(II) sintetizados como modelos enzimáticos de la Cu,Zn-SOD.

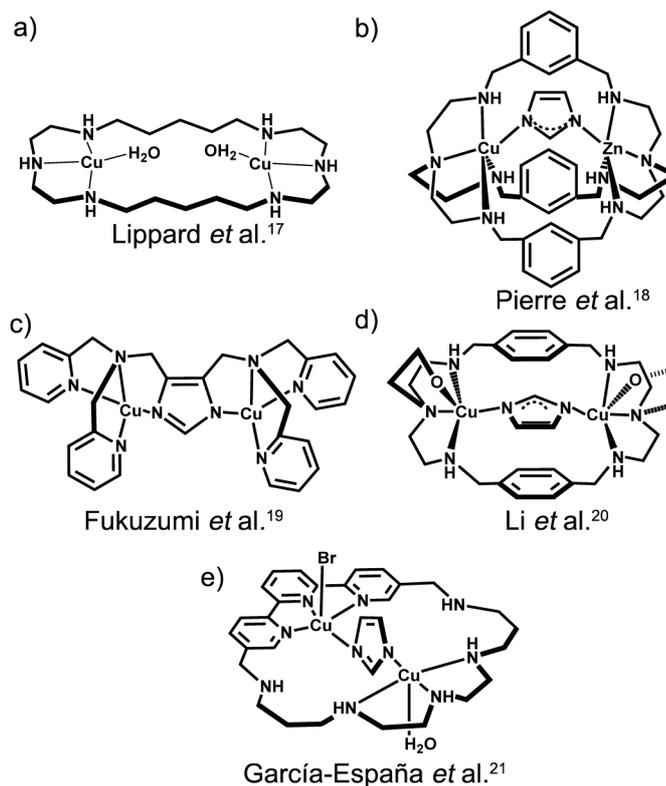


Figura 5. 5. Miméticos de la Cu,Zn-SOD encontrados en la bibliografía.¹⁷⁻²¹

Todos los receptores son capaces de coordinar dos metales de transición con posiciones de coordinación insaturadas que les permite actuar como miméticos de la SOD.

En este trabajo, hemos sintetizado un nuevo receptor (**L1**) tomando como referencia los trabajos pioneros de Lippard con receptores polinitrogenados altamente cargados y se estudió su potencial como mimético junto con otros tres receptores análogos (**L2-L4**)^{22,23} (figura 5. 6) sintetizados en el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. Pensamos que la presencia de siete átomos en la estructura de estos ligandos, seis aminas secundarias y el N de la piridina, junto con la flexibilidad y el tamaño de la cavidad

macrocíclica, hace que sean receptores capaces de coordinar dos átomos metálicos y completar su esfera de coordinación con ligandos externos como H_2O o OH^- . Éstos, pueden ser reemplazados por el anión superóxido pudiendo desempeñar su función como catalizador.

El nuevo receptor **L1** se diferencia del resto de ligandos de la serie en que únicamente tiene cadenas propilénicas en su estructura. Este hecho hace que el ligando presente una mayor flexibilidad y se minimicen las repulsiones electrostáticas entre grupos amino cargados.

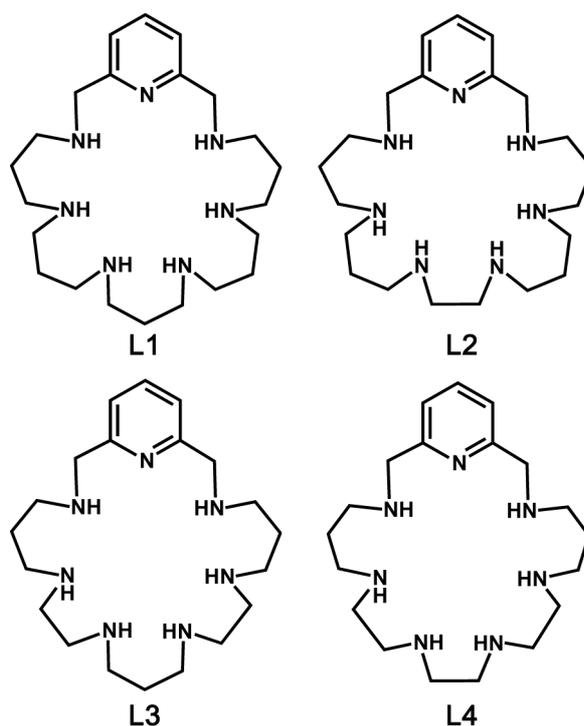


Figura 5. 6. Esquema de los receptores descritos en este capítulo.

5. 5. Estudios de especiación.

Tal y como hemos descrito, el centro activo de la enzima SOD está formado por un átomo de Cu(II) y un átomo de Zn(II), unidos mediante un puente imidazolato. Por tanto, en primer lugar realizamos los estudios, con los diferentes receptores, para determinar la formación de especies de los sistemas: Cu(II)-L, Zn(II)-L, Cu(II)-Zn(II)-L, Cu(II)-L-(Im), Zn(II)-L-(Im) y Cu(II)-Zn(II)-L-(Im) mediante potenciometría, espectroscopia UV-vis, difracción de rayos X y RMN paramagnético.

5. 5. 1. Comportamiento ácido-base.

Los receptores que hemos utilizado son poliaminas y por tanto, presentan carácter básico. Debido a que se produce una reacción de competición entre la entrada de un protón y la coordinación de un átomo metálico, es importante determinar las constantes de protonación, previamente, mediante estudios potenciométricos. En la tabla 5. 2 se recogen los valores logarítmicos para el nuevo receptor (**L1**), así como las de sus análogos (**L2-L4**).

Tabla 5. 2. Logaritmos de las constantes de protonación para los receptores **L1-L4**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L1	L2 ^[d]	L3 ^[e]	L4 ^[d]
L + H ⇌ LH	10.67(2) ^[b]	10.67(1)	9.82(2)	10.04(2)
HL + H ⇌ H ₂ L	9.41(1)	9.85(1)	9.38(2)	9.43(2)
H ₂ L + H ⇌ H ₃ L	8.24(5)	8.60(1)	8.28(2)	8.45(2)
H ₃ L + H ⇌ H ₄ L	7.35(7)	7.49(1)	7.35(2)	7.53(2)
H ₄ L + H ⇌ H ₅ L	6.98(9)	7.12(1)	5.83(3)	5.89(2)
H ₅ L + H ⇌ H ₆ L	5.87(2)	4.99(2)	4.66(4)	2.83(3)
logβ ^[c]	48.44(2)	48.72(1)	45.32(2)	44.18(2)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa; [c] Constante de basicidad global $\log\beta = (\Sigma K_{HjL})$; [d] Datos tomados de la referencia 22; [e] Datos tomados de la referencia 23.

Determinamos un total de seis constantes de protonación, para cada receptor, que se corresponden con las protonaciones de los seis grupos amino secundarios de la cavidad macrocíclica. Los valores obtenidos para las cuatro primeras constantes de **L1** son similares al resto de receptores. En cambio, a partir de la quinta constante de protonación identificamos en los ligandos dos comportamientos en función del número de cadenas propilénicas presentes en el macrociclo (**L1-L2** y **L3-L4**), ya que la secuencia de protonación de los grupos amino de los macrociclos está sujeta a las consideraciones de densidad de carga y repulsiones electrostáticas entre éstos. Por esta razón, dependiendo del macrociclo con el que lo comparemos, la constante de

protonación de **L1**, en la quinta y sexta etapa, puede ser incluso dos ordenes de magnitud mayor. En la figura 5. 7 se muestran los diagramas de distribución de las diferentes especies en función del pH.

Respecto a la basicidad global, como cabría esperar, **L1** y **L2** son los receptores más básicos, ya que presentan un mayor número de cadenas propilénicas que permite que se minimicen en mayor medida las repulsiones electrostáticas entre los grupos amino protonados.²⁴

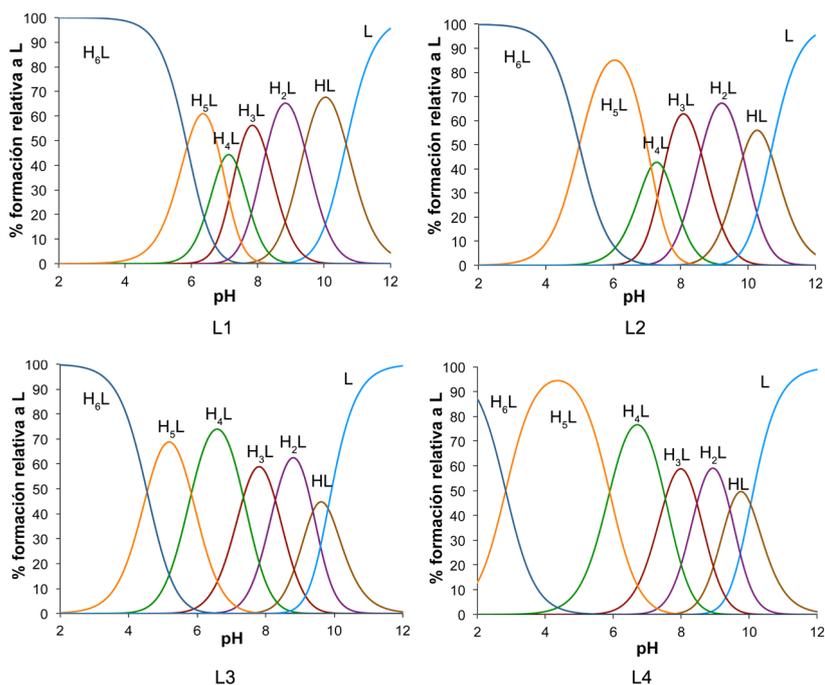


Figura 5. 7. Diagramas de distribución de especies para los receptores **L1-L4**.

5. 5. 2. Estudios de especiación con Cobre (II).

En la tabla 5. 3 se recogen las constantes de formación de los diferentes complejos formados con Cu(II). Para todos los ligandos, determinamos la formación de complejos tanto mono- como

binucleares. En concreto, **L1** forma complejos mononucleares con estequiometría $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$, tomando x valores entre 0 y 4, y los complejos binucleares $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$.

Tabla 5. 3. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II) con los receptores **L1-L4**, determinados a 298.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^[a]	L1	L2 ^[c]	L3 ^[d]	L4 ^[c]
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	17.22(6) ^[b]	18.34(3)	20.38(2)	19.29(3)
$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	9.75(3)	9.53(3)	8.24(2)	9.64(3)
$\text{CuHL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	7.44(2)	7.56(3)	7.35(2)	6.71(2)
$\text{CuH}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$	6.13(2)	4.65(2)	3.07(2)	3.36(2)
$\text{CuH}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}$	3.82(2)	4.69(2)	-	-
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	25.78(6)	30.03(3)	30.47(2)	30.21(3)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	-7.21(6)	-7.72(3)	-7.37(2)	-10.07(4)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa; [c] Datos tomados de la referencia 22; [d] Datos tomados de la referencia 23.

- Especies mononucleares.

El análisis exhaustivo de las constantes de protonación del complejo metálico y las del ligando libre proporcionan un valor estimado del número de átomos de nitrógeno implicados en la coordinación del metal. Para ello, debemos tener en cuenta aquellos equilibrios, tanto de los complejos como del ligando libre, en los que las especies afectadas tienen la misma carga global. Cuando la constante de protonación del complejo, $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$, es del mismo orden o superior a la constante de protonación del ligando libre,

$[\text{H}_{(2+x)}\text{L}]^{(2+x)+}$, se puede sugerir que la protonación ocurre en un átomo de nitrógeno no implicado en la coordinación del metal. En el caso contrario, cuando es significativamente menor, se puede concluir que la protonación ocurre en un átomo de nitrógeno implicado en la coordinación del metal.

En el caso de **L1**, los valores logarítmicos de las constantes de protonación obtenidos para las especies $[\text{CuHL}]^{3+}$, $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ y $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$ son 9.75, 7.44 y 6.13, respectivamente. Si se comparan con los valores de las constantes de protonación del ligando con la misma carga global ($[\text{H}_3\text{L}]^{3+}$, $[\text{H}_4\text{L}]^{4+}$ y $[\text{H}_5\text{L}]^{5+}$) se observa que $\log K[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+} \geq \log K[\text{H}_{(2+x)}\text{L}]^{(2+x)+}$ en todos los casos. Por tanto, podemos concluir que la protonación ocurre en átomos de nitrógeno que no están implicados en la coordinación del metal y, al menos, cuatro de los siete nitrógenos del macrociclo participan en la coordinación del metal. En el caso de los ligandos **L2-L4**, los valores de las constantes de formación decrecen con la formación de la especie $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$, siendo $\log K[\text{H}_5\text{L}]^{5+} > \log K[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$, por lo que sugiere que, al menos, cinco de los grupos amino coordinan del metal.

La formación de las diferentes especies en función del pH, para una relación molar Cu(II):L 1:1, se muestran en los diagramas de distribución de la figura 5. 8. En éstos observamos la formación de especies mononucleares a partir de valores de pH 4, para todos los receptores.

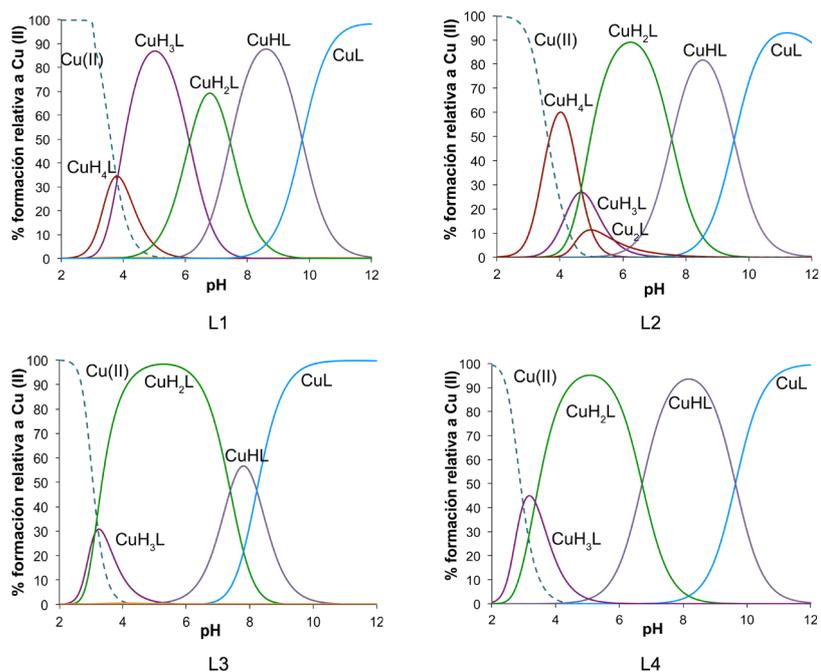


Figura 5. 8. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores **L1-L4** con Cu(II) en relación molar Cu(II):L 1:1 $[Cu(II)] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

Con el fin de poder obtener más información acerca de los nitrógenos implicados en la coordinación del metal, registramos los espectros de absorción de una disolución de Cu(II) y **L1**, para una relación molar Cu(II): L 1:1 a diferentes valores de pH (figura 5. 9).^a Se observa un máximo de absorción a 300 nm, coincidiendo con la formación de la especie $[CuH_4L]^{6+}$. Una vez se alcanza el máximo de absorbancia, el valor se mantiene invariable en el resto del intervalo de pH explorado. Estos cambios producidos en la banda de absorción

^a Ver anexo A. 5. 1. Variación de la absorbancia en función de la formación las especies para los sistemas Cu(II)-**L2** y Cu(II)-**L3**. En el caso de **L4** no pudimos completar el estudio.

del anillo de piridina nos sugieren que uno de los átomos implicados en la coordinación del metal es el nitrógeno de la piridina. Los otros dos átomos implicados en la coordinación son de la cadena poliamínica y su interacción con el metal se observa en los cambios de absorbancia de la banda d-d a 600 nm.

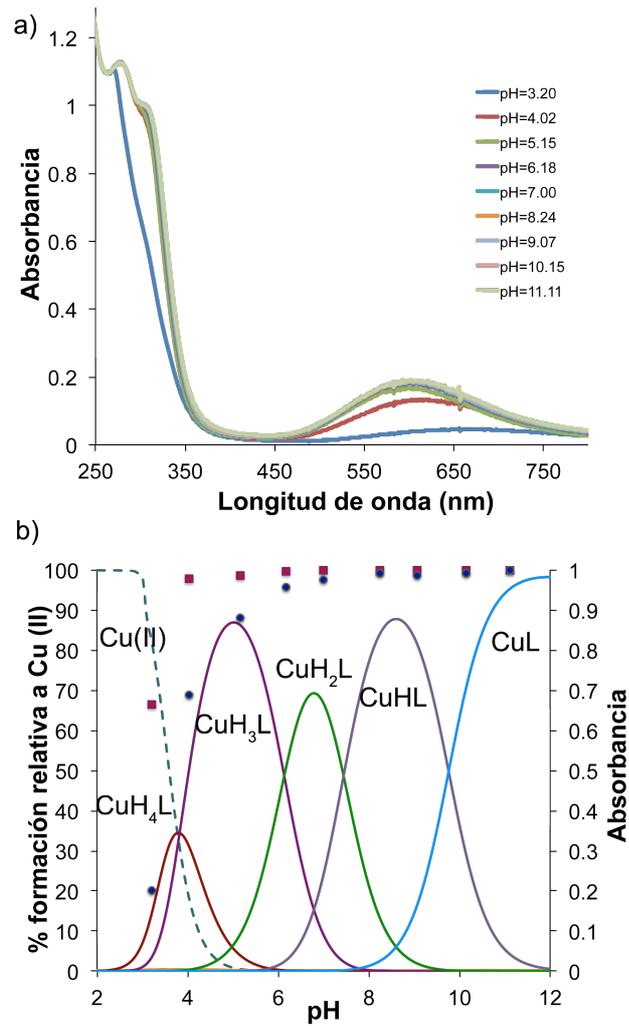


Figura 5. 9. a) Espectros UV-vis de una disolución acuosa que contiene Cu(II)-L1, en una relación molar 1:1, recogidos en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-L1 junto con los valores de absorbancia normalizados a 300 (cuadros/rojos) y 600 nm (círculos/azules). $[Cu(II)] = [L] = 1 \times 10^{-3} M$.

La existencia de complejos metálicos con un elevado número de grupos amino protonados y la participación del nitrógeno de la piridina en la coordinación del metal, se vio apoyada con la obtención

de la estructura cristalina del complejo $[\text{CuH}_4\text{L2}(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ aislada a partir de una disolución acuosa de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y **L2** (figura 5. 10).^b

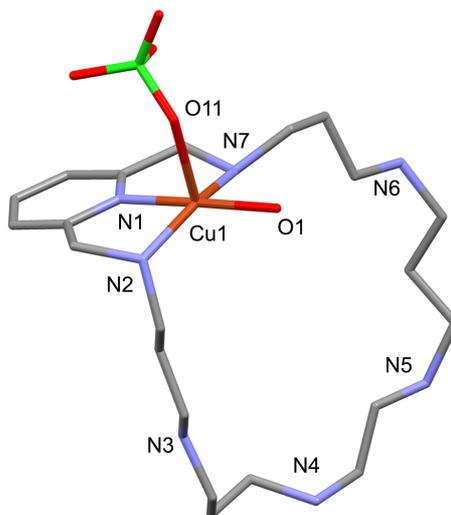


Figura 5. 10. Estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}(\text{H}_4\text{L2})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{5+}$.

La unidad asimétrica está formada por cationes $[\text{Cu}(\text{H}_4\text{L2})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{5+}$, aniones perclorato y moléculas de agua. El átomo de cobre adopta una geometría de pirámide de base cuadrada, en el que la base la forman el nitrógeno del anillo de la piridina (N1), los dos nitrógenos de los grupos amino de la cadena poliamínica adyacentes al anillo de piridina (N2 y N7) y el oxígeno de una molécula de agua (O1). Axialmente se coordina a un oxígeno de una molécula de perclorato (O11). Las distancias y los ángulos de enlace más relevantes se recogen en la tabla 5. 4.

Es interesante resaltar que un anión perclorato se sitúa en la parte de la cavidad macrocíclica cargada positivamente (figura 5. 11). Ésta molécula interacciona electrostáticamente con los grupos amino

^b Anexo A. 5. 2. Datos cristalográficos de **CS1**.

protonados, formando enlaces de hidrógeno con uno de ellos (N3-H3C···O31). También forma enlaces de hidrógeno, de forma bifurcada, con una molécula de agua (O1-H1WB···O32) y con uno de los NH coordinantes (N7-H7···O32).

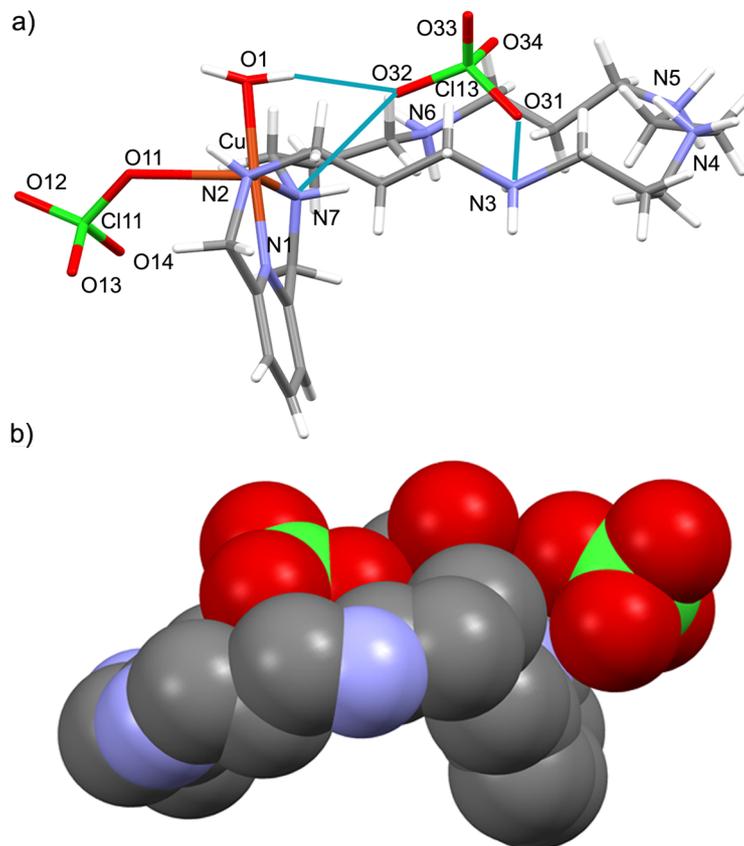


Figura 5. 11. a) Red de enlaces de hidrógeno en $[\text{Cu}(\text{H}_4\text{L2})(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{5+}$; b) vista en spacefill.

Tabla 5. 4. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura [Cu(H₄L2)(H₂O)(ClO₄)](ClO₄)₅·3H₂O.

Distancias seleccionadas / Å		Ángulos seleccionados / deg.	
Cu1-O1	1.966(6)	O1-Cu1-O11	84.8(3)
		N1-Cu1-N7	82.5(3)
Cu1-O11	2.338(7)	N7-Cu1-O11	111.6(3)
		O1-Cu1-N7	96.3(3)
Cu1-N1	1.909(7)	N1-Cu1-O11	97.4(3)
		N1-Cu1-N2	82.7(3)
Cu1-N2	2.063(7)	N2-Cu1-O11	87.7(3)
Cu1-N7	2.043(8)	O1-Cu1-N2	98.0(3)

- Especies binucleares.

Los valores de las constantes para el equilibrio $\text{Cu}^{2+} + [\text{CuL}]^{2+} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, son 7.96(6), 11.69(3), 10.10(2) y 10.92(3) para **L1**, **L2**, **L3** y **L4**, respectivamente. Llama la atención, la diferencia de tres unidades logarítmicas entre los valores obtenidos con **L1** y **L2**. Este hecho puede relacionarse con el número de anillos quelato de cinco y seis miembros que se forman, en la parte central de la cadena poliamínica, al coordinar el átomo metálico. Sabemos que la alternancia de los anillos de seis y cinco miembros aporta estabilidad adicional al complejo.²⁵ Tal y como se observa en la figura 5. 12, **L1** forma únicamente anillos de seis miembros, mientras que **L2** forma anillos alternados de seis y cinco miembros. Esta alternancia aporta estabilidad al complejo y se refleja en el valor de la constante de formación. Tal y como se verá más adelante, este hecho también influye en la actividad SOD.

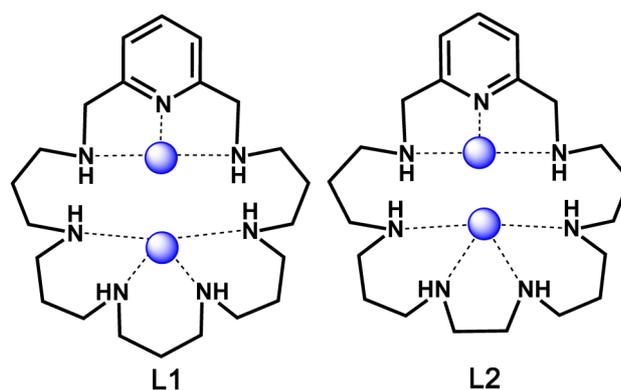


Figura 5. 12. Formación de anillos quelato de seis y cinco miembros en los receptores **L1** y **L2**.

En la figura 5. 13 se muestran los diagramas de distribución de especies para los sistemas Cu(II)-L para una relación molar 2:1. En el caso de **L1**, las especies con dos átomos metálicos se forman a partir de valores de pH próximos a 6. La especie $[\text{Cu}_2\text{L1}]^{4+}$ coexiste en equilibrio con otras especies entre los valores de pH 6 y 8, mientras que para el resto de receptores ésta es una especie mayoritaria. A partir de pH 7.5, **L1** forma la especie predominante $[\text{Cu}_2\text{L1}(\text{OH})]^{3+}$. Esta misma especie se observa para todos los receptores, aunque en el caso de **L2** y **L4**, se forma a valores de pH ligeramente más básicos.

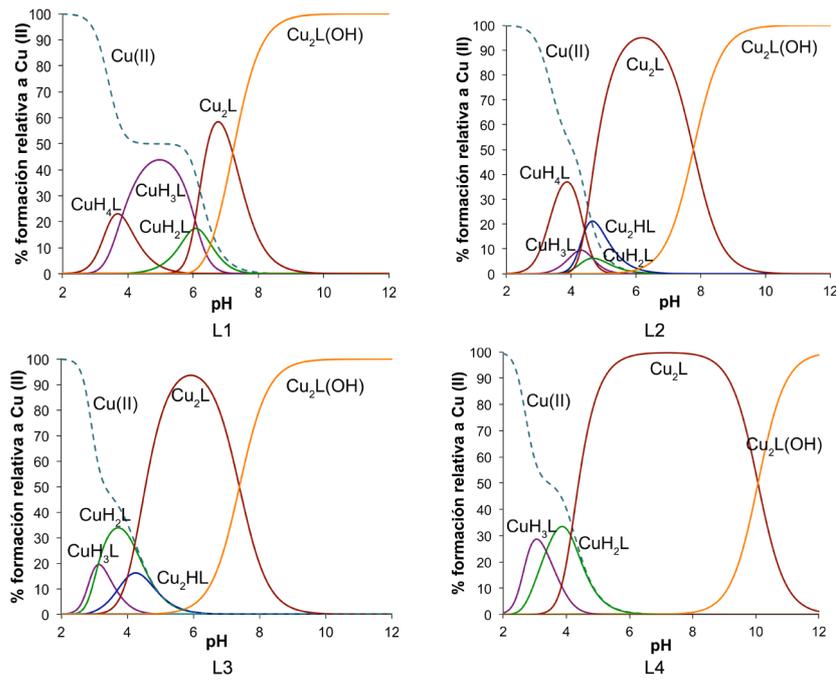


Figura 5. 13. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores L1-L4 con Cu(II) en relación molar Cu(II):L 2:1 [Cu(II)] = 2×10^{-3} M [L] = 1×10^{-3} M.

5. 5. 3 Estudios de especiación con Cinc (II).

Debido a la presencia de un átomo de cinc en el centro activo de la SOD, decidimos determinar las constantes de estabilidad de los diferentes complejos que forma éste con los receptores. En la tabla 5. 5 se recogen los valores determinados para las constantes logarítmicas de las especies mono- y binucleares.

Tabla 5. 5. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Zn(II) con los receptores **L1-L4**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L1	L2 ^[c]	L3 ^[d]	L4 ^[c]
Zn + L ⇌ ZnL	10.32(4) ^[b]	10.76(4)	10.80(3)	10.75(4)
ZnL + H ⇌ ZnHL	8.24(4)	9.28(3)	8.42(3)	9.33(3)
ZnHL + H ⇌ ZnH ₂ L	6.99(3)	6.65(6)	7.11(2)	6.50(7)
ZnH ₂ L + H ⇌ ZnH ₃ L	-	6.97(4)	-	7.15(5)
Zn + L + H ₂ O ⇌ ZnL(OH) + H	0.21(6)	0.005(5)	0.98(4)	-0.10(5)
2Zn + L ⇌ Zn ₂ L	-	15.69(5)	14.47(7)	15.57(7)
2Zn + L + H ₂ O ⇌ Zn ₂ L(OH) + H	6.36(6)	8.10(2)	-	8.09(2)
2Zn + L + 2H ₂ O ⇌ Zn ₂ L(OH) ₂ + 2H	-2.03(1)	-1.80(3)	-0.84(3)	-1.80(3)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa; [c] Datos tomados de la referencia 22; [d] Datos tomados de la referencia 23.

- Especies mononucleares.

Trabajando con la relación molar Zn(II):L 1:1 determinamos las constantes de formación de las especies [ZnH_xL]^{(2+x)+} siendo x valores comprendidos entre 2 y -1. En el caso de los ligandos **L2** y **L4** determinamos una constante de estabilidad adicional correspondiente a la especie triprotonada [ZnH₃L]⁵⁺. Como en el caso anterior, de los valores de las constantes de protonación de los complejos podemos estimar el número de grupos amino implicados en la coordinación del metal. En este caso los valores logarítmicos obtenidos para las especies [ZnHL]³⁺ y [ZnH₂L]⁴⁺, con **L1**, son 8.24 y 6.99, respectivamente. Si los comparamos con los valores de las constantes

de protonación del ligando con la misma carga global ($[\text{H}_3\text{L}]^{3+}$ y $[\text{H}_4\text{L}]^{4+}$) se observa que, en ambos casos, $\log K[\text{ZnH}_x\text{L}]^{(2+x)+} \geq \text{Log} K[\text{H}_{(2+x)}\text{L}]^{(2+x)+}$, lo que sugiere que al menos dos de los siete nitrógenos del ligando no participan, o lo hacen muy débilmente, en la coordinación del metal.

Es importante destacar que, los valores de las constantes de formación de complejos con cinc son inferiores a las obtenidas con cobre. Esto es debido a que el Zn(II) no presenta la contribución de estabilidad del campo cristalino. Si nos fijamos en los diagramas de distribución de especies de la figura 5. 14, se observa que, a diferencia de lo que ocurre con el cobre, la formación de los complejos con cinc no se produce hasta alcanzar valores de pH 5.5 - 6.0. Además, es importante destacar la formación de especies hidroxiladas mono- y binucleares a pH alcalinos.

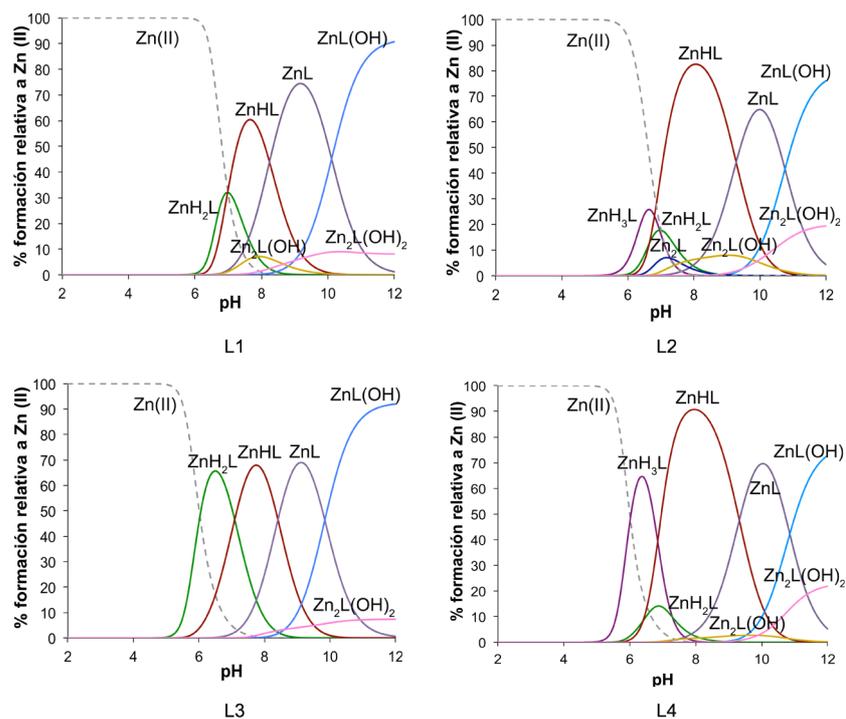


Figura 5. 14. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores L1-L4 con Zn(II) en relación molar Zn(II):L 1:1 $[Zn(II)] = [L] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

- Especies binucleares.

Los estudios realizados utilizando una relación molar Zn(II):L 2:1, indican que las especies binucleares $[Zn_2L]^{4+}$, $[Zn_2L(OH)]^{3+}$ y $[Zn_2L(OH)_2]^{2+}$ son predominantes a partir de valores de pH 6. Esto ocurre para todos los ligandos excepto L1, que en cuyo caso sólo se pudo determinar la formación de las dos especies hidroxiladas (figura 5. 15). Esto puede ser debido, atendiendo a los valores de las constantes, a que la especie $[Zn_2L]^{4+}$ es poco estable e hidroliza fácilmente. En el caso de L3, sólo se determinó la formación de una especie hidroxilada ($[Zn_2L(OH)_2]^{2+}$).

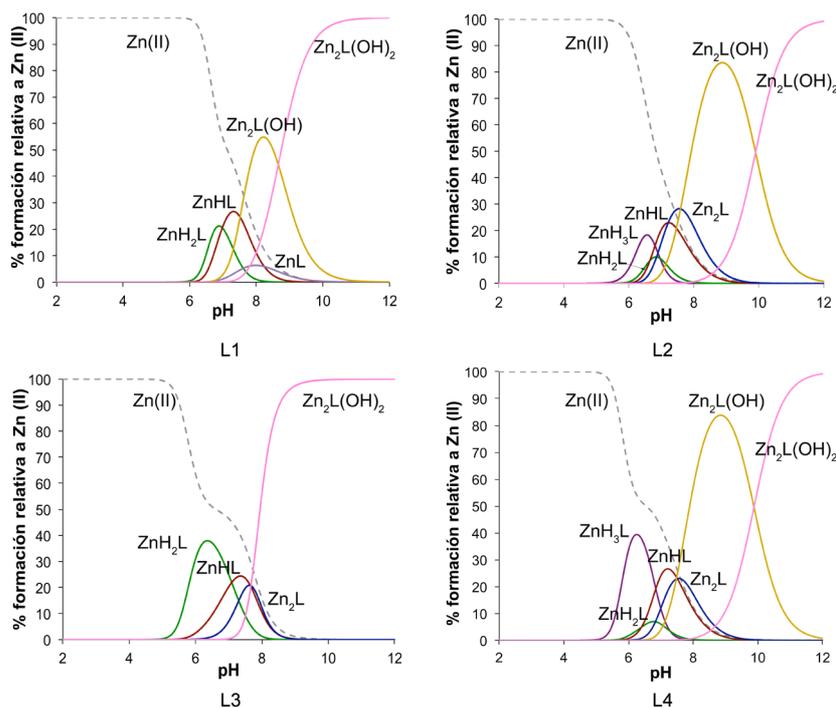


Figura 5. 15. Diagramas de distribución de especies para la interacción de los receptores **L1-L4** con Zn(II) en relación molar Zn(II):L 2:1 $[Zn(II)] = 2 \times 10^{-3}$ M; $[L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

5. 5. 4. Estudios de especiación con cobre-cinc y cobre-cinc-imidazol.

Como el centro activo de la SOD está formado por un átomo de cobre y un átomo de cinc unidos a través de un puente imidazolato, realizamos estudios para determinar la formación de complejos Cu(II)-Zn(II)-L y Cu(II)-Z(II)-L-Im. Previamente, debemos determinar las constantes de formación de complejos de los sistemas Cu(II)-L y Zn(II)-L con imidazol. En estas condiciones, el sistema se vuelve muy complejo puesto que se introducen muchos equilibrios que se solapan, por lo que, aunque en un principio iniciamos los estudios con todos los ligandos, finalmente nos limitamos al estudio del receptor **L1**.

- Especies heterobinucleares.

Mediante estudios potenciométricos pudimos determinar un total de tres constantes de formación de complejos heterobinucleares, tal y como se recoge en la tabla 5. 6.

Tabla 5. 6. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II)-Zn(II) con el receptor **L1**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción [a]	L1
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuZnHL}$	30.23(6) ^[b]
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{OH}) + \text{H}$	14.44(3)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{OH})_2 + 2 \text{H}$	6.24(3)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Es interesante destacar que no se pudo determinar la formación de la especie heterobinuclear [CuZnL]⁴⁺. Este hecho no es de extrañar, ya que si volvemos a las tablas 5. 3 y 5. 5, dónde se recogen las constantes de formación de los complejos homobinucleares para cobre y cinc, podemos comprobar que **L1** presenta la constante de formación más pequeña de todos los receptores para la especie Cu₂L y no se pudo determinar la formación de la especie Zn₂L.

En el diagrama de distribución de especies observamos la formación de especies mononucleares de cobre a valores de pH entre 3-7 (figura 5. 16), hecho que cabría esperar, puesto que como se ha visto anteriormente (ver figura 5. 14) la coordinación del cinc ocurre a valores de pH superiores. La especie [CuZnHL]⁵⁺ coexiste, en la misma proporción, con la especie [CuHL]³⁺ entre valores de pH 6-8 y,

a valores de pH más alcalinos, predominan las especies hidroxiladas $[\text{CuZnL}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{CuZnL}(\text{OH})_2]^{2+}$.

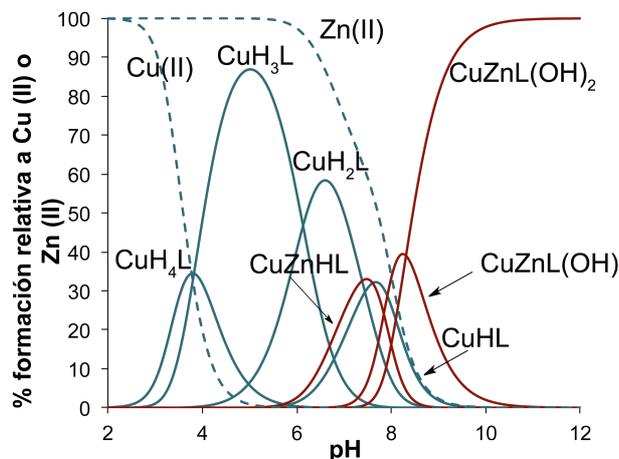


Figura 5. 16. Diagrama de distribución de especies para el sistema L1 con Cu(II) y Zn(II) en relación molar Cu(II):Zn(II):L 1:1:1 $[\text{Cu(II)}] = [\text{Zn(II)}] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

- Especies con Imidazol.

En el centro activo de la enzima, los átomos de cobre y cinc se encuentran unidos a través del anillo imidazolato de la His-61. El anillo de imidazol se protona (HIm) a valores de pH ácidos y la coordinación de un metal, provoca la pérdida del protón del átomo de N y pasa a estar en su forma neutra (Im). A valores de pH muy alcalinos y con la posibilidad de poder coordinar otro centro metálico, pierde el protón del segundo átomo de N para dar lugar a la forma aniónica o imidazolato (H_{-1}Im) (figura 5. 17).

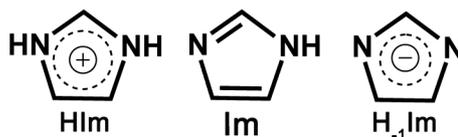


Figura 5. 17. Molécula de imidazol en su forma: catiónica, neutra y aniónica.

Especies homonucleares de Cu(II) con imidazol.

En la tabla 5. 7 se recogen los valores de las constantes de formación calculados de los complejos formados con el sistema Cu(II)-L-Im. Determinamos un total de seis constantes, siendo tres de ellas especies mononucleares y tres especies binucleares.

Tabla 5. 7. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II)-L-Im con el receptor **L1**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción [a]	L1
$\text{Cu} + \text{L} + 2\text{H} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}(\text{Im})$	38.97(8) ^[b]
$\text{Cu} + \text{L} + 3\text{H} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}(\text{Im})$	45.82(1)
$\text{Cu} + \text{L} + 4\text{H} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}(\text{Im})$	50.43(2)
$2\text{Cu} + \text{L} + \text{H} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{HL}(\text{Im})$	36.31(5)
$2\text{Cu} + \text{L} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{Im})$	29.79(2)
$2\text{Cu} + \text{L} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{H}_{-1}\text{Im}) + \text{H}$	22.28(1)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Según el diagrama de distribución que se representa en la figura 5. 18, los sistemas binucleares con imidazol se forman a partir de pH 6. A valores de pH menores, se forman diferentes especies

mononucleares que coexisten con el imidazol libre, mientras que a partir de pH 7.5 el ligando **L1** empieza a formar la especie $[\text{Cu}_2\text{L1}(\text{H}_1\text{Im})]^{3+}$, siendo ésta la especie mayoritaria a partir de pH 8.

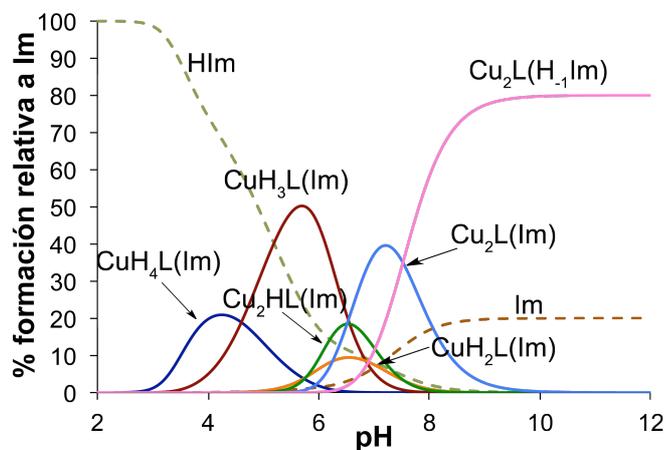


Figura 5. 18. Diagramas de distribución de especies para el sistema Cu(II)-L1-Im en relación molar Cu(II):L:Im 2:1:1 $[\text{Cu(II)}] = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{Im}] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

Los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L1-Im, se estudiaron también mediante estudios de RMN paramagnético. Adquirimos los espectros de ^1H , determinamos los tiempos de relajación longitudinal y transversal (T_1 y T_2) y analizamos la dependencia de las señales paramagnéticas con la temperatura. En la tabla 5. 8 se resume la información recopilada a partir de los estudios y en la figura 5. 19 se muestra los espectros obtenidos para los dos sistemas a pH 7.

Tabla 5. 8. Datos obtenidos a partir de los análisis de ^1H paramagnético de los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L1-Im, en relación molar 2:1 y 2:1:1, en D_2O a 298 K.

Sistema	Señal	δ (ppm)	Número de protones	Asignación	Dependencia temperatura	T_1^a	$\Delta\nu \frac{1}{2}$ (Hz) ^b	T_2^c
Cu ₂ L1 ^d	a	8.8	10	β CH ₂	Anti-Curie	3.8	230	1.4
	c	2.9			Anti-Curie	9.1	160	2.0
	d	1.8	3	Hm, p-py	Anti-Curie	8.5	132	2.4
	b	7.5			Anti-Curie	<1	-370	-0.86
	e	-2.0	24	α CH ₂	Curie	<1	1209	0.26
	f	-9.9			Curie	<1	1279	0.25
Cu ₂ L1(Im) ^e	a'	8.8	10	β CH ₂	Anti-Curie	3.3	179	1.8
	c'	3.0			Anti-Curie	8.4	102	3.1
	d'	1.8	3	Hm, p-py	Anti-Curie	8.4	96	3.3
	b'	7.5			Anti-Curie	<1	-324	-0.98
	e'	-1.8	24	α CH ₂	Curie	<1	1194	0.27
	f'	-10.0			Curie	<1	1313	0.24
	g'	20.0	3	α CH-Im	Curie	<1	3821	0.08

[a] Tiempo de relajación longitudinal; [b] Anchura de la banda a media altura; [c] Tiempo de relajación transversal. [d] Cu₂L: sistema Cu(II)-L; [e] Cu₂L(Im): sistema Cu(II)-L-Im.

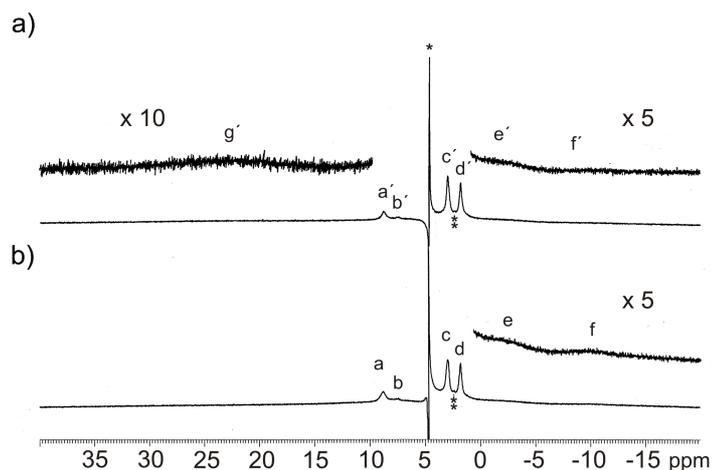


Figura 5. 19. Espectros ^1H paramagnético en D_2O a 298 K de los sistemas a) Cu(II)-L1-Im ; b) Cu(II)-L1 . $[\text{L}] = [\text{Im}] = 3 \times 10^{-3} \text{ M}$; $[\text{Cu(II)}] = 6 \times 10^{-3} \text{ M}$.

En el espectro ^1H del sistema Cu(II)-L1 , para una relación molar 2:1 ($\text{Cu}_2\text{L1}$), se observan un total de cinco señales paramagnéticas de las que podemos diferenciar, según la anchura de las señales y los valores de T_1 y T_2 obtenidos, tres señales de protones α y dos de protones β . Las señales de los protones (α) correspondientes a los carbonos contiguos a los grupos amino que participan en la coordinación del metal, suelen presentar una anchura igual o mayor de 500 Hz y los tiempos T_1 y T_2 suelen ser menores a 1, mientras que las señales de los protones en posición β respecto al grupo amino que participa en la coordinación, suelen ser más estrechas y sus tiempos de relajación longitudinal y transversal mayores a 1 ms.

El espectro registrado para el sistema Cu(II)-L1-Im , en una relación molar 2:1:1 ($\text{Cu}_2\text{L1(Im)}$), es muy similar al anterior, salvo que se observa una nueva señal muy ancha de tipo α , que podríamos asignar a los protones del anillo de imidazol. El hecho de que solamente se observe un tipo de señal indica que los dos átomos de

Cu(II), probablemente, se encuentren unidos a través del puente imidazolato (Cu-N-N-Cu) como se observa en el esquema de la figura 5. 20.

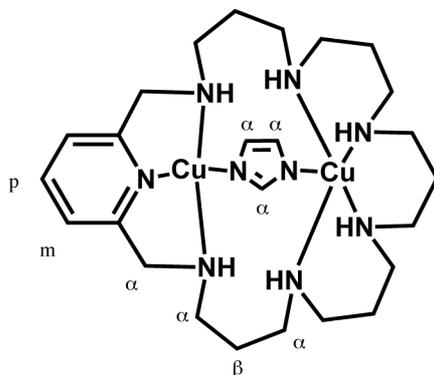


Figura 5. 20. Esquema del sistema Cu₂L1(Im).

Además, la anchura de las señales a media altura disminuye en la mayor parte de las señales con respecto al sistema Cu₂L1. Este hecho apoya la hipótesis de la unión de los centros metálicos mediante el puente imidazolato, puesto que implica un aumento en el grado de acoplamiento de espín en sistemas binucleares, como ya se observó en el sistema análogo de terpiridina que se muestra en la figura 1. 21.²¹

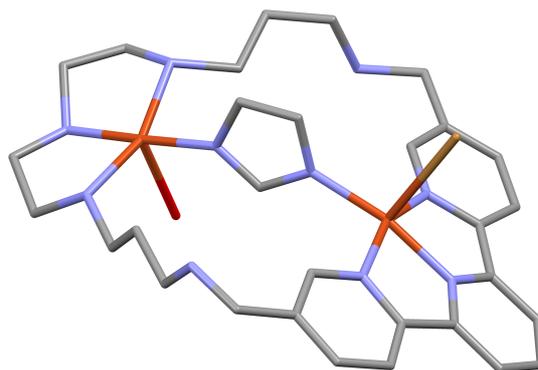


Figura 5. 21. Estructura cristalina de un receptor que contiene una unidad de terpiridina y una cadena poliamínica. Los dos átomos de cobre se encuentran unidos mediante un anillo imidazolato.²¹

Los estudios de los desplazamientos químicos de las señales en función de la temperatura se hizo entre los valores de temperatura 238 y 323 K, incrementando 10 K con cada adquisición. Según el análisis de los resultados, parte de las señales sufren un desplazamiento químico hacia campo bajo con el aumento de la temperatura, típico de un comportamiento anti-Curie. La existencia de señales anti-Curie son características de sistemas binucleares de cobre con acoplamiento antiferromagnético.^{21,26}

Especies homonucleares de Zn(II) con imidazol.

En el caso de los sistemas Zn(II)-L-Im, al igual que en el caso de los complejos de Zn(II), se aprecia la formación de un menor número de especies. En la tabla 5. 9 se recogen las constantes de formación de complejos determinadas mediante estudios potenciométricos.

Tabla 5. 9. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Zn(II)-Im con el receptor **L1**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L1
$2\text{Zn} + \text{L} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}(\text{Im})$	24.58(7) ^[b]
$2\text{Zn} + \text{L} + \text{H} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{HL}(\text{Im})$	17.38(3)
$2\text{Zn} + \text{L} + \text{Im} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}(\text{H}_{-1}\text{Im})(\text{OH}) + 2\text{H}$	1.48(2)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

En este caso sólo determinamos la formación de especies binucleares. Tal y como se muestra en el diagrama de distribución de especies de la figura 5. 22 estas especies se forman a partir de valores de pH 6.

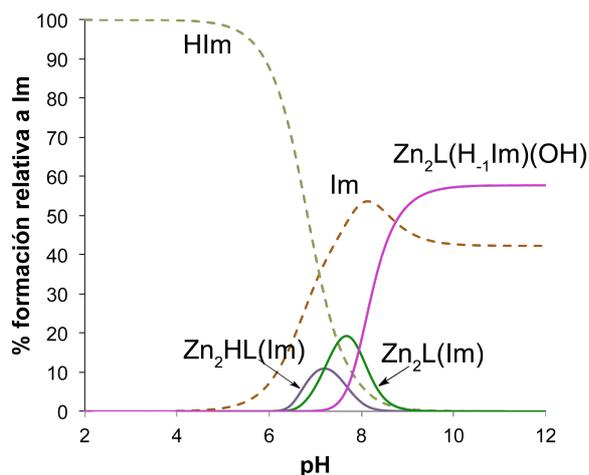


Figura 5. 22. Diagramas de distribución de especies para el sistema del receptor **L1** con Zn(II)-Im en relación molar Zn(II):L:Im 2:1:1 $[Zn(II)] = 2 \times 10^{-3}$ M; $[Im] = [L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

Especies heterobinucleares con imidazol.

Finalmente, se realizaron los estudios de especiación para los sistemas Cu(II)-Zn(II)-L-Im mediante estudios potenciométricos. En la tabla 5. 10 se recogen los valores de las constantes de estabilidad de los complejos obtenidas.

Tabla 5. 10. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II)-Zn(II)-Im con el receptor **L1**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L1
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{CuZnHL}(\text{Im})$	35.18(2) ^[b]
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{Im})$	27.11(5)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{Im} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{H}_1\text{Im})$	19.38(2)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{Im} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{H}_1\text{Im})(\text{OH}) + 2\text{H}$	10.84(1)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Para **L1** pudimos determinar la formación de cuatro especies cuaternarias que, tal y como se muestra en el diagrama de distribución de especies de la figura 5. 23, se forman entre los valores de pH 6 y 12. A valores de pH inferiores se observa especies mononucleares Cu(II)-L-Im y los metales y el imidazol en su forma libre.

Entre los valores de pH 7 y 9, coexisten las especies [CuZnHL**L1**(Im)]⁵⁺, [CuZn**L1**(Im)]⁴⁺, [CuZn**L1**(H₁Im)]³⁺, imidazol y Zn(II) (en su forma libre) y las especies mononucleares de Cu(II), [CuH₃**L1**(Im)]⁵⁺ y [CuH₂**L1**(Im)]⁴⁺. A partir de pH 9 se forma la especie mayoritaria [CuZn**L1**(H₁Im)(OH)]²⁺.

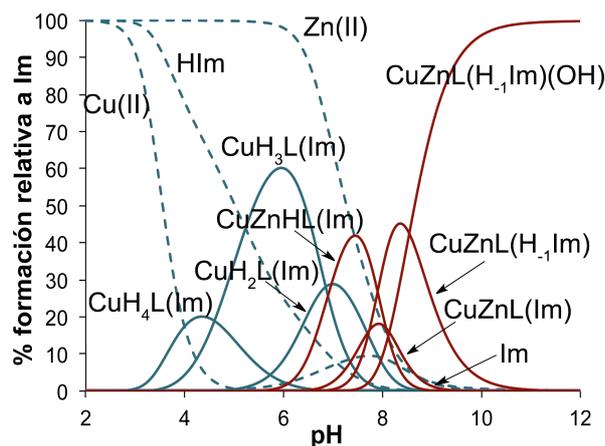


Figura 5. 23. Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-Zn(II)-Im con L1 en una relación molar Cu(II):Zn(II):L:Im 1:1:1:1 $[Cu] = [Zn] = [Im] = [L] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$.

5. 6. Estudios de la actividad SOD.

Una vez comprobado, mediante diferentes técnicas, que los receptores pueden formar a pH fisiológico complejos homo- y heterobinucleares de cobre y cinc, estudiamos la posibilidad de poder ser utilizados como miméticos de la SOD. Para determinar su eficacia como catalizador de la reacción de dismutación del anión superóxido utilizamos el método McCord-Fridovich.²⁷ Para ello, preparamos los complejos homobinucleares (Cu_2L y Cu_2LIm) y heterobinucleares ($CuZnL$ y $CuZnLIm$) con cada uno de los receptores en medio tamponado con TRIS a pH = 7.4 y utilizamos como referencia el nitroazul de tetrazolio.

El sistema xantina/xantina oxidasa es el responsable de la producción de anión superóxido. Éste reacciona con el nitroazul de tetrazolio (NBT) reduciéndolo a formazán (indicador). En presencia de nuestros complejos metálicos, se produce una reacción de competición

entre el NBT y los complejos metálicos por reaccionar con el anión superóxido, por lo que cuanto menor es la formación de formazán, mayor es la actividad del complejo metálico a ensayar. Los resultados obtenidos mediante éste método se recogen en la tabla 5. 11.

Tabla 5. 11. Datos de la actividad SOD de **L1-L4**. Potenciales formales asignados al par Cu(II)/Cu(I) y respecto a NHE. Cargas omitidas.

Sistema	IC ₅₀ /μM	k _{cat} /10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹	E°/mV	logK _{dis}
Cu ₂ L1	0.11 (2)	27.00	-80	-3.72
Cu ₂ L2	1.2 (2)	2.37	-150	-1.53
Cu ₂ L3	0.22 (4)	13.50	-250	-1.12
Cu ₂ L4	0.24 (1)	12.50	-250	-0.03
CuZnL1	0.5 (2)	5.94	-300	-0.73
CuZnL2	0.22 (3)	13.0	-380	
CuZnL3	2.2 (2)	1.34	-60	
CuZnL4	1.7 (3)	1.75	-220	
Cu ₂ L1Im	0.25(5)	11.88	+90	
Cu ₂ L2Im	0.27(5)	11.00	-400	
Cu ₂ L3Im	0.24(6)	12.37	+80	
Cu ₂ L4Im	0.4(1)	7.42	-100	
CuZnL1Im	0.36(9)	8.25	-210	
CuZnL2Im	0.73(4)	4.07	-260	
CuZnL3Im	4.9(2)	0.65	-460	
CuZnL4Im	3.3(3)	0.90	-240	
Cu ₂ (bpzbiap)Cl ₃ ^a	0.25 ^a	11.9	-390	
Cu ₂ (bdpi) ^b	0.32 ^b	81.2	-110	
CuZn(bdpi)	0.24 ^b	108	-230	
Cu ₂ Zn ₂ SOD	0.010(2)	430	+320	

[a] **Hbpzbiap** = 1,5-bis(1-pirazolil)-3-[bis(2-imidazolil)metil] azapentano; [b] **Hbdpi** = 4,5-bis(di(2-piridilmetil)aminometil)imidazole.^{19,28}

El análisis de los valores de IC_{50} obtenidos para los sistemas Cu(II)-L y Cu(II)-L-(Im), en una relación molar 2:1 y 2:1:1, muestra una importante actividad catalítica por parte de algunas de las especies con respecto a los datos recogidos en la bibliografía.^{19,28} Esta elevada actividad puede ser debida a la flexibilidad de la cadenas poliamínicas de los macrociclos que les permite la reorganización molecular durante el proceso catalítico.²⁹

Un aspecto importante a la hora de estudiar miméticos de la SOD es determinar su potencial de reducción a pH fisiológico. Éste debe estar comprendido entre los valores -0.33 V ($O_2/O_2^{\cdot-}$) y 0.89 V (O_2/H_2O_2).³⁰ Para ello, realizamos los estudios de electroquímica de los sistemas Cu(II)-L y Cu(II)-L-(Im), en una relación molar 2:1 y 2:1:1, a diferentes valores de pH y concentración milimolar.

La figura 5. 24 muestra los voltamperogramas de los sistemas Cu₂L1 y Cu₂L1Im a pH fisiológico. Según los estudios potenciométricos, a este valor de pH, predominan las especies binucleares (véase diagrama de distribución figuras 5. 13 y 5. 18). En ambos casos se observan dos picos catódicos a -0.22 y -0.48 V para el par $E^0[Cu(II)/Cu(I)]$ y $E[Cu(I)/Cu(0)]$ con sus correspondientes picos anódicos a -0.38 y 0.0 V, respectivamente. El primer pico catódico se puede atribuir a la reducción de Cu(II) a Cu(I). El valor de la función de corriente aparente del pico es de $600 \text{ mA cm}^{-2} \text{ V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2} \text{ mM}^{-1}$, lo que sugiere que se produce la transferencia de un electrón por átomo metálico. Se observa un solo pico para la etapa de reducción de Cu(II) a Cu(I), por lo que pensamos que el número total de electrones implicados en el proceso es dos y existe una independencia electroquímica de los átomos metálicos. El pico anódico, a un potencial de reducción menos negativo, indica la formación de depósitos de

Cu(0), de forma que nos sugiere que en la segunda etapa ocurre la reducción de Cu(I) a Cu(0).

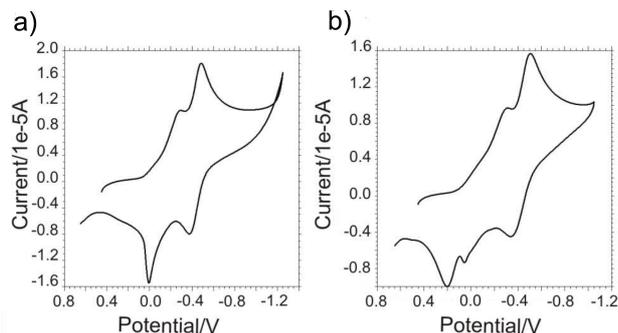


Figura 5. 24. Voltamperograma cíclico del sistema $\text{Cu}_2\text{L1}$ a pH 7.4, en NaClO_4 0.15 M. $[\text{L1}] = 10^{-3}$ M $[\text{Cu(II)}] = 2 \cdot 10^{-3}$ M. a) sin imidazol; b) ídem. con imidazol. Velocidad de barrido 50 mVs^{-1} .

En el caso de los complejos heterobinucleares, el sistema CuZnL1 a $\text{pH} = 7.4$ muestra un comportamiento electroquímico similar al caso anterior en el que observamos dos etapas de reducción. En cambio, la adición de imidazol al sistema produce cambios en su comportamiento electroquímico. Esto hecho se debe a que observamos la reducción directa en una sola etapa, con la participación de dos electrones. Esto ocurre de la misma manera para el sistema CuZnL1 a valores de pH mayores, donde predomina la especie $[\text{CuZnL1}(\text{OH})_2]^{2+}$. Se observa un pico anódico a -0.45 V y dos picos catódicos a -0.15 y 0.55 V .

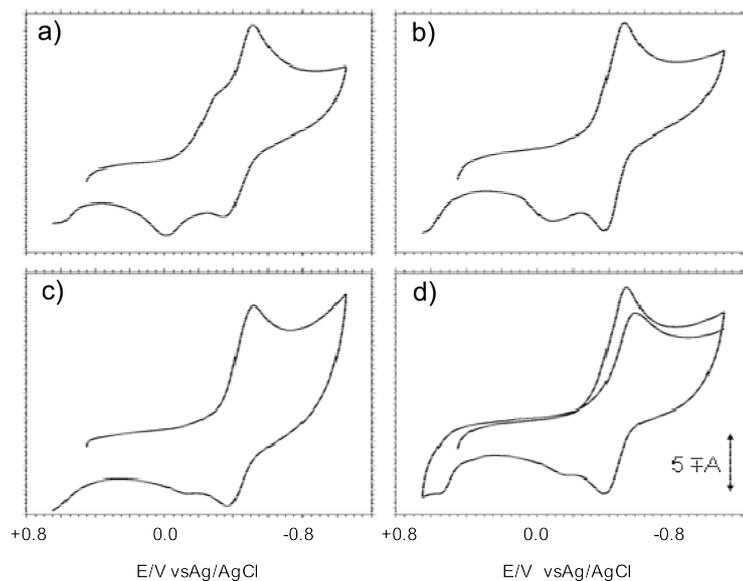
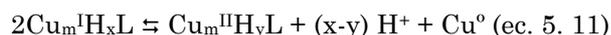


Figura 5. 25. Voltamperogramas cíclicos en NaClO_4 0.15 M de los sistemas: a) CuZnL1 a pH = 7.4 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = 1×10^{-3} M a) sin imidazol; b) CuZnL1(Im) a pH = 7.4 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = [Im] = 1×10^{-3} M; c) CuZnL1 a pH = 8.4 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = 10^{-3} M; d) CuZnL1 a pH = 9.5 [Cu(II)] = [Zn(II)] = [L1] = 1×10^{-3} M. Velocidad de barrido 50 mVs^{-1} .

Los resultados indican que la respuesta electroquímica, a pH neutro, se puede interpretar como un proceso que ocurre a través de dos etapas de reducción, mientras que a valores de pH básicos o en presencia de imidazol, el proceso ocurre en una sola etapa en la que los centros metálicos se encuentran electroquímicamente incomunicados ya que, de lo contrario, se observarían más señales correspondientes a las especies intermedias.

Considerando que se forman las especies $\text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L}$ y $\text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_y\text{L}$ a pH 7.4,^c determinamos los potenciales formales para el par $\text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L} / \text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_y\text{L}$ midiendo el potencial a media altura. No existe ninguna relación evidente entre los potenciales formales determinados y la actividad SOD de los complejos. Sin embargo, si podemos establecer una relación directa entre las constante de equilibrio de dismutación (ec. 5. 11) y la actividad SOD.³¹



Para ello, en primer lugar calculamos, mediante la ecuación 5. 12, las constantes de estabilidad de los complejos $\text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_y\text{L}$ ($\log \beta^{\text{I}}$) a partir de los potenciales formales E° (II/I) determinados de los datos voltamperométricos y las constantes de estabilidad de la especie $\text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L}$ ($\log \beta^{\text{II}}$) obtenidas mediante los estudios potenciométricos,

$$\log \beta^{\text{I}} = \log \beta^{\text{II}} + m [E^\circ (\text{II/I}) - E^\circ (\text{Cu(II)/Cu(I)})] / 59 + (y-x) \text{pH} \text{ (ec. 5. 12)}$$

donde E° (Cu(II)/Cu(I)) hace referencia al potencial de reducción del par Cu(II)/Cu(I) en un electrolito no complejante.

Una vez determinada $\log \beta^{\text{I}}$, podemos calcular la constante de dismutación $\log K_{\text{dis}}$ a partir de la ecuación ec. 5. 13

$$\log K_{\text{dis}} = \log \beta^{\text{II}} - 2 \log \beta^{\text{I}} + m \log K_{\text{dis}}(\text{Cu}^{\text{I}}) + \log \beta_x \text{ (ec. 5. 13)}$$

donde, $\log K_{\text{dis}}(\text{Cu}^{\text{I}}) = 6.24$ a 298 K y β_x hacen referencia a la constante de protonación de las especies H_xL . En este caso, sólo determinamos las $\log K_{\text{dis}}$ de los sistemas Cu(II)-L y el sistema CuZnL1 puesto que, como ya se ha visto anteriormente, en algunos casos la reducción de

^c Los superíndices II y I hacen referencia a los estados de oxidación +2 y +1 del cobre. Si no se indica nada al respecto (Cu_2L), se consideran complejos de cobre con estado de oxidación +2.

Cu(II) a Cu(0) ocurre en una sola etapa o bien existe un gran número de especies en equilibrio y el sistema se vuelve excesivamente complejo.

Los valores logarítmicos de las constantes de dismutación se recogen en la tabla 5. 11, junto con los valores de actividad SOD. Según estos valores, el complejo que forma **L1** resulta ser el más activo de la serie, siendo k_{cat} la mayor y $\log K_{dis}$, determinado mediante electroquímica, la menor de la serie. Es decir, que el complejo formado por **L1** es que el que presenta una mayor eficacia como catalizador de la dismutación del $O_2^{\cdot -}$ y la especie de $Cu_2^I L1$, necesaria para completar el ciclo catalítico, es la más estable.

En cambio, **L2** forma los complejos binucleares ($Cu_2 L2$) más estables (ver tabla 5. 3), pero su k_{cat} es la más baja de todos los complejos y los complejos $Cu_2^I L2$ son los más inestables de la serie. Por tanto, resulta coherente que sea el complejo con menor actividad. En cuanto a la actividad de los complejos heterobinucleares, la sustitución de un átomo de cobre por un átomo de cinc, los hace menos activos y esto podría atribuirse a la pérdida de un centro electroactivo.

Los ensayos de actividad SOD se completaron con estudios de inhibición de la luminiscencia en leucocitos polimorfonucleares humanos (PNMLs). Este tipo de ensayos se realizaron con los sistemas binucleares: Cu(II)-L y Cu(II)-L-(Im) en una relación molar 2:1 y 2:1:1, respectivamente.

Los PNMLs son capaces de generar grandes cantidades de $O_2^{\cdot -}$ y esta producción puede medirse fotoquímicamente utilizando luminol. La presencia de complejos que sean capaces de dismutar el radical superóxido, se traduce en una inhibición de la luminiscencia. Es decir,

a mayor inhibición, mayor capacidad antioxidante presenta el complejo.

Antes de realizar los estudios de luminiscencia determinamos la toxicidad de los complejos mediante el método del azul de tripán. Estos resultados mostraron que, en presencia de los complejos, la proporción de células muertas era significativamente menor (12%) que el control (28%), excepto para el caso de $\text{Cu}_2\text{L2(Im)}$ donde la proporción fue del 27%.

Los resultados obtenidos de las medidas de inhibición de la luminiscencia a dos concentraciones diferentes, se muestran en la figura 5. 24. Es interesante resaltar que, al igual que en el ensayo de NBT, el complejo $\text{Cu}_2\text{L2}$ es el que presenta una menor actividad.

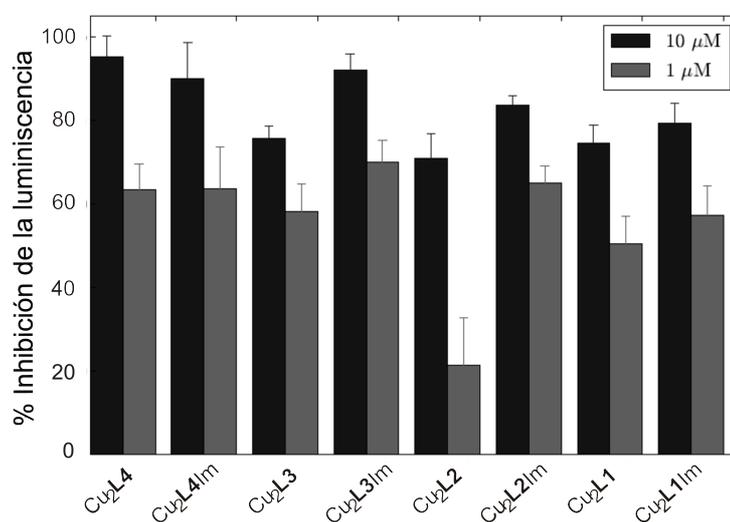


Figura 5. 24. Actividad antioxidante en leucocitos.

5. 7. Conclusiones.

Según los datos experimentales, obtenidos mediante los estudios potenciométricos, UV-vis, RMN paramagnético, difracción de rayos X y electroquímica, podemos decir que todos los receptores son capaces de formar complejos homo- y heterobinucleares de cobre y cinc.

La naturaleza de la cadena influye en el valor de las constantes de protonación y de formación de los complejos metálicos. Los grupos amino de la cadena poliamínica en **L1** están separados por cadenas propilénicas, aportando mayor flexibilidad al macrociclo. Este hecho se refleja en la basicidad del receptor, puesto que separación entre los grupos amino en **L1** permite que la repulsión entre éstos sea menor cuando están protonados y, por tanto, las constantes de protonación son mayores con respecto al resto de ligandos. En cuanto a las constantes de formación de los complejos con metales pudimos determinar, que los ligandos que pueden formar anillos quelato de cinco y seis miembros forman complejos más estables que los que forman sólo anillos de seis miembros. Lo pudimos determinar en los valores de las constantes de los complejos binucleares de Cu(II), donde la especie Cu_2L1 , que sólo forma anillos quelato de seis miembros en la parte central de la cadena poliamínica, forma los complejos menos estables de la serie. Este hecho podría estar relacionado con los datos de la actividad obtenidos como miméticos de la SOD. **L1** es el receptor que forma los complejos homobinucleares de Cu(II) menos estables, pero es el más efectivo y el más activo para dismutar el anion superóxido, según el ensayo de McCord-Fridovich. Esta mayor actividad, frente al resto de sistemas, podría asociarse a su mayor flexibilidad y, como consecuencia a su mayor facilidad en la reorganización molecular durante el ciclo catalítico. Además, según las constantes de estabilidad determinadas mediante los estudios electroquímicos y

potenciométricos, la especie $\text{Cu}_2\text{L1}$, necesaria para completar el ciclo catalítico, es la más estable de la serie. Por otra parte, determinamos que **L2** es el que forma los complejos binucleares de Cu(II) más estables y es el que presenta una menor actividad SOD, tanto por el método de McCord-Fridovich como por el de los leucocitos.

Hemos podido determinar que algunos de los complejos metálicos que forman estos ligandos son capaces de dismutar el anión superóxido. No obstante no hay que obviar que queda mucho trabajo por realizar, como por ejemplo determinar si son capaces de atravesar membranas o si tienen actividad en vivo, puesto que un medio celular es mucho más complejo.

5. 8. Bibliografía.

- (1) Halliwell, B. *Annual Review of Nutrition* **1996**, *16*, 33.
- (2) Vallet M, F. J., García-España E y Moratal J *Introducción a la Química Bioinorgánica*, 2003.
- (3) Valentine, J. S.; Wertz, D. L.; Lyons, T. J.; Liou, L. L.; Goto, J. J.; Gralla, E. B. *Current Opinion in Chemical Biology* **1998**, *2*, 253.
- (4) Flint, D. H.; Allen, R. M. *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 2315.
- (5) Gardner, P. R. *Bioscience Reports* **1997**, *17*, 33.
- (6) Oberley, L. W.; Buettner, G. R. *Cancer Research* **1979**, *39*, 1141.
- (7) Berlett, B. S.; Stadtman, E. R. *The Journal of Biological Chemistry* **1997**, *272*, 20313.
- (8) Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. *Biochemical Journal* **1984**, *219*, 1.
- (9) Wiseman, H.; Halliwell, B. *Biochememical Journal* **1996**, *313*, 17.
- (10) Dreher, D.; Junod, A. F. *European Journal of Cancer* **1996**, *32A*, 30.
- (11) McCord, J. M.; Fridovic, I. *Federation Proceedings* **1969**, *28*, 346.
- (12) Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chemical Reviews* **1996**, *96*, 2239.
- (13) Barondeau, D. P.; Kassmann, C. J.; Bruns, C. K.; Tainer, J. A.; Getzoff, E. D. *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038.
- (14) Tainer, J. A.; Getzoff, E. D.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. *Nature* **1983**, *306*, 284.

- (15) Bertini, I.; Mangani, S.; Viezzoli, M. S. *Advances in Inorganic Chemistry*, Vol 45 **1998**, 45, 127.
- (16) Sies, H. *Angewandte Chemie-International Edition in English* **1986**, 25, 1058.
- (17) Coughlin, P. K.; Lippard, S. J. *Inorganic Chemistry* **1984**, 23, 1446.
- (18) Pierre, J. L.; Chautemps, P.; Refaif, S.; Beguin, C.; Elmarzouki, A.; Serratrice, G.; Saintaman, E.; Rey, P. *Journal of the American Chemical Society* **1995**, 117, 1965.
- (19) Ohtsu, H.; Shimazaki, Y.; Odani, A.; Yamauchi, O.; Mori, W.; Itoh, S.; Fukuzumi, S. *Journal of the American Chemical Society* **2000**, 122, 5733.
- (20) Li, D. F.; Li, S.; Yang, D. X.; Yu, J. H.; Huang, J.; Li, Y. Z.; Tang, W. X. *Inorganic Chemistry* **2003**, 42, 6071.
- (21) Verdejo, B.; Blasco, S.; García-España, E.; Lloret, F.; Gaviña, P.; Soriano, C.; Tatay, S.; Jiménez, H. R.; Doménech, A.; Latorre, J. *Dalton Transactions* **2007**, 4726.
- (22) Aguilar, J.; Basallote, M. G.; Gil, L.; Hernández, J. C.; Mañez, M. A.; García-España, E.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Dalton Transactions* **2004**, 94.
- (23) Basallote, M. G.; Doménech, A.; Ferrer, A.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Mañez, M. A.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorganica Chimica Acta* **2006**, 359, 2004.
- (24) Bencini, A.; Bianchi, A.; García-España, E.; Micheloni, M.; Ramírez, J. A. *Coordination Chemistry Reviews* **1999**, 188, 97.
- (25) Hancock, R. D. *Journal of Chemical Education* **1992**, 69, 615.

- (26) Verdejo, B.; Aguilar, J.; Doménech, A.; Miranda, C.; Navarro, P.; Jiménez, H. R.; Soriano, C.; García-España, E. *Chemical Communications* **2005**, 3086.
- (27) Tarpey, M. M.; Fridovich, I. *Circulation Research* **2001**, *89*, 224.
- (28) Tabbi, G.; Driessen, W. L.; Reedijk, J.; Bonomo, R. P.; Veldman, N.; Spek, A. L. *Inorganic Chemistry* **1997**, *36*, 1168.
- (29) Maroz, A.; Kelso, G. F.; Smith, R. A. J.; Ware, D. C.; Anderson, R. F. *The Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 4929.
- (30) Wood, P. M. *Biochemical Journal* **1988**, *253*, 287.
- (31) Doménech, A.; García-España, E.; Marcelino, V.; Altava, B.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; Bianchi, A.; Ferrini, L. *Inorganica Chimica Acta* **1996**, *252*, 123.

5. 9. Anexo.

Anexo A. 5. 1. Variación de la absorbancia de una disolución de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ y L en función del pH.

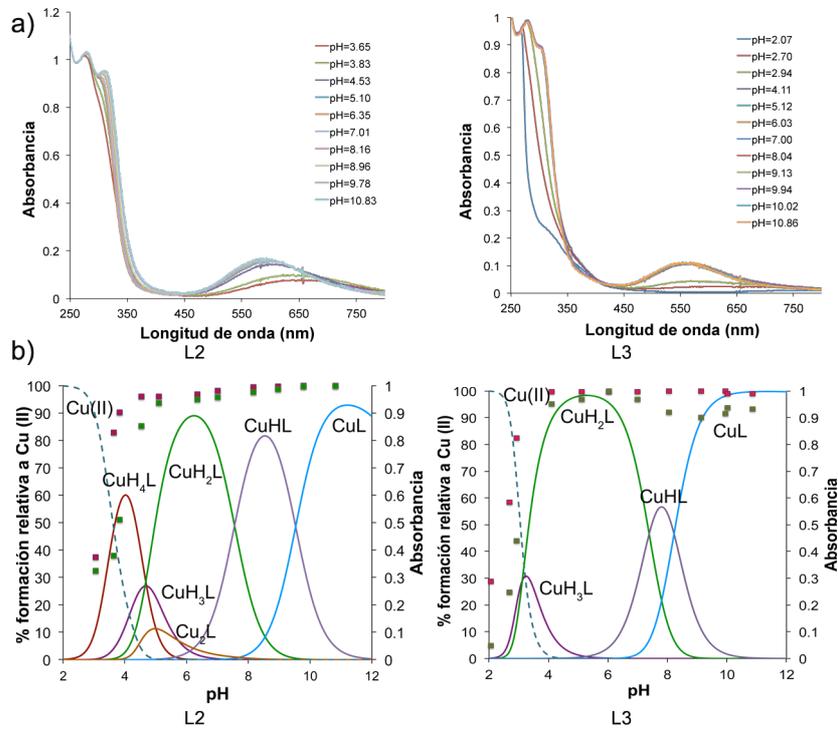


Figura A. 5. 1. a) Espectros UV-vis de disoluciones acuosas que contiene $\text{Cu}(\text{II})\text{:L}$, en una relación molar 1:1, recogidos en función del pH; b) Diagramas de distribución de especies del sistema $\text{Cu}(\text{II})\text{-L}$ junto con los valores de absorbancia normalizados a 300 (rojo) y 600 nm (verde).

Anexo 5. 2. Datos cristalográficos de **CS1**.**Tabla A. 5. 1.** Datos cristalográficos del compuesto $[\text{CuH}_4\text{L}_2(\text{ClO}_4)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.

Compuesto	CS1
Fórmula	$\text{C}_{21}\text{H}_{53}\text{Cl}_6\text{CuN}_7\text{O}_{28}$
Peso Molecular	1127.94
T (K)	293(2) K
Sistema cristalino	Ortorómbico
Grupo espacial	Pc2 ₁ b
a (Å)	8.4130(2)
b (Å)	18.1930(5)
c (Å)	28.4810(9)
α (°)	90
β (°)	90
γ (°)	90
Volumen (Å³)	4360.88(2)
Z	4
d. calc. (g/cm³)	1.718
λ (Å)	0.71073
F(000)	1148
μ (mm⁻¹)	0.970
Refls. totales	5746
Refls. únicas	4496
R(int)	0.032
restr/param	40/578
R1 (I>4σ)	0.0588
wR²	0.1569
GOF (F²)	1.067

Capítulo 6

Complejos de Cu(II) con un Azamacrociclo [1+1] de 1*H*-pirazol. Fijación de CO₂.

6. 1. Motivación.

En este capítulo de tesis se describe, por primera vez, el comportamiento y las propiedades de los complejos de Cu(II) que forma un nuevo ligando poliamínico de tipo [1+1] en el que se ha incorporado el anillo de pirazol como espaciador aromático.¹

Aunque existen trabajos en los que se estudia la química de coordinación del Cu(II) con ligandos poliamínicos de tipo piridinaciclofano [1+1]²⁻⁵ y con ligandos derivados del pirazol [1+2], [2+2] y [3+2],⁶⁻⁸ no existe ningún trabajo en la bibliografía en el que se hayan sintetizado ligandos poliamínicos de pirazol [1+1] y se hayan utilizado para el reconocimiento de sustratos.

La sustitución del anillo de piridina por el anillo de pirazol, en los ligandos poliamínicos [1+1], hace que el ligando forme complejos con Cu(II) muy diferentes. Como se detallará a lo largo del capítulo, este nuevo receptor de pirazol forma complejos metálicos de Cu(II) con posibles aplicaciones medioambientales.

6. 2. ¿Qué características tiene el anillo de pirazol?

El anillo de pirazol presenta una serie de características que lo diferencian de otros tipos de espaciadores utilizados en la síntesis de ligandos azamacrocíclicos, como la piridina o el benceno. El pirazol es un heterociclo aromático de cinco miembros perteneciente a la familia de los 1,2-azoles con dos átomos de nitrógeno contiguos no equivalentes. El nitrógeno situado en la posición relativa 1 es de tipo azol o pirrol y por tanto, aporta un par de electrones no enlazantes al sistema aromático y forma un enlace N-H. Por su parte, el átomo de nitrógeno adyacente situado en la posición relativa 2 es de tipo piridina, de manera que dispone de un par de electrones en un orbital perpendicular al sistema π . Por esta razón, el anillo de pirazol puede comportarse como nucleófilo y base a la vez (figura 6. 1).⁹

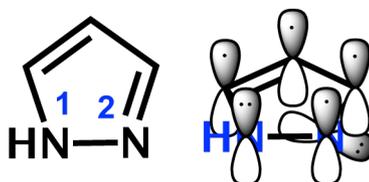


Figura 6. 1. Anillo de pirazol.

En su forma neutra, el pirazol se comporta como dador y/o aceptor de enlaces de hidrógeno, mientras que en su forma aniónica puede ser doblemente aceptor de enlaces de hidrógeno. Al interactuar con metales, se comporta como ligando monodentado en su forma neutra, mientras que puede actuar como ligando bis-monodentado o exobidentado en su forma anionica (figura 6. 2).^{6,10}

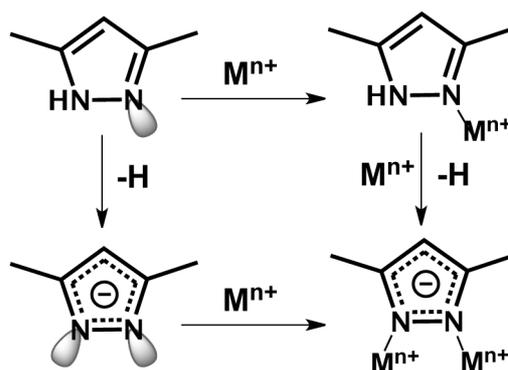


Figura 6. 2. Formas de interacción del pirazol.

En la década de los 70, el interés por ligandos que formaran complejos multimetálicos para estudiar nuevas propiedades electrónicas y magnéticas, hizo que aumentara el número de complejos de coordinación con más de un átomo metálico.¹¹ Partiendo de la idea de conectar dos átomos metálicos, se sintetizaron un gran número de receptores con espaciadores con dos átomos de nitrógeno contiguos como son los triazoles, tiadiazoles u oxadiazoles (figura 6. 3).^{7,8,11-14} Cuarenta años después, este interés no ha mermado y se sigue estudiando la formación de este tipo de complejos para determinar sus propiedades y aplicaciones.^{15,16}

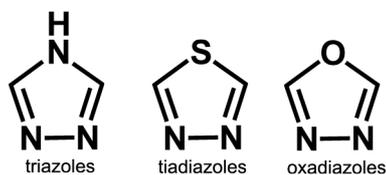


Figura 6. 3. Espaciadores con dos átomos de N contiguos.

En la figura 6. 4 se muestra un pequeña representación de los compuestos binucleares que se han obtenido a partir de ligandos que contienen este tipo de heterociclos. Tal y como se puede observar, los heteroátomos de los anillos participan en la conexión de los dos

metales, formando anillos quelato de cinco y seis miembros. La formación de los anillos quelato y la carga negativa de los anillos pirazolato y triazolato aporta estabilidad al complejo. Por esta razón, y debido a su semejanza con el anillo de imidazol, los ligandos que contienen anillos de pirazol en su estructura resultan muy interesantes para la búsqueda de nuevos complejos bimetalicos.

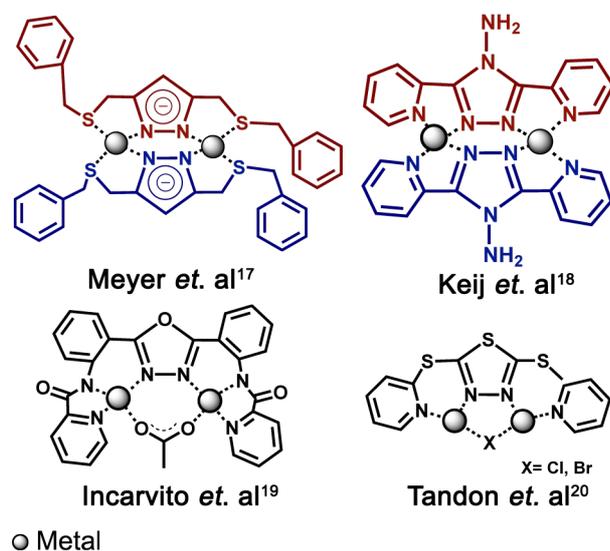


Figura 6. 4. Compuestos binucleares conectados a través de los heterociclos pirazol, triazol, oxadiazol y tiodiazol.¹⁷⁻²⁰

La modificación de los grupos funcionales, en las posiciones 3 y 5 del anillo de pirazol para la síntesis de ligandos, implica varias etapas. Alguna de ellas requiere bajas temperaturas, atmosfera inerte o el uso de productos extremadamente reactivos, por lo que no es sencilla la obtención de los ligandos finales.^{21,22} Sin embargo, existe un número significativo de complejos bimetalicos con ligandos de tipo lineal, o tipo pinza [1+2] (figura 6. 5).¹⁷ Éstos están formados por un anillo de pirazol funcionalizado en las posiciones 3 y 5, que engloba desde cadenas abiertas conteniendo grupos funcionales como

carboxilos o aminas hasta macrociclos,²³⁻²⁸ dando lugar a ligandos simétricos u asimétricos en función de la sustitución.

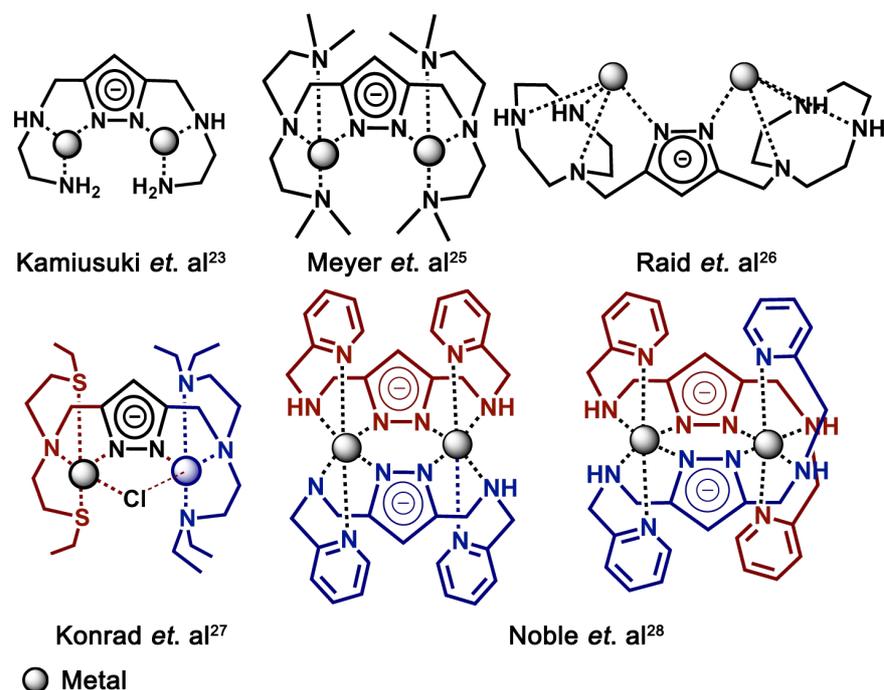


Figura 6. 5. Complejos binucleares con ligandos de condensación [1+2] derivados del pirazol.

Dentro de la familia de ligandos derivados del pirazol, es importante mencionar la aportación realizada por parte del grupo de Química Supramolecular del Instituto de Química Médica del CSIC junto con el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. Estos receptores están formados por dos o tres unidades de pirazol conectadas a través de poliaminas lineales o tripodales.²⁹⁻³³ Dependiendo de la relación entre las unidades de pirazol y de poliamina, podemos diferenciar dos grupos: los azamacrociclos de condensación [2+2] y los ligandos tipo criptando [3+2] (figura 6. 6).

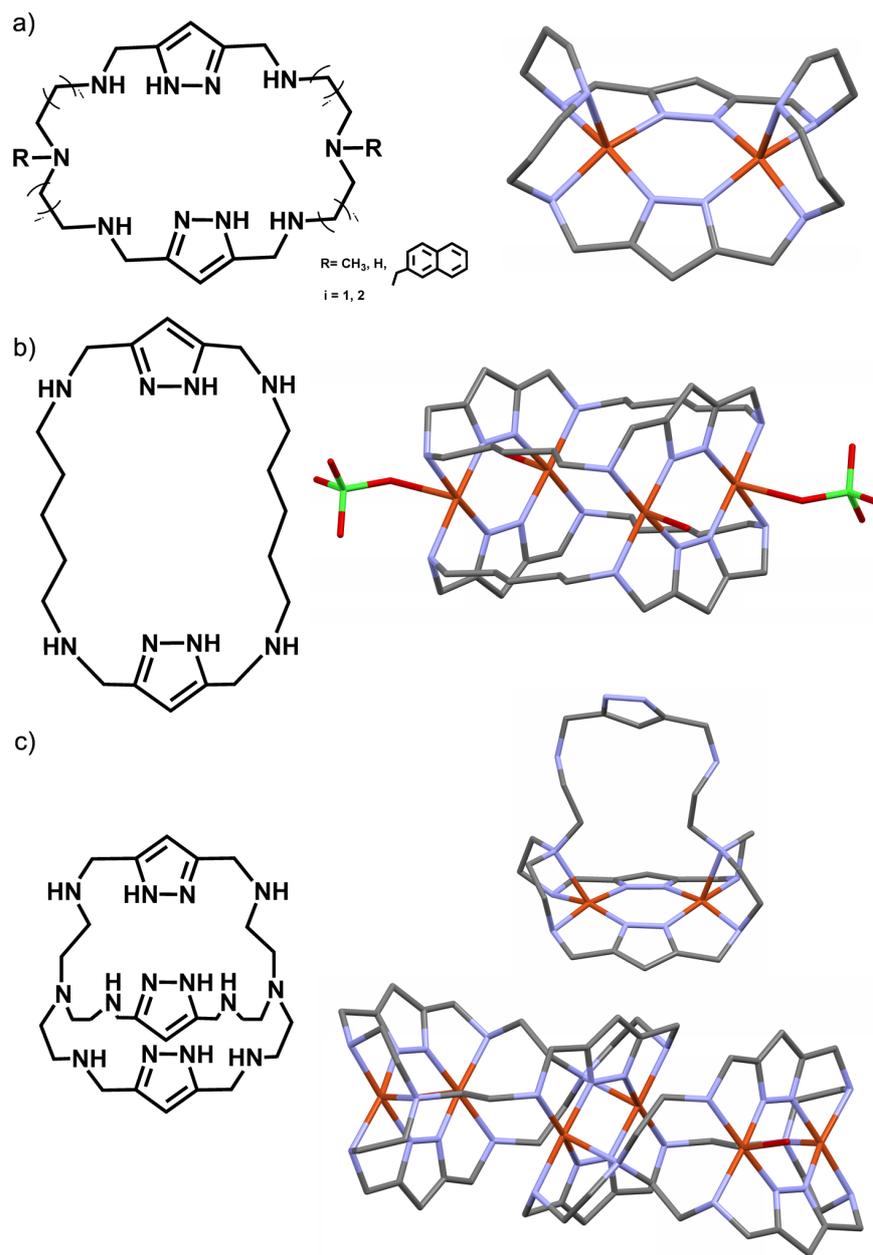


Figura 6. 6. Ligandos macrocíclicos de pirazol [2+2] y [2+3] y estructuras cristalinas de sus complejos de Cu(II).

Cuando los macrociclos [2+2] presentan un número suficiente de átomos dadores en el centro de la cadena que une los dos heterociclos (6. 6.a), la coordinación de los dos metales de transición ocurre en el interior de la cavidad macrocíclica.^{29,30} Los anillos de pirazolato actúan como ligandos puente y se completa la esfera de coordinación con los átomos de nitrógeno de la cadena poliamínica.

En cambio, en el caso del macrociclo [2+2] en el que no existen átomos dadores en el centro de la cadena poliamínica, como es el caso de la amina 1,5-diaminopentano (6. 6.b), la coordinación de los metales se produce, preferentemente, a través de dos unidades pirazolato de dos unidades macrocíclicas diferentes.³³ Es decir, se forma un complejo tetranuclear en el que los átomos metálicos se conectan a través de cuatro unidades de pirazol formando una estructura de tipo caja.

El ligando tipo criptando [2+3] (6. 6.c) se sintetizó por primera vez en 1995,³² pero no fue hasta 2000 y 2001, cuando se describieron por primera vez sus complejos con metales de transición. Cuando se utiliza una relación molar metal:ligando 2:1,³¹ se forma un complejo binuclear en el que los dos metales se conectan a través de dos anillos pirazolato del macrociclo, de forma que queda un anillo de pirazol y átomos dadores de la cadena poliamínica libres para poder coordinar otro tipo de sustrato. Sin embargo, recientemente se ha descrito que, si la relación molar metal:ligando que se utiliza es 3:1, el complejo que se forma es un complejo hexanuclear.³⁴ En este caso, cuatro de los seis metales se disponen en la cavidad de dos macrociclos de forma muy similar a como ocurría en el complejo resultante de la relación 2:1,^a mientras que los otros dos metales se conectan a través de las dos

^a Hay que destacar que el grupo funcional que ocupa la posición axial de los átomos de cobre varía en los complejos dinuclear y hexanuclear.

unidades de pirazol de ambos macrociclos que quedan libres en el complejo binuclear (6. 6.c). De forma que, la coordinación de estos dos últimos átomos de cobre da lugar a la formación del complejo dímero hexanuclear.

A pesar del interés que despierta el pirazol desde el punto de vista de la coordinación de metales de transición, ésta es la primera vez que se ha sintetizado un ligando macrocíclico [1+1] formado por una cadena poliamínica y un anillo de pirazol (**L5**). Para ver las diferencias en la química de coordinación del Cu(II) con sus azamacrociclos análogos con otros heterociclos, hemos escogido el receptor **L6**, que tiene un anillo de piridina como espaciador aromático (figura 6. 7).

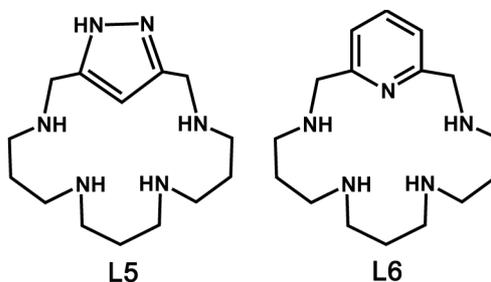


Figura 6. 7. Esquema de los receptores descritos en este capítulo.

6. 3. Estudios de especiación: propiedades ácido-base.

Antes de empezar con el estudio de los complejos de Cu(II), necesitamos determinar las constantes de basicidad de los grupos amino de ambos receptores. Este estudio previo es importante dado que las aminas son básicas y existe una competición entre la interacción con H⁺ y la coordinación del Cu(II). Además, nos permite *a posteriori* junto con las constantes de estabilidad de los complejos, tener una idea del número de grupos amino que participan en la coordinación de los metales. Para ello, se realizaron estudios

potenciométricos en un intervalo de pH entre 2.5 y 11.0. En la tabla 6.1 se recogen las constantes de protonación sucesivas, así como la basicidad global de ambos receptores.

Tabla 6. 1. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global para los receptores **L5** y **L6**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L5	L6
$L + H \rightleftharpoons HL$	10.63(2) ^[b]	10.60(3)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.35(1)	8.57(3)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	7.24(2)	6.73(3)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	5.58(2)	5.27(4)
$\log \beta$ ^[c]	32.80(3)	31.17(5)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa; [c] Constante de basicidad global $\log \beta = (\sum K_{HjL})$.

Cada receptor presenta un total de cuatro constantes de protonación, que se corresponden con la protonación de los cuatro grupos amino de la cadena poliamínica. Aunque, en ambos casos, los valores obtenidos son bastante similares, se observa que la entrada del tercer y cuarto protón está más favorecida en **L5**. Dado que la cadena poliamínica en ambos receptores es la misma, la diferencias en basicidad podrían ser debidas a la orientación en la que se dispone el espaciador aromático. Tal y como se describirá más adelante en la secuencia de protonación deducida de los estudios UV-vis y RMN, la entrada del segundo protón ocurre en el grupo amino adyacente al anillo aromático, de manera que, a parte de las repulsiones

electrostáticas producidas por el otro grupo amino protonado, se observa la influencia del grupo aromático.

Algo muy similar ocurría en las secuencias de protonación de ligandos [1+1] con piridina y benceno.^{5,35} Las constantes de protonación determinadas en las mismas condiciones, fueron ligeramente más básicas para el caso del ligando con benceno que las de su análogo de piridina. Teniendo en cuenta que la protonación de los grupos amino está más favorecida para el ligando que no presenta heteroátomos en su espaciador aromático, se podría pensar que la orientación del anillo en **L5** con los heteroátomos hacia fuera de la cavidad macrocíclica favorece, relativamente, la entrada de los H⁺.

Aparte de la protonación de los cuatro grupos amino perteneciente a la cadena poliamínica, se pensó en la posibilidad de un quinto equilibrio correspondiente a la protonación de los anillos aromáticos. El pK_a de los anillos de pirazol y piridina, en su forma libre, es 2.5 y 5.2, respectivamente.⁹ Su protonación podría quedar fuera del intervalo de pH utilizado durante el estudio, o enmascarado por las constantes de protonación de los grupos amino de la cadena. Por esta razón, realizamos valoraciones UV-vis en función del pH para comprobar la existencia de cambios en las bandas de absorción correspondientes a los anillos, y en el caso de **L5**, se completaron con estudios de RMN.³⁶⁻³⁸

En ninguno de los dos casos se encontraron evidencias de la protonación de los anillos, pero estos estudios nos permitieron deducir las secuencias de protonación de los grupos amino de la cavidad macrocíclica, encontrándose diferencias entre ambos ligandos.

Los espectros UV-vis de una disolución acuosa de **L5** en función del pH muestran que la absorbancia a 225 nm decrece a medida que la

disolución se acidifica. Si se representa la variación de la absorbancia en función del pH, junto con el diagrama de distribución de especies, se observan dos saltos de absorbancia que coinciden con la formación de las especies $[H_2L]^{2+}$ y $[H_4L]^{4+}$ (figura 6. 8). Esta variación indica que hay un cambio cerca del sistema aromático. Por tanto, se puede decir que la entrada del protón se produce en el grupo amino cercano al anillo aromático.

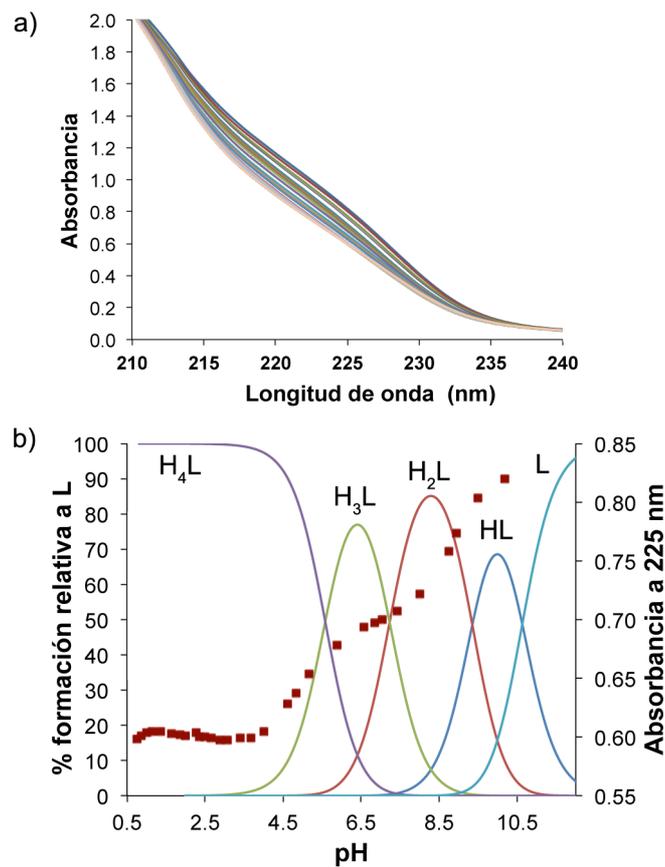


Figura 6. 8. a) Espectros UV-vis de una disolución de **L5** en función del pH;
b) Diagrama de distribución de especies de **L5** junto con la variación de la absorbancia a 225 nm. $[L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

Estas observaciones se apoyan en los resultados obtenidos mediante RMN. Las señales de ¹³C de los átomos centrales de las cadenas propilénicas (C5 y C9) son los que experimentan un mayor desplazamiento químico al variar el pH, y por eso se han representado junto con el diagrama de distribución de especies para determinar la secuencia de protonación promedio (figura 6. 9).

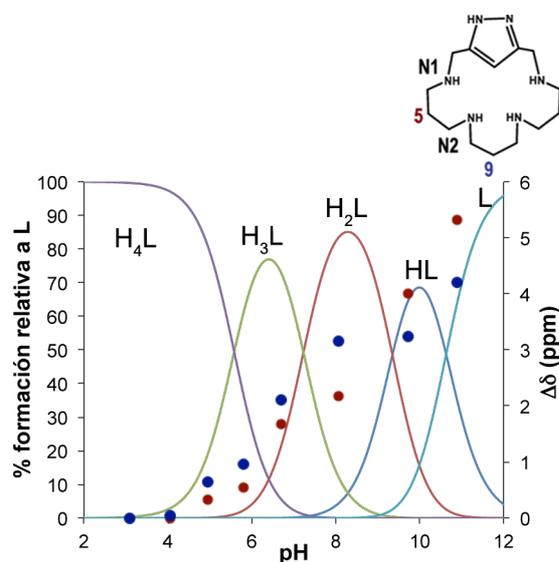


Figura 6. 9. Diagrama de distribución de especies para **L5** junto con el desplazamiento químico que sufren la señales de ¹³C de los átomos C5 y C9 en función del pH. [L] = 1 x 10⁻³ M.

Tal y como cabría esperar, la señal de C5 experimenta un desplazamiento continuo hacia menores frecuencias en todo el intervalo de pH, porque tiene dos grupos amino no equivalentes cerca. En cambio, C9 está entre dos grupos amino químicamente muy similares y experimenta dos desplazamientos hacia menores frecuencias cuando se forma la especie [HL5]⁺ y [H₃L5]³⁺. Según estos resultados y teniendo en cuenta la minimización de las repulsiones

electrostáticas de los grupos amino, podríamos proponer la secuencia de protonación de la figura 6. 10.

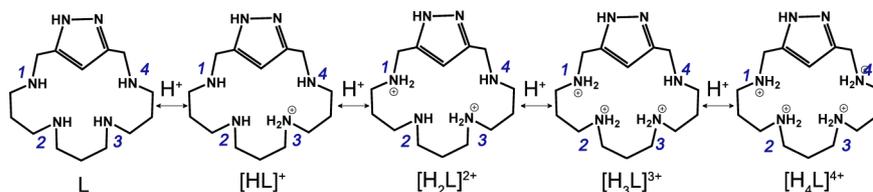


Figura 6. 10. Secuencia de protonación propuesta para **L5** según los datos experimentales obtenidos mediante espectroscopia UV-vis y RMN. Los números en cursiva indican las posiciones relativas.

Según la variación de la absorbancia a 225 nm y la variación en el desplazamiento químico de la señal de ^{13}C del átomo C9, la entrada del primer protón se produce en uno de los grupos amino de la parte central de la cadena poliamínica (N3).^b Como cabría esperar, con el fin de minimizar las repulsiones electrostáticas y teniendo en cuenta el cambio observado en la absorbancia a 225 nm, el segundo protón entra en el átomo de N del grupo amino situado en la posición opuesta al grupo amino protonado y adyacente al grupo aromático (N1). La formación de la especie $[\text{H}_3\text{L}]^{3+}$ no produce cambios significativos en la absorbancia y se observa una variación en los desplazamientos químicos de las señales de ^{13}C del átomo C9, por lo que sugiere que la entrada del tercer protón se produce sobre el grupo amino restante de la parte central de la cadena poliamínica (N2). Finalmente, con la formación de la especie $[\text{H}_4\text{L}]^{4+}$, se observa un cambio de absorbancia,

^b La secuencia de protonación del ligando es una secuencia promedio y se ha descrito en función de las posiciones relativas, en las que N1 y N4 pueden considerarse equivalentes y, del mismo modo, N2 y N3. Por tanto se podría describir otra secuencia equivalente en la que la entrada del primer protón se produzca en N2, el segundo en N4 el tercero en N3 y el cuarto en N1.

lo que indica que la entrada del protón se produce en el grupo amino adyacente al anillo de pirazol (N4).

De igual forma, se realizaron estudios de UV-vis con **L6**, y al igual que en el caso de **L5**, no observamos la protonación del anillo de piridina (figura 6. 11). En cambio, pudimos observar que la protonación de **L6** no presenta la misma secuencia que **L5**.

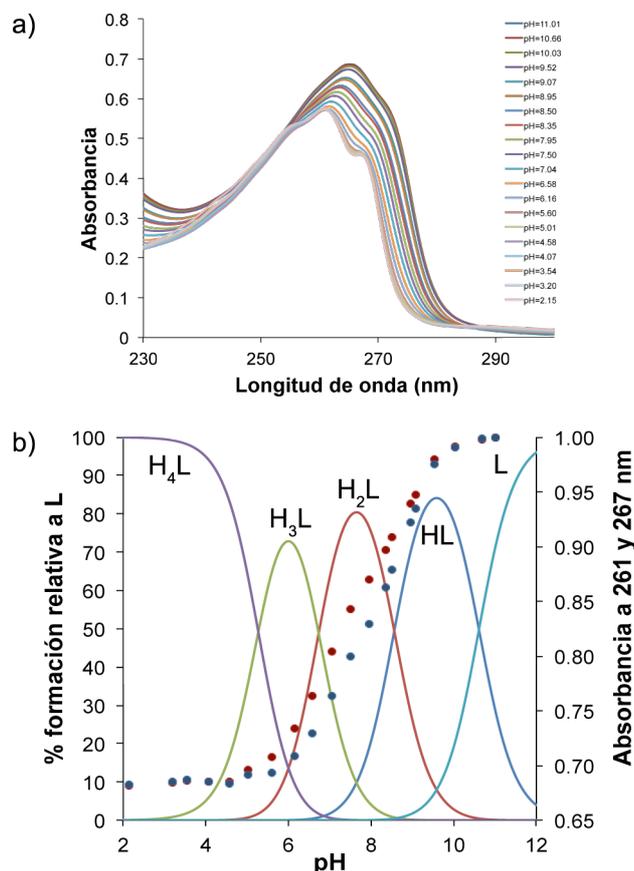


Figura 6. 11. a) Espectros UV-vis de una disolución de **L6** en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies de **L6** en función del pH junto con la variación de la absorbancia a 261 (rojo) y 267 (azul) nm. $[L] = 1 \times 10^{-3}$ M.

Según los espectros registrados, se observa un desplazamiento hipsocrómico e hipocrómico cuando pasamos de pH 9 a 5. Si se representa la absorbancia a 261 y 267 nm en función del pH, se observa un cambio brusco que coincide con la entrada del segundo y tercer protón. Esto indica que la entrada del protón en esta etapa afecta mayormente a la unidad de piridina. Teniendo en cuenta la minimización de las repulsiones electrostáticas producidas entre los grupos amino cargados y los datos experimentales de la valoración UV-vis, se podría proponer la secuencia de protonación promedio que se muestra en la figura 6. 12.^b

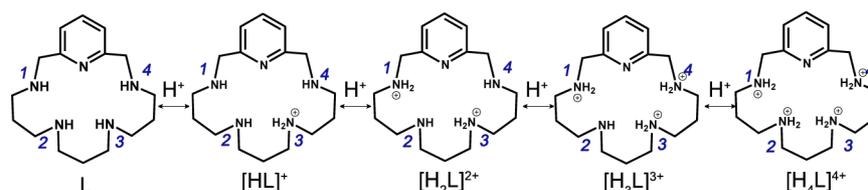


Figura 6. 12. Secuencia de protonación propuesta para L6 según los datos experimentales obtenidos mediante espectroscopia UV-vis. Los números en cursiva indican las posiciones relativas.

La entrada del primer protón se produce sobre un grupo amino de la parte central de la cadena poliamínica. Los cambios de absorbancia que se observan con la formación de la especie [H₂L]²⁺ indican que se produce la protonación en uno de los grupos amino cercanos a la unidad de piridina. Teniendo en cuenta las repulsiones electrostáticas y suponiendo que, la entrada del primer protón se produce sobre la posición relativa N3, el segundo grupo amino en protonarse es N1. La variación en la absorbancia sigue con la formación de la especie [H₃L]³⁺, por lo que la entrada del tercer protón se produce en el grupo amino contiguo al anillo de piridina, N4. Finalmente, no se observan cambios de absorbancia con la formación de la especie [H₄L]⁴⁺, por lo

que la entrada del cuarto protón ocurre en uno de los grupos amino centrales de la cadena poliamínica.

6. 4. Estudios de especiación: complejos de Cu(II).

La formación de complejos de Cu(II) se determinó tanto en estado sólido como en disolución. Las estructuras cristalinas, obtenidas por difracción de rayos X, indicaron que la naturaleza del anillo aromático es determinante en la formación de los complejos metálicos. Tal y como se detallará en esta sección, **L5** forma complejos mayormente binucleares mientras que **L6** forma complejos mononucleares.

6. 4. 1. Estudios en estado sólido.

La evaporación de una disolución acuosa de Cu(ClO₄)₂·6H₂O y **L6**, en una relación molar Cu:L (1:1), a pH 8 dio lugar a la obtención de cristales del complejo [Cu**L6**](ClO₄)₂ (**CS2**). Tal y como muestra la figura 6. 13, el átomo de Cu(II) se dispone en el centro de la cavidad macrocíclica, adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada ($\tau = 0.036$).^c El plano ecuatorial lo forman los átomos de nitrógeno del anillo de la piridina (N1), los dos átomos adyacentes al anillo (N2 y N5) y uno de los átomos de nitrógeno del centro de la cadena poliamínica del receptor (N3), de manera que se forman anillos quelato de seis y cinco miembros que aportan estabilidad al complejo. Por su parte, la posición axial, ligeramente distorsionada, la ocupa el nitrógeno N4 de la cadena poliamínica.

^c El parámetro estructural τ es una medida para complejos pentacoordinados que se define como $\tau = (\beta - \alpha)/60$, donde β y α representan los dos ángulos más grandes de la esfera de coordinación ($\beta > \alpha$). Se considera que se adopta una geometría de pirámide de base cuadrada cuando τ es 0 y una geometría de bipirámide trigonal cuando τ es 1.

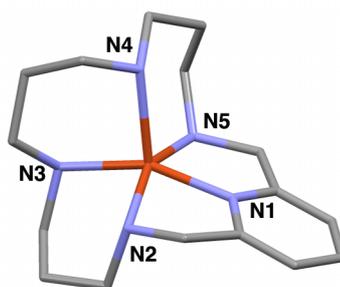


Figura 6. 13. Estructura cristalina del catión $[\text{CuL6}]^{2+}$.

En la tabla 6. 2 se recogen las distancias y ángulos de enlace de los átomos implicados en la coordinación. En ella se puede ver que la distancia más corta en el plano ecuatorial es la del enlace con el nitrógeno de la piridina (N1), mientras que la más larga es el enlace con N5, formando un anillo quelato de cinco miembros que comparte uno de sus lados con un anillo quelato de seis miembros. Por su parte, el átomo de Cu(II) se encuentra situado 0.41 Å por encima del plano ecuatorial.

Tabla 6. 2. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura $[\text{CuL6}](\text{ClO}_4)_2$.

Distancias de enlace (Å)			Ángulos de enlace (°)			
Cu1	N1	1.971(6)	N1	Cu1	N3	155.5(3)
Cu1	N3	2.028(5)	N1	Cu1	N2	80.6(3)
Cu1	N2	2.087(7)	N3	Cu1	N2	89.4(3)
Cu1	N5	2.125(6)	N1	Cu1	N5	80.5(3)
Cu1	N4	2.214(6)	N3	Cu1	N5	100.2(2)
			N2	Cu1	N5	153.3(3)
			N1	Cu1	N4	111.6(2)
			N3	Cu1	N4	92.8(2)
			N2	Cu1	N4	110.1(2)
			N5	Cu1	N4	94.4(2)

La coordinación del átomo de Cu(II) es la habitual en este tipo de ligandos. De hecho, podemos observar como otro receptor muy similar, con cadenas etilénicas separando los grupos amino, coordina al metal de forma análoga (figura 6. 14).²

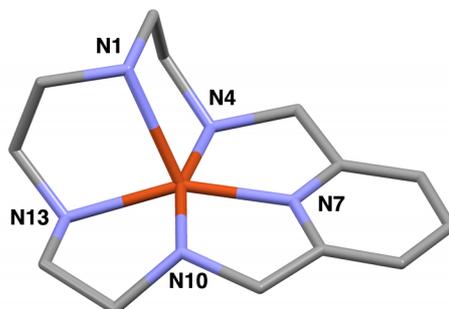


Figura 6. 14. Estructura cristalina del catión [CuL]²⁺.²

En este caso, el átomo de cobre se dispone en la cavidad central adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada ($\tau = 0.13$) y está coordinado a cinco átomos de nitrógeno. Al igual que en el caso anterior, el plano ecuatorial lo forman los átomos de nitrógeno del anillo de la piridina (N7), los dos átomos de nitrógeno de los grupos amino adyacentes al espaciador aromático (N4 y N10) y uno de los grupos amino de la parte central de la cadena poliamínica (N13). La posición axial la completa, al igual que en **L6**, el átomo de nitrógeno restante de la cadena poliamínica (N1). Respecto a las distancias de enlace, el enlace más corto es el que se forma con el N(sp²) de la piridina, situándose el átomo de Cu(II) 0.24 Å por encima del plano ecuatorial.

Sin embargo, si se mantiene la cadena poliamínica del receptor, pero se sustituye el anillo de piridina por un anillo de pirazol, el complejo metálico que se forma es completamente diferente. La evaporación lenta de una disolución acuosa de **L5** y Cu(ClO₄)₂·6H₂O,

en una relación 1:1 a pH 9, permitió que crecieran cristales aptos para la difracción de rayos X.

El complejo de Cu(II) formado con **L5**, $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75 \text{ H}_2\text{O}$ (**CS3**), es muy diferente a su análogo formado con **L6**. Tal y como se muestra en la figura 6. 15a, la estructura del complejo consiste en un catión $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})]^{3+}$ formado por dos receptores conectados a través de los anillos de pirazol y tres aniones perclorato como contraiones. Para una mejor visualización, hemos coloreado cada uno de dos receptores que forman el catión complejo en la estructura cristalina en verde y morado. Las unidades de pirazol de ambos macrociclos están desprotonadas, comportándose como ligandos bis(monodentados). Su orientación hacia fuera de la cavidad permite la coordinación de dos átomos de Cu(II) entre dos macrociclos.

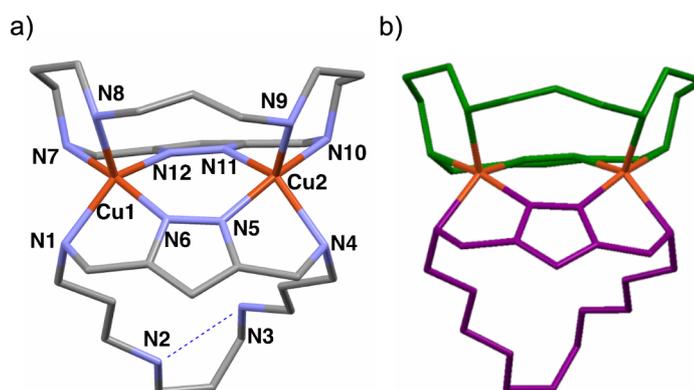


Figura 6. 15. a) Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})]^{3+}$; b) Representación esquemática del complejo.

Los átomos de Cu(II) adoptan una geometría de pirámide de base cuadrada con un importante componente de bipirámide trigonal ya que los parámetros τ son 0.38 y 0.43 para Cu1 y Cu2,

respectivamente. El plano ecuatorial está formado por un átomo de nitrógeno del anillo de pirazol (N6 y N12) y un átomo de nitrógeno del grupo amino adyacente a éste, que pertenecen a dos receptores diferentes (N1 y N7).^d Ambos centros metálicos se disponen 0.46 Å por encima del plano ecuatorial y la distancia entre ambos (3.9496(8) Å) es muy parecida a la que se observa en los complejos de pirazol de condensación [2+2].^{30,31,33,34}

Cada uno de los átomo de Cu(II) se coordinan axialmente con un átomo de nitrógeno de la parte central de la cadena poliamínica, pero en este caso, pertenecientes a un mismo macrociclo (N8 y N9). Es importante destacar que los grupos amino equivalentes del otro macrociclo no participan en la coordinación del metal, de manera que deja su cavidad macrocíclica libre. Las distancias y ángulos de enlace de los átomos implicados en la coordinación de los metales se recogen en la tabla 6. 3.

^d Referente a los átomo de nitrógeno que coordinan al átomo Cu1. Los átomos que forman el plano ecuatorial del metal Cu2 son N5, N11, N4 y N10.

Tabla 6. 3. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura [Cu₂(H(H₋₁L5))(H₋₁L5)](ClO₄)₃ · 3.75 H₂O.

Distancias de enlace (Å)			Ángulos de enlace (°)			
Cu1	N12	1.955(3)	N12	Cu1	N6	93.84(14)
Cu1	N6	1.955(4)	N12	Cu1	N7	79.12(14)
Cu1	N7	2.070(4)	N6	Cu1	N7	165.43(15)
Cu1	N1	2.136(4)	N12	Cu1	N1	142.67(15)
Cu1	N8	2.221(4)	N6	Cu1	N1	80.21(15)
Cu2	N5	1.956(4)	N7	Cu1	N1	97.59(16)
Cu2	N11	1.965(3)	N12	Cu1	N8	113.78(15)
Cu2	N10	2.054(4)	N6	Cu1	N8	96.98(15)
Cu2	N4	2.163(4)	N7	Cu1	N8	97.53(15)
Cu2	N9	2.202(4)	N1	Cu1	N8	103.53(14)
			N5	Cu2	N11	94.18(14)
			N5	Cu2	N10	166.25(16)
			N11	Cu2	N10	78.90(14)
			N5	Cu2	N4	79.88(15)
			N11	Cu2	N4	140.10(17)
			N10	Cu2	N4	97.73(16)
			N5	Cu2	N9	95.27(15)
			N11	Cu2	N9	117.06(15)
			N10	Cu2	N9	98.46(15)
			N4	Cu2	N9	102.80(16)

El átomo N3 está protonado y forma un enlace de hidrógeno con el átomo N2 (2.661(9) Å). Éstos, a su vez, participan en una red de enlaces de hidrógeno que conecta dos complejos diméricos a través de moléculas de agua y aniones perclorato (figura 6. 16).

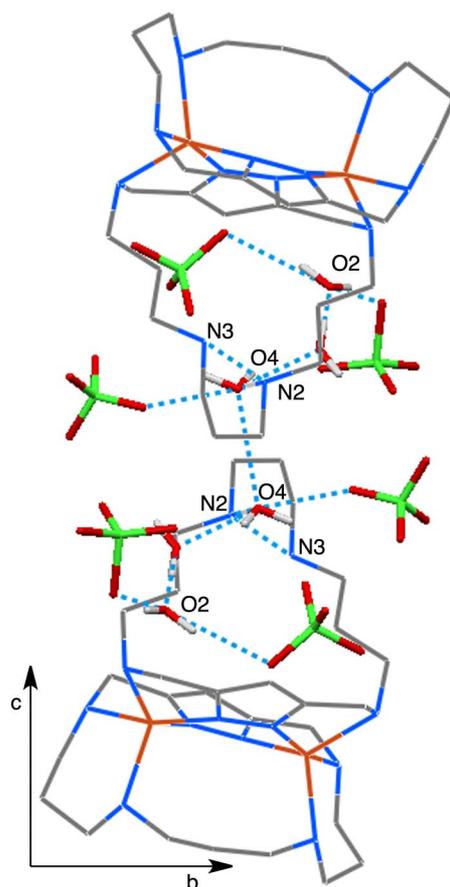


Figura 6. 16. Red de enlaces de hidrógeno que interconecta dos complejos catiónicos $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H-1L5}))(\text{H-1L5})]^{3+}$.

Al elevar el pH de la disolución de **L5** y $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hasta 10, obtuvimos cristales adecuados para la difracción de rayos X del complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H-1L5}))_{0.5}(\text{H-1L5})_{1.5}]_2(\text{ClO}_4)_3\text{Br}_2 \cdot 4.2\text{H}_2\text{O}$ (**CS4**) (figura 6. 17). Esta estructura es similar a la descrita anteriormente, produciéndose la coordinación de los átomos de Cu(II) a través de los anillos de pirazol de dos macrociclos diferentes. Las distancias de enlace y los ángulos de la esfera de coordinación de los centros

metálicos son muy similares, como se indica en la tabla 6. 4 dónde se recoge la información.

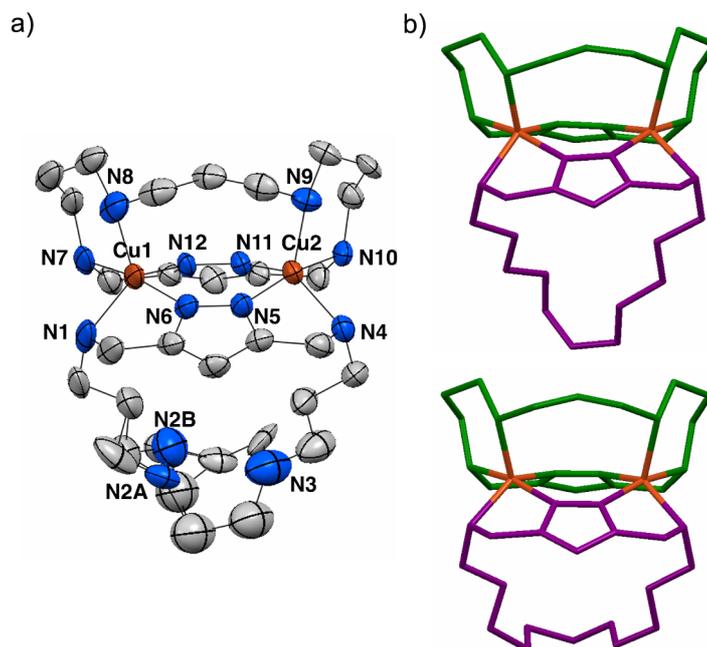


Figura 6. 17. a) Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H-1L5}))_{0.5}(\text{H-1L5})_{1.5}]^{2+}$; b) Representación esquemática de los dos complejos obtenidos.

La carga positiva se compensa con dos aniones bromuro y tres aniones perclorato que se comparten entre dos complejos diméricos. Sin embargo, una de las principales diferencias con respecto a la estructura **CS3** es que, uno de cada cuatro ligandos tiene el grupo amino (N3) protonado. Por esta razón, se observan dos disposiciones diferentes de la parte central de la cadena. En esquema de colores de la figura 6. 17.b se observa de forma más clara las dos organizaciones.

Tabla 6. 4. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura [Cu₂(H(H-1L5))_{0.5}(H-1L5)_{1.5}]₂(ClO₄)₃Br₂ 4.2 H₂O.

Distancias de enlace (Å)			Ángulos de enlace (°)			
Cu1	N6	1.935(7)	N6	Cu1	N12	93.9(3)
Cu1	N12	1.956(6)	N6	Cu1	N7	165.6(3)
Cu1	N7	2.053(8)	N12	Cu1	N7	79.0(3)
Cu1	N1	2.120(7)	N6	Cu1	N1	80.7(3)
Cu1	N8	2.178(9)	N12	Cu1	N1	142.4(3)
Cu2	N5	1.948(6)	N7	Cu1	N1	97.1(3)
Cu2	N11	1.951(7)	N6	Cu1	N8	96.4(3)
Cu2	N10	2.078(6)	N12	Cu1	N8	116.4(3)
Cu2	N4	2.102(7)	N7	Cu1	N8	97.9(4)
Cu2	N9	2.219(7)	N1	Cu1	N8	101.2(3)
			N5	Cu2	N11	94.2(3)
			N5	Cu2	N10	165.5(3)
			N11	Cu2	N10	78.7(3)
			N5	Cu2	N4	80.0(3)
			N11	Cu2	N4	142.8(3)
			N10	Cu2	N4	97.9(3)
			N5	Cu2	N9	96.1(3)
			N11	Cu2	N9	114.4(3)
			N10	Cu2	N9	98.3(3)
			N4	Cu2	N9	102.7(3)

Como parte de la caracterización de los complejos metálicos que forma **L5** con Cu(II), y dado que los átomos de Cu(II) se encuentran acoplados a través de los anillos de pirazol, realizamos medidas para determinar sus propiedades magnéticas. En el gráfico de la figura 6. 18 se representa la variación de χ_{MT} en función de T. Se puede observar que el valor de χ_{MT} disminuye a medida que la muestra se enfría hasta anularse cuando la temperatura es 70 K. Este tipo de

comportamiento es característico de una interacción antiferromagnética entre dos iones Cu(II) con estado fundamental de espín singlete.

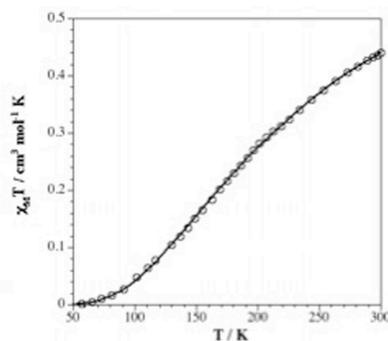


Figura 6. 18. Gráfico de la variación de $\chi_M T$ en función de T para el complejo $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H-1L5}))(\text{H-1L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75 \text{H}_2\text{O}$.

El tratamiento de los datos, nos permitió la estimación del valor de la constante de acoplamiento $J = -299(5) \text{ cm}^{-1}$, asumiendo que el factor g es el mismo en los dos átomos de Cu(II) ($g = 2.06(1)$). Este valor está dentro del intervalo de valores de sistemas binucleares de Cu(II) en los que los átomos metálicos se encuentra unidos a través de un puente de pirazol.^{17,30,39,40} Podemos decir que el electrón desapareado en cada metal se sitúa en los orbitales $d_{x^2-y^2}$, que son coplanares al esqueleto de pirazol, y el intercambio de magnetización se propaga a través de este puente.

6. 4. 2. ¿Se forman este tipo de complejos en disolución?

Una vez pudimos caracterizar el tipo de complejos formados en estado sólido, nos preguntamos si éstos también se formaban en disolución. Para su determinación, se llevaron a cabo valoraciones potenciométricas y UV-vis, así como estudios mediante espectrometría de masas y resonancia paramagnética electrónica (EPR).

En la tabla 6. 5 se recogen las constante de formación de los complejos que forman los receptores **L5** y **L6** con Cu(II). Los estudios potenciométricos se realizaron entre los valores de pH 2.5 y 11.0 La información que obtuvimos en estado sólido indica que **L5** forma sistemas más complejos que **L6**. Es decir, **L5** forma dímeros binucleares e incluso trinucleares, mientras que **L6** forma complejos mononucleares. Por tanto, para el sistema Cu(II)-**L5**, utilizamos diferentes relaciones molares Cu(II):**L5** y diferentes concentraciones de los componentes del sistema (10^{-4} - 10^{-3} M).

Tabla 6. 5. Logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos Cu(II)-L con los receptores **L5** y **L6**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L5	L6
$\text{Cu} + 2\text{H} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	26.76(1) ^[b]	26.88(8)
$\text{Cu} + \text{H} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuHL}$		23.29(7)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$		20.08(1)
$2\text{Cu} + \text{H} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{HL}_2$	43.00(1)	
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}_2$	37.49(1)	
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2 + \text{H}$	29.81(2)	
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2 + 2\text{H}$	20.23(5)	
$3\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{H}_{-2}\text{L}_2 + 2\text{H}$	27.92(2)	
$3\text{Cu} + 2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH}) + 3\text{H}$	20.20(4)	

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Según los datos obtenidos mediante estudios potenciométricos, **L5** forma un mayor número de especies y éstas pueden ser mono-, bi- y trinucleares, mientras que **L6** sólo forma especies mononucleares

Empezando por el sistema más sencillo, que es el sistema Cu(II)-**L6**, pudimos determinar la formación de un total de tres especies y, como cabría esperar, éstas se corresponden con complejos mononucleares.

En la figura 6. 19 se muestra el diagrama de distribución de especies, en el que se puede observar la formación de una especie mononuclear predominante en todo el intervalo de pH de estudio. Es importante destacar que esta especie, $[\text{CuL6}]^{2+}$, es la misma especie que se aisló en estado sólido (**CS2**) (figura 6. 13). Su constante de formación ($\log K_{\text{CuL6}} = 20.08$) es del mismo orden de magnitud que la que se obtiene con sistemas similares con anillos de piridina. Un ejemplo es el ligando con cadenas etilénicas mostrado anteriormente (ver figura 6. 14) que forma complejos de Cu(II) con una constante de formación $\log K_{\text{CuL}}$ de 23.31.²

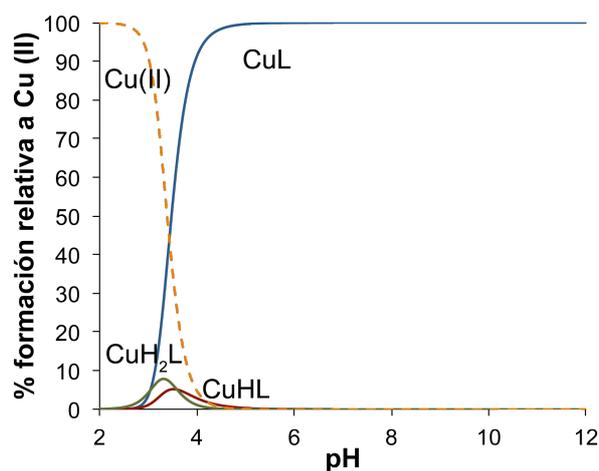


Figura 6. 19. Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-**L6**, para una relación molar 1:1. $[\text{Cu(II)}] = [\text{L}] = 1 \times 10^{-3}\text{M}$.

En cambio, para el sistema Cu(II)-**L5** determinamos un total de siete constantes de estabilidad, de las cuales una se corresponde con

una especie mononuclear, cuatro con la formación de dímeros binucleares y dos con complejos diméricos trinucleares.

El diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-**L5**, para una relación molar 1:1 se muestra en la figura 6. 20. En éste, se observa la formación de especies dímeras binucleares a partir de pH aproximadamente 5, siendo éstas predominantes hasta pH 12. No obstante, se observa la formación de una única especie monómera mononuclear minoritaria entre valores de pH 3.7 y 6.0.

Por otra parte, la variación de la absorbancia del sistema Cu(II)-**L5** (en una relación molar 1:1) a 376 y 600 nm en función del pH, indica que el máximo de absorbancia se alcanza con la formación de las especies dímeras binucleares. Una vez alcanzado este máximo, a valores de pH *ca.* 6, se mantiene invariable en el resto del intervalo.

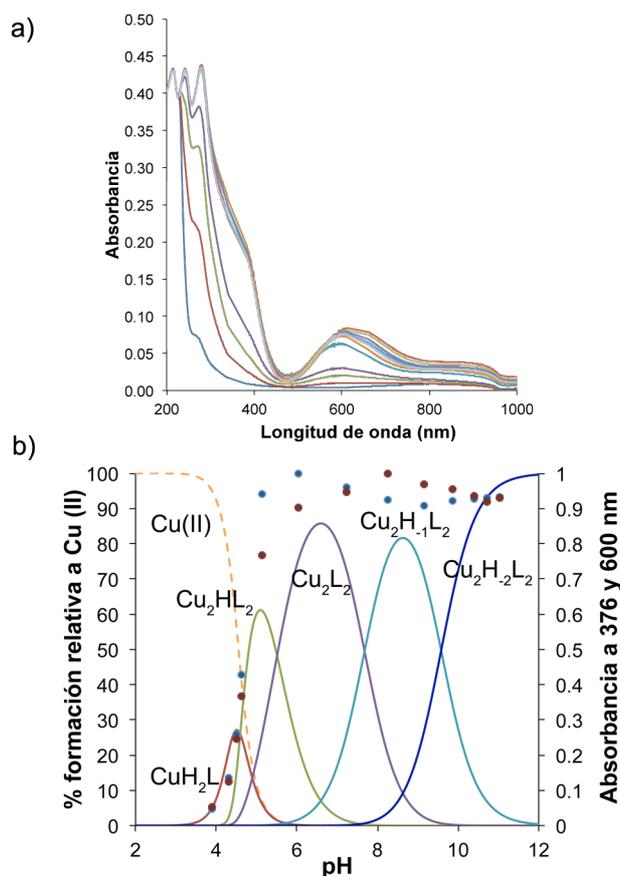


Figura 6. 20. a) Espectros UV-vis del sistema Cu(II)-**L5**, en una relación molar 1:1, en función del pH; b) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-**L5**, para una relación molar 1:1, en función del pH junto con la variación de la absorbancia a 376 (azul) y 600 (rojo) nm. $[Cu(II)] = [L] = 1 \times 10^{-3}M$.

Estos resultados se apoyan con los espectros de masas de dos muestras acuosas compuestas por **L5** y $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ a pH 7 y 9. En éstos se observa la formación de las especies dimeras binucleares $[Cu_2(H-1L5)_2]^{2+}$, $[Cu_2(H-1L5)_2(Cl)]^+$, $[Cu_2(H-1L5)_2(ClO_4)]^+$ y $[Cu_2(H-1L5)_2(CH_3OH)(Br)]^+$ que se corresponden con las relaciones m/z 342.9506(6), 721.3539(6), 785.3515(6) y 797.8471(6), respectivamente.

En las figuras 6. 21 y 6. 22 se muestran las ampliaciones de los espectros de ambas muestras, así como la modelización teórica de los espectros de los complejos. Tal y como se puede observar, los resultados experimentales se ajustan con la simulación de la distribución isotópica de las especies.

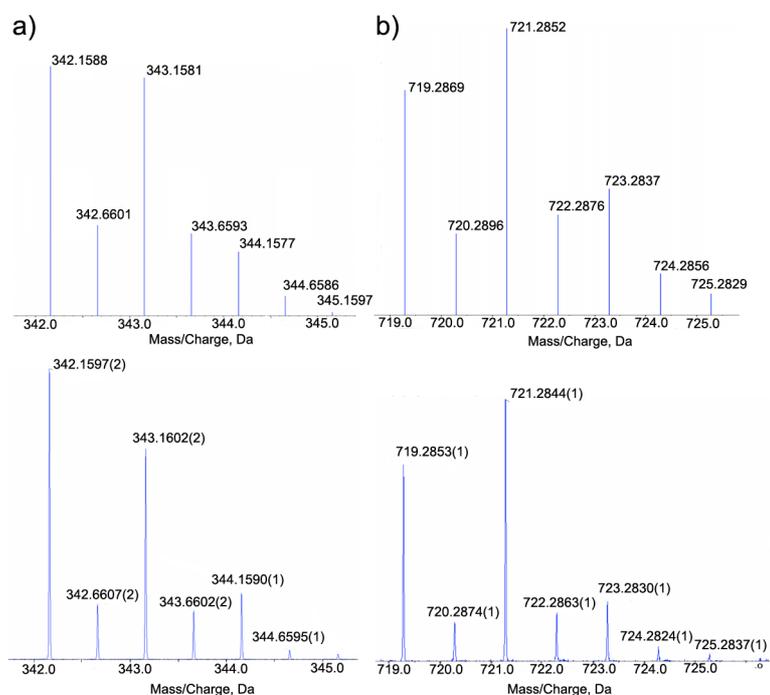


Figura 6. 21. a) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H-1L5})_2]^{2+}$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 7$. (teórico arriba y experimental abajo); b) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H-1L5})_2\text{Cl}]^+$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 9$ (teórico arriba y experimental abajo). Relación Cu(II):L 1:1.

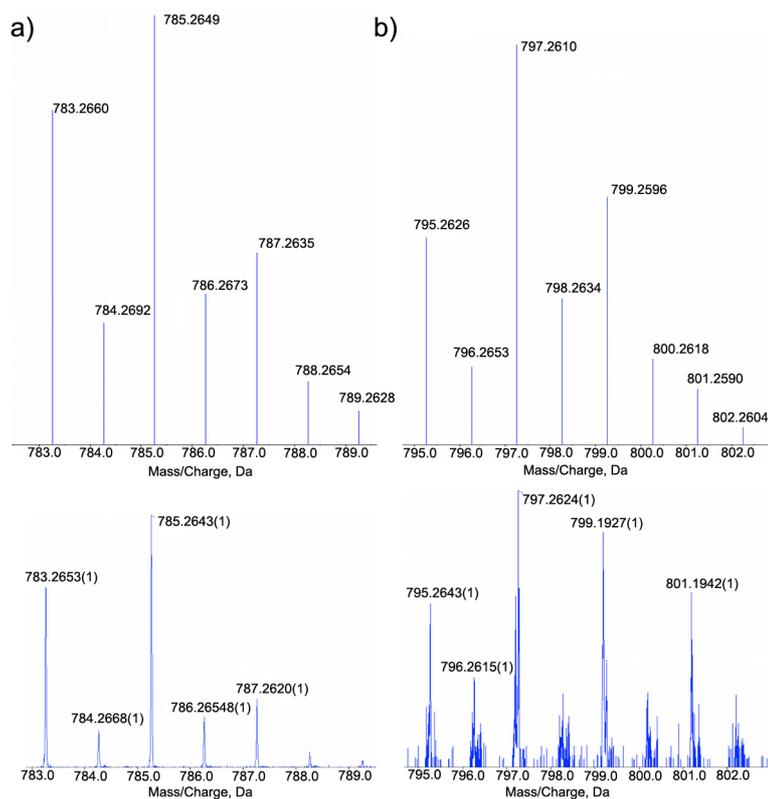


Figura 6. 22. a) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H-1L5})_2(\text{ClO}_4)]^+$ (teórico arriba y experimental abajo) en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 9$; b) Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_2(\text{H-1L5})_2(\text{CH}_3\text{OH})\text{Br}]^+$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 9$ (teórico arriba y experimental abajo). Relación $\text{Cu(II)}:\text{L} \ 1:1$

Finalmente para completar los estudios en disolución, realizamos medidas de EPR de disoluciones de **L5** y Cu(II) , en una relación molar 1:1, a diferentes valores de pH (figura 6. 23).

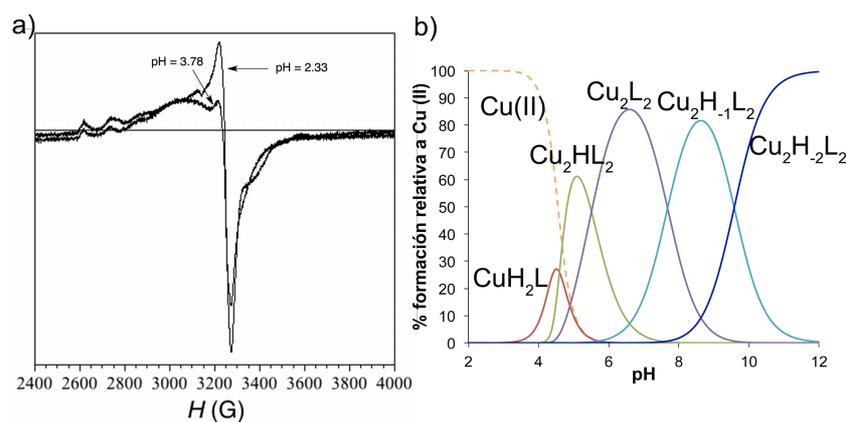


Figura 6. 23. a) Espectros EPR de disoluciones de Cu(II)-**L5** a pH: 2.3, 3.8, 5.5, 7.5, 9.5 y 11.0; b) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-**L5**, para una relación molar 1:1. $[Cu(II)] = [L] = 1 \times 10^{-3}M$.

De todas la muestras, se pudo observar una señal EPR en las disoluciones preparadas a pH 2.3 y 3.8. Estos datos están en consonancia con los datos obtenidos mediante potenciometría. Según el diagrama de distribución de especies, a estos valores de pH el Cu(II) está en su forma libre o formando la especie mononuclear $[CuH_2L]^{4+}$, por lo que parece lógico la señal de EPR.

En cambio, el resto de disoluciones no presentan señales EPR. Esto indica que prácticamente todo el Cu(II) se encuentra acoplado, y por tanto nos da una evidencia de la formación de dímeros binucleares. Teniendo en cuenta los estudios de susceptibilidad magnética descritos anteriormente y otros estudios previos de sistemas similares, se podría decir que la razón de la ausencia de señal de EPR se debe al acoplamiento de ambos átomos de Cu(II) a través de los anillos de pirazol.

Por tanto, los estudios potenciométricos junto con las datos de espectrometría de masas y los espectros EPR, indican que la formación de los dímeros binucleares también ocurre en disolución y

la conexión de los átomos metálicos ocurre a través de los anillos de pirazol.

6. 4. 3. ¿Se puede coordinar un tercer átomo en la cavidad libre del macrociclo?

Si se recuerdan las estructuras cristalinas de los complejos **CS3** y **CS4**, la coordinación de los dos átomos de Cu(II) se produce a través de los anillos de pirazol y los grupos amino adyacentes a éste, de manera que la cavidad de uno de los dos macrociclos quedaba libre (figuras 6. 15 y 6. 17). Por tanto, nos planteamos la posibilidad de que pudiese coordinar un tercer átomo de Cu(II) en esta parte del macrociclo.

Así pues, estudiamos el sistema Cu(II)-**L5** en relación 3:2 (tabla 6. 5), pudiendo determinar la formación de dos especies dímeras trinucleares. Los valores logarítmicos de sus constantes de formación son 27.92 y 20.20, y se corresponden con los equilibrios $3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L} \rightleftharpoons [\text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}_2]^{4+} + 2\text{H}^+$ y $3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}_2(\text{OH})]^{3+} + 3\text{H}^+$, respectivamente.

Tal y como se observa el diagrama de distribución de especies, para una relación molar Cu(II):**L5** 3:2 (figura 6. 24), las especies trinucleares se forman a partir de valores de pH superiores a 7, permaneciendo predominantes hasta pH 12. En cambio, en condiciones relativamente ácidas, siguen predominando las especies dímeras binucleares.

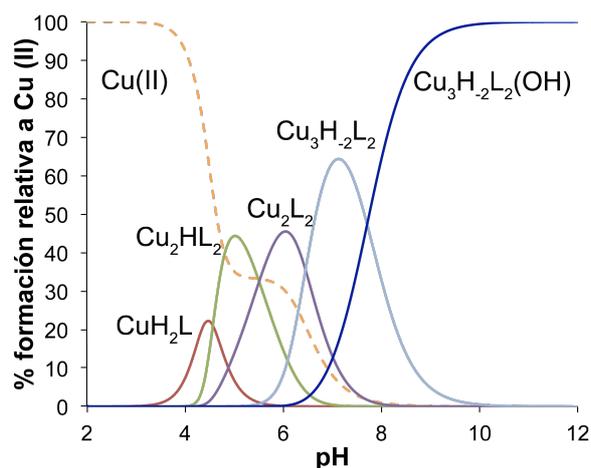


Figura 6. 24. Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-**L5**, para una relación molar 3:2. $[Cu(II)] = 1.5 \times 10^{-3} M$; $[L] = 1 \times 10^{-3} M$.

También pudimos determinar la formación de especies trinucleares en disolución por espectrometría de masas. En el espectro obtenido a partir de una muestra de Cu(II) y **L5**, en una relación molar 3:2 a pH 7, se observa un pico a m/z 408.5914 que, según los datos experimentales y la simulación teórica, se corresponde con la especie trinuclear $[Cu_3(H_{-1}L5)_2Cl_2]^{2+}$. En la figura 6. 25 se comparan los datos experimentales y la distribución isotópica teórica.

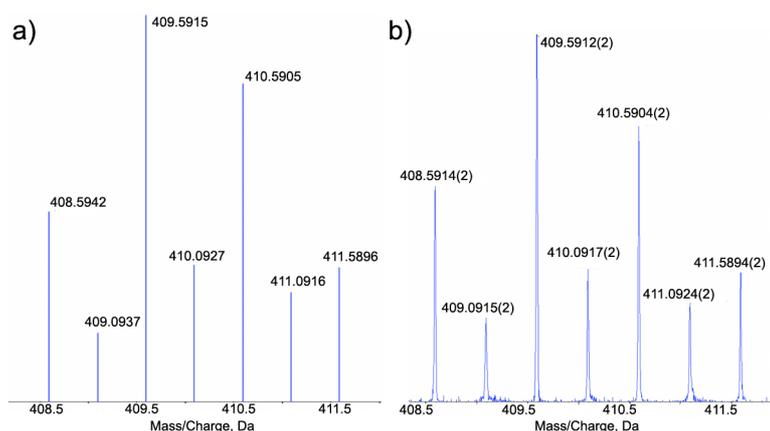


Figura 6. 25. Espectros HR-ES-MS de la especie $[\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L5})_2\text{Cl}_2]^{2+}$ en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ a $\text{pH} = 7$. a) teórico; b) experimental. Relación molar $\text{Cu}(\text{II}):\text{L}$ 3:2

6. 4. 4. Fijación de CO_2 .

Una vez pudimos determinar la formación de complejos trinucleares del sistema $\text{Cu}(\text{II})\text{-L5}$ en disolución, pensamos que el complejo trinuclear es similar al de los dímeros binucleares y el tercer átomo se coordina a los átomos de N libres de la cavidad macrocíclica que queda libre. Por tanto, para completar la esfera de coordinación necesita de otros ligandos externos. Es justamente en este punto dónde entra el CO_2 y la razón de su eficacia para su fijación.

La primera evidencia que tuvimos fue la resolución de la estructura cristalina del complejo $[\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L5})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**CS5**) por rayos X. Los cristales crecieron a partir de la evaporación lenta de una disolución acuosa de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y **L5**, en una relación 3:2, a $\text{pH} 9$ (figura 6. 26).

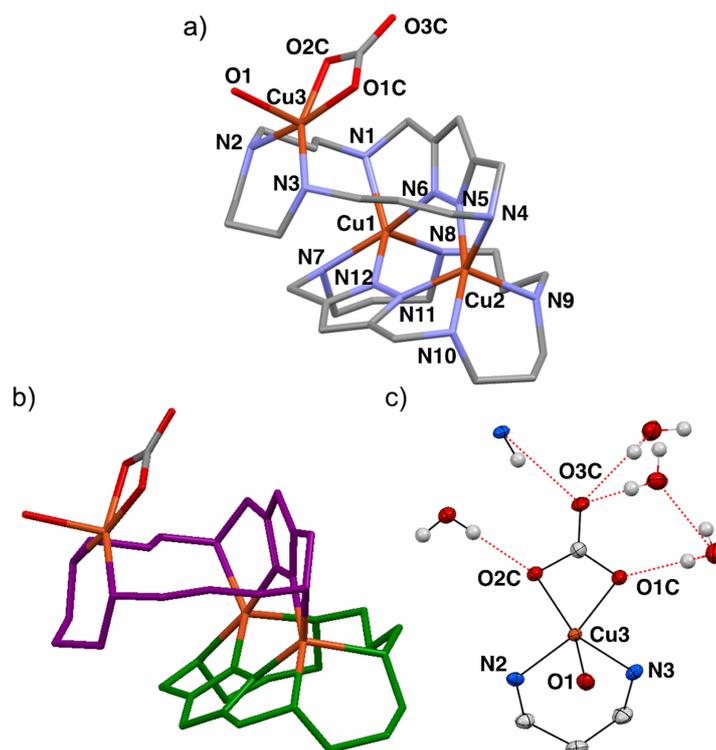


Figura 6. 26. a) Estructura cristalina del catión $[Cu_3(H-1L5)_2(CO_3)(H_2O)]^{2+}$; b) Representación esquemática del complejo; c) Ampliación de la coordinación de la anión de carbonato.

Tal y como se esperaba, la esencia del complejo es similar a las estructuras de los dímeros binucleares descritos anteriormente. La unión de dos macrociclos se produce a través de los anillos de pirazol y dos centro metálicos.

Por su parte, el tercer átomo de Cu(II) (Cu3) se sitúa en la cavidad macrocíclica que queda libre en uno de los receptores. El plano ecuatorial lo forman los dos grupos amino N2 y N3 (recordemos que dichos grupos no participaban en la coordinación de los metales en los dímeros binucleares) y se completa con un anión carbonato, que se coordina en forma de ligando η¹,η²-bidentado formando un anillo

quelato de cuatro miembros con un ángulo de 66.2° entre los átomos O1C-Cu3-O2C. La posición axial la ocupa una molécula de agua, de forma que el átomo de Cu3 adopta una geometría de pirámide de base cuadrada ($\tau = 0.15$). En la tabla 6. 6 se recogen los ángulos y distancias de enlace de los átomos que participan en la coordinación del Cu3.

Tabla 6. 6. Distancias (Å) y ángulos (°) seleccionados para la estructura $[\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$.

Distancias de enlace (Å)			Ángulos de enlace (°)			
Cu3	O1C	1.98	O1C	Cu3	O2	66.17(12)
Cu3	O2C	1.99	O2C	Cu3	N2	98.94(13)
Cu3	N2	1.99	O1C	Cu3	N3	93.94(13)
Cu3	N3	2.02	N2	Cu3	N3	100.26(14)
Cu3	O1	2.31	O1C	Cu3	O1	92.72(12)
			O2C	Cu3	O1	101.85(12)
			N2	Cu3	O1	91.52(12)
			N3	Cu3	O1	91.38(13)

Es importante destacar que no utilizamos disoluciones saturadas con CO_2 o carbonato para la obtención de los cristales, por lo que la molécula de carbonato proviene del CO_2 ambiental.

Con el fin de poder estimar la estabilidad del complejo ternario en disolución, realizamos estudios potenciométricos del sistema $\text{Cu(II)-L5-CO}_3^{2-}$ en una relación 3:2:3. Los estudios se realizaron desde valores de pH básicos hasta valores ácidos. De los datos obtenidos entre los valores de pH 10.0-7.0 se pudo estimar la constante de estabilidad ($\log\beta = 33.79(4)$) para el equilibrio $3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L5} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons [\text{Cu}_3(\text{H}_1\text{L5})_2(\text{CO}_3)]^{2+} + 2\text{H}^+$.

El diagrama de distribución de especies muestra que la formación de esta especie es mayoritaria entre los valores de pH 7 y 10 (figura 6. 27).

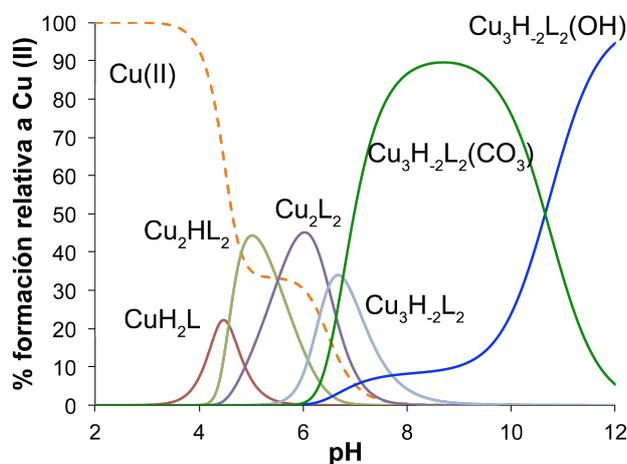


Figura 6. 27. Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II)-L5-CO₃²⁻, para una relación molar 3:2:3. [Cu(II)] = [CO₃²⁻] = 1.5 x 10⁻³M; [L] = 1 x 10⁻³ M

Tal y como se ha comentado a lo largo del capítulo, la sustitución del anillo de piridina por un anillo de pirazol repercute de forma directa en sus complejos metálicos. **L6** forma complejos mononucleares muy estables en un intervalo de pH amplio, mientras que, **L5** es capaz de formar complejos dimeros trinucleares muy eficaces para fijar CO₂ ambiental.

En un principio, este complejo no se diseñó para fijar CO₂, pero nos parece interesante ya que, el CO₂ es considerado como uno de los gases del efecto invernadero. Su generación proviene de la respiración y el consumo de combustibles fósiles. El CO₂ juega un papel importante en el ciclo del carbono y es necesario para la vida de animales y plantas, ya que éstas lo fijan al realizar la fotosíntesis y lo

convierten en materia orgánica para su supervivencia. En cambio, durante las últimas décadas la cantidad de CO₂ atmosférico ha crecido drásticamente como consecuencia de la actividad humana, de forma que las plantas no son capaces de mantener concentraciones adecuadas para alcanzar un equilibrio (figura 6. 28).

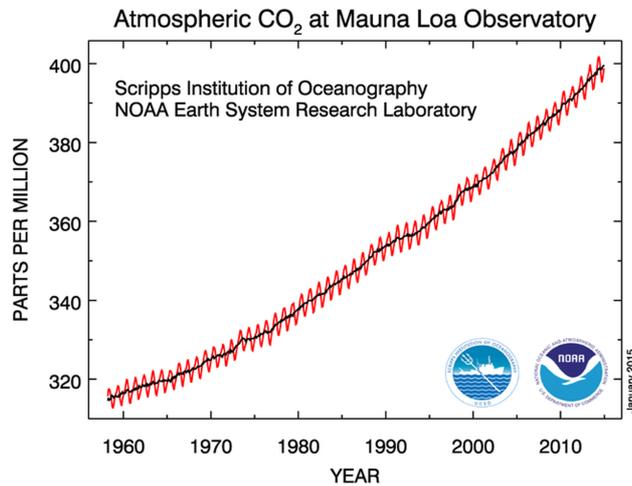


Figura 6. 28. Concentración de CO₂ atmosférico registrado durante los últimos 60 años.^e

Al drástico aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera desde la época industrial, cabe añadir que gran parte de la energía producida por la combustión de hidrocarburos (60%) se pierde en forma de calor y esto, junto con la deforestación e incendios, son las principales razones del calentamiento global.^{41,42}

Por ello, la búsqueda de soluciones para poder disminuir las emisiones actuales y encontrar energías alternativas se ha convertido

^e Gráfico obtenido a partir de la página web: <http://www.esrl.noaa.gov/gmd/> (National Oceanic and Atmospheric Administration U.S.A.). Datos recogidos en el observatorio Mauna Loa, Hawai.

en uno de los principales problemas de política medioambiental. Actualmente existen tres estrategias para mitigar las cantidades de CO₂ emitido a la atmósfera: reducir la cantidad de emisiones, bien utilizando tecnologías más efectivas o cambiando el estilo de vida, utilizar fuentes de energía que no impliquen la generación de CO₂, o bien diseñar dispositivos que sean capaces de capturar el CO₂.⁴³ Esta última opción resulta muy interesante para los científicos, puesto que el CO₂ es utilizado en un gran número de procesos industriales, tal y como se muestra en la tabla 6. 7.⁴⁴

Tabla 6. 7. Algunos ejemplos de la utilización del CO₂.

Sector	Aplicación industrial
Químico	Síntesis química y control de la temperatura de los reactores. Neutralización de efluentes alcalinos. Agente de expansión de poliuretano y poliestireno en la fabricación de contenedores plásticos. Secado de fibras sintéticas, animales o vegetales.
Farmacéutico	Como atmósfera inerte o fluido supercrítico en la síntesis de algunos fármacos. Transporte en frío.
Alimentario	Congelación de alimentos para su almacenamiento Envasado de alimentos Proceso de extracción de la cafeína del café.
Sanidad	Componente junto con oxígeno para promover una respiración profunda.
Drenaje	Control del pH de aguas residuales.

Debido a la elevada estabilidad de la molécula de CO₂, se precisa de un catalizador para su transformación en otra especie. Tomando como referencia la naturaleza, podemos encontrar ejemplos en las enzimas rubisco⁴⁵ o anhidrasa carbónica.⁴⁶ La enzima rubisco cataliza la fijación de CO₂ ambiental en la primera etapa del ciclo de Calvin para convertirlo en azúcares, mientras que la anhidrasa carbónica es la responsable de la hidratación del CO₂.

En la década de los 90, grupos pioneros como el de Kimura sintetizaron ligandos poliamínicos cuyos complejos metálicos se

estudiaron como miméticos de la anhidrasa carbónica.⁴⁷⁻⁵⁰ Siguiendo con la línea de receptores nitrogenados, muchos de los complejos con metales de transición resultan ser eficaces en la fijación de CO₂ en determinadas condiciones (en la figura 6. 29 se muestran algunos ejemplos). Es importante destacar que, los cristales obtenidos en los trabajos de Company *et al.* y Wang *et al.* se obtuvieron al burbujear con una corriente de CO₂ la disolución de preparación de los cristales, mientras que en la obtenida por Angamuthu *et al.*, el CO₂ fijado es de origen atmosférico. También, es importante destacar que el complejo preparado por Angamuthu es capaz de reducir cuatro moléculas de CO₂ a dos de oxalato, lo que le convierte en un metaloreceptor muy atractivo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que para la preparación de los compuestos se han utilizado disolventes orgánicos y esto, en determinadas condiciones, se convierte en una desventaja. En este sentido, existen otros trabajos en los que macrociclos, incorporando átomos de nitrógeno y oxígeno en su estructura, son capaces de capturar CO₂ atmosférico en medio acuoso.^{51,52}

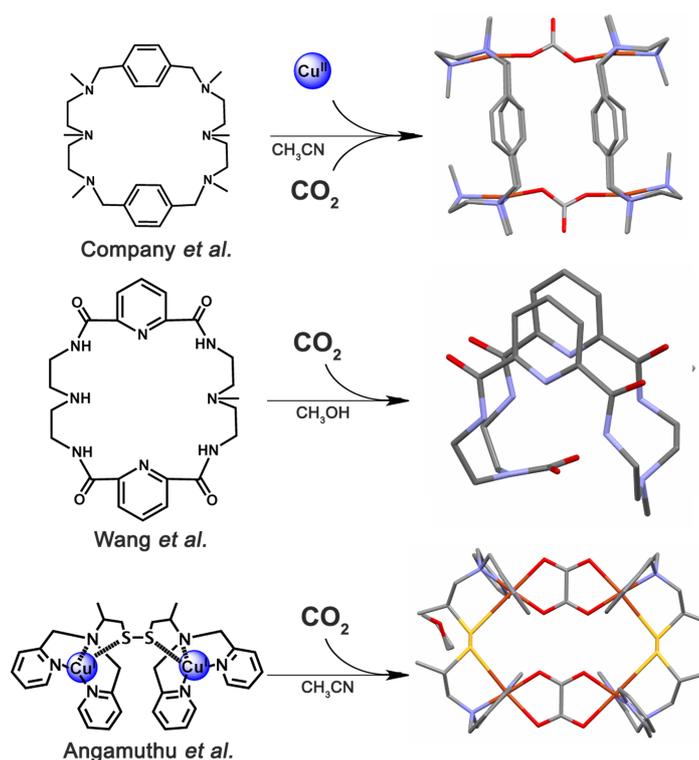


Figura 6. 29. Complejos metálicos capaces de fijar CO_2 .⁵³⁻⁵⁵

En el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia se sintetizó un azaciclofano con una unidad terpiridina como espaciador, capaz de fijar CO_2 atmosférico en medio acuoso a partir de sus complejos metálicos (figura 6. 30).^{56,57} Cuando se utiliza una relación molar 1:1 Cu(II):L , el átomo de cobre adopta una geometría de base cuadrada en la que se coordina a los tres nitrógenos de la terpiridina y un átomo de oxígeno del grupo carbamato, que se genera *in situ* una vez se forma el complejo metálico y éste reacciona con el CO_2 atmosférico.

En cambio, si se utiliza una relación molar Cu(II):L 2:1, uno de los átomos de cobre se dispone nuevamente en la parte de la terpiridina y el otro átomo de cobre se coordina a los tres grupos amino de la parte

central de la cadena poliamínica. Ambos átomos de cobre se conectan a través de una puente carbonato, que actúa como ligando μ,μ' -(bis)-monodentado, al interaccionar el complejo con el CO₂ atmosférico.

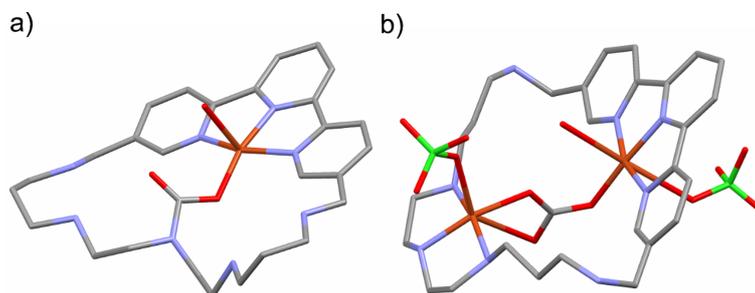


Figura 6. 30. Estructura cristalina del complejo: a) CuL(carb); b) Cu₂L(CO₃).

Es importante destacar el papel del espaciador, puesto que su análogo (utilizando la misma cadena poliamínica) con un anillo de piridina no es capaz de fijar CO₂.

Tal y como se ha visto, existen otros complejos capaces de fijar CO₂, con sus ventajas e inconvenientes, puesto que hay que tener en cuenta los costes, condiciones o eficacia. El trabajo presentado en este capítulo no pretende ser la solución al problema medioambiental, pues todavía queda mucho trabajo por hacer. Pero puede que, sus características y propiedades, puedan contribuir para dar con la solución en un futuro.

6. 5. Conclusiones.

En el capítulo se ha descrito por primera vez la química de coordinación del Cu(II) por parte de un ligando poliamínico [1+1] con una unidad de pirazol a modo de espaciador. Se ha visto que el receptor **L5** es capaz de interconectar dos átomos metálicos a través de dos heterociclos correspondientes a dos unidades macrocíclicas

diferentes, formando dímeros binucleares. La coordinación del Cu(II) por parte de este receptor es muy diferente a la su análogo de piridina (**L6**), pues los resultados experimentales utilizando diferentes técnicas, evidencian que tales diferencias ocurren tanto en estado sólido como en disolución.

Una de las principales características de estos metaloreceptores $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))(\text{H}_1\text{L5})](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3.75\text{H}_2\text{O}$ y $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{H}_1\text{L5}))_{0.5}(\text{H}_1\text{L5})_{1.2}]_2(\text{ClO}_4)_3\text{Br}_2 \cdot 4.2 \text{H}_2\text{O}$, es que la cavidad macrocíclica que queda libre en uno de los ligandos que forman el dímero y puede coordinar otro sustrato. Este hecho resulta interesante ya que permite la coordinación de otro átomo metálico. Experimentalmente, hemos podido observar la coordinación de un tercer átomo metálico en dicha cavidad y como consecuencia de ello, la posibilidad de coordinar otros sustratos. Una evidencia de ello es la formación del metaloreceptor trinuclear capaz de fijar CO_2 atmosférico. La obtención de cristales y los estudios potenciométricos indican que este nuevo metaloreceptor presenta una elevada tendencia a capturar CO_2 atmosférico.

6. 6. Bibliografía.

- (1) Belda, R.; Pitarch-Jarque, J.; Soriano, C.; Llinares, J. M.; Blasco, S.; Ferrando-Soria, J.; García-España, E. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 10795.
- (2) Fernandes, A. S.; Cabral, M. F.; Costa, J.; Castro, M.; Delgado, R.; Drew, M. G. B.; Felix, V. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2011**, *105*, 410.
- (3) Díaz, P.; Basallote, M. G.; Mañez, M. A.; García-España, E.; Gil, L.; Latorre, J.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Luis, S. V. *Dalton Transactions* **2003**, 1186.
- (4) Basallote, M. G.; Doménech, A.; Ferrer, A.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Mañez, M. A.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorganica Chimica Acta* **2006**, *359*, 2004.
- (5) Aguilar, J.; Basallote, M. G.; Gil, L.; Hernández, J. C.; Mañez, M. A.; García-España, E.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Dalton Transactions* **2004**, 94.
- (6) Mukherjee, R. *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, *203*, 151.
- (7) Klingele, J.; Dechert, S.; Meyer, F. *Coordination Chemistry Reviews* **2009**, *253*, 2698.
- (8) Ward, M. D.; McCleverty, J. A.; Jeffery, J. C. *Coordination Chemistry Reviews* **2001**, *222*, 251.
- (9) Dewick, P. M. *Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry*; Wiley, 2006.
- (10) Elguero, J. In *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*; Scriven, A. R. K. W. R. F. V., Ed.; Pergamon: Oxford, 1996, p 1.
- (11) Gavrilova, A. L.; Bosnich, B. *Chemical Reviews* **2004**, *104*, 349.
- (12) Haasnoot, J. G. *Coordination Chemistry Reviews* **2000**, *200*, 131.

- (13) Brooker, S.; Davidson, T. C.; Hay, S. J.; Kelly, R. J.; Kennepohl, D. M.; Plieger, P. G.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Bill, E.; Bothe, E. *Coordination Chemistry Reviews* **2001**, *216*, 3.
- (14) Klingele, M. H.; Brooker, S. *Coordination Chemistry Reviews* **2003**, *241*, 119.
- (15) Tanaka, S.; Tsurugi, H.; Mashima, K. *Coordination Chemistry Reviews* **2014**, *265*, 38.
- (16) Carnes, M. E.; Collins, M. S.; Johnson, D. W. *Chemical Society Reviews* **2014**, *43*, 1825.
- (17) Singh, A. K.; van der Vlugt, J. I.; Demeshko, S.; Dechert, S.; Meyer, F. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2009**, 3431.
- (18) Keij, F. S.; Degraaff, R. A. G.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1984**, 2093.
- (19) Incarvito, C.; Rheingold, A. L.; Qin, C. J.; Gavrilova, A. L.; Bosnich, B. *Inorganic Chemistry* **2001**, *40*, 1386.
- (20) Tandon, S. S.; Chen, L. Q.; Thompson, L. K.; Bridson, J. N. *Inorganic Chemistry* **1994**, *33*, 490.
- (21) Roder, J. C.; Meyer, F.; Pritzkow, H. *Organometallics* **2001**, *20*, 811.
- (22) Iturrino, L.; Navarro, P.; Rodríguez-Franco, M. I.; Contreras, M.; Escario, J. A.; Martínez, A.; Pardo, M. D. *European Journal of Medicinal Chemistry* **1987**, *22*, 445.
- (23) Kamiyusuki, T.; Okawa, H.; Matsumoto, N.; Kida, S. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transaction* **1990**, 195.
- (24) Kamiyusuki, T.; Okawa, H.; Kitaura, E.; Inoue, K.; Kida, S. *Inorganica Chimica Acta* **1991**, *179*, 139.

- (25) Meyer, F.; Rutsch, P. *Chemical Communications* **1998**, 1037.
- (26) Raidt, M.; Siegfried, L.; Kaden, T. A. *Dalton Transactions* **2003**, 4493.
- (27) Konrad, M.; Meyer, F.; Heinze, K.; Zsolnai, L. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1998**, 199.
- (28) Noble, A.; Olguin, J.; Clerac, R.; Brooker, S. *Inorganic Chemistry* **2010**, *49*, 4560.
- (29) Pitarch, J.; Paz Clares, M.; Belda, R.; Costa, R. D.; Navarro, P.; Ortí, E.; Soriano, C.; García-España, E. *Dalton Transactions* **2010**, *39*, 7741.
- (30) Miranda, C.; Escartí, F.; Lamarque, L.; García-España, E.; Navarro, P.; Latorre, J.; Lloret, F.; Jiménez, H. R.; Yunta, M. J. R. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2005**, 189.
- (31) Lamarque, L.; Navarro, P.; Miranda, C.; Aran, V. J.; Ochoa, C.; Escartí, F.; García-España, E.; Latorre, J.; Luis, S. V.; Miravet, J. F. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 10560.
- (32) Kumar, M.; Arán, V. J.; Navarro, P. *Tetrahedron Letters* **1995**, *36*, 2161.
- (33) Escartí, F.; Miranda, C.; Lamarque, L.; Latorre, J.; García-España, E.; Kumar, M.; Aran, V. J.; Navarro, P. *Chemical Communications* **2002**, 936.
- (34) Pitarch-Jarque, J.; Belda, R.; Lloret, F.; Ferrando-Soria, J.; Navarro, P.; Lopera, A.; García-España, E. *Dalton transactions* **2015**, *44*, 3378.
- (35) Algarra, A. G.; Basallote, M. G.; Belda, R.; Blasco, S.; Castillo, C. E.; Llinares, J. M.; García-España, E.; Gil, L.; Mañez, M. A.; Soriano, C.; Verdejo, B. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2009**, 62.
- (36) Frassinetti, C.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M. S.; Vacca, A. *Analytical Biochemistry* **1995**, *231*, 374.

- (37) Frassinetti, C.; Alderighi, L.; Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; Ghelli, S. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2003**, *376*, 1041.
- (38) Dagnall, S. P.; Hague, D. N.; McAdam, M. E.; Moreton, A. D. *Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions I* **1985**, *81*, 1483.
- (39) Teichgraber, J.; Leibelng, G.; Dechert, S.; Meyer, F. *Zeitschrift für Anorganische Allgemeine Chemie* **2005**, *631*, 2613.
- (40) Hanot, V. P.; Robert, T. D.; Kolnaar, J.; Haasnoot, J. G.; Reedijk, J.; Kooijman, H.; Spek, A. L. *Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions* **1996**, 4275.
- (41) Solomon, S.; Plattner, G. K.; Knutti, R.; Friedlingstein, P. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2009**, *106*, 1704.
- (42) Cox, P. M.; Betts, R. A.; Jones, C. D.; Spall, S. A.; Totterdell, I. J. *Nature* **2000**, *408*, 184.
- (43) Schrag, D. P. *Science* **2007**, *315*, 812.
- (44) Song, C. S. *Catalysis Today* **2006**, *115*, 2.
- (45) Spreitzer, R. J.; Salvucci, M. E. *Annual Review of Plant Biology* **2002**, *53*, 449.
- (46) Maren, T. H. *Physiological Review* **1967**, *47*, 595.
- (47) Koike, T.; Kimura, E.; Nakamura, I.; Hashimoto, Y.; Shiro, M. *Journal of the American Chemical Society* **1992**, *114*, 7338.
- (48) Zhang, X. P.; Vaneldik, R.; Koike, T.; Kimura, E. *Inorganic Chemistry* **1993**, *32*, 5749.

- (49) Kimura, E.; Shiota, T.; Koike, T.; Shiro, M.; Kodama, M. *Journal of the American Chemical Society* **1990**, *112*, 5805.
- (50) Kimura, E.; Nakamura, I.; Koike, T.; Shionoya, M.; Kodama, Y.; Ikeda, T.; Shiro, M. *Journal of the American Chemical Society* **1994**, *116*, 4764.
- (51) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Corana, F.; Fusi, V.; Giorgi, C.; Paoli, P.; Paoletti, P.; Valtancoli, B.; Zanchini, C. *Inorganic Chemistry* **1996**, *35*, 5540.
- (52) Andrés, S.; Escuder, B.; Doménech, A.; García-España, E.; Luis, S. V.; Marcelino, V.; Llinares, J. M.; Ramirez, J. A.; Soriano, C. *Journal of Physical Organic Chemistry* **2001**, *14*, 495.
- (53) Angamuthu, R.; Byers, P.; Lutz, M.; Spek, A. L.; Bouwman, E. *Science* **2010**, *327*, 313.
- (54) Company, A.; Jee, J. E.; Ribas, X.; Lopez-Valbuena, J. M.; Gomez, L.; Corbella, M.; Llobet, A.; Mahia, J.; Benet-Buchholz, J.; Costas, M.; van Eldik, R. *Inorganic Chemistry* **2007**, *46*, 9098.
- (55) Wang, Q. Q.; Day, V. W.; Bowman-James, K. *Organic Letters* **2014**, *16*, 3982.
- (56) García-España, E.; Gaviña, P.; Latorre, J.; Soriano, C.; Verdejo, B. A. *Journal of the American Chemical Society* **2004**, *126*, 5082.
- (57) Verdejo, B.; Blasco, S.; González, J.; García-España, E.; Gaviña, P.; Tatay, S.; Doménech, A.; Doménech-Carbo, M. T.; Jiménez, H. R.; Soriano, C. *European Journal of Inorganic Chemistry* **2008**, 84.

6. 7. Anexo

Tabla A. 6. 1. Datos cristalográficos de los compuestos: [CuL6](ClO₄)₂ (**CS2**), Cu₂(H(H₋₁L5))(H₋₁L5)](ClO₄)₃·3.75H₂O (**CS3**), [Cu₂(H(H₋₁L5))_{0.5}(H₋₁L5)_{1.5}]₂(ClO₄)₃Br₂·4.2H₂O (**CS4**) y [Cu₃(H₋₁L5)₂(CO₃)(H₂O)](ClO₄)₂·8H₂O (**CS5**).

Compuesto	CS2	CS3	CS4	CS5
Fórmula	C ₁₆ H ₂₉ Cl ₂ CuN ₅ O ₈	C ₁₁₂ H ₂₅₀ Cl ₁₂	C ₅₆ H _{117.4} Br ₂ Cl ₃	C ₂₅ H ₇₂ Cl ₂ Cu ₃
Peso Molecular	553,88	4211.32	1906.69	1170.51
T (K)	298(2) K	298(2) K	120(2)	120(2)
Sist. cristalino	Ortorómbico	Monoclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	Pna21	P 21/c	P 21/c	P 21/n
a (Å)	19.0320(5)	13.4590(2)	12.227(6)	21.5744(7)
b (Å)	8.4710(2)	17.8670(4)	17.389(1)	10.3781(3)
c (Å)	14.1470(8)	18.5920(4)	19.140(8)	23.7191(9)
a (°)	90	90	90	90
b (°)	90	91.9950(10)	104.329(2)	116.231(4)
g (°)	90	90	90	90
Volumen (Å³)	2280.78(15)	4468.14(15)	3943.1(3)	4763.8(3)
Z	4	1	2	4
d. calc. (g/cm³)	1.613	1.565	1.595	1.632
λ (Å)	0.71073	0.71073	0.71073	0.71073
F(000)	1148	2198	1959	2444
μ(mm⁻¹)	1.245	1.209	2.255	1.525
Q range	0.99 - 27.48	1.51 - 27.28	2.08 - 28.36	3.02 - 32.49
Refls. totales	9165	27627	15184	45251
Refls. únicas	4947	9884	9607	15663
R(int)	0.032	0.036	0.0501	0.0329
restr/param	1/290	202/677	220/605	83/625
R1 (I>4s)	0.0729;	0.0591;	0.0854;	0.0649;
wR²	0.2128;	0.1770;	0.2452;	0.1870;
GOF (F²)	1.040	1.052	1.018	1.141

Tabla A. 6. 2. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto **CS2**.

D	H	A	D-H	D-H..A	D-H..A	Ángulo
N2	H2	O12(#1)	0.91	2.22	3.101(14)	152.1
N3	H3	O14(#2)	0.91	2.28	3.082(12)	144.3
N4	H4	O22(#3)	0.91	2.33	3.188(11)	170.8
N5	H5	O21(#4)	0.91	2.24	3.101(11)	158.8

Operaciones de simetría: (#1) = x, y, z-1; (#2) = -x, -y+1, z-1/2;
(#3) = -x+1/2, y-1/2, z-1/2; (#4) = -x+1/2, y+1/2, z-1/2;

Tabla A. 6. 3. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto **CS3**.

D	H	A	D-H	D-H..A	D-H..A	Ángulo
N7	H7	O41(#2)	0.91	2.3	3.162(8)	157.9
N4	H4	O21(#1)	0.91	2.31	3.132(8)	150.4
N10	H10	O14(#1)	0.91	2.26	3.111(18)	155.4
N10	H10	O15(#1)	0.91	2.29	3.108(16)	149.5
N10	H10	O112(#1)	0.91	2.38	3.281(17)	171.2
N10	H10	O114(#1)	0.91	2.48	3.139(17)	130
N10	H10	O16(#1)	0.91	2.57	3.30(2)	137.9
N1	H1	O3(#3)	0.91	2.02	2.920(7)	170.6
N1	H1	O33(#3)	0.91	2.38	3.20(2)	149.4
N8	H8	O31(#3)	0.91	2.28	3.13(3)	155.6
N8	H8	O22(#3)	0.91	2.4	3.226(8)	150.5
N9	H9	O22(#1)	0.91	2.28	3.139(7)	158.3
N3	H3C	N2	0.9	1.83	2.661(8)	152.8
O2	H21W	O43(#6)	0.86	2.09	2.933(13)	166.2
O2	H22W	O12	0.84	2.16	2.99(2)	167.1
O2	H22W	O17	0.84	2.37	2.91(3)	122.3
O2	H22W	O112	0.84	2.35	2.938(19)	127.6
N2	H2N	O4(#5)	0.88	2.14	2.962(14)	153.7
O4	H41W	O34(#4)	0.81	2.12	2.65(2)	122.9
O4	H41W	O23(#4)	0.81	2.44	3.03(2)	130.4
O4	H42W	O1	0.83	1.98	2.68(2)	141.2
O3	H32W	O23	0.81	2.53	3.082(17)	127.2
O3	H31W	O44(#7)	0.84	2.17	3.003(12)	179.5
O1	H12W	O21	0.81	2.45	3.058(19)	133.5
O1	H12W	O24	0.81	2.46	3.26(2)	168.1
O1	H11W	O2	0.8	1.67	2.427(14)	157.9

Operaciones de simetría: (#1) = -x+1, y+1/2, -z+1/2; (#2) = x, y+1, z; (#3) = x+1, -y+3/2, z-1/2; (#4) = -x, -y, -z+1; (#5) = x+1, y+1, z; (#6) = -x+1, y-1/2, -z+1/2; (#7) = x-1, -y+1/2, z+1/2

Tabla A. 6. 4. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto **CS4**.

D	H	A	D-H	D-H..A	D-H..A	Ángulo
N4	H4	O3	0.91	2.08	2.960(13)	162.6
N10	H10N	O21	0.91	2.3	3.16(2)	156.2
N4	H4	O21	0.91	2.43	3.12(2)	132.2
N9	H9	Br2	0.91	2.56	3.367(11)	148.4
N7	H7N	Br2(#1)	0.91	2.58	3.422(10)	155
N7	H7N	Br1(#1)	0.91	2.59	3.449(9)	158.3
N8	H8	O34(#1)	0.91	2.4	3.244(11)	154.5
N1	H1	O34(#1)	0.91	2.28	3.082(11)	147
N3	H3D	O1	0.89	2.21	2.976(16)	145.2
N2B	H2E	N3	0.9	1.83	2.628(17)	145.9
N2A	H2D	N3	0.9	1.93	2.642(16)	135.2
O1	H11W	N2A(2#)	0.88	2.43	3.25(3)	155.6
O1	H12W	N3	0.76	2.28	2.986(16)	154.1
O2	H21W	O14	0.83	2.34	3.12(4)	156.7
O2	H22W	O13	0.82	2.37	3.01(4)	136.3
O3	H31W	Br1	0.83	2.43	3.259(16)	177.8
O3	H32W	O2	0.84	1.86	2.57(3)	140.9

Operaciones de simetría: (#1)= -x+2, y-1/2, -z+3/2; (#2)= -x+1, -y, -z+1;

Tabla A. 6. 5. Distancias de enlace de hidrógeno para el compuesto **CS5**.

D	H	A	D-H	D-H..A	D-H..A	Ángulo
N4	H4	O16(#1)	0.91	2.43	3.020(13)	123
N4	H4	O9(#9)	0.91	2.44	3.226(5)	144.4
N8	H8	O22(#4)	0.91	2.57	3.314(6)	139
N2	H2	O3C(#5)	0.91	2.01	2.852(4)	153.9
N1	H1	O9(#12)	0.91	2.17	3.025(5)	156.5
N9	H9	O16(#1)	0.91	2.16	3.002(14)	154.2
N9	H9	O11(#1)	0.91	2.24	3.045(11)	147.2
N9	H9	O14(#1)	0.91	2.4	3.206(7)	148
N7	H7	O18(#2)	0.91	2.03	2.937(14)	171.6
N7	H7	O12(#2)	0.91	2.06	2.943(9)	164.7
N10	H10	O23(#3)	0.91	2.42	3.217(6)	146.1
N3	H3	O5(#5)	0.91	2.18	3.091(5)	173.6
O3	H31W	O1C(#6)	0.82	1.95	2.765(5)	173.7
O2	H21W	O3C(#5)	0.82	2.17	2.981(5)	174.4
O5	H52W	O6(#7)	0.82	2.02	2.835(5)	170.4
O9	H91W	O23(#11)	0.82	2.05	2.860(6)	167.4
O8	H82W	O3C	0.82	1.97	2.778(5)	165.9
O5	H51W	O2	0.82	2.1	2.905(5)	169
O8	H81W	O7(#11)	0.82	1.87	2.692(5)	173.4
O4	H42W	O9(#6)	0.83	2.14	2.876(5)	148.9
O4	H41W	O3	0.83	2.02	2.821(6)	162.3
O7	H71W	O21	0.83	2.28	3.035(6)	151.8
O7	H71W	O13(#8)	0.83	2.49	3.086(9)	129.2
O7	H71W	O18(#8)	0.83	2.53	2.954(13)	112.6
O9	H92W	O8	0.82	1.94	2.748(5)	166
O2	H22W	O3	0.83	2.03	2.806(5)	155.6
O6	H61W	O4(#9)	0.82	1.87	2.667(5)	162
O6	H62W	O2	0.82	2.25	2.937(5)	141.2

O7	H72W	O6(#10)	0.82	2.08	2.862(6)	158.8
O3	H32W	O8(#6)	0.82	2.01	2.791(5)	157.9
O1	H11W	O2C(#5)	0.82	1.94	2.754(4)	176.4
O1	H12W	O5(#5)	0.82	2.07	2.817(5)	152.8

Operaciones de simetría: (#1) = $x-1/2, -y+3/2, z+1/2$; (#2) = $x, y, z+1$; (#3) = $-x+1/2, y-1/2, -z+3/2$; (#4) = $-x+1, -y+2, -z+2$; (#5) = $-x+3/2, y-1/2, -z+3/2$; (#6) = $x+1/2, -y+1/2, z+1/2$; (#7) = $-x+2, -y+1, -z+2$; (#8) = $-x+1, -y+1, -z+1$; (#9) = $-x+2, -y+1, -z+2$; (#10) = $-x+1, -y+1, -z+2$; (#11) = $x+1/2, -y+3/2, z-1/2$; (#12) = $-x+3/2, y+1/2, -z+3/2$;

Capítulo 7

Cómo mejorar la capacidad de gelación del GMP.

7. 1. Motivación.

El principal objetivo que se plantea en esta parte del trabajo es aumentar la eficacia del 5'-guanosina monofosfato (GMP) como gelador. Es decir, formar geles a temperatura ambiente y a concentraciones de GMP inferiores a las que generalmente se necesitan. La primera razón es porque permitirá ampliar su intervalo de aplicaciones y la segunda, es por la relación estructural que guardan los geles con el genoma de las células eucariotas.

7. 2. ¿Cómo se forman los geles de GMP?

Los geles de GMP están formados por la auto-asociación de cuatro moléculas de GMP.¹ Las cuatro bases del mononucleótido se disponen en un mismo plano unidas a través de ocho enlaces de hidrógeno entre los átomos N7 y N2, y el oxígeno O6 y el grupo amino N1 (figura 7. 1).² En la parte central de la estructura queda un hueco ocupado por un catión el cual aporta estabilidad a la estructura, minimizando las repulsiones electrostáticas entre los pares de electrones libres de los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo. En este trabajo, tratándose de sales sódicas, el átomo central en el centro de la estructura se

correspondería con un catión sodio.^{3,4} El apilamiento de un G-quartet sobre otro, da lugar a fibras y éstas a los geles (figuras 7. 1 y 7. 2).

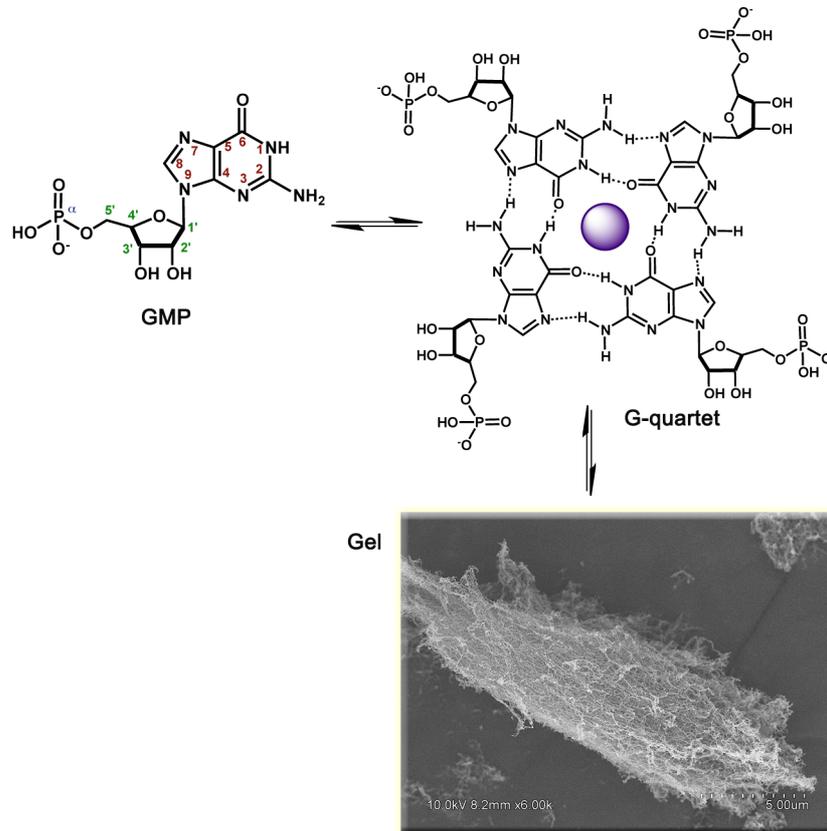


Figura 7. 1. Formación del gel.

Su formación está limitada a intervalos de pH entre 2 y 6. Esto se debe a que la base del nucleótido se protona a valores de pH inferiores a 2.4 (átomo N7). Por tanto, por debajo de este valor no se pueden formar los enlaces de hidrógeno entre los átomos N7 y N2. Por otra parte, el pK_{a2} de la cadena fosfatada es alrededor de 6, por lo que a valores de pH superiores, el número de cargas en el grupo fosfato es de dos y la repulsión electrostática es mayor. Por tanto, entre estos

valores de pH, la base del nucleótido se encuentra en su forma neutra y hay una carga negativa situada sobre el grupo fosfato.

La distancia entre dos planos de G-quartets apilados es de 0.32 nm y existe una torsión de 22° entre ambos para minimizar las repulsiones electrostáticas que se producen por el acercamiento de los grupos fosfato.²

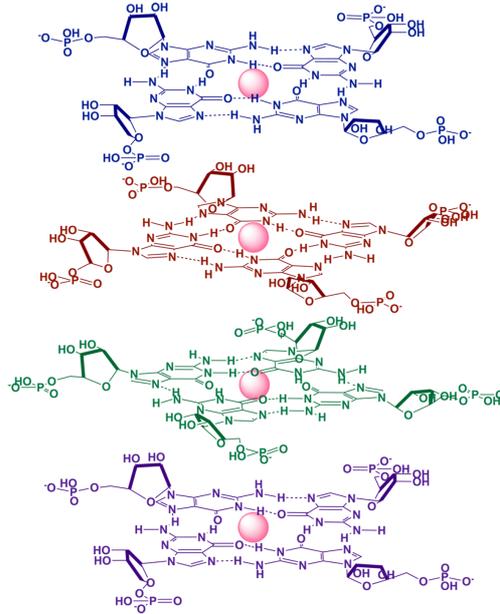


Figura 7. 2. Apilamiento de G-quartets.

El descubrimiento de este tipo de asociación fue muy importante para la biología y medicina, puesto que, los nucleótidos además de estar en su forma libre en los organismos celulares, forman parte de los ácidos nucleicos. Por esta razón, no es de extrañar que los científicos se cuestionaran, acto seguido, si la auto-asociación de la guanina se podía producir también en los ácidos nucleicos. Se ha demostrado, *in vivo* e *in vitro*, que en regiones ricas en guaninas de ADN y ARN, se forma este motivo estructural (figura 7. 3).⁵⁻¹¹

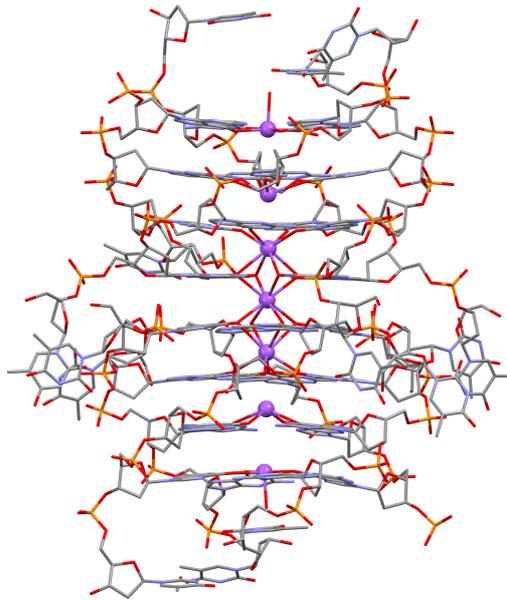


Figura 7. 3. Estructura del G-quadruplex obtenida a partir del hexanucleótido d(TG4T) (PDB 244D).

La estructura que forman al asociarse varias bases de guanina de los ácidos nucleicos se conoce con el nombre de G-quadruplex. Se cree que estas estructuras se forman en zonas del cromosoma, teniendo funciones reguladoras.^{11,12}

Los télómeros son secuencias repetitivas de ADN no codificado, situadas al final de los cromosomas. Su función es proteger el material genético de la recombinación, fusión de dos terminaciones y degradación. El ADN telomérico típico está formado por 5-8 kilobases de doble hebra y una mono-hebra rica en guaninas, que comprende de 100 a 200 bases, necesaria para asegurar la replicación del ADN cromosómico. Con cada división celular, los cromosomas se acortan en unos 50-200 pares de bases hasta que el tamaño del télómero alcanza una longitud crítica que causa la muerte celular.¹³

La telomerasa es la enzima responsable de mantener el tamaño del telómero. La actividad telomerasa en células que no necesitan mantener su división celular es muy baja, sin embargo, en células tumorales es alta. Es por ello, que el estudio de la telomerasa y su bloqueo, se ha convertido en uno de los objetivos para el desarrollo de fármacos antitumorales.^{14,15}

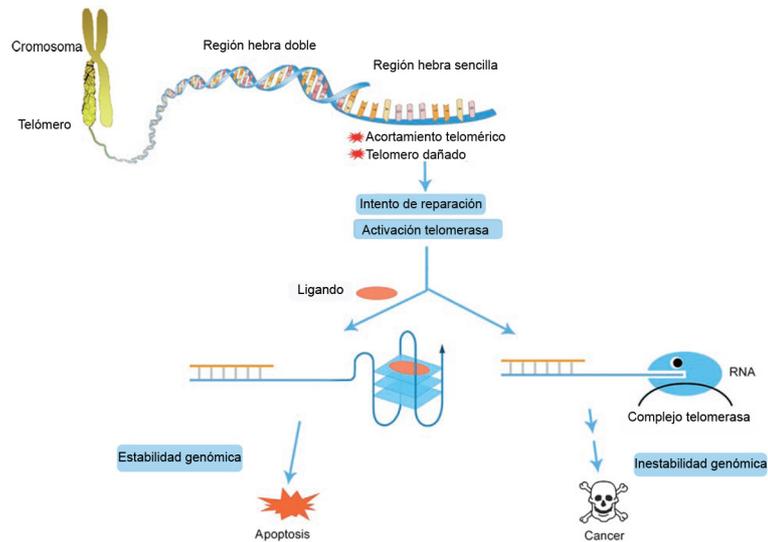


Figura 7. 4. Efecto de los ligandos sobre la telomerasa. Figura tomada de la referencia 15.

7. 3. ¿Cómo se puede aumentar la eficacia del GMP para formar geles?

El GMP se asocia formando G-quartets, cuyo apilamiento produce repulsiones electrostáticas entre las cadenas fosfato que dificulta la formación de los geles (figuras 7. 1 y 7. 2). Por tanto, creemos que la minimización de las repulsiones puede aumentar la eficacia en la formación de los geles. Partiendo de esta hipótesis, existen básicamente dos opciones: sustituir el grupo fosfato por otro grupo, de forma que se elimine la carga negativa localizada en éste o, minimizar

las repulsiones electrostáticas haciendo interaccionar los grupos fosfato con grupos de carga positiva.

La sustitución del fosfato podría derivar en otros problemas como la disminución de la solubilidad en agua o el aumento de la toxicidad. Sin embargo, es una opción que ofrece posibilidades en el caso de no utilizar los geles con fines biomédicos.¹⁶ En la figura 7. 5 se muestran tres guanosinas, capaces de formar geles, en los que se ha eliminado o modificado el grupo fosfato.¹⁷⁻¹⁹

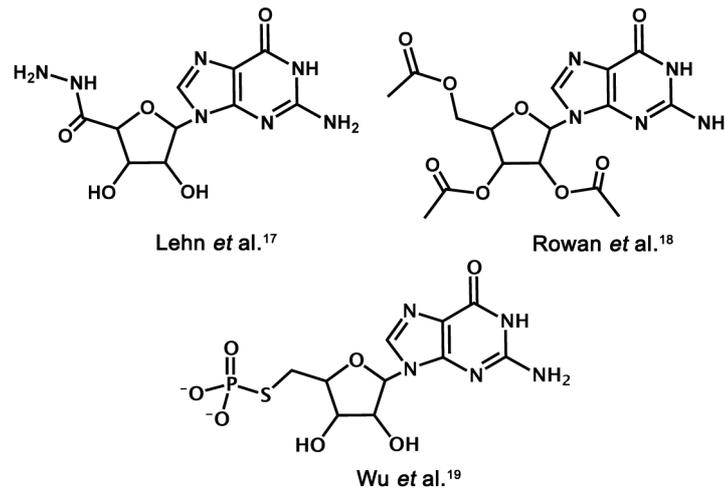


Figura 7. 5. Guanosinas modificadas.

La segunda opción conlleva la utilización de especies catiónicas para minimizar las repulsiones electrostáticas entre los fosfatos. Se podrían utilizar cationes simples como el sodio o el potasio, que resultan atractivos desde el punto de vista económico. Sin embargo, la afinidad de los fosfatos por éstos es relativamente baja.²⁰⁻²³

Otra alternativa que proponemos, es el uso de policationes. Hay varias clases de policationes que se podrían utilizar, como por ejemplo proteínas, lípidos o azúcares.

Las proteínas, como la protamina son muy eficientes minimizando repulsiones electrostáticas entre los grupos fosfato de ácidos nucleicos. Sin embargo, resultan poco atractivas desde el punto de vista económico y además, pueden causar reacciones inmunes.^{24,25}

Los lípidos o polímeros catiónicos son otra posibilidad. De hecho, este tipo de compuestos se han utilizado para terapia génica y no parecen presentar respuesta inmune. Por contra, tienen ciertas limitaciones como la toxicidad.²⁶

Aunque los ejemplos anteriores puede que encuentren una aplicación en un futuro, lo que se propone en este trabajo es usar poliaminas (figura 7. 6). Las ventajas que ofrecen las poliaminas es que, son relativamente asequibles, fáciles de modificar, solubles en agua, se puede controlar el número de cargas en función del pH y su afinidad por el grupo fosfato es aproximadamente dos ordenes de magnitud superior a la de monocaciones como el Na⁺.

La toxicidad es un factor a tener en cuenta a la hora de desarrollar aplicaciones biomédicas. En este sentido, entre las poliaminas utilizadas, la espermina (**L8**) y la espermidina (**L10**) no son tóxicas ya que son biogénicas y forman parte del metabolismo y la dieta humana.²⁷⁻³⁰ El resto son de origen sintético, por lo que habría que estudiar su toxicidad.

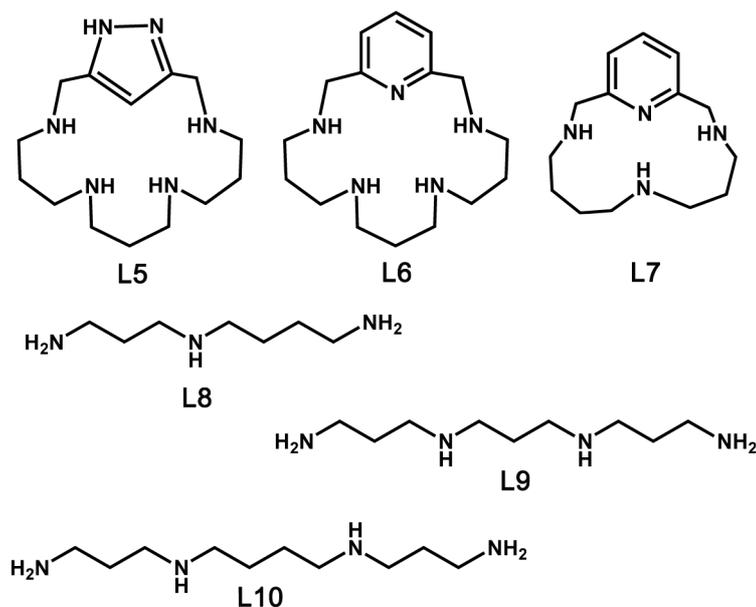


Figura 7. 6. Estructura de las poliaminas utilizadas como co-geladores. ^a

La adición de las poliaminas permite obtener geles a temperatura ambiente y a concentraciones muy inferiores a las que generalmente se suelen utilizar. En la fotografía de la figura 7. 7 se muestra el efecto de la adición de espermina (L10) a una disolución de GMP. Tal y como se puede observar, la poliamina facilita la interacción de las moléculas de GMP y por tanto la formación del gel.

^a Anexo 7.1 se muestra las constantes de protonación sucesivas para las poliaminas L5-L10 y los diagramas de distribución de especies en función del pH.



Figura 7. 7. Efecto de la adición de la poliamina **L10** sobre una disolución de GMP 30 mM a pH 5.

Variando la cantidad y relación molar de los componentes se pueden controlar propiedades como la resistencia a la presión o la temperatura. Por ejemplo, se pueden formar geles que se mantengan a temperaturas fisiológicas o que, por el contrario, fundan una vez inyectados (figura 7. 8). En general, las propiedades de los geles vendrán determinadas por la aplicación a la que se destinen. Generalmente, para formar geles a temperatura ambiente, se suelen utilizar concentraciones de GMP 180 - 1000 mM. Sin embargo, con la presencia de poliamina hemos podido reducir la concentración a 30 mM. No obstante, cuanto mayor es la concentración de GMP, mayor es la resistencia del gel.

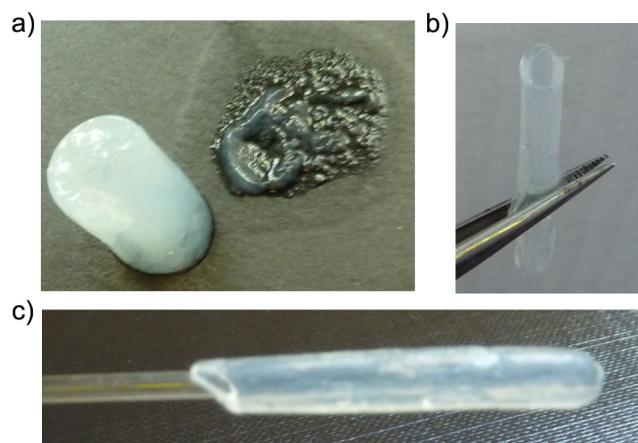


Figura 7. 8. Fotografías de los diferentes tipos de geles.

7. 4. ¿Cuánta poliamina se necesita añadir para formar un gel?

Para responder a esta pregunta, se probaron diferentes relaciones molares GMP:L, manteniendo la concentración de GMP 30 mM.^b Se considera que un material es un gel si: presenta una estructura continua y tiene un comportamiento predominante de sólido desde el punto de vista de la reología.^{31,c} El primer requisito se puede determinar visualmente, pero para el segundo se necesita realizar medias reológicas.

Para entender la referencia al comportamiento predominante de sólido, debemos tener en cuenta que un gel es una material viscoelástico. Esto quiere decir que presenta tanto comportamiento de sólido como de líquido, y la respuesta frente a la aplicación de una presión viene determinada por ambas características. Ambas componentes (sólida y líquida) están relacionadas mediante una ecuación compleja y se pueden medir mediante los módulos de almacenamiento y pérdida. El módulo de almacenamiento (G') está relacionado con la componente sólida del gel, mientras que el módulo de pérdida (G'') con la componente líquida. Por tanto si $G' > G''$, el material presenta un comportamiento predominante de sólido y se puede confirmar que el material de estudio es un gel.

Afortunadamente, tanto G' como G'' son valores que se pueden leer directamente de los datos que se obtienen en las medidas reológicas. Para su estimación, se realizaron medidas de dinámica oscilatoria de los geles en las que, para cada tipo de gel, se prepararon diferentes muestras utilizando diferentes relaciones molares de los componentes.

^b Todos los experimentos se realizaron a pH=5, excepto el gel con el ligando L1 del apartado 7. 8.

^c Definición de general gel más aceptada.

Además, la reología también permite determinar la tensión máxima que se puede aplicar a un gel sin llegar a romperlo. A este valor de máxima tensión, se le conoce con el nombre de límite de elasticidad (γ).

A continuación, se describe uno de los casos más sencillos, el de la poliamina **L7**. Ésta presenta tres grupos amino en su estructura y se realizó el test de formación a partir de una disolución de GMP 30 mM variando las relaciones molares (GMP:L): (tabla 7. 1). Tal y como se puede observar, la relación de poliamina que se utiliza afecta a la formación del gel y sus características.

Tabla 7. 1. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L7**.

Relación molar GMP: L7	
2:1	no gel
3:1	gel
4:1	gel
5:1	parcialmente gel

Cuando existe un exceso de carga positiva o carga negativa, se producen repulsiones electrostáticas y no se forman los geles. Por ejemplo, con relaciones molares GMP:L 1:1 y 2:1 se producen repulsiones electrostáticas entre los grupos amino cargados y no se forman los geles. En cambio, con la relación molar 5:1, existen repulsiones electrostáticas entre los grupos fosfato y se forman geles parcialmente. Esto quiere decir que, la red que forman los componentes de los geles no es capaz de inmovilizar toda la fase líquida.

Para determinar la diferencia entre los dos geles formados para relaciones molares GMP:L 3:1 y 4:1 utilizamos la reología (figura 7. 9).

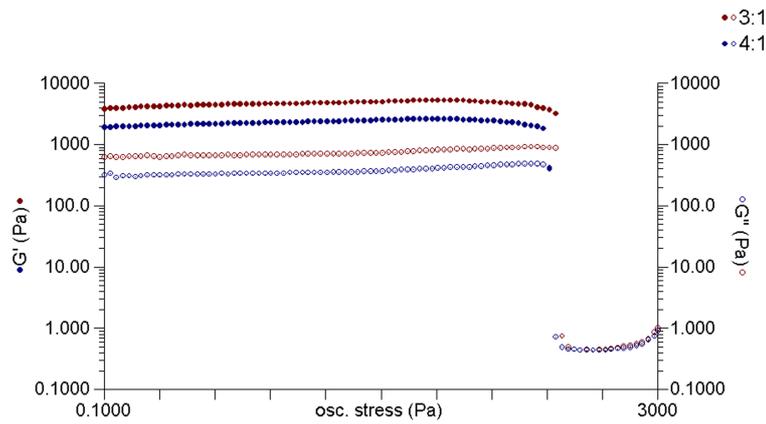


Figura 7. 9. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados con **L7** en función de la relación molar GMP:L (3:1 rojo y 4:1 azul).

En ambos casos, el módulo de almacenamiento G' es prácticamente un orden de magnitud superior al módulo de pérdida G'' , lo que nos indica que, ambas muestras son geles. Sin embargo, el límite de elasticidad es ligeramente superior para el gel formado con relación molar GMP:L 3:1 (440 y 350 Pa para relaciones GMP:L 3:1 y 4:1, respectivamente). Por tanto, podríamos decir que la relación GMP:L para formar un gel óptimo de GMP con **L7**, es 3:1.

Cuando la poliamina que se utiliza como co-gelador es **L6**, que tiene cuatro grupos amino en su estructura, la formación del gel ocurre en un intervalo mayor de relaciones molares. Sin embargo, se mantiene que el gel más resistente (mayor γ) se forma cuando el número de moléculas de GMP coincide con el número de grupos amino cargados. Tal y como se recoge en la tabla 7. 2, la formación de los geles abarca desde relaciones molares 3:1 hasta 8:1.

Tabla 7. 2. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L6**.

Relación molar GMP: L6	
2:1	no gel
3:1	gel
4:1	gel
5:1	gel
8:1	gel

Al igual que ocurría en el caso anterior, no se forman geles con las relaciones GMP:L 1:1 y 2:1, posiblemente a causa de las repulsiones electrostáticas entre los grupos amino cargados. Sin embargo, a diferencia de **L7**, con **L6** pueden formarse geles con relaciones 8:1.

Siguiendo con el mismo método, se determinó la relación molar óptima mediante estudios reológicos (figura 7. 10). En el gráfico se puede observar que, el límite de elasticidad aumenta cuando pasamos de una relación 3:1 a 4:1 y disminuye con las relaciones 5:1 y 8:1, pues los valores aproximados de los límites de elasticidad son 1000, 1400, 1000 y 500 Pa, respectivamente. Esto nos indica que se consigue el gel más resistente con la relación GMP:L 4:1. Es decir, cuando coinciden el número de moléculas de GMP con el número de grupos amino, como en el caso anterior.

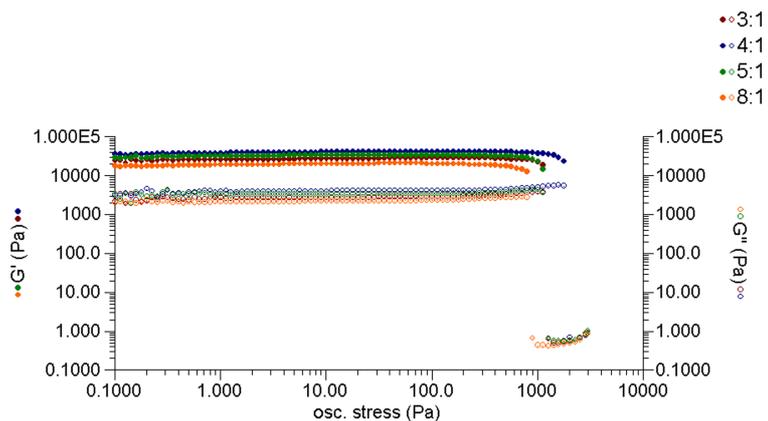


Figura 7. 10. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados con **L6** en función de la relación molar GMP:L (3:1 rojo, 4:1 azul, 5:1 verde y 8:1 naranja).

Este test se realizó con todas las poliaminas observándose el mismo comportamiento.^d El resumen de los datos obtenidos se recogen en la tabla 7. 3 dónde se describen las relaciones molares óptimas GMP:L y los valores aproximados de los módulos G' y G'' , así como los límites de elasticidad.

^d Los estudios con el resto de poliaminas se muestran en el anexo 7.2.

Tabla 7. 3. Relaciones molares óptimas para la formación de geles con cada una de las poliaminas. Valores determinados para G' , G'' y γ .^e

Poliamina	GMP:L	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
L5 (4NH, C) ^[a]	8:1	30000	3000	900
L6 (4NH, C)	4:1	39000	4000	1100
L7 (3NH, C)	3:1	4800	700	350
L8 (3NH, L)	3:1	460	50	35
L9 (4NH, L)	4:1	5600	750	300
L10 (4NH, L)	4:1	10000	950	300

[a] Entre paréntesis se indica el número de grupos amino presentes en la cadena. C y L hacen referencia a poliamina cíclica y lineal respectivamente.

Todos las muestras que se recogen en la tabla resultaron ser geles, pues G' es un orden de magnitud mayor que G'' . Los valores máximos de los límites de elasticidad se obtuvieron con aquellos geles en los que el número de moléculas de GMP es aproximadamente igual al número de grupos amino presentes en L. Es decir, aquellos en los que existe una carga negativa por cada carga positiva, excepto **L5** en el que se obtiene el gel con las propiedades óptimas cuando el número de cargas negativas es el doble que el número de cargas positivas. Desafortunadamente esta excepción no se ha podido explicar todavía.

También se observa que las propiedades de los geles varía según la poliamina que se ha utilizado. Las poliaminas cíclicas forman geles

^e Los valores de G' , G'' y γ son valores aproximados, tomados de la lectura de los gráficos.

más resistentes que sus análogos lineales y las poliaminas que tienen cuatro grupos amino en su estructura forman geles más resistentes que las que tienen tres.

Los resultados obtenidos con la reología utilizando la poliamina cíclica **L7** y su análogo lineal **L8** se muestran en la figura 7. 11. Ambas presentan el mismo número de grupos amino cargados pero los geles que forman tienen propiedades diferentes. El límite de elasticidad del gel con la poliamina **L7** es un orden de magnitud superior al del gel con la poliamina análoga (35 y 350 Pa).

Esto también ocurre con **L5**, **L6** y **L9**, aunque en este caso el límite de elasticidad para las poliaminas cíclicas es 0.5 ordenes de magnitud superior con respecto a la poliamina lineal.^f

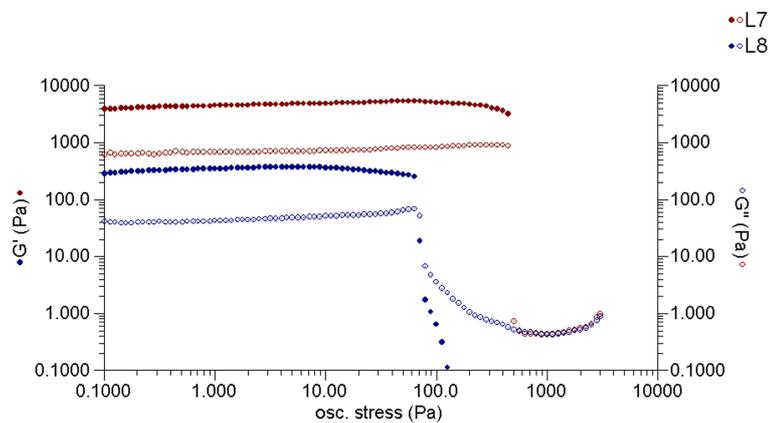


Figura 7. 11. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la flexibilidad de la poliamina. **L7** poliamina cíclica (rojo) y **L8** análogo lineal (azul).

El valor del límite de elasticidad también depende del número de grupos amino cargados que tiene la poliamina. En la figura 7. 12 se comparan los datos obtenidos para los geles formados con las

^f ver anexo 7.3 para comparación entre **L5**, **L6** y **L9**.

poliaminas **L8**, **L9** y **L10**, que tienen 3, 4 y 4 grupos amino en su estructura respectivamente. **L8** tiene una carga menos y forma geles mucho más débiles. Su límite de elasticidad es de alrededor 35 Pa, mientras que el límite determinado para **L9** y **L10** es 300 Pa.

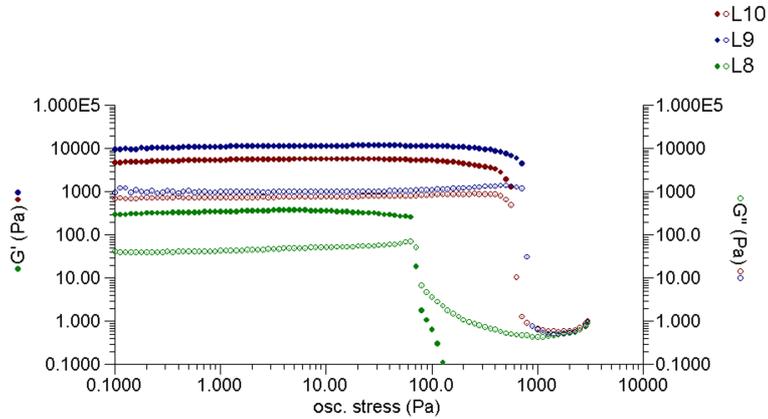


Figura 7. 12. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función del número de grupos amino cargados en la poliamina, **L10** (rojo), **L9** (azul) y **L8** (verde).

Una vez que determinada la cantidad de poliamina que hace falta para formar un gel, y analizado como varían las propiedades del gel en función de la cantidad y el tipo de poliamina utilizada, nos preguntamos por la morfología de los geles.

7. 5. ¿Qué aspecto tienen los geles?

Las imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido (SEM) de los geles indican que están formados por fibras (figura 7. 13).[§] Éstas se entrecruzan unas con otras de manera que forman una red no ordenada. Además, se puede observar que, algunas de las

[§] Las imágenes se corresponden con los geles formados con las poliaminas **L5**, **L10** y **L7**, respectivamente.

fibras experimentan un enrollamiento de tipo helicoidal en el sentido contrario a las agujas del reloj y presentan diferente espesor. Esta diferencia en el diámetro de las fibras es la consecuencia de la unión de varias de ellas, seguramente estimulado por la poliamina.

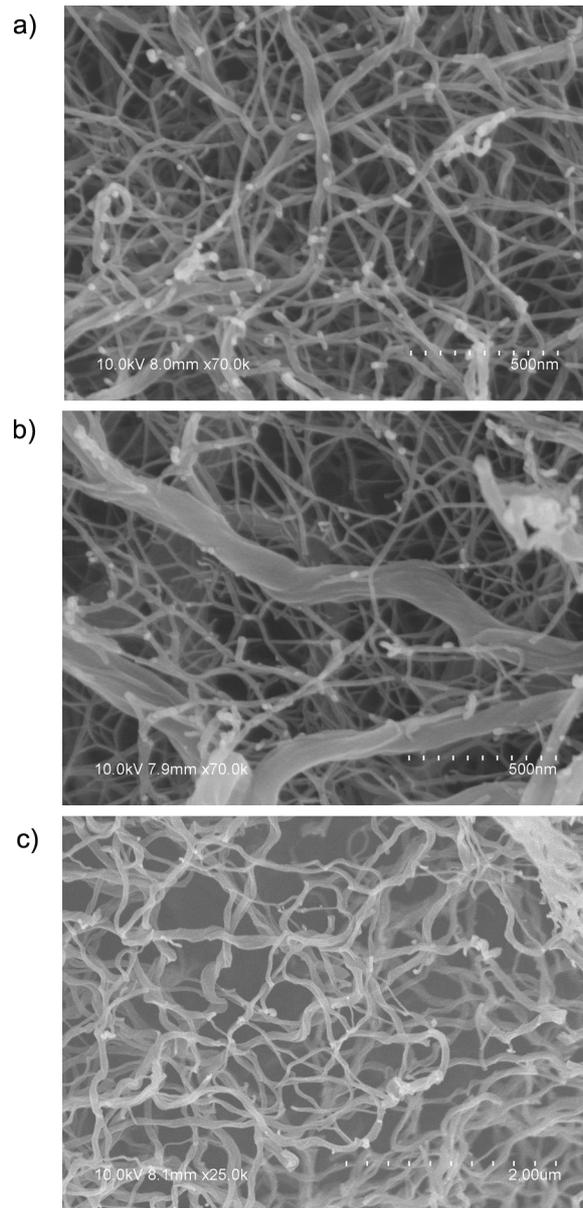


Figura 7. 13. Imágenes SEM de los geles formados con las poliaminas a) L5; b) L9; c) L8.

Aunque la forma que adoptan todos los geles explorados son fibras, se pueden observar algunas diferencias entre los geles formados

solamente con GMP^h y los que contienen poliamina (GMP-L). En la figura 7. 14, se muestran las imágenes de dos muestras tomadas con los mismos aumentos. Las imágenes del apartado a) se corresponden con un gel formado únicamente por GMP y las del apartado b) con un gel al que se ha añadido la poliamina **L9**. Como se puede observar, el tamaño del diámetro de las fibras del gel GMP-**L9** es mayor que el de las fibras del gel de GMP. Así pues, utilizando los mismos aumentos, la observación de las fibras es mucho más clara en el caso en el que se ha añadido la poliamina. Por otra parte, se observa que las muestras a las que se les ha añadido una de las poliaminas, forman una red en la que las fibras están mucho más entrecruzadas y ramificadas. Este hecho puede ser debido a que la poliamina puede estar interaccionando con las cargas de los fosfatos de varios apilamientos distintos de G-quartets.

^h Para la formación de geles de GMP sin poliamina se utilizó una concentración de GMP 10 veces superior a los que contienen poliamina.

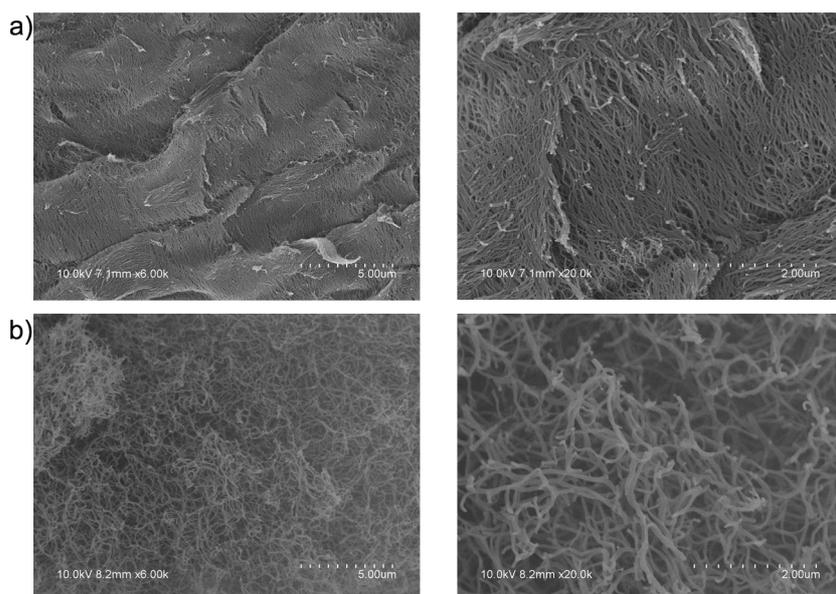


Figura 7. 14. Imágenes SEM de los geles formados por: a) GMP; b) GMP-L9.

Es conveniente destacar que, el secado y la preparación de la muestra puede alterar la estructura del gel. Se tiene que tener en cuenta que, el componente mayoritario en un gel es el disolvente y éste debe ser eliminado antes de ser explorado mediante SEM. En nuestro caso, el secado de las muestras se realizó llevando las mismas al punto crítico del CO_2 , lo que nos permitió eliminar gran parte del disolvente manteniendo la estructura del gel.

Las imágenes tomadas con el microscopio nos dan una idea de la morfología del gel, pero se ha eliminado una parte importante del gel, que es el disolvente y todo lo que queda disuelto en él. Esto hace que se pierda información ya que, después de todo, los geladores supramoleculares se encuentran en equilibrio entre su forma libre y su forma asociada. Es un aspecto interesante es saber cómo los componentes interactúan entre la fase líquida y sólida. ¿Se puede estudiar esta característica de los geles?

7. 6. Dinámica de los geles.

Para ello, utilizamos la resonancia magnética nuclear (RMN) de líquidos, que no es una técnica que se suele utilizar muy a menudo para estudiar geles. Generalmente se suele utilizar RMN de sólidos, en el que se analizan los xerogeles (geles deshidratados), pero esto implica eliminar la fase líquida. En este caso mostramos que el RMN de líquidos se puede utilizar para estudiar la fase líquida, la fase sólida y la relación entre ambas.

La fase líquida del gel se puede estudiar adquiriendo un espectro de ^1H . Al comparar el espectro ^1H de uno de los geles con un espectro de una disolución de GMP 30 mM o de poliamina, se observa que las señales de ambos componentes se ensanchan y sus integrales disminuyen (figura 7. 15).

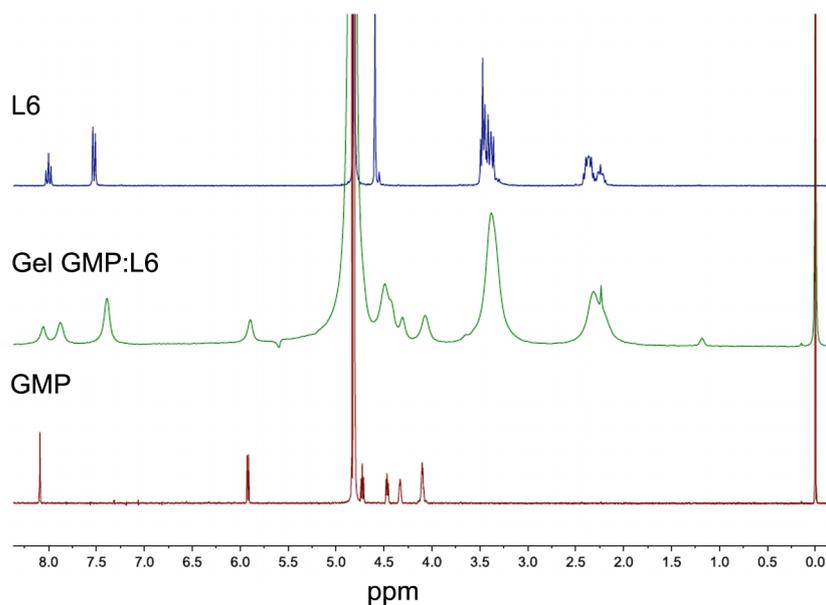


Figura 7. 15. Espectro ^1H de L6, gel GMP:L6 y GMP 30 mM en D_2O .

Las integrales están relacionadas con el número de moléculas, por tanto si éstas disminuyen quiere decir que las moléculas que están en

disolución pasan a la fase sólida. La evolución de las integrales se puede seguir adquiriendo espectros ^1H a medida que se forma el gel. En la figura 7. 16 se observa que el número de moléculas de GMP que desaparecen de la fase líquida es mayor que el número de moléculas de poliamina, tal como indicaba la reología, manteniendo un proporción similar.

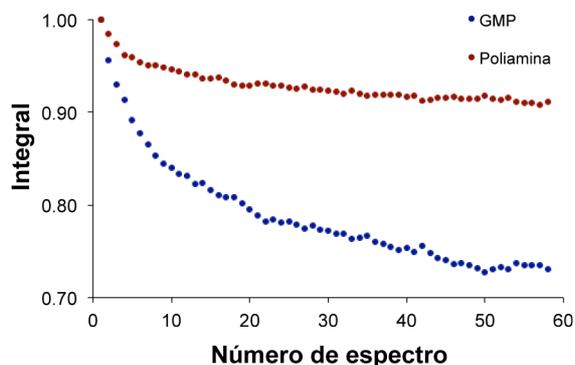


Figura 7. 16. Evolución de las integrales de los componentes del gel a medida que ocurre el proceso de gelificación, (GMP azul y L rojo).

La señal de la fase sólida resulta complicada de observar con espectros en los que la ventana espectral es de 5-10 kHz (10-20 ppm), ya que la anchura de la señal de la fase sólida es mucho mayor, siendo de decenas de kHz (50-200 ppm). Por tanto, para poder observar esta señal se adquirieron espectros ^1H con una ventana espectral de 100 kHz. En éstos, se puede distinguir dos tipos de señales, que se podrían corresponder con las dos fase del gel. En la figura 7. 17 se muestra el espectro de uno de los geles con una ventana espectral de 200 ppm en el que, se observan señales estrechas entre 0-10 ppm, que se corresponden con la fase líquida del gel, y una señal ancha (entre 70 y -70 ppm) que podría corresponderse con la fase sólida del gel.

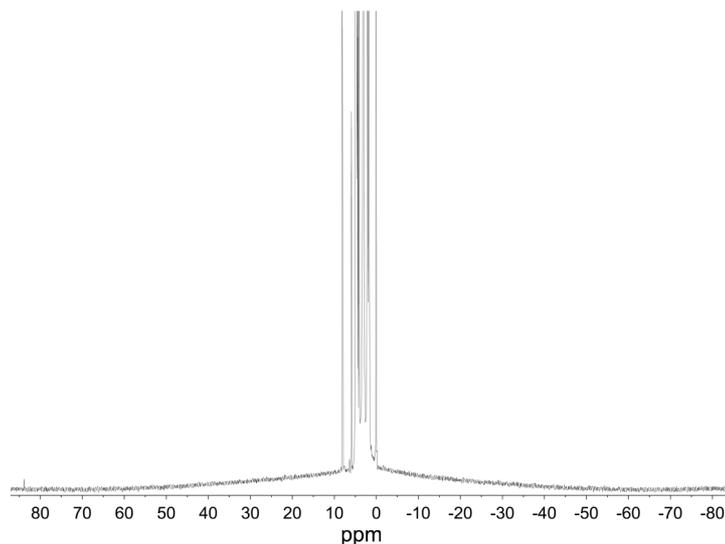


Figura 7. 17. Espectro ^1H del gel formado con L8.

No obstante, distorsiones de la línea base podrían inducirnos a error y dar la impresión de que hay una señal de tipo sólido. Por tanto, se necesita otra técnica para revelar la señal de la fase sólida. Para ello, se utilizó la espectroscopia z.³² Con esta técnica podemos determinar la señal de la fase sólida y determinar si existe una relación entre los componentes de la fase líquida y la fase sólida. Como se ha discutido, éste debe ser el caso de cualquier gel supramolecular.

La esencia del estudio consiste en saturar los espines de la fase sólida. Si existe alguna especie que esté temporalmente en la fase sólida, puede pasar la magnetización de la fase sólida a esta especie, y si ésta pasa a la disolución, la saturación pasará con la especie y nos dará la prueba de que ha habido una interacción (figura 7. 18).

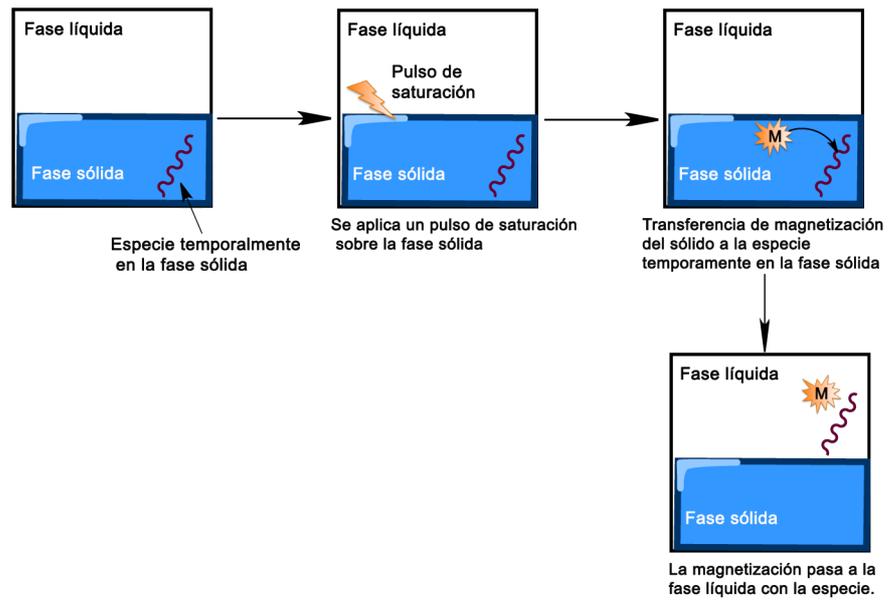


Figura 7. 18. Proceso de transferencia de magnetización.

La técnica consiste en aplicar un pulso de saturación sobre la señal de la fase sólida, pero a una frecuencia lejana de la frecuencia de las señales la fase líquida (figura 7. 19). La frecuencia del pulso se mueve con cada adquisición a lo largo de toda la ventana espectral y se controla si existe alguna atenuación de las señales de la fase líquida.

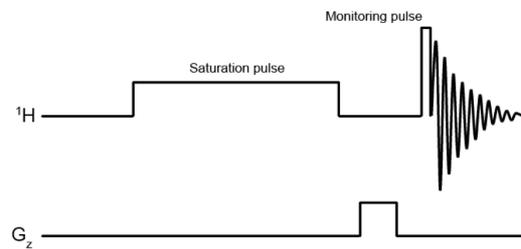


Figura 7. 19. Secuencia utilizada en los estudios de espectroscopia z.

En la figura 7. 20 se muestra los resultados que se obtienen de la espectroscopia z en una de las muestras. En esta, se representa la

intensidad de las señales frente a el intervalo de frecuencias a las que se le ha aplicado el pulso de saturación.

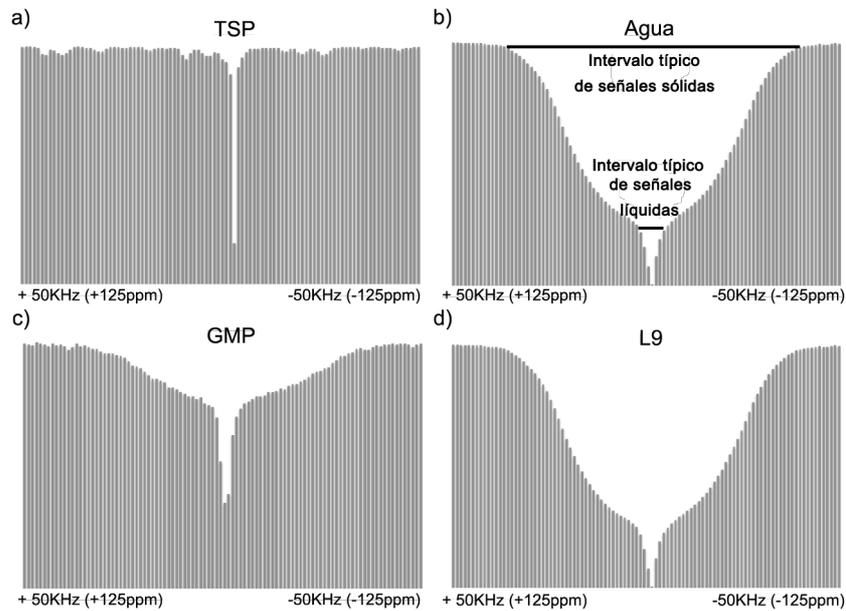


Figura 7. 20. Resultados del z-test con el gel formado con **L9**.

Como referencia se utilizó una disolución de TSP en un capilar interno. Ésta, no tienen ningún contacto con el gel por lo que, solamente se produce la atenuación de la señal cuando el pulso de saturación se aplica suficientemente cerca de su señal. Sin embargo, esto no ocurre con el resto de señales. Se puede observar que, las señales de los componentes que forman el gel (las correspondientes al GMP, a **L9** y al agua), sufren atenuación a frecuencias considerablemente lejos de sus señales. Esto es lo que se esperaría del comportamiento dinámico de geles supramoleculares en los que existe

un equilibrio de los componentes entre su forma libre y su forma asociada.ⁱ

Es interesante destacar que, este efecto es mucho más acusado en las señales de la poliamina lineal que en las del GMP. Esto puede ser debido a que las poliaminas se mueven con mayor facilidad entre la fase sólida y líquida del gel. No obstante, no es de extrañar, si volvemos a la hipótesis de la estructura general en la que la poliaminas se dispone alrededor del apilamiento de G-quartets. En este caso, parece obvio pensar que tienen mayor facilidad de movimiento que el GMP.

7. 7. ¿Se puede encontrar alguna evidencia directa de la formación de G-quartets en los geles?

Hasta ahora planteamos una hipótesis sobre la estructura de los geles y los resultados nos indican que parece ser que estamos en lo cierto. No obstante, no se ha presentado ningún resultado que nos de una evidencia directa de la formación de G-quartets, y su apilamiento, en los geles a los que se le ha añadido la poliamina como co-gelador. Una técnica que nos permite obtener información estructural es la dispersión de rayos X de ángulo ancho (WAXS).^j

En la figura 7. 21 se muestran los datos obtenidos para cada una de las poliaminas, así como los de un gel de GMP que se utilizó a como patrón.

ⁱ Los resultados de la espectroscopia z con el resto de geles se muestra en el anexo 7.4

^j Para la realización de las medidas se necesitó incrementar la concentración de ambos componentes 6 veces.

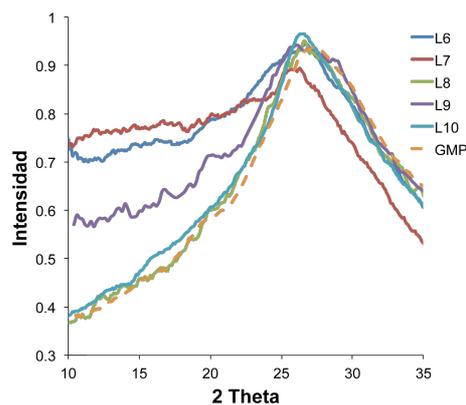


Figura 7. 21. Espectros WAXS de los geles. Todos los geles presentan un pico a un valor de 2 Theta, aproximadamente, 26.5 nm.

Como se observa en el gráfico, se pudo determinar un pico ancho, muy similar en todos los geles, excepto para los formados con **L5**, que se corresponde a una distancia de 0.32 nm aproximadamente. Esta distancia es la misma que describe Gellert *et al.* en sus estudios y se corresponde a la separación entre dos planos de G-quartets. Es también del mismo orden en el caso de los G-quadruplex de ADN y ARN sintéticos.^{2,5,9}

Esta medida es una prueba de que la hipótesis inicial es correcta. En ésta se describía que los geles en los que se ha utilizado una de las poliaminas para aumentar la eficacia del GMP como gelador, mantienen la estructura principal formando planos de G-quartet.

7. 8. Otras características y mejoras.

Es importante para aplicaciones biomédicas que los geles soporten temperaturas corporales. Usando el método denominado como “drop ball” se determinó que los geles formados con las poliaminas **L5**, **L6**, **L9** y **L10** son capaces de soportar temperaturas corporales. Estos

geles coinciden con los que presentan una mayor resistencia frente a una presión externa (γ). En la tabla 7. 4 se recogen los valores para cada uno de los geles formados con las diferentes poliaminas.

Tabla 7. 4. Temperaturas Tgel^k determinadas para los geles formados con cada una de las poliaminas con las relaciones molares GMP:L óptimas.

	Tgel (°C)
L8	26.0
L7	31.8
L10	37.3
L6	37.5
L5	40.9
L9	45.7

Podemos observar que los geles con los límites de elasticidad más altos, son los que mantienen la estructura del gel a valores mayores de temperatura.

El intervalo de pH de formación es otro requerimiento a tener en cuenta si se quieren utilizar los geles con fines biomédicos. Ninguno de los sistemas descritos gelifica a pH fisiológico. A este pH, la molécula de GMP presenta dos cargas negativas en el grupo fosfato y las repulsiones electrostáticas dificultan la formación de los geles. Además, a este pH, el número de grupos amino cargados en la poliamina es menor. Es decir, aumenta la cantidad de carga negativa

^k Tgel es la temperatura a la cual un gel deja de ser estable. No se debe confundir con Tm que es la temperatura a la cual un gel pasa a ser una disolución.

y disminuye la cantidad de carga positiva. Pensamos que el problema se puede evitar utilizando una poliamina que mantenga un mayor número de grupos amino protonados a este pH. Por ello, se escogió la poliamina **L1**, a modo de prueba, ya que a pH fisiológico, existe un número de grupos amino cargados mayor que en el resto de las poliaminas utilizadas (figura 7. 22).

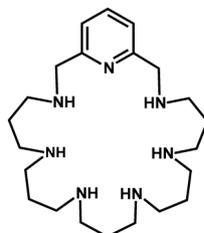


Figura 7. 22. Poliamina **L1**.

Este ligando presenta seis grupos amino en su cadena poliamínica. A pH 7.4 se forman las especies $[H_4L]^{4+}$ y $[H_3L]^{3+}$ al 50%, aproximadamente.¹ Con este ligando, se realizó el test de gelificación utilizando diferentes relaciones molares (tabla 7. 5) de L y GMP a pH aproximadamente 7.

Tabla 7. 5. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L1**.

Relación molar GMP:L1	
1:1	gel
2:1	no gel
3:1	no gel
4:1	no gel
5:1	no gel

De todas ellas, solamente se formó gel con la relación molar L:GMP 1:1 y se pudo estudiar su respuesta a la aplicación de una presión externa. En la figura 7. 23 se muestra los datos obtenidos.

¹ En el anexo 7.5 se muestra el diagrama de distribución de especies.

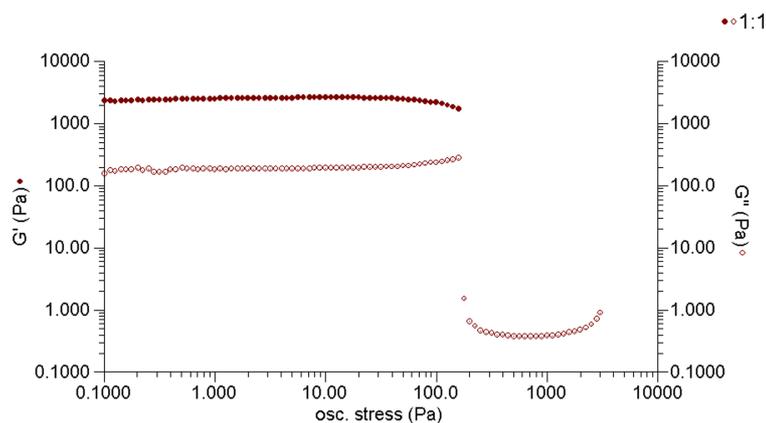


Figura 7. 23. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria del gel formado con **L1**, para una relación GMP:L 1:1.

Este gel formado con **L1** es ligeramente más débil en comparación a algunos de los obtenidos con los otras poliaminas. Tal y como se muestra en el gráfico, el límite de elasticidad es aproximadamente 100 Pa, pero esta aportación es interesante para futuros desarrollos.

Siguiendo con este objetivo, se pensó en ir un poco más allá, y se añadió a uno de los gels un nuevo componente a modo de fármaco. En este caso se utilizó topotecán (anti tumoral) y fenilefrina (descongestivo) (figura 7. 24).

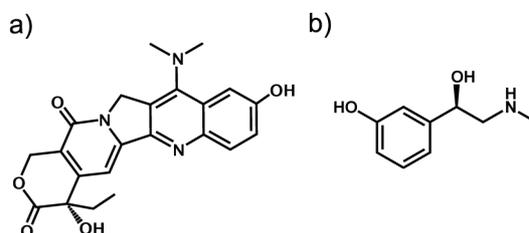


Figura 7. 24. a) Topotecan; b) Fenilefrina.

Ambos compuestos se incorporaron al gel formado con **L9** ya que, es uno de los que presenta mayor resistencia frente a presiones

externas y una mayor temperatura de gelificación. La adición de estos componentes hizo que los geles se volvieran menos estables. Con el topotecan solamente se consiguió formar geles a baja temperatura o al aumentar la concentración de GMP. Sin embargo, la muestra a la que se le incorporó la fenilefrina gelificó a temperatura ambiente y permitió explorar su comportamiento reológico (figura 7. 25).

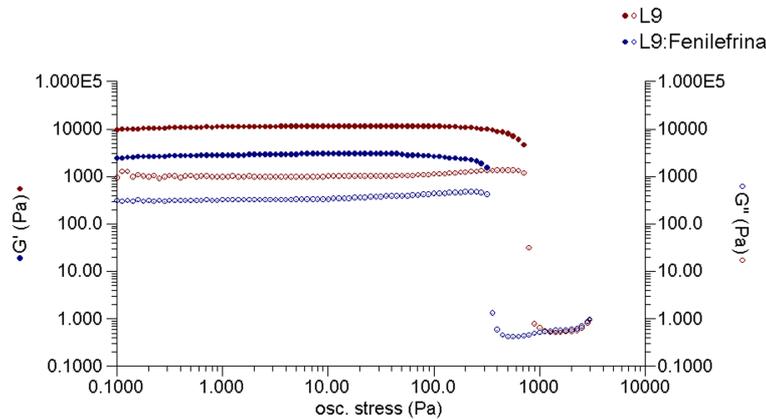


Figura 7. 25. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados con la poliamina **L9** sin (rojo) y con (azul) fenilefrina.

De los datos obtenidos, en el que se compara el gel con y sin fenilefrina, se puede concluir que al incorporar el nuevo compuesto, se sigue formando el gel ($G' > G''$). No obstante, se aprecia un disminución en el valor del límite de elasticidad de 100 Pa.

Por otra parte, hemos visto que los geles formados con poliaminas tienen una estructura muy similar a la que se forma en las zonas ricas en guanina de ADN y ARN. Las poliaminas ayudan a que las moléculas de GMP se asocien y formen G-quartets. Por tanto, pensamos que es posible que estas poliaminas puedan estabilizar estructuras G-quadruplex en los ácidos nucleicos. No hay que obviar que no son capaces de formar geles a pH fisiológico, pero en el ADN y

ARN existe una preorganización de las bases, ya que están unidas covalentemente, y sólo hay una carga negativa en la cadena de fosfato.

Muchos de los ligandos que se estudian como estabilizadores de G-quadruplex están basados en una estructura dónde priman los anillos aromáticos, de forma que se intercalan en la estructura o interaccionan por uno de los extremos del G-quadruplex. Se produce una estabilización debido a una interacción de tipo π entre los grupos aromáticos y el plano de G-quartet.^{33,34} Sin embargo, no se ha prestado mucha atención a las interacciones electrostáticas durante varios años. Existen evidencias de que en ADN, tanto la espermina como la espermidina, estabilizan dichas estructuras.³⁵⁻³⁷ No obstante, no hay que obviar que el medio celular es mucho más complejo que un simple vial. Existen muchos factores que van a influir en la interacción de la poliaminas con el ADN, como pueden ser la especificidad, el transporte de las poliaminas hasta el núcleo celular o la toxicidad. En el caso de la espermina y la espermidina, se sabe que existen transportadores para hacerlas llegar hasta el núcleo, pero son sintetizadas e ingeridas a diario y por tanto su concentración corporal esta regulada por el propio organismo.^{27,29} El resto de poliaminas son sintéticas y posiblemente haya que modificar su estructura, dado que son muy simples y puede que sean poco específicas. Por contra, presentan la ventaja de que, al ser derivados de poliaminas biogénicas, pueden existir transportadores para hacerlas llegar al núcleo celular. Uno de los problemas de algunos fármacos es que no son válidos porque, aún siendo específicos, no atraviesan las membranas celulares.

Por último, se podrían utilizar las condiciones de formación de los geles y los estudios dinámicos descritos en el capítulo, como un test preliminar para explorar posibles candidatos para estabilizar G-

quadruplex. Es decir, los ligandos capaces de formar geles con GMP presentan muchas probabilidades de que también puedan estabilizar la formación de G-quadruplex en ADN y ARN. Es un método sencillo, rápido y económico. No obstante, hay que tener en cuenta que la estructura que forman los geles es similar a los G-quadruplex de ADN, pero no la misma. Con esta propuesta, no se trata de sustituir un estudio de biología molecular por el test, pero sí hacer un muestreo previo para preseleccionar aquellos candidatos con mayores posibilidades.

7. 9. Conclusiones.

Según el objetivo marcado al principio del capítulo se ha podido aumentar la eficacia del GMP como gelador utilizando poliaminas.

Las características de este tipo de geles vienen determinadas por la cantidad y relación molar de los componentes. En este caso, hemos podido determinar la cantidad de poliamina necesaria para formar geles con características óptimas a una concentración determinada. Las características también vienen determinadas por el tipo de poliamina, pues se forman geles más resistentes con las poliaminas cíclicas y cuanto mayor es el número de grupos amino cargados en ésta.

Los geles están formados por fibras que se entrecruzan y forman fibras de diferente espesor, seguramente estimulado por la poliamina. Los componentes que forman esta red sólida están en equilibrio con su forma libre en disolución. La dinámica de los componentes entre ambas fases se ha podido estudiar gracias a la espectroscopia z, en la que se ha podido observar que el intercambio de magnetización es mucho más acusado en las poliaminas lineales. Es importante

destacar que este método se puede aplicar a cualquier tipo de geles supramoleculares.

Al principio del trabajo se hablaba de que los geles guardan una relación estructural con el genoma de eucariotas. Su estructura es muy similar a las estructuras G-quadruplex en ácidos nucleicos y se ha podido determinar distancias muy similares mediante medidas de WAXS.

Finalmente, se han propuesto algunas mejoras. Queda mucho trabajo por hacer para obtener un material al que se le pueda dar una aplicación final, pero se han conseguido mejorar la eficacia de gelación del GMP y sus propiedades al incorporar poliaminas. De hecho, se ha utilizado una concentración de GMP seis veces menor a la necesaria para formar un gel a temperatura ambiente.

7. 9. Bibliografía.

- (1) Bang, I. *Biochemische Zeitschrift* **1910**, *26*, 293.
- (2) Gellert, M.; Lipsett, M. N.; Davies, D. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1962**, *48*, 2013.
- (3) Wu, G.; Wong, A. *Chemical Communications* **2001**, 2658.
- (4) Wong, A.; Wu, G. *Journal of the American Chemical Society* **2003**, *125*, 13895.
- (5) Zimmerman, S. B.; Cohen, G. H.; Davies, D. R. *Journal of Molecular Biology* **1975**, *92*, 181.
- (6) Zimmerman, S. B. *Journal of Molecular Biology* **1976**, *106*, 663.
- (7) Sen, D.; Gilbert, W. *Nature* **1988**, *334*, 364.
- (8) Williamson, J. R.; Raghuraman, M. K.; Cech, T. R. *Cell* **1989**, *59*, 871.
- (9) Laughlan, G.; Murchie, A. I. H.; Norman, D. G.; Moore, M. H.; Moody, P. C. E.; Lilley, D. M. J.; Luisi, B. *Science* **1994**, *265*, 520.
- (10) Aboulela, F.; Murchie, A. I. H.; Lilley, D. M. J. *Nature* **1992**, *360*, 280.
- (11) Lipps, H. J.; Rhodes, D. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 414.
- (12) Brooks, T. A.; Kendrick, S.; Hurley, L. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **2010**, *277*, 3459.
- (13) Blackburn, E. H. *Nature* **1991**, *350*, 569.
- (14) Phatak, P.; Burger, A. M. *Br. Journal of Pharmacology* **2007**, *152*, 1003.
- (15) Ou, T. M.; Lu, Y. J.; Tan, J. H.; Huang, Z. S.; Wong, K. Y.; Gu, L. Q. *ChemMedChem* **2008**, *3*, 690.

- (16) Davis, J. T.; Spada, G. P. *Chemical Society Reviews* **2007**, *36*, 296.
- (17) Sreenivasachary, N.; Lehn, J. M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 5938.
- (18) Buerkle, L. E.; Li, Z.; Jamieson, A. M.; Rowan, S. J. *Langmuir* **2009**, *25*, 8833.
- (19) Kwan, I. C. M.; Delley, R. J.; Hodgson, D. R. W.; Wu, G. *Chemical Communications* **2011**, *47*, 3882.
- (20) Walmsley, J. A.; Pinnavaia, T. J. *Biophysical Journal* **1982**, *38*, 315.
- (21) De Stefano, C.; Giuffre, O.; Sammartano, S.; Gianguzza, A.; Piazzese, D. *Chemical Speciation and Bioavailability* **2001**, *13*, 113.
- (22) Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Lippolis, V. *Chemical Society Reviews* **2010**, *39*, 3709.
- (23) Sornosa-Ten, A.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Budimir, A.; Piantanida, I. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2010**, *8*, 2567.
- (24) Balhorn, R.; Brewer, L.; Corzett, M. *Molecular Reproduction and Development* **2000**, *56*, 230.
- (25) Balhorn, R. *Genome Biology* **2007**, *8*.
- (26) Lv, H. T.; Zhang, S. B.; Wang, B.; Cui, S. H.; Yan, J. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114*, 100.
- (27) Thomas, T.; Thomas, T. J. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2001**, *58*, 244.
- (28) Tabor, C. W.; Tabor, H. *Annual Reviews of Biochemistry* **1976**, *45*, 285.

- (29) Marton, L. J.; Pegg, A. E. *Annual Reviews of Pharmacology and Toxicology* **1995**, *35*, 55.
- (30) Feuerstein, B. G.; Williams, L. D.; Basu, H. S.; Marton, L. J. *Journal of Cellular Biochemistry* **1991**, *46*, 37.
- (31) Flory, J. P. *Faraday Discussions of the Chemical Society* **1974**, *57*, 7.
- (32) Grad, J.; Bryant, R. G. *Journal of Magnetic Resonance* **1990**, *90*, 1.
- (33) Luedtke, N. W. *Chimia* **2009**, *63*, 134.
- (34) Monchaud, D.; Teulade-Fichou, M. P. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2008**, *6*, 627.
- (35) Keniry, M. A. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **2003**, *542*, 153.
- (36) Keniry, M. A.; Owen, E. A. *European Biophysics Journal* **2007**, *36*, 637.
- (37) Sun, H. X.; Xiang, J. F.; Liu, Y.; Li, L.; Li, Q.; Xu, G. Z.; Tang, Y. L. *Biochimie* **2011**, *93*, 1351.

7. 10. Anexo.

Tabla A. 7. 1. Logaritmos de las constantes de protonación y de la basicidad global para los receptores **L5 – L10**, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L5	L6	L7	L8	L9	L10
L + H ⇌ LH	10.63(2) ^[b]	10.60(3)	10.31(2)	10.73(1)	10.52(2)	10.59(1)
HL + H ⇌ H ₂ L	9.35(1)	8.57(3)	8.45(1)	9.87(1)	9.97(1)	9.41(2)
H ₂ L + H ⇌ H ₃ L	7.24(2)	6.73(3)	6.19(1)	8.42(2)	8.73(2)	9.54(1)
H ₃ L + H ⇌ H ₄ L	5.58(2)	5.27(4)	-	-	7.38(2)	8.20(3)
log β ^[c]	32.80(3)	31.17(5)	24.95(1)	29.02(2)	36.60(2)	37.74(3)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa; [c] Constante de basicidad global $\log \beta = (\sum K_{HjL})$.

Tal y como indican el análisis de los datos obtenidos, **L5**, **L6**, **L9** y **L10** presentan cuatro constantes de protonación que se corresponden con la protonación de sus cuatro grupos amino. Con respecto a **L7** y **L8**, se registraron un total de tres constantes de protonación, que al igual que el resto de poliaminas, se corresponden con la protonación de los tres grupos amino.

En general, la entrada de los dos primeros protones presentan constantes de protonación cuyos valores son muy similares en todas las poliaminas. A partir de la entrada del tercer protón, las repulsiones electrostáticas en las poliaminas cíclicas son mayores y esto se refleja en la disminución de las constantes de los respectivos equilibrios, pues los valores determinados son más bajos que las de poliaminas lineales. La formación de las diferentes especies en función

del pH del medio se muestran en la figura A. 7. 1. Tal y como se puede observar, a pH aproximadamente 5, la especie mayoritaria es aquella en la que los grupos amino se encuentran totalmente protonados.

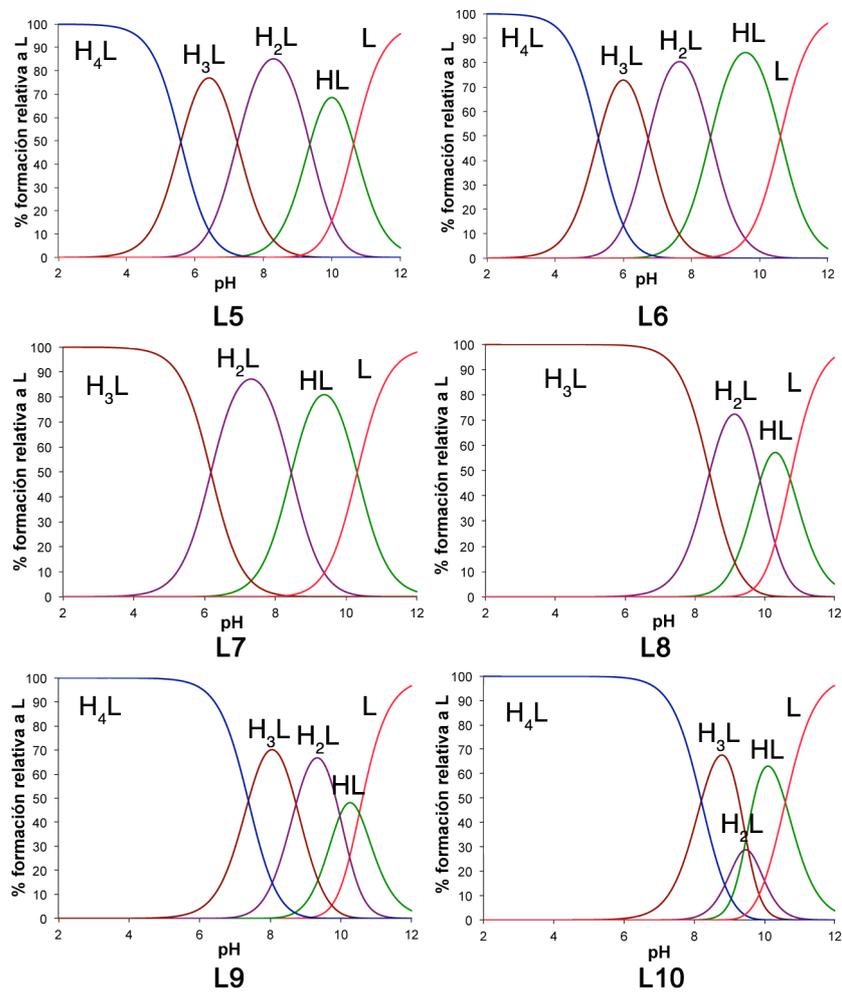


Figura A. 7. 1. Diagramas de distribución de especies de las poliaminas L5-L10.

Anexo 7. 2. Siguiendo con el objetivo de encontrar la cantidad de poliamina necesaria para poder formar un gel a partir de una disolución de GMP 30mM, se realizaron test de gelificación con cada una de las poliaminas. A continuación se presentan las tablas en las que se recogen los resultados y los gráficos de los estudios de dinámica oscilatoria obtenidos mediante medidas reológicas para cada una de las poliaminas (tabla A. 7. 2-tabla A. 7. 5 y figura A. 7. 2-figura A. 7. 5).

Los geles con la poliamina **L5** se forman entre las relaciones molares GMP:L 4:1 y 12:1 (tabla A. 7. 2).

Tabla A. 7. 2. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L5**.

Relación molar GMP:L5	
1:1	no gel
2:1	no gel
3:1	no gel
4:1	gel
5:1	gel
6:1	gel
7:1	gel
8:1	gel
9:1	gel
10:1	gel
11:1	gel
12:1	gel

Para su representación (figura A. 7. 2) se han seleccionado las relaciones molares GMP:L 4:1, 8:1 y 12:1, de entre todas las muestras en las que tuvo el proceso de gelificación.

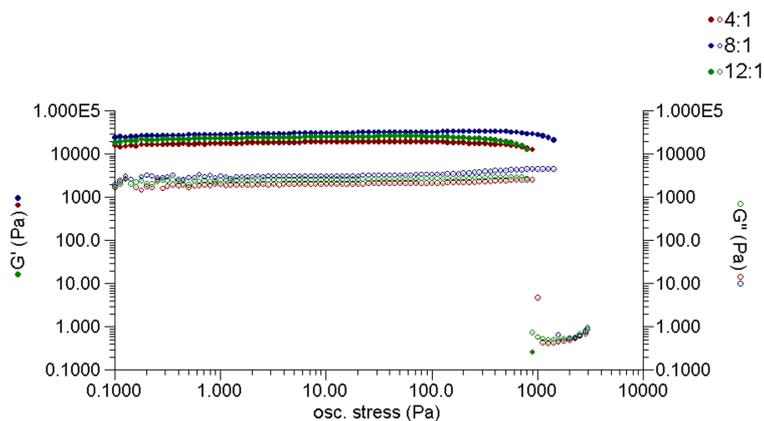


Figura A. 7. 2. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la relación molar GMP:L.

Tal y como se puede observar en el gráfico, el límite de elasticidad aumenta al pasar de una relación GMP:L 4:1 a 8:1 y disminuye al pasar a una relación molar 12:1, por lo que el gel que presenta una mayor resistencia es el que se ha utilizado una relación GMP:L 8:1.

Por su parte, los geles con la poliamina **L8**, sólo se forman cuando la relación entre los componentes es 3:1 (tabla A. 7. 3). Cuando la relación GMP:L es 4:1, se forman geles parcialmente, es decir que, la red que se forma no es capaz de inmovilizar toda la fase líquida.

Tabla A. 7. 3. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L8**.

Relación molar GMP:L8	
1:1	no gel
2:1	no gel
3:1	gel
4:1	parcialmente gel

Los datos experimentales obtenidos de las medidas reológicas se muestran en el gráfico de la figura A. 7. 3. Cabe destacar que, los

geles formados con la poliamina **L8**, resultan ser los más débiles de toda la serie.

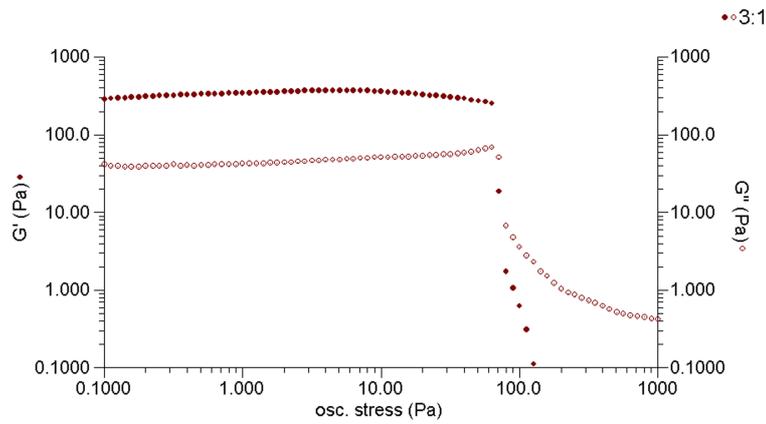


Figura A. 7. 3. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria para el gel formado con **L8**.

Al igual que en el caso anterior, los geles con la poliamina **L9**, solamente se forman con una relación molar, cuando GMP:L es 4:1. En la tabla A. 7. 4 se recogen los datos del test de gelificación.

Tabla A. 7. 4. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L9**.

Relación molar	
GMP:L9	
1:1	no gel
2:1	no gel
3:1	no gel
4:1	gel
5:1	parcialmente gel

Los datos obtenidos de la medidas reológicas, del gel GMP:L 4:1, se muestran el gráfico de la figura A. 7. 4,

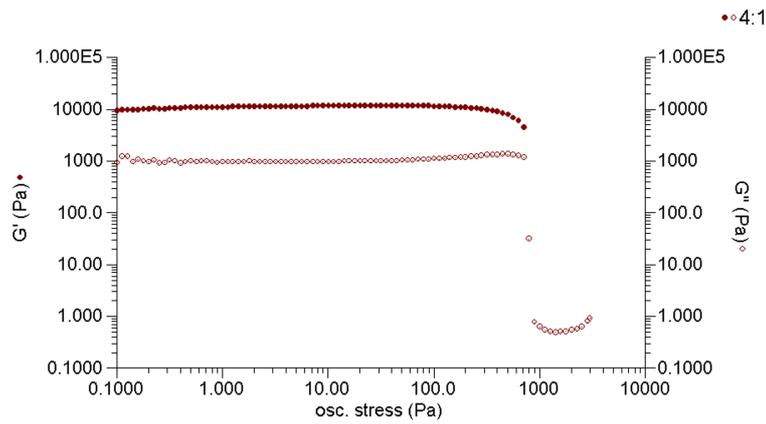


Figura A. 7. 4. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria para el gel formado con **L9**.

Finalmente, en la tabla A. 7. 5 se recogen los datos del test de gelificación para la poliamina **L10**. Con esta poliamina se pueden formar geles entre las relaciones molares GMP:L 2:1 y 12:1.

Tabla A. 7. 5. Resultados del test de formación de geles a diferentes relaciones molares con **L10**.

Relación molar GMP:L10	
1:1	no gel
2:1	gel
3:1	gel
4:1	gel
5:1	gel
6:1	gel
7:1	gel
8:1	gel
9:1	gel
10:1	gel
11:1	gel
12:1	gel

Para su representación, se han seleccionado las relaciones molares GMP:L 2:1, 3:1, 4:1 y 8:1 (figura A. 7. 5).

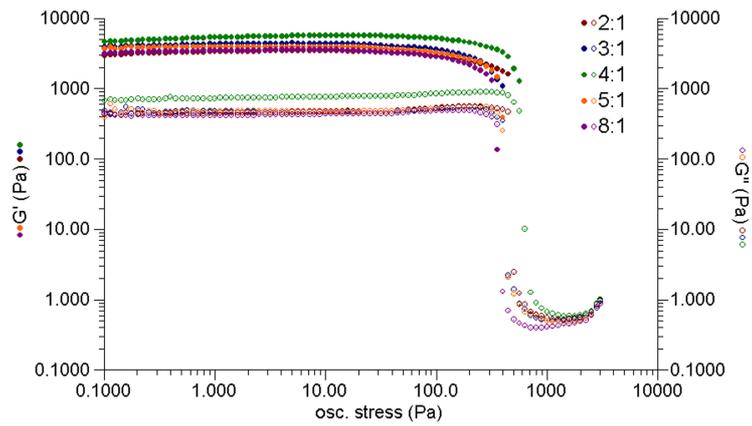


Figura A. 7. 5. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la relación molar GMP:L.

Tal y como podemos ver, el gel formado con la relación GMP:L 4:1, es ligeramente más estable que el resto. Así pues, el límite de elasticidad experimenta un aumento, llegando a su máximo con la relación 4:1, y vuelve a descender hasta sus valores iniciales.

Anexo 7. 3. En la figura A. 7. 6 se comparan los datos obtenidos mediante las medidas de dinámica oscilatoria de los geles formados por las poliaminas cíclicas **L5** y **L6**, y la análoga lineal **L9**. Tal y como se puede observar, los geles formados con las poliaminas cíclicas presentan límites de elasticidad, cuyos valores son 0.5 ordenes de magnitud superior a los geles con la poliamina lineal.

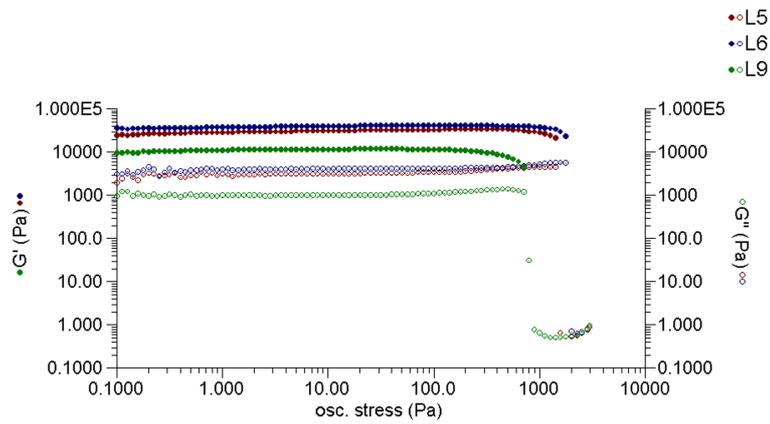


Figura A. 7. 6. Resultados de las medidas de dinámica oscilatoria en función de la flexibilidad de la poliamina.

Anexo 7. 4. En las figuras A. 7. 7 y A. 7. 8 se muestran el resultado de la espectroscopia z de los geles formados con las poliaminas **L5**, **L6**, **L7**, **L8** y **L10**. Estos resultados indican que existe una dinámica en los geles y se produce un transferencia de la magnetización entre la fase sólida y líquida del gel. Este proceso de intercambio ocurre, excepto con el gel formado con **L5**, principalmente a través de la poliamina.

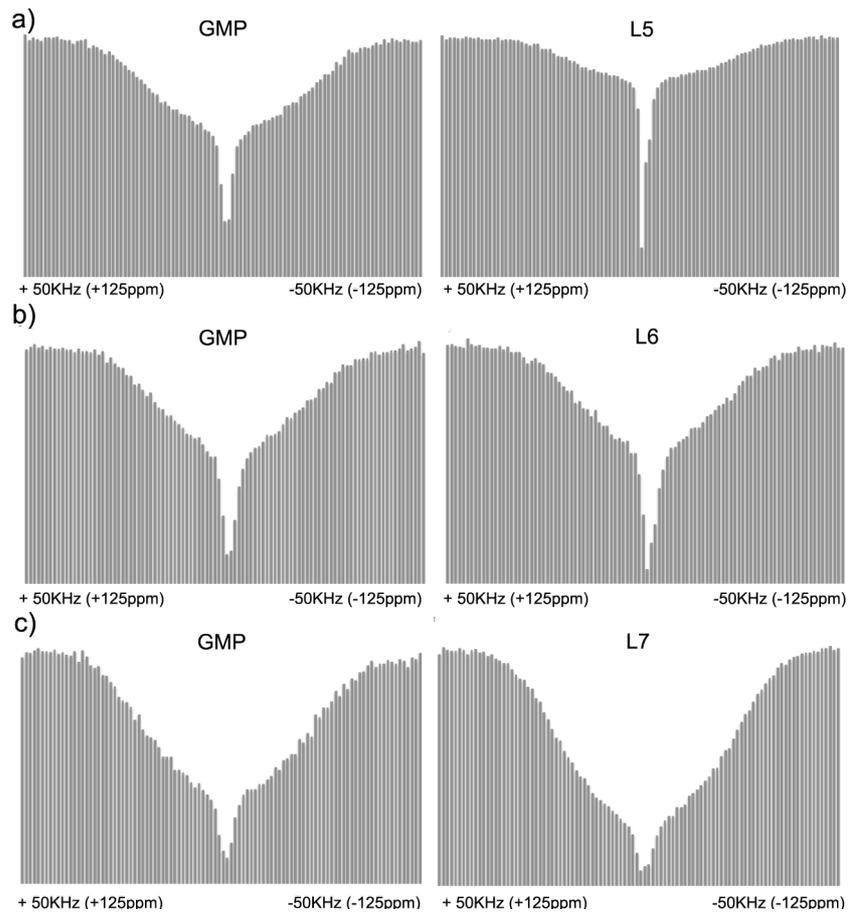


Figura A. 7. 7. Resultados del z-test de los geles formados con a) **L5**; b) **L6**; c) **L7**.

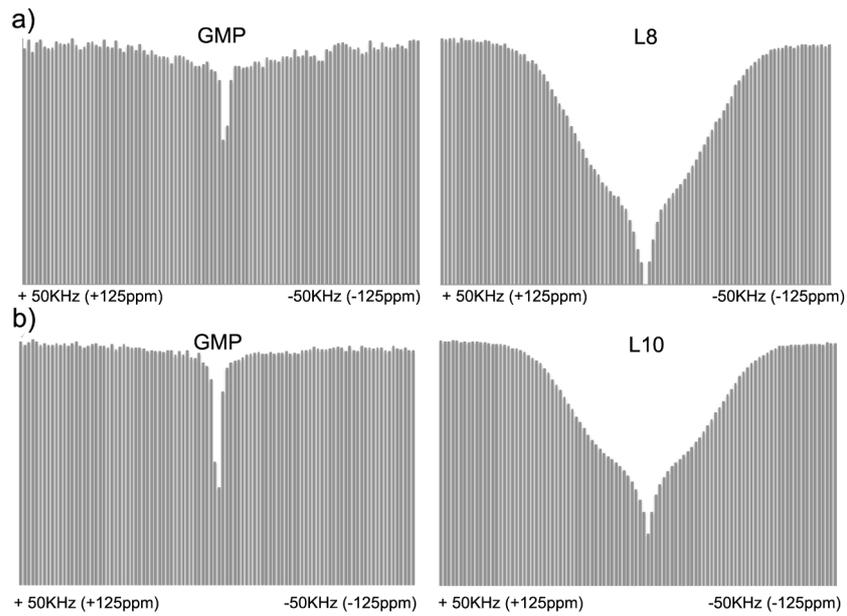


Figura A. 7. 8. Resultados del z-test de los geles formados con a) L8; b) L10.

Anexo 7. 5. Las constantes de protonación sucesivas para la poliamina L1 se determinaron mediante estudios potenciométricos. En la tabla A. 7. 6 se recoge la basicidad global y las constantes para cada uno de los equilibrios.

Tabla A. 7. 6. Logaritmos de las constantes de protonación para la poliamina L1, determinados a 298.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^[a]	L1
$L + H \rightleftharpoons LH$	10.67(2) ^[b]
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.41(1)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	8.24(5)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	7.35(7)
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	6.98(9)
$H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$	5.87(2)
$\log \beta$ ^[c]	48.44(2)

[a] Cargas omitidas; [b] Los números en paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa; [c] Constante de basicidad global $\log \beta = (\sum K_{H_jL})$.

Se pudo determinar un total de seis constantes de protonación correspondiente a los seis grupos amino presentes en la estructura de la poliamina. Tal y como se muestra en el diagrama de distribución de especies de la figura A. 7. 9, a pH 7.4 se encuentra, al 50%, formando las especies $[H_4L]^{4+}$ y $[H_3L]^{3+}$.

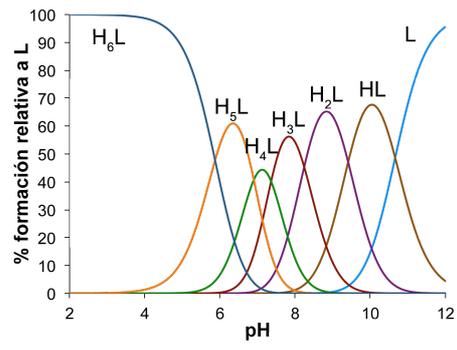


Figura A. 7. 9. Diagrama de distribución de especies de L1.

Capítulo 8

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the European Doctorate.

Atención: Este capítulo ha sido escrito en inglés para la obtención del Doctorado Europeo.

Summary and conclusions.

This work presented in this thesis has three main aims: study of Cu(II) complexes able to mimic the action of superoxide dismutase, study of the behaviour of the Cu(II) complex of a novel pyrazole ligand, and studies relating to enhancing the efficiency of 5'-guanosine monophosphate (GMP) as gelator (detailed below).

A family of polyamine receptors (**L1**, **L5**, **L6** and **L7**) was synthesised to achieve our proposal. There are several reasons to use them as a part of this work. They are water-soluble, can interact with anions or cations depending on the pH of the media, and they are relatively low-cost and easy to modify. As described in chapter 4 (nomenclature and synthesis), the syntheses of the polyamine receptors were done in relatively good yields, using a modified Richman-Atkins procedure. This comprises three main steps: (1) protection of the amino groups, (2) cyclisation, where the protected primary amines are linked to an aromatic spacer, and (3) removal of protecting groups.

In the cases of macrocycles **L1** and **L5**, some additional work needs to be done before the cyclisation reaction takes place. The number of amino groups has been increased in **L1**, hence some preliminary work on the polyamine precursor was necessary. On the other hand, the pyrazole unit needed to be modified to synthesise **L5**.

In the following pages, the objectives and the results obtained will be discussed briefly and the main conclusions outlined.

First aim (Chapter 5). *Homo- and heterobinuclear Cu(II) and Zn(II) complexes of cyclic hexaazapydinacyclophanes as Cu(II)-Zn(II)-SOD mimics.*¹

The main topic of this chapter is the study of homo- and heterobinuclear complexes of Cu(II) and Zn(II) and their ability to disproportionate the superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$). The cavity sizes and the high number of nitrogen donor atoms present in the structures of receptors **L1-L4**, make them good candidates to form metal complexes with good attributes as superoxide dismutase mimics.

Superoxide anion is a product of the oxygen metabolic cycle (reduction of an oxygen molecule into water), formed as a consequence of reduction of a molecule of dioxygen by addition of one electron. It is the precursor of other reactive oxygen species (ROS) such as $HO\cdot$; $RO\cdot$; O_2^{2-} , etc., and responsible for oxidative damage to proteins, lipids, nucleic acids and other cellular components.

Part of its generation is in the electron transport process or, by phagocytes. For this reason, aerobic systems have enzymes to protect themselves from superoxide ($O_2^{\cdot-}$). These kinds of enzymes are named superoxide dismutase (Cu,Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and Cu,Zn-SOD (SOD3)) and have the function of catalysing the superoxide anion reaction into O_2 and H_2O_2 . Under normal conditions, the superoxide anion is trapped by SOD (in cellular mitochondrial, plasma or extracellular spaces) and its level is controlled. But in some cases, the amounts of superoxide anion become excessive and the enzyme function is insufficient. This fact is called “oxidative stress” and its consequences are human diseases such as myocardium

infarction. Therefore, the synthesis of new metal complexes able to mimic the SOD function is of current scientific interest.

This work is focused on the CuZn SOD, in which the active centre consist of a Cu(II) and Zn(II) atoms linked through an imididazolate bridge. For this reason, binuclear complexes such as Cu_2L , $\text{Cu}_2\text{L}(\text{Im})$, CuZnL and $\text{CuZnL}(\text{Im})$, have been the subjects of our attention.

Each polyamine receptor used in the work (**L1-L4**) has seven nitrogen donor atoms in its structure, and differs from its analogues in the number of carbon atoms between the nitrogens. **L1** has exclusively propyl chains between the amino groups, making the receptor more flexible than **L2-L4** (which have both ethyl and propyl chains). This fact is reflected in the higher protonation constants of the macrocycle due to the lower electrostatic repulsions compared with the other macrocycles.

The formation of homo- and heterobinuclear complexes at desired pH was determined by potentiometric studies. The nature of the polyamine chain affects the stability constant of the complexes. Ligands that bind metals forming alternating five and six membered chelating rings, such as **L2**, have higher stability constants. This effect will be reflected in the SOD activity.

The crystal structure obtained for CuL2 complex showed that the pyridine N atom participates in the coordination of metal ions. This information was supported by UV-vis studies of CuL2 and the UV-vis results for the Cu(II) complexes of **L1**, **L3**, and **L4** were directly comparable. Complexation of the pyridine N atom was consequently assumed to be the case for the rest of the receptors.

The reduction potential of the complexes at physiological pH is one of the most important chemical aspects to consider in SOD mimicry. It

should be between -0.33 V ($O_2/O_2^{\cdot-}$) and 0.89 V ($H_2O_2/O_2^{\cdot-}$). E° ($Cu(II)H_xL/Cu(I)H_xL$) of the complex to be tested was determined by electrochemistry at physiological pH and the values obtained were within the required range.

SOD activity was tested for each complex and IC_{50} values were determined by the McCord-Fridovich method. **L1**, which forms the least $Cu(II)$ stable complex of the (Cu_2 -L) series, showed the highest SOD activity. This evidence is supported by the k_{cat} (the greatest of the series) and $\log K_{dis}$ (the lowest of the series). In other words, Cu_2^{II} -**L1**^a is the most efficient complex of the series to catalyse dismutation of $O_2^{\cdot-}$ and the species needed to complete the catalytic cycle (Cu_2^I **L1**) is the most stable. This could be explained by taking into account the fact that **L1** is the most flexible ligand of the series and this property facilitates its configurational reorganization during the catalytic cycle.

On the other hand, **L2** which forms the most stable $Cu(II)$ complex of the series, showed the lowest SOD activity. The IC_{50} determined for the Cu_2 **L2** complex was the highest of the series and, in agreement with the chemiluminescence in PNML SOD activity assay, the lowest luminescence inhibition.

There is still much work to do in this area, but the studies performed with these $Cu(II)L$ complexes, except (Cu_2 **L2**), could be improved and form the basis of antioxidant agents in the future.

^a superindex I and II refers to the oxidation state of copper in the complexes.

Second aim (Chapter 6). *Copper complexes of a 1H-pyrazolamacrocycle with evidence for atmospheric CO₂ fixation.*²

The main goal of this part of the work is the preparation and subsequent study of the properties of the Cu(II) complexes with a new receptor (**L5**). It is the first polyaminic macrocycle produced by [1+1] condensation with pyrazole units reported in the literature. The introduction of this ring in the structure confers new characteristics that make it significantly different from the pyridine analogue **L6**.

The aromatic heterocyclic pyrazole ring belongs to the 1,2-azole family. The five-membered ring has two contiguous, non-equivalent nitrogen atoms. The azole N atom (located in position 1) contributes two electrons to the aromatic system and forms an N-H bond (pyrazolium). The pyridine-like N atom, in position 2 has a lone pair of electrons in an orbital perpendicular to the π system. For this reason, pyrazole can behave as both a nucleophile and as a base.

In its neutral form, pyrazole can act as a hydrogen donor and acceptor; while in its anionic form it can accept two hydrogen bonds from appropriate groups. With respect to metal ions, pyrazole acts as a bis(monodentate) ligand in its neutral form, and as a bis(monodentate) or exobidentate ligand in its anionic form. The bis(monodentate) form allows the connection of two ligands and two metal ions through a pyrazole bridge. These binuclear complexes offer electronic and magnetic properties that differ from those of corresponding mononuclear complexes. For this reason, many chemists are involved in looking for novel pyrazole derivative ligands to form complexes with new electronic and magnetic characteristics.

There is a relatively large family of [1+2] and [2+2] receptors containing pyrazole units attached to polyamines. The Cu(II)

chemistry of both types is well known. However, macrocycles of [1+1] condensation, where pyrazole is attached to a polyamine has not previously been reported.

Solution and solid state studies show that the nature of the Cu(II) complexes of **L5** are quite different from the **L6** analogue (with a pyridine unit as the spacer ring). Crystal structures of complexes, with a Cu(II):L 1:1 stoichiometry, show the first evidence. While **L6** forms mononuclear complexes where the Cu(II) atom is placed in the middle of the cavity and all the amino groups are involved in the coordination of the metal, [Cu**L6**](ClO₄)₂ (**CS2**), **L5** forms binuclear dimer complexes ([Cu₂(H(H-**L5**))(H-**L5**)](ClO₄)₃·3.75H₂O (**CS3** and **CS4**). The cation consists of two ligands linked through the pyrazolate moieties and two copper atoms in a distorted square pyramidal geometry. The nitrogen atoms close to the aromatic rings complete the equatorial coordination. The axial positions are occupied by two amino groups from the central part of the same polyamine macrocycle. The equivalent amino groups belonging to the other macrocycle remain uncoordinated, leaving its cavity free to coordinate further substrates. This fact was demonstrated with the crystal structures of a trinuclear dimeric complex [Cu₃(H-**L5**)₂(CO₃)(H₂O)](ClO₄)₂·8H₂O (**CS5**) obtained from a solution which contains Cu(II):L in 3:2 molar ratio. Two macrocycles were linked through pyrazole units and two copper atoms, displaying distorted square pyramidal geometry. The third Cu(II) atom was placed in the free cavity of one of the macrocycles, adopting square pyramidal geometry. Cu(II) is bound to the two nitrogen atoms of the polyamine chain and the equatorial plane is completed with a carbonate anion. Since carbonate or carbon dioxide was not present as a reactant in the flask, it seems likely that CO₂ was fixed from the atmosphere.

Moreover, crystal structures showing complexation of CO₂ (**CS5**) were obtained even in the presence of dicarboxylic acids, showing its high binding affinity for atmospheric CO₂. This result makes the complex potentially very interesting because the amounts of this greenhouse gas (CO₂) in the atmosphere have increased substantially in recent decades and processes for fixing CO₂ are currently of high relevance.

On the other hand, potentiometric, mass spectrometry and EPR studies confirmed that Cu(II) complexes of **L5** and **L6** have the same behaviour in solution. **L5** forms mainly dimeric dinuclear complexes throughout the pH range studied, while **L6** forms only mononuclear complexes. Trinuclear dimeric complexes of Cu(II) and **L5**, could also be detected by mass spectrometry and potentiometric titrations. The distribution diagram shows that trinuclear species predominate above pH 7.

Furthermore, we could also determine the stability constant of ternary complexes with CO₃²⁻. Titrations of solutions containing Cu(II):**L5**:CO₃²⁻ in a 3:2:3 molar ratio were carried out from basic to acidic pH. Data obtained in the pH range 10-7 were fitted giving a value of $\log\beta = 33.79(4)$ for the reaction $3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L5} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons [\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L5})_2(\text{CO}_3)]^{2+} + 2\text{H}^+$.

Third aim (Chapter 7). *Increasing the efficiency of GMP as a gelator.*

It is well known that guanosine-5'-monophosphate (GMP) forms gels. Four bases in GMP, in a square co-planar arrangement, are linked through eight hydrogen bonds. This structure is called a G-quartet and these quartets can stack one upon other forming helical threads and, ultimately, gels. At pH 5, the nucleotide base part of the molecule is neutral and there is a negative charge on the phosphate group. The stacking of G-quartets increases the electrostatic repulsion between phosphates, hindering the gel formation. For this reason, high concentrations and low temperatures are necessary to form the gels.

Our main goal in this part of the work is to increase the efficiency of GMP as gelator, because this could potentially give rise to the development of new materials, and because its structural similarity with a nucleic acids, makes the formation of G-quartets intrinsically interesting.

There are two possibilities to achieve this goal: i) the substitution of phosphate group by a neutral group, or ii) to minimize the electrostatic repulsions by the introduction of a positive charges.

The first option implies a change to the molecule that could produce unwanted effects on properties such as solubility or toxicity. For the second option, we could use simple cations, such as Na^+ , or polycations such as lipids, sugars or proteins. In this work we have used polyamines as co-gelators (**L5-L10**). The polyamine allows formation of GMP gels at room temperature at concentrations lower than normally required.

These gels are pH and temperature sensitive. Properties such as strain and stress can be controlled by varying the amount of GMP and the molar ratio between components.

We decided to explore the minimum concentration of GMP needed to form a gel in the presence of a polyamine. It was found that 30 mM of GMP was sufficient and we could determine the quantity of polyamine by rheology. This technique confirms whether the material under study is a gel, and gives information about the maximum value of stress that it can tolerate. The data collected indicated that the optimal GMP:L molar ratio is generally when there are as many molecules of GMP as the number of charged amino groups in the polyamine, except for **L5**. Moreover, we could also observe that the gels get stronger with the number of positive charges and that cyclic polyamines form stronger gels than their linear analogues.

Pictures of the gels obtained by scanning electronic microscopy indicate that cross-linked fibres form in the gels. It was also possible to observe that some fibres adopt a helical shape and/or join together to form thicker fibres. Pictures were taken of a static system, in which the solvent and all the components dissolved in it were removed. However, in reality these gels are dynamic systems and we could prove this using z-spectroscopy. This technique involves the two phases of the gel and indicates that both components (polyamine and GMP) are dynamic. It was observed that linear polyamines move more easily between the two phases than GMP does. This was not surprising because in our hypothesis, polyamines are on the surface and GMP molecules are forming (interior) building blocks.

Wide-angle X-ray scattering (WAXS) spectra gave us evidence that the structure of the gels is maintained in the presence of polyamines. A broad peak centred at ca. 26.5 degrees, which corresponds with a

distance of 0.32 nm, was assigned to the distance between two stacked G-quartets.

These gels could be used in biomedical applications. In recent years, many gels of this nature have been investigated for this purpose. For this reason, the gel melting temperatures (T_{gel}) were determined. The data collected indicated that gels formed with **L5**, **L6**, **L9**, and **L10** have T_{gels} higher than body temperatures, therefore they could be used for this purpose.

In some cases, the addition of a new component such as a drug could disrupt the arrangement between gelators, in which case a gel is not formed. This could be a problem if we want to use them in biomedical applications. Hence, the next step was to test the gel formation incorporating a compound as a drug. In this case we used phenylephrine (decongestant) and topotecan (chemotherapeutic) in a GMP-**L9** gel. With phenylephrine the gel still formed and it was possible to demonstrate this by rheology. The data confirm that the material is a gel, but softer than without phenylephrine. In the case of topotecan, gels could be formed only at low temperatures or using higher concentrations of GMP. Therefore, there is still much work to do in this area.

However, a major weakness is the gelation pH. That is around 5 and for medical application it should be higher. To facilitate this, we tried forming gels using polyamines with a higher number of amino groups in the chain. At physiological pH, **L1** forms the $[H_4L]^{4+}$ and $[H_3L]^{3+}$ species in a 1:1 ratio. The gelation test indicates that for 1:1 GMP:L molar ratio the gel was formed.

Other possible applications include the use of such gels as G-quadruplex stabilizers. Studies show that the presence of polyamines

in the gels does not modify the G-quartet structure, and even facilitates its formation. This fact is interesting because in G-rich regions of synthetic DNA and RNA the association of the molecules takes place in a similar way to the G-quartet, and this plays an important role in the biology. Such structures have been found in chromosomal DNA, and it is thought that these structures have regulatory functions.

References

- (1) Belda, R.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Jimenez, H. R.; Doménech-Carbo, A.; Soriano, C.; Latorre, J.; Terencio, C.; García-España, E. *Dalton Transactions* **2013**, *42*, 11194.
- (2) Belda, R.; Pitarch-Jarque, J.; Soriano, C.; Llinares, J. M.; Blasco, S.; Ferrando-Soria, J.; García-España, E. *Inorganic Chemistry* **2013**, *52*, 10795.

Publications

Intermolecular Binding Modes in a Novel [1 + 1] Condensation 1*H*-Pyrazole Azamacrocyclic: A Solution and Solid State Study with Evidence for CO₂ Fixation

Raquel Belda,[†] Javier Pitarch-Jarque,[†] Conxa Soriano,[‡] José M. Linares,^{†,‡} Salvador Blasco,[†] Jesús Ferrando-Soria,[§] and Enrique García-España^{*†}

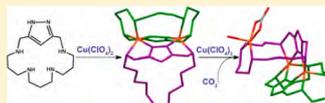
[†]Instituto de Ciencia Molecular, Universidad de Valencia, C/Catedrático José Beltrán Martínez, no. 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

[‡]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Avda. Vicente Andrés Estellés s/n 46100, Burjassot Valencia, Spain

[§]Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, Texas 77843, United States

Supporting Information

ABSTRACT: The synthesis of a novel cyclophane (L1) consisting of a 1*H*-pyrazole moiety linked through methylene groups to a 1,5,9,13-tetraazadecane chain is described. As far as we know, this is one of the first reported syntheses of a [1 + 1] condensation 1*H*-pyrazole azamacrocyclic ligand. The crystal structures of the complexes [Cu₂(H(L1))₂(H₂L1)]·(ClO₄)₂·3.75H₂O (1) and [(Cu₂(H(L1))₂)₂(H₂L1)]₂·(ClO₄)₂·Br₂·4.2H₂O (2) show that Cu²⁺ coordination leads to formation of 2:2 Cu²⁺:L dinuclear dimeric complexes in which the 1*H*-pyrazole units lose a proton behaving as bis(monodentate) bridging ligands. Unlike previously reported complexes of [2 + 2] pyrazole azamacrocyclics, the pyrazolate units in 1 are pointing outward from the macrocyclic cavity to bind the Cu²⁺ ions. Inner coordination with formation of 1:1 Cu²⁺:L complexes is however observed in [1 + 1] pyridine azamacrocyclics as shown by the crystal structure here presented of the complex [CuL2](ClO₄)₂ (3). Crystals of [Cu₂(H₂L1)₂(CO₃)(H₂O)](ClO₄)₂·8H₂O (4) grown by evaporating aqueous solution at pH 9 containing Cu²⁺ and L1 in 3:2 molar ratio show the presence of a further Cu²⁺ coordinated to the two free amine groups found in structures 1 and 2. The metal ion fills its coordination sphere capturing atmospheric CO₂ as a η²/η¹-bidentate carbonate anion placed in the equatorial position and an axial water molecule. pH-metric data, UV-vis spectroscopic data, EPR measurements, and HR-ESI-MS data support that the outer coordination mode with formation of 2:2 dinuclear dimeric and 3:2 trinuclear complexes is preserved in aqueous solution.

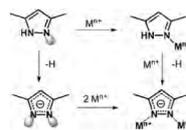


INTRODUCTION

Organic compounds with 1*H*-pyrazole units have raised a great deal of interest in the past years due to the interesting hydrogen bonding and coordination properties of this small heterocycle.^{1–3} Indeed, 1*H*-pyrazole in its neutral form can behave both as a hydrogen bond acceptor and donor, while in its pyrazolate anionic form it can accept two hydrogen bonds from appropriate donor groups. With respect to metal coordination, neutral 1*H*-pyrazole typically acts as a monodentate ligand while as a pyrazolate anion it behaves typically as a bridging bis(monodentate) or exobidentate ligand (Scheme 1).^{1–4}

Many ligands have been built with a pyrazole unit spacing two either equivalent or different coordination sites with the idea of placing two interconnected metal ions in close proximity in order to explore their electronic and magnetic interactions (see Scheme 2).^{5–8} Other spacers containing two adjacent nitrogen atoms able to provide similar organizations are pyridazines,^{9,10} 1,2,4,5-tetraazines,¹¹ 1,2,4-triazoles,^{12–14} 1,3,4-thiadiazoles, and 1,3,4-oxadiazoles.¹⁵ In recent years some of us have contributed to this topic with the preparation and study of the supramolecular and coordination chemistry of

Scheme 1. Coordination Modes of Pyrazole

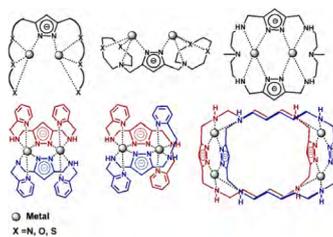


a series of azamacrocyclics formed either by [2 + 2] or [3 + 2] condensation of 1*H*-pyrazole-3,5-dicarbaldehyde with different triamines or with the tripodal tetraamine tris(2-aminoethyl)amine, respectively.^{16–20} These studies evidenced interesting binding capabilities toward metal ions and organic molecules of biological relevance, such as amino acids or dopamine. With respect to metal ion coordination, the preferred coordination

Received: March 15, 2013

Published: September 16, 2013

Scheme 2. Kinds of Polynuclear Complexes of Pyrazole Ligands

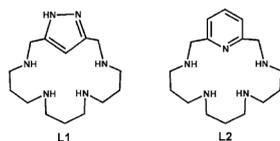


mode of pyrazole as a bis(monodenate) pyrazolate anion bridging two metal ions in the interior of the macrocycle (Scheme 2).

However, in spite of all these interesting chemical features, as far as we know [1 + 1] pyrazole azamacrocycles had not yet been reported. This kind of macrocycle can give rise to novel binding modes due to the fact that an outer orientation of the pyrazole nitrogen atoms favors intermolecular organizations with the metal ion linking more than one ligand (Scheme 2). Moreover, these metal complexes might behave as receptors for additional metal ions which in their turn can bind other target substrates through the formation of mixed metal complexes. Such an outer orientation has been somehow evidenced by the tetranuclear macrocyclic cage formed when two 1*H*-pyrazole units are condensed with two 1,5-diazapentane (cadaverine) diamines in the presence of Cu²⁺ (Scheme 2).²¹

Here we report the synthesis of the first macrocycle of this [1 + 1] series (L1) (Chart 1). L1 is made by linking the polyamine 1,5,9,13-tetraazatridecane through methylene groups to the 3,5-positions of a 1*H*-pyrazole ring.

Chart 1

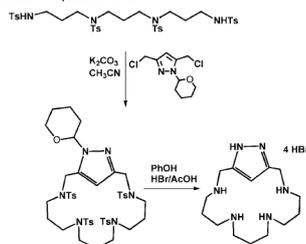


We have also studied the Cu²⁺ coordination of L1. Formation of mononuclear, binuclear complexes with 2:2 Cu²⁺:L1 stoichiometry and trinuclear ones with 3:2 Cu²⁺:L1 stoichiometry has been evidenced through different solution and solid state techniques. Furthermore, we show that the 3:2 Cu²⁺:L1 complexes are able to fix atmospheric carbon dioxide in water with remarkable affinity. For comparison, we have also studied the Cu²⁺ coordination chemistry of a related macrocycle (L2) containing a 2,6-dimethylpyridine linker connecting the ends of the same polyamine chain.²²

RESULTS AND DISCUSSION

Synthetic Procedure. The synthesis of L1 and L2 was performed according to a modification of the well-known Richman–Atkins procedure,²³ which is based on a macrocyclization reaction of the tosylated polyamine with either 1*H*-3,5-bis(chloromethyl)pyrazole or with 2,6-bis(bromomethyl)pyridine in CH₂CN using K₂CO₃ as a base. However, in the case of L1, to avoid side reactions, it was first necessary to protect the nucleophilic NH group of pyrazole by reaction with 3,4-dihydroxypropan in CH₂Cl₂.²⁴ 1*H*-3,5-Bis(chloromethyl)pyrazole was prepared from 1*H*-3,5-pyrazoledicarboxylate in a three-step procedure which consists first of esterification in ethanol, followed by reduction with di(isobutyl)aluminum hydride (DIBAL) to obtain the diol and then treatment with thionyl chloride (Scheme 3).²⁵ An alternative synthesis of the macrocycle L2 had been previously reported by I. Dierk et al.²²

Scheme 3. Synthesis of L1



Acid–Base Properties. The basicity constants of L1 and L2 are shown in Table 1. Both ligands present four protonation

Table 1. Logarithms of the Basicity Constants for Compounds L1 and L2 Determined in 0.15 M NaClO₄ at 298.1 K^a

reaction ^b	L1	L2
L + H ⇌ HL	10.63(2) ^c	10.60(3)
HL + H ⇌ H ₂ L	9.35(1)	8.57(3)
H ₂ L + H ⇌ H ₃ L	7.24(2)	6.73(3)
H ₃ L + H ⇌ H ₄ L	5.58(2)	5.27(4)
log β	32.80(3)	31.17(5)

^aLogarithms of the stepwise (K_{HL}) and cumulative [β = (ΠK_{HL})] protonation constants are reported. ^bCharges omitted. ^cValues in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

steps in the pH range available for the potentiometric measurements (pH 2.5–11.0). Except for the first one, L1 displays higher basicity than L2 for all the protonation steps. Moreover, although the pyrazole or pyridine units may bear themselves an additional protonation step, we have not detected such a protonation constant. UV–vis spectra of L1 recorded at variable pH do not show any significant change below pH 4 supporting that the pyrazole ring does not protonate in this pH range (see Supporting Information, Figure

S1). However, a plot of the absorbance at 225 nm overlapped with the species distribution diagram (Figure 1a) denotes that

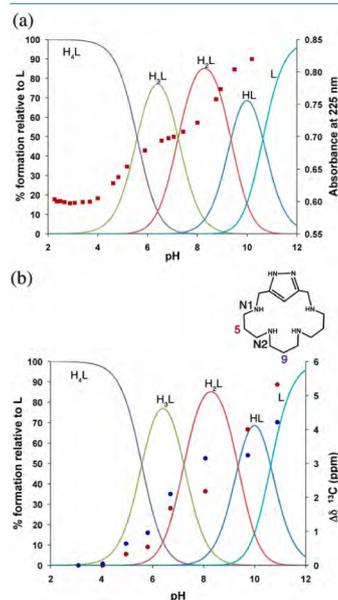


Figure 1. Plot of the species distribution diagram of L1 along with (a) the variation in the absorbance at 225 nm with pH (pH values 2.26, 2.35, 2.49, 2.66, 2.88, 3.07, 3.39, 3.68, 4.00, 4.62, 4.83, 5.17, 5.89, 6.56, 6.84, 7.05, 7.43, 8.00, 8.75, 8.93, 9.49, and 10.19) and (b) variations with pH of the chemical shifts of ^{13}C NMR signals of C5 (red) and C9 (blue) (pH values 3.09, 4.05, 4.96, 5.81, 6.70, 8.07, 9.73, and 10.89).

significant changes occur following the second and fourth protonation steps (H_2L^{2+} and H_4L^{4+} species, respectively), suggesting that in such steps the amine groups closest to the pyrazole ring are the ones protonating at a larger extent.

The changes with pH of the ^{13}C NMR labeled as C5 and C9 (see Figure 1b) support also the major participation of the nitrogen atoms closest to the pyrazole ring at this stage. While C5, which is placed in β -position with respect to amine groups N1 and N2,²⁹ experiences a continuous upfield shift upon protonation of L1, C9, which is just placed in β -position with respect to N2, only moves significantly upfield in correspondence with the first and third protonation steps of L1.

Pyridinophane L2 has comparable basicity to L1 in its first protonation and lower basicity in the following three next steps. In agreement with what has been observed for related pyridine macrocycles,^{27,28} protonation of the pyridine is not observed in the 2–11 pH range in which the potentiometric measurements were carried out. As shown in Supporting Information Figure S2, the largest hypochromicity and hypsochromic shifts in the UV spectra are observed from pH 9 to 5, suggesting that, in this case, the second and third protonation steps are mostly affecting the secondary nitrogen atoms closest to the pyridine spacer.

Cu²⁺ Coordination. *Crystal Structure of [Cu₂(H(H₋L1))(H₋L1)](ClO₄)₃·3.75H₂O (1).* Crystals of [Cu₂(H(H₋L1))(H₋L1)](ClO₄)₃·3.75H₂O (1) were grown by slow evaporation of aqueous solutions containing L1·4HBr·H₂O and Cu(ClO₄)₂·6H₂O in 1:1 mol ratio at pH 9. The crystal structure of 1 consists of [Cu₂(H(H₋L1))(H₋L1)]³⁺ dinuclear dimeric cations, ClO₄⁻ anions, and lattice water molecules. Table 2 collects selected bond distances and angles,

Table 2. Selected Bond Distances (Å) and Angles (deg) for [Cu₂(H(H₋L1))(H₋L1)](ClO₄)₃·3.75H₂O (1)

bond distance (Å)		bond angle (deg)				
Cu1	N12	1.955(3)	N12	Cu1	N6	93.84(14)
Cu1	N6	1.955(4)	N12	Cu1	N7	79.12(14)
Cu1	N7	2.070(4)	N6	Cu1	N7	165.43(15)
Cu1	N1	2.136(4)	N12	Cu1	N1	142.67(15)
Cu1	N8	2.221(4)	N6	Cu1	N1	80.21(15)
Cu2	N5	1.956(4)	N7	Cu1	N1	97.59(16)
Cu2	N11	1.965(3)	N12	Cu1	N8	113.78(15)
Cu2	N10	2.054(4)	N6	Cu1	N8	96.98(15)
Cu2	N4	2.163(4)	N7	Cu1	N8	97.53(15)
Cu2	N9	2.202(4)	N1	Cu1	N8	103.53(14)
			N5	Cu2	N11	94.18(14)
			N5	Cu2	N10	166.25(16)
			N11	Cu2	N10	78.90(14)
			N5	Cu2	N4	79.88(15)
			N11	Cu2	N4	140.10(17)
			N10	Cu2	N4	97.73(16)
			N5	Cu2	N9	95.27(15)
			N11	Cu2	N9	117.06(15)
			N10	Cu2	N9	98.46(15)
			N4	Cu2	N9	102.80(16)

and Supporting Information Table S1 details of the crystal structure refinement. In the dimeric [Cu₂(H(H₋L1))(H₋L1)]³⁺ complex units the metal ions are connecting two different L1 macrocycles (Figure 2a,b). In both macrocycles the pyrazole units are deprotonated behaving as bis(monodentate) ligands. Unlike most of the previously reported pyrazole azamacrocycles resulting from [2 + 2] and [3 + 2] condensations in which the pyrazolate units adopted an inner orientation to bind the metal ions,^{18,30} in the present [1 + 1] macrocycle the pyrazolate anion displays an outer orientation which permits the binding of the metal ions in cooperation with a second macrocycle. As above-mentioned, a somewhat similar case was observed in the formation of the metallogate Cu²⁺ tetranuclear complex reported in ref 21.

The metal ions in 1 make a sort of hinge between the macrocycles which dispose the central parts of their polyamine chains toward opposite sides of the plane defined by the metal ions and the pyrazole units (Figure 2b). The Cu²⁺ metal ions

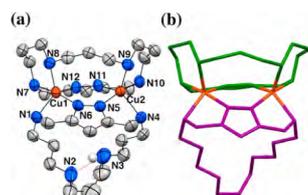


Figure 2. (a) View of the dinuclear dimeric complex $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{L}1))(\text{H}(\text{L}1))]^{2+}$ of **1**. Ellipsoids are shown at 50% probability level. Hydrogen atoms omitted except the one of the ammonium group involved in intramolecular hydrogen bonding. (b) Two-colored view of the complex $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{L}1))(\text{H}(\text{L}1))]^{2+}$ of **1** highlighting the connection between the macrocycles.

have in both sites distorted square pyramidal geometry with strong trigonal bipyramidal component ($\tau = 0.38$ and $\tau = 0.43$ for Cu1 and Cu2, respectively).²⁹ The equatorial plane is defined by two nitrogen atoms belonging to pyrazolate fragments of different macrocycles and by two contiguous secondary nitrogen atoms, also of different macrocycles. The elevation of both Cu²⁺ ions above the mean plane defined by the equatorial nitrogen atoms is ca. 0.46 Å. The distance between the copper atoms (3.9496(8) Å) is fixed by the nature of the pyrazolate bridges and is close to that usually observed in Cu²⁺ complexes of [2 + 2] pyrazole macrocycles with a similar bridging scheme.^{18,30} The axial positions are occupied by two amine groups at the central part of the polyamine chain, but in this case belonging to the same macrocyclic unit (Figure 2a).

The equivalent amine groups of the other macrocycle remain uncoordinated, one of them being protonated at the pH values where these crystals evolved (Figure 2). Formation of an intramolecular hydrogen bond between the protonated (N3) and nonprotonated (N2) amine groups of this noncoordinating bridge portion is also observed. The N2–N3 distance is 2.661(9) Å. This pattern extends intermolecularly to connect the complexes through a relay of hydrogen bonds involving the protonated amine group, water molecules, perchlorate anions, and a coordinated amine group (see Supporting Information Figure S3). Hydrogen bonding contacts are collected in Supporting Information Table S2.

Crystal Structure of $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{L}1))_2(\text{H}(\text{L}1))_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{Br}_2 \cdot 4.2\text{H}_2\text{O}$ (2**).** When slowly evaporating solutions of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and **L1**·4HBr·H₂O at pH 10, crystals of $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{L}1))_2(\text{H}(\text{L}1))_2](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{Br}_2 \cdot 4.2\text{H}_2\text{O}$ (**2**) appeared. Details of the data collection, selected bond distances, and hydrogen bonding contacts are included in the Supporting Information (Tables S1, S3, and S4). All the bond distances and angles in the coordination sphere of the metal ions are close to those found in **1** (Figure 3 and Table S3). In this case, there are two bromide anions and three perchlorate anions shared by two dimeric complexes. One perchlorate is disordered in two possible positions. The main difference with respect to the previously discussed structure is that only one out of every four ligands has a protonated amine group in the noncoordinated chain. This part of the chain is disordered being observed two arrangements for the C4N2C5C6C7 set of atoms.

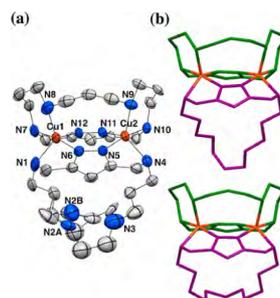


Figure 3. (a) ORTEP view of **2**. Counter ions are not shown. Ellipsoids are shown at 50% probability level. (b) Stick plots highlighting the two different dispositions of the noncoordinated lateral chain in the $[\text{Cu}_2(\text{H}(\text{L}1))_2(\text{H}(\text{L}1))_2]^{2+}$ cation.

Crystal Structure of $[\text{CuL}_2](\text{ClO}_4)_2$ (3**).** Compound **3** is formed by $[\text{CuL}_2]^{2+}$ monomeric cationic complexes and perchlorate counteranions. The crystal structure shows that Cu²⁺ is coordinated in a regular square pyramidal geometry ($\tau = 0.036$). The pyridine nitrogen (N1), the two nitrogen atoms closest to the aromatic spacer (N2 and N5), and one of the nitrogen atoms (N3) of the central part of the chain surrounded by six-membered chelate rings conform the equatorial plane. The slightly distorted axial position is occupied by the remaining nitrogen atom (N4) (Figure 4).

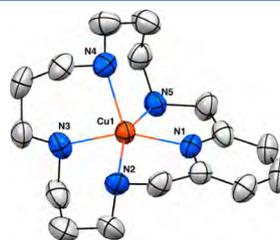


Figure 4. Molecular structure showing the cationic complex $[\text{CuL}_2]^{2+}$. Ellipsoids are shown at the 50% probability level. Hydrogen atoms omitted.

Table 3 collects selected bond distances and angles. The shortest bond distance in the equatorial plane is that with the pyridine nitrogen, while the longest one is that with one of the contiguous secondary nitrogen atoms (N5), which is sharing the corner between five-membered and six-membered chelate rings. The location of this longest equatorial bond distance can be attributed to the aromatic spacer that prevents a closer

Table 3. Selected Bond Distances (Å) and Angles (deg) of Complex 3

bond distance (Å)			bond angle (deg)			
Cu1	N1	1.971(6)	N1	Cu1	N3	155.5(3)
Cu1	N3	2.028(5)	N1	Cu1	N2	80.6(3)
Cu1	N2	2.087(7)	N3	Cu1	N2	89.4(3)
Cu1	N5	2.125(6)	N1	Cu1	N5	80.5(3)
Cu1	N4	2.214(6)	N3	Cu1	N5	100.2(2)
			N2	Cu1	N5	153.3(3)
			N1	Cu1	N4	111.6(2)
			N3	Cu1	N4	92.8(2)
			N2	Cu1	N4	110.1(2)
			N5	Cu1	N4	94.4(2)

approach. The elevation of the copper atom above the nitrogen atoms in the equatorial plane is 0.41 Å. Unlike compound **1**, in this case only a few weak intermolecular hydrogen bonds have been observed (Table S5).

Crystal Structure of $[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{L1})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (4**).** Slow evaporation at pH 8 of aqueous solutions containing $\text{L1} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in 3:2 molar ratio led to the formation of crystals of $[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{L1})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**4**) composition suitable for X-ray diffraction analysis. The structure reproduces the essential features of **1** and **2** with two macrocycles connected by two Cu^{2+} metal ions, but it has an additional Cu^{2+} bound to the two amine groups that remained free in one of the bridges of **1** or **2** (Figure 5a,b). Interestingly, this third Cu^{2+} completes its equatorial plane with a carbonate anion bound in a $\eta^1\eta^2$ -bidentate fashion with an O–Cu–O angle of $66.2(2)^\circ$ (selected bond distances, angles,

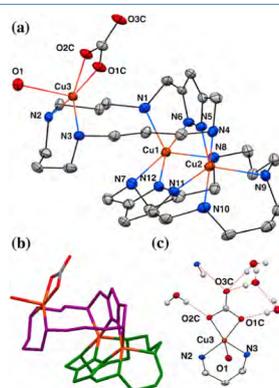


Figure 5. (a) ORTEP plot of the $[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{L1})_2(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. Ellipsoids are shown at the 50% probability level. Hydrogen atoms omitted. (b) View highlighting with different colors the two macrocycles present in **4**. (c) View of the carbonate binding site and hydrogen bonding network.

and hydrogen bonding contacts are collected in Table 4 and in Supporting Information Tables S6 and S7). The axial position

Table 4. Selected Bond Distances (Å) and Angles (deg) of $\text{Cu}3$ Coordination Site in **4**

bond distance (Å)			bond angle (deg)			
Cu3	O1C	1.988(3)	O1C	Cu3	O2C	66.17(12)
Cu3	O2C	1.998(3)	O2C	Cu3	N2	98.94(13)
Cu3	N2	1.999(3)	O1C	Cu3	N3	93.94(13)
Cu3	N3	2.023(3)	N2	Cu3	N3	100.26(14)
Cu3	O1	2.315(3)	O1C	Cu3	O1	92.72(12)
			O2C	Cu3	O1	101.85(12)
			N2	Cu3	O1	91.52(12)
			N3	Cu3	O1	91.38(13)

of the square pyramid ($\tau = 0.15$) is occupied by a water molecule. The narrow angle imposed by the carbonate ligand provides a rather rhombic geometry to the system as evidenced by the EPR spectra of the crystals (see Figure S4). Since carbonate or carbon dioxide was not introduced as a reactant in the reaction flask, CO_2 should have been fixed from the atmosphere. Carbonate fixation is reinforced in the solid state by an extensive hydrogen bond network; while the coordinated oxygen atoms O1C and O2C hydrogen bond to a lattice water molecule and to the coordinated water molecule of another complex, O3C forms a trifurcated hydrogen bond with an amine group and two lattice water molecules (Figure 5c).

Such a CO_2 fixation induced by an unsaturated Cu^{2+} coordination site forming part of a larger preorganized complex entity puts into evidence one of the potential application of the ligand **L1** reported in this work.

Cu^{2+} Complex Formation in Solution. The stability constants for the systems Cu^{2+} –**L1** and Cu^{2+} –**L2** determined in $0.15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaClO}_4$ at 298.1 K have been included in Table 5, and the distribution diagrams in Figure 6 and

Table 5. Stability Constants for the Systems Cu^{2+} –**L1** and Cu^{2+} –**L2**^a

reaction ^b	L1	L2
$\text{Cu} + 2\text{H} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	$26.76(1)^c$	$26.88(8)$
$\text{Cu} + \text{H} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuHL}$		$23.29(7)$
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$		$20.08(1)$
$2\text{Cu} + \text{H} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_2$	$43.00(1)$	
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}_2$	$37.49(18)$	
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2 + \text{H}$	$29.81(2)$	
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2 + 2\text{H}$	$20.23(5)$	
$3\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}_2 + 2\text{H}$	$27.92(2)$	
$3\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{H}_2\text{L}_2(\text{OH}) + 3\text{H}$	$20.20(4)$	

^aLogarithms of the constants are reported. ^bCharges omitted. ^cValues in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

Supporting Information Tables S5 and S6. In order to select the best speciation model, particularly for the system Cu^{2+} –**L1**, different titrations were carried out varying not only the Cu^{2+} :**L1** molar ratio but also the concentration of the ligand and metal ion. The speciation study shows in both systems for 1:1 Cu^{2+} :**L** molar ratios the formation of complexes of 1:1 Cu^{2+} :**L** stoichiometry. However, as the X-ray studies evidenced the formation of 2:2 Cu^{2+} :**L1** dimeric dinuclear complexes, we carried out ESI mass spectrometry and EPR measurements to ascertain the nature of the complexes formed at the

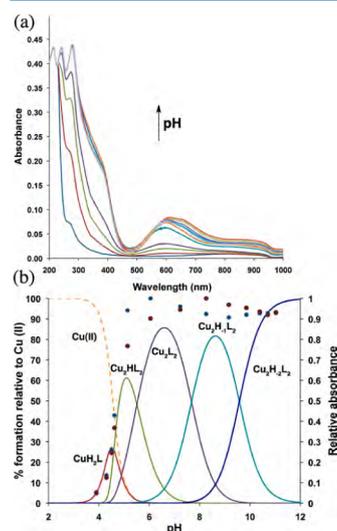


Figure 6. (a) UV-vis spectra of aqueous solutions containing $\text{Cu}^{2+}:\text{L1}$ in 1:1 molar ratio recorded as a function of pH (pH values: 3.9, 4.3, 4.5, 4.6, 5.1, 6.0, 7.2, 8.2, 9.2, 9.9, 10.4, 10.7, and 11.0). (b) Plot of the distribution diagram of the system $\text{Cu}^{2+}:\text{L1}$ for 1:1 molar ratio ($[\text{Cu}^{2+}] = 1 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{L1}] = 0.15 \text{ mol dm}^{-3}$, NaClO_4 , $T = 298.1 \pm 0.1 \text{ K}$, charges omitted) along with the absorbance values at 376 (blue) and 600 nm (red). Absorbances are normalized with respect to the maximum values at each wavelength.

concentration range used in the titrations (ca. 10^{-4} – 10^{-3} M). HR-ESI-MS spectra recorded in the positive mode of aqueous solutions containing $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ and $\text{L1} \cdot 4\text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$ adjusted to pH 7 and 9 show basically the existence in solution of dimeric dinuclear 2:2 species as denoted by the m/z peaks at 342.1597, 719.2853, 783.2653, and 795.2643 which correspond to the species $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L1})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L1})_2(\text{Cl})]^+$, $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L1})_2(\text{ClO}_4)]^+$, and $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L1})_2(\text{CH}_3\text{OH})(\text{Br})]^+$, respectively (see Figure S7). A very good agreement between the experimental and simulated isotopic distributions was obtained in all the cases.

Moreover, in the EPR spectra of solutions containing Cu^{2+} and L1 recorded at pH values 2.3, 3.8, 5.5, 7.5, 9.5, and 11, it can be seen that while at pH values 2.3 and 3.8 the signal of free aqueous Cu^{2+} ion appears, the other solutions are EPR silent (see Supporting Information Figure S8). Taking into account the magnetic susceptibility study and previous reports on pyrazolate bridged complexes,³¹ this can be ascribed to the formation of dinuclear complexes with a strong antiferromag-

netic coupling occurring through the pyrazolate bridges (see below). Therefore, these experiments suggest that the stoichiometry of the species existing in equilibrium above pH 5 should be 2:2 instead of 1:1. This is also supported by the fitting of the pH-metric titrations. This means that, as it happened in the solid state, also in solution the pyrazolate subunits have to be disposed outward from the macrocyclic cavity, which makes a clear-cut difference with L2 containing a pyridine ring or with other ligands containing pyrazole units.³² The analysis of the UV-vis spectra agrees with the formation of only one type of complexes at this molar ratio. As early as the dinuclear $[\text{Cu}_2(\text{L1})_2]^{2+}$ species starts forming in solution (pH ca. 4, Figure 6a), the intensity of the peaks at 376 and 600 nm increases reaching a maximum at pH 6 accordingly with the full formation of the dinuclear species. Since then on, dimeric dinuclear species prevail throughout all the pH range, and no further changes in the UV-vis spectra are observed (Figure 6b).

When speciation studies were performed for solutions with molar ratios $\text{Cu}^{2+}:\text{L1}$ over 1, complexes of higher nuclearity needed to be introduced in the model to obtain a satisfactory fitting of the system. Although in principle a $[\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L})_3(\text{OH})]^{2+}$ species could provide a reasonable fitting, the HR-ESI mass and EPR spectra and the previously discussed crystal structure 4 did not support this stoichiometry. EPR spectra showed the presence of a paramagnetic mononuclear Cu^{2+} center (Figure S4) while the HR-ESI mass spectra of solutions presented a peak at 408.5914 that could be ascribed to the species $[\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L})_2\text{Cl}]^{2+}$ (Figure S9). Therefore, we introduced in our model species of this stoichiometry finding the best fit for the species $[\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L})_2]^{4+}$ and $[\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L})_2(\text{OH})]^{3+}$ in agreement with the X-ray and mass spectra. It has to be emphasized that while distribution diagrams calculated for 1:1 $\text{Cu}^{2+}:\text{L}$ molar ratio do not show formation of complexes of 3:2 $\text{Cu}^{2+}:\text{L}$ stoichiometry, distribution diagrams calculated for 3:2 $\text{Cu}^{2+}:\text{L}$ molar ratio show that such species predominate above pH 7 (Figure S5).

In order to estimate the stability of the ternary complexes we carried out titrations of solution containing Cu^{2+} , L1 , and CO_3^{2-} in 3:2:3 molar ratios from basic to acidic pH values. Data obtained in the pH range 10.0–7.0 were treated with the HYPERQUAD program³³ giving a value of $\log \beta = 32.40(4)$ for the reaction $3\text{Cu}^{2+} + 2\text{L1} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons [\text{Cu}_3(\text{H}_{-1}\text{L1})_2(\text{CO}_3)]^{2+}$. The distribution diagram for this system (see Figure S10) provides evidence that the ternary complex predominates from pH 10.0 to 7.5, which indicates an important ability for fixing CO_2 .

In the case of L2 , the value obtained for the stability constant of the $[\text{CuL2}]^{2+}$ complex compares well with the stability values reported for the open-chain pentaamine 1,5,8,11,15-pentaazatetradecane ($\log K_{\text{CuL}} = 21.28$)³⁶ or with a related pyridinophane in which this polyamine subunit had been connected to a 2,6-pyridine spacer through methylene groups ($\log K_{\text{CuL}} = 20.44$),³² suggesting that the pentacoordination observed in the crystal structure of 3 is also kept in solution.

Magnetic Behavior. The magnetic properties of 1 are shown in Figure 7 in the form of $\chi_{\text{M}}T$ versus T , χ_{M} being the magnetic susceptibility per two Cu^{2+} ions. The value of $\chi_{\text{M}}T$ at room temperature is $0.44 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ K}$, a value that is significantly lower than that expected for two uncoupled Cu^{2+} ions. When the sample has been cooled, $\chi_{\text{M}}T$ continuously decreases, vanishing at around 70 K. This magnetic behavior is

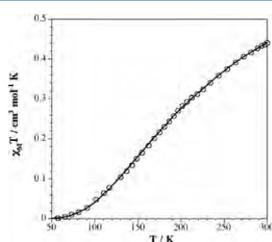


Figure 7. $\chi_M T$ vs T plot for compound 1.

characteristic of an important antiferromagnetic interaction between the Cu^{2+} ions with singlet spin ground state.

Given that the interaction between dinuclear subunits is expected to be very weak, it is reasonable to assume that the magnetic properties are determined by the coupling within dinuclear subunits. For this reason we have interpreted the magnetic data according to the actual dinuclear nature of the complex through the spin Hamiltonian $H = -JS_1S_2$. The fit of the experimental data to the appropriate susceptibility expression derived from the van Vleck formula, and with the assumption that the g factors for both Cu^{2+} are identical, leads to $J = -299(5) \text{ cm}^{-1}$ and $g = 2.06(1)$. The observed J values are within the range found for related bis(μ -pyrazolato)-bridged dinuclear complexes.^{30,31}

The pathway for the magnetic exchange is propagated through the bridging pyrazolate moieties. From the molecular structure of **1**, one can conclude that the unpaired electron in each metal center is clearly described by a $d_{x^2-y^2}$ magnetic orbital which is coplanar with the pyrazolate skeleton. The significant overlap between these magnetic orbitals accounts for the strong antiferromagnetic coupling observed.

CONCLUSIONS

The synthesis of a [1 + 1] condensation pyrazole azamacrocycle is described. At least in the pH range 2–11, neither protonation nor deprotonation of the pyrazole unit is observed in this ligand. However, in the presence of an equivalent of Cu^{2+} , the pyrazole unit readily deprotonates to form 2:2 dimeric Cu^{2+} complexes with the pyrazolate moieties pointing outward hinging the two macrocyclic units. This makes an important difference with related cyclophanes containing pyridine spacers. The presence of the metal ions and free amine and ammonium groups within the same structural unit provides appealing characteristics for the recognition of guest species at this site of the molecule. As a matter of fact, we have shown that a third Cu^{2+} ion can be bound to the two free amine groups of the polyamines giving rise to an unsaturated coordination site which prompts this metalloceptor for capturing further substrates. This is clearly demonstrated by the crystal structure of $[\text{Cu}_3(\text{H}_2\text{L}_1)(\text{CO}_3)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**4**) in which an atmospheric CO_2 molecule is efficiently fixed at this site. Future studies will be performed to address the possibility of using these complexes as catalysts in CO_2 chemistry.

EXPERIMENTAL SECTION

1*H*-3,5-Bis(chloromethyl)pyrazole and 3,5-bis(chloromethyl)-1-(tetrahydropyran-2-yl)-pyrazole were prepared as described in refs 24 and 25.

1,5,9,13-Tetra-(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13-tetraazatricadecane. *N,N'*-Bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (10.0 g, 53.1 mmol) was dissolved in 400 mL of THF, and K_2CO_3 (53.6 g, 387.7 mmol) in 100 mL of water was placed in a three-necked round-bottom flask provided with mechanical stirring. Then, a solution of *p*-tolylsulfonyl chloride (55.4 g, 290.8 mmol) in 100 mL of THF was dropwise added over 1 h. The solution was kept under stirring for one day, and the organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness. The residue was suspended in ethanol and refluxed for two hours. Then, it was filtered and washed exhaustively with ethanol (yield: 89%). Mp: 128–130 °C. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.62 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.32–7.26 (m, 8H), 5.39 (t, 2H, $J = 6$ Hz), 3.13 (t, 4H, $J = 8$ Hz), 3.08 (t, 4H, $J = 8$ Hz), 2.98 (td, 4H, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 6$ Hz), 2.42 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.91–1.69 (m, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 143.8, 143.5, 136.9, 135.7, 130.0, 129.9, 127.3, 127.1, 47.5, 46.6, 40.3, 29.5, 28.7, 21.6.

1-Tetrahydropyran-2-yl-3,7,11,15-p-toluensulfonyl-1(3,5)-pyrazolacyclohexadecaphane. 1,5,9,13-Tetra-(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13-tetraazatricadecane (2.65 g, 3.29 mmol) and K_2CO_3 (4.21 g, 32.9 mmol) were suspended in CH_3CN (250 mL). To this mixture, 3,5-bis(chloromethyl)-1-(tetrahydropyran-2-yl)-1*H*-pyrazole (820 mg, 3.29 mmol) in 150 mL was added dropwise over 2 h. The suspension was refluxed for further 20 h and then filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness. Purification was achieved by column chromatography (silica gel, chloroform/acetone = 25/1) (yield: 34%). Mp: 78–80 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.73–7.63 (m, 8H), 7.40–7.28 (m, 8H), 6.27 (s, 1H), 5.58 (dd, 1H, $J_1 = 10$ Hz, $J_2 = 2$), 4.40 (d, 1H, $J = 15$ Hz), 4.27 (d, 1H, $J = 15$ Hz), 4.12 (d, 1H, $J = 7$ Hz), 4.07 (d, 1H, $J = 7$ Hz), 3.92–3.83 (m, 1H), 3.78–3.68 (m, 1H), 3.23–2.84 (m, 12H), 2.47 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.39–2.37 (m, 2H), 1.88–1.42 (m, 10H). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 148.9, 144.3, 143.5, 138.5, 135.7, 134.6, 130.2, 129.9, 127.5, 127.4, 127.3, 100.1, 84.4, 68.4, 48.3, 48.2, 47.9, 47.8, 47.5, 30.1, 29.7, 29.6, 21.7. ESI-MS observed m/z 1003.44; calcd for $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1003.32.

3,7,11,15-Tetraaza-1(3,5)-pyrazolacyclohexadecaphane tetrahydrobromide (L1-4HBr·H₂O). 1-Tetrahydropyran-2-yl-3,7,11,15-*p*-toluensulfonyl-1(3,5)-pyrazolacyclohexadecaphane (2.64 g, 2.69 mmol) and phenol (12.18 g, 129 mmol) were suspended in $\text{HBr} \cdot \text{AcOH}$ 33% (130 mL). The mixture was stirred at 90 °C for 24 h and then cooled. The resulting residue was filtered off and washed several times with dry ethanol to give the product L1 as its pentahydrobromide salt (yield: 65%). Mp: 250–257 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ 6.84 (s, 1H), 4.42 (s, 4H), 3.23–3.17 (m, 12H), 2.15–2.07 (m, 6H). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, D_2O): δ 138.9, 109.9, 43.8, 43.5, 43.4, 22.0, 21.9. ESI-MS observed m/z 281.24; calcd for $[\text{M} + \text{H}]^+$ 281.24. Anal. Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{N}_4 \cdot 4\text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 27.18; H, 5.54; N, 13.59. Found: C, 27.0; H, 5.5; N, 13.6.

3,7,11,15-Tetraaza-3,7,11,15-p-toluensulfonyl-1-(2,6)-pyridinacyclohexadecaphane. 1,5,9,13-Tetra-(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13-tetraazatricadecane (1.5 g, 1.86 mmol) and K_2CO_3 (2.57 g, 18.6 mmol) were suspended in CH_3CN (250 mL). To this mixture was added 2,6-bis(bromomethyl)pyridine (0.49 g, 1.86 mmol) in 150 mL CH_3CN dropwise over 2 h. The suspension was refluxed for further 20 h and then filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness and the residue suspended in refluxing ethanol. Then, it was filtered to give a white solid (yield: 88%). Mp: 157–160 °C. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.62 (d, 4H, $J = 8$ Hz), 7.42–7.28 (m, 1H), 4.19 (s, 4H), 3.18 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 2.98 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 2.83 (t, 4H, $J = 7$ Hz), 2.46 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 1.61 (quin, 4H, $J = 7$ Hz), 1.09 (quin, 2H, $J = 7$ Hz). $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ 144.1, 143.9, 138.3, 135.5, 130.3, 130.2, 127.6, 127.5, 54.4, 48.9, 48.8, 48.6, 30.4, 30.2, 21.5, 21.4.

3,7,11,15-Tetraaza-1-(2,6)-pyridinacyclohexadecaphane tetrahydrobromide (L2-4HBr·2H₂O). 3,7,11,15-Tetraaza-3,7,11,15-*p*-toluensulfonyl-1-(2,6)-pyridinacyclohexadecaphane (1.78 g, 2.96

mmol) and phenol (9.4 g, 99 mmol) were suspended in HBr–AcOH (33% (100 mL). The mixture was stirred at 90 °C for 24 h and then cooled. The resulting residue was filtered off and washed several times with dry ethanol to give the product as its tetrahydrobromide salt (yield: 65%), which decomposes at 250 °C. ¹H NMR (400 MHz, D₂O): δ 7.92 (t, 1H, *J* = 8 Hz), 7.47 (d, 2H, *J* = 8 Hz), 4.53 (s, 4H), 3.3–3.39 (m, 12H), 2.15–2.30 (m, 6H). ¹³C NMR (400 MHz, D₂O): δ 150.2, 139.5, 122.9, 50.55, 44.4, 42.1, 41.9, 22.1, 19.3. ESI-MS observed *m/z* 292.2, calcd for [M + H]⁺ 292.24; observed *m/z* 314.2, calcd for [M – Na]⁺ 314.2. Anal. Calcd for C₁₆H₂₀N₂·4HBr·2H₂O: C, 29.51; H, 5.73; N, 10.76. Found: C, 29.4; H, 5.7; N, 10.6.

[Cu₂(H(LI))₂(H₂O)](ClO₄)₂·3.75H₂O (1). Crystals of 1 were grown by slow evaporation of aqueous solutions containing LI·4HBr·H₂O and Cu(ClO₄)₂·6H₂O in 1:1 mol ratio at pH 9 in an open vessel. After several days, blue crystals of 1 suitable for X-ray diffraction were obtained. Anal. Calcd for C₁₆H₂₀Cl₂Cu₂N₂O_{18.75}: C, 31.94; H, 5.98; N, 15.96. Found: C, 31.8; H, 6.1; N, 15.8.

[Cu₂(H(LI))₂(H₂O)]₂(ClO₄)₂·Br₂·4.2H₂O (2). Crystals of 2 were obtained as those of 1 but with pH of 10. Anal. Calcd for C₃₂H₄₀Br₂Cl₂Cu₄N₄O_{36.2}: C, 35.27; H, 6.20; N, 17.63. Found: C, 35.5; H, 6.2; N, 17.6.

[Cu₂(L(CO₂))₂(H₂O)]₂(ClO₄)₂·6H₂O (3). Crystals of 3 were obtained by slow evaporation of an aqueous solution containing Cu(ClO₄)₂·6H₂O and L₂·4HBr·2H₂O at pH 8 with an excess of NaClO₄. Anal. Calcd for C₁₆H₂₀Cl₂Cu₂N₂O₈: C, 34.70; H, 5.28; N, 12.64. Found: C, 34.9; H, 5.6; N, 12.7.

[Cu₂(H(LI))₂(CO₂)(H₂O)](ClO₄)₂·8H₂O (4). Crystals of 4 were grown by slow evaporation of aqueous solutions containing LI·4HBr·H₂O and Cu(ClO₄)₂·6H₂O in 2:3 mol ratio at pH 9 in an open vessel. After several days, blue crystals of 1 suitable for X-ray diffraction were obtained. Anal. Calcd for C₁₆H₂₀Cl₂Cu₂N₂O₃₂: C, 29.75; H, 6.20; N, 14.35. Found: C, 29.8; H, 6.3; N, 14.3.

Electromotive Force Measurements. The potentiometric titrations were carried out at 298.1 ± 0.1 K using NaClO₄ 0.15 M as supporting electrolyte. The experimental procedure (buret, potentiometer, cell, stirrer, microcomputer, etc.) has been fully described elsewhere.³⁵ The acquisition of the emf data was performed with the computer program PASAT.³⁶ The reference electrode was a Crison 52 40 Ag/AgCl electrode in 0.5 M NaCl solution. A Wilhelm bridge filled with 0.5 M NaCl was used to separate the glass and the reference electrode. The glass electrode (Crison 52 50 Ag/AgCl) was calibrated as a hydrogen-ion concentration probe by titration of previously standardized amounts of HCl with CO₂-free NaOH solutions and determination of the equivalent point by Gran's method,³⁷ which gives the standard potential, *E*⁰, and the ionic product of water (*pK*_w = 13.73(1)).

The computer program HYPERQUAD³³ was used to fit the protonation and stability constants. Solutions containing the ligand salts with Cu²⁺:L molar ratios varying from 2:1 to 1:2 were titrated with NaOH. In the case of the system Cu²⁺–LI nine independent titrations with Cu²⁺ concentrations ranging from 2.0 × 10^{−3} M to 1.1 × 10^{−3} M with a total of 769 experimental data points were carried out. The different titration curves for each ligand were treated as separated curves without significant variations in the values of the stability constants. Finally, the sets of data were merged together and treated simultaneously to give the final stability constants. For estimating the constant for the formation of the carbonate complexes, two titrations of solutions containing Cu²⁺, LI, and Na₂CO₃ in 3:2:3 molar ratio were performed from basic to acidic pH values. The constants for the protonation of LI and carbonate, for the formation of binary Cu²⁺–LI complexes, were introduced as fixed parameters, and then the constants for the formation of ternary Cu²⁺–LI–CO₃^{2−} complexes calculated. When more than one model fit the experimental data, the most reliable chemical model was chosen by performing *F* tests at the 0.05 confidence level.^{38,39} More details on data treatment are included in the Supporting Information.

NMR Measurements. The ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on Bruker Avance DPX 300 MHz and Bruker Avance DPX 400 MHz spectrometer operating at 299.95 and 399.95 MHz for ¹H and at 75.43 and 100.58 MHz for ¹³C. *tert*-Butyl alcohol was used

as a reference standard (δ = 1.24 ppm for ¹H and δ = 70.36 ppm for ¹³C).⁴⁰ Adjustments to the desired pH were made using drops of DCl or NaOD solutions. The pH was calculated from the measured pH values using the correlation pH = pD − 0.4.⁴¹

X-ray Analysis. Single crystals of 1 and 4 were measured in an Oxford diffraction Supernova diffractometer using Mo *K*α radiation (λ = 0.710 73 Å) at 293 and 120 K, respectively. Single crystals of 2 and 3 were measured in an Enraf Nonius Kappa CCD diffractometer using Mo *K*α radiation at 293 and 120 K, respectively. Structures were solved by direct methods using SIR97⁴² and refined by full-matrix least-squares on all *F*² using SHELXL97⁴³ with the WinGX suite.⁴⁴ The non-hydrogen atoms were refined anisotropically, and hydrogen atoms were placed in calculated positions and refined using a riding model. Table S1 summarizes crystal data and final refinement parameters. Hydrogen bonds have been analyzed with SHELXL97. Molecular drawings were produced with the MERCURY program.⁴⁵

Magnetic Susceptibility Measurements. Magnetic susceptibility measurements on polycrystalline samples of compound [Cu₂(H(LI))₂(H₂O)](ClO₄)₂·3.75H₂O were carried out in the 1.9–300.0 K temperature range with a Quantum Design SQUID magnetometer under an applied magnetic field of 5000 G. The experimental data were corrected for the diamagnetic contributions of the constituent atoms and the sample holder as well as for the temperature-independent paramagnetism of the Cu²⁺ ion (6 × 10^{−6} cm³ mol^{−1}).

Spectrometric Measurements. HR-ESI mass spectra of solutions (water/methanol 50/50 vol/vol) containing LI and Cu(ClO₄)₂·6H₂O in 1:1 and 2:3 molar ratio were acquired in the positive ion mode using a Triple TOF 5600 hybrid quadrupole time-of-flight (TOF) mass spectrometer. N₂ was used as a curtain and nebulizing gas. The experiments were performed at a voltage of 5300 V and G1 and G2 (35 ps) ion source gas at 723.15 K. The AB SCIEX Peak View software was used for the analysis of the data.

Spectroscopic Measurements. Spectra of the samples containing the ligand and the complexes in 1:1 and 2:3 molar ratio (1 × 10^{−3} M) were recorded with an Agilent 8453 spectrometer UV–vis spectra at 293.15 K.

Electron Paramagnetic Resonance Measurements. X-band EPR spectra (ν = 9.47 GHz) of the frozen-matrix aqueous solutions at 70 K and Q-band EPR spectra (ν = 34.03 GHz) of [Cu₂(H(LI))₂(CO₂)(H₂O)](ClO₄)₂·8H₂O at 9 K were recorded in nonsaturating conditions on a Bruker ER 200 D spectrometer equipped with a helium cryostat.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

CIF data, crystallographic data, distribution diagrams, UV–vis spectra, EPR spectra, ESI-mass spectra, and experimental details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: enrique.garcia-es@uv.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support by the Spanish MINECO, MECID, and FEDER funds of the E.U. (Projects CTQ2010-14892 and CONSOLIDER INGENIO 2010 CSD2010-00065) and Generalitat Valenciana (PROMETEO 2011/008) is gratefully acknowledged. The authors would like to thank Prof. K. Rissanen and G. de Munno for their help with the X-ray analysis. R.B. and J.P.-J. want to thank MECID and MINECO for their Ph.D. grants.

REFERENCES

- (1) Elguero, J. *Pyrazoles in Comprehensive Heterocyclic Chemistry II, A Review of the Literature 1982–1995*; Katritzky, A. R., Rees, C. V., Scriven, E. F. V., Eds.; Pergamon: New York, 1997; Vol. 3, pp 1–75.
- (2) Mukherjee, R. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *203*, 151–258.
- (3) Chaudhuri, P.; Kataev, V.; Bichner, B.; Klaus, H.; Kersting, B.; Meyer, F. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253*, 2261–2285.
- (4) Vlucht, J. I.; Demeshko, S.; Dechert, S.; Meyer, F. *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 1576–1585.
- (5) Prokofieva, A.; Prikhod'ko, A.; Enyedy, E.; Farkas, E.; Maringgele, W.; Demeshko, S.; Dechert, S.; Meyer, F. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 4288–4307.
- (6) Eisenwiener, A.; Neuburger, M.; Kaden, T. *Dalton Trans.* **2007**, 218–233.
- (7) Brooker, S.; Davidson, T. C.; Hay, S. J.; Kelly, R. J.; Kennepohl, D. K.; Plieger, P. G.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Bill, E.; Bothe, E. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *216*–217, 3–30.
- (8) (a) Weller, H.; Siegfried, L.; Neuburger, M.; Zehnder, M.; Kaden, T. A. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 2315–2328. (b) Eisenwiener, A.; Neuburger, M.; Kaden, T. *Dalton Trans.* **2007**, 218–233.
- (9) Brooker, S. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 2535–2547.
- (10) Brooker, S.; Davidson, T. C.; Hay, S. J.; Kelly, R. J.; Kennepohl, D. K.; Plieger, P. G.; Moubaraki, B.; Murray, K. S.; Bill, E.; Bothe, E. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *3*, 216–217.
- (11) Kaim, W. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *230*, 127–139.
- (12) Haasnoot, J. G. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200*, 131–185.
- (13) Klingele, M. H.; Brooker, S. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *241*, 119–132.
- (14) Beckmann, U.; Brooker, S. *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *245*, 17–29.
- (15) Raper, E. S. *Coord. Chem. Rev.* **1994**, *129*, 91–156.
- (16) (a) Kumar, M.; Arán, V. J.; Navarro, P. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3159–3162. (b) Kumar, M.; Arán, V. J.; Navarro, P.; Ramos-Gallardo, A.; Vegas, A. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35*, 5723–5726.
- (17) Arán, V. J.; Kumar, M.; Molina, J.; Lamarque, L.; Navarro, P.; García-España, E.; Ramirez, J. A.; Luis, S. V.; Escuder, B. J. *Org. Chem.* **1999**, *64*, 6135–6146.
- (18) Lamarque, L.; Navarro, P.; Miranda, C.; Arán, V. J.; Ochoa, C.; Escarti, F.; García-España, E.; Latorre, J.; Luis, S. V.; Miravet, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10560–10570.
- (19) Miranda, C.; Escarti, F.; Lamarque, L.; Yunta, M. J. R.; Navarro, P.; García-España, E.; Latorre, J.; Jimeno, M. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 823–833.
- (20) Noble, A.; Olgui, J.; Clérac, R.; Brooker, S. *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 4560–4569.
- (21) Escarti, F.; Miranda, C.; Lamarque, L.; Latorre, J.; García-España, E.; Kumar, M.; Arán, V. J.; Navarro, P. *Chem. Commun.* **2002**, 936–937.
- (22) Dierck, I.; Herman, G. G.; Goeminne, A. M.; Van der Kelen, G. P. *Bull. Soc. Chim. Bel.* **1993**, *102*, 63–66.
- (23) (a) Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268–2270. (b) Bencini, A.; Burguete, M. I.; Luis, S. V.; Miravet, J. F.; García-España, E.; Soriano, C. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4749–4753.
- (24) Röder, J. C.; Meyer, F.; Pritzkow, H. *Organometallics* **2001**, *20*, 811–817.
- (25) Iurrino, L.; Navarro, P.; Rodríguez-Franco, I.; Contreras, M.; Escario, J. A.; Martínez, A.; Del Rosario Pardo, M. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 445–451.
- (26) (a) Frassinetti, C.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M. S.; Vacca, A. *Anal. Biochem.* **1995**, *231*, 374–382. (b) Frassinetti, C.; Alderighi, L.; Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; Ghelli, S. *Anal. Biochem.* **2003**, *376*, 1041–1052. (c) Dagnall, S. P.; Hague, D. N.; McAdam, M. E.; Moreton, A. D. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1985**, *81*, 1483–1494. (d) Hague, D. N.; Moreton, A. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, *2*, 265–270.
- (27) Fernandes, A. S.; Cabral, M. F.; Costa, J.; Castro, M.; Delgado, R. *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 410–419.
- (28) Díaz, P.; García Basallote, M.; Mañez, M. A.; García-España, E.; Gil, L.; Latorre, J.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Luis, S. V. *Dalton Trans.* **2003**, 1186–1193.
- (29) Addison, A. W.; Rao, T. N.; Reedijk, J.; van Rijn, J.; Verschoor, G. C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1984**, *7*, 1349–1356.
- (30) Miranda, C.; Escarti, F.; Lamarque, L.; García-España, E.; Navarro, P.; Latorre, J.; Lloret, F.; Jiménez, H. R.; Yunta, M. J. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 189–208.
- (31) (a) Hanot, V. P.; Robert, T. D.; Kolnaar, J.; Haasnoot, Reedijk, H. K.; Spek, L. J. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 4275–4281. (b) Teichgraber, J.; Leibeling, G.; Dechert, S.; Meyer, F. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2005**, *631*, 2613–2618. (c) Singh, A. K.; van der Vlucht, J. I.; Demeshko, S.; Dechert, S.; Meyer, F. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 3431–3439.
- (32) Díaz, P.; García Basallote, M.; Mañez, M. A.; García-España, E.; Gil, L.; Latorre, J.; Soriano, C.; Verdejo, B.; Luis, S. V. *Dalton Trans.* **2003**, 1186–1193.
- (33) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- (34) Aguilar, J. A.; Díaz, P.; Escarti, F.; García-España, E.; Gil, L.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *39*, 307–316.
- (35) García-España, E.; Ballester, M. J.; Lloret, F.; Moratal, J. M.; Faus, J.; Bianchi, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1988**, 101–104.
- (36) Fontanelli, M.; Micheloni, M. *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes*; Diputación de Castellón, Castellón, Spain, 1990.
- (37) (a) Gran, G. *Analyst* **1952**, *77*, 661–671. (b) Rossotti, F. J.; Rossotti, H. *J. Chem. Educ.* **1965**, *42*, 375–378.
- (38) Hamilton, W. C. *Statistics in Physical Chemistry*; The Roland Press Co.: New York, 1964.
- (39) Bologni, L.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Inorg. Chim. Acta* **1983**, *69*, 71–75.
- (40) Gottlieb, H. E.; Kotlyar, V.; Nudelman, A. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- (41) Covington, A. K.; Paabo, M.; Robinson, R. A.; Bates, R. G. *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–706.
- (42) Giacovazzo, C. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 115–119.
- (43) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr., Sect. A* **2008**, *64*, 112–122.
- (44) Farrugia, L. J. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, *32*, 837–838.
- (45) Macrae, C. F.; Bruno, I. J.; Chisholm, J. A.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Rodríguez-Monge, L.; Taylor, R.; van de Streek, J.; Wood, P. A. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, *41*, 466–470.

Cite this: *Dalton Trans.*, 2013, 42, 11194

Homo- and heterobinuclear Cu²⁺ and Zn²⁺ complexes of abiotic cyclic hexaazapyridinocyclophanes as SOD mimics†

Raquel Belda,^a Salvador Blasco,^a Begoña Verdejo,^{*a} Hermas R. Jiménez,^b Antonio Doménech-Carbó,^c Conxa Soriano,^a Julio Latorre,^d Carmen Terencio^e and Enrique García-España^{*a}

The new receptor 3,7,11,15,19,23-hexaaza-1(2,6)-pyridinacyclotetracosaphane (**L1**) containing a complete sequence of propylenic chains has been synthesised. The acid–base behaviour and Cu²⁺ and Zn²⁺ coordination have been analysed by potentiometric measurements in 0.15 M NaClO₄ for **L1** and for the related compounds 3,7,11,14,18,22-hexaaza-1(2,6)-pyridinacyclotricosaphane (**L2**), 3,7,10,13,16,20-hexaaza-1(2,6)-pyridinacycloheicosaphane (**L3**) and 3,7,10,12,15,19-hexaaza-1(2,6)-pyridinacycloicosaphane (**L4**). The crystal structure of [(CuH₂L2)(H₂O)](ClO₄)₂·3H₂O shows an interesting combination of a metal ion coordinated by the pyridine nitrogen atom and the adjacent amine groups of the chain, and a perchlorate anion sitting at the middle of the site defined by the remaining four protonated ammonium groups of **L1**. Paramagnetic NMR data suggest that imidazole coordinates to the Cu²⁺ ions as a bridging ligand in a wide pH range. SOD activity for Cu²⁺–Cu²⁺ and Cu²⁺–Zn²⁺ complexes with **L1–L4** have been measured by NBT assays at pH 7.4, obtaining some of the lowest values so far reported for SOD mimics. SOD activity has also been checked by chemiluminescence assays using polymorphonuclear leukocytes (PMNLs).

Received 17th April 2013,
Accepted 30th May 2013
DOI: 10.1039/c3dt51012c
www.rsc.org/dalton

Introduction

Human diseases such as myocardium infarction or Parkinson's disease are associated with the presence of oxidative agents such as hydrogen peroxide or superoxide anions formed as a consequence of aerobic metabolism. Protective enzymes like superoxide dismutases (SODs), a family of oxidoreductases containing Cu/Zn (SOD1 and SOD3) or Mn (SOD2) at their active centers, act as an important antioxidant defence catalyzing superoxide dismutation into hydrogen peroxide and

molecular oxygen. Hydrogen peroxide is then removed by the concerted action of catalase-type enzymes (CAT).^{1,2}

While under normal conditions superoxide radicals are trapped by SODs present at cellular mitochondria, plasma or extracellular spaces, the control of the free radical flow coming from O₂ chemistry can be problematic when excessive amounts of superoxide anion are produced. Therefore, the design and synthesis of molecules able to mimic SOD activity is a research topic of current interest both from academic and pharmaceutical points of view. For these reasons, since the pioneering work of Lippard *et al.*³ with Cu–Cu and Cu–Cu–imidazole polyamine complexes, a great deal of work has been done in this area.⁴

One recurrent feature in metal sites of enzymes is their coordinative unsaturation that permits the approach and binding of the target substrate to the metal center. In this respect, some polyazacyclophane receptors with different polyamine chains containing up to six nitrogen atoms and different aromatic spacers, such as benzene, pyridine or terpyridine, have been synthesized in our group during the last few years.⁵ Although these receptors have been proved to be able to bind simultaneously two metal ions, the low number of nitrogen donors in the receptor prevents the coordination spheres of the metal from being filled giving rise to unsaturated coordination spheres. These arrangements are favourable

^aInstituto de Ciencia Molecular, C/Catedrático José Beltrán no. 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain. E-mail: enrique.garcia-es@uv.es

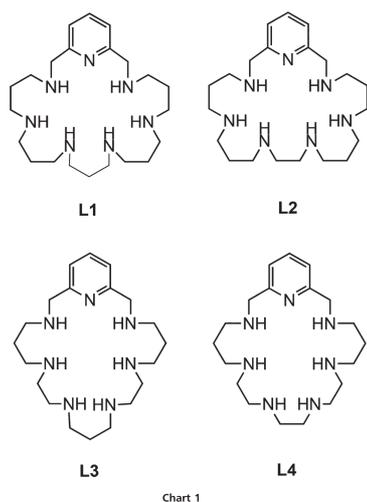
^bDepartamento de Química Inorgánica, Universidad de Valencia, C/Dr Moliner 50, 46100 Burjassot/Valencia, Spain

^cDepartamento de Química Analítica, Universidad de Valencia, C/Dr Moliner 50, 46100 Burjassot/Valencia, Spain

^dInstituto de Materiales, C/Catedrático José Beltrán no. 2, 46980 Paterna, Valencia, Spain

^eDepartamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universitat de València, Av. Vicent Andrés Estellés s/n 46100, Burjassot/Valencia, Spain

†Electronic supplementary information (ESI) available. CCDC 934155. For ESI and crystallographic data in CIF or other electronic format see DOI: 10.1039/c3dt51012c



for the recognition and/or activation of additional guests as exogen ligands in mixed complexes. An example of this behaviour is the recognition of imidazolite as a bridging ligand by a binuclear complex of a terpyridinophane receptor.^{4g}

Within this context, here we report the synthesis and characterization of the new receptor 3,7,11,15,19,23-hexaaza-1(2,6)-pyridinacyclotetracosaphane (**L1**) (see Chart 1). **L1** meets the above mentioned characteristics being able to incorporate two metal ions with coordinatively unsaturated coordination sites.

With the aim to study the ability of the Cu^{2+} and $\text{Cu}^{2+}\text{-Zn}^{2+}$ complexes of ligands **L1-L4** as SOD mimics, we have analysed the Cu^{2+} and Zn^{2+} coordination behaviour of the new receptor, along with the Zn^{2+} coordination chemistry of **L2-L4** and the formation of mixed $\text{Cu}^{2+}\text{-Zn}^{2+}$ complexes by **L1**.^{5a,6} These studies have been conducted by means of potentiometric, electrochemistry and paramagnetic NMR techniques. The SOD activity of the complexes has been checked either by the nitro blue tetraazolum (NBT) or by the chemiluminescence polymorphonuclear leukocytes (PMNL's) *in vitro* methods. Some of the IC_{50} values obtained rank among the lowest so far reported in the literature for SOD mimics.

Results and discussion

Protonation studies

The protonation constants of receptor **L1** calculated by pH-metric titration along with those previously reported for **L2-L4**

are presented in Table 1. The distribution diagram for **L1** is shown in Fig. S1 of the ESI.†

These ligands follow the typical protonation behaviour usually found for cyclic amines based on charge density considerations and minimization of repulsions between ammonium groups.⁷ In this respect, while the first five protonation constants of receptor **L1** are close to those previously reported for **L2**,^{5a} the value obtained for the last protonation constant of **L1** is slightly higher. This can be ascribed to the presence of a further propyl chain in **L1**, which increases the separation between charged centres at this stage. The alternate sequence of ethylenic and propyl chains of **L3** promotes a decrease in basicity already in the fifth protonation step.⁸ Similar reasoning explains the slightly higher fifth protonation constant and the remarkable higher last protonation constant of **L1** in comparison with **L4**, which presents three ethylenic central chains^{5a} (see Table 1).

Cu^{2+} complexation

The equilibrium constants for the formation of Cu^{2+} complexes of **L1** determined by potentiometric titration are presented in Table 2. The values for the related pyridinophanes **L2**, **L3** and **L4** have also been included for comparison.

L1 forms $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2-x)+}$ mononuclear complexes with $x = 0-4$ as well as the binuclear species $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ and $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$. The distribution diagram shows that for a 1 : 1 Cu^{2+} : L molar ratio only mononuclear species are present in solution throughout the pH-range covered in the studies (2.5–11.0) (Fig. 1A). Although deriving coordination numbers just from free energy

Table 1 Stepwise protonation constants of **L1-L4** determined at 298.1 ± 0.1 K in 0.15 M NaClO_4

Entry	Reaction ^a	L1	L2 ^c	L3 ^d	L4 ^e
1	$\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{LH}$	10.67(2) ^b	10.67(1)	9.82(2)	10.04(2)
2	$\text{HL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}$	9.41(1)	9.85(1)	9.38(2)	9.43(2)
3	$\text{H}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}$	8.24(5)	8.60(1)	8.28(2)	8.45(2)
4	$\text{H}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L}$	7.35(7)	7.49(1)	7.35(2)	7.53(2)
5	$\text{H}_4\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}$	6.98(9)	7.12(1)	5.83(3)	5.89(2)
6	$\text{H}_5\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_6\text{L}$	5.87(2)	4.99(2)	4.66(4)	2.83(3)

^a Charges omitted. ^b Numbers in parentheses are standard deviations in the last significant figure. ^c Taken from ref. 5a. ^d Taken from ref. 6.

Table 2 Logarithms of the equilibrium constants for the interaction of Cu^{2+} with **L1-L4** determined at 298.1 ± 0.1 K in 0.15 M NaClO_4

Entry	Reaction ^a	L1	L2 ^c	L3 ^d	L4 ^e
1	$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	17.22(6) ^b	18.34(3)	20.38(2)	19.29(3)
2	$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	9.75(3)	9.53(3)	8.24(2)	9.64(3)
3	$\text{CuHL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	7.44(2)	7.56(3)	7.35(2)	6.71(2)
4	$\text{CuH}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$	6.13(2)	4.65(2)	3.07(2)	3.36(2)
5	$\text{CuH}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}$	3.82(2)	4.69(2)	—	—
6	$\text{Cu} + \text{CuL} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	7.96(6)	11.69(3)	10.10(2)	10.92(3)
7	$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	-7.21(6)	-7.72(3)	-7.37(2)	-10.07(4)

^a Charges omitted. ^b Numbers in parentheses are standard deviations in the last significant figure. ^c Taken from ref. 5a. ^d Taken from ref. 6.

terms can be highly misleading, comparisons of the stability constants of **L1** with those of the related ligands **L2–L4** previously studied and with other systems suggest at least three as the number of nitrogen atoms tightly bound to Cu^{2+} . In view of previous structures and taking into account the UV-Vis spectral changes produced when varying the pH of a solution containing Cu^{2+} and **L1** in a 1:1 molar ratio it is reasonable to assume that one of such atoms would be the pyridine nitrogen and the other two would come from the polyamine chain. Similar to **L2** (Fig. 1B), the absorption peaks associated with the d-d band in the visible region and the pyridine band in the UV region reach their maximum intensity as soon as the first protonated complex $[\text{CuH}_2\text{L}]^{2+}$ is formed, remaining constant above pH 4 (Fig. 1A). In agreement with previously reported studies for **L2–L4**, the pyridine moiety should act as an anchorage point for the metal.^{26a} Therefore, several nitrogen atoms are either uncoordinated or weakly coordinated to the metal prone to bear protonation processes. This is reflected in the first three protonation constants of $[\text{CuL}]^{2+}$ (entries 2–4 in Table 2), which display values that are, in some cases, even higher than the stepwise protonation constants of the free receptor at the stages at which both reactions display the same charges (for instance $[\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuHL}]^{2+}$, $\log K = 9.75(3)$ with $\text{H}_2\text{L}^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^{3+}$, $\log K = 8.24(5)$, entries 3–5 in Table 1 and 2–4 in Table 2).

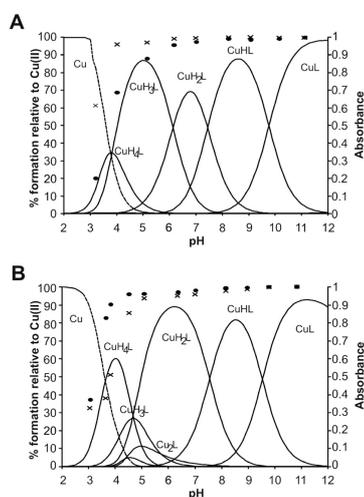


Fig. 1 Distribution diagram for the system (A) Cu^{2+} -**L1** and (B) Cu^{2+} -**L2**; $[\text{Cu}^{2+}] = [\text{L}] = 10^{-3}$ M. UV-Vis spectroscopic parameters absorbance (● and x) are overlaid. (A) (x) 300 nm, (●) 600 nm; (B) (x) 305 nm, (●) 590 nm.

The existence of complexes with high protonation degrees is supported by the preparation of crystals of a tetraprotonated Cu^{2+} complex of **L2** suitable for X-ray diffraction. As far as we know this constitutes the first X-ray structure solved for a hexaazacyclophane receptor with these characteristics. Crystals of $[\text{CuH}_4\text{L}_2(\text{ClO}_4)_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ were obtained by slow evaporation of solutions containing **L2** and $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ in a 1:1 Cu^{2+} :**L** molar ratio at pH 4 (Fig. 2). The asymmetric unit contains $[\text{Cu}(\text{H}_4\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{2+}$ cations, perchlorate counter-anions and lattice water molecules. The coordination geometry of Cu^{2+} is an axially elongated square pyramidal (see Fig. 2) with the equatorial positions occupied by the pyridine nitrogen atom (Cu-N1 1.909(7) Å), the benzylic nitrogen atoms (Cu-N2 2.063(7) Å, Cu-N7 2.043(8) Å) and an oxygen atom of a water molecule (Cu-O1 1.966(6) Å). The elongated axial position is occupied in the solid state by an oxygen atom of a perchlorate anion (Cu-O11 2.338(7) Å). The Cu^{2+} site is placed 0.12 Å above the equatorial plane defined by the donor atoms. The plane defined by the ammonium groups and the coordinated benzylic nitrogens is almost normal to the plane of the pyridine ring (84°) with a sort of L-shaped conformation.

Table 3 presents a selection of bond distances and angles. In agreement with the presence of highly protonated mononuclear species inferred from the potentiometric studies (Table 2), the four nitrogen atoms of the polyamine chain not involved in the coordination to the metal remain protonated. One perchlorate anion sits at this positively charged side of the molecule. Apart from interacting electrostatically with all the ammonium groups, this perchlorate anion forms a hydrogen bond with one of the ammonium groups (N3-H3C...O31 2.16 Å) and a bifurcated hydrogen bond with the coordinated water molecule (O1-H1WB...O32 2.21 Å) and one of the coordinating NH groups (N7-H7...O32 2.37 Å) (Fig. 3).

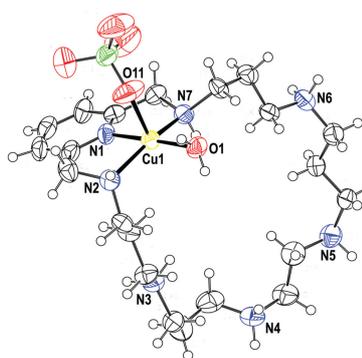


Fig. 2 ORTEP drawing of the cation $[\text{Cu}(\text{H}_4\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{2+}$. Thermal ellipsoids are drawn at the 50% probability level.

Table 3 Selected bond lengths (Å) and angles (°) for the compound $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3(\text{H}_2\text{O})$

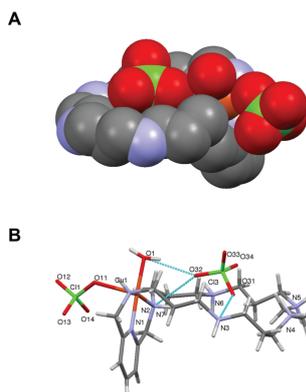
Selected distances/Å		Selected angles/°			
Cu1–O1	1.966(6)	O1–Cu1–O11	84.8(3)	N1–Cu1–N7	82.5(3)
Cu1–O11	2.338(7)	N7–Cu1–O11	111.6(3)	O1–Cu1–N7	96.3(3)
Cu1–N1	1.909(7)	N1–Cu1–O11	97.4(3)	N1–Cu1–N2	82.7(3)
Cu1–N2	2.063(7)	N2–Cu1–O11	87.7(3)		
Cu1–N7	2.043(8)	O1–Cu1–N2	98.0(3)		

Another aspect that deserves to be pointed out is the lower stability constant that $[\text{CuL}_1]^{2+}$ has in comparison with the analogous complexes of **L2–L4**. Although all these receptors have the same number of nitrogen atoms, the steric hindrance afforded by the binding to the metal is minimized for **L2–L4** due to the formation of five and six-membered chelate rings. In fact, an analysis of binding constant values with polyamine ligands having different aliphatic chains previously reported indicates that the less stable complexes are formed with ligands having a sequence of just propylenic chains which give rise to six-membered chelate rings, and the most stable ones with ligands affording an alternate sequence of five- and six-membered rings as occurs in the case of **L3**.⁸

The distribution diagram calculated for a 2 : 1 Cu^{2+} : L molar ratio shows that the binuclear species $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ and $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ start to prevail in solution above pH 6, being $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ predominant over pH 7.5 (Fig. S3†). The introduction of a second metal ion in **L1** is accompanied by an important decrease in the stepwise formation constant in comparison with the hexazaapyridinophane ligands **L2–L4** (entry 6 in Table 2), which can be again explained by the hydrocarbon chain sequence of **L1**, which have a worse bite angle to Cu^{2+} . Analogous to **L2** and **L3**, the high propensity of the $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ to hydrolyze (entry 7 in Table 2) suggests the formation of a hydroxo bridge between the two metal centres.

Zn²⁺ complexation

Table 4 presents the equilibrium constants determined for the formation of Zn^{2+} complexes of **L1** and its related pyridinophanes **L2–L4**. For a 1 : 1 Zn^{2+} : L molar ratio, $[\text{ZnH}_2\text{L}]^{2+}$

**Fig. 3** (A) Space-fill representation of $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{4+}$. (B) H-bond network in $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L}_2)(\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)]^{3+}$.

mononuclear species with protonation degrees varying from 2 to –1 have been detected in all cases, while for **L2** and **L4** a tri-protonated $[\text{ZnH}_3\text{L}]^{5+}$ species was additionally identified. As expected, the values of the constants obtained are lower than those obtained for the Cu^{2+} complexes and remain less affected by the sequence of ethylenic and propylenic chains present in the structure of **L1–L4**.⁸ As occurred for Cu^{2+} , the number of protonated species and high values of the protonation constants (entries 2–4 in Table 4) suggest that such processes involved uncoordinated nitrogen atoms.

For a 2 : 1 Zn^{2+} : L molar ratio, $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$, $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ and $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$ species have been observed for **L2** and **L4**. However, for **L1** only binuclear mono- and bishydroxylated species were detected probably due to a lower stability of the $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$ neutral binuclear species which readily hydrolyzes as shown in the distribution diagrams shown in Fig. S4.† Finally,

Table 4 Logarithms of the stability constants for the formation of Zn^{2+} complexes with the receptors **L1–L4** determined at 298.1 ± 0.1 K in 0.15 M NaClO_4

Entry	Reaction ^a	L1	L2	L3	L4
1	$\text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{ZnL}$	10.32(4) ^b	10.76(4)	10.80(3)	10.75(4)
2	$\text{ZnL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{ZnHL}$	8.24(4)	9.28(3)	8.42(3)	9.33(3)
3	$\text{ZnLH} + \text{H} \rightleftharpoons \text{ZnH}_2\text{L}$	6.99(3)	6.65(6)	7.11(2)	6.50(7)
4	$\text{ZnLH}_3 + \text{H} \rightleftharpoons \text{ZnH}_4\text{L}$	—	6.97(4)	—	7.15(5)
5	$\text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ZnL}(\text{OH}) + \text{H}$	0.21(6)	0.005(5)	0.98(4)	–0.10(5)
6	$\text{ZnL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ZnL}(\text{OH}) + \text{H}$	–10.11(7)	–10.75(7)	–9.82(5)	–10.85(7)
7	$2\text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}$	—	15.69(5)	14.47(7)	15.57(7)
8	$\text{ZnL} + \text{Zn} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}$	—	4.93(6)	3.67(8)	4.79(7)
9	$2\text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	6.36(6)	8.10(2)	—	8.09(2)
10	$2\text{Zn} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}$	–2.03(1)	–1.80(3)	–0.84(3)	–1.80(3)
11	$\text{Zn}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})$	—	–7.59(5)	—	–7.48(5)
12	$\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2$	–8.39(6)	–9.90(3)	—	–9.89(4)

^a Charges omitted. ^b Numbers in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

for **L3** a constant for a monohydroxylated species could not be derived from the emf data. Similar to Cu^{2+} the high values of the first hydrolytic step of the binuclear complex could be supporting the coordination of hydroxide as a bridging ligand between the metal centers.

Cu^{2+} - Zn^{2+} mixed complexes

Owing to the presence of these two metal ions in the CuZn -SOD active site, heterobinuclear complexes Cu^{2+} - Zn^{2+} -**L** systems have been studied. However, due to the complexity of these systems (a high number of constants, overlapping equilibria, etc.; see the Experimental section for a description of the procedure followed) we have limited our studies to **L1** and **L2** (Table 5). As can be seen in the distribution diagrams (see Fig. 4) for receptor **L2**, Cu^{2+} - Zn^{2+} mixed hydroxylated species $[\text{CuZnL}(\text{OH})]^{3+}$ and $[\text{CuZnL}(\text{OH})_2]^{2+}$ prevail in solution above pH 8. However, for receptor **L1** the predominant one is $[\text{CuZnL}(\text{OH})_2]^{2+}$.

Paramagnetic ^1H NMR studies

The electronic structure and the coordination characteristics of the binuclear Cu^{2+} - Cu^{2+} complexes with receptors **L1** and **L2**, and its interaction with the imidazole ligand have been analyzed by means of paramagnetic nuclear magnetic resonance. We have recorded the paramagnetic ^1H NMR spectra, measured the longitudinal and transversal relaxation times, T_1 and T_2 , and analyzed the temperature dependence of the hyperfine-shifted resonances.

The ^1H NMR spectrum of the system $\text{Cu}_2\text{L1}$ in D_2O at pH 7.0 displays, in the downfield region, two well resolved isotropically shifted signals (a, b). Additionally, this spectrum shows four signals (c-f) shifted upfield (Fig. 5B). The hyperfine-shifted resonances, linewidths at half-height, longitudinal relaxation time values (T_1) and assignments are included in Table 6 and Scheme 1A. Although $\text{Cu}_2\text{L1}$ shows a similar pattern of chemical shifts with $\text{Cu}_2\text{L2}$,^{3c} it presents some differences (Fig. S5†): $\text{Cu}_2\text{L1}$ has a greater number of isotropically shifted $\alpha\text{-CH}_2$ and $\beta\text{-CH}_2$ protons and higher longitudinal relaxation times (T_1) than $\text{Cu}_2\text{L2}$. This behaviour can be interpreted as being due to a change in the coordination site of the copper ions and therefore in the characteristic of the spin-coupled binuclear copper system.

The analysis of the ^1H NMR spectrum of the ternary complex $\text{Cu}_2\text{L1}$ -Im for a 1:2 molar ratio in D_2O at pH 7.0 shows a new signal (g' , Fig. 5A). The broad signal g' at

Table 5 Logarithms of the stability constants for the formation of Cu^{2+} and Zn^{2+} complexes with the receptors **L1** and **L2** determined at 298.1 \pm 0.1 K in 0.15 M NaClO_4

Entry	Reaction ^a	L1	L2
1	$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuZnHL}$	30.23(6) ^b	—
2	$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuZnL}$	—	23.26(9)
3	$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{OH}) + \text{H}$	14.55(3)	18.57(2)
4	$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{OH})_2 + 2\text{H}$	6.24(3)	5.34(6)

^a Charges omitted. ^b Numbers in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

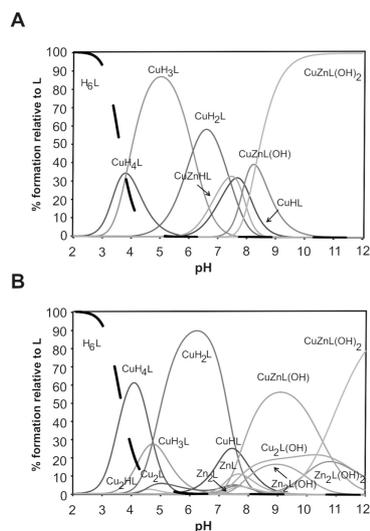


Fig. 4 Distribution diagram for the ternary systems: (A) Cu^{2+} - Zn^{2+} -**L1** and (B) Cu^{2+} - Zn^{2+} -**L2**. $[\text{Cu}^{2+}] = [\text{Zn}^{2+}] = [\text{L}] = 10^{-3}$ M.

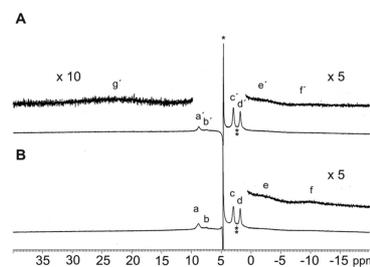
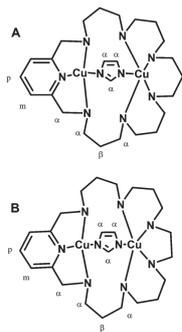


Fig. 5 400 MHz proton NMR spectra in D_2O at 298 K of (A) $\text{Cu}_2\text{L1}$ -Im at pH 7.5 and (B) $\text{Cu}_2\text{L1}$ at pH 7.0. In the downfield and upfield regions, the intensity of the spectrum is multiplied by five or ten. The asterisks mark the residual solvent and impurity signals (*, H_2O ; **, HDO).

20.0 ppm for the imidazolite ligand protons can be assigned on the basis of the longitudinal relaxation times and of the integrated protons (see Table 6 and Scheme 1A). These results show the formation of the ternary complexes ($\text{Cu}_2\text{L1}$ -Im, 1:1)

Table 6 ^1H NMR hyperfine-shifted resonances of $\text{Cu}_2\text{L1}$, $\text{Cu}_2\text{L1-Im}$ complexes in D_2O at 298 K and pH 7.0

Syst.	Sig.	δ (ppm)	No. of protons	Assign.	Temperature dependence	T_1 (ms)	$\Delta\nu_{1/2}$ (Hz)	T_2^a (ms)
$\text{Cu}_2\text{L1}$	a	8.8	10	βCH_2	Anti-Curie	3.8	230	1.4
	c	2.9			Anti-Curie	9.1	160	2.0
	d	1.8	3	Hm,p-Py	Anti-Curie	8.5	132	2.4
	b	7.5	24	αCH_2	Anti-Curie	<1	~370	~0.86
	e	-2.0			Curie	<1	1209	0.26
	f	-9.9			Curie	<1	1279	0.25
$\text{Cu}_2\text{L1-Im}$	a'	8.8	10	βCH_2	Anti-Curie	3.3	179	1.8
	e'	3.0			Anti-Curie	8.4	102	3.1
	d'	1.8	3	Hm,p-Py	Anti-Curie	8.4	96	3.3
	b'	7.5	24	αCH_2	Anti-Curie	<1	~324	~0.98
	e''	-1.8			Curie	<1	1194	0.27
	f'	-10.0			Curie	<1	1313	0.24
	g'	20.0	3	$\alpha\text{CH-Im}$	Curie	<1	3821	0.08

^a Measured from the linewidth at half-height.**Scheme 1** (A) $\text{Cu}_2\text{L1-Im}$. (B) $\text{Cu}_2\text{L2-Im}$.

in which the imidazole ligand is coordinated as a bidentate bridge ligand, Cu–N–N–Cu. In addition, the values of the proton linewidths at half-height are relatively smaller in comparison with the $\text{Cu}_2\text{L1}$ system. This is in accordance with the coordination of one imidazole bridge ligand that implies increases of the degree of spin-coupling in the binuclear copper system, in a similar way to the previously reported binuclear complex of a terpyridinophane receptor, which presents similar T_1 (<1 ms) and $\Delta\nu_{1/2}$ (5969 Hz) values in comparison with those of the $\text{Cu}_2\text{L1-Im}$.^{4g}

When the spectrum of the ternary complex $\text{Cu}_2\text{L2-Im}$ for a 1 : 2 molar ratio is recorded in D_2O at pH 7.0, the spectrum shows a similar pattern of chemical shifts as $\text{Cu}_2\text{L2}$ (Fig. S5B[†]), but a new signal (e') appears (Fig. S5A[†]). The assignments of the isotropically shifted signals by means of the integration of signals, and the longitudinal relaxation times (T_1) of the paramagnetic signals are reported here (see Table S2[†]). Additionally, as can be observed in Table S2[†] the longitudinal relaxation times in the $\text{Cu}_2\text{L2-Im}$ are higher in

comparison with those of the dimer $\text{Cu}_2\text{L2}$. The magnitude of T_1 values of the $\beta\text{-CH}_2$ and Hm,p-Py protons follows the order $\text{Cu}_2\text{L2} < \text{Cu}_2\text{L2-Im}$ (pH = 7.0). This ordering is in accordance with the coordination of the imidazole ligands that implies increases of magnetic exchange. These results indicate the presence of at least one imidazole ligand coordinated as a bidentate ligand, Cu–N–N–Cu (see Scheme 1B).

On the other hand, variable temperature ^1H NMR spectra of ternary complexes were registered from 283 to 323 K. Isotropically shifted signals are temperature dependent and follow an anti-Curie behaviour excepting some signals belonging to $\alpha\text{-CH}_2$ protons of the macrocyclic receptor that show Curie behaviour; thus the paramagnetically shifted signals decrease with increasing temperature. The existence of anti-Curie behaviour (see Tables 6 and S2[†]) is indicative of the spin-coupled binuclear copper systems with antiferromagnetic coupling.^{4g,5c}

Electrochemistry

One of the most important chemical aspects in order to mimic the SOD function (catalysis of superoxide anion dismutation) is the reduction potential for the different receptors at physiological pH that has to be intermediate between -0.33 V ($\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$) (redox potential relative to 1 mol of O_2 dm⁻³, $E_0(\text{O}_2(\text{aq})/\text{O}_2^{\cdot-}) = -0.16$ V) and 0.89 V ($\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$).⁹ In order to obtain this information, the electrochemistry of the $\text{Cu}^{2+}\text{-L}$ and $\text{Cu}^{2+}\text{-Zn}^{2+}\text{-L}$ systems has been studied at different pH values with concentrations at the millimolar level. For the binuclear complex $\text{Cu}_2\text{L1}$, above pH 7.0 where predominates the $\text{Cu}_2\text{L1}(\text{OH})$ species, CVs consist of two reduction peaks at -0.22 and -0.48 V with anodic counterparts at -0.38 and 0.0 V. The first cathodic peak can be attributed to the reduction of Cu^{2+} to Cu^+ , as clearly shown by peak current function values of ca. $600 \mu\text{A cm}^{-2} \text{V}^{-1/2} \text{s}^{1/2} \text{mM}^{-1}$, corresponding to a one electron-per-Cu transfer. This suggests that the first reductive step corresponds to an overall 2-electron reduction where the two copper centres behave independently. The variation of the peak potential and peak current with the potential scan rate suggests that there is some complex pre-dissociation preceding the electron transfer process. The anodic peak at less negative

potentials exhibits a typical high profile, characteristic of the stripping oxidation of deposits of copper metal, thus showing that in the second electron transfer, metallic copper is formed. This voltammetry is essentially unchanged upon addition of imidazole as can be seen in Fig. 6.

The CVs of the heterobinuclear complex CuZnL1 system display, at pH values between 6.0 and 8.5, two cathodic waves at -0.40 and -0.60 V followed by anodic counterparts at -0.38 and 0.00 V (see Fig. 7A). This voltammetry, which can be described in terms of two successive one-electron reduction processes corresponding to the stepwise reduction of Cu^{2+} to Cu^+ and Cu^0 , moves to an apparently direct two-electron reduction in the presence of imidazole (Fig. 7B). At pH values higher than 8.5 (see Fig. 7C and 7D), where $\text{CuZnL1}(\text{OH})_2$ predominates, CVs show only one reversible couple at a midpoint potential of -0.45 V with a peak current function of $685 \mu\text{A cm}^{-2} \text{V}^{-1/2} \text{ s}^{1/2} \text{ mM}^{-1}$. This couple is accompanied in the anodic region of CVs by additional weak oxidation peaks at -0.15 and $+0.55$ V. This response is essentially unchanged upon addition of imidazole. The response at neutral and

weakly acidic pHs can be interpreted in terms of two successive one-electron reductions of the Cu^{2+} centre whereas at high pH values, as well as upon addition of imidazole, the electrochemical pathway can be explained by a direct two-electron reduction of the copper centre, suggesting that the electronic communication between the metal centres is blocked.

All the studied systems present a similar behaviour, displaying a first quasi-reversible one-electron reduction step. Assuming that $\text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L}$ and $\text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_x\text{L}$ complexes are formed at a given pH, the measured midpoint potentials can be regarded as apparent formal electrode potentials for the $\text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L}/\text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_x\text{L}$ couple. Collected data in Table 7 reveal that there is no evident correlation between the SOD activities and the apparent formal electrode potentials. However, a correlation can be established between the SOD activities and the equilibrium constant for the disproportionation process $2\text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_x\text{L} \rightarrow \text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L} + (x-y)\text{H}^+ + \text{Cu}^0$ (charge of complexes omitted), K_{dis} , that can be calculated from voltammetric data as previously described,¹⁰ considering that the first electron transfer step behaves reversibly. Assuming that a Cu^+ complex of stoichiometry $\text{Cu}_m^{\text{I}}\text{H}_x\text{L}$ is formed, its stability constant, β_1 , can be calculated from the corresponding value for the $\text{Cu}_m^{\text{II}}\text{H}_x\text{L}$ complex, β_{11} , determined from potentiometric data, and the formal electrode potential of the $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ couple, $E^\circ(\text{II/I})$, determined from voltammetric data, by means of the relationship (mV at 298 K)

$$\log \beta_1 = \log \beta_{11} + m[E^\circ(\text{II/I}) - E^\circ(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+)]/59 + (y-x)\text{pH} \quad (1)$$

where $E^\circ(\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+)$ denotes the standard potential for the $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$ couple (equal to $+159$ mV vs. NHE) in a

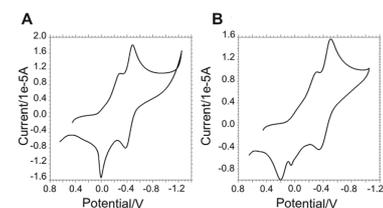


Fig. 6 CVs at GCE for: (A) 1.59×10^{-3} M $\text{Cu}_2\text{L1}$; (B) *id.* plus 1.60×10^{-3} M imidazole in 0.15 M NaClO_4 at pH 7.0. Potential scan rate 50 mV s^{-1} .

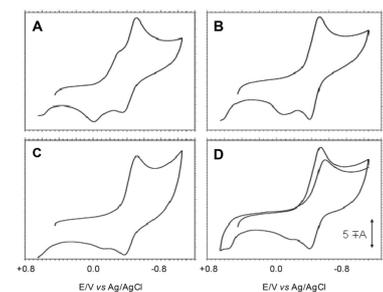


Fig. 7 CV at GCE for: (A) 1.19×10^{-3} M CuZnL1 , pH 7.4; (B) *id.* plus 1.20×10^{-2} M imidazole, pH 7.4; (C) 1.19×10^{-3} M CuZnL1 , pH 8.6; (D) *id.* pH 9.5. Electrolyte: 0.15 M NaClO_4 at the potential scan rate 50 mV s^{-1} .

Table 7 SOD activity for receptors L1–L4 obtained by the McCord–Fridovich test and examples reported from the literature¹²

System	$\text{IC}_{50}/\mu\text{M}$	$k_{\text{cat}}/10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	E°/mV	$\log K_{\text{dis}}$
$\text{Cu}_2\text{L1}$	0.11 (2)	27.00	-80	-3.72
$\text{Cu}_2\text{L2}$	1.2 (2)	2.37	-150	1.53
$\text{Cu}_2\text{L3}$	0.22 (4)	13.50	-250	-1.12
$\text{Cu}_2\text{L4}$	0.24 (1)	12.50	-250	-0.03
CuZnL1	0.5 (2)	5.94	-300	0.73
CuZnL2	0.22 (3)	13.0	-380	
CuZnL3	2.2 (2)	1.34	-60	
CuZnL4	1.7 (3)	1.75	-220	
$\text{Cu}_2\text{L1Im}$	0.25(5)	11.88	+90	
$\text{Cu}_2\text{L2Im}$	0.27(5)	11.00	-400	
$\text{Cu}_2\text{L3Im}$	0.24(6)	12.37	+80	
$\text{Cu}_2\text{L4Im}$	0.4(1)	7.42	-100	
CuZnL1Im	0.36(9)	8.25	-210	
CuZnL2Im	0.73(4)	4.07	-260	
CuZnL3Im	4.9(2)	0.65	-460	
CuZnL4Im	3.3(3)	0.90	-240	
$\text{Cu}_2(\text{bpbziap})\text{Cl}_3^{\text{a}}$	0.25	11.9	-390	
$\text{Cu}_2(\text{bdpi})^{\text{b}}$	0.32	81.2	-110	
$\text{CuZn}(\text{bdpi})$	0.24	108	-230	
$\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$	0.010(2)	430	+320	

^a (**Hbpbziap**) = 1,5-bis(1-pyrazolyl)-3-[bis(2-imidazolyl)methyl]azapentane.
^b (**Hbdpi**) = 4,5-bis[di(2-pyridyl)methyl]aminomethylimidazole.

noncomplexing electrolyte. Then, the disproportionation constant of the complex can be calculated as:

$$\log K_{\text{dis}} = \log \beta_{11} - 2 \log \beta_1 + m \log K_{\text{dis}}(\text{Cu}^+) + \log \beta_x \quad (2)$$

Here, $\log K_{\text{dis}}(\text{Cu}^+) = 6.24$ at 298 K and β_x represents the formation constant for the H_xL species. Combining voltammetric and potentiometric data, we obtain the $\log K_{\text{dis}}$ values in Table 7. In this table, the $E^\circ(\text{II/I})$ values have been taken as the onset potential for the first cathodic peak in the voltammograms such as in Fig. 6 and 7.

As can be seen in Fig. 7, the voltammetric response of the studied complexes is scarcely sensitive to the presence of imidazole. This can be interpreted by the occurrence of an electrochemical reduction pathway involving relatively fast ligand dissociation prior to the electron transfer step. The electrochemical pattern is quite similar for all the studied systems, suggesting that a similar electrochemical reaction scheme is operative. In the case of most binuclear complexes, the voltammetric profile clearly shows that the reduction of the metallic centres is independent, *i.e.*, that there is no electronic communication between the metal units forming the complex.

Superoxide dismutase activity

NBT (nitro blue tetrazolium) assays¹¹ allow calculating the IC_{50} values for Cu_2LIm and CuZnLIm systems for receptors L1–L4 at physiological pH. The analysis of these experiments shows that all homobinuclear Cu_2LIm and heterobinuclear CuZnLIm species exhibit a remarkable catalytic activity towards O_2^- dismutation in comparison with the literature.¹² The high activity observed for many of these systems can be ascribed probably to the flexibility of their chains that would permit molecular re-arrangements along the catalytic pathway.¹³ Interestingly, the lowest k_{cat} is observed for the complex showing the highest stepwise stability constant for the formation of the binuclear copper complex and the largest dismutation constant ($\text{Cu}_2\text{L2}$, see Table 7). The substitution of one Cu^{2+} by a Zn^{2+} metal ion yields a pronounced decrease in activity, except in the case of $\text{Cu}_2\text{L2}$ for which a 6-fold increase is observed. On the other hand, addition of imidazole to the binuclear complexes does not produce any significant change except for $\text{Cu}_2\text{L2}$.

Chemiluminescence in PNML SOD activity assays

Additionally to the McCord–Fridovich test, the SOD activity of Cu^{2+} binuclear systems (with or without imidazole) has also been complemented with luminescence inhibition studies on polymorphonuclear human leukocytes (PNMLs).

PNMLs are able to generate great quantities of O_2^- in the NADPH-oxidase system¹⁴ as a part of their role in the immune system. This O_2^- production can be measured using luminol chemiluminescence assays. The presence of free radical scavengers inhibits luminescence, and in this sense a major inhibition can be associated with a major antioxidant ability. Trypan blue dye exclusion assay results show that all complexes are nontoxic (data not shown).

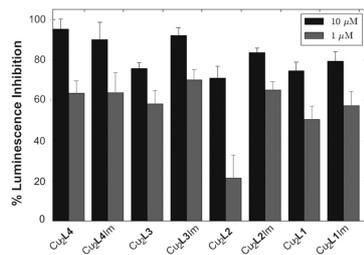


Fig. 8 Antioxidant activity in leukocytes.

Fig. 8 depicts the results obtained from the luminescence inhibition measurements at two different concentrations. As can be seen all Cu^{2+} binuclear systems studied clearly inhibit luminescence, generated by stimulation of PMNLs with 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), which supports the antioxidant properties of these systems. Interestingly, in agreement with the NBT method, the lowest inhibition percentage of the luminescence is observed for $\text{Cu}_2\text{L2}$ (see Fig. 8).

Conclusions

IC_{50} values obtained for copper complexes with different hexazapyridinophane receptors show some of the lowest values reported in the literature for Cu -SODs mimics. Through different techniques, this behaviour can be related with the coordination modes of the Cu^{2+} ions and with the flexibility of their aliphatic chains that would permit the molecular re-arrangements along the catalytic pathway. Although paramagnetic ^1H NMR studies suggest that imidazole bridges the metal centres in its anionic imidazolate form, this seems to have no particular role in the catalytic activity. The lowest k_{cat} is observed for the complex showing the highest stepwise stability constant for the formation of the binuclear Cu^{2+} complex and the largest dismutation constant. The studies performed hold promise for the use of copper complexes of these ligands, with the possible exception of $\text{Cu}_2\text{L2}$, as antioxidant agents in more complex fish and murine models. We will explore these possibilities shortly.

Experimental

Synthesis of L1

Ligand L1 was prepared following a reported procedure (see Scheme S1†).⁶ All reagents and chemicals were obtained from commercial sources and used as received. Solvents used for the chemical synthesis were of analytical grade and used without further purification.

5,9,13-Tetra(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13-tetraazadecane (1)

N,N'-Bis(3-aminopropyl)-1,3-propanediamine (10.0 g, 53.1 mmol) dissolved in 400 cm³ of THF and K₂CO₃ (53.6 g, 387.7 mmol) dissolved in 100 cm³ of water were placed in a three-necked round-bottom flask provided with mechanical stirring. Then, a solution of *p*-tolylsulfonyl chloride (55.4 g, 290.8 mmol) in 100 cm³ of THF was added dropwise over 1 h. The solution was kept under stirring for one day, the organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness. The residue was suspended in ethanol and refluxed for two hours. Then, it was filtered and washed exhaustively with ethanol. (Yield: 89%) NMR (CDCl₃): δ_H (ppm): 1.84 (m, 6H), 2.41 (s, 6H), 2.43 (s, 6H), 2.98 (d, 4H), 3.09–3.16 (m, 8H), 5.39 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.28–7.32 (m, 8H), 7.63 (d, 4H, *J* = 8 Hz), 7.73 (d, 4H, *J* = 8 Hz).

1,19-Phthalimido-4,8,12,16-tetrakis(*p*-tolylsulfonyl)-4,8,12,16-tetraazanonadecane (2)

The tosylated amine **1** (18.0 g, 22.3 mmol), K₂CO₃ (32.2 g, 254.5 mmol) and *N*-(3-bromopropyl) phthalimide (17.0 g, 63.6 mmol) were suspended in 300 cm³ refluxing CH₃CN. After refluxing for 48 h, the mixture was filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness and the residue suspended in refluxing ethanol. Then it was filtered to give **2** as a white solid. (Yield: 46%) NMR (CDCl₃): δ_H (ppm): 1.86–1.81 (m, 10H), 2.37 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 3.13–3.09 (m, 16H), 3.64 (t, 4H, *J* = 7 Hz), 7.29–7.22 (m, 8H), 7.64–7.58 (m, 8H), 7.69–7.66 (m, 4H), 7.80–7.78 (m, 4H). δ_C (ppm): 21.9, 47.1, 123.64, 127.55, 130.20, 132.44, 134.35, 168.50.

4,8,12,16-Tetrakis(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaazaheneicosane (3)

A mixture of compound **2** (8.0 g, 6.7 mmol) and hydrazine monohydrate 85% (32.9 cm³, 60.3 mmol) in THF (300 cm³) was refluxed for 24 h, then cooled and the resulting solid filtered off. After adding 50 cm³ of water, the solution was vacuum evaporated to dryness, to give a solid residue. The solid was dissolved in CH₂Cl₂ and the solution was dried with anhydrous Na₂SO₄. Then, it was vacuum evaporated to dryness to obtain **3**. (Yield: 76%) NMR (CDCl₃): δ_H (ppm): 1.66–1.90 (m, 10H), 2.18 (s, 1H), 2.38 (s, 6H), 2.40 (s, 6H), 2.73 (t, 4H, *J* = 7 Hz), 3.11–3.13 (m, 16H), 7.25–7.30 (m, 8H), 7.62–7.70 (m, 8H) δ_C (ppm): 21.7, 31.8, 38.9, 47.0, 47.2, 127.3, 130.0, 130.2, 135.9, 143.6, 143.7.

1,5,9,13,17,21-Hexakis(*p*-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaazaheneicosane (4)

3 (10 g, 10.8 mmol) dissolved in 400 cm³ of THF and K₂CO₃ (8.1 g, 58.8 mmol) dissolved in 100 cm³ of water were placed in a three-necked round bottom flask provided with mechanical stirring. Then a solution of *p*-tolylsulfonyl chloride (5.5 g, 29.4 mmol) in THF was added dropwise over 1 h. The solution was kept under stirring for one day, and the organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness. The residue was suspended in ethanol and refluxed exhaustively with ethanol.

(Yield: 89%) NMR (CDCl₃): δ_H (ppm): 1.78–1.91 (m, 10H), 2.38 (s, 9H), 2.41 (s, 9H), 2.95–2.93 (m, 4H), 3.12–3.10 (m, 16H), 5.44 (t, 2H, *J* = 6 Hz), 7.31–7.23 (m, 12H), 7.71–7.61 (m, 12H) δ_C (ppm): 143.8, 137.0, 135.6, 130.1, 129.9, 127.3, 47.7, 47.6, 47.5, 40.4, 29.6, 29.2, 21.7.

1,5,9,13,17,21-Hexakis(*p*-tolylsulfonyl)-3,7,11,15,19,23-hexaaza-1(2,6)-pyridina cyclotetrasophane (5)

4 (0.9 g, 0.7 mmol) and K₂CO₃ (0.97 g, 7.0 mmol) were suspended in dried CH₃CN (250 cm³). To this mixture, 2,6-bis(bromomethyl)pyridine (0.2 g, 2.6 mmol) in 150 cm³ was added dropwise over 2 h. The suspension was refluxed for further 20 h and filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness and the residue suspended in refluxing ethanol. Then, it was filtered to give a white solid. (Yield: 98%) NMR (CDCl₃): δ_H (ppm): 1.94–1.66 (m, 10H), 2.38 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 2.40 (s, 6H), 3.23–2.94 (m, 20H), 4.30 (s, 4H), 7.36–7.27 (m, 12H), 7.65–7.54 (m, 15H). δ_C (ppm): 156.7, 143.6, 130.1, 130.0, 127.5, 127.4, 127.4, 47.8, 47.7, 29.9, 28.9, 21.7. MS *m/z* (FAB) 1327(M⁺).

3,7,11,15,19,23-Hexaaza-1(2,6)-pyridina cyclotetrasophane (L1-6HBr-3H₂O)

5 (0.33 g, 0.2 mmol) and phenol (1.6 g, 17.1 mmol) were suspended in HBr-AcOH 33% (250 cm³). The mixture was stirred at 90 °C for 24 h and then cooled. The resulting residue was filtered off and washed several times with CH₂Cl₂ to give the product **L1** in a salt form. (Yield: 62%) NMR (CDCl₃): δ_H (ppm): 2.38–2.16 (m, 10H), 3.35–3.26 (m, 20H), 4.49 (s, 4H), 7.46 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 7.93 (t, *J* = 8 Hz, 1H). δ_C (ppm): 150.8, 139.6, 123.1, 51.2, 44.9, 44.6, 44.1, 23.1, 22.6, 21.7. MS *m/z* (ESI) 406.4 [(M + H)⁺]. Anal. Calcd for C₂₂H₅₃N₇Br₆O₃: C, 27.9; H, 5.9; N, 10.4. Found: C, 27.8, H, 5.7, N, 10.2.

EMF measurements

The potentiometric titrations were carried out at 298.1 ± 0.1 K using 0.15 M NaClO₄ as a supporting electrolyte. The experimental set-up (burette, potentiometer, cell, stirrer, microcomputer, etc.) has been fully described elsewhere.¹⁵ The EMF data were acquired with the computer program PASAT.¹⁶ The reference electrode was a Ag/AgCl electrode in a saturated KCl solution. The glass electrode was calibrated as a hydrogen-ion concentration probe by titration of previously standardized amounts of HCl with CO₂-free NaOH solutions and the equivalent point determined by Gran's method,¹⁷ which gives the standard potential, *E*⁰, and the ionic product of water [*p*K_w = 13.73(1)]. The computer program HYPERQUAD was used to calculate the protonation and stability constants.¹⁸ The pH range investigated was 2.5–11.0 and the concentration of the metal ions and of the ligands ranged from 1 × 10⁻³ to 5 × 10⁻³ M with M/L molar ratios varying from 2 : 1 to 1 : 2. When more than one model fits the experimental data, the most reliable chemical model was chosen by performing *F* tests at the 0.05 confidence level.^{19,20} More details of data treatment are included in the ESI†

UV-Vis measurements

The solvents used were of spectroscopic or equivalent grade. Water was twice distilled and passed through a Millipore apparatus. All solutions were prepared 0.15 M in NaClO₄. The pH values were measured with a Mettler-Toledo MP-120 pH-meter and adjustments of the hydrogen ion concentration of the solutions were made with diluted HCl and NaOH solutions. UV-Vis absorption spectra were recorded on an Agilent 8453 spectroscopy system.

Paramagnetic NMR spectroscopy

The paramagnetic NMR measurements were acquired on a Bruker Avance400 spectrometer operating at 399.91 MHz. One-dimensional spectra were recorded in a D₂O solvent with pre-saturation of the H₂O signal during part of the relaxation delay to eliminate the H₂O signal.²¹ Relaxation delay times of 50–200 ms, 30–75 kHz spectral width range and acquisition times of 60–200 ms were used. 1D spectra were processed using exponential line-broadening weighting functions as apodization with values of 10–30 Hz. Chemical shifts were referenced to residual solvent protons of D₂O resonating at 4.76 ppm (298 K) relative to TSP. Sample concentrations for paramagnetic ¹H NMR were 3 mM in Cu₂L1 or Cu₂L2 complexes. The longitudinal relaxation times of the hyperfine shifted resonances were determined using the inversion recovery pulse sequence (*d*₁-180°-τ-90°-acq, where *d*₁ is the relaxation delay and acq the acquisition time), 15 values of τ were selected between 0.4 ms and 200 ms.²² (*d*₁ + acq) values were at least five times the longest expected T₁ ranging from 100 to 400 ms, and the number of scans was 16 000. The T₁ values were calculated from the inversion-recovery equation. Transversal relaxation times were obtained measuring the line broadening of the isotropically shifted signals at half-height through the equation $T_2^{-1} = \pi \Delta \nu_{1/2}$.

Electrochemistry

The electrochemistry of the different Cu^{II}-L and Cu^{II}-Zn^{II}-L systems has been studied by cyclic voltammetry in the 3.4–10.0 pH range at concentrations ca. 1.0 × 10⁻³ M. 0.15 M NaClO₄ was used as a supporting electrolyte, and the pH adjusted to the required value by adding appropriate amounts of HClO₄ and/or NaOH. Voltammograms were obtained in a three-electrode cell under an argon atmosphere with glassy carbon working electrodes, a platinum wire auxiliary electrode and a AgCl (3 M NaCl)/Ag reference electrode, using a CH 1660 equipment.

Crystallographic analysis

Slow evaporation of vessels containing either L2 along with Cu(ClO₄)₂ in a NaClO₄ 0.15 M water solution yielded blue crystals suitable for X-ray diffraction. Analysis of single crystals of the ligand was carried out with an Enraf-Nonius KAPPA CCD single-crystal diffractometer (λ = 0.71073 Å). The structure was solved by the Patterson method using the program SHELXS-86.²³ Isotropic least-squares refinement was

performed by means of the program SHELXL-97.²⁴ Crystal data, data collection parameters, and results of the analysis are listed in Table S1.† Due to the low reflectivity exhibited by the crystal, in the data collection a θ of 22.78° was achieved. However the final refinement yields no ambiguity in the atom assignment and the final refinement parameters are within reasonable values. Molecular plots were produced with either the program ORTEP²⁵ or Mercury.²⁶ Crystallographic data have been deposited as CCDC 934155.

McCord-Fridovich SOD activity assays

SOD-like activity was determined by using the nitro blue tetrazolium (NBT) reduction method.^{27–29} The assay was carried out in an HEPES buffer 50 mM at pH = 7.4 and at room temperature. The concentration of NBT was 50 mM and the superoxide was generated with the xanthine oxidase-xanthine system.

Cellular toxicity assays

The possible cytotoxicity of the complexes herewith tested was determined by means of the trypan blue dye exclusion assay.³⁰ Several aliquots of PMNL suspension were exposed to 1 μM of a solution of the complex tested. After 15 minutes of incubation, the dye was applied and the viable cells were counted and compared with a blank that contained the buffer used.

Chemiluminescence in PMNL SOD activity assays

The SOD-like activity of the complexes was tested by measuring the inhibition of the luminescence of PMNLs.^{31,32} The luminescent agent was luminol 40 μM and TPA 1 μM was used as a leukocyte-activating agent. The method for the purification of PMNLs from human blood has been described elsewhere.³³

Acknowledgements

Financial support from the Spanish Ministry of Science and Innovation (CONSOLIDER INGENIO 2010 CSD2010-00065 Projects), FEDER funds and Generalitat Valenciana PROMETEO 2011/008 is gratefully acknowledged. R. B. thanks MCYT of Spain for a Ph.D. grant. B. V. thanks MINECO for a Juan de la Cierva grant.

References

- (a) I. Fridovich, *Science*, 1978, **201**, 875–880; (b) I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, **64**, 97–112; (c) E. Bienvenue, S. Choua, M.-A. Lobo-Recio, C. Marzin, P. Pacheco, P. Seta and G. Tarrago, *J. Inorg. Biochem.*, 1995, **57**, 157–168; (d) J. M. McCord and I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, 1969, **244**, 6049–6055; (e) J. S. Valentine, D. L. Wertz, T. J. Lyons, L.-L. Liou, J. J. Goto and E. B. Gralla, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1998, **2**, 253–262.
- C. A. Salata, M.-T. Youinou and C. J. Burrows, *Inorg. Chem.*, 1991, **30**, 3454–3461.

- 3 (a) G. Kolks, C. R. Frihart, H. N. Rabinowitz and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1976, **98**, 5720–5721; (b) C.-L. O'Young, J. C. Dewan, H. R. Lilienthal and S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, **100**, 7291–7300; (c) P. K. Coughlin, J. C. Dewan, S. J. Lippard, E.-I. Watanabe and J.-M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.*, 1979, **101**, 265–266; (d) G. Kolks, C. R. Frihart, P. K. Coughlin and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 1981, **20**, 2933–2940; (e) G. Kolks, S. J. Lippard, J. V. Waszczak and H. R. Lilienthal, *J. Am. Chem. Soc.*, 1982, **104**, 717–725; (f) P. K. Coughlin, A. E. Martin, J. C. Dewan, E.-I. Watanabe, J. E. Bulkowski, J.-M. Lehn and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 1004–1009; (g) P. K. Coughlin and S. J. Lippard, *Inorg. Chem.*, 1984, **23**, 1446–1451.
- 4 (a) M. G. B. Drew, C. Cairns, A. Lavery and S. M. Nelson, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1980, 1122–1125; (b) M. G. B. Drew, M. McCann and S. M. Nelson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1981, 1868–1878; (c) J.-L. Pierre, P. Chautemps, S. Refaif, C. Beguin, A. El Marzouki, G. Serratrice, E. Saint-Aman and P. Rey, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1965–1973; (d) G. Tabbi, W. L. Driessen, J. Reedijk, R. P. Bonomo, N. Veldman and A. L. Spek, *Inorg. Chem.*, 1997, **36**, 1168–1175; (e) D. Li, S. Li, D. Yang, J. Yu, J. Huang, Y. Li and W. Tang, *Inorg. Chem.*, 2003, **42**, 6071–6080; (f) Y.-H. Zhou, H. Fu, W.-X. Zhao, W.-L. Chen, C.-Y. Su, H. Sun, L.-N. Ji and Z.-W. Mao, *Inorg. Chem.*, 2007, **46**, 734–739; (g) B. Verdejo, S. Blasco, E. García-España, F. Lloret, P. Gaviña, C. Soriano, S. Tatay, H. R. Jiménez, A. Doménech and J. Latorre, *Dalton Trans.*, 2007, 4726–4737.
- 5 (a) J. Aguilar, M. G. Basallote, L. Gil, J. C. Hernández, M. A. Mániz, E. García-España, C. Soriano and B. Verdejo, *Dalton Trans.*, 2004, 94–103; (b) E. García-España, P. Gaviña, J. Latorre, C. Soriano and B. Verdejo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, **126**, 5082–5083; (c) B. Verdejo, J. Aguilar, A. Doménech, C. Miranda, P. Navarro, H. R. Jiménez, C. Soriano and E. García-España, *Chem. Commun.*, 2005, 3086–3088.
- 6 M. G. Basallote, A. Doménech, A. Ferrer, E. García-España, J. M. Linares, M. A. Mániz, C. Soriano and B. Verdejo, *Inorg. Chim. Acta*, 2006, **359**, 2004–2014.
- 7 (a) J. E. Sarnesky, H. L. Surprenant, F. K. Molen and C. N. Reilly, *Anal. Chem.*, 1975, **47**, 2116–2124; (b) S. P. Dagnall, D. N. Hague and M. E. McAdam, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1984, 435–440; (c) S. P. Dagnall, D. N. Hague and M. E. McAdam, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1984, 1111–1114; (d) D. N. Hague and A. D. Moreton, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1994, 265–270; (e) C. Frassinetti, S. Ghelli, P. Gans, A. Sabatini, M. S. Moruzzi and A. Vacca, *Anal. Biochem.*, 1995, **231**, 374–382.
- 8 (a) T. G. Fawcett, S. M. Rudich, B. H. Toby, R. A. Lalancette, J. A. Potenza and H. J. Schugar, *Inorg. Chem.*, 1980, **19**, 940–945; (b) G. Marongiu, E. C. Lingafelter and P. Paoletti, *Inorg. Chem.*, 1969, **8**, 2763–2767.
- 9 P. M. Wood, *Biochem. J.*, 1988, **253**, 287–289.
- 10 A. Doménech, E. García-España, V. Marcelino, B. Altava, S. V. Luis, J. F. Miravet, A. Bianchi and L. Ferrini, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, **252**, 123–129.
- 11 M. M. Tarpey and I. Fridovich, *Circ. Res.*, 2001, **89**, 224–236.
- 12 H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh and S. Fukuzumi, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 5733–5741.
- 13 A. Maroz, G. F. Kelso, R. A. J. Smith, D. C. Ware and R. F. Anderson, *J. Phys. Chem. A*, 2008, **112**, 4929–4935.
- 14 C. Dahlgren and A. Karlsson, *J. Immunol. Methods*, 1999, **232**, 3–14.
- 15 E. García-España, M. J. Ballester, F. Lloret, J. M. Moratal, J. Faus and A. Bianchi, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1988, 101–104.
- 16 M. Fontanelli and M. Micheloni, *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes, Peniscola, Castellón 1990*. Program for the Automatic Control of the Microburette and the Acquisition of the Electromotive Force Readings, Diputación de Castellón, 1990.
- 17 (a) G. Gran, *Analyst*, 1952, **77**, 661–671; (b) F. J. C. Rossotti and H. Rossotti, *J. Chem. Educ.*, 1965, **42**, 375–378.
- 18 P. Gans, A. Sabatini and A. Vacca, *Talanta*, 1996, **43**, 1739–1753.
- 19 W. C. Hamilton, *Statistics in Physical Chemistry*, The Roland Press Co., New York, 1964.
- 20 L. Bologni, A. Sabatini and A. Vacca, *Inorg. Chim. Acta*, 1983, **69**, 71–75.
- 21 T. Inubushi and E. D. Becker, *J. Magn. Reson.*, 1983, **51**, 128–133.
- 22 R. L. Vold, J. S. Waugh, M. P. Klein and D. P. Phelps, *J. Chem. Phys.*, 1968, **48**, 3831–3832.
- 23 G. M. Sheldrick, C. Kruger and R. Goddard, *Crystallographic Computing 3: Data Collection, Structure Determination, Proteins and Database*, Clarendon Press, Oxford, UK, 1985, p. 175.
- 24 G. M. Sheldrick, *SHELXL-93: Program for Crystal Structure Refinement*, Institut für Anorganische Chemie der Universität, Göttingen, Germany, 1993.
- 25 C. K. Johnson, ORTEP, Report ORNL-3794, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, 1971.
- 26 C. F. Macrae, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, G. P. Shields, R. Taylor, M. Towler and J. Van de Streek, *J. Appl. Crystallogr.*, 2006, **39**, 453–457.
- 27 L. W. Oberley and D. R. Spitz, *Handbook of Methods of Oxygen Radicals Research*, ed. R. A. Grenwald, CRC Press, Boca Raton, USA, 1986, p. 218.
- 28 C. Beauchamp and I. Fridovich, *Anal. Biochem.*, 1971, **44**, 276–287.
- 29 J. Y. Zhou and P. Prognon, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, **40**, 1143–1148.
- 30 E. Knoll-Köhler and J. Stiebel, *Eur. J. Oral Sci.*, 2002, **110**, 296–301.
- 31 I. Ginsburg, R. Misgav, D. F. Gibbs, J. Varani and R. Kohen, *Inflammation*, 1993, **17**, 227–243.
- 32 A. Halstensen, B. Haneberg, J. Glette, S. Sandberg and C. O. Solberg, *J. Immunol. Methods*, 1986, **88**, 121–128.
- 33 M. C. Terencio, M. L. Ferrándiz, I. Posadas, E. Roig, S. De Rosa, A. De Giulio, M. Payá and M. J. Alcaraz, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1998, **357**, 565–572.