



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultat de Química

Departament de Química Inorgànica

Azaciclofanos modificados para el estudio de moléculas de interés biológico.

Memoria para la obtención del título de Doctor en Nanociencia y
Nanotecnología por la Universitat de València

Doctorando

D. Lluís Guijarro Ferrer

Directores

Dr. D. Enrique García-España Monsonís

Dra. Dña. Begoña Verdejo Viu

Mayo de 2018

València, España

D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València, y **D^a Begoña Verdejo Viu**, del Grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Azaciclofanos modificados para el estudio de moléculas de interés biológico.**”, ha sido realizada bajo su dirección en el Departament de Química Inorgànica de la Universitat de València por el graduado **D. Lluís Guijarro Ferrer** 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 Facultat de Química.

Paterna, 8 de Mayo de 2018

D. Enrique García-España Monsonís

D^a Begoña Verdejo Viu

D. Lluís Guijarro Ferrer, Graduado en Química por la Universitat de les Illes Balears, presenta esta memoria con el título **“Azaciclofanos modificados para el estudio de moléculas de interés biológico.”** en el marco del programa de doctorado en Nanociencia y Nanotecnología (RD 99/2011) con el fin de optar al título de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Paterna a 8 de Mayo de 2018.

D. Lluís Guijarro Ferrer

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de tesis, D. Enrique García-España Monsonís y D^a Begoña Verdejo Viu, por haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos. Gracias por el tiempo que me han dedicado todos estos años, por sus consejos y por todo lo que me han enseñado.

A todos mis compañeros del Grupo de Química Supramolecular con los que he tenido la suerte de coincidir durante todos estos años. Desde que llegué de las islas me he sentido como en casa y siempre he tenido a alguien en quien apoyarme cuando lo he necesitado. Con cada uno de vosotros tengo alguna anécdota divertida que podría redactar en estos agradecimientos, lo que significa que hemos disfrutado de grandes momentos juntos.

A todos los que han coincidido conmigo durante estos años en València, durante el master y el doctorado.

A los todos los mallorquines, químicos o no, que durante estos años han estado para unas risas siempre que lo he necesitado, finde tras finde. A aquellos que han venido a pasar unos días a València, y han aprovechado para tirar unos petarditos, y en especial a los que han pasado unos años compartiendo ciudad, facultad y aficiones. Gràcies a tots.

A Cristina, por estar ahí durante todos estos años de emigración y por ser un apoyo constante, esto lo hemos conseguido juntos.

Y por último, pero no menos importante, a mi familia. La cual siempre ha estado ahí cuando la necesitaba y ha supuesto un pilar fundamental durante todos estos años. En especial a mis padres, por su comprensión y apoyo constante, gràcies als dos.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Química supramolecular.....	3
1.1.1. <i>Aplicación supramolecular a la química médica</i>	5
1.2. Aplicaciones biomédicas de las poliaminas	12
1.2.1. <i>Poliaminas en los sistemas biológicos</i>	12
1.2.2. <i>Compuestos poliamínicos como miméticos SOD</i>	15
1.2.3. <i>Ácidos nucleicos como diana supramolecular</i>	34
Referencias	
2. Objetivos	55
3. Nomenclatura	61
3.1. Nomenclatura sistemática de los fanos	63
3.2. Nomenclatura sistemática de los piridinaciclofanos.....	64
3.3. Nomenclatura simplificada	65
Referencias	
4. Material y métodos	69
4.1. Estudios potenciométricos.....	71
4.1.1. <i>Sistema potenciométrico</i>	71
4.1.2. <i>Adquisición y tratamiento de los datos</i>	73
4.2. Análisis elemental.....	76

4.3. Espectrometría de masas	76
4.4 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	76
4.5. Difracción de rayos X	77
4.6. Espectroscopía de absorción UV-Vis y de emisión de fluorescencia	77
<i>4.6.1. Estudios de interacción con ácidos nucleicos</i>	79
4.6.1.1. Valoraciones fluorimétricas directas	81
4.6.1.2. Desplazamiento de indicador fluorescente	81
4.6.1.3. Desnaturalizaciones térmicas	83
<i>4.6.2. Determinación de constantes de estabilidad</i>	85
4.7. Dicroísmo circular	88
4.8. Estudios cinéticos para la determinación de la actividad antioxidante	90
<i>4.8.1. Procedimiento experimental</i>	92
<i>4.8.2. Tratamiento de los datos</i>	93
4.9. Estudios electroquímicos	95
4.10. Estudios teóricos	96
4.11. Espectroscopía de rayos X por energía dispersiva	98
4.12. Estudios biológicos	99
Referencias	
5. Síntesis	103
5.1. Mecanismos de síntesis	105

5.1.1. Reacción de tosilación.....	105
5.1.2. Reacción de ciclación.....	107
5.1.3. Reacción de alargamiento	108
5.1.4. Reacción con la N-tosilaziridina	110
5.1.5. Reacción con la N-(3-bromopropil)ftalimida.....	111
5.1.6. Reacción de ciclación de L1-Ts.....	112
5.1.7. Reacción de destosilación.....	113
5.1.8. Reacción de funcionalización	114
5.2. Síntesis del ligando precursor pytren-al-Ts.....	115
5.3. Síntesis de L1	118
5.4. Síntesis de L2	121
5.5. Síntesis de L3	124
5.6. Síntesis de los derivados de L1	127
Referencias	
6. Propiedades ácido-base.....	133
6.1. Poliaminas L1, L2 y L3	136
6.2. Poliaminas L1-2Py, L1-3Py y L1-4Q.....	142
6.3. Poliamina L1-A.....	151
Referencias	
7. Miméticos de la SOD	157
7.1. Formación de complejos metálicos.....	163

7.1.1. Poliaminas L1, L2 y L3	164
7.1.1.1. Coordinación con Cu(II)	165
7.1.1.2. Coordinación con Mn(II)	184
7.1.1.3. Formación de complejos mixtos Cu(II)-Zn(II)	189
7.1.2. Poliaminas derivadas de L1	200
7.1.2.1. Coordinación con Cu(II)	201
7.2. Evaluación de la toxicidad	211
7.3. Evaluación de la actividad SOD.....	214
7.3.1. Estudios electroquímicos	215
7.3.1.1. Voltametría cíclica de las poliaminas L1, L2 y L3	215
7.3.1.2. Voltametría cíclica de las poliaminas derivadas de L1	224
7.3.2. Estudios cinéticos.....	228
7.3.3. Ensayos biológicos.....	234

Referencias

8. Interacción con ácidos nucleicos	239
8.1. Interacción con ácidos nucleicos de doble hélice.....	248
8.1.1. Ensayos de desnaturalización térmica	251
8.1.2. Ensayos de desplazamiento de indicador fluorescente.....	253
8.1.3. Influencia de la coordinación con Zn(II) en la interacción.....	260
8.2. Interacción con ácidos nucleicos de secuencia específica	263
8.2.1. Secuencias de tipo horquilla	265

8.2.2. <i>Secuencias de tipo horquilla con repeticiones CXG</i>	286
---	-----

Referencias

9. Conclusiones	295
9.1. Síntesis.....	297
9.2. Propiedades ácido-base.....	298
9.3. Miméticos de la superóxido dismutasa	299
9.3.1. <i>Formación de complejos metálicos</i>	300
9.3.2. <i>Evaluación de la toxicidad</i>	301
9.3.3. <i>Evaluación de la actividad SOD</i>	302
9.3.3.1. Estudios electroquímicos.....	302
9.3.3.2. Estudios cinéticos.....	303
9.3.3.3. Ensayos biológicos.....	304
9.4. Interacción con ácidos nucleicos.....	305
9.4.1. <i>Interacción con ácidos nucleicos de doble hélice</i>	305
9.4.2. <i>Interacción con ácidos nucleicos de secuencia específica</i>	306

Anexos

Anexo 1. Publicaciones	III
Anexo 2. Espectros de RMN	XIX
Anexo 3. Datos cristalográficos	XXIX

Índice de tablas

Tabla 1.1. Valores aproximados para las energías de disociación de los distintos tipos de enlace en las interacciones no covalentes.	6
Tabla 3.1. Abreviaturas utilizadas para distintos grupos sustituyentes.	66
Tabla 4.1. Descripción de los componentes del sistema potenciométrico.	72
Tabla 4.2. Experimentos llevados a cabo durante la tesis junto a la descripción técnica de los aparatos usados.	78
Tabla 4.3. Secuencias específicas de oligonucleótidos seleccionados para su estudio.	79
Tabla 4.4. Coeficientes de extinción molar ($\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$) para los polinucleótidos y los oligonucleótidos utilizados.	80
Tabla 4.5. Material y disoluciones necesarias para el ensayo Mcord-Fridovich.	92
Tabla 6.1. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global para los receptores L1 , L2 y L3 , determinados mediante valoraciones potenciométricas a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ en $\text{NaCl } 0.15 \text{ M}$	137
Tabla 6.2. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global calculadas para los receptores L1 , L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q . Valores determinados a partir de estudios potenciométricos y valoraciones UV-Vis a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ en $\text{NaCl } 0.15 \text{ M}$	143
Tabla 6.3. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global para L1-A y L1 junto a los valores obtenidos de la bibliografía para el <i>pytren-A</i> . Valores determinados mediante valoraciones potenciométricas a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ en $\text{NaCl } 0.15 \text{ M}$	152
Tabla 7.1. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos de Cu(II) con L1 , L2 y L3 , determinados a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ en $\text{NaCl } 0.15 \text{ M}$	165
Tabla 7.2. Comparación de los logaritmos de las constantes de protonación para los ligandos libres y los complejos de Cu(II) con L1 , L2 y L3	166
Tabla 7.3. Distancias (\AA) y ángulos ($^\circ$) de enlace seleccionados para el catión $[\text{Cu}_2\text{HL3Br}_2]^{3+}$	179
Tabla 7.4. Distancias (\AA) y ángulos ($^\circ$) de enlace seleccionados para el catión $[\text{Cu}_2\text{L3Cl}_2]^{2+}$	181
Tabla 7.5. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos de Mn(II) de L1 , L2 y L3 , determinados a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$ en $\text{NaCl } 0.15 \text{ M}$	185

Tabla 7.6. Comparación de los logaritmos de las constantes de protonación para los ligandos libres y los complejos de Mn(II) con L1 , L2 y L3	186
Tabla 7.7. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos de Zn(II) con L1 , L2 y L3 , determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.	190
Tabla 7.8. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos mixtos de Cu(II) y Zn(II) con L3 , determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.	194
Tabla 7.9. Composición atómica en % de los tres experimentos TEM-EDX.	197
Tabla 7.10. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para el catión $[\text{CuZnL3Cl}_2]^{2+}$	199
Tabla 7.11. Logaritmos de las constantes de estabilidad obtenidos para los complejos de Cu(II) con L1 , L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q , determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.	202
Tabla 7.12. Valores de pCu(II) a pH 7.4 calculados para distintas relaciones molares Cu(II):L.	204
Tabla 7.13. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Cu(II) para L1 , L2 y L3 . Potenciales formales asignados al par Cu(II)/Cu(I). Cargas omitidas.	229
Tabla 7.14. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Cu(II) para los derivados de L1 . Potenciales formales asignados al par Cu(II)/Cu(I). Cargas omitidas.	231
Tabla 7.15. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Mn(II). Potenciales formales asignados al par Mn(II)/Mn(III). Cargas omitidas.	233
Tabla 8.1. Nombres y abreviaciones de las nucleobases de los ácidos nucleicos, nucleósido y nucleótidos.	243
Tabla 8.2. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m , °C) para el <i>ctADN</i> y el <i>poliA-poliU</i> tras la adición de L1 y L3 a distintas relaciones $[\text{L}]/[\text{polinucleótido}]$ (<i>r</i>).	252
Tabla 8.3. Valores de IC ₅₀ obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de <i>EB</i> y <i>DAPI</i> para la interacción de los polinucleótidos <i>ctADN</i> y <i>poliA-poliU</i> con L1 y L3	258
Tabla 8.4. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m , °C) para el <i>poliA-poliU</i> tras la adición de los complejos metálicos de L1 y L3 utilizando relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1, $[\text{L}]/[\text{polinucleótido}] = 0.05$	260
Tabla 8.5. Secuencias de oligonucleótidos seleccionadas.	264
Tabla 8.6. Oligonucleótidos <i>hp 1-4</i>	266
Tabla 8.7. Constantes de estabilidad (K_{off} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) calculadas a partir de los valores obtenidos en las valoraciones fluorimétricas para la interacción de L1-A y L-A con <i>hp 1-4</i> . F/F_0 representa la relación entre la intensidad inicial y final ($\lambda_{\text{em}} = 418$ nm).	269

Tabla 8.8. Valores de T_m obtenidos para las secuencias hp 1-4 libres junto a los valores de ΔT_m determinados para distintas relaciones $[hp]/[L]$	270
Tabla 8.9. Oligonucleótidos hp_{CXG} seleccionados junto a las enfermedades asociadas a cada tipo de repetición CXG.	287
Tabla 8.10. Constantes de estabilidad (K_{aff} , $M^{-1}s^{-1}$) calculadas a partir de los valores obtenidos en las valoraciones fluorimétricas para la interacción entre L1-A y L-A con las distintas secuencias hp_{CXG} . F/F_0 representa la relación entre la intensidad inicial y final ($\lambda_{em} = 416$ nm).	291

Índice de figuras

Figura 1.1. Ganadores del Premio Nobel en Química, 1987.	4
Figura 1.2. Ejemplos de interacciones de tipo no-covalente en las que intervienen anillos aromáticos.	8
Figura 1.3. Descripción de la química huésped-anfitrión y del desplazamiento de moléculas presentes en la esfera de solvatación producido por la interacción.	8
Figura 1.4. Representaciones esquemáticas del concepto de la llave y la cerradura desarrollado por H. E. Fischer. Se presentan (a) las fuerzas que intervienen en el proceso y (b) el concepto de complementariedad entre el huésped y el anfitrión.	9
Figura 1.5. (a) Formación de una bicapa fosfolipídica a partir de los grupos individuales (fosfolípidos). (b) Estructuras adoptadas mediante el proceso de ensamblaje de los fosfolípidos, en función de las condiciones externas o sus propiedades. (c) Formación de distintas estructuras finales a partir de las unidades básicas, “ <i>building blocks</i> ”.	11
Figura 1.6. Ejemplo de poliaminas biogénicas. Grupos amino protonados a pH 7.4.	13
Figura 1.7. Comparación de las estructuras cuaternarias (arriba) y los centros activos (abajo) de distintas SOD; (a) Cu ₂ Zn ₂ SOD humana (PDB, 1pu0), (b) MnSOD (PDB, 1vew), (c) FeSOD de <i>E. Coli</i> (PDB, 1isa) y (d) NiSOD de <i>S. Coeliocor</i> (PDB, 1t6u).	16
Figura 1.8. Ciclo catalítico de las CuZnSOD para la dismutación del radical superóxido, mecanismo de esfera interna propuesto.	19
Figura 1.9. Comparación de las estructuras cuaternarias (arriba) y de los centros activos (abajo) de distintas MnSOD; (a) humanos (PDB, 1n0j), (b) <i>E. Coli</i> (PDB, 1vew) y (c) <i>D. radiodurans</i> (PDB, 2ce4).	21
Figura 1.10. Ciclo catalítico de las MnSOD para la dismutación del radical superóxido.	22
Figura 1.11. Datos electroquímicos de algunas SOD nativas. Potenciales respecto a NHE.	25
Figura 1.12. Estado <i>entático</i> y energía de activación. Diagrama de energía libre para la misma reacción en presencia de un catalizador convencional (complejo metálico), energía de activación ΔG^{\ddagger}_1 , y uno <i>entático</i> (metaloproteína), energía de activación ΔG^{\ddagger}_2	27
Figura 1.13. Centro activo de las CuZnSOD junto a dos miméticos SOD conteniendo un átomo de cobre, (a) sin residuo de arginina y (b) con un residuo de arginina.	28
Figura 1.14. Complejos de Mn(II) con [15]aneN ₅ y algunos de sus derivados.	30

Figura 1.15. Complejos con actividad SOD.	31
Figura 1.16. Ejemplos de miméticos SOD encontrados en la bibliografía.	32
Figura 1.17. Compuestos sintetizados en el GQS-UV cuyos complejos de manganeso y/o cobre presentan actividad SOD.	33
Figura 1.18. Estructura cristalina (PDB, 102D) de: (a) dodecámero d(CGCAAATTTGCG) ₂ y (b) complejo resultante de la interacción del antiséptico <i>propamidina</i> con el surco menor del dodecámero de ADN.	37
Figura 1.19. Estructura cristalina (PDB, 1n37) del complejo resultante de la interacción de la antraciclina <i>respinomicina D</i> con el octámero de ADN d(AGACGTCT) ₂ , mediante la intercalación directa entre los pares de bases G-C centrales.	38
Figura 1.20. Agentes intercalantes del ADN.	39
Figura 1.21. Representación esquemática de un sensor fluorescente.	42
Figura 1.22. Esquema de las distintas respuestas ópticas de los sensores fluorescentes (a) intrínsecos y (b) extrínsecos.	43
Figura 1.23. Compuestos diseñados su interacción selectiva con los ácidos nucleicos.	44
Figura 1.24. Ligandos poliamínicos sintetizados en el GQS-UV.	45
Figura 3.1. Operación de simplificación en la nomenclatura de ciclofanos.	63
Figura 3.2. Operación de simplificación para el ligando 6-[7-(bis-aminoetil)-3,7-diazaheptilo]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinacilodecafanilo].	64
Figura 3.3. Estructura de los compuestos L1 , L2 y L3	65
Figura 3.4. Grupos sustituyentes utilizados para la obtención de los derivados de L1	66
Figura 4.1. Esquema del sistema potenciométrico: A , Celda de medida; B , celda de referencia; C , puente salino; D , electrodo de medida; E , electrodo de referencia; F , pH-metro; G , inyección de argón; H , bureta automática; I , NaOH 0.1 M; J , sistema informático.	71
Figura 4.2. Esquema de los pasos seguidos en los estudios potenciométricos.	75
Figura 4.3. Ejemplo de la variación en la intensidad de emisión de fluorescencia del EB producida por la interacción de una molécula con <i>poliA-poliU</i> a distintas relaciones [ligando]/[EB].	82
Figura 4.4. Ejemplo del efecto en el perfil de desnaturalización térmica de <i>poliA-poliU</i> inducido por la interacción de un ligando a distintas relaciones molares ($r = \text{[ligando]}/\text{[poliA-poliU]}$).	83

Figura 4.5. Ejemplo de ajuste obtenido (línea sólida) de los valores obtenidos durante las valoraciones fluorimétricas (■), mediante el uso de la ecuación 4.4.	87
Figura 4.6. Representación de la valoración de un polinucleótido con un ligando seguida por DC a distintas relaciones [ligando]/[oligonucleótido].	89
Figura 4.7. Sistema xantina-xantina oxidasa para la generación de radical superóxido <i>in-situ</i> (negro), sistema indicador NBT-MF ⁺ para la detección del radical superóxido en disolución (azul), eliminación de radical superóxido por la enzima SOD o por miméticos de la SOD (verde).	91
Figura 4.8. Porcentaje de inhibición de NBT (IC ₅₀) frente a la concentración de compuesto.	94
Figura 4.9. Esquema de los pasos seguidos en los estudios teóricos para el evaluar la interacción ligando-oligonucleótido.	97
Figura 5.1. Mecanismo de reacción para la tosilación del grupo amino primario.	106
Figura 5.2. Esquema de reacción para la obtención de la amina tripodal protegida <i>tren-Ts</i>	106
Figura 5.3. Esquema del mecanismo de reacción para la obtención del <i>pytren-Ts</i>	108
Figura 5.4. Esquemas de los mecanismos de reacción para la obtención del <i>pytren-al-Ts</i>	109
Figura 5.5. Esquema del mecanismo de reacción para la obtención de L1-Ts	110
Figura 5.6. Esquemas de los mecanismos de reacción para la obtención de L2-Ts	111
Figura 5.7. Esquema del mecanismo de reacción para la obtención de L3-Ts	112
Figura 5.8. Montaje para la reacción de destosilación.	113
Figura 5.9. Esquema para el proceso de funcionalización de L1	114
Figura 5.10. Esquema para la síntesis del ligando precursor de tipo escorpiando <i>pytren-al-Ts</i>	117
Figura 5.11. Esquema de L1-Ts	119
Figura 5.12. Esquema de L1	120
Figura 5.13. Esquema de L2-Ts	122
Figura 5.14. Esquema de L2	123
Figura 5.15. Esquema de L3-Ts	125
Figura 5.16. Esquema de L3	126

Figura 5.17. Esquema de L1-2Py	128
Figura 5.18. Esquema de L1-3Py	129
Figura 5.19. Esquema de L1-4Q	130
Figura 5.20. Esquema de L1-A	131
Figura 6.1. Poliaminas L1 , L2 y L3	136
Figura 6.2. Diagramas de distribución de los ligandos L1 , L2 y L3 , calculados a partir de las constantes de protonación. $[L] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.	139
Figura 6.3. (Izquierda) Variaciones en los espectros UV-Vis de L1 , L2 , L3 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagramas de distribución de especies junto a las variaciones a 265 nm en función del pH. $[L] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.	141
Figura 6.4. Poliaminas sintetizadas a partir de L1 : L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q	142
Figura 6.5. (Izquierda) Variación en el espectro UV-Vis de L1-2Py a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para L1-2Py junto a la variación a 260 nm en función del pH (eje secundario ampliado). $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	144
Figura 6.6. (a) Representación de la formación del enlace de hidrógeno entre el grupo amonio secundario y el nitrógeno de la piridina en L1-2Py . (b) Estructura propuesta para el grupo piridina desprotonado en L1-3Py	145
Figura 6.7. (Izquierda) Variación en el espectro UV-Vis de L1-3Py a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para L1-3Py junto a la variación a 260 nm en función del pH (eje secundario ampliado). $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	146
Figura 6.8. (Izquierda) Variación en el espectro UV-Vis de L1-4Q a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para L1-4Q junto a la variación a (■) 273 nm y (•) 317 nm en función del pH. $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	147
Figura 6.9. (Izquierda) Variación en el espectro de emisión de fluorescencia de L1-4Q a distintos valores de pH ($\lambda_{ex} = 350$ nm). (Derecha) Diagrama de distribución de especies junto a la variación en máximo de emisión en función del pH ($\lambda_{em} = 425$ nm). $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	149
Figura 6.10. Secuencia de protonación propuesta para L1-4Q	150
Figura 6.11. Poliaminas L1-A , L1 y <i>pytren-A</i>	151
Figura 6.12. (Izquierda) Variación en el espectro de emisión de fluorescencia de L1-A a distintos valores de pH ($\lambda_{ex} = 371$ nm). (Derecha) Diagrama de distribución de especies junto a la variación en el máximo de emisión en función del pH ($\lambda_{em} = 418$ nm). $[L] = 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	153
Figura 6.13. Secuencia de protonación propuesta para L1-A	154

Figura 7.1. Representación de tipo “ <i>cartoon</i> ” para (arriba) la enzima CuZnSOD citoplasmática (SOD tipo 1) y para (abajo) la enzima MnSOD presente en la mitocondria (SOD tipo 2), junto con los entornos de coordinación. Las esferas de coordinación de los centros metálicos se completan en disolución con una molécula de H ₂ O.	159
Figura 7.2. Ejemplo de algunos compuestos obtenidos en el GQS-UV cuyos complejos de Cu(II) y Mn(II) presentan actividad SOD.	160
Figura 7.3. Compuestos obtenidos en la tesis para la evaluación de su capacidad para actuar como miméticos de la CuZnSOD y la MnSOD.	161
Figura 7.4. Poliaminas L1 , L2 y L3	164
Figura 7.5. Representación del posible modo de coordinación del Cu(II) en las especies [CuH ₃ L] ⁵⁺ y [CuH ₂ L] ⁴⁺ para L1 y L3	168
Figura 7.6. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para L1 , L2 y L3 . Calculados para relaciones molares Cu(II):L 1:1. [L] = 10 ⁻³ M. Cargas omitidas.	170
Figura 7.7. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para L1 , L2 y L3 . Calculados para relaciones molares Cu(II):L 2:1. [L] = 10 ⁻³ M. Cargas omitidas.	171
Figura 7.8. (Arriba, izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1 1:1 a distintos valores de pH. (Arriba, derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L1 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 270 nm. (Abajo) Diagrama de distribución para el sistema Cu(II): L1 1:1 junto a la variación en el máximo de absorbancia de la banda d-d. [L] = 5x10 ⁻⁴ M. Cargas omitidas.	173
Figura 7.9. Representación del posible modo de coordinación del Cu(II) en las especies [CuH ₂ L] ⁴⁺ y [CuL] ²⁺ para L1	173
Figura 7.10. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L1 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 270 nm. [L] = 5x10 ⁻⁴ M. Cargas omitidas.	174
Figura 7.11. Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L1 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 645 nm. [L] = 5x10 ⁻⁴ M. Cargas omitidas.	174
Figura 7.12. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L2 1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L2 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. [L] = 5x10 ⁻⁴ M. Cargas omitidas.	175
Figura 7.13. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L2 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema	

Cu(II): L2 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 264 nm, [L] = 5×10^{-4} M. Cargas omitidas.	176
Figura 7.14. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L3 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L3 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. [L] = 5×10^{-4} M. Cargas omitidas.	177
Figura 7.15. Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2\text{HL3Br}_2]^{3+}$. Los átomos de hidrógeno y los iones perclorato han sido omitidos.	178
Figura 7.16. Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2\text{L3Cl}_2]^{2+}$. Los átomos de hidrógeno y los iones perclorato han sido omitidos.	180
Figura 7.17. Entornos de coordinación del Cu(II) presentes en las distintas estructuras cristalinas analizadas, en rojo los planos ecuatoriales definidos para cada una de las geometrías de coordinación.	182
Figura 7.18. Variaciones en las geometrías de coordinación de los complejos $[\text{Cu}_2\text{HL3Br}_2]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L3Cl}_2]^{4+}$, obtenidos a distintos valores de pH.	183
Figura 7.19. Poliaminas L1 , L2 y L3	184
Figura 7.20. Diagramas de distribución de los sistemas Mn(II):L para L1 , L2 y L3 . Calculados para relaciones molares Mn(II):L 1:1. [L] = 10^{-3} M. Cargas omitidas.	187
Figura 7.21. Diagrama de distribución para el sistema Mn(II): L3 . Calculado para relación molar Mn(II):L 2:1. [L] = 10^{-3} M. Cargas omitidas.	188
Figura 7.22. Poliaminas L1 , L2 y L3	189
Figura 7.23. Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para L1 , L2 y L3 . Calculado para relaciones molares Zn(II):L 1:1. [L] = 1×10^{-3} M. Cargas omitidas.	191
Figura 7.24. Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para L1 , L2 y L3 . Calculados para relaciones molares Zn(II):L 2:1. [L] = 10^{-3} M. Cargas omitidas.	193
Figura 7.25. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):Zn(II): L3 1:1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):Zn(II): L3 1:1:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. [L] = 5×10^{-4} M. Cargas omitidas.	195
Figura 7.26. Estructura cristalina del catión $[\text{CuZnL3Cl}_2]^{2+}$. Los átomos de hidrógeno y los aniones perclorato han sido omitidos.	196
Figura 7.27. (Izquierda) Imagen TEM-EDX de varios monocristales de $[\text{CuZnL3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$. (Derecha) Espectro EDX de las tres experimentos.	197

Figura 7.28. Entornos de coordinación de Zn1 y Cu1 en $[\text{CuZnL3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$, en rojo los planos ecuatoriales definidos para cada una de las geometrías de coordinación.	198
Figura 7.29. Poliaminas L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q	200
Figura 7.30. Representación de pCu(II) frente al pH de los derivados de L1 (negro); L1-2Py (rojo), L1-3Py (verde) y L1-4Q (lila). Calculados a partir de las constantes de estabilidad para Cu(II):L 1:1 y 2:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	203
Figura 7.31. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q . Calculados para relaciones molares Cu(II):L 1:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.	204
Figura 7.32. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q . Calculados para relaciones molares Cu(II):L 2:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.	205
Figura 7.33. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1-2Py 1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución para el sistema Cu(II): L1-2Py 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	206
Figura 7.34. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1-2Py 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L1-2Py 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 300 nm, $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	207
Figura 7.35. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1-3Py 1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para Cu(II): L1-3Py 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 300 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	207
Figura 7.36. (Arriba) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1-3Py 2:1 a distintos valores de pH. (Abajo) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L1-3Py 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 300 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	208
Figura 7.37. (Arriba) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1-4Q 1:1 a distintos valores de pH. (Abajo, Izquierda) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II): L1-4Q 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 273 nm. (Abajo, Derecha) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II): L1-4Q 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 315 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	209
Figura 7.38. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II): L1-4Q 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II): L1-4Q 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 266 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.	210

Figura 7.39. Porcentaje de supervivencia de células VERO tratadas con L1 , L2 y L3 junto con los correspondientes complejos de Cu(II) a relaciones Cu(II):L 1:1 y 2:1. Concentraciones de 10, 50 y 100 μM . Incubadas durante 48 horas a 37°C.	211
Figura 7.40. Porcentaje de supervivencia de células VERO tratadas con L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q junto con los correspondientes complejos de Cu(II) a relaciones Cu(II):L 1:1 y 2:1. Concentraciones de 10, 50 y 100 μM . Incubadas durante 48 horas a 37°C.	212
Figura 7.41. Porcentaje de supervivencia de células VERO tratadas con L1 y L3 junto con los correspondientes complejos de Mn(II) a relaciones Mn(II):L 1:1 y 2:1. Concentraciones de 10, 50 y 100 μM . Incubadas durante 48 horas a 37°C.	213
Figura 7.42. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con L1 y L2 para relaciones molares Cu(II):L 1:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	216
Figura 7.43. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con L1 y L2 para relaciones molares Cu(II):L 2:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	217
Figura 7.44. (Izquierda) Voltamperograma cíclico del sistema de Cu(II) con L3 para relación molar Cu(II):L 1:1. (Derecha) Voltamperograma cíclico del sistema de Cu(II) y Zn(II) con L3 para relación molar Cu(II):Zn(II):L 1:1:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	218
Figura 7.45. Voltamperogramas cíclicos del sistema de Cu(II) con L3 para relación molar Cu(II):L 2:1. Velocidades de barrido de 500, 250, 100 y 50 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	219
Figura 7.46. Gráficos Cottrell obtenidos a partir de los datos cronoamperométricos registrados tras la aplicación de un paso potencial de -0.60 V para los sistemas de L1 y L3 para relaciones molares Cu(II):L 2:1. NaCl 0.15 M y pH 7.4. $[\text{L}] = 2 \times 10^{-3}$ M.	221
Figura 7.47. Voltamperogramas cíclicos del sistema de Mn(II) con L1 para relación molar Mn(II):L 1:1. Velocidades de barrido de 500, 250, 100 y 50 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	222
Figura 7.48. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Mn(II) con L3 para relaciones molares (derecha) Mn(II):L 1:1 y (izquierda) Mn(II):L 2:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.	223
Figura 7.49. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con L1-2Py y L1-3Py para relaciones molares Cu(II):L 1:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M.	225
Figura 7.50. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con L1-2Py y L1-3Py para relaciones molares Cu(II):L 2:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M.	226

Figura 7.51. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) para L1-4Q a relaciones molares (izquierda) Cu(II):L 1:1 y (derecha) Cu(II):L 2:1. Velocidades de barrido de 500, 250, 100 y 50 mV/s. [L] = $5 \cdot 10^{-4}$ M.	227
Figura 7.52. Ensayos de crecimiento de las cepas deficientes en SOD1 tratadas con los ligandos libres L1 y L3 junto a los correspondientes complejos mononucleares y binucleares Cu(II) y el complejo heterobinuclear de Cu(II) y Zn(II) de L3 . [L] = 10^{-5} M.	235
Figura 7.53. Ensayos de crecimiento de las cepas deficientes en SOD1 tratadas con los ligandos libres L1-2Py , L1-3Py y L1-4Q junto a los correspondientes complejos de Cu(II) para relaciones molares Cu(II):L 2:1. [L] = 10^{-5} M.	236
Figura 8.1. Elementos estructurales de los nucleótidos más comunes.	242
Figura 8.2. Ejemplo de la estructura primaria para la secuencia de ADN 5'-ACGTG-3'.	244
Figura 8.3. (a) Representación de las asociaciones entre los pares de bases A-T y G-C en el ADN. (b) Tipo de estructuras secundarias adoptadas por una monohebra de ADN o ARN.	245
Figura 8.4. Elementos estructurales más comunes del ADN: estructuras de doble hélice tipo A, B y Z.	246
Figura 8.5. Elementos estructurales de los ácidos nucleicos derivados de asociaciones de tipo no-canónicas entre los pares de bases: cuarteto-G, motivos-i, H-ADN y unión de "holliday".	247
Figura 8.6. Diferencias estructurales entre las conformaciones de doble hélice tipo A y tipo B.	248
Figura 8.7. Ligandos seleccionados para el estudio de su interacción con el <i>ctADN</i> y el <i>poliA-poliU</i>	249
Figura 8.8. Número promedio de grupos amino protonados para los ligandos libres y los correspondientes complejos metálicos de Zn(II) para relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1, a pH 7.4.	250
Figura 8.9. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m) para el <i>ctADN</i> y el <i>poliA-poliU</i> tras la adición de L1 y L3 a distintas relaciones [L]/[polinucleótido] (<i>r</i>).	252
Figura 8.10. Indicadores seleccionados <i>EB</i> y <i>DAPI</i>	253
Figura 8.11. Perfiles de variación en la intensidad de emisión de fluorescencia (λ_{ex} = 520) obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de <i>EB</i> para <i>ctADN</i> por adición de (a) L1 y (c) L3 , y para <i>poliA-poliU</i> por adición de (b) L1 y (d) L3 . [EB] = 3×10^{-6} M. NaCac 50 mM, pH = 7.4.	254
Figura 8.12. Variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia (λ_{ex} = 520 nm, λ_{em} = 610 nm) para (•) <i>ctADN</i> y (■) <i>poliA-poliU</i> , mediante la valoración con (rojo) L1 y (negro) L3 . [EB] = 3×10^{-6} M. NaCac 50 mM, pH = 7.4.	255

Figura 8.13. Perfiles de variación en la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$) obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de <i>DAPI</i> para <i>ctADN</i> por adición de (a) L1 y (c) L3 , y para <i>poliA-poliU</i> por adición de (b) L1 y (d) L3 . [<i>DAPI</i>] = 10^{-6} M . NaCac 50 mM, pH = 7.4.	256
Figura 8.14. Variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 486 \text{ nm}$) para (•) <i>ctADN</i> y (■) <i>poliA-poliU</i> , mediante la valoración con (rojo) L1 y (negro) L3 . [<i>DAPI</i>] = 10^{-6} M . NaCac 50 mM, pH = 7.4.	257
Figura 8.15. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m) para el <i>poliA-poliU</i> tras la adición de L1 y L3 junto a los complejos metálicos de Zn(II) para relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1. [L]/[polinucleótido] = 0.05.	261
Figura 8.16. Espectros de emisión de fluorescencia para los ensayos de desplazamiento con (a) <i>EB</i> y (b) <i>DAPI</i> , [L]/[indicador] = 1.	262
Figura 8.17. Ligandos seleccionados para el estudio de su interacción con ácidos nucleicos de secuencia específica.	263
Figura 8.18. Representación del equilibrio conformacional entre la forma hibridada y la no hibridada para las secuencias <i>hp 1-4</i>	265
Figura 8.19. Variación en los espectros de emisión de fluorescencia de L1-A tras la adición de (a) <i>hp 1</i> , (b) <i>hp 2</i> , (c) <i>hp 3</i> y (d) <i>hp 4</i> ($\lambda_{\text{exc}} = 371 \text{ nm}$). Las gráficas internas presentan la intensidad emisión a 418 nm (<i>hp 2-3</i>) y 430 (<i>hp 1</i>) respecto a [hp]/[L]. [L] = $5 \times 10^{-6} \text{ M}$	267
Figura 8.20. Variación en los espectros de emisión de fluorescencia de L-A tras la adición de (a) <i>hp 1</i> , (b) <i>hp 2</i> , (c) <i>hp 3</i> y (d) <i>hp 4</i> ($\lambda_{\text{exc}} = 371 \text{ nm}$). Las gráficas internas presentan la intensidad de emisión a 418 nm respecto a [hp]/[L]. [L] = $5 \times 10^{-6} \text{ M}$	268
Figura 8.21. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m) para <i>hp 1-4</i> a distintas relaciones [hp]/[L].	271
Figura 8.22. Datos de DC para (a) las secuencias <i>hp 1-4</i> libres y (b) tras la adición de L1-A , [hp]/[L] = 0.1. [hp] = 10^{-6} M	273
Figura 8.23. Cambios en los espectros de DC para la secuencia <i>hp 1</i> tras la adición de cantidades crecientes de L1-A , L-A y L1 . [hp]/[L] = 0-0.1. [hp] = 10^{-6} M	274
Figura 8.24. Cambios en los espectros de DC para (a) <i>hp 1</i> , (b) <i>hp 2</i> , (c) <i>hp 3</i> y (d) <i>hp 4</i> tras la adición de cantidades crecientes de L1-A . [hp]/[L] = 0-0.1. [hp] = 10^{-6} M	275
Figura 8.25. Cambios en los espectros de DC para (a) <i>hp 1</i> , (b) <i>hp 2</i> , (c) <i>hp 3</i> y (d) <i>hp 4</i> tras la adición de cantidades crecientes de L-A . [hp]/[L] = 0-0.1. [hp] = 10^{-6} M	275

Figura 8.26. Cambios en los espectros de DC para (a) <i>hp 1</i> , (b) <i>hp 2</i> , (c) <i>hp 3</i> y (d) <i>hp 4</i> tras la adición de cantidades crecientes de L1 . $[hp]/[L] = 0-0.1$. $[hp] = 10^{-6}$ M.	276
Figura 8.27. Representaciones tipo <i>cartoon</i> de los cuatro oligonucleótidos estudiados, obtenidas mediante estudios de dinámica molecular, (arriba) vista lateral de la cadena y (abajo) vista axial.	277
Figura 8.28. Vista lateral de las representaciones de tipo <i>cartoon</i> obtenidas a partir de los estudios de dinámica molecular: (rojo) <i>hp 1</i> libre y (amarillo) complejo <i>hp 1-L</i> , para (izquierda) L1-A y (derecha) L-A	279
Figura 8.29. Representación de tipo <i>cartoon</i> del sitio de unión entre L1-A y la secuencia rica en A y T (<i>hp 1</i>). Distancias en Å.	280
Figura 8.30. Representación de tipo <i>cartoon</i> del sitio de unión entre L1-A y la secuencia rica en A y T (<i>hp 1</i>). Distancias en Å.	281
Figura 8.31. Representación de tipo <i>cartoon</i> del sitio de unión entre L-A y la secuencia rica en A y T (<i>hp 1</i>). Distancias en Å.	282
Figura 8.32. Representación de tipo <i>cartoon</i> del sitio de unión entre L-A y la secuencia rica en A y T (<i>hp 1</i>). Distancias en Å.	283
Figura 8.33. Representación de tipo <i>cartoon</i> del sitio de unión entre L1 y la secuencia rica en A y T (<i>hp 1</i>).	284
Figura 8.34. Vista lateral de las representaciones de tipo <i>cartoon</i> obtenidas a partir de los estudios de dinámica molecular para: (rojo) <i>hp 1</i> libre y (amarillo) complejo <i>hp 1-L1</i> . Visión ampliada del sitio de unión entre L1 y <i>hp 1</i>	285
Figura 8.35. Representación del equilibrio conformacional entre la forma hibridada y la no hibridada de las secuencias <i>hp_{CXG}</i>	286
Figura 8.36. Valores de ΔT_m obtenidos para la interacción de L1-A con las secuencias <i>hp_{CXG}</i> para $[hp]/[L] = 1$	288
Figura 8.37. Variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia de L1-A por adición de (a) <i>hp_{CAG}</i> , (b) <i>hp_{CGG}</i> , (c) <i>hp_{CCG}</i> y (d) <i>hp_{CTG}</i> ($\lambda_{exc} = 371$ nm). Las gráficas internas presentan las variaciones en la emisión a 416 (<i>hp_{CGG}</i> , <i>hp_{CCG}</i> y <i>hp_{CTG}</i>) y 428 nm (<i>hp_{CAG}</i>) respecto a $[hp]/[L]$. $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.	289
Figura 8.38. Variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia de L-A tras la adición de (a) <i>hp_{CAG}</i> , (b) <i>hp_{CGG}</i> , (c) <i>hp_{CCG}</i> y (d) <i>hp_{CTG}</i> ($\lambda_{exc} = 371$ nm). Las gráficas internas presentan las variaciones en la emisión a 416 (<i>hp_{CGG}</i> , <i>hp_{CCG}</i> y <i>hp_{CTG}</i>) y 428 nm (<i>hp_{CAG}</i>) respecto a $[hp]/[L]$. $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.	290
Figura 8.39. Fotografía de la emisión en el visible de cuatro viales conteniendo L1-A en presencia de <i>hp_{CAG}</i> , <i>hp_{CGG}</i> , <i>hp_{CCG}</i> o <i>hp_{CTG}</i> ($\lambda_{exc} = 254$ nm). $[hp]/[L] = 2$, $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.	292

Abreviaturas y acrónimos

A	adenina
ADN	ácido desoxirribonucleico
AgCl	cloruro de plata
ARN	ácido ribonucleico
C	citosina
CH₂Cl₂	diclorometano
c.a.	concentración aproximada
ctADN	ácido desoxirribonucleico de timo de ternera
d	doblete (RMN)
DC	dicroísmo circular
DCI	dicroísmo circular inducido
EB	bromuro de etidio
ESI	ionización por electrospray
EtOH	etanol
fs	femtosegundo
G	guanina
h	hora
HCl	ácido clorhídrico
HBr	ácido bromhídrico
I.F.	intensidad de fluorescencia
IUPAC	Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada
J	constante de acoplamiento (RMN)
K	kelvin
KCl	cloruro potásico
K₂CO₃	carbonato potásico
M	molar
m/z	relación masa/carga
MeOH	metanol
MF	monoformazano
mg	miligramo
mL	mililitro
mM	milimolar
mmol	milimol
MS	espectroscopía de masas

MTT	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NaOH	hidróxido sódico
Na₂SO₄	sulfato sódico
NaCac	cacodilato de sodio
NaCl	cloruro sódico
NBT	azul de nitrotetrazolio
NHE	electrodo normal de hidrógeno
nm	nanómetro
ns	nanosegundo
°C	grados celsius
pb	pares de bases
PDB	protein data bank
PET	transferencia electrónica fotoinducida
PhOH	fenol
poliA-poliU	ácido poliadenílico-poliuridílico (sal sódica)
poli(dAT)₂	ácido poli(desoxiadenílico-timidínico) (sal sódica)
poli(dGC)₂	ácido poli(desoxiguanílico-citidílico) (sal sódica)
ppm	partes por millon
PTS	sistema de transporte de poliaminas
q	cuarteto (RMN)
RMN	resonancia magnética nuclear
s	simplete (RMN)
SOD	superóxido dismutasa
T	timina
t	triplete (RMN)
tren	tris(2-aminoetil)amina
TRIS	tris(hidroximetil)aminometano
Ts	tosilo (4-toluensulfonilo)
u.a.	unidades arbitrarias
UV-Vis	ultravioleta-visible
vide infra	véase abajo
vide supra	véase arriba
δ	desplazamiento químico
λ	lamda
μl	microlitro
%	porcentaje (tanto por ciento)

1. Introducción

Capítulo 1

1.1. Química supramolecular

La química supramolecular, definida por Jean-Marie Lehn como “*la química más allá de las moléculas*”, es un campo multidisciplinar que engloba el estudio de las propiedades químicas, físicas y biológicas de las especies de mayor complejidad que las mismas moléculas, las cuales se mantienen unidas a través de interacciones intermoleculares.[1] Al contrario de como sucede en la química molecular, la cual se basa en el establecimiento de enlaces de tipo covalente, la química supramolecular estudia las entidades resultantes de la asociación de dos o más especies químicas unidas mediante fuerzas de tipo no covalente.

Breve historia de la química supramolecular

Los antecedentes teóricos que sentaron las bases de la química supramolecular se remontan a la segunda mitad del siglo XIX. En 1873 Johannes Diderik van der Waals postuló la existencia de fuerzas de tipo intermolecular (entre grupos de distintas moléculas) y posteriormente, en 1883, Alfred Werner introdujo el concepto de la química de coordinación.[2] En la misma época, año 1894, Hermann Emili Fischer acuñó el concepto conocido como “modelo de la llave y la cerradura”. Este mecanismo, que se basa en los fenómenos de complementariedad estérica entre el sustrato y el centro activo de las enzimas, fue propuesto para describir la interacción específica enzima-sustrato.[3]

Sin embargo, no fue hasta la década de 1960 cuando se produjo el avance definitivo en el campo de la química supramolecular. El descubrimiento del *rol* (papel) biológico esencial de cationes tales como Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} en los procesos eléctricos (transmisión nerviosa) y musculares (contracción muscular),[4][5] junto al de un conjunto de antibióticos naturales (valinomicina, gramidicina y nonactina) que presentaban una elevada afinidad hacia distintos cationes alcalinos y a su vez los transportaban a través de membrana,[6][7][8] sirvió como inspiración

para que un conjunto de científicos desarrollaran sistemas sintéticos con propiedades análogas. En 1967 el químico americano Charles John Pedersen publicó la síntesis de una serie de poliéteres cíclicos, denominados como éteres corona, que tenían la capacidad de coordinar metales alcalinos de forma selectiva (figura 1.1).[9] Posteriormente el trabajo de C. J. Pedersen fue expandido por Donald James Cram mediante la síntesis de receptores de topología tridimensional capaces de encapsular al ión metálico (figura 1.1), lo que conducía a la obtención de complejos metálicos con una mayor estabilidad.[10] En la misma época, el químico francés Jean-Marie Lehn propuso el diseño de una serie de compuestos capaces de transportar cationes a través de membranas celulares, mimetizando así a los antibióticos ciclopeptídicos anteriormente mencionados. El desarrollo de este tipo de moléculas condujo por primera vez a la obtención de ligandos macrobíclicos, denominados criptandos, en los que dos átomos de nitrógeno cabezas de puente están conectados por cadenas de tipo poliéter (figura 1.1).[11][12]

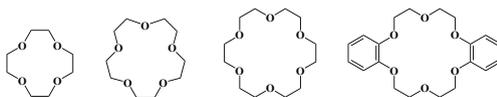
Premio Nobel en Química, 1987



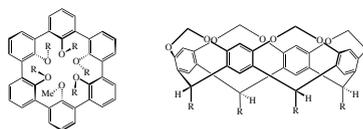
“for their development and use of molecules with structure-specific interactions of high selectivity”



C. J. Pederson



D. J. Cram



J.-M. Lehn

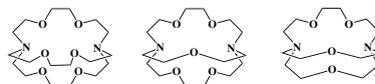


Figura 1.1. Ganadores del Premio Nobel en Química, 1987.

La relevancia del trabajo de estos tres científicos fue reconocida en 1987 mediante la concesión del Premio Nobel en Química (figura 1.1), por sus trabajos pioneros en el campo de la química huésped-anfitrión (del inglés host-guest), más específicamente “*por el desarrollo y uso de moléculas que presentan una alta selectividad debida a interacciones estructuralmente específicas*”.

Posteriormente, la química supramolecular ha desarrollado sus propias bases teóricas así como un lenguaje propio, impulsado en gran medida por el trabajo posterior llevado a cabo por J.-M. Lehn.[13] Los fundamentos de esta disciplina, junto a los principales avances producidos, han sido recopilados recientemente en la enciclopedia “*Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*”. [14]

1.1.1. Aproximación supramolecular a la química médica

Un análisis rápido del conjunto de los procesos involucrados en el correcto funcionamiento de los sistemas biológicos conduce a la conclusión de que la mayoría de las interacciones clave en este tipo de sistemas son de tipo supramolecular.[14] Así pues, dado que el objetivo principal de la química médica es el de influir en este tipo de procesos, resulta esencial profundizar en su estudio para poder aprovechar así estos conocimientos en el diseño de nuevos fármacos.

Para la correcta comprensión del impacto de la química supramolecular en la química médica se procederá a detallar las fuerzas intermoleculares de tipo no covalente responsables de las interacciones a nivel supramolecular junto a los conceptos de reconocimiento molecular y autoensamblaje.

Fuerzas intermoleculares

Como se ha mencionado anteriormente, las especies supramoleculares resultan de la asociación de dos o más moléculas como consecuencia de la suma de diferentes interacciones intermoleculares, tanto atractivas como repulsivas, por lo que resulta conveniente llevar a cabo una breve descripción de las mismas.

La tabla 1.1 recoge los tipos de fuerza no covalentes más importantes junto a las correspondientes energías de disociación y el grado de direccionalidad asociado a cada una. En todos los casos este tipo de fuerzas son más débiles que los enlaces de tipo iónico o covalente, por lo que es común referirse a ellas como “fuerzas débiles”.

Tabla 1.1. Valores aproximados para las energías de disociación de los distintos tipos de enlace en las interacciones no covalentes.[15]

Tipo de interacción	Energía de disociación (kJ/mol)	Direccionalidad
Enlace iónico	350 - 100	No direccional
Enlace de coordinación	300 - 100	Direccional
Ion - dipolo	200 - 50	Poco direccional
Enlace de hidrógeno	120 - 4	Direccional
Catión - π	80 - 5	Direccional
Enlace de halógeno	50 - 10	Direccional
Anión - π	50 - 5	Direccional
Dipolo - dipolo	50 - 5	Poco direccional
Apilamiento π	50 - 2	Direccional
Fuerzas de Van der Waals	< 5	No direccional

Las interacciones ion-dipolo ocurren entre un ion y una molécula neutra que presenta un momento dipolar, pudiendo ser éste permanente o temporal. Un ejemplo es la interacción de un ion alcalino con un éter corona. Por otro lado, las interacciones dipolo-dipolo se producen entre dos moléculas neutras que poseen momento dipolar intrínseco.[16] Este tipo de interacciones son las responsables de las orientaciones de las cadenas hidrocarbonadas que se agregan para formar micelas o bicapas lipídicas (figura 1.5).

Una mención especial merece el enlace de hidrógeno, éste es considerado como una interacción dipolo-dipolo particular en la que existe una interacción atractiva direccional entre un átomo de hidrógeno de una molécula X-H (dador de enlace de hidrógeno), donde el átomo X es más electronegativo que H, y un átomo electrón-atrayente (aceptor de enlace de hidrógeno). Estas asociaciones resultan de elevada importancia en multitud de procesos biológicos. Uno de los ejemplos más representativo lo encontramos en la formación de las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, proceso en el que dos hebras quedan enfrentadas mediante el establecimiento de múltiples enlaces de hidrógeno direccionales entre las bases nucleicas.[17]

Otro tipo de fuerzas que cobran gran relevancia en los sistemas biológicos, y a las cuales se hará mención durante la presente tesis, son las interacciones que involucran sistemas aromáticos extendidos, pudiendo éstas clasificarse en distintas categorías (figura 1.2): apilamiento- π , ión- π (catión- π y anión- π) y XH- π .[18] Este tipo de fuerzas derivan de contribuciones electroestáticas, dipolos inducidos, contribuciones dispersivas y efectos hidrófobos.[19] La interacción por apilamiento- π presenta energías de enlace inferiores a 50 kJ/mol, siendo más intensas en el caso de sistemas en los que está involucrados dos anillos aromáticos, uno electrón deficiente y otro electrón excedente. La presencia de átomos electrón-atrayentes en el anillo aromático conduce a un estado en el que el sistema presenta una menor densidad de carga π . Por otra parte, si algún heteroátomo del anillo aromático está implicado en la coordinación de un ion metálico, o se encuentra alquilado, el carácter π deficiente se acentúa.[20]

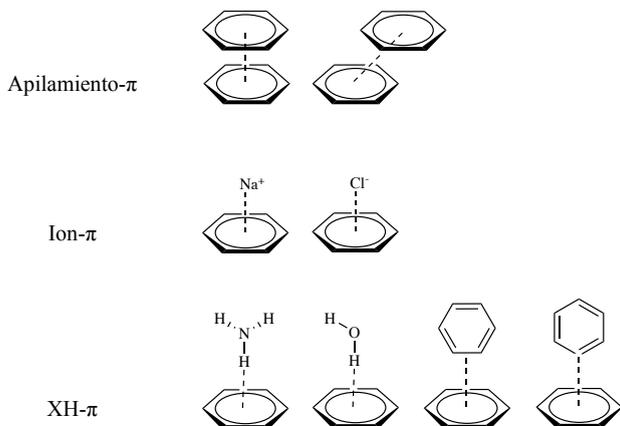


Figura 1.2. Ejemplos de interacciones de tipo no-covalente en las que intervienen anillos aromáticos.

Otro factor a considerar es el entorno en el que se producen este tipo de interacciones. Por lo general, la asociación entre una molécula y su diana biológica tiene lugar en medio acuoso y, por consiguiente, deben tenerse en cuenta los efectos hidrófobos, los cuales gobiernan la asociación de moléculas apolares en disolución acuosa.[21] Así pues, al desplazarse las moléculas de agua presentes en la cavidad como consecuencia de la interacción de la molécula huésped hidrófoba se produce un efecto entrópico favorable (figura 1.3). Dicho proceso puede llegar a compensar el cambio de entropía desfavorable derivado de la inmovilización de la molécula.[14]

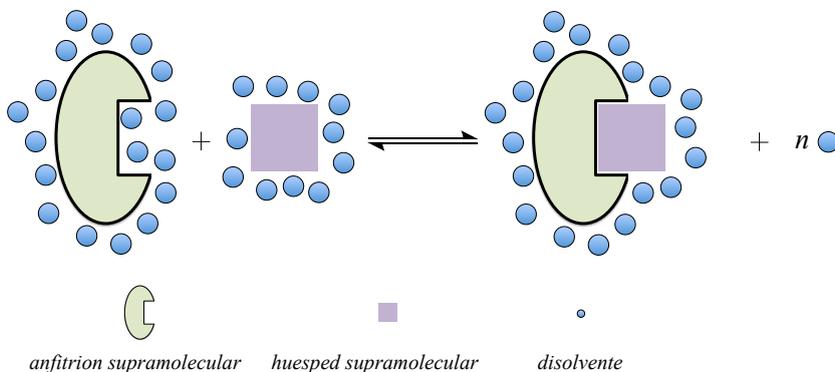


Figura 1.3. Descripción de la química huésped-anfitrión y del desplazamiento de moléculas presentes en la esfera de solvatación producido por la interacción.

Reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular se define como un proceso que engloba tanto la unión como la selección de sustratos específicos por parte de una molécula receptora para realizar una función específica.[14] Se trata de un concepto ampliamente utilizado en el campo de la biología desde que H. E. Fischer planteara la hipótesis de la llave y la cerradura. Este tipo de asociaciones se ha revelado como uno mecanismo clave en una gran variedad de procesos biológicos tales como la formación de membranas lipídicas, el plegamiento de las proteínas, los procesos de replicación del ADN, la actividad de distintos receptores y transportadores de membrana, así como la gran cantidad de procesos catalíticos cuya primera etapa consiste en el reconocimiento específico del sustrato por parte de la enzima.[22]

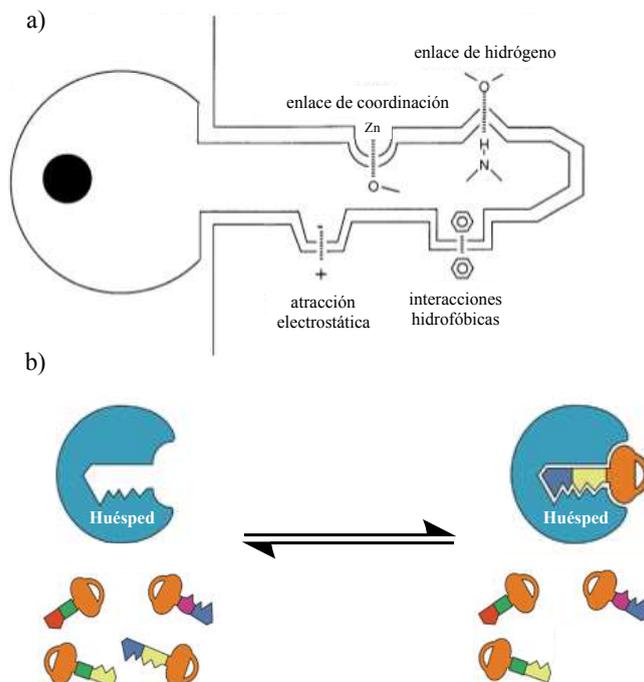


Figura 1.4. Representaciones esquemáticas del concepto de la llave y la cerradura desarrollado por H. E. Fischer. Se presentan (a) las fuerzas que intervienen en el proceso y (b) el concepto de complementariedad entre el huésped y el anfitrión.

En el ámbito de la química supramolecular se expande el concepto de reconocimiento molecular más allá de los sistemas biológicos, definiéndose así el concepto de huésped y anfitrión. Así pues, el aducto (complejo) resultante de la interacción entre el huésped y el anfitrión está constituido por dos o más moléculas, o iones, que se mantienen unidos por medio de fuerzas de tipo no covalente (figura 1.4). En este tipo de procesos no sólo es necesario que exista una elevada afinidad sino que a su vez debe existir selectividad por un determinado sustrato (figura 1.4). Esto último se consigue por medio de los fenómenos conocidos como preorganización y complementariedad.

El principio de preorganización establece que cuanto más organizadas estén inicialmente las moléculas implicadas en la interacción más estable será el complejo resultante, mientras que la complementariedad implica una disposición estereoelectrónica adecuada de los distintos sitios de unión del anfitrión respecto a los de la molécula huésped.[23][24][25]

Autoensamblaje

Se entiende por autoensamblaje la formación de una estructura final por medio de la asociación directa y espontánea de sus componentes individuales. Para que este proceso se produzca éstos deben encontrarse en una mezcla que presente las condiciones adecuadas (concentración, pH, fuerza iónica, temperatura etc.). Por otro lado, este proceso debe ser completamente reversible y la estructura final ser el producto termodinámicamente más estable.[26]

Al igual que los procesos de reconocimiento molecular, el fenómeno de autoensamblaje está involucrado en una gran variedad de procesos biológicos, lo que permite alcanzar el grado de complejidad y organización asociado a estos sistemas. Algunos ejemplos son el establecimiento de las estructuras secundarias de los ácidos nucleicos, la formación de membranas

fosfolípicas así como el plegamiento de las proteínas en su estructura tridimensional (figura 1.5).

Las moléculas individuales a partir de las cuales se obtiene la estructura compleja poseen de forma intrínseca toda la información necesaria para que este proceso tenga lugar. El reto para la extrapolación de este tipo de procesos consiste en el diseño y la síntesis de nuevos componentes moleculares, “*building blocks*”, que contengan codificada toda la información necesaria (estructura, carga, polarizabilidad etc.) para que se lleve a cabo la autoorganización de forma espontánea. En la figura 1.5 se observa cómo en función de su información intrínseca, así como de las condiciones de la mezcla, el autoensamblaje de las distintas unidades básicas puede conducir a la obtención de una estructura final u otra.

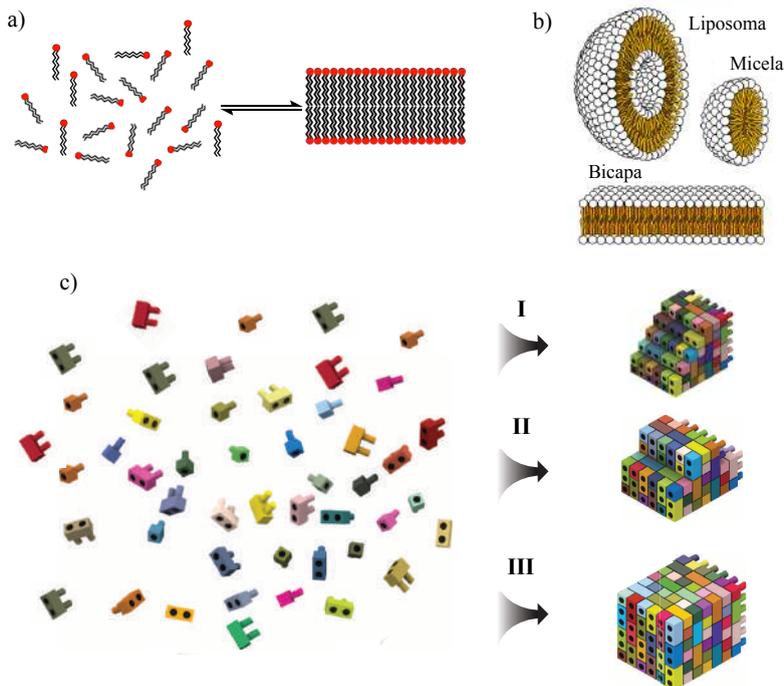


Figura 1.5. (a) Formación de una bicapa fosfolípica a partir de los grupos individuales (fosfolípidos). (b) Estructuras adoptadas mediante el proceso de ensamblaje de los fosfolípidos, en función de las condiciones externas o sus propiedades. (c) Formación de distintas estructuras finales a partir de las unidades básicas, “*building blocks*”.

1.2. Aplicaciones biomédicas de las poliaminas

En el presente apartado se procederá a describir brevemente las poliaminas de origen natural y sus *roles* biológicos (*Poliaminas en los sistemas biológicos*, apartado 1.2.1), así como algunas de las aplicaciones biomédicas de poliaminas sintéticas descritas durante las últimas décadas. Más específicamente, se hará una breve descripción de las aplicaciones de este tipo de moléculas en el campo de la defensa contra el estrés oxidativo (*Compuestos poliamínicos como miméticos SOD*, apartado 1.2.2), así como de su uso para la interacción con secuencias de ácidos nucleicos enfocado a la obtención de nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico (*Ácidos nucleicos como diana supramolecular*, apartado 1.2.3).

1.2.1. Poliaminas en los sistemas biológicos

Durante las últimas décadas se ha visto que las poliaminas desarrollan un papel esencial en una gran variedad de procesos biológicos directamente involucrados en el crecimiento y desarrollo celular,[27] estando presentes éstas en concentraciones altas (mM) en prácticamente todas las células.

Las poliaminas de pequeño peso molecular juegan un papel clave en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, en procesos de regulación de expresión génica así como en el control de la actividad de ciertos canales de iones y en la modulación de la actividad quinasa.[28] Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que las poliaminas naturales desarrollan un *rol* esencial en los procesos de división celular, alcanzándose concentraciones elevadas de éstas en condiciones de alta división celular tales como procesos de crecimiento tumoral o en la fibrosis quística.[27] Por todo ello, y con el objetivo de mantener la concentración de las poliaminas en niveles intracelulares, las células presentan una respuesta rápida y significativa para regular su biodisponibilidad mediante la actuación de un

conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y degradación de las mismas (ornitina descarboxilasa, aminopropil transferasas, acetil transferasas, poliamina oxidasas, etc.).[27]

La naturaleza, composición y concentración de las poliaminas varía entre organismos (figura 1.6). Las poliaminas predominantes en mamíferos, denominadas como “poliaminas naturales”, son la putrescina, la espermidina y la espermina. Todas ellas son moléculas de bajo peso molecular que se encuentran cargadas positivamente a pH fisiológico (figura 1.6).[27] Las poliaminas biogénicas interactúan con los surcos del ADN y del ARN mediante fuerzas de tipo electrostático así como por medio del establecimiento de enlaces de hidrógeno. Dicha interacción favorece la condensación del ADN protegiéndolo así de agentes dañinos tales como radicales ionizantes y especies reactivas de oxígeno.[29] A su vez, la interacción de este tipo de moléculas con el ARN es uno de los procesos de regulación génica más extendidos; esto es así ya que dicha interacción produce cambios conformacionales en la secuencia de los ácidos nucleicos imposibilitando su interacción con las proteínas encargadas de la traducción.[30] Sin embargo, a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo el papel preciso de los distintos tipos de poliaminas en los sistemas vivos no se ha descrito aún en su totalidad.

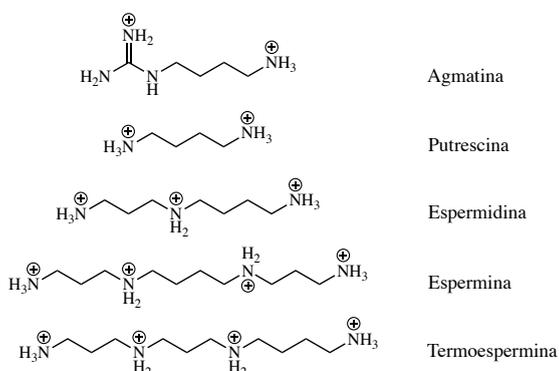


Figura 1.6. Ejemplo de poliaminas biogénicas. Grupos amino protonados a pH 7.4.
[31]

La alimentación y las bacterias gastrointestinales son las principales fuentes de poliaminas exógenas.[30] La internalización de este tipo de moléculas se lleva a cabo mediante el proceso conocido como sistema de transporte de poliaminas (STP), aunque cabe destacar que a día de hoy no se ha resuelto completamente su mecanismo. El STP se compone de un conjunto de permeasas, sistemas de transporte de membrana, específicas para distintos sustratos. Tanto la identidad como composición de este tipo de proteínas integrales de membrana no se ha descrito en su totalidad. Por otro lado, se ha determinado que con frecuencia la actividad del STP aumenta de forma significativa con la transformación oncogénica de las células, generada por la activación de un protooncogen, encontrándose estrechamente relacionado este proceso con un aumento significativo de la presencia de poliaminas en el interior de la célula. [32] De ello se deduce que este mecanismo de transporte de poliaminas se encuentra sobreexpresado en la gran mayoría de células cancerígenas, lo que abre un campo para la aplicación de las poliaminas como agentes antitumorales.

1.2.2. Compuestos poliamínicos como miméticos SOD

Se entiende por estrés oxidativo la generación de cantidades no metabólicas de distintas especies reactivas caracterizadas por poseer uno o más electrones desapareados, algunos ejemplos son el superóxido (O_2^-), el óxido nítrico (NO), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito ($ONOO^-$). El desequilibrio *redox* entre estas especies y los distintos sistemas antioxidantes endógenos se traduce en un daño oxidativo a las moléculas biológicas así como en un deterioro en las vías de señalización.[33] El estrés oxidativo está relacionado con una gran variedad de dolencias tales como: patologías del sistema nervioso central (esclerosis lateral amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson, trastorno bipolar y enfermedad de Alzheimer)[34] [35][36][37], afecciones cardiovasculares y pulmonares,[38][39][40] diabetes,[41] enfermedades oculares,[42] envejecimiento,[43] cáncer [44] y lesiones por radiación.[45]

En el caso específico del superóxido, O_2^- , éste se genera cuando la molécula de O_2 se reduce por un electrón. Pequeñas cantidades de este radical se producen en una gran variedad de procesos metabólicos de las células aeróbicas; algunos ejemplos son la respiración celular, el metabolismo del ácido araquidónico y la actividad de la enzima xantina oxidasa,[46] por lo que existe una producción celular baja pero continua de O_2^- . A su vez, también se genera O_2^- como resultado de la activación de los fagocitos en respuesta a procesos de infección (neutrófilos, monocitos, macrófagos etc.).[47] Si bien el radical O_2^- dismuta de forma espontánea, esta reacción no es lo suficientemente rápida como para mantener su concentración intracelular en niveles no tóxicos.[48] Por este motivo los organismos han evolucionado generando una familia de metaloenzimas protectoras, llamadas superóxido dismutasas (SOD), las cuales catalizan de forma eficiente la reacción de dismutación del O_2^- . Las enzimas SOD se clasifican en función del tipo de metal presente en su centro activo; se han determinado enzimas con cobre y zinc (CuZnSOD), con manganeso (MnSOD), con hierro (FeSOD) y con níquel (NiSOD) (figura 1.7).[49]

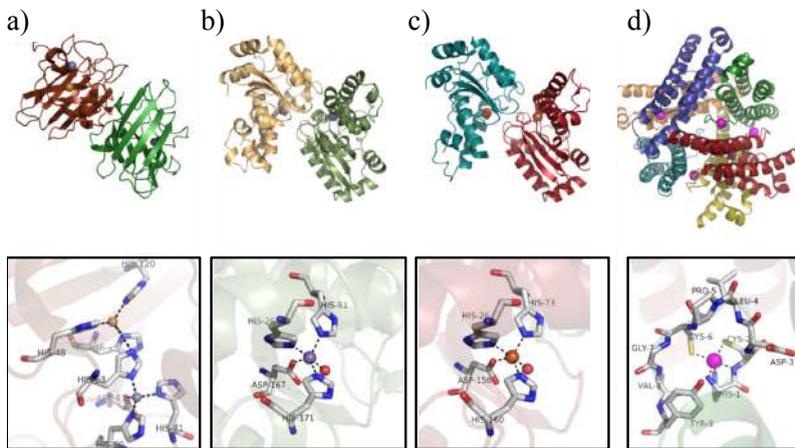


Figura 1.7. Comparación de las estructuras cuaternarias (arriba) y los centros activos (abajo) de distintas SOD; (a) Cu₂Zn₂SOD humana (PDB, 1pu0), (b) MnSOD (PDB, 1vew), (c) FeSOD de *E. Coli* (PDB, 1isa) y (d) NiSOD de *S. Coeliocor* (PDB, 1t6u).

Las MnSOD y las FeSOD, que se localizan respectivamente en las mitocondrias y en algunas células procariotas, están emparentadas evolutivamente por lo que presentan una alta similitud estructural. Por otro lado, las NiSOD se encuentran en algunas células procariotas mientras que las CuZnSOD están presentes en prácticamente todas las células eucariotas.[49]

En el caso de los mamíferos se ha determinado la presencia de enzimas CuZnSOD en el citosol y en el exterior celular, así como de MnSOD en el interior de las mitocondrias.[50][51] La mayor parte de la producción de O₂⁻ intracelular procede de la cadena respiratoria mitocondrial, en donde a lo largo de los distintos ciclos encargados del suministro de la energía necesaria para la actividad celular, por medio de la conversión de ADP a ATP, un electrón pueden reducir a la molécula de O₂ generando esta especie reactiva de oxígeno.[52] Por ello estos orgánulos juegan un papel crítico en los procesos de estrés oxidativo.[53]

A continuación se describirán brevemente las metaloenzimas con mayor presencia en los mamíferos, CuZnSOD y MnSOD, junto a sus correspondientes ciclos catalíticos. Por otro lado, se discutirán los factores

más importantes que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar compuestos poliamínicos como miméticos SOD, así como algunos ejemplos encontrados en la literatura.

Superóxido dismutasas de cobre y zinc (CuZnSOD)

Este tipo de enzimas fueron las primeras SOD en ser aisladas y estudiadas. Ya en 1932 Taddeus Mann y David Keilin aislaron una enzima azul de cobre de eritrocitos bovinos a la que denominaron hemocupreína y determinaron su contenido en cobre (0.34 %), así como su peso (24 kDa). [54] Años más tarde se aislaron otro conjunto de enzimas con características similares procedentes de eritrocitos humanos, las cuales recibieron el nombre de eritrocupreína de cerebro, cerebrocupreína, y eritrocupreína de hígado, hepatocupreína.[55][56] Sin embargo, no se tuvo constancia de la función biológica de este tipo de metaloenzimas hasta que Joe Milton McCord y Irwin Fridovich determinaron su función en 1969. El trabajo de estos dos científicos concluyó que este tipo de macromoléculas eran las encargadas de catalizar la reacción de dismutación del O_2^- , pasando a denominarse como superóxido dismutasas de cobre y zinc (CuZnSOD).[57]

La mayoría de las enzimas de cobre y zinc son dímeros de unos 32 kDa, por lo que comúnmente se denominan como Cu_2Zn_2SOD . A modo de ejemplo, la Cu_2Zn_2SOD de eritrocito bovino (PDB, 2SOD) está compuesta por dos subunidades idénticas de unos 16 kDa. Cada una de las subunidades CuZnSOD presenta una estructura de tipo barril- β achatado integrada por un total de ocho láminas- β antiparalelas. A su vez, ambas subunidades presentan una cavidad cónica con un diámetro de 24 Å en la parte externa y de 4 Å en la parte interna, situándose el centro activo al final de esta cavidad. Las cadenas laterales que forman las paredes de las cavidades están compuestas por aminoácidos cargados positivamente, lo que genera un gradiente eléctrico que atrae a moléculas cargadas negativamente hacia el centro activo.[58] Cada uno de los centros activos presenta un átomo de cobre y uno

de zinc unidos por una histidina (His-61), cuyo grupo imidazol desprotonado actúa como ligando puente bis-monodentado entre los centros metálicos (figura 1.8). En su forma oxidada la esfera de coordinación del cobre presenta, además del imidazolato puente, tres residuos de histidina (His-44, His-46 y His-118) así como una molécula de agua débilmente unida al centro metálico, adoptando una geometría de coordinación de pirámide de base cuadrada distorsionada (figura 1.8). Cercano al cobre se encuentra la cadena lateral de la Arg-141, la cual está cargada positivamente y cuya función parece ser la de ayudar en el proceso de transferencia de protones, a la vez que fija la orientación del O_2^- en el centro activo. Por otro lado, la esfera de coordinación del zinc se compone de dos histidinas (His-69 y His-78) y un grupo aspartato (Asp-81), adquiriendo una geometría de coordinación tetraédrica distorsionada (figura 1.8).

En cuanto a la actividad catalítica, el cobre actúa como centro electroactivo mientras que el zinc parece desempeñar una función meramente estructural. Esta hipótesis se verificó experimentalmente ya que al sustituir el zinc por otro catión divalente (cobre, cobalto, cadmio o mercurio) no se observó una pérdida de actividad significativa.[58]

En la figura 1.8 se muestra el mecanismo propuesto para el ciclo catalítico de las CuZnSOD, el cual consta de una etapa de oxidación del metal seguida por otra de reducción, junto a las correspondientes etapas intermedias de transferencia de protones, entrada de sustratos y salida de productos. Más específicamente, el primer paso consiste en la difusión del O_2^- hasta el centro activo, guiado por el gradiente de potencial eléctrico generado por los aminoácidos que conforman las paredes de la cavidad.

Como se ha mencionado anteriormente, el resto Arg-141 juega un papel relevante ya que no sólo atrae al O_2^- sino que lo dispone espacialmente de forma adecuada para las posteriores etapas. Una vez coordinado el superóxido al metal se produce una transferencia electrónica mediante un mecanismo de esfera interna; el O_2^- se oxida a O_2 mientras que por otro lado el estado de oxidación del cobre pasa de +2 a +1. Posteriormente, el oxígeno

molecular generado se libera al medio a la vez que el grupo imidazol puente se protona permaneciendo coordinado al Zn(II) como ligando monodentado (figura 1.8). El siguiente paso consiste en la fijación de un segundo O_2^- por parte del centro metálico; este proceso viene acompañado de una reducción del radical por un mecanismo de esfera interna regenerándose así el cobre en su estado de oxidación inicial +2. Paralelamente se produce la transferencia del protón de la His-61 al superóxido, dando lugar a la formación de la especie HO_2^- . Una vez liberado el anión HO_2^- éste se protona, obteniéndose así la especie H_2O_2 . Como consecuencia directa de esta etapa catalítica se restablece el puente imidazolato entre el cobre y el zinc, regenerándose así la geometría de coordinación inicial (figura 1.8).

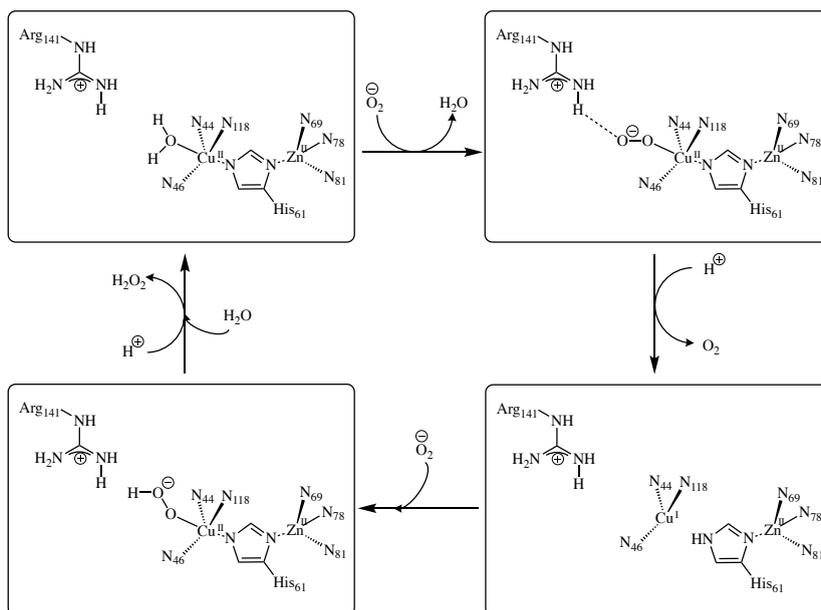


Figura 1.8. Ciclo catalítico de las CuZnSOD para la dismutación del radical superóxido, mecanismo de esfera interna propuesto.[59]

Si bien se ha descrito que ambos procesos *redox* del O_2^- transcurren mediante un mecanismo de esfera interna, algunos trabajos han sugerido la hipótesis de que al menos una de las dos etapas tenga lugar por un mecanismo de esfera externa.[60]

Superóxido dismutasas de manganeso (MnSOD)

En 1970 se aislaron y describieron otro tipo de enzimas SOD cuyo centro activo presentaba un ión manganeso (MnSOD). Las MnSOD están presentes en casi todos los sistemas vivos, desde bacterias hasta seres humanos. La estructura primaria de las MnSOD se compone de un total de 200 residuos, con un peso de aproximadamente 88 kDa.[61] Estos residuos se disponen en dos dominios, presentando el primero de ellos dos hélices- α (α_1 y α_2) y el segundo cinco hélices- α (α_3 - α_7) y tres láminas- β . El centro activo se sitúa entre ambos dominios. Las hélices del primer dominio (α_1 y α_2) se disponen en posición antiparalela con un ángulo relativo de 35° , aportando cada una de ellas un grupo histidina como posición coordinante hacia el átomo de manganeso. El segundo dominio se divide en tres subunidades, por un lado las hélices α_3 y α_4 , por otro las hélices α_6 y α_7 mientras que las tres láminas- β y la hélice α_5 se disponen en el centro. Las dos posiciones coordinantes restantes para completar la esfera de coordinación del manganeso son la His-163 y el grupo Asp-159, provenientes respectivamente de β_3 y α_6 del segundo dominio. El entorno de coordinación del manganeso está altamente conservado en las distintas enzimas MnSOD sin importar el organismo considerado (figura 1.9).

A modo de ejemplo, el centro activo de la MnSOD humana (PDB, 1n0j) presenta un catión manganeso coordinado a tres histidinas (His-26, His-74 y His-63), a un grupo aspartato (Asp-159) y a una molécula de agua (figura 1.9). En este caso, el manganeso adopta una geometría de coordinación de bipirámide trigonal distorsionada con una de las histidinas y una molécula de agua ocupando las posiciones axiales.

En los sistemas biológicos las MnSOD suelen encontrarse en forma de dímeros (figura 1.9), viéndose esta estructura estabilizada por la interacción directa entre un conjunto de residuos cercanos a los centros metálicos. En estos sistemas los cationes metálicos se encuentran separados por aproximadamente 18 Å.[62][63][64] En algunos casos se observa la asociación de dos dímeros para conducir a la obtención de tetrámeros (figura

1.9). Esta disposición se ha identificado principalmente en MnSOD presentes en las mitocondrias de levaduras, eucariotas superiores y algunos organismos extremófilos.[62]

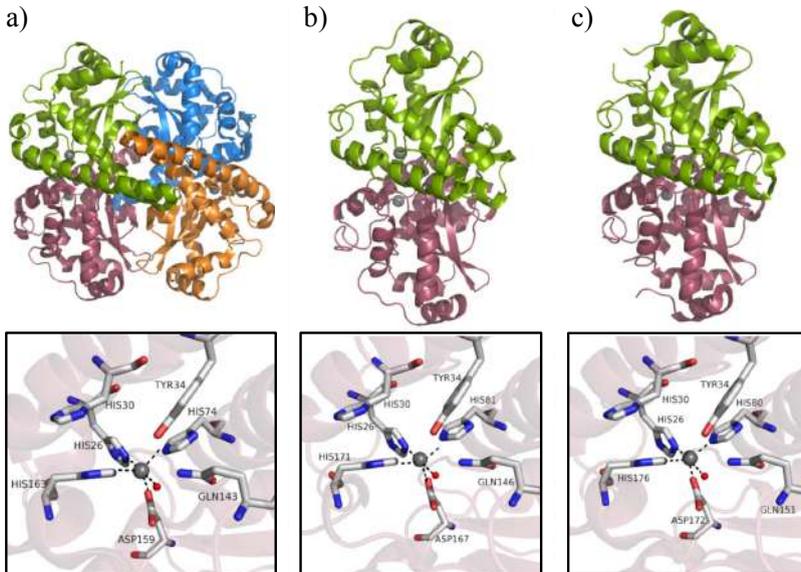


Figura 1.9. Comparación de las estructuras cuaternarias (arriba) y de los centros activos (abajo) de distintas MnSOD: (a) humanos (PDB, 1n0j), (b) *E. Coli* (PDB, 1vev) y (c) *D. radiodurans* (PDB, 2ce4).

En la figura 1.10 se muestra el mecanismo propuesto para el ciclo catalítico de las MnSOD. A lo largo de las distintas etapas el manganeso modifica su estado de oxidación de +2 a +3, mientras que a su vez se observa la entrada y salida de sustratos así como distintos procesos de transferencia de protones.

Más específicamente, partiendo del estado inicial en el que el manganeso se encuentra pentacoordinado y en estado de oxidación +2, la fijación y posterior reducción del O_2^- transcurre por un mecanismo de esfera externa a través de su coordinación con la molécula de agua que ocupa la posición axial (figura 1.10). Como consecuencia se produce la oxidación del

centro metálico así como la transferencia de dos protones, uno procedente de la molécula de agua y otro del grupo tirosina cercano, lo que conduce a la liberación de H_2O_2 . Posteriormente se regenera el grupo hidroxilo de la tirosina y se produce la entrada de una segunda molécula de O_2^- , la cual se coordina directamente al ión metálico. Este paso tiene lugar sin producirse el desplazamiento del grupo hidroxilo, aumentándose así el índice de coordinación del centro metálico (figura 1.10).[58] La transferencia electrónica para la oxidación del segundo O_2^- transcurre a través de un mecanismo de esfera interna, lo que conduce a la liberación de O_2 . Se observa como tanto la molécula de agua presente en la esfera de coordinación del manganeso como el grupo tirosina tienen un papel fundamental a lo largo del ciclo catalítico, tanto por su habilidad para actuar como dadores de protones como para la coordinación y correcta orientación del O_2^- .

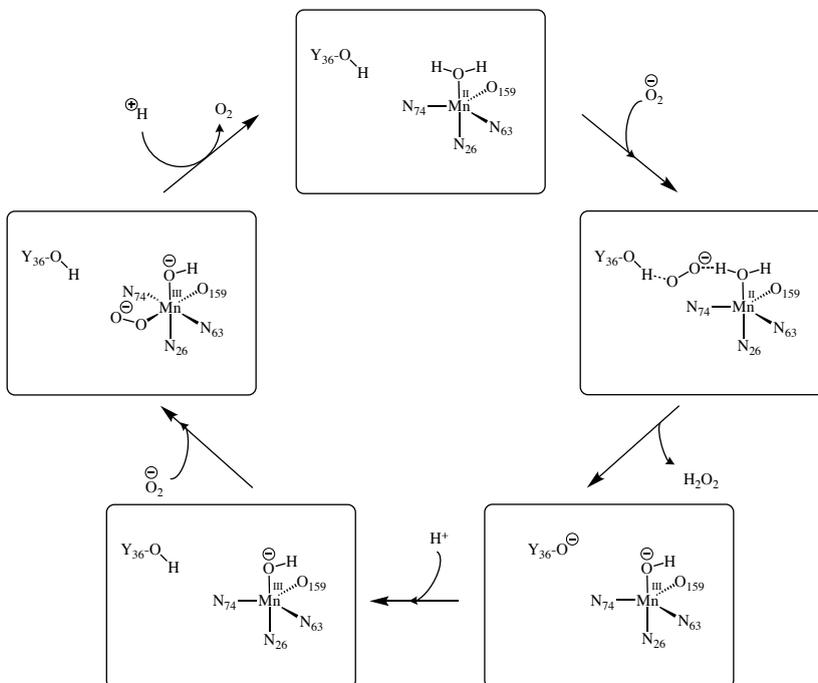


Figura 1.10. Ciclo catalítico de las MnSOD para la dismutación del radical superóxido.[59]

Si bien se ha descrito que uno de los procesos *redox* del O_2^- transcurre a través de un mecanismo de esfera externa, mientras que el otro lo hace a través de uno de esfera interna, algunos trabajos han sugerido la hipótesis de que ambas etapas tengan lugar a través de un mecanismo de esfera interna.[58][65]

Diseño de miméticos de las SOD

Como se ha mencionado anteriormente, enfermedades tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o el Alzheimer se han relacionado con distintas mutaciones en las enzimas CuZnSOD,[34][37] por otro lado, un funcionamiento deficiente de este tipo de metaloenzimas se asocia a un envejecimiento prematuro así como a una mayor incidencia del cáncer.[44] El *rol* de las CuZnSOD se evidenció por medio de experimentos llevados a cabo en ratones que presentaban una deficiencia en este tipo de metaloenzimas, en cuyo caso los ratones mostraron un crecimiento normal aunque eran susceptibles de padecer ciertas lesiones neuronales.

En el caso de las MnSOD, las cuales están presentes en casi todos los sistemas aeróbicos, su deficiencia puede resultar letal. De echo, experimentos llevados a cabo en condiciones de deficiencia de la enzima MnSOD condujeron a una elevada mortalidad de los roedores, debido a cardiomiopatía, neurodegeneración y acidosis metabólica.[49]

Para contrarrestar estos efectos, como primera aproximación se llevaron a cabo experimentos clínicos en los que se suministró directamente la enzima CuZnSOD obtenida de fuentes biológicas (Cu₂Zn₂SOD bovina u Orgotein®). Sin embargo, en la actualidad su aplicación no está muy extendida debido a que el uso de proteínas como fármaco resulta, en general, poco eficiente; su gran tamaño y densidad de carga provoca una extravasación lenta seguida de una eliminación renal rápida.[66] Por otro lado, el uso de este tipo de macromoléculas como fármacos suele conducir a la aparición de respuestas inmunológicas severas, no pueden ser administradas por vía oral y los costos de producción son muy elevados.[49]

Por todo ello, durante las últimas décadas se está realizando un gran esfuerzo de investigación enfocado a la obtención de compuestos de tipo no proteicos y de bajo peso molecular que resulten capaces de mimetizar (imitar) el comportamiento de las enzimas SOD.

A continuación se detallaran los principales factores a tener en cuenta a la hora de diseñar miméticos de las SOD.

a) Ión metálico y química redox

El centro activo de cualquier mimético de SOD es el metal electroactivo, debiendo éste ser capaz de reducirse y oxidarse por un electrón de forma reversible. Otra condición indispensable, regida por la ley de la termodinámica, es que el potencial *redox* del centro metálico debe encontrarse entre los valores de oxidación y de reducción del ión superóxido, o lo que es lo mismo: el metal en su forma reducida debe presentar un carácter reductor mayor que el superóxido, mientras que en su forma oxidada debe ser más oxidante que el propio superóxido. Con este objetivo, la naturaleza ha seleccionado los iones metálicos cobre, manganeso, hierro y en menor medida el níquel, todos ellos presentando las condiciones termodinámicas necesarias para catalizar la dismutación del ion superóxido de forma efectiva (figura 1.11).

Existe una correlación entre el potencial *redox* del centro metálico y la velocidad catalizada de dismutación del radical superóxido, que se cumple siempre que el paso limitante de la velocidad de reacción sea bien el proceso de oxidación o el de reducción del anión superóxido. Este fenómeno está relacionado con la teoría, desarrollada por R. A. Marcus para las reacciones de transferencia electrónica.[67]

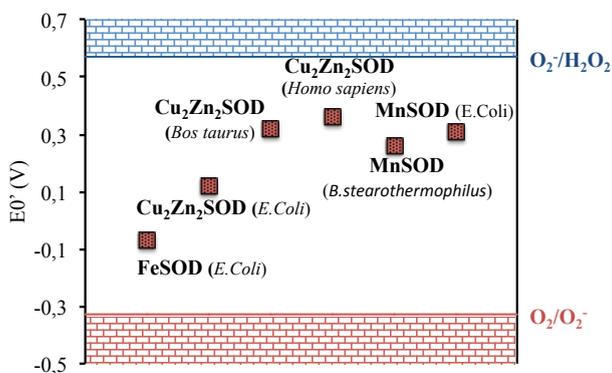


Figura 1.11. Datos electroquímicos de algunas SOD nativas. Potenciales respecto a NHE.

En la figura 1.11 se presentan los valores de potencial formal obtenidos para distintas SOD nativas de hierro, cobre y manganeso.[68][69][70] Se observa que la mayoría de los potenciales formales de las distintas enzimas están próximos a la semisuma de los potenciales formales de reducción y oxidación del O_2^- (+ 0.35 V), o ligeramente inferiores, puesto que a este valor de potencial de reducción se alcanza la máxima velocidad en el ciclo catalítico. Sin embargo, algunos autores consideran que a la hora de diseñar miméticos de las SOD es mejor dirigirse a la obtención de potenciales *redox* más positivos para favorecer así el paso de reducción inicial, lo cual hace que el compuesto reaccione de forma selectiva con el radical superóxido, evitándose así posibles reacciones paralelas con otros oxidantes como pueden ser el hipoclorito, el peroxinitrito o el peróxido de hidrógeno.[71]

b) Geometría de coordinación y flexibilidad

Una de las características principales de las metaloenzimas, y en especial de las oxidoreductasas, es que el metal electroactivo presenta un índice de coordinación bajo, evitándose así la saturación total. Por otro lado, en todos los casos se observa la adopción de geometrías de coordinación irregulares; esto es así ya que los sitios de coordinación presentes en las proteínas tienen un alto grado de preorganización, siendo el metal el que debe adaptarse en cierta medida al entorno de coordinación preexistente.[58] Así pues, a diferencia de lo que sucede con los ligandos monodentados simples, en este caso el ion metálico no puede organizar a su alrededor la esfera de coordinación que más le acomode, sino que tiene que adaptarse al entorno de coordinación proporcionado por la metaloenzima. En la figura 1.12 se observa como este nuevo estado de tensión estereoquímica, estado *entático*, se encuentra energéticamente más próximo a la situación en la que se encuentra un complejo metálico en el complejo activado de una reacción (estado de transición) que a su estado inicial más estable. El estado *entático* produce una disminución de la energía de activación y por consiguiente un aumento en la velocidad de reacción (figura 1.12). Esto explica la gran reactividad de las metaloproteínas en comparación con la de los complejos análogos con ligandos más sencillos.

Así pues, una estrategia eficiente para obtener nuevos miméticos de las SOD con características mejoradas es el diseño de ligandos que conduzcan a la formación de complejos metálicos en los que el metal, una vez coordinado, se encuentre en un estado *entático*, así como que presente cierto grado de instauración coordinativa.

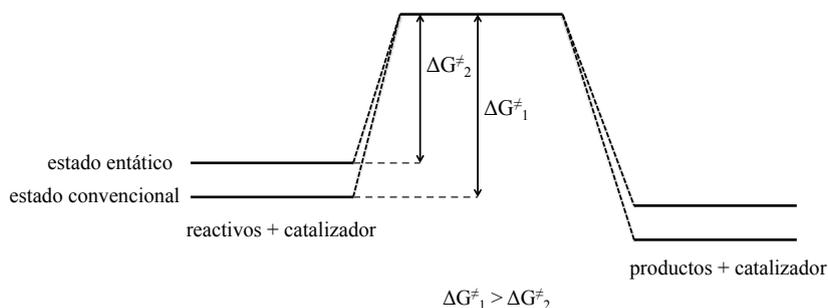


Figura 1.12. Estado *entático* y energía de activación. Diagrama de energía libre para la misma reacción en presencia de un catalizador convencional (complejo metálico), energía de activación ΔG^{\ddagger}_1 , y uno entático (metaloproteína), energía de activación ΔG^{\ddagger}_2 . [58]

Debido a que el metal tiende a completar la esfera de coordinación, la presencia de grupos con un alto grado de flexibilidad en la molécula favorece estados de elevada saturación coordinativa. Algunas de las técnicas utilizadas para evitar este fenómeno son limitar la presencia de grupos dadores adicionales así como la introducción de cierto grado de rigidez en la molécula, evitando así la adaptabilidad intrínseca de las cadenas poliamínicas. La flexibilidad del ligando también tiene un efecto decisivo en las geometrías de los estados de transición adoptados a lo largo de todo el proceso catalítico. Esto es así ya que una vez iniciado el ciclo catalítico las geometrías de coordinación óptimas para cada uno de los estados de transición pueden variar. Por lo tanto, si alguno de estos estados de oxidación se encuentra altamente estabilizado la reducción u oxidación de dicho estado pasaría a considerarse un paso limitante, y la velocidad global del ciclo resultaría la de dicho paso. Para evitar esta situación el ligando diseñado debe presentar cierto grado de flexibilidad para poder adaptarse a los cambios del estado de oxidación, pero no conducir en ningún caso a un estado irreversible de mínima energía.

c) Presencia de residuos auxiliares y transferencia de protones

Como se ha descrito anteriormente, los centros activos de las CuZnSOD y las MnSOD presentan residuos de aminoácidos cercanos, los cuales se ha demostrado que están involucrados en los procesos de orientación del sustrato y/o transferencia de protones a lo largo de los ciclos catalíticos. Algunos ejemplos son la Arg-141 en las CuZnSOD (figura 1.13) y la Tyr-34 en las MnSOD (figura 1.10).

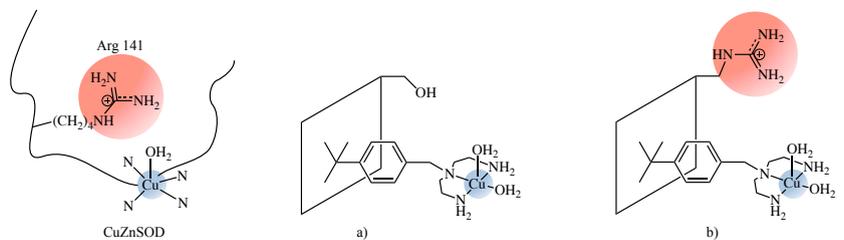


Figura 1.13. Centro activo de las CuZnSOD junto a dos miméticos SOD conteniendo un átomo de cobre, (a) sin residuo de arginina y (b) con un residuo de arginina.[72]

A modo de ejemplo, en la figura 1.13 se presentan dos sistemas miméticos con la diferencia de que uno de ellos presenta un grupo -OH en las inmediaciones del centro activo mientras que el otro presenta un resto de arginina en la misma posición.[72] Éste último presentó casi el doble de actividad frente a la dismutación del radical superóxido respecto al complejo sin arginina. Así pues, la introducción de grupos capaces de estabilizar y/o orientar el O_2^- mediante la formación de enlaces de hidrógeno, como grupos amino, puede ser una estrategia útil para la obtención de miméticos con una mayor capacidad catalítica.

d) Estabilidad de los complejos metálicos

Resulta fundamental que los ligandos sintetizados presenten suficiente afinidad por el metal de transición seleccionado, tanto en su estado oxidado como reducido. Esto es particularmente importante en el caso de los complejos de cobre, debido a que pequeñas cantidades del metal no coordinado puede dar lugar a la generación de radicales libres mediante reacciones de tipo Fenton,[73] lo que resulta nocivo a nivel celular. Por otro lado, el metal en sí mismo presenta actividad SOD,[74] por lo que resultaría difícil discernir si la actividad biológica es debida al complejo estudiado o si por el contrario, el ligando actúa como un mero vehículo para el metal.[75]

Como se verá en los ejemplos planteados más adelante, las estrategias empleadas para obtener complejos con una mayor estabilidad suelen basarse en el uso de ligandos de tipo quelato o macrocíclico.

e) Propiedades farmacocinéticas

Las propiedades farmacocinéticas de un compuesto comprenden los mecanismos de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad (ADME-T). Resulta necesario entonces reparar en las distintas características que influyen en estas variables a la hora de diseñar un fármaco. Así pues, hay que tener en cuenta propiedades tales como el peso molecular y el número de átomos dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno, así como la relación entre su carácter lipófilo e hidrófilo. Para ello puede considerarse la aproximación empírica de Lipinski,[76] la cual reconoce la necesidad de equilibrar las fuerzas que permiten que una molécula sea suficientemente hidrófila para disolverse adecuadamente en un medio acuoso y que a su vez pueda penetrar en entornos más hidrófobos.

Ejemplos de miméticos de las SOD

Entre los miméticos de las SOD descritos hasta la fecha que presentan una mayor actividad catalítica encontramos los complejos heptacoordinados de manganeso (Mn(II)) con ligandos macrocíclicos basados en pentaazaciclopentadecano [15]aneN₅ (figura 1.14).[77][78] Algunos de estos complejos se encuentran entre los primeros miméticos de las SOD que han entrado en fases clínicas, debido a su eficiencia en el tratamiento de afecciones relacionadas con el estrés oxidativo.[79] Trabajos posteriores se han enfocado en introducir distintas modificaciones estructurales con el objetivo de mejorar tanto la actividad como la estabilidad de los correspondientes complejos metálicos (figura 1.14). Resulta destacable el complejo de Mn(II) de M40403, cuyo valor de constante catalítica para la dismutación del radical superóxido (k_{cat}) es parecido al obtenido para algunas enzimas MnSOD nativas.[80]

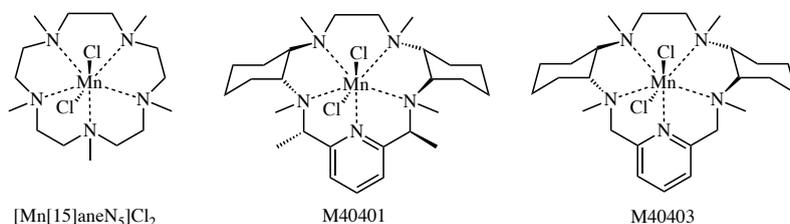


Figura 1.14. Complejos de Mn(II) con [15]aneN₅ y algunos de sus derivados.[77][78]

Otros ejemplos encontrados en la literatura son ligandos macrocíclicos con cadenas laterales que presentan átomos dadores adicionales (figura 1.15, a y b). La presencia de unidades de benzimidazol en este tipo de moléculas permite completar la esfera de coordinación, lo que confiere una mayor estabilidad termodinámica y cinética a los correspondientes complejos de Mn(II). Adicionalmente, los distintos grupos sustituyentes proporcionan un entorno hidrófobo para el manganeso, lo que parece favorecer la actividad SOD de este tipo de compuestos.[81]

Por otro lado, la inclusión de grupos ácidos en posiciones enfrentadas en el ciclén aumenta la afinidad del receptor hacia el manganeso (figura 1.15, c y d), lo que confiere al complejo resultante una mayor capacidad para la dismutación del radical superóxido.[82] Sin embargo, debido a su elevado potencial de oxidación y a la irreversibilidad del proceso esta reacción tiene lugar en relaciones estequiométricas, imposibilitando el uso de este tipo de compuestos como tratamiento efectivo contra enfermedades asociadas al estrés oxidativo.

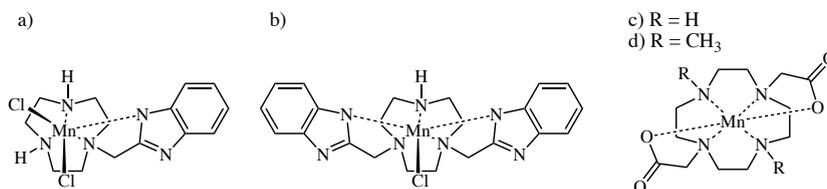


Figura 1.15. Complejos con actividad SOD.[81][82]

La gran mayoría de ejemplos descritos en la bibliografía enfocados a reproducir las características de las CuZnSOD se han centrado en imitar estructuralmente el centro activo de este tipo de metaloenzimas, mediante la síntesis de complejos binucleares con un grupo imidazol actuando como ligando bisonodentado. En estos derivados, el centro activo está compuesto bien por dos átomos de cobre [83][84][85][86] o por un átomo de cobre y otro de zinc.[87] Sin embargo, a pesar de que el puente imidazolato resulta un motivo visualmente llamativo, su función es principalmente estructural y contribuye poco al proceso de dismutación del radical superóxido. Anteriormente se ha descrito que el grupo arginina cercano al centro activo juega un papel mucho más relevante en el mecanismo de reacción, por medio de la orientación del sustrato y/o la transferencia de protones en los distintos ciclos catalíticos, sin embargo éste ha recibido mucha menos atención.[84][85][86]

Por otro lado, se han ensayado otros complejos que, aunque no guardan similitud estructural clara con el centro activo de las CuZnSOD, han demostrado presentar una elevada capacidad para la dismutación catalítica del radical O_2^- (figura 1.16). Entre los ejemplos encontrados en la bibliografía se destacan un conjunto de complejos mononucleares,[88] binucleares [89] e incluso trinucleares de cobre.[90]

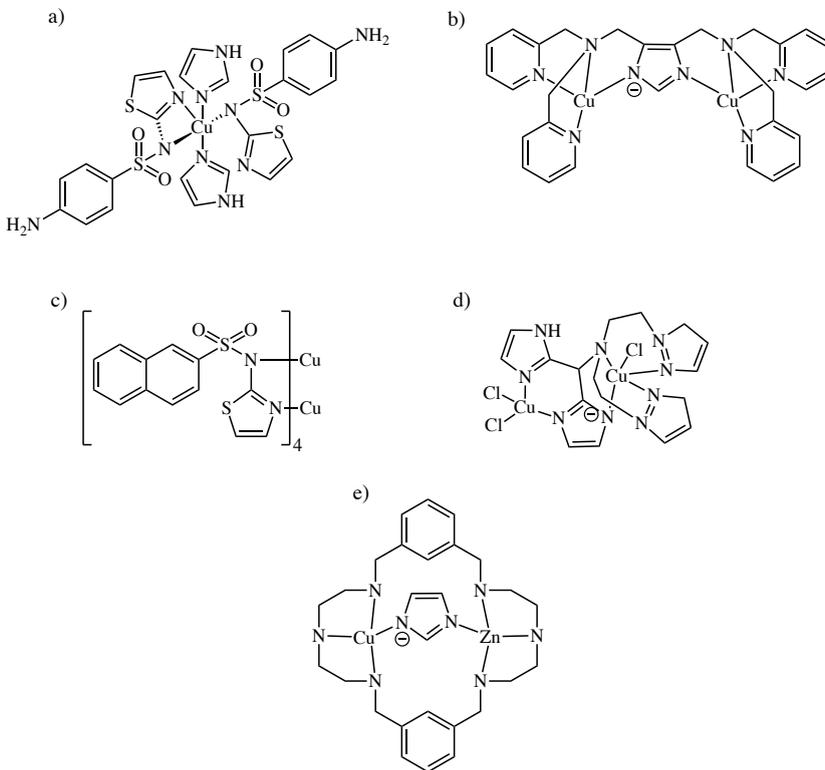


Figura 1.16. Ejemplos de miméticos SOD encontrados en la bibliografía.[88][89][90]

Durante los últimos años en el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (GQS-UV) se han descrito distintos compuestos cuyos complejos de Mn(II) presentan una elevada actividad SOD tanto *in vitro* como *in vivo* (figura 1.17).[91][92] En particular el complejo de manganeso del derivado *pytren-4Q* (figura 1.17, a) muestra una elevada capacidad para la dismutación catalítica del O_2^- , presentando un valor de k_{cat} similar al del compuesto de referencia M40403.[93] A su vez, se han sintetizado receptores poliamínicos presentando éstos uno o dos entornos de coordinación disponibles (figura 1.17). Los correspondientes complejos de cobre de estos derivados muestran capacidades catalíticas elevadas.[94][95][96]

Por otro lado, se han obtenido complejos heterobinucleares de cobre y zinc, en cuyo caso se determinó que la capacidad catalítica del complejo venía determinada por la presencia del cobre en la estructura.[97]

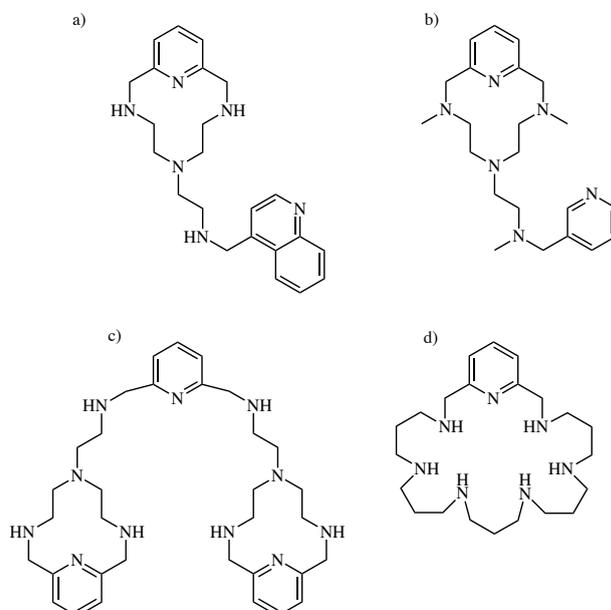


Figura 1.17. Compuestos sintetizados en el GQS-UV cuyos complejos de manganeso y/o cobre presentan actividad SOD.

1.2.3. Ácidos nucleicos como diana supramolecular

La mayoría de los procesos biológicos dependen del reconocimiento molecular, así como de las interacciones reversibles, entre distintas moléculas.[14] Por ejemplo, se ha descrito que tanto el empaquetamiento cromosómico como la integridad estructural de los ácidos nucleicos dependen de numerosas interacciones entre estas macromoléculas con otras.[98] A su vez, la función biológica del ADN está regulada por su asociación con distintas proteínas y moléculas de pequeño peso molecular, siendo éste uno de los procesos más extendidos para modular la expresión proteica, generalmente a través de la regulación del correspondiente gen. La replicación del ADN también resulta estar altamente controlada por este tipo de interacciones.

Como se ha mencionado al inicio del apartado, una de las principales dianas biológicas de las poliaminas naturales son los ácidos nucleicos. La asociación entre estas dos entidades se ha demostrado que juega un papel importante en la estabilización conformacional de los ácidos nucleicos, así como en la regulación activa del conjunto de procesos en los que estas macromoléculas están involucrados. La asociación entre las poliaminas y los ácidos nucleicos se establece por medio de interacciones de tipo no covalente y puede, por tanto, ser considerada como química supramolecular *in vitro*. [99]

La gran variedad funcional así como la diversidad estructural intrínseca asociada a los ácidos nucleicos abre las puertas a múltiples aplicaciones aún por explorar en el campo de la biomedicina. Todo ello haciendo que éstas sean moléculas diana muy atractivas para el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos.

Históricamente, la mayor parte de las investigaciones sobre la interacción entre moléculas de bajo peso molecular con los ácidos nucleicos se ha focalizado en el ADN, sin embargo, en las últimas décadas se han centrado grandes esfuerzos para obtener moléculas que interaccionen de

forma específica con secuencias de ARN, las cuales desarrollan un papel fundamental en procesos tales como la expresión génica así como en distintas reacciones bioquímicas.[98] A su vez, las secuencias de ARN presentan una mayor diversidad estructural respecto al ADN, habiéndose descrito, aparte de la estructura de doble hélice tipo A-ARN, conformaciones secundarias de tipo bucle, nudos o triples hélices.[98][100]

Modos de interacción entre las poliaminas y los ácidos nucleicos

Debido a la composición y a la diversidad estructural que presentan los ácidos nucleicos, su interacción con poliaminas se produce mediante el establecimiento de una gran diversidad de enlaces de tipo no covalente. Esto es así ya que este tipo de estructuras presentan un esqueleto azúcar-fosfato cargado negativamente, permitiendo la interacción mediante asociaciones de tipo electrostático con las aminas las cuales, en función de su estructura, se encontrarán parcial o completamente protonadas a pH fisiológico. A su vez se forman enlaces de hidrógeno direccionales entre las bases que componen las secuencias y los grupos amonio y amino de las poliaminas. Otro modo de interacción muy frecuente es la intercalación de superficies aromáticas extendidas entre los pares de bases apilados de los ácidos nucleicos, los cuales generan un entorno hidrofóbico que favorece este proceso. La combinación de dos o más modos de enlace en una misma interacción conduce a una mayor fuerza de enlace global y suele ser el modo de unión observado para la gran mayoría de poliaminas estudiadas.

A continuación se detallarán los distintos modos de interacción no covalentes que se producen entre las poliaminas y los ácidos nucleicos.

a) Interacción con el borde exterior

Existen poliaminas, como la putrescina, la espermidina y la espermina, que interaccionan de forma no específica con las cadenas azúcar-fosfato de los ácidos nucleicos a través de interacciones de tipo puramente electrostático.[27][98] Estas poliaminas son ubicuas en las células eucariotas y están involucradas en una gran variedad de procesos celulares. Por ejemplo, se ha postulado que las poliaminas desempeñan en el empaquetamiento del ADN en la cromatina una función análoga a las histonas, en el sentido de que neutralizan las cargas negativas de la cadena principal del ADN favoreciendo, por lo tanto, su empaquetamiento. Por otro lado, la unión de las poliaminas con el ADN a través del borde exterior de estas secuencias permite modular de forma precisa su interacción con distintas proteínas, lo cual desempeña un papel importante en la proliferación celular.[98]

b) Interacción con el surco mayor y menor

El conjunto de estructuras de tipo doble hélice descritas tanto para el ADN como para el ARN presentan un surco mayor y un surco menor cuya conformación y propiedades dependen principalmente de la secuencia considerada (figura 1.18). Estos motivos difieren en potencial electrostático, grado de exposición de las nucleobases, efectos estéricos, grado de hidratación, etc..[27] La gran mayoría de las proteínas ha evolucionado para interaccionar de forma específica con secuencias de ADN y/o de ARN a través del surco mayor. Sin embargo, algunas proteínas y la gran mayoría de las pequeñas moléculas interaccionan con estas secuencias a través del surco menor. Estas asociaciones se establecen principalmente mediante la formación de enlaces de hidrógeno direccionales así como por medio de interacciones de tipo electrostático.

A modo de ejemplo, la propamidina interacciona con el surco menor del dodecámero $d(\text{CGCAAATTTGCG})_2$ mediante enlaces de hidrógeno entre los nitrógenos de los extremos y los oxígenos de las unidades de timina presentes en la secuencia (figura 1.18). En este caso, la estructura está estabilizada por medio de interacciones de tipo electrostático entre la poliamina y moléculas de agua del entorno.

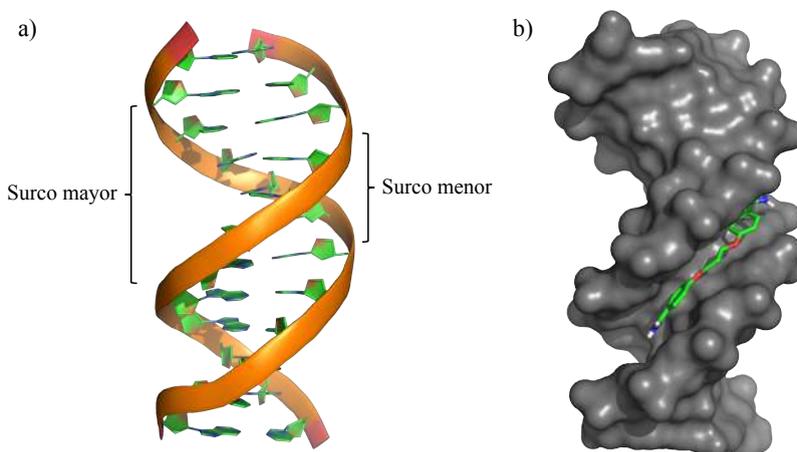


Figura 1.18. Estructura cristalina (PDB, 102D) de: (a) dodecámero $d(\text{CGCAAATTTGCG})_2$ y (b) complejo resultante de la interacción del antiséptico *propamidina* con el surco menor del dodecámero de ADN.

c) Intercalación entre los pares de bases

Se define como intercalación a la inserción de una molécula entre los pares de bases que componen la secuencia del ácido nucleico (figura 1.19). Este mecanismo fue descrito por primera vez por Leonard Lerman en 1961.[101] Para ello, la molécula intercalante debe presentar un tamaño apropiado así como una estructura química adecuada, siendo los mejores

candidatos los compuestos policíclicos aromáticos planos. Sin embargo, muchas moléculas intercalantes poseen sustituyentes voluminosos que, en los complejos formados con el ADN, deben permanecer en los surcos que componen la secuencia (figura 1.19).

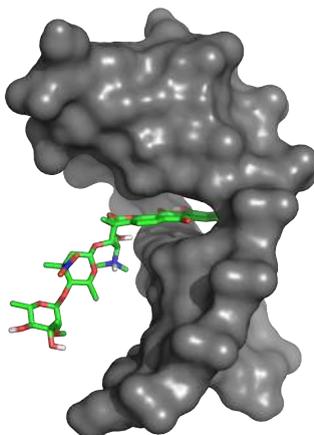


Figura 1.19. Estructura cristalina (PDB, 1n37) del complejo resultante de la interacción de la antraciclina *respinomicina D* con el octámero de ADN d(AGACGTCT)₂, mediante la intercalación directa entre los pares de bases G-C centrales.

Para que una molécula intercalante encaje entre dos pares de bases adyacentes se debe producir una apertura dinámica de la secuencia, consistente en un aumento en la distancia entre los pares de bases, lo que está asociado a un desenrollamiento de la estructura de doble hélice. El grado de desenrollamiento variará según el agente intercalante considerado, así, por ejemplo, la apertura del ADN generada por el bromuro de etidio (EB por sus siglas en inglés) es de aproximadamente 26°, mientras que la proflavina produce una apertura de 17°. Este proceso provoca una torsión y un aumento en la distancia entre los pares de bases adyacentes de aproximadamente 3.4 Å, así como un alargamiento de la cadena del ADN. Estas modificaciones

estructurales conducen a cambios funcionales que resultan a menudo en una inhibición de los procesos de transcripción, replicación y reparación del ADN, lo que hace que los intercalantes sean potentes mutágenos.[98][102] Otros ejemplos de moléculas intercalantes son la berberina, la daunorrubicina, la doxorubicina (o hidroxodaunorrubicina) y la talidomida (figura 1.20). Los compuestos intercalantes se han utilizado históricamente en tratamientos quimioterapéuticos con el objetivo de inhibir la replicación del ADN en células cancerosas de crecimiento rápido. Entre los agentes más usados actualmente se incluyen la daunorrubicina y la doxorubicina, ambos utilizados en el tratamiento del linfoma de Hodgkin,[103][104] y la dactinomicina, utilizada para el tratamiento del tumor de Wilm.

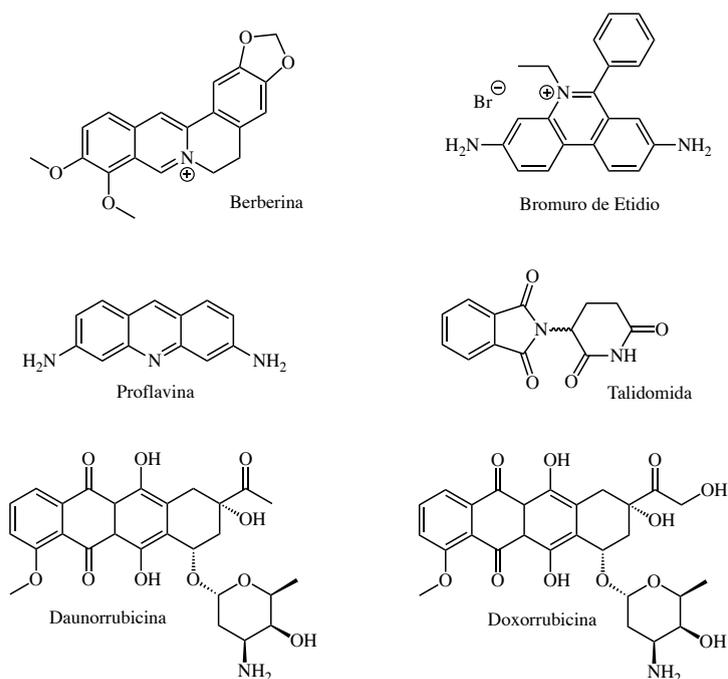


Figura 1.20. Agentes intercalantes del ADN.

Diversidad estructural de los ácidos nucleicos

A lo largo del siglo XX se determinaron un conjunto de estructuras de tipo doble hélice para secuencias de ADN y ARN, entre las que se encuentran las conformaciones tipo *A*, *B* y *Z* para el ADN mientras que para ARN se ha descrito la conformación de doble hélice tipo *A*.^{[98][105]} Sin embargo, desde 1980, y como resultado del rápido avance de las técnicas analítica y de análisis físico, se han identificado otras muchas conformaciones para este tipo de macromoléculas lo que manifiesta gran heterogeneidad estructural.^{[105][106][107]} Todo ello ha conducido a una conclusión importante: los ácidos nucleicos han evolucionado conformacionalmente para interactuar con otras macromoléculas.

Si bien la adopción de este tipo de estructuras por parte de los ácidos nucleicos viene dada principalmente por las propiedades intrínsecas de cada secuencia, la interacción específica entre éstas con proteínas o pequeñas moléculas puede conducir a la aparición de algunas estructuras de elevada complejidad.^[108] Por otro lado, se observa como el ARN posee una mayor propensión al plegamiento en estructuras secundarias más complejas respecto al ADN.^{[98][105]}

La aparición o alteración de algunos motivos estructurales se ha asociado al desarrollo de enfermedades de tipo neurodegenerativo así como, en algunos casos, a un crecimiento celular anómalo e incontrolado, lo que conduce a la aparición de cáncer.^{[98][109][110][111]} Así pues, tanto la detección como la modificación y/o estabilización de este tipo de estructuras secundarias ha centrado en los últimos años gran parte de los estudios de la interacción de pequeñas moléculas con los ácidos nucleicos.

A modo de ejemplo, en la década de los 90 se identificó una nueva mutación génica la cual conducía al desarrollo de un conjunto de enfermedades de tipo neurodegenerativo.^{[99][112][113]} Ésta consistía en una repetición anómala de tres nucleótidos *CXG*, donde *X* hace referencia a cualquier nucleobase, en una misma región. La expansión descontrolada de este tipo de repeticiones se relacionó con el desarrollo de un mínimo de 20

enfermedades neurodegenerativas. Cada enfermedad está asociada a un gen defectuoso, el cual desencadena el proceso de patogénesis a través de la expresión proteica aberrante.[114] Esto permitió a su vez entender el carácter hereditario de este tipo de enfermedades. Estudios recientes han demostrado que una elevada concentración de este tipo de repeticiones en las secuencias de ARN conducen a la formación de estructuras de tipo doble hélice intramoleculares estables (estructuras tipo *horquilla*),[114] presentando algunas la capacidad de secuestrar proteínas y formar conglomerados nucleares. Aunque este campo ha centrado grandes esfuerzos en investigación durante los últimos 20 años, aún no se ha encontrado una cura efectiva.[115] Así pues, moléculas que puedan identificar y/o modificar estructuralmente este tipo de motivos resultan de gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos.

Poliaminas como sensores de ácidos nucleicos

Se entiende por sensor aquel dispositivo que interacciona con la materia o energía generando, como respuesta, una señal medible. Así pues, un *sensor químico* es un dispositivo microscópico o macroscópico que interacciona de forma reversible con un analito químico generando una señal. Por otra parte, un *quimiosensor* es una molécula de origen abiótico que señala la presencia de materia o energía. Del mismo modo, un *sensor biológico* es un dispositivo microscópico o macroscópico que interacciona reversiblemente con un analito biológico generando una señal y un *biosensor* es una molécula de origen biótico que señala la presencia de materia o energía.

La transducción de la señal es el mecanismo a través del cual la interacción del sensor con el analito produce una forma medible de energía, que puede corresponder a longitudes de onda características de las diferentes técnicas espectroscópicas (UV, Vis, RMN etc.) o puede producir respuestas electroquímicas. Resulta fundamental que este tipo de interacciones posean ciertos requisitos: debe existir una elevada sensibilidad, deben establecerse

enlaces de forma selectiva y debe existir reversibilidad en los mismos (figura 1.21). Estas propiedades pueden ser ajustadas haciendo uso de los principios de complementariedad y preorganización mencionados anteriormente.[116]

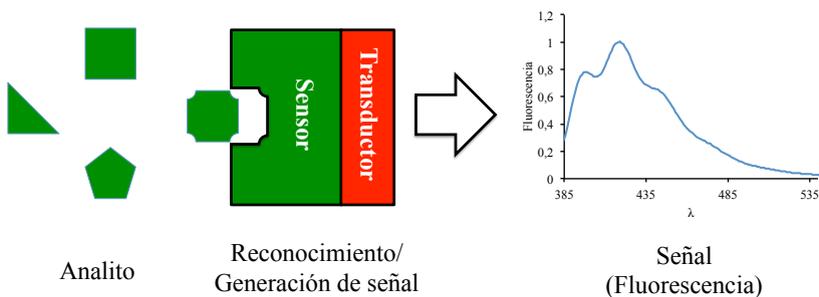


Figura 1.21. Representación esquemática de un sensor fluorescente.

La primera aproximación para la obtención de *biosensores* consistió en analizar la capacidad de distintos sensores obtenidos de fuentes biológicas, es decir, receptores bióticos para reconocer y detectar analitos. Pero estos presentan un conjunto de inconvenientes como son su limitada estabilidad, la imposibilidad de obtención a gran escala, así como la dificultad de traducir los eventos de interacción biomolecular en señales fácilmente medibles.[117] Estas características los hacen bastante caros e imposibilita su aplicación como dispositivos analíticos eficaces en tiempo real. La alternativa obvia es la síntesis de receptores abióticos capaces de interacción de forma selectiva con el analito de interés, lo que permite abaratar los costes de obtención. Por otra parte, el uso de sensores abióticos permite modular sintéticamente las propiedades del mismo, tanto para aumentar la afinidad y selectividad hacia distintos analitos como para introducir elementos de señalización que conduzcan a una traducción en señales analíticamente útiles (cromóforos, fluoróforos, etc.). En este campo la química supramolecular juega un papel relevante, tanto para la comprensión de los sistemas como para el diseño de nuevos sensores moleculares.

Se entiende por sensor fluorescente aquel sensor cuya respuesta medible es la fluorescencia. Este tipo de sensores presentan una elevada sensibilidad, de tal manera que, aunque requieran de un proceso sintético largo y éstos presenten bajos rendimientos, unos pocos miligramos son suficientes para miles de análisis. A su vez, la fluorescencia presenta la ventaja de ser una técnica altamente sensible y, normalmente, no destructiva. Por otro lado, éstos deben cumplir una serie de requisitos entre los que destacan la selectividad por el analito de interés, la necesidad de que exista un mecanismo de transducción de la señal claro, la posibilidad de un calibrado interno de la señal, la estabilidad del fluoróforo y la invariabilidad de la señal con el pH del medio empleado.

En los sensores fluorescentes la detección del analito puede darse a través de la interacción directa del fluoróforo con el analito, lo que conduce a una variación en la propiedades de emisión fluorescente del mismo (fluoróforo intrínseco), o a través de la interacción de una subunidad del sensor con el analito, proceso que viene acompañado de una variación en el estado electrónico de la molécula en cuyo caso la señal se transmite al fluoróforo unido covalentemente, el cual genera una señal medible (figura 1.22).

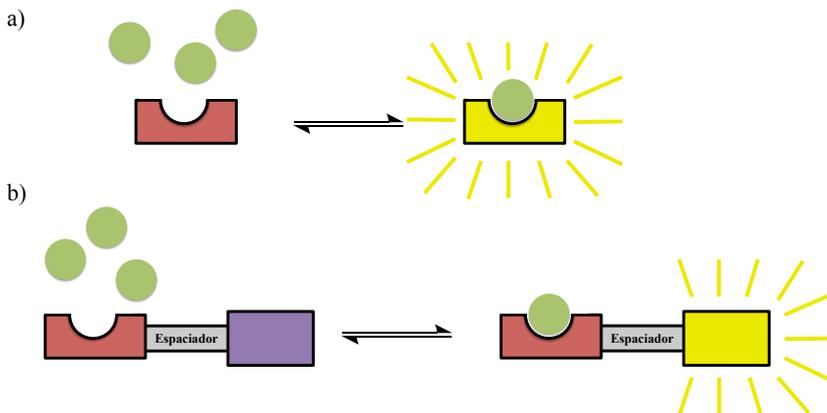


Figura 1.22. Esquema de las distintas respuestas ópticas de los sensores fluorescentes (a) intrínsecos y (b) extrínsecos.

Durante las últimas décadas se han realizado grandes esfuerzos en la obtención de compuestos poliamínicos que puedan interactuar de forma específica con secuencias y/o conformaciones secundarias determinadas de los ácidos nucleicos y que, a su vez, esta interacción conduzca a un estado de la molécula medible por alguna de las técnicas disponibles.[108] En la figura 1.23 se muestran algunos ejemplos de compuestos que interactúan de forma selectiva con distintos motivos estructurales de los ácidos nucleicos, y cuya interacción conduce a una variación en sus propiedades fluorescentes medible; se muestran compuestos sintetizados para su interacción con los surcos de las conformaciones de doble hebra, HOECHST y DAPI,[118][119] así como distintos sensores fluorescentes sintetizados para la detección de conformaciones de mayor complejidad estructural (DAOTA-M2, ThT y Salphen).[120][121][122]

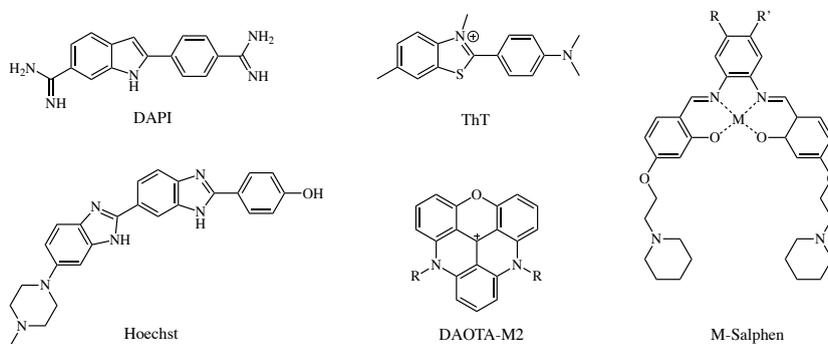


Figura 1.23. Compuestos diseñados su interacción selectiva con los ácidos nucleicos.

Durante los últimos años en el GQS-UV se han descrito diversos derivados poliamínicos enfocados a su interacción con secuencias de ácidos nucleicos. De entre los compuestos estudiados cabe destacar la poliamina bipodal mostrada en la figura 1.24, *pypod*, la cual presenta dos cavidades macrocíclicas equivalentes unidas por una cadena central. Estudios llevados a cabo con distintas secuencias de ácidos nucleicos han revelado una elevada predilección de esta poliamina para interactuar de forma específica con

estructuras secundarias bicatenarias representativas de ARN (*poliA-poliU*), frente a distintos modelos de ADN (*ctDNA* y *poli(dA)-poli(dT)*).[123]

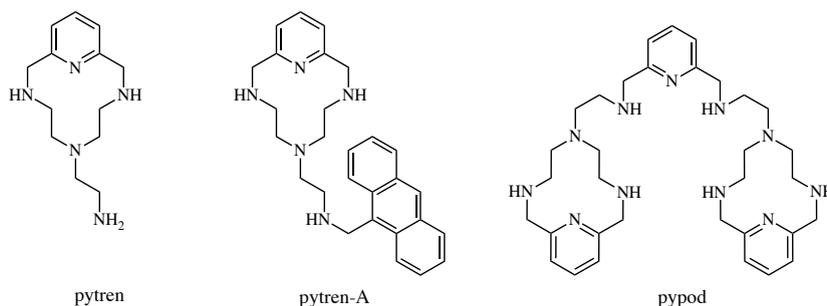


Figura 1.24. Ligandos poliamínicos sintetizados en el GQS-UV.

Por otro lado, la funcionalización del derivado *pytren* con distintos grupos aromáticos extendidos ha permitido monitorizar la interacción de estos nuevos derivados con secuencias de ácidos nucleicos mediante técnicas espectroscópicas. El derivado *pytren-A*, cuya estructura presenta una cavidad macrocíclica y un antraceno unidos por una cadena poliamínica lineal, genera una respuesta espectroscópica totalmente diferente frente a disoluciones de distintas secuencias de ácidos nucleicos.[124] Así pues, mientras que la valoración con *poli(dGC)₂* produce a una desactivación de la emisión de fluorescencia, la adición de *poliA-poliU* o de *poli(dAT)₂* genera un aumento significativo en el comportamiento emisor del compuesto.[125] Estos resultados abren la puerta a la aplicación de este tipo de estructuras como sensores fluorescentes para la detección selectiva de secuencias de ácidos nucleicos.

Referencias

- [1] Lehn, J.-M. *Science*. **1993**, 260, 1762-1763.
- [2] Werner, A. Z. *Anorg. Allg. Chem.* **1893**, 3(1), 267-330.
- [3] Fischer, E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985-2993.
- [4] Desmedt, J. E. *J. Physiol.* **1953**, 121, 191-205.
- [5] Itoh, T.; Kuriyama, H.; Nanjo, T. *J. Physiol.* **1982**, 333(1), 555-576.
- [6] Moore, C.; Pressman, B. C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1964**, 15, 562-567.
- [7] Chapell, J. B.; Crofts, A. R. *Biochem. J.* **1965**, 95, 393-402.
- [8] Graven, S. N.; Lardy, H. A.; Johnson, D.; Rutter, A. *Biochemistry*. **1966**, 5, 1729-1735.
- [9] Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017-7036.
- [10] Cram, D. J.; Kaneda, T.; Helgeson, R. C.; Lein, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6752-6754.
- [11] Dietrich, B.; Lehn, J.-M.; Sauvage, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 2885-2888.
- [12] Lehn, J.-M. *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871-892.
- [13] Lehn, J.-M. *Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives* VCH, **1995**.
- [14] Rekharsky, M.; Inoue, Y. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Volume 1, Ed. P. A. Gale and J. W. Steed. John Wiley & Sons, Ltd., **2012**.
- [15] Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry* Ed. John Wiley & Sons, Ltd., **2000**.
- [16] Beer, P.; Gale, P.; Smith, D. *Supramolecular Chemistry*, Oxford chemistry primers, **1999**.
- [17] Pranata, J.; Wierschke, S. G.; Jorgensen, W. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, Vol. 113, N° 8.
- [18] Wheeler, S. E.; Bloom, J. W. G. *J. Phys. Chem. A.* **2014**, 118, 6133-6147.
- [19] Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525-5534.
- [20] Janiak, C. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2000**, 3885-3896.
- [21] Meyer, E. E.; Rosenberg, K. J.; Israelachvili, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, 103, 15739-15746.
- [22] Whitesides, G. M.; Lipomi, D. J. *Faraday Discuss.* **2009**, 143, 373-384.
- [23] Cram, D. J. *Science*. **1988**, 240, 760-767.

-
- [24] Schneider, H.-J.; Yatsimirsky, A. K. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 263-277.
- [25] Cram, D. J.; Lein, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 3657-3658.
- [26] Philp, D.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1154-1196.
- [27] Woster, P. M.; Casero, R. A. *Polyamine Drug Discovery* Royal Society of Chemistry, **2011**.
- [28] (a) Yoshida, M.; Kashiwagi, K.; Shigemasa, A.; Taniguchi, S.; Yamamoto, K.; Makinoshima, H.; Ishishama, A.; Igarashi, K. *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 46008-46013. (b) Saini, P.; Eyler, D. E.; Green, R.; Dever, T. E. *Nature*. **2009**, 459, 118-121. (c) Lopatin, A. N.; Nichols, G. C. *Nature*. **1994**, 372, 366-369.
- [29] N'soukpoé-Kossi, C. N.; Ouameur, A. A.; Thomas, T.; Shirahata, A.; Thomas, T. J.; Tajmir-Riahi, H. A. *Biomacromolecules*. **2008**, 9, 2712-2718.
- [30] Battaglia, V.; DeStefano Shields, C. *Amino Acids*. **2014**, 46, 511-519.
- [31] Wishart DS, Feunang YD, Guo AC, Lo EJ, Marcu A, Grant JR, Sajed T, Johnson D, Li C, Sayeeda Z, Assempour N, Iynkkaran I, Liu Y, Maciejewski A, Gale N, Wilson A, Chin L, Cummings R, Le D, Pon A, Knox C, Wilson M. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 2017 Nov 8.
- [32] Poulin, R.; Casero, R. A.; Soulet, D. *Amino Acids*. **2012**, 42, 711-723.
- [33] Batini-Haberle, I.; Rebouc, J. S.; Spasojevic, I. *Antioxidants & Redox Signaling* **2010**, 13, 6.
- [34] Boillee S.; Velde V.C.; Cleveland DW. *Neuron*. **2006**, 52, 39-59.
- [35] Miller, R.J.; James-Kracke, M.; Sun, G.Y.; Sun, A.Y. *Neurochem Res.* **2009**, 34, 55-65.
- [36] Wang, J.F. *Can. J. Psychiatry*. **2007**, 52, 753-762.
- [37] Christen, Y. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71(2), 621-629.
- [38] Finsterer, J. *Vasa* **2007**, 36, 229-240.
- [39] Cremades, N.; Velazquez-Campoy, A.; Martinez-Julvez, M.; Neira, J. L.; Perez-Dorado, I.; Hermoso, J.; Jimenez, P.; Lanas, A.; Hoffman, P. S.; Sancho, J. *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4(11), 928-938.
- [40] Hoshino, T.; Okamoto, M.; Takei, S.; Sakazaki, Y.; Iwanaga, T.; Aizawa, H.; *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, 10, 769-783.
- [41] (a) Figueroa-Romero, C.; Sadidi, M.; Feldman, E. L. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2008**, 9, 301-314. (b) Hoshino, Y.; Mishima, M. *Antioxid. Redox Signal.* **2008**, 10, 701-704.

[42] (a) Aslan, M.; Cort, A.; Yucel, I. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 367-376. (b) Nilsson, J.; Bengtsson, E.; Fredrikson, GN.; Bjorkbacka, H. *Curr. Opin. Lipidol.* **2008**, 19, 519-524.

[43] (a) Shoham, A.; Hadziahmetovic, M.; Dunaief, JL.; Mydlarski, M. B.; Schipper, H. M. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, 45, 1047-1055. (b) Ungvari, Z.; Parrado-Fernandez, C.; Csiszar, A.; de Cabo, R. *Circ. Res.* **2008**, 102, 519-528. (c) Viani, G. A.; Mantya, G. B.; Fonseca, E. C.; De Fendi, L. I.; Afonso, S. L.; Stefano, E. J. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2009**, 28, 47.

[44] (a) Brown, N. S.; Bicknell, R. *Breast Cancer Res.* **2001**, 3, 323-327. (b) Csiszar, A.; Wang, M.; Lakatta, E. G.; Ungvari, Z. I. *J. Appl. Physiol.* **2008**, 105, 1333-1341. (c) Toyokuni, S. *IUBMB Life* **2008**, 60, 441-447.

[45] Mocellin, S.; Bronte, V.; Nitti, D. *Med. Res. Rev.* **2007**, 27, 317-352.

[46] Raha, S.; Robinson, B. H. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25(10), 502-508.

[47] Bylund, J.; Brown, K. L.; Movitz, C.; D, Claes.; Karlsson, A. *Free Radical Biology & Medicine* **2010**, 49, 1834-1845.

[48] Imlay, J. A. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 755-776.

[49] Ivanović-Burmazović, I.; Filipović, M. R. *Adv. Inorg. Chem.* **2012**, 64, 53-95.

[50] Iranzo, O. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 73-87.

[51] Miriyala, S.; Spasojevic, I.; Tovmasyan, A.; Salvemini, D.; Vujaskovic, Z.; St. Clair, D.; Batinic-Haberle, I. *Biochim. Biophys. Acta.* **2012**, 1822, 794-814.

[52] Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W. *Fundamentals of Biochemistry, 2nd Edition.* John Wiley and Sons, **2006**. Inc. pp. 547, 556.

[53] (a) Carreras, M. C.; Poderoso, J. J. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2006**, 292, C1569-C1580. (b) Hoye, A. T.; Davoren, J.R.; Wipf, P. *Acc. Chem. Res.* **2008**, 41, 87-97. (c) Murphy, M. P. *Biochim. Biophys. Acta.* **2008**, 177, 1028-1031.

[54] Mann, T.; Keilin, D. *Proc. Roy. Soc. Ser. B Biol. Sci.* **1938**, 126(844), 303-315.

[55] Markowitz, H.; Cartwright, G. E.; Wintrobe, M. M. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 40.

[56] Kimmel, H. M.; Brown, D. M. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 46.

[57] (a) McCord, J. M.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244(22), 6049-6055. (b) McCord, J. M.; Fridovich, I. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244(22), 6056-6063.

[58] Vallet, M.; Faus, J.; García-España, E.; Moratal, J. *Introducción a la Química Bioinorgánica.* Ed. Síntesis, **2003**.

[59] Cabelli, D. E.; Riley, D. P.; Rodriguez, J. A.; Valentine, J. S.; Zhu, H. *Models of superoxide dismutases in Biomimetic oxidations catalysed by transition metal complexes.* **2000**, Imperial College Press, London.

-
- [60] Hart, P. J.; Balbirnie, M. M.; Ogihara, N. L.; Nersissian, A. M.; Weiss, M. S.; Valentine, J. S.; Eisenberg, D. *Biochem.* **1999**, 38(7), 2167-2178.
- [61] Parent, R. A. *Comparative Biology of the Normal Lung, Capítulo 25 - Antioxidant Defenses in the Lung*, 2ª Edición, **2015**.
- [62] Wagner, U. G.; Pattridge, K. A.; Ludwig, M.L.; Stallings, W.C.; Werber, M.M.; Oefner, C.; Frolow, F.; Sussman, J. L. *Prot. Sci.* **1993**, 2(5), 814-825.
- [63] Stallings, W. C.; Pattridge, K. A.; Strong, R. K.; Ludwig, M. L. *J. Biol. Chem.* **1985**, 260(30), 16424-16432.
- [64] (a) Stoddard, B. L.; Howell, P. L.; Ringe, D.; Petsko, G. A. *Biochem.* **1990**, 29(38), 8885-8893. (b) Ludwig, M. L.; Metzger, A. L.; Pattridge, K. A.; Stallings, W. C. *J. Mol. Biol.* **1991**, 219(2), 335-358.
- [65] Holm, R. H.; Kennepohl, P.; Solomon, E. I. *Chem. Rev.* **1996**, 96(7), 2239-2314.
- [66] McCord, J. M.; Edeas, M. *Biomed. Pharmacother.* **2005**, 59(4), 139-142.
- [67] (a) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1956**, 24(5), 966-978. (b) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1956**, 24(5), 979-989; (c) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1957**, 26(4), 867-871. (d) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1957**, 26(4), 872-877. (e) Marcus, R. A. *Disc. Faraday Soc.* **1960**, 29, 21-31. (f) Marcus, R. A. *J. Phys. Chem.* **1963**, 67(4), 853-857. (g) Marcus, R. A. *Ann. Rev. Phys. Chem.* **1964**, 15, 155-196. (h) Marcus, R. A. *J. Chem. Phys.* **1965**, 43(2), 679-692. (i) Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, 811(3), 265-322.
- [68] Verhagen, M.F.; Meussen, E. T.; Hagen, W. R. *Biochim. Biophys. Acta* **1995** 1244(1), 99-103
- [69] Lawrence, G. D.; Sawyer, D. T. *Biochem.* **1979**, 18(14), 3045-3050.
- [70] Azab, H. A.; Banci, L.; Borsari, M.; Luchinat, C.; Sola, M.; Viezzoli, M. S.; *Inorg. Chem.* **1992**, 31(22), 4649-4655.
- [71] Muscoli, C.; Cuzzocrea, S.; Riley, D. P.; Zweier, J. L.; Thiemermann, C.; Wang, Z. Q.; Salvemini, D.; *Brit. J. Pharmacol.* **2003**, 140(3), 445-460.
- [72] Zhou, Y. H.; Fu, H.; Zhao, W. X.; Chen, W. L.; Su, C. Y.; Sun, H.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. *Inorg. Chem.* **2007**, 46(3), 734-739.
- [73] Koppenol, W.H. *Free Radical Biology and Medicine* **1993**, 15(6), 645-651.
- [74] Barnese, K.; Gralla, E. B.; Cabelli, D. E.; Valentine, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 4604-4606.
- [75] Iranzo, O. *Bioorg. Chem.* **2011**, 39, 73-87.
- [76] Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, 46, 3-26.

-
- [77] Riley, D. P. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2773-2587.
- [78] Weiss, R. H.; Riley, D. P. *Drugs Future.* **1996**, 21, 383-389.
- [79] Salvemini, D. *PCT Int. Appl.* WO 98/58636, **1998**.
- [80] Salvemini, D.; Wang, Z.-Q.; Zweier, J. L.; Samouliov, A.; Macarthur, H.; Misko, T. P.; Currie, M. G.; Cuzzocrea, S.; Sikorski, J. A.; Riley, D. P. *Science.* **1999**, 286, 304-306.
- [81] Li, Q.-X.; Luo, Q.-H.; Li, Y.-Z.; Pan, Z.-Q.; Shen, M.-C. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, 4447-4456.
- [82] Failli, P.; Bani, D.; Bencini, A.; Cantore, M.; Di Cesare Mannelli, L.; Ghelardini, C.; Giorgi, C.; Innocenti, M.; Rugi, F.; Spepi, A.; Udisti, R.; Valtancoli, B. *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 7273-7283.
- [83] (a) Kolks, G.; Frihart, C.; Rabinowitz, H.; Lippard, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98(18), 5720-5721. (b) Coughlin, P. K.; Dewan, J. C.; Lippard, S. J.; Watanabe, E.; Lehn, J.-M. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 265-266. (c) Coughlin, P.K.; Lippard, S.J. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1446-1451. (d) Kolks, G.; Frihart, C. R.; Coughlin, P. K.; Lippard, S. J. *Inorg. Chem.* **1981**, 20(9), 2933-2940.
- [84] Fu, H.; Zhou, Y. H.; Chen, W. L.; Deqing, Z. G.; Tong, M. L.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4924-4925.
- [85] Zhou, Y. H.; Zhao, W. X.; Chen, W. L.; Su, C. Y.; Sun, H.; Ji, L. N.; Mao, Z. W. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 734-739.
- [86] Verdejo, B.; Blasco, S.; García-España, E.; Lloret, F.; Gaviña, P.; Soriano, C.; Tatay, S.; Jiménez, H. R.; Doménech, A.; Latorre, J. *Dalton Trans.* **2007**, 41, 4726-4737.
- [87] (a) Lu, Q.; Luo, Q. H.; Dai, A. B.; Zhou, Z. Y.; Hub, G. Z. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 20, 1429-1430. (b) Pierre, J. L.; Chautemps, P.; Refaif, S.; Beguin, C.; Marzouki, A. E.; Serra-Trice, G.; Saint-Aman, E.; Rey, P. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 1965-1973. (c) Szilágyi, I.; Hernandi, K.; Pálinkó, I. N. N.; Korecz, L.; Rockenbauer, A.; Kele, Z.; Kiss, T. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99(8), 1619-1629. (d) Belda, R.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Jiménez, H. R.; Doménech-Carbó, A.; Soriano, C.; Latorre, J.; Terencio, C.; García-España, E. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 11194.
- [88] (a) Autzen, S.; Korth, H. G.; Boese, R.; de Groot, H.; Sustmann, R. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2003** 7, 1401-1410. (b) Casanova, J.; Alzuet, G.; Borrás, J.; Carugo, O. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 11, 2239-2244. (c) Jitsukawa, K.; Harata, M.; Arii, H.; Sakurai, H.; Masuda, H. *Inorg. Chim. Acta.* **2001**, 324(1-2), 108-116. (d) Li, Q. X.; Luo, Q. H.; Lia, Y. Z.; Shena, M. C. *Dalton Trans.* **2004**, 2329-2335. (e) Le, X.; Liao, S.; Liu, X.; Feng, X. *J. Coord. Chem.* **2006**, 59(9), 985-995. (f) González-Álvarez, M.; Alzuet, G.; Borrás, J.; del Castillo, A. L.; García-Granda, S.; Montejo-Bernardo, J. M. *Inorg. Chem.*, **2005**, 44(25), 9424-9433. (g) Barik, A.; Mishra, B.;

Kunwar, A.; Kadam, R. M.; Shen, L.; Dutta, S.; Padhye, S.; Satpati, A. K.; Zhang, H. Y.; Priyadarsini, K. I. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42(4), 431-439. (h) Fernandes, A. S.; Gaspar, J.; Cabral, M. F.; Caneiras, C.; Guedes, R.; Rueff, J.; Castro, M.; Costa, J.; Oliveira, N. G. *J. Inorg. Biochem.* **2007**, 101(5), 849-858.

[89] (a) Howe-Grant, M. S.; Lippard, S. J. *Biochemistry* **1979**, 18, 5762-5769. (b) James, T. D.; Linnane, P.; Shinkai, S. *Chem. Commun.* **1996**, 281-288.

[90] Cai, Z. P.; Hagan, A. K.; Wang, M. M.; Flitsch, S. L.; Liu, L.; Voglmeir, J. *Anal. Chem.* **2014**, 86, 5179-5186.

[91] González-García, J.; Martínez-Camarena, A.; Verdejo, B.; Clares, M. P.; Soriano, C.; García-España, E.; Jiménez, H. R.; Doménech-Carbó, A.; Tejero, R.; Calvo, E.; Briansó-Llort, L.; Serena, C.; Trefler, S.; García-España, A. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 163, 230-239.

[92] Clares, M. P.; Blasco, S.; Inclán, M.; Agudo, L. del C.; Verdejo, B.; Soriano, C.; Doménech, A.; Latorre, J.; García-España, E. *Chem. Commun.* **2011**, 47(21), 5988.

[93] Clares, M. P.; Serena, C.; Blasco, S.; Nebot, A.; Del Castillo, L.; Soriano, C.; Doménech, A.; Sánchez-Sánchez, A. V.; Soler-Calero, L.; Mullor, J. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 143, 1-8.

[94] Nebot-Guinot, A.; Liberato, A.; Máñez, M. A.; Clares, M. P.; Doménech, A.; Pitarch-Jarque, J.; Martínez-Camarena, A.; Basallote, M. G.; García-España, E. *Inorganica Chim. Acta* **2017**, 472, 139-148.

[95] Blasco, S. *Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como Miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universitat de València, **2011**.

[96] Inclán, M. *Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas*; Tesis Doctoral; Facultad de ciencias Químicas. Universitat de València, **2016**.

[97] Belda, R.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Jiménez, H. R.; Doménech-Carbó, A.; Soriano, C.; Latorre, J.; Terencio, C.; García-España, E. *Dalt. Trans.* **2013**, 42(31), 11194.

[98] Blackburn, M.; Gait, M.; Loakes, D.; Williams, David, *Nucleic acids in chemistry and biology*, Ed. The Royal Society of Chemistry, **2006**, Cambridge, UK.

[99] García-España, E.; Piantanida, I.; Schneider, H.-J. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*. Editado por Hans-Jörg Schneider, RSC Publishing, **2013**.

[100] Butcher, S. E.; Pyle, A. M. *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 1302-1311.

[101] Lerman, L. A. *J. Mol. Biol.* **1961**, 3, 18-30.

[102] Ferguson, L. R.; Denny, W. A. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 623(1-2), 14-23.

- [103] Pigram, W. J.; Fuller, W.; Hamilton, L. D. *Nature*. **1972**, 235, 17-19.
- [104] Quigley, G. J.; Wang, A. H.; Ughetto, G.; van der Marel, G.; van Boom, J. H.; Rich, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1980**, 77, 7204-7208.
- [105] Belmont, P.; Constant, J. F.; Demeunynck, M. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30(1), 70-81.
- [106] Kaushik, M.; Kaushik, S.; Roy, K.; Singh, A.; Mahendru, S.; Kumar, M.; Chaudhary, S.; Ahmed, S.; Kukreti, S. *Biochem. Biophys. Reports* **2016**, 5, 388-395.
- [107] Bikard, D.; Loot, C.; Baharoglu, Z.; Mazel, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74(4), 570-588.
- [108] Biver, T. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257(19-20), 2765-2783.
- [109] De, S.; Michor, F. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011**, 18(8), 950-955.
- [110] Wells, R. D.; Dere, R.; Hebert, M. L.; Napierala, M.; Son, L. S. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33(12), 3785-3798.
- [111] Dillon, L. W.; Pierce, L. C. T.; Ng, M. C. Y.; Wang, Y.-H. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, 22(7), 1443-1456.
- [112] Marquis-Gacy, A.; Goellner, G.; Juranić, N.; Macura, S.; McMurray, C. T. *Cell* **1995**, 81(4), 533-540.
- [113] Mirkin, S. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, 16(3), 351-358.
- [114] Kiliszek, A.; Rypniewski, W. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42(13), 8189-8199.
- [115] Hagihara, M.; He, H.; Kimura, M.; Nakatani, K. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2012**, 22(5), 2000-2003.
- [116] Schneider, H.-J. *Supramolecular Systems in Biomedical Fields*. Ed. Hans- Jörg Schneider, RSC Publishing, **2013**.
- [117] Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. *Acc. Chem. Res.* **2009**, 43, 496-505.
- [118] Lakowicz, J. R.; Gryczynski, I.; Malak, H.; Schrader, M.; Engelhardt, P.; Kano, H.; Hell, S. W. *Biophys. J.* **1997**, 72(2), 567-578.
- [119] Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 623(1-2), 3-13.
- [120] Shivalingam, A.; Izquierdo, M. A.; Marois, A. Le; Vyšniauskas, A.; Suhling, K.; Kuimova, M. K.; Vilar, R. *Nat. Commun.* **2015**, 6, 8178.
- [121] Bhasikuttan, A. C.; Mohanty, J. *Chem. Commun.* **2015**, 51(36), 7581-7597.
- [122] (a) Campbell, N. H.; Karim, N. H. A.; Parkinson, G. N.; Gunaratnam, M.; Petrucci, V.; Todd, A. K.; Vilar, R.; Neidle, S. *J. Med. Chem.* **2012**, 55(1), 209-222.

(b) Abd Karim, N. H.; Mendoza, O.; Shivalingam, A.; Thompson, A. J.; Ghosh, S.; Kuimova, M. K.; Vilar, R. *RSC Adv.* **2014**, 4(7), 3355-3363.

[123] González-García, J.; Uzelac, L.; Kralj, M.; Llinares, J. M.; García-España, E.; Piantanida, I. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11(13), 2154.

[124] Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134(23), 9644-9656.

[125] Inclán, M.; Guijarro, L.; Pont, I.; Frías, J. C.; Rotger, C.; Orvay, F.; Costa, A.; García-España, E.; Albelda, M. T. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23(63), 15966-15973.

2. Objetivos

La presente tesis doctoral se desarrolla en el marco de los proyectos “Aplicación de la Química Supramolecular al diseño, síntesis y estudio de compuestos bioactivos de acción antiinflamatoria, antitumoral o antiparasitaria” [CSD-2010-00065], “Química Supramolecular Médica. Actividad antiparasitaria y/o antitumoral de compuestos polinitrogenados” [CTQ2013-48917-1-P], “Diseño, síntesis y nanofuncionalización de pequeñas moléculas y complejos metálicos con actividad frente a kinetoplástidos. Búsqueda de dianas terapéuticas y mecanismos de acción” [CTQ2016-78499-C6-1-R] y “Química Supramolecular Médica. Avances en el diseño, síntesis y estudio de compuestos bioactivos con acción antioxidante, antitumoral y/o antiparasitaria” [PrometeoII 2015/002].

Así pues, como miembro investigador dentro del Grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València, el autor de la presente tesis ha orientado su trabajo a desarrollar y cumplir con las metas propuestas en los mismos.

A continuación se detallarán los objetivos planteados para la presente tesis doctoral presentados como objetivos generales y objetivos específicos (*O.E.*).

Objetivo General 1. Diseño, síntesis y caracterización de nuevos derivados poliamínicos con potenciales aplicaciones biomédicas.

O.E.1.1. Se avanzará en las rutas sintéticas ya establecidas en el grupo con el objetivo de obtener nuevos ligandos de tipo poliamínico con características mejoradas y novedosas, basados en compuestos previamente caracterizados en el GQS-UV y que demostraron propiedades interesantes.

O.E.1.2. En el caso de que sea necesario, se desarrollarán y optimizarán nuevas rutas sintéticas para la obtención de los nuevos receptores.

Objetivo General 2. Caracterización de las propiedades ácido-base en disolución acuosa de los ligandos sintetizados.

O.E.2.1. Dado que, por definición, las poliaminas sintetizadas presentan grupos susceptibles de ser protonados y que tanto las características químicas como su posible actividad biológica dependen en gran medida de su grado de protonación a un pH concreto, en primera instancia se procederá a determinar las constantes de protonación de los compuestos sintetizados.

O.E.2.2. A partir de las constantes de equilibrio ácido-base se calcularán y analizarán los diagramas de distribución de especies en función del pH. Esto permitirá, además, determinar el grado de protonación promedio de las poliaminas a pH fisiológico.

O.E.2.3. Mediante la combinación de las distintas técnicas disponibles en el grupo de trabajo se intentarán determinar las secuencias de protonación de los nuevos receptores.

Objetivo General 3. Evaluación de la capacidad de coordinación de los ligandos poliamínicos sintetizados con metales de transición.

O.E.3.1. Se evaluará, mediante valoraciones potenciométricas, la capacidad de los receptores obtenidos para formar complejos metálicos en disolución acuosa con Cu(II), Zn(II) y Mn(II).

O.E.3.2. Una vez determinadas las constantes de estabilidad de los complejos metálicos, se calcularán y analizarán los diagramas de distribución de especies frente al pH. Posteriormente se monitorizará la formación de los complejos de Cu(II) en disolución mediante espectroscopía UV-Vis. Todo ello enfocado a elucidar cuáles son los átomos de nitrógeno involucrados en la coordinación de los átomos metálicos.

O.E.3.3. Se determinará la estructura de los complejos metálicos mediante la resolución de los monocristales obtenidos a distintas relaciones molares Cu(II):L.

Objetivo General 4. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa de los complejos metálicos determinados.

O.E.4.1. Como primera aproximación para evaluar la capacidad de los complejos metálicos caracterizados para actuar como miméticos SOD, se evaluará su comportamiento electroquímico en disolución mediante estudios de voltamperometría cíclica.

O.E.4.2. Se determinará, mediante estudios cinéticos indirectos, la capacidad de los distintos complejos metálicos para dismutar de forma efectiva el radical superóxido en disolución acuosa. Posteriormente se evaluará si existe relación entre las actividades determinadas y la estructura de los compuestos estudiados, así como con los potenciales *redox* determinados para los distintos centros metálicos.

Objetivo General 5. Estudio de la capacidad de interacción de los ligandos sintetizados con distintas secuencias de ácidos nucleicos. Con el objetivo de evaluar la capacidad de los nuevos ligandos para actuar como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico.

O.E.5.1. Se estudiará la interacción de determinados receptores con secuencias de ácidos nucleicos características de ADN (*ctADN*) y de ARN (*poliA-poliU*), con el fin de evaluar la posible selectividad hacia una secuencia determinada. Paralelamente se determinará la influencia de la formación de complejos metálicos con Zn(II) en dicha interacción

O.E.5.2. Se analizará la interacción de aquellos compuestos que presenten propiedades fotoluminiscentes frente a un panel de secuencias específicas de ácidos nucleicos, las cuales presentan estructuras secundarias de tipo *horquilla*. Todo ello enfocado a evaluar su potencial uso como sensores fluorescentes para la detección selectiva de secuencias de ácidos nucleicos características de enfermedades neurodegenerativas.

O.E.5.3. En todos los casos, se llevarán a cabo estudios enfocados a caracterizar los modos de interacción de las poliaminas con las distintas secuencias, con el objetivo final de establecer posibles relaciones estructura-actividad. También se intentarán correlacionar las diferentes estructuras secundarias de los ácidos nucleicos estudiados con el modo preferente de interacción y la posible selectividad.

Objetivo General 6. Evaluación de la actividad biológica de los nuevos compuestos. *Estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación de Biología Molecular perteneciente al Institut de Investigació Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Joan XXIII de la Universitat Rovira i Virgili.*

O.E.6.1. Una vez caracterizada la formación de los complejos metálicos con Cu(II) y Mn(II), se llevarán a cabo estudios para determinar su citotoxicidad en función de la concentración.

O.E.6.2. Se evaluará el posible efecto protector frente al estrés oxidativo de los complejos metálicos más prometedores mediante ensayos *in vitro* con cultivos de levaduras deficientes en la enzima citoplasmática SOD1.

3. Nomenclatura

3.1. Nomenclatura sistemática de los fanos

El objetivo de la nomenclatura sistemática es generar, para cada molécula, un nombre mediante el cual ésta quede identificada de forma inequívoca y sin posibles ambigüedades. Para ello se ha desarrollado una metodología que permite identificar a cada molécula mediante el ensamblaje de nombres que describen los componentes de la misma. Las reglas que rigen esta nomenclatura están tuteladas por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC por sus siglas en inglés), la cual publica guías y recomendaciones a seguir para la asignación de nombres.[1]

En la presente tesis se han sintetizado moléculas orgánicas formadas todas ellas por una cadena y un espaciador aromáticos que reciben el nombre de ciclofanos.[2] Las recomendaciones emitidas por la IUPAC en referencia a la nomenclatura de fanos se basan en una operación denominada simplificación (figura 3.1), la cual consiste en la construcción de un esqueleto simplificado mediante la sustitución de los espaciadores aromáticos por “*superátomos*”. [3][4] La inversa de esta operación se denomina amplificación.

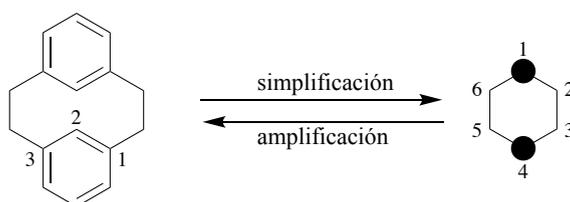


Figura 3.1. Operación de simplificación en la nomenclatura de ciclofanos.

3.2. Nomenclatura sistemática de los piridinaciclofanos

Debido a que los ligandos estudiados en la presente tesis presentan, como mínimo, un anillo macrocíclico de piridina, estos pertenecen a la familia de los piridinaciclofanos, o azaciclofanos. A su vez todos ellos presentan una cadena lateral la cual puede sufrir movimientos moleculares en respuesta a estímulos externos (variaciones de pH, coordinación con metales etc.), por lo que históricamente este tipo de ligandos han sido nombrados como compuestos de tipo escorpiando.[5][6]

Aplicando las recomendaciones anteriormente descritas al compuesto de tipo escorpiando de la figura 3.2, se obtiene la estructura de tipo simplificada que consta de un ciclo de 10 átomos (macrociclo) el cual contiene a su vez un grupo 2,6-piridina en la posición 1, un grupo 3,7-diazaheptilo en la posición 6 y tres grupos amino en las posiciones 3, 6 y 9. El nombre sistemático para el compuesto es 6-[7-(bis-aminoetil)-3,7-diazaheptilo]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano]. En el capítulo 5 (*Síntesis*) se nombran los distintos ligandos sintetizados con la nomenclatura sistemática IUPAC.

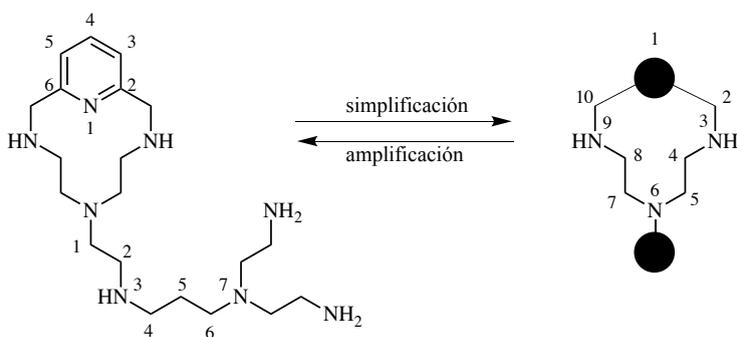


Figura 3.2. Operación de simplificación para el ligando 6-[7-(bis-aminoetil)-3,7-diazaheptilo]-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinaciclodecafano].

3.3. Nomenclatura simplificada

Como se ha mencionado anteriormente, la nomenclatura sistemática resulta inequívoca y no ambigua. Sin embargo, en muchos casos ésta resulta excesivamente compleja y no adaptada al uso cotidiano. Por ello, habitualmente en la literatura científica los autores proponen nomenclaturas simplificadas para las nuevas series de compuestos químicos sintetizados.

Durante los últimos años, en el Grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València (GQS-UV) se ha usado la nomenclatura simplificada para nombrar gran variedad de compuestos obtenidos (*tren*, *pytren*, *pytren-al*, *pycrab*, *pytren-A...*), siendo alguno de ellos precursores de los ligandos obtenidos en esta tesis.[7][8]

La gran mayoría de los compuestos sintetizados en la presente tesis son derivados de un mismo compuesto (**L1**) (figura 3.3), el cual presenta un anillo macrocíclico de piridina unido por una cadena central, etil-propilamina, a dos grupos etilamina. A su vez se ha sintetizado **L2**, el cual conserva el anillo macrocíclico así como la cadena central presente en **L1**, pero presenta dos grupos propilamina al final de la misma. El derivado **L3** presenta un anillo macrocíclico adicional en el extremo de la cadena central. La letra “L” sin resaltar hará referencia a un ligando sin especificar.

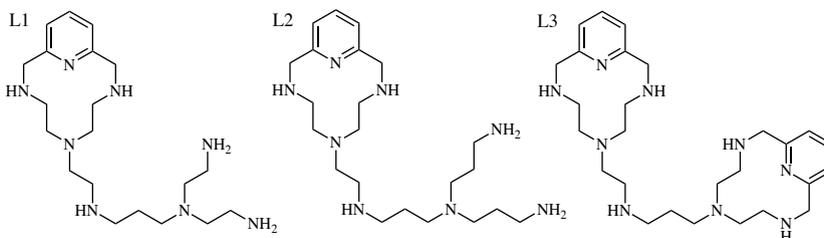


Figura 3.3. Estructura de los compuestos **L1**, **L2** y **L3**.

Como se ha mencionado anteriormente, los ligandos sintetizados en esta tesis doctoral son, en su gran mayoría, derivados de **L1** en los que las dos aminas terminales han sido funcionalizadas con un grupo aromático. A cada grupo aromático sustituyente se le asocia una abreviatura relacionada con su nombre extendido con el objetivo, nuevamente, de simplificar la nomenclatura (tabla 3.1 y figura 3.4). A su vez, en el caso que sea necesario las abreviaturas indican la posición sustituida en el anillo aromático respecto al heteroátomo, en este caso el nitrógeno (N).

Tabla 3.1. Abreviaturas utilizadas para distintos grupos sustituyentes.

Nombre	Abreviatura
2-Piridina	2Py
3-Piridina	3Py
4-Quinolina	4Q
Antraceno	A

Para nombrar de forma inequívoca a los ligandos sintetizados se utilizará el sistema de abreviaturas alfanuméricas. Así pues, el nombre de los nuevos receptores incluirá el nombre asignado al ligando de partida, **L1**, seguido de la abreviatura correspondiente al grupo sustituyente utilizado para su obtención (tabla 3.1 y figura 3.4).

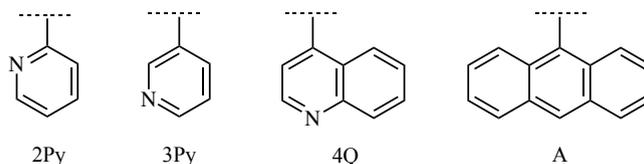


Figura 3.4. Grupos sustituyentes utilizados para la obtención de los derivados de **L1**.

Referencias

- [1] *International Union of Pure and Applied Chemistry. Organic Chemistry Division. Commission on Nomenclature of Organic Chemistry. A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds, Recommendations*. Ed. Panico, R.; Powell, W. H.; Richer, J.-C. Oxford: Blackwell Scientific Publications, **1993**.
- [2] *Cyclophanes*; Ed. Philip Keehn, Elsevier, **2012**.
- [3] Powell, W. H. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 1513-1545.
- [4] Favre, H. A.; Hellwinkel, D.; Powell, W. H.; Smith, H. A.; Tsay, S. S.-C. *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 809-834.
- [5] Chang, C. K.; Traylor, T. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 5810-5811.
- [6] Bowman, K.; Riley, D. P.; Busch, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5036-5038.
- [7] Verdejo, B.; Ferrer A.; Blasco, S.; Castillo, C.E.; González, J.; Latorre, J.; Mañez, M. A.; García Basallote M.; Soriano, C.; García-España E. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5707.
- [8] Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 9644-9656.

4. Material y métodos

4.1. Estudios potenciométricos

La potenciometría es una técnica ampliamente utilizada en el estudio de equilibrios en disolución. En la presente tesis se ha hecho uso de ésta tanto para el cálculo de las constantes de basicidad de las distintas poliaminas obtenidas como para el estudio de formación de complejos binarios y mixtos con Cu(II), Zn(II) y Mn(II).

4.1.1. Sistema potenciométrico

Las medidas potenciométricas se han llevado a cabo en un potenciómetro automático controlado por ordenador (figura 4.1). El potenciómetro está compuesto por dos celdas; una de medida y otra de referencia. Ambas celdas están unidas por un puente salino tipo Wilhelm mediante un capilar en forma de J (para evitar flujos gravitacionales) que contiene cloruro sódico (NaCl) 0.5 M.

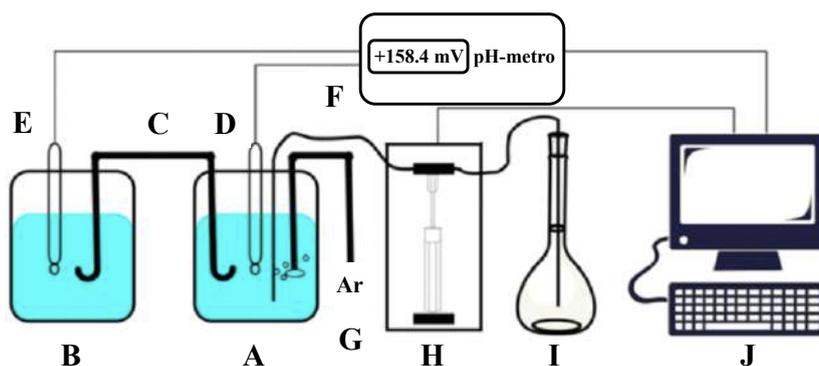


Figura 4.1. Esquema del sistema potenciométrico: **A**, celda de medida; **B**, celda de referencia; **C**, puente salino; **D**, electrodo de medida; **E**, electrodo de referencia; **F**, pH-metro; **G**, inyección de argón; **H**, bureta automática; **I**, NaOH 0.1 M; **J**, sistema informático.

El electrodo de medida es un electrodo de vidrio Crison 52 50, mientras que el electrodo de referencia es un electrodo Crison 52 40 de Ag/AgCl en KCl 3 M. Como valorante se utiliza una disolución de NaOH 0.1 M libre de CO₂. La disolución de NaOH se adiciona con una bureta automática Crison modelo micro BU 20 31. Tanto la celda de medida como la de referencia están termostatadas a 298.1 ± 0.1 K con un baño de agua Haake EK 51 (figura 4.1). Una descripción más detallada de cada uno de los componentes se puede obtener en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Descripción de los componentes del sistema potenciométrico.

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

Todas las valoraciones se han llevado a cabo utilizando como fuerza iónica una disolución de NaCl 0.15 M. Dicha fuerza iónica fue seleccionada tanto por razones de solubilidad como por ser considerada una fuerza iónica cercana a la encontrada en condiciones fisiológicas y usada en los sueros fisiológicos (0.9 % NaCl).

4.1.2. Adquisición y tratamiento de los datos

Calibrado de los electrodos

Previamente a cada medida potenciométrica se realizó un calibrado de los electrodos mediante la valoración de un ácido fuerte (HCl 0.1 M previamente valorado con un patrón primario (TRIS)) con una base fuerte (NaOH 0.1 M), siendo esta última la misma disolución valorante utilizada en el experimento. Tanto las valoraciones como el posterior tratamiento de los datos se realizan de forma automática por el programa PASAT.[1] Este programa calcula, mediante una representación de Gran,[2][3] el valor de $E^{0'}$, el valor del producto iónico del agua (pK_w) y la concentración de la disolución valorante (NaOH). Mediante la diferencia de concentración de valorante en la zona ácida y en la zona básica es posible determinar también el grado de carbonatación de la disolución de valorante (NaOH), el cual se debe mantener por debajo del 1%.

Adquisición de los datos

La medida de los datos potenciométricos se lleva a cabo de forma automatizada mediante el programa PASAT.[1] Este programa controla tanto la adición de valorante mediante la bureta automática como la posterior lectura y registro de los datos ofrecidos por el pH-metro. Para cada alícuota de valorante adicionada el programa adquiere un total de 10 valores de potencial calculando la desviación estándar de los mismos (σ) y la diferencia entre el primer y el último valor (deriva), si estos parámetros superan unos criterios de selección fijados por el operador (en nuestro caso σ y deriva <0.05) se registra el valor medio en un archivo que contendrá los valores de los volúmenes de valorante añadidos (mL) y las medidas de la fuerza electromotriz registrados (mV). En el caso contrario, se toma otro valor y se calculan de nuevo σ y el valor de deriva de los últimos 10 valores, este

proceso se repite hasta que se cumplen los criterios establecidos. En el caso de que se llegue a las 100 medidas se considera que no se ha alcanzado el equilibrio y se procede a tomar otro valor de potencial tras la adición de una alícuota de valorante.

Tratamiento de los datos

Con los datos obtenidos se calculan las constantes de equilibrio del sistema mediante los programas SUPERQUAD e HYPERQUAD.[4][5] Estos programas utilizan el método de Levenberg-Marquard para realizar un ajuste de mínimos cuadrados no lineal dirigido a optimizar los valores de las constantes del modelo propuesto, hasta obtener el mejor ajuste de éstos a los valores experimentales.

La definición termodinámica de una constante de formación es un cociente de actividades. Para estos cálculos, sin embargo, se asume que los coeficientes de actividad son constantes (esta suposición está justificada ya que los experimentos se hacen en un medio de elevada fuerza iónica) y, por tanto, se pueden expresar las constantes de formación como un cociente de concentraciones:

$$\beta_{a,b...} = \frac{[A_a B_b \dots]}{[A]^a [B]^b \dots} + cte$$

Ecuación 4.1

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

El algoritmo de refinamiento toma como variable independiente el volumen de la disolución valorante y como variable dependiente el potencial medido. Este potencial se relaciona con la concentración de protones a través

de la ecuación de Nernst (ecuación 4.2), por lo que es necesario conocer previamente el valor del potencial estándar $E^{0'}$.

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

Ecuación 4.2

Mediante un proceso iterativo se minimiza la suma de los errores cuadráticos de los parámetros estimados inicialmente, hasta obtener valores que satisfagan los criterios establecidos.

Para asegurar la reproducibilidad de los datos, los valores finales de las constantes globales de equilibrio se obtienen siempre mediante el ajuste de, al menos, dos conjuntos de datos de diferentes experimentos. Finalmente, con las constantes globales de equilibrio es posible calcular los diagramas de distribución de especies en función del pH, utilizando el programa HySS.[6]

El siguiente esquema detalla los pasos seguidos en los estudios potenciométricos:

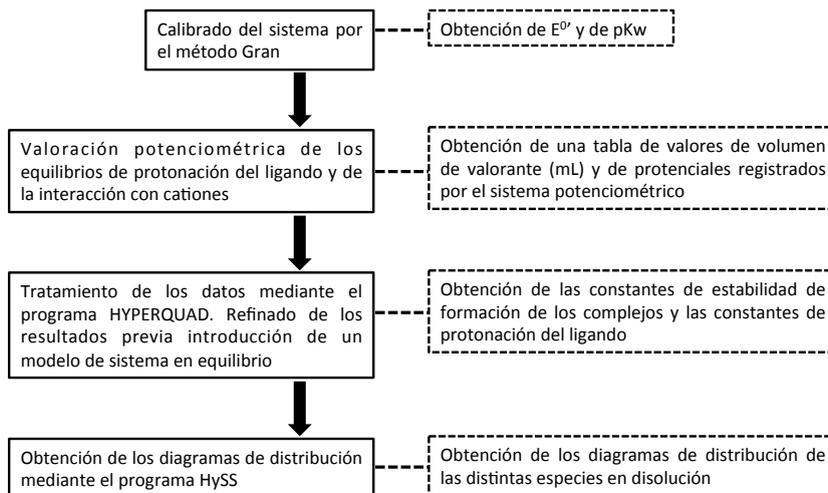


Figura 4.2. Esquema de los pasos seguidos en los estudios potenciométricos.

4.2. Análisis elemental

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

4.3. Espectrometría de masas

El análisis mediante electrospray (ESI-MS) se ha llevado a cabo en un espectrómetro de masas de trampa de iones Esquire 3000 (Bruker), perteneciente al SCSIE de la Universitat de València

4.4. Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear se han registrado en equipos Avance DRX Bruker 300 y Avance 400 MHz Bruker, pertenecientes al SCSIE de la Universitat de València, que operan respectivamente a 300.0 y 400.0 MHz para RMN de ^1H y a 75.4 y 100.6 MHz para RMN de ^{13}C .

Se han utilizado disolventes deuterados apropiados a las características de cada muestra. En el caso de los experimentos llevados a cabo en agua deuterada (D_2O), el pD se ha ajustado mediante el uso de disoluciones de DCl y NaOD. El pD se calculó teniendo en cuenta la relación existente entre pD y pH:[7]

$$pH = pD_{lectura} - 0.4$$

Ecuación 4.3

4.5. Difracción de rayos X

El análisis por difracción de rayos X de los monocristales obtenidos se realizó con un difractómetro Oxford Supernova (XtaLAB) (rayos X procedentes de MoK_α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$) a 120 K).

Las estructuras han sido resueltas mediante métodos directos utilizando SHELXT [8] y refinando por un sistema de mínimos cuadrados de matriz completa en todos los F^2 con la *suite* OLEX2.[9] Las representaciones moleculares se han llevado a cabo con el programa MERCURY.[10] Para corregir la geometrías de algunas partes desordenadas, así como los correspondientes parámetros térmicos, se introdujeron algunas restricciones blandas en SHELXL (DELU, ISOR, SIMU, DFIX).

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

Durante el transcurso de la tesis se han utilizado las técnicas de espectroscopía UV-Vis y de emisión de fluorescencia para realizar los distintos experimentos descritos en la tabla 4.2.

En general, se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de camino óptico, salvo en las medidas cinéticas, en las que se emplearon celdas desechables de poliestireno de volumen reducido (1 mL). En todos los casos la temperatura fue termostatada a $298.1 \pm 0.1 \text{ K}$. Los valores de pH, en el caso de disoluciones no tamponadas, se ajustaron mediante la adición de pequeñas cantidades de HCl y/o NaOH.

Tabla 4.2. Experimentos llevados a cabo durante la tesis junto a la descripción técnica de los aparatos usados.

Equipo	Experimentos
Espectrofotómetro UV-Vis	Valoraciones ácido-base, estudios de interacción ligando-metal y estudios de interacción ligando-oligonucleótido
Fluorímetro	Valoraciones ácido-base y estudios de interacción ligando-oligonucleótido
Especificaciones	
	Agilent 8453
Espectrofotómetros UV-Vis	Agilent Cary 300 con soporte de celdas múltiple y control de temperatura (5-90 °C)
Fluorímetro	PTI modular. Opción de lámpara de Xenón o laser de N ₂

Para las medidas de fluorescencia se empleó siempre una geometría en ángulo recto y celdas de cuarzo con las cuatro caras transparentes. La concentración de las disoluciones se ajustó para que la absorbancia a la longitud de onda de excitación no fuese superior a 0.2 unidades. Los datos de fluorescencia se han corregido teniendo en cuenta la absorbancia y los efectos de dilución debidos a las cantidades de ácido y base añadidas así como a la adición de los oligonucleótidos.

En los apartados sucesivos se presentan los detalles específicos para cada uno de los experimentos llevados a cabo mediante el uso de las distintas técnicas espectroscópicas. Los estudios cinéticos se detallarán en el apartado 4.8 (*Estudios cinéticos para la determinación de la actividad antioxidante*).

4.6.1. Estudios de interacción con ácidos nucleicos

Todas las valoraciones se han llevado a cabo en medio tamponado a pH 7.4, utilizándose disoluciones adecuadas para cada experimento. En el caso de los estudios con el *ctADN* y el *poliA-poliU* se utilizó una disolución de NaCac 50 mM, mientras que para los ensayos llevados a cabo con las secuencias específicas de oligonucleótidos (tabla 4.3) se utilizaron disoluciones de TRIS 20 mM y NaCl 100 mM. Todas las valoraciones se realizaron al menos dos veces para garantizar la reproducibilidad.

Las disoluciones de *ctDNA* y *poliA-poliU* se prepararon disolviendo 1-2 mg de la sal liofilizada en 200 µL de tampón. Las disoluciones se dejaron reposar a 4 °C durante 24 horas para su posterior almacenamiento a -10 °C. Previo a su uso se dejan descongelar lentamente y se agitan en un dispositivo agitador vortex para su completa homogeneización.

Tabla 4.3. Secuencias específicas de oligonucleótidos seleccionados para su estudio.

Abreviación	Secuencia completa (5'-3')
<i>hp 1</i>	GGC-AAA-ATT-TCG-TTT-TTC-GAA-ATT-TTG-CC
<i>hp 2</i>	GGC-AAG-CTT-CGC-TTT-TTG-CGA-AGC-TTG-CC
<i>hp 3</i>	GGC-GAA-GGC-AGC-TTT-TTG-CTG-CCT-TCG-CC
<i>hp 4</i>	GGC-AGG-CCC-AGC-TTT-TTG-CTG-GGC-CTG-CC
<i>hp_{CAG}</i>	TTC-AGC-AGA-ATG-TTT-CAG-CAG-AA
<i>hp_{CGG}</i>	TTC-GGC-GGA-ATG-TTT-CGG-CGG-AA
<i>hp_{CCG}</i>	TTC-CGC-CGA-ATG-TTT-CCG-CCG-AA
<i>hp_{CTG}</i>	TTC-TGC-TGA-ATG-TTT-CTG-CTG-AA

Las disoluciones de los oligonucleótidos de tipo *horquilla* (hp hace referencia a la abreviatura de la palabra inglesa *hairpin*) (tabla 4.3) se prepararon en el tampón de trabajo mediante la adición del volumen necesario para alcanzar la concentración final deseada (5×10^{-5} M). Las disoluciones se dejaron reposar a 4 °C durante un mínimo de 24 horas para posteriormente aplicarles una rampa de temperatura para su correcta hibridación, consistente en: calentamiento hasta los 90 °C, mantenimiento a 90 °C durante 10 minutos y enfriamiento progresivo hasta alcanzar la temperatura ambiente.

Para el cálculo de la concentración de las distintas secuencias se utilizó una cubeta de cuarzo de volumen reducido en la que se introdujo 1 mL del tampón de trabajo, una vez registrado el espectro del tampón (blanco) se adicionaron 5 alícuotas de la disolución de polinucleótido de 1 µL cada una, midiéndose la absorbancia después de cada adición. Finalmente, mediante la ley de Beer-Lambert y haciendo uso de los coeficientes de extinción molar detallados en la tabla 4.4 se calcularon las concentraciones en la cubeta para cada una de las adiciones. La concentración final de la disolución madre se obtuvo como el valor promedio de las 5 medidas.

Tabla 4.4. Coeficientes de extinción molar ($\lambda_{\text{max}} = 260$ nm) para los polinucleótidos y los oligonucleótidos utilizados.

Secuencias	ϵ ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ^a
<i>ctADN</i>	6600
<i>poliA-poliU</i>	6000
<i>hp 1</i>	271200
<i>hp 2</i>	257400
<i>hp 3</i>	254600
<i>hp 4</i>	250800
<i>hp_{CAG}</i>	231400
<i>hp_{CGG}</i>	220600
<i>hp_{CCG}</i>	209000
<i>hp_{CTG}</i>	210200

^a Coeficientes proporcionados por el vendedor.

4.6.1.1. Valoraciones fluorimétricas directas

La presencia de unidades fluorescentes en alguno de los ligandos sintetizados permite monitorizar de forma directa su interacción con las secuencias mediante medidas de emisión de fluorescencia. Para ello se preparara una disolución del ligando a estudiar (c.a. 5×10^{-6} M) en una cubeta de cuarzo de volumen reducido con las cuatro caras transparentes y paso óptico de 1 cm. Posteriormente, se adicionan alícuotas del oligonucleótido a estudiar desde una disolución 5×10^{-4} M hasta alcanzar la relación oligonucleótido-ligando deseada, registrando el espectro de emisión tras cada alícuota. Tras cada adición se registraron los espectros UV-Vis con el objetivo de corregir posibles variaciones en la emisión de fluorescencia debido a efectos de dilución.

4.6.1.2. Desplazamiento de indicador fluorescente

Entre los distintos métodos existentes para el estudio de la interacción de pequeñas moléculas los con ácidos nucleicos se encuentran los llamados ensayos de desplazamiento de indicador fluorescente (FID por sus siglas en inglés). La técnica se basa en la variación en las propiedades de emisión de fluorescencia del indicador unido al ADN al ser desplazado de su posición de equilibrio, como consecuencia directa de la interacción de una molécula con la secuencia de ácido nucleico. Se trata de una técnica muy utilizada ya que permite el estudio de moléculas que no presentan fluorescencia intrínseca y además los experimentos se llevan a cabo a concentraciones muy bajas (μM). Existe un amplio catálogo de indicadores fluorescentes; siendo algunos selectivos, por ejemplo, a los surcos de la doble hélice (HOECHST 33258, DAPI) o a determinadas conformaciones adoptadas por los ácidos nucleicos (naranja de triazolio: selectivo hacia estructuras de quartetos de guanina), así como otros que intercalan entre los pares de bases como el bromuro de etidio (EB por sus siglas en inglés).[11][12][13][14]

De los datos experimentales obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento es posible extraer información acerca del modo de interacción de la molécula estudiada con cada secuencia, así como de la estabilidad del complejo formado; expresada como valor IC_{50} (relación ligando-indicador que induce un desplazamiento del 50% del indicador fluorescente inicialmente unido al ADN).

A la hora de extraer conclusiones se debe tener en cuenta que se trata de un ensayo indirecto y que la fluorescencia del indicador puede verse afectada no sólo por el desplazamiento de su posición de equilibrio, sino por otros factores tales como efectos de desactivación fluorescente o la interacción directa de la molécula con el indicador.

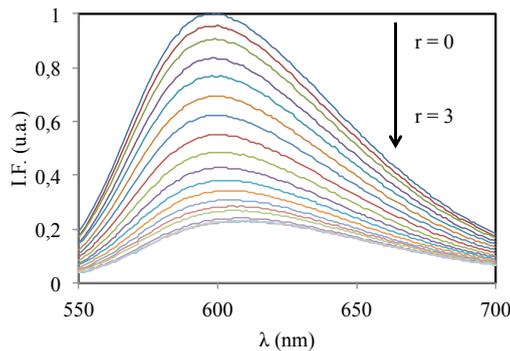


Figura 4.3. Ejemplo de la variación en la intensidad de emisión de fluorescencia del *EB* producida por la interacción de una molécula con *poliA-poliU* a distintas relaciones $[ligando]/[EB]$.

Los ensayos se han llevado a cabo preparando una disolución del polinucleótido a estudiar (c.a. 10^{-5} M) en el tampón de trabajo. Posteriormente se le adiciona el indicador en relación (pares de bases):indicador 3:1 para el EB y 10:1 para el DAPI. Una vez adicionado el indicador fluorescente se registra la emisión ($\lambda_{exc} = 520$ nm para el EB y $\lambda_{exc} = 400$ nm para el DAPI), a continuación se adicionan alícuotas del ligando registrando los espectros de emisión tras cada adición (figura 4.3).

4.6.1.3. Desnaturalizaciones térmicas

Se trata de una técnica ampliamente utilizada para la determinación del grado de interacción entre una molécula y secuencias de ácidos nucleicos. Se basa en la posibilidad de determinar la estabilidad térmica de la estructura secundaria de los ácidos nucleicos y poder así cuantificar los posibles cambios inducidos en esta variable por medio de la interacción con una molécula de bajo peso molecular.[15] Cabe destacar que esta técnica permite el estudio de una gran variedad de estructuras aparte de la conformación típica de ADN tipo B; algunos ejemplos son conformaciones de doble hebra tipo A y Z, cuartetos de guanina, conformaciones de tipo *horquilla*, etc.. [16]

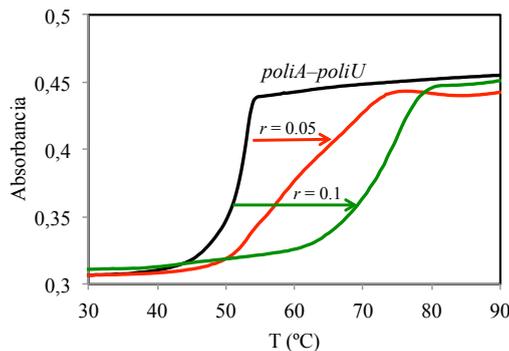


Figura 4.4. Ejemplo del efecto en el perfil de desnaturalización térmica de *poliA-poliU* inducido por la interacción de un ligando a distintas relaciones molares ($r = [\text{ligando}]/[\text{poliA-poliU}]$).

El fundamento de esta técnica es el siguiente: al elevar la temperatura de una disolución que contenga la secuencia que se desea estudiar se induce la rotura de su estructura secundaria, pasando de la estructura asociada a la forma desplegada monohebra. Dicho proceso viene asociado a cambios en las propiedades de absorción de las bases que componen la secuencia. De esta manera, si se representa la variación de la absorbancia, a la longitud de onda característica de cada secuencia, en

función de la temperatura se obtiene una curva tal y como se presenta en la figura 4.4. Como se observa, a bajas temperaturas la secuencia se encuentra en su forma hibridada debido a la estabilización de la estructura secundaria mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases complementarios. Así pues, a valores de temperatura bajos la absorbancia se mantiene constante hasta que se alcanza la temperatura en la que se empiezan a romper los enlaces entre los pares de bases y la secuencia empieza a disociarse, un subsiguiente aumento en la temperatura conduce al estado en el que las cadenas se encuentran en su estado totalmente disociadas, monohebra. Este cambio conformacional tiene lugar en una ventana relativamente estrecha de temperatura y viene acompañado de un efecto hipercrómico de un 15-20% (figura 4.4).

La temperatura de fusión, T_m , se define como la temperatura a la que la mitad de la secuencia presente en disolución se encuentra en su forma disociada y se asigna al punto de mayor pendiente en el salto de la curva (calculado como el máximo de la primera derivada). Este parámetro puede verse modificado mediante el cambio del tampón de trabajo, las sales presentes en disolución o el pH; tratándose entonces de un parámetro característico de la secuencia bajo unas condiciones de trabajo específicas.[17]

Si se adiciona a una disolución que contiene un polinucleótido determinado una molécula que interacciona con la secuencia por alguno de los modos de interacción descritos se observa un desplazamiento del T_m , ya sea hacia temperaturas mas bajas (desestabilización de la conformación secundaria) o hacia temperaturas mas altas (estabilización de la estructura secundaria). Se define entonces ΔT_m como la diferencia entre las temperaturas de fusión del polinucleótido libre y la de los aductos formados con los receptores estudiados.[18]

4.6.2. Determinación de constantes de estabilidad

Como ya se ha mencionado anteriormente, durante la presente tesis se han utilizado las valoraciones potenciométricas para el cálculo de constantes de estabilidad de los distintos sistemas en equilibrio. Sin embargo, en algunos casos se han complementado estos estudios utilizando las técnicas espectroscópicas UV-Vis y de fluorescencia, un ejemplo es el estudio de aquellos equilibrios que se dan en condiciones muy ácidas ($\text{pH} < 2.5$) o muy básicas ($\text{pH} > 11.0$). Por otro lado también se ha hecho uso de éstas para estudiar los distintos sistemas ligando-oligonucleótido. A continuación se detallan los métodos usados.

Estudios ácido-base

Los datos fueron obtenidos bien por espectroscopía UV-Vis, mediante el registro de la absorbancia a distintos valores de pH, o por espectroscopía de emisión de fluorescencia; en este segundo caso se registraron, como paso previo, varios espectros de absorción a distintos valores de pH con el objetivo de localizar posibles puntos isobéctico (valor de longitud de onda en el que la absorbancia total de la muestra no varía durante el experimento). Posteriormente se utilizó el valor de longitud de onda determinado como valor para la excitación en las valoraciones fluorimétricas, evitando así variaciones en la energía de excitación durante el experimento. A partir de los datos obtenidos se calcularon las constantes de estabilidad mediante su tratamiento matemático con el programa HypSpec.[4] El cálculo se lleva a cabo mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados para ajustar los valores de las constantes de estabilidad a los datos experimentales en base a un modelo previamente propuesto (coeficientes estequiométricos). El programa permite realizar el ajuste de mínimos cuadrados con múltiples longitudes de onda a la vez.

Estudios de interacción ligando-oligonucleótido.

De los datos obtenidos durante las valoraciones fluorimétricas es posible obtener las constantes de afinidad (K_{aff}) de los distintos sistemas en equilibrio, éste parámetro permite evaluar el grado de interacción de un ligando dado con los distintos oligonucleótidos. Para ello los datos obtenidos se analizaron de acuerdo con el modelo de sitios independientes mediante el ajuste no lineal de la relación F/F_0 (a la longitud de onda de emisión máxima) frente a la cantidad de oligonucleótido adicionado, usando la ecuación 4.4.[19]

$$\frac{F}{F_0} = 1 + \frac{(F_{Sat} - F_0)}{F_0} \left(\frac{A + B + nx - \sqrt{(A + B + nx)^2 - 4Bnx}}{2B} \right)$$

Ecuación 4.4

Donde:

F = intensidad de fluorescencia

F_0 = intensidad de fluorescencia inicial

F_{Sat} = intensidad de fluorescencia tras la saturación

$$A = \frac{1}{K_{aff}}$$

B = [Ligando]

n = número de sitios de union independientes

x = [oligonucleótido]

Los valores se obtuvieron mediante la rutina de ajuste de Levenberg-Marquardt en el software *Origin 8*. Se seleccionó aquel valor de n que proporcionaba un mejor ajuste a los valores experimentales obtenidos, $\chi^2 > 98\%$.

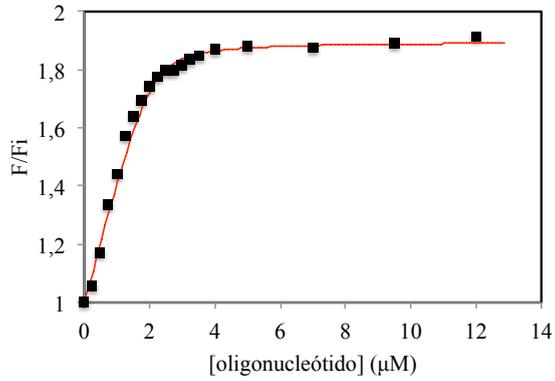


Figura 4.5. Ejemplo del ajuste (línea sólida) de los valores de fluorescencia experimentales (■), obtenido al aplicar la ecuación 4.4.

4.7. Dicroísmo circular

La técnica fue desarrollada a mediados del siglo XX con el objetivo de asignar la configuración absoluta a moléculas que presentan quiralidad. Desde entonces, gracias a su sensibilidad se ha convertido en una de las técnicas más relevantes para estudiar cambios conformacionales sutiles en interacciones supramoleculares.[20] La técnica se basa en las variaciones que se producen en la absorción de luz circularmente polarizada hacia derecha e izquierda por parte de moléculas quiralmente activas.[21] Si bien la quiralidad de una molécula es un requisito necesario para que se observe señal de dicroísmo circular (DC), los cromóforos no quirales pueden dar señales de dicroísmo circular inducido (DCI) al interactuar con una molécula quiralmente activa, como consecuencia del nuevo ambiente asimétrico al que son sometidos.

Debido a la alta sensibilidad de esta técnica a la hora de caracterizar la estructura secundaria de las distintas conformaciones adoptadas por los ácidos nucleicos, el dicroísmo circular es una técnica ampliamente utilizada a la hora de evaluar y cuantificar posibles cambios conformacionales inducidos por las interacciones entre moléculas de bajo peso molecular y los ácidos nucleicos. El sentido y la intensidad de las señales pueden servir para asignar la orientación relativa del ligando respecto al eje de la doble hélice.[22]

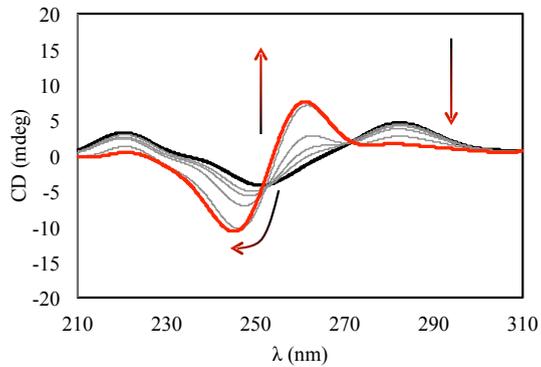


Figura 4.6. Representación de la valoración de un oligonucleótido con un ligando seguida por DC a distintas relaciones [ligando]/[oligonucleótido].

Los espectros de DC se registraron en un espectrofotómetro JASCO J815 termostatado a 298.1 ± 0.5 K, utilizando una celda de cuarzo de 3 mL con 1 cm de paso óptico. La sensibilidad se configuró a 5 *mdeg* (donde *mdeg* representa la elipticidad molar a una longitud de onda determinada) y se registraron los espectros con una ventana comprendida entre 200 y 400 nm en modo continuo, con una velocidad de barrido de 50 nm/s. Se realizaron 3 acumulaciones para cada muestra sustrayéndose el blanco previamente medido, siendo éste la disolución tampón de trabajo. Los espectros obtenidos se trataron con *Origin8* para suavizar las curvas mediante un promedio de puntos (figura 4.6).

4.8. Estudios cinéticos para la determinación de la actividad antioxidante

Los estudios cinéticos realizados han tenido como objetivo la determinación de la actividad superóxido dismutasa (SOD) de los complejos de cobre y manganeso obtenidos para los distintos receptores. Existen varios métodos propuestos en la literatura para la determinación de la actividad SOD, que se pueden clasificar en dos categorías:

a) **métodos directos**, aquellos que miden directamente la variación de la concentración de superóxido en disolución.

b) **métodos indirectos**, aquellos en los que se sigue la variación en la concentración de superóxido a través de un indicador capaz de reaccionar con él, emitiendo éste una señal fácilmente detectable por una técnica espectroscópica.

Los métodos indirectos son, con diferencia, los más utilizados hasta la fecha ya que no requieren de largos tiempos de medida y pueden llevarse a cabo utilizando técnicas espectroscópicas UV-Vis y de fluorescencia. Por ello se ha optado por un método indirecto como primera aproximación para la evaluación de la actividad SOD de los distintos complejos metálicos. El método seleccionado, desarrollado por Charles Beauchamp e Irwin Fridovich (los mismos descubridores de la actividad biológica de la SOD), estaba basado inicialmente en el uso del citocromo c como indicador.[23] En el GQS-UV se utiliza una adaptación del método anterior puesto a punto por el Dr. Salvador Blasco y que está ampliamente descrito en su tesis doctoral.[24]

El denominado método de McCord-Fridovich utilizado para la determinación de la actividad SOD se basa en la conjunción de dos sistemas esquematizados en la figura 4.7; un sistema capaz de generar radicales superóxido (sistema xantina-xantina oxidasa) y un sistema indicador cuya velocidad de reducción puede seguirse fácilmente mediante técnicas espectroscópicas (sistema NBT-MF⁺).

La xantina oxidasa es una monooxigenasa que cataliza la conversión de la xantina en ácido úrico, en un proceso en el que una fracción de moléculas de dioxígeno, en lugar de oxidar al sustrato, son reducidas a superóxido (figura 4.7).[25]

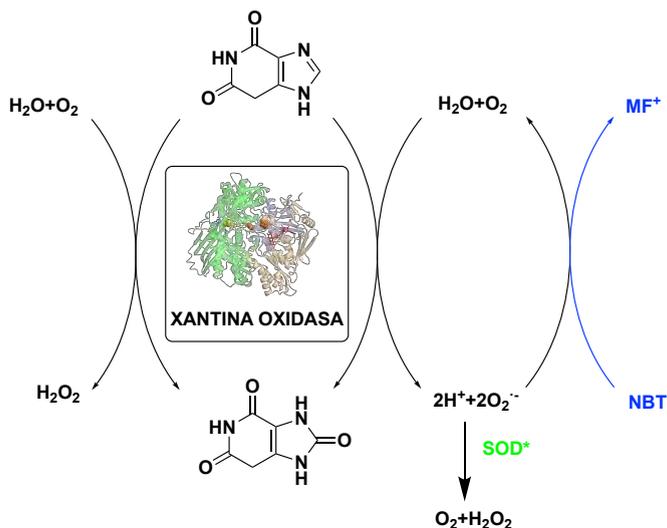


Figura 4.7. Sistema xantina-xantina oxidasa para la generación de radical superóxido *in-situ* (negro), sistema indicador NBT- MF^+ para la detección del radical superóxido en disolución (azul), eliminación de radical superóxido por la enzima SOD o por miméticos de la SOD (verde).

Como se ha mencionado anteriormente, en el método original el indicador usado era el citocromo c, sin embargo, en este sistema se opta por el azul de nitrotetrazolio (NBT por sus siglas en inglés). Este compuesto presenta un color amarillo pálido en su forma oxidada el cual, tras su reducción monoeléctrica, se convierte en monoformazano (MF^+), siendo éste de color violeta y presentando un máximo de absorción a 560 nm (figura 4.7). Al introducir el compuesto a estudiar en la disolución si éste presenta actividad SOD competirá con el NBT por los radicales superóxido, de manera que la variación de la absorbancia a 560 nm en función del tiempo variará como resultado de este efecto competitivo, lo que se traducirá en una disminución de la pendiente registrada.

4.8.1. Procedimiento experimental

En una cubeta desechable de poliestireno de volumen reducido (1mL) se introducen 100 μ L de la disolución que contiene el compuesto a estudiar, 800 μ L de la mezcla de reacción y en último lugar 100 μ L de la dilución de xantina oxidasa, la cual desencadena la reacción. Inmediatamente después se agita vigorosamente la cubeta y se introduce en el instrumento de medida. Se sigue la variación de la absorbancia a 560 nm durante dos minutos. Previamente se llevan a cabo una serie de experimentos para determinar el blanco (control), sirviendo éste como referencia para conocer la actividad enzimática de la disolución de xantina oxidasa preparada, para ello se sigue el mismo procedimiento experimental pero en lugar de adicionar 100 μ L de la disolución de compuesto se adicionan 100 μ L de tampón TRIS.

Tabla 4.5. Material y disoluciones necesarias para el ensayo Mcord-Fridovich.

Material necesario	
Tampón HEPES (50 mM, pH 7.4)	
Tampón TRIS (50 mM, pH 7.4)	
Xantina	
Xantina oxidasa de 40 U	
Azul de nitrotetrazolio (NBT)	
Disoluciones necesarias	
Disoluciones del compuesto	0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 μ M en tampón TRIS
Mezcla de reacción (preparada el mismo día)	5 ml de NBT 2.24 nM en tampón HEPES 25 ml de xantina 1.8 mM en tampón HEPES
Xantina oxidasa	Disolucion 1/5 v/v de xantina oxidasa en tampón HEPES. En frío para preservar de degradación

4.8.2. Tratamiento de los datos

Para cada experimento se obtiene un valor de la pendiente (variación de la absorbancia con respecto al tiempo), también denominado como velocidad de reacción. El valor de la pendiente correspondiente al blanco, valor control, representa la velocidad de reducción del NBT en ausencia del compuesto a estudiar (S_0). Para cada uno de los experimento llevado a cabo se obtiene un valor de pendiente (S_i). La diferencia entre el valor S_0 y el obtenido para las distintas disoluciones del compuesto estudiado, S_i , representa la contribución del compuesto a la disminución de la concentración de aniones superóxido en disolución.

La inhibición asociada a cada uno de los experimentos llevados a cabo se calcula como indica la ecuación 4.5. Al aplicar esta relación se consigue a su vez normalizar posibles variaciones en la actividad de la enzima, permitiendo así comparar valores obtenidos en distintos experimentos.

$$IC_i = \frac{S_0 - S_i}{S_0}$$

Ecuación 4.5

Del mismo modo es posible calcular el error en cada punto utilizando la siguiente fórmula de propagación de errores:

$$\varepsilon_{IC}^2 = \frac{(S \cdot \varepsilon_{S_0})^2 + (S_0 \cdot \varepsilon_S)^2}{S_0^4}$$

Ecuación 4.6

Una vez obtenidos los datos se lleva a cabo una representación de IC_i en función de la concentración del compuesto (figura 4.8). Para cuantificar la actividad se toma el valor de la concentración en donde se cumple que $IC = 50\%$, [23] siendo este un método ampliamente usado para la comparación de distintas sustancias con actividad SOD.

Durante la tesis se ha utilizado el software desarrollado por el Dr. Salvador Blasco para el ajuste de los datos y el cálculo del valor IC_{50} (superSOD V 0.6). [26]

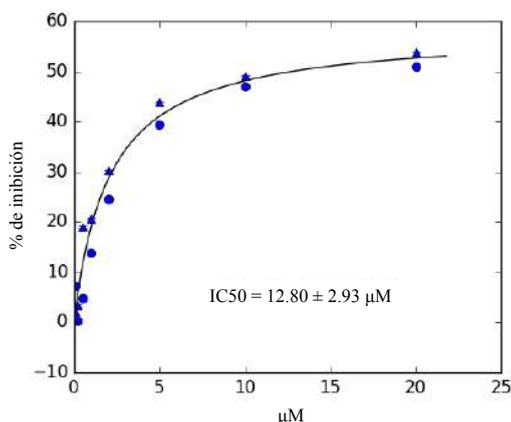


Figura 4.8. Porcentaje de inhibición de NBT (IC_i) frente a la concentración de compuesto.

Uno de los problemas del uso de los valores de IC_{50} para la expresión de actividades catalíticas es que éstos dependen de la naturaleza del indicador así como de su concentración, por lo que no es posible comparar los valores obtenidos mediante el uso de distintos indicadores. Por este motivo se suele expresar también la actividad catalítica mediante el uso del valor de la constante catalítica (k_{cat}), siendo éste un parámetro de la actividad catalítica independiente de las condiciones experimentales. En el caso de los métodos indirectos la k_{cat} se obtiene de manera aproximada a

partir del valor de IC_{50} obtenido experimentalmente y la constante del detector utilizado, utilizando la siguiente expresión:

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

Ecuación 4.8

El valor de la constante del detector utilizada para la obtención de k_{cat} ha sido $k_{NBT} = 5.9 \pm 0.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. [27]

4.9. Estudios electroquímicos

Las medidas electroquímicas se realizaron con un equipo compuesto por un potenciostato CV-50W y una celda de medida C3 de Bioanalytical Systems dotada de un sistema de purga de argón y de un agitador magnético, perteneciente al GQS-UV. Para cada experimento se preparan 5 mL (c.a. 10^{-3} M) del compuesto a estudiar en TRIS 50 mM y NaCl 150 mM, a pH 7.4. Los electrodos utilizados han sido: electrodo de referencia Ag/AgCl, electrodo auxiliar de platino y electrodo de trabajo de grafito BASi MF-2012.

4.10. Estudios teóricos

Los estudios de dinámica molecular se han llevado a cabo mediante la construcción inicial de la estructura de la poliamina libre y del oligonucleótido a estudiar (programa *xleap*), haciendo uso del campo de fuerzas *gaff*, mientras que el campo de fuerza *ff12SB* se ha utilizado para las bases nucleicas. De la misma manera, las condiciones ambientales se han simulado utilizando el campo *ionisjc_tip3p*. Todos los estudios se han llevado a cabo mediante el uso del paquete de software de construcción asistida de modelos con refinamiento de energía (AMBER por sus siglas en ingles).[28]

A cada una de las moléculas construidas se le aplica un proceso de calentamiento previo a la dinámica molecular, consistente en una etapa de minimización y optimización energética de la estructura seguida de una etapa de calentamiento, 0.9 ns (9×10^5 ciclos de 1 fs), hasta temperatura final de 300 K. Posteriormente se le aplica una dinámica molecular de 16 ns, consistente en 8 etapas de 2×10^6 ciclos de 1 fs, a 300 K. Finalmente se seleccionan los 10 mínimos energéticos y se minimizan energéticamente sus estructuras. Como último paso se analizan gráficamente las estructuras obtenidas.

Posteriormente se construye el complejo ligando-oligonucleótido, en el caso de las poliaminas con superficies aromáticas extendidas se insertaron restricciones de distancia con el objeto de estudiar su capacidad como agentes intercalantes. Para ello se aplicaron las correspondientes restricciones de distancia entre los átomos pesados del compuesto y los átomos pesados del entorno de interacción, usándose un promedio para todas las distancias entre los átomos en la interacción (mediana $\langle r^{-6} \rangle^{-1/6}$ de todas las distancias de interacción de los átomos del grupo). En el caso de los ligandos sin unidades intercalantes no se implementaron restricciones de distancias. Una vez construidos los distintos complejos ligando-oligonucleótido se les aplicó un proceso de minimización energética, calentamiento y dinámica molecular tal y como se ha descrito anteriormente. Finalmente se seleccionaron los diez conformeros de mínima energía y se minimizaron energéticamente las estructuras sin restricciones de distancia.

El paquete Pymol v1.7.4.5 se ha utilizado para realizar el análisis de las modelizaciones así como para la posterior representación gráfica de los resultados.[29]

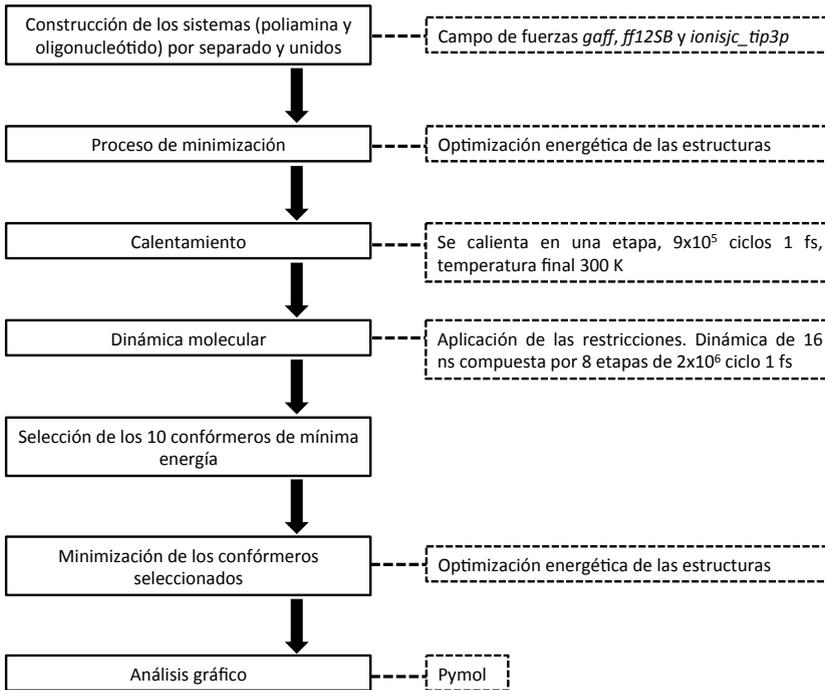


Figura 4.9. Esquema de los pasos seguidos en los estudios teóricos para el evaluar la interacción ligando-oligonucleótido-

4.11. Espectroscopia de rayos X por energía dispersiva

La espectroscopia de rayos X por energía dispersiva (EDX) permite monitorizar las bandas de radiación X características de los distintos iones metálicos presentes en los monocristales obtenidos, lo que facilita la cuantificación de la composición atómica en los mismos.

El análisis por EDX se llevó a cabo mediante un dispositivo EDX XL-30 ESEM (Philips) ubicado en el SCSIE. La adquisición de los datos se realizó con una voltaje de aceleración de 20 kV, 10 mm de distancia focal y 60 segundos de tiempo de acumulación. Se llevaron a cabo 3 mediciones con una ventana de lectura de 500x500 μm que contenía, como mínimo, dos monocristales. Los datos experimentales se han expresado como un promedio de las tres mediciones.

4.12. Estudios biológicos

Los estudios biológicos se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación de Biología Molecular perteneciente al Institut de Investigació Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Joan XXIII de la Universidad Rovira i Virgili, bajo la dirección de A. García-España. A continuación se detallan los estudios realizados.

Ensayos de toxicidad

Para la evaluación de la toxicidad de los ligandos se llevaron a cabo ensayos de viabilidad frente a una línea celular de tipo no tumoral (VERO). Para ello se utilizó el método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).[30] Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la capacidad que presentan las células vivas para reducir el MTT (amarillo) a formazán (púrpura), gracias a la acción de las enzimas presentes en las mitocondrias. Este cambio de color permite, mediante una curva de calibrado, calcular directamente el número de células viables.

Se prepararon cultivos celulares de c.a. 5×10^3 células en 200 μL del medio correspondiente en placas de 96 pocillos, permitiendo que éstas se adhirieran y se recuperasen de la tripsinación (separación de las células de su soporte mediante la tripsina) durante 24 h. Pasado este período se retiró el medio y se añadieron los compuestos a analizar a distintas concentraciones, disueltos en 200 μL de medio. Una vez transcurridas 48 horas de incubación con los compuestos, se incubaron las células durante otras 3 horas adicionales en medio fresco conteniendo éste MTT (1.2 μM). El precipitado resultante (formazán) se disolvió en 200 μL de DMSO y se registró el valor de absorción a 540 nm mediante el uso de un espectrómetro automático.

El porcentaje de supervivencia se calcula aplicando la siguiente relación:

$$\% \text{ células vivas} = \frac{A_{\text{pocillo experimental}}}{A_{\text{pocillo control}}} \cdot x100$$

Ecuación 4.9

El IC₅₀ se define como la concentración de compuesto que causa una reducción del 50% en la viabilidad celular.

Ensayos con levaduras deficientes en SOD

La evaluación de la capacidad antioxidante de los distintos complejos metálicos se llevó a cabo mediante cultivos de una cepa deficiente en la enzima citoplasmática SOD1 de levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* [(ATCC): ATCC 96687 (SOD), MATa ura3-52 trp1 -289 his3-Δ1 leu2 -3 leu2-112 sod1 :: URA3).[31][32][33][34]

Se diluyó una solución la cepa con una densidad óptica de 0.7 mU ($\lambda = 620 \text{ nm}$) a 1:200 en 5 ml de medio SDC (0,68% de YNB, 0,16% de mezcla de desprendimiento sin Leu, 0.15% de Leu, 0.03% de triptófano, uracilo e histidina, 0.07% de adenosina y 2.00% de glucosa). Las levaduras se hicieron crecer aeróbicamente en tubos falcon de 50 mL a 30 °C con agitación a 220 rpm en presencia de los compuestos a analizar (10 μM). El crecimiento a los tiempos indicados se midió turbidimétricamente ($\lambda = 620 \text{ nm}$).

La capacidad antioxidante viene determinada por las diferencias entre el crecimiento de la cepa deficiente en SOD1 con los ligandos, o sus correspondientes complejos metálicos, y el crecimiento de la cepa sin ellos ((SOD1+Compuesto)/SOD1).

Referencias

- [1] Fontanelli, M.; Micheloni, M. *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes*. **1990**, Peñíscola, España.
- [2] Gran, G. *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 559-577.
- [3] Gran, G. *Analyst.* **1952**, *77*, 661-671.
- [4] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Talanta*. **1996**, *43*, 1739-1753.
- [5] Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195-1200.
- [6] Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311-318.
- [7] Covington A. K.; Paabo, M.; Robinson, R.A.; Bates, R.G.; *Anal. Chem.* **1968**, *40*(14), 2081.
- [8] Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr. C. Struct. Chem.* **2015**, *71*, 3-8.
- [9] Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann H. *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339-341.
- [10] Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E. G.; Shields, P.; Taylor, R.; Towler, M.; van de Streek, J. *J. Appl. Cryst.* **2006**, *39*, 453-457.
- [11] Monchaud, D.; Allain, C.; Teulade-Fichou, M-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 4842-4845.
- [12] Jan Kapuscinski; *Biotechnic & Histochemistry*; Vol. 70, Num. 5, **1995**.
- [13] Guan, Y.; Shi, R.; Li, X.; Zhao, M.; Li, Y. *J. Phys. Chem. B.* **2007**, *111*(25), 7336-7344.
- [14] Morgan, A. R.; Lee, J. S.; Pulleyblanck, D. E.; Murray, N. L.; Evans, D. H. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 547-569.
- [15] Haq, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *403*(1), 1-15.
- [16] Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*(17), 5482-5515.
- [17] Tan, Z.-J.; Chen, S.-J. *Biophys. J.* **2006**, *90*, 1175-1190.
- [18] Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. *Biochem.* **1982**, *21*, 3933-3940.
- [19] (a) Stootman F. H.; Fisher, D. M.; Rodger, A.; Aldrich-Wright, J. R. *Analyst* **2006**, *131*(10), 1145-1151. (b) Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*(3), 1305-1323.
- [20] van Dijk, L.; Bobbert, P. A.; Spano, F. C. *J. Phys. Chem. B.* **2010**, *114*, 817-825.
- [21] Berova, N.; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 914-931.

- [22] Nordén, B.; Kubista, M.; Kuruscev, T. Q. *Rev. Biophys.* **1992**, 25, 51-171.
- [23] Beauchamp, C.; Fridovich, I. *Anal. Biochem.* **1971**, 44, 276-287.
- [24] Blasco, S. *Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como Miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universitat de València, **2011**.
- [25] Hodges, G. R.; Young, M. J.; Paul, T.; Ingold, K.U. *Free Radical Bio. Med.* **2000**, 29, 434-441.
- [26] Blasco, S. *Supersod v.0.6*. Beerware. **2015**.
- [27] Oberley, L. W.; Spitz, D. R. *Method. Enzymol.* **1984**, 105, 457-464.
- [28] Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E.; Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Merz, K.M.; Roberts, B.; Hayik S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Götz, A.W.; Kolossváry, I.; Wong, K.F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R.M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S.R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Roe, D.R.; Mathews, D.H.; Seetin, M.G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P.A. **2012**, AMBER 12, University of California. San Francisco.
- [29] PyMOL Molecular Graphics System, Versión 1.74 Schrödinger, LLC.
- [30] Mosmann, T. *J. Immunol. Methods.* **1983**, 65, 55-63.
- [31] Gralla E B. *Superoxide dismutase: studies in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Scandalios J G, editor. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**, 495-525.
- [32] Longo, V. D.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 12275-12280.
- [33] Liu, X. F.; Elashvili, I.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S.; Lapinskas, P.; Culotta, V. *C. J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 18298-18302.
- [34] Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 5918-5920.

5. Síntesis

5.1. Mecanismos de síntesis

A lo largo del capítulo se detallarán los procedimientos sintéticos generales utilizados para la obtención de los distintos derivados poliamínicos.

5.1.1. Reacción de tosilación

Desde que fuera descrito por Emil Fischer, el 4-toluensulfonilo (Ts) ha sido ampliamente usado en química orgánica como grupo protector de aminas ya que presenta varias ventajas:[1][2]

i) Permite la posterior monofuncionalización de la amina protegida mediante una reacción sencilla y con un alto rendimiento.

ii) Induce rigidez conformacional, favoreciéndose así la organización previa de la molécula facilitando la obtención de conformaciones cíclicas de forma mayoritaria frente a oligómeros, aumentando así los rendimientos de reacción.

iii) Las aminas tosiladas tienen tendencia a cristalizar en EtOH, lo que facilita las etapas de preparación, manipulación y purificación de intermedios en la síntesis.

iv) La desprotección puede llevarse a cabo en una sola etapa.

Sin embargo, la etapa de desprotección requiere del uso de condiciones muy energéticas. Un ejemplo es la metodología propuesta por H. R. Snyder, la cual utiliza HBr en HAc al 33% y PhOH,[3] lo que en algunas ocasiones conduce a la ruptura del anillo macrocíclico.

El reactivo de partida utilizado para la protección de la amina es el cloruro del ácido *p*-toluensulfónico (TsCl). El mecanismo de la reacción consiste en una sustitución nucleofílica en la que el grupo amino actúa como nucleófilo desplazando al cloruro en posición α al azufre, formándose así un grupo sulfonamida. Debido a que el grupo amino resulta protonable en disolución acuosa, es necesario el uso de una base para que éste se encuentre en su forma desprotonada, en este caso se ha optado por el K_2CO_3 (figura 5.1).

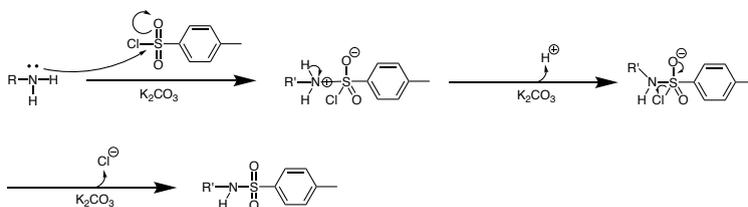


Figura 5.1. Esquema del mecanismo de reacción para la tosilación del grupo amino primario.

En la presente tesis se ha hecho uso de este procedimiento sintético para llevar a cabo la tosilación de los tres grupos amino primarios presentes en la amina tripodal tris-(2-aminoetil)amina (*tren*), obteniéndose así la amina tripodal protegida *tren-Ts* (figura 5.2).

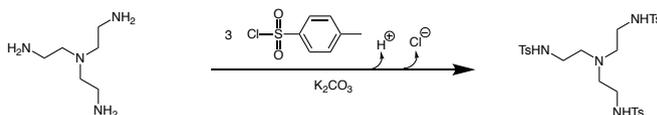


Figura 5.2. Esquema de reacción para la obtención de la amina tripodal protegida *tren-Ts*.

5.1.2. Reacción de ciclación

El procedimiento sintético para la ciclación, basada en el proceso descrito en los años setenta por J. E. Richman y T. J. Atkins,[4] consiste en la reacción entre la poliamina previamente tosilada, *tren-Ts*, y la 2,6-bis(bromometil)piridina en relación molar 1:1, para dar lugar a la formación del poliazamacrociclo *pytren-Ts* (figura 5.3).

La presencia de grupos tosilo en el *tren-Ts* ha demostrado ejercer un efecto estérico que dota de una elevada rigidez a la poliamina tripodal, favoreciendo el predominio de las conformaciones apropiadas para el proceso de ciclación. Así, una vez ha reaccionado uno de los extremos de la amina tripodal ésta se pliega de manera que uno de los extremos libres queda en una disposición favorable para que se produzca la reacción intramolecular. A su vez, los grupos tosilo pueden actuar como espinas de una alambrada, impidiendo el acercamiento de otras moléculas al punto de reacción. La reacción debe transcurrir a través de un estado de alto nivel de preorganización, con factores entrópicos favorables, obteniéndose así de forma mayoritaria los productos monoméricos frente a los oligoméricos. Así pues, la presencia de grupos tosilo resulta decisiva tanto desde el punto de vista de la reactividad de la poliamina, aumentando la acidez de los enlaces N-H, como desde el punto de vista conformacional, favoreciendo las disposiciones más adecuadas para que tenga lugar el proceso intramolecular.

La reacción se lleva a cabo usando un volumen de disolvente grande en relación a la cantidad de reactivos. Además, se añade uno de los reactivos gota a gota y con agitación vigorosa, evitándose así concentraciones locales altas de reactivos. Por otro lado, resulta necesario el uso de una base, en este caso K_2CO_3 , para que el grupo amino tosilado se encuentre en equilibrio con su forma desprotonada a la vez que sirve para neutralizar el HBr generado en la reacción.

Durante la reacción se produce una doble sustitución nucleofílica de dos de los grupos amino protegidos de la triamina tosilada, que actúan como nucleófilos, a los carbonos en posición bencílica presentes en la 2,6-bis(bromometil)piridina, los cuales actúan como electrófilos (figura 5.3).

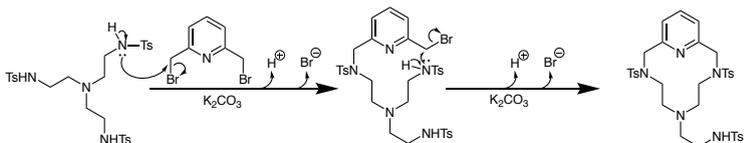


Figura 5.3. Esquema del mecanismo de reacción para la obtención del *pytren-Ts*.

5.1.3. Reacción de alargamiento

Este procedimiento sintético se ha utilizado para la introducción de un grupo propilamina en el extremo la poliamina previamente obtenida *pytren-Ts*.

La ruta sintética, variante de la síntesis de Gabriel,[5] consta de dos pasos (figura 5.4):

i) Sustitución nucleofílica entre el grupo amino tosilado de la cadena lateral, que actúa como nucleófilo, y el carbono en posición α al bromo de la N-(3-bromopropil)ftalimida, que actúa como electrófilo. Esta reacción se ve favorecida por el uso de una base, en este caso K_2CO_3 , la cual cumple una doble función ya que, además de neutralizar el HBr generado, mantiene desprotonado el nitrógeno secundario, aumentando así el carácter nucleofílico del mismo.

ii) Eliminación del grupo ftalimida por el método de Ing-Manske,[6] el cual implica el uso de hidrazina (N_2H_4). En esta reacción se produce una doble sustitución nucleofílica. En primer lugar uno de los nitrógenos de la hidrazina actúa como nucleófilo reaccionando con uno de los dos grupos carbonílicos del grupo ftálico. Posteriormente se produce una segunda sustitución nucleofílica, de tipo intramolecular, entre el nitrógeno restante de la hidrazina y el segundo grupo carbonilo (figura 5.4).

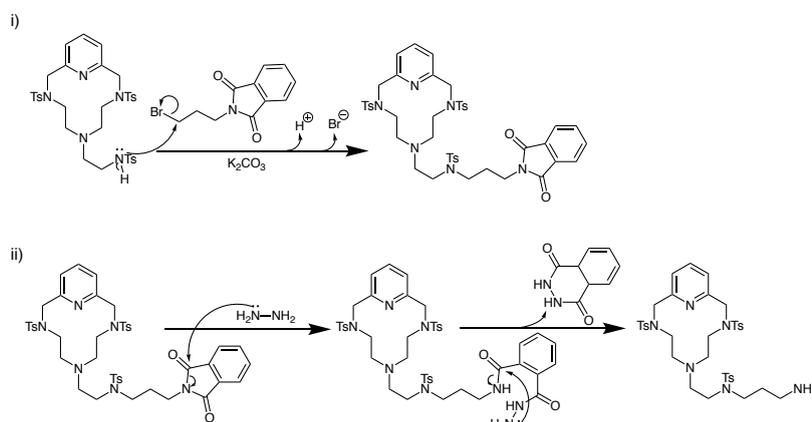


Figura 5.4. Esquema de los mecanismos de reacción para la obtención del *pytren-al-Ts*.

5.1.4. Reacción con la N-tosilaziridina

Este procedimiento se ha utilizado para la alquilación de la amina primaria presente en el *pytren-al-Ts* por dos grupos etilmina, para obtener así el derivado poliamínico **L1-Ts**.

Esta etapa consiste en la reacción de la poliamina *pytren-al-Ts* y la N-tosilaziridina en relación molar 1:2.[7] En primera lugar se produce un ataque nucleofílico del nitrógeno primario, el cual actúa como nucleófilo, a uno de los carbonos de la N-tosilaziridina, lo que produce la apertura del anillo de tres átomos. La reacción de este intermedio con un segundo equivalente de N-tosilaziridina conduce a la obtención de la poliamina **L1-Ts** (figura 5.5).

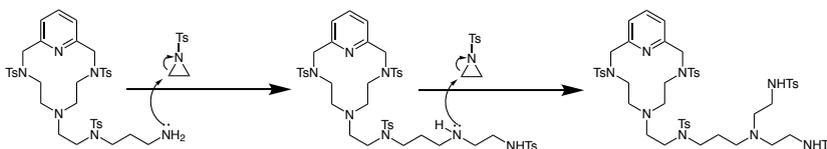


Figura 5.5. Esquema del mecanismo de reacción para la obtención de **L1-Ts**.

5.1.5. Reacción con la N-(3-bromopropil)ftalimida

Este procedimiento se ha utilizado para la alquilación de la amina primaria presente en el *pytren-al-Ts* por dos grupos propilamina, para obtener así el derivado poliamínico **L2-Ts**.

Como se ha descrito anteriormente en el apartado 5.1.3 (*Reacción de alargamiento*), la reacción con la N-(3-bromopropil)ftalimida consta de una primera etapa de adición nucleofílica seguida de una etapa de desprotección. En este caso, debido a la presencia de un grupo amino primario en el extremo de la cadena lateral de la poliamina *pytren-al-Ts*, se introducirán dos grupos propilamina en el extremo de la misma (figura 5.6). Esta reacción se ve favorecida por el uso de una base, en este caso K_2CO_3 .

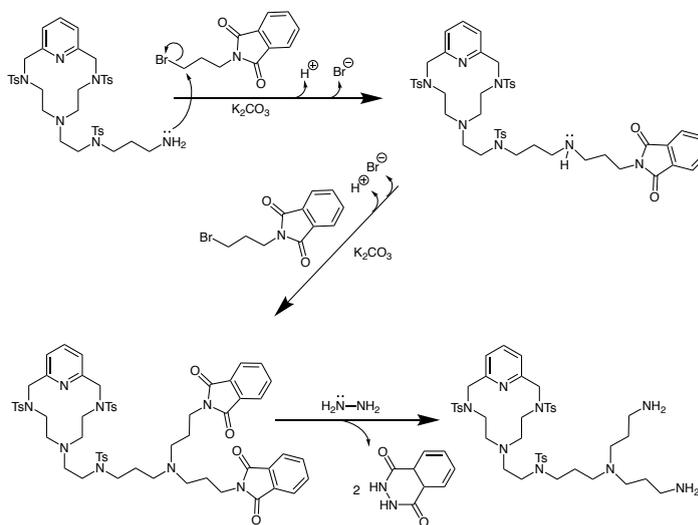


Figura 5.6. Esquema de los mecanismos de reacción para la obtención de **L2-Ts**.

5.1.6. Reacción de ciclación de **L1-Ts**

Una vez sintetizado el precursor **L1-Ts**, el derivado con dos unidades macrocíclicas, **L3-Ts**, se obtiene mediante la reacción de la poliamina con un equivalente de la 2,6-bis(bromometil)piridina. Durante esta etapa se produce una doble sustitución nucleofílica de los grupos amino protegidos sobre los carbonos electrófilos en posiciones bencílicas presentes en la 2,6-bis(bromometil)piridina. La reacción se lleva a cabo mediante la adición de uno de los reactivos gota a gota y en presencia de K_2CO_3 (figura 5.7).

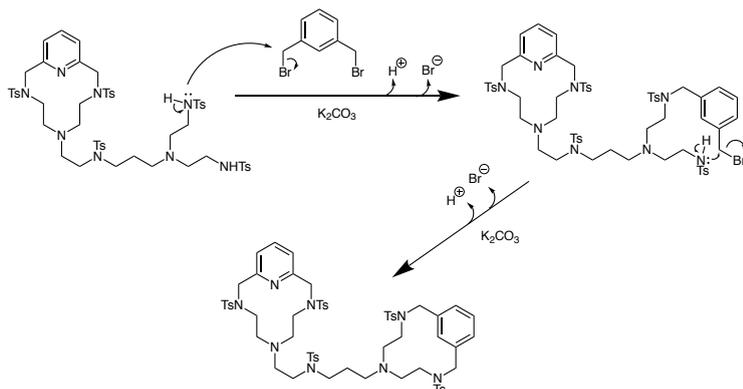


Figura 5.7. Esquema del mecanismo de reacción para la obtención de **L3-Ts**.

5.1.7. Reacción de destosilación

Como se ha indicado anteriormente, la eliminación de los grupos protectores tosilo (Ts) se realiza bajo condiciones severas, en este caso se ha utilizado ácido bromhídrico (HBr) en ácido acético (HAc) al 33 % (que hace a la vez de disolvente) y en presencia de fenol (PhOH).[2][8] La razón por la cual se añade PhOH es porque la reacción transcurre por un mecanismo radicalario y éste resulta ser un buen captador de radicales. Para neutralizar el exceso de HBr que se libera durante la reacción se acopla al sistema de reacción una trampa de gases cargada con una disolución concentrada de hidróxido sódico (NaOH) (figura 5.8).

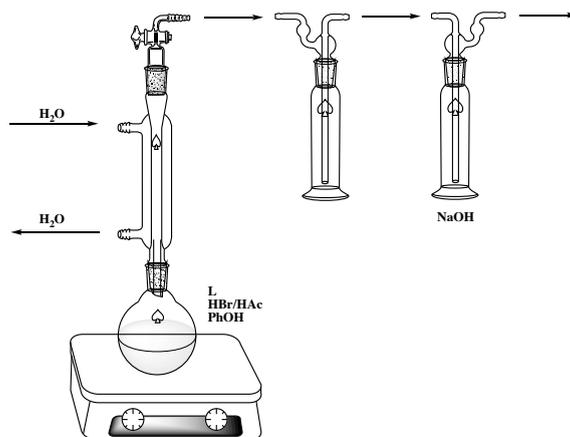


Figura 5.8. Montaje para la reacción de destosilación.

5.1.8. Reacción de funcionalización

En el desarrollo de un fármaco, una vez que se ha obtenido un producto con una actividad biológica prometedora se suele modificar su estructura mediante la incorporación de grupos funcionales que permitan modular sus propiedades farmacológicas, para así alcanzar, por ejemplo, mayor selectividad, mayor actividad, menor toxicidad, mejor biodistribución, etc. También en la química supramolecular resulta de gran interés introducir modificaciones en un receptor mediante la incorporación de grupos funcionales con distintos propósitos: incluir un grupo fluoróforo para dotar al receptor de propiedades fotoluminiscentes, incluir átomos dadores adicionales, etc. A este proceso de incluir un grupo funcional en el esqueleto base de un receptor dado con el fin de modificar sus propiedades se le denomina funcionalización.

En el caso concreto de las poliaminas sintetizadas, el proceso de funcionalización consistirá en la reacción de las dos aminas primarias presentes en **L1** con dos equivalentes de un carbaldehído comercial, lo que conduce a la obtención de una base de Schiff, o imina.[9] La imina obtenida se reduce *in situ* con NaBH_4 para así obtener el producto en su forma de amina libre (figura 5.9).

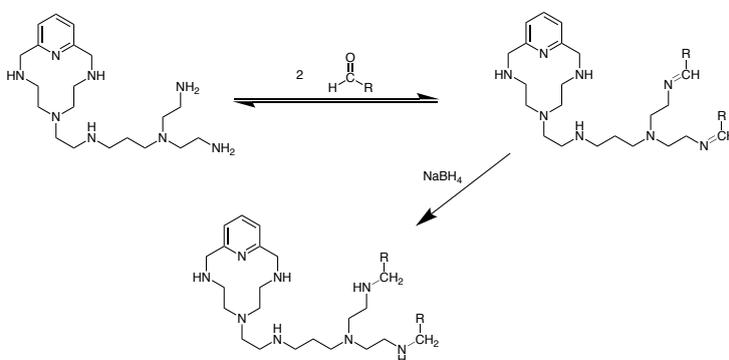


Figura 5.9. Esquema para el proceso de funcionalización de **L1**.

5.2. Síntesis del ligando precursor *pytren-al-Ts*

A lo largo del apartado se detallarán los procedimientos sintéticos seguidos para la obtención del precursor *pytren-al-Ts* (figura 5.10). La síntesis de esta poliamina ya se había descrito en tesis y artículos previos a la realización de este trabajo.[10][11]

a) Tosilación de la tris-(2-aminoetil)amina

Como primer paso en la ruta sintética se procedió a la tosilación de la poliamina tripodal, tris(2-aminoetil)amina (*tren*). Para ello se introduce en un matraz de fondo redondo la poliamina (3.02 g, 20.70 mmol) disuelta en 200 mL de THF junto con el K_2CO_3 (11.40 g, 80.26 mmol) disuelto en 100 mL de H_2O . Posteriormente se adiciona gota a gota el cloruro de tosilato ($TsCl$) (11.80 g, 62.02 mmol) disuelto en 200 mL de THF. La mezcla se mantiene con agitación vigorosa y a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se evapora la fase orgánica a presión reducida. La fase acuosa se extrae con CH_2Cl_2 (3x100 ml) para así, una vez eliminado el disolvente, obtener un aceite de color amarillo que se purifica por recristalización de EtOH. El producto final se obtiene como agujas de color blanco de elevada pureza. Rendimiento > 90%.

b) Procedimiento de ciclación

Se disuelve la poliamina tripodal tosilada, *tren-Ts*, (7.89 g, 12.97 mmol) junto con el K_2CO_3 (17.92 g, 129.70 mmol) en 400 mL de CH_3CN seco. La mezcla se lleva a reflujo en atmósfera de nitrógeno y se le adiciona gota a gota la 2,6-bis(bromometil)piridina (3.50 g, 12.97 mmol) previamente disuelta en 100 mL de CH_3CN seco. Terminada la adición, la mezcla se mantiene bajo las mismas condiciones durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de reacción se deja enfriar y se filtra la mezcla para eliminar el K_2CO_3 en suspensión. Posteriormente se elimina el disolvente y el sólido obtenido se recristaliza de EtOH. Rendimiento > 60%.

c) Proceso de alargamiento

El procedimiento experimental para la obtención del *pytren-al-Ts* consta de dos etapas (figura 5.10):

i) Se disuelve la poliamina tosilada *pytren-Ts* (3.23 g, 4.54 mmol) junto con 1.3 equivalentes de la N-(3-bromopropil)ftalimida (1.58 g, 5.90 mmol) y el K_2CO_3 (6.28 g, 45.40 mmol) en 200 mL de CH_3CN seco. La mezcla se somete a reflujo durante 24 horas en atmósfera inerte. Posteriormente se deja enfriar y se filtra para eliminar el K_2CO_3 en suspensión. Se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose así un aceite de color amarillo.

ii) Se redisuelve el aceite obtenido en la etapa anterior en 150 mL de EtOH seco a reflujo y se adicionan 12 equivalentes de N_2H_4 . La reacción se mantiene a reflujo durante 24 horas en atmósfera inerte. Al enfriar se observa la aparición de un sólido blanco correspondiente a la ftalhidrazida, que se elimina por filtración. A continuación se elimina el disolvente a presión reducida obteniéndose así el producto final como un sólido de color amarillo. Rendimiento > 90%.

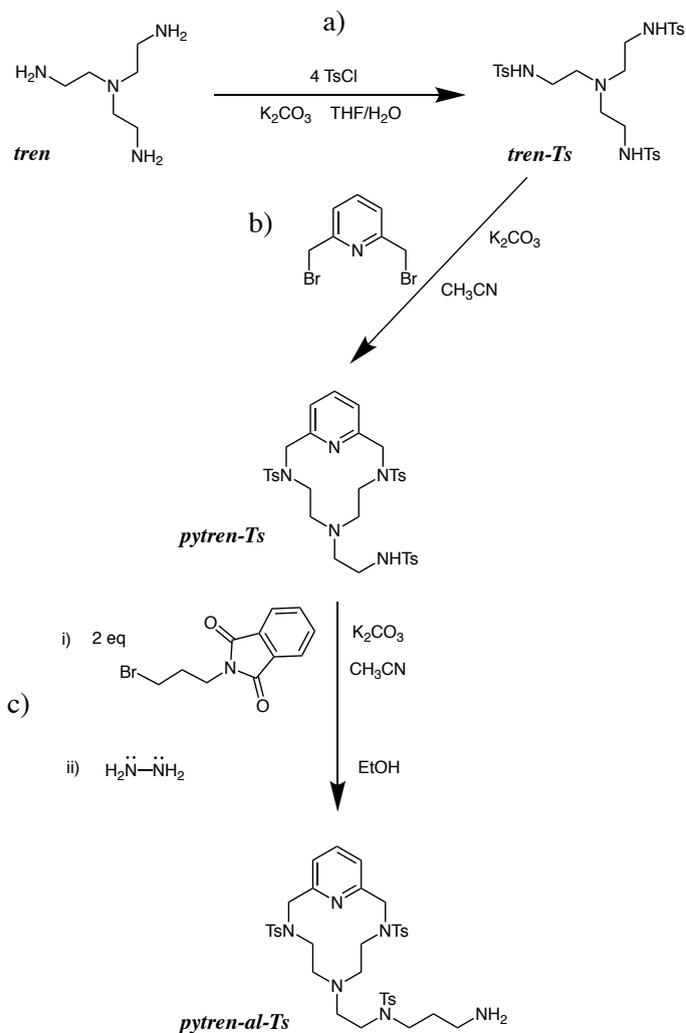


Figura 5.10. Esquema para la síntesis del ligando precursor de tipo escorpiando *pytren-al-Ts*.

5.3. Síntesis de L1

L1 se ha sintetizado a partir de la poliamina *pytren-al-Ts*. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos implicados en esta ruta sintética se incluyen en el Anexo 2 (*Espectros de RMN*). La síntesis del compuesto **L1** ha sido publicada en *Inorg. Chem. (Publicaciones, anexo 1)*.^[12]

Obtención de L1-Ts

Se disuelve la poliamina tosilada *pytren-al-Ts* (3.29 g, 4.28 mmol) en 50 mL de CH_3CN seco. Posteriormente se le adicionan gota a gota 2.1 equivalentes de la N-tosilaziridina (1.85 g, 9.42 mmol) disueltos en 80 mL de CH_3CN , manteniéndose la mezcla a reflujo y bajo atmósfera inerte durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se elimina el disolvente a presión reducida y el producto obtenido se purifica mediante columna cromatográfica de gel de sílice (40-63 μm) (CH_2Cl_2 :MeOH 98:2) (figura 5.11).

Destosilación de L1-Ts

Para llevar a cabo la destosilación se introduce **L1-Ts** (3.00 g, 2.57 mmol) en un matraz de fondo redondo disuelto en 170 ml de HBr en HAc al 33 %, junto con 13 equivalentes de PhOH (15.40 g, 163.07 mmol) por cada grupo Ts. La mezcla se calienta a 90 °C durante 24 horas. Al enfriarse la disolución se observa la aparición de un sólido correspondiente a la poliamina destosilada en su forma de bromohidrato. El precipitado se recupera por filtración al vacío y se lava repetidas veces con EtOH seco. El exceso de ácido acético se elimina mediante una columna de intercambio aniónico (AMBERLITE IRA-402). El aceite resultante se precipita con ácido clorhídrico (HCl) 4.0 M en dioxano, obteniéndose así **L1** en forma de clorohidrato (figura 5.12).

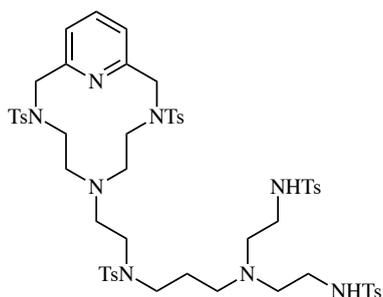


Figura 5.11. Esquema de L1-Ts.

^1H NMR (300.0 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.9-7.7 (m, 12H), 7.4-7.2 (m, 14H), 5.9-5.8 (m, 2H), 4.3 (s, 4H), 3.1-3.0 (m, 6H), 2.9-2.8 (m, 6H), 2.5-2.3 (m, 27H), 1.7-1.6 (m, 2H).

^{13}C NMR (75.4 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 155.4, 144.0, 143.4, 139.1, 137.5, 136.2, 135.4, 130.3, 130.1, 128.0, 127.6, 124.3, 55.3, 55.0, 53.9, 52.6, 52.5, 50.3, 47.3, 45.3, 41.1, 25.7, 21.9.

6-[7-aminoetil-3,7,10-triazadecil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecafano

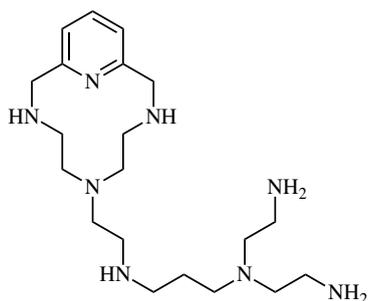


Figura 5.12. Esquema de L1.

¹H NMR (300.0 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.9 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 7.4 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 4.6 (s, 4H), 3.3-3.2 (m, 16H), 3.1-3.0 (m, 4H), 2.9 (t, *J* = 5 Hz, 4H), 1.9-1.8 (m, 2H).

¹³C NMR (75.4 MHz, D₂O), δ (ppm): 149.2, 140.2, 122.6, 51.2, 50.9, 50.5, 50.2, 49.9, 56.3, 45.7, 44.0, 35.3, 21.5.

Anal. Calc. para C₂₀H₄₀N₈ · 6HCl · 4H₂O: C, 35.1; H, 7.9; N, 16.7. **Exp.:** C, 35.2; H, 7.9; N, 16.4.

MS (ESI) m/z [M+H]⁺: 393.3 g/mol.

Rendimiento: 80%

5.4. Síntesis de L2

L2 se ha sintetizado a partir de la poliamina *pytren-al-Ts*. En el anexo 2 (*Espectros de RMN*) se recogen los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos implicados.

Obtención de L2-Ts

El proceso sintético seguido para la obtención de **L2-Ts** consta de dos etapas:

i) Se disuelve la poliamina tosilada *pytren-al-Ts* (2.14 g, 2.78 mmol) junto con 2.2 equivalentes de la N-(3-bromopropil)ftalimida (1.64 g, 6.12 mmol) y 10 equivalentes de K_2CO_3 (3.84 g, 27.80 mmol) en 200 mL de CH_3CN seco. La mezcla se somete a reflujo con agitación vigorosa durante 48 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se deja enfriar la mezcla y se filtra para eliminar el K_2CO_3 en suspensión. A continuación se elimina el disolvente en atmósfera reducida obteniéndose así un aceite de color amarillo.

ii) Se disuelve el aceite obtenido en la etapa anterior en 150 mL de EtOH seco a reflujo, adicionándose a continuación 12 equivalentes de N_2H_4 . La reacción se mantiene a reflujo durante 24 horas en atmósfera inerte. Transcurrido el tiempo de reacción se deja enfriar la mezcla y se elimina el precipitado blanco por filtración al vacío. Una vez evaporado el disolvente se obtiene **L2-Ts** como un aceite de color amarillo (figura 5.13).

Destosilación de L2-Ts

Se disuelve **L2-Ts** (2.00 g, 1.67 mmol) en 106 mL de HBr en HAc al 33 %, junto con 13 equivalentes de PhOH (10.01 g, 106.39 mmol) por cada grupo Ts. La mezcla se calienta a 90 °C durante 24 horas. Al enfriarse la disolución se observa la aparición de un sólido correspondiente al bromohidrato de la poliamina destosilada. El precipitado se recupera por filtración al vacío y se lava repetidas veces con EtOH seco (figura 5.14).

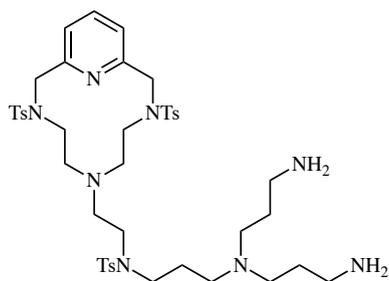


Figura 5.13. Esquema de L2-Ts.

¹H NMR (300.0 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.8-7.6 (m, 7H), 7.4-7.2 (m, 9H), 4.4-4.2 (m, 4H), 3.2-2.8 (m, 12H), 2.6-2.2 (m, 21H), 1.9-1.4 (m, 6H).

¹³C-DEPT NMR (75.4 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 138.7, 129.9, 127.2, 123.8, 54.5, 54.4, 51.7, 47.0, 44.8, 39.4, 25.4, 25.0, 21.6.

6-[7-aminopropil-3,7,11-triazaundecil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecafacano

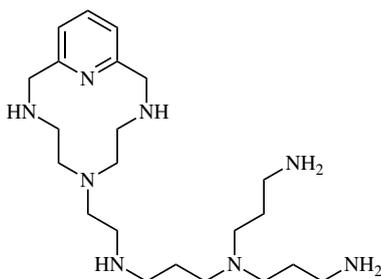


Figura 5.14. Esquema de L2.

¹H RMN (300 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.8 (t, *J* = 8 Hz, 1H), 7.3 (d, *J* = 8 Hz, 2H), 4.5 (s, 4H), 3.3-3.1 (m, 14H), 3.0 (t, *J* = 8 Hz, 6H), 2.8 (t, *J* = 5 Hz, 4H), 2.2-1.9 (m, 6H).

¹³C RMN (75.4 MHz, D₂O), δ (ppm): 149.2, 140.2, 122.6, 82.1, 51.3, 50.8, 50.5, 49.9, 46.3, 45.2, 44.1, 36.8, 22.0, 21.1.

Anal. Calc. para C₂₂H₄₄N₈·6HCl·H₂O: C, 40.2; H, 8.0; N, 17.0. **Exp.:** C, 40.1; H, 9.1; N, 16.9.

MS (ESI) m/z [M+H]⁺: 421.4 g/mol .

Rendimiento: 65%

5.5. Síntesis de L3

L3 se ha obtenido mediante la reacción de **L1-Ts** con un equivalente de la 2,6-bis(bromometil)piridina. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos implicados pueden encontrarse en el Anexo 2 (*Espectros de RMN*). La síntesis de **L3** ha sido publicada en *Inorg. Chem. (Publicaciones, anexo 1)*. [12]

Obtención de L3-Ts

Se disuelve **L1-Ts** (1.70 g, 1.46 mmol) junto con el K_2CO_3 (2.02 g, 14.60 mmol) en 200 mL de CH_3CN seco. Posteriormente la mezcla se somete a reflujo en atmósfera inerte y se adiciona gota a gota la 2,6-bis(bromometil)piridina (0.39 g, 1.46 mmol) disuelta en 70 mL de CH_3CN seco. Transcurridas 24 horas se filtra la suspensión para eliminar el K_2CO_3 y se elimina el disolvente a presión reducida. El aceite de color amarillo obtenido se purifica por cromatografía en columna de gel de sílice (40-63 μm) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 90:10) (figura 5.15).

Destosilación de L3-Ts

Se introduce **L3-Ts** (0.89 g, 0.70 mmol) en un matraz de fondo redondo junto con 13 equivalentes de PhOH (4.20 g, 44.50 mmol) por cada grupo Ts disuelto en 45 mL de HBr en HAc al 33 %. La mezcla se calienta a 90 °C durante 24 horas. Al enfriarse la disolución se observa la aparición de un sólido correspondiente al bromohidrato de la poliamina destosilada. El precipitado se recupera por filtración al vacío y se lava repetidas veces con EtOH seco (figura 5.16).

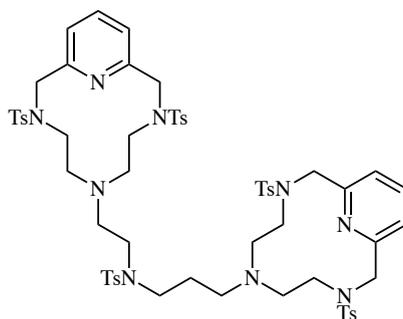


Figura 5.15. Esquema de L3-Ts.

¹H NMR (300.0 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.8-7.6 (m, 12H), 7.4-7.2 (m, 15H), 4.3 (s, 8H), 3.2-2.9 (m, 12H), 2.5 (t, 2H), 2.5-2.2 (m, 26H), 1.5 (m, 2H).

¹³C NMR (75.4 MHz, CDCl₃), δ(ppm): 155.0, 143.5, 138.7, 136.6, 135.9, 129.9, 127.2, 123.9, 54.5, 54.3, 52.4, 51.6, 47.0, 44.7, 44.5, 44.4, 27.36, 21.55.

1,6-bis[3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecafino-6-il]3-azahexano

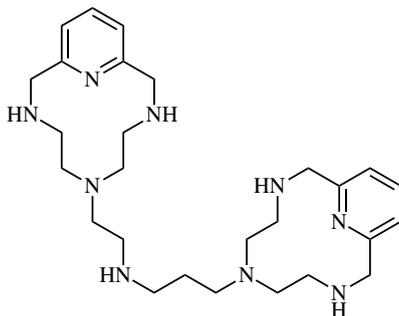


Figura 5.16. Esquema de **L3**.

¹H NMR (300.0 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.9 (t, *J* = 8 Hz, 2H), 7.5 (d, *J* = 8 Hz, 4H), 4.6 (s, 8H), 3.3-3.1 (m, 10H), 3.0-2.9 (m, 4H), 2.8-2.6 (m, 10H), 1.9-1.8 (m, 2H).

¹³C NMR (75.4 MHz, D₂O), δ (ppm): 149.2, 140.1, 122.6, 52.5, 51.3, 50., 50.7, 49.9, 46.6, 46.4, 45.4, 43.8, 21.7.

Anal. Calc. para C₂₇H₄₅N₉·6HBr·4H₂O: C, 30.8; H, 5.6; N, 11.9. **Exp.:** C, 30.9; H, 5.2; N, 11.4.

MS (ESI) m/z [M+H]⁺: 496.3 g/mol.

Rendimiento: 65%

5.6. Síntesis de los derivados de L1

Todos los derivados de **L1** se han obtenido a partir de la reacción de la amina libre con los correspondientes aldehídos comerciales. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos pueden encontrarse en el anexo 2 (*Espectros de RMN*).

Funcionalización de L1

Debido a que **L1** se obtuvo en su forma de clorhidrato, se ha utilizado una resina de intercambio aniónico (Amberlite IRA-402) para sustituir los cloruros por grupos hidroxilo, obteniéndose así la amina en su forma totalmente desprotonada.

Se disuelven 1-4 mmol de la poliamina **L1** en 80 mL de EtOH seco, manteniéndose la disolución con agitación vigorosa y en atmósfera inerte. Posteriormente se adicionan gota a gota 2.1 equivalentes del carbaldehído correspondiente disueltos en 50 de EtOH seco. Una vez se ha confirmado mediante cromatografía de capa fina que la reacción de formación de la imina ha alcanzado el equilibrio, se adicionan 20 equivalentes de NaBH_4 y se mantiene la disolución bajo las mismas condiciones durante 12 horas. Transcurrido el tiempo de reacción se elimina el disolvente a presión reducida y se extrae el sólido obtenido con $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ (3x40 mL). La fase orgánica se seca con Na_2SO_4 anhidro y se elimina el disolvente para obtener así el producto final en forma de aceite. Dado que resulta más cómodo trabajar con las sales de los compuestos poliamínicos que con las correspondientes aminas libres, ya que así se evita su degradación y la captación de CO_2 atmosférico, se disuelve la amina obtenida en un disolvente orgánico seco (EtOH o CH_2Cl_2) y se precipita la sal utilizando una disolución de HCl 4.0 M en dioxano. El sólido obtenido se filtra en placa y se lava repetidas veces con EtOH seco para obtener el producto final en su forma de clorhidrato.

**6-[7-(4-(2-piridil))-3-azabutil]-11-(2-piridil)-3,7,10-triazaundecil]-
3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecaano**

L1-2Py se ha obtenido mediante la reacción de **L1** en su forma de amina libre (0.46 g, 1.17 mmol) con el aldehído comercial *piridina-2-carbaldehído* (0.28 g, 2.58 mmol), seguida de reducción in situ con NaBH_4 (0.89 g, 23.40 mmol).

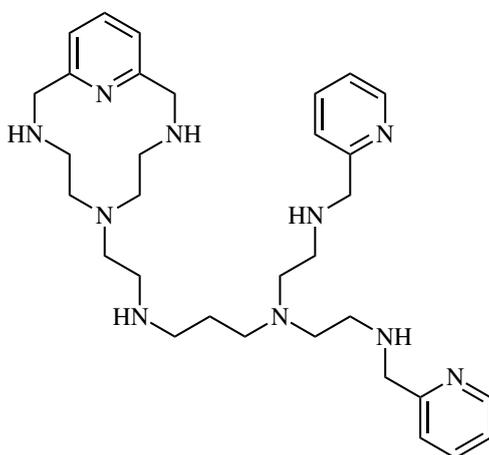


Figura 5.17. Esquema de **L1-2Py**.

^1H RMN (300.0 MHz, D_2O) , δ (ppm): 8.8-8.6 (m, 2H), 8.5 (t, $J = 7$ Hz, 2H), 8.0-7.8 (m, 5H), 7.4 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 4.6 (s, 8H), 3.5-3.3 (m, 4H), 3.3-3.2 (m, 6H), 3.2-3.1 (m, 6H), 3.1-2.9 (m, 2H) 2.9-2.8 (m, 6H), 2.1-1.9 (m, 2H).

^{13}C -DEPT RMN (75.4 MHz, D_2O) , δ (ppm): 144.8, 145.6, 127.1, 127.1, 127.2, 122.5, 50.9, 50.6, 49.3, 49.2, 49.2, 45.9, 46.0, 44.5, 43.8, 21.2.

Anal. Calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{N}_{10} \cdot 8\text{HCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: C, 41.0; H, 7.1; N, 14.9. **Exp.:** C, 40.8; H, 8.6; N, 15.0.

MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 575.4 g/mol.

Rendimiento: 45%

**6-[7-(4-(3-piridil))-3-azabutil]-11-(3-piridil)-3,7,10-triazaundecil]-
3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecafino**

L1-3Py se ha obtenido mediante la reacción de **L1** en su forma de amina libre (0.57 g, 1.45 mmol) con el aldehído comercial *piridina-3-carbaldehído* (0.34 g, 3.19 mmol), seguida de reducción in situ con NaBH_4 (1.10 g, 29.03 mmol).

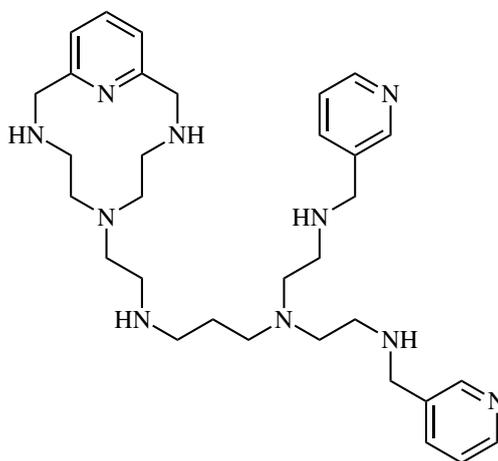


Figura 5.18. Esquema de **L1-3Py**.

^1H RMN (300.0 MHz, D_2O) , δ (ppm): 9.9-9.8 (m, 2H), 8.9 (d, $J = 2$ Hz, 2H), 8.7 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 8.1 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 7.9 (t, $J = 7$ Hz, 1H), 7.4 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 4.3-4.6 (m, 8 H), 3.3-3.2 (m, 10H), 3.2-3.0 (m, 4H), 3.0-2.9 (m, 8H), 2-8-2.7 (m, 2H), 2.0-1.9 (m, 2H).

^{13}C RMN (75.4 MHz, D_2O) , δ (ppm): 148.73, 143.34, 142.98, 140.18, 128.11, 122.38, 50.72, 49.61, 49.18, 48.98, 49.15, 47.70, 46.44, 46.06, 45.09, 21.48

Anal. Calc. para $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{N}_{10}\cdot 8\text{HCl}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 42.6; H, 6.9; N, 15.4. **Exp.:** C, 42.6; H, 8.6; N, 15.1.

MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 575.4 g/mol.

Rendimiento: 52%

6-[7-(4-(4-quinolil))-3-azabutil)-11-(4-quinolil)-3,7,10-triazaundecil]-3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecafano

L1-4Py se ha obtenido mediante la reacción de **L1** en su forma de amina libre (0.27 g, 0.69 mmol) con el aldehído comercial *quinolina-4-carbaldehído* (0.23 g, 1.45 mmol), seguida de reducción in situ con NaBH_4 (0.52, 13.80 mmol).

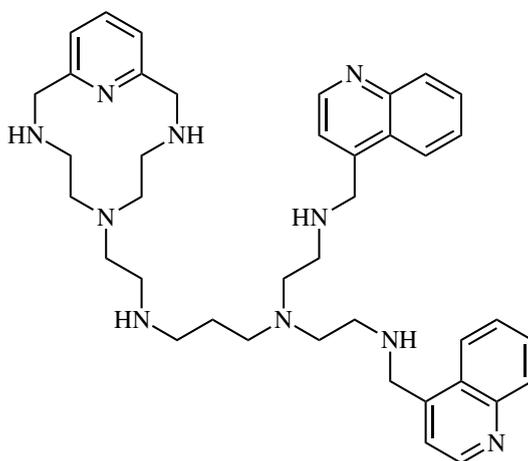


Figura 5.19. Esquema de **L1-4Q**.

^1H RMN (300.0 MHz, D_2O) , δ (ppm): 9.2 (d, $J = 6$ Hz, 2H), 8.5 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 8.3 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 8.2 (m, 4H), 8.0 (d, $J = 8$ Hz, 2H), 7.9 (t, $J = 10$ Hz, 1H), 7.4 (d, $J = 5$ Hz, 2H), 5.1 (s, 4H), 4.6 (s, 4H), 3.6 (t, $J = 6$ Hz, 4H), 3.4-3.1 (m, 12H), 3.0-2.8 (m, 10H), 2.1-1.9 (m, 2H).

^{13}C RMN (75.4 MHz, D_2O) , δ (ppm): 144.61, 140.09, 135.32, 131.26, 124.58, 122.32, 122.43, 121.74, 50.87, 51.23, 49.83, 49.52, 46.38, 46.20, 45.93, 43.98, 36.83, 22.24.

Anal. Calc. para $\text{C}_{40}\text{H}_{54}\text{N}_{10} \cdot 7\text{HCl} \cdot 10\text{H}_2\text{O}$: C, 43.3; H, 7.4; N, 12.6. **Exp.:** C, 43.4; H, 7.4; N, 12.7.

MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$: 675.4 g/mol.

Rendimiento: 65%.

**6-[7-(4-(9-antril))-3-azabutil]-11-(9-antril)-3,7,10-triazaundecil]-
3,6,9-triaza-1-(2,6)piridinaciclodecafino**

L1-A se ha obtenido mediante la reacción de **L1** (0.69 g, 1.75 mmol) con el aldehído comercial *antraceno-9-carbaldehído* (0.79 g, 3.84 mmol), seguida de una reacción in situ con NaBH₄ (1.32 g, 34.90 mmol). El producto de reacción se purificó mediante columna cromatográfica de gel de alúmina (40-63 μm) (CH₂Cl₂:MeOH 25:75).

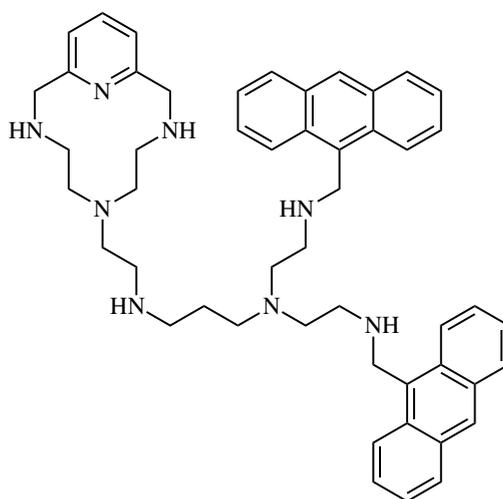


Figura 5.20. Esquema de **L1-A**.

¹H RMN (300.0 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.93-7.83 (m, 3H), 7.76-7.69 (m, 3H), 7.53 (d, *J* = 4 Hz, 4H), 7.40-7.29 (m, 7H), 7.24 (t, *J* = 8 Hz, 4H), 4.53 (s, 8H), 3.24-3.10 (m, 8H), 3.00-2.91 (m, 4H), 2.87-2.78 (m, 8H), 2.53 (t, *J* = 6 Hz, 2H), 2.37 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 1.71-1.61 (m, 2H).

¹³C-DEPT RMN (75.4 MHz, D₂O), δ (ppm): 137.73, 129.14, 128.14, 126.80, 125.23, 123.99, 120.68, 53.93, 53.46, 52.51, 52.15, 51.85, 46.76, 46.41, 46.10, 44.00, 29.68, 23.94.

Anal. Calc. para C₅₀H₆₀N₈·6HCl·6H₂O: C, 54.6; H, 7.14; N, 10.2. **Exp.:** C, 54.4; H, 7.0; N, 10.3.

MS (ESI) m/z [M+H]⁺: 773.4 g/mol.

Rendimiento: 45%

Referencias

- [1] Sureshbabu, V. V.; Narendra, N. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry. Vol.4. Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*. Ed. Andrew B. Hughes, Wiley-VCH, **2011**.
- [2] Wuts, P. G. M. *Greene's Protective Groups in Organic Chemistry*. Ed. Wiley & Sons, **2007**.
- [3] Snyder, H. R.; Hecker, R.E. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2006.
- [4] Richman, J. E.; Atkins, T. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 2268-2270.
- [5] Gabriel, S. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 2224-2236.
- [6] Ing, H. R.; Manske, R. H. F. *J. Chem. Soc.* **1926**, 2348-2351.
- [7] Bazzicalupi, C.; Bencini, A.; Bianchi, A.; Biver, T.; Boggioni, A. Bonacchi, S.; Danesi, A.; Giorgi, C.; Gratteri, P.; Ingrañ, A. M.; Secco, F.; Sissi, C.; Valtancoli, B.; Venturini, M. *Chem. Eur. J.* **2008**, 14, 184-196.
- [8] Haskell, B. E.; Bowlus, S. B. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 159-160.
- [9] Schiff, H. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1864**, 131, 118-119.
- [10] Inclán, M. A. *Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universitat de València, **2016**.
- [11] Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9644-9656.
- [12] Guijarro, L.; Inclán, M.; Pitarch-Jarque, J.; Doménech-Carbó, A.; Chicote, J. U.; Trefler, S.; García-España, E.; García-España, A.; Verdejo, B. *Inorg. Chem.* **2017**, 56(22), 13748-13758.

6. Propiedades ácido-base

Los ligandos sintetizados en la presente tesis doctoral pertenecen al grupo de las poliaminas y cuentan, por lo tanto, con varios átomos de nitrógeno con pares de electrones no compartidos, los cuales son susceptibles de ser protonados. Por otro lado, las propiedades de estos ligandos a la hora de interaccionar con distintos sustratos tales como cationes, aniones, ácidos nucleicos, etc., dependen en gran medida del número de cargas positivas y del número de átomos dadores o aceptores de enlaces de hidrógeno, o lo que es lo mismo, de su grado de protonación.[1][2] Por todo ello, resulta imprescindible conocer cuál es la distribución de especies en disolución en función del pH.

Se han evaluado las propiedades ácido-base de las poliaminas sintetizadas mediante el uso de técnicas potenciométricas así como por medio de valoraciones espectroscópicas UV-Vis y de fluorescencia. El tratamiento de los datos obtenidos ha permitido obtener las constantes de protonación correspondientes a los distintos grupos amino. A partir de estos datos es posible calcular los diagramas de distribución, permitiendo conocer cuál es la distribución de especies en disolución en función del pH, por otro lado éstos permiten determinar que especies predominan a pH fisiológico. Mediante la combinación de las distintas técnicas mencionadas se han descrito, en algunos casos, las secuencias de protonación, lo que permite elucidar que átomos están implicados en las distintas etapas de protonación.

6.1. Poliaminas **L1**, **L2** y **L3**

L1 y **L2** presentan un macrociclo de piridina unido por una cadena central a la poliamina lineal de cadena abierta dietilen-triamina (**L1**) y dipropilen-triamina (**L2**) (figura 6.1). Por otro lado, la poliamina **L3** presenta dos cavidades macrocíclicas isoestructurales unidas por la misma cadena central. A lo largo del capítulo se analizará en detalle cómo estas variaciones estructurales afectan a la química ácido-base de los distintos ligandos.

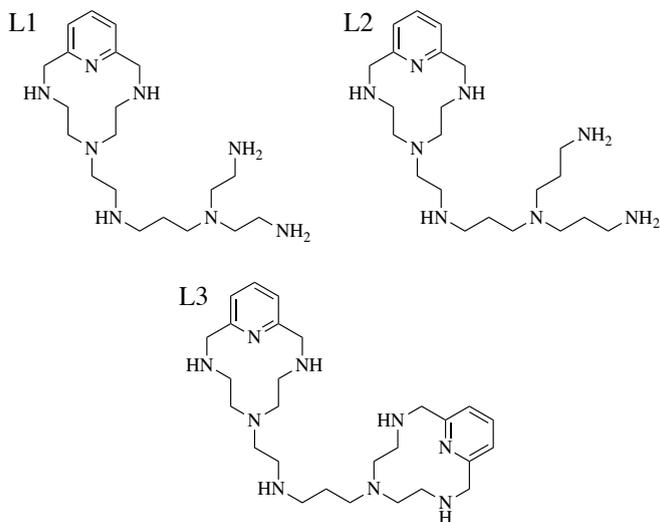


Figura 6.1. Poliaminas **L1**, **L2** y **L3**.

Estudios potenciométricos

En la tabla 6.1 se presentan los valores logarítmicos de las constantes sucesivas de protonación encontrados para los receptores **L1**, **L2** y **L3**, siguiendo éstos la tendencia que cabría esperar en base a la minimización de las repulsiones electrostáticas entre cargas del mismo signo.[3] En general, excepto para las últimas etapas, las diferencias entre los valores de las constantes pueden explicarse en términos estadísticos.[3]

Para los tres receptores, a pesar de que éstos presentan como mínimo 8 nitrógenos, se han determinado cinco (**L1** y **L3**) o seis (**L2**) constantes de protonación dentro del intervalo de pH abarcado por la técnica potenciométrica (2.5 - 11.0) (tabla 6.1). En todos los casos los cinco primeros equilibrios de protonación corresponden a la protonación de los distintos grupos amino primarios y secundarios de los receptores. La sexta constante identificada para **L2** ($H_5L^{5+} + H^+ \rightleftharpoons H_6L^{6+}$, $\log K = 5.36(1)$) puede atribuirse, *a priori*, a la protonación de una de las aminas terciaria presente el compuesto (*vide infra*).

Tabla 6.1. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global para los receptores **L1**, **L2** y **L3**, determinados mediante valoraciones potenciométricas a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1	L2	L3
$L + H \rightleftharpoons HL^a$	9.84(3) ^b	10.95(1)	10.19(3)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.72(1)	10.14(1)	9.58(3)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	9.00(2)	9.26(1)	8.74(3)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	8.55(2)	8.52(1)	8.24(3)
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	7.36(2)	7.29(1)	7.28(3)
$H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$		5.36(1)	
$\log \beta^c$	44.47(2)	51.63(1)	44.03(3)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa. (c) La basicidad global β se define como $\beta = \sum Ki$.

En todos los casos las protonaciones no determinadas de los grupos amino involucrarían al nitrógeno de la piridina y las aminas terciarias de los anillos macrocíclicos. Las constantes de protonación para estos grupos son más bajas debido a las fuertes repulsiones electrostáticas que se generarían por los tres grupo amonio próximos y, por lo tanto, no pueden ser detectadas por esta técnica.[4] Además, hay que tener en cuenta que los nitrógenos terciarios en disolución acuosa son menos básicos que los primarios y secundarios.[5]

Los valores de las constantes de protonación ofrecen información sobre el comportamiento ácido-base de los compuestos, permitiendo el cálculo del grado medio de protonación a distintos valores de pH.[6] Sin embargo, estas constantes son un dato macroscópico que no aporta información acerca de cada uno de los átomos protonables de forma individual. A pesar de esto, mediante la comparación de los valores obtenidos experimentalmente para **L2** con aquellos encontrados en la bibliografía correspondientes a la protonación de la amina central para la poliamina lineal 3-3'-diamino-N-metildipropilamina ($H_2L^{2+} + H^+ \rightleftharpoons H_3L^{3+}$, $\log K = 6.98(3)$),[7] es posible asignar la sexta constante determinada para **L2** a la protonación del grupo amino terciario presente en el extremo de la cadena lateral ($H_5L^{5+} + H^+ \rightleftharpoons H_6L^{6+}$, $\log K = 5.36(1)$). Las ligeras variaciones entre estos valores podrían venir dadas por la presencia de un mayor número de cargas cercanas al grupo protonable en **L2**. Así pues, la presencia de las dos cadenas propilénicas permite que se minimicen en mayor medida las repulsiones electrostáticas entre los grupos amonio, lo que aumenta el valor de la constante y posibilita su determinación mediante técnicas potenciométricas. Por otro lado, la menor longitud de la cadena abierta en **L1** imposibilita la determinación de la protonación del grupo amino terciario.[5][8][9]

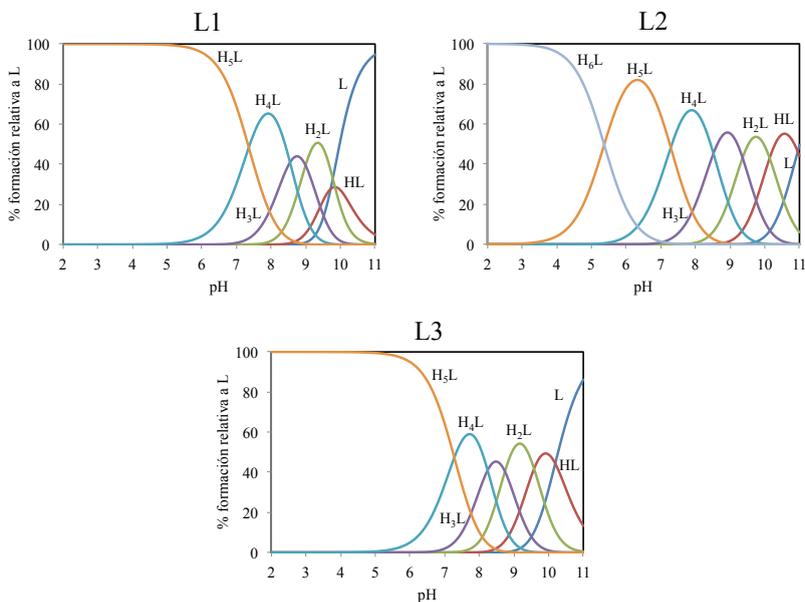


Figura 6.2. Diagramas de distribución de los ligandos **L1**, **L2** y **L3**, calculados a partir de las constantes de protonación. $[L] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

Los diagramas de distribución obtenidos para **L1** y **L3** presentan un perfil similar (figura 6.2), predominando en ambos casos las especies totalmente protonadas, H_3L^{5+} , a pH ácido. A valores de pH alcalinos se observa la coexistencia de especies con distintos grados de protonación (H_4L^{4+} , H_3L^{3+} , H_2L^{2+} , HL^+ y L).

Para **L2**, la obtención de la constante adicional ($H_5L^{5+} + H^+ \rightleftharpoons H_6L^{6+}$, $\log K = 5.36(1)$) se traduce en la presencia en disolución de una mezcla de especies con grados de protonación 5 y 4 a valores de pH ácidos. A valores de pH superiores se observa un diagrama de distribución análogo al observado para **L1** y **L3**.

Para los tres sistemas, las especies H_5L^{5+} y H_4L^{4+} coexisten en disolución a pH fisiológico, presentando las poliaminas grados de protonación de 4.3 (**L1**), 4.2 (**L2**) y 4.1 (**L3**).

Estudios UV-Vis

La presencia de anillos de piridina en este tipo de derivados, cuya banda característica de transición ($\pi - \pi^*$) se centra sobre 260 nm, permite monitorizar mediante espectroscopía UV-Vis la formación de las especies con distinto grado de protonación.[10]

Para los tres receptores se observa un aumento en la absorbancia de la piridina a valores de pH comprendidos entre 7.0 y 11.0 (figura 6.3), el cual viene acompañado de un ligero desplazamiento batocrómico del máximo de la banda ($\Delta\lambda = 5$ nm). En este tipo de ligandos la superposición de los valores de absorción a los correspondientes diagramas de distribución proporciona una herramienta útil para evaluar posibles cambios en los estados de protonación de las poliaminas. Sin embargo, en la figura 6.3 se puede apreciar como todas las etapas de protonación de las poliaminas parecen contribuir al aumento de la absorbancia observado, posiblemente debido a efectos de reorganización molecular y compartición de protones mediante la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares. A la vista de estos resultados, la superposición de estas especies en disolución imposibilita la asignación de los cambios observados a la desprotonación de algún grupo en particular.

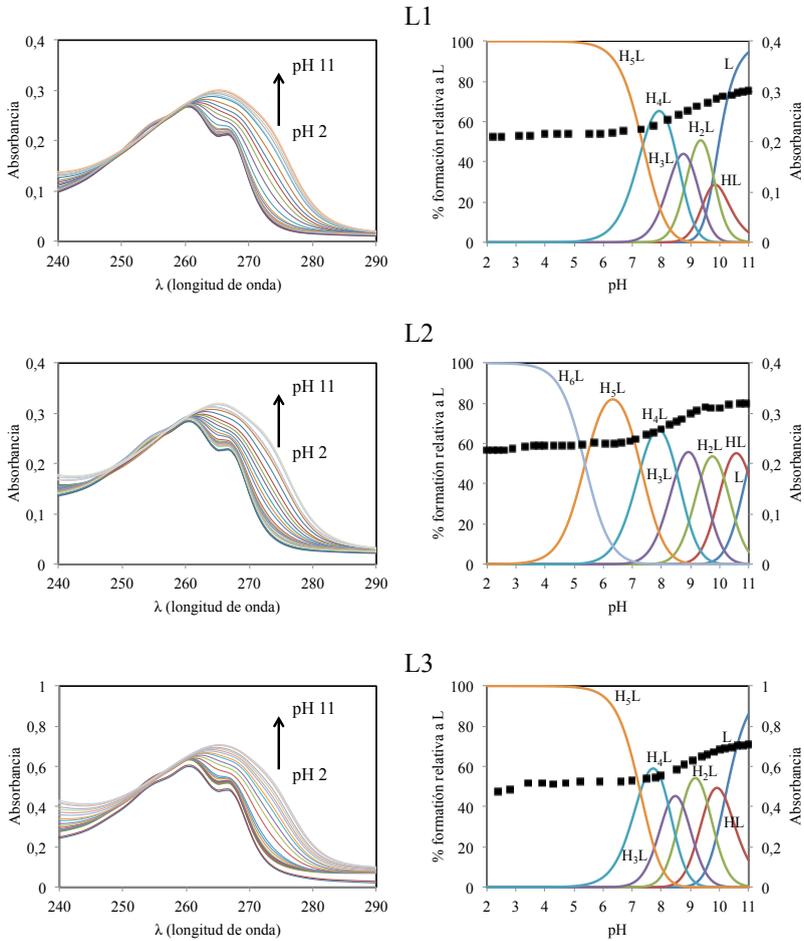


Figura 6.3. (Izquierda) Variaciones en los espectros UV-Vis de L1, L2, L3 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagramas de distribución de especies junto a las variaciones a 265 nm en función del pH. $[L] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

6.2. Poliaminas L1-2Py, L1-3Py y L1-4Q

La figura 6.4 muestra las poliaminas sintetizadas en las que se han unido distintos grupos funcionales a las aminas primarias de **L1**. Así pues, **L1-2Py** y **L1-3Py** presentan un esqueleto común así como dos anillos de piridina en los extremos de la cadena lateral sustituidos en posición 2 (**L1-2Py**) y en posición 3 (**L1-3Py**). Por otro lado, **L1-4Q** presenta dos unidades de quinolina en los extremos sustituidos en posición 4 respecto al heteroátomo (figura 6.4).

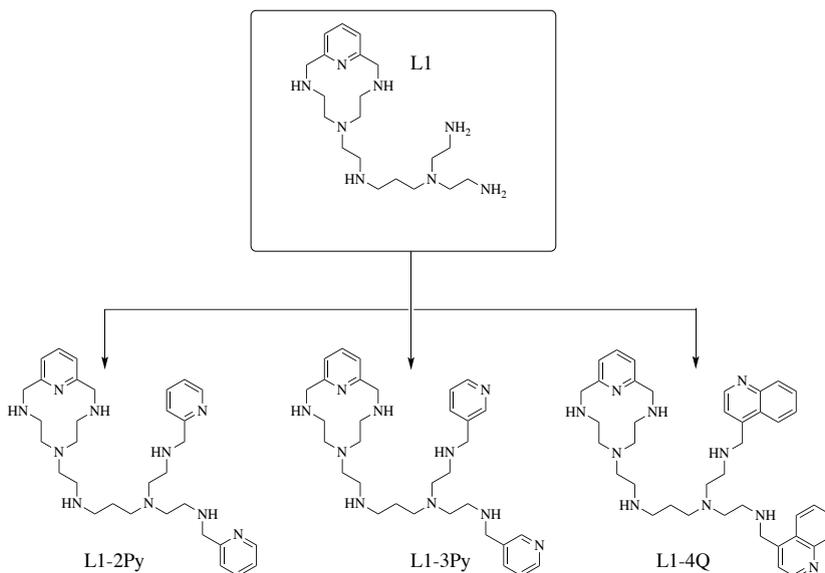


Figura 6.4. Poliaminas sintetizadas a partir de **L1**: **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**.

En la tabla 6.2 se comparan los valores para las constantes sucesivas de protonación de los receptores **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**, determinados mediante estudios potenciométricos y valoraciones UV-Vis.

En todos los casos se han identificado etapas de protonación adicionales respecto al precursor **L1**. Sin embargo, las constantes de basicidad globales son, al contrario de como cabría esperar, similares a la del precursor, lo que indica que la introducción de los grupos funcionales disminuye la basicidad de los grupos amino de la molécula.

Tabla 6.2. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global calculadas para los receptores **L1**, **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**. Valores determinados a partir de estudios potenciométricos y valoraciones UV-Vis a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1	L1-2Py	L1-3Py	L1-4Q
$L + H \rightleftharpoons HL^a$	9.84(3) ^b	10.46(2)	10.70(1)	9.64(2)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.72(1)	9.48(2)	9.52(1)	8.96(2)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	9.00(2)	8.26(2)	8.38(2)	7.89(3)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	8.55(2)	7.64(2)	7.59(1)	6.81(3)
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	7.36(2)	6.66(3)	6.92(3)	4.53(3)
$H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$		1.47(1) ^c	4.26(2)	3.39(2) ^c
$H_6L + H \rightleftharpoons H_7L$			2.58(7)	1.98(7) ^c
$\log\beta^d$	44.47(2)	43.97(3)	49.9(1)	43.29(3)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa. (c) Valores obtenidos a partir de datos UV-Vis (d) La basicidad global β se define como $\beta = \sum_i K_i$.

Para **L1-2Py** y **L1-3Py** se han identificado cinco constantes de protonación con valores comprendidos entre 10.7 y 6.6 unidades logarítmicas, correspondientes a la protonación de los grupos amino secundarios presentes en ambos receptores. De forma análoga, para **L1-4Q** se han identificado cinco constantes de protonación con valores ligeramente inferiores a los de los derivados de piridina (tabla 6.2). Los valores obtenidos siguen la tendencia que cabría esperar en base a la minimización de las repulsiones electrostáticas entre cargas del mismo signo.[3]

Las constantes de protonación de los nitrógenos presentes en los grupos piridina y quinolina son menores que las correspondientes a los grupos amino secundarios,[10][11] lo que en muchos casos imposibilita el estudio de estos equilibrios mediante técnicas potenciométricas. Para profundizar en el estudio de estos equilibrios, y tomando ventaja de la presencia de grupos piridina en **L1-2Py** y **L1-3Py**, los cuales presentan una banda de absorción centrada en 260 nm (banda de transición $\pi - \pi^*$),[12] así como de las unidades de quinolina en **L1-4Q**, presentando éstas distintas bandas de absorción en función de su estado de protonación (bandas de transición $\pi - \pi^*$, centradas sobre 273 nm y 317 nm),[11] se procedió a monitorizar la protonación de estos grupos a valores de pH ácidos mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis.

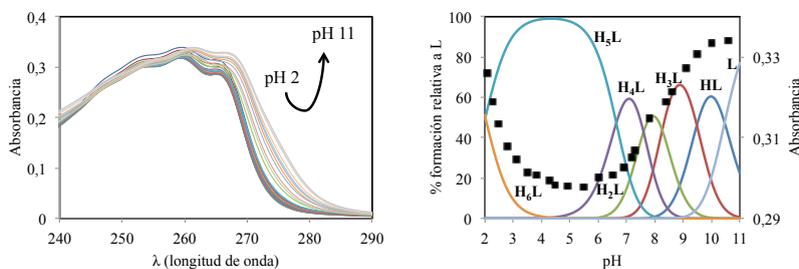


Figura 6.5. (Izquierda) Variación en el espectro UV-Vis de **L1-2Py** a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para **L1-2Py** junto a la variación a 260 nm en función del pH (eje secundario ampliado). $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

A valores de pH ácidos **L1-2Py** presenta una banda de absorción centrada a 260 nm, la cual disminuye en intensidad al aumentar progresivamente el pH hasta alcanzar un valle sobre pH = 4 (figura 6.5). Por otro lado, a valores de pH alcalinos se observa un aumento en la absorbancia acompañado de un desplazamiento batocrómico del máximo de la banda ($\Delta\lambda = 5$ nm). El análisis detallado de estos datos mediante el programa HypSpec ha permitido determinar una constante de protonación adicional con un valor de $\log K = 1.47(1)$ ($H_5L^{5+} + H^+ \rightleftharpoons H_6L^{6+}$) (tabla 6.2), atribuible a la protonación del nitrógeno de una de las piridinas sustituidas en posición 2. El valor relativamente bajo obtenido para la constante de protonación, y su comparación con los valores bibliográficos encontrados para diferentes ligandos que presentan grupos amino-piridina, permite indicar que este proceso implica la ruptura de un enlace de hidrógeno intramolecular previamente establecido entre el nitrógeno de la piridina y el grupo amonio secundario contiguo (figura 6.6). Ya se han descrito efectos similares en poliaminas que presentaban restos metil-2-piridil.[10]

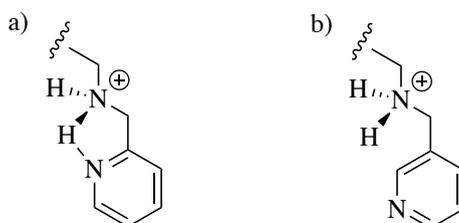


Figura 6.6. (a) Representación de la formación del enlace de hidrógeno entre el grupo amonio secundario y el nitrógeno de la piridina en **L1-2Py**. (b) Estructura propuesta para el grupo piridina desprotonado en **L1-3Py**.

La superposición de los valores de absorción con el diagrama de distribución obtenido para **L1-2Py** permite relacionar las variaciones en el espectro UV-Vis iniciales a la ruptura del enlace de hidrógeno establecido entre el nitrógeno de la piridina y el grupo amonio contiguo (figura 6.5 y figura 6.6). Por otro lado, el aumento en absorbancia observado a valores de pH superiores se corresponde, con bastante precisión, al momento en el que

se inicia la desprotonación de H_3L^{3+} , esta tendencia se prolonga hasta que la especie totalmente desprotonada, L, predomina en disolución (figura 6.6). A pH fisiológico coexisten las especies H_4L^{4+} (52 %) y H_3L^{3+} (33 %).

Para **L1-3Py** se han determinado mediante técnicas potenciométricas dos constantes de protonación con valores bajos ($\log K$; $H_5L^{5+} = 4.26(2)$ y $H_6L^{6+} = 2.58(7)$). La monitorización de la banda de absorción de la piridina permite atribuir la disminución en intensidad inicial a la desprotonación de los dos grupos piridina sustituidos en posición 3, dicha tendencia se prolonga hasta alcanzar valores de pH cercanos a 5 (figura 6.7). Los valores obtenidos para la protonación de los nitrógenos de ambas piridinas son superiores al obtenido para **L1-3Py**, lo que indicaría que estas etapas de protonación no implicarían la ruptura de enlaces de hidrógeno intramoleculares previamente establecidos entre los nitrógenos de las piridinas y los grupos amonio secundarios (figura 6.6). A pH fisiológico las especies H_5L^{5+} (16 %), H_4L^{4+} (49 %) y H_3L^{3+} (31 %) coexisten en disolución.

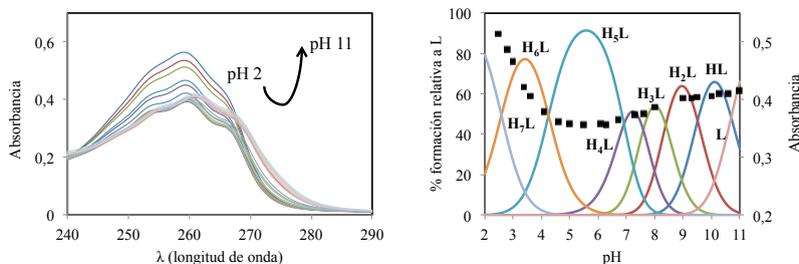


Figura 6.7. (Izquierda) Variación en el espectro UV-Vis de **L1-3Py** a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para **L1-3Py** junto a la variación a 260 nm en función del pH (eje secundario ampliado). $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

A la vista de los resultados, la distinta sustitución de los anillos de piridina presentes en **L1-2Py** y **L1-3Py** ejercen un papel relevante en las propiedades ácido-base de los ligandos a valores de pH ácidos.

A pH ácido el espectro de absorción de **L1-4Q** se rige por la banda característica de transición $\pi - \pi^*$ de la quinolina protonada,[11] centrada a 317 nm, junto a la del grupo piridina del macrociclo, 260 nm (figura 6.8). Sin embargo, al aumentar progresivamente el pH de la disolución se observa la aparición de una nueva banda a 273 nm, la cual puede describirse como la superposición de la banda de transición del grupo quinolina desprotonado, centrada a 273 nm, con la correspondiente al anillo de piridina.[11] Así pues, a lo largo de la valoración ácido-base se observan dos máximos de absorción centrados a 273 y 317 nm, todo ello conduciendo a la aparición de un punto isobéptico a 297 nm (figura 6.9).

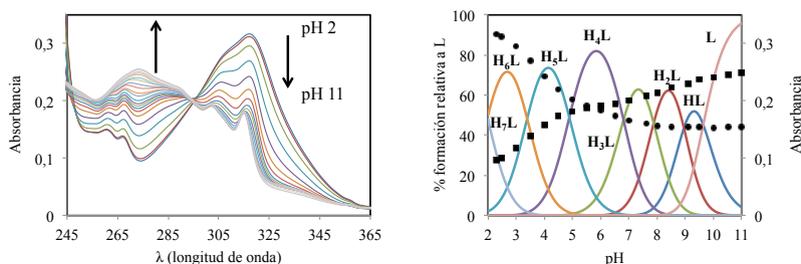


Figura 6.8. (Izquierda) Variación en el espectro UV-Vis de **L1-4Q** a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para **L1-4Q** junto a la variación a (■) 273 nm y (●) 317 nm en función del pH. $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

El análisis detallado de los datos UV-Vis mediante el programa HypSpec ha permitido determinar dos constantes de protonación adicionales ($H_5L^{5+} + H^+ \rightleftharpoons H_6L^{6+}$, $\log K = 3.39(2)$ y $H_6L^{6+} + H^+ \rightleftharpoons H_7L^{7+}$, $\log K = 1.98(7)$). Estudios espectroscópicos llevados a cabo anteriormente con el derivado *pytren-4Q*, el cual presenta una unidad quinolina sustituida en posición 4 al final de la cadena central del precursor *pytren*, permitieron determinar la constante de protonación del nitrógeno de la quinolina ($H_3L^{3+} + H^+ \rightleftharpoons H_4L^{4+}$, $\log K = 2.28(1)$).[11] A la vista de estos resultados, es posible asignar las dos últimas etapas de protonación determinadas para **L1-4Q** a la protonación sucesiva de los nitrógenos presentes en los anillos aromáticos de quinolina.

Como se puede observar en la figura 6.8, la disminución de la banda centrada a 317 nm se produce en el intervalo de pH 2.0 - 8.0, pudiendo asociarse estas variaciones a la desprotonación sucesiva de los nitrógenos presentes en las quinolinas así como a la de los dos nitrógenos contiguos a ambos grupos cromóforos.[11]

Paralelamente se observa un aumento brusco en la absorción de la banda centrada a 273 nm entre valores de pH 2.0 - 4.5, correspondiéndose este aumento con bastante precisión a la desprotonación sucesiva de las especies H_7L^{7+} y H_6L^{6+} . Todo ello permite confirmar que la primera y segunda etapa de desprotonación implican a los nitrógenos presentes en los grupos quinolina.

Estudios de fluorescencia

El comportamiento emisivo de compuestos poliamínicos que contienen grupos fluoróforos depende en gran medida del grado de protonación de dichos receptores. [11][13] Esto es así ya que la presencia de un átomo dador con un par de electrones disponibles en las proximidades del grupo fluoróforo puede dar lugar a un fenómeno de transferencia electrónica fotoinducida (PET por sus siglas en inglés), lo que se traduce en una disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia. Por el contrario, al protonarse la amina el par de electrones ya no se encuentra disponible y este fenómeno PET se ve interrumpido, lo que se traduce en un aumento en la intensidad de emisión.

Así pues, la fluorescencia intrínseca de los grupos quinolina permite monitorizar de forma directa posibles variaciones en el grado de protonación de **L1-4Q** durante el transcurso de las valoraciones ácido-base (figura 6.9), lo que proporciona información acerca de cuales son grupos amino involucrados en las distintas etapas de protonación.

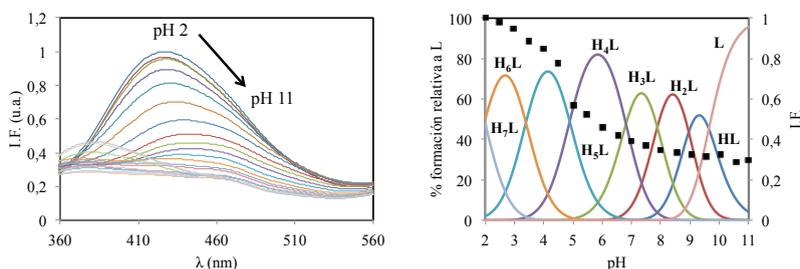


Figura 6.9. (Izquierda) Variación en el espectro de emisión de fluorescencia de **L1-4Q** a distintos valores de pH ($\lambda_{\text{ex}} = 350$ nm). (Derecha) Diagrama de distribución de especies junto a la variación en máximo de emisión en función del pH ($\lambda_{\text{em}} = 425$ nm). $[L] = 2 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas

En la figura 6.9 se muestra el espectro de emisión de fluorescencia de **L1-4Q** a distintos valores de pH, observándose una desactivación de la fluorescencia a medida que aumenta el pH de la disolución.

La superposición de los valores de emisión al correspondiente diagrama de distribución permite relacionar la disminución en intensidad observada a la desprotonación de los grupos amonio secundarios próximos a los cromóforos ($\text{H}_3\text{L}^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L}^{4+}$, $\log K = 6.81(3)$ y $\text{H}_4\text{L}^{4+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}^{5+}$, $\log K = 4.53(3)$), debido al fenómeno PET. Por otro lado, a valores de pH relativamente ácidos se observa ya una disminución en la fluorescencia, lo que indicaría que la desprotonación de los grupos quinolina contribuye a la desactivación fluorescente observada.

A valores de pH alcalinos se observa una emisión fluorescente residual (figura 6.9), este fenómeno ya se había observado anteriormente en compuestos poliamínicos estructuralmente análogos, *pytren-4Q*, en cuyo caso se determinó que la implicación de distintos grupos amonio en la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares se traducían en una emisión residual a valores de pH alcalinos.[11]

La combinación de los datos obtenidos mediante las distintas técnicas utilizadas para estudiar éste sistema ha permitido determinar la secuencia de protonación más probable para **L1-4Q**, la cual se presenta en la figura 6.10. Resulta importante aclarar que la secuencia de protonación solo refleja una situación promedio ya que, al tratarse de equilibrios, no es posible asignar de forma inequívoca un protón a un único átomo dador.

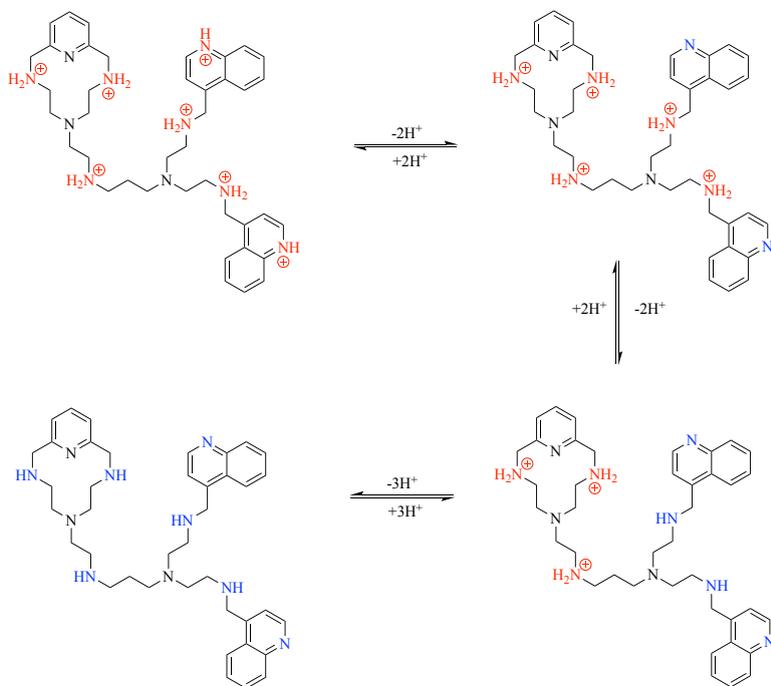


Figura 6.10. Secuencia de protonación propuesta para **L1-4Q**.

6.3. Poliamina L1-A

Tal y como se muestra en la figura 6.11, **L1-A** presenta un esqueleto común a **L1** en el que se han introducido dos unidades antraceno en ambos extremos de la cadena central. También se ha incluido la poliamina *pytren-A*, la cual presenta un macrociclo de piridina unido por una cadena central a un grupo antraceno.

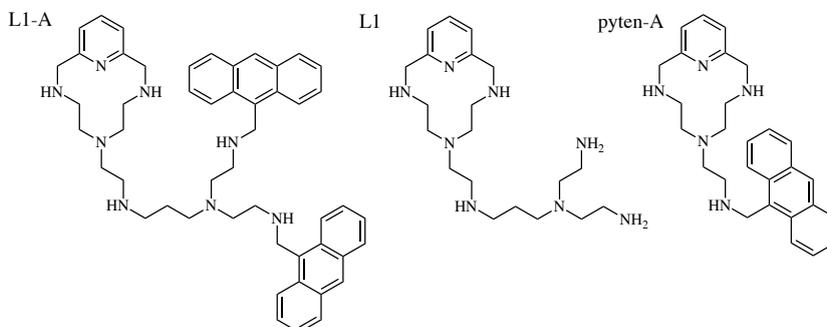


Figura 6.11. Poliaminas **L1-A**, **L1** y *pytren-A*.

En la tabla 6.3 se comparan los valores de las constantes sucesivas de protonación determinados para **L1-A**, junto a los obtenidos anteriormente para el precursor **L1** y para el *pytren-A*.^[14] A diferencia de **L1**, el cual presenta cinco equilibrios que pueden asociarse a las distintas etapas de protonación de los grupos amino primarios y secundarios, el receptor **L1-A** presenta seis constantes de protonación con valores que oscilan entre 8.9 y 3.8 unidades logarítmicas. Las constantes de basicidad obtenidas para **L1-A** resultan en todos los casos menores que las correspondientes al precursor **L1**, lo que se explica en base al carácter hidrófobo de los anillos aromáticos sustituyentes. Al igual que para **L2**, en este caso se ha identificado una sexta constante de protonación ($H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$, $\log K = 3.86(7)$), la cual puede atribuirse a la protonación de la amina terciaria presente en la cadena central (*vide infra*). Por otro lado, el derivado con una sola unidad antraceno, *pytren-A*, presenta un total de tres constantes de protonación con valores

comprendidos entre 9.8 y 7.1 unidades logarítmicas. Estudios espectroscópicos llevados a cabo con este receptor permitieron corroborar que la última protonación tiene lugar preferentemente en la amina secundaria cercana al cromóforo, mientras que las dos primeras involucran a las aminas secundarias del macrociclo.[14]

Al comparar los valores obtenidos para **L1-A** y *pytren-A* pueden extraerse varias conclusiones: las tres primeras etapas de protonación determinadas para **L1-A** involucrarían a las dos aminas secundarias del macrociclo así como a la de la cadena central, por otro lado la quinta y sexta etapa de protonación presentan valores similares a la última constante obtenida para el derivado *pytren-A*, lo cual permitiría asignar estas etapas a la protonación sucesiva de los nitrógenos cercanos a los antracenos (*vide infra*). El último valor obtenido para **L1-A** resulta menor a cualquiera de los valores determinados para el *pytren-A*, lo que hace pensar que éste implicaría la protonación del grupo amino terciario de la cadena central.

Tabla 6.3. Logaritmos de las constantes de protonación y de basicidad global para **L1-A** y **L1** junto a los valores obtenidos de la bibliografía para el *pytren-A*. Valores determinados mediante valoraciones potenciométricas a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1-A	L1	<i>pytren-A</i> ^d
$L + H \rightleftharpoons HL^a$	8.86(4)	9.84 (1) ^b	9.80(2)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	8.55(3)	9.72(3)	8.66(2)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	8.07(3)	8.99(2)	7.19(3)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	7.30(3)	8.54(1)	
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	6.66(3)	7.36(2)	
$H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$	3.86(7)		
$\log\beta^c$	43.30(7)	44.47(2)	25.65(3)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis indican las desviaciones estándar en la última cifra significativa. (c) La basicidad global β se define como $\beta = \Sigma iK_i$. (d) Datos obtenidos de la referencia [13].

Tomando ventaja de la presencia de dos unidades antraceno en **L1-A**, las cuales presentan un máximo de emisión de fluorescencia a 418 nm, se han monitorizado los cambios en las propiedades de emisión de receptor en el intervalo de pH 2.0 - 11.0 (figura 6.12).

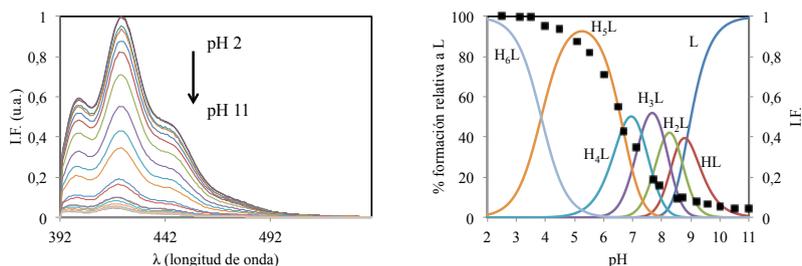


Figura 6.12. (Izquierda) Variación en el espectro de emisión de fluorescencia de **L1-A** a distintos valores de pH ($\lambda_{\text{ex}} = 371$ nm). (Derecha) Diagrama de distribución de especies junto a la variación en el máximo de emisión en función del pH ($\lambda_{\text{em}} = 418$ nm). $[L] = 10^{-4}$ M. Cargas omitidas

Al superponer los valores de emisión al correspondiente diagrama de distribución obtenido para **L1-A** es posible asociar el fuerte efecto PET observado al momento en el que tiene lugar la segunda y tercera etapa de desprotonación, conduciendo a la aparición de H_3L^{3+} en disolución (figura 6.12). Este tipo de análisis permite afirmar que las dos etapas mencionadas involucran a los dos nitrógenos contiguos a los grupos cromóforos.[13][15] Por otro lado, se observa como la desprotonación de la especie H_6L^{6+} no influye en el espectro de emisión de la poliamina (figura 6.12), lo que corrobora que esta etapa corresponde a la desprotonación del grupo amonio terciario de la cadena central.

A partir de las distintas evidencias experimentales recolectadas es posible describir de forma precisa la secuencia de protonación de **L1-A**, presentada en figura 6.13.

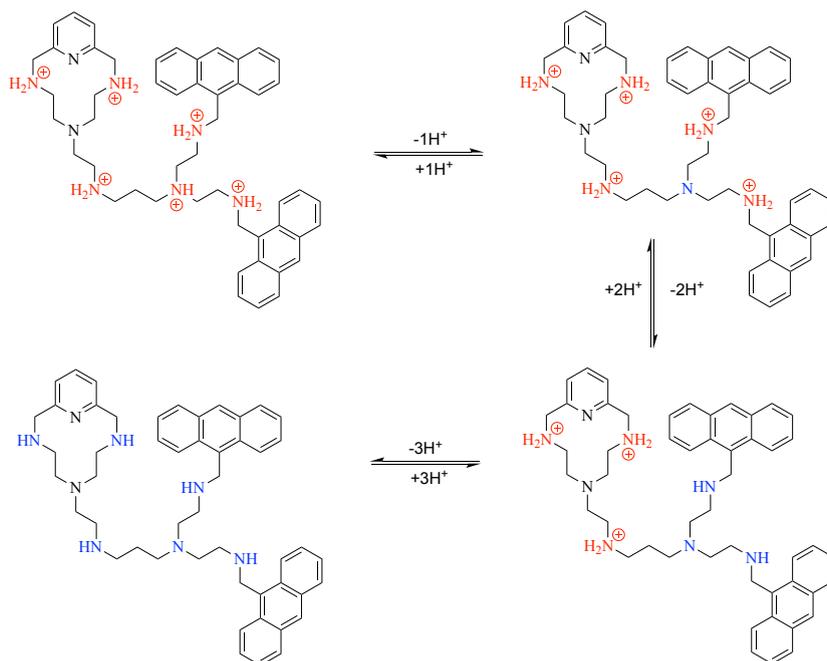


Figura 6.13. Secuencia de protonación propuesta para **L1-A**.

Por otro lado, una vez calculados los diagramas de distribución es posible determinar que a pH fisiológico las especies H_4L^{4+} (37 %) y H_3L^{3+} (46 %) coexisten en disolución (figura 6.12). Este análisis permite deducir que a pH 7.4 tanto los dos nitrógenos secundarios de la cavidad macrocíclica como el de la cadena central estarían protonados, a este pH uno de los nitrógenos contiguos al antraceno también se encontraría parcialmente protonado.

Referencias

- [1] Woster, P. M.; Casero, R. A. *Polyamine Drug Discovery*. RSC Publishing, **2012**.
- [2] García-España, E.; Díaz, P.; Llinares, J. M.; Bianchi, A. *Coordination Chemistry Reviews*, **2006**, 250(23-24), 2952-2986.
- [3] (a) Sarneski, J. E.; Surprenant, H. L.; Molen, F. K.; Reilley, C. N. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 2116-2124. (b) Dagnall, S. P.; Hague, D. N.; McAdam, M. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 2, 435-440. (c) Dagnall, S. P.; Hague, D. N.; McAdam, M. E. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 2, 1111-1114. (d) Hague, D. N.; Moreton, A. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 2, 265-270. (e) Frassinetti, C.; Ghelli, S.; Gans, P.; Sabatini, A.; Moruzzi, M. S.; Vacca, A. *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 374-382.
- [4] Verdejo, B.; Ferrer, A.; Blasco, S.; Castillo, C. E.; González, J.; Latorre, J.; Mániz, M. A.; García Basallote, M.; Soriano, C.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5707-5719.
- [5] Bencini, A.; Bianchi, A.; García-España, E.; Micheloni, M.; Ramírez, J. A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 188, 97-156.
- [6] Alderighi, L.; Gans, P.; Ienco, A.; Peters, D.; Sabatini, A.; Vacca, A. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311-318.
- [7] Martell, A. E.; R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vols. 1-6, Plenum Press, New York, 1974, 1975, 1977, 1976, 1982, 1989.
- [8] (a) Frassinetti, C.; Alderighi, L.; Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca, A.; Ghellini, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 376, 1041. (b) Sarneski, J. E.; Surprenant, H. L.; Molen, F. K.; Reilley, C. N. *Anal. Chem.* **1975**, 47, 2116. (c) Hague, N.; Moreton, A. D. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1994**, 265.
- [9] Basallote, M. G.; Doménech, A.; Ferrer, A.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Mániz, M. A.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorganica Chim. Acta* **2006**, 359(7), 2004-2014.
- [10] Ten, A. S.; Humbert, N.; Verdejo, B.; Llinares, J. M.; Elhabiri, M.; Jezierska, J.; Soriano, C.; Kozłowski, H.; Albrecht-Gary, A. M.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2009**, 48 (18), 8985-8997.
- [11] Castillo, C. E.; Mániz, M. A.; Basallote, M. G.; Clares, M. P.; Blasco, S.; García-España, E. *Dalt. Trans.* **2012**, 41(18), 5617.
- [12] Mohamadou, A.; Gerard, C. J. *Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 3320-3328.
- [13] Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134(23), 9644-9656.

[14] Inclán, M. *Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas*; Tesis Doctoral; Facultad de ciencias Químicas. Universitat de València, **2016**.

[15] (a) Julliard, M.; Chanon, M. *Chem. Rev.* **1983**, 83, 425-506. (b) de Silva, A. P.; Dayasiri Rupasinghe, R. A. D. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1985**, 1669-1670.

7. Miméticos de la SOD

El interés en el estudio de compuestos de tipo escorpiando como miméticos de la superóxido dismutasa (SOD) nace de las similitudes estructurales detectadas entre los centros activos de las distintas enzimas (figura 7.1) con los entornos de coordinación que generan estos ligandos en algunos de sus complejos metálicos (figura 7.2).[1][2][3][4][5] Por otra parte, la funcionalización de estas estructuras básicas con distintos grupos sustituyentes permite modular el entorno de coordinación de los cationes, así como su grado de saturación coordinativa, para adaptarlo aún más a una función catalítica dada.[6][7][8][9]

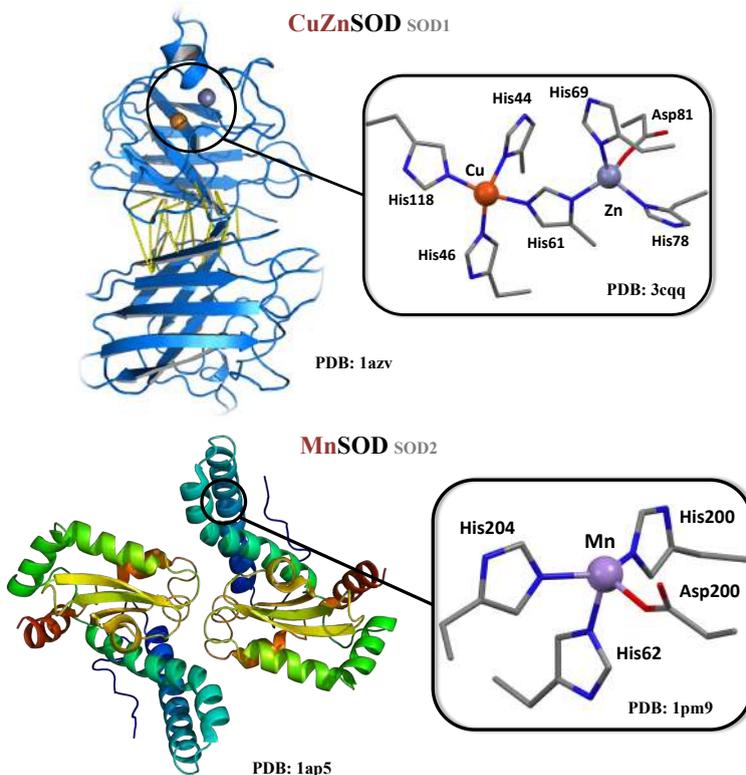


Figura 7.1. Representación de tipo “cartoon” para (arriba) la enzima CuZnSOD citoplasmática (SOD tipo 1) y para (abajo) la enzima MnSOD presente en la mitocondria (SOD tipo 2), junto con los entornos de coordinación. Las esferas de coordinación de los centros metálicos se completan en disolución con una molécula de H₂O.

Los primeros estudios de actividad SOD llevados a cabo en el GQS-UV con complejos metálicos de los derivados de *pytren* dieron lugar a resultados muy prometedores (*Introducción*, Capítulo 1).[3][4][6] Un ejemplo es el complejo de Mn(II) del compuesto 6-[(4-(4-quinolil)-3-azabutil)-3,6,9-triaza-1-(2,6)-piridinacilodecafano], $[Mn(pytren-4Q)]^{2+}$, cuya capacidad para la dismutación catalítica del radical superóxido es una de las más elevadas descritas en la bibliografía ($k_{cat} = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).[6] Hasta la fecha la gran mayoría de compuestos con actividad SOD que se habían desarrollado en el GQS-UV eran derivados del *pytren* y el *pytren-al* (figura 7.2).

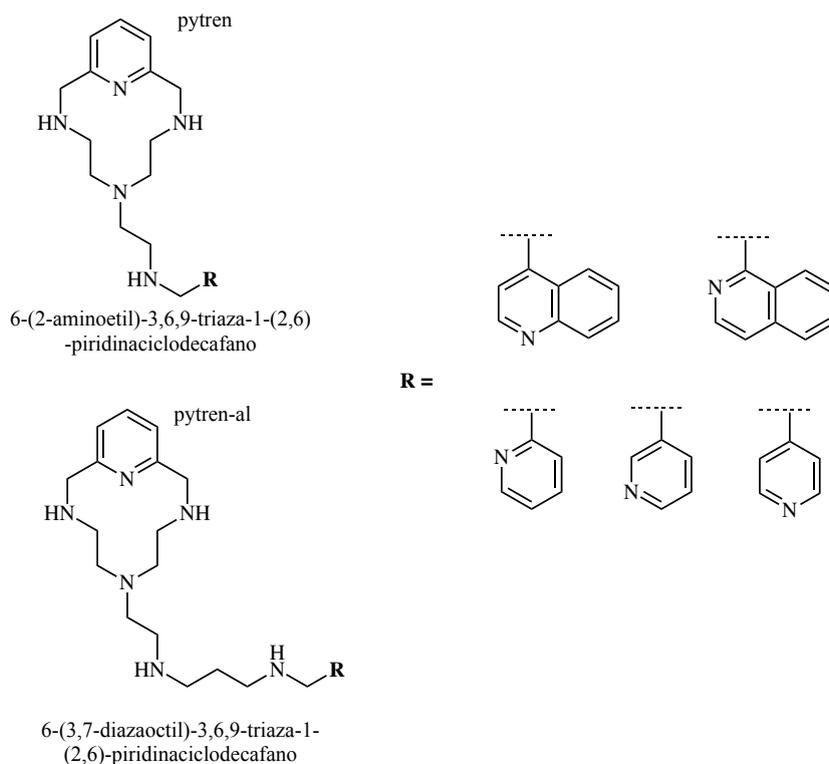


Figura 7.2. Ejemplo de algunos compuestos obtenidos en el GQS-UV cuyos complejos de Cu(II) y Mn(II) presentan actividad SOD.

En la tesis doctoral del Dr. Salvador Blasco se presentaron resultados de la actividad SOD de diversos derivados del *pytren*, junto con los primeros datos sobre la actividad del compuesto alargado *pytren-al* (figura 7.2).[3] El complejo de Cu(II) de este nuevo derivado presentó una actividad similar a los complejos de Mn(II) anteriormente descritos en el GQS-UV ($k_{cat} = 5.2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). A su vez, en la tesis del Dr. Mario Inclán se extiende la familia del *pytren-al* obteniéndose los derivados de piridina y quinolina (figura 7.2), los complejos metálicos de Mn(II) de estos nuevos receptores presentaron resultados SOD prometedores.[4]

A la vista de estos antecedentes, en la presente tesis se procedió a diseñar y sintetizar nuevos derivados del *pytren-al* con el fin de obtener complejos metálicos mono- y binucleares con elevada actividad SOD (figura 7.3), ya que hasta el inicio de la misma los complejos evaluados de esta serie (*pytren* y *pytren-al*) contenían un único centro metálico.

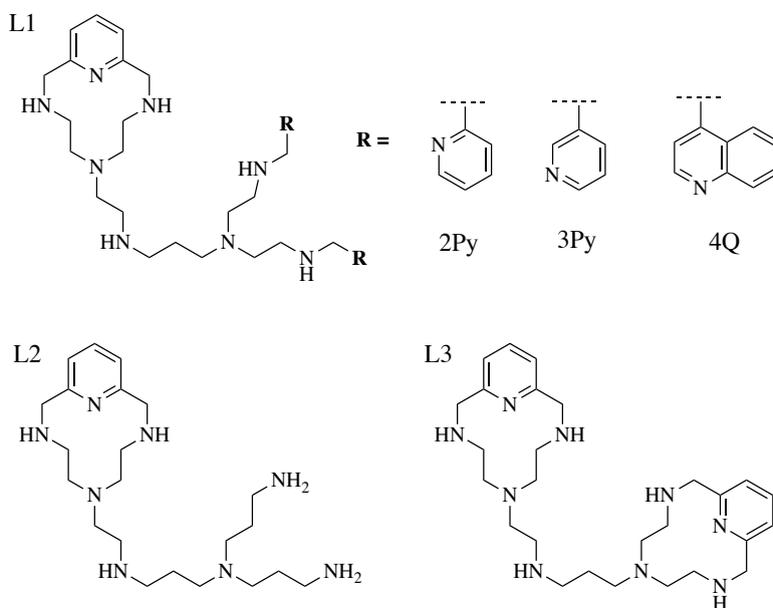


Figura 7.3. Compuestos obtenidos en la tesis para la evaluación de su capacidad para actuar como miméticos de la CuZnSOD y la MnSOD.

Tomando como punto de partida la estructura común de los compuestos descritos en la figura 7.2, se sintetizaron nuevos derivados que preservasen el anillo macrocíclico de piridina y que, a su vez, pudiesen presentar entornos de coordinación adicionales. Como se puede ver en la figura 7.3, las características estructurales de estos ligandos harán que en sus complejos binucleares de Cu(II) y Mn(II) ambos centros metálicos presenten entornos de coordinación diferentes con grados de saturación diversos. Todo ello está enfocado a la modulación controlada de las propiedades electroquímicas así como al control de la accesibilidad del radical superóxido a los centros metálicos, ya que, como se ha mencionado anteriormente, estos factores determinan la capacidad catalítica de los complejos metálicos (*Introducción*, Capítulo 1).

En este capítulo se analiza la formación de complejos tanto homonucleares como binucleares de Cu(II), Zn(II) y Mn(II), así como la de complejos heterobinucleares de Cu(II) y Zn(II) (*Formación de complejos metálicos*, apartado 7.1).

Una vez determinadas qué especies predominan en disolución a pH fisiológico (pH = 7.4), se ha evaluado la toxicidad tanto de los ligandos libres como de los complejos metálicos en la línea celular VERO (*Evaluación de la toxicidad*, apartado 7.2), en colaboración con el grupo de investigación de Biología Molecular perteneciente al Institut de Investigació Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Joan XXIII de la Universidad Rovira i Virgili.

En última instancia se discute la capacidad mimética de superóxido dismutasa (SOD) de los compuestos seleccionados (*Evaluación de la actividad SOD*, apartado 7.3).

7.1. Formación de complejos metálicos

Con el objetivo de facilitar la discusión de los resultados obtenidos se han organizado los compuestos en dos grupos; el primer grupo está compuesto por los ligandos de cadena abierta **L1**, **L2** y por el bismacrocielo **L3** (figura 7.4), mientras que el segundo engloba los ligandos funcionalizados con unidades de piridina **L1-2Py** y **L1-3Py** y el ligando **L1-4Q** que contiene unidades de quinolina (figura 7.30).

El estudio de la formación de complejos metálicos en disolución acuosa se ha llevado a cabo mediante valoraciones potenciométricas y de espectroscopía UV-Vis. Las técnicas de difracción de rayos X y de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDXRF por sus siglas en inglés) han servido para resolver las distintas estructuras cristalinas obtenidas.

7.1.1. Poliaminas **L1**, **L2** y **L3**

Como se ha mencionado anteriormente, **L1** y **L2** presentan un macrociclo de piridina unido por una cadena central a las poliaminas lineales de cadena abierta dietilen-triamino (**L1**) o dipropilen-triamino (**L2**) (figura 7.4). Por otro lado, la poliamina **L3** presenta dos macrociclos de piridina unidos por la misma cadena central. En el presente capítulo se analizará en detalle cómo estas variaciones estructurales afectan a la química de coordinación con los iones metálicos Cu(II), Zn(II) y Mn(II).

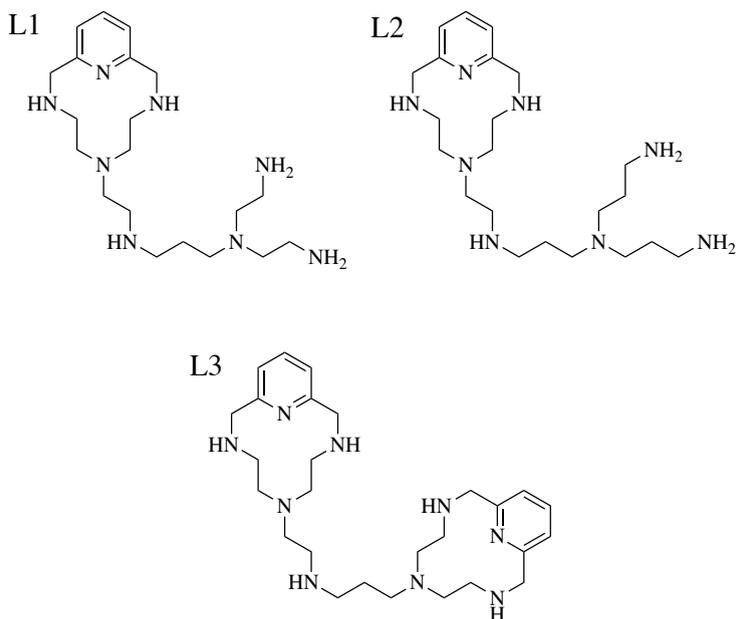


Figura 7.4. Poliaminas **L1**, **L2** y **L3**.

7.1.1.1. Coordinación con Cu(II)

Estudios potenciométricos

En la tabla 7.1 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad obtenidos para la formación de complejos de Cu(II) con **L1**, **L2** y **L3**. Estos valores han sido determinadas mediante valoraciones potenciométricas llevadas a cabo a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M, utilizando relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1.

Tabla 7.1. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos de Cu(II) con **L1**, **L2** y **L3**, determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1	L2	L3
$\text{CuH}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}$ ^a		4.15(2)	
$\text{CuH}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$	4.22(3) ^b	6.06(2)	5.82(8)
$\text{CuHL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	8.29(5)	8.93(3)	8.21(5)
$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	9.94(3)	10.67(4)	9.50(3)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	18.96(5)	19.10(5)	18.23(7)
$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuL}(\text{OH}) + \text{H}$	-11.28(9)	-11.12(8)	-10.5(1)
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	32.31(3)	29.94(3)	33.84(5)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{HL}$			4.76(5)
$\text{CuL} + \text{Cu} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	13.35(7)	10.84(3)	15.61(9)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	-8.74(5)	-9.59(5)	-9.86(5)
$\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}$	-10.53(9)	10.75(6)	-10.6(1)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

A partir de las valoraciones potenciométricas se ha determinado la formación en disolución de especies mononucleares con grados de protonación que varían entre 3 y 0 para **L1** y **L3** y entre 4 y 0 para **L2** (tabla 7.1). En todos los casos se observa la formación de la especie adicional monohidroxilada $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$. A su vez, se ha determinado para los tres ligandos la formación de los complejos binucleares $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$. Para **L3** se observa la formación de la especie adicional $[\text{Cu}_2\text{HL}]^{5+}$ (tabla 7.1).

Tabla 7.2. Comparación de los logaritmos de las constantes de protonación para los ligandos libres y los complejos de Cu(II) con **L1**, **L2** y **L3**.

Equilibrio	L1	L2	L3
$[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$	4.22(3) ^a	6.06(2)	5.82(8)
$\text{H}_4\text{L}^{4+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}^{5+}$	7.36(2)	7.29(1)	7.28(3)
$[\text{CuHL}]^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$	8.29(5)	8.93(3)	8.21(5)
$\text{H}_3\text{L}^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L}^{4+}$	8.54(1)	8.52(1)	8.24(3)
$[\text{CuL}]^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{CuHL}]^{3+}$	9.94(3)	10.67(4)	9.50(3)
$\text{H}_2\text{L}^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^{3+}$	8.99(2)	9.26(1)	8.74(3)

(a) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Un análisis detallado de los valores de las constantes de estabilidad obtenidos para los tres receptores puede aportar información acerca del número de átomos de nitrógeno implicados en la coordinación de los iones metálicos. 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 con la misma carga global, $\text{H}_{(2+x)}\text{L}^{(2+x)+}$, 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 la tabla 7.2 se observa como los valores de las

constantes de protonación de las especies mononucleares $[\text{CuL}]^{2+}$ y $[\text{CuHL}]^{3+}$ son parecidos a los respectivos valores de las constantes de protonación de los receptores libres H_2L^{2+} y H_3L^{3+} , lo que sugiere que al menos dos de los nitrógenos de la poliamina no están implicados en la coordinación del primer ion metálico. Por otro lado, las constantes sucesivas para la protonación de las especies $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ resultan inferiores a los valores previamente obtenidos para H_4L^{4+} , indicando la participación de, al menos, tres de los grupos amino en la coordinación del Cu(II).

Los valores logarítmicos de las constantes de estabilidad de las especies mononucleares $[\text{CuL}]^{2+}$ son similares para los tres ligandos ($\text{Cu}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuL}]^{2+}$; $\log K$: **L1** = 18.96(5), **L2** = 19.10(5) y **L3** = 18.23(7)), lo que sugiere un modo de coordinación similar en todos los casos. Además, las constantes obtenidas para la formación de las especies $[\text{CuL}]^{2+}$ son similares a la del precursor *pytren* ($\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$; $\log K = 20.43(3)$); la resolución de distintas estructuras cristalinas obtenidas para este complejo confirmó que la esfera de coordinación del Cu(II) está compuesta por los cuatro nitrógenos del anillo macrocíclico así como por el grupo amino de la cadena central. [2][3]

Todos estos datos sugieren que en la especie $[\text{CuL}]^{2+}$ el Cu(II) estaría coordinado por los cuatros nitrógenos de la cavidad macrocíclica y por el grupo amino secundario de la cadena central. Así pues, mientras que las dos primeras etapas de protonación en los complejos de **L1** y **L2** involucrarían a grupos amino primarios no coordinados, la tercera etapa de protonación del complejo implicaría probablemente al grupo amino secundario de la cadena lateral que sí que estaría implicado en la coordinación del Cu(II) (figura 7.5). Para **L3** las dos primeras etapas de protonación involucrarían a los dos grupos amino secundarios presentes en la otra cavidad macrocíclica (figura 7.5).

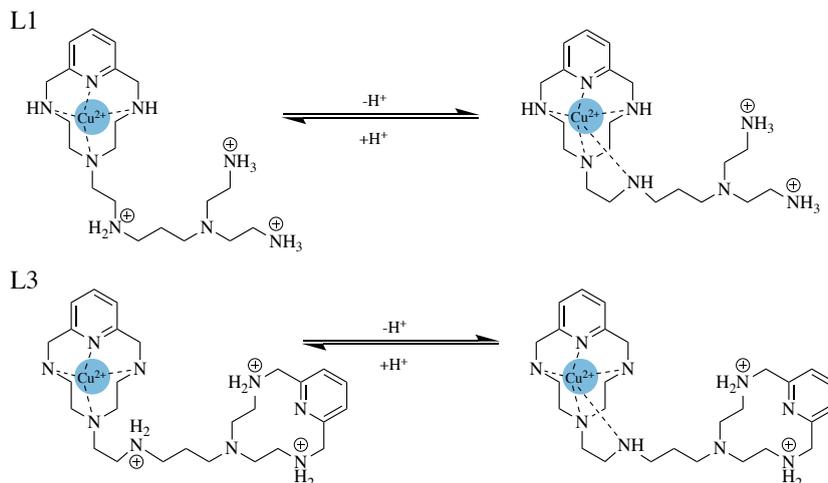


Figura 7.5. Representación del posible modo de coordinación del Cu(II) en las especies $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$ y $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ para **L1** y **L3**.

Por otra parte, en la tabla 7.1 se observa como las constantes de estabilidad sucesivas para las especies binucleares $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ son inferiores a las obtenidas para las correspondientes especies mononucleares ($[\text{CuL}]^{2+} + \text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, $\log K$: **L1** = 13.35(7), **L2** = 10.84(3) y **L3** = 15.61(9)). Esto indica que el entorno de coordinación disponible para el segundo Cu(II) es menos favorable y que, a su vez, no existe ningún fenómeno de cooperatividad entre los centros metálicos. Los constantes de estabilidad para las especies $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ siguen la tendencia **L3** > **L1** > **L2**. Estas variaciones pueden racionalizarse analizando los distintos entornos disponibles para la coordinación del segundo Cu(II). Así pues, en **L3** la presencia de un anillo macrocíclico adicional ofrece un entorno de coordinación altamente favorable para la entrada del segundo átomo de Cu(II). El mayor grado de pre-organización asociado a este tipo de estructuras, conocido como efecto macrocíclico, explicaría el elevado valor de la constante de **L3** respecto a los de **L1** y **L2**. [10][11][12][13][14]

Por otro lado, es conocido que el Cu(II) está coordinado más eficientemente por ligandos que proporcionan secuencias alternadas de

anillos quelato de 5 y 6 miembros que por aquellos que dan lugar a secuencias de anillos quelatos únicamente de 6 miembros.[15][16] Este fenómeno se ha observado para distintas aminas tripodales; por ejemplo, el valor bibliográfico encontrado para la formación del complejo $[\text{CuL}]^{2+}$ de la poliamina tris(2-aminoetil)amina es 5 ordenes de magnitud superior al determinado para la poliamina tris(3-aminopropil)amina, $\log K = 18.8(3)$ y $\log K = 13.12(2)$ respectivamente.[17] Este tipo de análisis permitiría interpretar la diferencia de casi tres órdenes de magnitud entre el valor de la constante de estabilidad determinada para **L1** respecto a **L2**, ($[\text{CuL}]^{2+} + \text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, $\log K$: **L1** = 13.35(7) y **L2** = 10.84(3)).

El bajo valor de las constante de protonación obtenido para la especie binuclear $[\text{Cu}_2\text{L3}]^{5+}$ parece indicar que en ésta todos los nitrógenos participan en la coordinación de los dos centros metálicos (tabla 7.1). Para **L1** y **L2** no se ha detectado la formación de las especies binucleares protonadas $[\text{Cu}_2\text{HL}]^{5+}$.

En la figura 7.6 se presentan los diagramas de distribución calculados para relaciones molares Cu(II):L 1:1. Tanto para **L1** como para **L2** se observa la presencia mayoritaria en disolución de especies mononucleares con grados de protonación varios en todo el intervalo de pH estudiado. Sin embargo, el elevado valor de la constante de estabilidad determinada para la $[\text{Cu}_2\text{L}_3]^{3+}$ ($[\text{CuL}]^{2+} + \text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, $\log K = 15.61(9)$) hace que las especies mononucleares y binucleares coexistan en un amplio intervalo de pH incluso a relaciones molares Cu(II):**L3** 1:1.

La poca tendencia de los complejos mononucleares a hidrolizarse ($[\text{CuL}]^{2+} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuL}(\text{OH})]^+ + \text{H}^+$, $\log K$: **L1** = -11.28(9), **L2** = -11.12(8) y **L3** = -10.5(1)) se traduce en que las especies hidroxiladas sólo se formen a valores de pH muy elevados (figura 7.6).

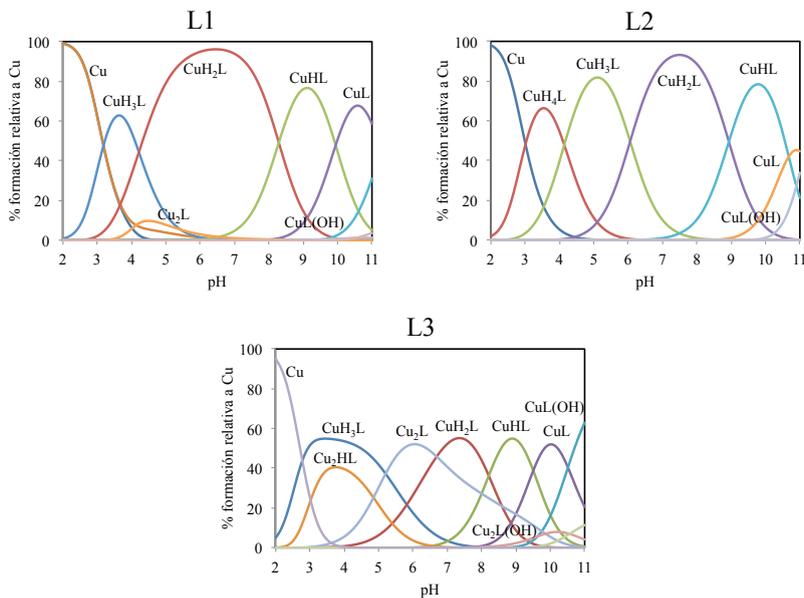


Figura 7.6. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para **L1**, **L2** y **L3**. Calculados para relaciones molares Cu(II):L 1:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

Los diagramas de distribución obtenidos para relaciones Cu(II):L 2:1 se muestran en la figura 7.7. En este caso, para **L1** se observa como las especies binucleares predominan a valores de pH superiores a 4, mientras que para **L2** éstas predominan a valores de pH por encima de 6. Así pues, el valor de la constante de estabilidad relativamente bajo obtenido para $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$ ($\log K = 10.84(3)$) se traduce en un predominio de las especies mononucleares a pH ácido (figura 7.7). Por otro lado, para **L3** las especies binucleares predominan en casi todo el intervalo de pH estudiado.

Cabe destacar que la tendencia de los complejos binucleares a formar especies hidroxiladas es mucho más elevada que la de los complejos mononucleares, formándose ya estas especies a valores de pH relativamente bajos (figura 7.7). Este hecho se explica teniendo en cuenta la insaturación coordinativa del segundo centro metálico.

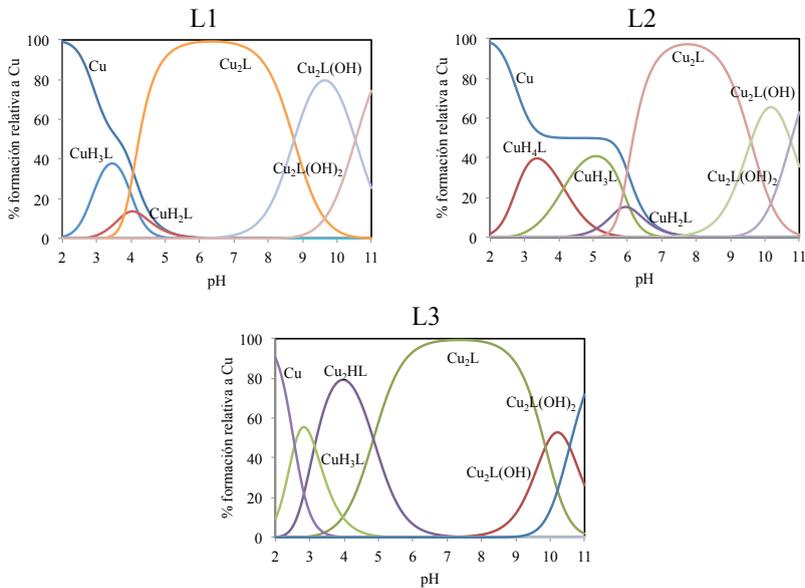


Figura 7.7. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para **L1**, **L2** y **L3**. Calculados para relaciones molares Cu(II):L 2:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

Estudios UV-Vis y de difracción de rayos X

La presencia de anillos de piridina, cuya banda característica de absorción se centra sobre los 260 nm, permite monitorizar la formación de especies en disolución mediante espectroscopía UV-Vis. Por otro lado, al llevar a cabo las valoraciones en presencia de Cu(II) se observa la aparición de una banda de absorción en la región visible del espectro electromagnético, debida transiciones electrónicas entre los orbitales *d* del cobre.[18]

La superposición de los valores de absorción de los máximos de estas bandas, obtenidos para cada valor de pH, con los correspondientes diagramas de distribución permite asociar estas variaciones a etapas de coordinación y protonación específicas. Todo ello proporciona una herramienta de elevada utilidad para evaluar posibles cambios en los entornos de coordinación del ion metálico en función del pH.

Poliamina L1

Como se puede observar en la figura 7.8, la formación del complejo $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$ viene acompañada de un rápido aumento de la absorbancia de la piridina, que alcanza una meseta para luego seguir aumentando a medida que se forma la especie $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$. La formación de las especies con menor grado de protonación $[\text{CuHL}]^{3+}$ y $[\text{CuL}]^{2+}$ no conllevan, sin embargo, aumentos adicionales de absorbancia.

El análisis de estos datos espectroscópicos, junto con los valores de las constantes de formación de los complejos mononucleares discutidas en el apartado anterior, sugieren que el Cu(II) en la especie $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$ está coordinado al anillo macrocíclico y que la posterior desprotonación del nitrógeno secundario de la cadena lateral haría que éste pasase a formar parte de la esfera de coordinación del metal en la especie $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ (figura 7.5). Por otro lado, las dos siguientes etapas de desprotonación ya no implicarían la participación de más grupos amino en la coordinación (figura 7.9).

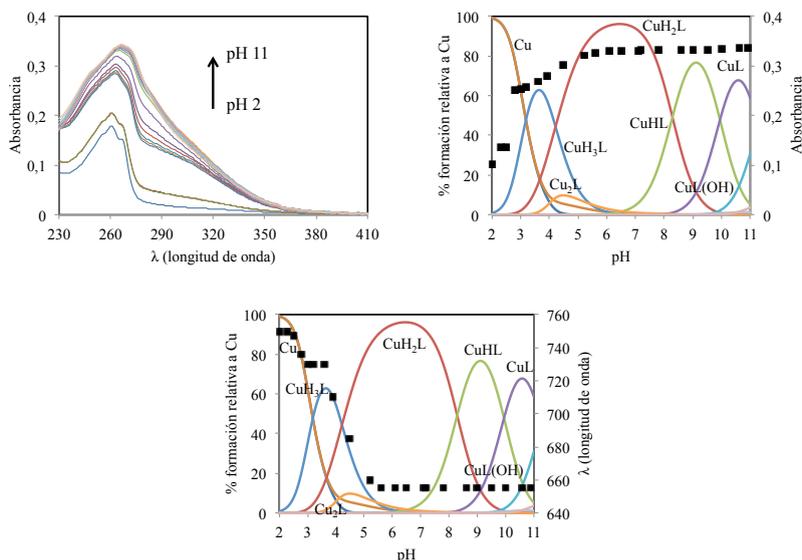


Figura 7.8. (Arriba, izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1 1:1 a distintos valores de pH. (Arriba, derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L1 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 270 nm. (Abajo) Diagrama de distribución para el sistema Cu(II):L1 1:1 junto a la variación en el máximo de absorbancia de la banda d-d. $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

La monitorización de la banda de transición *d-d* del Cu(II) corrobora la interpretación anterior. En la Figura 7.8 se representa la variación en la longitud de onda del máximo de la banda *d-d* observada, la cual muestra un desplazamiento hipsocrómico a medida que se forman la especie $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$, alcanzando el máximo desplazamiento para la especie $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$; como en el caso anterior la formación de las especies con menor grado de protonación no producen cambios posteriores.

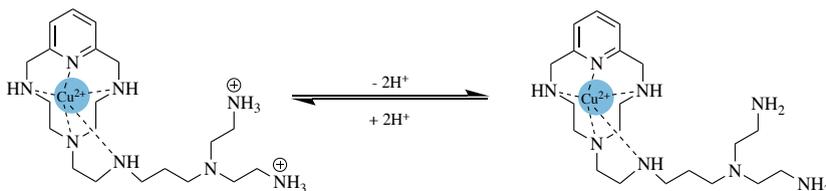


Figura 7.9. Representación del posible modo de coordinación de Cu(II) en las especies $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ y $[\text{CuL}]^{2+}$ para L1.

Por otro lado, para el sistema Cu(II):L1 en relación molar 2:1, para la cual predominan las especies binucleares a valores de pH superiores a 4, se observa cómo la formación del complejo $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ viene acompañada de un aumento tanto de la absorbancia de la piridina (figura 7.10) como de la banda de transición *d-d* del Cu(II) (figura 7.11). En la especie $[\text{Cu}_2\text{L1}]^{4+}$ el segundo Cu(II) se encontraría coordinado por, como mínimo, los dos nitrógenos primarios y el nitrógeno terciario de la cadena central, no pudiéndose descartar alguna reorganización de la esfera de coordinación del primer ión metálico al producirse la coordinación del segundo Cu(II).

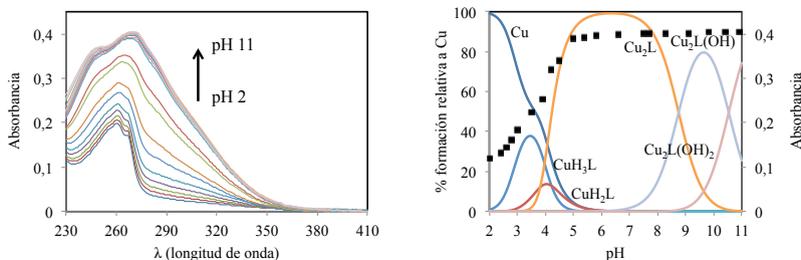


Figura 7.10. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L1 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 270 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

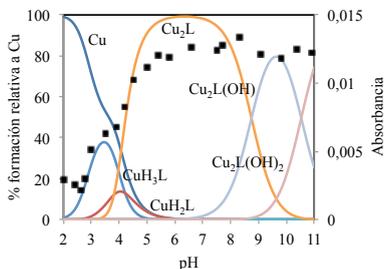


Figura 7.11. Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L1 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 645 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Poliamina L2

Cabe recordar que, al contrario que para L1 y L3, para este sistema se identificó también una especie mononuclear adicional de estequiometría $[\text{CuH}_4\text{L2}]^{6+}$. Este hecho está en concordancia con que en el ligando libre también se observa una etapa adicional de protonación la cual ha sido asociada a la protonación del nitrógeno terciario de la cadena central. Como puede observarse en la figura 7.12, tanto la formación del complejo $[\text{CuH}_4\text{L2}]^{6+}$ como la del complejo $[\text{CuH}_3\text{L2}]^{5+}$ vienen acompañadas de un aumento en absorción de la banda de la piridina. Por otra parte las etapas sucesivas de desprotonación del complejo ya no producen cambios en el espectro de absorción. En lo que respecta a la banda *d-d*, se observa un desplazamiento hipsocrómico hasta que se forma la especie mononuclear diprotonada. Análogamente al caso anterior, estas evidencias experimentales se pueden interpretar considerando que en la especie $[\text{CuH}_4\text{L2}]^{6+}$ el ion metálico se une en principio a los nitrógenos del anillo macrocíclico, para posteriormente incorporar en su esfera de coordinación al nitrógeno secundario de la cadena central en $[\text{CuH}_3\text{L2}]^{5+}$; quedando los restantes nitrógenos no coordinados y teniendo, por lo tanto, una gran tendencia a protonarse en medios ligeramente ácidos.

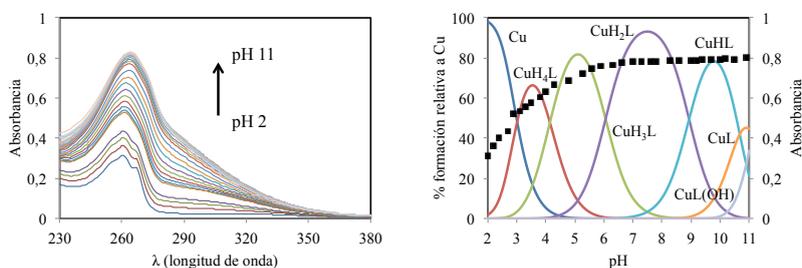


Figura 7.12. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L2 1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L2 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Como se ha descrito anteriormente, para relaciones molares Cu(II):L2 2:1 no se forman especies binucleares hasta que se alcanzan valores de pH neutros. En la figura 7.13 se observa como la formación de las especies mononucleares viene acompañada de un incremento de la absorbancia de la piridina, mientras que la formación de las especies binucleares da lugar a un aumento brusco atribuible a la coordinación del segundo metal. En la especie $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$ el segundo Cu(II) se encontraría coordinado por, como mínimo, los dos nitrógenos primarios y el nitrógeno terciario de la cadena central, no pudiéndose descartar alguna reorganización de la esfera de coordinación del primer ión metálico al producirse la coordinación del segundo Cu(II).

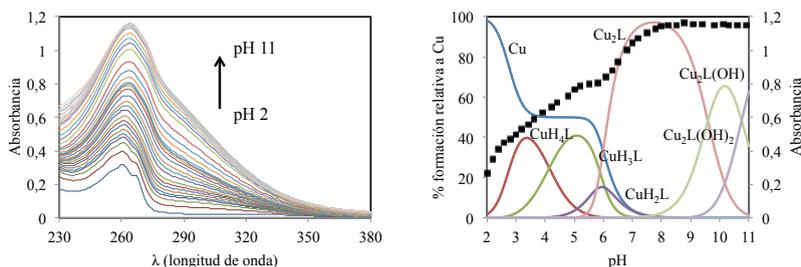


Figura 7.13. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L2 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L2 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 264 nm, $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Poliamina L3

Como se ha comentado al inicio del apartado, en el caso del sistema Cu(II):L3 para relaciones molares 1:1 se observa tanto la formación de complejos mononucleares como binucleares en disolución (figura 7.6), lo que dificulta el análisis de este sistema. Por ello, en este caso la discusión se limitará a relaciones molares Cu(II):L3 2:1, en las que sólo predominan las especies binucleares.

En la figura 7.14 se observa un incremento progresivo de la absorbancia de las piridinas hasta que la especie binuclear $[\text{Cu}_2\text{L}_3]^{4+}$ predomina en disolución. Lo que sugiere la participación del nitrógeno central en la coordinación de uno de los dos Cu(II).

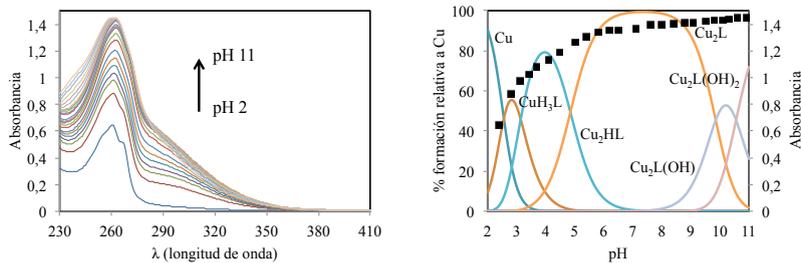


Figura 7.14. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L3 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L3 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

En este sistema, la evaporación lenta de una disolución acuosa que contenía $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y **L3** en relación molar M:L 2:1 y a pH 4.2 condujo a la obtención de monocristales de color azul del complejo $[\text{Cu}_2(\text{HL3})\text{Br}_2](\text{ClO}_4)_3$. La resolución estructural mediante difracción de rayos X de estos cristales ha permitido describir de forma unívoca la estructura del compuesto (figura 7.15).

En la tabla 7.3 se recogen las distancias y los ángulos de enlace de los átomos implicados en la coordinación de cada uno de los iones presentes en el complejo. Los parámetros experimentales se recogen en el anexo 3 (*Datos cristalográficos*).

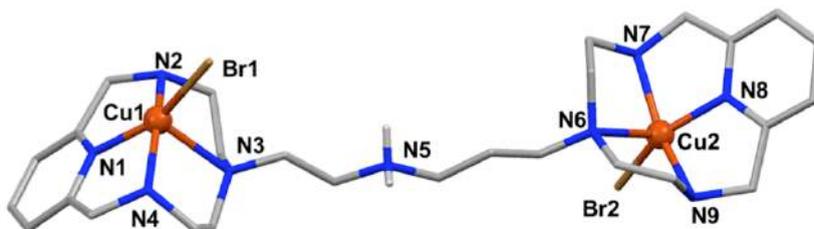


Figura 7.15. Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2\text{HL3Br}_2]^{5+}$. Los átomos de hidrógeno y los iones perclorato han sido omitidos.

Tal y como se muestra en la figura 7.15, el Cu1 se dispone en el centro de una de las cavidades macrocíclicas, adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada axialmente alargada ($\tau = 0.01$). El plano ecuatorial lo definen los átomos de nitrógeno del anillo de la piridina (N1 1.943(5) Å), los dos átomos adyacentes al anillo (N2, 2.054(5) Å y N4, 2.065(5) Å) y un ion bromuro (Br1, 2.3734(10) Å). La posición axial la ocupa el nitrógeno terciario presente en el anillo macrocíclico (N3, 2.287(6) Å).

En el caso del Cu2, éste se dispone en el centro de la otra cavidad macrocíclica adoptando una conformación análoga a la observada para el Cu1 ($\tau = 0.14$). El plano ecuatorial está formado por el nitrógeno de la piridina (N8, 1.930(6) Å), los dos nitrógenos contiguos al mismo (N7, 2.047(6) Å y N9, 2.043(6) Å) y otro ion bromuro (Br2, 2.3734(10) Å). La esfera de coordinación se completa con la posición axial ocupada por el nitrógeno (N6, 2.201(5) Å). En esta estructura se observa como el nitrógeno de la cadena central se encuentra protonado, por lo que éste no se encuentra disponible para la coordinación de ninguno de los dos átomos de Cu(II).

Tabla 7.3. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para el catión $[\text{Cu}_2\text{HL3Br}_2]^{3+}$.

Cu1—Br1	2.3734 (10) ^a	N1—Cu1—Br1	158.53 (15)
Cu1—N1	1.943 (5)	N1—Cu1—N2	82.1 (2)
Cu1—N2	2.054 (5)	N1—Cu1—N4	81.9 (2)
Cu1—N4	2.065 (5)	N1—Cu1—N3	101.0 (2)
Cu1—N3	2.287 (6)	N2—Cu1—Br1	100.98 (16)
Cu2—Br2	2.4086 (11)	N2—Cu1—N4	158.2 (2)
Cu2—N8	1.930 (6)	N2—Cu1—N3	85.0 (2)
Cu2—N6	2.201 (5)	N4—Cu1—Br1	99.33 (16)
Cu2—N9	2.043 (6)	N4—Cu1—N3	83.8 (2)
Cu2—N7	2.047 (6)	N3—Cu1—Br1	100.41 (15)
		N8—Cu2—Br2	146.66 (16)
		N8—Cu2—N6	110.1 (2)
		N8—Cu2—N9	81.4 (2)
		N8—Cu2—N7	81.0 (3)
		N6—Cu2—Br2	103.24 (15)
		N9—Cu2—Br2	102.8 (2)
		N9—Cu2—N6	84.8 (2)
		N9—Cu2—N7	155.0 (3)
		N7—Cu2—Br2	101.7 (2)
		N7—Cu2—N6	84.7 (2)

(a) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Paralelamente, la evaporación lenta de una disolución acuosa que contenía $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y **L3** en relación molar M:L 2:1 y a pH 7.4 condujo a la obtención monocristales del complejo $[\text{Cu}_2\text{L3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$ (figura 7.16). En la tabla 7.4 se recogen las distancias y los ángulos de enlace de los átomos implicados en la coordinación del Cu1 y el Cu2. Los parámetros experimentales se recogen en el anexo 3 (*Datos cristalográficos*).

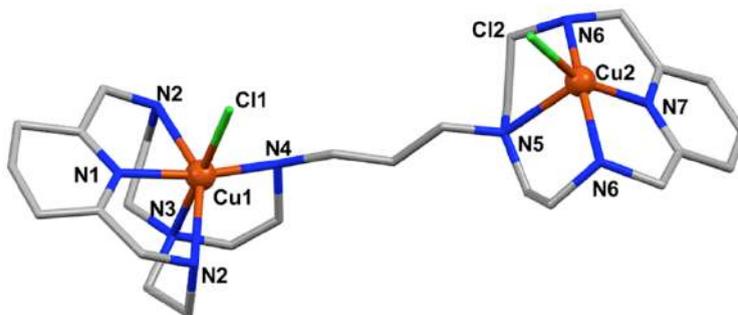


Figura 7.16. Estructura cristalina del catión $[\text{Cu}_2\text{L3Cl}_2]^{2+}$. Los átomos de hidrógeno y los iones perclorato han sido omitidos.

Tal y como se muestra en la figura 7.16, el Cu1 se dispone en el centro de una de las cavidades macrocíclicas adoptando una geometría octaédrica. El plano ecuatorial viene definido por el nitrógeno del anillo de la piridina (N1, 1.934(1) Å), el nitrógeno terciario (N3, 2.183(15) Å), el nitrógeno de la cadena central (N4, 2.050(15) Å) y un ion cloruro (Cl1, 2.376(4) Å). Mientras que las posiciones axiales se completan con los dos nitrógenos equivalentes adyacentes al anillo de piridina (N2, 2.29(2) Å).

El segundo átomo metálico, Cu2, adopta una geometría de tipo pirámide de base cuadrada axialmente alargada ($\tau = 0.01$). En este caso las posiciones ecuatoriales vienen definidas por el nitrógeno del anillo de la piridina (N7, 1.960(13) Å), los dos nitrógenos equivalentes contiguos a la piridina (N6, 2.022(13) Å) y el ion cloruro (Cl2, 2.256(4) Å). La esfera de coordinación se completa con el nitrógeno terciario de la cavidad macrocíclica (N5, 2.283(12) Å), el cual ocupa la posición axial alargada.

Tabla 7.4. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para el catión $[\text{Cu}_2\text{L}_3\text{Cl}_2]^{2+}$.

Cu1—N1	1.934(14) ^a	N1—Cu1—Cl1	89.0 (4)
Cu1—N2 ⁱ	2.29(2)	N1—Cu1—N3	90.1 (6)
Cu1—N2	2.29(2)	N1—Cu1—N4	164.4 (5)
Cu1—N3	2.183(15)	N1—Cu1—N4 ⁱ	164.4 (5)
Cu1—N4 ⁱ	2.050(15)	N1—Cu1—N2 ⁱ	78.1 (5)
Cu1—N4	2.050(15)	N1—Cu1—N2	78.1 (5)
Cu1—Cl1	2.376(4)	N3—Cu1—Cl1	179.1 (4)
Cu2—Cl2	2.256(4)	N3—Cu1—N2	80.5 (4)
Cu2—N5	2.283(12)	N3—Cu1—N2 ⁱ	80.5 (4)
Cu2—N6 ⁱ	2.022(13)	N4—Cu1—Cl1	96.3 (4)
Cu2—N6	2.022(13)	N4 ⁱ —Cu1—Cl1	96.3 (4)
Cu2—N7	1.960(13)	N4—Cu1—N3	84.5 (6)
		N4 ⁱ —Cu1—N3	84.5 (6)
		N4—Cu1—N4 ⁱ	29.2 (9)
		N4 ⁱ —Cu1—N2 ⁱ	115.2 (7)
		N4 ⁱ —Cu1—N2	86.5 (7)
		N4—Cu1—N2 ⁱ	86.5 (7)
		N4—Cu1—N2	115.2 (7)
		N2 ⁱ —Cu1—Cl1	99.3 (4)
		N2—Cu1—Cl1	99.3 (4)
		N2 ⁱ —Cu1—N2	149.4 (8)
		Cl2—Cu2—N5	101.4 (3)
		N6—Cu2—Cl2	100.5 (3)
		N6 ⁱ —Cu2—Cl2	100.5 (3)
		N6 ⁱ —Cu2—N5	84.4 (3)
		N6—Cu2—N5	84.4 (3)
		N6—Cu2—N6 ⁱ	157.8 (5)
		N7—Cu2—Cl2	158.5 (4)
		N7—Cu2—N5	100.1 (5)
		N7—Cu2—N6	81.6 (3)
		N7—Cu2—N6 ⁱ	81.6 (3)

(a) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Las geometrías de coordinación que presentan los Cu(II) en ambas estructuras son las habituales en compuestos con cavidades macrocíclicas basadas en anillos de piridina, pudiéndose observar analogías entre los complejos descritos en esta tesis y aquellos previamente obtenidos con los derivados *pytren* y *pytren-al*. [3] Así pues, se han identificado y descrito dos de las geometrías de coordinación típicas de Cu(II): geometrías de tipo pirámide de base cuadrada, en la cual el Cu(II) se encuentra coordinado por cinco átomos (cuatro definiendo un plano y una posición axial con una distancia de enlace mayor) y geometrías de tipo octaédrico, en la que el Cu(II) se encuentra coordinado por seis átomos (cuatro definiendo un plano y dos posiciones axiales con distancias de enlace mayores) (figura 7.17)

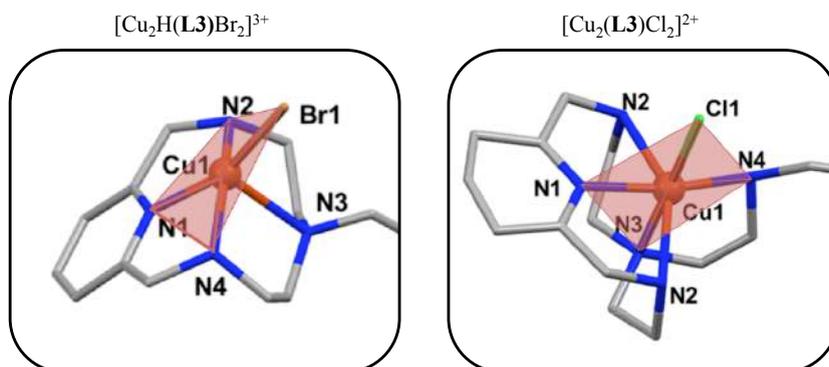


Figura 7.17. Entornos de coordinación del Cu(II) presentes en las distintas estructuras cristalinas analizadas, en rojo los planos ecuatoriales definidos para cada una de las geometrías de coordinación.

Por otro lado, una vez analizadas ambas estructuras cristalinas se deduce el rol activo del nitrógeno de la cadena central, pudiendo éste formar parte, o no, en la coordinación de uno de los centros metálicos en función del pH (figura 7.18). Todo ello apoya las conclusiones anteriormente extraídas a partir de las valoraciones potenciométricas y UV-Vis.

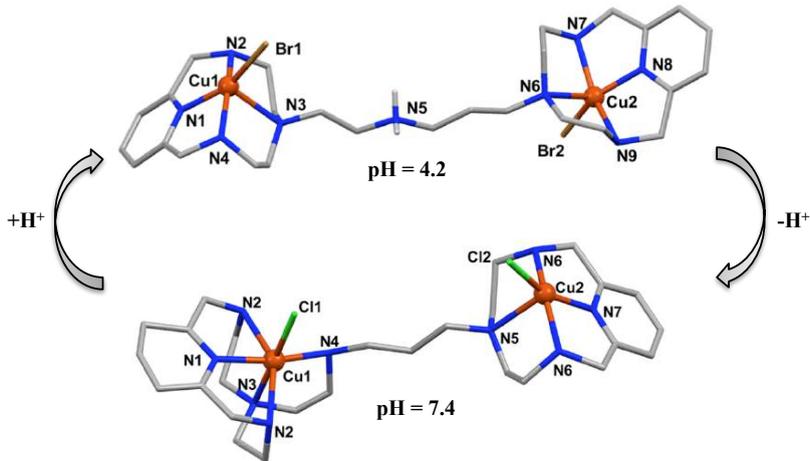


Figura 7.18. Variaciones en las geometrías de coordinación de los complejos $[\text{Cu}_2\text{HL}_3\text{Br}_2]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}_3\text{Cl}_2]^{4+}$, obtenidos a distintos valores de pH.

7.1.1.2. Coordinación con Mn(II)

En la tabla 7.5 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad obtenidos para la formación de complejos de Mn(II) con **L1**, **L2** y **L3** (figura 7.19). Estos valores han sido determinados mediante valoraciones potenciométricas a temperatura de 298 ± 0.1 K y utilizando NaCl 0.15 M como fuerza iónica. Las relaciones molares Mn(II):L utilizadas variaron entre 1:1 y 2:1.

Cabe destacar que aun siendo la estabilidad de los complejos de Mn(II) menor en todos los casos que la de los correspondientes complejos de Cu(II) (*Coordinación con Cu(II)*, apartado 7.1.1.1.), los valores obtenidos son suficientemente elevados como para considerar que los complejos formados predominan en un amplio intervalo de pH.

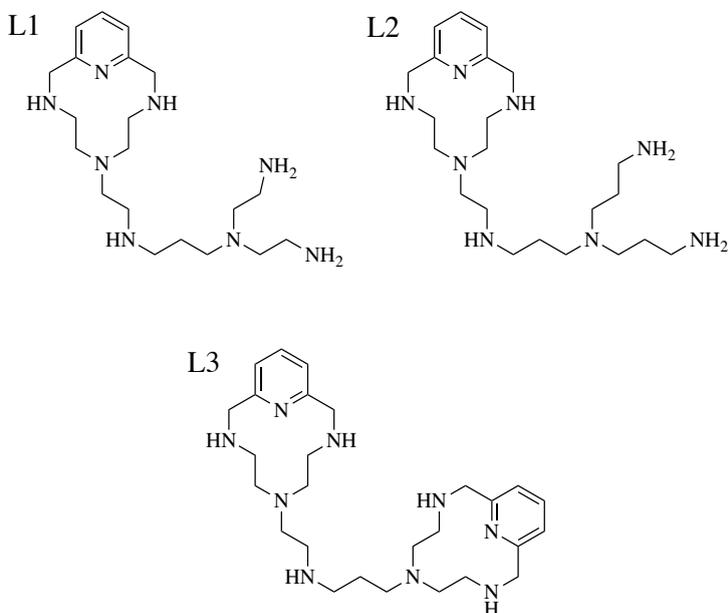


Figura 7.19. Poliaminas L1, L2 y L3.

Al llevar a cabo los experimentos en relación Mn(II):L 1:1 se ha determinado la formación de complejos mononucleares con grados de protonación que varían entre 2 y 0. Para **L1** y **L2** también se ha detectado la formación adicional de la especie $[\text{MnH}_3\text{L}]^{5+}$. Por otro lado, en el caso de los sistemas Mn(II):**L1** y Mn(II):**L3** se observa la formación de la especie monohidroxilada $[\text{MnL}(\text{OH})]^+$.

Al llevar a cabo los experimentos en relación molar Mn(II):L 2:1, mientras que con **L1** y **L2** sólo se detecta la formación de especies mononucleares, en el caso de **L3** se ha determinado la formación de la especie binuclear $[\text{Mn}_2\text{L}]^{4+}$, así como la de las especies hidroxiladas $[\text{Mn}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Mn}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$.

Tabla 7.5. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos de Mn(II) de **L1**, **L2** y **L3**, determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1	L2	L3
$\text{MnH}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{MnH}_3\text{L}^{\text{a}}$	6.67(5) ^b	6.82(2)	
$\text{MnHL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{MnH}_2\text{L}$	9.21(6)	9.16(2)	8.13(5)
$\text{MnL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{MnHL}$	9.33(5)	10.50(3)	10.06(9)
$\text{Mn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{MnL}$	9.33(4)	9.99(4)	9.2(1)
$\text{MnL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{MnL}(\text{OH}) + \text{H}$	-10.10(6)		-9.3(1)
$2\text{Mn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Mn}_2\text{L}$			16.38(2)
$\text{MnL} + \text{Mn} \rightleftharpoons \text{Mn}_2\text{L}$			7.2(1)
$\text{Mn}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Mn}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$			-9.30(5)
$\text{Mn}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Mn}_2\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}$			-9.99(7)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Los valores de las constantes de estabilidad de las especies mononucleares $[\text{MnL}]^{2+}$ son, para los tres sistemas, del mismo orden de magnitud ($\text{Mn}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{MnL}]^{2+}$; $\log K$: **L1** = 9.33(4), **L2** =9.99(4) y **L3** = 9.2(1)), lo que indica un modo de coordinación similar. Por otro lado, éstos valores son ligeramente inferiores al valor obtenido para el correspondiente complejo del precursor *pytren-al* ($\text{Mn}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{MnL}]^{2+}$, $\log K = 10.93(2)$); la resolución de una estructura cristalina de dicho complejo evidenció que la coordinación del átomo de Mn(II) se producía por los cuatro nitrógenos del anillo macrocíclico así como por el nitrógeno secundario y el terciario presentes en la cadena lateral.[3]

Tabla 7.6. Comparación de los logaritmos de las constantes de protonación para los ligandos libres y los complejos de Mn(II) con **L1**, **L2** y **L3**.

Equilibrio	L1	L2	L3
$[\text{MnHL}]^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{MnH}_2\text{L}]^{4+}$	9.21(6)	9.16(2)	8.13(5)
$\text{H}_3\text{L}^{3+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L}^{4+}$	8.54(1)	8.52(1)	8.24(3)
$[\text{MnL}]^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{MnHL}]^{3+}$	9.33(5)	10.50(3)	10.06(9)
$\text{H}_2\text{L}^{2+} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}^{3+}$	8.99(2)	9.26(1)	8.74(3)

(a) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Como se observa en la tabla 7.6, los valores de las constantes de protonación de las especies $[\text{MnL}]^{2+}$ y $[\text{MnHL}]^{3+}$ son parecidos a los obtenidos para los receptores libres H_2L^{2+} y H_3L^{3+} , lo que sugiere que al menos dos de los nitrógenos de la poliamina no están implicados en la coordinación del ion metálico.

Los diagramas de distribución obtenidos para relaciones Mn(II):L 1:1 se presentan en la figura 7.20. Para los tres ligandos estudiados no se observa la formación de complejos metálicos hasta valores de pH = 6, siendo en todos los casos $[\text{MnH}_2\text{L}]^{4+}$ la especie predominante en disolución a pH fisiológico.

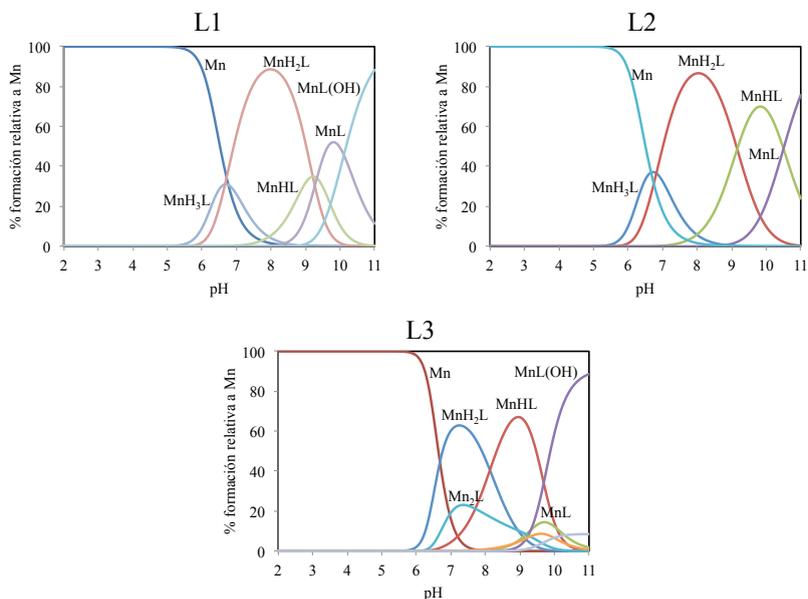


Figura 7.20. Diagramas de distribución de los sistemas Mn(II):L para **L1**, **L2** y **L3**. Calculados para relaciones molares Mn(II):L 1:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

Por otro lado, la presencia de un anillo macrocíclico adicional en **L3** posibilita la coordinación de un segundo Mn(II). El valor para la formación de la especie binuclear $[\text{Mn}_2\text{L}]^{4+}$ ($[\text{MnL}]^{2+} + \text{Mn}^{2+} \rightleftharpoons [\text{Mn}_2\text{L}]^{4+}$, $\log K = 7.2(1)$) resulta dos órdenes de magnitud inferior al correspondiente para la formación de la especie mononuclear $[\text{MnL}]^{2+}$ ($\log K = 9.2(1)$), pudiéndose explicar dicha variación teniendo en cuenta las diferencias en los entornos de coordinación disponibles para ambos Mn(II). Así pues, al igual que lo descrito anteriormente para $[\text{Cu}_2\text{L3}]^{4+}$, mientras que uno de los Mn(II)

presentaría un entorno de coordinación compuesto por los cuatro nitrógenos de la cavidad macrocíclica y el nitrógeno de la cadena central, el segundo Mn(II) estaría coordinado por los cuatro átomos de nitrógeno del otro macrociclo de piridina.

En la figura 7.21 se presenta el diagrama de distribución obtenido para relaciones molares Mn(II):L3 2:1. Al igual que lo observado para los complejos mononucleares, las especies binucleares no se forman hasta valores de pH superiores a 6. Por otro lado, cabe destacar que la insaturación coordinativa del segundo centro metálico conduce a la formación de especies hidroxiladas a valores de pH relativamente bajos.

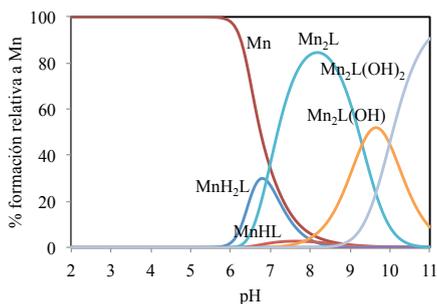


Figura 7.21. Diagrama de distribución para el sistema Mn(II):L3. Calculado para relación molar Mn(II):L 2:1. [L] = 10⁻³ M. Cargas omitidas.

7.1.1.3. Formación de complejos mixtos Cu(II)-Zn(II)

Como paso previo para el estudio de los sistemas heterobinucleares Cu(II)-Zn(II) se ha investigado la formación de complejos de Zn(II) con **L1**, **L2** y **L3** (figura 7.22). Posteriormente se procedió a evaluar la capacidad de los distintos ligandos para formar complejos heterobinucleares mediante valoraciones potenciométricas y de espectroscopía UV-Vis. Las técnicas de difracción de rayos X y de fluorescencia de rayos X por energía dispersiva (EDXRF) han servido para resolver las estructuras cristalinas obtenidas.

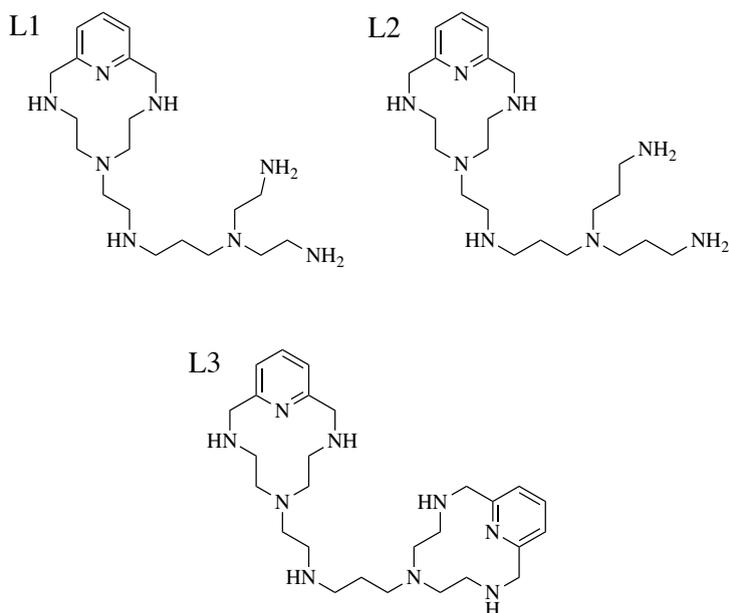


Figura 7.22. Poliaminas **L1**, **L2** y **L3**.

Coordinación con Zn(II)

En la tabla 7.7 se presentan los valores de las constantes de estabilidad obtenidos para la formación de complejos de Zn(II) con **L1**, **L2** y **L3**. Estos valores han sido determinadas mediante valoraciones potenciométricas llevadas a cabo a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M, utilizando relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1.

En los diagramas de distribución presentados en las figuras 7.23 y 7.24 se observa cómo, en función de la relación molar utilizada, se produce la formación de especies bien mononucleares o binucleares en disolución a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado.

Tabla 7.7. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos de Zn(II) con **L1**, **L2** y **L3**, determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1	L2	L3
$ZnH_3L + H \rightleftharpoons ZnH_4L^a$		4.85(2)	
$ZnH_2L + H \rightleftharpoons ZnH_3L$	5.36(1) ^b	6.49(3)	
$ZnHL + H \rightleftharpoons ZnH_2L$	8.44(3)	9.07(5)	8.35(5)
$ZnL + H \rightleftharpoons ZnHL$	9.80(6)	10.67(6)	9.68(5)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnL$	15.99(6)	16.23(7)	17.23(7)
$ZnL + H_2O \rightleftharpoons ZnL(OH) + H$	-10.72(7)	-10.72(6)	-10.29(9)
$2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2L$	23.88(4)		28.93(3)
$ZnL + Zn \rightleftharpoons Zn_2L$	7.89(5)		11.70(8)
$Zn_2L + H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH) + H$	-8.77(5)		-8.76(7)
$Zn_2L(OH) + H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH)_2 + H$	-11.11(8)		-10.0(1)
$2Zn + L + H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH) + H$	15.10(5)	15.24(5)	20.17(5)
$2Zn + L + 2H_2O \rightleftharpoons Zn_2L(OH)_2 + 2H$	3.99(8)	5.6(1)	10.19(6)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Al llevar a cabo las valoraciones utilizando relaciones molares Zn(II):L 1:1 se ha determinado la formación de especies mononucleares con grados de protonación que varían entre 3 y 0 para **L1**, entre 4 y 0 para **L2** y

entre 2 y 0 en el caso de **L3**. A su vez, se ha detectado en todos los casos la formación de la especie adicional monohidroxilada $[\text{ZnL}(\text{OH})]^+$.

Los valores logarítmicos de las constantes de estabilidad obtenidos para la formación de las especies mononucleares $[\text{ZnL}]^{2+}$ resultan similares ($\text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{ZnL}$; $\log K$: **L1** = 15.99(6), **L2** = 16.23(7) y **L3** = 17.23(7)), lo que indica un modo de coordinación equivalente en los tres ligandos. Tanto para **L1** como para **L2**, las constantes de protonación obtenidas para las especies mononucleares $[\text{ZnH}_2\text{L}]^{4+}$ son inferiores a los respectivos valores para la protonación de los receptores libres H_4L^{4+} , lo que sugiere que en ambos casos el nitrógeno de la cadena central participa en la coordinación del $\text{Zn}(\text{II})$.

La figura 7.23 presenta los diagramas de distribución obtenidos para relaciones molares $\text{Zn}(\text{II}):\text{L}$ 1:1. En ellos se observa la coexistencia de especies mononucleares con distintos grados de protonación en todo el intervalo de pH estudiado. Para los tres ligandos la especie $[\text{ZnH}_2\text{L}]^{4+}$ predomina a pH fisiológico.

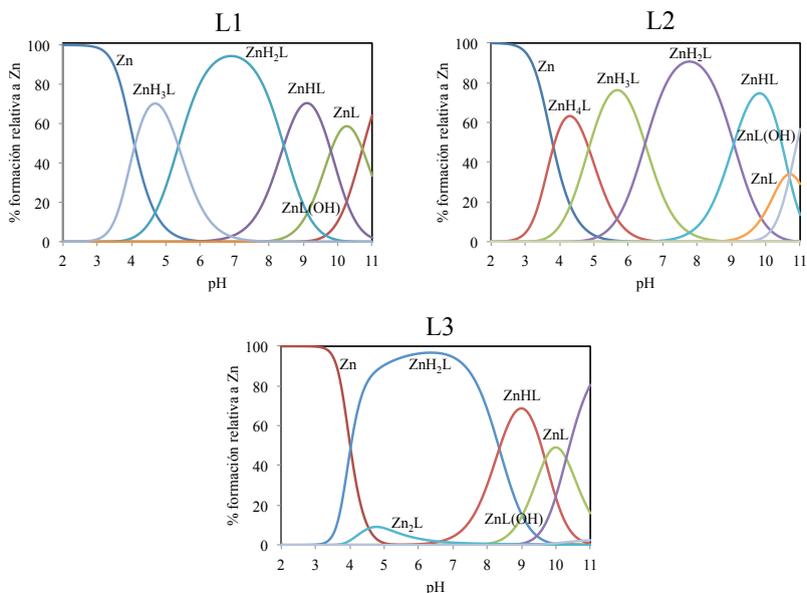


Figura 7.23. Diagramas de distribución de los sistemas $\text{Zn}(\text{II}):\text{L}$ para **L1**, **L2** y **L3**. Calculado para relaciones molares $\text{Zn}(\text{II}):\text{L}$ 1:1. $[\text{L}] = 1 \times 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

Para relaciones molares Zn(II):L 2:1 se ha determinado en los tres sistemas la formación de los complejos binucleares hidroxilados $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$, mientras que para **L1** y **L3** se observa también la formación de la especie binuclear no protonada $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$, cuyos valores de estabilidad siguen la tendencia **L3** > **L1** ($[\text{ZnL}]^{2+} + \text{Zn}^{2+} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$, logK: **L1** = 7.89(5), **L3** = 11.70(8)). Al igual que para los complejos de Cu(II), estas variaciones pueden explicarse analizando los distintos entornos de coordinación disponibles en ambos ligandos. En **L3** la presencia del anillo macrocíclico adicional proporciona un entorno de coordinación más favorable si se compara con la cadena poliamínica abierta presente en **L1**. [15][16] Así pues, el efecto macrocíclico característico de este tipo de estructuras explicaría la diferencia de 4 órdenes de magnitud en los valores obtenidos para **L3** respecto a **L1**. Por otro lado, debido a la menor estabilidad asociada a los anillos quelato de 6 miembros respecto los de 5 miembros, no se ha determinado la formación de la especie binuclear $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$ en **L2**. [15]

Para relaciones molares Zn(II):L 2:1 se observa la presencia en disolución de especies mononucleares y binucleares con grados de protonación varios en función del pH considerado (figura 7.24). Mientras que para **L1** y **L2** las especies binucleares no aparecen en disolución hasta valores de pH 6 y 8 respectivamente, para **L3** éstas predominan en todo el intervalo de pH.

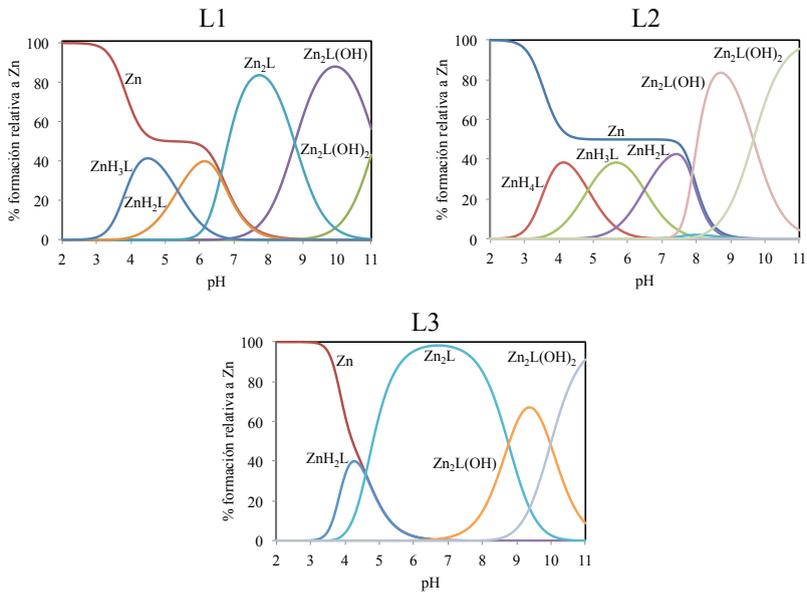


Figura 7.24. Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para L1, L2 y L3. Calculados para relaciones molares Zn(II):L 2:1. $[L] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

Formación de complejos heterobinucleares de Cu(II) y Zn(II)

Teniendo en cuenta la presencia de Cu(II) y Zn(II) en el centro activo de las CuZnSOD (figura 7.1), se ha estudiado la capacidad de las distintas poliaminas para formar complejos heterobinucleares con ambos cationes.

Al llevarse a cabo las valoraciones potenciométricas con los distintos receptores utilizando relaciones molares Cu(II):Zn(II):L 1:1:1 sólo se pudo determinar la formación de complejos heterobinucleares en el caso de **L3**. En la tabla 7.8 se presentan las distintas especies caracterizadas así como los valores logarítmicos de las constantes de estabilidad obtenidos.

Tabla 7.8. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los complejos mixtos de Cu(II) y Zn(II) con **L3**, determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuZnHL}^{\text{a}}$	37.34(2) ^b
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuZnL}$	32.09(4)
$\text{Zn} + \text{Cu} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuZnL}(\text{OH}) + \text{H}$	22.46(8)

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

El diagrama de distribución respecto a Cu(II) obtenido para relación molar Cu(II):Zn(II):**L3** 1:1:1 se presenta en la figura 7.25. En este caso los complejos $[\text{CuZnL}]^{4+}$ y $[\text{CuZnHL}]^{5+}$ predominan en disolución en el intervalo de pH 4.0-9.0, coexistiendo a su vez con las especies homobinucleares. A pH fisiológico el Cu(II) se encuentra en un 70% formando la especie heterobinuclear $[\text{CuZnL}]^{4+}$ mientras que el 30 % restante participa en la formación de la especie homobinuclear $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$. Por otro lado, a valores de pH alcalinos se observa la coexistencia de la especie $[\text{CuZnL}(\text{OH})]^{3+}$ con las correspondientes especies homobinucleares hidroxiladas.

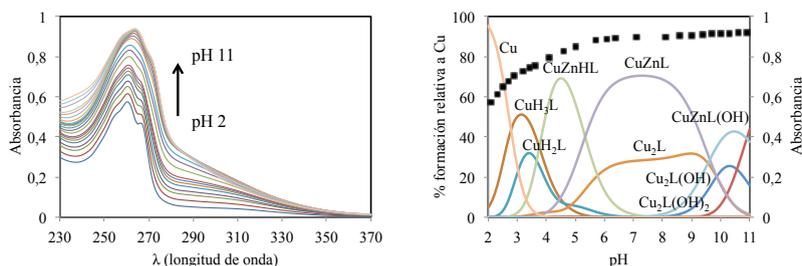


Figura 7.25. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):Zn(II):L3 1:1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):Zn(II):L3 1:1:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. [L] = 5×10^{-4} M. Cargas omitidas.

Como se puede observar en la figura 7.25 al aumentar progresivamente el pH de una disolución que contiene cantidades equimolares de Cu(II), Zn(II) y L3 se produce un aumento de la banda de absorción característica de la piridina (transición $\pi - \pi^*$). Al superponer estas variaciones con el correspondiente diagrama de distribución es posible asociar el aumento en absorción inicial a la formación de la especie $[\text{CuZnHL}]^{5+}$, en cuyo caso cada uno de los cationes metálicos se encontraría coordinado por uno de los anillos macrocíclicos, estando el nitrógeno de la cadena central protonado a este pH. El máximo en la banda de absorción se alcanza una vez la especie heterobinuclear no protonada, $[\text{CuZnL3}]^{4+}$, predomina en disolución. En este complejo todos los nitrógenos de la poliamina participan en la coordinación de los iones metálicos.

La resolución de la estructura cristalina del compuesto $[\text{CuZnL3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$, obtenido mediante la evaporación lenta de una disolución que contenía cantidades equimolares de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y **L3** a pH 7.0, permitió dilucidar la estructura de este complejo (figura 7.26). En la tabla 7.10 se recogen las distancias y los ángulos de enlace de los átomos implicados en la coordinación de ambos cationes metálicos. Los parámetros experimentales se recogen en el anexo 3 (*Datos cristalográficos*).

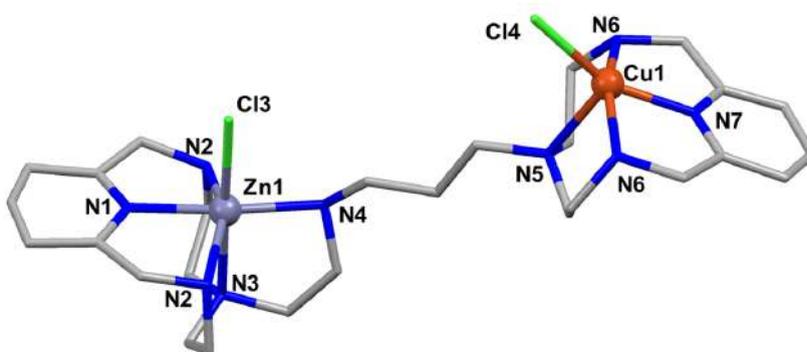


Figura 7.26. Estructura cristalina del catión $[\text{CuZnL3Cl}_2]^{2+}$. Los átomos de hidrógeno y los aniones perclorato han sido omitidos.

En primera instancia, y debido a que los iones $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$ son prácticamente indistinguibles por la técnica de rayos X convencional, se evaluó la composición atómica de los distintos cristales mediante fluorescencia de rayos X por energía dispersiva. Esta técnica permite, mediante el seguimiento de las bandas $K\alpha$ características de $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Zn}(\text{II})$, discernir entre ambos metales y así corroborar la estequiometría de las estructuras obtenidas (figura 7.27).[19][20]

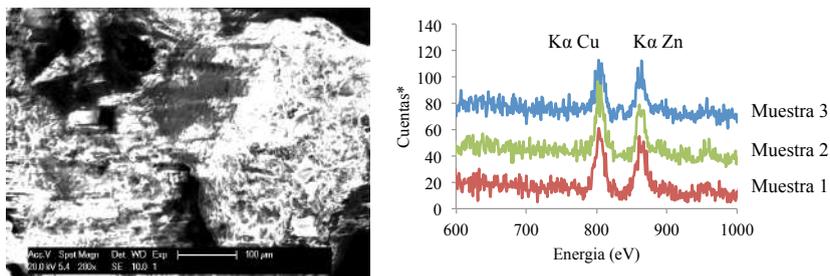


Figura 7.27. (Izquierda) Imagen TEM-EDX de varios monocristales de $[\text{CuZnL3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$. (Derecha) Espectro EDX de tres experimentos.

El análisis de varios cristales distintos reveló un promedio de composición atómica de 2.37% para Cu(II) y 2.46% para Zn(II) (tabla 7.9). Estos datos permiten confirmar la estequiometría Cu(II):Zn(II):L3 1:1:1 en el complejo $[\text{CuZnL3}]^{4+}$.

Tabla 7.9. Composición atómica en % de los tres experimentos TEM-EDX.

Muestra	Cu	Zn
1	2.68	2.81
2	2.26	2.32
3	2.17	2.25
Promedio	2.37	2.46
Desviación	0.27	0.30

Una vez corroborada la estequiometría de la especie heterobinuclear de Cu(II) y Zn(II), se procedió a evaluar la geometría de coordinación de los distintos cationes mediante el análisis de los datos de difracción de rayos X de monocristal presentados en la tabla 7.10. La asignación de los átomos de Cu(II) y Zn(II) se realizó teniendo en cuenta las distancias de enlace y las geometrías de coordinación.

Tal y como se muestra en la figura 7.28, el Zn1 se dispone en el centro de una de las cavidades macrocíclicas adoptando una geometría octaédrica ligeramente distorsionada. El plano ecuatorial lo forman el

nitrógeno de la piridina (N1, 2.025(19) Å), los dos grupos amino adyacentes al anillo (N2, 2.11(2) Å) y el nitrógeno presente en la cadena central (N3, 2.229(18) Å). El nitrógeno terciario ocupa una de las posiciones axiales (N4, 2.17(2) Å), mientras que la otra posición axial la ocupa un ion cloruro (Cl3, 2.380(4) Å).

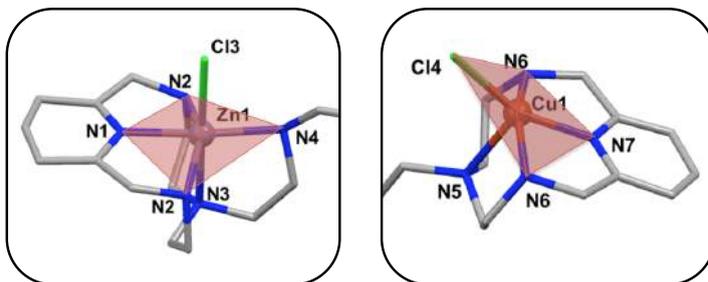


Figura 7.28. Entornos de coordinación de Zn1 y Cu1 en $[\text{CuZnL3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$, en rojo los planos ecuatoriales definidos para cada una de las geometrías de coordinación.

El Cu1 se dispone en el centro de la segunda cavidad macrocíclica adoptando una geometría de pirámide de base cuadrada distorsionada. En este caso la base la forman el nitrógeno del anillo de la piridina (N7, 1.956(16) Å), los dos nitrógenos equivalentes adyacentes al anillo (N6, 2.030(15) Å) y un ion cloruro (Cl4, 2.295(4) Å). El grupo amino terciario presente en el macrociclo ocupa la posición axial alargada (N5, 2.227(12) Å), completándose así la esfera de coordinación. La distorsión observada en este último caso, asociada al efecto Jahn-Teller del Cu(II) para la minimización de las repulsiones electrostáticas,[21] permitió asignar las posiciones de ambos iones metálicos en el complejo.

Tabla 7.10. Distancias (Å) y ángulos (°) de enlace seleccionados para el catión $[\text{CuZnL3Cl}_2]^{2+}$.

Cu1—Cl4	2.295 (4) ^a	N5—Cu1—Cl4	104.6 (4)
Cu1—N5	2.227 (12)	N6—Cu1—Cl4	101.4 (3)
Cu1—N6i	2.030 (15)	N6 ⁱ —Cu1—Cl4	101.4 (3)
Cu1—N6	2.030 (15)	N6 ⁱ —Cu1—N5	84.4 (3)
Cu1—N7	1.956 (16)	N6—Cu1—N5	84.4 (3)
Zn1—Cl3	2.380 (4)	N6 ⁱ —Cu1—N6	156.5 (6)
Zn1—N1	2.025 (19)	N7—Cu1—Cl4	154.7 (4)
Zn1—N2	2.11 (2)	N7—Cu1—N5	100.7 (6)
Zn1—N2i	2.11 (2)	N7—Cu1—N6	81.0 (3)
Zn1—N3	2.229 (18)	N7—Cu1—N6 ⁱ	81.0 (3)
Zn1—N4	2.17 (2)	N1—Zn1—Cl3	90.2 (5)
		N1—Zn1—N2 ⁱ	80.0 (7)
		N1—Zn1—N2	80.0 (7)
		N1—Zn1—N3	90.1 (7)
		N1—Zn1—N4 ⁱ	163.3 (7)
		N1—Zn1—N4	163.3 (7)
		N2 ⁱ —Zn1—Cl3	101.6 (4)
		N2—Zn1—Cl3	101.6 (4)
		N2 ⁱ —Zn1—N2	149.2 (9)
		N2 ⁱ —Zn1—N3	78.5 (4)
		N2—Zn1—N3	78.5 (4)
		N2—Zn1—N4 ⁱ	113.7 (10)
		N2—Zn1—N4	83.6 (10)
		N2 ⁱ —Zn1—N4 ⁱ	83.6 (10)
		N2 ⁱ —Zn1—N4	113.7 (10)
		N3—Zn1—Cl3	179.7 (6)
		N4 ⁱ —Zn1—Cl3	96.0 (5)
		N4—Zn1—Cl3	96.1 (5)
		N4 ⁱ —Zn1—N3	83.7 (7)
		N4—Zn1—N3	83.7 (7)
		N5—Cu1—Cl4	104.6 (4)

(a) Los valores entre paréntesis representan las desviaciones estándar en la última cifra significativa.

7.1.2. Poliaminas derivadas de **L1**

A modo de recordatorio, la figura 7.29 muestra las poliaminas sintetizadas en las que se han unido distintos grupos funcionales en las aminas primarias de **L1**. Los grupos incorporados han sido piridinas sustituidas en posición 2 (**L1-2Py**) y en posición 3 (**L1-3Py**), así como unidades de quinolina sustituidas en posición 4 (**L1-4Q**).

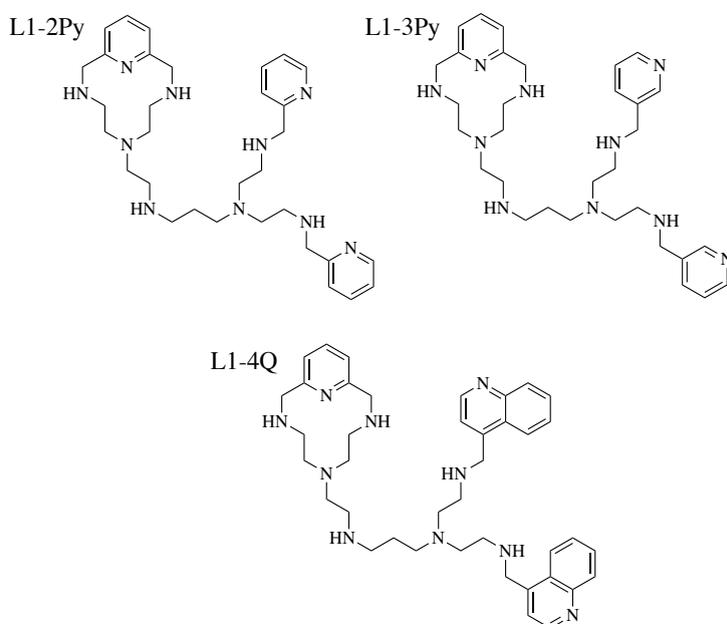


Figura 7.29. Poliaminas **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**.

Las posiciones relativas de los átomos de nitrógeno en los distintos heterociclos, así como el grado de condensación del sustituyente aromático, tendrán una gran influencia en la capacidad coordinante de Cu(II) de estos nuevos ligandos. Así, la presencia de los diferentes grupos funcionales hará que los iones metálicos adquieran diversas geometrías de coordinación así como distintos grados de saturación coordinativa. Como se ha discutido

anteriormente, estos factores juegan un papel relevante a la hora de regular el comportamiento *redox* del centro metálico así como para modular la accesibilidad del radical superóxido al mismo y, por tanto, influirán sobre la capacidad de los complejos metálicos para actuar como miméticos SOD (*Introducción*, Capítulo 1).

7.1.2.1. Coordinación con Cu(II)

En la tabla 7.11 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para la formación de complejos de Cu(II) con **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**, obtenidos mediante valoraciones potenciométricas llevadas a cabo a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M, utilizando relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1. Para facilitar la discusión de los resultados, en la misma tabla se han vuelto a incluir los correspondientes valores de **L1**.

Se ha determinado la formación de complejos mononucleares con grados de protonación que varían entre 4 y 0 para **L1-3Py** y **L1-4Q**, mientras que para **L1-2Py** se ha identificado, aparte de la especie neutra, complejos con 1 y 2 grupos amino protonados. La formación de la especie hidroxilada $[\text{CuL}(\text{OH})]^+$ solo se ha detectado para **L1-4Q**.

Los valores logarítmicos de las constantes para la formación de las especies $[\text{CuL}]^{2+}$ siguen la tendencia **L1-3Py** > **L1-2Py** > **L1-4Q** ($\text{Cu}^{2+} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuL}]^{2+}$; $\log K$: **L1-2Py** = 19.19(5), **L1-3Py** = 20.01(7), y **L1-4Q** = 18.34(4)). Las constantes obtenidas para **L1-2Py** y **L1-4Q** son del mismo orden de magnitud que la correspondiente para la formación de la especie mononuclear del ligando de referencia **L1** ($\log K = 18.95(5)$), siendo la constante de **L1-3Py** ligeramente superior.

Tabla 7.11. Logaritmos de las constantes de estabilidad obtenidos para los complejos de Cu(II) con **L1**, **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**, determinados a 298.1 ± 0.1 K en NaCl 0.15 M.

Equilibrio	L1	L1-2Py	L1-3Py	L1-4Q
$\text{CuH}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}^{\text{a}}$			4.08(2)	3.29(4)
$\text{CuH}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$	4.22(3) ^b		4.37(3)	3.78(3)
$\text{CuHL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	8.29(5)	8.78(3)	6.94(3)	5.08(2)
$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	9.94(3)	10.15(5)	9.35(5)	7.94(3)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	18.96(5) ^b	19.19(5)	20.01(7)	18.34(4)
$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuL}(\text{OH}) + \text{H}$	-11.28(9)			-10.62(4)
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	32.31(3)	31.28(4)	27.15(5)	26.99(4)
$\text{Cu}_2\text{HL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}$				4.53(2)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{HL}$		6.35(4)	7.84(4)	4.17(4)
$\text{CuL} + \text{Cu} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	13.35(7)	12.09(5)	7.14(6)	8.65(4)
$\text{Cu}_2\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}$	-8.74(5)		-9.60(6)	-7.99(5)
$\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH}) + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2 + \text{H}$	-10.53(9)		-10.89(8)	-9.61(5)
$\text{Cu}_2\text{L} + 2(\text{H}_2\text{O}) \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2 + 2\text{H}$		-22.00(8)		

(a) Cargas omitidas. (b) Los valores entre paréntesis representan desviaciones estándar en la última cifra significativa.

Por otra parte, tanto para **L1-2Py** como para **L1-3Py** se ha identificado la formación de complejos binucleares con grados de protonación 0 y 1, así como de las especies hidroxiladas $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$ para **L1-3Py** y la especie $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$ para **L1-2Py**. En el caso de **L1-4Q** se observa la formación de especies binucleares con grados de protonación comprendidos entre 2 y 0 así como la formación de las especies hidroxiladas $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$ (tabla 7.11).

Los valores de las constantes sucesivas de estabilidad obtenidas para $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ siguen la tendencia **L1-2Py** > **L1-4Q** > **L1-3Py** ($[\text{CuL}]^{2+} + \text{Cu}^{2+} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, $\log K$: **L1-2Py** = 12.09(5), **L1-3Py** = 7.14(6) y **L1-4Q** = 8.65(4)). A la vista de estos resultado se observa como la posición relativa de los nitrógenos en los anillos aromáticos sustituyentes influye de forma notable en la capacidad de las poliaminas para coordinar el segundo átomo de Cu(II).

La introducción de dos anillos de piridina sustituidos en posición 2 conduce a la formación de especies binucleares más estables respecto a aquellos sustituidos en posición 3, siendo la constante obtenida para **L1-2Py** 5 órdenes de magnitud superior que para **L1-3Py**. Todo ello sugiere la participación de un mayor número de átomos en la esfera de coordinación del segundo Cu(II).[3]

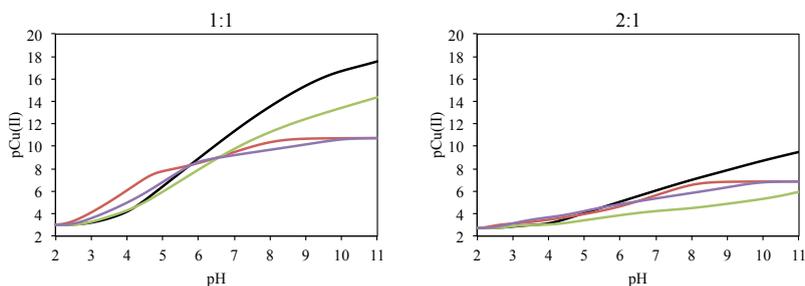


Figura 7.30. Representación de pCu(II) frente al pH de los derivados de **L1** (negro); **L1-2Py** (rojo), **L1-3Py** (verde) y **L1-4Q** (lila). Calculados a partir de las constantes de estabilidad para Cu(II):L 1:1 y 2:1. $[L] = 10^{-3}$ M.

Debido a que la basicidad de las poliaminas influye en los valores de las constantes de estabilidad obtenidos, en este caso se ha optado por el pCu(II) como parámetro para comparar la estabilidad de los complejos de Cu(II); siendo éste un valor que refleja la cantidad de metal libre en disolución a un pH determinado ($pCu = -\log_{10}([Cu_{libre}])$).

A primera vista llama la atención que, independientemente de la relación Cu(II):L considerada, los complejos de **L1** son los más estables a valores de pH superiores a 6. Al comparar la estabilidad de los distintos derivados de **L1** se ve que para relaciones Cu(II):L 1:1 los complejos de **L1-3Py** son los más estables a pH elevados. Sin embargo, a valores de pH fisiológico los tres derivados presentan una estabilidad similar (tabla 7.12).

Para relaciones molares Cu(II):L 2:1 los complejos de **L1-2Py** y **L1-4Q** presentan estabilidades similares en todo el intervalo de pH estudiado, a pH fisiológico la estabilidad de los complejos de ambos receptores es mayor que la de los del derivado **L1-3Py** (tabla 7.12).

Tabla 7.12. Valores de pCu(II) a pH 7.4 calculados para distintas relaciones molares Cu(II):L.

	1:1	2:1
L1	12.3	6.4
L1-2Py	9.9	6.0
L1-3Py	10.4	4.3
L1-4Q	9.4	5.5

En la figura 7.31 se observa cómo, debido a los elevados valores de las constantes de estabilidad obtenidas, la especies de Cu(II) se forman desde valores de pH relativamente ácidos. Para **L1-2Py** la especie $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ predomina en disolución hasta valores de pH alcalinos. Por otro lado, tanto para **L1-3Py** como para **L1-4Q** la especie predominante en disolución a pH fisiológico es $[\text{CuHL}]^{3+}$.

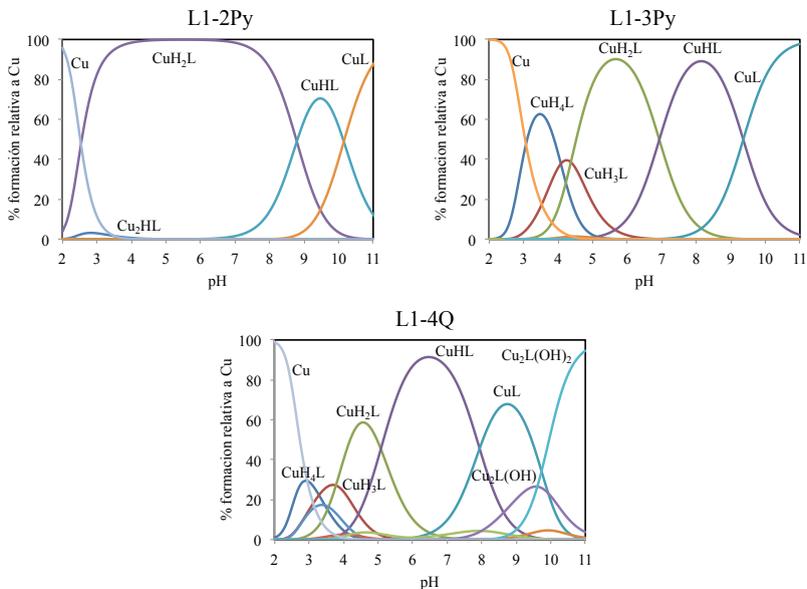


Figura 7.31. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**. Calculados para relaciones molares Cu(II):L 1:1. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Cargas omitidas.

En la figura 7.32 se presentan los diagramas de distribución calculados para los distintos derivados de **L1**, utilizando relaciones molares Cu(II):L 2:1. Para **L1-2Py** no se observa la formación de las especies hidroxiladas incluso a valores de pH elevados ya que, como se ha descrito anteriormente, la correcta disposición de los nitrógenos presentes en los grupos piridina sustituyentes permitiría completar la esfera de coordinación del segundo átomo de Cu(II). Por otro lado, para **L1-3Py** las especies hidroxiladas predominan a partir de valores de pH 9.5 mientras que para **L1-4Q** éstas empiezan a formarse a valores de pH neutros (figura 7.32).

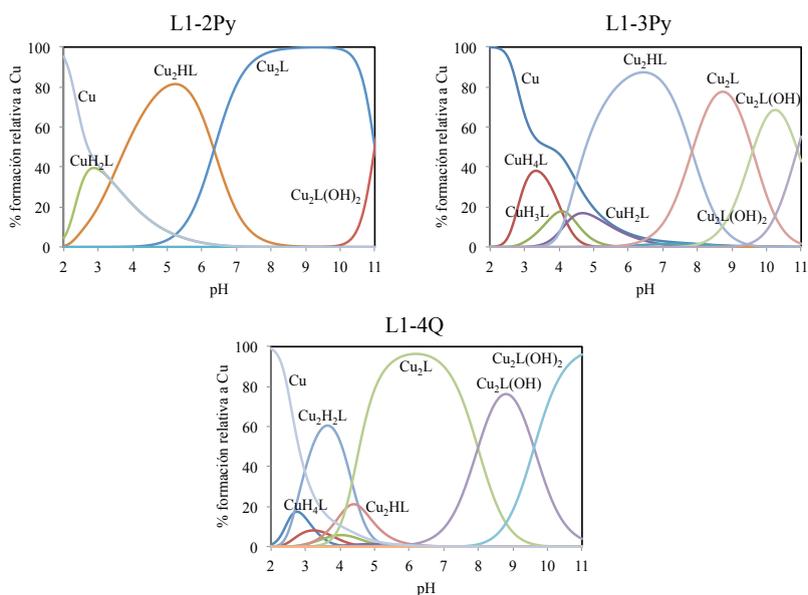


Figura 7.32. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**. Calculados para relaciones molares Cu(II):L 2:1. [L] = 10⁻³ M. Cargas omitidas.

Poliamina L1-2Py

Al registrar los espectros UV-Vis a relación molar Cu(II):L1-2Py 1:1 se observa, a valores de pH ácidos, la presencia de la banda de absorción característica de las piridinas (transición $\pi - \pi^*$), seguida de un hombro centrado a 288 nm, atribuible a una transferencia de carga amina-Cu(II) (figura 7.33).[18] Sin embargo, los espectros UV-Vis no experimentan cambios significativos a lo largo de toda la valoración ácido-base (pH 2.0-11.0). La superposición de los valores de absorción a 260 nm al correspondiente diagrama de distribución permite confirmar que las especies $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$, $[\text{CuHL}]^{3+}$ y $[\text{CuL}]^{2+}$ presentan un mismo modo de coordinación.

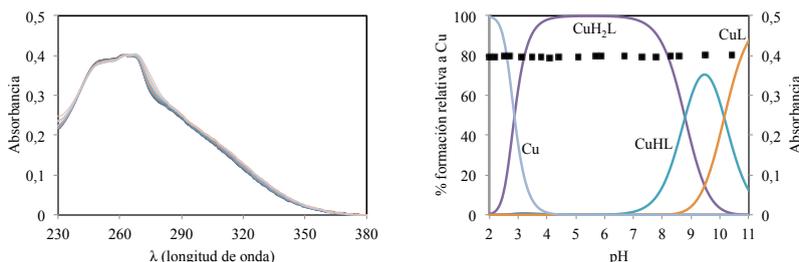


Figura 7.33. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1-2Py 1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución para el sistema Cu(II):L1-2Py 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 260 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

En la figura 7.34 se muestran los datos espectroscópicos registrados a distintos valores de pH para una disolución que contenía Cu(II) y L1-2Py en relación molar Cu(II):L 2:1. Mediante la superposición de los datos experimentales con el correspondiente diagrama de distribución es posible atribuir el aumento en absorción observado a la coordinación del segundo Cu(II) en la especie $[\text{Cu}_2\text{HL}]^{5+}$, así como a la participación sucesiva de nuevos átomos de nitrógeno en la coordinación de uno de los dos Cu(II) en $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$.

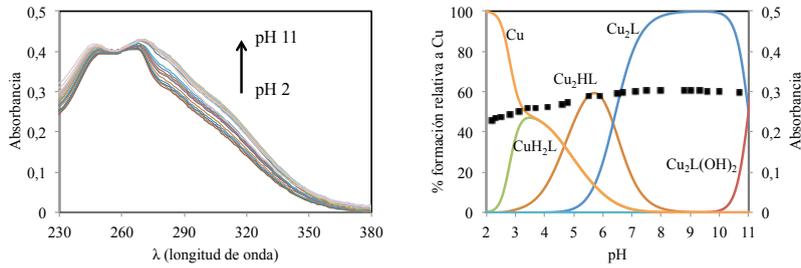


Figura 7.34. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1-2Py 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L1-2Py 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 300 nm, $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Poliamina L1-3Py

Al aumentar el pH de una disolución que contiene Cu(II) y L1-3Py en relación molar Cu(II):L 1:1 se observa desde el momento inicial un incremento en absorción a longitudes de onda comprendidas entre 280 y 330 nm (figura 7.35). Estas variaciones pueden relacionarse con la formación del complejo $[CuH_2L]^{4+}$ en disolución, todo ello sugiriendo la participación de nuevos átomos en la coordinación del Cu(II). El valor relativamente bajo de la constante de protonación obtenida para $[CuH_2L]^{4+}$ ($\log K = 4.37(3)$) permite corroborar que dicho proceso involucra un nitrógeno que participa en la coordinación del Cu(II).

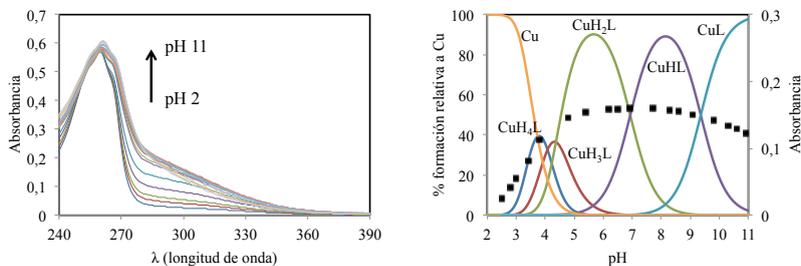


Figura 7.35. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1-3Py 1:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para Cu(II):L1-3Py 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 300 nm. $[L] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Para relaciones molares Cu(II):L1-3Py 2:1 se observa a lo largo de la valoración ácido-base un incremento en la banda de absorción centrada a 256 nm, así como la aparición de una nueva banda a 300 nm (figura 7.36). Como se ha descrito anteriormente, para está relación Cu(II):L1-3Py no se forman especies binucleares hasta que se alcanzan valores de pH neutros, en la figura 7.36 se observa como este proceso genera un aumento brusco de la absorbancia, atribuible a la coordinación del segundo metal.

El descenso en absorción observado a valores de pH alcalinos puede asociarse a una reorganización de los enlaces amina-Cu(II) como consecuencia de la formación de las especies hidroxiladas $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$.

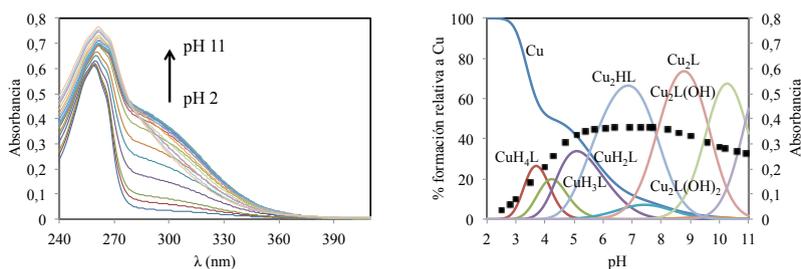


Figura 7.36. (Arriba) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1-3Py 2:1 a distintos valores de pH. (Abajo) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L1-3Py 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 300 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Poliamina L1-4Q

Como se ha descrito anteriormente (*Propiedades ácido-base*, capítulo 6), a valores de pH ácidos el espectro de absorción de **L1-4Q** presenta una banda dominante centrada a 315 nm, acompañada por otra de menor intensidad a 260 nm (figura 7.37).

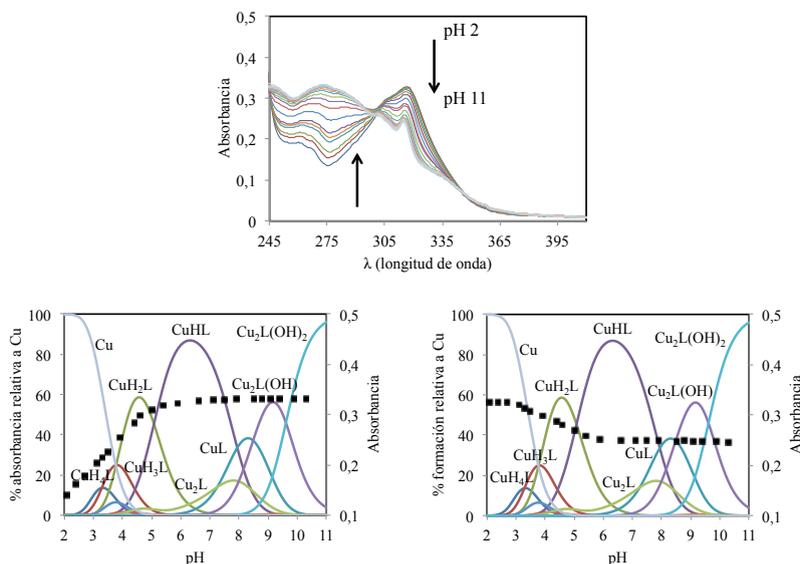


Figura 7.37. (Arriba) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):**L1-4Q** 1:1 a distintos valores de pH. (Abajo, Izquierda) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II):**L1-4Q** 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 273 nm. (Abajo, Derecha) Diagrama de distribución de especies del sistema Cu(II):**L1-4Q** 1:1 junto a la variación de la absorbancia a 315 nm. [L] = 5×10^{-4} M. Cargas omitidas.

Como se puede observar en la figura 7.37 la formación de la especie $[\text{CuH}_2\text{L1-4Q}]^{4+}$ viene acompañada de un rápido aumento en la absorbancia de la banda centrada sobre 273 nm, la cual puede entenderse como la superposición de las bandas de la piridina junto a la correspondiente al grupo quinolina desprotonado. Paralelamente, la banda centrada sobre 315 nm disminuye hasta alcanzar un valle. Ambos procesos conducen a la aparición de un punto isobéptico a 300 nm (figura 7.37). Las variaciones observadas

pueden atribuirse a la participación sucesiva de nuevos átomos de nitrógeno en el entorno de coordinación del Cu(II). Dicha tendencia se estabilizan una vez la especie $[\text{CuH}_3\text{L}]^{5+}$ desaparece en disolución, indicando que la formación de $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ implica la desprotonación de un nitrógeno que pasa a formar parte de la coordinación del Cu(II). Las posteriores desprotonaciones ya no implicarían la participación de más nitrógenos en la coordinación del Cu(II).

Por otro lado, el valor relativamente bajo de la constante obtenida para la protonación de la especie $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ ($\log K = 3.78(3)$) permitiría indicar que dicho proceso involucra un nitrógeno que está implicado en la coordinación del Cu(II).

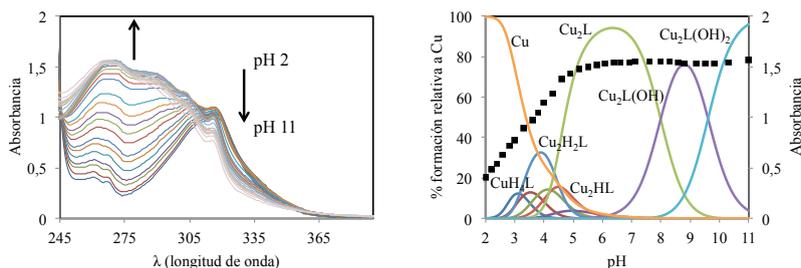


Figura 7.38. (Izquierda) Espectros UV-Vis del sistema Cu(II):L1-4Q 2:1 a distintos valores de pH. (Derecha) Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II):L1-4Q 2:1 junto a la variación de la absorbancia a 266 nm. $[\text{L}] = 5 \times 10^{-4}$ M. Cargas omitidas.

Por otro lado, al aumentar el pH de una disolución que contiene Cu(II) y L1-4Q en relación molar Cu(II):L 2:1 se observa como la formación del complejo $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ viene acompañada de un aumento brusco en absorbancia (figura 7.38). En esta especie todos los nitrógenos secundarios de la poliamina se encontrarían formando parte de uno de los dos entornos de coordinación de los Cu(II).

7.2. Evaluación de la toxicidad

Una vez descrita la química de coordinación de los receptores sintetizados se procedió a evaluar la actividad antiproliferativa de los ligandos libres y de los distintos complejos metálicos caracterizados. Para ello se llevaron a cabo ensayos de viabilidad en una línea celular tipo no tumoral (VERO). Estos estudios se han llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación de Biología Molecular perteneciente al Institut de Investigació Sanitaria Pere Virgili (IISPV) del Hospital Joan XXIII de la Universidad Rovira i Virgili (*Estudios biológicos*, apartado 4.13). La citotoxicidad de los complejos homo- y binucleares se comparó con la de los compuestos en su forma libre.

Los estudios llevados a cabo con las poliaminas **L1**, **L2** y **L3** permiten concluir que los ligandos en su forma libre presentan una mayor toxicidad que los correspondientes complejos de Cu(II) (figura 7.39). El compuesto que mostró una mayor toxicidad resultó ser **L1**, con un valor de IC_{50} menor a $10 \mu\text{M}$.

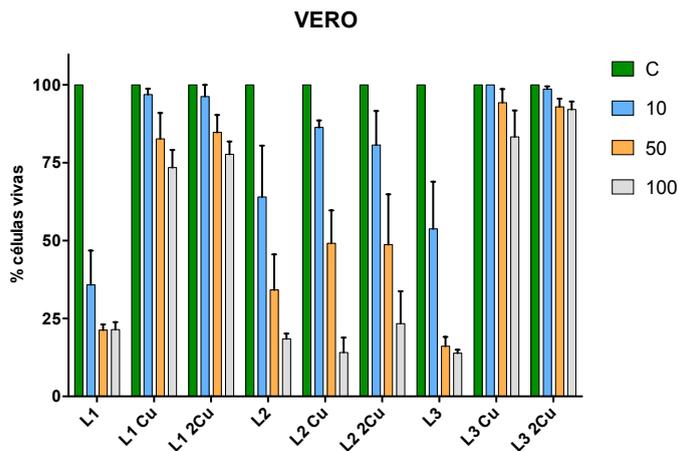


Figura 7.39. Porcentaje de supervivencia de células VERO tratadas con **L1**, **L2** y **L3** junto con los correspondientes complejos de Cu(II) a relaciones Cu(II):L 1:1 y 2:1. Concentraciones de 10, 50 y 100 μM . Incubadas durante 48 horas a 37°C.

En la figura 7.39 se observa como los complejos de **L1** y **L3** presentan baja capacidad antiproliferativa incluso a concentraciones de 100 μM , mientras que los de **L2** si muestran cierta toxicidad a dicha concentración, presentando estos últimos valores de IC_{50} cercanos a 50 μM . A raíz de los ensayos de MTT es posible concluir que los complejos de Cu(II) no son citotóxicos en el intervalo de concentraciones a las que se llevan a cabo los estudios de capacidad antioxidante (1-50 μM).

Paralelamente se evaluó la toxicidad de los derivados de **L1**, en cuyo caso los ensayos de MTT demostraron que el Cu(II) es capaz de bloquear la actividad antiproliferativa mostrada por los ligandos libres. En la figura 7.40 se observa como los receptores presentan una elevada toxicidad a concentraciones ligeramente superiores a 10 μM , mientras que los correspondientes complejos de Cu(II) no resultan citotóxicos incluso a concentraciones de 100 μM .

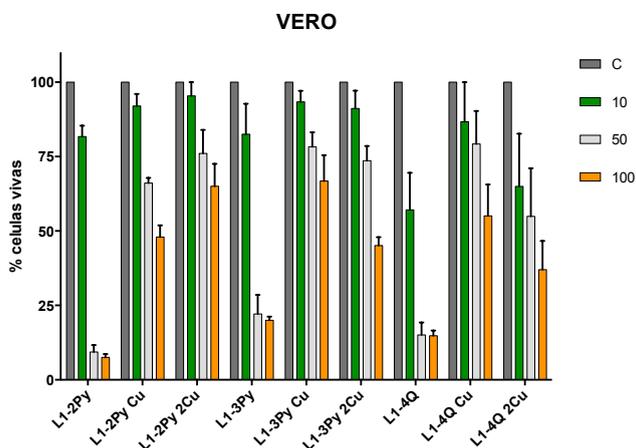


Figura 7.40. Porcentaje de supervivencia de células VERO tratadas con **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q** junto con los correspondientes complejos de Cu(II) a relaciones Cu(II):L 1:1 y 2:1. Concentraciones de 10, 50 y 100 μM . Incubadas durante 48 horas a 37°C.

Por otro lado se estudió la toxicidad de los complejos de Mn(II) caracterizados para **L1** y **L3** (figura 7.41). Al igual que para los ensayos llevados a cabo con Cu(II), la formación de los complejos metálicos produce una disminución en la actividad antiproliferativa de ambos compuestos. Sin embargo, en este caso el descenso no resulta tan notable, mostrando los complejos mononucleares elevada citotoxicidad a concentraciones de 50 μM . El complejo binuclear de **L3** resulta no tóxico incluso a concentraciones tan elevadas como 100 μM .

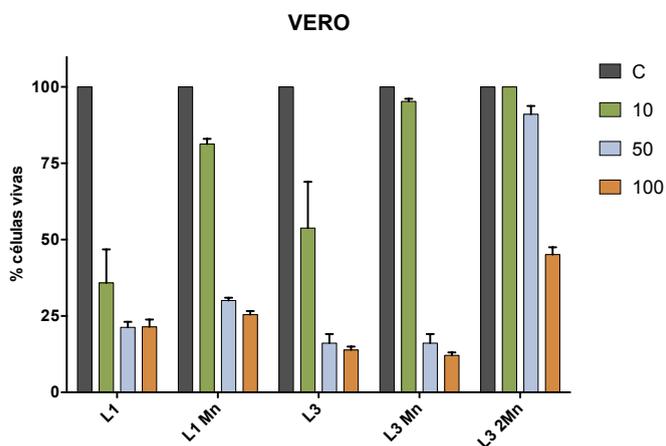


Figura 7.41. Porcentaje de supervivencia de células VERO tratadas con **L1** y **L3** junto con los correspondientes complejos de Mn(II) a relaciones Mn(II):L 1:1 y 2:1. Concentraciones de 10, 50 y 100 μM . Incubadas durante 48 horas a 37°C.

7.3. Evaluación de la actividad SOD

Una vez se determinó que los distintos complejos metálicos no eran tóxicos a concentraciones inferiores a 50 μM , se llevaron a cabo estudios enfocados a evaluar su capacidad para actuar como miméticos de la SOD.

Como primer paso se procedió a estudiar las propiedades *redox* de las especies seleccionadas, obteniéndose así los potenciales formales para los procesos de reducción y oxidación de los distintos centros metálicos.

A continuación se evaluó la capacidad de los complejos metálicos para dismutar el radical superóxido mediante ensayos *in vitro* de tipo McCord-Fridovich.[22] El protocolo de este ensayo ha sido ligeramente modificado en el GQS-UV para adaptarlo a este tipo de compuestos y consiste en la generación del ion radical superóxido *in situ* mediante el sistema xantina-xantina oxidasa, detectándose la cantidad de superóxido espectroscópicamente de forma indirecta mediante el indicador colorimétrico NBT.[3] La presencia de una especie con comportamiento SOD disminuye la concentración del radical y por lo tanto influye en la velocidad de aparición de la forma oxidada del indicador (*Estudios cinéticos para la determinación de la actividad antioxidante*, apartado 4.8).

Además, se determinó la capacidad antioxidante de los complejos más prometedores en cultivos de una cepa deficiente en la enzima citoplasmática SOD1 de levaduras *Saccharomyces Cerevisiae*. Se mide la capacidad antioxidante del complejo como el cociente entre la variación del crecimiento de la cepa en presencia y en ausencia del mismo ($(SOD1 + \text{Compuesto})/SOD1$).

7.3.1. Estudios electroquímicos

El comportamiento electroquímico de los complejos de Cu(II) y Mn(II), así como el de los complejos mixtos de Cu(II) y Zn(II), se ha estudiado a pH 7.4 en medio tamponado TRIS 50 mM y utilizando NaCl 150 mM como electrolito auxiliar.

7.3.1.1. Voltametría cíclica de las poliaminas **L1**, **L2** y **L3**

Como se ha descrito en anteriormente, las diferencias estructurales de los ligandos sintetizados permiten obtener complejos metálicos de estequiometrias Cu(II):L 1:1 y 2:1 con una gran variedad estructural (*Formación de complejos metálicos*, apartado 7.1). En éstos el Cu(II) presenta distintos entornos de coordinación con grados de saturación coordinativa varios. Así pues, el principal objetivo de los estudios electroquímicos es evaluar como estas variaciones estructurales afectan a la química *redox* del Cu(II) una vez coordinado, con el objetivo final de determinar posibles relaciones estructura-actividad.

Por otro lado, se ha evaluado la respuesta voltamétrica de los complejos de Mn(II) determinados para **L1** y **L3**.

Sistemas con Cu(II)

La Figura 7.42 compara la respuesta voltamétrica de soluciones acuosas de **L1** y **L2** a relaciones molares Cu(II):L 1:1. En ellas se observa como la respuesta catódica de las especies predominantes en disolución, $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$, consiste en picos de reducción a -0.57 V para **L1** (C1) y -0.56 V para **L2** (C2), acoplados a las señales anódicas de oxidación a -0.49 V para **L1** (A1) y -0.46 V para **L2** (A2). En ambos casos los valores obtenidos se pueden atribuir a la reducción y posterior oxidación del Cu(II) por un electrón, con valores de potencial formal para los pares Cu(II)/Cu(I) de -0.53 V para la pareja C1/A1 (**L1**) y de -0.51 V para el par C2/A2 (**L2**), respecto a electrodo Ag/AgCl.

Por otro lado, se observa un pico de *stripping* (descarga) adicional a -0.10 V (A_{Cu}), el cual puede atribuirse sin ambigüedad a la oxidación del cobre metálico previamente depositada sobre la superficie del electrodo. Lo que indicaría que el ciclo electroquímico global implica la interconversión de Cu(II) a Cu(0).

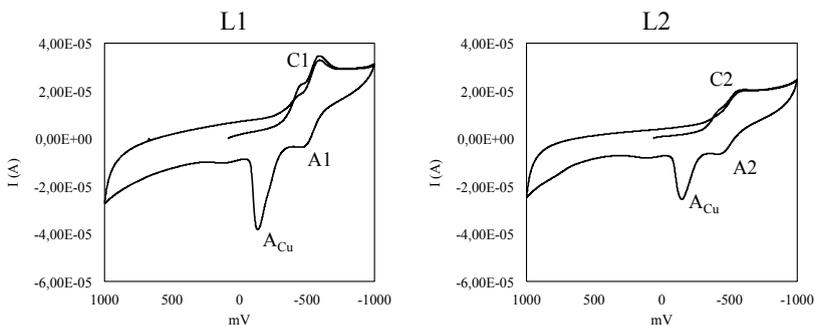


Figura 7.42. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con **L1** y **L2** para relaciones molares Cu(II):L 1:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.

El voltamperograma cíclico de $[\text{Cu}_2\text{L1}]^{4+}$, especie predominante en disolución para relación molar $\text{Cu(II)}:\text{L1}$ 2:1, puede verse en la figura 7.43. En este caso la respuesta catódica consiste en dos señales consecutivas centradas a -0.40 V (C3) y -0.60 V (C4), seguidas de un hombro anódico débil a -0.50 V (A3), aparentemente acoplado a la señal catódica precedente C4. Posteriormente se observa la aparición de un pico de *stripping* a -0.10 V (A_{Cu}) seguido por una onda de oxidación a $+0.10$ V (A5). Esta electroquímica puede describirse en términos de la reducción independiente de los dos centros metálicos siguiendo diferentes vías electroquímicas. Entonces, es posible distinguir dos procesos de reducción de Cu(II) a Cu(I) los cuales implican a las parejas C3/A4 y C4/A3.

Aunque la separación entre los picos catódicos y anódicos resulta mayor que la esperada para un comportamiento reversible, los potenciales formales de electrodo pueden ser calculados como la mitad de la suma de los potenciales de los picos anteriores, con valores de -0.25 V para el par C3/A4 y -0.55 V para la pareja C4/A3.

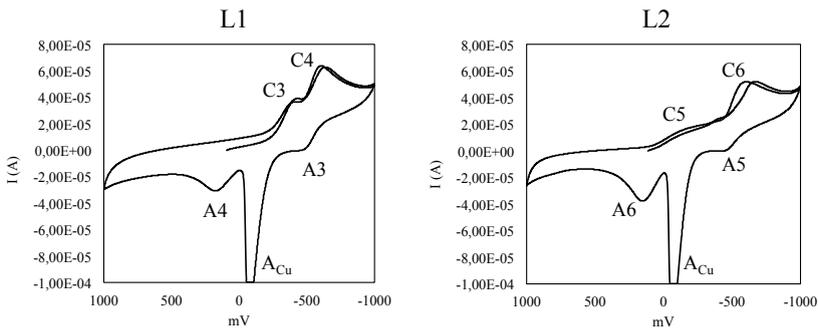


Figura 7.43. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con **L1** y **L2** para relaciones molares $\text{Cu(II)}:\text{L}$ 2:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}\text{M}$.

La respuesta catódica para $[\text{Cu}_2\text{L2}]^{4+}$ consiste en dos señales consecutivas a -0.14 (C5) y a -0.57 V (C6), seguidas de un hombro anódico débil a -0.49 V (A5) aparentemente acoplado a la señal C5 catódica precedente (figura 7.43). En este caso la segunda onda de oxidación se centra a $+0.12$ V (A6).

El análisis de los datos obtenidos permite indicar que los pares C3/A4 (-0.25 V, **L1**) y C5/A6 (-0.01 V, **L2**) involucran a los Cu(II) coordinados por las cadenas abiertas, en cuyo caso los entornos de coordinación disponibles en **L1** y **L2** marcarían las diferencias observadas. Por otro lado, el potencial formal de la pareja C4/A3 obtenido para **L1** (-0.55 V) es similar al obtenido para el par C6/A5 de **L2** (-0.53 V), lo que apunta a que estos procesos corresponderían en ambos casos al par electrónico de los Cu(II) coordinados por las cavidades macrocíclicas.

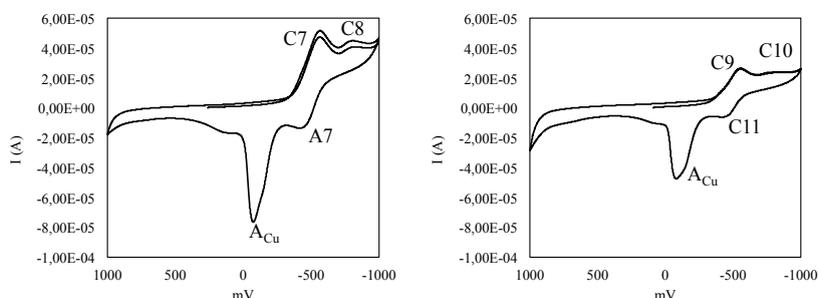


Figura 7.44. (Izquierda) Voltamperograma cíclico del sistema de Cu(II) con **L3** para relación molar Cu(II):L 1:1. (Derecha) Voltamperograma cíclico del sistema de Cu(II) y Zn(II) con **L3** para relación molar Cu(II):Zn(II):L 1:1:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.

La figura 7.44 compara la respuesta voltamétrica de las distintas especies binucleares de **L3** determinadas a pH fisiológico, $[\text{Cu}_2\text{L3}]^{4+}$ y $[\text{CuZnL3}]^{4+}$. En los barridos catódicos ambos complejos muestran un pico de reducción a -0.55 V (C7 y C9) y otro a -0.80 V (C8 y C10). En la exploración anódica subsiguiente le siguen un pico de oxidación a -0.45 V (A7 y A11) y un pico de oxidación intenso a -0.08 V (A_{Cu}). Curiosamente, la corriente de pico C7 en $[\text{Cu}_2\text{L3}]^{4+}$ es dos veces mayor que la corriente de la misma señal para $[\text{CuZnL3}]^{4+}$ (C9), lo que indica que en el complejo $[\text{Cu}_2\text{L3}]^{4+}$ ambos centros metálicos se reducen en el mismo voltaje y de forma independiente.[23]

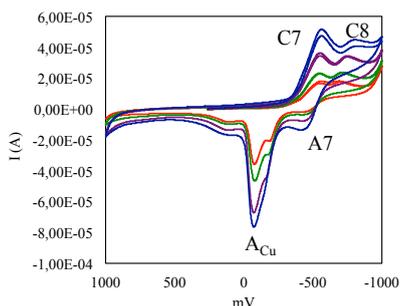
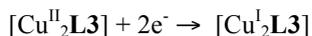


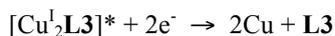
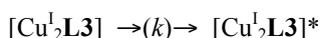
Figura 7.45. Voltamperogramas cíclicos del sistema de Cu(II) con **L3** para relación molar Cu(II):L 2:1. Velocidades de barrido de 500, 250, 100 y 50 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}\text{M}$.

Para racionalizar las voltametrías obtenidas para **L3** a relación molar Cu(II):L 2:1 se debe considerar que al incrementar la velocidad de exploración potencial el pico A7 aumenta en altura en relación al pico C7, mientras que el pico C8 exhibe el efecto opuesto (figura 7.45). Esta característica sugiere que hay una reacción química intermedia acoplada entre dos procesos sucesivos de transferencia de electrones (mecanismo ECE).[24][25]

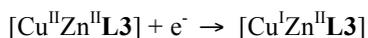
Así pues, el par C7/A7 correspondería a la reducción de un electrón por cobre, o lo que es lo mismo, al paso de Cu(II) a Cu(I):



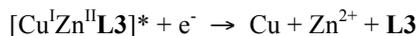
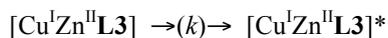
Le sigue una reacción de reorganización o disociación que da lugar a una especie de cobre diferente que se reduce posteriormente a cobre metálico a través del proceso C8:



Un esquema similar se aplica para el complejo $[\text{CuZnL}_3]^{4+}$, para el cual la reducción inicial de un electrón del centro de cobre conduce a:



Le sigue una reacción de reorganización o disociación que da lugar a una especie de cobre diferente, que se reduce a continuación a cobre metálico (C10):



En la medida en que la reducción del centro Zn(II) ocurriría en potenciales claramente más negativos, no hay posibilidad de detectar una electroquímica localizada en Zn(II) para el complejo bajo estas condiciones experimentales.

Con el fin de evaluar las vías electroquímicas propuestas, se registraron los cronoamperogramas de los complejos en disolución mediante la aplicación de un potencial ligeramente más negativo respecto al pico catódico registrado en los experimentos de voltametría cíclica. La figura 7.48 compara las gráficas de Cottrell, corriente (i) frente a la inversa de la raíz cuadrada del tiempo ($t^{-1/2}$), para soluciones de **L1** y **L3** a relaciones molares Cu(II):L 2:1.

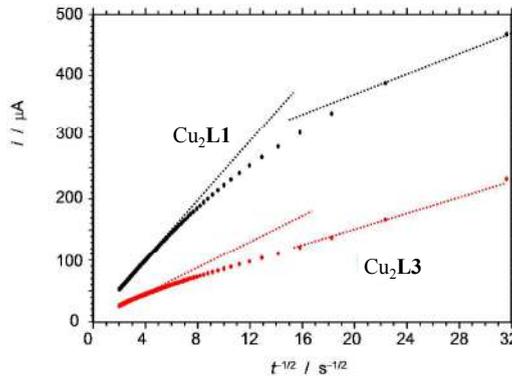


Figura 7.46. Gráficos Cottrell obtenidos a partir de los datos cronoamperométricos registrados tras la aplicación de un paso potencial de -0.60 V para los sistemas de **L1** y **L3** para relaciones molares Cu(II):L 2:1. NaCl 0.15 M y pH 7.4. $[\text{L}] = 2 \times 10^{-3}\text{ M}$.

A tiempos cortos (valores de $t^{-1/2}$ grandes) los datos experimentales tienden a líneas rectas de pendiente similar, consistentes con la asignación de un electrón bajo control de difusión al paso inicial del proceso voltamétrico. Sin embargo, a tiempos grandes (valores bajos de $t^{-1/2}$), los datos experimentales tienden a una línea recta diferente cuya pendiente es aproximadamente dos veces la pendiente obtenida para tiempos cortos (figura 7.46). Este comportamiento es justo el esperado para un mecanismo ECE consistente en dos transferencias sucesivas de un electrón por Cu, controladas por difusión, acopladas a una reacción química intermedia, tal como ha sido descrito teóricamente por Feldberg y Jestic.[26]

Sistemas con Mn(II)

Para **L1**, en cuyo caso se determinó que la especie $[\text{MnH}_2\text{L}]^{4+}$ predomina a pH fisiológico para relaciones molares Mn(II):L 1:1, se observa un proceso reversible de oxidación por un electrón con un pico anódico (A1) y uno catódico (C1) que aparecen respectivamente alrededor de +0.66 V y +0.29 V (figura 7.47). A velocidades de barrido bajas, 50 mV/s, la relación entre la corriente del pico catódico y la del pico anódico es cercana a la unidad, sin embargo ésta decrece al incrementar la velocidad de barrido. Este comportamiento indica que al proceso de oxidación inicial A1 le sigue una disociación parcial del Mn(III) generado electroquímicamente. Este proceso explicaría la aparición de una señal catódica adicional cerca de -0.65 V (C2), la cual se podría atribuir a la reducción del acuocomplejo de Mn(III) proveniente de la disociación del complejo.

El potencial formal de electrodo puede ser calculado como la mitad de la suma de los potenciales de los picos A1 y C1 anteriores, $A1/C1 = +0.47$ V.

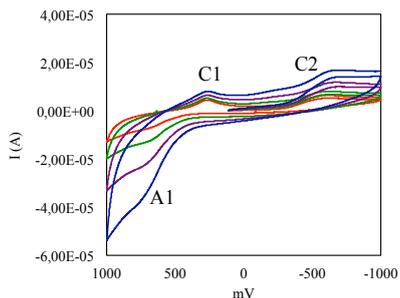


Figura 7.47. Voltamperogramas cíclicos del sistema de Mn(II) con **L1** para relación molar Mn(II):L 1:1. Velocidades de barrido de 500, 250, 100 y 50 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M

Como se ha descrito anteriormente, para relaciones molares Mn(II):L3 1:1 las especies $[\text{MnH}_2\text{L}]^{4+}$ (62 %) y $[\text{Mn}_2\text{L}]^{4+}$ (23%) coexisten en disolución (*Coordinación con Mn(II)*, apartado 7.1.1.2.). La respuesta voltamétrica de una disolución de estas características presenta un pico anódico a +0.56 V (A2) mientras que en el subsecuente escaneo catódico se observan dos señales con valores de +0.42 V (C3) y -0.22 V (C4) (figura 7.48). Estos picos se corresponden con la oxidación y posterior reducción por un electrón de los dos centros metálicos de la especie $[\text{Mn}_2\text{L}_3]^{4+}$. Los potenciales formales de electrodo calculados son +0.49 V para el par A2/C3 y +0.17 V para A2/C4.

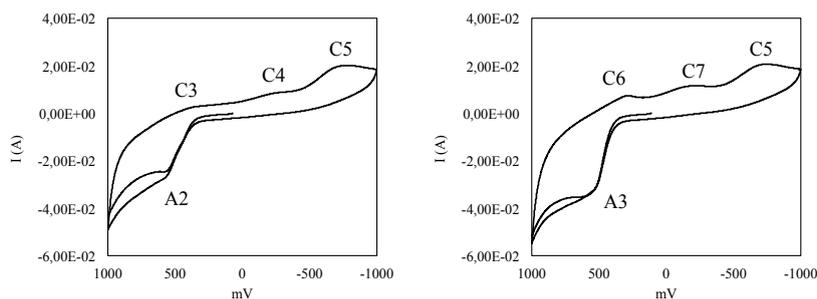


Figura 7.48. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Mn(II) con L3 para relaciones molares (derecha) Mn(II):L 1:1 y (izquierda) Mn(II):L 2:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.

Para relaciones molares Mn(II):L3 2:1 se observa un perfil voltamétrico análogo al caso anterior, presentando éste picos de mayor intensidad. El hecho de que la intensidad de las señales obtenidas para relaciones Mn(II):L3 2:1 sean el doble que para Mn(II):L3 1:1 indica que en el complejo $[\text{Mn}_2\text{L}_3]^{4+}$ ambos centros metálicos se reducen por un electrón.

Se observa un proceso reversible de oxidación independiente monoelectrónica para cada uno de los centros metálicos, tal y como puede apreciarse por el pico anódico a +0.58 V (A3) y los picos catódicos a +0.32

V (C6) y +0.17 V (C7) (figura 7.48). Los potenciales formales de ambos centros metálicos pueden ser abordados como la mitad de la suma de los potenciales de los picos anteriores, +0.45 V para A3/C6 y +0.20 V para A3/C7.

En ambos casos se observa como a los procesos de oxidación iniciales les siguen la reducción del acuocomplejo de Mn(III) en disolución (C5), proveniente del proceso de disociación del complejo.

7.3.1.2. Voltametría cíclica de las poliaminas derivadas de **L1**

La Figura 7.49 compara la respuesta voltamétrica de soluciones acuosas de **L1-2Py** y **L1-3Py** en relaciones molares Cu(II):L 1:1. La respuesta catódica para las especies predominantes en disolución, $[\text{CuH}_2\text{L1-2Py}]^{4+}$ y $[\text{CuHL1-3Py}]^{3+}$, consiste en ambos casos en un pico de reducción a -0.40 V (C1), respecto al electrodo de Ag/AgCl, el cual se desplaza hacia potenciales mas negativos al aumentar la velocidad de barrido. En la exploración inversa no se detectaron picos anódicos acoplados para **L1-3Py** en el intervalo de velocidad de barrido estudiado, mientras que para **L1-2Py** si se que registró una señal anódica débil a altas velocidades de exploración (A1).

El comportamiento observado para ambos ligandos se puede describir en términos de la ocurrencia de una reducción monoelectrónica del centro de Cu(II), seguida de una reacción química relativamente rápida (mecanismo de ECE), presumiblemente debido a una reorganización de los ligandos.

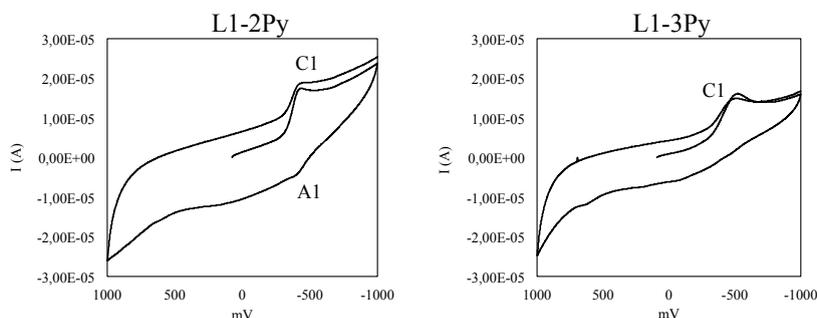


Figura 7.49. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con **L1-2Py** y **L1-3Py** para relaciones molares Cu(II):L 1:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. [L] = 5×10^{-4} M.

La respuesta voltamétrica de los complejos binucleares de **L1-2Py** y **L1-3Py** se presenta en la figura 7.50. En este caso, la respuesta catódica de la especie predominante en disolución para **L1-2Py**, $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, consiste en dos picos catódicos superpuestos centrados a -0.38 V (C2) y -0.51 V (C3). Le siguen en la exploración anódica posterior dos señales a -0.32 V (A2) y -0.20 V (A3), presentando la segunda mayor intensidad. Para **L1-3Py**, cuya especie predominante en disolución es $[\text{Cu}_2\text{HL}]^{5+}$, se observa una señal catódica única centrada en -0.40 V (C4), acompañada de un pico anódico alto a -0.15 V (A4). Dado que los picos altos anteriores A3 y A4 pueden atribuirse inequívocamente a la disolución oxidativa de los depósitos de cobre generados electroquímicamente en los pasos catódicos previos, es posible concluir que en el caso de **L1-3Py** los dos Cu(II) se reducen simultáneamente a Cu(0). Sin embargo, en el caso de **L1-2Py** la reducción de los centros metálicos implica dos vías electroquímicas; uno de los centros de Cu(II) se reduce a Cu(0), mientras que el otro presentaría una reducción monoeléctrica del Cu(II) para dar lugar a Cu(I).

El potencial formal de electrodo para el centro metálicos de Cu(II) presente en el complejo $[\text{Cu}_2\text{HL1-2Py}]^{5+}$ puede obtenerse como la mitad de la suma de los potenciales de los picos anteriores, $\text{C2-3/A2} = +0.41$ V.

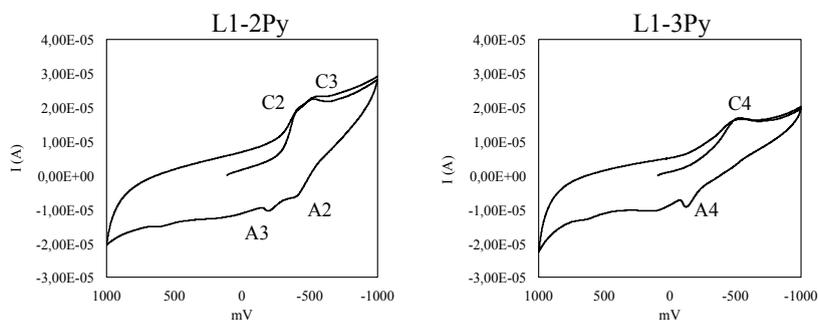


Figura 7.50. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) con **L1-2Py** y **L1-3Py** para relaciones molares Cu(II):L 2:1. Velocidad de barrido de 500 mV/s. [L] = 5×10^{-4} M.

La figura 7.51 presenta la respuesta voltamétrica de una solución acuosa de Cu(II) y **L1-4Q** en relación molar Cu(II):L 1:1. La respuesta catódica para la especie predominante en disolución, $[\text{CuHL}]^{3+}$, consiste en un pico de reducción centrado a -0.57 (C5). En la exploración inversa se detecta a altas velocidades de exploración una señal anódica débil centrada sobre -0.39 V (A5). Este comportamiento se puede describir en términos de la ocurrencia de una reducción del centro de Cu(II) por un electrón, seguida de una reacción química relativamente rápida (mecanismo de ECE), presumiblemente producida por una reorganización del ligando. El potencial formal de electrodo para el centro metálico de Cu(II) presente en el complejo $[\text{CuHL}]^{3+}$ puede ser abordado como la mitad de la suma de los potenciales de los picos anteriores, $C5/A5 = -0.48$ V.

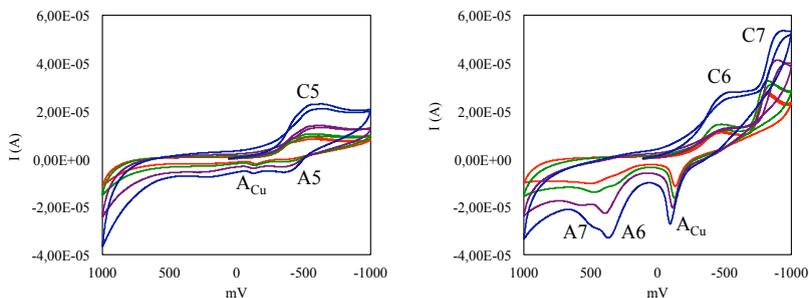


Figura 7.51. Voltamperogramas cíclicos de los sistemas de Cu(II) para **L1-4Q** a relaciones molares (izquierda) Cu(II):L 1:1 y (derecha) Cu(II):L 2:1. Velocidades de barrido de 500, 250, 100 y 50 mV/s. $[L] = 5 \cdot 10^{-4} M$

Por otro lado, la respuesta catódica para la especie $[Cu_2L1-4Q]^{4+}$ consiste en la sucesión de dos picos en la exploración catódica a -0.48 V (C6) y -0.89 V (C7), respecto al electrodo de Ag/AgCl. En la exploración inversa se detectan, aparte de pico de *stripping*, dos señales anódicas centradas sobre +0.34 V (A6) y +0.45 V (A7).

El potencial formal de electrodo para los dos centros metálicos de Cu(II) presentes en $[Cu_2L]^{4+}$ es de -0.015 V para el par C6/A7 y de -0.275 V en el caso de C7/A6.

7.3.2. Estudios cinéticos

Una vez determinada la respuesta electroquímica de los distintos complejos metálicos se procedió a evaluar la actividad SOD de aquellos que presentaban características más prometedoras, mediante el método indirecto de tipo McCord Fridovich y utilizando NBT como indicador, a pH 7.4 (*Estudios cinéticos para la determinación de la capacidad antioxidante*, apartado 4.8).[3][22] Se ha estudiado la capacidad para dismutar el radical superóxido de los complejos de Cu(II) de **L1**, **L2** y **L3**, así como de los complejos binucleares de **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**. También se seleccionaron para su estudio los complejos de Mn(II) de **L1** y **L3**.

A lo largo del capítulo se presentan los valores de IC_{50} y de k_{cat} obtenidos mediante el ensayo de tipo *in vitro*. Para facilitar la discusión de los resultados también se incluyen los potenciales formales determinados mediante estudios de voltametría cíclica.

Complejos de Cu(II)

En la tabla 7.13 se muestran los resultados de actividad SOD de los complejos de Cu(II) de **L1**, **L2** y **L3**. Para facilitar el análisis se incluyen también los valores correspondientes al Cu(II) libre así como el valor determinado para la enzima CuZnSOD nativa. Cabe destacar que los ligandos libres no mostraron actividad catalítica incluso para concentraciones de 100 μ M.

Tabla 7.13. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Cu(II) para **L1**, **L2** y **L3**. Potenciales formales asignados al par Cu(II)/Cu(I). Cargas omitidas.

Complejo	IC ₅₀ (μM) ^a	<i>k_{cat}</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)	E° (V) ^b
Cu L1	12.80 ± 2.93	(2.72 ± 0.52) × 10 ⁵	-0.530 ± 0.005
Cu ₂ L1	0.23 ± 0.07	(1.52 ± 0.43) × 10 ⁷	-0.250 ± 0.005 -0.550 ± 0.005
Cu L2	0.45 ± 0.07	(7.69 ± 0.21) × 10 ⁶	-0.510 ± 0.005
Cu ₂ L2	0.19 ± 0.05	(1.77 ± 0.19) × 10 ⁷	-0.010 ± 0.005 -0.530 ± 0.005
Cu ₂ L3	2.93 ± 0.62	(1.19 ± 0.21) × 10 ⁶	-0.500 ± 0.005
CuZn L3	18.24 ± 0.98	(1.91 ± 0.25) × 10 ⁵	-0.500 ± 0.005
Cu(ClO) ₄	1.1 ± 0.1	2.70 × 10 ⁶	-0.038
CuZnSOD	0.010 ± 0.002	4.30 × 10 ⁸	+0.123
O ₂ /O ₂ ⁻			-0.597
O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂			+0.453

(a) Resultados obtenidos mediante el método McCord-Fridovich, a pH 7.4 y utilizando NBT como indicador. (b) En relación a electrodo Ag/AgCl (NaCl saturado).

En la tabla 7.13 se observa como los compuestos binucleares de **L1** y **L2** son los que presentan una mayor actividad catalítica (*k_{cat}*; Cu₂**L1** = (1.52 ± 0.43) × 10⁷ M⁻¹s⁻¹ y Cu₂**L2** = (1.77 ± 0.19) × 10⁷ M⁻¹s⁻¹). Los valores determinados para ambos compuestos se encuentran entre los mejores valores reportados en la literatura.[27] Sin embargo, la actividad mostrada por el Cu₂**L3** (*k_{cat}* = (1.19 ± 0.21) × 10⁶ M⁻¹s⁻¹) es menor que la del resto de complejos homobinucleares.

Por otro lado, al llevar a cabo los experimentos con los complejos mononucleares de **L1** y **L2** los valores de k_{cat} obtenidos son varios órdenes de magnitud inferiores a aquellos determinados para los correspondientes complejos binucleares (k_{cat} ; $\text{CuL1} = (2.72 \pm 0.52) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $\text{CuL2} = (7.69 \pm 0.21) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Respecto al complejo heterobinuclear de **L3** (CuZnL3), se observa como la sustitución del uno de los Cu(II) por un Zn(II) disminuye la capacidad catalítica mostrada por $\text{Cu}_2\text{L3}$. En este caso la constante catalítica de CuZnL3 ($k_{cat} = (1.91 \pm 0.25) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) es del mismo orden que la obtenida para CuL1 ($k_{cat} = (2.72 \pm 0.52) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), lo que se explica teniendo en cuenta la presencia de un solo átomo de Cu(II) en ambas estructuras.

Estos resultados ponen de manifiesto una estrecha relación entre los grados de saturación coordinativa que presentan los iones de Cu(II) en los distintos complejos metálicos y sus capacidades catalíticas. Así pues, los complejos que presentan una mayor actividad catalítica son aquellos en los que uno de los Cu(II) está coordinado por una cadena poliamínica abierta ($\text{Cu}_2\text{L1}$ y $\text{Cu}_2\text{L2}$), en cuyo caso éstos presentan grados de saturación coordinativa reducidos. Por otro lado, los complejos que muestran una menor capacidad catalítica son aquellos en los que los átomos de Cu(II) están coordinados por un una de las cavidades macrocíclicas, lo que se ha demostrado que conduce a la obtención de centros metálicos con un mayor grado de saturación coordinativa (*Formación de complejos metálicos*, apartado 7.1).

A su vez, la tabla 7.13 recoge los valores de potenciales formales determinados para los pares Cu(II)/Cu(I); encontrándose todos ellos dentro del intervalo óptimo para la actividad SOD. Se observa como aquellos complejos en los que el Cu(II) está coordinado por una cavidad macrocíclica presentan potenciales cercanos a -0.500 V, mostrando todos ellos una capacidad moderada para la dismutación del radical superóxido. Por otro

lado, la introducción de un segundo Cu(II) en **L1** y **L2**, el cual presentará un entorno de coordinación con menor grado de saturación, conduce a la obtención de potenciales formales más positivos lo que a su vez se traduce en una mayor capacidad para la dismutación catalítica del radical superóxido.

Tabla 7.14. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Cu(II) para los derivados de **L1**. Potenciales formales asignados al par Cu(II)/Cu(I). Cargas omitidas.

Complejo	IC ₅₀ (μM) ^a	<i>k_{cat}</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)	E° (V) ^b
Cu ₂ L1-2Py	1.0 ± 0.2	(3.49 ± 0.42) × 10 ⁶	-0.415 ± 0.005
Cu ₂ L1-3Py	3.74 ± 0.9	(9.33 ± 0.84) × 10 ⁵	-
Cu ₂ L1-4Q	1.3 ± 0.3	(2.68 ± 0.53) × 10 ⁶	-0.015 ± 0.005 -0.275 ± 0.005
O ₂ /O ₂ ⁻			-0.597
O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂			+0.453

(a) Resultados obtenidos mediante el método McCord-Fridovich, a pH 7.4 y utilizando NBT como indicador. (b) En relación a electrodo Ag/AgCl (NaCl saturado).

A la vista de los datos presentados en la tabla 7.14, la introducción de grupos aromáticos con átomos dadores adicionales en los extremos de la cadena lateral de **L1** provoca, en todos los casos, una disminución en las propiedades catalíticas de los correspondientes complejos binucleares de Cu(II). Los valores de capacidad catalítica siguen la tendencia **L1-4Q** > **L1-2Py** > **L1-3Py**. Como se ha descrito anteriormente, para **L1-4Q** se han obtenido dos valores de potenciales formales los cuales pueden asignarse, al igual que para **L1**, a dos procesos *redox* independientes. Así pues, se ha determinado un primer proceso correspondiente al par electrónico de un Cu(II) que presenta un entorno de coordinación ligeramente saturado

(-0.275V), y otro, con un valor de potencial mas positivo, correspondiente al par electrónico de un Cu(II) con un menor grado de saturación coordinativa (-0.015 V). Sin embargo, aún presentado **L1-4Q** valores de potenciales formales más positivos, la actividad catalítica resulta similar a la mostrada por el derivado **L1-2Py** (tabla 7.14).

Complejos de Mn(II)

En la tabla 7.15 se muestran los resultados de actividad SOD de los complejos de Mn(II) de **L1** y **L3**, determinados mediante el método indirecto de tipo McCord Fridovich y utilizando NBT como indicador.[3][22] Para facilitar la comparación y el análisis de los resultados también se incluyen los valores de k_{cat} correspondientes al metal libre, así como los de la enzima MnSOD nativa junto a algunos miméticos que destacan en la literatura.

Los valores de k_{cat} obtenidos para los distintos complejos de Mn(II) se encuentran dentro del mismo orden de magnitud ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), siendo estos un orden de magnitud inferior a los valores obtenidos para los compuestos de referencia *pytren-4Q* y *M40403*. Por otro lado, se observa como la introducción de un segundo ion de Mn(II) en **L3** no produce cambios significativos en la capacidad catalítica respecto al complejo mononuclear (k_{cat} , $\text{MnL3} = (3.49 \pm 0.43) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $\text{Mn}_2\text{L3} = (3.87 \pm 0.21) \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

En todos los complejos estudiados los potenciales formales para el par Mn(III)/Mn(II) están dentro del intervalo óptimo para la actividad SOD (tabla 7.15). La similitud entre los valores de potencial formal determinados para los distintos complejos de Mn(II) explicaría la semejanza en los valores de k_{cat} obtenidos.

Tabla 7.15. Resultados de la actividad SOD de los complejos de Mn(II). Potenciales formales asignados al par Mn(II)/Mn(III). Cargas omitidas.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) ^a	<i>k_{cat}</i> (M ⁻¹ s ⁻¹)	E° (V) ^b
MnL1	0.72 ± 0.07	(4.84 ± 0.12) x 10 ⁶	+ 0.470 ± 0.005
MnL3	1.0 ± 0.2	(3.49 ± 0.43) x 10 ⁶	+ 0.494 ± 0.005 + 0.177 ± 0.005
Mn ₂ L3	0.9 ± 0.1	(3.87 ± 0.21) x 10 ⁶	+ 0.450 ± 0.005 + 0.204 ± 0.005
Mn(Pyren-4Q)	0.30 ± 0.01	1.5 x 10 ⁷	+0.483 ^c
Mn(M40403)	-	2.0 x 10 ⁷	+0.543 ^c
MnSO ₄	3.6 ± 0.5	0.8 x 10 ⁶	+1.303
MnSOD	-	10 ⁸	+0.113
O ₂ /O ₂ ⁻			-0.597
O ₂ ⁻ /H ₂ O ₂			+0.453

(a) Resultados obtenidos mediante el método McCord-Fridovich, a pH 7.4 y utilizando NBT como indicador. (d) En relación a electrodo Ag/AgCl (NaCl saturado).

7.3.3. Ensayos biológicos

En última instancia se evaluó la actividad SOD de los complejos de Cu(II) en sistemas vivos utilizando una cepa deficiente en la enzima citoplasmática SOD1 de levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* [(ATCC): ATCC 96687 (SOD1), MATa ura3-52 trp1-289 his3- Δ 1 leu2 -3 leu2-112 sod1 :: URA3). El ensayo consistió en la monitorización del crecimiento de la cepa deficiente en SOD1 en ausencia (control) y en presencia de los compuestos.[28][29][30][31]

A continuación se presentan los datos de crecimiento de las levaduras medido por turbidimetría, siguiendo la absorbancia a 620 nm. Se muestra el crecimiento medido 16, 18 y 20 horas después del tratamiento en relación a la cepa deficiente en SOD1 (*SOD1*). Los experimentos se llevaron a cabo utilizando concentraciones de las especies estudiadas de 10 μ M.

Todos los complejos metálicos estudiados incrementaron el crecimiento de las levaduras deficientes en SOD (figura 7.54 y figura 7.55). Por otro lado, al llevar a cabo los experimentos con los ligandos libres, y como consecuencia de su elevada toxicidad que estos presentan (*Evaluación de la toxicidad*, apartado 7.2), se observó un crecimiento de las levaduras menor respecto al control.

En la figura 7.52 se representa el crecimiento de las levaduras tras la adición de los complejos metálicos de Cu(II) de **L1** y **L3**. En todos los casos los compuestos adicionados ejercen un efecto protector frente al estrés oxidativo, independientemente de la estequiometría Cu(II):L utilizada.

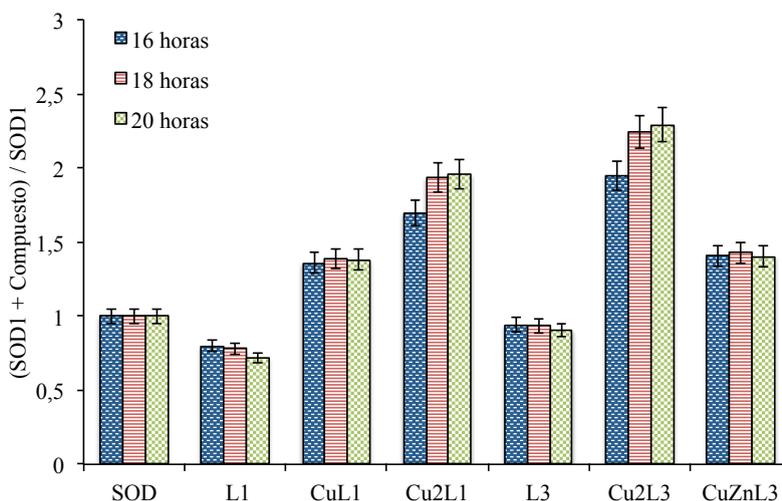


Figura 7.52. Ensayos de crecimiento de las cepas deficientes en SOD1 tratadas con los ligandos libres **L1** y **L3** junto a los correspondientes complejos mononucleares y binucleares de Cu(II) y el complejo heterobinuclear de Cu(II) y Zn(II) de **L3**. [L] = 10^{-5} M.

Tras 20 horas los complejos homobinucleares de **L1** y **L2** aumentaron el crecimiento de las levaduras en un 96 % (**L1**) y un 130% (**L2**) respecto al control. Estos resultados concuerdan con los datos previamente obtenidos mediante el ensayo indirecto de tipo McCord-Fridovich, en cuyo caso se determinó que ambos complejos presentaban una elevada capacidad para la dismutación catalítica del radical superóxido (*Estudios cinéticos*, apartado 7.3.2). Mediante los ensayos de tipo indirecto se determinó que el complejo que presentaba una mayor capacidad catalítica era **Cu₂L1**; sin embargo, en este caso el que presenta una mayor capacidad protectora frente al estrés oxidativo es **Cu₂L3**. Para racionalizar estas discrepancias se debe tener en cuenta que al evaluar la actividad antioxidante de los compuestos en sistemas vivos entran en juego otros factores tales como la biodistribución. Por otro lado, el complejo mononuclear de **L1** presenta la misma capacidad protectora que el complejo heterobinuclear de **L3**, lo que concuerda con los valores anteriormente obtenidos en los estudios cinéticos (k_{cat} , **CuL1** = $(2.72 \pm 0.52) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y **CuZnL3** = $(1.91 \pm 0.25) \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Estos ensayos se repitieron con los correspondientes complejos binucleares de Cu(II) de **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q** (figura 7.53). Los resultados obtenidos fueron positivos y análogos a los descritos para **L1** y **L3**. De los tres complejos ensayados el que mayor capacidad protectora sobre las levaduras presentó fue el compuesto **L1-4Q**. Le sigue en actividad antioxidante **L1-2Py**, mientras que **L1-3Py** es el que menor actividad muestra. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos anteriormente mediante ensayos de tipo *in vitro*, en donde se determinó que los compuestos que presentaban mayor capacidad catalítica eran **L1-2Py** y **L1-4Q**.

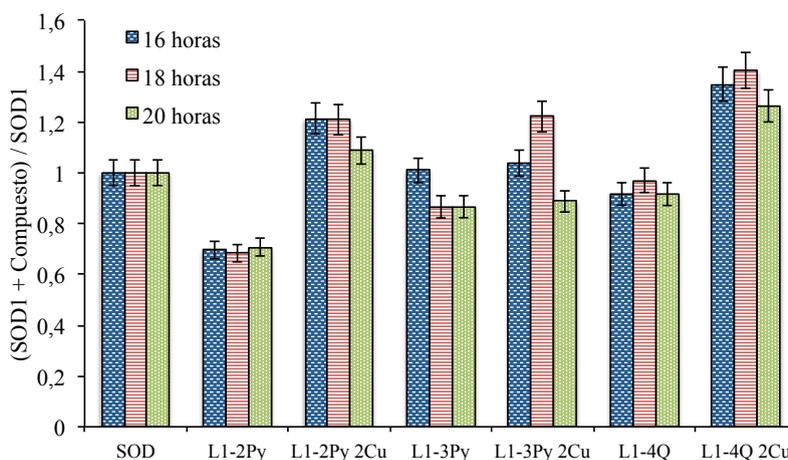


Figura 7.53. Ensayos de crecimiento de las cepas deficientes en SOD1 tratadas con los ligandos libres **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q** junto a los correspondientes complejos de Cu(II) para relaciones molares Cu(II):L 2:1. $[L] = 10^{-5}$ M.

El efecto campana observado en la figura 7.53 (disminución del valor $(SODI+Compuesto)/SODI$ al aumentar el tiempo) se debe a que la referencia se toma en el crecimiento de la cepa deficiente en SOD1, la cual continua su crecimiento respecto al tiempo. Así pues, a tiempos experimentales altos se igualan los crecimientos de las levaduras control con los de los experimentos con los distintos complejos metálicos, tendiendo el valor a la unidad (figura 7.53).

Referencias

- [1] Verdejo, B.; Ferrer, A.; Blasco, S.; Castillo, C. E.; González, J.; Latorre, J.; Máñez, M. A.; Basallote, M. G.; Soriano, C.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2007**, 46(14), 5707-5719.
- [2] Verdejo, B. *Química supramolecular de piridofanos sintéticos*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universitat de València, **2007**.
- [3] Blasco, S. *Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como Miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universitat de València, **2011**.
- [4] Inclán, M. *Nuevos ligandos poliamínicos de tipo escorpiando para aplicaciones biomédicas*; Tesis Doctoral; Facultad de ciencias Químicas. Universitat de València, **2016**.
- [5] González-García, J.; Martínez-Camarena, A.; Verdejo, B.; Clares, M. P.; Soriano, C.; García-España, E.; Jiménez, H. R.; Doménech-Carbó, A.; Tejero, R.; Calvo, E.; Briansó-Llort, L.; Serena, C.; Trefler, S.; García-España, A. *J. Inorg. Biochem.* **2016**, 163, 230-239.
- [6] Clares, M. P.; Blasco, S.; Inclán, M.; Agudo, L. del C.; Verdejo, B.; Soriano, C.; Doménech, A.; Latorre, J.; García-España, E. *Chem. Commun.* **2011**, 47(21), 5988.
- [7] Clares, M. P.; Serena, C.; Blasco, S.; Nebot, A.; Del Castillo, L.; Soriano, C.; Doménech, A.; Sánchez-Sánchez, A. V.; Soler-Calero, L.; Mullor, J. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Inorg. Biochem.* **2015**, 143, 1-8.
- [8] Serena, C.; Calvo, E.; Clares, M. P.; Díaz, M. L.; Chicote, J. U.; Beltrán-Debon, R.; Fontova, R.; Rodríguez, A.; García-España, E.; García-España, *PLoS One* **2015**, 10(3), 1-12.
- [9] Nebot-Guinot, A.; Liberato, A.; Máñez, M. A.; Clares, M. P.; Doménech, A.; Pitarch-Jarque, J.; Martínez-Camarena, A.; Basallote, M. G.; García-España, E. *Inorganica Chim. Acta* **2017**, 472, 139-148.
- [10] Cabiness, D. K.; Margerum, D. W. *J. Am. Chem.Soc.* **1969**, 91, 6540.
- [11] Hinz, F. P.; Margerum, D. W. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1976**, 13, 2941.
- [12] Anichini, A.; Fabbrizzi, L.; Paoletti, P.; Clay, R. M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 244.
- [13] Fabbrizzi, L.; Micheloni, M.; Paoletti, P. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1979**, 1881.
- [14] Izatt, R. M.; Christensen, J. J. *Synthesis of Macrocycles. The Design of Selective Complexing Agents* **1987**, Wiley, New York.

- [15] Hay, B.P.; Hancock, R.D. *Coord. Chem. Rev.* 2001, 212, 61.
- [16] Basallote, M. G.; Doménech, A.; Ferrer, A.; García-España, E.; Llinares, J. M.; Máñez, M. A.; Soriano, C.; Verdejo, B. *Inorganica Chim. Acta* **2006**, 359(7), 2004-2014.
- [17] Martell, A. E.; R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, Vols. 1-6, Plenum Press, New York, 1974, 1975, 1977, 1976, 1982, 1989.
- [18] Ten, A. S.; Humbert, N.; Verdejo, B.; Llinares, J. M.; Elhabiri, M.; Jezierska, J.; Soriano, C.; Kozłowski, H.; Albrecht-Gary, A. M.; García-España, E. *Inorg. Chem.* **2009**, 48(18), 8985-8997.
- [19] Russ, J. C. *Fundamentals of Energy Dispersive X-Ray Analysis*. Ed, M. Ashby Frs R. Kiessling J. Charles, Butterworth-Heinemann, **1984**.
- [20] Fuhrmann, D.; Dietrich, S.; Krautscheid, H. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23(14), 3338-3346.
- [21] Jahn, H. A.; Teller, E. *Proc. R. Soc. Lond. A* **1937**, 161, 220-235
- [22] Beauchamp, C.; Fridovich, I. *Anal. Biochem.* **1971**, 44, 276-287.
- [23] Yao, C. L.; He, L. P.; Korp, J. D.; Bear, J. L. *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 4389-4395.
- [24] Polcyn, D. S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **1966**, 38, 370-375.
- [25] Nicholson, R. S.; Shain, I. *Anal. Chem.* **1965**, 37, 178-190.
- [26] Feldberg, S. W.; Jeftic, L. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 2439-2446.
- [27] Belda, R.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Jiménez, H. R.; Doménech-Carbó, A.; Soriano, C.; Latorre, J.; Terencio, C.; García-España, E. *Dalt. Trans.* **2013**, 42(31), 11194.
- [28] Gralla E. B. *Superoxide dismutase: studies in the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Scandalios J G, editor. *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **1997**, 495-525.
- [29] Longo, V. D.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 12275-12280.
- [30] Liu, X. F.; Elashvili, I.; Gralla, E. B.; Valentine, J. S.; Lapinskas, P.; Culotta, V. C. *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 18298-18302.
- [31] Gralla, E. B.; Valentine, J. S. *J. Bacteriol.* **1991**, 173, 5918-5920.

8. Interacción con ácidos nucleicos

El conocimiento de la estructura del ADN constituyó un gran desafío para los científicos de la primera mitad del siglo XX. Aunque grandes nombres como Linus Pauling y Robert Brainard Corey presentaron hipótesis aproximadas sobre la misma,[1] no se tuvo una idea precisa sobre su naturaleza de doble hélice hasta que James Watson y Francis Crick resolvieron su estructura basándose en los datos de difracción de rayos X de las fibras de ADN obtenidos por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins. El trabajo de J. Watson y F. Crick se publicó el 25 de abril de 1953 en Nature bajo el título: “*Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*”.[2] La descripción de dicha estructura permitió esclarecer como el ADN se podía desenrollar para posibilitar su lectura o copia, asegurándose así la correcta transmisión de los caracteres hereditarios entre células.

El ADN, ácido desoxirribonucleico, es la molécula que contiene la información genética usada en el desarrollo y el funcionamiento de los seres vivos así como de algunos virus. Su análisis estructural indica que el ADN es un polímero formado por unidades simples, llamadas nucleótidos, conectadas entre sí.[3] A su vez, los nucleótidos son moléculas orgánicas formadas por la unión covalente de un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada (figura 8.1). En el caso del ADN el azúcar es la pentosa desoxirribosa. A estos polímeros de nucleótidos se les denomina comúnmente polinucleótidos o ácidos nucleicos.

A diferencia del ADN, el ARN es un polinucleótido lineal y de hebra sencilla, aunque ocasionalmente se encuentra en forma de doble hebra.[4] Los nucleótidos de ARN tienen como azúcar a la ribosa en vez de la desoxirribosa presente en el ADN. En lo que respecta al *rol* biológico del ARN, éste es el encargado de transmitir la información contenida en el ADN durante el proceso de transcripción celular, o lo que es lo mismo, durante la síntesis de proteínas.

Estructura de los nucleótidos

Los nucleótidos son ésteres fosfato de pentosa, en los que cada nucleobase heterocíclica se une al C1' del azúcar (figura 8.1). La unión entre la pentosa y la nucleobase heterocíclica recibe el nombre de nucleósido.

Las nucleobases heterocíclicas se clasifican en dos grupos, las purinas, o bases púricas, y las pirimidinas, o bases pirimidínicas. Las principales bases púricas son la adenina (A) y la guanina (G), mientras que las pirimidínicas son la citosina (C), el uracilo (U) y la timina (T) (figura 8.1). Sin embargo, en las estructuras de las ácidos nucleicos se han detectado más de 80 nucleósidos distintos formados por derivados de estas cinco nucleobases.[5]

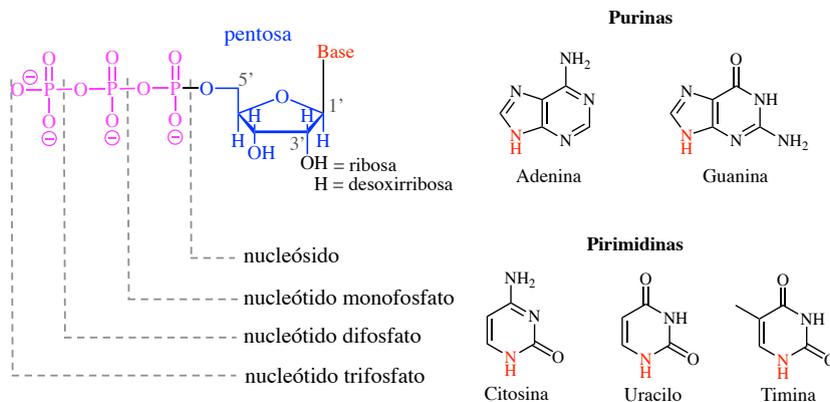


Figura 8.1. Elementos estructurales de los nucleótidos más comunes.

En cuanto a la subunidad de pentosa, ésta puede presentar en el C3' un grupo hidroxilo (ribosa), en cuyo caso se usa el término ribonucleótido, o un hidrógeno (2-desoxirribosa), por lo que se utiliza el término desoxirribonucleótido (figura 8.1). Como se ha indicado anteriormente, el ADN, ácido desoxirribonucleótido, está compuesto por la pentosa 2-desoxirribosa, mientras que el ARN por la ribosa. La presencia de un azúcar

de tipo ribosa o desoxirribosa afecta a la estabilidad de los ácidos nucleicos, ya que la ribosa es menos estable y descompone con mayor facilidad. Dicho factor se relaciona con el papel de cada una de las secuencias en los sistemas biológicos; mientras que el ADN debe presentar una elevada estabilidad ya que almacena la información genética, el ARN es un vehículo puntual encargado de la modulación y transducción génica.[4]

A modo de resumen, en la tabla 8.1 se recogen los nombres y abreviaciones de las principales nucleobases presentes en los ácidos nucleicos, así como los nombres de los correspondientes nucleósidos y nucleótidos.

Tabla 8.1. Nombres y abreviaciones de las nucleobases de los ácidos nucleicos, nucleósido y nucleótidos.

Nucleobase X = H	Nucleósido X = ribosa	Nucleótido X = ribosa monofosfato
Adenina (A)	Adenosina (Ade)	Desoxiadenosina monofosfato (dAMP)
Guanina (G)	Guanosina (Gua)	Desoxiguanosina monofosfato (dGMP)
Citosina (C)	Citidina (Cit)	Desoxicitidina monofosfato (dCMP)
Uracilo (U)	Uridina (Uri)	Uridina monofosfato (UMP)
Timina (T)	Desoxitimidina (dTi)	Desoxitimidina monofosfato (dTMP)

Estructura primaria de los ácidos nucleicos

Se denomina estructura primaria de los ácidos nucleicos a la secuencia de nucleótidos que los conforman, los cuales están conectados entre sí por enlaces fosfato.[6] Así pues, como en el caso de las proteínas, la ADN o ARN polimerasa construye el polímero a partir de los nucleótidos trifosfato, dando lugar a una cadena de nucleótidos la cual sigue siempre el sentido 5'-3' (figura 8.2).

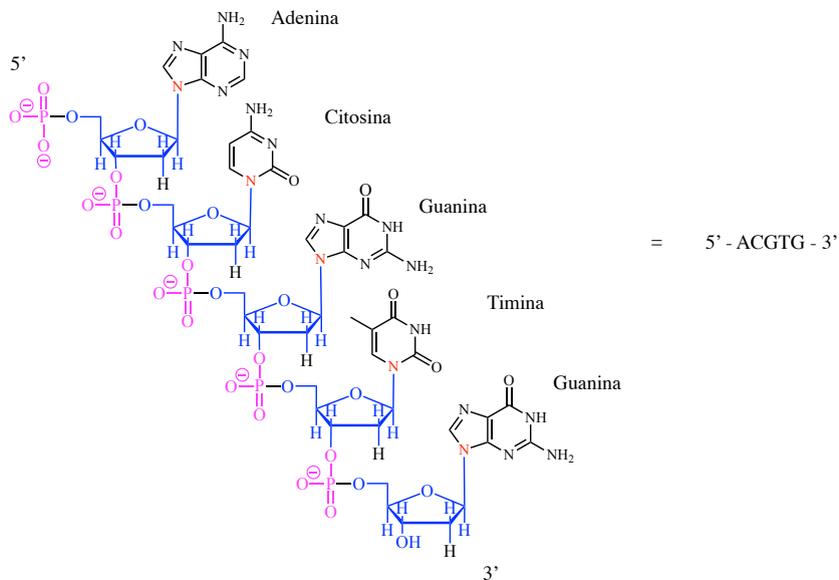


Figura 8.2. Ejemplo de la estructura primaria para la secuencia de ADN 5'-ACGTG-3'.

Además de las diferencia en el tipo de pentosa que poseen, el ADN presenta la base pirimidínica timina (T) mientras que el ARN tiene el uracilo (U). Dado que el esqueleto azúcar-fosfato resulta invariable en todos los polímeros de ADN y ARN, la secuencia específica de las bases nitrogenadas es la que determina la información genética.[7]

Estructura secundaria de los ácidos nucleicos

Se conoce como estructura secundaria de los ácidos nucleicos al plegamiento local regular que adoptan las cadenas. Éstas interactúan entre sí mediante el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases enfrentados e interacciones de apilamiento $\pi - \pi$.

Las dos cadenas son complementarias entre sí y a su vez antiparalelas, pues el extremo 3' de una se enfrenta al extremo 5' de la otra. En el caso del ADN se establecen uniones entre las unidades de G y las de C, así como entre las unidades de A y las de T (figura 8.3). Por otro lado, para el ARN son las nucleobases de U las que establecen la interacción con las de A. Estas asociaciones suelen producirse siguiendo, generalmente, los apareamientos convencionales de tipo Watson y Crick, los cuales implican el establecimiento de dos enlaces de hidrógeno en los contactos A-T y de tres enlaces de hidrógeno en los contactos G-C (figura 8.3).[7]

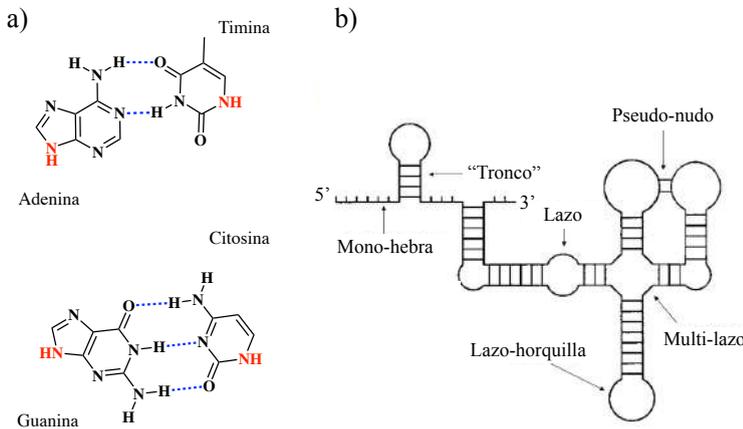


Figura 8.3. (a) Representación de las asociaciones entre los pares de bases A-T y G-C en el ADN. (b) Tipo de estructuras secundarias adoptadas por una monohebra de ADN o ARN.

En el caso del ARN se observa generalmente la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares, lo que conduce a que el ARN presente una mayor diversidad de estructuras secundarias que el ADN (figura 8.3). Sin embargo, el ADN también presenta otros tipos de estructuras secundarias que tienen una gran relevancia biológica (*vide infra*).

Una vez establecida la asociación entre los pares de base de los ácidos nucleicos, éstos se orientan tridimensionalmente para dar lugar a estructuras ordenadas en el espacio. Las fuerzas directoras son, aparte de la interacción directa entre los pares de bases, interacciones de tipo supramolecular entre cadenas cercanas (enlaces de hidrógeno entre las pentosas y los grupos fosfatos, interacciones hidrófobas, etc.). Se ha determinado que la composición, así como la concentración del medio, son factores que condicionan la adopción de las distintas estructuras secundarias de los ácidos nucleicos.[6][7] Por lo general, este tipo de asociaciones dan lugar a la formación de estructuras de doble hélice tipo A, B o Z (figura 8.4).

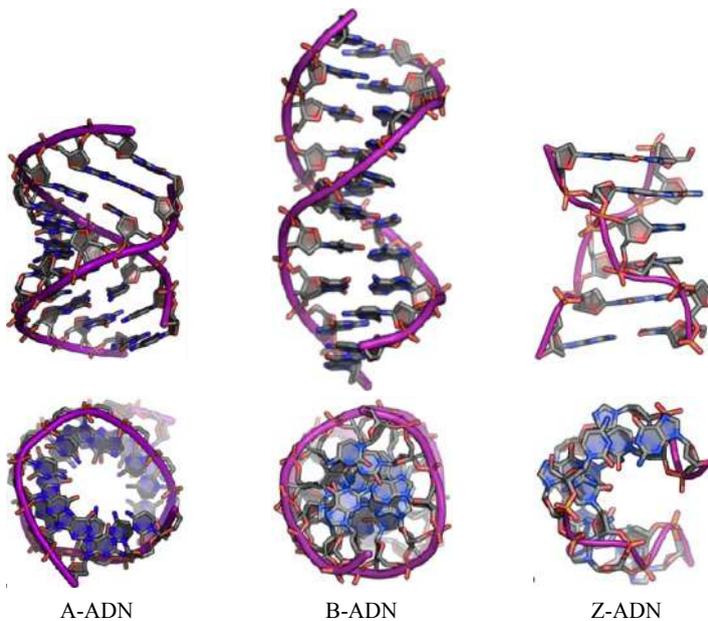


Figura 8.4. Elementos estructurales más comunes del ADN: estructuras de doble hélice tipo A, B y Z.

Sin embargo, durante las últimas décadas se ha determinado que los sistemas vivos presentan estructuras secundarias del ADN diferentes a las de doble hélice. Este tipo de estructuras se forman como consecuencia de la asociación no-canónica entre pares de bases, las cuales conducen a conformaciones de elevada complejidad.[8] Algunos ejemplos de estos motivos estructurales son los cuartetos de guanina (cuarteto-G), los motivos-i, el H-ADN, así como la unión “holliday” (figura 8.5).[9][10]

Se ha demostrado que estas estructuras desempeñan un papel relevante en los distintos procesos en los que están involucrados los ácidos nucleicos, tales como el almacenamiento de la información genética (cromosomas), la replicación del ADN y los procesos de transcripción.

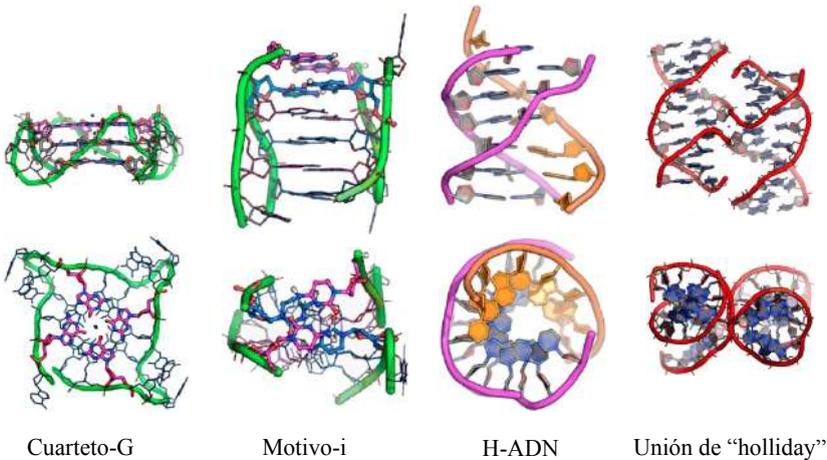


Figura 8.5. Elementos estructurales de los ácidos nucleicos derivados de asociaciones de tipo no-canónicas entre los pares de bases: cuarteto-G, motivos-i, H-ADN y unión de “holliday”.

8.1. Interacción con ácidos nucleicos de doble hélice

Avanzando en los objetivos de la presente tesis se procedió a estudiar la interacción de los receptores sintetizados con distintas secuencias de ácidos nucleicos de estructura de doble hélice.

Para ello se seleccionó el polinucleótido de ADN de timo de ternera (*ctADN*), el cual presenta una secuencia de bases heterogénea adoptando una conformación de doble hélice dextrógira tipo B, con un surco menor estrecho y un surco mayor ancho y poco profundo. Paralelamente, se seleccionó la secuencia sintética modelo de ARN *poliA-poliU*, con una secuencia de bases de A y U alternadas y caracterizada por una estructura de doble hélice dextrógira tipo A, la cual presenta un surco menor ancho y poco profundo y un surco mayor estrecho y profundo.[11][12] En la figura 8.6 se representan estos motivos estructurales.

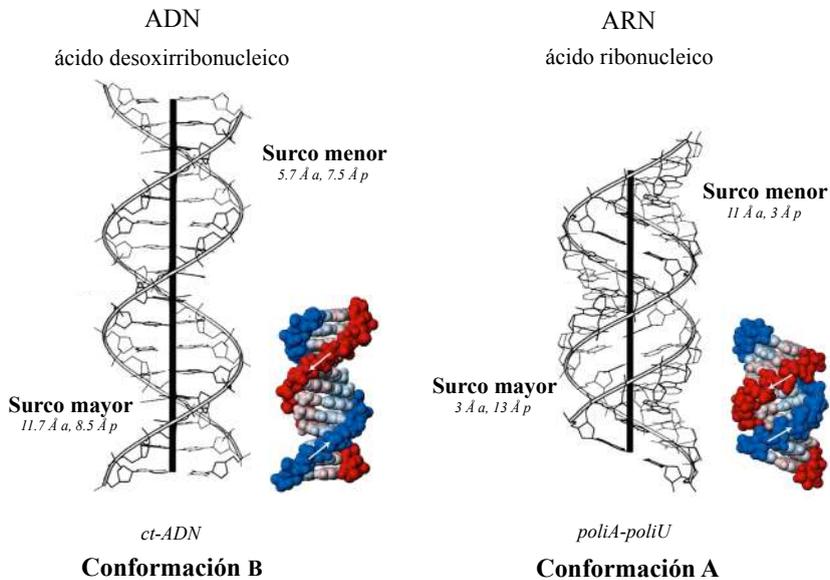


Figura 8.6. Diferencias estructurales entre las conformaciones de doble hélice tipo A y tipo B.

En este apartado se evaluará el modo de interacción de los ligandos **L1** y **L3** (figura 8.7) con las secuencias seleccionadas (figura 8.6). A su vez, se analizará la influencia que tiene la formación de los complejos mono- y binucleares de Zn(II) sobre dicha interacción. Todos los experimentos se han llevado a cabo en medio tamponado NaCac 50 mM a pH 7.4.

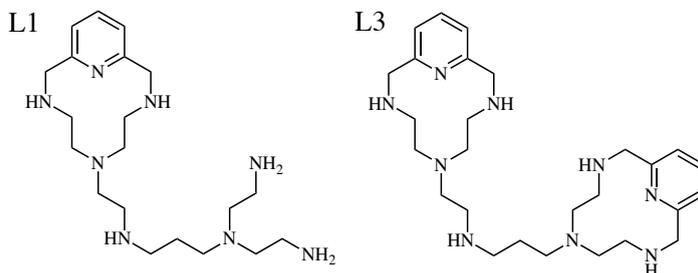


Figura 8.7. Ligandos seleccionados para el estudio de su interacción con el *ctADN* y el *poliA-poliU*.

El número de grupos amino protonados es un factor que se ha de tener en cuenta a la hora de evaluar la interacción entre una poliamina y los ácidos nucleicos, ya que ésta se establece predominantemente mediante interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno.

Como se observa en la figura 8.8, a pH fisiológico los ligandos libres presentan un promedio de 4.5 grupos aminos protonados (*Propiedades ácido-base*, Capítulo 6). Por lo que respecta a los complejos con Zn(II), para relación molar Zn(II):L 1:1 la especie predominante en disolución a pH =7.4 es $[ZnH_2L]^{4+}$ para ambos ligandos. Como se ha discutido anteriormente, en estos complejos el Zn(II) está coordinado por los cuatro nitrógenos de la cavidad macrocíclica así como por el nitrógeno secundario de la cadena central (*Formación de complejos mixtos con Cu(II) y Zn(II)*, apartado 6.1.1.3). En ambos casos los dos grupos amino que no participan en la coordinación del ion metálico se encuentran protonados a este pH (figura 8.8).

Por otro lado, para relación molar Zn(II):L 2:1 la especie $[Zn_2L]^{4+}$ predomina en disolución a pH fisiológico de 7.4. En esta especie todos los grupos amino están implicados en la coordinación de los iones metálicos, no quedando grupos libres susceptibles de ser protonados (figura 8.8). Todos los complejos presentan una carga global 4 a pH fisiológico.

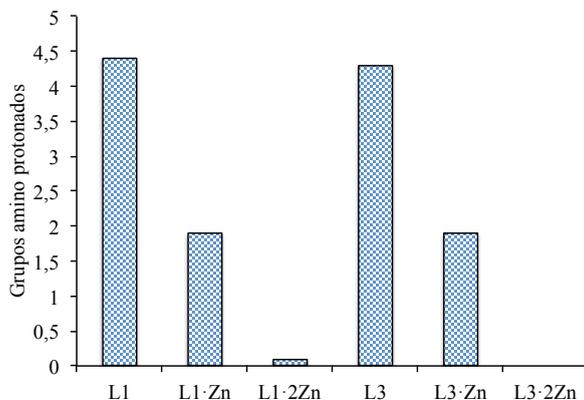


Figura 8.8. Número promedio de grupos amino protonados para los ligandos libres y los correspondientes complejos metálicos de Zn(II) para relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1, a pH 7.4.

8.1.1. Ensayos de desnaturalización térmica

Como se ha mencionado en el apartado anterior, tanto el *ctADN* como el *poliA-poliU* presentan en disolución una conformación de doble hélice, la cual se encuentra estabilizada por enlaces de hidrógeno de tipo canónico entre los pares de bases enfrentados. Sin embargo, mediante el calentamiento progresivo de una disolución que contiene este tipo de secuencias (polinucleótidos) es posible romper los enlaces entre los pares de bases, lo que conduce a un estado en el que las dos hebras complementarias se encuentren disociadas.[13]

El grado de estabilidad de los polinucleótidos libres depende principalmente del contenido en bases G-C, ya que dicha asociación se produce mediante un mayor número de enlaces de hidrógeno respecto a los pares A-T. Por otro lado, la estabilidad térmica de este tipo de conformaciones puede alterarse por su interacción con moléculas de pequeño peso molecular. Se define entonces ΔT_m como la variación entre las temperaturas de fusión del polinucleótido libre y la de los aductos formados con moléculas pequeñas. Este parámetro permite evaluar el grado de estabilización o desestabilización inducida en la conformación de la doble hélice por una molécula. Si bien este método no proporciona evidencias inequívocas para determinar el modo de interacción, sí que aporta información acerca de la magnitud de la asociación entre un ligando y las secuencias estudiadas.[14][15][16][17]

Los experimentos de desnaturalización con los polinucleótidos se llevaron a cabo usando distintas relaciones molares L:polinucleótido ($r = [L]/[\text{polinucleótido}]$).

En la tabla 8.2 se observa como, mientras que los valores de ΔT_m obtenidos en los experimentos llevados a cabo con el *ctADN* varían entre 0.3 y 3.2 °C, los obtenidos para los experimentos llevados a cabo con el *poliA-poliU* alcanzan valores superiores a 16 °C a partir de $r = 0.05$. Al aumentar la concentración de los receptores se observan desplazamientos en los puntos de fusión del *poliA-poliU* mayores de 25° C.

Tabla 8.2. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m , °C) para el *ctADN* y el *poliA-poliU* tras la adición de **L1** y **L3** a distintas relaciones [L]/[polinucleótido] (*r*).

		<i>r</i>				
		0.01	0.05	0.1	0.2	0.5
L1	<i>ctADN</i>	0.3 ^a	0.8	1.9	3.2	(p)
	<i>poliA-poliU</i>	0.5	21.3	22.0	26.5	(p)
L3	<i>ctADN</i>	1.4	1.3	1.0	1.2	1.6
	<i>poliA-poliU</i>	0.2	17.1	16.9	21.4	24.7

(a) Error en $\Delta T_m = 0.5$ °C. (p) Se observa precipitado.

A la vista de estos resultados, es posible concluir que existe una mayor interacción así como una clara selectividad de ambos ligandos hacia la secuencia representativa de ARN *poliA-poliU* (figura 8.9). Como se ha mencionado anteriormente, el *poliA-poliU* presenta una conformación de doble hélice tipo A, cuya estructura presenta un surco menor más ancho y menos profundo respecto al *ctADN*. Este tipo de conformaciones dejan expuestos tanto los grupos fosfato, cargados negativamente, como las nucleobases al exterior, todo ello favoreciendo su interacción con moléculas pequeñas cargadas positivamente.

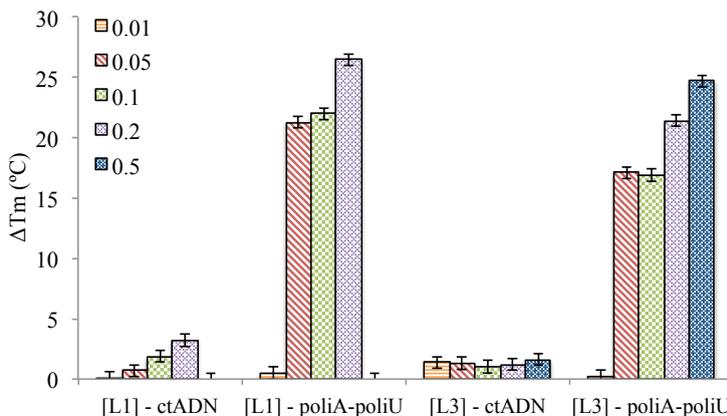


Figura 8.9. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m) para el *ctADN* y el *poliA-poliU* tras la adición de **L1** y **L3** a distintas relaciones [L]/[polinucleótido] (*r*).

8.1.2. Ensayos de desplazamiento de indicador fluorescente

Para profundizar en el estudio de la interacción de **L1** y **L3** con el *ctADN* y el *poliA-poliU* se han llevado a cabo estudios de desplazamiento competitivo de indicador fluorescente. Para ello se ha seleccionado un indicador con propiedades intercalantes (*EB*) y un indicador cuyo sitio de unión preferente es el surco menor de los ácidos nucleicos (*DAPI*) (figura 8.10).

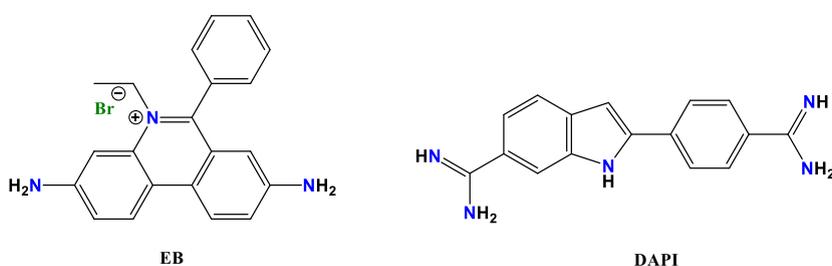


Figura 8.10. Indicadores seleccionados *EB* y *DAPI*.

Si bien ambos indicadores presentan una emisión fluorescente muy débil en disolución, la intensidad de la misma incrementa varios órdenes de magnitud una vez se unen a los ácidos nucleicos. Teniendo en cuenta esta característica, el ensayo se basa en monitorizar las diferencias en el comportamiento emisor de ambas moléculas una vez desplazadas de sus sitios de unión preferentes, en cuyo proceso éstas pasan de un entorno hidrófobo a otro en el que se encuentran totalmente solvatadas por las moléculas de agua del entorno (*Desplazamiento de indicador fluorescente*, apartado 4.6.1.2).[18][19][20] Cabe destacar que el desplazamiento del indicador puede producirse tanto por la competición directa de ambas moléculas por el sitio de unión como por los cambios conformacionales generados en la estructura del ácido nucleico.

Para realizar los ensayos se adiciona un ligero exceso del indicador sobre la secuencia (*ctADN* o *poliA-poliU*) para garantizar que todos los sitios de unión estén saturados (*Desplazamiento de indicador fluorescente*, apartado 4.6.1.2). A continuación se va adicionando el ligando a estudiar.

Ensayos de desplazamiento de EB

Como se observa en la figura 8.11, la adición de cualquiera de los ligandos produce una disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia debido al desplazamiento de las moléculas de *EB* intercaladas entre los pares de bases de los ácidos nucleicos (*ctADN* y *poliA-poliU*).

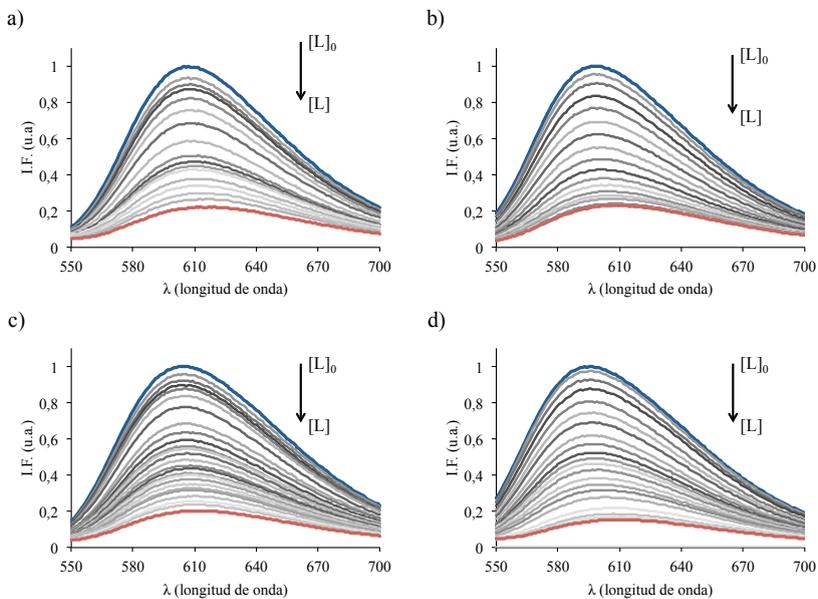


Figura 8.11. Perfiles de variación en la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 520$) obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de *EB* para *ctADN* por adición de (a) **L1** y (c) **L3**, y para *poliA-poliU* por adición de (b) **L1** y (d) **L3**. $[EB] = 3 \times 10^{-6}$ M, NaCac 50 mM, pH = 7.4.

En la figura 8.12 se representa la variación en intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{em}} = 602$ nm) en función de la relación $[L]/[EB]$. Se observa como, para un polinucleótido dado, ambos ligandos producen un desplazamiento similar. Por otro lado, la adición de ambas poliaminas a una disolución que contenía *poliA-poliU* produjo un mayor desplazamiento del *EB* intercalado en comparación con el *ctDNA* (figura 8.12).

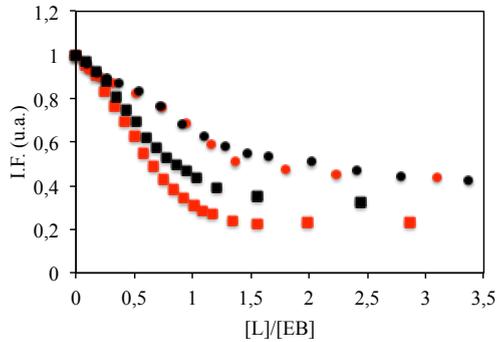


Figura 8.12. Variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 520 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 610 \text{ nm}$) para (●) *ctADN* y (■) *poliA-poliU*, mediante la valoración con (rojo) **L1** y (negro) **L3**. $[\text{EB}] = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$. NaCac 50 mM, pH = 7.4.

Cabe destacar que incluso a valores de $[\text{L}]/[\text{EB}]$ elevados se observa una emisión residual del *EB* (20%) (figura 8.12), todo ello indicando que la interacción de los receptores con el *poliA-poliU* no desplaza totalmente al indicador intercalado. Sin embargo, para $[\text{L}]/[\text{EB}] > 1$ no se observan variaciones significativas en la emisión, lo que sugiere que se han saturado los sitios de unión disponibles para las distintas poliaminas.

Ensayos de desplazamiento de DAPI

La figura 8.13 presenta los ensayos de desplazamiento realizados con el indicador *DAPI*. Al igual que lo observado para el *EB*, para un polinucleótido dado ambos ligandos exhiben un comportamiento similar.

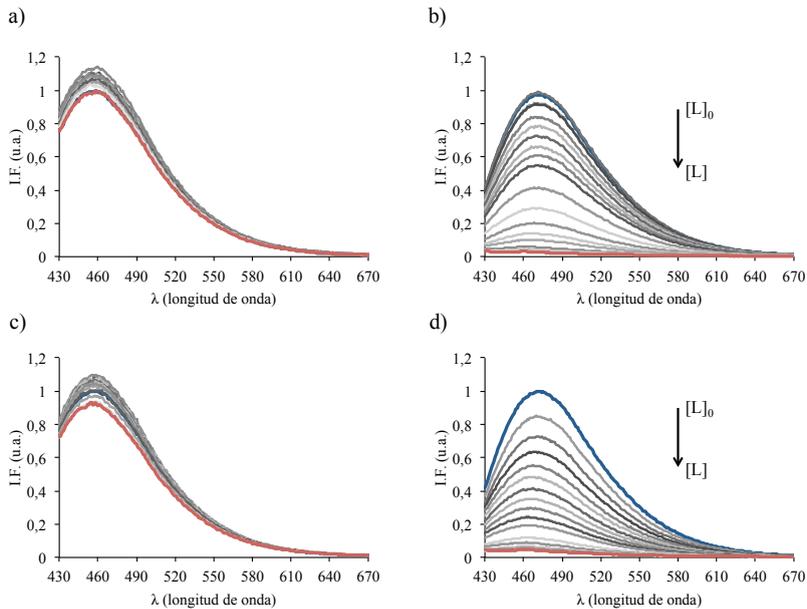


Figura 8.13. Perfiles de variación en la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$) obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de *DAPI* para *ctADN* por adición de (a) **L1** y (c) **L3**, y para *poliA-poliU* por adición de (b) **L1** y (d) **L3**. $[\text{DAPI}] = 10^{-6} \text{ M}$. NaCac 50 mM, pH = 7.4.

En este caso, mientras que para el *poliA-poliU* se observa como la adición de ambas poliaminas produce una desactivación completa de la emisión del colorante, la adición de estos receptores a una disolución de *ctADN* no provoca variaciones significativas en la emisión del marcador (figura 8.14).

Estos resultados sugieren que la interacción de ambas poliaminas desplaza totalmente el *DAPI* situado en el surco menor del *poliA-poliU*. Por otro lado, los experimentos llevados a cabo con *ctADN* no muestran desplazamiento alguno del indicador, lo que permitiría concluir que en este caso la interacción no se produce a través del surco menor de la secuencia (figura 8.14).

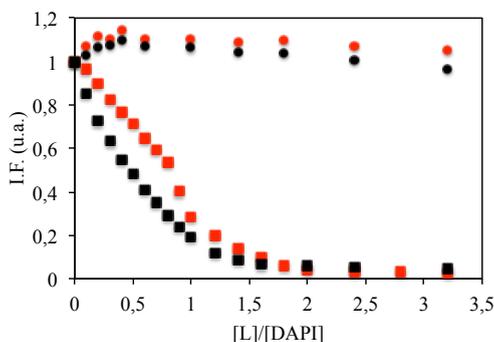


Figura 8.14. Variaciones en la intensidad de emisión de fluorescencia ($\lambda_{\text{ex}} = 400 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 486 \text{ nm}$) para (●) *ctADN* y (■) *poliA-poliU*, mediante la valoración con (rojo) **L1** y (negro) **L3**. $[\text{DAPI}] = 10^{-6} \text{ M}$. NaCac 50 mM, pH = 7.4.

Al comparar los resultados obtenidos mediante ambos indicadores se observa como la magnitud del desplazamiento para el *DAPI* resulta mucho mayor que para el *EB* (figura 8.12 y figura 8.14). En el caso del *DAPI* la adición de aproximadamente dos equivalentes de **L1** y **L3** genera un desplazamiento del 100% del indicador unido al *poliA-poliU*. A la vista de estos resultados, y teniendo en cuenta que una unidad de *DAPI* interacciona con 10 pares de bases, es posible afirmar que el sitio de unión de cada molécula de receptor abarca un mínimo de 5 pares de bases.

Por otro lado, si bien los resultados parecen indicar que la interacción se produce a través del establecimiento de múltiples enlaces de hidrógeno entre los grupos amonio y las cadenas azúcar-fosfato, mediante estas técnicas no es posible descartar que existan fenómenos de intercalación de los anillos de piridina entre los pares de bases de las secuencias.

A partir de las isotermas de los ensayos de desplazamiento obtenidas para ambos indicadores es posible calcular los valores de IC₅₀ para cada sistema (tabla 8.3). El valor IC₅₀ corresponde a la relación [L]/[indicador] que produce el 50% de disminución de la intensidad inicial.

Tabla 8.3. Valores de IC₅₀ obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de *EB* y *DAPI* para la interacción de los polinucleótidos *ctADN* y *poliA-poliU* con **L1** y **L3**.

		<i>EB</i>	<i>DAPI</i>
L1	<i>poliA-poliU</i>	0.63	0.86
	<i>ctADN</i>	1.37	
L3	<i>poliA-poliU</i>	0.86	0.43
	<i>ctADN</i>	2.03	

Al analizar los valores de IC₅₀ obtenidos mediante los ensayos con el *EB* se observa un mayor grado de interacción de ambas moléculas hacia el *poliA-poliU* respecto al *ctDNA*, siendo parecidos los valores obtenidos para **L1** y **L3** (tabla 8.3). Por otro lado, en los ensayos llevados a cabo con el *DAPI* **L3** presenta un valor de IC₅₀ significativamente menor que **L1**, lo cual puede relacionarse con una mayor afinidad del receptor hacia el *poliA-poliU*.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento permiten extraer cierta información acerca del modo de interacción de **L1** y **L3** con las distintas secuencias de ácidos nucleicos. Así pues, de las valoraciones llevadas a cabo con *EB* y *DAPI* se extrae que ambos ligandos muestran una elevada selectividad hacia *poliA-poliU*; esto es así ya que, debido a sus propiedades estructurales intrínsecas, en esta secuencia los grupos fosfato y las bases nitrogenadas quedan expuestas hacia el exterior, facilitando la interacción de moléculas a través del surco menor. Esto, junto a la elevada carga que presentan ambas poliaminas en condiciones fisiológicas, conduce a una elevada interacción entre éstas y la secuencia de *poliA-poliU*. Este fenómeno ya se había observado en compuestos previamente obtenidos

en el GQS-UV que presentaban dos macrociclos de piridina unidos por cadenas poliamínicas centrales de distinta naturaleza. Estudios llevados a cabo con distintas secuencias de ácidos nucleicos revelaron una elevada predilección de estos derivados para interactuar de forma selectiva con la secuencia representativa de ARN *poliA-poliU*. [21]

Por otro lado, las disimilitudes estructurales entre ambas poliaminas permitirán explicar las diferencias observadas entre **L1** y **L3** en los ensayos con *DAPI*. Así pues, la ausencia de aminas primarias en la estructura de **L3**, las cuales presentan un mayor grado de solvatación respecto al anillo de piridina en disolución acuosa, explicaría la mayor capacidad de esta poliamina para interactuar con las secuencias de ácidos nucleicos.

8.1.3. Influencia de la coordinación con Zn(II) en la interacción

Una vez corroborada la selectividad de **L1** y **L3** hacia el *poliA-poliU* se procedió a evaluar como influye en dicha interacción la formación de los complejos de Zn(II). Para ello se llevaron a cabo estudios de desnaturalización térmica y valoraciones con los distintos indicadores fluorescentes (*EB* y *DAPI*) utilizando distintas relaciones molares Zn(II):L.

Como se observa en la tabla 8.4 y la figura 8.15, la formación de los complejos de Zn(II) produce una marcada disminución en los valores de ΔT_m respecto a los determinados para los ligandos libres. Así pues, la adición de un equivalente de Zn(II) disminuye los ΔT_m en 19.4 °C para **L1** y en 13.0 °C para **L3**. La coordinación de un segundo Zn(II) genera, de nuevo, un descenso en los valores de ΔT_m respecto a los ligandos libres; llegándose a observar para **L3** una ligera desestabilización de la conformación de doble hebra ($\Delta T_m < 0$).

Tabla 8.4. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m , °C) para el *poliA-poliU* tras la adición de los complejos metálicos de **L1** y **L3** utilizando relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1, $[L]/[\text{polinucleótido}] = 0.05$.

	L	1:1	2:1
L1	21.3 ^a	1.9	1.1
L3	17.1	4.1	-0.9

(a) Error en $\Delta T_m = 0.5$ °C.

Para relaciones molares Zn(II):L 2:1 las especies predominantes en disolución a pH fisiológico son $[\text{Zn}_2\text{L1}]^{4+}$ y $[\text{Zn}_2\text{L3}]^{4+}$, en ambos complejos los grupos amino están involucrados en la coordinación de los centros metálicos (figura 8.8). Así pues, la coordinación del Zn(II) modifica la capacidad de **L1** y **L3** para establecer enlaces de hidrógeno direccionales con los grupos fosfato expuestos en el surco menor del *poliA-poliU*, lo que

explicaría el menor grado de estabilización observado para los complejos respecto a los ligandos libres (valores de ΔT_m menores) (tabla 8.4 y figura 8.15). A raíz de estos datos, es posible concluir que existe un bloqueo en la interacción de **L1** y **L3** con el *poliA-poliU* asociado a la formación de los complejos metálicos de Zn(II).

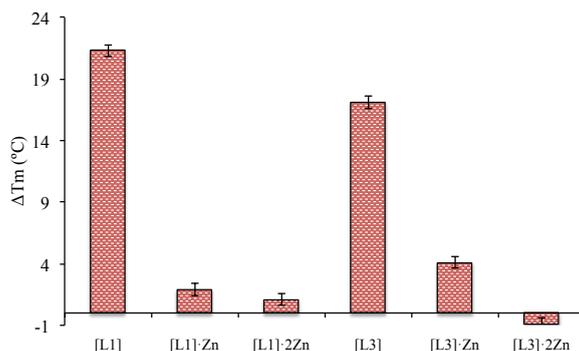


Figura 8.15. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m) para el *poliA-poliU* tras la adición de **L1** y **L3** junto a los complejos metálicos de Zn(II) para relaciones molares Zn(II):L 1:1 y 2:1, [L]/[polinucleótido] = 0.05.

Por último, se realizaron ensayos de desplazamiento de indicador fluorescente con el *poliA-poliU*. Para ello se registraron los espectros de emisión de fluorescencia para cada uno de los colorantes tras la adición de un equivalente de los correspondientes complejos metálicos binucleares de **L1** y **L3** (figura 8.16).

En la figura 8.16 se observa que en los experimentos llevados a cabo utilizando *EB* ambos complejos binucleares de **L1** y **L3** desplazan un porcentaje del indicador inferior al 20%, mientras que los ligandos libres desplazan respectivamente un 70% y un 52% del indicador. Todo esto parece indicar que al no establecerse los enlaces de hidrógeno entre los grupos amonio y el *poliA-poliU* se disminuye el grado de distorsión generado en la secuencia, lo que se traduce en un menor desplazamiento del indicador *EB* intercalado.

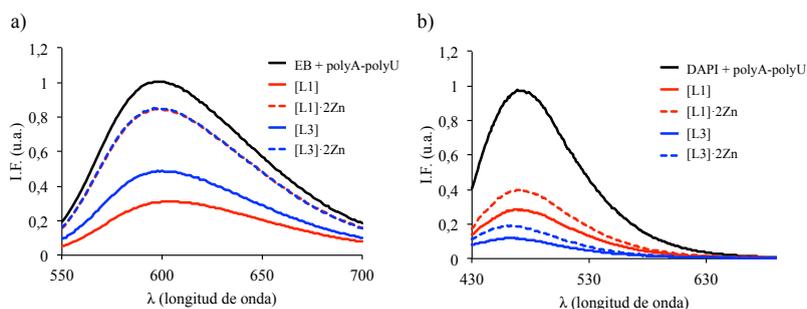


Figura 8.16. Espectros de emisión de fluorescencia para los ensayos de desplazamiento con (a) *EB* y (b) *DAPI*, $[L]/[\text{indicador}] = 1$.

Para los ensayos llevados a cabo con el indicador *DAPI* no se aprecian diferencias significativas en la magnitud de desplazamiento observada para los complejos de Zn(II) respecto a los ligandos libres. En la figura 8.16 se observa que la adición de los complejos binucleares de **L1** y **L3** conduce a un desplazamiento mayor del 60%, todo ello sugiriendo que, al igual que para los ligandos libres, el modo preferente de unión de las especies $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$ con el *poliA-poliU* es el surco menor.

Otra conclusión extraída de los ensayos de desplazamiento de indicador fluorescente es la conveniencia de utilizar *DAPI* como sonda fluorescente para el estudio de la interacción entre este tipo de compuestos poliamínicos y secuencias de ácidos nucleicos. En base a los resultados éstos se unen a los surcos de los ácidos nucleicos por lo que el uso de este marcador permite obtener un modelo más preciso.

8.2. Interacción con ácidos nucleicos de secuencia específica

Avanzando en los objetivos de la tesis, se procedió a evaluar la capacidad de **L1-A** para actuar como sonda fluorescente para la detección de secuencias de ácidos nucleicos que presentaran estructuras secundarias distintas a las de doble hélice.

En la figura 8.17 se presentan las poliaminas seleccionadas para llevar a cabo estos estudios: el compuesto **L1-A**, el cual presenta un anillo macrocíclico así como dos unidades antraceno al final de la cadena lateral; el precursor **L1**, que comparte un esqueleto común a **L1-A** aunque carece de unidades intercalantes; y la poliamina **L-A** (*pytren-A*), la cual presenta la misma cavidad macrocíclica pero sólo cuenta con un antraceno al final de la cadena central. Las distintas características estructurales que presentan este grupo de poliaminas permitirán evaluar posibles fenómenos de bis-intercalación por parte del derivado **L1-A**.

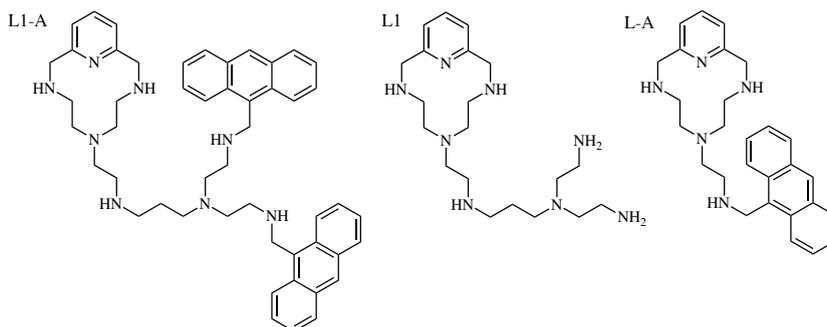


Figura 8.17. Ligandos seleccionados para el estudio de su interacción con ácidos nucleicos de secuencia específica.

Como se ha mencionado anteriormente, el número de grupos amonio presentes en una poliamina es un factor a tener en cuenta a la hora de evaluar su interacción con ácidos nucleicos. Así pues, a partir de los datos obtenidos mediante medidas potenciométricas (*Propiedades ácido-base*, Capítulo 6), junto a los datos bibliográficos de L-A,[22] se ha determinado el número promedio de grupos amino protonados para cada una de la especies a pH fisiológico ($L1 = 4.5$, $L1-A = 3.4$ y $L-A = 2.4$).

Se seleccionaron un total de 8 secuencias de oligonucleótidos las cuales, una vez hibridadas en el tampón de trabajo, presentan estructuras de tipo *horquilla* (*hp* hace referencia la abreviatura de la palabra inglesa *hairpin*) (tabla 8.5).[23] Estas secuencias pueden dividirse en dos grupos en función de sus características: el primero grupo se compone de 4 secuencias con diferentes propiedades estructurales, estas variaciones permiten analizar el modo de interacción de las moléculas seleccionadas hacia secuencias de ácidos nucleicos que presentan conformaciones de tipo *horquilla* (*hp 1-4*); el segundo grupo incluye 4 secuencias que presentan repeticiones de trinucleótidos CXG, donde X hace referencia a una nucleobase, lo que permite estudiar la respuesta fotoquímica de L1-A hacia secuencias que presentan este tipo de reiteraciones aberráticas (*hp_{CXG}*).

Tabla 8.5. Secuencias de oligonucleótidos seleccionadas.

Abreviación	Secuencia completa (5'-3')
<i>hp 1</i>	GGC-AAA-ATT-TCG-TTT-TTC-GAA-ATT-TTG-CC
<i>hp 2</i>	GGC-AAG-CTT-CGC-TTT-TTG-CGA-AGC-TTG-CC
<i>hp 3</i>	GGC-GAA-GGC-AGC-TTT-TTG-CTG-CCT-TCG-CC
<i>hp 4</i>	GGC-AGG-CCC-AGC-TTT-TTG-CTG-GGC-CTG-CC
<i>hp_{CAG}</i>	TTC-AGC-AGA-ATG-TTT-CAG-CAG-AA
<i>hp_{CGG}</i>	TTC-GGC-GGA-ATG-TTT-CGG-CGG-AA
<i>hp_{CCG}</i>	TTC-CGC-CGA-ATG-TTT-CCG-CCG-AA
<i>hp_{CTG}</i>	TTC-TGC-TGA-ATG-TTT-CTG-CTG-AA

8.2.1. Secuencias de tipo *horquilla*

Los oligonucleótidos seleccionados en el primer grupo están compuestos por 29 bases y adoptan una conformación de tipo *horquilla* una vez hibridados en el tampón de trabajo. Como se puede observar en la figura 8.18, esta estructura presenta un bucle central compuesto por 5 unidades de timina (T) unidos a una sección de 12 pares de bases enfrentadas entre sí, la cual presenta una estructura de doble hélice. La conformación descrita se mantiene estabilizada por medio de los 2 pares de bases G-C contiguos al bucle central así como por otros 3 pares G-C presentes al final (figura 8.18).

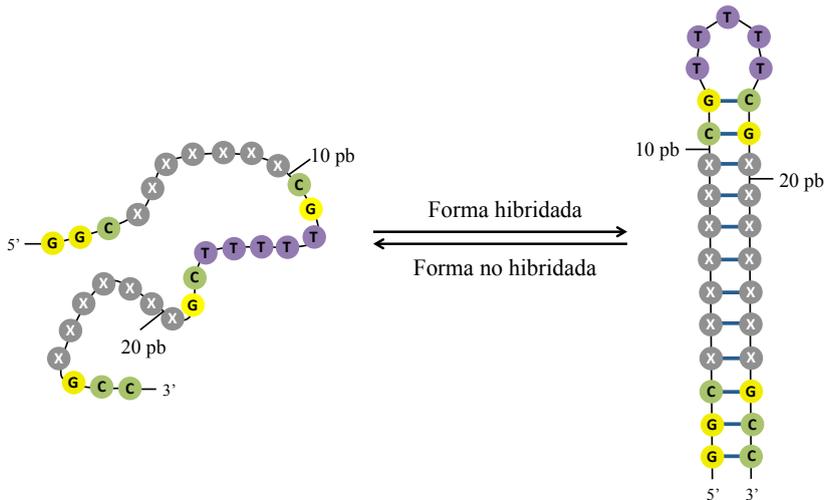


Figura 8.18. Representación del equilibrio conformacional entre la forma hibridada y la no hibridada para las secuencias *hp 1-4*.

La composición de bases específica para cada secuencia se muestra en la tabla 8.6. En ella se puede ver como el primer oligonucleótido, *hp 1*, presenta una secuencia rica en A y T (AAAATTT) entre los pares de bases G-C. Las otras secuencias varían entre una composición rica en G y C (AGGCC, *hp 4*) así como las correspondientes composiciones mixtas: una secuencia rica en A y T con bases C y G intercaladas (AAGCTT, *hp 2*) y una secuencia rica en G y C con bases A y T intercaladas (GAAGGC, *hp 3*) (tabla 8.6).

Tabla 8.6. Oligonucleótidos *hp 1-4*.

	Secuencia completa (5'-3')
<i>hp 1</i>	GGC-AAAATTT-CG-TTTTT-CG-AAATTTT-GCC
<i>hp 2</i>	GGC-AAGCTT-CGC-TTTTT-GCG-AAGCTT-GCC
<i>hp 3</i>	GGC-GAAGGC-AGC-TTTTT-GCT-GCCTTC-GCC
<i>hp 4</i>	GGC-AGGCC-AGC-TTTTT-GCT-GGGCCT-GCC

Si bien una vez hibridadas las 4 secuencias seleccionadas presentan estructuras de tipo *horquilla* (figura 8.18), éstas difieren en dimensiones y características de los surcos que las forman. Esta variabilidad estructural resulta de gran utilidad para analizar los modos de enlace de los ligandos seleccionados hacia este tipo de conformaciones.

En el presente capítulo se estudiará la interacción de los ligandos seleccionados con las secuencias mediante el uso de distintas técnicas espectroscópicas (UV-Vis, emisión de fluorescencia y dicroísmo circular). Los experimentos se han llevado a cabo en medio tamponado TRIS 20 mM y NaCl 100 mM a pH 7.4.

Por último se presenta un estudio exhaustivo sobre este tipo de interacciones mediante técnicas computacionales (estudios de dinámica molecular).

Espectroscopía de emisión de fluorescencia

La fluorescencia intrínseca de **L1-A** y **L-A** permite evaluar de forma directa su interacción con las secuencias *hp* seleccionadas (*hp 1-4*). Así pues, se monitorizaron las variaciones en los espectros de emisión de los ligandos tras adicionar cantidades crecientes de los distintos oligonucleótidos (figura 8.19 y figura 8.20).

En la figura 8.19 se observa como la interacción de **L1-A** con *hp 2*, *hp 3* y *hp 4* produce una desactivación casi total de la emisión de la poliamina. Sin embargo, tras la adición de la secuencia rica en A y T (*hp 1*) se produce un aumento de la fluorescencia de **L1-A** acompañado de un ligero desplazamiento batocrómico del máximo de emisión, $\Delta\lambda = 12$ nm (figura 8.19).

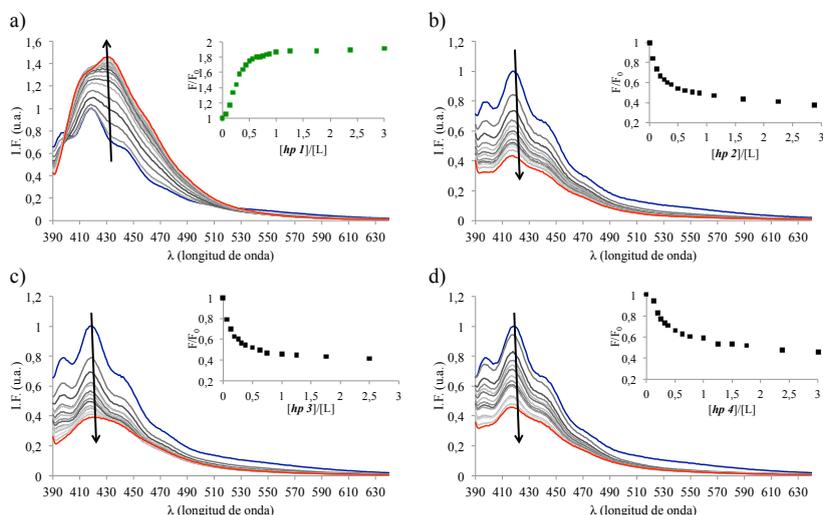


Figura 8.19. Variación en los espectros de emisión de fluorescencia de **L1-A** tras la adición de (a) *hp 1*, (b) *hp 2*, (c) *hp 3* y (d) *hp 4* ($\lambda_{\text{exc}} = 371$ nm). Las gráficas internas presentan la intensidad emisión a 418 nm (*hp 2-3*) y 430 (*hp 1*) respecto a $[hp]/[L]$. $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.

Al representar la intensidad de emisión respecto a la relación $[hp]/[L1-A]$ se observa saturación para $r = 0.5$ en el caso de **hp 1**, mientras que para las demás secuencias esta saturación se alcanza para valores de r cercanos a 1 (figura 8.19). Estos datos sugieren que dos moléculas de **L1-A** interaccionan con un equivalente de **hp 1**, mientras que para **hp 2**, **hp 3** y **hp 4** se requeriría una sola molécula para alcanzar la saturación.

Resulta interesante destacar que cuando se realizan los experimentos con el ligando que presenta una sola unidad intercalante, **L-A**, se observó en todos los casos una disminución de la intensidad de emisión de fluorescencia (figura 8.20). Análogamente a lo observado para **L1-A**, la adición de **hp 1** a una disolución de **L-A** viene acompañada de un desplazamiento del máximo de emisión hacia el rojo, $\Delta\lambda = 12$ nm. Por otro lado, en la figura 8.20 se observa como para los 4 oligonucleótidos se alcanza la saturación para valores de r cercanos a 1.

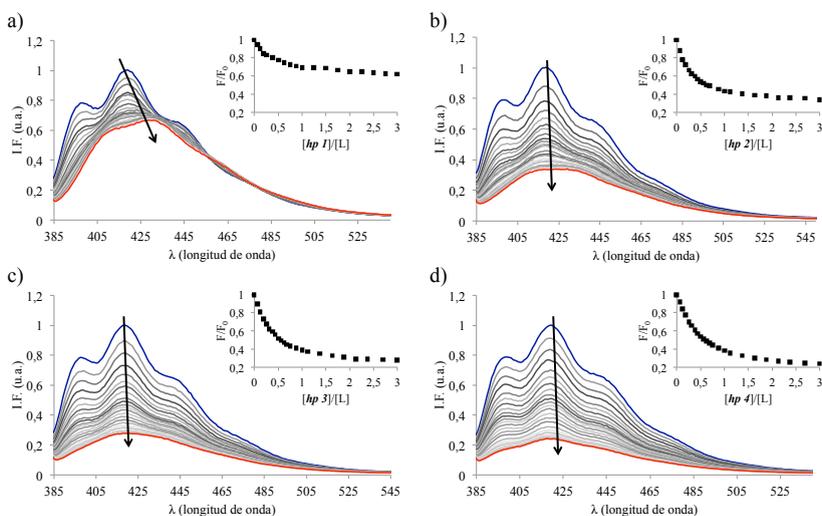


Figura 8.20. Variación en los espectros de emisión de fluorescencia de **L-A** tras la adición de (a) **hp 1**, (b) **hp 2**, (c) **hp 3** y (d) **hp 4** ($\lambda_{exc} = 371$ nm). Las gráficas internas presentan la intensidad de emisión a 418 nm respecto a $[hp]/[L]$. $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.

Los datos obtenidos de las valoraciones fluorimétricas permiten estimar las constantes de afinidad (K_{aff}) para la interacción de **L1-A** y **L-A** con las secuencias **hp 1-4** (tabla 8.7).

Los valores obtenidos para **L1-A** reflejan una mayor afinidad de la poliamina hacia la secuencia rica en A y T (**hp 1** = $(3.6 \pm 2.9) \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), siendo la constante un orden de magnitud mayor que las obtenidas para las demás secuencias, los valores calculados siguen la tendencia **hp1** > **hp2** \approx **hp 3** > **hp 4** (tabla 8.7).

Por otro lado, las constantes obtenidas para **L-A** son del mismo orden independientemente del oligonucleótido considerado ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), siendo la constante obtenida para **hp 1** ligeramente superior. Los valores determinados se encuentran dentro del mismo orden de magnitud respecto a aquellos obtenidos previamente al evaluar la interacción de **L-A** con otro tipo de secuencias de ácidos nucleicos (K_{aff} : poli d(AT)₂ = $5.01 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, poli d(GC)₂ = $7.94 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y ctADN = $5.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).[24]

Tabla 8.7. Constantes de estabilidad (K_{aff} , $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) calculadas a partir de los valores obtenidos en las valoraciones fluorimétricas para la interacción de **L1-A** y **L-A** con **hp 1-4**. F/F₀ representa la relación entre la intensidad inicial y final ($\lambda_{em} = 418 \text{ nm}$).

		L1-A	L-A
hp 1	K_{aff}	$(3.6 \pm 2.9) \times 10^7$	$(9.50 \pm 3.40) \times 10^5$
	F/F ₀	$\lambda_{418 \text{ nm}} = 1.35; \lambda_{430 \text{ nm}} = 1.89$	0.61
hp 2	K_{aff}	$(1.57 \pm 0.15) \times 10^6$	$(1.8 \pm 0.5) \times 10^6$
	F/F ₀	0.40	0.35
hp 3	K_{aff}	$(2.5 \pm 0.2) \times 10^6$	$(1.16 \pm 0.16) \times 10^6$
	F/F ₀	0.42	0.27
hp 4	K_{aff}	$(5.1 \pm 0.6) \times 10^5$	$(1.8 \pm 0.6) \times 10^6$
	F/F ₀	0.41	0.32

La tabla 8.7 recoge además las variaciones en emisión de fluorescencia (F/F_0) de **L1-A** y **L-A** generadas por su interacción con las distintas secuencias. Curiosamente, para **L1-A** se observa una activación de la banda centrada sobre 430 nm (estado ON) al adicionar cantidades crecientes de *hp 1*, viéndose incrementada la emisión en un 89 %. Por otro lado la interacción con el resto de los oligonucleótidos produce una desactivación de la emisión del 60 %. Para **L-A** se observa una desactivación de la emisión de fluorescencia del ligando independientemente de la secuencia adicionada (tabla 8.7).

Ensayos de desnaturalización térmica

Ya que los máximos cambios en los ensayos de fluorescencia se obtienen para $r = 0.5$ y $r = 1$, se seleccionaron estas relaciones *hp*:L para llevar a cabo los ensayos de desnaturalización con las tres poliaminas. En el caso de **L1-A** también se observan cambios para un exceso de ligando, así pues se realizaron medidas para $r = 0.2$.

Los valores de las temperaturas de fusión (T_m) obtenidos para los oligonucleótidos libres siguen la tendencia *hp 1* < *hp 2* < *hp 3* < *hp 4*, lo cual está en consonancia con el contenido de bases C y G en cada uno de ellos (tabla 8.8).

Tabla 8.8. Valores de T_m obtenidos para las secuencias *hp 1-4* libres junto a los valores de ΔT_m determinados para distintas relaciones [*hp*]/[L].

	libre	L1-A			L1		L-A	
		0.2	0.5	1	0.5	1	0.5	1
<i>hp 1</i>	74.8 ^a	4.5	2.2	1.8	0.3	0.2	1.2	0.5
<i>hp 2</i>	86.4	3.7	2.0	1.5	0.7	0.6	1.0	1.4
<i>hp 3</i>	89.3	3.2	1.7	1.0	0.7	0.7	1.3	0.8
<i>hp 4</i>	92.2	3.0	0.5	0.6	0.5	0.2	0.6	1.0

(a) Error en $T_m = 0.5$ °C.

En la tabla 8.8 se presentan los valores de ΔT_m obtenidos para los distintos sistemas $hp:L$. Se observa cómo la interacción de **L1** y **L-A** con las distintas secuencias no produce en ningún caso una estabilización significativa de la conformación de tipo *horquilla* ($\Delta T_m \approx 1$ °C). Sin embargo, la interacción de **L1-A** con las cuatro secuencias se traduce en un desplazamiento de las temperaturas de fusión hacia valores más positivos, todo ello indicando una estabilización de la conformación por medio de la formación del aducto. La mayor estabilización se obtiene para la secuencia que tiene mayor contenido de residuos A y T (**hp 1**), mientras que a medida que se aumenta el contenido en G y C los valores de ΔT_m disminuyen (figura 8.21); siguiendo la misma tendencia observada para las K_{aff} calculadas a partir de los datos espectroscópicos.

Estos resultados sugieren un papel potencialmente interesante de los dos grupos intercalantes, indicando que la interacción de **L1-A** hacia las distintas secuencias se produce a través de la inserción de ambos grupos aromáticos entre los pares de bases. Sin embargo, a pesar de que está bien establecido que la intercalación de pequeñas moléculas entre las bases que conforman la doble hélice producen típicamente un incremento de los valores de T_m , [22][24] este método no proporciona evidencias inequívocas para descartar otros modos de interacción. [13]

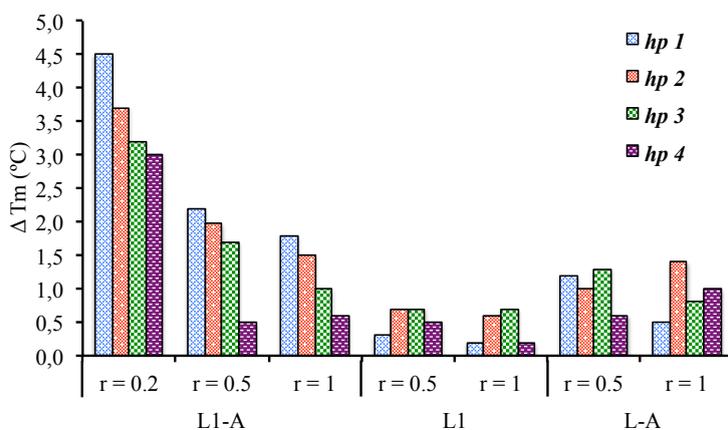


Figura 8.21. Variación en los puntos de fusión (ΔT_m) para **hp 1-4** a distintas relaciones $[hp]/[L]$.

Estudios de dicroísmo circular

La espectroscopia de dicroísmo circular (DC) es una herramienta altamente sensible para caracterizar las estructuras secundarias de moléculas quirales tales como proteínas y ácidos nucleicos.[25][26] Así pues, se ha utilizado esta técnica para monitorizar los cambios conformacionales en las secuencias tipo *horquilla* inducidos por su interacción con los distintos receptores. Por otro lado, moléculas aquirales como son **L1**, **L1-A** y **L-A** pueden adoptar conformaciones quirales como consecuencia de su interacción con ácidos nucleicos, exhibiendo un espectro de DC inducido (DCI).[27][28] Lo que permite a su vez evaluar este tipo de asociaciones mediante el seguimiento de las bandas características de los distintos receptores.

Los espectros de DC de las horquillas estudiadas se rigen por la conformación de doble hélice adoptada por el tronco de la estructura, aunque el bucle de cadena simple central puede contribuir ligeramente a los espectros completos. Como se observa en la figura 8.22, todas las secuencias estudiadas muestran un espectro de DC representativo de conformaciones tipo B, las cuales se caracterizan por una banda positiva a 285 nm y una elipticidad negativa a 250 nm. Sin embargo, para *hp 4* se observa la presencia de una banda positiva más amplia, con dos máximos a 282 y 269 nm, junto a dos bandas negativas centradas a 246 y 230 nm (figura 8.22). Este perfil de DC resulta característico de secuencias ricas en G y C, y a su vez sugiere que ésta adopta una conformación de doble hélice de tipo B inusual, con algunas características distintivas de la formas tipo A. Por otro lado, tanto *hp 1* como *hp 2* presentan un pico positivo de baja intensidad a 220 nm, característico de las secuencias ricas en A y T.[29]

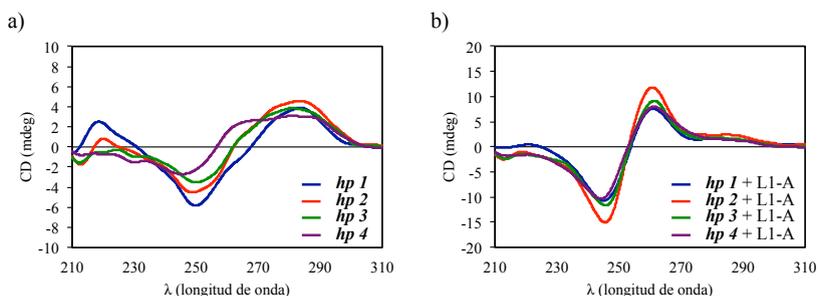


Figura 8.22. Datos de DC para (a) las secuencias *hp 1-4* libres y (b) tras la adición de **L1-A**, $[hp]/[L] = 0.1$. $[hp] = 10^{-6}$ M.

En la figura 8.22 se observa como, tras la adición de **L1-A** los perfiles de DC obtenidos para los cuatro oligonucleótidos resultan casi idénticos, todo ello sugiriendo que la interacción con la poliamina produce los mismos cambios conformacionales independientemente de la secuencia considerada. Por otro lado, debido al nuevo ambiente asimétrico al que es sometida la poliamina, ésta puede adoptar una conformación quiral lo que puede contribuir al espectro de DC observado.

A modo de ejemplo, durante la valoración de *hp 1* con **L1-A** se observa como la elipticidad positiva a 285 nm disminuye en intensidad con la aparición concomitante de una nueva banda positiva centrada a 262 nm (figura 8.23). Además, la banda negativa se desplaza de 250 nm a 245 nm generándose a su vez un aumento en intensidad. Por otro lado, la banda centrada a 220 nm desaparece totalmente.

El desenrollamiento clásico de la doble hélice de ADN inducido por agentes intercalantes produce una fuerte disminución en la intensidad de la banda de centrada sobre 280 nm.[30] Por otro lado, estudios anteriores llevados a cabo en el GQS-UV han demostrado que la intercalación de unidades antraceno entre los pares de bases produce la aparición de una banda positiva de DC a 260 nm junto a una aparición concomitante de una banda DCI negativa a 240 nm. [22] Por todo ello, es posible concluir que las

variaciones en los espectros de DC observadas pueden atribuirse a la unión de **L1-A** al oligonucleótido (figura 8.23 y figura 8.24), en cuyo caso los antracenos estarían en paralelo con el eje de los pares de bases.

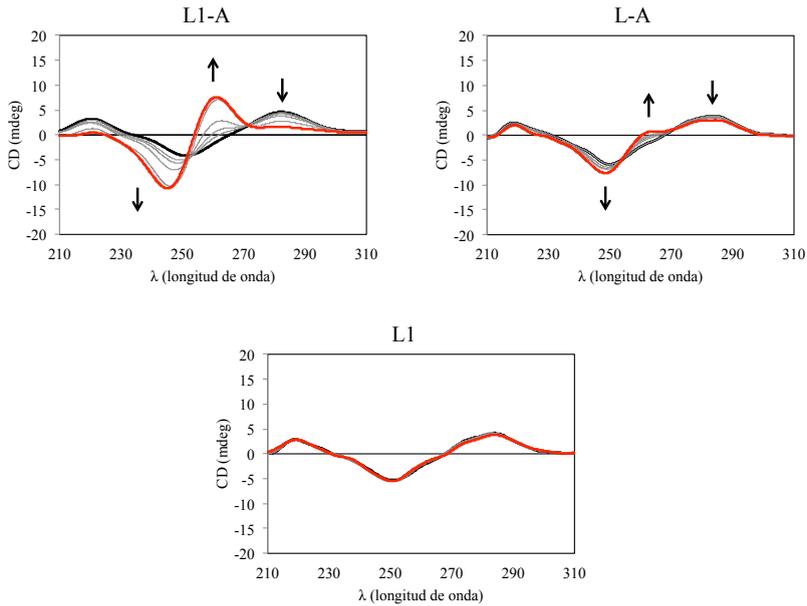


Figura 8.23. Cambios en los espectros de DC para la secuencia *hp I* tras la adición de cantidades crecientes de **L1-A**, **L-A** y **L1**. $[hp]/[L] = 0-0.1$. $[hp] = 10^{-6}$ M.

La interacción de **L-A** con las distintas secuencias genera cambios en los espectros de DC similares a los observados para **L1-A** (figura 8.23 y figura 8.25), sin embargo la magnitud de estas variaciones son menores probablemente debido a la presencia de una sola unidad intercalante en la poliamina. Por otro lado, la adición de **L1** no genera cambio alguno en los espectros de DC (figura 8.23 y 8.26), lo que sugiere que la ausencia de unidades intercalantes en **L1** modifica su modo de interacción.

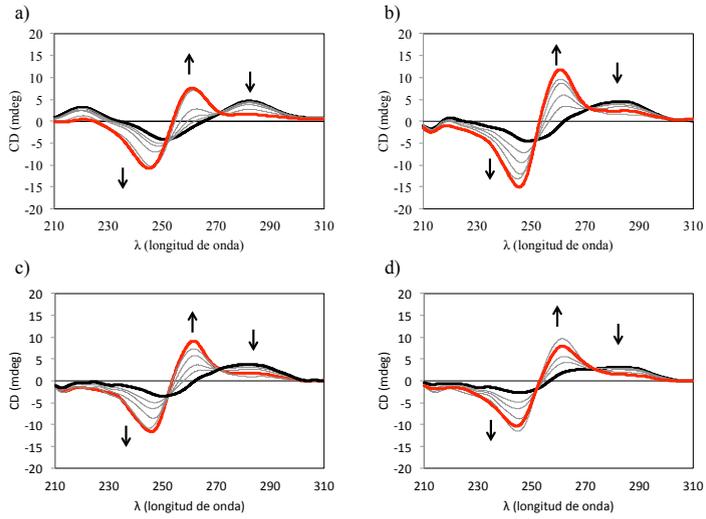


Figura 8.24. Cambios en los espectros de DC para (a) *hp 1*, (b) *hp 2*, (c) *hp 3* y (d) *hp 4* tras la adición de cantidades crecientes de L1-A. $[hp]/[L] = 0-0.1$. $[hp] = 10^{-6}$ M.

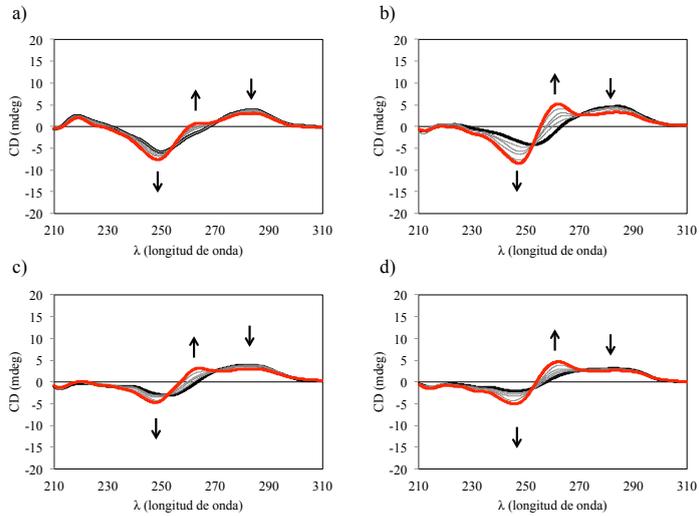


Figura 8.25. Cambios en los espectros de DC para (a) *hp 1*, (b) *hp 2*, (c) *hp 3* y (d) *hp 4* tras la adición de cantidades crecientes de L-A. $[hp]/[L] = 0-0.1$. $[hp] = 10^{-6}$ M.

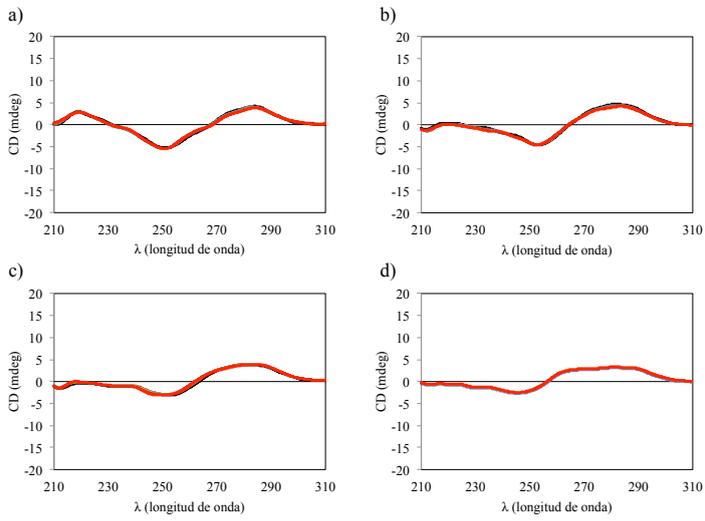


Figura 8.26. Cambios en los espectros de DC para (a) *hp 1*, (b) *hp 2*, (c) *hp 3* y (d) *hp 4* tras la adición de cantidades crecientes de **L1**. $[hp]/[L] = 0-0.1$. $[hp] = 10^{-6}$ M.

Estudios de dinámica molecular

Con el objetivo de seguir indagando en el estudio de los modos de interacción entre los receptores seleccionados y las secuencias tipo *horquilla*, se llevaron a cabo estudios de dinámica molecular en colaboración con Àlvar Martínez Camarena, del GQS-UV (*Estudios teóricos*, apartado 4.11).

La figura 8.27 muestra las representaciones de tipo *cartoon* de los distintos oligonucleótidos libres, obtenidas a partir de los estudios de dinámica molecular. Al analizar los datos obtenidos se observa cómo, aún presentando las cuatro estructuras claramente una conformación típica de ADN tipo B, existen ligeras diferencias en la profundidad de los surcos y la exposición de las nucleobases. Además, la vista axial permite corroborar la simetría a lo largo del eje vertical de las secuencias (figura 8.27).

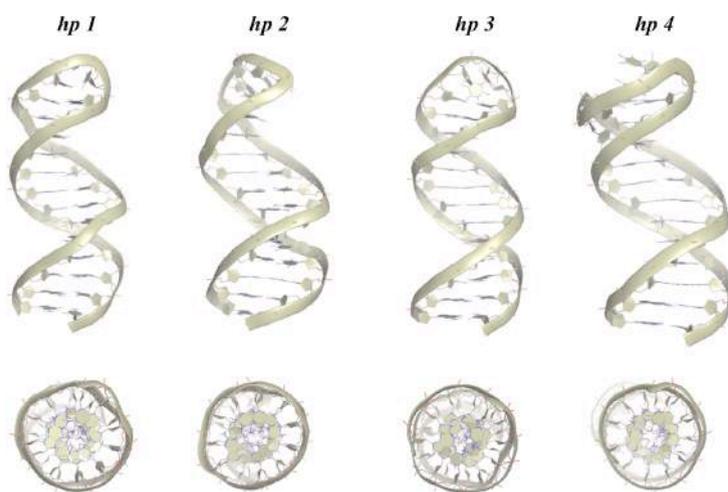


Figura 8.27. Representaciones tipo *cartoon* de los cuatro oligonucleótidos estudiados, obtenidas mediante estudios de dinámica molecular, (arriba) vista lateral de la cadena y (abajo) vista axial.

Una vez construidas y optimizadas las estructuras de las poliaminas **L1-A** y **L-A** con las correspondientes cargas a pH fisiológico, se construyó el complejo inicial de éstas con los distintos oligonucleótidos por medio de la intercalación de los grupos aromáticos entre los pares de bases de las secuencias. Inicialmente se realizaron estudios con una restricción de distancia entre los átomos pesados de las bases centrales y los de los compuestos, estudiándose en todos los casos la intercalación de los grupos antraceno entre distintos pares de bases. Una vez seleccionadas aquellas estructuras que conducían a un mínimo energético se procedió a optimizar su energía sin aplicar restricciones. La formación de los complejos para estudiar las interacciones entre **L1** y las *horquillas* se llevó a cabo acercando el compuesto al esqueleto azúcar-fosfato. Una vez realizado el proceso de dinámica molecular se seleccionaron aquellas estructuras correspondientes al mínimo energético

El análisis de los mínimos energéticos obtenidos para la interacción de **L1-A**, **L1** y **L-A** con las cuatro secuencias revela características generales en los modos de interacción. En todos los casos la interacción se produce por medio de fuerzas electrostáticas, incluida la formación de múltiples puentes salinos entre los oxígenos de los grupos fosfato y los grupos amino protonados de los ligandos, así como por medio del establecimiento de enlaces de hidrógeno adicionales que implican a las nucleobases. Además, se observa la mono-intercalación (**L-A**) y la bis-intercalación (**L1-A**) de los antracenos entre los pares de bases a través del surco mayor (figura 8.28).

En la figura 8.28 se observa cómo, debido a la inserción de las unidades aromáticas entre los pares de bases, la interacción de **L1-A** con *hp I* produce una apertura dinámica de la doble hélice de la secuencia. Los estudios llevados cabo con **L-A** revelan un comportamiento similar, siendo en este caso la magnitud del desenrollamiento menor. Este fenómeno ya se había mencionado anteriormente en los estudios de dicroísmo circular, en cuyo caso se relacionaron las variaciones en los espectros de DC observadas tras la adición de **L1-A** y **L-A** al desenrollamiento de las secuencias. La

interacción de ambas poliaminas con el resto de secuencias estudiadas, *hp 2-4*, produce los mismos cambios conformacionales. En todos los casos el macrociclo de piridina permanece en los surcos de la secuencias (figura 8.28).

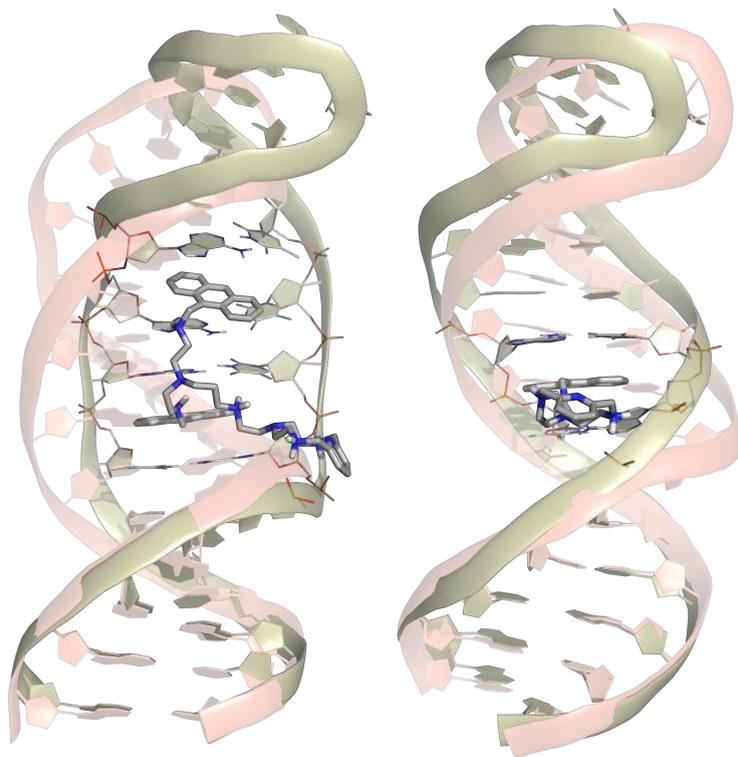


Figura 8.28. Vista lateral de las representaciones de tipo *cartoon* obtenidas a partir de los estudios de dinámica molecular: (rojo) *hp 1* libre y (amarillo) complejo *hp 1-L*, para (izquierda) **L1-A** y (derecha) **L-A**.

Como se ha mencionado anteriormente, la interacción de **L1-A** con las distintas secuencias implica el establecimiento de una red puentes salinos entre los grupos amino protonados del compuesto y los oxígenos presentes en la cadena azúcar-fosfato, con una longitud de enlace promedio de 1.70 Å. A su vez se establecen enlaces de hidrógeno entre grupos amino contiguos a las unidades aromáticas y las nucleobases. Este último tipo de interacciones

parecen favorecer la intercalación de ambas unidades de antraceno entre los pares de bases de las secuencias (figura 8.30). Por otro lado, se observan dos patrones de intercalación diferentes dependiendo de las horquillas consideradas; mientras que en *hp 1* y *hp 3* una unidad de antraceno se sitúa paralela a las bases y la otra unidad experimenta un ligero desplazamiento y se dispone perpendicular a las bases ($\alpha \approx 93,5^\circ$, calculado a partir del plano descrito por ambos restos de antraceno), en el caso de *hp 2* y *hp 4* ambos restos se disponen de forma paralela entre sí y con los pares de bases.

A modo de ejemplo, en la figura 8.29 se observa cómo la interacción de **L1-A** con *hp 1* se produce a través del establecimiento de 3 puentes salinos entre los oxígenos de los grupos fosfatos y las aminas cargadas positivamente, con distancias que varían desde 1.69 a 1.71 Å.

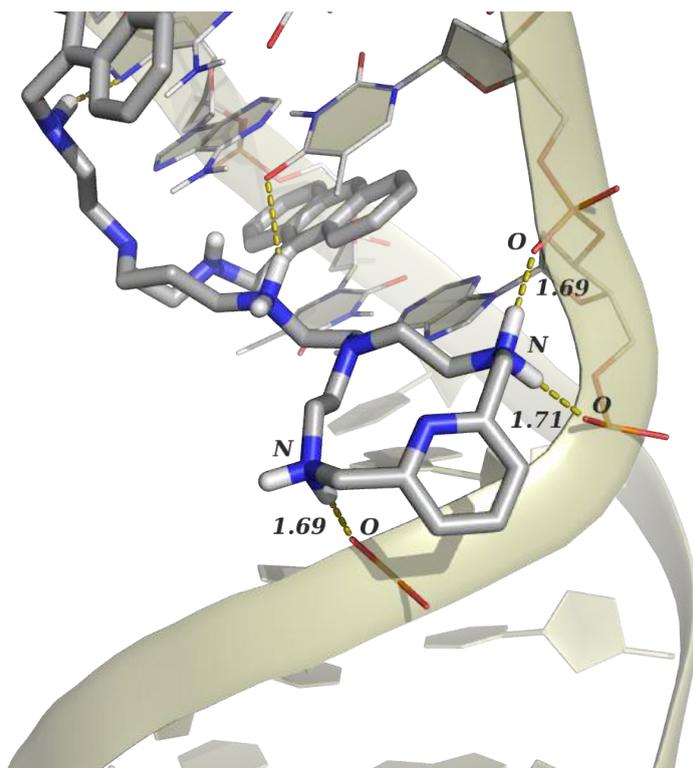


Figura 8.29. Representación de tipo *cartoon* del sitio de unión entre **L1-A** y la secuencia rica en A y T (*hp 1*). Distancias en Å.

Adicionalmente, se observa la formación de un enlace de hidrógeno entre el átomo N7 de una adenina y el nitrógeno secundario contiguo al anillo antraceno de la poliamina, con una distancia de 2.00 Å, así como entre el átomo O4 de la timina y el grupo amino secundario protonado de la cadena lateral, con una distancia de enlace de 2.26 Å (figura 8.30). Todo ello favoreciendo los procesos de intercalación de los grupos antraceno entre los pares de bases.

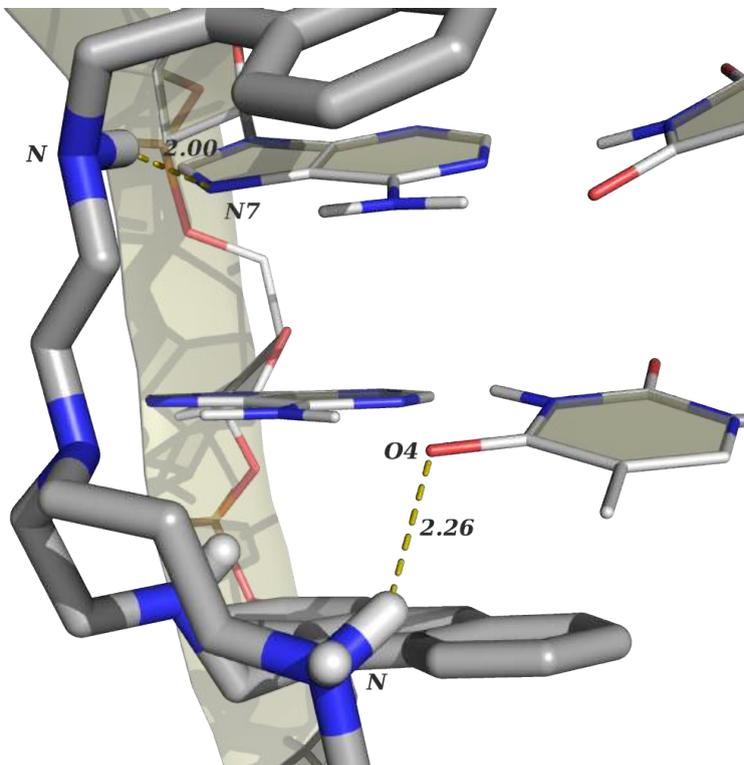


Figura 8.30. Representación de tipo *cartoon* del sitio de unión entre L1-A y la secuencia rica en A y T (*hp 1*). Distancias en Å.

De la misma manera que **L1-A**, la interacción de **L-A** con *hp 1* implica el establecimiento de una red de enlaces de hidrógeno entre los grupos amino protonados de la poliamina con los oxígenos de los grupos fosfato (figura 8.31).

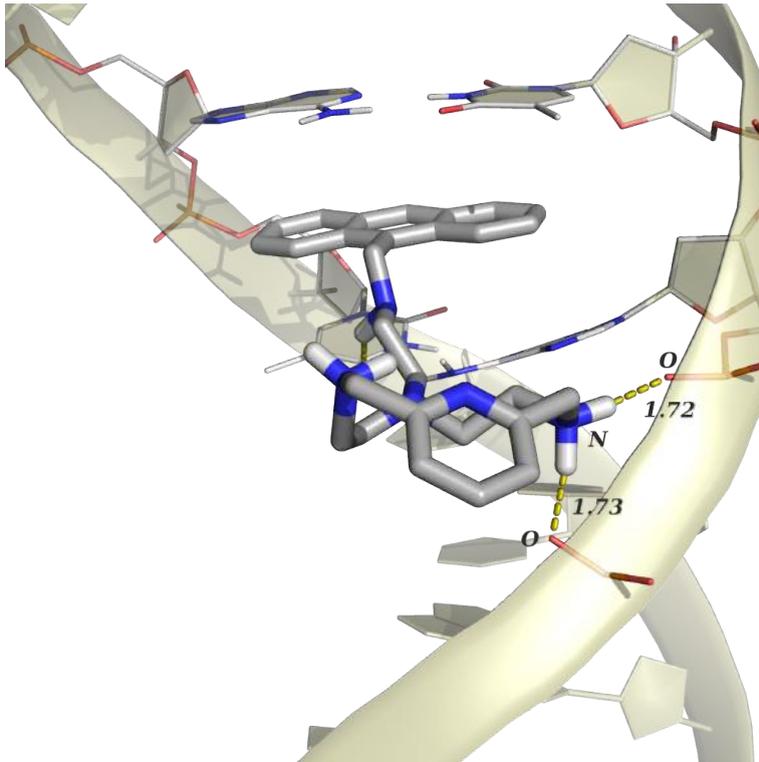


Figura 8.31. Representación de tipo *cartoon* del sitio de unión entre **L-A** y la secuencia rica en A y T (*hp 1*). Distancias en Å.

Por otro lado se observa la formación de un enlace de hidrógeno débil entre el grupo amino no protonado de la cadena central de **L-A**, el cual favorece el proceso de intercalación (figura 8.32). Estos resultados concuerdan con trabajos llevados a cabo previamente con **L-A**, en cuyo caso se determinó que la interacción de esta poliamina con distintos modelos de ADN y ARN (ADN: *ctADN*, *poli(dGC)₂*, *poli(dAT)₂* y ARN: *poliA-poliU*) se producía por medio de la intercalación de la unidad aromática entre los pares de bases de las distintas secuencias.[22][24]

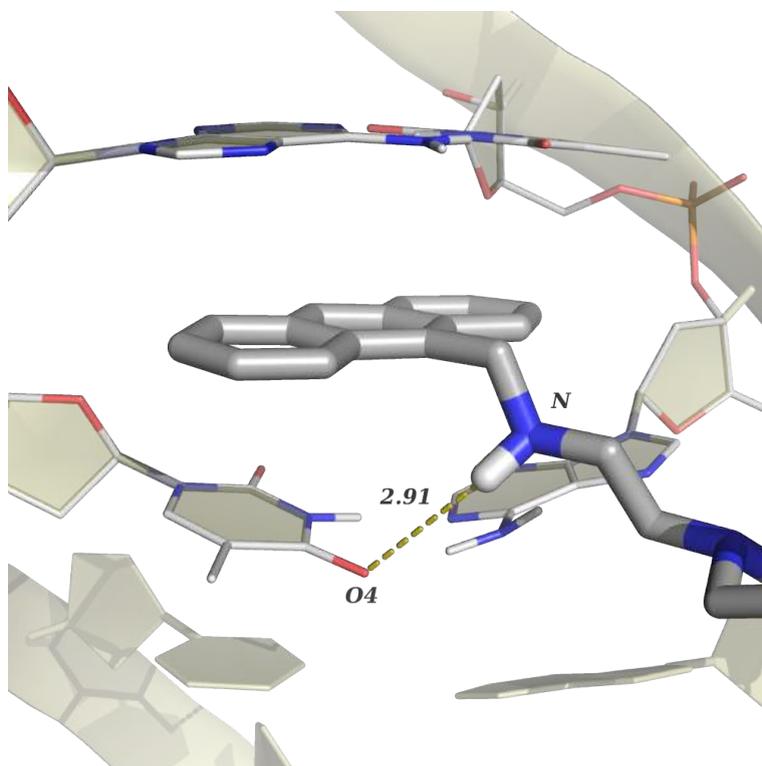


Figura 8.32. Representación de tipo *cartoon* del sitio de unión entre **L-A** y la secuencia rica en A y T (*hp 1*). Distancias en Å.

Como se puede observar en la figura 8.33, la interacción de la poliamina **L1** con *hp 1* está totalmente dirigida por interacciones de tipo electrostático así como por el establecimiento de un conjunto de puentes salinos entre los grupos amino y los oxígenos de la cadena azúcar-fosfato principal (10 interacciones en total), presentando éstos distancias de enlace que varían entre 1.70 y 1.80 Å, con un valor promedio de 1.73 Å. Esta interacción se produce a través del surco menor de las secuencias.

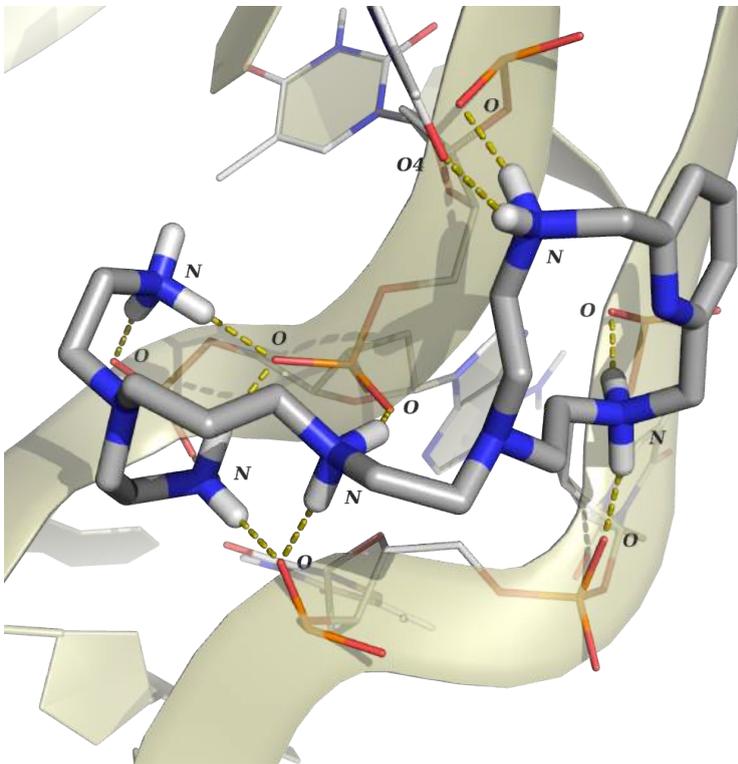


Figura 8.33. Representación de tipo *cartoon* del sitio de unión entre **L1** y la secuencia rica en A y T (*hp 1*).

A su vez, la unión de **L1** genera una flexión en la *horquilla* de 90 grados, así como una torsión en las cadenas que la componen, restringiéndose así el surco menor (figura 8.34).

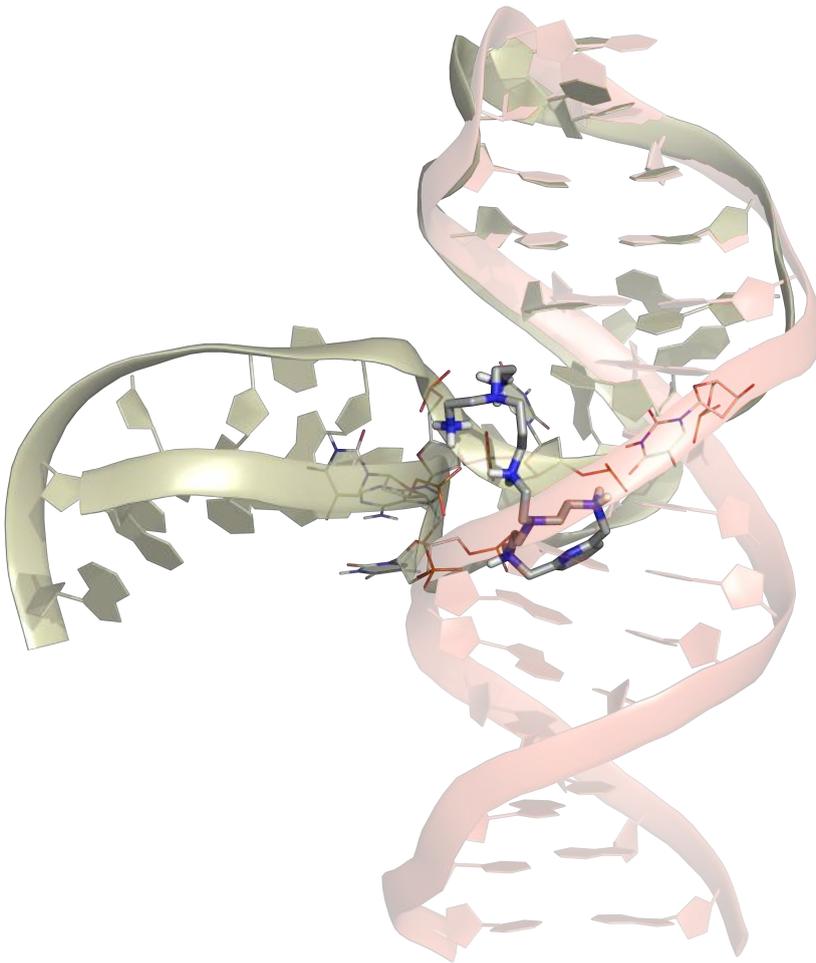


Figura 8.34. Vista lateral de las representaciones de tipo *cartoon* obtenidas a partir de los estudios de dinámica molecular para: (rojo) *hp 1* libre y (amarillo) complejo *hp 1-L1*. Visión ampliada del sitio de unión entre **L1** y *hp 1*.

8.2.2. Secuencias de tipo *horquilla* con repeticiones CXG

En última instancia se procedió a estudiar la interacción de **L1-A** y **L-A** con un conjunto de secuencias de ácidos nucleicos caracterizadas todas ellas por la presencia de repeticiones de trinucleótidos CXG.[31][32] Como se ha mencionado anteriormente, se ha determinado que una acumulación no controlada de este tipo de repeticiones en una misma región de los ácidos nucleicos conduce a la formación de estructuras de tipo *horquilla* intramolecular (*Introducción*, capítulo 1).[33]

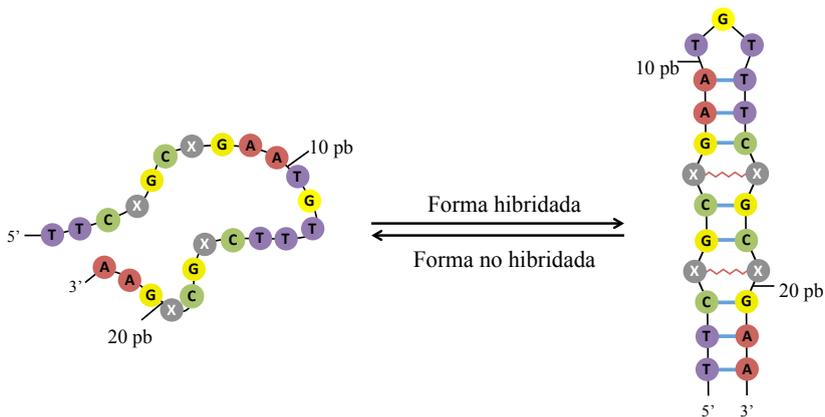


Figura 8.35. Representación del equilibrio conformacional entre la forma hibridada y la no hibridada de las secuencias *hp_{CXG}*.

Los oligonucleótidos seleccionados están compuestos por un total de 23 bases y adoptan todos ellos una conformación de tipo *horquilla* una vez hibridados en el tampón de trabajo. Como se observa en la figura 8.32, estas estructuras presentan un bucle central TGT unido a una sección de 10 pares de bases enfrentadas entre sí, la cual presentará una estructura de doble hélice. La conformación descrita se mantiene estabilizada por medio de dos pares de bases A-T contiguos al bucle central, así como por otros 2 pares A-T presentes al final (figura 8.35).

Una vez adoptada la estructura de tipo *horquilla* las repeticiones CXG quedan enfrentadas ente sí, lo que conduce al establecimiento de asociaciones de tipo no canónico entre las bases equivalentes.

Tabla 8.9. Oligonucleótidos *hp*_{CXG} seleccionados junto a las enfermedades asociadas a cada tipo de repetición CXG.[31]

	Secuencia completa (5'-3')	Enfermedad asociada
<i>hp</i> _{CAG}	TT-CAG-CAG-AATGTTT-CAG-CAG-AA	<i>Enfermedad de Huntington</i>
<i>hp</i> _{CGG}	TT-CGG-CGG-AATGTTT-CGG-CGG-AA	<i>Síndrome del X frágil</i>
<i>hp</i> _{CCG}	TT-CCG-CCG-AATGTTT-CCG-CCG-AA	^a
<i>hp</i> _{CTG}	TT-CTG-CTG-AATGTTT-CTG-CTG-AA	<i>Distrofia miotónica</i>

[a] Este tipo de repeticiones se ha asociado al desarrollo de las enfermedades observadas para las otras repeticiones CXG.

La composición de bases específica varía con el objetivo de poder estudiar diferentes repeticiones de tipo CXG asociadas cada una a distintas enfermedades de tipo neurodegenerativo: CAG, CGG, CCG y CTG (tabla 8.9).[31] Todo ello permite evaluar si existen efectos de selectividad fluorescente por parte de L1-A y/o L-A hacia alguna secuencia en concreto.

Ensayos de desnaturalización térmica

Como se observa en la figura 8.36 al adicionar cantidades equimolares de **L1-A**, $[hp_{CXG}]/[L] = 1$, se produce en todos los casos una estabilización de la conformación de tipo *horquilla*. Este hecho sugiere que, al igual que para los oligonucleótidos *hp 1-4*, se produce la intercalación de los grupos antraceno entre los pares de bases de las secuencias *hp_{CXG}*.

Los valores de ΔT_m obtenidos varían entre 4.0 y 10.9 °C, observándose la mayor estabilización para el oligonucleótido *hp_{CCG}* (ΔT_m : *hp_{CAG}* = 7.5 °C, *hp_{CGG}* = 4.6 °C, *hp_{CCG}* = 10.9 °C y *hp_{CTG}* = 4.0 °C). Por otro lado, al llevar a cabo los experimentos en presencia de un exceso de 2 veces el ligando, $[hp_{CXG}]/[L] = 0.5$, se observó la aparición de agregados en disolución, lo que sugiere un alto grado de interacción.

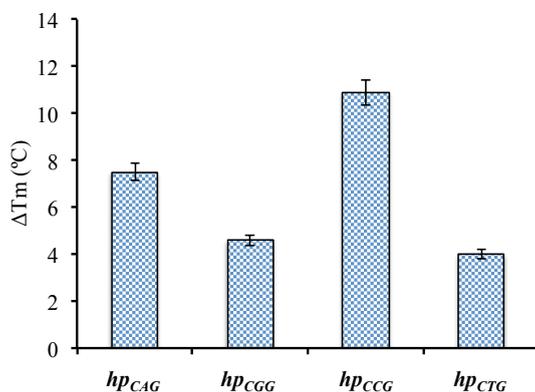


Figura 8.36. Valores de ΔT_m obtenidos para la interacción de **L1-A** con las secuencias *hp_{CXG}* para $[hp]/[L] = 1$.

Espectroscopia de emisión de fluorescencia

En la figura 8.37 se observa cómo la interacción de **L1-A** con *hpCGG* y *hpCTG* provoca una desactivación casi total de la emisión de la poliamina. Sin embargo, al adicionar cantidades crecientes de *hpCAG* se produce un aumento en la emisión de **L1-A**, acompañado de un desplazamiento batocrómico ($\Delta\lambda = 12$ nm). La adición de *hpCGG* genera un desplazamiento del máximo de emisión análogo al observado para *hpCAG*, aunque en esta ocasión la interacción viene acompañada de una desactivación de la emisión.

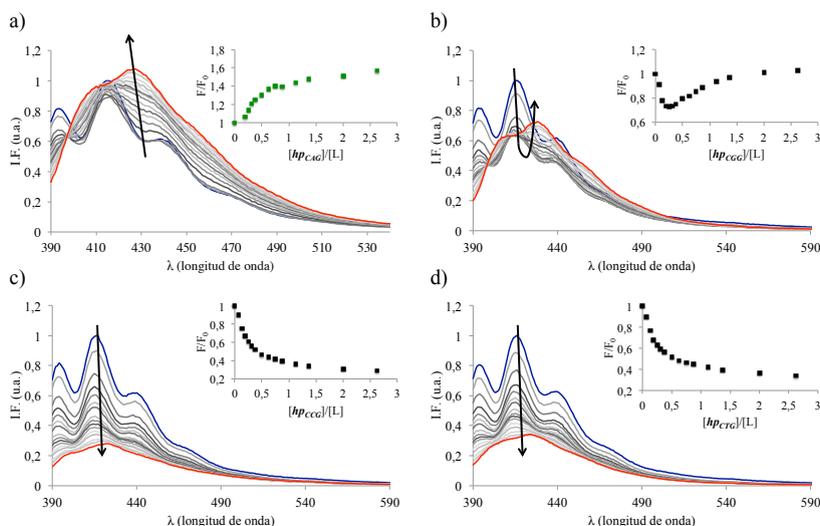


Figura 8.37. Variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia de **L1-A** por adición de (a) *hpCAG*, (b) *hpCGG*, (c) *hpCCG* y (d) *hpCTG* ($\lambda_{\text{exc}} = 371$ nm). Las gráficas internas presentan las variaciones en la emisión a 416 (*hpCGG*, *hpCCG* y *hpCTG*) y 428 nm (*hpCAG*) respecto a $[hp]/[L]$. $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.

Al representar la intensidad de emisión de fluorescencia respecto a la relación $[hp_{CXG}]/[\mathbf{L1-A}]$ se observa un comportamiento distinto en función de la secuencia considerada. Para las secuencias que presentan repeticiones CAG, CCG y CTG las variaciones se estabilizan para valores de r cercanos a

1, mientras que para hp_{CGG} se observa una disminución de la emisión inicial seguida de un rápido aumento, en cuyo caso este aumento se estabiliza para valores de r cercanos a 2.

Para las valoraciones llevadas a cabo con el derivado que presenta una sola unidad intercalante, **L-A**, se han registrado cambios en los perfiles de emisión de fluorescencia parecidos a los descritos para **L1-A** (figura 8.38). Así pues, para hp_{CAG} se produce una ligera activación de la banda centrada a 428 nm, mientras que para el resto de secuencias se observa una desactivación de la emisión de la poliamina.

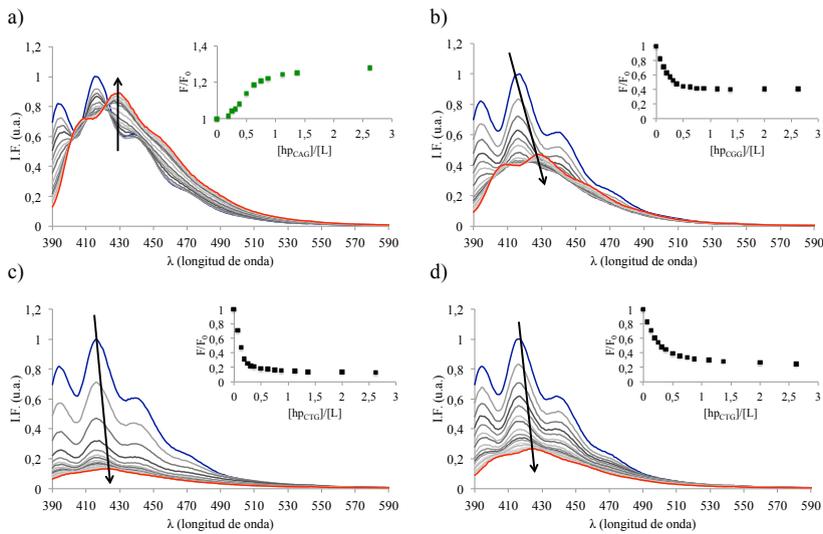


Figura 8.38. Variaciones en los espectros de emisión de fluorescencia de **L-A** tras la adición de (a) hp_{CAG} , (b) hp_{CGG} , (c) hp_{CCG} y (d) hp_{CTG} ($\lambda_{exc} = 371$ nm). Las gráficas internas presentan las variaciones en la emisión a 416 (hp_{CGG} , hp_{CCG} y hp_{CTG}) y 428 nm (hp_{CAG}) respecto a $[hp]/[L]$. $[L] = 5 \times 10^{-6}$ M.

La tabla 8.10 recoge las constantes de afinidad calculadas (K_{aff}) a partir de los datos espectroscópicos, junto a las variaciones en emisión fluorescente (F/F_0) de los distintos máximos observados. Las constantes obtenidas para **L1-A** y **L-A** están dentro del intervalo 10^5 - 10^7 M^{-1} , siendo éstas comparables a las obtenidas anteriormente para su interacción con secuencias de tipo **hp 1-4** (*Secuencias de tipo horquilla*, apartado 8.2.1). En este caso la constante obtenida para la interacción de **L1-A** con **hp_{CCG}** resulta casi dos órdenes de magnitud superior a las obtenidas para las otras secuencias. Las variaciones en intensidad de fluorescencia (F/F_0) muestran una activación de la banda centrada sobre 428 nm (estado ON) tanto para **L1-A** (72%) como para **L-A** (41%) al interaccionar con la secuencia que presenta repeticiones CAG (**hp_{CAG}**). Por otro lado, cuando los ligandos interaccionan con las secuencias que presentan repeticiones CCG y CTG la banda de emisión centrada sobre 416 nm se desactiva (estado OFF), observándose un descenso de la emisión del 70%. A la vista de estos resultados es posible concluir que ambos ligandos presentan un perfil de emisión de fluorescencia discriminatorio hacia la secuencia que presenta las repeticiones de trinucleótidos CAG, siendo el incremento observado para **L1-A** el más pronunciado.

Tabla 8.10. Constantes de estabilidad (K_{aff} , $M^{-1}s^{-1}$) calculadas a partir de los valores obtenidos en las valoraciones fluorimétricas para la interacción entre **L1-A** y **L-A** con las distintas secuencias **hp_{CXG}**. F/F_0 representa la relación entre la intensidad inicial y final ($\lambda_{em} = 416$ nm).

		L1-A	L-A
hp_{CAG}	K_{aff}	$(7.09 \pm 5.38) \times 10^5$	$(7.74 \pm 1.25) \times 10^5$
	F/F_0	$\lambda_{416 \text{ nm}} = 1.46; \lambda_{428 \text{ nm}} = 1.72$	$\lambda_{428 \text{ nm}} = 1.41$
hp_{CCG}	K_{aff}	$(1.40 \pm 1.07) \times 10^7$	$(1.02 \pm 0.21) \times 10^6$
	F/F_0	0.63	0.39
hp_{CCG}	K_{aff}	$(1.74 \pm 0.71) \times 10^5$	$(1.49 \pm 0.17) \times 10^6$
	F/F_0	0.24	0.13
hp_{CTG}	K_{aff}	$(1.77 \pm 0.10) \times 10^5$	$(6.46 \pm 0.43) \times 10^5$
	F/F_0	0.31	0.27

Tal y como se aprecia en la fotografía de la figura 8.39, el distinto comportamiento fotoquímico observado para **L1-A** en presencia de los oligonucleótidos *hp_{CXG}* permite discriminar fácilmente, y a simple vista, una disolución que contiene *hp_{CAG}* de otras que contienen *hp_{CGG}*, *hp_{CCG}* o *hp_{CTG}*. Esta característica conduce a pensar en posibles aplicaciones de esta molécula para la detección fluorimétrica *in vitro* de muestras de ADN de pacientes que presenten la enfermedad de Huntington, las cuales se caracterizan por presentar una acumulación de tripletes CAG. A su vez este comportamiento también permitiría visualizar este tipo de conformaciones mediante microscopía confocal de fluorescencia.

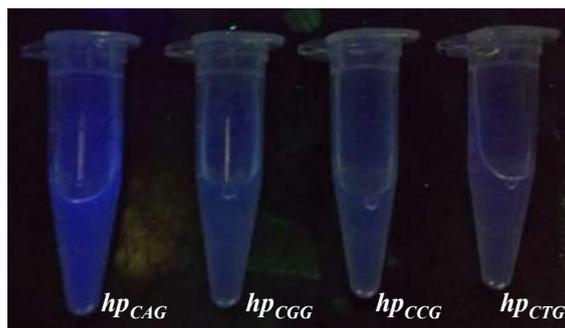


Figura 8.39. Fotografía de la emisión en el visible de cuatro viales conteniendo **L1-A** en presencia de *hp_{CAG}*, *hp_{CGG}*, *hp_{CCG}* o *hp_{CTG}* ($\lambda_{\text{exc}} = 254 \text{ nm}$). $[hp]/[L] = 2$, $[L] = 5 \times 10^{-6} \text{ M}$.

Referencias

- [1] (a) Pauling, L.; Corey, R. B. *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.A.*, **1953**, 39, 84; (b) Paling, L.; Corey, R. B. *Nature* **1951**, 168, 550. (c) Pauling, L.; Corey, R. B. *Arch. Biochem. and Biophys.* **1956**, 65, 164.
- [2] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, 171(4356), 737.
- [3] Devlin, T. E. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*, 7^a Ed. John Wiley & Sons, **2010**.
- [4] Lippard, S. J.; Berg, J. M. *Principles of Bioinorganic Chemistry*, Ed. University Science Books, **1994**, California.
- [5] D. Söll y U. Rajbhandary (Eds.), *tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function* Ed. American Society for Microbiology Press, **1995**, Washington, p. 141-163.
- [6] Belmont, P.; Constant, J. F.; Demeunynck, M. *Chemical Society Reviews*, **2001**, 30(1), 70-81.
- [7] Blackburn, M.; Gait, M.; Loakes, D.; Williams, David, *Nucleic acids in chemistry and biology*, Ed. The Royal Society of Chemistry, **2006**, Cambridge, UK.
- [8] Saini, N.; Zhang, Yu.; Usdin, K.; Lobachev, K. S. *Biochemie* **2013**, 95(2), 117-123.
- [9] Kaushik, M.; Kaushik, S.; Roy, K.; Singh, A.; Mahendru, S.; Kumar, M.; Chaudhary, S.; Ahmed, S.; Kukreti, S. *Biochem. Biophys. Reports* **2016**, 5, 388-395.
- [10] Biver, T. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257 (19-20), 2765-2783.
- [11] González, J. *Química de coordinación aniónica y catiónica de nuevos poliazareceptores politópicos*; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universitat de València, **2013**.
- [12] Cantor, C. R.; Schimmel, P. R. *Biophysical Chemistry, The conformation of biological macromolecules*. WH Freeman and Co., **1980**, vol. 3, San Francisco.
- [13] Mergny, J.-L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides* **2003**, 13(6), 515-537.
- [14] Haq, I. *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, 403(1), 1-15.
- [15] Lane, A. N.; Chaires, J. B.; Gray, R. D.; Trent, J. O. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36 (17), 5482-5515.
- [16] Chaires, J. B.; Dattagupta, N.; Crothers, D. M. *Biochem.* **1982**, 21, 3933-3940.
- [17] Mergny, J.-L.; Lacroix, L. *Oligonucleotides* **2004**, 13(6), 515.
- [18] Eggleston, A. K.; Rahim, N. A.; Kowalczykowski, S. C. *Nucleic Acids Res.* **1996**, 24(7), 1179-1186.

-
- [19] Lakowicz, J. R.; Gryczynski, I.; Malak, H.; Schrader, M.; Engelhardt, P.; Kano, H.; Hell, S. W. *Biophys. J.* **1997**, 72(2), 567-578.
- [20] Strekowski, L.; Wilson, B. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **2007**, 623(1-2), 3-13.
- [21] González-García, J.; Uzelac, L.; Kralj, M.; Llinares, J. M.; García-España, E.; Piantanida, I. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11(13), 2154-2161.
- [22] Inclán, M.; Albelda, M. T.; Frías, J. C.; Blasco, S.; Verdejo, B.; Serena, C.; Salat-Canela, C.; Díaz, M. L.; García-España, A.; García-España, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134(23), 9644-9656.
- [23] Bikard, D.; Loot, C.; Baharoglu, Z.; Mazel, D. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2010**, 74(4), 570-588.
- [24] Inclán, M.; Guijarro, L.; Pont, I.; Frías, J. C.; Rotger, C.; Orvay, F.; Costa, A.; García-España, E.; Albelda, M. T. *Chem. - A Eur. J.* **2017**, 23(63), 15966-15973.
- [25] Berova, N.; Di Bari, L.; Pescitelli, G. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 914-931.
- [26] Nordén, B.; Kubista, M.; Kuruscev, T. Q. *Rev. Biophys.* **1992**, 25, 51-171.
- [27] Garbett, N.C.; Ragazzon, P.A.; Chaires, J.B. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 3166.
- [28] Eriksson, M.; Nordén, B. *Linear and Circular Dichroism of Drug-Nucleic Acid Complexes. Methods in Enzymology.* Chaires, J. B.; Waring, M. J., Eds.; Academic Press. **2001**, Vol. 340, 68-98. San Diego,
- [29] Kypr, J.; Kejnovská, I.; Renčiuk, D.; Vorlíčková, M. *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37(6), 1713-1725.
- [30] Duff, M. R.; Tan, W. B.; Bhambhani, A.; Perrin, B. S.; Hota, J.; Rodger, A.; Kumar, C. V. *J. Phys. Chem. B.* **2006**, 110, 20693.
- [31] Kiliszek, A.; Rypniewski, W. *Nucleic Acids Res.* **2014**, 42(13), 8189-8199.
- [32] Krzyzosiak, W. J.; Sobczak, K.; Wojciechowska, M.; Fiszer, A.; Mykowska, A.; Kozłowski, P. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40(1), 11-26.
- [33] Błaszczyk, L.; Rypniewski, W.; Kiliszek, A. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* **2017**, 8(4), 1-25.

9. Conclusiones

9.1. Síntesis

En la primera etapa de la tesis se llevó a cabo la síntesis de un total de siete nuevos compuestos poliamínicos, pudiendo clasificarse estos en dos grupos en función de sus características estructurales. El primero de ellos está compuesto por **L1** y **L2**, los cuales comparten un esqueleto común, *pytren-al*, y presentan dos grupos etilamina (**L1**) y propilamina (**L2**) en el extremo de la cadena central. En este grupo también se incluye el compuesto **L3** que presenta dos cavidades macrocíclicas isoestructurales unidas por una cadena asimétrica etil-propilamina. Para la obtención de estos tres compuestos se desarrollaron y optimizaron nuevas rutas sintéticas. Los cuatro receptores restantes son derivadas de la poliamina **L1**, sintetizados a partir de la funcionalización de las aminas primarias con distintos grupos sustituyentes, haciendo uso de una metodología previamente establecida en el GQS-UV. Los grupos incorporados han sido piridinas sustituidas en posición 2 (**L1-2Py**) y en posición 3 (**L1-3Py**), unidades de quinolina sustituidas en posición 4 (**L1-4Q**) y grupos antraceno (**L1-A**).

9.2. Propiedades ácido-base

Una vez sintetizados los receptores se llevó a cabo un estudio exhaustivo de sus propiedades ácido-base en disolución acuosa. Mediante el uso de técnicas potenciométricas se obtuvieron los valores de las constantes de basicidad de los distintos grupos protonables en el rango de pH 2.5-11.0. A raíz de estos estudios se determinó la protonación de los nitrógenos secundarios y primarios presentes en los compuestos. Por otro lado, para **L3** y **L1-A** se pudo identificar una etapa adicional correspondiente a la protonación de la amina terciaria de la cadena central.

Posteriormente se calcularon los diagramas distribución de especies en función del pH para cada sistema. Este tipo de análisis permitió determinar el grado de protonación promedio que presentan los receptores a pH fisiológico.

La presencia de grupos cromóforos en los receptores permitió seguir los distintos equilibrios ácido-base mediante valoraciones espectroscópicas UV-Vis y de fluorescencia. Así, en algunos casos la combinación de éstas técnicas con los valores obtenidos a partir de los estudios potenciométricos sirvió para ampliar el conocimiento de los equilibrios ácido-base en disolución, a la vez que para determinar constantes de protonación que, por requisitos metodológicos, no se pudieron determinar por potencimetría.

9.3. Miméticos de la superóxido dismutasa

9.3.1. Formación de complejos metálicos

Se llevaron a cabo estudios de especiación de los receptores con Cu(II) y Mn(II). Los resultados demostraron que los ligandos son capaces de formar complejos mononucleares con Cu(II) muy estables, presentando constantes de afinidad del orden de 18 a 20 unidades logarítmicas. En cuanto a la formación de complejos binucleares de Cu(II), en todos los casos se determinó la formación de especies con estequiometrias Cu(II):L 2:1, las cuales presentan constantes de afinidad comprendidas entre 27 y 34 unidades logarítmicas. Cabe destacar el progreso logrado para la incorporación de distintos grupos dadores adicionales en los nuevos derivados, los cuales proporcionan entornos altamente favorables para la coordinación de un segundo átomo de Cu(II). Estos resultados son de gran interés de cara a las posibles aplicaciones biomédicas de los complejos de Cu(II).

La resolución de dos estructuras cristalinas de los compuestos $[\text{Cu}_2(\text{HL3})\text{Br}_2](\text{ClO}_4)_3$ y $[\text{Cu}_2\text{L3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$ permitió describir las geometrías de coordinación de ambos complejos. El análisis comparativo de estas estructuras permitió deducir el rol activo del nitrógeno de la cadena central, pudiendo éste formar parte, o no, en la coordinación de los centros metálicos en función del pH.

También se determinó para **L1**, **L2** y **L3** la formación de complejos mononucleares de Mn(II), con constantes de afinidad suficientemente elevadas como para considerar que éstos predominan en un alto intervalo de pH. Por otro lado, solo se detectó la formación de complejos binucleares de Mn(II) para el derivado **L3**.

En última instancia se evaluó la habilidad de **L1**, **L2** y **L3** para formar complejos heterobinucleares de Cu(II) y Zn(II) en disolución, en cuyo caso solo se detectó la formación de especies con estequiometría Cu(II):Zn(II):L 1:1:1 para **L3**. La obtención y resolución de monocristales de $[\text{CuZnL3Cl}_2](\text{ClO}_4)_2$ permitió dilucidar la estructura de este complejo, así como los entornos de coordinación que presentaban ambos iones metálicos. Además, el análisis de la composición atómica de estos cristales mediante fluorescencia de rayos X por energía dispersiva permitió corroborar la presencia de cantidades equimolares de Cu(II) y Zn(II) en el complejo.

Los cambios asociados a los procesos de coordinación y de protonación de los distintos complejos metálicos de Cu(II) se han estudiado mediante espectroscopía UV-Vis. Todo ello permitiendo determinar cuáles son los nitrógenos implicados en la coordinación de los distintos iones metálicos. De forma general, la entrada del primer Cu(II) se produce mediante su coordinación por los cuatro nitrógenos del anillo macrocíclico, mientras que la del segundo Cu(II) implica la participación de los nitrógenos de las cadenas poliamínicas presentes en el extremo de cadena central, quedando el nitrógeno secundario de la misma disponible para coordinar un Cu(II) u otro. Para **L3** ambos átomos de cobre se encuentran coordinados por una de las cavidades macrocíclicas.

9.3.2. Evaluación de la toxicidad

Los estudios de toxicidad llevados a cabo en células VERO demostraron una elevada actividad antiproliferativa de las poliaminas libres, incluso a concentraciones de 10 μM . Sin embargo, la formación de los complejos tanto mono- como binucleares de Cu(II) produce una marcada disminución en la toxicidad, los cuales resultan no citotóxicos a concentraciones tan altas como 100 μM . Análogamente a lo descrito para el Cu(II), la formación de los complejos de Mn(II) demostró bloquear la toxicidad mostrada por los receptores libres.

A raíz de los ensayos llevados a cabo se determinó que los complejos de Cu(II) y Mn(II) no muestran toxicidad alguna en el intervalo de concentraciones en el que se llevan a cabo los estudios de capacidad antioxidante (10 - 50 μM).

9.3.3. Evaluación de la actividad SOD

9.3.3.1. Estudios electroquímicos

Se evaluó el comportamiento electroquímico de los complejos de Cu(II) caracterizados para **L1**, **L2**, **L3**, **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q** pudiéndose determinar para la gran mayoría de sistemas las reacciones que tienen lugar en disolución acuosa durante los procesos de oxidación y de reducción de los distintos centros metálicos. Para los complejos binucleares de Cu(II) con **L1** y **L2** se determinaron dos valores de potenciales formales correspondientes a la reducción monoelectrónica de los dos centros metálicos de forma individual. En ambos casos el segundo cobre coordinado presentó valores de potencial más positivos que los obtenidos para el primer Cu(II). También se estudió la respuesta electroquímica de disoluciones que presentaban cantidades equimolares de Cu(II), Zn(II) y **L3**, en cuyo caso se determinó un solo proceso *redox* correspondiente la reducción monoelectrónica del Cu(II) coordinado.

En última instancia se evaluó el comportamiento electroquímico de los complejos Mn(II) determinados para **L1** y **L3**, pudiéndose deducir las reacciones que tiene lugar en disolución acuosa durante el proceso de oxidación y reducción del par Mn(II)/Mn(III).

En todos los casos los potenciales formales detectados se encuentran dentro del intervalo adecuados para miméticos de la SOD.

9.3.3.2. Estudios cinéticos

Los resultados de las medidas cinéticas, llevadas a cabo a través del método indirecto NBT, son positivos en todos los casos, dando lugar a la obtención de constantes catalíticas con valores comprendidos entre 10^5 y 10^7 $M^{-1}s^{-1}$.

La capacidad catalítica mostrada por los complejos binucleares de Cu(II) de **L1**, **L2** y **L3** es superior a la de los correspondientes complejos mononucleares, encontrándose los valores obtenidos para **L1** y **L2** entre los más elevados reportados hasta el momento. Por otro lado, la actividad mostrada por el complejo heterobinuclear de Cu(II) y Zn(II) con **L3** fue similar a la observada para el complejo mononuclear de **L1**, lo que se explica teniendo en cuenta la presencia de un solo átomo de Cu(II) en ambas estructuras.

Los valores de las constantes catalíticas obtenidos para los complejos binucleares de Cu(II) de **L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q** se encuentran todos dentro del mismo orden de magnitud ($10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

En el caso del Mn(II), los valores obtenidos para los complejos con **L1** y **L3** son mayores a los del metal libre, lo que indica que la complejación del metal por parte de la poliamina aumenta la capacidad catalítica del catión.

9.3.4. Ensayos biológicos

Estudios llevados a cabo mediante cultivos de una cepa deficiente en la enzima citoplasmática SOD1 de levaduras *Saccharomyces Cerevisiae* revelaron que los complejos de **L1** y **L3** con Cu(II) ejercen un elevado efecto protector frente al estrés oxidativo, lo que concuerda con los datos obtenidos previamente mediante estudios cinéticos. Por otro lado, la adición de los ligandos libres resultó en un menor crecimiento de las levaduras.

Los complejos binucleares de Cu(II) de los derivados de **L1** (**L1-2Py**, **L1-3Py** y **L1-4Q**) generaron, en todos los casos, un efecto protector frente al estrés oxidativo. De entre los tres el compuesto que mostró una mayor actividad antioxidante fue **L1-4Q**.

9.4. Interacción con ácidos nucleicos

9.4.1. Interacción con ácidos nucleicos de doble hélice

Los estudios espectroscópicos llevados a cabo para evaluar la interacción de **L1** y **L3** con los polinucleótidos de cadena doble, *ctADN* y *poliA-poliU*, apuntan a una interacción selectiva de ambas poliaminas con la secuencia representativa de ARN (*poliA-poliU*). Los datos obtenidos a partir de los ensayos de desplazamiento de indicador fluorescente permitieron concluir que se produce una interacción específica con el surco menor del *poliA-poliU* por parte de ambas poliaminas.

Por otro lado, se observó como la formación de los complejos binucleares de Zn(II) modificaba el modo de unión de **L1** y **L3** con el *poliA-poliU*. En cuyo caso se postuló que los cambios conformacionales inducidos por la coordinación del metal imposibilitan el establecimiento de enlaces de hidrógeno entre los grupos amino y las cadenas azúcar-fosfato que componen el *poliA-poliU*.

9.4.1. Interacción con oligonucleótidos de secuencia específica

Se llevó a cabo un estudio exhaustivo para evaluar la interacción de **L1-A**, **L1** y **L-A** con distintos oligonucleótidos de secuencia específica. Para ello se seleccionaron un total de 8 secuencias que presentan una estructura secundaria de tipo *horquilla* (**hp 1-4** y **hp_{CXG}**).

Los estudios de emisión de fluorescencia llevados a cabo con **L1-A** y **L-A** apuntan a que la interacción de ambas poliaminas con **hp 1-4** se produce a través de la intercalación de los grupos antraceno entre los pares de bases de los oligonucleótidos. Para el ligando que presenta dos unidades intercalantes, **L1-A**, se obtuvo una respuesta fluorescente totalmente

diferente en función de la secuencia estudiada. Así pues, se observó una activación de la banda centrada sobre 430 nm (estado ON) al interactuar con *hp 1*, viéndose incrementada la emisión en un 89%. Por otro lado la interacción de **L1-A** con el resto de los oligonucleótidos produjo una desactivación de la emisión del 60% (estado OFF). Para **L-A** se observó en todos los casos una desactivación de la emisión de entre el 40% y el 70%.

Los estudios de dicroísmo circular permitieron corroborar la intercalación de los grupos antraceno presentes en **L1-A** y **L-A** entre los pares de bases de los distintos oligonucleótidos. En todos los casos los cambios en los espectros de DC inducidos por **L-A** resultan inferiores a los observados para **L1-A**, todo ello permitiendo concluir que en **L1-A** los dos antracenos se intercalan entre los pares de bases.

Estudios de dinámica molecular permitieron profundizar en la descripción de estos sistemas, observándose características generales en los modos de unión de **L1-A** y **L-A** con *hp 1-4*. Así, la interacción se produce por medio de fuerzas electrostáticas, incluyendo la formación de múltiples enlaces de hidrógeno entre los oxígenos de los grupos fosfato y los grupos amonio de los receptores. Además se observa la mono-intercalación (**L-A**) y bis-intercalación (**L1-A**) de los antracenos entre los pares de base a través de del surco mayor.

Los estudios llevados a cabo con las secuencias *hp_{CXG}* permitieron corroborar una elevada interacción entre **L-A** y **L1-A** con estos oligonucleótidos. A su vez se observó una respuesta fotoquímica distintiva para la interacción de **L1-A** y **L-A** con *hp_{CAG}*, en cuyo caso se determinó que se produce una activación de la banda centrada sobre 428 nm (estado ON) del 72% para **L1-A** y del 41% para **L-A**. La interacción con las demás secuencias condujo a una desactivación de la banda (estado OFF) superior al 70%.

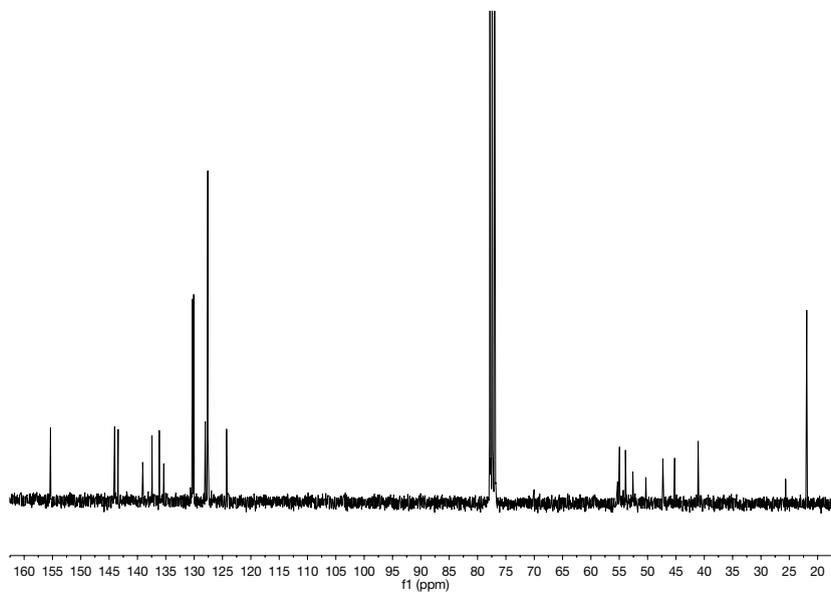
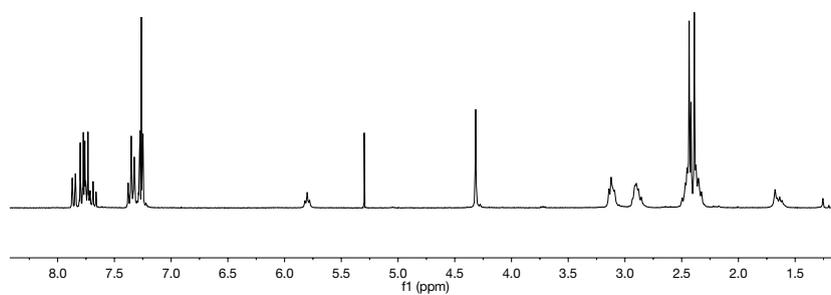
Anexos

Anexo 1. Publicaciones

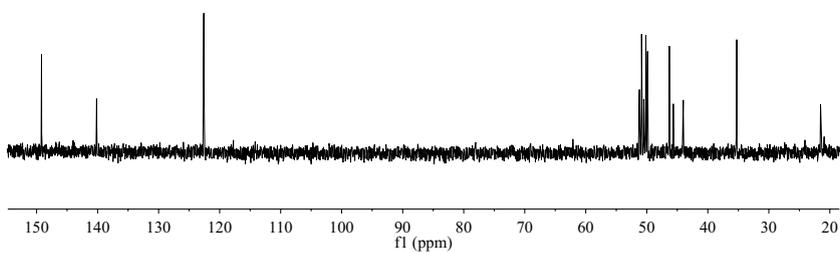
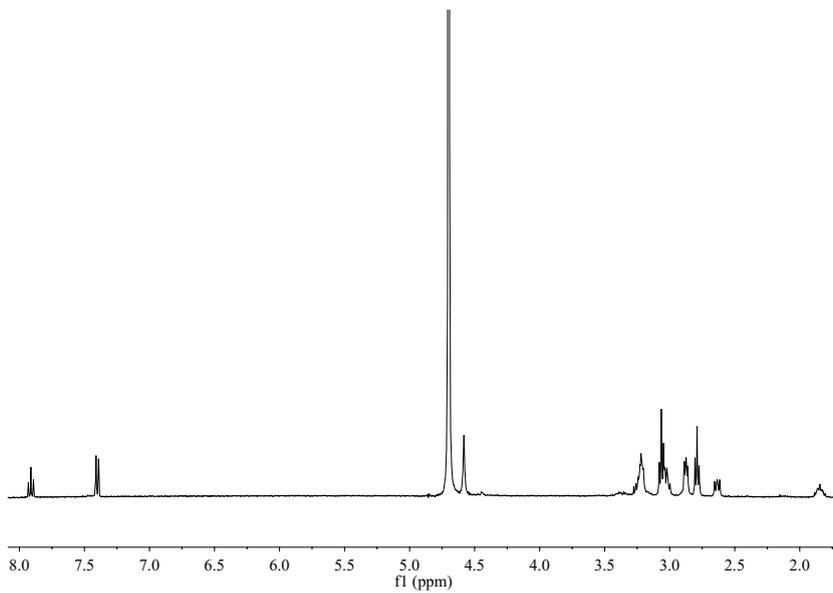
Listado de publicaciones directamente relacionadas con la tesis

(a) Guijarro, L.; Inclán, M.; Pitarch-Jarque, J.; Doménech-Carbó, Antonio.; Chicote, J. U.; Trefler, S.; García-España, E.; García-España, A.; Verdejo, Begoña. *Inorg. Chem.* **2017**, 56, 13748-13758.

Anexo 2. Espectros de RMN

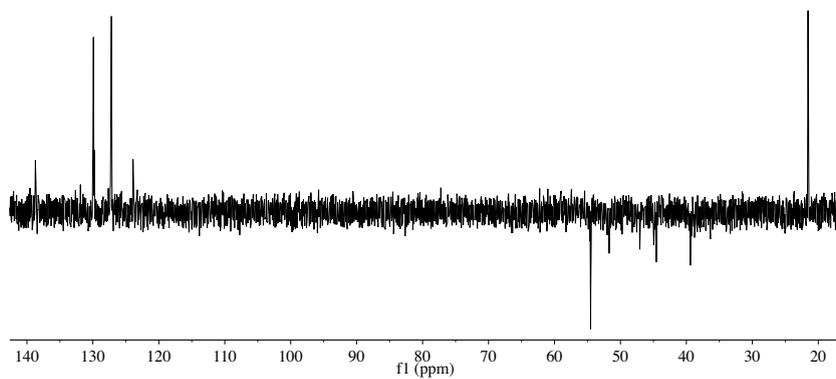
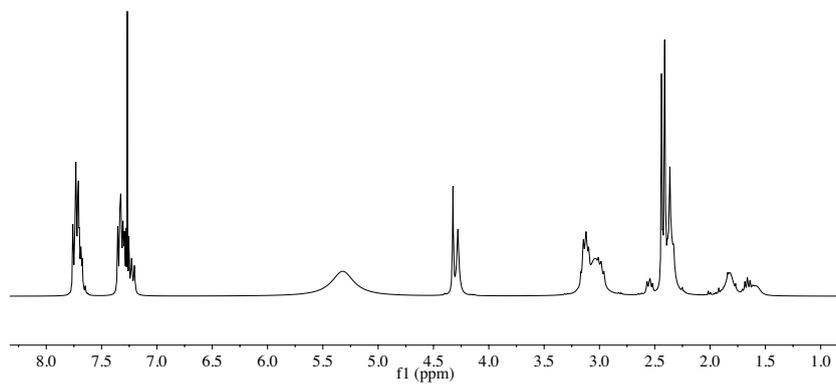


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L1-Ts

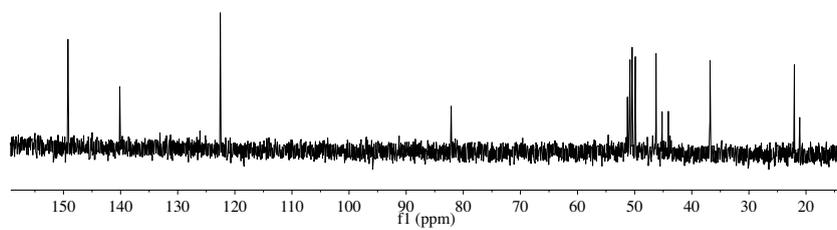
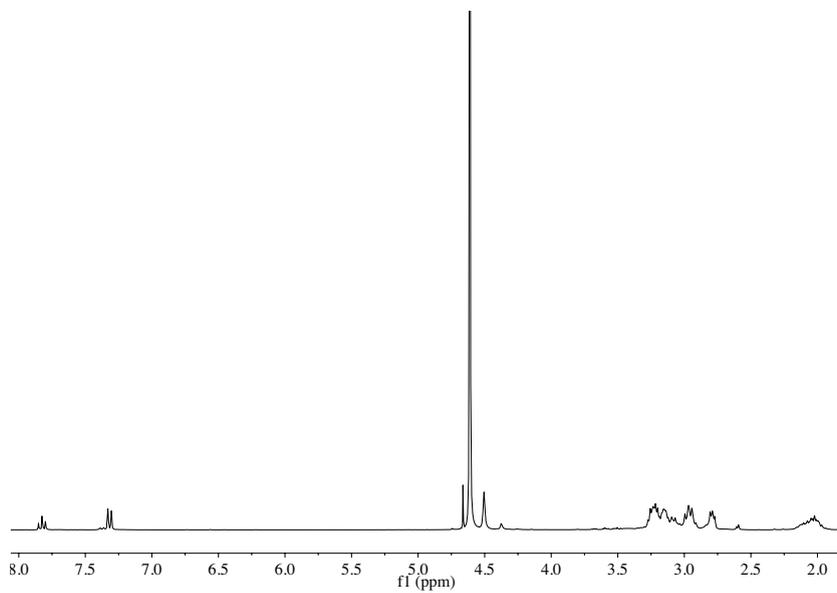


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L1

Anexos

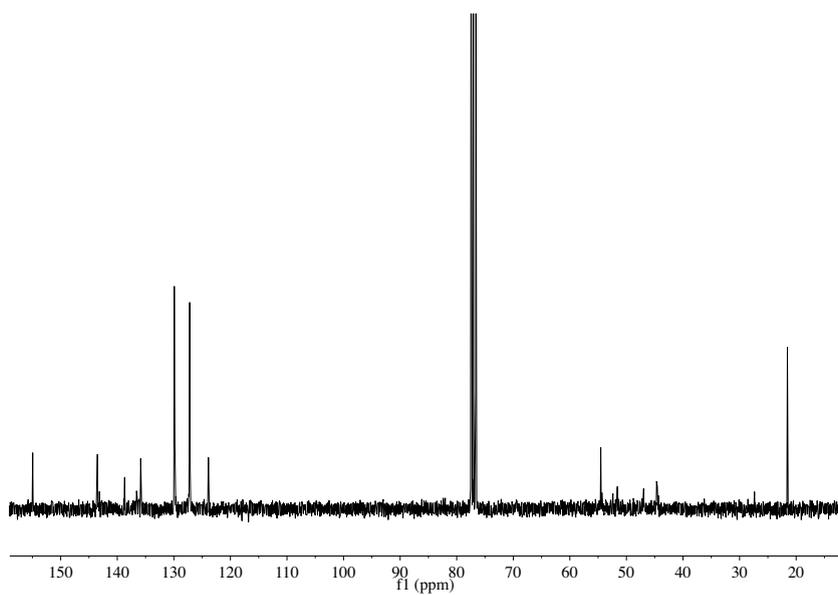
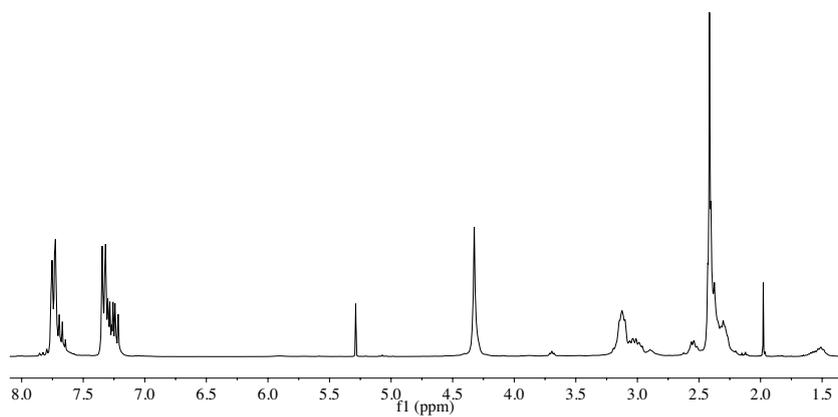


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C -DEPT para **L2-Ts**

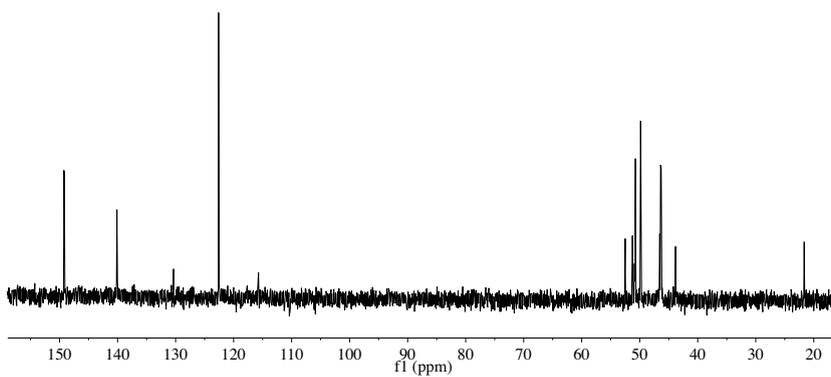
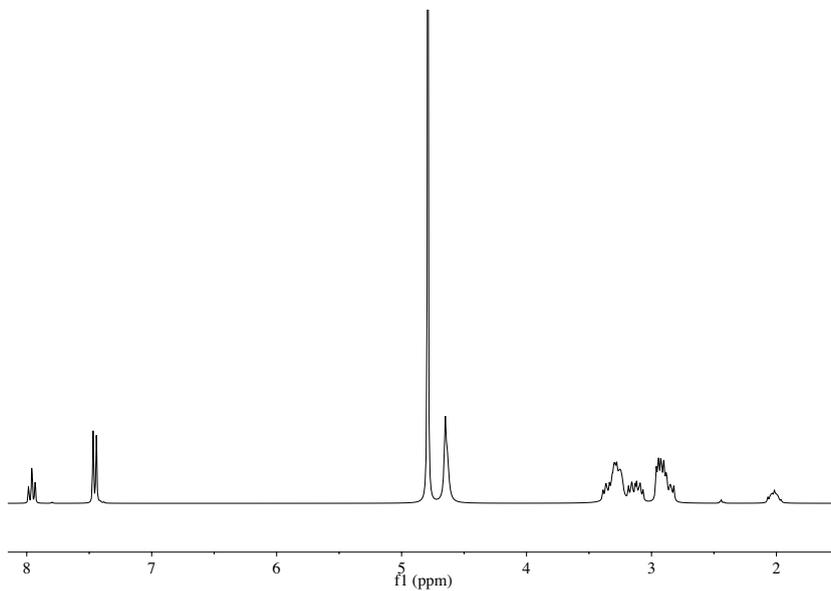


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L2

Anexos

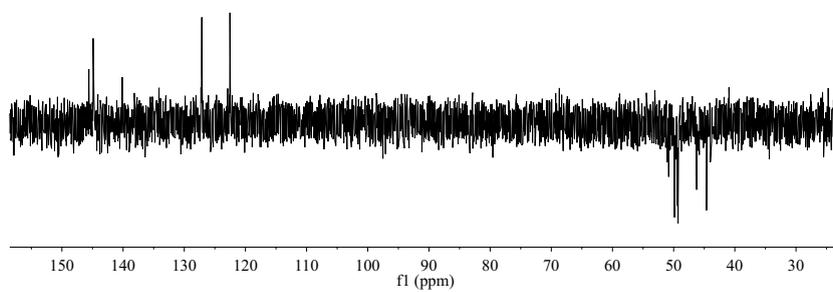
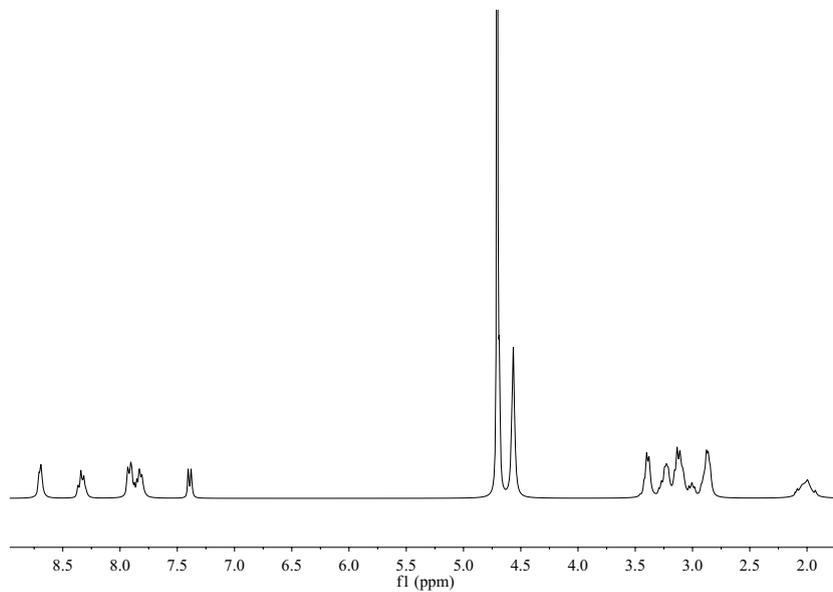


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L3-Ts

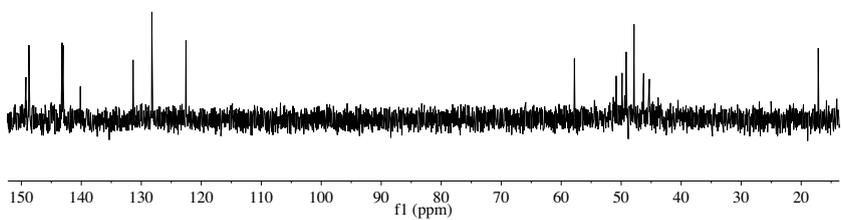
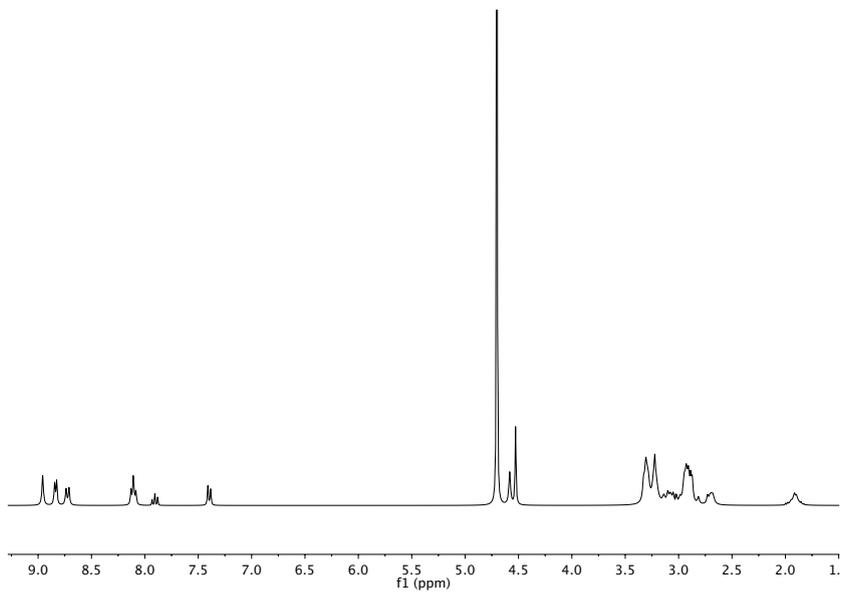


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L3

Anexos

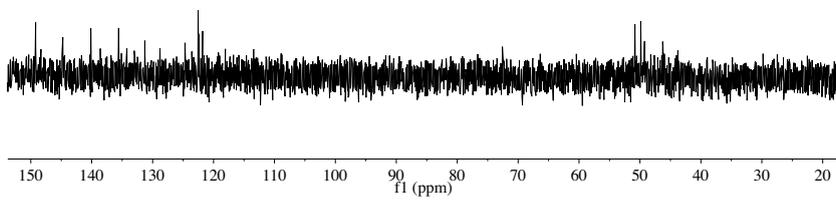
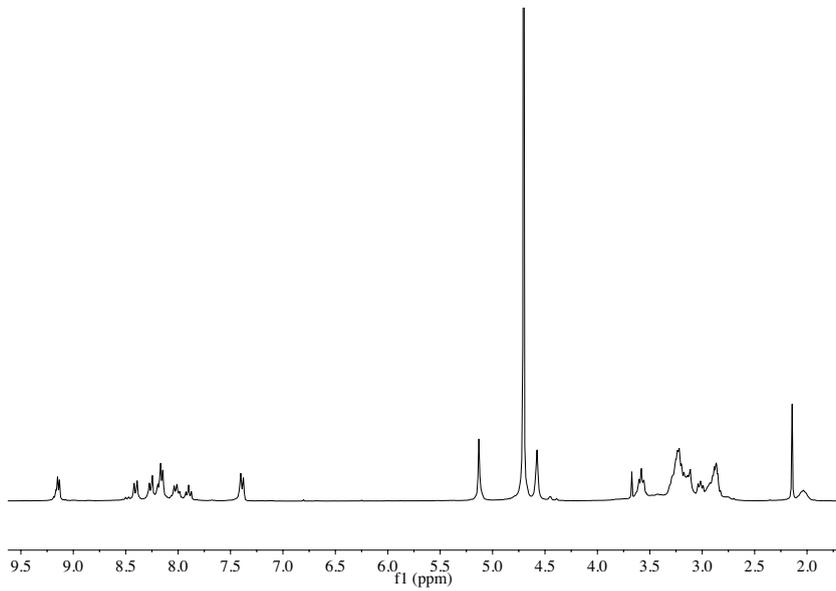


Espectros de RMN ¹H y ¹³C-DEPT para **L1-2Py**

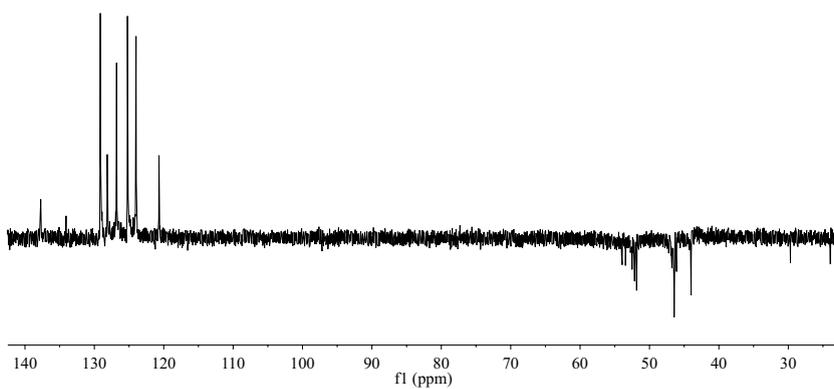
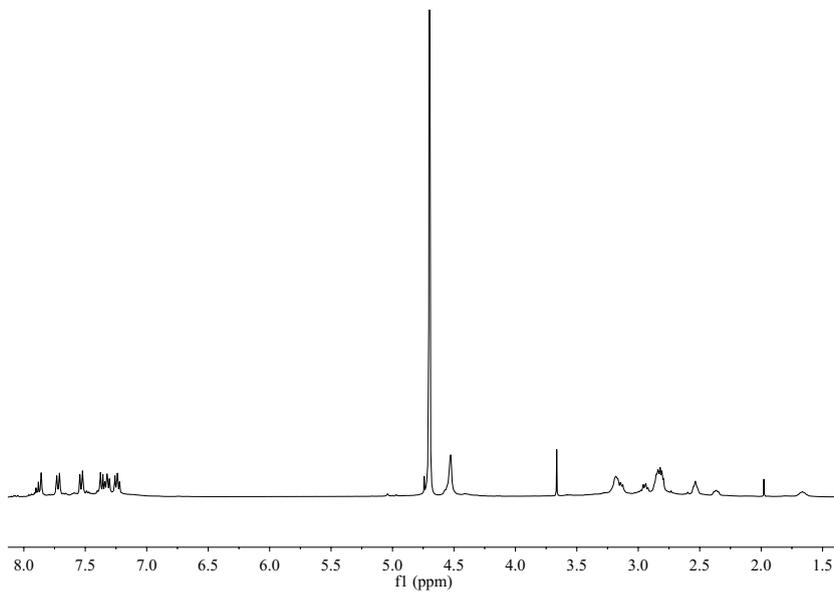


Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L1-3Py

Anexos



Espectros de RMN ^1H y ^{13}C para L1-4Q



Espectros de RMN ^1H y ^{13}C -DEPT para L1-A

Anexo 3. Datos cristalográficos

	[Cu ₂ L3Cl ₂](ClO ₄) ₂	[Cu ₂ (HL3)Br ₂](ClO ₄) ₃	[CuZnL3Cl ₂](ClO ₄) ₂
Fórmula empírica	C ₂₇ H _{48.33} Cl ₄ Cu ₂ N ₉ O _{9.67}	C ₃₄ H ₉₂ Br ₄ Cl ₆ Cu ₄ N ₁₈ O ₂₇	C ₂₇ H ₄₄ Cl ₄ CuN ₉ O ₈ Zn
Mw	922.64	2211.95	893.42
Temperatura	120.00(10)	120.00(10)	120
Sistema cristalino	orthorhombic	monoclinic	orthorhombic
Grupo espacial	Pnmm	P2 ₁ /n	Pnmm
a(Å)	27.845(4)	16.6488(5)	15.726(3)
b(Å)	15.657(2)	9.7909(4)	27.803(5)
c(Å)	8.616(2)	25.0215(8)	8.709(3)
α(°)	90	90	90
β(°)	90	94.233(3)	90
γ(°)	90	90	90
Volumen (Å ³)	3756.2(12)	4067.5(2)	3807.8(16)
Z	4	2	4
d _{calc} (g/cm ³)	1.632	1.806	1.558
Tamaño del cristal (mm)	0.15 × 0.15 × 0.1	0.2 × 0.1 × 0.08	0.33 × 0.2 × 0.06
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073	0.71073
F(000)	1907	2232	1840
μ (mm ⁻¹)	1.481	3.279	1.526
Corrección de absorción	Multi-scan	Multi-scan	Multi-scan
Rango Q	2.926 to 25	2.85 to 25	3.398 to 25
Reflecciones recolectadas	10072	19385	17165
Reflecciones únicas	3532	7150	3500
R(int)	0.0987	0.0495	0.1168
dat/restr/param	3532/105/294	7150/28/568	3500/148/280
[I > 2 sigma(I)]	R ₁ = 0.1415 wR ₂ = 0.2919	R ₁ = 0.0595 wR ₂ = 0.1439	R ₁ = 0.1496 wR ₂ = 0.3234
Índices R todos los datos	R ₁ = 0.1737 wR ₂ = 0.3129	R ₁ = 0.0812 wR ₂ = 0.1582	R ₁ = 0.1924 wR ₂ = 0.3479
GOF (F ²)	1.145	1.086	1.034