



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Facultad de Química

Departamento de Química Inorgánica

Química Supramolecular y Aspectos Biomédicos de Azamacrociclos [1+1] de 1*H*-Pirazol

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

Presentada por:

Alberto Lopera López

Directores:

Dr. D. Enrique García-España Monsonís

Dra. Dña. M. Paz Clares García

Mayo 2019

Valencia

D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia, y **Dña. M. Paz Clares García**, del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia,

CERTIFICAN:

Que la presente Memoria, titulada “**Química Supramolecular y Aspectos Biomédicos de Azamacrociclos [1+1] de 1H-Pirazol**”, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Valencia por el Licenciado **D. Alberto Lopera López**, y que encontrándose concluida, autorizan su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

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

Paterna, 3 de Mayo de 2019

D. Enrique García-España Monsonís

Dña. M. Paz Clares García

D. Alberto Lopera López, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad de Valencia, presenta esta Memoria, con el título “**Química Supramolecular y Aspectos Biomédicos de Azamacrociclos [1+1] de 1H-Pirazol**”, en el marco del programa de doctorado en Nanociencia y Nanotecnología, con el fin de optar al título de Doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Paterna, a día 3 de Mayo de 2019.

D. Alberto Lopera López

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mis directores de Tesis, el profesor Enrique García-España Monsonís y M. Paz Clares García, por haberme dado la oportunidad de realizar la Tesis en el grupo de Química Supramolecular. Gracias por todo el tiempo que me habéis dedicado. Gracias por haber estado siempre disponibles.

También quisiera dar las gracias a Javi y a Raquel. Por haberme introducido en el maravilloso universo del pirazol. Gracias por la paciencia infinita que tuvisteis conmigo desde el primer minuto. Porque sois los mejores.

No me olvido de la familia de Química Supramolecular. Han sido muchos años compartiendo laboratorio. Gracias a todos, tanto a los que habéis estado y ya no estáis, así como a los que estáis.

Quisiera agradecer al profesor Jonathan Steed por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Durham. También quiero dar las gracias a James, a Jess y a Yui, por lo mucho que me ayudaron desde el primer momento, pero también por las cervezas por Durham y por los buenos momentos que pasamos en el laboratorio. También a Juan y a Raquel (sí, otra vez), por estar siempre disponibles, y por hacerme mucho más fácil y mucho más divertida la estancia.

Por supuesto, a los estudiantes de TFG: Gema, César y Ariadna. Gracias en primer lugar por lo que habéis aportado a este trabajo. Pero sobre todo, gracias por lo mucho que he disfrutado en el laboratorio con vosotros. Gracias por hacer que cada día fuera distinto. Estoy muy muy muy orgulloso de vosotros.

A mis amigos de la carrera: José Alberto, Néstor, Alexis y Elena. ¿Qué puedo decir de vosotros? Os conozco desde hace más de diez años, entre carrera, máster y doctorado. Habéis estado siempre que os he necesitado, para la ciencia y para lo que no era ciencia. Habéis hecho que esto haya sido mucho más fácil y mucho más divertido. También a las personas que he conocido durante el máster o durante el doctorado: Sergio, Jorge, Roger y José Navarro. Habéis sido un descubrimiento maravilloso.

A mis amigos del barrio. Los de toda la vida: Estrela, Pagán, Javi y Ernesto. Gracias por formar parte de mi vida desde hace tantos años. Gracias por sacarme de casa cuando lo he necesitado. Gracias por las cervezas. Gracias en particular a Estrela y a Ernesto, por venir hasta Durham para visitarme, aunque casi no llegáis.

A mis padres y a mi hermana. Por lo mucho que habéis tenido que aguantar. Por lo mucho que hacéis siempre por mí. Por hacer que mi día a día haya sido muchísimo más fácil. A mis abuelos, por todo lo que habéis hecho por mí, no solo ahora, sino desde siempre. Por la comida de los viernes. La mejor forma de acabar la semana. A toda mi familia. Muchas gracias.

A Teresa y a Zero. Mis dos compañeros de vida. Porque para mí, vosotros dos lo sois todo. Habéis estado siempre. En los buenos momentos, pero sobre todo en los malos. Porque siempre que lo he necesitado, me habéis dado la energía que me faltaba. Porque sin vosotros dos esto no habría sido posible. Hacéis que la vida sea maravillosa. Gracias por haber creído siempre en mí. Os quiero mucho.

Nota del Autor

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a distintas colaboraciones, las cuales me gustaría destacar.

La síntesis y caracterización de los compuestos **L7** y **L8**, así como parte de los estudios en disolución acuosa, ha sido realizada por los estudiantes Gema Alfonso Landete y César Engra Tomás, respectivamente.

La medida y la resolución de las estructuras cristalinas han sido realizadas por el Dr. Javier Pitarch Jarque.

La interpretación de las medidas de electroquímica ha sido realizada por el profesor Antonio Doménech Carbó.

Los valores de IC_{50} y de k_{cat} en la evaluación de la actividad superóxido dismutasa han sido determinados con la ayuda del Dr. Salvador Blasco Llopis.

El estudio de la citotoxicidad de los compuestos **L6-L8** ha sido realizado por la estudiante de doctorado Isabel Pont Nicolòs.

Índice

Índice	I
Abreviaturas y Acrónimos	VII
Abstract	XI
Capítulo 1. Introducción	1
1.1. La Química Supramolecular	3
1.1.1. ¿Qué es la Química Supramolecular?	3
1.1.2. Las interacciones intermoleculares	10
1.1.3. El enlace de coordinación	22
1.1.4. Reconocimiento molecular, catálisis supramolecular, transporte supramolecular, y auto-ensamblaje	24
1.2. Azamacrociclos [1+1] con unidades 1 <i>H</i> -Pirazol	34
1.2.1. La química del 1 <i>H</i> -pirazol	34
1.2.2. Desarrollo de receptores con unidades 1 <i>H</i> -pirazol: De la mimesis a la búsqueda de nuevas propiedades electrónicas y magnéticas	39
1.3. Bibliografía	51
Capítulo 2. Objetivos	59

Capítulo 3. Material y Métodos	65
3.1. Potenciometría	67
3.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	75
3.3. Espectrometría de Masas	76
3.4. Análisis Elemental	77
3.5. Determinación del Punto de Fusión	77
3.6. Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica	78
3.7. Difracción de Rayos X	79
3.8. Espectroscopia de Absorción UV-Visible	80
3.9. Espectroscopia de Emisión de Fluorescencia	81
3.10. Preparación de los Hidrogeles	82
3.11. Test de Inversión	82
3.12. Reología	83
3.13. Crio-Microscopía Electrónica de Barrido	85
3.14. <i>Dropping Ball</i>	85
3.15. Electroquímica	86
3.16. Método McCord-Fridovich	87
3.17. Método Intrínseco	92

3.18. Desnaturalización Térmica–FRET	99
3.19. Ensayo de Proliferación Celular por MTT	107
3.20. Bibliografía	111
Capítulo 4. Nomenclatura	113
4.1. Nomenclatura IUPAC	115
4.2. Nomenclatura Simplificada	118
4.3. Bibliografía	122
Chapter 5. Synthesis and Characterization	123
5.1. Introduction	125
5.2. Modification of the Pyrazole Moiety	129
5.2.1. Synthesis of ethyl 1 <i>H</i> -pyrazole-3,5-dicarboxylate	130
5.2.2. Synthesis of 3,5-bis-(hydroxymethyl)-1 <i>H</i> -pyrazole	131
5.2.3. Synthesis of 3,5-bis-(chloromethyl)-1 <i>H</i> -pyrazole	132
5.2.4. Synthesis of 3,5-bis-(chloromethyl)-1-(tetrahydropyran-2-yl)-pyrazole	133
5.3. Polyamine Protection with the Tosyl Group	134
5.4. Lengthening of Lineal Polyamines	138

5.4.1. Reaction with N-(3-bromopropyl)phthalimide	138
5.4.2. Removal of the phthalimide groups	140
5.5. Cyclisation	142
5.6. Removal of Tosyl and Tetrahydropyran-2-yl Groups	149
5.7. Functionalization	156
5.8. References	160
Capítulo 6. Propiedades Ácido-Base y Química de Coordinación	161
6.1. Propiedades Ácido-Base	163
6.1.1. Ligandos basados en poliaminas lineales	165
6.1.2. Ligandos de tipo escorpiando	176
6.2. Química de Coordinación con Cobre(II)	185
6.2.1. Ligandos basados en poliaminas lineales	186
6.2.2. Ligandos de tipo escorpiando	227
6.3. Química de Coordinación con Zinc(II)	238
6.3.1. Ligandos basados en poliaminas lineales	239
6.3.2. Ligandos de tipo escorpiando	250
6.4. Bibliografía	253

Capítulo 7. Formación de Hidrogeles con 5'-Guanosina Monofosfato	255
7.1. Introducción	257
7.2. Formación de Hidrogeles Híbridos GMP-Poliamina	266
7.3. Reología: Estudio de las Propiedades Mecánicas de los Hidrogeles	270
7.4. Resonancia Magnética Nuclear: Estudio de la Cinética de Formación de los Hidrogeles	278
7.5. Crio-Microscopía Electrónica de Barrido: Estudio de la Morfología de los Hidrogeles	283
7.6. Hidrogeles Híbridos GMP-Poliamina como Materiales Biocompatibles	286
7.7. Conclusiones	294
7.8. Bibliografía	296
Capítulo 8. Miméticos de la Enzima Cu,Zn-SOD	299
8.1. Introducción	301
8.2. Electroquímica	318
8.3. Evaluación de la Actividad Superóxido Dismutasa	322
8.4. Conclusiones	326
8.5. Bibliografía	327

Capítulo 9. Interacción con Oligonucleótidos	331
9.1. Introducción	333
9.2. Valoraciones Fluorimétricas Directas	343
9.3. Desnaturalización Térmica-FRET	349
9.4. Ensayo de Proliferación Celular por MTT: Estudio de la Citotoxicidad	358
9.5. Conclusiones	360
9.6. Bibliografía	363
Chapter 10. Conclusions	365
Annex A. Nuclear Magnetic Resonance	377
Anexo B. Espectrometría HR-ESI-Masas	411
Anexo C. Datos Cristalográficos	435
Anexo D. Publicaciones	449

Abreviaturas y Acrónimos

λ	Longitud de onda
τ	Parámetro de Addison
γ	Límite de elasticidad
A	Adenina
AcOH	Ácido acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIE	Aggregation Induced Emission
ARN	Ácido desoxirribonucleico
Asp	Aspartato
C	Citosina
Cac	Cacodilato
CHEQ	Chelation Enhancement of the Quenching
Cryo-SEM	Cryo-Scanning Electron Microscopy
d	Doblete
dd	Doblete de dobletes
DHP	3,4-Dihidro-2H-pirano
DIBAL-H	Hidruro de diisobutilaluminio
DME	Etilenglicol dimetiléter
DMF	2,5-Dimetilfurano
EPR	Electron Paramagnetic Resonance
ESI	Electrospray Ionization
EtOH	Etanol

FAM	Fluoresceína
FRET	Förster Resonance Energy Transfer
G	Guanina
G'	Módulo de almacenamiento
G''	Módulo de pérdida
GMP	5'-Guanosina monofosfato
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfónico
His	Histidina
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
ICMol	Instituto de Ciencia Molecular
IUPAC	International Union of Pure and Applied chemistry
J	Constante de acoplamiento
LMWG	Low Molecular Weight Gelator
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
m	Multiplete
MF	Monoformazano
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NBT	Nitroblue Tetrazolium
PDB	Protein Data Bank
PET	Photoinduced Electron Transfer
PhOH	Fenol

q	Cuadruplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
ROS	Reactive Oxygen Species
s	Singulete
SCSIE	Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental
SEM	Scanning Electron Microscopy
SOD	Superóxido Dismutasa
T	Timina
TAMRA	Carboxy Tetramethyl-Rhodamine
TOF	Time Of Flight
TPA	Trifenilamina
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Ts	Tosilo
U	Uracilo

Abstract

The synthesis and characterization of two new families of 1*H*-pyrazole-based [1+1] azamacrocycles is presented. The first family is formed by five ligands containing in their structure the 1*H*-pyrazole ring as spacer and different linear polyamines, while the second family is constituted by three scorpiand-like ligands having the 1*H*-pyrazole ring as spacer and the tripodal polyamine tris(2-aminoethyl)amine.

The acid-base behaviour and the coordination chemistry with copper(II) and zinc(II) cations was studied in aqueous solution by means of pH-metric titrations, UV-vis spectroscopy, HR-ESI-mass spectrometry and fluorescence experiments, revealing different behaviours depending on the structure of the azamacrocycle. X-ray crystallography studies showed an interesting and often surprising solid state chemistry, noticing a wide range of stoichiometries in some cases with the ability to capture atmospheric carbon dioxide.

We demonstrate how the nature of the polyamine which constitutes the azamacrocycle as well as the number of amino groups and/or the chain size allow us to employ the compound for different purposes, including the formation of hybrid hydrogels with guanosine 5'-monophosphate, the design of new superoxide dismutase enzyme mimetics, and the interaction with duplex and quadruplex oligonucleotide sequences.

1

Introducción

1.1. La Química Supramolecular

1.1.1. ¿Qué es la Química Supramolecular?

El término *Química Supramolecular* fue introducido por primera vez por Jean-Marie Lehn en 1978 para hacer referencia a la química de las interacciones intermoleculares.^[1] Del mismo modo que la química molecular estudia las moléculas, las cuales están constituidas por átomos conectados mediante enlaces covalentes, la química supramolecular estudia las entidades moleculares de mayor complejidad, constituidas por varias moléculas y conectadas mediante interacciones intermoleculares de naturaleza no covalente. En la Figura 1.1 se representan esquemáticamente los conceptos de química molecular y química supramolecular.

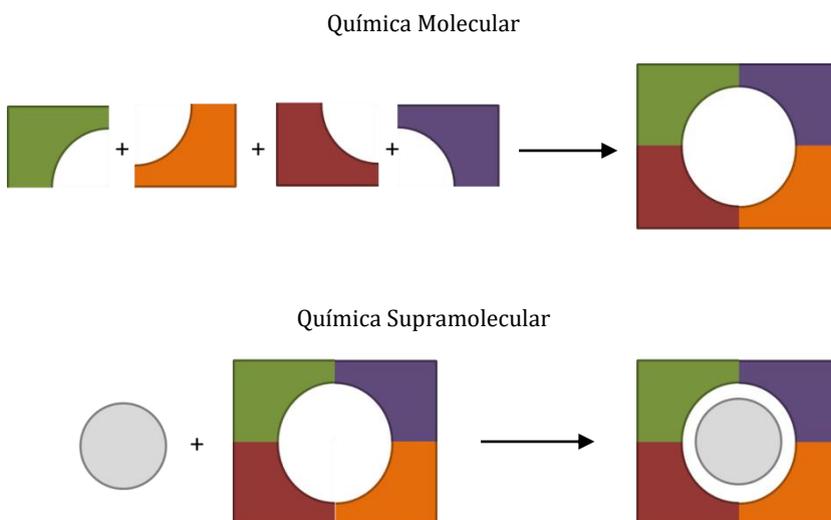


Figura 1.1. Representación esquemática de los conceptos de química molecular y de química supramolecular.

La historia de la química supramolecular comienza en 1873, cuando el físico holandés Johannes Diderik van der Waals postuló en su memoria de Tesis Doctoral por primera vez la existencia de las fuerzas intermoleculares para explicar la no idealidad de los gases reales.^[2] En 1891, el farmacéutico y químico francés Antoine Villiers publicó el artículo *Sur la fermentation de la fécule par l'action du ferment butyrique* (Sobre la fermentación del almidón por la acción del fermento butírico) en la revista *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, donde entre otras cosas se describe la formación de dextrinas.^[3] Hoy en día se sabe que estos compuestos no eran dextrinas, sino ciclodextrinas, y que está considerado como el primer ejemplo de síntesis de un receptor molecular. Dos años más tarde, Alfred Werner introduce el concepto de química de coordinación,^[4] y un año después Emil Fischer propone el modelo de llave-cerradura, que describe la interacción selectiva entre una enzima y un sustrato, el cual se basa en la complementariedad entre enzima y sustrato.^[5]

En 1937 el químico alemán Karl Lothar Wolf introduce el término *übermoleküle* (*supramolécula*) para hacer referencia a la formación de dímeros del ácido acético mediante interacciones intermoleculares,^[6] en concreto mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Dos años más tarde, el químico y bioquímico estadounidense Linus Pauling incluye los enlaces de hidrógeno en su libro *The Nature of the Chemical Bond*,^[7] considerado como una de las obras científicas más influyentes de todos los tiempos.

En 1953 se publica el artículo científico *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid* en la revista *Nature*,^[8] donde los biólogos James Watson y Francis Crick, basándose en las imágenes de rayos X tomadas por la investigadora británica Rosalind Franklin,^[9] determinan la estructura del ADN. Esta biomolécula contiene codificada la información genética de todos los organismos vivos conocidos, así como la de algunos virus. La química supramolecular juega un papel fundamental en la organización de esta biomolécula, pues las interacciones intermoleculares son responsables de la conformación y geometría finales de la estructura de la misma.

En las décadas de los sesenta y setenta tuvieron lugar una serie de acontecimientos que revolucionaron el área de la química supramolecular. En 1967, el químico estadounidense Charles John Pedersen publica dos artículos donde se describía la síntesis de poliéteres cíclicos,^[10,11] conocidos comúnmente como *éteres corona*. Estas fueron las primeras moléculas sintetizadas con capacidad para formar complejos estables con cationes de metales alcalinos. En la Figura 1.2 se representan algunos de los éteres corona desarrollados por Charles Pedersen y colaboradores.

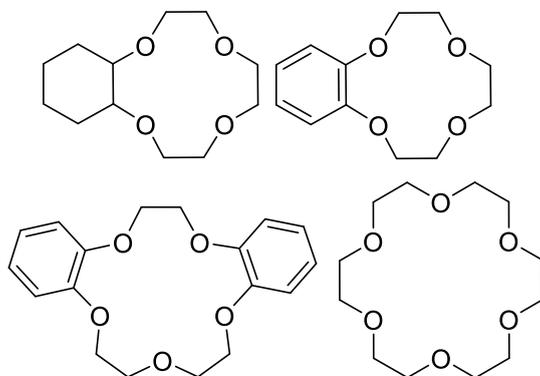


Figura 1.2. Éteres corona desarrollados por Charles Pedersen y colaboradores, publicados en la revista *Journal of the American Chemical Society* en 1967.

Dos años más tarde, los químicos franceses Jean-Marie Lehn, Bernard Dietrich y Jean-Pierre Sauvage diseñaron, prepararon, y estudiaron los primeros *criptandos*, moléculas análogas a los éteres corona desarrollados por Charles Pedersen, pero que presentan una cavidad macrocíclica tridimensional. Este hecho les confiere una mayor selectividad frente a los cationes de los metales alcalinos, haciendo que los complejos resultantes sean más estables. En la Figura 1.3 se ilustran algunos de los criptandos desarrollados por Jean-Marie Lehn, descritos por primera vez en junio de 1969 en dos artículos en la revista *Tetrahedron*.^[12,13]

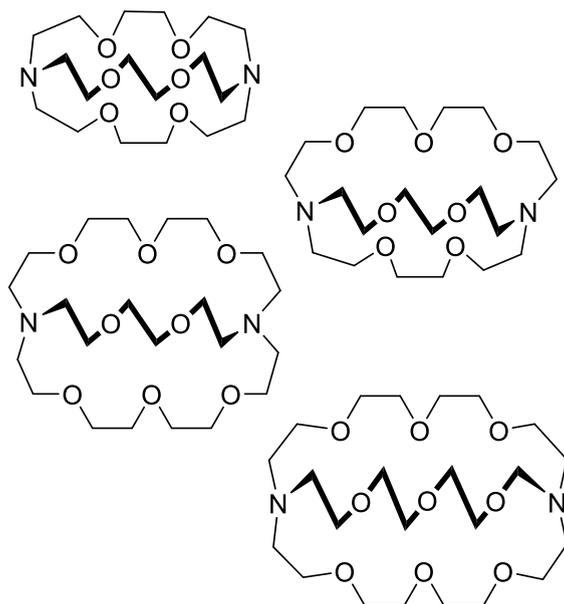


Figura 1.3. Familia de criptandos diseñados, preparados, y estudiados por Jean-Marie Lehn, Bernard Dietrich y Jean-Pierre Sauvage, publicados en la revista *Tetrahedron* en 1969.

En 1973, basándose en los trabajos de Charles Pedersen, el químico estadounidense Donald James Cram y colaboradores publicaron cinco artículos,^[14-18] en los que se describe la síntesis de una serie de moléculas tridimensionales, las cuales recibieron el nombre de *esferandos*, algunas de las cuales se representan en la Figura 1.4.

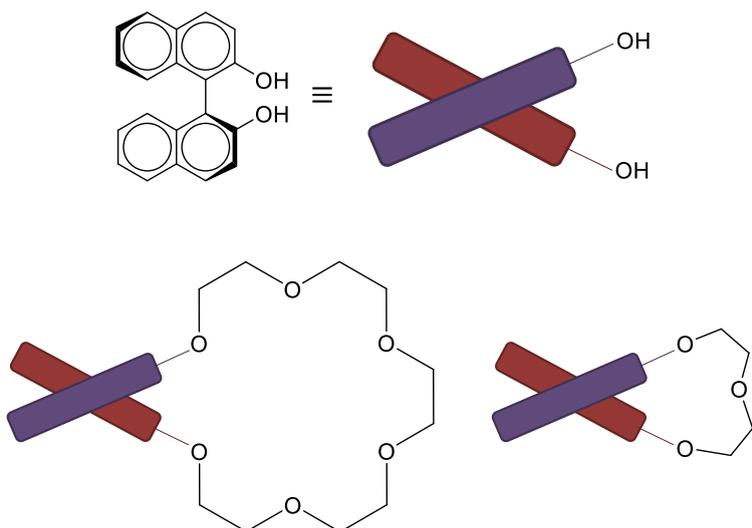


Figura 1.4. Familia de esferandos desarrollados por Donald Cram y colaboradores, publicados durante 1973 en las revistas *Journal of the American Chemical Society* y *Chemical Communications*.

El punto culminante de la química supramolecular tuvo lugar en 1987, cuando Donald Cram, Jean-Marie Lehn y Charles Pedersen recibieron el premio Nobel de Química por sus trabajos pioneros en el campo de la química supramolecular, así como por su contribución al desarrollo de esta nueva disciplina.

Desde entonces, la química supramolecular ha suscitado un enorme interés, el cual ha crecido exponencialmente con el tiempo:

Robert Curl, Harold Kroto y Richard Smalley recibieron el Premio Nobel de Química en 1996 por el descubrimiento de una nueva forma estable del carbono: los fullerenos.^[19-21] Estos han sido estudiados exhaustivamente durante los últimos 30 años. Los fullerenos, entre otras aplicaciones, han sido utilizados con fines biomédicos como agentes de contraste de imagen, así como portadores de fármacos.

Casi una década después, los estadounidenses Peter Agre^[22-24] y Roderick MacKinnon^[25,26] recibieron el Premio Nobel de Química en 2003 por los descubrimientos referentes a los canales de agua en membranas celulares, revelando toda una familia de máquinas moleculares: canales, puertas y válvulas, indispensables para el correcto funcionamiento de la célula.

Más recientemente, Fraser Stoddart,^[27-29] Jean-Pierre Sauvage^[30-32] y Ben Feringa^[33-35] recibieron el Premio Nobel de Química en 2016 por el diseño y síntesis de máquinas moleculares. Las máquinas moleculares son supramoléculas que han sido diseñadas y desarrolladas para realizar movimientos mecánicos (output) en respuesta a una serie de estímulos externos apropiados (input), tales como cambios en el pH del medio, cambios en la temperatura o la exposición a la radiación electromagnética, entre otros.

- 1873** Johannes van der Waals postula la existencia de las interacciones intermoleculares.
- 1893** Alfred Werner: La química de coordinación.
- 1894** Emil Fisher desarrolla el concepto de llave y cerradura.
- 1937** Karl Wolf introduce el término *übermoleküle*.
- 1939** Linus Pauling publica el libro *The Nature of the Chemical Bond*, donde se incluye el enlace de hidrógeno.
- 1953** James Watson y Francis Crick determinan la estructura del ADN, basándose en las imágenes de rayos X tomadas por Rosalind Franklin.
- 1967** Charles Pedersen: Síntesis de los primeros éteres corona.
- 1969** Jean-Marie Lehn, Bernard Dietrich y Jean-Pierre Sauvage: Síntesis de los primeros criptandos.
- 1973** Donald Cram: Síntesis de los primeros esferandos.
- 1978** Jean-Marie Lehn introduce el término *Química Supramolecular*.
- 1987** Donald Cram, Jean-Marie Lehn y Charles Pedersen: Premio Nobel de Química por su trabajo en el campo de la Química Supramolecular.
- 1996** Robert Curl, Harold Kroto y Richard Smalley: Premio Nobel de Química por el descubrimiento de una nueva forma del carbono: los Fullerenos.
- 2003** Peter Agre y Roderick MacKinnon: Premio Nobel de Química por los descubrimientos referentes a los canales en membranas celulares.
- 2016** Fraser Stoddart, Jean-Pierre Sauvage y Ben Feringa: Premio Nobel de Química por el diseño y síntesis de máquinas moleculares.

1.1.2. Las interacciones intermoleculares^[36]

Las entidades supramoleculares o supramoléculas están formadas por dos o más moléculas conectadas entre sí mediante interacciones de naturaleza no covalente, que reciben el nombre de *interacciones supramoleculares* o *interacciones intermoleculares*. Las interacciones intermoleculares pueden ser tanto atractivas como repulsivas, y se pueden clasificar en direccionales, como los enlaces de hidrógeno y las interacciones π - π , anión- π y catión- π , y en no direccionales, como las interacciones ión-ión y las fuerzas de van der Waals. En la Tabla 1.1 se recogen los principales tipos de interacciones intermoleculares.

Tabla 1.1. Tipos de interacciones intermoleculares.^[36]

Interacciones Intermoleculares	Energía (kJ·mol ⁻¹)
Ión-ión	100-350
Ión-dipolo	50-200
Dipolo-dipolo	5-50
Interacciones π - π	2-50
Interacciones anión- π	2-40
Interacciones catión- π	5-80
Enlace de hidrógeno	4-120
Fuerzas de van der Waals	< 5

Interacciones ión-ión

Las interacciones ión-ión tienen lugar entre especies iónicas. Se trata de interacciones de tipo electrostático no direccionales, que pueden ser atractivas o repulsivas. Aunque se clasifican como interacciones intermoleculares, son muy intensas y su energía es comparable a la del enlace covalente, siendo inversamente proporcional a la distancia entre iones ($1/r$). Un sólido iónico típico es el cloruro de sodio, el cual en el estado sólido presenta una estructura cristalina cúbica en la que cada ión se encuentra rodeado por seis iones de signo opuesto, como se representa en la Figura 1.5.

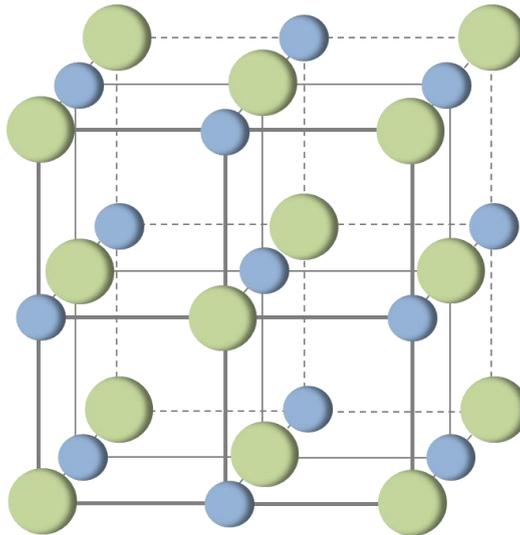


Figura 1.5. Estructura cristalina del cloruro de sodio. Aniones cloruro, en verde. Cationes sodio, en azul.

Interacciones ión-dipolo

Las interacciones ión-dipolo se producen entre una especie iónica y una molécula neutra con momento dipolar distinto de cero. También se trata de interacciones de tipo electrostático, pero no son tan intensas como las interacciones ión-ión. Presentan cierto grado de direccionalidad debido a la naturaleza anisotrópica de las moléculas polares, siendo la intensidad de las mismas inversamente proporcional al cuadrado de la distancia entre el ión y el dipolo ($1/r^2$). Un ejemplo de interacciones ión-dipolo se da en disoluciones acuosas de cloruro de sodio. Los aniones cloruro interaccionan con los hidrógenos de las moléculas de agua, que presentan densidad de carga positiva. En cambio, los cationes sodio lo hacen con el oxígeno de las moléculas de agua, con densidad de carga negativa, según se ilustra en la Figura 1.6.

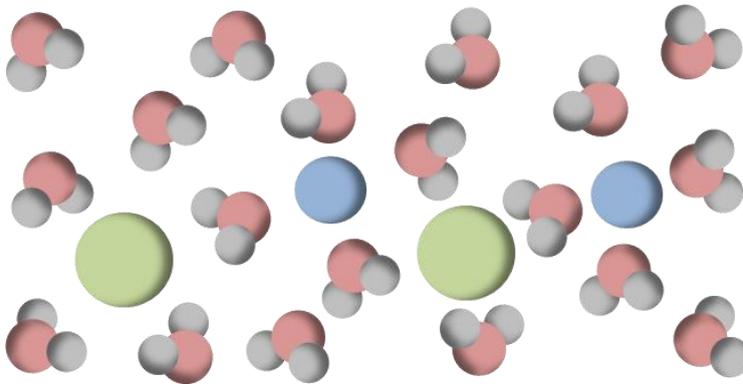


Figura 1.6. Representación esquemática de las interacciones ión-dipolo entre los aniones cloruro y los cationes sodio, con las moléculas de agua. Aniones cloruro, en verde. Cationes sodio, en azul. Hidrógeno, en gris. Oxígeno, en rojo.

Interacciones dipolo-dipolo

Las interacciones dipolo-dipolo se dan entre moléculas con un momento dipolar distinto de cero. Son interacciones débiles de tipo electrostático y que presentan cierto grado de direccionalidad, siendo la intensidad de las mismas inversamente proporcional al cubo de la distancia entre dipolos ($1/r^3$). No obstante, pueden jugar un papel muy importante en la organización de entidades supramoleculares, como en la disposición de los hidrocarburos polares que se agregan para formar micelas o bicapas lipídicas. En la Figura 1.7 se representa la estructura de una micela en medio acuoso. La parte no polar del hidrocarburo se orienta hacia el interior, mientras que la parte polar lo hace hacia el exterior, interaccionando con las moléculas de agua mediante interacciones de tipo dipolo-dipolo.

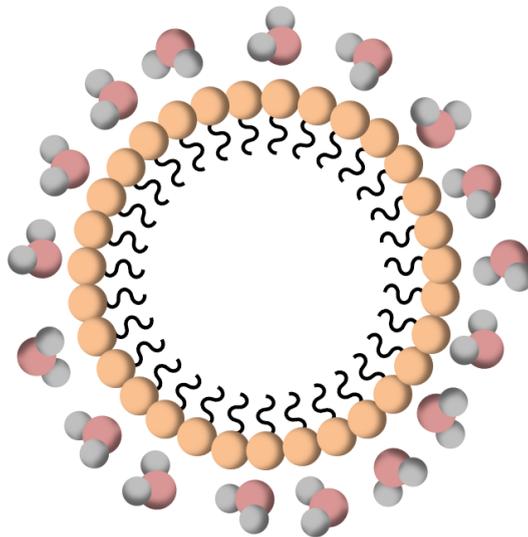


Figura 1.7. Representación esquemática de la estructura de una micela en disolución acuosa. La parte polar, representada en naranja, se orienta hacia las moléculas de agua.

Interacciones π - π

Las interacciones π - π son aquellas que tienen lugar entre sistemas π , es decir, entre sistemas aromáticos. Habitualmente se dan en situaciones en las que uno de los sistemas es rico en densidad electrónica y el otro es deficiente en densidad electrónica, pudiendo ser de naturaleza atractiva o repulsiva. Básicamente, existen dos tipos de interacciones π - π : cara-cara y cara-lado, aunque se conoce una gran variedad de geometrías intermedias.

Toda la variedad de geometrías se pueden explicar haciendo uso del modelo teórico desarrollado por los investigadores Christopher Hunter y Jeremy Sanders,^[37] el cual además permite predecir cuantitativamente la energía de interacción entre dos sistemas aromáticos. El modelo Hunter-Sanders considera que un sistema aromático está formado por tres capas: dos capas exteriores con simetría π con carga $-1/2$, y una capa central con simetría σ con carga $+1$. En la Figura 1.8 se aplica el modelo Hunter-Sanders para el caso de la molécula de benceno, a modo de ejemplo.

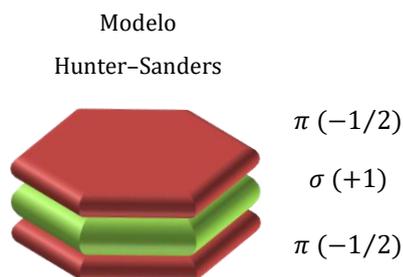


Figura 1.8. Modelo Hunter-Sanders aplicado a la molécula de benceno.

Las interacciones cara-cara se producen entre sistemas aromáticos orientados de forma paralela. Pueden ser atractivas o repulsivas, dependiendo de cómo se produce el solapamiento entre las nubes de densidad electrónica. El solapamiento directo da lugar a interacciones repulsivas, mientras que el solapamiento entre sistemas desplazados da lugar a interacciones atractivas, como se representa en la Figura 1.9.

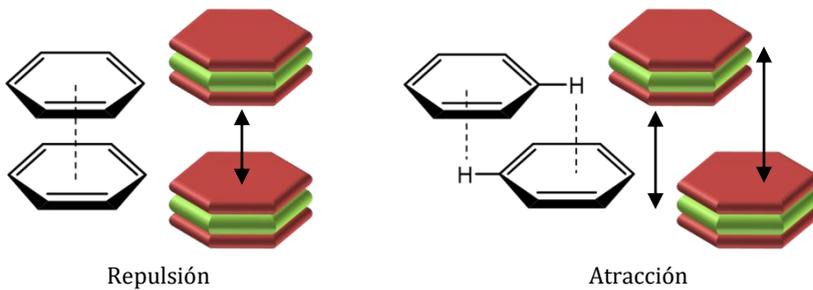


Figura 1.9. Distintos modos de interacciones cara-cara.

Estas interacciones se producen entre las capas de grafeno apiladas unas encima de otras que constituyen el grafito, siendo responsables de las propiedades finales del grafito (Figura 1.10).

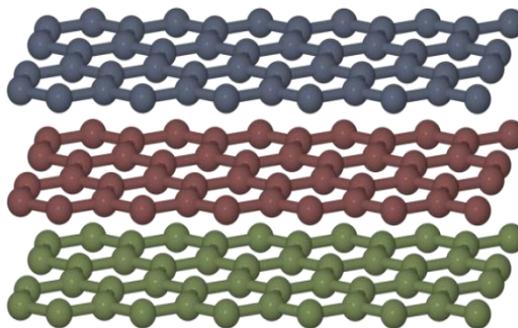


Figura 1.10. Representación esquemática de la estructura del grafito.

Las interacciones cara-lado tienen lugar entre sistemas aromáticos orientados perpendicularmente, como se representa en la Figura 1.11. Son interacciones atractivas y se pueden considerar como una forma débil de enlace de hidrógeno entre los átomos de hidrógeno de uno de los sistemas aromáticos y la nube de electrones π del otro sistema.

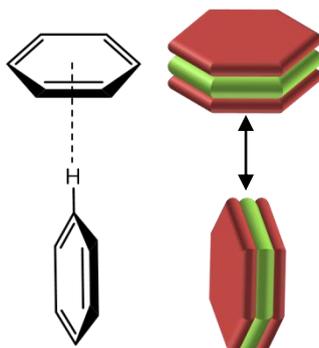


Figura 1.11. Representación esquemática de la interacción cara-lado.

Estas interacciones son responsables directas del característico modo de cristalizar en forma de espiga de muchos hidrocarburos aromáticos, como en el caso del benceno (Figura 1.12).

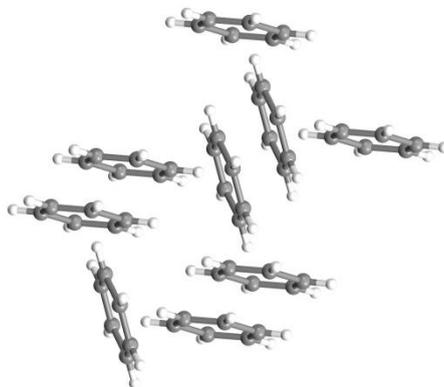


Figura 1.12. Estructura de rayos X del benceno, adaptada de la referencia [38].

Interacciones catión- π

Las interacciones catión- π se dan entre un catión y un sistema π , que puede ser un sistema aromático o bien un doble o triple enlace. Estas interacciones son de naturaleza electrostática con cierto componente de polarización. El catión experimenta una interacción atractiva con la nube de electrones π , que presenta densidad de carga negativa. La naturaleza del catión, la presencia de sustituyentes en el sistema π , así como el disolvente, determinan la magnitud de la interacción.

Estas interacciones son determinantes en el reconocimiento molecular de cationes por parte de algunos receptores sintéticos, estabilizando y condicionando la conformación final de la supramolécula, como es el caso de los *éteres lariat*, que son éteres corona que incorporan cadenas laterales flexibles que contienen átomos dadores.^[39] En la Figura 1.13 se presenta la estructura cristalina de un éter lariat que incorpora en su estructura una unidad de benceno, donde se producen interacciones catión- π entre la unidad de benceno y un catión potasio, el cual se encuentra coordinado a los cuatro átomos de oxígeno y los dos de nitrógeno que constituyen el éter lariat.

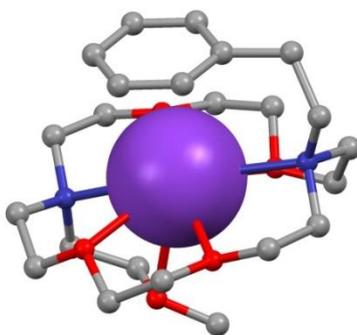


Figura 1.13. Estructura cristalina de un éter lariat donde se producen interacciones catión- π , adaptada de la referencia [40]. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Potasio, en morado.

Interacciones anión- π

Las interacciones anión- π son menos intuitivas que las interacciones catión- π , pues resulta lógico pensar que la interacción entre un anión y un sistema aromático es repulsiva. Sin embargo, estudios teóricos han demostrado que sistemas aromáticos deficientes en densidad electrónica, debido a la presencia de átomos electronegativos, exhiben interacciones atractivas con aniones. Estas interacciones son de naturaleza electrostática, presentando cierto componente de polarización.^[41] La mayoría de las evidencias experimentales de estas interacciones proviene de estudios con receptores orgánicos y metal-orgánicos desarrollados para el reconocimiento y captación de aniones, como el caso que se muestra en la Figura 1.14.

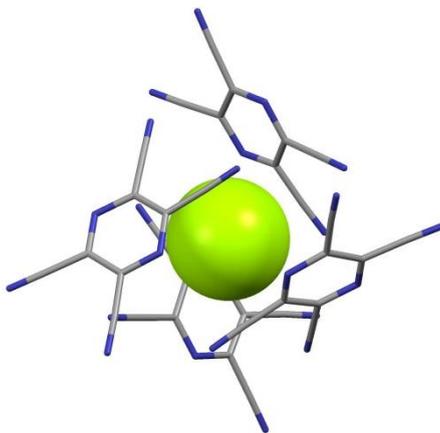


Figura 1.14. Estructura cristalina del complejo formado por cuatro unidades tetracianopirazina y un ion bromuro, el cual se encuentra estabilizado por interacciones anión- π , adaptada de la referencia [42]. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Bromuro, en verde.

El enlace de hidrógeno

La primera descripción del enlace de hidrógeno fue proporcionada por Linus Pauling en 1931, en un artículo científico en el que se describía la naturaleza del enlace químico.^[43] Posteriormente, el enlace de hidrógeno fue incluido en su libro *The Nature of the Chemical Bond*,^[7] del que se ha hablado anteriormente.

El enlace de hidrógeno se puede considerar como un caso particular de interacción dipolo-dipolo, en la que un átomo de hidrógeno enlazado covalentemente a un átomo electronegativo D es atraído por un segundo átomo electronegativo A. En general, el enlace de hidrógeno se puede representar como $D - H \cdots A$, donde el átomo de hidrógeno actúa como puente entre los dos átomos electronegativos o electrón-atrayentes. Los enlaces de hidrógeno se pueden dividir en tres categorías: fuertes, moderados y débiles, exhibiendo distintas energías, longitudes y geometrías, como se resume en la Tabla 1.2.^[44]

Tabla 1.2. Propiedades de los enlaces de hidrógeno.^[36]

Enlace de Hidrógeno	Fuerte	Moderado	Débil
Enlace	Principalmente covalente	Principalmente electrostático	Electrostático
Energía (KJ·mol ⁻¹)	60-120	16-60	< 12
Longitud de enlace (Å)	D-H ~ H...A	D-H < H...A	D-H << H...A
H...A	1.2-1.5	1.5-2.2	2.2-3.2
D...A	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Ángulo de enlace (°)	175-180	130-180	90-150
Ejemplos	Esponjas de protones: H ₅ O ₂ ⁺	Biomoléculas: ADN, ARN	C-H...O O-H...π

En la Figura 1.15 se presentan los distintos tipos de geometrías que puede adoptar el enlace de hidrógeno.

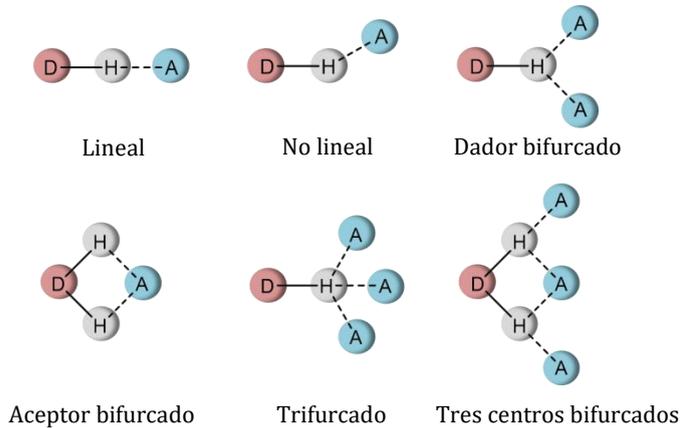


Figura 1.15. Tipos de geometrías que puede exhibir el enlace de hidrógeno.

El enlace de hidrógeno juega un papel fundamental en biología, participando en la estabilización de la estructura de doble hebra del ADN. Las bases nucleicas que lo constituyen interactúan mediante la formación de enlaces de hidrógeno, como se representa en la Figura 1.16, contribuyendo a la estabilización de la estructura y determinando la conformación final de la doble hélice.

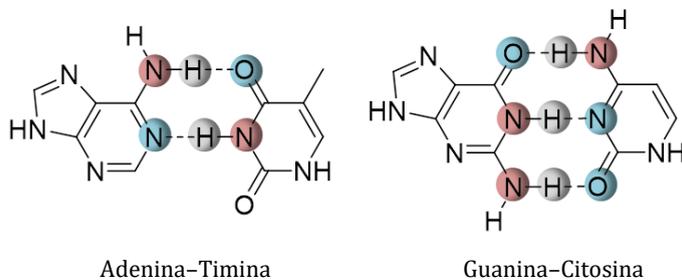


Figura 1.16. Formación de enlaces de hidrógeno Watson-Crick entre las distintas bases nucleicas.

Fuerzas de van der Waals

Las interacciones de van der Waals se pueden considerar como interacciones dipolo inducido–dipolo inducido, las cuales derivan de la polarización de una nube de electrones debido a la proximidad de un núcleo adyacente, resultando en una interacción electrostática débil de naturaleza atractiva y no direccional. La intensidad de las mismas es directamente proporcional a la superficie de contacto, disminuyendo rápidamente con la distancia ($1/r^6$).

Las interacciones de van der Waals son poco interesantes en la construcción de entidades supramoleculares. No obstante, intervienen en la estabilización global de la supramolécula sumándose al resto de interacciones supramoleculares. Estas interacciones son especialmente importantes en la formación de compuestos de inclusión, donde moléculas pequeñas, normalmente orgánicas, se incorporan dentro de redes cristalinas o cavidades moleculares. En la Figura 1.17 se presenta la estructura cristalina de un compuesto de inclusión, en la que una unidad de tolueno se introduce en la cavidad de un ciclofano constituido por cuatro unidades fenólicas metiladas en posición *para*.

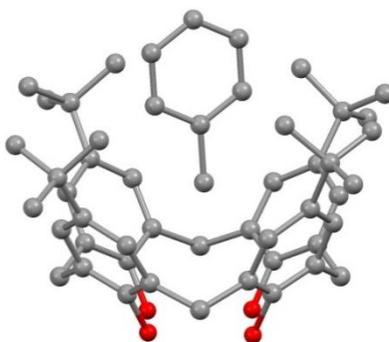


Figura 1.17. Estructura cristalina de un compuesto de inclusión estabilizado mediante interacciones de van der Waals, adaptada de la referencia [45]. Carbono, en gris. Oxígeno, en rojo.

1.1.3. El enlace de coordinación

El enlace de coordinación es la unión entre un átomo metálico, que actúa como aceptor de electrones o ácido de Lewis, y un átomo no metálico, que actúa como dador de electrones o base de Lewis. Como consecuencia, el enlace de coordinación presenta cierto carácter covalente. No obstante, el enlace de coordinación es de magnitud inferior a la del enlace covalente, y normalmente de naturaleza reversible, presentando determinadas características que lo distinguen del enlace covalente.

El enlace de coordinación tiene un papel muy importante en la construcción de entidades supramoleculares, poniendo a nuestra disposición una gran variedad de herramientas pertenecientes al campo de la química inorgánica. Mediante la modificación del centro metálico, el enlace de coordinación permite obtener fácilmente una gran cantidad de estructuras con distintas geometrías. Estas estructuras pueden ser bien bidimensionales, como triángulos y cuadrados, o bien tridimensionales. Además, el enlace de coordinación permite de manera sencilla modificar o añadir nuevas propiedades a una determinada entidad supramolecular, como por ejemplo la introducción de propiedades ópticas o magnéticas, aportando nuevas funcionalidades a la supramolécula.

El enlace de coordinación se encuentra presente en muchos sistemas biológicos, como en las metaloproteínas,^[46] que son proteínas que incorporan uno o más centros metálicos en su estructura. El metal o los metales pueden participar directamente en la función o funciones de la proteína, o bien desempeñar una función estructural, estabilizando y/o regulando la estructura de la misma.

En la Figura 1.18 se presenta el centro activo de la metaloenzima anhidrasa carbónica,^[47,48] el cual se encuentra constituido por un catión zinc(II) coordinado a tres residuos histidina: His-94, His-96 e His-119. La coordinación se completa con una molécula de agua, dando lugar a una geometría de coordinación tetraédrica distorsionada. La anhidrasa carbónica es una metaloenzima de zinc perteneciente al grupo de las liasas, que participa en el metabolismo del dióxido de carbono, constituyendo un claro ejemplo de la importancia del enlace de coordinación en los sistemas biológicos.

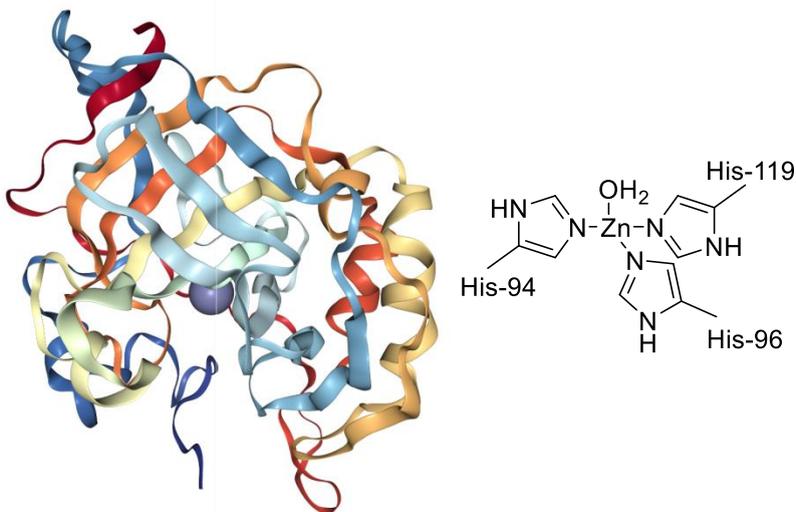


Figura 1.18. En la izquierda, diagrama de cintas de la metaloproteína anhidrasa carbónica adaptado de la referencia [49], PDB 1V9E. En la derecha, estructura del centro activo de la anhidrasa carbónica.

1.1.4. Reconocimiento molecular, catálisis supramolecular, transporte supramolecular, y auto-ensamblaje

Reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular hace referencia al proceso de unión selectivo y específico entre receptor y sustrato. Es necesario que exista cierta complementariedad en tamaño, geometría y propiedades electrónicas entre ambos, de manera que se maximicen las interacciones atractivas y se minimicen las interacciones repulsivas.

El concepto de reconocimiento molecular deriva del modelo llave-cerradura propuesto por Emil Fisher en 1894,^[5] el cual describe la interacción selectiva entre una enzima y un sustrato, y que se trata de la primera aproximación al proceso de reconocimiento molecular. En el modelo de Fisher, enzima y sustrato presentan estructuras rígidas y complementariedad geométrica. En consecuencia, el reconocimiento se produce exclusivamente cuando las estructuras de enzima y sustrato acoplan, como lo hace una llave en una cerradura, como se ilustra en la Figura 1.19.

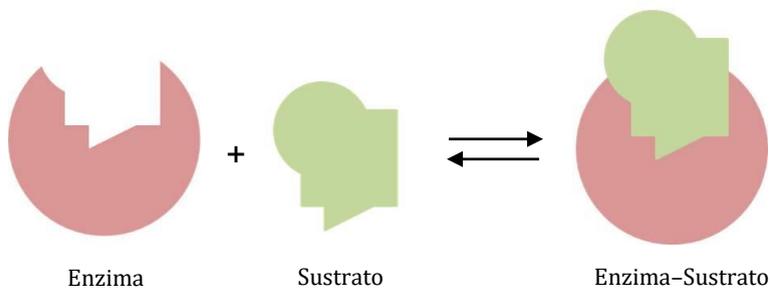


Figura 1.19. Modelo llave-cerradura, propuesto por Emil Fisher.

Posteriormente, Daniel Koshland propuso una serie de modificaciones en el modelo llave-cerradura, basadas en la evidencia experimental de que algunas enzimas presentan estructuras flexibles, las cuales se pueden adaptar a la estructura del sustrato. En consecuencia, el sustrato induce cambios conformacionales en el centro activo de la enzima, dando lugar a un reconocimiento inducido.^[50-52] Este modelo se conoce como modelo enzimático inducido, el cual se ilustra en la Figura 1.20.

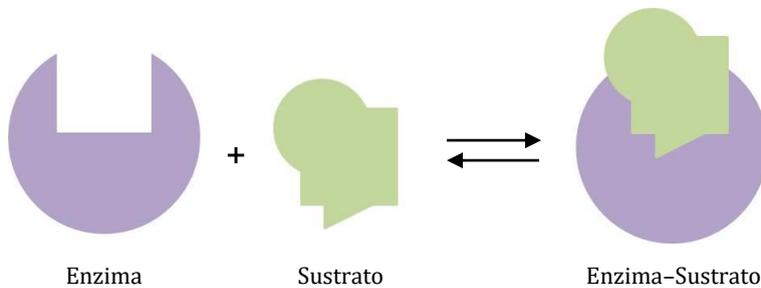


Figura 1.20. Modelo enzimático inducido, propuesto por Daniel Koshland.

Complementariedad y preorganización

Las interacciones no covalentes entre receptor y sustrato que tienen lugar en el reconocimiento molecular son las mismas que las que se producen entre disolvente y receptor, y entre disolvente y sustrato. Como consecuencia de la mayor concentración de disolvente en el medio en relación a receptor y sustrato, el reconocimiento de ambos requiere de la actuación simultánea de numerosas interacciones no covalentes, y que la suma sea superior a la energía de interacción con el disolvente. Existen dos factores claves en el proceso de reconocimiento molecular: la complementariedad y la preorganización.

El principio de complementariedad expone que para que tenga lugar el reconocimiento entre receptor y sustrato, el receptor debe tener sitios de unión que puedan interactuar y atraer simultáneamente los sitios de unión del sustrato, sin generar tensiones internas o repulsiones. En resumen, maximizar las interacciones atractivas y minimizar las interacciones repulsivas. El principio de preorganización manifiesta que cuanto más organizados se encuentren receptor y sustrato para la posterior interacción y menor sea la solvatación de ambos, más estable será el complejo formado, ya que supondrá un menor coste energético la reorganización y desolvatación de ambos.

Cooperatividad

La cooperatividad es un fenómeno que se produce en aquellos receptores que contienen dos o más sitios de unión, donde la interacción del sustrato con uno de los sitios de unión del receptor condiciona la posterior interacción con el resto de sitios de unión.

Cuando la estabilidad del complejo resultante es mayor que la suma de las interacciones individuales, la cooperatividad es positiva. Un ejemplo clásico de cooperatividad positiva es la hemoglobina, metaloproteína que se encarga de transportar el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos. La hemoglobina se une secuencialmente a cuatro moléculas de oxígeno en distintos sitios. Cada oxígeno se une con mayor afinidad que el anterior, debido a los cambios inducidos en la estructura de la hemoglobina, como consecuencia de las uniones previas.^[53] No obstante, también existen casos de cooperatividad negativa, normalmente como consecuencia de repulsiones estéricas y electrónicas.

Efecto quelato

La palabra quelato proviene de la palabra griega *χηλή*, que significa *garra* o *pinza*. El efecto quelato fue introducido por el químico suizo Gerold Schwarzenbach en la década de los cuarenta,^[54] para hacer referencia a la mayor estabilidad, desde el punto de vista cinético y termodinámico, de un determinado complejo formado por un receptor conteniendo n átomos dadores, en comparación con la de un complejo formado por n receptores conteniendo un solo átomo dador.

Efecto macrocíclico

El efecto macrocíclico fue introducido por Dale Cabbines y Dale Margerum en la década de los sesenta, para hacer referencia a la mayor estabilidad, desde el punto de vista cinético y termodinámico, que presentan los complejos formados por receptores cíclicos o de cadena cerrada, en comparación con la de los complejos formados por receptores análogos de cadena abierta.^[55]

Los orígenes del efecto macrocíclico no están del todo claros, habiendo sido tema de discusión durante años. Lo que sí se sabe es que los siguientes dos factores juegan un papel importante en el efecto macrocíclico. (1) La mayor preorganización del receptor macrocíclico, que favorece la complejación. (2) La menor solvatación de los átomos dadores debido a la mayor dificultad del disolvente para acceder a la cavidad macrocíclica.

Efecto criptando

El término criptando proviene de la palabra griega *κρυπτός*, que significa *oculto* o *escondido*. Los criptandos son receptores bicíclicos, y como consecuencia de ello presentan una cavidad macrocíclica tridimensional. Posiblemente, los criptandos más conocidos sean los descritos por Jean-Marie Lehn, Bernard Dietrich, y Jean-Pierre Sauvage en 1969,^[12,13] de los que se ha hablado anteriormente.

El efecto criptando hace referencia a la mayor estabilidad de los complejos formados por receptores bicíclicos con cavidades tridimensionales en comparación con los complejos análogos formados por receptores monocíclicos con cavidad bidimensional. Principalmente se debe a tres factores. (1) La mayor preorganización del criptando, lo cual favorece la complejación. (2) La presencia de una cavidad tridimensional, y como consecuencia menos accesible para el disolvente. (3) La mayor cooperatividad entre los átomos dadores que constituyen el criptando, dando lugar a la formación de complejos más estables.

En la Figura 1.21 se representa esquemáticamente el concepto de los efectos quelato, macrocíclico y criptando.

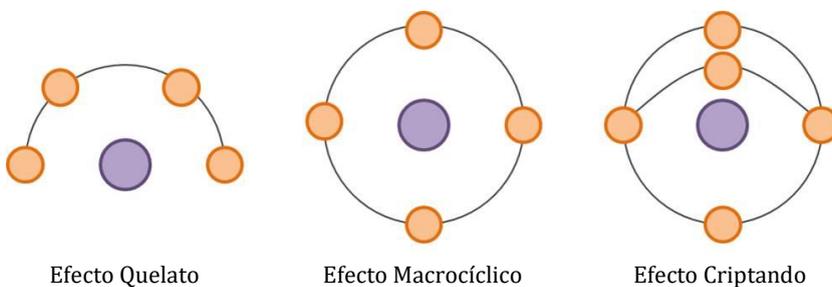


Figura 1.21. Representación esquemática del concepto de los efectos quelato, macrocíclico y criptando.

Catálisis supramolecular

La palabra catálisis proviene de la palabra griega *κατάλυσις*, que significa *disolución* o *acabamiento*. Del diccionario de la Real Academia Española:

catálisis

1. f. *Quím.* Incremento de la velocidad de una reacción en presencia de un catalizador.

El catalizador es una sustancia química que tiene la capacidad de aumentar la velocidad de una determinada reacción, sin experimentar ninguna transformación al final del proceso.

En el proceso de catálisis supramolecular, un receptor actúa como catalizador de la transformación de un sustrato, presentando dos etapas principales: una primera etapa en la que se produce la unión entre receptor y sustrato, y una segunda etapa en la que tiene lugar la transformación del sustrato y liberación de los productos. La catálisis supramolecular se representa esquemáticamente en la Figura 1.22.

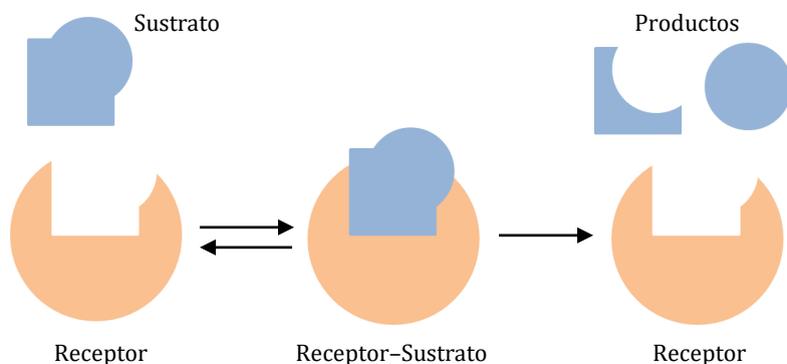


Figura 1.22. Representación esquemática del proceso de catálisis supramolecular.

Transporte supramolecular

El transporte supramolecular es un proceso esencial en muchos sistemas biológicos, permitiendo el paso de sustratos orgánicos e inorgánicos a través de las bicapas lipídicas que constituyen las membranas celulares, impermeables a dichos sustratos. El fundamento es el siguiente: un sustrato no puede atravesar una barrera, pero la unión de este sustrato a un receptor permite el paso del sustrato a través de la barrera, y su posterior liberación. El mal funcionamiento de los mecanismos de transporte de iones a través de las membranas celulares da lugar a la aparición de enfermedades, conocidas como canalopatías.^[56-58]

El proceso de transporte supramolecular presenta cuatro etapas, representadas en la Figura 1.23. (1) Se produce la formación del complejo receptor-sustrato. (2) El complejo se difunde a través de la membrana. (3) El complejo se disocia, produciéndose la liberación del sustrato al otro lado de la membrana. (4) Se produce la retrodifusión del portador a su posición original.

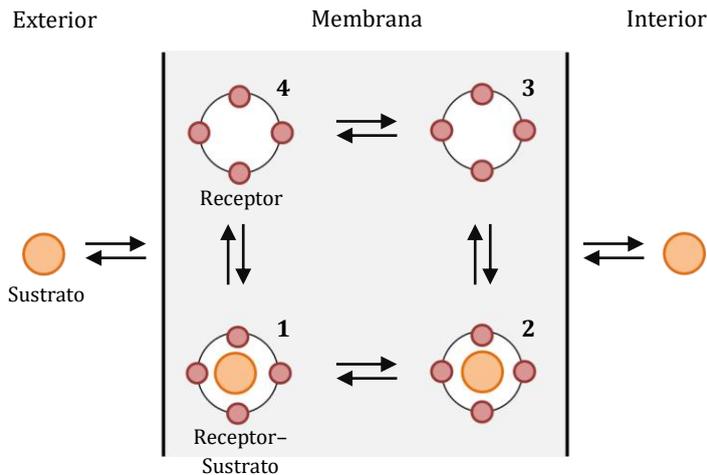


Figura 1.23. Representación esquemática del mecanismo de transporte supramolecular de un sustrato mediante un portador.

Las moléculas transportadoras se conocen como *portadores* o *carriers*. En el caso de que el portador transporte sustratos de naturaleza iónica, recibe el nombre de ionóforo. No obstante, existen otros mecanismos de transporte que no implican la presencia de un portador, como la creación de canales en la membrana que permitan el paso del sustrato. Estos canales pueden disponer o no de lo que se conoce como puerta. Ambas posibilidades se representan en la Figura 1.24.

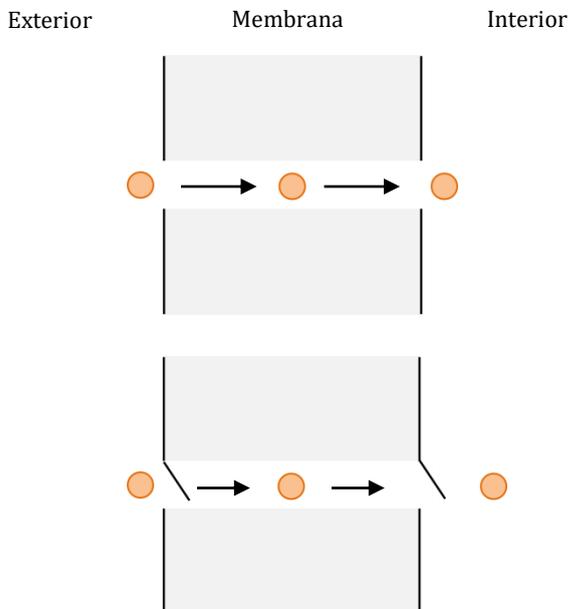


Figura 1.24. Representación esquemática del mecanismo de transporte supramolecular mediante la creación de canales en la membrana. En la imagen superior, sin puertas. En la imagen inferior, con puertas.

Auto-ensamblaje

El auto-ensamblaje es un proceso espontáneo en el que dos o más moléculas se unen mediante interacciones no covalentes para formar un agregado estructurado y estable, conocido como supramolécula.

En todos los procesos de auto-ensamblaje se distinguen cuatro características importantes. (1) Es un proceso en el que dos o más moléculas con unas propiedades determinadas dan lugar a la formación de una nueva estructura, también con nuevas propiedades. (2) Es un proceso reversible, lo que permite la formación y disolución de uniones mediante la autocorrección, dando lugar a la formación de la supramolécula que presenta una estructura más estable termodinámicamente. (3) Las moléculas que participan en el proceso de auto-ensamblaje contienen toda la información necesaria para dar lugar a la formación de la supramolécula. (4) Las moléculas se unen mediante interacciones supramoleculares en un proceso cooperativo.

El proceso de auto-ensamblaje está íntimamente relacionado con el proceso de reconocimiento molecular, ya que el reconocimiento de los distintos componentes que forman el agregado supramolecular dirige la construcción del mismo. El auto-ensamblaje se puede dividir en homomérico y heteromérico, conceptos que se representan esquemáticamente en la Figura 1.25. Homomérico hace referencia a los procesos en los que participan las mismas subunidades o moléculas. Heteromérico hace referencia a los procesos en los que participan distintas subunidades o moléculas.

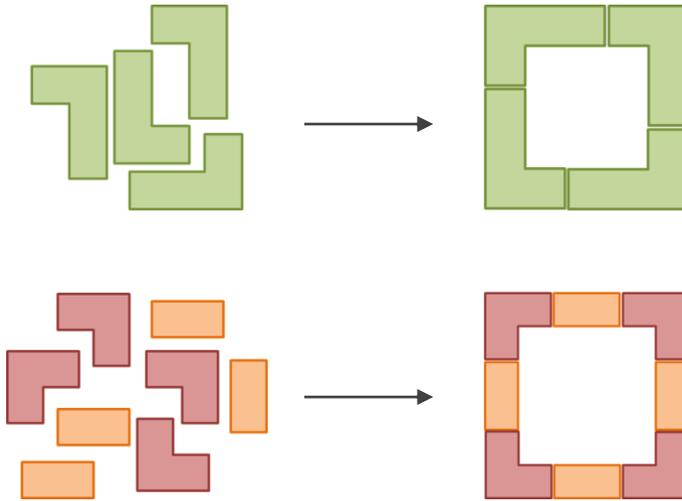


Figura 1.25. En la imagen superior, auto-ensamblaje homomérico. En la imagen inferior, auto-ensamblaje heteromérico.

Existen distintos factores que pueden condicionar el proceso de auto-ensamblaje. (1) La naturaleza de los componentes, como por ejemplo la estructura y las propiedades físicas de los mismos. (2) La intensidad, la direccionalidad y la reversibilidad de las interacciones intramoleculares e intermoleculares que participan en el proceso. (3) El disolvente o la mezcla de disolventes en el que tiene lugar el proceso, o las interfaces sólidas que puedan haber en el entorno.

Asimismo, los procesos de auto-ensamblaje pueden estar dirigidos por metales de transición, tales como el paladio y el platino, actuando a modo de plantilla, organizando los distintos componentes en una geometría determinada.^[59-61]

1.2. Azamacrociclos [1+1] con unidades 1*H*-Pirazol

1.2.1. La química del 1*H*-pirazol

El 1*H*-pirazol es un heterociclo aromático constituido por tres átomos de carbono y dos átomos de nitrógeno adyacentes, que pertenece a la familia de los 1,2-azoles.^[62] Existen dos isómeros no aromáticos del 1*H*-pirazol: el 3*H*-pirazol^[63] y el 4*H*-pirazol^[64], también conocidos como pirazolenina e isopirazol, respectivamente. Las estructuras de los tres isómeros de la familia del pirazol se representan en la Figura 1.26.

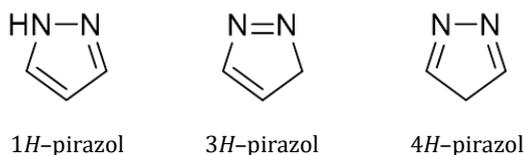


Figura 1.26. Estructura de los tres isómeros de la familia del pirazol.

El anillo de 1*H*-pirazol fue sintetizado por primera vez en 1889 por Eduard Buchner,^[65] mediante la descarboxilación del ácido-1*H*-3,4,5-pirazol tricarboxílico, según la reacción que se indica en la Figura 1.27.



Figura 1.27. Proceso de síntesis de la unidad 1*H*-pirazol, llevado a cabo por Eduard Buchner en 1889.

Se conocen pocos ejemplos de moléculas conteniendo pirazol o derivados del mismo en sistemas biológicos, en comparación con otros heterociclos que incorporan uno o varios átomos de nitrógeno en su estructura, tales como el pirrol, el imidazol, el indol y el benzimidazol. Este hecho es probablemente consecuencia de la dificultad de los organismos vivos para construir el enlace $N - N$.

El primer producto natural aislado conteniendo pirazol en su estructura fue el 3-nonil-1*H*-pirazol, el cual fue obtenido por los investigadores japoneses Takuo Kosuge e Hideo Okeda en la década de los cincuenta.^[66] El producto procedía de la *Houttuynia Cordata*, planta perteneciente a la familia de las piperáceas, que se encuentra principalmente en la zona tropical de Asia. Posteriormente, Sir Leslie Fowden y Frederick Noe aislaron el aminoácido L-β-pirazol-1-ilalanina,^[67] segundo producto natural aislado que incorporaba la unidad de pirazol en su estructura. El aminoácido fue obtenido de las semillas de la sandía, *Citrullus vulgaris*, pero también se encuentra en las semillas de otras plantas cucurbitáceas. En la Figura 1.28 se representa la estructura de estos dos compuestos de pirazol.

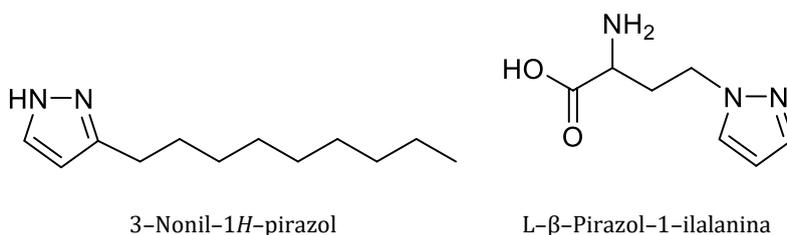


Figura 1.28. Estructura del compuesto 3-nonil-1*H*-pirazol y del aminoácido L-β-pirazol-1-ilalanina.

El 1*H*-pirazol es un ácido débil, comparable a los alcoholes alifáticos, pero también una base débil, exhibiendo menor basicidad que la piridina o las aminas aromáticas sencillas. En la Figura 1.29 se representa el comportamiento ácido-base de la unidad 1*H*-pirazol.^[68]

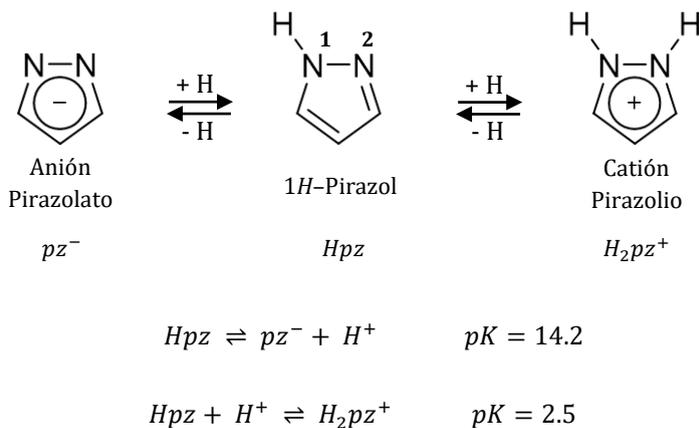


Figura 1.29. Química ácido-base de la unidad 1*H*-pirazol.

El nitrógeno *N* – *H* situado en posición 1 es un ácido de Lewis débil de tipo pirrólico, el cual se puede desprotonar dando lugar al anión pirazolato. Además, este nitrógeno posee un par de electrones no enlazantes que participan en la aromaticidad del sistema. En cambio, el nitrógeno *N* situado en posición 2 es una base de Lewis débil de tipo piridina, el cual dispone de un par de electrones en un orbital perpendicular al sistema aromático. Como consecuencia, se puede protonar, resultando en la formación del catión pirazolio.

La unidad de pirazol exhibe una gran capacidad para formar enlaces de hidrógeno con especies de distinta naturaleza, presentando un comportamiento distinto dependiendo de si se encuentra como 1*H*-pirazol, como anión pirazolato o como catión pirazolio. La unidad 1*H*-pirazol se comporta como aceptora y como dadora de enlaces de hidrógeno. En cambio, en su forma de anión pirazolato lo hace como doble aceptora de enlaces de hidrógeno, mientras que en su forma de catión pirazolio lo hace como doble dadora de enlaces de hidrógeno, como se ilustra en la Figura 1.30.

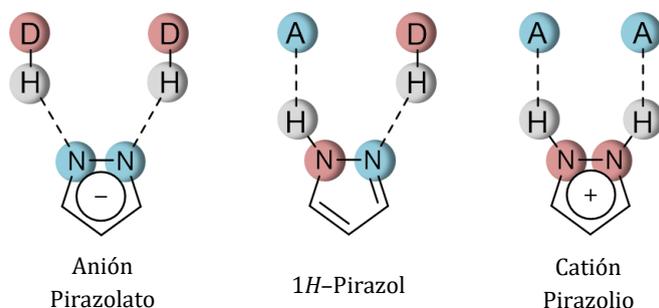


Figura 1.30. Formación de enlaces de hidrógeno por la unidad 1*H*-pirazol, el anión pirazolato y el catión pirazolio.

El anillo de pirazol presenta una química de coordinación muy diversa, como se representa en la Figura 1.31. La unidad 1*H*-pirazol actúa normalmente como ligando monodentado coordinando a través del átomo de nitrógeno *N2*, lo que permite al mismo tiempo la formación de enlaces de hidrógeno a través del nitrógeno *N1*. En cambio, en su forma de anión pirazolato presenta una química de coordinación con mucha más variedad, habiéndose identificado hasta veinte distintos modos de coordinación, si bien los modos de coordinación más habituales son el bis(monodentado) y el exobidentado.^[69]

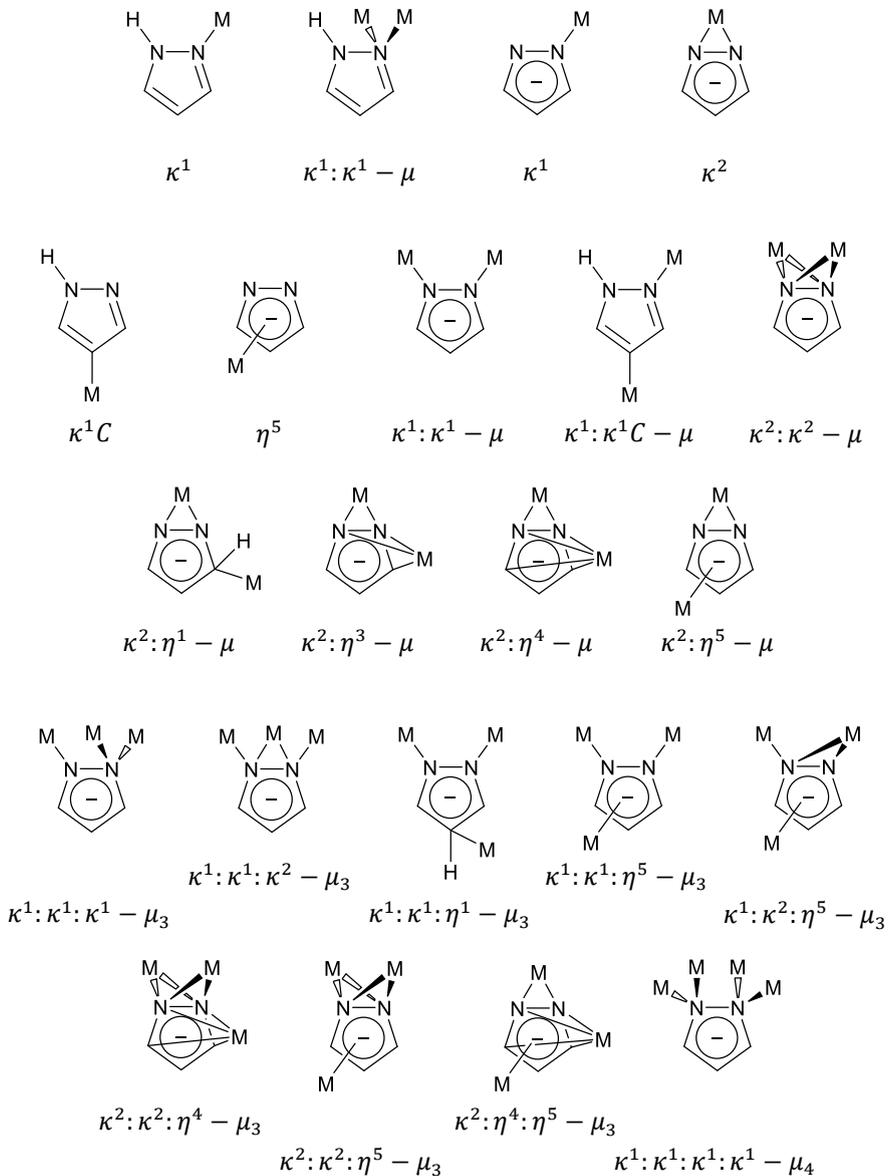


Figura 1.31. Modos de coordinación conocidos de la unidad 1H-pirazol y del anión pirazolato, adaptados de la referencia [69].

1.2.2. Desarrollo de receptores con unidades 1*H*-pirazol: De la mimesis a la búsqueda de nuevas propiedades electrónicas y magnéticas

En la bibliografía se puede encontrar una gran cantidad de complejos polinucleares formados por metales de transición y distintos ligandos polidentados, conteniendo en su estructura una o varias unidades de pirazol o similares, como piridazina,^[70,71] 1,2,4,5-tetrazina^[72] o 1,2,4-triazol,^[73] entre otras. En cambio, el número de azamacrociclos con unidades 1*H*-pirazol descritos en la literatura es muy pequeño.^[74]

El estudio de la química de coordinación de complejos polinucleares se remonta a la década de los setenta, extendiéndose hasta la actualidad, principalmente motivado por el interés en el desarrollo de sistemas capaces de reproducir el entorno del centro activo de determinadas metaloproteínas, constituido en muchas ocasiones por dos o más metales de transición. Pero también estimulado por el interés en la obtención de complejos con dos o más centros metálicos próximos que permitan la interacción entre los mismos, resultando en la formación de sistemas polinucleares con nuevas e interesantes propiedades electrónicas y/o magnéticas.^[75-77]

El químico ucraniano Swiatoslaw Trofimenko introdujo la familia de los ligandos polipirazolilboratos en la segunda mitad de la década de los sesenta, fecha que se puede considerar como punto de partida en el campo de los ligandos constituidos por unidades de pirazol.^[78-81] Los ligandos polipirazolilboratos son compuestos aniónicos que pueden estar constituidos por dos, tres o cuatro unidades de pirazol o derivados del pirazol, las cuales se encuentran enlazadas a un átomo de boro. En base al número de unidades de pirazol, existen tres familias dentro de los ligandos polipirazolilboratos: bispirazolilboratos, trispirazolilboratos y tetrakispirazolilboratos, los cuales se representan en la Figura 1.32.



Figura 1.32. Familia de ligandos polipirazolilboratos, introducidos por Swiatoslaw Trofimenko en la segunda mitad de la década de los sesenta.

En las décadas de los setenta y de los ochenta los ligandos polipirazolilboratos encontraron una amplia aplicación en química de coordinación. Destacan los estudios realizados con el ligando hidrotris(pirazolil)borato, cuyos complejos polinucleares con distintos metales de transición fueron empleados como modelos para la reproducción del centro activo de distintas metaloenzimas,^[82-85] si bien destacan en particular las investigaciones llevadas a cabo por el químico japonés Nobumasa Kitajima.^[86-89]

Resulta necesario mencionar la figura del químico estadounidense Stephen Lippard, quien está considerado como uno de los fundadores de la química bioinorgánica. Los trabajos de Lippard y colaboradores también se orientaron hacia el desarrollo de ligandos polipirazolilborato. Principalmente, Lippard y colaboradores estudiaron la química de coordinación de los mismos con hierro, con el objetivo de reproducir el centro activo de la hemeritrina, proteína responsable del transporte de oxígeno en algunos invertebrados marinos, pero también el de enzimas análogas, como la ribonucleótido reductasa y la metano monooxigenasa, entre otras.^[90-96] En la Figura 1.33 se presenta la estructura de rayos X del complejo binuclear de hierro del ligando hidrotrospirazolilborato, la cual ha sido adaptada de la referencia [91].

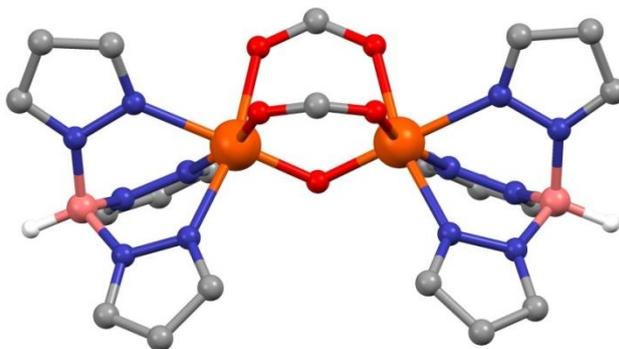
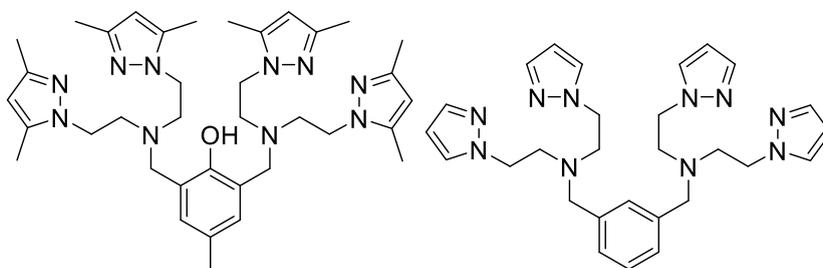
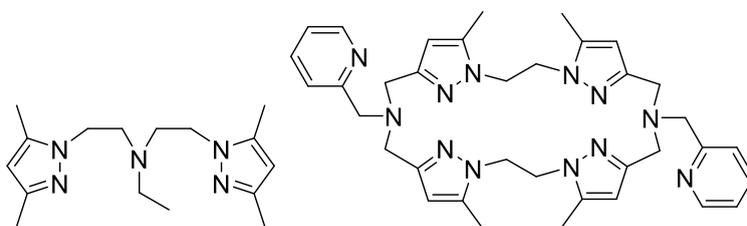


Figura 1.33. Estructura de rayos X del complejo binuclear de hierro(II) $[Fe_2(O)(O_2CH)_2(HBpz_3)_2]$, adaptada de la referencia [91]. Hidrógeno, en blanco. Boro, en rosa. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Hierro, en naranja.

Paralelamente al desarrollo de los ligandos polipirazolilboratos, se sintetizaron otras familias de ligandos conteniendo unidades de pirazol en su estructura, y se estudió la química de coordinación de las mismas con distintos metales de transición. En este sentido, destacan los trabajos realizados por Thomas Sorrell y colaboradores en la década de los ochenta, en los que mimetizan el centro activo de la hemocianina, proteína que se encuentra en la sangre de algunos moluscos, crustáceos y arácnidos, cuyo centro activo se encuentra constituido por dos átomos de cobre.^[97-102] También merecen ser citadas las investigaciones llevadas a cabo por Jan Reedijk y colaboradores en la mimesis del centro activo de la hemocianina, así como de la tirosinasa, enzima de cobre presente en plantas y animales encargada de catalizar la oxidación de fenoles.^[103-106] En la Figura 1.34 se muestran algunos de los compuestos preparados por ambos investigadores.



Thomas Sorrell *et al.*



Jan Reedijk *et al.*

Figura 1.34. Ligandos preparados por Thomas Sorrell y colaboradores, y por Jan Reedijk y colaboradores.

En la misma década, destacan los trabajos de investigación de Fabrizio Mani y colaboradores, concentrados en el estudio de determinados complejos de cobalto como modelos espectroscópicos de la enzima anhidrasa carbónica; enzima cuyo centro activo está constituido por zinc, pero que puede ser sustituido por cobalto manteniendo sus funciones y conservando inalteradas ciertas características, como sus propiedades ácido-base.^[107-109] Por su parte, Rabindranath Mukherjee y colaboradores se interesaron en el estudio de las propiedades electrónicas y magnéticas de los complejos formados por una familia de ligandos basados en piridina y pirazol con distintos metales de transición.^[110-116] En la Figura 1.35 se presentan algunos de los compuestos desarrollados por ambos investigadores.

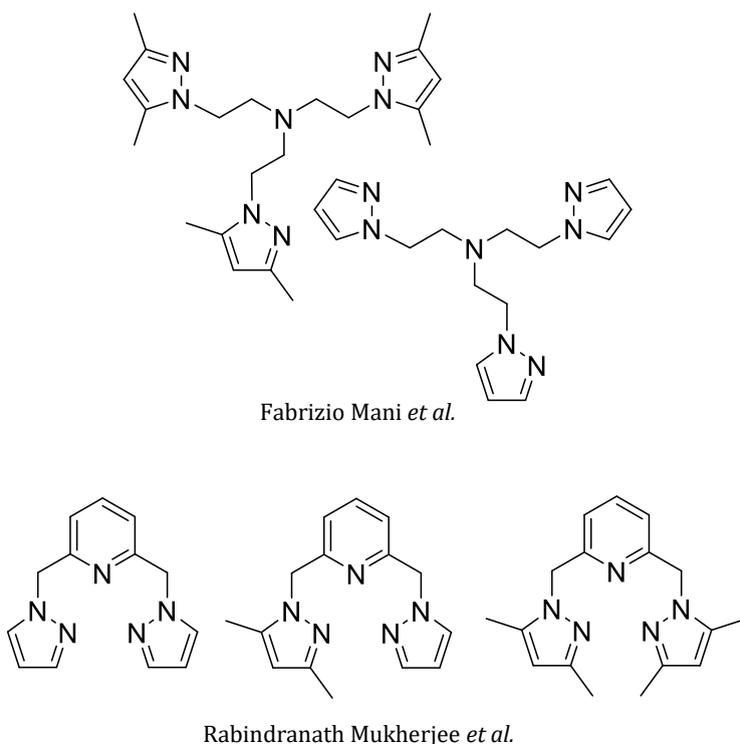


Figura 1.35. Ligandos desarrollados por Fabrizio Mani y colaboradores, y por Rabindranath Mukherjee y colaboradores.

Más recientemente, Franc Meyer y colaboradores han sintetizado diversas familias de ligandos que incorporan la unidad de pirazol en su estructura. Este grupo de investigación ha estudiado la química de coordinación de dichos ligandos con distintos metales de transición, evaluando las propiedades electrónicas y magnéticas de los complejos metálicos formados,^[117,118] realizando investigaciones para su posible uso como modelos de las enzimas ureasa y catecol oxidasa,^[119-123] así como de su posible empleo como catalizadores de determinadas reacciones.^[124,125] En la Figura 1.36 se presentan algunos de los complejos metálicos de los ligandos sintetizados por Franc Meyer y colaboradores.

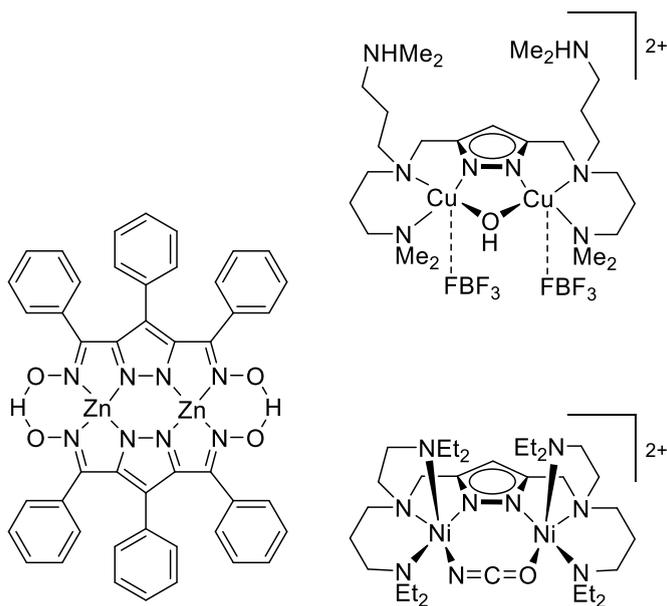
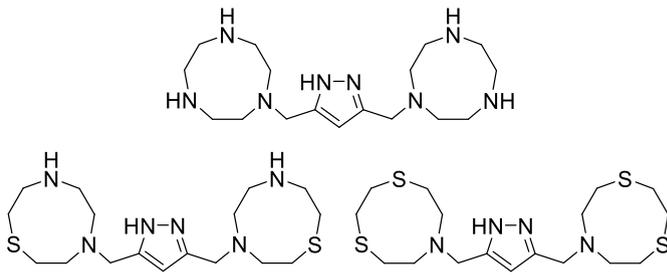


Figura 1.36. Complejos metálicos de níquel(II), cobre(II) y zinc(II), de los ligandos sintetizados por Franc Meyer y colaboradores.

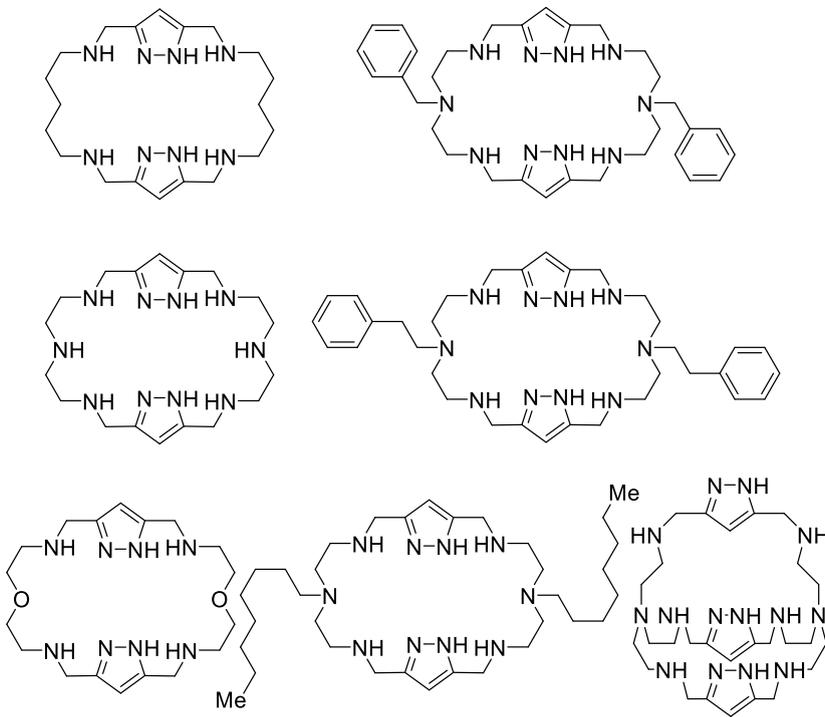
Para encontrar en la literatura los primeros macrociclos incorporando en su estructura una o varias unidades 1*H*-pirazol hemos de retroceder a la década de los noventa. Destacan los trabajos de Thomas Kaden y colaboradores, quienes desarrollaron varias familias de ligandos macrocíclicos interconectados por unidades de pirazol, con el objetivo de formar complejos binucleares con distintos metales de transición, motivados por el interés en el desarrollo de modelos sintéticos capaces de reproducir la estructura del centro metálico de aquellas proteínas que presentan dos o más metales en su centro activo, como la hemocianina o las enzimas ascorbato oxidasa y superóxido dismutasa, entre otras.^[126,127]

También en la década de los noventa, Pilar Navarro y colaboradores sintetizaron las primeras familias de macrociclos y criptandos constituidos por cadenas poliamínicas y unidades de pirazol, las cuales se pueden considerar precursoras de los compuestos que se presentan en este trabajo.^[128,129] Posteriormente, en colaboración con el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, coordinado por el profesor Enrique García-España, se sintetizaron nuevos ligandos macrocíclicos y se estudió la química de coordinación de las nuevas familias de macrociclos y criptandos conteniendo unidades de pirazol con distintos metales de transición, como cobre(II) y zinc(II), así como con sustratos de interés biológico, como dopamina, anfetamina, metanfetamina y L-glutamato.^[130-137]

En la Figura 1.37 se presentan algunos de los macrociclos preparados por Thomas Kaden y colaboradores, y algunos de los macrociclos y criptandos desarrollados por Pilar Navarro y colaboradores.



Thomas Kaden *et al.*



Pilar Navarro *et al.*

Figura 1.37. Macrociclos preparados por Thomas Kaden y colaboradores. Macrociclos y criptandos preparados por Pilar Navarro y colaboradores.

El Dr. Javier Pitarch-Jarque, en su trabajo de Tesis Doctoral,^[138] realizado en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, preparó distintos macrociclos de condensación [2+2]. Estos se encuentran constituidos por poliaminas de diversa naturaleza y dos unidades de pirazol, en algunos casos incorporando en su estructura unidades aromáticas como el naftaleno o el dansilo, los cuales se representan en la Figura 1.38.

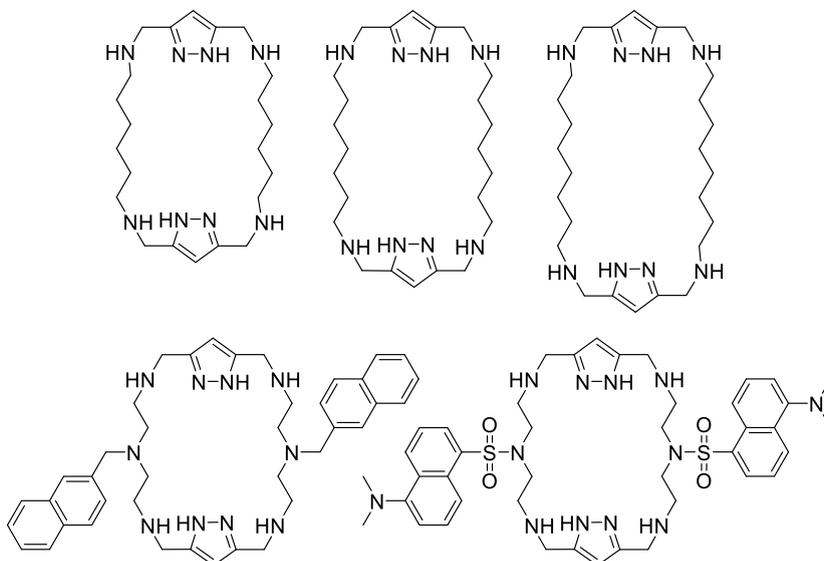


Figura 1.38. Macrociclos de condensación [2+2] preparados por el Dr. Javier Pitarch-Jarque.

No obstante, los compuestos que se presentan en esta memoria son macrociclos de condensación [1+1], constituidos por poliaminas de distinta naturaleza y una unidad de pirazol, los cuales están inspirados en el trabajo realizado por la Dra. Raquel Belda,^[139] investigadora del grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, quien preparó el primer receptor de estas características,^[140] el ligando **PZ333**, el cual se presenta en la Figura 1.39.

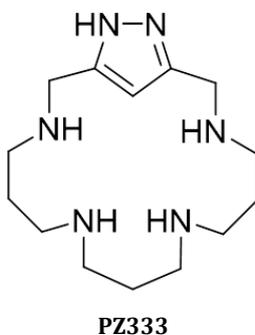


Figura 1.39. Estructura del macrociclo de condensación [1+1] desarrollado por la Dra. Raquel Belda, precursor de los macrociclos que se presentan en este trabajo.

Estudios en disolución acuosa y en estado sólido revelaron que, en presencia de un equivalente de cobre(II), el ligando **PZ333** daba lugar a la formación de complejos dinucleares dímeros, observando un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los dos átomos de cobre, los cuales están conectados por puentes pirazolato, cuya estructura cristalina se presenta en la Figura 1.40.^[140]

Este comportamiento es completamente distinto al que presentan macrociclos de condensación [1+1] análogos conteniendo otros heterociclos como piridina, fenantrolina, benceno, naftaleno o tiofeno, que dan lugar a la formación de complejos monómeros.^[141-147] Asimismo, por medio de distintas técnicas se detectó la formación de un complejo trinuclear dímico, en el que el tercer átomo de cobre completaba su coordinación captando dióxido de carbono e incorporándolo a la estructura en forma de carbonato, cuya estructura también se presenta en la Figura 1.40.^[140]

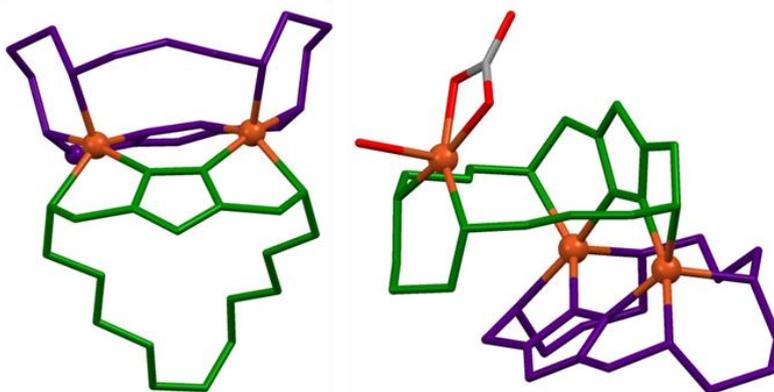


Figura 1.40. En la izquierda, estructura de rayos X del complejo dinuclear dímico de cobre(II). En la derecha, estructura de rayos X del complejo trinuclear dímico de cobre(II), el cual incorpora una molécula de carbonato. Macrociclos, en verde y en morado. Carbono, en gris. Oxígeno, en rojo. Cobre, en naranja.

En este trabajo se presentan ocho nuevos macrociclos de condensación [1+1], todos ellos constituidos por una unidad 1*H*-pirazol y una cadena poliamínica de distinta naturaleza (Figura 1.41).

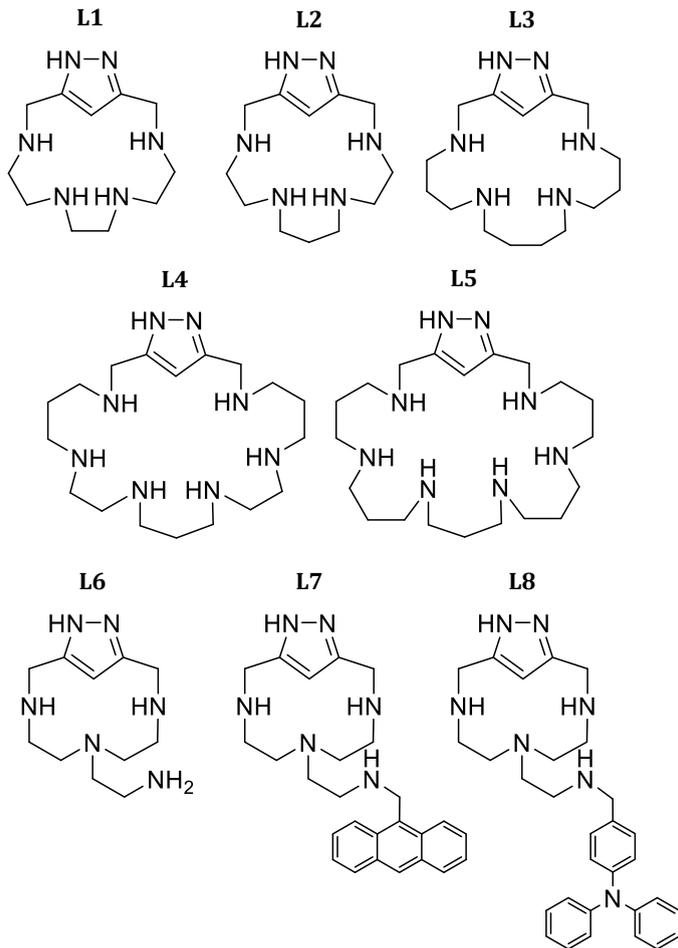


Figura 1.41. Macrociclos de condensación [1+1] que se presentan en este trabajo, todos ellos constituidos por una unidad 1*H*-pirazol y una cadena poliamínica de distinta naturaleza.

1.3. Bibliografía

- [1] J.-M. Lehn. *Supramolecular Chemistry: Concepts and Perspectives*. VHC Weinheim, **1995**.
- [2] J. D. van der Waals. *Over de Continuïteit van Den Gas – En Vloeïstoftoestand*. Universiteit Leiden, **1873**.
- [3] A. M. Villiers. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1891**, 112, 536–538.
- [4] A. Werner. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1893**, 3, 267–270.
- [5] E. Fischer. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985–2993.
- [6] K. L. Wolf, H. Frahm, H. Harms. *Z. Phys. Chem.* **1937**, 36B, 237–287.
- [7] L. Pauling. *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals: An Introduction to Modern Structural Chemistry*. Cornell University Press, **1939**.
- [8] J. D. Watson, F. H. C. Crick. *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [9] R. E. Franklin, R. G. Gosling. *Nature* **1953**, 171, 740–741.
- [10] C. J. Pedersen. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 2495–2496.
- [11] C. J. Pedersen. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017–7036.
- [12] B. Dietrich, J.-M. Lehn, J.-P. Sauvage. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 2885–2888.
- [13] B. Dietrich, J.-M. Lehn, J.-P. Sauvage. *Tetrahedron Lett.* **1969**, 10, 2889–2892.
- [14] E. P. Kyba, M. G. Siegel, L. R. Sousa, G. D. Y. Sogah, D. J. Cram. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 2691–2692.
- [15] E. B. Kyba, K. Koga, L. R. Sousa, M. G. Siegel, D. J. Cram. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 2692–2693.
- [16] R. C. Helgeson, K. Koga, J. M. Timko, D. J. Cram. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 3021–3023.
- [17] R. C. Helgeson, J. M. Timko, D. J. Cram. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, 95, 3023–3025.
- [18] G. W. Gokel, D. J. Cram. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1973**, 481–482.
- [19] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley. *Nature* **1985**, 318, 162–163.

- [20] J. R. Heath, S. C. O'Brien, Q. Zhang, Y. Liu, R. F. Curl, H. W. Kroto, F. K. Tittel, R. E. Smalley. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 7779–7780.
- [21] Q. L. Zhang, S. C. O'Brien, J. R. Heath, Y. Liu, R. F. Curl, H. W. Kroto, R. E. Smalley, *J. Phys. Chem.* **1986**, 90, 525–528.
- [22] G. M. Preston, B. L. Smith, M. L. Zeidel, J. J. Moulds, P. Agre. *Science* **1994**, 265, 1585–1587.
- [23] M. Yasui, A. Hazama, T.-H. Kwon, S. Nielsen, W. B. Guggino, P. Agre. *Nature* **1999**, 402, 184–187.
- [24] M. Borgnia, S. Nielsen, A. Engel, P. Agre. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 425–458.
- [25] D. A. Doyle, J. M. Cabral, R. A. Pfuetzner, A. Kuo, J. M. Gulbis, S. L. Cohen, B. T. Chait, R. MacKinnon. *Science* **1998**, 280, 69–77.
- [26] R. MacKinnon. *Science* **1998**, 280, 106–109.
- [27] V. Balzani, A. Credi, F. M. Raymo, J. F. Stoddart. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3348–3391.
- [28] J. D. Badjic, V. Balzina, A. Credi, S. Silvi, J. F. Stoddart. *Science* **2004**, 303, 1845–1849.
- [29] V. Balzani, M. Clemente-Leon, A. Credi, B. Ferrer, M. Venturi, A. H. Flood, J. F. Stoddart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 1178–1183.
- [30] C. O. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage, J. P. Kintzinger. *Tetrahedron Lett.* **1983**, 24, 5095–5098.
- [31] M. C. Jiménez, C. Dietrich-Buchecker, J.-P. Sauvage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, 39, 3284–3287.
- [32] P. Mobian, J.-M. Kern, J.-P. Sauvage. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 2392–2395.
- [33] S. P. Fletcher, F. Dumur, M. M. Pollard, B. L. Feringa. *Science* **2005**, 310, 80–82.
- [34] W. R. Browne, B. L. Feringa. *Nature Nanotechnology* **2006**, 1, 25–35.
- [35] N. Ruangsapapichat, M. M. Pollard, S. R. Harutyunyan, B. L. Feringa. *Nature Chemistry* **2011**, 3, 53–60.
- [36] J. W. Steed, P. A. Gale. *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*. Wiley, **2012**.
- [37] C. A. Hunter, J. K. M. Sanders. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 5525–5534.

- [38] A. Katrusiak, M. Podsiadło, A. Budzianowski. *Cryst. Growth Des.* **2010**, 10, 3461–3465.
- [39] G. W. Gokel, L. J. Barbour, R. Ferdani, J. Hu. *Acc. Chem. Res.* **2002**, 35, 878–886.
- [40] J. Hu, L. J. Barbour, G. W. Gokel. *Chem. Commun.* **2002**, 1808–1809.
- [41] A. Frontera, P. Gamez, M. Mascal, T. J. Mooibroek, J. Reedijk. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 9564–9583.
- [42] Y. S. Rosokha, S. V. Lindeman, S. V. Rosokha, J. K. Kochi. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 4650–4652.
- [43] L. Pauling. *J. Am. Chem. Soc.* **1931**, 53, 1367–1400.
- [44] J. W. Steed, J. L. Atwood. *Supramolecular Chemistry*. Wiley, **2009**.
- [45] G. D. Andretti, R. Ungaro, A. Pochini. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1979**, 1005–1007.
- [46] R. H. Kretsinger, V. N. Uversky, E. A. Permiãkov. *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer, **2013**.
- [47] D. Keilin, T. Mann. *Biochem. J.* **1940**, 34, 1163–1176.
- [48] S. Lindskog. *Pharmacol. Ther.* **1997**, 74, 1–20.
- [49] R. Saito, T. Sato, A. Ikai, N. Tanaka. *Acta Cryst.* **2004**, D60, 792–795.
- [50] D. E. Koshland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, 44, 98–104.
- [51] D. E. Koshland. *Science* **1963**, 142, 1533–1541.
- [52] D. E. Koshland. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1995**, 33, 2375–2378.
- [53] M. F. Perutz, G. Fermi, B. Luisi, B. Shaanan, R. C. Liddington. *Acc. Chem. Res.* **1987**, 20, 309–321.
- [54] G. Schwarzenbach, H. Ackermann, P. Ruckstuhl. *Helv. Chim. Acta* **1949**, 32, 1175–1186.
- [55] D. K. Cabbiness, D. W. Margerum. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 6540–6541.
- [56] F. M. Ashcroft. *Ion Channels and Disease*. Academic Press, **1999**.
- [57] D. N. Sheppard, D. P. Rich, L. S. Ostedgaard, R. J. Gregory, A. E. Smith, M. J. Welsh. *Nature* **1993**, 362, 160–164.
- [58] E. Cordat, J. R. Casey. *Biochem. J.* **2009**, 417, 423–439.

- [59] E. M. López-Vidal, M. D. García, C. Peinador, J. M. Quintela. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 2259–2267.
- [60] O. Domarco, I. Neira, T. Rama, A. Blanco-Gómez, M. D. García, C. Peinador, J. M. Quintela. *Org. Biomol. Chem.* **2017**, 15, 3594–3602.
- [61] A. Blanco-Gómez, T. Rama, O. Domarco, I. Neira, V. Blanco, J. M. Quintela, M. D. García, C. Peinador. *Dalton Trans.* **2017**, 46, 15671–15675.
- [62] Elguero, J. *Pyrazoles in Comprehensive Heterocyclic Chemistry II: A Review of the Literature*. Pergamon, **1984**.
- [63] M. P. Sammes, A. R. Katritzky. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1983**, 34, 1–52.
- [64] M. P. Sammes, A. R. Katritzky. *Adv. Heterocycl. Chem.* **1983**, 34, 53–78.
- [65] E. Buchner. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1889**, 22, 842–847.
- [66] T. Kosuge, H. Okeda. *J. Biochem.* **1954**, 41, 183–186.
- [67] F. F. Noe, L. Fowden. *Nature* **1959**, 184, 69–70.
- [68] J. Catalan, R. M. Claramunt, J. Elguero, J. Laynez, M. Menendez, F. Anvia, J. H. Quian, M. Taagepera, R. W. Taft. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 4105–4111.
- [69] M. A. Halcrow. *Dalton Trans.* **2009**, 2059–2073.
- [70] S. Brooker, T. C. Davidson, S. J. Hay, R. J. Kelly, D. K. Kennepohl, P. G. Plieger, B. Moubaraki, K. S. Murray, E. Bill, E. Bothe. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 216–217, 3–30.
- [71] S. Brooker. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2002**, 2535–2547.
- [72] W. Kaim. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 230, 127–139.
- [73] J. G. Haasnoot. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200–202, 131–185.
- [74] A. L. Gavrilova, B. Bosnich. *Chem. Rev.* **2004**, 104, 349–384.
- [75] F. Mani. *Coord. Chem. Rev.* **1992**, 120, 325–359.
- [76] R. Mukherjee. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 203, 151–218.
- [77] J. Klingele, S. Dechert, F. Meyer. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, 253, 2698–2741.
- [78] S. Trofimenko. *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, 88, 1842–1844.
- [79] S. Trofimenko. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 3170–3177.
- [80] S. Trofimenko. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 6288–6294.
- [81] S. Trofimenko. *Chem. Rev.* **1993**, 93, 943–980.
- [82] J. S. Thompson, T. J. Marks, J. A. Ibers. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4180–4192.

- [83] R. Alsfasser, S. Trofimenko, A. Looney, G. Parkin, H. Vahrenkamp. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 4098–4100.
- [84] A. A. Eagle, L. J. Laughlin, C. G. Young, E. R. T. Tiekink. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9195–9197.
- [85] Z. Xiao, C. G. Young, J. H. Enemark, A. G. Wedd. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9194–9195.
- [86] N. Kitajima, K. Fujisawa, Y. Morooka. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3210–3212.
- [87] N. Kitajima, H. Fukui, Y. Morooka, Y. Mizutani, T. Kitagawa. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 6402–6403.
- [88] N. Kitajima, U. P. Singh, H. Amagai, M. Osawa, Y. Morooka. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 7757–7758.
- [89] N. Kitajima, K. Fujisawa, M. Tanaka, Y. Morooka. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9232–9233.
- [90] W. H. Armstrong, S. J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, 105, 4837–4838.
- [91] W. H. Armstrong, A. Spool, G. C. Papaefthymiou, R. B. Frankel, S. J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 3653–3667.
- [92] W. H. Armstrong, S. J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 4632–4633.
- [93] W. H. Armstrong, M. E. Roth, S. J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6318–6326.
- [94] S. M. Gorun, S. J. Lippard. *Inorg. Chem.* **1988**, 27, 149–156.
- [95] S. J. Lippard. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1988**, 27, 344–361.
- [96] R. H. Beer, W. B. Tolman, S. G. Bott, S. J. Lippard. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 2082–2092.
- [97] T. N. Sorrell, M. R. Malachowski, D. L. Jameson. *Inorg. Chem.* **1982**, 21, 3250–3252.
- [98] T. N. Sorrell, D. L. Jameson, C. J. O'Connor. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 190–195.
- [99] T. N. Sorrell, C. O'Connor, O. P. Anderson, J. H. Reibenspies. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, 107, 4199–4206.
- [100] T. N. Sorrell, M. L. Garrity, D. J. Ellis. *Inorg. Chim. Acta* **1989**, 166, 71–77.
- [101] T. N. Sorrell, V. A. Vankai. *Inorg. Chem.* **1990**, 29, 1687–1692.
- [102] T. N. Sorrell, V. A. Vankai, M. L. Garrity. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 207–210.
- [103] W. L. Driessen, R. A. G. de Graaf, F. J. Parlevliet, J. Reedijk, R. M. de Vos. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, 216, 43–49.

- [104] J. E. Bol, W. L. Driessen, R. Y. N. Ho, B. Maase, L. Que, J. Reedijk. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1997**, 36, 998–1000.
- [105] J. E. Bol, B. Maase, G. Gonesh, W. L. Driessen, K. Goubitz, J. Reedijk. *Heterocycles* **1997**, 45, 1477–1492.
- [106] R. H. Bode, J. E. Bol, W. L. Driessen, F. B. Hulsbergen, J. Reedijk, A. L. Spek. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 1239–1243.
- [107] Bertini, Ivano, Canti, Giorgio, Luchinat, Claudio, Mani, Fabrizio, *Inorg. Chim. Acta* **1980**, 46, L91–L92.
- [108] I. Bertini, G. Canti, C. Luchinat, F. Mani. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 1670–1673.
- [109] C. Benelli, I. Bertini, M. Di Vaira, F. Mani. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1422–1425.
- [110] S. Mahapatra, N. Gupta, R. Mukherjee. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1991**, 2911–2915.
- [111] S. Mahapatra, R. Mukherjee. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1992**, 2337–2341.
- [112] S. Mahapatra, D. Bhuniya, R. Mukherjee. *Polyhedron* **1992**, 11, 2045–2049.
- [113] S. Mahapatra, R. J. Butcher, R. Mukherjee. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1993**, 3723–3726.
- [114] S. Mahapatra, R. Mukherjee. *Indian J. Chem.* **1993**, 32A, 428–430.
- [115] S. Mahapatra, T. K. Lal, R. Mukherjee. *Polyhedron* **1993**, 12, 1477–1481.
- [116] S. Mahapatra, R. Mukherjee. *Polyhedron* **1993**, 12, 1603–1606.
- [117] J. Teichgräber, G. Leibelng, S. Dechert, F. Meyer. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2005**, 631, 2613–2618.
- [118] L. Penkova, S. Demeshko, M. Haukka, V. A. Pavlenko, F. Meyer, I. O. Fritsky, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2008**, 634, 2428–2436.
- [119] F. Meyer. *Chem. Commun.* **1998**, 1555–1556.
- [120] F. Meyer, A. Jacobi, B. Nuber, P. Rutsch, L. Zsolnai. *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 1213–1218.
- [121] F. Meyer, E. Kaifer, P. Kircher, K. Heinze, H. Pritzkow. *Chem. Eur. J.* **1999**, 5, 1617–1630.
- [122] M. Konrad, F. Meyer, A. Jacobi, P. Kircher, P. Rutsch, L. Zsolnai. *Inorg. Chem.* **1999**, 38, 4559–4566.
- [123] J. Ackermann, F. Meyer, E. Kaifer, H. Pritzkow. *Chem. Eur. J.* **2002**, 8, 247–258.

- [124] A. Ficks, C. Sibbald, M. John, S. Dechert, F. Meyer. *Organometallics* **2010**, 29, 1117–1126.
- [125] J. Wimberg, S. Meyer, S. Dechert, F. Meyer. *Organometallics* **2012**, 31, 5025–5033.
- [126] L. Behle, M. Neuburger, M. Zehnder, T. A. Kaden. *Helv. Chim. Acta* **1995**, 78, 693–702.
- [127] H. Weller, L. Siegfried, M. Neuburger, M. Zehnder, T. A. Kaden. *Helv. Chim. Acta* **1997**, 80, 2315–2328.
- [128] M. Kumar, V. J. Arán, P. Navarro. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 3159–3162.
- [129] M. Kumar, V. J. Arán, P. Navarro. *Tetrahedron Lett.* **1995**, 2161–2164.
- [130] V. J. Arán, M. Kumar, J. Molina, L. Lamarque, P. Navarro, E. García-España, J. A. Ramírez, S. V. Luis, B. Escuder. *J. Org. Chem.* **1999**, 64, 6135–6146.
- [131] L. Lamarque, C. Miranda, P. Navarro, F. Escartí, E. García-España, J. Latorre, J. A. Ramírez. *Chem. Commun.* **2000**, 1337–1338.
- [132] L. Lamarque, P. Navarro, C. Miranda, V. J. Arán, C. Ochoa, F. Escartí, E. García-España, J. Latorre, S. V. Luis, J. F. Miravet. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 10560–10570.
- [133] F. Escartí, C. Miranda, L. Lamarque, J. Latorre, E. García-España, M. Kumar, V. J. Arán, P. Navarro. *Chem. Commun.* **2002**, 936–937.
- [134] C. Miranda, F. Escartí, L. Lamarque, M. J. R. Yunta, P. Navarro, E. García-España, M. L. Jimeno. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 823–833.
- [135] C. Miranda, F. Escartí, L. Lamarque, E. García-España, P. Navarro, J. Latorre, F. Lloret, H. R. Jiménez, M. J. R. Yunta. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, 2005, 189–208.
- [136] F. Reviriego, M. I. Rodríguez-Franco, P. Navarro, E. García-España, M. Liugonzález, B. Verdejo, A. Domènech. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 16458–16459.
- [137] A. Domènech, E. García-España, P. Navarro, C. Miranda. *Dalton Trans.* **2006**, 4926–4935.
- [138] J. Pitarch-Jarque. *Química de Coordinación de Macrociclos con Unidades 1H-Pirazol*. Universidad de Valencia, **2015**.
- [139] R. Belda. *Aspectos Medioambientales y Biomédicos de la Química Supramolecular de Azaciclofanos Derivados de la Piridina y el Pirazol*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, **2015**.

- [140] R. Belda, J. Pitarch-Jarque, C. Soriano, J. M. Llinares, S. Blasco, J. Ferrando-Soria, E. García-España. *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 10795–10803.
- [141] A. Andrés, M. I. Burguete, E. García-España, J. F. Miravet, C. Soriano. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1993**, 749–756.
- [142] A. Andrés, C. Bazzicaluppi, S. V. Luis. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 2995–3004.
- [143] J. A. Aguilar, P. Díaz, A. Domènech, E. García-España, J. M. Llinares, S. V. Luis, J. A. Ramírez, C. Soriano. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1999**, 1159–1168.
- [144] P. Díaz, M. G. Basallote, A. Máñez, E. García-España, L. Gil, J. Latorre, C. Soriano, B. Verdejo, S. V. Luis. *Dalton Trans.* **2003**, 1186–1193.
- [145] A. Mendoza, J. Aguilar, M. G. Basallote, L. Gil, J. C. Hernández, M. A. Máñez, E. García-España, L. Ruiz-Ramírez, C. Soriano, B. Verdejo. *Chem. Commun.* **2003**, 3032–3033.
- [146] J. Aguilar, M. G. Basallote, L. Gil, J. C. Hernández, M. A. Máñez, E. García-España, C. Soriano, B. Verdejo. *Dalton Trans.* **2004**, 94–103.
- [147] M. G. Basallote, A. Domènech, A. Ferrer, E. García-España, J. M. Llinares, M. A. Máñez, C. Soriano, B. Verdejo. *Inorg. Chim. Acta* **2006**, 359, 2004–2014.

2

Objetivos

Entre las distintas líneas de investigación del grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, se encuentra el diseño, la síntesis, y la caracterización de nuevos ligandos azamacrocíclicos de condensación [1+1] con unidades de 1*H*-pirazol.

Este trabajo ha sido orientado hacia el estudio de la química de coordinación de azamacrociclos [1+1] de 1*H*-pirazol, con metales de transición de importancia biológica, tales como el cobre(II) y el zinc(II), presentes en numerosas proteínas, y que son esenciales para la vida. También han sido estudiadas las posibles aplicaciones biológicas de los azamacrociclos [1+1] de 1*H*-pirazol, los cuales han sido empleados para distintos propósitos dependiendo de la naturaleza de la poliamina que constituye el macrociclo.

A continuación, se enumeran los seis objetivos principales que se han marcado para la realización de este trabajo:

Objetivo 1: Síntesis y caracterización de nuevos azamacrociclos [1+1] de 1*H*-pirazol

Los azamacrociclos que se presentan en esta memoria están constituidos por una unidad de 1*H*-pirazol como espaciador aromático, y por una cadena poliamínica de distinta naturaleza, la cual presentará más o menos grupos amino y/o átomos de carbono entre los grupos amino.

Objetivo 2: Estudio de las propiedades ácido-base de los nuevos azamacrociclos [1+1] de 1H-pirazol en disolución acuosa

En disolución acuosa, las aminas se comportan como bases moderadamente fuertes y se pueden protonar. En base a ello, en primer lugar será necesario determinar las constantes de protonación de los nuevos azamacrociclos.

Los estudios se realizarán por medio de distintas técnicas, tales como potenciometría, espectroscopia de absorción UV-visible, y espectroscopia de emisión de fluorescencia.

Objetivo 3: Estudio de la química de coordinación de los nuevos azamacrociclos [1+1] de 1H-pirazol en disolución acuosa y en estado sólido

Mediante potenciometría, se determinarán las constantes de estabilidad de los nuevos azamacrociclos con cobre(II) y zinc(II), en disolución acuosa, para distintas relaciones molares.

Haciendo uso de distintas técnicas, tales como espectroscopia de absorción UV-visible, espectroscopia de emisión de fluorescencia, espectrometría de masas de alta resolución, y espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica, se intentará obtener información complementaria a la deducida de las valoraciones potenciométricas.

En la medida de lo posible, se intentará obtener monocristales adecuados para difracción de rayos X, con el propósito de adquirir información estructural de los mismos.

Objetivo 4: Formación de hidrogeles con 5'-guanosa monofosfato

El propósito principal será el estudio del potencial de algunos de los nuevos azamacrociclos para incrementar la capacidad de la guanina para auto-organizarse en estructuras de tipo G-quadruplex en disolución acuosa, así como el posible uso de los hidrogeles como nuevos materiales biocompatibles, mediante la introducción de isoniazida en los hidrogeles, el cual es un fármaco ampliamente empleado para el tratamiento de la tuberculosis.

Los estudios se realizarán por medio de distintas técnicas, tales como reología, resonancia magnética nuclear, y crio-microscopía electrónica de barrido.

Objetivo 5: Evaluación de la actividad superóxido dismutasa

El propósito principal será el estudio de la capacidad de algunos de los nuevos azamacrociclos, así como la de los complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II) de los mismos, para mimetizar la enzima superóxido dismutasa de cobre y zinc.

Mediante electroquímica, se determinarán los potenciales rédox de los sistemas ensayados como miméticos de la enzima.

Mediante el método indirecto McCord-Fridovich, se evaluará la capacidad de los sistemas ensayados para catalizar efectivamente la dismutación del anión superóxido en disolución acuosa.

Objetivo 6: Estudio de la interacción con secuencias de oligonucleótidos

El propósito principal será el estudio de la capacidad de algunos de los nuevos azamacrociclos, así como la de los complejos mononucleares de cobre(II) y zinc(II), para interactuar con distintas secuencias de oligonucleótidos.

Mediante el Método Intrínseco, se determinarán las constantes de afinidad de los azamacrociclos seleccionados para los estudios con las distintas secuencias de oligonucleótidos.

Mediante ensayos de desnaturalización térmica, se determinará la variación en la temperatura de desnaturalización de las distintas secuencias de oligonucleótidos, como consecuencia de la interacción con los azamacrociclos seleccionados para el estudio, así como de los complejos mononucleares de cobre(II) y zinc(II) de los mismos.

Mediante ensayos de proliferación celular por MTT, se estudiará la citotoxicidad de los azamacrociclos seleccionados para el estudio.

3

Material y Métodos

3.1. Potenciometría

Descripción del potenciómetro

Los estudios potenciométricos fueron realizados mediante un potenciómetro automático Metrohm 905 Titrand, el cual se encuentra disponible en el laboratorio del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia. El potenciómetro está equipado con una bureta automática Metrohm 800 Dosino y un agitador magnético Metrohm 801 Stirrer, controlado por un ordenador Intel Core i3-2100.

El potenciómetro está formado por dos celdas: una de medida y otra de referencia, conectadas por un puente salino conteniendo una disolución de NaCl 0.5 M. Como electrodo de medida se hizo uso de un electrodo de vidrio Metrohm, mientras que como electrodo de referencia se hizo uso de un electrodo Metrohm de Ag/AgCl en KCl 3 M. En la Figura 3.1 se muestra una representación esquemática del sistema potenciométrico empleado.

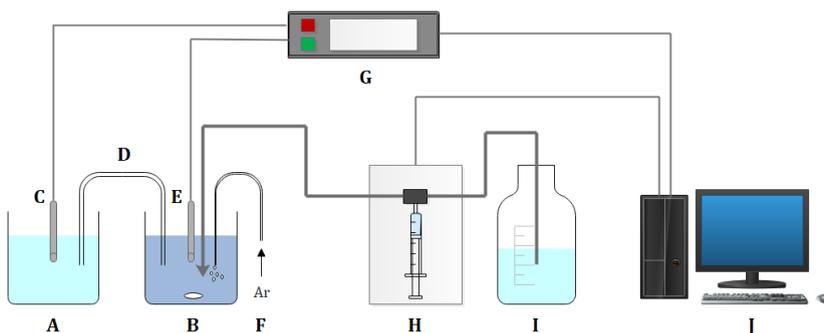


Figura 3.1. Esquema del sistema potenciométrico. **A:** Celda de referencia. **B:** Celda de medida. **C:** Electrodo de referencia. **D:** Puente salino. **E:** Electrodo de medida. **F:** Argón. **G:** Lectura del potencial de la disolución. **H:** Bureta automática. **I:** Valorante: NaOH 0.1 M. **J:** Ordenador.

Fundamento teórico

La potenciometría es un método analítico que permite el estudio de equilibrios en disolución. En el presente trabajo, se ha utilizado para determinar las constantes de protonación de las poliaminas sintetizadas, así como para la posterior determinación de las constantes de estabilidad de los distintos sistemas estudiados.

Para determinar las constantes de estabilidad de un sistema es necesario conocer la concentración en el equilibrio de todas las especies presentes en la disolución, pero esto normalmente no es posible. De hecho, basta con poder medir la concentración de una de las especies presentes en el equilibrio, siempre que esta se pueda relacionar con las concentraciones de las especies restantes a través de los balances de masas y cargas del sistema y las constantes de equilibrio. La potenciometría se fundamenta en la medida de la fuerza electromotriz de una disolución, permitiendo relacionar la concentración de uno de sus componentes con las constantes de estabilidad y las concentraciones iniciales de las especies.

En disolución acuosa, en sistemas conteniendo especies protonables, como en el caso de las poliaminas que se presentan en este trabajo, se mide la concentración de los iones H^+ con un electrodo de vidrio. Haciendo uso de la ecuación de Nernst se relaciona la concentración de los iones H^+ con la fuerza electromotriz de la disolución, como se representa en la ecuación 3.1:

$$E = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln[H^+] \quad (3.1)$$

Donde $E^{0'}$ es un valor que se debe determinar para cada experiencia haciendo uso de las mismas condiciones de trabajo, puesto que no es un término constante, sino que es la suma de varios potenciales, algunos de ellos variables con el tiempo, como se detalla en la ecuación 3.2:

$$E^{0'} = E^0 + E_j + E_{ass} \quad (3.2)$$

Donde E^0 es el potencial estándar o potencial normal de reducción del electrodo. E_j es el potencial de unión líquida, el cual se encuentra relacionado con la concentración de iones H^+ , motivo por el cual las valoraciones potenciométricas suelen realizarse a valores de pH superiores a 2.0, puesto que para valores de pH más ácidos este término deja de ser constante. Y donde E_{ass} es el potencial de asimetría.

Procedimiento experimental

Calibrado de los electrodos

En primer lugar, es necesario realizar la valoración de la base con la que posteriormente se va a trabajar en las medidas potenciométricas, que será el valorante (NaOH 0.1 M), con un ácido fuerte de concentración conocida (HCl 0.1 M). La valoración se realiza en disolución acuosa y empleando la misma fuerza iónica que posteriormente se empleará en las medidas potenciométricas.

La fuerza iónica empleada para las valoraciones potenciométricas fue NaCl 0.15 M. La elección de NaCl como fuerza iónica se debe a que los iones sodio y cloruro son los electrolitos principales en el compartimento extracelular, lo que incluye los fluidos intersticial, intravascular y transcelular, desempeñando papeles determinantes en procesos esenciales para la vida, como en el mantenimiento de la presión sanguínea, así como en la absorción y transporte de nutrientes.^[1,2]

El calibrado de los electrodos se realiza por dos razones: (1) calibrar los electrodos, y (2) comprobar la carbonatación de la base. Tanto la valoración como el tratamiento de los datos se realizan automáticamente por el programa Metrohm Tiamo 2.3 del potenciómetro. Haciendo uso de una representación de Gran,^[3-5] el programa calcula el valor de E^0 , el valor del producto iónico del disolvente y la concentración del valorante.

Medidas potenciométricas

Todas las valoraciones se realizaron en disolución acuosa, haciendo uso de H₂O ultrapura, a la temperatura controlada de 298.1 ± 0.1 K, empleando como fuerza iónica NaCl 0.15 M, con agitación constante y bajo atmósfera inerte de argón. Las valoraciones potenciométricas se realizaron un mínimo de dos veces para cada sistema, para asegurar la reproducibilidad de los resultados.

La adquisición de los datos se encuentra también automatizada por el programa Metrohm Tiamo 2.3, con el que se controla tanto la adición de valorante mediante una bureta automática como la lectura del potencial mediante el electrodo de vidrio. Al final de la experiencia, se genera un fichero que contiene los volúmenes de valorante añadido y las medidas del potencial de la disolución.

Análisis de los datos

Los ficheros generados en cada valoración potenciométrica se trataron haciendo uso del programa informático HYPERQUAD.^[6] Dicho programa permite realizar un ajuste de los datos utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg–Marquardt,^[7,8] proporcionando las constantes de estabilidad de un determinado sistema.

Conocidas las constantes de estabilidad de un determinado sistema, es posible obtener el diagrama de distribución de especies de dicho sistema haciendo uso del programa informático HySS.^[9]

Programa HYPERQUAD

Como se ha comentado anteriormente, el programa HYPERQUAD proporciona las constantes de estabilidad para un determinado sistema. Es necesario tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- (1) Para cada especie presente en la disolución hay una única constante de equilibrio, que es la constante de formación y que se expresa como un cociente de concentraciones.
- (2) Los electrodos se comportan de acuerdo con la ecuación de Nernst.
- (3) El calibrado del electrodo, la preparación de las disoluciones, así como la estandarización del valorante son fuentes de error sistemático. Es necesario realizar un trabajo experimental cuidadoso para la minimización de estos errores sistemáticos.
- (4) Los errores en el volumen de valorante añadido, y en el potencial obtenido de la lectura del potenciómetro tienen una distribución normal.
- (5) Es necesario introducir un punto de partida en el programa, es decir, un modelo de sistema en equilibrio, con unos valores aproximados para las constantes de formación de cada una de las especies de dicho sistema.

El programa realiza un ajuste de los datos utilizando el método de mínimos cuadrados no lineales de Levenberg–Marquardt, minimizando la variable U según la ecuación 3.3:

$$U = \sum w_i [E_i(\text{calculado}) - E_i(\text{experimental})]^2 \quad (3.3)$$

Sin embargo, no todos los datos experimentales tienen el mismo peso estadístico w_i , sino que es inversamente proporcional al parámetro σ_i , el cual se define según la ecuación 3.4:

$$\sigma_i^2 = \sigma_o^2 + \left(\frac{\delta E_i}{\delta v} \right)^2 \times \sigma_v^2 \quad (3.4)$$

Donde σ_o y σ_v son las varianzas estimadas del volumen de valorante adicionado y del potencial obtenido de la lectura del potenciómetro, y donde $\left(\frac{\delta E_i}{\delta v} \right)$ se corresponde con la pendiente de la curva de valoración.

Los puntos próximos a un salto de potencial dan lugar a valores elevados para σ_i , lo que resulta en un menor peso estadístico. En cambio, los puntos en zonas tamponadas dan lugar a valores pequeños para σ_i , lo que resulta en un mayor peso estadístico, siendo más importantes en el refinamiento del modelo de sistema en equilibrio.

El potencial $E_i(\text{experimental})$ se obtiene del potencial de la lectura del potenciómetro. El potencial $E_i(\text{calculado})$ es el potencial teórico de cada punto, el cual se obtiene de los datos experimentales y de las constantes de los distintos equilibrios que participan, el cual ha de minimizar el valor de la función U.

En la Figura 3.2 se presenta un esquema con los pasos experimentales seguidos para la realización de las valoraciones potenciométricas, así como la información que se deduce en cada paso.

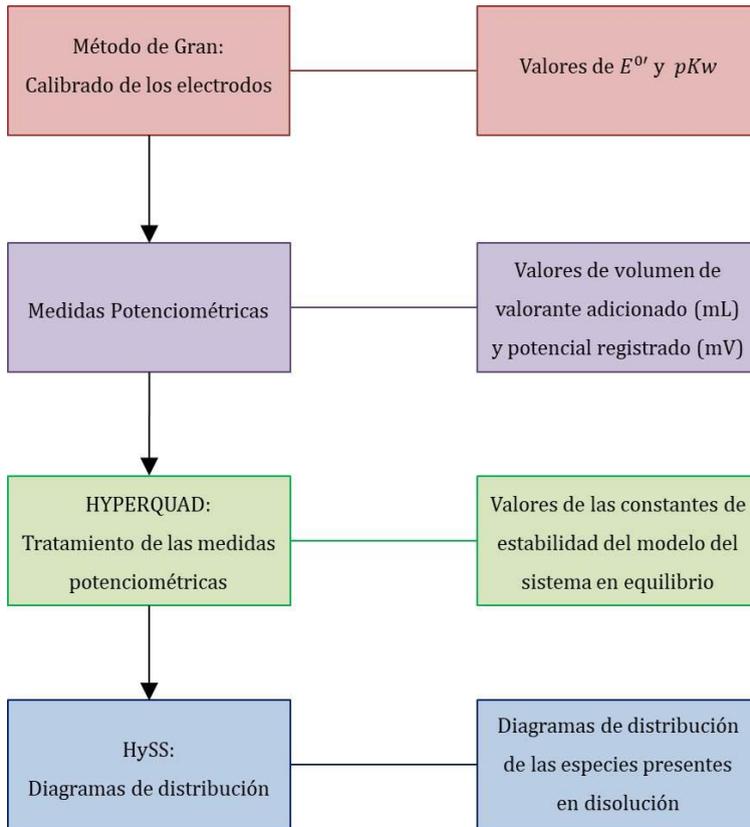


Figura 3.2. Esquema de los pasos experimentales seguidos para la realización de las valoraciones potenciométricas, así como la información deducida en cada uno de los pasos.

3.2. Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

La técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) fue empleada para distintos propósitos, tales como para la caracterización de los productos preparados durante el proceso de síntesis, así como para los estudios cinéticos de formación de los hidrogeles híbridos con 5'-guanosina monofosfato.

Los espectros de RMN de los distintos productos preparados durante la síntesis fueron obtenidos haciendo uso de un equipo Bruker Advance DPX 300 MHz, el cual se encuentra disponible en el servicio central de soporte a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Las muestras se disolvieron empleando el disolvente deuterado adecuado. El procesamiento de los espectros se llevó a cabo mediante el software Mnova NMR 10.0.

Los estudios cinéticos de formación de los hidrogeles se llevaron a cabo empleando un equipo Varian Inova-500, operando a frecuencias de 500.130 MHz para ^1H , el cual se encuentra disponible en el servicio de RMN del Departamento de Química de la Universidad de Durham (Durham, Reino Unido). Los hidrogeles se prepararon empleando D_2O como disolvente. El valor del pH se ajustó mediante la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas de DCl y/o NaOD . El valor del pD se calculó a partir del valor del pH de lectura del pH-metro, haciendo uso de la ecuación 3.5:

$$pD = pH_{pH\text{-metro}} + 0.4 \quad (3.5)$$

3.3. Espectrometría de Masas

La técnica de espectrometría de masas fue empleada para distintos propósitos, tales como para la caracterización de las nuevas poliaminas sintetizadas, así como para la realización de los estudios de especiación con cobre(II) y zinc(II) de las mismas poliaminas.

Los espectros de masas (ESI-MS) de las nuevas poliaminas sintetizadas fueron obtenidos mediante un espectrómetro de masas de trampa de iones Bruker Esquire 3000 plus, el cual se encuentra disponible en el servicio central de soporte a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

Los espectros de masas de alta resolución (HR-ESI-MS) para los estudios de especiación con cobre(II) y zinc(II) fueron obtenidos empleando un espectrómetro de masas híbrido con analizador cuadrupolo-tiempo de vuelo (TOF) modelo TripleTOF 5600 AB Sciex, el cual se encuentra disponible en el servicio central de soporte a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Las medidas se realizaron empleando N₂ como cortina de gas nebulizado, un voltaje de 5300 V, y con las fuentes de iones GS1 y GS2 a 35 psi y 723.15 K. Las muestras se prepararon pesando la cantidad adecuada de poliamina y adicionando el volumen adecuado de disoluciones acuosas de concentración aproximada 0.1 M de Cu(ClO₄)₂ y/o Zn(ClO₄)₂, para obtener disoluciones de concentración 10⁻³ M, empleando como disolvente H₂O/MeOH (50/50 vol/vol). El valor del pH de las disoluciones se ajustó mediante la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas de HCl y/o NaOH. El procesado de los espectros se realizó mediante el software AB Sciex Peak View.

3.4. Análisis Elemental

Los análisis elementales de las nuevas poliaminas sintetizadas se realizaron empleando un equipo Carlo-Elba modelo EA1108 CHNS-O, el cual se encuentra disponible en el servicio central de soporte a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

3.5. Determinación del Punto de Fusión

La determinación del punto de fusión de algunas de las nuevas poliaminas sintetizadas se realizó haciendo uso de un equipo Stuart™ Melting Point Apparatus SMP3.

3.6. Espectroscopia de Resonancia Paramagnética Electrónica

Los espectros de resonancia paramagnética electrónica (EPR) se adquirieron haciendo uso de un espectrómetro Bruker ELEXYS E580 equipado con un criostato de helio, el cual se encuentra disponible en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) de la Universidad de Valencia. Las medidas se llevaron a cabo en la banda X, a la frecuencia de 9.47 GHz y a la temperatura de 70 K.

Las muestras se prepararon pesando la cantidad adecuada de poliamina y adicionando el volumen adecuado de una disolución acuosa de concentración aproximada 0.1 M de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, para obtener disoluciones de concentración 10^{-3} M, empleando como disolvente H_2O /etilenglicol (70/30 vol/vol). El valor del pH de las disoluciones se ajustó mediante la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas de HCl y/o NaOH.

3.7. Difracción de Rayos X

La determinación de las estructuras cristalinas se realizó mediante difracción de rayos X, empleando los siguientes equipos:

(1) Difractómetro Enraf Nonius Kappa CCD, equipado con un detector APEX-II y un monocromador de grafito con radiación Mo-K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), el cual se encuentra disponible en el servicio central de soporte a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia. La adquisición y el tratamiento de los datos se realizaron con los programas Collect y Denzo-SMN.

(2) Difractómetro Oxford Supernova, equipado con un detector Sapphire CCD y un monocromador de espejo con radiación Mo-K α ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$), el cual se encuentra disponible en el Instituto de Ciencia Molecular (ICMol) de la Universidad de Valencia. La adquisición y el tratamiento de los datos se realizaron con el programa CrysAlisPro.

La temperatura de adquisición de datos fue de $293.1 \pm 0.1 \text{ K}$, o bien de $120.1 \pm 0.1 \text{ K}$, dependiendo del equipo. El refinado de las estructuras fue llevado a cabo mediante un método de mínimos cuadrados haciendo uso de los programas SHELX-97 y SHELX-2013, los cuales se encuentran dentro de los paquetes informáticos WinGX^[10] y OLEX2,^[11] respectivamente. Todos los átomos se modelizaron anisotrópicamente, mientras que los átomos de hidrógeno se colocaron en las posiciones adecuadas mediante parámetros térmicos isotrópicos. Las representaciones de las estructuras cristalinas que se muestran en este trabajo se realizaron empleando el software Mercury.^[12]

3.8. Espectroscopia de Absorción UV-Visible

Los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible se realizaron empleando un espectrofotómetro ultravioleta-visible Agilent 8453, el cual se encuentra disponible en el laboratorio del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

Las medidas se llevaron a cabo haciendo uso de una cubeta Hellma con un camino óptico de 1 cm, a temperatura controlada de 298.1 ± 0.1 K. Las muestras se prepararon pesando la cantidad adecuada de poliamina para obtener disoluciones de concentración 10^{-3} M, empleando como disolvente H_2O ultrapura. En el caso de los estudios de especiación con metales se adicionó el volumen adecuado de disoluciones acuosas de concentración aproximada de 0.1 M de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ y/o $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2$, para alcanzar la relación molar deseada. El valor del pH de las disoluciones se ajustó mediante la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas de HCl y/o NaOH.

3.9. Espectroscopia de Emisión de Fluorescencia

Los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia se realizaron haciendo uso de un fluorímetro PTI modular equipado con una lámpara de xenón, el cual se encuentra disponible en el laboratorio del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

Las medidas se llevaron a cabo haciendo uso de una cubeta Hellma con un camino óptico de 1 cm y con las cuatro caras transparentes a la radiación electromagnética, a temperatura controlada de 298.1 ± 0.1 K. Las muestras se prepararon pesando la cantidad adecuada de poliamina para obtener disoluciones de concentración 10^{-5} M, empleando como disolvente H_2O ultrapura. En el caso de los estudios de especiación con metales se adicionó el volumen adecuado de disoluciones acuosas de concentración aproximada de 0.1 M de $Cu(ClO_4)_2$ y/o $Zn(ClO_4)_2$, para alcanzar la relación molar deseada. El valor del pH de las disoluciones se ajustó mediante la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas de HCl y/o NaOH.

Los datos de intensidad de emisión de fluorescencia se corrigieron con los valores de la absorbancia y con la dilución de volumen debido a la adición de las alícuotas de disoluciones concentradas de HCl y/o NaOH.

3.10. Preparación de los Hidrogeles

Los hidrogeles se prepararon pesando la cantidad adecuada de poliamina en un vial, que depende de la relación molar que se desea alcanzar, y posteriormente añadiendo 1 mL de una disolución acuosa de 5'-guanosina monofosfato de concentración 30 mM, que había sido preparada previamente.

El valor del pH fue ajustado a 5 mediante la adición de pequeñas alícuotas de disoluciones concentradas de HCl y/o NaOH. La mezcla resultante se calentó con una pistola de calor y se homogenizó con la ayuda de un equipo de ultrasonidos. Finalmente, la muestra se dejó en reposo durante toda la noche.

3.11. Test de Inversión

El test de inversión permite de manera rápida y sencilla, y sin la necesidad de disponer de equipos sofisticados, determinar si se forma un gel en unas condiciones dadas. La metodología consiste en invertir el vial que contiene la muestra. Si al realizar esta operación el material fluye o cae por efecto de la gravedad, se concluye en que la muestra no se puede considerar como gel.

3.12. Reología

Las medidas reológicas se realizaron haciendo uso de un reómetro TA Instrument Advanced Rheometer 2000, controlado por un ordenador mediante el programa Rheology Advance Instrument control (v 5.8.2), el cual se encuentra disponible en el Durham Centre for Soft Matter, de la Universidad de Durham (Durham, Reino Unido).

En la Figura 3.3 se muestra una representación esquemática del sistema empleado para la realización de las medidas de reología.

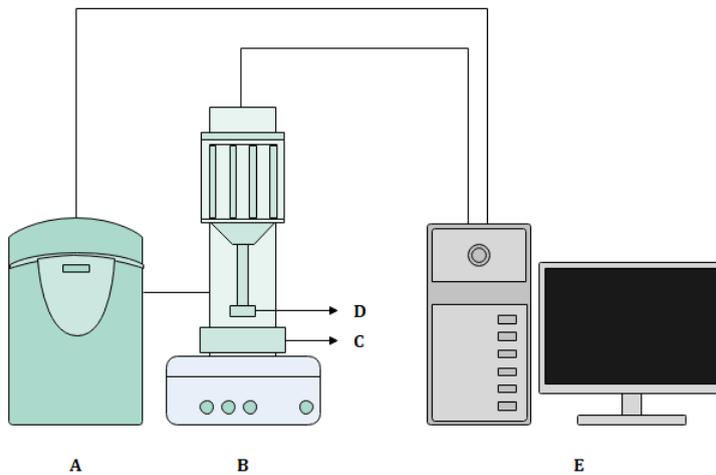


Figura 3.3. Esquema del reómetro. **A:** Torre conteniendo la electrónica del reómetro. **B:** Reómetro. **C:** Plato estacionario. **D:** Plato móvil. **E:** Ordenador. En todas las experiencias la separación entre los platos **C** y **D** fue de 1000 μm .

Las medidas se llevaron a cabo empleando una geometría paralela entre platos, siendo la separación entre el plato móvil y el plato estacionario de 1000 μm . La preparación de las muestras se realizó depositando 1 mL del gel, fundido previamente haciendo uso una pistola de calor, en un molde de vidrio cilíndrico de 25 mm de diámetro, a una temperatura controlada mediante termostato de 283.1 ± 0.1 K, esperando 25 minutos la formación del gel para iniciar la experiencia.

Los hidrogeles se estudiaron por medio de dos experimentos: barrido de frecuencia y barrido de tensión. Los experimentos de barrido de frecuencia se realizaron en un intervalo de 0.1–100.0 Pa, con una tensión oscilatoria constante de 3.259 Pa. Los experimentos de barrido de tensión se llevaron a cabo en un intervalo de 0.1–10000.0 Pa, con una frecuencia constante de 1 Hz.

El análisis de los datos fue llevado a cabo mediante el programa Rheology Advantage Data Analysis v 5.7.0. Con el objetivo de garantizar la reproducibilidad de los resultados, los experimentos se realizaron como mínimo por duplicado.

3.13. Crio-Microscopía Electrónica de Barrido

La morfología de los hidrogeles se estudió mediante crio-microscopía electrónica de barrido (crio-SEM), haciendo uso de un equipo JEOL modelo JSM 5410, el cual se encuentra disponible en el servicio de microscopía electrónica de la Universidad Politécnica de Valencia.

Los hidrogeles se enfriaron lo más rápidamente posible empleando nitrógeno líquido. Posteriormente, se pasaron al sistema de crio-observación, donde primero se sublimó el hielo superficial y después se recubrió la superficie de las mismas con oro, para hacer posible la posterior observación de las muestras.

3.14. *Dropping Ball*

El método conocido como *dropping ball*^[13] permite de manera rápida y sencilla determinar la temperatura de disociación de un gel. La metodología consiste en colocar una esfera de cristal sobre la superficie del gel, aumentando gradualmente la temperatura. La temperatura a la cual la esfera cae al fondo del vial, se corresponde con la temperatura de disociación del gel. En este trabajo se ha empleado una esfera de cristal de 261.1 mg de masa. La temperatura se aumentó gradualmente, empleando una rampa de temperatura de 1.0 °C/min.

3.15. Electroquímica

Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo haciendo uso de un potenciostato BAS Cell Strand CV-50W controlado por un ordenador Intel Core i3-2100, equipado con una celda de medida C3 de Bioanalytical Systems, la cual incorpora un sistema de purga mediante argón y agitador magnético, el cual se encuentra disponible en el laboratorio del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

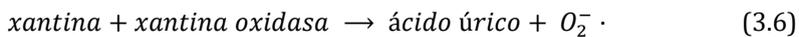
Como electrodo de medida se empleó un electrodo de grafito BASi modelo MF-2012. Como electrodo auxiliar se hizo uso de un electrodo de hilo de platino. Como electrodo de referencia se empleó un electrodo de Ag/AgCl en NaCl 3 M. Las muestras se prepararon pesando la cantidad adecuada de poliamina y adicionando el volumen adecuado de una disolución acuosa de concentración aproximada 0.1 M de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$, para obtener disoluciones de concentración 10^{-3} M, empleando como disolvente una disolución acuosa de TRIS 50 mM y NaCl 0.15 M, preparada para pH 7.4. El procedimiento se encuentra descrito con detalle en la referencia [14].

3.16. Método McCord–Fridovich

Fundamento teórico

Principalmente, existen dos tipos de métodos para determinar la actividad SOD: directos e indirectos. En los métodos directos, se mide directamente la velocidad con la que varía la concentración de anión superóxido, mientras que en los métodos indirectos, se mide la velocidad de la variación de la concentración de una especie indicadora, la cual se puede relacionar con la concentración de anión superóxido.

En este trabajo se ha empleado el método de McCord–Fridovich,^[15-17] que se trata de un método indirecto. En este procedimiento, el sistema xantina/xantina oxidasa genera los aniones superóxido, como se detalla en la ecuación 3.6. Como especie indicadora se ha empleado azul de tetrazolio (NBT, del inglés *nitrobluetetrazolium*), de color amarillo pálido en su forma oxidada. Como se describe en la ecuación 3.7, al reaccionar con el anión superóxido, el NBT se reduce a monoformazano (MF), de color violeta, con un máximo de absorbancia a 560 nm.



Registrando los cambios en la absorbancia a 560 nm en función del tiempo es posible monitorizar la reacción del NBT con el anión superóxido, o lo que es lo mismo, siguiendo la variación de la concentración del MF, que se puede relacionar fácilmente con la concentración de radical superóxido.

Si la muestra no presenta actividad SOD, todo el radical superóxido generado por el sistema xantina/xantina oxidasa reaccionará con el NBT, y como consecuencia de ello la variación de la absorbancia a 560 nm con el tiempo será grande (Figura 3.4, línea azul). En cambio, si la muestra presenta actividad SOD, esta competirá con el NBT por los aniones superóxido, reaccionando según las ecuaciones 3.8 y 3.9, y como consecuencia la variación de la absorbancia en función del tiempo disminuirá (Figura 3.4, línea naranja).

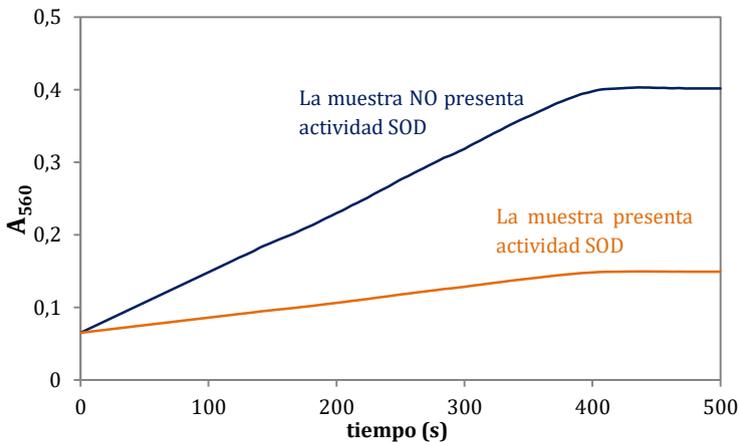
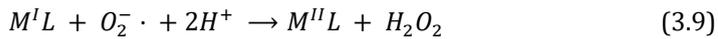
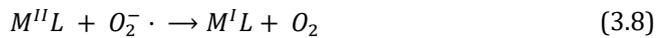


Figura 3.4. Ejemplo de la evolución de la absorbancia a 560 nm en función del tiempo, haciendo uso del método McCord-Fridovich. Para una muestra que no presenta actividad SOD (línea azul) y para una muestra que sí presenta actividad SOD (línea naranja).

Procedimiento experimental

Los estudios cinéticos se realizaron empleando un espectrofotómetro ultravioleta-visible Agilent 8453, el cual se encuentra disponible en el laboratorio del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

Todos los estudios se realizaron empleando la metodología que se describe a continuación:

(1) En una cubeta de poliestireno con capacidad de 1 mL, se introducen 800 μ L de mezcla de reacción (30 mL de tampón HEPES 50 mM preparado para pH 7.4/1.1 mg de xantina/1.8 mg de NBT).

(2) En la misma cubeta, se añade 100 μ L de muestra con una concentración en el intervalo 0.05–100 μ M, preparada empleando una disolución tampón de TRIS 50 mM para pH 7.4.

(3) En la misma cubeta, se adicionan 100 μ L de enzima xantina oxidasa (1/8 v/v en una disolución tampón de HEPES 50 mM, preparada para pH 7.4). La muestra se agita y se introduce rápidamente en el espectrofotómetro, midiendo la variación de absorbancia a la longitud de onda de 560 nm durante 2 minutos.

En cada experiencia es necesario medir un blanco, el cual se prepara del mismo modo al descrito, pero añadiendo 100 μ L de la disolución tampón de TRIS 50 mM preparada para pH 7.4, en lugar de la disolución que contiene la muestra.

Análisis de los datos

Como se ha mencionado, de cada medida se obtiene la variación de la absorbancia a 560 nm en función del tiempo, que representa la velocidad de reacción para una determinada concentración de compuesto (S). De la misma manera, se obtiene el valor de la velocidad de reacción para el blanco (S_0), lo que permite calcular lo que se conoce como inhibición (IC) para una determinada concentración de compuesto, según la ecuación 3.10:

$$IC = \frac{S_0 - S}{S_0} \quad (3.10)$$

Conocidos los valores de la inhibición, estos se pueden representar frente a la concentración de compuesto. Por convenio, el valor que se da como medida de la actividad SOD de un compuesto es el denominado IC_{50} , que representa la concentración de compuesto a la cual la inhibición es del 50%. Existen distintas formas de calcular el valor de IC_{50} , como por ejemplo, mediante interpolación. No obstante, en nuestro caso se ha empleado el software SuperSOD, desarrollado por el Dr. Salvador Blasco. La metodología se encuentra descrita con detalle en la referencia [18].

El uso del valor de IC_{50} como medida de la actividad SOD, sin embargo, presenta una serie de inconvenientes, ya que depende de la naturaleza de la especie indicadora, así como de su concentración. Esto impide la comparación entre resultados obtenidos utilizando distintos indicadores, o entre resultados en los que se ha utilizado el mismo indicador pero distintas concentraciones del mismo.

Como consecuencia, junto con el valor de IC_{50} se calcula el valor de la denominada constante catalítica (k_{cat}), que es una medida de la actividad independiente de las condiciones experimentales, la cual se puede calcular a partir del valor de IC_{50} mediante la ecuación 3.11:

$$k_{cat} = \frac{k_{indicador} \cdot [indicador]}{IC_{50}} \quad (3.11)$$

En este caso en particular en el que se ha empleado NBT como especie indicadora, la ecuación 3.11 queda de la siguiente manera:

$$k_{cat} = \frac{k_{NBT} \cdot [NBT]}{IC_{50}}$$

Donde:

$$k_{NBT} = (5.9 \pm 0.5) \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$$

3.17. Método Intrínseco

Fundamento teórico

La espectroscopia de emisión de fluorescencia permite estudiar directamente la interacción de aquellos compuestos que contienen unidades fluorescentes en su estructura con distintas secuencias de oligonucleótidos, siendo posible calcular el valor de la constante de estabilidad de dichos sistemas en el equilibrio.

A lo largo de los años, las constantes de equilibrio se han calculado haciendo uso de distintos métodos, como los desarrollados por George Scatchard,^[19] James McGhee y Peter von Hippel,^[20] Alison Rodger y Bengt Nordén,^[21] entre muchos otros. No obstante, muchas de estas metodologías tradicionales requieren numerosos pasos en la determinación del valor de la constante de equilibrio, lo que supone un inconveniente. Asimismo, en ciertas ocasiones resulta necesaria la intervención del juicio subjetivo del investigador que realiza el tratamiento de los datos.

En nuestro caso, el valor de la constante de estabilidad se ha calculado empleando el denominado Método Intrínseco,^[22,23] recientemente desarrollado por Janice Aldrich-Wright y Frank Stootman, el cual está basado en los métodos desarrollados por Alison Rodger, Bengt Nordén y colaboradores.

Esta metodología permite obtener el valor de la constante de estabilidad directamente de los datos experimentales, haciendo uso de un ajuste no lineal de mínimos cuadrados a partir de un modelo de equilibrio sencillo, como el que se muestra en la ecuación 3.12:



Donde $[H]$ hace referencia a la concentración de receptor libre, que en nuestro caso es la poliamina, $[G]$ es la concentración de sustrato libre, que en nuestro caso es el oligonucleótido y $[HG]$ es la concentración del complejo receptor-sustrato, la cual estará relacionada con la medida experimental de la intensidad de emisión de fluorescencia. Finalmente, K es la constante de estabilidad del sistema receptor-sustrato en el equilibrio, parámetro que queremos conocer.

Si se define $[H]_0$ como la concentración total de receptor, y $[G]_0$ como la concentración total de sustrato, se obtienen las ecuaciones 3.13 y 3.14, correspondientes a los balances de masa de receptor y sustrato, respectivamente:

$$[H]_0 = [H] + [HG] \quad (3.13)$$

$$[G]_0 = [G] + [HG] \quad (3.14)$$

Sustituyendo las ecuaciones 3.13 y 3.14 en la ecuación 3.12, se obtiene la ecuación 3.15:

$$K = \frac{[HG]}{([H]_0 - [HG])([G]_0 - [HG])} \quad (3.15)$$

Desarrollando la ecuación 3.15 y reorganizando los componentes se llega a la ecuación 3.16, la cual es una ecuación cuadrática:

$$[HG]^2 - [HG] \left([H]_0 + [G]_0 + \frac{1}{K} \right) - [H]_0[G]_0 = 0 \quad (3.16)$$

Las ecuaciones cuadráticas que presentan la forma $ax^2 + bx + c = 0$, como la ecuación 3.16, tienen dos soluciones:

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a}$$

De las dos soluciones matemáticas, únicamente tiene sentido físico la solución con signo negativo, la cual se presenta en la ecuación 3.17:

$$[HG] = \frac{1}{2} \left\{ \left([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K} \right) - \sqrt{\left([G]_0 + [H]_0 + \frac{1}{K} \right)^2 + 4[G]_0[H]_0} \right\} \quad (3.17)$$

No obstante, para realizar el ajuste de los datos experimentales de intensidad de emisión de fluorescencia y de concentración de oligonucleótido, resulta conveniente reescribir la ecuación 3.17 introduciendo los parámetros independientes A, B y R, lo que da lugar a la ecuación 3.18:

$$y = \frac{1}{2}R \left\{ (A + B + x) - \sqrt{(A + B + x)^2 + 4Bx} \right\} \quad (3.18)$$

La variable independiente x será $[G]$, que se corresponde con la concentración de oligonucleótido. La variable dependiente y será $[HG]$, que se deriva de la medida experimental correspondiente a la intensidad de emisión de fluorescencia. Los parámetros A, B y R se deducen directamente del ajuste de los datos experimentales, cuya relación con las variables físicas de la ecuación 3.17 se resume en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Relación de los parámetros independientes A, B y R con las variables físicas de la ecuación 3.17.

Parámetro	Relación
A	$A = 1/K$
B	$B = [H]_0$
R	Asociado al instrumento

Conocidos los parámetros A y B, la constante de estabilidad se calcula haciendo uso de la ecuación 3.19:

$$K = \frac{B}{A \cdot [Poliamina]} \quad (3.19)$$

Procedimiento experimental

Hibridación del oligonucleótido

En primer lugar, es necesario preparar la disolución de oligonucleótido y proceder a la hibridación de la estructura del mismo.

La disolución de oligonucleótido se prepara haciendo uso de una disolución tampón 10 mM KCl/10 mM LiCac/90 mM LiCl preparada para pH 7.4, empleando el volumen adecuado de la misma para la obtención de una disolución de oligonucleótido de concentración 1 mM.

Posteriormente, se procede a la hibridación de la estructura del oligonucleótido, calentando progresivamente la disolución de oligonucleótido hasta 95 °C, manteniendo constante la temperatura durante 5 minutos y dejando enfriar la disolución durante toda la noche.

Finalmente, conocido los coeficientes de extinción molar de los oligonucleótidos, mediante espectroscopia de absorción UV-visible se recalcula la concentración de las disoluciones de oligonucleótido, empleando la Ley de Lambert-Beer. Los coeficientes de extinción molar de los oligonucleótidos empleados se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Coeficiente de extinción molar de los oligonucleótidos empleados. Valores para la longitud de onda $\lambda = 260$ nm.

Oligonucleótido	ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$)
22AG	228.5
ckit1	213.2
ds26	253.2

Espectroscopia de emisión de fluorescencia

En una cubeta de cuarzo Hellma con un camino óptico de 1 cm y con las cuatro caras transparentes a la radiación electromagnética, se prepara 1 mL de una disolución de poliamina de concentración 10 μ M, empleando la misma disolución tampón que en la preparación de las disoluciones de los oligonucleótidos, 10 mM KCl/10 mM LiCac/90 mM LiCl preparada para pH 7.4.

Posteriormente, se adicionan alícuotas de la disolución de oligonucleótido hasta la saturación de la emisión de fluorescencia, registrando el espectro de emisión de fluorescencia con un fluorímetro PTI modular equipado con una lámpara de xenón, el cual se encuentra disponible en el laboratorio del Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

Análisis de los datos

Los valores experimentales de intensidad de emisión de fluorescencia y concentración de oligonucleótido se ajustan empleando la ecuación 3.18, mediante el algoritmo Levenberg–Marquardt,^[7,8] haciendo uso del programa informático Origin 8, lo que permite obtener los valores de los parámetros A, B y R.

Conocida la concentración de poliamina empleada en la experiencia y conocidos los parámetros A y B, se calcula el valor de la constante de estabilidad K , mediante la ecuación 3.19. El valor de la constante de estabilidad se presenta como $\log K$, con el objetivo de que la comparación de los valores durante la presentación de los resultados sea más sencilla.

En la Figura 3.5 se representa la intensidad de emisión de fluorescencia frente a la concentración de oligonucleótido de una hipotética experiencia, a modo de ejemplo. La línea roja se corresponde con el ajuste de los datos experimentales de emisión de fluorescencia y concentración de oligonucleótido, empleando la ecuación 3.18.

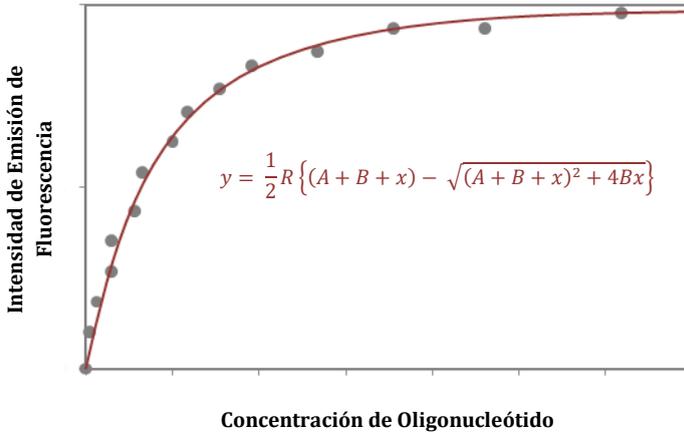


Figura 3.5. Representación de la intensidad de emisión de fluorescencia frente a la concentración de oligonucleótido, de una hipotética experiencia (círculos grises). Ajuste de los datos experimentales empleando el Método Intrínseco, haciendo uso de la ecuación 3.18 (línea roja).

3.18. Desnaturalización Térmica–FRET

Transferencia de energía de resonancia de Förster

El proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés) fue descrito por primera vez por el fisicoquímico francés Jean Baptiste Perrin en 1927,^[24] aunque posteriormente fue desarrollado y dotado de una base mecanocuántica por el fisicoquímico alemán Theodor Förster en 1948,^[25] quien da nombre al proceso. El FRET es un proceso de transferencia de energía entre dos cromóforos que se encuentran próximos, normalmente ubicados en la misma molécula, mediante interacciones dipolo-dipolo. Uno de los dos cromóforos, denominado dador, es excitado y transfiere parte de la energía al otro cromóforo, denominado aceptor, que termina por emitir la energía mediante un proceso radiativo, normalmente mediante emisión de fluorescencia, como se representa en la Figura 3.6.

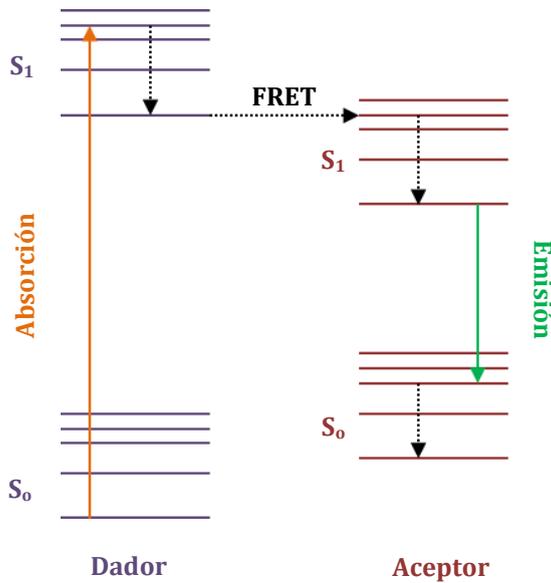


Figura 3.6. Diagrama de Jablonski correspondiente al proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster, FRET.

Habitualmente, cuando ambos cromóforos son fluorescentes se emplea el término "transferencia de energía de resonancia de fluorescencia", aunque la energía no se transfiere por fluorescencia, lo que puede dar lugar a una interpretación errónea del fenómeno. Asimismo, el proceso no está restringido a la emisión de fluorescencia. También puede suceder en relación a la fosforescencia. Consecuentemente, es preferible emplear el término "transferencia de energía de resonancia de Förster".

La eficacia del proceso de transferencia de energía depende principalmente de tres factores:^[26]

(1) La distancia entre cromóforos, la cual se encuentra normalmente comprendida en el intervalo 1–10 nm. La eficiencia del proceso de transferencia de energía es inversamente proporcional a la sexta potencia de la distancia entre dador y aceptor:

$$\text{Eficacia del proceso FRET}, E = 1/[1 + (r/R_0)^6]$$

(2) El solapamiento entre el espectro de absorción del aceptor y el espectro de emisión del dador. Cuanto mayor sea el solapamiento entre los espectros del dador y del aceptor, más eficaz será la transferencia de energía.

(3) La orientación relativa de los cromóforos. La interacción dipolo-dipolo será mayor cuanto más alineados se encuentren los momentos dipolares del dador y del aceptor. En consecuencia, la transferencia de energía será más eficaz.

Fundamento teórico

El ensayo de desnaturalización térmica-FRET^[27-29] está basado en el proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster. Es una metodología ampliamente utilizada en la química de los ácidos nucleicos, la cual permite determinar la afinidad de un determinado compuesto por una secuencia de oligonucleótido, que está marcada con dos fluoróforos: un dador y un aceptor. En este trabajo, se han empleado secuencias marcadas con fluoresceína como dador (FAM), y con una rodamina como aceptor (TAMRA).

El procedimiento consiste en aumentar gradualmente la temperatura, registrando el espectro de emisión de fluorescencia del dador. En el inicio de la experiencia, la estructura del oligonucleótido se encuentra ensamblada, como se representa en la Figura 3.7. Los dos fluoróforos se encuentran lo suficientemente próximos para que tenga lugar la transferencia de energía mediante un proceso FRET. Como consecuencia, la emisión de fluorescencia se produce a través del aceptor y no se registra emisión de fluorescencia por parte del dador. En cambio, el aumento de la temperatura da lugar a la desnaturalización de la estructura del oligonucleótido, resultando en el alejamiento de los dos fluoróforos, inhibiéndose el proceso de transferencia de energía. Como consecuencia, se restablece la emisión de fluorescencia del dador, como se representa en la Figura 3.7.

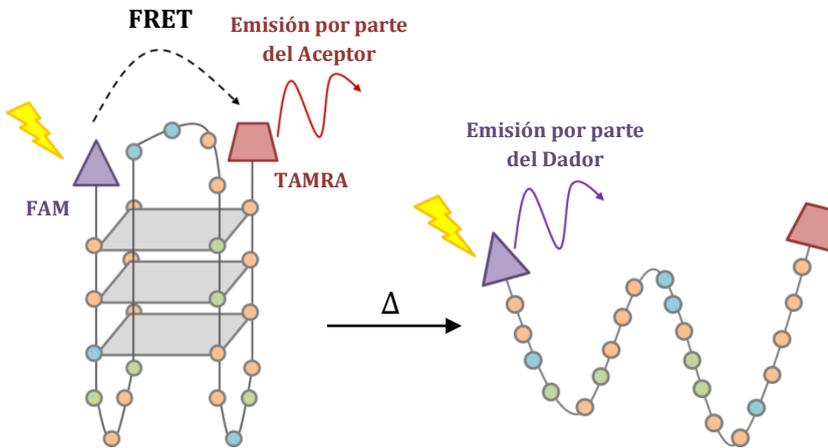


Figura 3.7. Fundamento del ensayo de desnaturalización térmica-FRET.

De cada experiencia, se obtiene lo que se conoce como curva de desnaturalización, la cual relaciona la intensidad de emisión de fluorescencia del dador con la temperatura, y que permite deducir la temperatura de desnaturalización. La temperatura de desnaturalización se denota como T_m , y se define como la temperatura a la cual la intensidad de emisión de fluorescencia normalizada es igual a 0.5.

El valor de la variación de la temperatura de desnaturalización se mide como ΔT_m , y es la diferencia entre la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido en presencia de un determinado compuesto y la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido libre. Valores positivos significan que se produce una estabilización de la estructura del oligonucleótido debido a la presencia de un determinado compuesto, mientras que valores negativos indican una desestabilización.

En la Figura 3.8 se representan esquemáticamente dos hipotéticas curvas de desnaturalización. La curva morada se corresponde con la curva de desnaturalización del oligonucleótido libre, la cual presenta la temperatura de desnaturalización $T_{m,1}$. La curva naranja se corresponde con la curva de desnaturalización del oligonucleótido en presencia de un determinado compuesto, la cual presenta la temperatura de desnaturalización $T_{m,2}$.

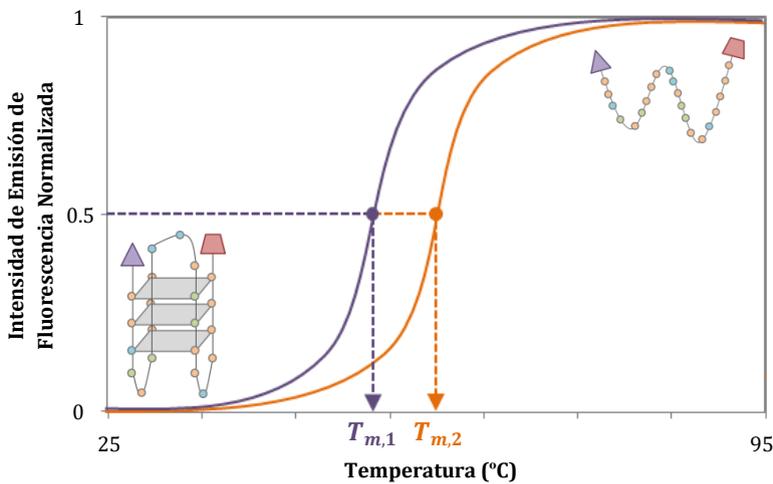


Figura 3.8. Representación esquemática de la curva de desnaturalización de un hipotético oligonucleótido (morado) y la del mismo oligonucleótido en presencia de un determinado compuesto (naranja).

Conocidas las temperaturas de desnaturalización $T_{m,1}$ y $T_{m,2}$, se puede calcular la variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m como consecuencia de la presencia de un determinado compuesto, según la ecuación 3.20:

$$\Delta T_m = T_{m,2} - T_{m,1} \quad (3.20)$$

Procedimiento experimental

Hibridación del oligonucleótido

En primer lugar, es necesario preparar la disolución de oligonucleótido y proceder a la hibridación de la estructura del mismo.

La disolución de oligonucleótido se prepara partiendo de una disolución intermedia de oligonucleótido de concentración 20 μM , la cual se obtiene a partir de una disolución madre de concentración 100 μM .

La disolución intermedia de oligonucleótido se diluye haciendo uso de una disolución tampón 10 mM KCl/10 mM LiCac/90 mM LiCl preparada para pH 7.4, empleando el volumen adecuado para la obtención de una disolución de oligonucleótido de concentración 0.4 μM , que será la disolución empleada en las medidas.

Finalmente, se procede a la hibridación de la estructura del oligonucleótido, calentando progresivamente la disolución de oligonucleótido hasta 95 °C, manteniendo constante la temperatura durante 5 minutos y dejando enfriar la disolución durante toda la noche.

Ensayo de desnaturalización térmica-FRET

Los ensayos de desnaturalización térmica-FRET se llevaron a cabo empleando un equipo de PCR modelo StepOnePlus, el cual se encuentra disponible en el servicio central de soporte a la investigación (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

El espectro de emisión de fluorescencia se registra cada 0.5 °C a la longitud de onda de 516 nm, en el intervalo de temperaturas 25–95 °C, empleando una rampa de temperatura de 0.5 °C/min, excitando a la longitud de onda de 492 nm.

La preparación de las muestras se realiza en una placa microtituladora que contiene 96 pocillos, empleando para cada muestra cuatro pocillos. En primer lugar, en cada uno de los cuatro pocillos se añade 20 µL de disolución de oligonucleótido 0.4 µM, que previamente se ha preparado e hibridado. En uno de los pocillos se añade 20 µL de disolución tampón 10 mM KCl/10 mM LiCac/90 mM LiCl, lo que constituirá el blanco de medida, del que se deducirá la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido libre. En los tres pocillos restantes se añade 20 µL de disolución de poliamina de concentraciones 0.8, 2.0 y 4.0 µM, de los que se deducirá la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido en presencia de 2, 5 y 10 equivalentes de poliamina. Esta operación se realiza por triplicado para cada muestra.

Análisis de los datos

Los datos experimentales de intensidad de emisión de fluorescencia y temperatura se recogen haciendo uso del programa informático StepOne v 2.3. El tratamiento de los datos experimentales se realiza empleando el programa informático Origin 8, obteniendo el valor de la temperatura de desnaturalización (T_m) para cada caso.

El valor de la variación de la temperatura de desnaturalización (ΔT_m) se calcula como la diferencia entre la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido en presencia de un determinado compuesto y la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido libre, mediante la ecuación 3.20.

3.19. Ensayo de Proliferación Celular por MTT

Fundamento teórico

El ensayo de proliferación celular por MTT es un ensayo colorimétrico que permite determinar la actividad metabólica celular, que fue descrito por primera vez por el investigador británico Tim Mosmann en 1983.^[30]

La metodología se basa en la reducción de una sal de tetrazolio de color amarillo, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliobromuro), por parte de las células metabólicamente activas, dando lugar a la formación de cristales violetas de formazán, en una reacción de reducción que implica la participación de los cofactores NADH y NADPH, la cual se representa en la Figura 3.9.^[31]

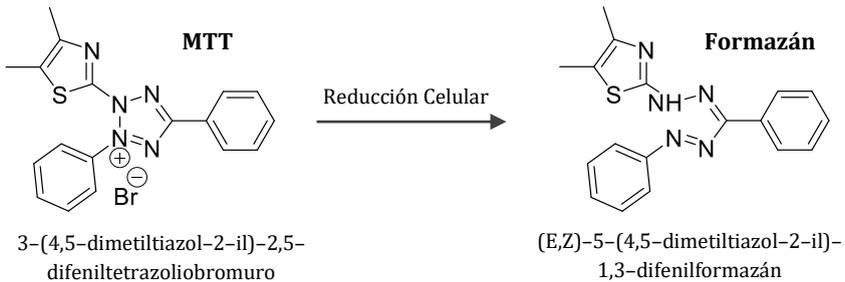


Figura 3.9. Reacción de reducción de la sal de tetrazolio MTT, que resulta en la formación de cristales violetas de formazán.

La formación de cristales violetas de formazán está directamente relacionada con el número de células vivas. La cantidad de formazán que se ha generado durante la reacción se puede calcular mediante espectroscopia de absorción UV-visible. Conocida la cantidad de formazán, se puede estimar la viabilidad celular o porcentaje de supervivencia de las células, según la ecuación 3.21:

$$Viabilidad\ Celular = \frac{A}{A_0} \cdot 100 \quad (3.21)$$

Donde A es la absorbancia de las células tratadas con la poliamina, y donde A_0 es la absorbancia de las células sin tratar, valor que se toma como máximo de viabilidad celular, el cual se corresponde con un 100% de viabilidad celular.

La citotoxicidad de cada poliamina se calcula como el IC_{50} , parámetro que hace referencia a la concentración de poliamina necesaria para dar lugar a una reducción del 50% en la viabilidad celular.

Procedimiento experimental

Ensayo de proliferación celular por MTT

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron empleando la línea celular de glioblastoma multiforme LN 229,^[32,33] derivada de tumores sólidos, la cual fue cedida por el Dr. Joan Seoane, del Institut de Recerca Vall d'Hebron de Barcelona.

La preparación de las muestras se realiza en una placa microtituladora que contiene 96 pocillos. En primer lugar, en cada uno de los pocillos se añade 150 μL de una suspensión de concentración 480000 células/mL, dando lugar a una concentración final de 4000 células/placa, las cuales se incuban durante 24 horas permitiendo que las células se adhieran a la placa microtituladora.

Transcurridas las 24 horas, se elimina el medio de cultivo y se añade 100 μL de disoluciones de poliamina de distintas concentraciones: 1, 2.5, 5, 10, 50 y 100 μM . Las células se incuban durante 48 horas.

Transcurridas las 48 horas, se elimina el líquido sobrenadante y se añade 100 μL de una disolución de MTT 1.2 mM, preparada mediante la dilución de una disolución madre de MTT 12 M, empleando el medio de cultivo para realizar la dilución. Las células se incuban durante 4 horas.

Los cristales de formazán se disuelven empleando 100 μL de DMSO y las células se incuban durante 20 minutos. Finalmente, se registra el espectro de absorción UV-visible a la longitud de onda de 570 nm, empleando un espectrofotómetro ESPECTRA-MAX-PLUS.

Análisis de los datos

De cada experiencia se obtiene la absorbancia a la longitud de onda de 570 nm en función de la cantidad de poliamina añadida sobre las células. La viabilidad celular o porcentaje de supervivencia de las células se calcula empleando la ecuación 3.21.

El valor del IC_{50} se calcula haciendo uso del software Origin 8, parámetro que coincide con la concentración de poliamina necesaria para dar lugar a una reducción del 50% en la viabilidad celular, o lo que es lo mismo, para que la viabilidad celular sea del 50%, como se representa en la Figura 3.10.

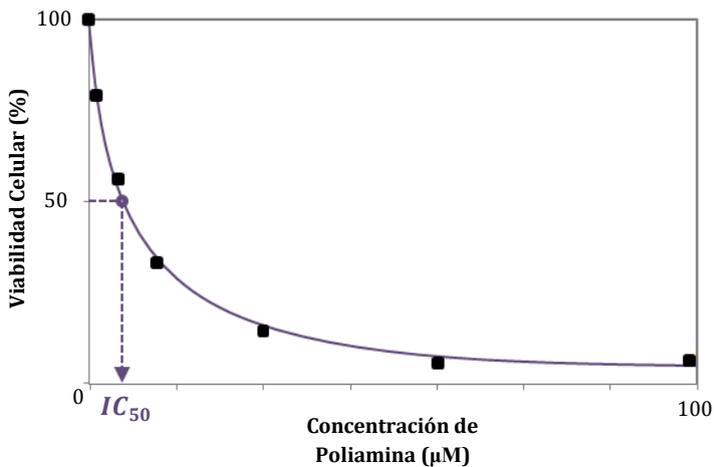


Figura 3.10. Representación esquemática para el cálculo del valor del IC_{50} en una hipotética experiencia.

3.20. Bibliografía

- [1] J. W. Erdman, I. A. Macdonald, S. H. Zeisel. *Present Knowledge in Nutrition*. Wiley, **2012**.
- [2] A. C. Ross, B. Caballero, R. J. Cousins, K. L. Tucker, T. R. Ziegler. *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lippincott Williams & Wilkins, **2014**.
- [3] G. Gran. *Acta Chem. Scand.* **1950**, 4, 559–577.
- [4] G. Gran. *Analyst* **1952**, 77, 661–671.
- [5] F. J. C. Rossotti, H. Rossotti. *J. Chem. Educ.* **1965**, 42, 375–378.
- [6] P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca. *Talanta* **1996**, 43, 1739–1753.
- [7] K. Levenberg. *Q. Appl. Math.* **1944**, 2, 164–168.
- [8] D. W. Marquardt. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **1963**, 11, 431–441.
- [9] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311–318.
- [10] L. J. Farrugia. *J. Appl. Crystallogr.* **1999**, 32, 837–838.
- [11] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, H. Puschmann. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, 42, 339–341.
- [12] C. F. Macrae, I. J. Bruno, J. A. Chisholm, P. R. Edgington, P. McCabe, E. Pidcock, L. Rodriguez-Monge, R. Taylor, J. van de Streek, P. A. Wood. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, 41, 466–470.
- [13] B. Escuder, J. F. Miravet. *Functional Molecular Gels*. The Royal Society of Chemistry, **2013**.
- [14] M. Martini, M. T. Albelda, M. Inclán, F. M. Valle-Algarra, E. García-España, A. Domènech. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, 720–721, 24–33.
- [15] J. M. McCord, I. Fridovich. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6049–6055.
- [16] C. Beauchamp, I. Fridovich. *Anal. Biochem.* **1971**, 44, 276–287.
- [17] L. W. Oberley, D. R. Spitz, in *Methods in Enzymology*. Elsevier, **1984**.
- [18] S. Blasco. *Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como Miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes*. Universidad de Valencia, **2011**.
- [19] G. Scatchard. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1949**, 51, 660–672.
- [20] J. D. McGhee, P. H. von Hippel. *J. Mol. Biol.* **1974**, 86, 469–489.

- [21] A. Rodger, B. Nordén. *Circular Dichroism and Linear Dichroism*. Oxford University Press, **1998**.
- [22] F. H. Stootman, D. M. Fisher, A. Rodger, J. R. Aldrich-Wright. *Analyst* **2006**, 131, 1145–1151.
- [23] P. Thordarson. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 1305–1323.
- [24] J. B. Perrin. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* **1927**, 184, 1097–1100.
- [25] T. Förster. *Ann. Phys.* **1948**, 437, 55–75.
- [26] F. Schaufele, I. Demarco, R. N. Day, in *Molecular Imaging*. Elsevier, **2005**.
- [27] J.-L. Mergny, J.-C. Maurizot. *ChemBioChem* **2001**, 2, 124–132.
- [28] A. Decian, L. Guittat, M. Kaiser, B. Sacca, S. Amrane, A. Bourdoncle, P. Alberti, M.-P. Teulade-Fichou, L. Lacroix, J. Mergny. *Methods* **2007**, 42, 183–195.
- [29] A. De Rache, J.-L. Mergny. *Biochimie* **2015**, 115, 194–202.
- [30] T. Mosmann. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.
- [31] M. V. Berridge, A. S. Tan. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 303, 474–482.
- [32] A. C. Diserens, N. de Tribolet, A. Martin-Achard, A. C. Gaide, J. F. Schnegg, S. Carrel. *Acta Neuropathol.* **1981**, 53, 21–28.
- [33] N. Ishii, D. Maier, A. Merlo, M. Tada, Y. Sawamura, A.-C. Diserens, E. G. Van Meir. *Brain Pathol.* **1999**, 9, 469–479.

4

Nomenclatura

4.1. Nomenclatura IUPAC

Los químicos franceses Antoine-Laurent de Lavoisier, Claude-Louis Berthollet, Antoine-François de Fourcroy y Luois-Bernard Guyton de Morveau intentaron sistematizar el nombre de todos los compuestos conocidos hasta la fecha durante el último cuarto del siglo XVIII, elaborando una propuesta de nomenclatura, la cual nombraba de manera sistemática los compuestos a partir de los elementos de los que estaban formados.^[1]

En una de las sesiones de la Academia de Ciencias de Francia, Antoine-Laurent de Lavoisier presentó los principios generales sobre los que se había construido la nueva nomenclatura, enunciando las siguientes palabras:^[1]

“Es el momento de que la química se libre de todo el lastre que pueda causar impedimento en su avance, de introducir en ella un verdadero espíritu de análisis, y esta reforma debe empezar por perfeccionar el lenguaje.”

Las memorias de Antoine-Laurent de Lavoisier, Claude-Louis Berthollet, Antoine-François de Fourcroy y Luois-Bernard Guyton de Morveau fueron presentadas en la Academia de Ciencias de Francia, acompañadas de una adenda del diplomático y científico francés Pierre-Auguste Adet con los nuevos caracteres y símbolos. Posteriormente, estas se editaron en un volumen titulado *Méthode de Nomenclature Chimique*, publicado en París en 1787, el cual se trata del primer texto de la historia donde se normaliza la nomenclatura química.^[2]

La nomenclatura química se puede definir como el conjunto de reglas que permite la identificación inequívoca de cualquier compuesto químico. En la actualidad, la IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) es el organismo encargado de establecer las correspondientes normas.^[3]

En el presente trabajo se presenta una serie de azamacrociclos de condensación [1+1], constituidos todos ellos por una unidad de 1*H*-pirazol como espaciador aromático, y por una cadena poliamínica de distinta naturaleza. Este tipo de compuestos recibe el nombre de *fanos*. Cuando son cíclicos, como así sucede con los compuestos que se presentan en esta memoria, se denominan *ciclofanos*.^[4]

En cuanto a la nomenclatura de los ciclofanos, la IUPAC establece que hay que realizar una operación denominada simplificación, la cual se describe a continuación. En primer lugar, cada anillo aromático se considera como un único átomo llamado *superátomo*. El macrociclo conteniendo el superátomo se reduce a un esqueleto alifático, el cual se nombra remplazando el correspondiente sufijo *-no* por *-fano*. Las posiciones de los superátomos se indican considerando su situación en el esqueleto, teniendo la prioridad de ostentar los números más bajos, siendo nombrados como prefijos y haciendo uso de su nombre correspondiente de espaciador pero terminado en *-a*. Finalmente, en caso de la existencia de sustituyentes en el esqueleto, estos se nombran al principio, indicando su posición en la estructura. La inversa de esta operación recibe el nombre de amplificación.^[5,6]

En la Figura 4.1 se ilustra un ejemplo de las operaciones de simplificación y amplificación. Aplicando la normativa de la IUPAC al ciclofano que se presenta se obtiene un esqueleto de diez átomos, conteniendo un grupo *3,5-pirazola* en la posición 1, un grupo *2-aminoetilo* en la posición 6, y tres grupos *azo* en las posiciones 3, 6, 9. El nombre sistemático sería el siguiente: *6-(2-aminoetil)-3,6,9-triaza-1-(3,5)-pirazolociclodecafano*.

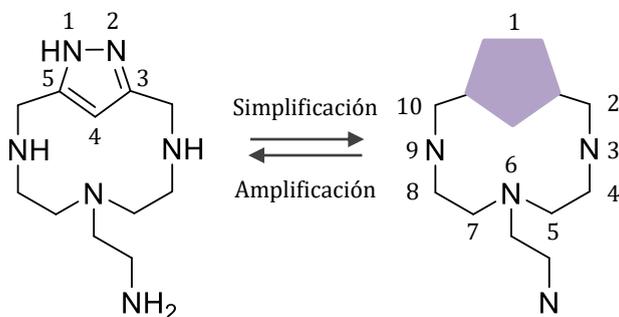


Figura 4.1. Operación de simplificación y de amplificación aplicada a uno de los ciclofanos que se presentan en este trabajo.

4.2. Nomenclatura Simplificada

La estructura de los ligandos que se presentan en este trabajo es relativamente compleja, lo que da lugar a una nomenclatura IUPAC excesivamente complicada. Por ello, es recomendable emplear una nomenclatura más sencilla, la cual está basada en una nomenclatura alfanumérica, que deriva de la que se emplea para nombrar los éteres corona y criptandos, la cual se construye según la Figura 4.2.



Figura 4.2. Esquema para la construcción de la nomenclatura simplificada.

Espaciador aromático

Todos los compuestos que se presentan en este trabajo están constituidos por la unidad de 1*H*-pirazol como espaciador aromático, la cual se abrevia con el prefijo *PZ*-, como se representa en la Figura 4.3.

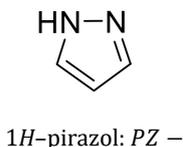


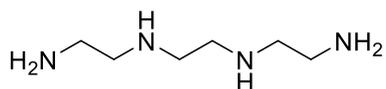
Figura 4.3. Estructura de la unidad de 1*H*-pirazol, y la correspondiente nomenclatura simplificada.

Cadena poliamínica

Los compuestos que se presentan en este trabajo están formados por cadenas poliamínicas de distinta naturaleza, las cuales pueden ser poliaminas lineales o la poliamina tripodal tris(2-aminoetil)amina.

Poliaminas lineales

Las poliaminas lineales se nombran mediante un secuencia numérica que hace referencia al número de átomos de carbono existentes entre dos grupos amino contiguos, como se presenta en la Figura 4.4.

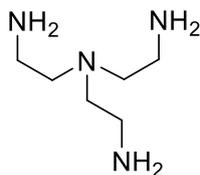


Trietilentetramina: -222

Figura 4.4. Estructura de la cadena poliamínica trietilentetramina, y la correspondiente nomenclatura simplificada.

Tris(2-aminoetil)amina

La poliamina tripodal tris(2-aminoetil)amina se conoce comúnmente como *tren*, la cual se representa en la Figura 4.5.



Tris(2-aminoetil)amina: -*Tren*

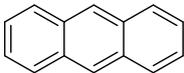
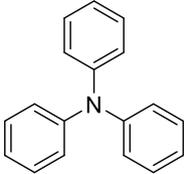
Figura 4.5. Estructura de la poliamina tripodal tris(2-aminoetil)amina, y la correspondiente nomenclatura simplificada.

Grupo funcional

Los macrociclos que están constituidos por la poliamina tripodal tris(2-aminoetil)amina pueden incorporar un grupo funcional en su estructura, lo cual se explica con más detalle en la sección *Synthesis and Characterization*.

En estos casos, cada grupo funcional se ha abreviado de distinta manera, estando la abreviatura relacionada con el nombre del mismo. En la Tabla 4.1 se recogen los dos grupos funcionales que se han empleado, y la abreviatura asociada a cada uno de ellos.

Tabla 4.1. Estructura de los grupos funcionales, y la correspondiente nomenclatura simplificada.

Estructura	Nombre	Abreviatura
	Antraceno	-A
	Trifenilamina	-TPA

No obstante, con el objetivo de hacer la lectura de la presente memoria más sencilla, se ha decidido nombrar los macrociclos como L_i , siendo i un número distinto para cada ciclofano, los cuales se resumen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Nomenclatura simplificada para cada ciclofano, y la correspondiente numeración empleada en esta memoria.

Ligando	Nomenclatura simplificada
L1	PZ222
L2	PZ232
L3	PZ343
L4	PZ32323
L5	PZ33333
L6	PZTren
L7	PZTrenA
L8	PZTrenTPA

4.3. Bibliografía

- [1] A. Muñoz-Páez. *Lavoisier. La Química Moderna. La Revolución Está en el Aire*. RBA, **2013**.
- [2] A.-L. de Lavoisier, C.-L. Berthollet, A.-F. de Fourcroy, L.-B. Guyton-Morveau, P.-A. Adet, J. H. Hassenfrantz. *Méthode de Nomenclature Chimique*. Cuchet, **1787**.
- [3] R. Panico, W. H. Powell, J.-C. Richer. *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*. Blackwell Scientific Publications, **1993**.
- [4] P. Keehn. *Cyclophanes*. Elsevier, **2012**.
- [5] W. H. Powell. *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 1513–1545.
- [6] H. A. Favre, D. Hellwinkel, W. H. Powell, H. A. Smith. *Pure Appli. Chem.* **2002**, 75, 809–834.

5

Synthesis and Characterization

Note: This chapter has been written in English in order to obtain the International Mention.

5.1. Introduction

The synthesis was based on the Richman–Atkins procedure,^[1] which is one of the most employed synthetic pathways to prepare macrocyclic polyamines. The original method was described by Jack Richman and Thomas Atkins in 1974 (Figure 5.1). The reaction involves a nucleophilic substitution between one deprotonated tosylamine previously prepared and a complementary reagent having good leaving groups. The tosyl groups can be removed by using a strong acid media at the end of the process.

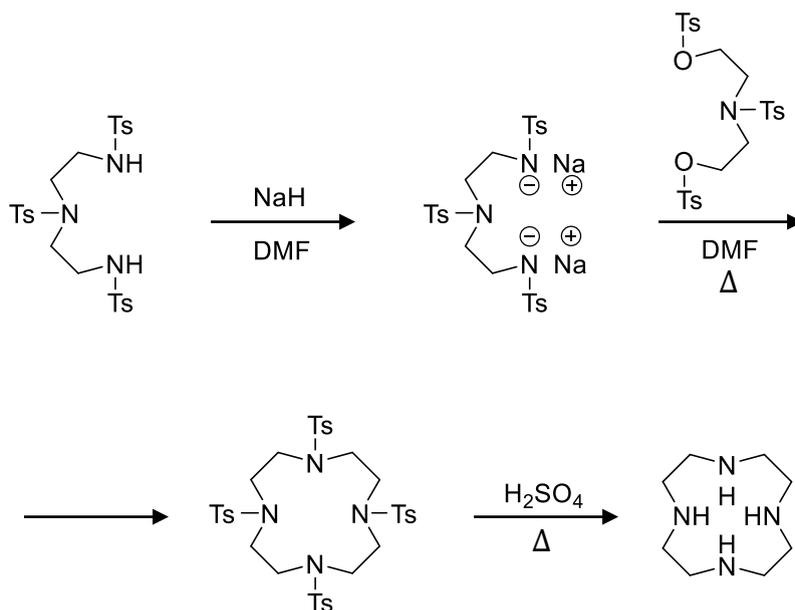


Figure 5.1. Richmann–Atkins original procedure.

The compounds prepared in this work have been obtained employing a general synthetic route which comprises four reaction steps: (1) modification of the pyrazole moiety, (2) protection of the polyamine with the tosyl group, (3) cyclisation and (4) removal of the tosyl and tetrahydropyrane-2-yl groups.

3,5-Pyrazoledicarboxylic acid monohydrate was used as starting material. 3,5-Bis-(chloromethyl)-1*H*-pyrazole was then obtained after esterification with ethanol in acid media, reduction with diisobutylaluminium hydride (DIBAL-H) and reaction with thionyl chloride. However, with the aim to avoid side reactions during the cyclisation it was necessary to protect the nucleophilic NH group of the pyrazole moiety with tetrahydropyrane. The polyamine protection was achieved with tosyl chloride in tetrahydrofuran/water mixed medium, using sodium hydrogen carbonate as a base. The cyclisation between 3,5-bis-(chloromethyl)-1-(tetrahydropyrane-2-yl)-pyrazole and the tosylamine in anhydrous acetonitrile under nitrogen atmosphere gave the protected macrocycle. Tosyl and tetrahydropyrane-2-yl removal was performed in acid media, using the hydrobromic acid/acetic acid mixture and phenol.

Nevertheless, it was necessary to perform additional steps in two specific cases: hexaaza polyaminic chains and compounds having anthracene or triphenylamine moieties. Hexaaza polyamines were not available in the market and a lengthening process consisting in the addition of the 3-aminopropyl groups prior to the protection with chloride tosyl was performed to prepare them. The synthesis of the compounds incorporating anthracene and triphenylamine moieties in their structure needed an extra reaction step via the Schiff base generation and in situ reduction with sodium borohydride in anhydrous ethanol, next to the tosyl and tetrahydropyrane-2-yl removal.

Here we present the synthesis and characterization of two new families of pyrazole-based azamacrocycles:

The first family is shown in Figure 5.2 and is constituted by five ligands containing in their structure the 1*H*-pyrazole ring as spacer and different polyamines, having four or six amino groups and distinct number of carbon atoms between the amino groups.

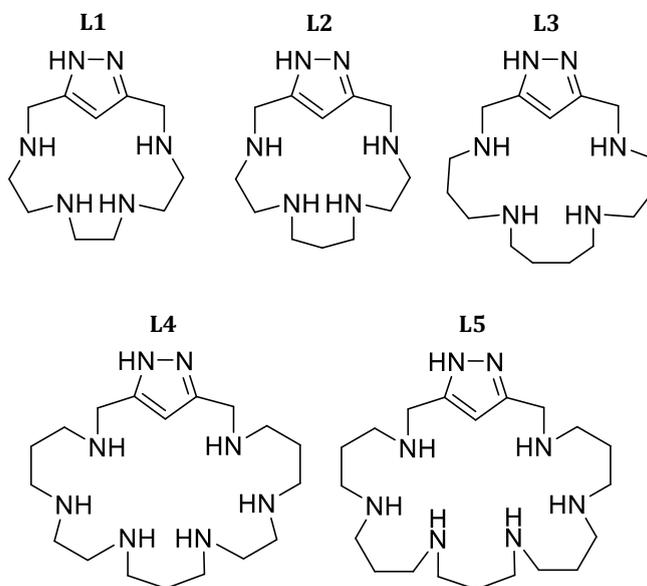


Figure 5.2. Family of ligands based on the 1*H*-pyrazole ring as spacer and different polyamines.

The second family is shown in Figure 5.3 and is constituted by three scoriand-like ligands, containing the 1*H*-pyrazole ring as spacer connected through methylene groups to the tripodal polyamine tris(2-aminoethyl)amine, either alone or further functionalised with aryl groups.

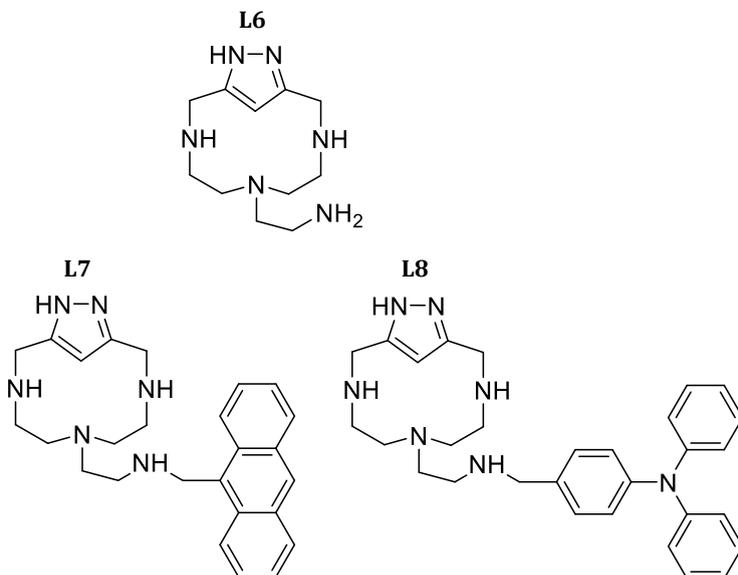


Figure 5.3. Family of ligands based on the 1*H*-pyrazole ring as spacer and the tripodal polyamine tris(2-aminoethyl)amine, either alone or further functionalised with aryl groups.

Scoriand-like ligands consist in a fixed macrocyclic core with an arm having donor groups and were first prepared by Tobias Lotz and Thomas Kaden in the 1970s.^[2] Later Professor Luigi Fabbrizzi and collaborators introduced the term *scoriand* to refer to these compounds due to the similarity with the scorpion body.^[3]

5.2. Modification of the Pyrazole Moiety

The modification of the 1*H*-pyrazole ring was performed in a four-stage process, which is shown in Figure 5.4 and described in reference [4]: (1) synthesis of ethyl 1*H*-pyrazole-3,5-dicarboxylate, (2) synthesis of 3,5-bis-(hydroxymethyl)-1*H*-pyrazole, (3) synthesis of 3,5-bis-(chloromethyl)-1*H*-pyrazole and (4) synthesis of 3,5-bis-(chloromethyl)-1-(tetrahydropyrane-2-yl)-pyrazole.

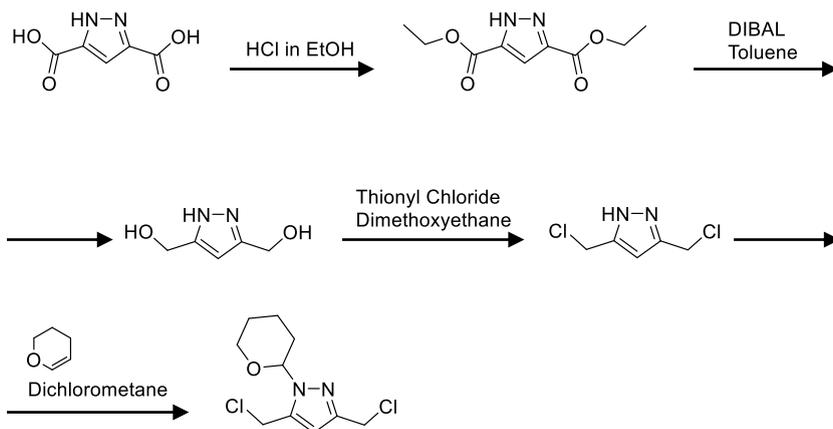
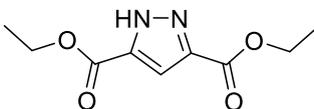


Figure 5.4. Modification of the pyrazole moiety.

5.2.1. Synthesis of ethyl 1*H*-pyrazole-3,5-dicarboxylate



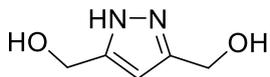
3,5-Pyrazoledicarboxylic acid monohydrate (15.00 g, 86.2 mmol) was dissolved in 350 mL of an 1.25 M hydrogen chloride solution in ethanol and stirred for five days at room temperature. Then the mixture was evaporated to dryness and a saturated solution of NaHCO₃ was added. The product was extracted with dichloromethane and the organic phase was separated and dried over Na₂SO₄. The solvent was removed obtaining the product as a white solid.

Yield: 83%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.33 (s, 1H), 4.41 (q, *J*=7 Hz, 4H), 1.41 (t, *J*=7 Hz, 6H).

¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 160.5, 111.4, 61.8, 14.4.

5.2.2. Synthesis of 3,5-bis-(hydroxymethyl)-1H-pyrazole

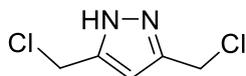


A solution of diethyl-1*H*-pyrazole-3,5-dicarboxylate (8.00 g, 37.7 mmol) in 60 mL of anhydrous toluene was added dropwise to a 1.2 M toluene solution of diisobutylaluminium cooled at -78 °C under a nitrogen atmosphere. Once the addition ended, the mixture was stirred overnight at room temperature. Then the mixture was cooled at 0 °C and 100 mL of methanol was added appearing a grey solid. The solid was extracted in methanol by using a soxhlet during seven days. The resulting oil was crystallized in ethyl acetate giving the product as a white solid.

Yield: 73%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.37 (s, 1H), 4.65 (s, 4H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 149.4, 104.4, 57.1.

5.2.3. Synthesis of 3,5-bis-(chloromethyl)-1H-pyrazole

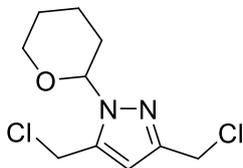
3,5-Bis(hydroxymethyl)-1H-pyrazole (1.00 g, 7.8 mmol) was suspended in 40 mL of ethyleneglycol dimethyl ether and then 13 mL of thionyl chloride (178.2 mmol) was added. The mixture was stirred during 48 hours at room temperature obtaining the product as the hydrochloride salt.^[5]

Yield: 50%.

¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 6.57 (s, 1H), 4.71 (s, 4H).

¹³C NMR (75.43 MHz, D₂O): δ 146.0, 105.6, 36.2.

5.2.4. Synthesis of 3,5-bis-(chloromethyl)-1-(tetrahydropyran-2-yl)-pyrazole



The hydrochloride salt of 3,5-bis-(chloromethyl)-1*H*-pyrazole (1.00 g, 5.0 mmol) was suspended in 50 mL of dichloromethane and then 1 mL of 3,4-dihydro-2*H*-pyran was added. The mixture was kept under stirring overnight and the organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness. The resulting oil was crystallized in petroleum ether, obtaining the product as a white solid.^[6]

Yield: 56%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 6.40 (s, 1H), 5.45 (dd, *J*=9 Hz, *J*=3 Hz, 1H), 4.72–4.53 (m, 4H), 4.07–3.99 (m, 1H), 3.74–3.64 (m, 1H), 2.47–2.33 (m, 1H), 2.16–1.97 (m, 2H), 1.78–1.50 (m, 3H).

¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 148.5, 139.9, 107.6, 85.4, 67.9, 39.0, 34.7, 29.6, 25.0, 22.5.

5.3. Polyamine Protection with the Tosyl Group

Tosyl chloride is widely used to protect alcohols and amines in organic synthesis.^[7,8] The reaction consists in a nucleophilic substitution where the amino group from the polyamine act as the nucleophile, resulting in the formation of a sulphonamide bond (Figure 5.5). The tosyl group has double function: (1) protecting secondary amines from further reactions and (2) increasing the acidity of the primary amines, leading to more reactive species that can be deprotonated more easily. Hence, during the reaction it is necessary to keep the amino group deprotonated by using a base.

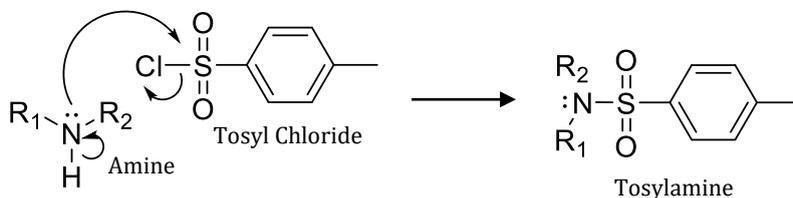
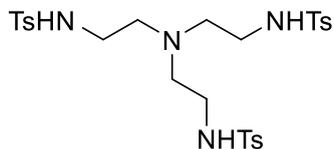


Figure 5.5. Polyamine protection with the tosyl group.

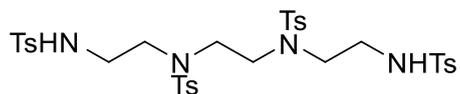
The polyamine (50.0 mmol) dissolved in 300 mL of THF and K_2CO_3 (3 equivalents per amino group) dissolved in 100 mL of H_2O were placed in a round-bottom flask. Then, a solution of p-tolylsulfonyl (1.2 equivalents per amino group) in 100 mL of THF was dropwise added to the mixture. The solution was kept under stirring overnight and then the organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness. The residue was suspended in ethanol and refluxed for two hours. The product was filtered and washed with ethanol.

Tris[2-(N-p-tolylsulfonylaminoethyl)]amine

Yield: 71%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.79 (d, $J=9$ Hz, 6H), 7.29 (d, $J=9$ Hz, 6H), 5.84 (t, $J=6$ Hz, 3H), 2.96–2.86 (m, 6H), 2.52–2.44 (m, 6H), 2.40 (s, 9H).

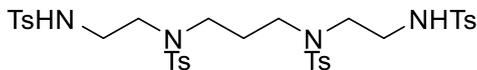
^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 143.5, 137.0, 129.9, 127.3, 54.3, 41.1, 21.7.

1,4,7,10-Tetra-(p-tolylsulfonyl)-1,4,7,10-tetraazadecane

Yield: 71%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.68–7.55 (m, 8H), 7.33–7.21 (m, 8H), 3.08–3.02 (m, 4H), 2.89–2.82 (m, 4H), 2.52–2.49 (m, 4H), 2.38 (s, 6H), 2.35 (s, 6H).

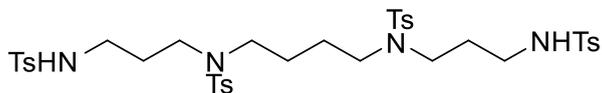
^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 144.0, 137.6, 130.0, 127.1, 52.8, 50.6, 39.0, 21.7.

1,4,8,11-Tetra-(p-tolylsulfonyl)-1,4,8,11-tetraazaundecane

Yield: 78%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.76 (d, $J=9$ Hz, 4H), 7.65 (d, $J=9$ Hz, 4H), 7.30 (t, $J=9$ Hz, 8H), 5.74 (t, $J=6$ Hz, 2H), 3.25–3.08 (m, 12H), 2.43 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.67–1.58 (m, 2H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 144.0, 143.5, 137.1, 134.9, 130.1, 129.9, 127.5, 127.2, 50.5, 48.6, 43.6, 21.7.

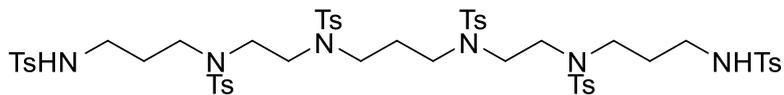
1,5,10,14-Tetra-(p-tolylsulfonyl)-1,5,10,14-tetraazatetradecane

Yield: 84%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.73 (d, $J=9$ Hz, 4H), 7.65 (d, $J=9$ Hz, 4H), 7.33–7.27 (m, 8H), 5.29 (t, $J=6$ Hz, 2H), 3.16–2.93 (m, 12H), 2.43 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.81–1.70 (m, 4H), 1.56–1.48 (m, 4H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 143.7, 143.5, 137.0, 135.9, 130.0, 129.9, 127.3, 127.2, 49.1, 46.3, 40.2, 29.5, 26.1, 21.7.

1,5,8,12,15,19-Hexakis-(p-tolylsulfonyl)- **1,5,8,12,15,19-**
hexaazanonadecane

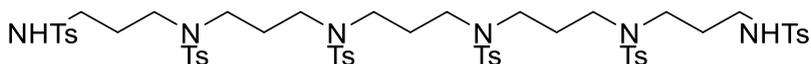


Yield: 82%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.74–7.64 (m, 12H), 7.35–7.25 (m, 12H), 5.27 (t, $J=6$ Hz, 2H), 3.34–3.10 (m, 16H), 2.45 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 2.38 (s, 6H), 1.99–1.74 (m, 10H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 144.0, 137.0, 135.3, 130.1, 129.9, 127.4, 49.4, 48.2, 47.5, 40.2, 29.0, 25.8, 21.7.

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



Yield: 77%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.71–7.61 (m, 12H), 7.31–7.23 (m, 12H), 5.44 (t, $J=6$ Hz, 2H), 3.32–3.10 (m, 16H), 2.95–2.93 (m, 4H), 2.41 (s, 9H), 2.38 (s, 9H), 1.91–1.78 (m, 10H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 143.8, 137.0, 135.6, 130.1, 129.9, 127.3, 47.7, 47.6, 47.5, 40.4, 29.6, 29.2, 21.7.

5.4. Lengthening of Lineal Polyamines

The lengthening process consists in the addition of the 3-aminopropyl groups to the ends of the desired tosylamine. The reaction is based on the Gabriel synthesis^[9] and presents two steps: (1) reaction with N-(3-bromopropyl)phthalimide and (2) removal of the phthalimide groups.

5.4.1. Reaction with N-(3-bromopropyl)phthalimide

First step involves a nucleophilic substitution on the carbon in α position to the bromide from the N-(3-bromopropyl)phthalimide (Figure 5.6).

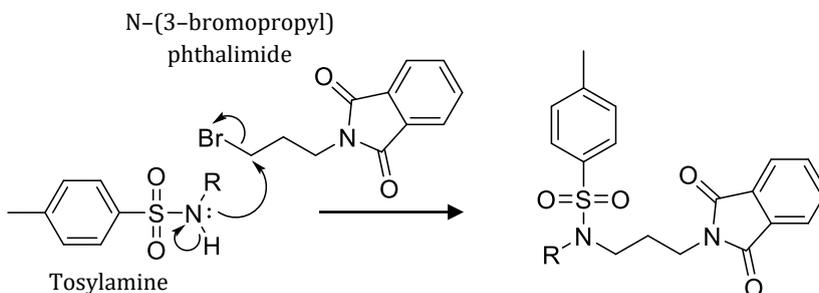
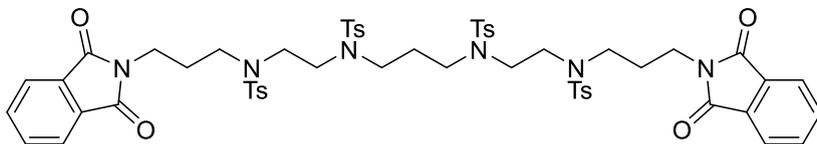


Figure 5.6. Reaction with N-(3-bromopropyl)phthalimide.

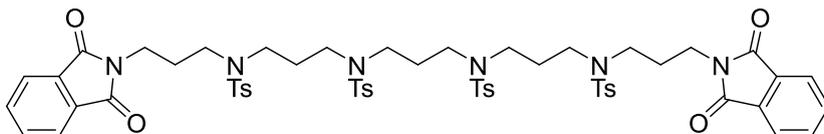
The tosylamine (10.0 mmol), K₂CO₃ (100.0 mmol) and N-(3-bromopropyl)phthalimide (25.0 mmol) were suspended in 300 mL of anhydrous acetonitrile and refluxed for 48 hours under nitrogen atmosphere. Then the mixture was filtrated and vacuum evaporated to dryness. The residue was refluxed in ethanol to give the product.

1,17-Phthalimido-4,7,11,14-tetrakis-(p-tolylsulfonyl)- 4,7,11,14-tetraazaheptadecane

Yield: 87%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.87–7.79 (m, 4H), 7.75–7.66 (m, 12H), 7.35–7.28 (m, 8H), 3.39–3.11 (m, 16H), 2.43 (s, 6H), 2.38 (s, 6H), 2.02–1.86 (m, 10H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 168.3, 143.7, 135.4, 134.1, 132.3, 130.1, 127.6, 123.4, 48.3, 35.7, 27.9, 21.7.

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

Yield: 86%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.80–7.78 (m, 4H), 7.69–7.76 (m, 4H), 7.64–7.58 (m, 8H), 7.29–7.22 (m, 8H), 3.64 (m, 4H), 3.13–3.09 (m, 16H), 2.39 (s, 6H), 2.37 (s, 6H), 1.86–1.81 (m, 10H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 168.5, 134.4, 132.4, 130.2, 127.6, 123.6, 47.1, 21.9.

5.4.2. Removal of the phthalimide groups

The second step consists in the removal of the phthalimide groups by using hydrazine following the Ing-Manske procedure.^[10] The reaction was performed in ethanol, obtaining the primary amine while phthalhydrazide precipitated as secondary product, which could be easily removed during the work-up (Figure 5.7).

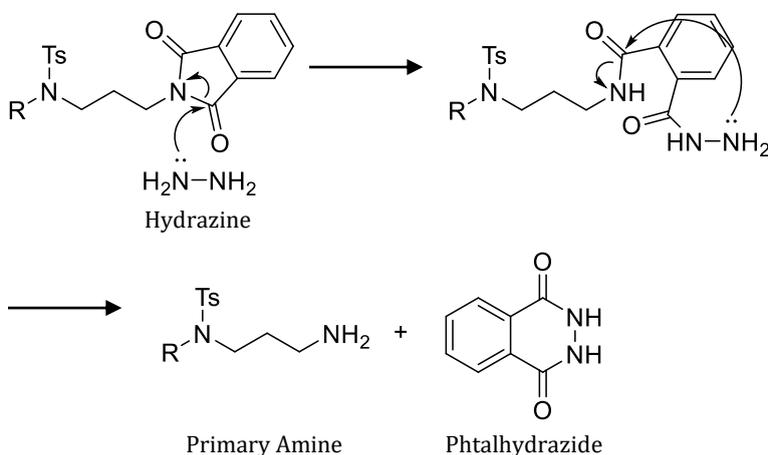
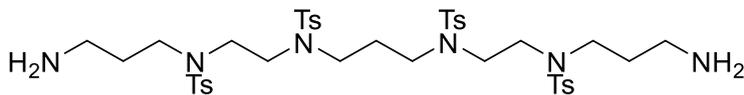
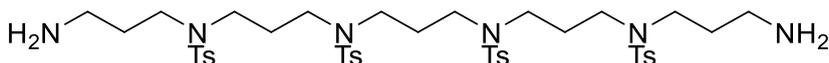


Figure 5.7. Removal of the phthalimide groups.

The protected polyamine (5.0 mmol) and hydrazine monohydrate (45.0 mmol) were refluxed in 300 mL of ethanol during 24 hours. The mixture was cooled and after adding 50 mL of H_2O the solution was vacuum evaporated to dryness. The residue was extracted with CH_2Cl_2 and the organic phase dried using Na_2SO_4 . The solution was filtered and vacuum evaporated to dryness obtaining the product as a solid. **Caution!** *hydrazine monohydrate is potentially explosive and should be handled with care.*

**4,7,11,14-Tetrakis-(p-tolylsulfonyl)-
hexaazanonadecane** **1,5,8,12,15,19-**

Yield: 63%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.72–7.67 (m, 8H), 7.34–7.28 (m, 8H), 3.36–3.11 (m, 16H), 2.43 (s, 6H), 2.40 (s, 6H), 1.75–1.56 (m, 10H).¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 144.2, 144.0, 135.9, 130.3, 127.7, 49.9, 48.5, 39.2, 32.5, 21.9.**4,8,12,16-Tetrakis-(p-tolylsulfonyl)-
hexaazaheneicosane** **1,5,9,13,17,21-**

Yield: 63%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.70–7.62 (m, 8H), 7.30–7.25 (m, 8H), 3.13–3.11 (m, 16H), 2.73 (m, 4H), 2.40 (s, 6H), 2.38 (s, 6H), 1.90–1.66 (m, 10H).¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 143.7, 143.6, 135.9, 130.2, 130.0, 127.3, 47.2, 47.0, 38.9, 31.8, 21.7.

5.5. Cyclisation

The cyclisation process consists in a nucleophilic substitution where the nitrogen from the amino group of the tosylamine acts as the nucleophile and the carbon in α position to the chloride of the 3,5-bis-(chloromethyl)-1-(tetrahydropyrane-2-yl)-pyrazole as the electrophile (Figure 5.8).^[1]

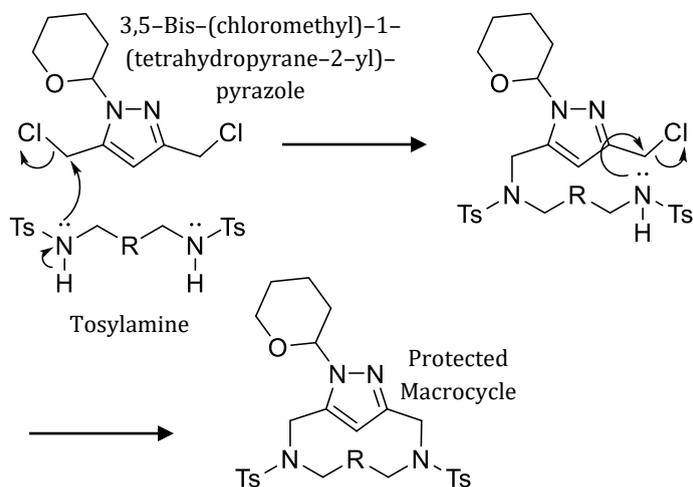
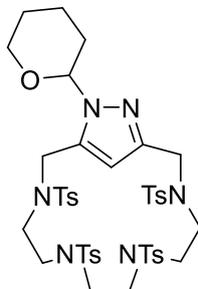


Figure 5.8. Cyclisation process.

The tosylamine (5.0 mmol) and K_2CO_3 (50.0 mmol) were suspended in 250 mL of anhydrous acetonitrile in a round-bottom flask. 3,5-Bis-(chloromethyl)-1-(tetrahydropyrane-2-yl)-pyrazole (5.0 mmol) was dissolved in 150 mL of anhydrous acetonitrile and dropwise added over one hour. The suspension was refluxed for 48 hours under a nitrogen atmosphere and then filtered off. The solution was vacuum evaporated to dryness. Purification was carried out by column chromatography (silica gel, chloroform/acetone 25/1) to give the product as a solid.

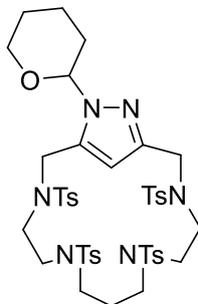
1¹-Tetrahydropyran-2-yl-3,6,9,12-tetraaza-3,6,9,12-p-toluensulfonyl-1-(3,5)-pyrazolacyclotridecaphane



Yield: 48%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.76–7.68 (m, 8H), 7.39–7.29 (m, 8H), 6.22 (s, 1H), 5.57 (dd, *J*=9Hz, *J*=3 Hz, 1H), 4.38–4.25 (m, 2H), 4.13–4.03 (m, 2H), 3.92–3.83 (m, 1H), 3.79–3.69 (m, 1H), 3.12–2.57 (m, 12H), 2.46 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.43 (s, 6H), 2.32–2.19 (m, 1H), 2.05–1.95 (m, 1H), 1.81–1.47 (m, 4H).

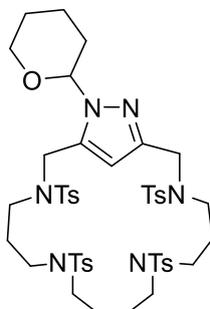
¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 149.3, 143.9, 143.3, 137.6, 129.3, 128.3, 105.3, 99.9, 68.1, 47.7, 45.9, 45.8, 45.5, 29.8, 25.1, 23.1, 21.3.

11-Tetrahydropyran-2-yl-3,6,10,13-tetraaza-3,6,10,13-p-toluensulfonyl-1-(3,5)-pyrazolacyclotetradecaphane

Yield: 56%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.81–7.69 (m, 8H), 7.40–7.29 (m, 8H), 6.21 (s, 1H), 5.54 (dd, $J=9$ Hz, $J=3$ Hz, 1H), 4.35–4.27 (m, 2H), 4.10–4.02 (m, 2H), 3.91–3.82 (m, 1H), 3.73–3.62 (m, 1H), 3.30–2.85 (m, 12H), 2.44 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.31–2.24 (m, 1H), 2.03–1.94 (m, 1H), 1.81–1.46 (m, 4H), 1.30–1.08 (m, 2H).

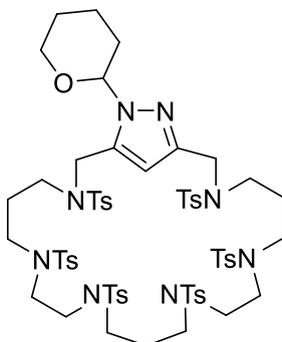
^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 149.1, 143.8, 143.1, 137.5, 129.2, 128.5, 100.2, 68.4, 47.7, 46.2, 45.7, 45.4, 45.0, 29.7, 25.0, 23.2, 21.6, 21.3.

1¹-Tetrahydropyran-2-yl-3,7,12,16-tetraaza-3,7,12,16-p-toluensulfonyl-1-(3,5)-pyrazolacycloheptadecaphane

Yield: 45%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.72–7.60 (m, 8H), 7.37–7.26 (m, 8H), 6.17 (s, 1H), 5.56 (dd, *J*=9 Hz, *J*=3 Hz, 1H), 4.50–4.45 (m, 1H), 4.34–4.29 (m, 1H), 4.12–4.04 (m, 2H), 3.95–3.86 (m, 1H), 3.79–3.69 (m, 1H), 3.22–2.74 (m, 12H), 2.44 (s, 3H), 2.40 (s, 9H), 2.04–1.88 (m, 2H), 1.77–1.35 (m, 12H).

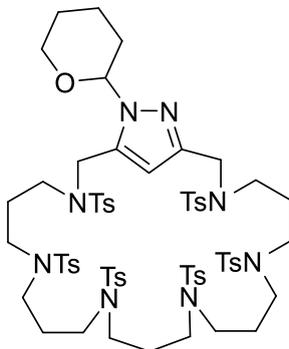
¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 149.0, 143.87, 143.3, 137.5, 129.4, 128.2, 105.6, 99.8, 68.1, 48.0, 47.6, 45.8, 45.2, 44.9, 29.8, 25.0, 23.3, 23.0, 22.2, 21.3.

11-Tetrahydropyran-2-yl-3,7,10,14,17,21-hexaaza- 3,7,10,14,17, 21-p-toluenesulfonyl-1-(3,5)-pyrazolacyclodocosaphane

Yield: 48%.

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.76–7.68 (m, 6H), 7.59–7.54 (m, 6H), 7.37–7.25 (m, 12H), 6.32 (s, 1H), 5.47 (dd, $J=9$ Hz, $J=3$ Hz, 1H), 4.60–4.56 (m, 1H), 4.28–4.10 (m, 3H), 3.96–3.87 (m, 1H), 3.74–3.63 (m, 1H), 3.40–2.84 (m, 20H), 2.45 (s, 3H), 2.44 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.41 (s, 3H), 2.39 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.02–1.80 (m, 6H), 1.73–1.44 (m, 6H).

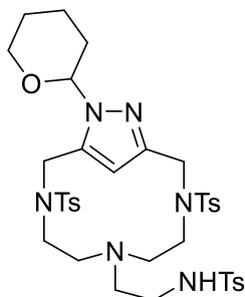
^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 149.7, 143.6, 144.2, 138.1, 129.9, 129.1, 105.6, 100.4, 68.3, 50.9, 50.6, 48.4, 45.0, 44.9, 30.0, 25.5, 23.5, 22.4, 23.1.

1¹-Tetrahydropyran-2-yl-3,7,11,15,19,23-hexaaza- 3,7,11,15,19,23-p-toluenesulfonyl-1-(3,5)-pyrazolacyclotetracosaphane

Yield: 31%.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.70–7.59 (m, 12H), 7.33–7.27 (m, 12H), 6.24 (s, 1H), 5.57 (dd, *J*=9 Hz, *J*=3 Hz, 1H), 4.58–4.53 (m, 1H), 4.29–4.15 (m, 3H), 3.98–3.90 (m, 1H), 3.81–3.68 (m, 1H), 3.18–2.88 (m, 20H), 2.43 (s, 3H), 2.41 (s, 6H), 2.40 (s, 9H), 2.04–1.81 (m, 10H), 1.77–1.57 (m, 6H).

¹³C NMR (75.43 MHz, CDCl₃): δ 149.7, 143.7, 144.1, 138.1, 139.8, 128.9, 105.5, 100.1, 68.1, 50.1, 49.1, 48.7, 47.9, 29.9, 27.4, 25.3, 23.3, 21.3.

11-Tetrahydropyran-2-yl-6(p-toluenesulfonylaminoethyl)- 3,6,9-triaza-3,9-p-toluenesulfonyl-1-(3,5)-pyrazolacyclodecaphane

Yield: 37%.

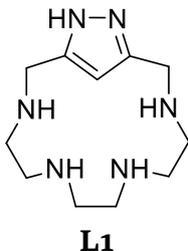
^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ 7.81–7.59 (m, 6H), 7.40–7.27 (m, 6H), 6.47 (s, 1H), 5.65–5.49 (m, 1H), 5.17–5.05 (m, 1H), 4.09–3.95 (m, 1H), 3.88–3.71 (m, 1H), 2.95–2.83 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.38 (s, 3H), 2.35–3.27 (m, 2H), 2.08–1.84 (m, 2H), 1.80–1.46 (m, 3H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, CDCl_3): δ 147.3, 144.1, 138.3, 137.0, 135.2, 133.7, 130.3, 127.6, 111.1, 84.3, 76.7, 68.2, 52.8, 50.3, 48.5, 45.6, 44.7, 42.3, 40.4, 31.0, 24.9, 22.7, 21.7.

5.6. Removal of Tosyl and Tetrahydropyran-2-yl Groups

The removal of both tosyl and tetrahydropyran-2-yl groups was performed in a strong acid media by using a solution of 33% hydrogen bromide in acetic acid and phenol in excess. The phenol has double function: (1) removes bromine from the reaction mixture avoiding side reactions with the liberated amine and (2) increases the solubility of the tosylamine. During the reaction it is necessary to place a gas trap containing sodium hydroxide in order to neutralize the excess of hydrobromic acid released.^[11,12]

The protected macrocycle (2.0 mmol) and phenol (12 equivalents per protective group) were suspended in HBr-AcOH 33% (12 mL per protective group). The mixture was stirred at 90 °C during 14 hours and then was cooled. The resulting residue was filtered off and washed with acetone to give the final ligands **L1-L5** as well as the scorpion-like ligand **L6** as its hydrobromide salts.

**3,6,9,12-Tetraaza-1-(3,5)-pyrazolacyclo-
tridecaphane**

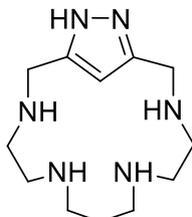
Yield: 65%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.98 (s, 1H), 4.53 (s, 4H), 3.42–3.37 (m, 4H), 3.15–3.11 (m, 8H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 139.7, 110.0, 43.3, 42.7, 42.5, 42.3.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 239.2. Found: 239.1.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_6 \cdot 5\text{HBr} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: C, 19.5; H, 4.6; N, 12.4. Found: C, 21.6, H, 4.2; N, 12.3.

3,6,10,13-Tetraaza-1-(3,5)-pyrazolacyclo-tetradecaphane**L2**

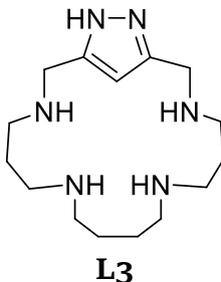
Yield: 47%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.97(s, 1H), 4.57 (s, 4H), 3.43 (s, 8H), 3.23–3.16 (m, 4H), 1.99–1.86 (m, 2H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 139.0, 110.0, 43.1, 42.4, 40.9, 40.6, 20.7.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 253.2. Found: 253.2.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_6 \cdot 5\text{HBr} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 21.4; H, 4.6; N, 12.5. Found: C, 21.3, H, 4.5; N, 12.2.

3,7,12,16-Tetraaza-1-(3,5)-pyrazolacycloheptadecaphane

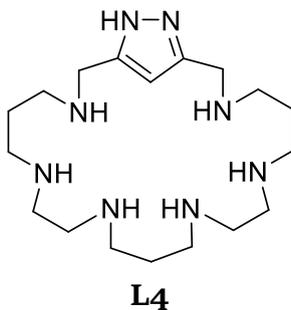
Yield: 63%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.84 (s, 1H), 4.45 (s, 4H), 3.24–3.12 (m, 12H), 2.20–2.10 (m, 4H), 1.84–1.77 (m, 4H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 139.2, 109.8, 45.8, 43.7, 43.4, 42.6, 22.5, 22.0.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 295.3. Found: 296.3.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_6 \cdot 4\text{HCl}$: C, 40.9; H, 7.8; N, 19.1. Found: C, 40.8, H, 10.7; N, 18.6.

3,7,10,14,17,21-Hexaaza-1-(3,5)-pyrazolacyclo-docosaphane

Yield: 59%.

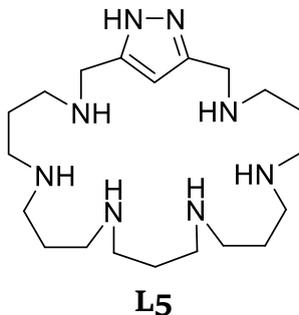
^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.79 (s, 1H), 4.42 (s, 4H), 3.57 (s, 8H), 3.40-3.29 (m, 8H), 3.26-3.18 (m, 4H), 2.29-2.13 (m, 6H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 138.8, 108.7, 44.4, 44.3, 43.4, 42.7, 42.3, 42.1, 22.6, 21.5.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 367.3. Found: 367.2.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{38}\text{N}_8 \cdot 6\text{HCl}$: C, 36.9; H, 7.6; N, 19.1. Found: C, 37.3, H, 8.9; N, 19.0.

3,7,11,15,19,23-Hexaaza-1-(3,5)-pyrazolacyclo-tetracosaphane



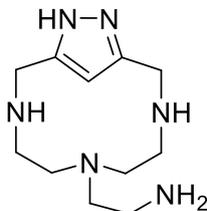
Yield: 53%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.78 (s, 1H), 4.42 (s, 4H), 3.35–3.20 (m, 20H), 2.23–2.09 (m, 10H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 138.9, 108.6, 44.2, 44.1, 44.0, 43.9, 43.6, 42.3, 22.5, 22.3, 21.7.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 395.4. Found: 395.2.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{20}\text{H}_{42}\text{N}_8 \cdot 6\text{HCl}$: C, 39.2; H, 7.9; N, 18.3. Found: C, 38.7, H, 8.4; N, 19.1.

6-(2-aminoethyl)-3,6,9-triaza-1-(3,5)-pyrazola-cyclodecaphane**L6**

Yield: 43%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 6.96 (s, 1H), 4.37 (s, 4H), 3.07-2.96 (m, 8H), 2.66-2.55 (m, 2H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 139.9, 110.1, 50.2, 42.8, 42.1, 35.6.

Melting point: 208.9–210.3 °C.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 239.2. Found: 239.1.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_6 \cdot 4\text{HBr} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$: C, 21.5; H, 5.2; N, 13.6. Found: C, 23.5, H, 4.7; N, 12.4.

5.7. Functionalization

The functionalization process allows incorporating to a given compound a variety of functional groups, leading to the formation of new compounds with new desired properties. For instance: to incorporate a fluorophore group to give the receptor photoluminescent properties, incorporate additional donor atoms or improve the solubility of the receptor in a given solvent.

The functionalization was carried out through the reaction of the polyamine in its free amine form with the desired carbaldehyde, leading to the formation of the Schiff base which was reduced in situ with NaBH_4 to give the final product in its amine form (Figure 5.9).^[13]

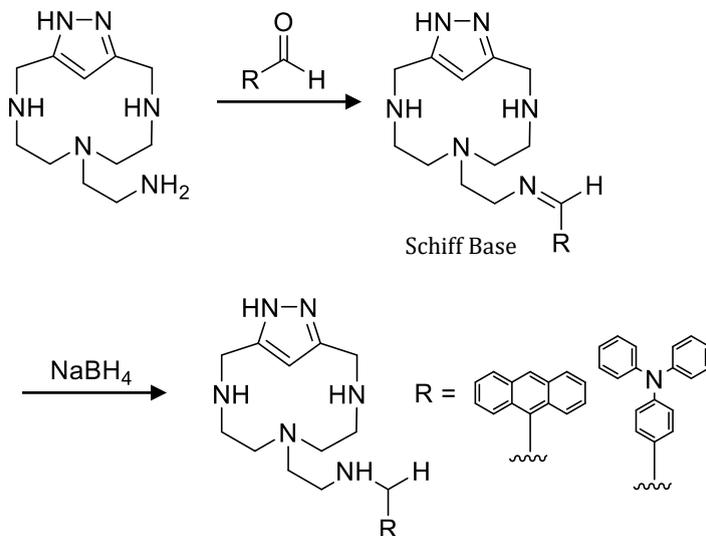
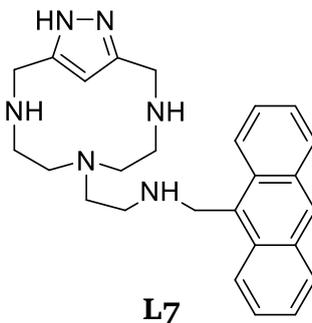


Figure 5.9. Functionalization process via Schiff base formation

First, the polyamine **L6** was obtained in its free amine form by using an ion-exchange resin (Amberlite IRA-402).

Then, **L6** in its free amine form (3.0 mmol) was dissolved in 150 mL of anhydrous ethanol and the carbaldehyde (3.0 mmol) dissolved in 150 mL of anhydrous ethanol was dropwise added to the mixture and kept under stirring at room temperature for two hours. Later, NaBH_4 (30.0 mmol) was added to the mixture and kept under stirring overnight. The solvent was evaporated and the product was extracted with dichloromethane. The organic phase was separated and vacuum evaporated to dryness and the resulting oil was dissolved in anhydrous dichloromethane.

The final product was precipitated by using a solution of HCl 4 M in 1,4-dioxane, giving the final scoriand-like ligands **L7** and **L8** as the hydrochloride salts.

6-[4-(9-Antrhyl)-3-azabutyl]- 3,6,9-triaza-1-(3,5)-pyrazolacyclodecaphane

Yield: 61%.

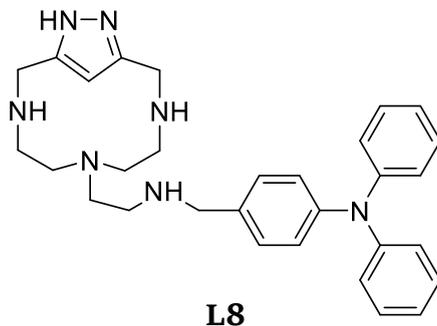
^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 8.39 (s, 1H), 8.08 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.99 (d, $J=9$ Hz, 2H), 7.67 (t, $J=9$ Hz, 2H), 7.56 (t, $J=9$ Hz, 2H), 6.93 (s, 1H), 4.94 (s, 2H), 4.37 (s, 4H), 3.16 (t, $J=9$ Hz, 2H), 2.89 (t, $J=9$ Hz, 4H), 2.53 (t, $J=9$ Hz, 2H), 2.42–1.41 (m, 4H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 140.2, 129.9, 128.2, 125.9, 122.9, 120.5, 110.6, 49.1, 47.9, 43.7, 43.2, 42.2.

Melting point: 272.7–288.8 °C.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 429.3. Found: 429.2.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{N}_6\cdot 4\text{HCl}$: C, 54.4; H, 6.3; N, 14.6. Found: C, 53.5, H, 8.1; N, 14.9.

6-[4-(p-Diphenylaminophenyl)-3-azabutyl]-3,6,9-triaza-1-(3,5)-pirazolacyclodecaphane

Yield: 56%.

^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ 7.32–7.23 (m, 6H), 7.11–7.00 (m, 8H), 6.95 (s, 1H), 4.36 (s, 4H), 4.10 (s, 2H), 3.10–2.96 (m, 8H), 2.68–2.60 (m, 2H).

^{13}C NMR (75.43 MHz, D_2O): δ 147.2, 131.1, 129.7, 124.9, 123.9, 122.6, 110.2, 49.1, 47.7, 42.8, 42.6, 42.1.

Melting point: 319.4–320.2 °C.

ESI-MS (m/z): Calculated for $[\text{L}+\text{H}]^+$: 496.3. Found: 496.0.

Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{30}\text{H}_{37}\text{N}_7\cdot 4\text{HCl}$: C, 56.2; H, 6.4; N, 15.3. Found: C, 55.4, H, 7.6; N, 16.1.

5.8. References

- [1] J. E. Richman, T. J. Atkins. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 2268–2270.
- [2] T. J. Lotz, T. A. Kaden. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 15–16.
- [3] P. S. Pallavicini, A. Perotti, A. Poggi, B. Seghi, L. Fabbrizzi. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 5139–5144.
- [4] R. Belda, J. Pitarch-Jarque, C. Soriano, J. M. Llinares, S. Blasco, J. Ferrando-Soria, E. García-España. *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 10795–10803.
- [5] L. Iturrino, P. Navarro, M. I. Rodríguez-Franco, M. Contreras, J. Escario, A. Martinez, M. R. Pardo. *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, 22, 445–451.
- [6] J. C. Röder, F. Meyer, H. Pritzkow. *Organometallics* **2001**, 20, 811–817.
- [7] A. B. Hughes. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*. Wiley, **2009**.
- [8] P. G. M. Wuts. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*. Wiley, **2014**.
- [9] S. Gabriel. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 2224–2236.
- [10] H. R. Ing, R. H. F. Manske. *J. Chem. Soc.* **1926**, 2348–2351.
- [11] H. R. Snyder, R. E. Heckert. *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, 74, 2006–2009.
- [12] B. E. Haskell, S. B. Bowlus. *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 159–160.
- [13] H. Schiff. *Annal. Chem. Pharm.* **1864**, 131, 118–119.

6

**Propiedades Ácido-
Base y Química de
Coordinación**

6.1. Propiedades Ácido-Base

Todos los ligandos que se presentan en esta memoria son de naturaleza poliamínica y, por lo tanto, contienen varios grupos amino en su estructura. Las aminas son derivados orgánicos del amoníaco, que contienen uno o más grupos alquilo o arilo enlazados al átomo de nitrógeno. En base al número de grupos alquilo o arilo unidos al nitrógeno las aminas se clasifican como primarias, secundarias o terciarias, como se presenta en la Figura 6.1.^[1-3]

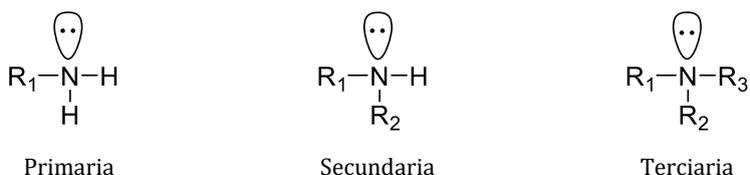


Figura 6.1. Clasificación de las aminas en base al número de grupos arilo o alquilo enlazados al átomo de nitrógeno.

Las aminas son compuestos nucleófilos, las cuales presentan un par de electrones no enlazado, lo que permite que formen nuevos enlaces con compuestos electrófilos, como se representa en la Figura 6.2.^[1-3]

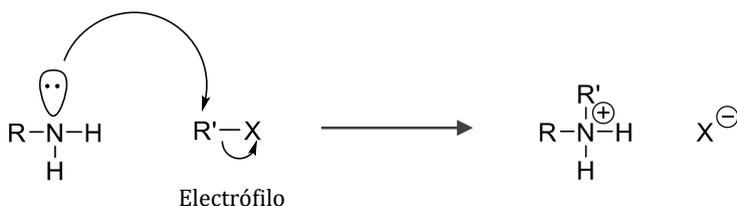


Figura 6.2. Reacción de una amina primaria con un electrófilo.

Las aminas pueden actuar como bases de Brønsted-Lowry, aceptando un protón de un ácido de Brønsted-Lowry, en un proceso similar al que se presenta en la Figura 6.3.^[1-3]

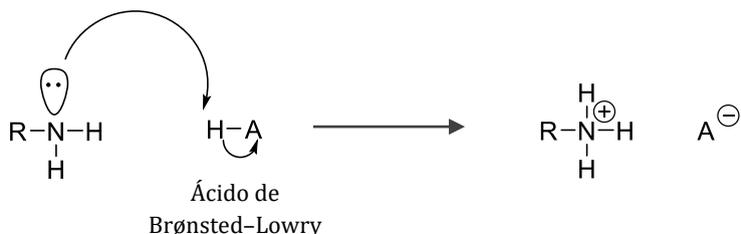


Figura 6.3. Reacción de una amina primaria con un ácido de Brønsted-Lowry.

En disolución acuosa, las aminas se comportan como bases moderadamente fuertes y se pueden protonar, dando lugar a la formación de un ion amonio y un ión hidroxilo, como se representa en la Figura 6.4.^[1-3]

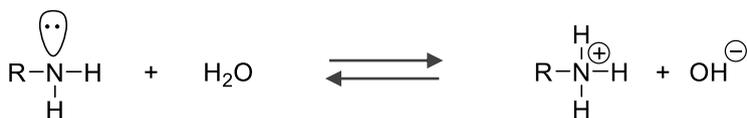


Figura 6.4. Equilibrio ácido-base de una amina primaria en disolución acuosa.

Los estudios que se presentan en este trabajo han sido realizados en disolución acuosa, motivo por el cual en primer lugar fue necesario estudiar las propiedades ácido-base de las nuevas poliaminas sintetizadas.

6.1.1. Ligandos basados en poliaminas lineales

Poliaminas L1-L3

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.1 se presentan los valores de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales para las poliaminas **L1-L3**, los cuales se han obtenido mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.1. Logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales para las poliaminas **L1-L3**, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L1	L2	L3
$L + H \rightleftharpoons HL^a$	9.15(2) ^b	9.77(2)	10.52(1)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	8.10(2)	8.19(2)	9.46(1)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	4.84(3)	5.19(3)	6.76(1)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	2.65(3)	3.71(3)	5.87(1)
Log β^c	24.74(3)	26.86(3)	32.61(1)

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa. (c) $\log \beta = \sum_j \log K_{HjL}$.

En los tres sistemas se han determinado cuatro constantes de protonación, lo que coincide con el número de grupos amino protonables presentes en la estructura de los receptores. El valor de los logaritmos de las constantes disminuye a medida que aumenta el número de centros protonados, lo cual se debe principalmente a dos factores: (1) el aumento de las repulsiones electrostáticas entre los grupos amino cargados positivamente y (2) el efecto estadístico.^[4]

En ninguno de los sistemas fue posible detectar la constante correspondiente a la protonación del nitrógeno piridínico presente en la unidad de 1*H*-pirazol, en el intervalo de pH disponible para los estudios potenciométricos (2.5–11.0).

Ordenada de mayor a menor, se observa la siguiente tendencia para la basicidad global de las poliaminas: **L3** > **L2** > **L1**. La explicación reside en el número de átomos de carbono entre grupos amino contiguos, de manera que cuanto mayor es el número de átomos de carbono entre dos grupos amino contiguos, menores son las repulsiones electrostáticas entre los mismos cuando se encuentran protonados, dando lugar a valores más altos para los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas, y como consecuencia a una mayor constante de protonación global. Además, cuanto más larga es la cadena hidrocarbonada, mayor es el efecto inductivo dador de densidad electrónica, lo que da lugar a una mayor basicidad de las aminas.^[4]

En la Figura 6.5 se representan los diagramas de distribución de especies para **L1–L3**, los cuales se han obtenido mediante el software HySS^[5] haciendo uso de los datos de la Tabla 6.1.

Los diagramas de distribución de **L1** y **L2** presentan un perfil bastante similar, predominando la especie $[H_2L]^{2+}$ a valores de pH neutros y próximos a la neutralidad, coexistiendo las especies $[H_4L]^{4+}$ y $[H_3L]^{3+}$ a valores de pH ácido, mientras que las especies $[HL]^+$ y $[L]$ lo hacen a valores de pH alcalino. El grado de protonación medio de ambos sistemas para valores de pH fisiológicos (7.4) es bastante parecido, siendo este de 1.8 para la poliamina **L1**, y de 1.9 para la poliamina **L2** (Figura 6.5).

En cambio, el diagrama de distribución de especies para **L3** exhibe un perfil distinto, predominando la especie $[H_4L]^{4+}$ a valores de pH ácido, y coexistiendo el resto de especies a valores de pH neutro y alcalino. El grado de protonación medio para valores de pH fisiológicos es de 2.2, siendo este ligeramente superior al de **L1** y **L2**, lo que deriva de la mayor basicidad de **L3**, debido a las diferencias estructurales, como se ha explicado anteriormente (Figura 6.5).

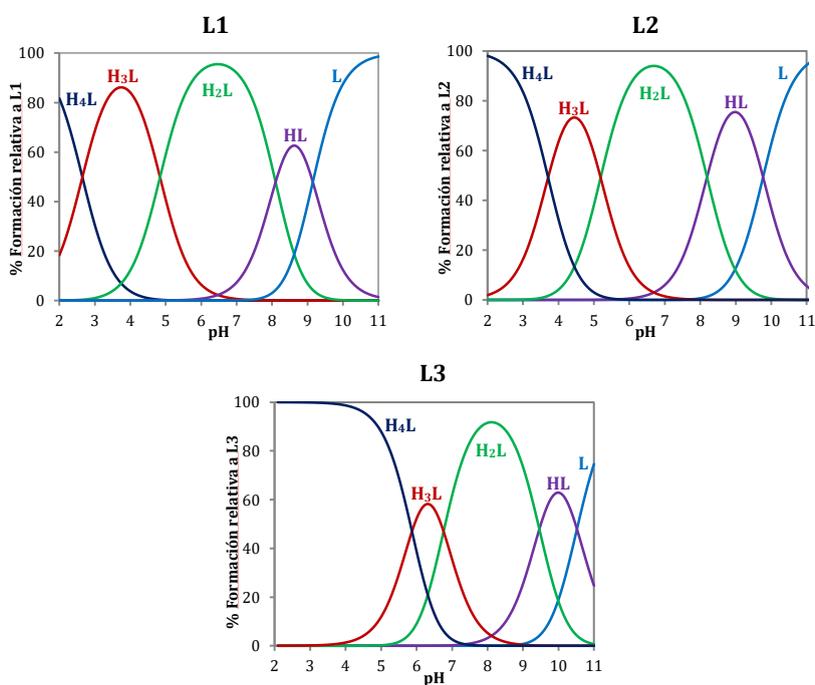


Figura 6.5. Diagrama de distribución para las poliaminas **L1-L3**. $[L] = 10^{-3}M$.

Espectroscopia de absorción UV-visible

La unidad de 1*H*-pirazol es un polieno conjugado, que presenta una banda de absorción característica en el intervalo de longitudes de onda de 200–300 nm, lo que permite registrar el espectro de absorción UV-visible para distintos valores de pH, proporcionando información complementaria a la deducida de las valoraciones potenciométricas.

La superposición de los valores de absorbancia con el diagrama de distribución ofrece información acerca de la secuencia de protonación de **L1–L3**, ya que la protonación y desprotonación de las aminas contiguas a la unidad de 1*H*-pirazol dará lugar a variaciones de la absorbancia más acusadas.^[6]

En la Figura 6.6 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible para **L1–L3**. En los tres sistemas el aumento del pH de la disolución da lugar a un aumento discreto de la absorbancia, siendo este más o menos acusado dependiendo del sistema.

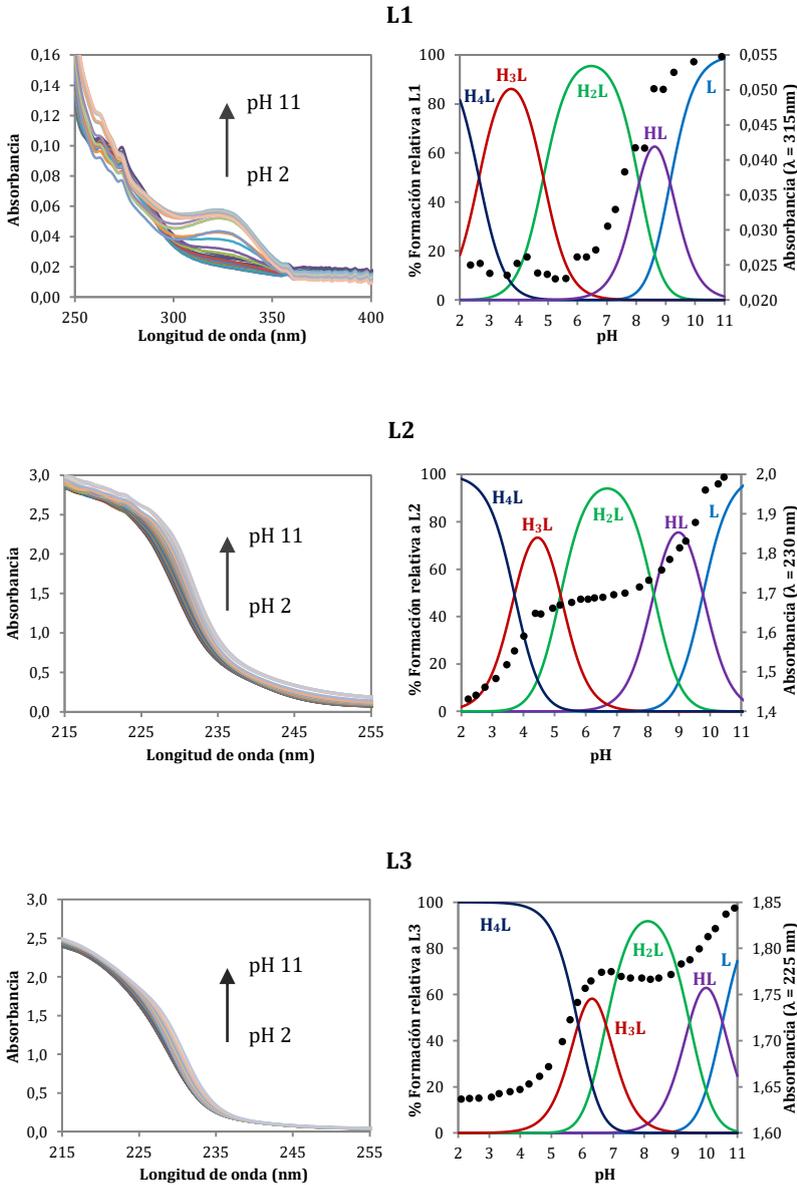


Figura 6.6. En la izquierda, espectros de absorción UV-visible en disolución acuosa para **L1-L3**. En la derecha, variación de la absorbancia en función del pH, junto con el diagrama de distribución de especies para **L1-L3**. $[L] = 10^{-3}$ M.

Para **L1**, la primera y segunda etapas de protonación coinciden con un descenso discreto de la absorbancia, lo que indica que en dichas etapas se protonan mayoritariamente las dos aminas contiguas a la unidad de 1*H*-pirazol. En cuanto a la tercera y cuarta etapas de protonación, no se observa variación en la absorbancia, indicando que se protonan mayoritariamente las dos aminas de la parte central de la cadena poliamínica (Figura 6.6). Esto permite sugerir la secuencia de protonación para **L1** que se presenta en la Figura 6.7.

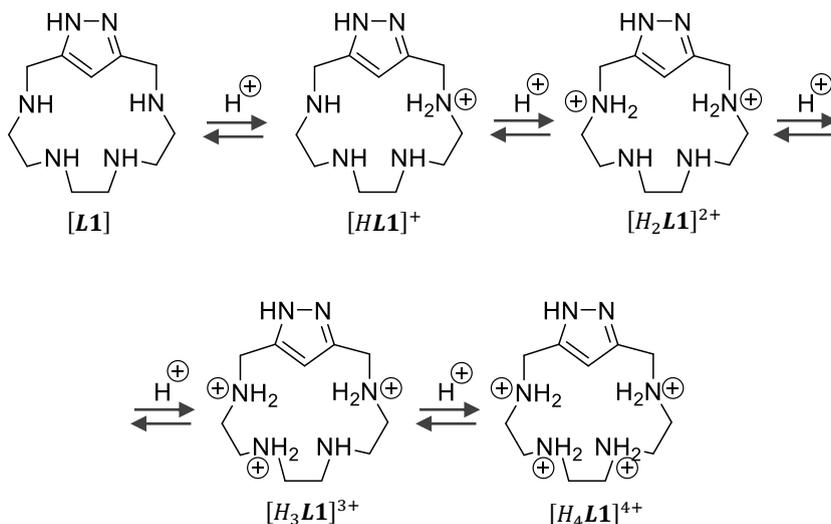


Figura 6.7. Secuencia de protonación sugerida para **L1**, en base a los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible y a las valoraciones potenciométricas.

En cambio, para **L2** y **L3** el comportamiento es distinto. En ambos casos, la primera y última etapas de protonación coinciden con un descenso ligero de la absorbancia, lo que sugiere que en dichas etapas se protonan mayoritariamente las dos aminas contiguas a la unidad de 1*H*-pirazol, mientras que para la segunda y tercera etapas de protonación tercera no se observa prácticamente variación en la absorbancia (Figura 6.6). Esto permite sugerir la secuencia de protonación para **L2** y **L3**, la cuales se presentan en las Figuras 6.8 y 6.9, respectivamente.

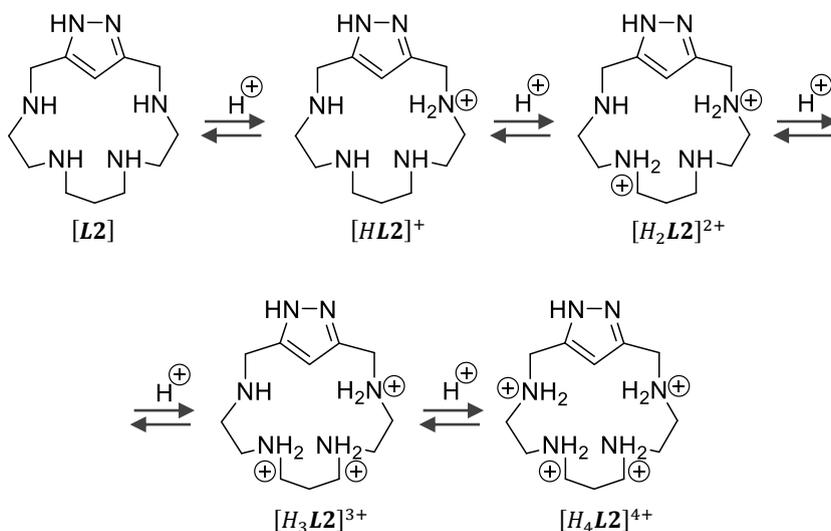


Figura 6.8. Secuencia de protonación sugerida para **L2**, en base a los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible y a las valoraciones potenciométricas.

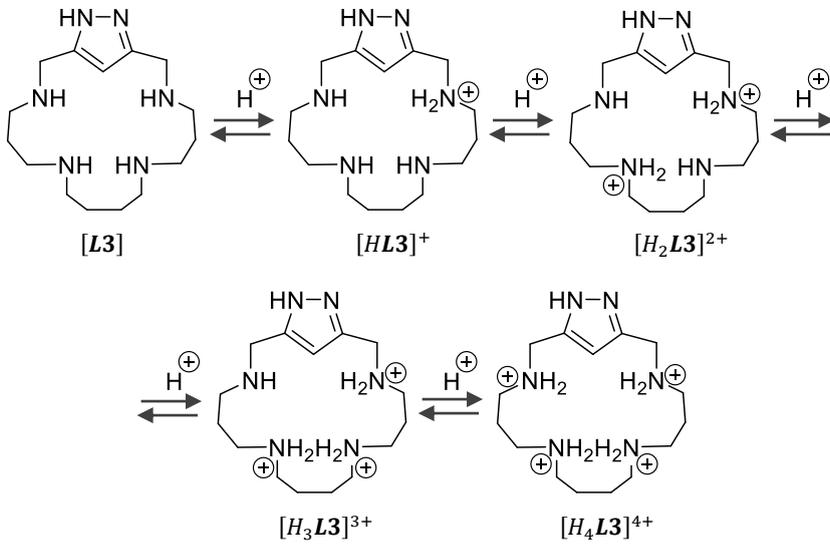


Figura 6.9. Secuencia de protonación sugerida para L3, en base a los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible y a las valoraciones potenciométricas.

Poliaminas L4-L5

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.2 se presentan los valores de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales para las poliaminas **L4** y **L5**, los cuales se han obtenido mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.2. Logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales para las poliaminas **L4** y **L5**, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L4	L5
$L + H \rightleftharpoons HL^a$	10.06(1) ^b	10.72(1)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.24(1)	9.80(1)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	8.09(1)	8.63(1)
$H_3L + H \rightleftharpoons H_4L$	6.50(1)	7.46(1)
$H_4L + H \rightleftharpoons H_5L$	5.41(1)	6.90(1)
$H_5L + H \rightleftharpoons H_6L$	4.42(2)	6.02(1)
$\text{Log } \beta^c$	43.72(2)	49.53(1)

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa. (c) $\log \beta = \sum_j \log K_{HjL}$.

Ambos ligandos presentan seis constantes de protonación, lo que coincide con el número de grupos amino protonables presentes en la estructura de los mismos, observando una disminución en el valor de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas a medida que aumenta el número de centros protonados, como consecuencia del aumento de las repulsiones electrostáticas y del efecto estadístico.

En ninguno de los sistemas fue posible determinar la constante asociada a la protonación del nitrógeno de tipo piridina de la unidad de 1*H*-pirazol, en el intervalo de pH disponible para los estudios potenciométricos.

Para todas las etapas, **L5** presenta constantes de protonación sucesivas más altas, en comparación con **L4**, lo que da lugar a una mayor basicidad global para **L5**. La diferencia de basicidad se puede explicar en base a las diferencias estructurales de las poliaminas que integran ambos macrociclos. **L4** está constituido por tres cadenas propilénicas y dos etilénicas, en cambio **L5** está constituido por cinco cadenas propilénicas. La separación entre grupos aminos es mayor en el caso de **L5**, lo que resulta en una minimización más efectiva de las repulsiones electrostáticas, dando lugar a constantes de protonación sucesivas más altas, y en última instancia, a una mayor basicidad global. Además, el efecto inductivo dador de densidad electrónica es mayor para **L5**, lo que también contribuye a la mayor basicidad de este macrociclo.^[4]

En la Figura 6.10 se presentan los diagramas de distribución de especies para **L4** y **L5**, los cuales se han obtenido mediante el software HySS haciendo uso de los datos de la Tabla 6.2.

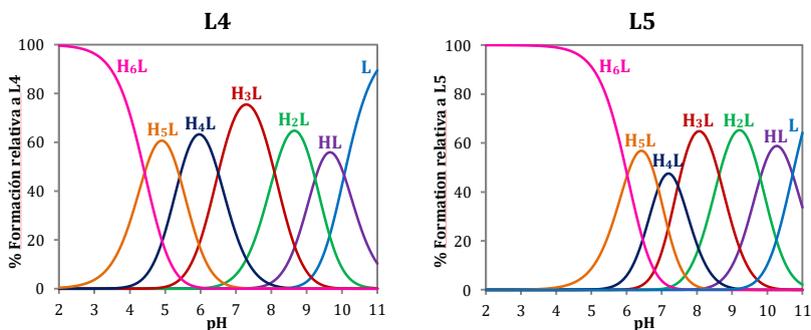


Figura 6.10. Diagrama de distribución para las poliaminas **L4** y **L5**. [L] = 10⁻³M.

Aunque ambos macrociclos presentan una estructura relativamente parecida, exhiben diagramas de distribución con perfiles distintos. En el caso de **L4**, predomina la especie $[H_3L]^{3+}$ a valores de pH próximos a la neutralidad, presentando un grado de protonación medio de 2.9 a valores de pH fisiológico. Las tres especies $[H_6L]^{6+}$, $[H_5L]^{5+}$ y $[H_4L]^{4+}$ coexisten a valores de pH ácido, mientras que las tres especies $[H_2L]^{2+}$, $[HL]^+$ y $[L]$ lo hacen a valores de pH básico (Figura 6.10).

En cambio, en el caso de **L5** las tres especies $[H_5L]^{5+}$ y $[H_4L]^{4+}$ coexisten a valores de pH próximos a la neutralidad, la especie $[H_6L]^{6+}$ predomina a valores de pH ácido, mientras que las especies $[H_3L]^{3+}$, $[H_2L]^{2+}$, $[HL]^+$ y $[L]$ coexisten a valores de pH básico. El grado de protonación medio para valores de pH fisiológico es de 3.7, mayor que para **L4**, lo cual es consecuencia de la mayor basicidad global de **L5** (Figura 6.10).

6.1.2. Ligandos de tipo escorpiando

Poliaminas L6-L8

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.3 se presentan los valores de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales para las poliaminas **L6-L8**, los cuales se han obtenido mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.3. Logaritmos de las constantes de protonación sucesivas y globales para las poliaminas **L6-L8**, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L6	L7	L8
$L + H \rightleftharpoons HL^a$	9.45(1) ^b	9.30(2)	10.26(3)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	8.64(1)	8.02(1)	8.63(3)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	7.03(2)	6.88(2)	7.29(3)
Log β^c	25.12(2)	24.20(2)	26.18(3)

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa. (c) $\log \beta = \sum_j \log K_{HjL}$.

Los tres escorpiandos exhiben un comportamiento parecido, habiéndose determinado tres constantes de protonación para cada uno. En el caso de **L6** estas están asociadas a la protonación de una amina primaria y dos aminas secundarias, mientras que en el caso de **L7** y **L8**, lo están a la protonación de tres aminas secundarias.

El valor de los logaritmos de las constantes de protonación sucesivas disminuye a medida que aumenta el número de centros protonados, de manera similar a lo que sucede para **L1-L5**, lo cual es consecuencia del aumento de las repulsiones electrostáticas y del efecto estadístico.

En ninguno de los sistemas fue posible determinar la etapa de protonación correspondiente al nitrógeno piridínico de la unidad de 1*H*-pirazol, en el intervalo de pH disponible para los estudios potenciométricos. Tampoco fue posible detectar la protonación de la amina terciaria de la cadena poliamínica que forma parte de los tres escorpiandos, así como la protonación de la amina terciaria presente en la unidad de TPA de **L8**.

La basicidad global de poliaminas, ordenada de mayor a menor, es la siguiente: **L8 > L6 > L7**. La mayor basicidad de **L6** con respecto a **L7** es atribuible a la presencia de una amina primaria en el primero, ya que estas son más básicas que las aminas secundarias en disolución acuosa.^[4] La mayor basicidad de **L8** con respecto a **L6** se explica por la presencia de la unidad de TPA en el primero, que es un electrón-dador excelente.^[7] Como consecuencia, por efecto inductivo dador de densidad electrónica se produce un aumento en la basicidad de la amina secundaria contigua a la unidad de TPA, lo que resulta en un aumento de la basicidad global de **L8**.

En comparación con los escorpiandos análogos que incorporan la unidad de piridina como espaciador aromático, **L6** y **L7** presentan constantes de protonación sucesivas más pequeñas para todas las etapas, lo que da lugar a una basicidad global menor.^[8,9] En cambio, en el caso de **L8** sucede lo contrario, exhibiendo constantes sucesivas más altas para todas las etapas de protonación.^[10]

En la Figura 6.11 se presentan los diagramas de distribución de especies para **L6–L8**, los cuales se han obtenido mediante el software HySS haciendo uso de los datos de la Tabla 6.3.

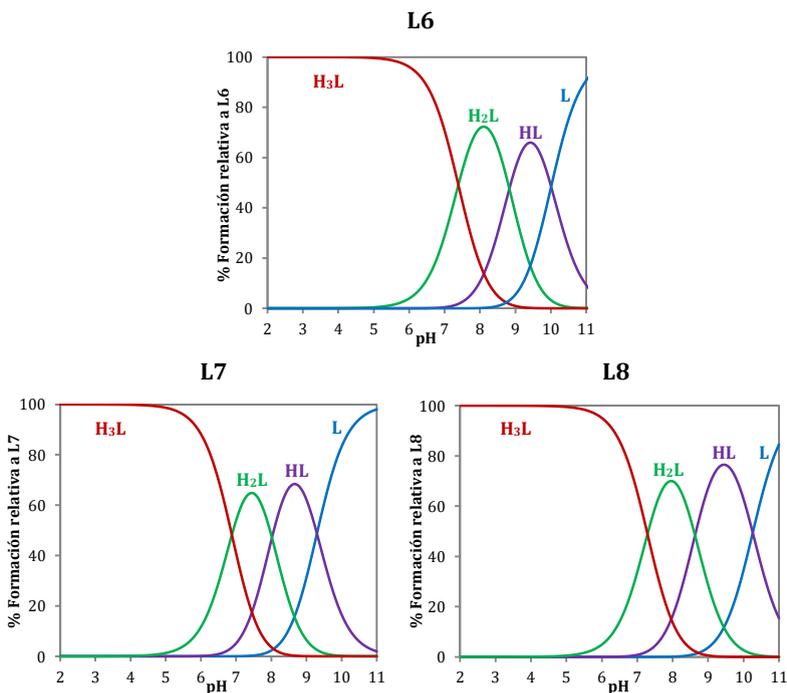


Figura 6.11. Diagrama de distribución para las poliaminas **L6–L8**. $[L] = 10^{-3}M$.

Los tres sistemas presentan diagramas de distribución con perfiles parecidos, predominando la especie $[H_3L]^{3+}$ a valores de pH ácido, y coexistiendo el resto de especies a valores de pH neutro y básico. El grado de protonación medio para valores de pH fisiológico es de 2.4 para **L8**, mientras que para **L6** y **L7** es menor, siendo este de 2.2 y 2.0 respectivamente, siguiendo la tendencia esperada en base a la basicidad global de los tres escorpiandos (Figura 6.11).

En base a la estructura de **L6**, y con los datos de las valoraciones potenciométricas, se puede sugerir una secuencia para la protonación del mismo. Lo lógico es pensar que la amina primaria se protonará en primer lugar, ya que es más básica que las otras dos aminas que constituyen el macrociclo, las cuales son secundarias y se protonarán en segundo y tercer lugar, como se representa en la Figura 6.12.

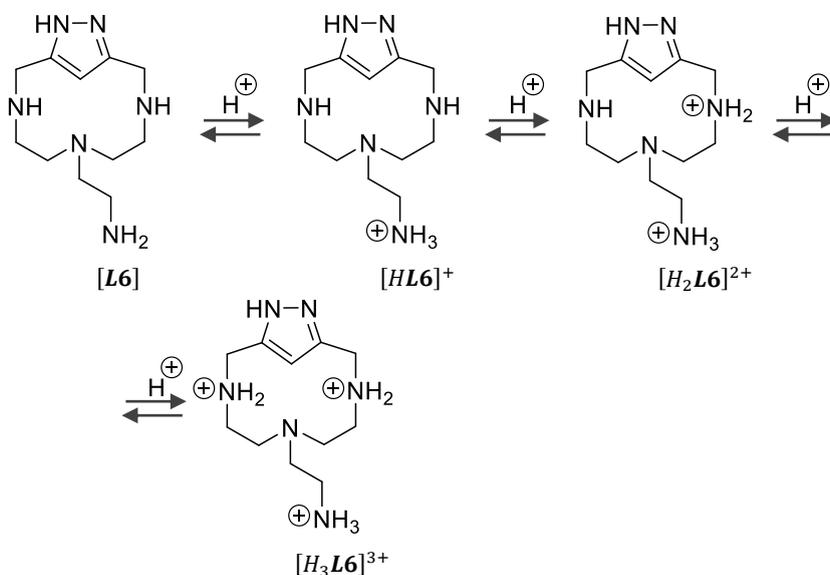


Figura 6.12. Secuencia de protonación sugerida para **L6**, en base a la estructura del mismo y a las valoraciones potenciométricas.

Espectroscopia de emisión de fluorescencia

Los escorpiandos **L7** y **L8** incorporan en su estructura las unidades fluorescentes antraceno y TPA, respectivamente. La presencia de estas unidades permite registrar el espectro de emisión de fluorescencia de disoluciones acuosas de ambos receptores, y estudiar la evolución de los mismos a medida que se modifica el pH de la disolución. Esto proporciona información adicional y complementaria a la que se deduce de las valoraciones potenciométricas.

En la Figura 6.13 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia para **L7**, donde se advierte un aumento de la intensidad de la emisión a medida que disminuye el pH de la disolución, lo que coincide con la tercera etapa de protonación:

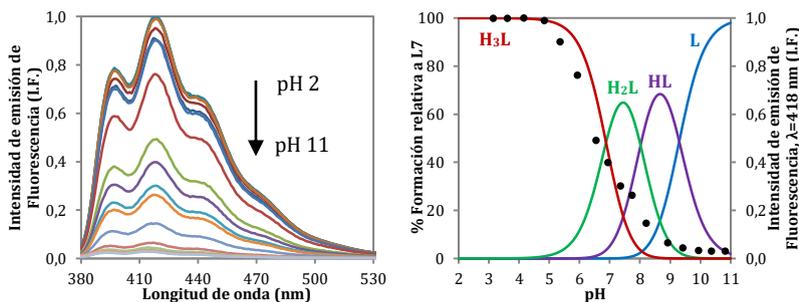
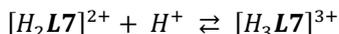


Figura 6.13. En la izquierda, espectro de emisión de fluorescencia en disolución acuosa para **L7**. En la derecha, variación de la emisión de fluorescencia a la longitud de onda de 418 nm en función del pH, junto con el diagrama de distribución de especies para **L7**. [L] = 10⁻⁵ M.

La presencia de un átomo dador con un par de electrones disponibles en las proximidades de la unidad de antraceno, como es el caso del nitrógeno de la amina secundaria contigua al antraceno, da lugar a un fenómeno de transferencia electrónica fotoinducida (PET, del inglés *Photoinduced Electron Transfer*),^[11] que desactiva la emisión de fluorescencia. Este proceso se ve interrumpido cuando se produce la protonación del nitrógeno de la amina, lo que da lugar a un aumento de la emisión de fluorescencia. En base a lo mencionado, la tercera etapa de protonación se puede asignar a la protonación de la amina secundaria contigua al antraceno, mientras que la primera y segunda etapas estarán asociadas a la protonación de las aminas secundarias contiguas a la unidad de 1*H*-pirazol, como se representa en la Figura 6.14.

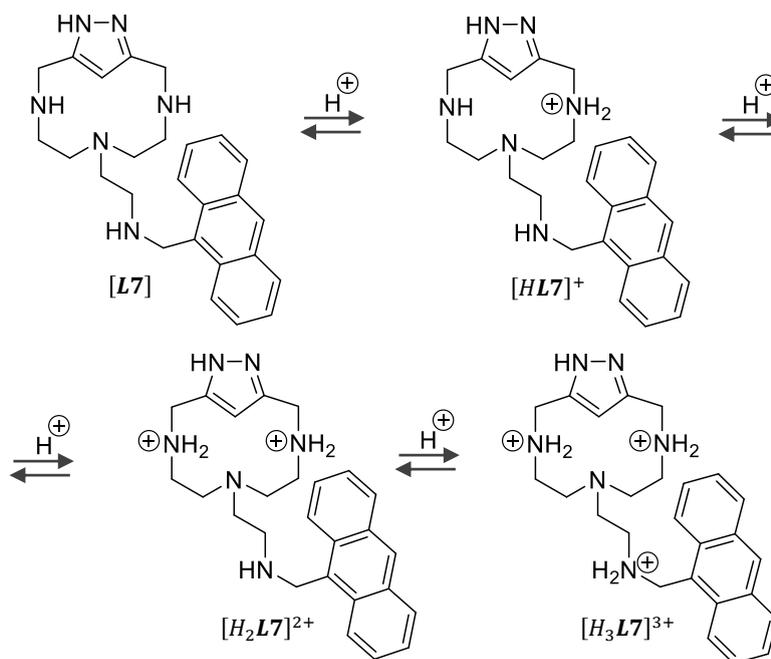


Figura 6.14. Secuencia de protonación sugerida para L7, en base a los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia y a las valoraciones potenciométricas.

En la Figura 6.15 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia para **L8**. En este caso la tendencia que se observa es la contraria, produciéndose un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia a medida que aumenta el pH de la disolución, el cual coincide con la pérdida del segundo protón:

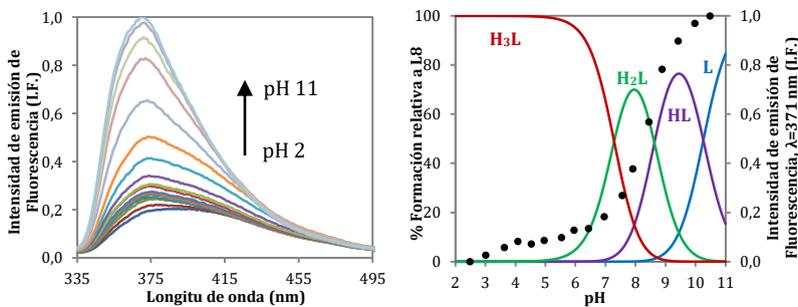
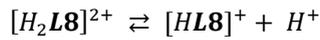


Figura 6.15. En la izquierda, espectro de emisión de fluorescencia en disolución acuosa para **L8**. En la derecha, variación de la emisión de fluorescencia a la longitud de onda de 371 nm en función del pH, junto con el diagrama de distribución de especies para **L8**. $[L] = 10^{-5}$ M.

El aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia a medida que aumenta el pH de la disolución se puede atribuir a un proceso de emisión inducida por agregación (AIE, del inglés *Aggregation-Induced Emission*),^[7] originado por la presencia de la unidad de TPA en la estructura del escorpiando. El aumento del pH de la disolución da lugar a la desprotonación de la poliamina, lo que resulta en una disminución de las repulsiones electrostáticas intramoleculares e intermoleculares, lo que permite la formación de agregados moleculares mediante la formación de distintas interacciones supramoleculares, tales como enlaces de hidrógeno e interacciones π - π . La formación de agregados dificulta las rotaciones intramoleculares, hecho que da lugar a un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia.

Aunque no se observa ningún proceso de transferencia electrónica fotoinducida, se puede sugerir una secuencia de protonación para **L8** en base a la estructura del mismo, y con los datos de las valoraciones potenciométricas. Como se ha comentado durante la discusión de las constantes de protonación, la unidad de TPA es un electrón-dador excelente, lo que dará lugar a un aumento de la basicidad de la amina secundaria contigua al TPA. Esta amina secundaria se protonará en primer lugar, mientras que las otras dos aminas secundarias, contiguas a la unidad de 1*H*-pirazol, se protonarán en segundo y tercer lugar, como se representa en la Figura 6.16.

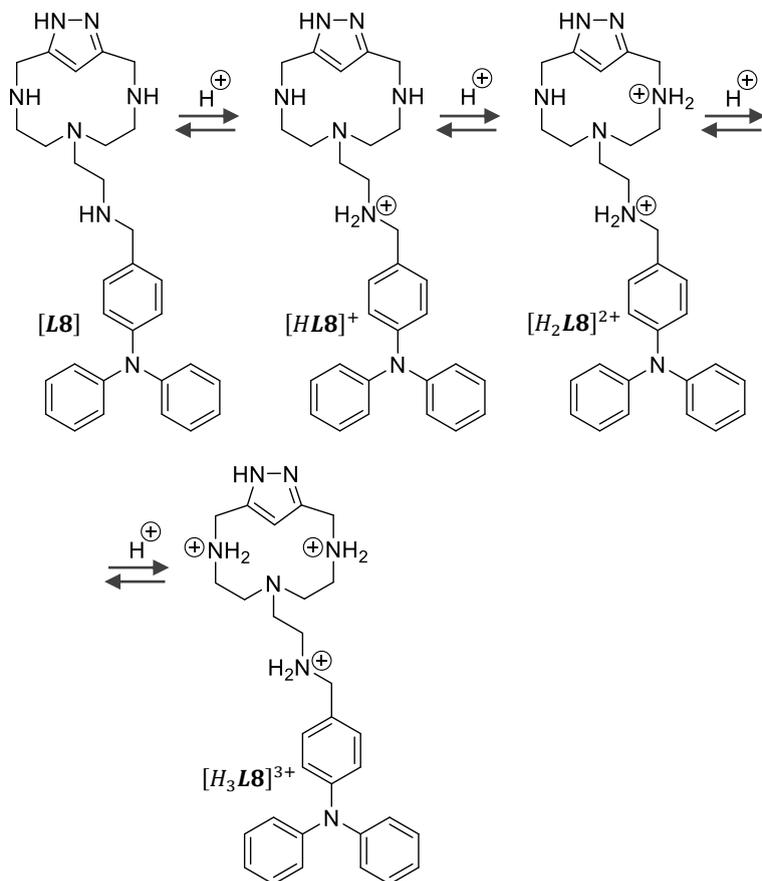


Figura 6.16. Secuencia de protonación sugerida para **L8**, en base a la estructura del mismo y a las valoraciones potenciométricas.

6.2. Química de Coordinación con Cobre(II)

El cobre es un elemento esencial que se encuentra presente a nivel de traza en casi todos los sistemas vivos. Todos los organismos, a excepción de algunas células procariotas, necesitan cobre para su supervivencia. En los sistemas biológicos el cobre forma parte de numerosas proteínas, presentando funciones relacionadas principalmente con la transferencia electrónica, así como con el transporte y la activación del dióxígeno, siendo los estados de oxidación +1 y +2 los más relevantes.^[12,13]

El estado de oxidación más común del cobre es el +2, aunque se conocen complejos de cobre para los estados de oxidación +1, +3 y +4. El cobre(II) es un sistema d^9 , siendo los índices de coordinación más comunes 4, 5 y 6. La distorsión Jahn-Teller, característica de los complejos de cobre(II) da lugar a geometrías irregulares, principalmente octaédricas con distorsión tetragonal. El cobre(II) es un ácido de Lewis intermedio que se coordina perfectamente con ligandos que contienen grupos amina e imidazol, pero también con ligandos O-dadores y S-dadores. La mayoría de los complejos de cobre(II) presentan una coloración azul o verde, debido a la existencia de una banda de absorción ancha y asimétrica situada en la región visible del espectro electromagnético, comprendida en el intervalo de longitudes de onda de 600-900 nm.^[12,13]

6.2.1. Ligandos basados en poliaminas lineales

Poliaminas L1-L3

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.4 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu(II)-L1, Cu(II)-L2 y Cu(II)-L3, determinados mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.4. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu(II)-L1, Cu(II)-L2, y Cu(II)-L3, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L1	L2	L3
$\text{Cu} + \text{L} + 2\text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}^{\text{a}}$	21.97(2) ^b	22.71(5)	-
$\text{Cu} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	18.41(1)	19.34(2)	21.66(1)
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}_2$	30.63(4)	34.43(2)	34.31(2)
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2 + \text{H}$	25.71(3)	28.09(5)	26.99(5)
$2\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2 + 2\text{H}$	18.87(9)	18.91(10)	16.80(6)
$3\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{H}_{-2}\text{L}_2 + 2\text{H}$	-	-	24.98(3)
$3\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_3\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH}) + 3\text{H}$	-	-	15.99(7)
$4\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_4\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})_2 + 4\text{H}$	17.40(3)	19.49(3)	-
$4\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_4\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})_3 + 5\text{H}$	9.96(8)	12.35(9)	-
$4\text{Cu} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_4\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})_4 + 6\text{H}$	0.32(9)	1.76(12)	-

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa.

Para relaciones molares Cu(II):L 1:1, los tres sistemas presentan un comportamiento similar, detectando la formación de especies mononucleares monómeras de estequiometría Cu(II):L 1:1, y de especies dinucleares dímeras de estequiometría Cu(II):L 2:2. En los tres sistemas se detecta la formación de la especie mononuclear monómera $[\text{CuHL}]^{3+}$ y de las tres especies dinucleares dímeras $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$, $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2]^{2+}$. Además, en el caso de los sistemas Cu(II)-**L1** y Cu(II)-**L2** se detecta la formación de la especie mononuclear monómera adicional $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$.

Para relaciones molares Cu(II):L de orden superior se observa un comportamiento distinto dependiendo del sistema. Para los dos sistemas Cu(II)-**L1** y Cu(II)-**L2** se detecta la formación de especies tetranucleares de estequiometría Cu(II):L 4:2, $[\text{Cu}_4\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})_2]^{4+}$, $[\text{Cu}_4\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})_3]^{3+}$, y $[\text{Cu}_4\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})_2]^{2+}$. Para el sistema Cu(II)-**L3** se detecta la formación de dos especies trinucleares de estequiometría Cu(II):L 3:2, $[\text{Cu}_3\text{H}_{-2}\text{L}_2]^{4+}$ y $[\text{Cu}_3\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{OH})]^{3+}$.

A continuación, se discute la química de coordinación de los sistemas Cu(II)-**L1**, Cu(II)-**L2** y Cu(II)-**L3** en disolución acuosa y en el estado sólido, para las relaciones molares Cu(II):L 1:1 y de orden superior.

Relación molar Cu(II):L 1:1

En la Figura 6.17 se representa el pCu ($-\log[\text{Cu(II)}]$) en función del pH, que es una medida de la cantidad de cobre(II) libre en disolución.^[14] Cuanto más alto es el valor del pCu, menor es la cantidad de cobre(II) libre en disolución. En consecuencia, mayor es la capacidad complejante de las poliaminas y se puede concluir que mayor es la estabilidad de los sistemas de cobre.

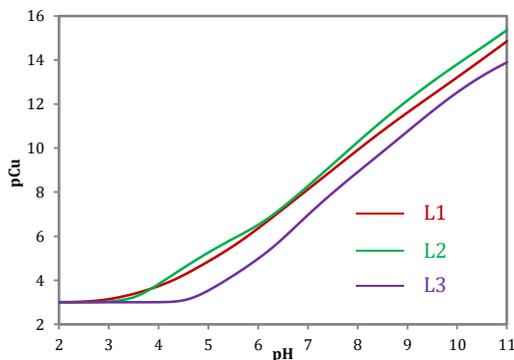


Figura 6.17. Representación del pCu en función del pH para los sistemas Cu(II)-L1, Cu(II)-L2 y Cu(II)-L3, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. $[\text{L}] = [\text{Cu(II)}] = 10^{-3} \text{ M}$.

Ordenada de mayor a menor, se observa la siguiente tendencia para la estabilidad de los sistemas: **L2 > L1 > L3**. Esta secuencia se puede explicar en base a la estructura de los ligandos, siendo determinante el tamaño de la cavidad del macrociclo y la rigidez del mismo, así como el número de átomos de carbono entre los nitrógenos de las aminas.

L3 está constituido por dos cadenas propilénicas y una cadena butilénica, lo que da lugar a la cavidad macrocíclica más grande de los tres ligandos. Esto confiere mayor flexibilidad a **L3**, que se encuentra menos preorganizado, lo que da lugar a la obtención de constantes de estabilidad ligeramente más pequeñas, y por lo tanto a sistemas menos estables.

L2 es similar a **L1**, que está constituido por tres cadenas etilénicas, pero con una cadena propilénica en lugar de una cadena etilénica. Para **L2**, la coordinación con el cobre da lugar a la formación alternada de anillos quelato de cinco y seis miembros, mientras que para **L1** la coordinación con el cobre da lugar a la formación de anillos quelato exclusivamente de cinco miembros. La primera situación es más estable que la segunda, motivo por el cual **L2** da lugar a la formación de sistemas más estables.^[15]

En la Figura 6.18 se presentan los diagramas de distribución de especies para los tres sistemas, los cuales se han obtenido mediante el software HySS empleando los datos de la Tabla 6.4.

En el caso de los sistemas Cu(II)-**L1** y Cu(II)-**L2** todo el cobre se encuentra complejado a partir de pH 5, sin embargo los diagramas de distribución exhiben perfiles distintos. Para **L1** predomina la especie dinuclear $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]^{2+}$ a valores de pH básico, mientras que a pH ácido predomina la formación de especies mononucleares. En cambio, para **L2** la formación de especies mononucleares se produce en menor medida, y predomina la formación de las especies dinucleares en el intervalo de pH 4-11 (Figura 6.18).

En el caso del sistema Cu(II)-L3 la complejación de cobre comienza a valores de pH más básicos, y todo el cobre no se encuentra complejado hasta pH 6, lo cual es consecuencia de la menor capacidad complejante de L3 en comparación con L1 y L2. Para L3 la formación de la especie mononuclear $[\text{CuHL}]^{3+}$ se produce en mayor medida que en los dos sistemas anteriores, si bien la especie que predomina en el diagrama de distribución es la especie dinuclear dímera $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2]^{3+}$, que es la especie mayoritaria en el intervalo de pH 7-10 (Figura 6.18).

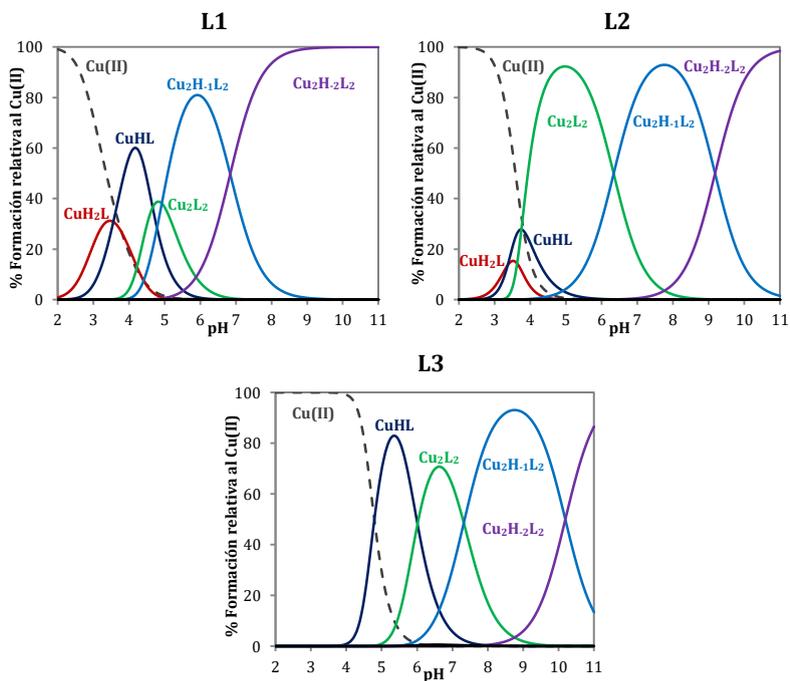


Figura 6.18. Diagrama de distribución para los sistemas Cu(II)-L1, Cu(II)-L2, y Cu(II)-L3. $[\text{L}] = [\text{Cu(II)}] = 10^{-3} \text{ M}$.

Espectrometría de masas de alta resolución

Para los tres sistemas, la formación de complejos dinucleares dímeros fue confirmada mediante espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 6.5). La correlación obtenida entre las distribuciones isotópicas experimentales y teóricas fue excelente (ver Anexo B).

Tabla 6.5. Picos m/z experimentales y teóricos de las especies dinucleares dímeras detectadas para los sistemas Cu(II)-L1, Cu(II)-L2 y Cu(II)-L3, mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Especie	L1		L2		L3	
	detectado	teórico	detectado	teórico	detectado	teórico
[Cu ₂ H ₋₂ L ₂] ²⁺	300.1134	300.1118	314.1285	314.1275	356.1746	356.1744
[Cu ₂ H ₋₂ L ₂ (Br)] ⁺	679.1427	629.1425	707.1730	707.1738	-	-
[Cu ₂ H ₋₂ L ₂ (ClO ₄)] ⁺	699.1739	699.1727	727.2033	727.2040	811.2988	811.2979
[Cu ₂ H ₋₁ L ₂ (ClO ₄)] ²⁺	-	-	-	-	406.1526	406.1526

Para los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L2 se detectó la formación de las tres mismas especies: [Cu₂H₋₂L₂]²⁺, [Cu₂H₋₂L₂(Br)]⁺ y [Cu₂H₋₂L₂(ClO₄)]⁺. Las tres especies son variantes de la especie [Cu₂H₋₂L₂]²⁺, determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.18).

Para el sistema Cu(II)-L3 también se detectó la formación de las dos especies anteriores [Cu₂H₋₂L₂]²⁺ y [Cu₂H₋₂L₂(ClO₄)]⁺, pero no la de la misma especie con bromuro. Esto es una consecuencia del proceso de síntesis, ya que L1 y L2 fueron obtenidos en forma bromohidrato, mientras que L3 fue obtenido en forma de clorhidrato. Además, se detectó la formación de la especie [Cu₂H₋₁L₂(ClO₄)]²⁺, la cual se corresponde con la especie [Cu₂H₋₁L₂]³⁺, que también fue determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.18).

Espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética

Además, la formación de especies dinucleares dimeras también fue confirmada mediante espectroscopia de resonancia electrónica paramagnética (EPR) para el sistema Cu(II)-L2 (Figura 6.19).

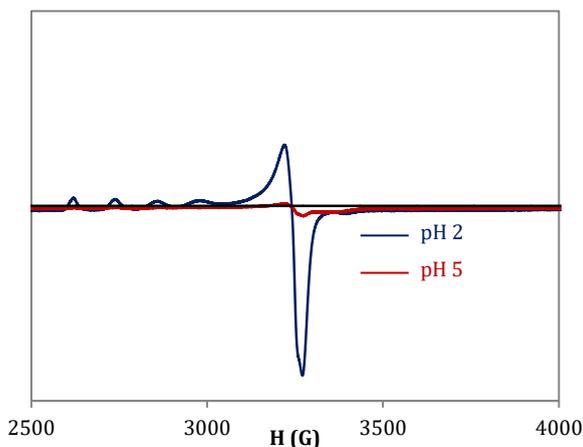


Figura 6.19. Espectro EPR para el sistema Cu(II)-L2. $[L] = [Cu(II)] = 10^{-3}$ M. Etilenglicol 30%. $\nu = 9.47$ GHz. $T = 77$ K.

Como se aprecia en el espectro de EPR, para pH 2 aparece la señal característica del cobre(II) libre en disolución acuosa, lo cual es debido a que para L2 la complejación del cobre(II) no comienza hasta pH 4 (Figura 6.18). Esta señal desaparece a partir de pH 5, coincidiendo con la formación de las especies dinucleares dimeras (Figura 6.18). En base a estudios previos, esta evidencia experimental se puede atribuir a la formación de dímeros dinucleares con un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre dos átomos de cobre.^[6]

Espectroscopia de absorción UV-visible

Como se ha comentado durante la discusión de las propiedades ácido-base, la unidad de 1*H*-pirazol presenta una banda de absorción en el intervalo de longitudes de onda de 200–300 nm. Además, como se ha mencionado al principio de esta sección, el cobre(II) presenta una banda de absorción en la región visible del espectro electromagnético, debido a las transiciones electrónicas en los orbitales *d*. Esto permite monitorizar la formación de las especies mediante el registro del espectro de absorción UV-visible a distintos valores de pH. La superposición de los valores de absorbancia con los diagramas de distribución permite asociar los cambios en el espectro de absorción con cambios en el entorno de coordinación del cobre.

En la Figura 6.20 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible para el sistema Cu(II)-L1, observando un aumento en las bandas del pirazol y del cobre(II) a medida que se produce la complejación del cobre. El aumento de la absorbancia de la banda del pirazol cesa cuando se completa la formación de los complejos de estequiometría Cu(II):L 1:1. En cambio, en el caso de la banda asociada al cobre(II), el aumento de la absorbancia continúa hasta la formación de la primera de las especies dinucleares dimeras, permaneciendo constante a partir de la formación de dicha especie. Además, se observa la presencia de un hombro a la longitud de onda de 900 nm, el cual se puede asociar a la formación de complejos con distorsión Jahn-Teller.

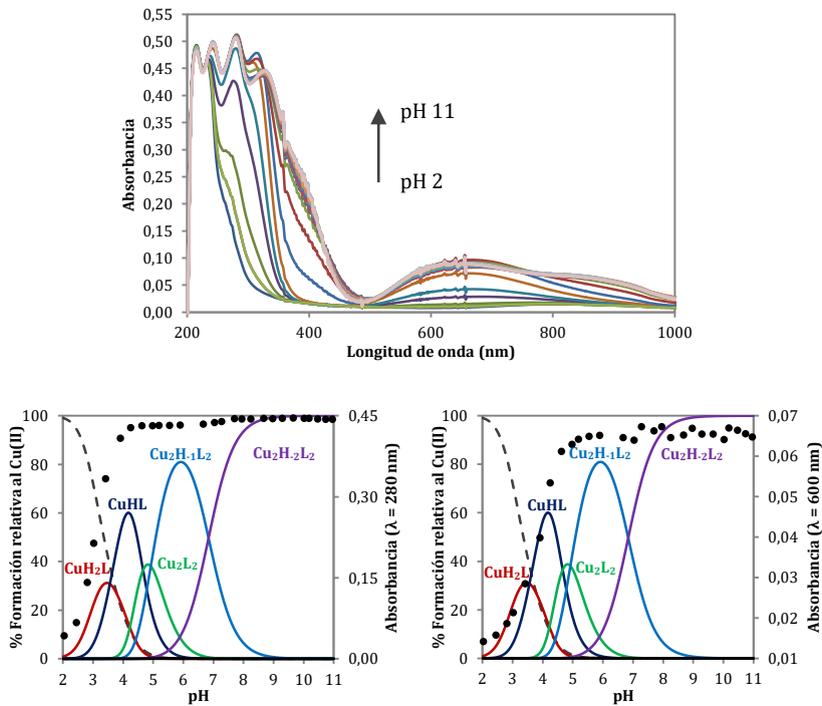


Figura 6.20. En la parte superior, espectro de absorción UV-visible en disolución acuosa para el sistema Cu(II)-L1. En la parte inferior, variación de la absorbancia a distintas longitudes de onda en función del pH (círculos negros), junto con el diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-L1. $[Cu(II)] = [L] = 10^{-3}$ M.

En la Figura 6.21 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible para el sistema Cu(II)-**L2**, observando un comportamiento parecido al que se ha descrito anteriormente para el sistema Cu(II)-**L1**.

Sin embargo, se advierten diferencias entre los dos sistemas. Para el sistema Cu(II)-**L2** se observa una disminución de la absorbancia en la banda asociada al cobre(II) posterior a la formación de la primera especie dinuclear dímera, que coincide con la formación del resto de especies de la misma estequiometría. Esto estaría asociado a la formación de complejos octaédricos con un centro de inversión, lo que da lugar a coeficientes de extinción molar más pequeños para tales complejos, y por lo tanto a valores de absorbancia más pequeños.^[16] La presencia de un hombro a la longitud de onda de 900 nm (Figura 6.21), así como las dos estructuras cristalinas que se presentan a continuación (Figuras 6.22 y 6.23), respaldarían esta hipótesis.

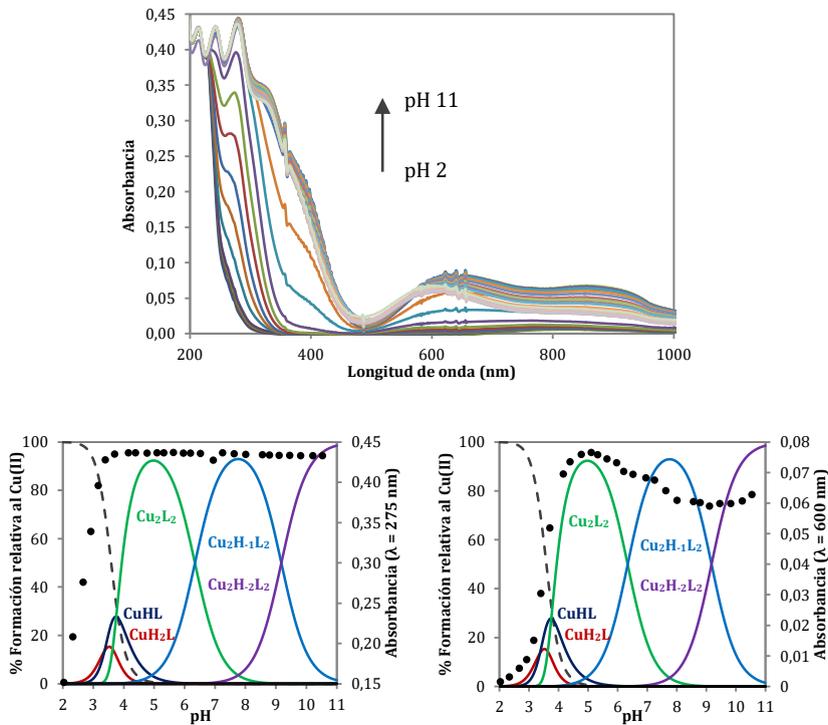


Figura 6.21. En la parte superior, espectro de absorción UV-visible en disolución acuosa para el sistema Cu(II)-L₂. En la parte inferior, variación de la absorbancia a distintas longitudes de onda en función del pH (círculos negros), junto con el diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)-L₂. [Cu(II)] = [L] = 10⁻³ M.

*Estructura cristalina $[Cu_2(H(H_1L2))_2](ClO_4)_4 \cdot 4H_2O$ (**1**)*

La evaporación lenta de una disolución acuosa a pH 5 de **L2** y $Cu(ClO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en cantidades equimolares, permitió la obtención de monocristales y la resolución de la estructura cristalina **1**, la cual se representa en la Figura 6.22, confirmando la formación de dímeros dinucleares en el estado sólido.

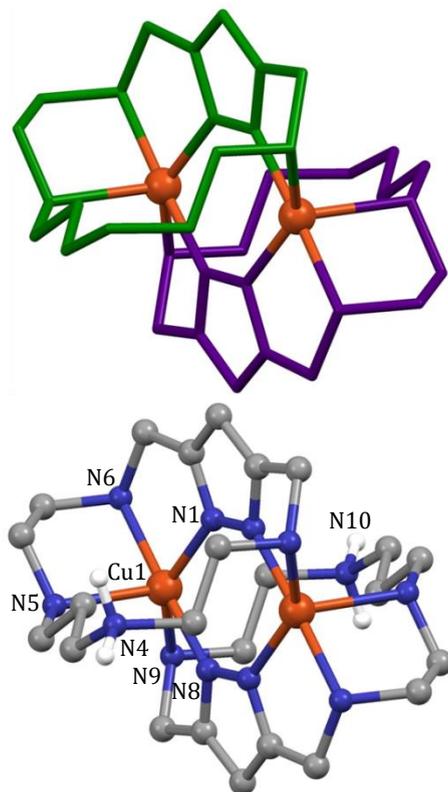


Figura 6.22. Estructura cristalina del catión del complejo **1**. Los átomos de hidrógeno se han omitido, a excepción de los hidrógenos de las aminas protonadas. Macrociclos, en verde y morado. Hidrógeno, en blanco. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Cobre, en naranja.

La estructura cristalina **1** se corresponde con la especie dinuclear $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$, determinada mediante valoraciones potenciométricas, la cual predomina en el intervalo de pH 4–7 (Figura 6.18).

Los dos átomos de cobre presentan un entorno de coordinación idéntico. Ambos centros adoptan una geometría de coordinación que se encuentra entre pirámide de base cuadrada y bipirámide trigonal, como se deduce del parámetro de Addison calculado ($\tau = 0.54$).^[17]

Cada átomo de cobre se encuentra coordinado a dos átomos de nitrógeno pertenecientes a unidades pirazolato de distintos macrociclos (N1 y N8), y a dos aminas contiguas a dichas unidades pirazolato, y por lo tanto también pertenecientes a distintos macrociclos (N6 y N9). Los dos átomos de cobre completan la coordinación con una amina de la parte central de la cadena poliamínica, procedente de distintos macrociclos (N5), pues para cada uno de los macrociclos la otra de las aminas centrales de la cadena poliamínica se encuentra protonada y no participa en la coordinación (N4 y N10).

En la Tabla 6.6 se presentan las distancias y los ángulos de enlace que se han seleccionado para la estructura cristalina **1**. Los datos cristalográficos de la estructura se encuentran resumidos en el Anexo C.

Tabla 6.6. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina **1**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu1 - N6	2.071(3)	N6 - Cu1 - N1	81.7(1)
Cu1 - N1	1.938(2)	N6 - Cu1 - N8	177.8(1)
Cu1 - N8	1.935(3)	N6 - Cu1 - N9	102.7(1)
Cu1 - N9	2.129(2)	N6 - Cu1 - N5	83.1(1)
Cu1 - N5	2.243(3)	N1 - Cu1 - N8	96.2(1)
		N1 - Cu1 - N9	145.5(1)
		N1 - Cu1 - N9	110.6(1)
		N8 - Cu1 - N4	78.7(1)
		N8 - Cu1 - N5	98.2(1)
		N9 - Cu1 - N5	104.0(1)

*Estructura cristalina $[Cu_2(H_1L2)_2](Cl)_2 \cdot 2.5H_2O$ (**2**)*

La evaporación lenta de una disolución acuosa de las mismas características que la anterior pero a pH 10, permitió la obtención de monocristales y la resolución de la estructura cristalina **2**, que también es un complejo dinuclear dímero, la cual se representa en la Figura 6.23.

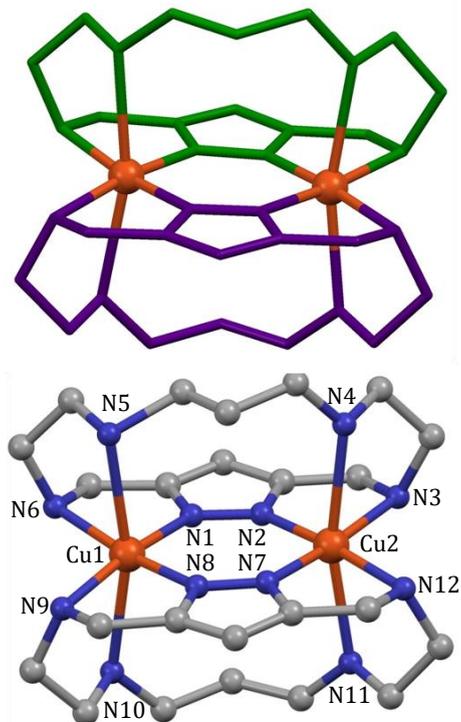


Figura 6.23. Estructura cristalina del catión del complejo **2**. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Macrociclos, en verde y morado. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Cobre, en naranja.

La estructura cristalina **2** se corresponde con la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]^{2+}$, determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.18), y mediante espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 6.5), la cual predomina a partir de pH 10.

En la estructura, ninguna de las aminas de la cadena se encuentra protonada, y como consecuencia de ello todas participan en la coordinación con el cobre. Esto da lugar a una geometría de coordinación octaédrica con una marcada distorsión axial Jahn-Teller para ambos centros metálicos, lo que coincide con la información deducida de los estudios de espectroscopia de absorción UV-visible (Figura 6.21), en los que se observa una disminución de la banda de absorción del cobre(II) que coincide con la formación de las especies dinucleares $[\text{Cu}_2\text{H}_1\text{L}_2]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]^{2+}$, que se había atribuido a la formación de complejos octaédricos con distorsión Jahn-Teller.^[16]

Para ambos átomos de cobre, el plano ecuatorial se encuentra definido por dos nitrógenos pertenecientes a unidades pirazolato de distintos macrociclos, y por dos nitrógenos pertenecientes a aminas contiguas a las unidades pirazolato, y por lo tanto procedentes de distintos macrociclos. Las posiciones axiales están ocupadas por dos nitrógenos de dos de las aminas de la parte central de la cadena poliamínica, cada una de ellas procedente de distintos macrociclos.

Los dos átomos de cobre no son equivalentes, pues presentan un entorno de coordinación ligeramente distinto, como se puede deducir de las distancias y ángulos de enlace que se han seleccionado para la estructura cristalina **2**, que se presentan en la Tabla 6.7. Los datos cristalográficos de la estructura se encuentran resumidos en el Anexo C.

Tabla 6.7. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina 2.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu1 - N6	2.090(5)	N6 - Cu1 - N1	81.4(2)
Cu1 - N1	1.933(5)	N6 - Cu1 - N8	172.7(2)
Cu1 - N8	1.937(5)	N6 - Cu1 - N9	101.8(2)
Cu1 - N9	2.082(5)	N6 - Cu1 - N5	78.2(2)
Cu1 - N5	2.612(7)	N6 - Cu1 - N10	90.9(2)
Cu1 - N10	2.600(5)	N1 - Cu1 - N8	96.4(2)
Cu2 - N3	2.082(5)	N1 - Cu1 - N9	172.5(2)
Cu2 - N2	1.929(4)	N1 - Cu1 - N5	92.4(2)
Cu2 - N7	1.925(5)	N1 - Cu1 - N10	95.0(2)
Cu2 - N12	2.108(5)	N8 - Cu1 - N9	81.3(2)
Cu2 - N4	2.565(6)	N8 - Cu1 - N5	95.0(2)
Cu2 - N11	2.503(5)	N8 - Cu1 - N10	96.2(2)
		N9 - Cu1 - N5	94.9(2)
		N9 - Cu1 - N10	78.2(2)
		N5 - Cu1 - N10	165.8(2)
		N3 - Cu2 - N2	81.7(2)
		N3 - Cu2 - N7	174.9(2)
		N3 - Cu2 - N12	101.1(2)
		N3 - Cu2 - N4	78.3(2)
		N3 - Cu2 - N11	92.7(2)
		N2 - Cu2 - N7	96.6(2)
		N2 - Cu2 - N12	175.2(2)
		N2 - Cu2 - N4	92.6(2)
		N2 - Cu2 - N11	96.8(2)
		N7 - Cu2 - N12	81.0(2)
		N7 - Cu2 - N4	97.1(2)
		N7 - Cu2 - N11	92.3(2)
		N12 - Cu2 - N4	91.9(2)
		N12 - Cu2 - N11	79.2(2)
		N4 - Cu2 - N11	166.0(2)

Relaciones molares Cu(II):L de orden superior

Como se ha mencionado, los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L2 presentan un comportamiento similar, formando especies de estequiometría Cu(II):L 4:2, sin haber sido posible detectar la formación de especies de estequiometría Cu(II):L 3:2. En cambio, el sistema Cu(II)-L3 exhibe un comportamiento distinto, formando dos especies de estequiometría Cu(II):L 3:2, sin haber sido posible la formación de especies de estequiometría Cu(II):L 4:2. Por este motivo, el tratamiento de los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L2 se realizará conjuntamente, mientras que el tratamiento del sistema Cu(II)-L3 se realizará por separado.

En la Figura 6.24 se presentan los diagramas de distribución de especies para los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L2, calculados para la relación molar Cu(II):L 2:1, obtenidos mediante el software HySS empleando los datos de la Tabla 6.4.

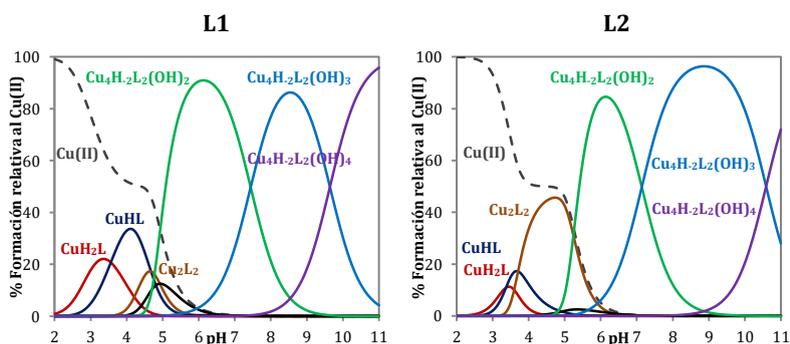


Figura 6.24. Diagrama de distribución de especies para los sistemas Cu(II)-L1 y Cu(II)-L2. $[L] = 10^{-3}$ M. $[Cu(II)] = 2 \cdot 10^{-3}$ M.

La complejación del cobre se inicia a pH 2, lo que pone de manifiesto la gran capacidad complejante de **L1** y **L2**. La formación de las especies tetranucleares se inicia a pH 4, las cuales predominan a partir de pH 5 en todo el intervalo de pH disponible para las valoraciones potenciométricas. En el caso de **L1**, para valores de pH inferiores a 5 predominan las dos especies mononucleares $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ y $[\text{CuHL}]^{3+}$, mientras que para **L2** lo hace la especie dinuclear $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$. No obstante, el porcentaje de formación de tales especies es menor que el de las especies tetranucleares (Figura 6.24).

En la Figura 6.25 se presenta el diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)–**L3**, calculado para la relación molar Cu(II):L 3:2, obtenido mediante el software HySS empleando los datos de la Tabla 6.4. La complejación del cobre no se inicia hasta pH 4, evidenciando la menor capacidad complejante de **L3**, mientras que la formación de las especies trinucleares se inicia a pH 6. De la misma manera que sucede para la relación molar Cu(II):L 1:1, la formación de la especie mononuclear $[\text{CuHL}]^{3+}$ se produce en mayor medida que para los dos sistemas Cu(II)–**L1** y Cu(II)–**L2**.

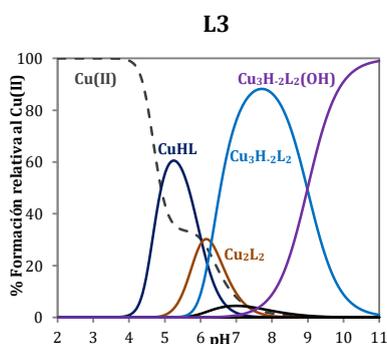


Figura 6.25. Diagrama de distribución de especies para el sistema Cu(II)–**L3**. $[\text{L}] = 10^{-3} \text{ M}$. $[\text{Cu(II)}] = 1.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

No obstante, en este caso, para ninguno de los sistemas fue posible detectar la formación de especies de dichas estequiometrías mediante el empleo de otras técnicas, tales como la espectrometría de masas de alta resolución o la resonancia electrónica paramagnética, así como mediante la obtención de monocristales apropiados para la difracción de rayos X.

En cambio, sí fue posible la obtención de monocristales y la resolución de estructuras cristalinas de estequiometría Cu(II):L 3:2 y 4:2 para el macrociclo **PZ333**, del que se ha hablado en la sección *Introducción*. Los estudios previos realizados con este macrociclo evidenciaron que, las disoluciones acuosas básicas que contienen **PZ333** y cobre(II) en relación molar Cu(II):L 3:2 presentan una capacidad extraordinaria para la captación de dióxido de carbono del ambiente, incorporándolo en su estructura como carbonato, dando lugar a la formación de un complejo ternario muy estable, en disolución acuosa y en el estado sólido.^[6]

Con el objetivo de estudiar la captación de distintos compuestos carboxílicos, se preparó una serie de cristalizadores que contenían el ligando **PZ333** y cobre(II) en la relación molar Cu(II):L 3:2, y posteriormente sobre estas disoluciones se añadió un equivalente de distintos ácidos carboxílicos, tales como ácido oxálico, ácido málico o ácido fumárico, entre otros. En todos los casos se obtuvieron monocristales cuya resolución dio lugar a la estructura cristalina que incorporaba carbonato, evidenciando preferencia por la captación de dióxido de carbónico del ambiente en lugar de la captación del correspondiente ácido carboxílico presente en la disolución, a excepción del caso del ácido oxálico, para el que se obtuvo una estructura cristalina que incorpora oxalato, la cual se discute a continuación (Figura 6.26).

*Estructura cristalina $[Cu_3(H_1PZ333)_2(C_2O_4)(H_2O)](ClO_4)_2 \cdot 3H_2O$ (**3**)*

En la Figura 6.26 se presenta la estructura cristalina **3**, la cual está constituida por dos macrociclos **PZ333** y tres átomos de cobre(II), y que incorpora una molécula de oxalato y una molécula de agua.

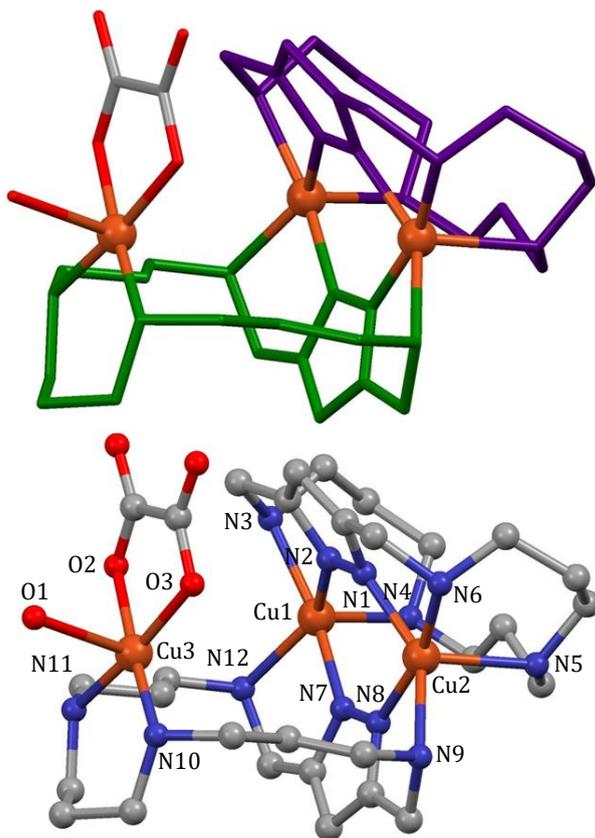


Figura 6.26. Estructura cristalina del catión del complejo **3**. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Macrociclos, en verde y morado. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Cobre, en naranja.

Los átomos de cobre Cu1 y Cu2 presentan una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada, si bien se encuentra bastante distorsionada ($\tau = 0.40$ y $\tau = 0.33$, respectivamente). Ambos átomos se encuentran coordinados a dos nitrógenos pertenecientes a unidades pirazolato de distintos macrociclos, y a dos aminas contiguas a las unidades pirazolato, y por lo tanto pertenecientes a distintos macrociclos. Ambos átomos de cobre completan la coordinación con una amina de la parte central de la cadena poliamínica, en ambos casos procedente del mismo macrociclo. En cambio, el átomo de cobre Cu3 está coordinado a las dos aminas de la parte central del otro macrociclo (N10 y N11), a un átomo de oxígeno de una molécula de agua (O1), y a dos átomos de oxígeno de la molécula de oxalato (O2 y O3), lo que da lugar a una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada, prácticamente sin distorsión ($\tau = 0.05$). Los datos cristalográficos, así como las distancias de enlace y ángulos de enlace que se han seleccionado para la estructura cristalina **3** se encuentran resumidos en el Anexo C.

En cambio, si se adiciona un equivalente de cobre(II) más sobre una disolución acuosa básica que contiene el macrociclo **PZ333** y cobre(II) en relación molar Cu(II):L 3:2, se obtienen monocristales cuya estructura cristalina se corresponde con la de una caja metal-orgánica [4+2] de cobre(II) (Figura 6.27). En cambio, si se adiciona paladio(II) sobre este sistema tiene lugar una reacción de transmetalación, obteniendo una caja metal-orgánica [4+2] mixta de paladio(II) y de cobre(II) (Figura 6.28).

*Estructura cristalina $[Cu_4(H_1PZ333)_2(OH)_2Br](ClO_4)_3$ (**4**)*

En la Figura 6.27 se presenta la estructura cristalina **4**, que se corresponde con la de una caja metal-orgánica [4+2], la cual está constituida por dos macrociclos **PZ333** y por cuatro átomos de cobre(II). Los datos cristalográficos, así como las distancias y ángulos de enlace que se han seleccionado para la estructura cristalina **4** se encuentran resumidos en el Anexo C.

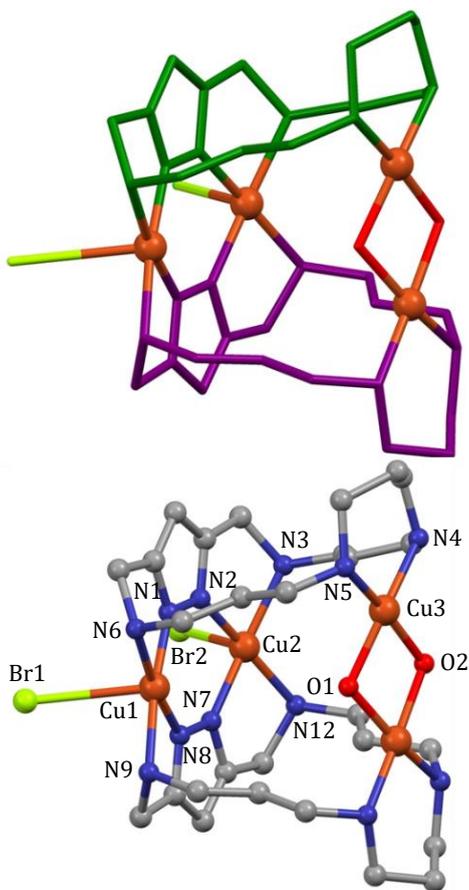


Figura 6.27. Estructura cristalina del catión del complejo **4**. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Macrociclos, en verde y morado. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Bromuro, en amarillo. Cobre, en naranja.

Los átomos Cu1 y Cu2 exhiben una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada perfecta ($\tau = 0$). El entorno de coordinación es similar para ambos centros metálicos. La base de la pirámide está definida por dos átomos de nitrógeno pertenecientes a unidades pirazolato de distintos macrociclos, y por dos nitrógenos de dos aminas secundarias contiguas a las unidades de pirazol, mientras que la posición axial está ocupada por un bromuro. Los otros dos átomos de cobre son idénticos (Cu3), presentando las mismas distancias y ángulos de enlace. Ambos centros metálicos adoptan una geometría cuadrado plana, están conectados por dos puentes hidroxilo y completan la coordinación con dos aminas de la parte central de la cadena poliamínica, que pertenecen al mismo macrociclo.

Los bromuros actúan como puentes interconectando varias unidades, lo que da lugar a la formación de un polímero de coordinación unidimensional en forma de zig-zag (Figura 6.28).

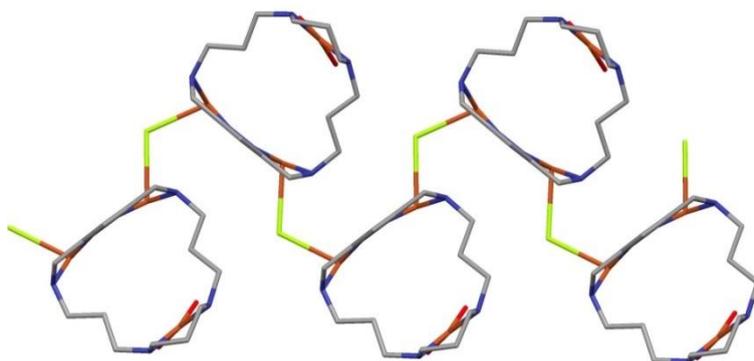


Figura 6.28. Estructura en zig-zag del polímero de coordinación formado por varias unidades interconectadas del catión del complejo 4. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Bromuro, en amarillo. Cobre, en naranja.

Estructura cristalina [Cu₂Pd₂(H₋₁-PZ333)₂(OH)₂Cl](ClO₄)₂(Cl)·2.5H₂O (5)

En la Figura 6.29 se presenta la estructura cristalina **5**, análoga a la anterior, pero constituida por dos macrociclos **PZ333**, dos átomos de cobre(II) y dos átomos de paladio(II). Los datos cristalográficos, así como las distancias y ángulos de enlace que se han seleccionado para la estructura cristalina **5** se encuentran resumidos en el Anexo C.

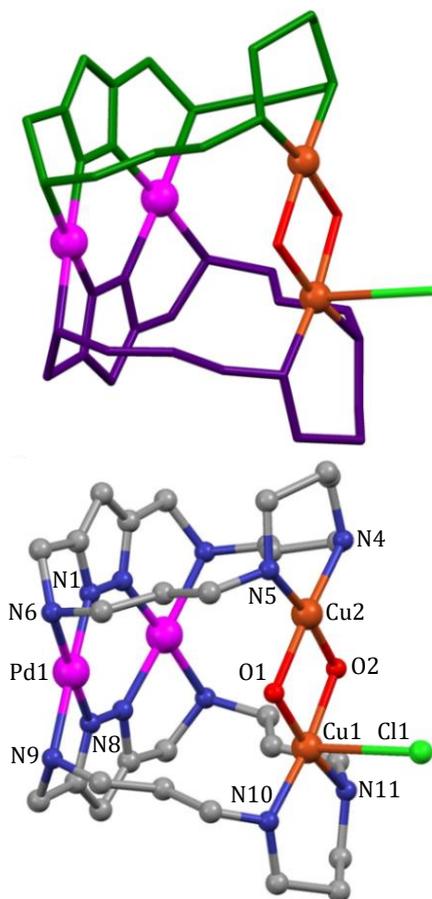


Figura 6.29. Estructura cristalina del catión del complejo **5**. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Macrociclos, en verde y morado. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Cloruro, en verde. Cobre, en naranja. Paladio, en magenta.

La adición de paladio(II) da lugar a una reacción de transmetalación, en la que el paladio(II), de carácter más blando que el cobre(II), lo desplaza hacia las posiciones de coordinación más duras del macrociclo, que son las aminas de la cadena poliamínica.

Los dos átomos de paladio son equivalentes, adoptando una geometría cuadrado plana en la que cada uno de los átomos de paladio está coordinado a dos átomos de nitrógeno de unidades pirazolato de distintos macrociclos, completando la coordinación con dos aminas secundarias contiguas a las unidades de pirazol. Los dos átomos de cobre se encuentran pentacoordinados, presentando una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada perfecta ($\tau = 0$). Ambos metales están conectados a través de dos puentes hidroxilo, completando la base de la pirámide con dos aminas secundarias de la parte central de la misma cadena, mientras que la posición axial está ocupada por un cloruro, que actúa como puente entre dos cajas que se encuentran enfrentadas (Figura 6.30).

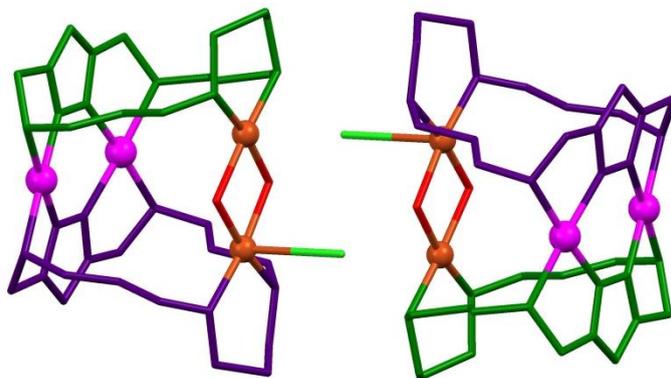


Figura 6.30. Dos unidades del catión del complejo **5** enfrentadas. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Macrociclos, en verde y morado. Oxígeno, en rojo. Cloruro, en verde. Cobre, en naranja. Paladio, en magenta.

Estructuras cristalinas $[Cu_7(H_1L2)_2(OH)_6(H_2O)_5(Cl)_3](ClO_4)_{2.5}(Br)_{0.5} \cdot 2H_2O$ (**6**) y $[Cu_9(H_1L2)_2(CO_3)_4(OH)_6(H_2O)_4](ClO_4)_2 \cdot 5H_2O$ (**7**)

Cuando se preparan cristalizadores que contienen disoluciones acuosas básicas de **L2** y cobre(II) en relaciones molares Cu(II):L 3:2 y 2:1 se obtienen estructuras cristalinas que contienen siete y nueve átomos de cobre en su estructura por cada dos macrociclos, respectivamente. Este comportamiento es distinto al que se deduce de los estudios en disolución acuosa, además de discrepar con el comportamiento en estado sólido que se ha descrito para el macrociclo **PZ333**.

En la Figura 6.31 se presenta la estructura cristalina **6**, la cual está constituida por siete átomos de cobre y dos unidades del macrociclo **L2**, además la estructura contiene seis puentes hidroxilo, tres cloruros y cinco moléculas de agua.

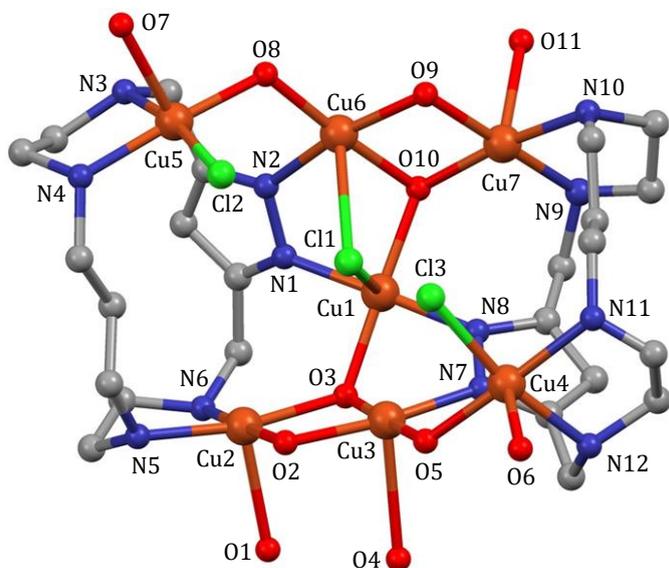


Figura 6.31. Estructura cristalina del catión del complejo **6**. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Cloruro, en verde. Cobre, en naranja.

Los siete átomos de cobre de la estructura presentan una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada, presentando mayor o menor distorsión dependiendo de cada caso, con valores del parámetro de Addison comprendidos en el intervalo 0.10–0.21. En la estructura se pueden distinguir cinco entornos de coordinación, los cuales se presentan en la Figura 6.32.

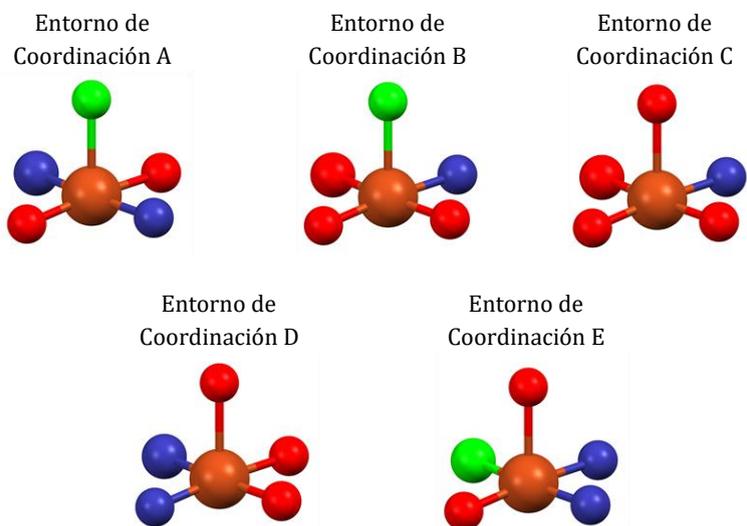


Figura 6.32. Entornos de coordinación de los átomos de cobre presentes en la estructura cristalina 6. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Cloruro, en verde. Cobre, en naranja.

El átomo de cobre central (Cu1) presenta el entorno de coordinación A, y actúa como puente entre los dos macrociclos que constituyen la estructura mediante la coordinación a dos átomos de nitrógeno de unidades pirazolato de distintos macrociclos (N1 y N8). La coordinación la completa con dos oxígenos (O3 y O10) y un cloruro (Cl1), que ocupa la posición axial de la pirámide.

El átomo Cu6 presenta el entorno de coordinación B, mientras que el Cu3 presenta el entorno de coordinación C. La base de la pirámide es similar para ambos entornos, la cual está constituida por el otro nitrógeno de las unidades de pirazol y tres hidroxos, los cuales actúan como puente entre los distintos átomos de cobre que contiene la estructura. En cambio, en el entorno B la posición axial está ocupada por el cloruro (Cl1), el cual comparte con el átomo de cobre central Cu1, mientras que en el entorno C la posición axial está ocupada por un átomo de oxígeno procedente de una molécula de agua (O4).

Los átomos Cu2 y Cu7 presentan el entorno de coordinación D. La base de la pirámide está constituida por un nitrógeno de una amina contigua a la unidad de pirazol (N6 y N9, respectivamente) y un nitrógeno de una amina de la parte central de la cadena (N5 y N10, respectivamente), y por dos hidroxos que actúan como puente entre distintos centros metálicos. La posición axial está ocupada por un átomo de oxígeno perteneciente a una molécula de agua (O1 y O11, respectivamente).

Finalmente, los átomos Cu4 y Cu5 presentan el entorno de coordinación E. La base de la pirámide, al igual que en el entorno D, está constituida por una amina contigua a la de unidad pirazol (N12 y N3, respectivamente) y una amina de la parte central de la cadena poliamínica (N11 y N4, respectivamente). Sin embargo, en este caso ambos centros metálicos completan la coordinación con un hidroxos que actúa como puente entre los distintos átomos de cobre (O5 y O8, respectivamente) y un cloruro (Cl3 y Cl2, respectivamente). La posición axial, al igual que en los entornos de coordinación C y D, está ocupada por un átomo de oxígeno perteneciente a una molécula de agua (O6 y O7, respectivamente).

En la Figura 6.33 se presenta la estructura cristalina **7**, que está constituida por nueve átomos de cobre y dos unidades del macrociclo **L2**, además de cuatro moléculas de carbonato, cuatro moléculas de agua y seis puentes hidroxilo. Esta estructura cristalina es similar a las estructuras que se conocen como *pillarplexes*, las cuales se encuentran descritas en la bibliografía, y que pueden estar constituidas por ocho átomos metálicos y dos macrociclos.^[18]

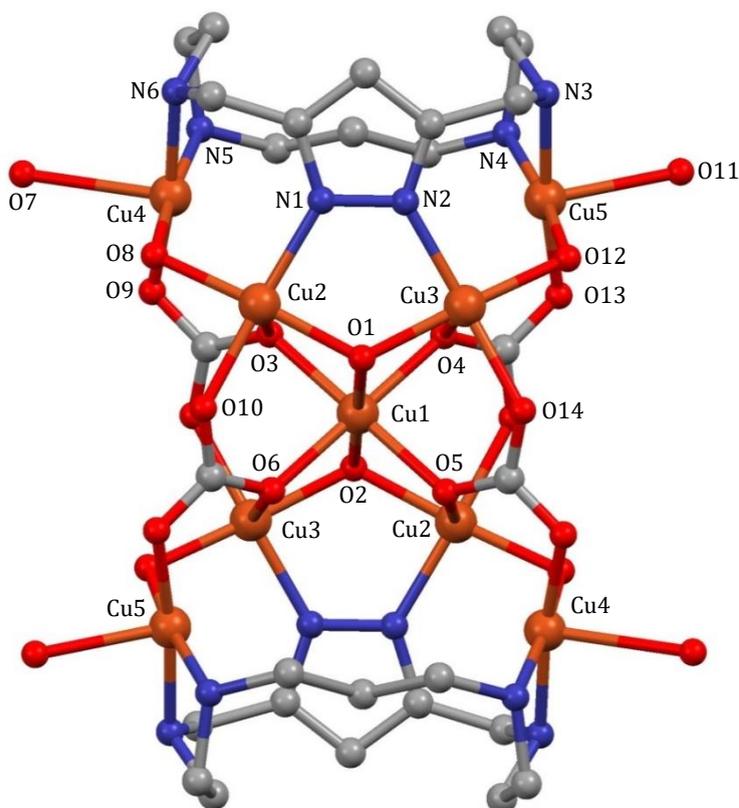


Figura 6.33. Estructura cristalina del catión del complejo **7**. Los átomos de hidrógeno se han omitido. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Cloruro, en verde. Cobre, en naranja.

El átomo de cobre central (Cu1) presenta una geometría de coordinación octaédrica, mientras que el resto de átomos de cobre (Cu2–Cu5) presentan una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada, con distinto grado de distorsión, dependiendo del centro metálico. En realidad se trata de una estructura simétrica, en la que se distinguen tres entornos de coordinación, los cuales se presentan en la Figura 6.34.



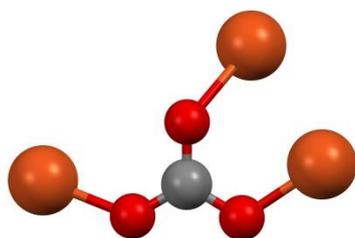
Figura 6.34. Entornos de coordinación de los átomos de cobre presentes en la estructura cristalina 7. Nitrógeno, en azul. Oxígeno, en rojo. Cobre, en naranja.

El átomo de cobre central (Cu1) presenta el entorno de coordinación F. El plano ecuatorial está ocupado por cuatro átomos de oxígeno, cada uno de ellos perteneciente a una de las cuatro moléculas de carbonato que incorpora la estructura (O1, O2, O3 y O4). Las posiciones axiales están ocupadas por dos átomos de oxígeno, no obstante en este caso pertenecen a dos grupos hidroxilo (O5 y O6), los cuales actúan como puente con los átomos de cobre que presentan el entorno de coordinación G.

Los átomos Cu2 y Cu3 presentan el entorno de coordinación G. La base de la pirámide está constituida por uno de los nitrógenos pertenecientes a una de las unidades de pirazol y por tres átomos de oxígeno, dos de ellos pertenecen a grupos hidroxilo que actúan como puentes entre distintos centros metálicos, y el otro pertenece a una molécula de carbonato. La posición axial también está ocupada por un átomo de oxígeno de una de las moléculas de carbonato.

Finalmente, los átomos Cu4 y Cu5 presentan el entorno de coordinación H. La base de la pirámide está constituida por una amina contigua a una de las unidades de pirazol, una amina de la parte central de la cadena poliamínica y por dos átomos de oxígeno, uno de ellos perteneciente a un puente hidroxilo y el otro perteneciente a una de las moléculas de carbonato. La posición axial está ocupada por un átomo de oxígeno que pertenece a una molécula de agua.

Las cuatro moléculas de carbonato que incorpora la estructura adoptan el modo de coordinación trinuclear $\mu_3 - CO_3$,^[19] el cual se representa en la Figura 6.35, en el que cada molécula de carbonato se encuentra coordinada a tres átomos de cobre distintos.



Modo de Coordinación $\mu_3 - CO_3$

Figura 6.35. Modo de coordinación de las moléculas de carbonato presentes en la estructura cristalina 7. Carbono, en gris. Oxígeno, en rojo. Cobre, en naranja.

La presencia de carbonato en la estructura se debe seguramente a la captación de dióxido de carbono atmosférico, y su posterior incorporación a la estructura a modo de carbonato, lo que resulta particularmente interesante. Esta hipótesis se sugiere en base a los antecedentes experimentales que se han descrito anteriormente para el macrociclo **PZ333**, análogo a **L2**, y que presenta una gran capacidad para la captación de dióxido de carbono atmosférico.^[6] Además, la preparación de las disoluciones se realizó empleado como disolvente H₂O ultrapura, lo que descarta la posibilidad de presencia de carbonato en el medio.

Poliaminas L4-L5
Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.8 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, determinados mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.8. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L4	L5
$\text{Cu} + \text{L} + 4\text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_4\text{L}^{\text{a}}$	-	43.71(3)
$\text{Cu} + \text{L} + 3\text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_3\text{L}$	38.06(5) ^b	38.97(4)
$\text{Cu} + \text{L} + 2\text{H} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L}$	34.82(2)	34.42(1)
$\text{Cu} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	30.75(5)	28.21(2)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	22.67(7)	19.23(3)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_{-1}\text{L} + \text{H}$	-	8.62(3)
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	30.58(6)	28.00(4)
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L} + \text{H}$	26.65(3)	23.20(1)
$2\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L} + 2\text{H}$	16.57(6)	11.95(4)
$\text{CuL} + \text{Cu} \rightleftharpoons \text{Cu}_2\text{L}$	7.91(7)	8.77(3)

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa.

Los dos sistemas presentan un comportamiento similar, formando especies Cu(II):L de estequiometría 1:1 y 2:1, lo que coincide con el comportamiento descrito para ligandos análogos pero constituidos por una unidad de piridina como espaciador aromático.^[20] Sin embargo, este comportamiento discrepa con el que presentan las poliaminas **L1-L3**, las cuales tienen dos grupos amino menos en su estructura, circunstancia que seguramente dé lugar a esta discrepancia en cuanto a comportamientos.

Para la relación molar Cu(II):L 1:1 se detecta la formación de especies que responden a la fórmula general $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(x+2)+}$. En el caso del sistema Cu(II)-**L4** se forman cuatro especies, con grados de protonación comprendidos entre 0 y 3, mientras que en el caso del sistema Cu(II)-**L5** se forman seis especies, con grados de protonación comprendidos entre 0 y 4, además de una especie adicional monodesprotonada $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$.

Para la relación molar Cu(II):L 2:1 ambos sistemas presentan un comportamiento similar, formando especies de estequiometría Cu(II):L 2:1 que responden a la fórmula general $[\text{Cu}_2\text{H}_x\text{L}]^{(x+4)+}$. En ambos casos se detecta la formación de las tres mismas especies dinucleares: $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$, $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}]^{3+}$ y $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$.

A continuación, se procede a la discusión de la química de coordinación de los sistemas Cu(II)-**L4** y Cu(II)-**L5** en disolución acuosa, para las relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1.

Relación molar Cu(II):L 1:1

En la Figura 6.36 se representa el pCu en función del pH para los dos sistemas, lo que permite comparar simultáneamente la estabilidad de ambos sistemas. Como se observa, el sistema Cu(II)-L4 da lugar a la formación de los complejos más estables, a pesar de que el número de complejos formados es menor. La menor estabilidad del sistema Cu(II)-L5 se puede atribuir a la mayor flexibilidad de la poliamina que constituye el macrociclo, en comparación con L4, lo que hace que L5 se encuentre menos preorganizado. Además, L4 está constituido por cadenas etilénicas y propilénicas alternadas, lo que da lugar a la formación de anillos quelatos con cobre(II) de cinco y seis miembros, situación más favorable que la que tiene lugar con L5, el cual está constituido por cadenas propilénicas y da lugar exclusivamente a la formación de anillos quelatos de seis miembros.^[15]

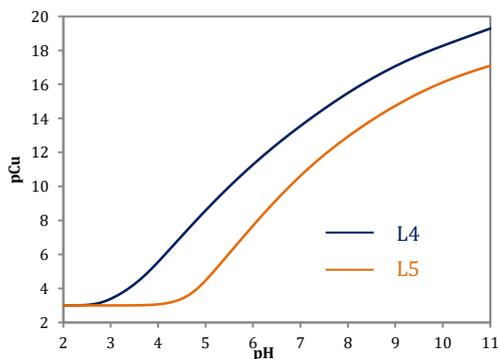


Figura 6.36. Representación del pCu en función del pH para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. $[L] = [Cu(II)] = 10^{-3} M$.

En la Figura 6.37 se presentan los diagramas de distribución de especies para los dos sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.8.

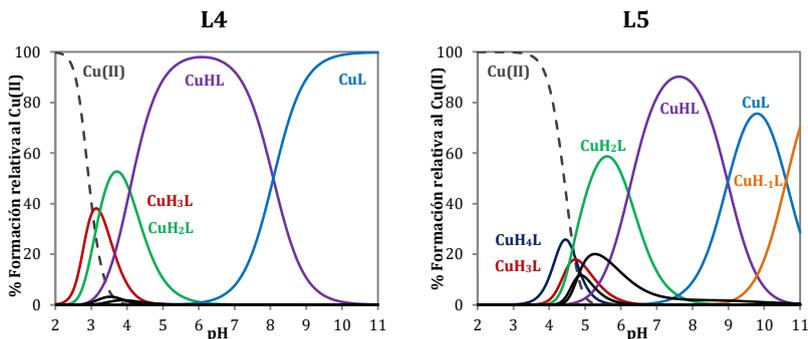


Figura 6.37. Diagrama de distribución para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5. $[L] = [Cu(II)] = 10^{-3} M$.

Aunque ambos sistemas dan lugar a la formación de especies análogas de estequiometría Cu(II):L 1:1, el perfil de los diagramas de distribución es distinto. Para el sistema Cu(II)-L4 la formación de especies de cobre comienza a pH 2, y a partir de pH 4 todo el cobre se encuentra complejado, predominando las especies $[CuHL]^{3+}$ y $[CuL]^{2+}$. En cambio, para el sistema Cu(II)-L5 la complejación del cobre no comienza hasta valores de pH próximos a 4, evidenciando una menor capacidad para la complejación del cobre. La formación de las dos primeras especies, $[CuH_4L]^{6+}$ y $[CuH_3L]^{5+}$, tiene lugar a pH ácido y se produce en menor medida, en comparación con el resto. Las especies protonadas $[CuH_2L]^{4+}$ y $[CuHL]^{3+}$ predominan en el intervalo de pH 5-9, mientras que las especies $[CuL]^{2+}$ y $[CuH_{.1}L]^+$ coexisten a partir de pH 9 (Figura 6.37).

Espectrometría de masas de alta resolución

Para ambos sistemas, la formación de complejos mononucleares de estequiometría Cu(II):L 1:1 fue confirmada mediante espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 6.9). La correlación obtenida entre las distribuciones isotópicas experimentales y teóricas fue excelente (ver Anexo B).

Tabla 6.9. Picos m/z experimentales y teóricos de las especies mononucleares monómeras detectadas para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Especie	L4		L5	
	detectado	teórico	detectado	teórico
[CuL] ²⁺	214.6258	214.6252	228.6411	228.6401
[CuL(Cl)] ⁺	464.2193	464.2199	492.2513	492.2512
[CuL(ClO ₄)] ⁺	528.1984	528.1995	556.2309	556.2308
[CuH ₋₁ L] ⁺	-	-	456.2742	456.2745

En los dos sistemas se pudo detectar la formación de las tres mismas especies: [CuL]²⁺, [CuL(Cl)]⁺ y [CuL(ClO₄)]⁺. Estas especies son variantes de la especie [CuL]²⁺, que fue determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.37). Además, para el sistema Cu(II)-L5 se pudo detectar la formación de la especie [CuH₋₁L]⁺, que también fue determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.37).

Relación molar Cu(II):L 2:1

En la Figura 6.38 se representa el pCu en función del pH para los dos sistemas, para la relación molar Cu(II):L 2:1. Al igual que para la relación molar Cu(II):L 1:1 (Figura 6.36), el sistema Cu(II)-L4 da lugar a la formación de los complejos más estables, evidenciando la mayor capacidad de L4 para la complejación del cobre también para relaciones molares Cu(II):L 2:1. La explicación de la diferencia de estabilidad entre sistemas sería la misma que la que se ha dado anteriormente en la discusión de resultados para la relación molar Cu(II):L 1:1, siendo una consecuencia directa de la diferencia estructural de ambas poliaminas.

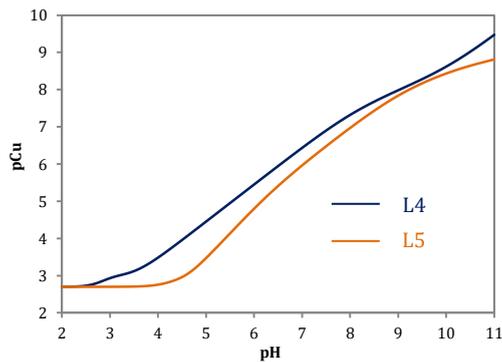


Figura 6.38. Representación del pCu en función del pH para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. [L] = 10⁻³ M. [Cu(II)] = 2·10⁻³ M.

En la Figura 6.39 se presentan los diagramas de distribución de especies para los dos sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.8.

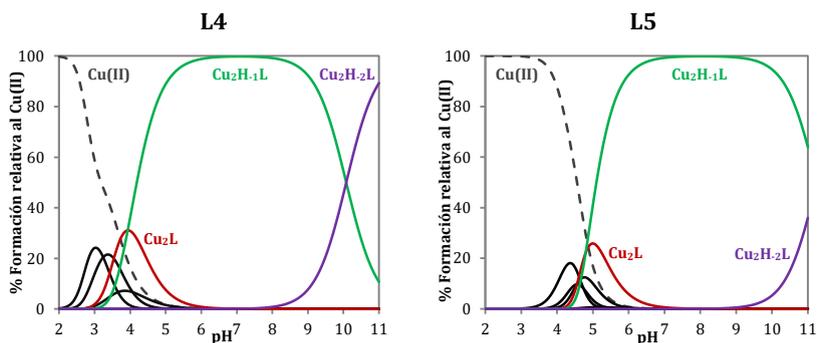


Figura 6.39. Diagrama de distribución para los sistemas Cu(II)-**L4** y Cu(II)-**L5**.
 $[L] = 10^{-3}$ M. $[Cu(II)] = 2 \cdot 10^{-3}$ M.

Los dos sistemas presentan diagramas de distribución con un perfil muy parecido, si bien la formación de complejos dinucleares para el sistema Cu(II)-**L4** empieza a pH 3, mientras que para el sistema Cu(II)-**L5** lo hace a pH 4, lo cual es consecuencia de la mayor capacidad complejante de **L4**. No obstante, en ambos sistemas predomina la especie dinuclear $[Cu_2H_{-1}L]^{3+}$, mientras que la formación de las otras dos especies dinucleares tiene lugar en menor medida (Figura 6.39).

Espectrometría de masas de alta resolución

La formación de complejos dinucleares de estequiometría Cu(II):L 2:1 también fue confirmada mediante espectrometría de masas de alta resolución para ambos sistemas (Tabla 6.9). La correlación obtenida entre las distribuciones isotópicas experimentales y teóricas fue excelente (ver Anexo B).

Tabla 6.10. Picos m/z experimentales y teóricos de las especies dinucleares monómeras detectadas para los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Especie	L4		L5	
	detectado	teórico	detectado	teórico
$[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}(\text{Cl})]^{2+}$	263.0712	263.0705	277.0871	277.0862
$[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}(\text{ClO}_4)]^{2+}$	295.0610	295.0604	309.0775	309.0760
$[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$	245.0833	245.0822	259.0992	259.0979
$[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}(\text{Cl})]^+$	525.1331	525.1338	553.1654	553.1651
$[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}(\text{ClO}_4)]^+$	589.1125	589.1135	617.1452	617.1448

En ambos sistemas se detecta la formación de las mismas cinco especies dinucleares de cobre. Las especies monodesprotonadas $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}(\text{Cl})]^{2+}$ y $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}(\text{ClO}_4)]^{2+}$ se corresponden con la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L}]^{3+}$, que fue determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.39). En cambio, las especies $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$, $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}(\text{Cl})]^+$ y $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}(\text{ClO}_4)]^+$ se corresponden con la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$, que también fue determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.39).

6.2.2. Ligandos de tipo escorpiando

Poliaminas L6-L8

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.11 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu(II)-L6, Cu(II)-L7 y Cu(II)-L8, determinados mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.11. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu(II)-L6, Cu(II)-L7 y Cu(II)-L8, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L6	L7	L8
$\text{Cu} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}^{\text{a}}$	18.27(1) ^b	17.29(1)	19.30(2)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	12.20(1)	10.99(2)	13.51(2)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_1\text{L} + \text{H}$	4.07(2)	1.83(3)	3.38(3)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuH}_2\text{L} + 2\text{H}$	-6.38(5)	-	-

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa.

Los sistemas Cu(II)-L7 y Cu(II)-L8 presentan un comportamiento similar, dando lugar a la formación de las especies mononucleares $[\text{CuHL}]^{3+}$, $[\text{CuL}]^{2+}$ y $[\text{CuH}_1\text{L}]^+$. En cambio, el sistema Cu(II)-L6 da lugar a la formación de una especie mononuclear adicional, $[\text{CuH}_2\text{L}]$. En cualquier caso, los tres sistemas dan lugar exclusivamente a la formación de especies mononucleares monómeras, comportamiento similar al que presentan ligandos análogos que incorporan en su estructura una unidad de piridina como espaciador aromático.^[8,9]

En la Figura 6.40 se representa el pCu para los tres sistemas en función del pH. Para valores de pH ácido no hay formación de complejos, por lo que no se puede comparar la estabilidad de los sistemas. En cambio, para valores de pH básico se observa la siguiente secuencia de estabilidad, ordenada de más estable a menos estable: **L6 > L8 > L7**.

La mayor estabilidad del sistema Cu(II)-**L6** se puede atribuir a la formación de la especie adicional $[CuH_2L]$, la cual se formará a valores de pH básico, lo que da lugar a una mayor capacidad complejante de **L6** a valores de pH básico. En cambio, la mayor estabilidad del sistema Cu(II)-**L8** con respecto al sistema Cu(II)-**L7** se puede atribuir a la presencia de la unidad de TPA en **L8**, que es un excelente dador de densidad electrónica, lo que da lugar a un enlace de coordinación más fuerte entre el cobre y la amina secundaria contigua a la unidad de TPA, en comparación con **L7**, similar a **L8** pero con una unidad de antraceno.

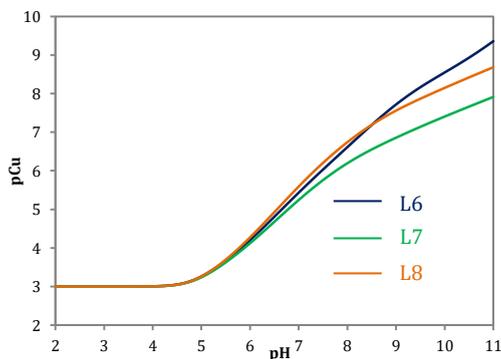


Figura 6.40. Representación del pCu en función del pH para los sistemas Cu(II)-**L6**, Cu(II)-**L7** y Cu(II)-**L8**, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. $[L] = [Cu(II)] = 10^{-3} M$.

En la Figura 6.41 se presentan los diagramas de distribución para los tres sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.11. Estos presentan un perfil distinto dependiendo del sistema, si bien en todos los casos la formación de los complejos de cobre comienza a partir de pH 4. En el sistema Cu(II)-L6, la especie $[\text{CuHL}]^{3+}$ es la primera en formarse, predominando en el intervalo de pH 4-6, mientras que las especies $[\text{CuL}]^{2+}$, $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$ y $[\text{CuH}_{-2}\text{L}]$ coexisten a valores de pH básico. En cambio, en el caso del sistema Cu(II)-L7 predomina la especie $[\text{CuL}]^{2+}$ en el intervalo de pH 6-9, mientras que la especie $[\text{CuH}_{-1}\text{L}]^+$ lo hace a partir de pH 9. Para el sistema Cu(II)-L8 también predomina la especie $[\text{CuL}]^{2+}$, en este caso en el intervalo de pH 6-10, siendo claramente la especie mayoritaria.

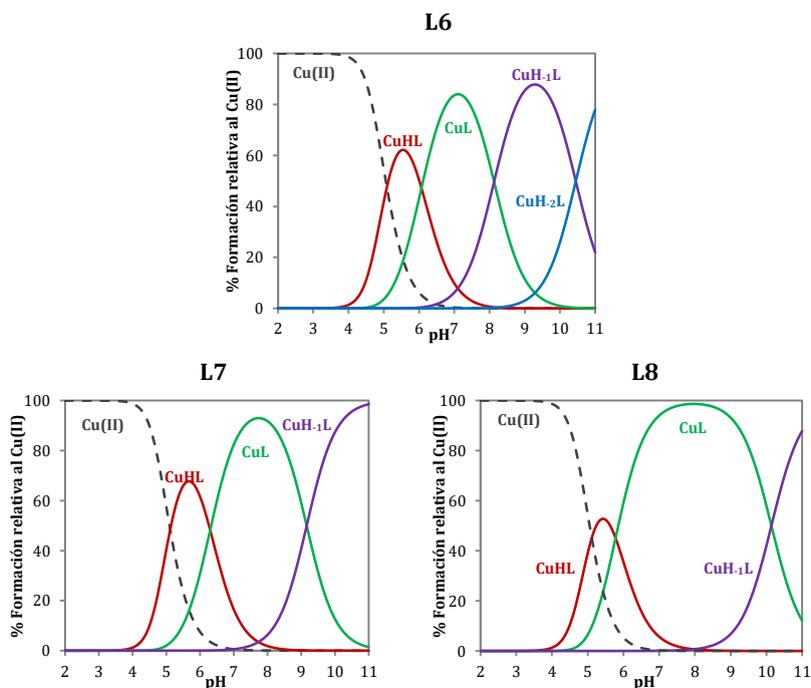


Figura 6.41. Diagrama de distribución para los sistemas Cu(II)-L6, Cu(II)-L7 y Cu(II)-L8. $[\text{L}] = [\text{Cu(II)}] = 10^{-3} \text{ M}$.

Espectrometría de masas de alta resolución

En los tres sistemas, se pudo confirmar la formación de especies mononucleares monómeras mediante espectrometría de masas de alta resolución (Tabla 6.12). La correlación obtenida entre distribuciones isotópicas experimentales y teóricas fue excelente (Anexo B).

Tabla 6.12. Picos m/z experimentales y teóricos de las especies mononucleares monómeras detectadas para los sistemas Cu(II)-L6, Cu(II)-L7 y Cu(II)-L8, mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Especie	L6		L7		L8	
	detectado	teórico	detectado	teórico	detectado	teórico
[CuL(Cl)] ⁺	336.0887	336.0885	526.1662	526.1668	593.2074	593.2090
[CuL(Br)] ⁺	380.0382	380.0380	570.1153	570.1162	-	-
[CuH ₋₁ L] ⁺	300.1119	300.1118	490.1898	490.1901	557.2307	557.2323

Para los tres sistemas se pudo detectar la formación de las especies mononucleares [CuL(Cl)]⁺ y [CuH₋₁L]⁺, las cuales se corresponden con las especies [CuL]²⁺ y [CuH₋₁L]⁺ determinadas mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.41). Adicionalmente, para los sistemas Cu(II)-L6 y Cu(II)-L8 se pudo detectar la formación de la especie [CuL(Cl)]⁺, que es una variante de la especie [CuL]²⁺, citada anteriormente.

Espectroscopia de emisión de fluorescencia

La presencia de unidades fluorescentes en **L7** y **L8** permite registrar el espectro de emisión de fluorescencia de los sistemas Cu(II)-**L7** y Cu(II)-**L8** para distintos valores de pH. La superposición de los valores de emisión de fluorescencia con los diagramas de distribución permite asociar los cambios en el espectro de emisión con cambios en el entorno de coordinación del cobre.

En la Figura 6.42 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia para el sistema Cu(II)-**L7**. La intensidad de emisión de fluorescencia disminuye coincidiendo con la formación de la especie $[\text{CuHL}]^{3+}$. Este fenómeno se conoce como CHEQ (*Chelation Enhancement of the Quenching*) y se puede atribuir a un proceso de transferencia electrónica desde el estado excitado del antraceno al cobre, cuando se produce la coordinación del cobre a la amina contigua a la unidad de antraceno, bloqueando la emisión de fluorescencia del antraceno. Esto permite sugerir la participación de la amina secundaria contigua al antraceno en la coordinación con el cobre.

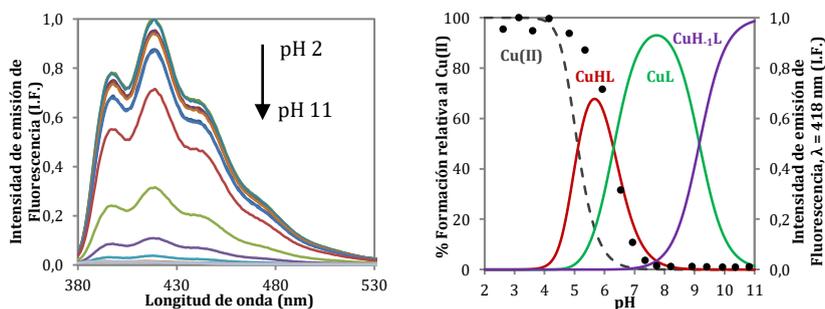


Figura 6.42. En la izquierda, espectro de emisión de fluorescencia en disolución acuosa para el sistema Cu(II)-**L7** para distintos valores de pH. En la derecha, variación de la intensidad de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de 418 nm en función del pH (círculos negros), junto con el diagrama de distribución para el sistema Cu(II)-**L7**. $[\text{Cu(II)}] = [\text{L}] = 10^{-5} \text{ M}$.

En la Figura 6.43 se presentan los resultados de los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia para el sistema Cu(II)-L8. Igual que para el sistema Cu(II)-L7, se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia, que coincide con la formación de la misma especie que para el sistema anterior: $[\text{CuHL}]^{3+}$. Este hecho se puede atribuir de nuevo a un proceso CHEQ, como consecuencia de la transferencia electrónica, pero en este caso desde el estado excitado de la unidad de TPA al cobre, cuando se produce la coordinación del cobre a la amina secundaria contigua a la unidad de TPA. Esto permite sugerir la participación de dicha amina en la coordinación con el cobre.

No obstante, mientras que para el sistema Cu(II)-L7 se produce un bloqueo total de la emisión de fluorescencia como consecuencia de la formación de la especie $[\text{CuHL}]^{3+}$, para el sistema Cu(II)-L8 tiene lugar un bloqueo parcial, disminuyendo la intensidad de emisión de fluorescencia un 60% aproximadamente.

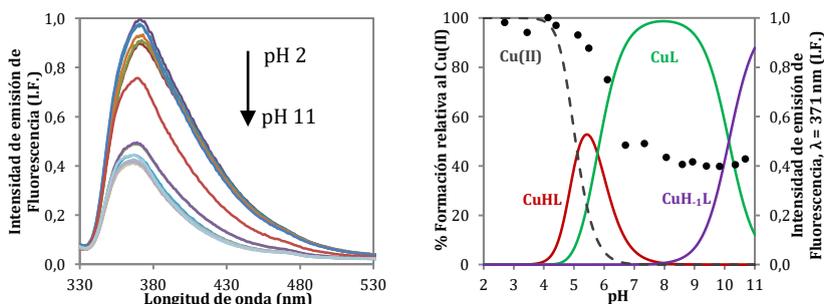


Figura 6.43. En la izquierda, espectro de emisión de fluorescencia en disolución acuosa para el sistema Cu(II)-L8 para distintos valores de pH. En la derecha, variación de la intensidad de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de 371 nm en función del pH (círculos negros), junto con el diagrama de distribución para el sistema Cu(II)-L8. $[\text{Cu(II)}] = [\text{L}] = 10^{-5}$ M.

Estructura cristalina [Cu(HL6)(Br)₂](Br)·H₂O (8)

La evaporación lenta de una disolución acuosa a pH 5 de **L6** y Cu(ClO₄)₂·6H₂O en cantidades equimolares, permitió la obtención de monocristales y la resolución de la estructura cristalina de un complejo de estequiometría Cu(II):L 1:1, el cual se presenta en la Figura 6.44. La estructura cristalina **8** coincide con la especie [CuHL]³⁺, determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.41), y confirma la formación de especies mononucleares monómeras, tanto en disolución acuosa como en estado sólido.

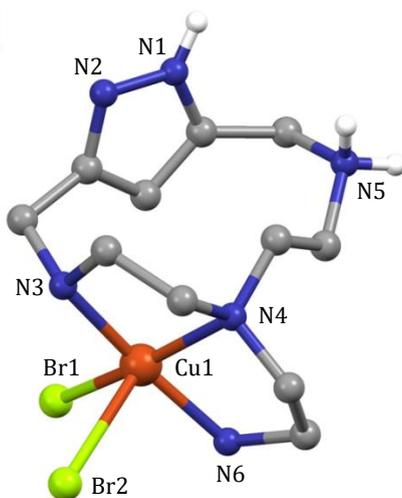


Figura 6.44. Estructura cristalina del catión del complejo **8**. Los átomos de hidrógeno se han omitido, a excepción de los hidrógenos de la amina protonada y de la unidad de pirazol. Hidrógeno, en blanco. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Bromuro, en amarillo. Cobre, en naranja.

El átomo de cobre se encuentra pentacoordinado y adopta una geometría de coordinación piramidal de base cuadrada, aunque ligeramente distorsionada ($\tau = 0.12$). La base de la pirámide está formada por la amina terciaria (N4), por una de las aminas secundarias (N3), por la amina primaria (N6) y por un bromuro (Br1), mientras que la posición axial está ocupada por un segundo bromuro (Br2). La otra amina secundaria (N5) se encuentra protonada, y como consecuencia de ello no participa en la coordinación. La unidad de pirazol no participa en la coordinación, lo que da lugar a la formación de un complejo mononuclear monómero, a diferencia de lo que se ha descrito anteriormente para las estructuras de los cationes **1-7**, donde dos macrociclos están conectados por puentes pirazolato mediante uno o más átomos de cobre. En la Tabla 6.13 se presentan las distancias y ángulos de enlace seleccionadas para la estructura cristalina **8**, mientras que los datos cristalográficos se resumen en el Anexo C.

Tabla 6.13. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina **8**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu1 - N3	2.029(5)	N3 - Cu1 - N4	86.5(2)
Cu1 - N4	2.085(5)	N3 - Cu1 - N6	171.0(2)
Cu1 - N6	1.990(5)	N3 - Cu1 - Br1	98.8(2)
Cu1 - Br1	2.417(1)	N3 - Cu1 - Br2	83.5(2)
Cu1 - Br1	2.882(1)	N4 - Cu1 - N6	85.3(2)
		N4 - Cu1 - Br1	164.1(2)
		N4 - Cu1 - Br2	101.8(2)
		N6 - Cu1 - Br1	90.1(2)
		N6 - Cu1 - Br2	94.4(2)
		Br1 - Cu1 - Br2	93.7(1)

Estructura cristalina $[Cu_2(H_3L6)_2(Br)_8](ClO_4)_2 \cdot 2H_2O$ (9)

En cambio, la adición de ácido bromhídrico hasta pH 2 sobre una disolución de las mismas características que la anterior, da lugar a la obtención de monocristales, pero en este caso la estructura cristalina es un complejo dinuclear de estequiometría Cu(II):L 2:2, la cual se presenta en la Figura 6.45.

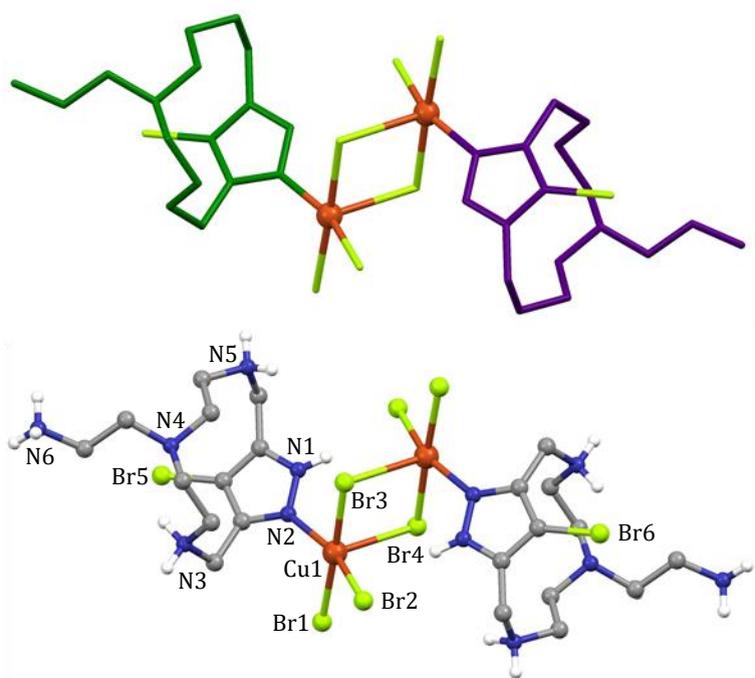


Figura 6.45. Estructura cristalina del catión del complejo **9**. Los átomos de hidrógeno se han omitido, a excepción de los hidrógenos de las aminas protonadas y de la unidad de pirazol. Macrociclos, en verde y morado. Hidrógeno, en blanco. Carbono, en gris. Nitrógeno, en azul. Bromuros, en amarillo. Cobre, en naranja.

Los dos átomos de cobre presentan el mismo entorno de coordinación, con las mismas distancias y ángulos de enlace. La geometría de coordinación es de tipo piramidal de base cuadrada, aunque presenta un grado de distorsión notable ($\tau = 0.32$). La base de la pirámide está constituida por el nitrógeno piridínico de la unidad de pirazol (N2) y tres bromuros (Br1, Br2 y Br3), mientras que la posición axial está ocupada por un cuarto bromuro (Br4).

Debido al pH de la disolución que dio lugar a los monocristales, la amina primaria (N6) y las dos aminas secundarias (N3 y N5) de cada uno de los macrociclos se encuentran protonadas y no participan en la coordinación. El pirazol actúa como ligando monodentado, y por lo tanto el nitrógeno de tipo imidazol de la unidad de pirazol (N1) no se encuentra desprotonado, a diferencia de lo que se ha descrito anteriormente para las estructuras de los cationes **1-7**, en las que la unidad de pirazol se encuentra en forma de pirazolato y coordina como ligando bis(monodentado). Sorprendentemente, se observa la bromación del CH de la unidad de pirazol de los dos macrociclos presentes en la estructura (Br5 y Br6), lo cual seguramente sea consecuencia del exceso de ácido bromhídrico en el medio, que da lugar a una reacción de halogenación, que posiblemente pueda estar catalizada por el cobre(II) presente en el medio.

En la Tabla 6.14 se presentan las distancias y ángulos de enlace seleccionadas para la estructura cristalina **9**, mientras que los datos cristalográficos se resumen en el Anexo C.

Tabla 6.14. Distancias (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina **9**.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu1 - N2	2.038(7)	N2 - Cu1 - Br1	91.0(2)
Cu1 - Br1	2.417(1)	N2 - Cu1 - Br2	158.4(2)
Cu1 - Br2	2.391(1)	N2 - Cu1 - Br3	87.6(2)
Cu1 - Br3	2.430(1)	N2 - Cu1 - Br4	97.9(2)
Cu1 - Br4	2.741(1)	Br1 - Cu1 - Br2	91.6(1)
		Br1 - Cu1 - Br3	177.8(1)
		Br1 - Cu1 - Br4	93.9(4)
		Br2 - Cu1 - Br3	89.1(1)
		Br2 - Cu1 - Br4	103.4(1)
		Br3 - Cu1 - Br4	88.0(1)

6.3. Química de Coordinación con Zinc(II)

El zinc es esencial para la vida, encontrándose presente a nivel de traza en todas las formas de vida que se conocen. Actualmente, se tiene constancia de la existencia de más de 300 enzimas que contienen zinc en su centro activo, lo que supone el grupo de metaloenzimas más importante en cuanto a número. Estas enzimas catalizan la conversión metabólica y degradación de proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, así como de otras biomoléculas importantes. El zinc puede desempeñar un papel directo, siendo el centro catalítico de la enzima, esencialmente actuando como ácido de Lewis, pero también puede desempeñar un papel indirecto, llevando a cabo una función estructural en muchas otras metaloproteínas.^[12,13]

El zinc presenta únicamente el estado de oxidación +2, lo que lo hace inactivo frente a procesos redox, motivo por el cual la mayoría de metaloenzimas no redox emplean el zinc como centro activo, pues entre otros factores, se elimina el riesgo de que se generen radicales libres durante el proceso. El zinc(II) presenta una configuración d^{10} , por lo que no presenta efectos de estabilización del campo de los ligandos y como consecuencia no tiene preferencia por un índice de coordinación determinado, si bien los índices de coordinación más comunes para los complejos de zinc son 4, 5 y 6. Las disoluciones acuosas de zinc(II), como consecuencia de su configuración electrónica, son incoloras. Además, el zinc(II) es de naturaleza diamagnética. Estas características explican las dificultades que hubo en su tiempo para detectar la presencia e importancia del zinc en los sistemas biológicos.^[12,13]

6.3.1. Ligandos basados en poliaminas lineales

Poliaminas L1-L3

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.15 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Zn(II)-L1, Zn(II)-L2 y Zn(II)-L3, determinados mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.15. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Zn(II)-L1, Zn(II)-L2 y Zn(II)-L3, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L1	L2	L3
$\text{Zn} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{ZnHL}^{\text{a}}$	-	-	15.30(4)
$\text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{ZnL}$	5.98(4) ^b	7.71(3)	-
$2\text{Zn} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{L}_2$	-	-	19.09(5)
$2\text{Zn} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2 + \text{H}$	9.03(2)	12.27(2)	11.08(3)
$2\text{Zn} + 2\text{L} \rightleftharpoons \text{Zn}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2 + 2\text{H}$	0.18(4)	2.23(8)	0.90(4)

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa.

Los tres sistemas presentan un comportamiento similar, detectándose la formación de especies mononucleares y dinucleares dimeras de estequiometría Zn(II):L 1:1 y 2:2, respectivamente. Este comportamiento es similar al que se ha descrito para los mismos sistemas con cobre.

En la Figura 6.46 se representa conjuntamente el pZn y el pCu en función del pH para **L1-L3**, lo que permite comparar la estabilidad relativa de los sistemas de zinc y los de cobre. En los tres sistemas, la estabilidad de las especies de zinc es menor que la de las especies de cobre. Así, mientras que la complejación del cobre comienza a valores de pH ácidos, la complejación de zinc no comienza hasta valores de pH próximos a la neutralidad.

La secuencia de estabilidad sería la siguiente, ordenada de sistema más estable a menos estable: **L2 > L1 > L3**. Esto coincide con la secuencia de estabilidad que se ha deducido anteriormente para los mismos sistemas con cobre. La explicación de la diferencia de estabilidad sería la misma que para el caso de los sistemas con cobre, atribuible a las diferencias estructurales de la poliamina que constituye cada uno de los macrociclos.

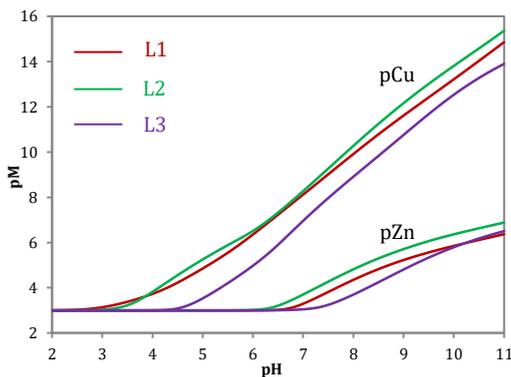


Figura 6.46. Representación del pM en función del pH para los sistemas M(II)-**L1**, M(II)-**L2** y M(II)-**L3**, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. $[L] = [M(II)] = 10^{-3}$ M. M(II)= Cu(II), Zn(II).

En la Figura 6.47 se presentan los diagramas de distribución de especies para los tres sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.15. Para los sistemas Zn(II)-L1 y Zn(II)-L2, la complejación del zinc comienza a pH 6. En primer lugar, se forma la especie mononuclear monómera $[ZnL]^{2+}$, para después formarse las dos especies dinucleares dimeras $[Zn_2H_{-1}L_2]^{3+}$ y $[Zn_2H_{-2}L_2]^{2+}$, las cuales predominan a valores de pH neutro y básico. En cambio, para el sistema Zn(II)-L3 la complejación de zinc no comienza hasta valores de pH neutros, evidenciando la menor capacidad complejante de L3. En primer lugar, se forma la especie mononuclear monómera protonada $[ZnHL]^{3+}$, coexistiendo las especies dinucleares dimeras $[Zn_2L_2]^{4+}$, $[Zn_2H_{-1}L_2]^{3+}$ y $[Zn_2H_{-2}L_2]^{2+}$ a valores de pH básico.

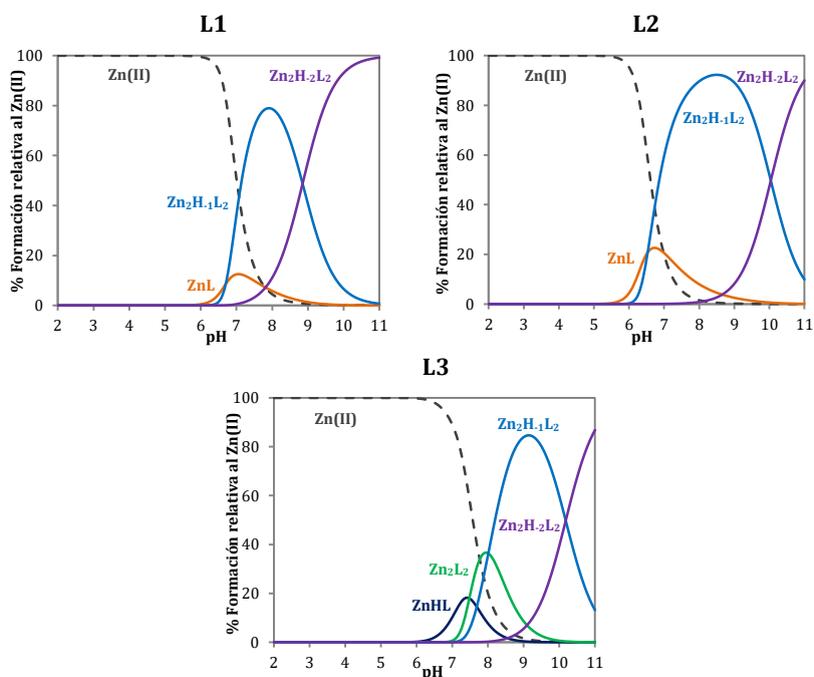


Figura 6.47. Diagrama de distribución para los sistemas Zn(II)-L1, Zn(II)-L2 y Zn(II)-L3. $[L] = [Zn(II)] = 10^{-3}M$.

Espectrometría de masas de alta resolución

Para los sistemas Zn(II)-L1 y Zn(II)-L2, la formación de complejos dinucleares dímeros fue confirmada mediante espectrometría de masas de alta resolución. En cambio, esto no fue posible para el sistema Zn(II)-L3, probablemente debido a la menor estabilidad de las especies. (Tabla 6.16). La correlación obtenida entre las distribuciones isotópicas experimentales y teóricas fue excelente (ver Anexo B).

Tabla 6.16. Picos m/z experimentales y teóricos de las especies dinucleares dimeras detectadas para los sistemas Zn(II)-L1 y Zn(II)-L2, mediante espectrometría de masas de alta resolución.

Especie	L1		L2	
	detectado	teórico	detectado	teórico
[Zn ₂ H ₂ L ₂] ²⁺	301.1117	301.1114	315.1276	315.1270
[Zn ₂ H ₂ L ₂ (Cl)] ⁺	637.1913	637.1921	-	-
[Zn ₂ H ₂ L ₂ (Br)] ⁺	681.1396	681.1416	-	-
[Zn ₂ H ₂ L ₂ (ClO ₄)] ⁺	701.1685	701.1718	-	-
[Zn ₂ H ₁ L ₂ (Br)] ²⁺	341.0757	341.0745	-	-
[Zn ₂ H ₁ L ₂ (Br) ₂] ⁺	761.0652	761.0678	-	-
[Zn ₂ H ₁ L ₂ (Br)(ClO ₄)] ⁺	781.0960	701.0980	-	-

Para los dos sistemas se pudo detectar la formación de la especie dinuclear $[\text{Zn}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2]^{2+}$, determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.47). Además, para el sistema Zn(II)-**L1** se pudo detectar tres variantes de la misma especie, con distintos contraiones: $[\text{Zn}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{Cl})]^+$, $[\text{Zn}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{Br})]^+$ y $[\text{Zn}_2\text{H}_{-2}\text{L}_2(\text{ClO}_4)]^+$.

También para el sistema Zn(II)-**L1**, fue posible detectar la formación de tres especies: $[\text{Zn}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2(\text{Br})]^{2+}$, $[\text{Zn}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2(\text{Br})_2]^+$ y $[\text{Zn}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2(\text{Br})(\text{ClO}_4)]^+$. Estas tres especies son variantes de la misma, y se corresponden con la especie monodesprotonada $[\text{Zn}_2\text{H}_{-1}\text{L}_2]^{3+}$, determinada mediante valoraciones potenciométricas (Figura 6.47).

Poliaminas L4 y L5

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.17 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5, determinados mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.17. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L4	L5
$Zn + L + 2H \rightleftharpoons ZnH_2L^a$	25.47(1) ^b	25.42(5)
$Zn + L + H \rightleftharpoons ZnHL$	19.03(2)	18.70(2)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnL$	10.57(3)	9.37(4)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnH_{-1}L + H$	0.70(3)	-
$2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2L$	15.12(13)	14.80(4)
$2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2H_{-1}L + H$	9.16(2)	7.86(1)
$2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2H_{-2}L + 2H$	-0.26(3)	-1.36(2)
$2Zn + L \rightleftharpoons Zn_2H_{-2}L(OH) + 3H$	-11.54(6)	-

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa.

Ambos sistemas presentan un comportamiento parecido, dando lugar a la formación de especies mononucleares y dinucleares de estequiometría Zn(II):L 1:1 y 2:1 respectivamente, de manera similar a lo que se ha descrito anteriormente para los mismos sistemas con cobre. Este comportamiento es completamente distinto al que exhiben las poliaminas **L1-L3**, lo cual se puede atribuir a las diferencias estructurales, ya que **L4** y **L5** están constituidos por poliaminas que incorporan dos grupos amino más en su estructura.

Para relaciones molares Zn(II):L 1:1, en los dos sistemas se detecta la formación de las tres mismas especies mononucleares de estequiometría Zn(II):L 1:1, las cuales responden a la fórmula general $[ZnH_xL]^{(x+2)+}$, con valores de x comprendidos entre 0 y 2. Además, en el caso del sistema Zn(II)-**L4** también se detecta la formación de la especie adicional monodesprotonada $[ZnH_{-1}L]^+$. Para relaciones molares Zn(II):L 2:1, de nuevo se detecta la formación de las tres mismas especies para ambos sistemas: $[Zn_2L]^{4+}$, $[Zn_2H_{-1}L]^{3+}$ y $[Zn_2H_{-2}L]^{2+}$, mientras que para el sistema Zn(II)-**L4** se detecta nuevamente la formación de una especie adicional, la especie hidroxilada $[Zn_2H_{-2}L(OH)]^+$.

Relación molar Zn(II):L 1:1

En la Figura 6.48 se representa el pZn y el pCu en función del pH para los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5. Los complejos formados por el sistema Zn(II)-L4 son más estables que los formados por el sistema Zn(II)-L5, siguiendo la misma tendencia que la que se ha descrito para la complejación del cobre. La explicación sería la misma que la que se ha argumentado para los sistemas con cobre. Asimismo, los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5 son menos estables que los sistemas equivalentes de cobre, comportamiento similar al descrito para L1-L3. De este modo, mientras que la complejación del cobre comienza a valores de pH ácido, la complejación del zinc no lo hace hasta valores de pH próximos a la neutralidad, lo que refleja la menor capacidad de L4 y L5 para la complejación del zinc, en comparación con su capacidad complejante de cobre.

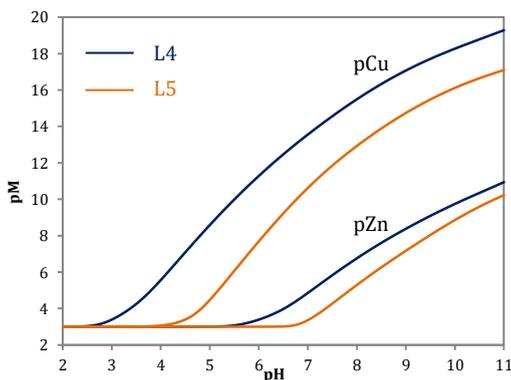


Figura 6.48. Representación del pM en función del pH para los sistemas M(II)-L4 y M(II)-L5, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. [L] = [M(II)] = 10⁻³ M. M(II)= Cu(II), Zn(II).

En la Figura 6.49 se presentan los diagramas de distribución de especies para los dos sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.17. En el caso del sistema Zn(II)-L4, la coordinación del zinc comienza a valores de pH 5, predominando la formación de las distintas especies mononucleares monómeras en el intervalo de pH 5-11. En cambio, para el sistema Zn(II)-L5 la complejación del zinc no comienza hasta pH neutro, exponiendo la menor capacidad de L5 para la complejación de zinc. Además, en el diagrama de distribución de especies predominan las especies dinucleares $[\text{Zn}_2\text{H}_{-1}\text{L}]^{3+}$ y $[\text{Zn}_2\text{H}_{-2}\text{L}]^{2+}$, frente a las especies mononucleares, al contrario de lo que cabe esperar para relaciones molares Zn(II):L 1:1.

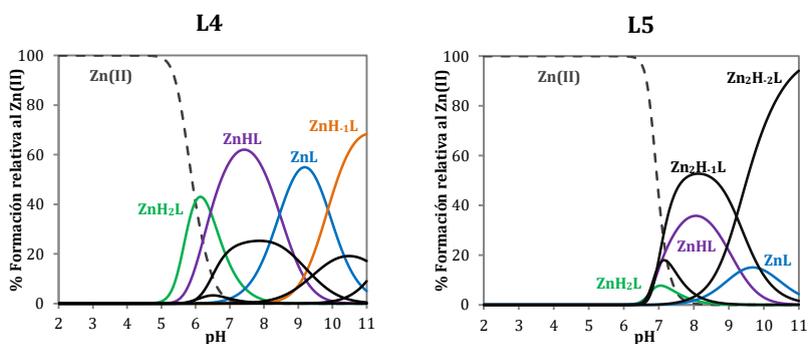


Figura 6.49. Diagrama de distribución para los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5. $[\text{L}] = [\text{Zn(II)}] = 10^{-3}\text{M}$.

Relación molar Zn(II):L 2:1

En la Figura 6.50 se representa el pZn y el pCu en función del pH para los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5, para la relación molar Zn(II):L 2:1. La estabilidad de los sistemas con zinc es menor que la de los mismos sistemas con cobre, de manera similar a lo que sucede para relaciones molares Zn(II):L 1:1.

No obstante, en este caso el sistema Zn(II)-L4 es más estable hasta valores de pH 9, a partir del cual hay un cambio en la tendencia, y el sistema Zn(II)-L5 pasa a ser más estable. Este hecho se puede atribuir a la formación de la especie hidroxilada $[Zn_2H_2L(OH)]^+$ en el caso del sistema Zn(II)-L4, la cual es mucho menos estable que el resto de especies, que no se forma en el caso del sistema Zn(II)-L5.

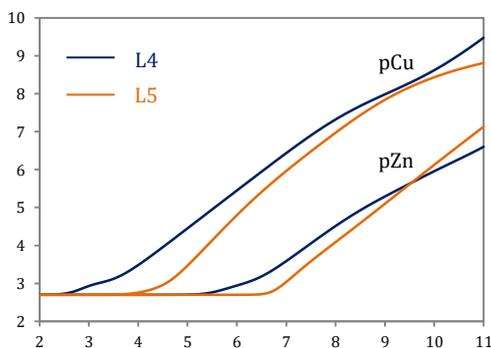


Figura 6.50. Representación del pM en función del pH para los sistemas M(II)-L4 y M(II)-L5, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. $[L] = 10^{-3}M$. $[M(II)] = 2 \cdot 10^{-3} M$. M(II)= Cu(II), Zn(II).

En la Figura 6.51 se presentan los diagramas de distribución de especies para los dos sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.17. En ambos sistemas todo el zinc se encuentra complejado a partir de pH 8. En cambio, la complejación del zinc comienza a valores de pH más ácidos para el caso del sistema Zn(II)-L4, lo que explica la menor cantidad de zinc libre en disolución para valores de pH ácido, en comparación con el sistema Zn(II)-L5, lo que coincide con la información deducida de la Figura 6.50.

En los dos sistemas, predominan las dos especies dinucleares $[Zn_2H_{-1}L]^{3+}$ y $[Zn_2H_{-2}L]^{2+}$, coexistiendo en el intervalo de pH 6-11. La formación de la especie hidroxilada $[Zn_2H_{-2}L(OH)]^+$ en el sistema Zn(II)-L4 tiene lugar a partir de pH 9, coincidiendo con el valor de pH en el que tiene lugar el cambio de tendencia que se observa en la Figura 6.50.

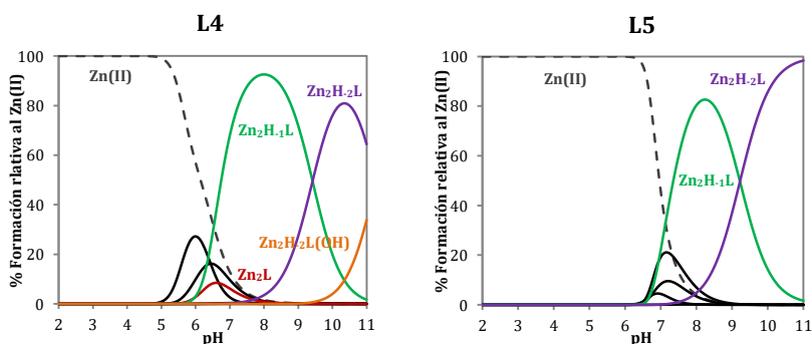


Figura 6.51. Diagrama de distribución para los sistemas Zn(II)-L4 y Zn(II)-L5. $[L] = 10^{-3}M$. $[Zn(II)] = 2 \cdot 10^{-3}M$.

6.3.2. Ligandos de tipo escorpiando

Poliaminas L6-L8

Valoraciones potenciométricas

En la Tabla 6.18 se presentan los logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Zn(II)-L6, Zn(II)-L7 y Zn(II)-L8, determinados mediante valoraciones potenciométricas.

Tabla 6.18. Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Zn(II)-L6, Zn(II)-L7 y Zn(II)-L8, determinados en NaCl 0.15 M a la temperatura de 298 ± 0.1 K.

Reacción	L6	L7	L8
$Zn + L + H \rightleftharpoons ZnHL^a$	14.77(1) ^b	-	14.79(10)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnL$	6.66(1)	-	7.86(2)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnH_{-1}L + H$	-1.91(1)	-2.95(1)	-1.00(3)
$Zn + L \rightleftharpoons ZnH_{-2}L + 2H$	-	-13.72(6)	-

(a) Las cargas se han omitido. (b) Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar en la última cifra significativa.

En los tres sistemas se detecta la formación de especies mononucleares de estequiometría Zn(II):L 1:1, las cuales responden a la fórmula general $[ZnH_xL]^{(x+2)+}$. En cambio, el número de especies, así como las especies que se forman en cada caso, varía de un sistema a otro. Para los sistemas Zn(II)-L6 y Zn(II)-L8 se detecta la formación de las tres mismas especies: $[ZnHL]^{3+}$, $[ZnL]^{2+}$ y $[ZnH_{-1}L]^+$. En cambio, para el sistema Zn(II)-L7 únicamente se detecta la formación de las dos especies desprotonadas: $[ZnH_{-1}L]^+$ y $[ZnH_{-2}L]$.

En la Figura 6.52 se compara la estabilidad de los sistemas de zinc y de los mismos sistemas con cobre para los escorpiandos **L6-L8**. Los complejos de zinc son menos estables que los equivalentes de cobre, de manera similar a lo que sucede para **L1-L5**. La complejación del zinc no comienza hasta valores de pH próximos a la neutralidad, por lo que resulta imposible comparar la estabilidad de los sistemas. No obstante, para valores de pH básico se observa la siguiente tendencia, ordenada de sistema más estable a menos estable: **L8 > L6 > L7**.

La mayor estabilidad del sistema Zn(II)-**L8** se puede atribuir a la presencia de la unidad de TPA, que es un dador de densidad electrónica excelente, lo que da lugar a un enlace de coordinación más fuerte con el zinc. Esta tendencia es distinta a la que se observa para los sistemas de cobre, en la que la poliamina **L7** también da lugar a la formación de los complejos menos estables, pero **L6** forma complejos más estables que **L8**, observándose la tendencia: **L6 > L8 > L7**.

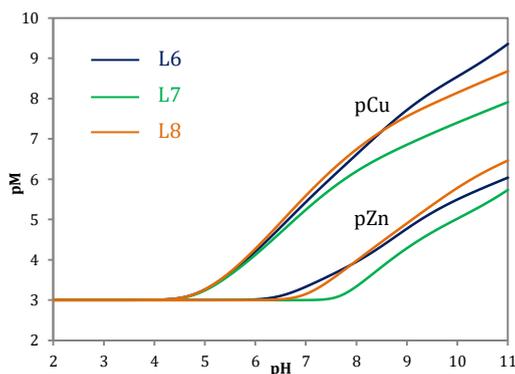


Figura 6.52. Representación del pM en función del pH para los sistemas M(II)-**L4** y M(II)-**L5**, calculado a partir de los datos de las valoraciones potenciométricas. $[L] = [M(II)] = 10^{-3}$ M. M(II) = Cu(II), Zn(II).

En la Figura 6.53 se presentan los diagramas de distribución de especies para los tres sistemas, calculados mediante el software HySS haciendo uso los datos de la Tabla 6.18. El perfil de los diagramas de distribución es distinto para cada uno de los sistemas, si bien en los tres sistemas la complejación del zinc comienza a valores de pH próximos a la neutralidad. El sistema Zn(II)-L7 es el que da lugar al diagrama de distribución más sencillo, predominando la especie monodesprotonada $[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]^+$. En cuanto a los sistemas Zn(II)-L6 y Zn(II)-L8, coexisten las tres especies $[\text{ZnHL}]^{3+}$, $[\text{ZnL}]^{2+}$ y $[\text{ZnH}_{-1}\text{L}]^+$ a valores de pH básico, si bien la especie monodesprotonada es la que se forma en mayor medida.

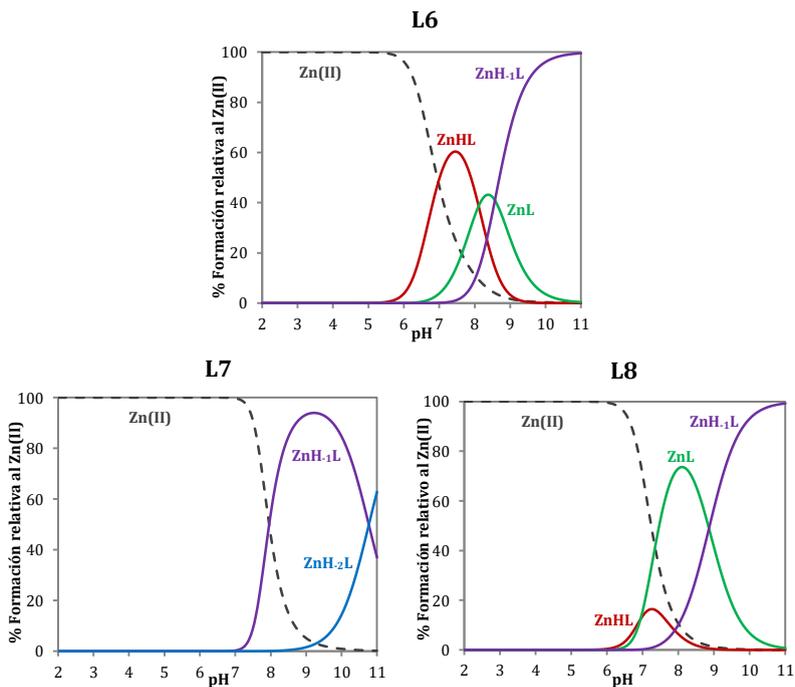


Figura 6.53. Diagrama de distribución para los sistemas Zn(II)-L6, Zn(II)-L7 y Zn(II)-L8. $[\text{L}] = [\text{Zn(II)}] = 10^{-3}\text{M}$.

6.4. Bibliografía

- [1] S. A. Lawrence. *Amines: Synthesis, Properties, and Applications*. Cambridge University Press, **2004**.
- [2] L. G. Wade. *Química Orgánica*. Pearson, **2011**.
- [3] D. Klein. *Organic Chemistry*. Wiley, **2017**.
- [4] A. Bencini, A. Bianchi, E. García-España, M. Micheloni, J. A. Ramirez. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 188, 97–156.
- [5] L. Alderighi, P. Gans, A. Ienco, D. Peters, A. Sabatini, A. Vacca. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 184, 311–318.
- [6] R. Belda, J. Pitarch-Jarque, C. Soriano, J. M. Llinares, S. Blasco, J. Ferrando-Soria, E. García-España. *Inorg. Chem.* **2013**, 52, 10795–10803.
- [7] M. Zhang, W. Yang, T. Gong, W. Zhou, R. Xue. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2017**, 19, 21672–21682.
- [8] B. Verdejo, A. Ferrer, S. Blasco, C. E. Castillo, J. González, J. Latorre, M. A. Máñez, M. G. Basallote, C. Soriano, E. García-España. *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5707–5719.
- [9] M. Inclán, M. T. Albelda, J. C. Frías, S. Blasco, B. Verdejo, C. Serena, C. Salat-Canela, M. L. Díaz, A. García-España, E. García-España. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 9644–9656.
- [10] I. Pont, J. González-García, M. Inclán, M. Reynolds, E. Delgado-Pinar, M. T. Albelda, R. Vilar, E. García-España. *Chem. Eur. J.* **2018**, 24, 10850–10858.
- [11] B. Valeur, I. Leray. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 205, 3–40.
- [12] J. S. Casas, V. Moreno, Á. Sánchez, J. L. Sánchez, J. Sordo. *Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis **2002**.
- [13] M. Vallet, J. Faus, E. García-España, J. Moratal. *Introducción a La Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis **2003**.
- [14] W. R. Harris, K. N. Raymond, F. L. Weigl. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, 103, 2667–2675.
- [15] B. P. Hay, R. D. Hancock. *Coord. Chem. Rev.* **2001**, 212, 61–78.
- [16] A. B. P. Lever. *Inorganic Electronic Spectroscopy*. Elsevier, **1984**.

- [17] A. W. Addison, T. N. Rao, J. Reedijk, J. van Rijn, G. C. Verschoor. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 1349–1356.
- [18] P. J. Altmann, A. Pöthig. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 13171–13174.
- [19] S. S. Massoud, F. R. Louka, M. A. Al-Hasan, R. Vicente, F. A. Mautner. *New J. Chem.* **2015**, 39, 5944–5952.
- [20] R. Belda, S. Blasco, B. Verdejo, H. R. Jiménez, A. Domènech, C. Soriano, J. Latorre, C. Terencio, E. García-España. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 11194–11204

7

**Formación de
Hidrogeles con 5'-
Guanosina
Monofosfato**

7.1. Introducción

Hidrogeles de 5'-guanosina monofosfato

En 1910, el médico y químico noruego Ivar Christian Bang publicó el artículo *Untersuchungen über die Guanylsäure (Estudios sobre el Ácido Guanílico)* en la revista *Biochemische Zeitschrift*, donde por primera vez se comunica que, en determinadas condiciones, disoluciones acuosas de ácido guanílico dan lugar a la formación de hidrogeles.^[1]

Sin embargo, tuvo que transcurrir más de medio siglo para que, en la década de los sesenta, el biólogo molecular Martin Gellert, en colaboración con los investigadores Marie Lipsett y David Davies, determinaran la estructura de estos hidrogeles por medio de difracción de rayos X. Los estudios revelaron la formación de agregados helicoidales, los cuales a su vez se encontraban constituidos por tetrámeros apilados unos encima de otros.^[2]

En la actualidad se conoce que disoluciones acuosas de 5'-guanosina monofosfato (GMP) dan lugar a la formación de hidrogeles, en un proceso en el que cuatro moléculas de GMP se autoensamblan en el mismo plano, adoptando una disposición cuadrado plana en la que cada una de las moléculas es dadora y aceptora de dos enlaces de hidrógeno de tipo Hoogsteen, formando lo que se conoce como *tétrada de guanina*, la cual aparece representada en la Figura 7.1. La parte central de la estructura está ocupada por un catión, normalmente sodio o potasio, el cual aporta estabilidad a la estructura mediante la minimización de las repulsiones electrostáticas.^[3-5]

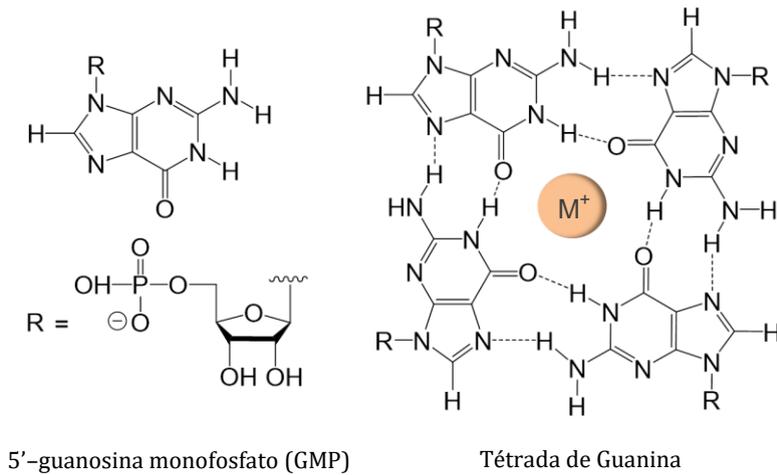
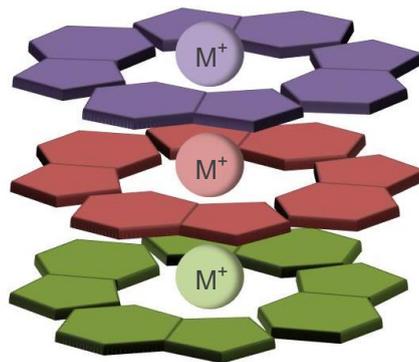


Figura 7.1. En la izquierda, estructura de la molécula de GMP. En la derecha, estructura de una tétrada de guanina.

Las tétradas de guanina se pueden apilar unas encima de otras dando lugar a estructuras que se conocen como *G-quadruplex*,^[6,7] las cuales aparecen representadas en la Figura 7.2.



G-quadruplex

Figura 7.2. Representación esquemática de una estructura G-quadruplex, formada por el apilamiento de varias tétradas de guanina.

Formación de estructuras G-quadruplex *in vivo*

Estudios bioquímicos realizados durante la segunda mitad de la década de los ochenta, demostraron que en regiones de ADN ricas en guanina tiene lugar un proceso similar al que se ha descrito para la formación de hidrogeles de guanosina, formándose tétradas de guanina, la cuales se pueden apilar unas encima de otras dando lugar a la formación de estructuras de tipo G-quadruplex.^[8,9]

En estudios más recientes se ha puesto de manifiesto la formación de estructuras de tipo G-quadruplex *in vivo*, en regiones de ADN y ARN genómico ricas en guanina. Estas estructuras presentan pequeñas variaciones estructurales debido a la presencia de otras nucleobases además de la guanina, sugiriendo la participación de las mismas en distintos procesos biológicos tales como la regulación del tamaño del telómero, así como en los procesos de replicación, transcripción y traducción.^[10,11] En la Figura 7.3 se ilustra una estructura de tipo G-quadruplex, la cual se encuentra en el protooncogén c-myc, presente en los seres humanos.

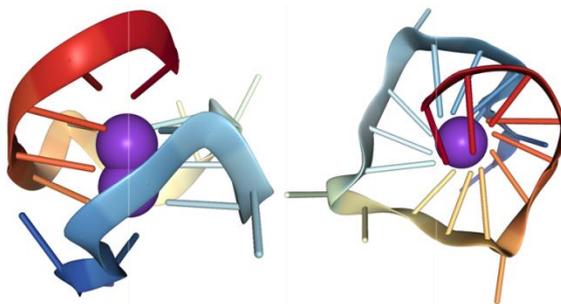


Figura 7.3. Representación desde distintos puntos de vista de una estructura de tipo G-quadruplex, adaptada de la referencia [12], PDB 1XAV.

Las estructuras de tipo G–quadruplex presentan un elevado grado de polimorfismo, pudiendo subdividirse en distintas familias, como por ejemplo G–quadruplex “paralelo” o “antiparalelo” en función de la orientación de las hebras de ADN que forman la estructura, así como “intramolecular” o “intermolecular” en función de cómo se produce el pliegue de las hebras, las cuales se describen en la Figura 7.4.^[13]

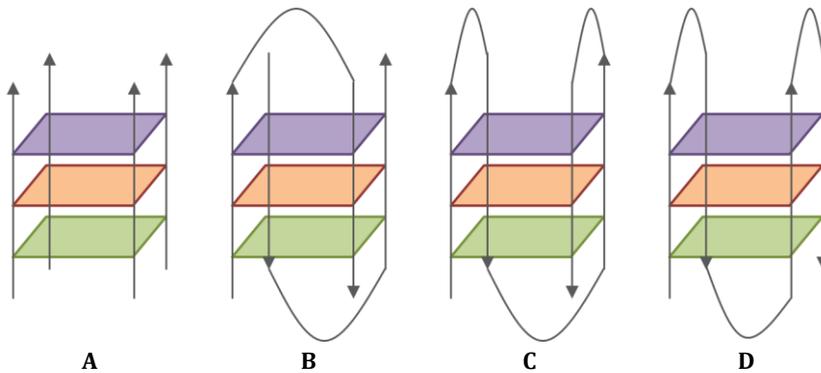


Figura 7.4. Ejemplo del grado de polimorfismo de las estructuras de tipo G–quadruplex. **A:** Tetramolecular paralelo. **B:** Bimolecular antiparalelo. **C:** Unimolecular antiparalelo. **D:** Unimolecular antiparalelo.

En células eucariotas, las zonas con mayor concentración de estructuras G–quadruplex son los telómeros, ^[14,15] que son regiones de ADN no codificante ubicados en los extremos de los cromosomas, los cuales juegan un papel biológico muy importante, ayudando a la organización de los cromosomas en el núcleo celular, protegiendo el extremo de los mismos de posibles recombinaciones, fusiones y degradaciones, así como permitiendo que el cromosoma se replique adecuadamente durante la división celular.^[16]

En células somáticas humanas el ADN telomérico está constituido por una doble hebra, formada por repeticiones de la secuencia TTAGGG comprendiendo 2–10 kilobases de longitud, y por una monohebra rica en guanina en el extremo, que comprende 100–200 bases de longitud y que puede plegarse formando estructuras de tipo G–quadruplex. Durante cada división celular, la doble hebra se acorta 50–100 pares de bases, hasta que el telómero alcanza una longitud crítica, provocando la muerte de la célula. Por este motivo, el control de la longitud del telómero es clave en el ciclo celular, estando relacionado con la inmortalización de la célula y la tumorigénesis.^[17,18]

La telomerasa es la enzima encargada de controlar el tamaño del telómero.^[19–21] En células somáticas sanas la actividad telomerasa es baja, lo cual no es suficiente para mantener constante el tamaño del telómero, dando lugar a un acortamiento progresivo del telómero con cada división celular, provocando en última instancia la muerte de la célula. En cambio, en células tumorales la actividad telomerasa es alta, siendo un factor clave en la inmortalización de la célula.^[22,23] Como consecuencia, la enzima telomerasa es una de las dianas principales en el desarrollo de fármacos antitumorales. Una posible vía es el diseño de nuevos compuestos con la capacidad para estabilizar estructuras de tipo G–quadruplex, inhibiendo la enzima telomerasa, dado que los telómeros que adoptan conformaciones de este tipo presentan menor afinidad por la misma.^[24–28]

Desarrollo de nuevos materiales biocompatibles

En los últimos veinte años, el estudio de los denominados geladores de bajo peso molecular (LMWGs, del inglés *Low Molecular Weight Gelators*) ha suscitado un gran interés debido a su potencial en aplicaciones tan diversas como en el diseño de nuevos sensores^[29-31] y catalizadores,^[32-34] en optoelectrónica,^[35-37] en el diseño de materiales biocompatibles para el transporte y liberación de fármacos,^[38-40] así como en la bioingeniería.^[41-43] A día de hoy se entiende que un LMWG es cualquier molécula que presenta una masa molecular inferior a 3000 g/mol, que puede dar lugar a la formación de geles supramoleculares, en agua o en cualquier disolvente orgánico, necesitando para ello concentraciones no muy elevadas. En la bibliografía se pueden encontrar numerosos artículos de revisión, en los cuales se discute la formación de geles supramoleculares, así como sus posibles aplicaciones.^[44-48]

Entre todas las posibles aplicaciones, el desarrollo de nuevos materiales biocompatibles para el transporte y liberación de fármacos resulta particularmente interesante, pudiendo solucionar problemas relacionados con la solubilidad o la biodisponibilidad de un determinado fármaco, aumentando la eficacia del mismo. A lo largo de los años han sido empleadas distintas estrategias para lograr este propósito, haciendo uso de distintos transportadores, entre los que se encuentran determinados liposomas, micelas y polímeros. No obstante, en los últimos años los hidrogeles supramoleculares han surgido como una alternativa a los mencionados transportadores.^[49]

Es necesario tener en cuenta que aquellos hidrogeles que vayan a ser empleados como biomateriales para el transporte y liberación de fármacos deben exhibir la suficiente resistencia mecánica, pero además han de presentar cierta estabilidad química, así como resistencia a la degradación enzimática.^[49]

En particular, los hidrogeles supramoleculares basados en guanina, así como en derivados de la guanina, presentan un potencial extraordinario como posibles materiales biocompatibles.^[50-56] La naturaleza débil y reversible de las interacciones no covalentes que mantienen la estructura de los hidrogeles les proporciona la capacidad de respuesta a distintos estímulos externos. Asimismo, la preparación de los hidrogeles es rápida, sencilla, y viable desde el punto de vista económico. Como consecuencia, son excelentes candidatos para ser empleados en distintas aplicaciones *in vivo*.

Formación de hidrogeles híbridos con poliaminas

Como se ha comentado al principio del capítulo, en las condiciones adecuadas una disolución acuosa de GMP puede dar lugar a la formación de hidrogeles. Desde el punto de vista molecular, se trata de un proceso en el que el GMP se auto-ensambla formando tétradas, las cuales a su vez se apilan unas encima de otras dando lugar estructuras de tipo G-quadruplex. No obstante, el apilamiento de las tétradas genera repulsiones electrostáticas entre los grupos fosfato, dificultando la formación de los hidrogeles, precisando de elevadas concentraciones de GMP y de temperaturas bajas.^[57]

En un trabajo reciente llevado a cabo por la Dra. Raquel Belda en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, en colaboración con el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Durham, se puso de manifiesto que la minimización de las repulsiones electrostáticas favorece la formación de estas estructuras, dando lugar a hidrogeles más resistentes.^[58]

Principalmente, existen dos estrategias para minimizar las repulsiones electrostáticas: sustituir los grupos fosfato por otros grupos que sean neutros,^[59,60] o emplear cationes que interaccionen electrostáticamente con las cargas negativas de los grupos fosfato. En este trabajo se propone la segunda opción, mediante el uso de poliaminas. Es posible utilizar otro tipo de policationes, como proteínas, péptidos o lípidos. No obstante, esta alternativa es poco viable desde el punto de vista económico.

El empleo de cationes más sencillos como el sodio o el potasio resultan interesantes desde el punto de vista económico, pero la afinidad que presentan los grupos fosfato por estos cationes es varios órdenes de magnitud inferior a la que presentan por las poliaminas. Asimismo, las poliaminas son solubles en agua, lo que permite controlar el número de cargas positivas en función del pH y de la poliamina empleada, pudiendo regular fácilmente su interacción con los grupos fosfato, cargados negativamente.

En este capítulo se procede al estudio de cómo se puede incrementar la capacidad de la guanina para auto-organizarse en estructuras de tipo G-quadruplex, así como al estudio del posible uso de los hidrogeles como nuevos materiales biocompatibles. Para hacer frente a este reto, debido al mayor número de grupos amino en su estructura, y por lo tanto, mayor número de centros protonables, se propone el uso de los receptores **L1-L5**, los cuales pertenecen a la familia de macrociclos basados en poliaminas lineales, conteniendo cuatro o seis grupos amino en su estructura.

7.2. Formación de Hidrogeles Híbridos GMP-Poliamina

La concentración empleada para la formación de geles de GMP a temperatura ambiente se encuentra comprendida en el intervalo 180–1000 mM. Se puede afirmar que, a temperatura ambiente y para concentraciones de GMP inferiores a 180 mM, el proceso de formación de geles es ineficiente. No obstante, en presencia de la cantidad adecuada de la poliamina apropiada se pueden obtener hidrogeles a temperatura ambiente, haciendo uso de concentraciones de hasta un orden de magnitud inferior a las mencionadas. En base a nuestra experiencia, el proceso de formación de hidrogeles híbridos de GMP depende de tres factores:

(1) La concentración de GMP empleada para la preparación de los hidrogeles. Generalmente, cuanto mayor es la concentración de la disolución de GMP de la que se parte, mayor es la resistencia del hidrogel que se obtiene. En este trabajo, empleando poliaminas ha sido posible obtener hidrogeles con disoluciones de GMP de concentración 30 mM.

(2) El pH de la disolución, que determina el número de cargas negativas de la molécula de GMP y el número de cargas positivas de la poliamina. Cuanto más básico sea el pH, la molécula de GMP presentará mayor densidad de carga negativa, y las poliaminas menor densidad de carga positiva, lo que dificultará la formación de los hidrogeles. En este trabajo, los hidrogeles se prepararon ajustando el pH de la disolución a 5, ya que para este valor de pH la molécula de GMP presenta una carga negativa, mientras que las poliaminas presentan un grado de protonación comprendido en el intervalo 3–5, dependiendo de la poliamina.

(3) La relación molar GMP:poliamina empleada para la preparación del hidrogel, la cual determina la carga neta de la estructura para un pH determinado, lo que influirá en la estabilidad del hidrogel.

La modificación de uno o varios de los citados factores dará lugar a cambios en las propiedades de los hidrogeles resultantes, como la resistencia mecánica o la temperatura de descomposición de los mismos. En base a ello, los hidrogeles se prepararon manteniendo constante la concentración de GMP y el pH de la disolución: empleando disoluciones de GMP de concentración 30 mM y ajustando el pH de la disolución a 5. La cantidad de poliamina se fue variando, o lo que es lo mismo, la relación molar GMP:poliamina, con el objetivo de determinar el intervalo de relaciones molares en el que se produce la formación de hidrogeles.

La manera más sencilla de determinar si un material es un hidrogel o no es mediante el test de inversión, el cual se encuentra descrito con detalle en la sección *Material y Métodos*. En la Tabla 7.1 se muestran los resultados del test de inversión para cada uno de los sistemas estudiados.

Tabla 7.1. Resultados del test de inversión para cada sistema, para distintas relaciones molares. En verde: sí se forma gel. En rojo: no se forma gel.

Poliamina	Relación Molar GMP:Poliamina									
	3:1	4:1	5:1	6:1	7:1	8:1	10:1	15:1	30:1	50:1
L1	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red
L2	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Red	Red	Red	Red
L3	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green
L4	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
L5	Red	Green								

Como se deduce de los resultados del test de inversión, **L3** exhibe los mejores resultados en cuanto al intervalo de relaciones molares en que se produce la formación de hidrogeles, dando lugar a la formación de hidrogeles en todas la relaciones GMP:poliamina que fueron ensayadas. En cambio, **L4** presenta los peores resultados, ya que sorprendentemente no fue posible la formación de hidrogeles en ninguna de las relaciones molares que se ensayaron.

En la Figura 7.5 se muestra una fotografía de distintos hidrogeles híbridos formados por el sistema GMP-**L3**, en comparación con una muestra que contiene únicamente GMP. Como se observa, cuando los hidrogeles que contienen la poliamina son sometidos al test de inversión, el material no cae por efecto de la gravedad. En cambio, la muestra que contiene únicamente GMP cae por efecto de la gravedad, no habiéndose producido la formación del hidrogel.

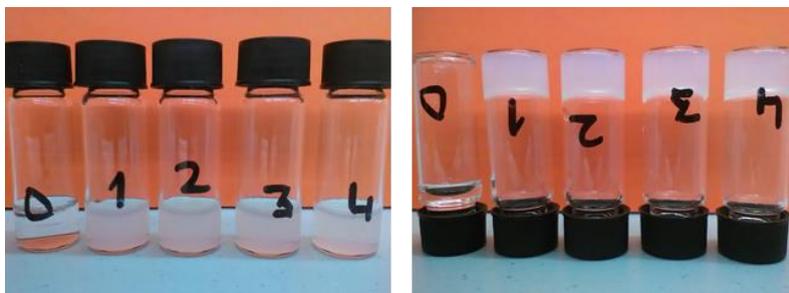


Figura 7.5. Efecto de la adición de la poliamina **L3** sobre una disolución de GMP 30 mM. Vial 0: disolución de GMP 30 mM. Viales 1–4: disolución de GMP 30 mM en presencia de distintas cantidades de la poliamina **L3**.

El test de inversión, aunque sencillo, también permite sacar conclusiones acerca de la cantidad mínima de poliamina que se necesita adicionar para que se produzca la formación del hidrogel. El mejor resultado lo presentan las poliaminas **L3** y **L5**, para las cuales se observa la formación de hidrogeles hasta relaciones molares GMP:poliamina 50:1. Es decir, que para la adición de un equivalente de poliamina por cada cincuenta equivalentes de GMP ya se observa la formación de hidrogeles, lo cual es un resultado extraordinario.

Sin embargo, dada la simplicidad del test de inversión, no es posible obtener más información acerca de los hidrogeles formados en cada sistema. Para una caracterización más exhaustiva de los hidrogeles fue necesario emplear técnicas de análisis más sofisticadas. En nuestro caso, se hizo uso principalmente de la reología, en combinación con otras técnicas complementarias tales como la resonancia magnética nuclear de líquidos y la crio-microscopía electrónica de barrido.

7.3. Reología: Estudio de las Propiedades Mecánicas de los Hidrogeles

La reología es la rama de la física que estudia la relación entre el esfuerzo que se ejerce sobre un material y la deformación que se produce sobre el mismo. El término fue introducido por primera vez en la década de los veinte por el químico estadounidense Eugene Cook Bingham, para describir el flujo de los líquidos y la deformación de los sólidos, inspirado en el aforismo *panta rei*, atribuido por Platón al filósofo griego Heráclito, el cual procede de la palabra griega *πάντα ρεῖ*, que significa *todo fluye*.^[61]

Los geles son materiales viscoelásticos, es decir, presentan tanto comportamiento de sólido como comportamiento de líquido. Desde el punto de vista de la reología, un material es un gel cuando la componente sólida del mismo predomina sobre la componente líquida. Asimismo, la componente sólida de un material viscoelástico está relacionada con el módulo de almacenamiento (G'), mientras que la componente líquida está relacionada con el módulo de pérdida (G''), valores que se pueden obtener directamente de las medidas reológicas. Como consecuencia, si se cumple la condición $G' > G''$, se puede considerar que el material es un gel.

Además, la reología permite determinar la tensión máxima que se puede aplicar sobre el material de estudio sin llegar a romperlo, parámetro que se conoce como límite de elasticidad (γ). Cuando se aplican tensiones superiores a este límite el material experimenta un comportamiento plástico, y se deforma de manera permanente, no recuperando su forma original cuando se retira la tensión aplicada.

El límite de elasticidad, por lo tanto, está directamente relacionado con la resistencia del material, de modo que cuanto mayor sea el límite de elasticidad del hidrogel, mayor será la resistencia del mismo. Y en última instancia, la capacidad de la poliamina para estabilizar estructuras de tipo G-quadruplex será mayor.

En las Tablas 7.2-7.5 se presenta para cada sistema los valores estimados para el módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y límite de elasticidad (γ) de los hidrogeles, los cuales se han obtenido de las medidas reológicas de dinámica oscilatoria, que se muestran en las Figuras 7.6-7.9.

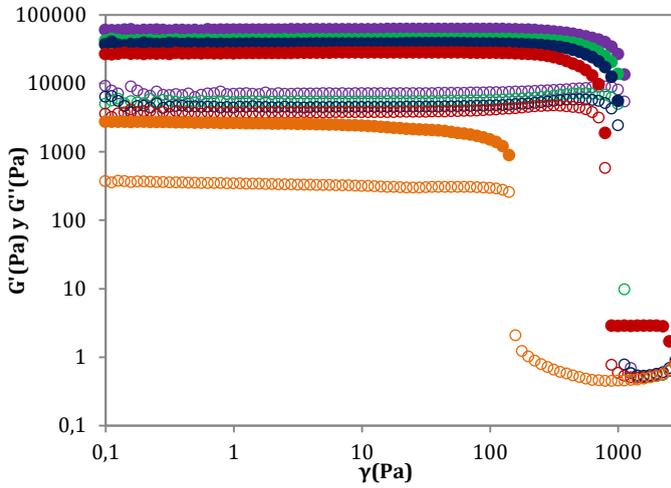


Figura 7.6. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L1. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Relaciones molares GMP:L1: 3:1 (morado), 4:1 (verde), 5:1 (azul), 10:1 (rojo), 30:1 (naranja).

Tabla 7.2. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L1.

GMP:L1	Carga estimada	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
3:1	0	65000	7300	1190
4:1	-1	43000	5300	1000
5:1	-2	44000	5200	1000
6:1	-3	41000	4600	890
8:1	-5	32000	3900	790
10:1	-7	30000	4000	790
12:1	-9	22000	2800	560
30:1	-27	2400	300	140

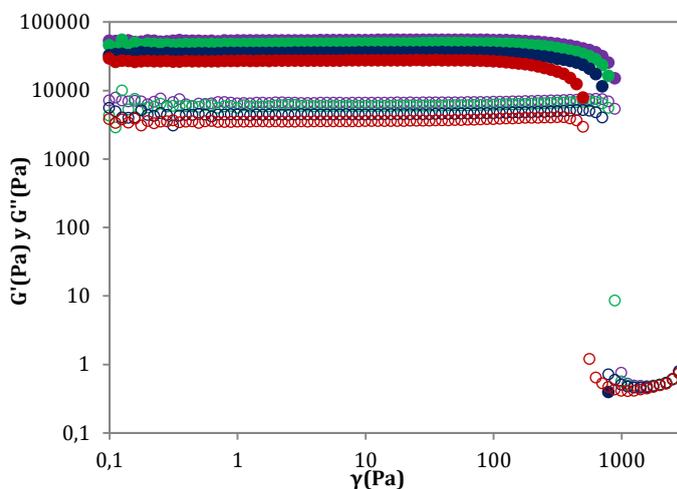


Figura 7.7. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L2. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Relaciones molares GMP:L2: 3:1 (morado), 4:1 (verde), 5:1 (azul), 10:1 (rojo).

Tabla 7.3. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L2.

GMP:L2	Carga estimada	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
3:1	0	50000	6100	890
4:1	-1	48000	5900	790
5:1	-2	33000	4000	710
6:1	-3	30000	3800	670
8:1	-5	30000	3900	670
10:1	-7	26000	3400	500

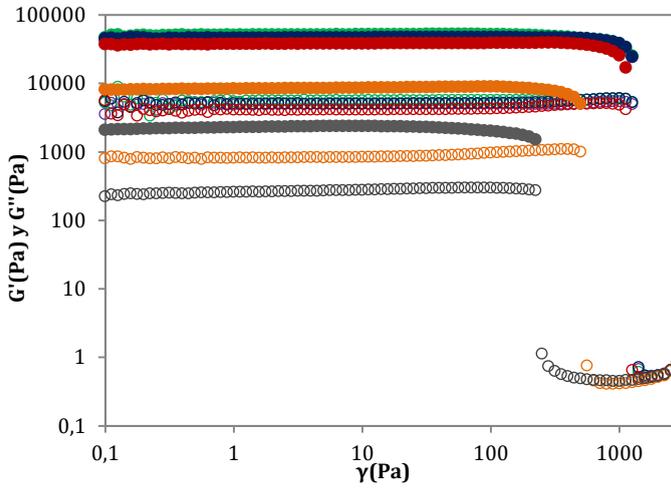


Figura 7.8. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L3. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Relaciones molares GMP:L3: 3:1 (morado), 5:1 (azul), 10:1 (rojo), 30:1 (naranja), 50:1 (gris).

Tabla 7.4. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L3.

GMP:L3	Carga estimada	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
3:1	+1	45000	5000	1260
4:1	0	49000	5400	1260
5:1	-1	47000	5100	1260
6:1	-2	43000	4800	1260
8:1	-4	43000	4800	1120
10:1	-6	40000	4300	1120
12:1	-8	30000	3100	1000
30:1	-26	8600	860	500
50:1	-46	2700	320	250

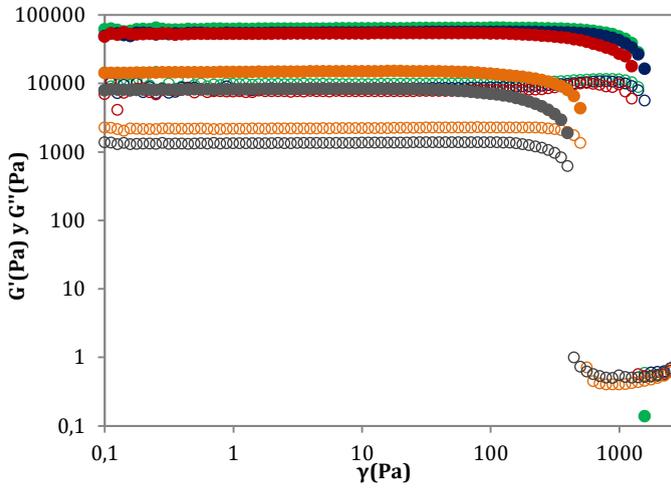


Figura 7.9. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L5. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Relaciones molares GMP:L5: 4:1 (verde), 5:1 (azul), 10:1 (rojo), 30:1 (naranja), 50:1 (gris).

Tabla 7.5. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L5.

GMP:L5	Carga estimada	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
4:1	+1	65000	10000	1590
5:1	0	60000	9100	1780
6:1	-1	60000	9200	1410
8:1	-3	56000	9000	1410
10:1	-5	54000	7700	1260
12:1	-7	39000	5600	950
30:1	-25	15000	2200	530
50:1	-45	7700	1300	380

En los cuatro sistemas, como se aprecia en los datos de las Tablas 7.2–7.5, así como en las Figuras 7.6–7.9, para todas las relaciones molares estudiadas el módulo de almacenamiento es mayor que el módulo de pérdida, cumpliéndose la condición $G' > G''$ y confirmándose que las muestras son geles. Esto coincide con los resultados del test de inversión (Tabla 7.1).

También para los cuatro sistemas, el valor máximo para el límite de elasticidad se obtiene cuando el número de cargas negativas que aporta la molécula de GMP es igual al número de cargas positivas que aporta la poliamina. Es decir, la relación molar GMP:poliamina óptima es aquella en la que la estructura resultante del hidrogel se puede considerar neutra (Tabla 7.6).

Tabla 7.6. Valores estimados del módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y límite de elasticidad (γ), para la relación molar GMP:L óptima para cada sistema.

Poliamina	GMP:L	Carga estimada	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
L1	3:1	0	65000	7300	1190
L2	3:1	0	50000	6100	890
L3	4:1	0	49000	5400	1260
L5	5:1	0	60000	9100	1780

Cuando se alcanza la relación molar óptima para cada sistema, a medida que disminuye la cantidad de poliamina que se adiciona en el hidrogel, y por lo tanto aumenta el cociente GMP/Poliamina, el hidrogel resultante es más débil, dando lugar a valores más pequeños para el límite de elasticidad, hasta alcanzar un punto en el que no se produce la formación de hidrogel (Figura 7.10).

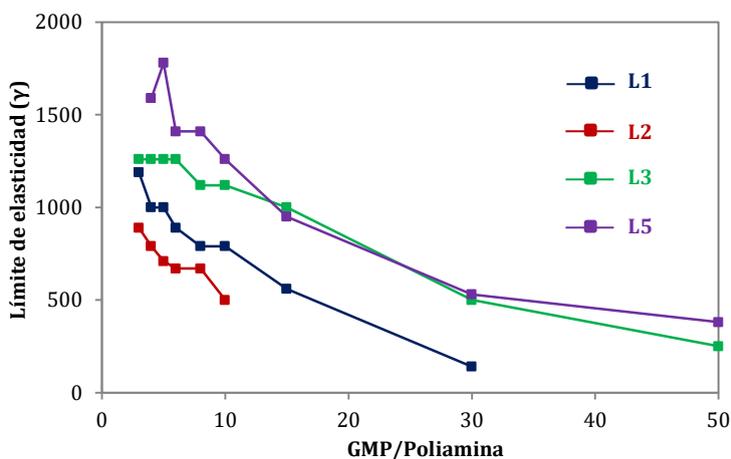


Figura 7.10. Representación del límite de elasticidad en función del cociente GMP/Poliamina, haciendo uso de los datos de las Tablas 7.2–7.5.

La Figura 7.10 permite además comparar simultáneamente los cuatro sistemas de manera clara y sencilla. Las poliaminas **L3** y **L5** dan lugar a la formación de los hidrogeles más resistentes, en comparación con las otras dos poliaminas, exhibiendo límites de elasticidad de 1260 Pa y 1780 Pa, respectivamente. Pero además, también presentan el mayor intervalo de relaciones molares en que se produce la formación de hidrogeles. En cambio, la poliamina **L2** da lugar a la formación de los hidrogeles menos resistentes, además de presentar el menor intervalo de relaciones molares en que se produce la formación de los hidrogeles.

7.4. Resonancia Magnética Nuclear: Estudio de la Cinética de Formación de los Hidrogeles

La técnica de resonancia magnética nuclear (RMN) de líquidos permite estudiar la fase líquida de los hidrogeles, proporcionando una metodología sencilla para seguir el proceso de formación de los mismos, mediante el análisis de la evolución de los espectros de ^1H de los hidrogeles en función del tiempo.

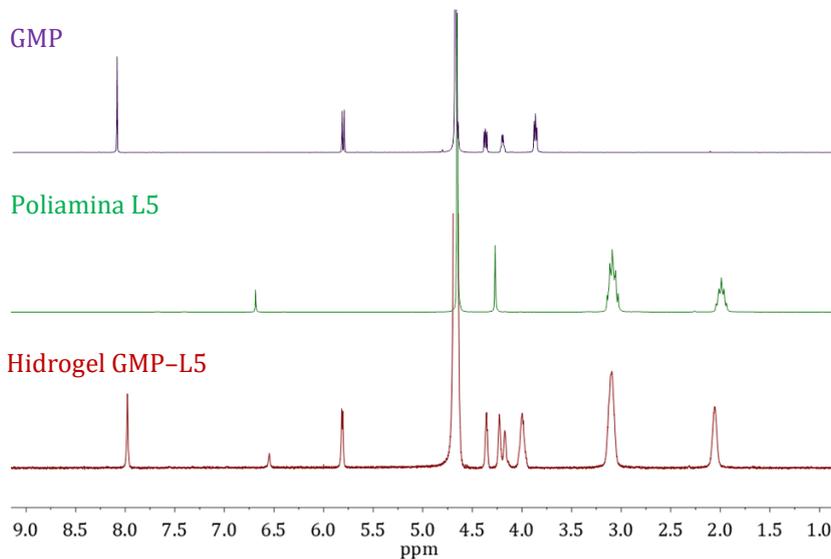


Figura 7.11. Espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H del GMP, de la poliamina **L5** y del hidrogel formado por el sistema GMP-**L5** para la relación molar óptima: GMP:**L5** 5:1.

Como se observa en la Figura 7.11, cuando se comparan los espectros de ^1H del GMP y de la poliamina **L5** con el espectro del hidrogel formado por los mismos, se observa que las señales de ambos componentes se desplazan y están menos definidas, lo cual se debe a la interacción entre los dos componentes del hidrogel.

El proceso de formación de los hidrogeles se puede seguir mediante RMN, monitorizando una señal conocida del espectro de ^1H de cada uno de los componentes que forman el hidrogel. La integral de estas señales se encuentra relacionada con el número de moléculas en disolución acuosa de cada uno de los componentes. Debido a que la formación de los hidrogeles implica el paso de moléculas desde la fase líquida hasta la fase sólida del hidrogel, las integrales de las señales monitorizadas disminuirán a medida que se forma el hidrogel. En el caso de la molécula de GMP, se monitorizó la señal correspondiente al $\text{H}1'$, el cual se corresponde con el átomo de hidrógeno del grupo CH de la unidad de pentosa. En el caso de las poliaminas, se monitorizó la señal correspondiente al $\text{H}4$, que se corresponde con el átomo de hidrógeno del CH de la unidad de 1H -pirazol, y que se encuentra presente en todas las poliaminas estudiadas (Figura 7.12).

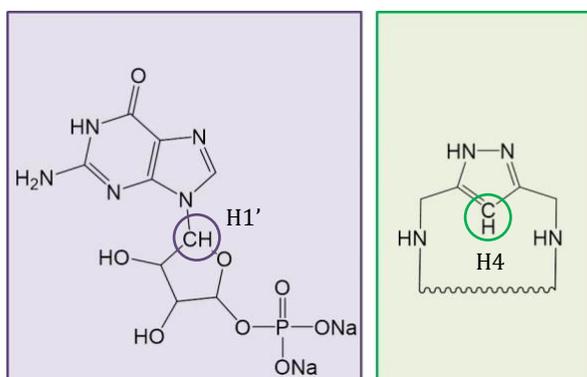


Figura 7.12. Señales de ^1H RMN monitorizadas durante los estudios cinéticos de formación de los hidrogeles.

En la Figura 7.13 se muestra la evolución con el tiempo de las señales de ^1H monitorizadas durante los estudios de la cinética de formación de los distintos hidrogeles.

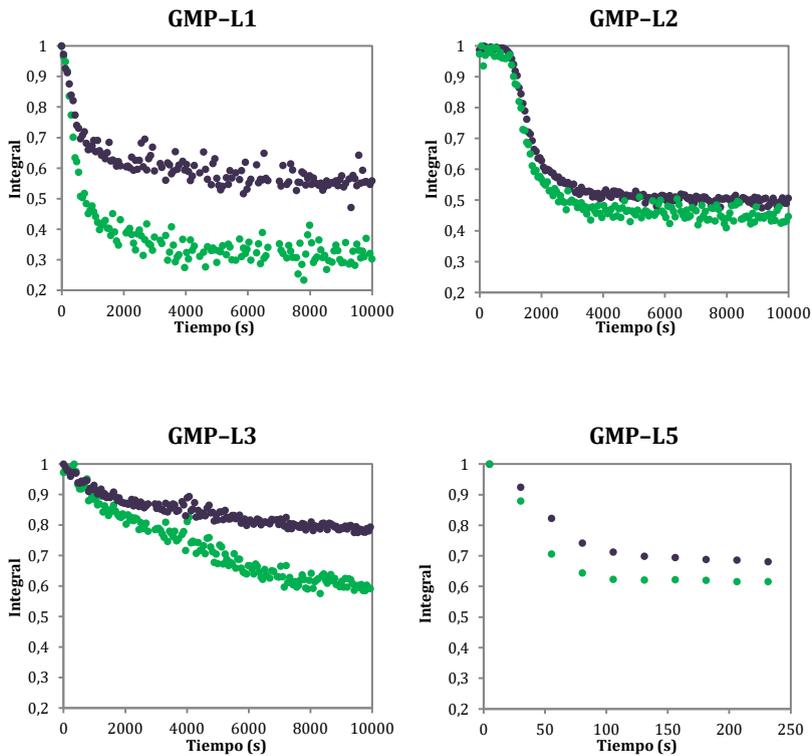


Figura 7.13. Evolución con el tiempo de las integrales durante el proceso de formación de los hidrogeles. Integrales del GMP, en morado. Integrales de la correspondiente poliamina, en verde. Los estudios se realizaron empleando las relaciones molares óptimas para la formación de los hidrogeles: GMP:L1 3:1, GMP:L2 3:1, GMP:L3 4:1, GMP:L5 5:1.

Como se puede ver en la Figura 7.13, en los cuatro sistemas se observa una disminución en las integrales a medida que aumenta el tiempo, tanto en el caso del GMP como de la poliamina, lo que indica el paso de moléculas desde la fase líquida a la fase sólida de hidrogel, como se ha explicado anteriormente.

Sin embargo, el perfil de la evolución de las integrales en función del tiempo es distinto dependiendo del sistema. Por un lado se encuentra el sistema GMP-L3, para el que se observa un descenso paulatino de las integrales de ambos componentes a medida que aumenta el tiempo. Por otro lado están el resto de sistemas, para los que el descenso de las integrales es más acusado, hasta que se produce una estabilización del valor de las integrales de ambos componentes. No obstante, en el caso del sistema GMP-L2 existe una meseta al inicio de la cinética, lo cual puede indicar un mecanismo de formación distinto o, simplemente que la cinética de formación es más lenta que en el resto de sistemas con el mismo perfil, precisando de más tiempo para que se inicie la formación del hidrogel.

Finalmente, cabe destacar que la cinética de formación del hidrogel constituido por GMP y L5 es mucho más rápida que en el resto de sistemas, como se puede apreciar en la escala del tiempo de las gráficas que se muestran en la Figura 7.13. De esta manera, mientras que en el caso de los sistemas GMP-L1 y GMP-L2 la formación de los hidrogeles se puede dar por concluida para un tiempo de 1 hora aproximadamente, y en el caso del sistema GMP-L3 para un tiempo de 2 horas, en el caso del sistema GMP-L5 el tiempo de formación del gel es mucho menor, siendo únicamente de 2-3 minutos, aproximadamente.

Esto se aprecia mejor en la Figura 7.14, donde se presentan los espectros registrados durante los estudios cinéticos de formación de hidrogeles para el sistema GMP-L5.

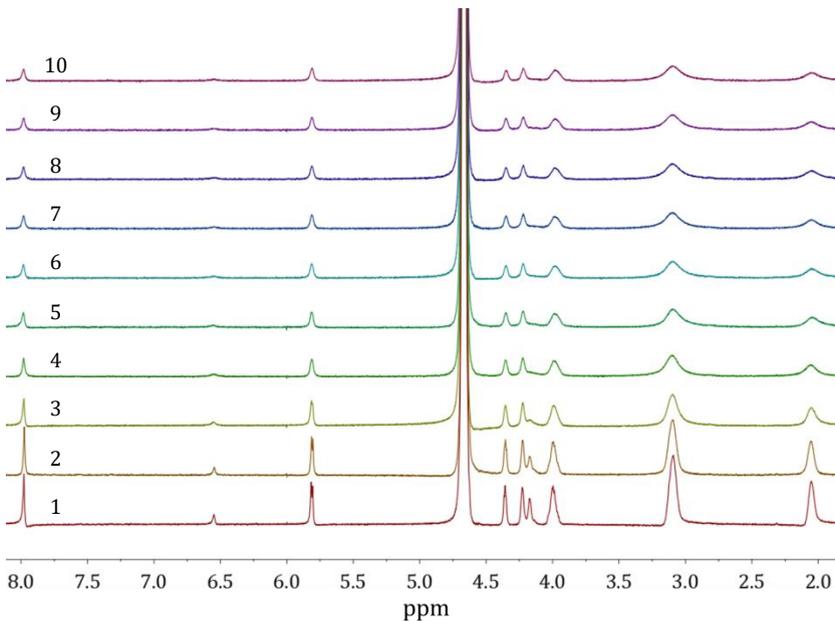


Figura 7.14. Espectros de RMN registrados durante los estudios cinéticos de formación de los hidrogeles para el sistema formado por GMP y la poliamina **L5**. Los estudios se realizaron empleando la relación molar óptima para la formación de los hidrogeles: GMP:L5 5:1.

Como se observa en la Figura 7.14, las señales del GMP y de **L5** decrecen rápidamente. Cabe destacar que cada espectro fue tomado con una separación de 25 segundos, y que en el quinto espectro la señal de la poliamina casi ha desaparecido por completo. En consecuencia, se puede decir que la cinética de formación de los hidrogeles es extraordinariamente rápida para el caso del sistema GMP-L5, que a su vez es el sistema que da lugar a la formación de los hidrogeles más resistentes, como se ha demostrado mediante reología.

7.5. Crio-Microscopía Electrónica de Barrido: Estudio de la Morfología de los Hidrogeles

La microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*) es una técnica que permite la obtención de imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra, haciendo uso de un haz de electrones para interactuar con la materia. El SEM es una técnica de análisis ampliamente utilizada en áreas de investigación tan dispares como la biología, la ciencia de los materiales y la arqueología, entre otras.

La crio-microscopía electrónica de barrido (crio-SEM) es una forma de microscopía en la que la muestra se criogeniza, enfriándola lo más rápido posible, normalmente mediante el empleo de nitrógeno líquido. La crio-microscopía permite una mayor conservación de la estructura original de la muestra en comparación con la microscopía clásica, haciendo posible la observación de cualquier muestra biológica o que contenga un elevado contenido de agua, como los hidrogeles que se presentan en este trabajo, precisando además de una preparación rápida y sencilla. Los biofísicos Jacques Dubochet, Joachim Frank y Richard Henderson recibieron el premio Nobel de Química de 2017 por el desarrollo de la técnica de crio-microscopía electrónica, para la determinación en alta resolución de la estructura de biomoléculas en disolución, lo que evidencia la importancia y la repercusión que tiene dicha técnica.

Para que una determinada muestra pueda ser analizada mediante crio-SEM ha de satisfacer dos requisitos: debe estar deshidratada y debe ser conductora. El proceso de deshidratación se realiza haciendo uso de un proceso de sublimación controlado, donde se elimina parcialmente el agua que contiene la muestra. Como consecuencia, se reduce la distorsión producida, dando lugar a una mayor preservación de la estructura original de la muestra. En cuanto al segundo requisito, las muestras necesitan recubrirse con un material que las haga conductoras, generalmente oro o carbono, permitiendo de esta manera su observación en el microscopio.

En la Figura 7.15 se presentan las imágenes tomadas en el crio-SEM para los hidrogeles de los cuatro sistemas estudiados. En todos los hidrogeles se advierte una estructura heterogénea e irregular, observando distintas regiones con canales de distintos tamaños. Asimismo, la estructura de los hidrogeles presenta un elevado grado de entrecruzamiento. Lo citado es concordante con la estructura que cabe esperar que exhiba un hidrogel, ya que se trata de un material que presenta tanto características de líquido como de sólido. Es decir, un hidrogel presenta una estructura no tan ordenada como la de un sólido, pero no tan desordenada como la de un líquido, y esto es precisamente lo que se deduce de las imágenes de la Figura 7.15.

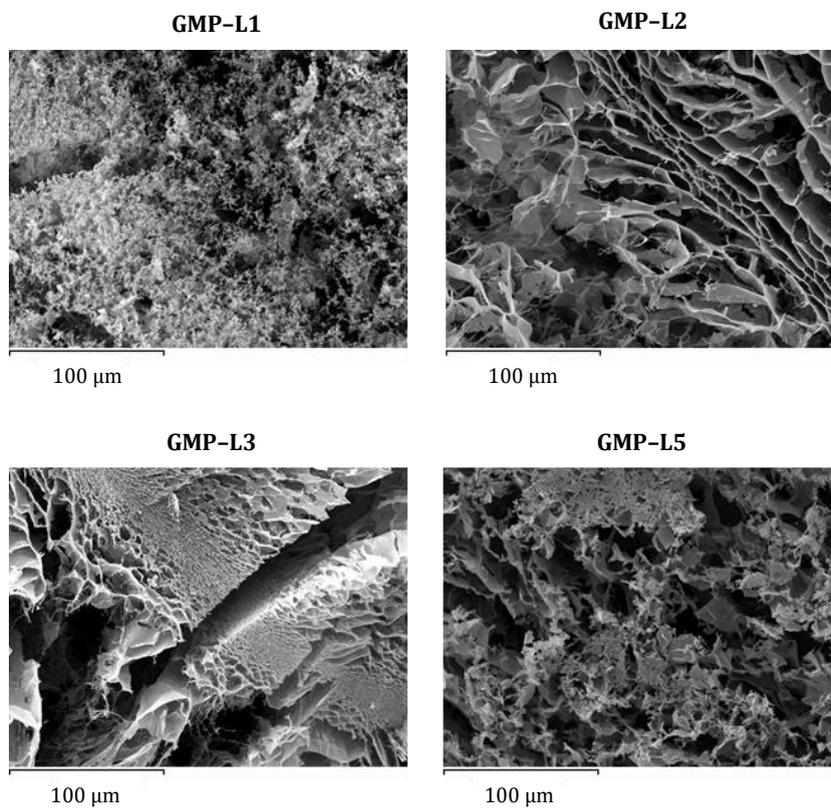


Figura 7.15. Imágenes de los hidrogeles de los distintos sistemas capturadas mediante crio-SEM. Los estudios se realizaron empleando las relaciones molares óptimas para la formación de los hidrogeles: GMP:L1 3:1, GMP:L2 3:1, GMP:L3 4:1, GMP:L5 5:1.

7.6. Hidrogeles Híbridos GMP–Poliamina como Materiales Biocompatibles

Hasta el momento, se ha evaluado la capacidad que presentan las poliaminas L1–L5 para estabilizar estructuras de tipo G–quadruplex, mediante la formación de hidrogeles híbridos con GMP y la posterior caracterización de los mismos haciendo uso de distintas técnicas, tales como la reología, la resonancia magnética nuclear de líquidos y la criomicroscopía electrónica.

Como se ha indicado en la introducción, los hidrogeles basados en guanina y en derivados de la guanina, presentan un potencial extraordinario como posibles materiales biocompatibles. Uno de los requisitos que deben presentar los hidrogeles es que deben exhibir suficiente resistencia mecánica, lo cual se ha demostrado mediante los estudios de reología.

Además, si se desea emplear los hidrogeles como materiales para aplicaciones biomédicas, estos deben de ser estables en condiciones *in vivo*. Por ejemplo, los hidrogeles tienen que ser estables a la temperatura del cuerpo humano. En base a ello, la estabilidad térmica de los hidrogeles se estudió mediante el método denominado *dropping ball*, el cual se encuentra descrito con más detalle en la sección *Material y Métodos*. Este método permite determinar la temperatura de disociación de los hidrogeles, que en todos los casos resultó ser superior a la temperatura del cuerpo humano, estando comprendidas en el intervalo 39–41 °C, dependiendo del hidrogel.

Confirmado que los hidrogeles presentan suficiente resistencia mecánica y estabilidad térmica, se decidió estudiar la formación de hidrogeles conteniendo el fármaco isoniacida como tercer componente, cuya estructura se presenta en la Figura 7.16.

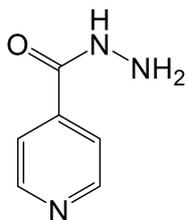


Figura 7.16. Estructura de la isoniacida.

La isoniacida es un derivado sintético de la vitamina B3, que se utiliza como fármaco principalmente para el tratamiento de la tuberculosis. Esta se puede administrar por vía oral e intramuscular, aunque normalmente la administración se realiza mediante vía oral, la cual puede ser en forma de pastillas, de cápsulas o de jarabe. Algunos de los jarabes disponibles en el mercado presentan una concentración de 10 mg de isoniacida por mililitro del mismo, motivo por el cual se decidió preparar hidrogeles conteniendo 10 mg de isoniacida por mililitro de hidrogel. También se prepararon hidrogeles conteniendo 1 mg de isoniacida por mililitro de hidrogel, con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de distintas cantidades de isoniacida. Los estudios se realizaron empleando las relaciones molares óptimas para la formación de los hidrogeles

En las Tablas 7.7–7.10 se presentan los valores estimados para el módulo de almacenamiento (G'), módulo de pérdida (G'') y límite de elasticidad (γ) de los hidrogeles, obtenidos de las medidas reológicas de dinámica oscilatoria, que se muestran en las Figuras 7.17–7.20.

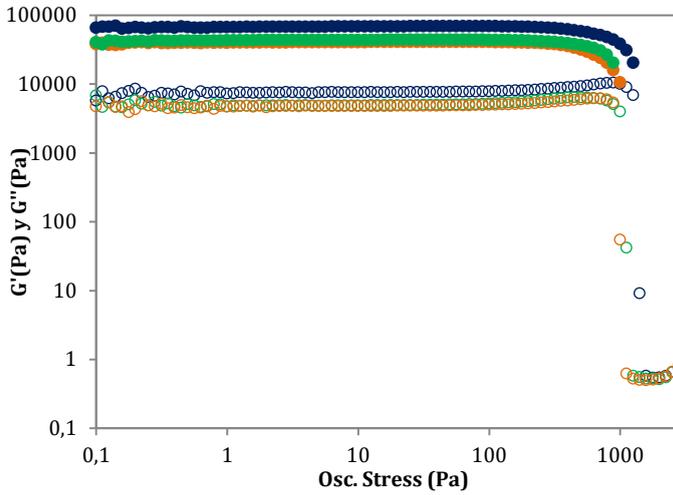


Figura 7.17. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L1-Isoniacida. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Hidrogel sin isoniacida, preparado haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L1 3:1 (azul). Hidrogel GMP:L1 3:1 conteniendo 1 mg isoniacida/mL (verde). Hidrogel GMP:L1 3:1 conteniendo 10 mg isoniacida/mL (naranja).

Tabla 7.7. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L1-Isoniacida, haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L1 3:1.

GMP:L1	Isoniacida (mg/mL)	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
3:1	0	65000	7300	1190
3:1	1	46000	5300	1060
3:1	10	42000	4600	950

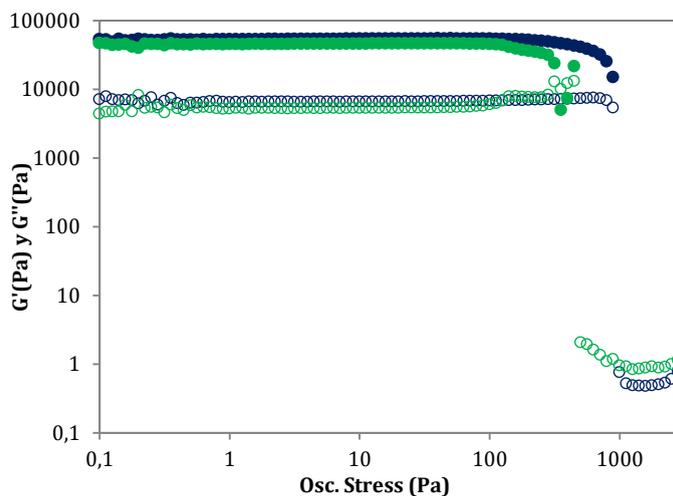


Figura 7.18. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L2-Isoniacida. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Hidrogel sin isoniacida, preparado haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L2 3:1 (azul). Hidrogel GMP:L2 3:1 conteniendo 1 mg isoniacida/mL (verde).

Tabla 7.8. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L2-Isoniacida, haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L2 3:1.

GMP:L2	Isoniacida (mg/mL)	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
3:1	0	50000	6100	890
3:1	1	46000	5300	450
3:1	10	-	-	-

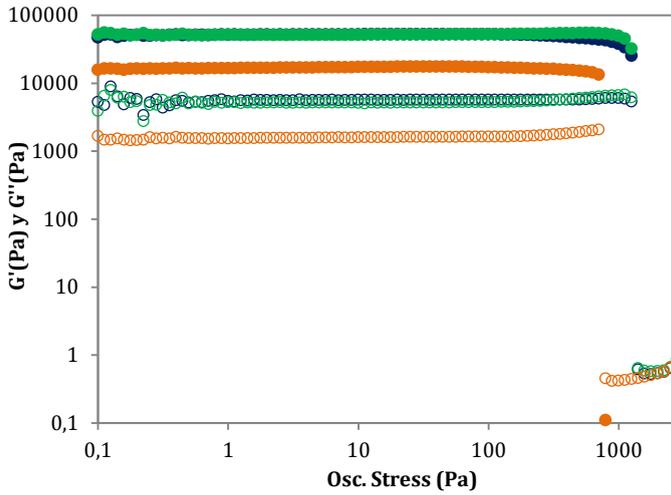


Figura 7.19. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L3-Isoniacida. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Hidrogel sin isoniacida, preparado haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L3 4:1 (azul). Hidrogel GMP:L3 4:1 conteniendo 1 mg isoniacida/mL (verde). Hidrogel GMP:L3 4:1 conteniendo 10 mg isoniacida/mL (naranja).

Tabla 7.9. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L3-Isoniacida, haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L3 4:1.

GMP:L3	Isoniacida (mg/mL)	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
4:1	0	49000	5400	1260
4:1	1	52000	5200	1260
4:1	10	18000	1700	790

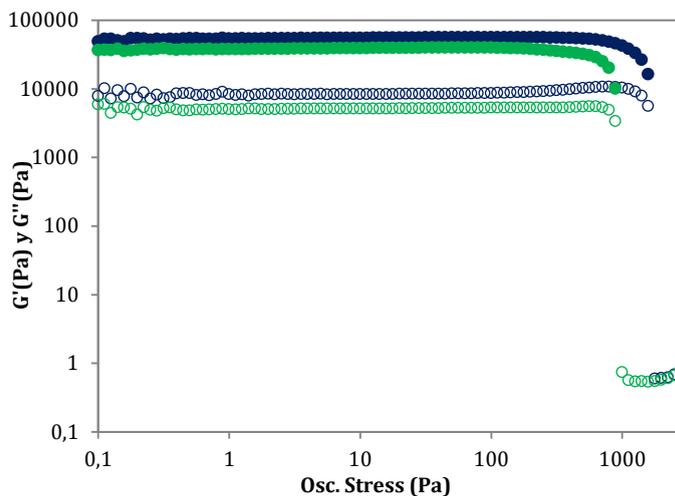


Figura 7.20. Medidas de dinámica oscilatoria para el sistema GMP-L5-Isoniacida. Círculos rellenos: G' . Círculos huecos: G'' . Hidrogel sin isoniacida, preparado haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L5 5:1 (azul). Hidrogel GMP:L5 5:1 conteniendo 1 mg isoniacida/mL (verde).

Tabla 7.10. Resultados de las medidas reológicas para el sistema GMP-L5-Isoniacida, haciendo uso de la relación molar óptima, GMP:L5 5:1.

GMP:L5	Isoniacida (mg/mL)	G' (Pa)	G'' (Pa)	γ (Pa)
5:1	0	60000	9100	1780
5:1	1	52000	5200	1260
5:1	10	-	-	-

En la Figura 7.21 se representa el límite de elasticidad de los hidrogeles de los distintos sistemas en función de la cantidad de isoniacida añadida, lo que permite evaluar de manera sencilla el efecto de la adición de isoniacida sobre la estabilidad de los hidrogeles.

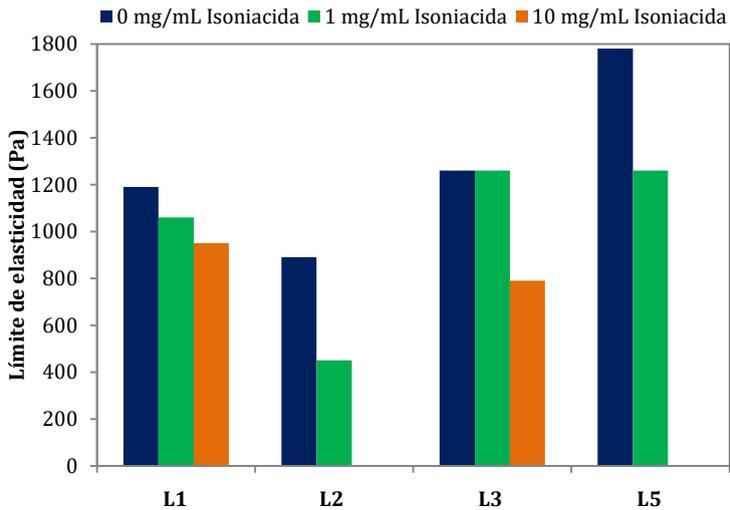


Figura 7.21. Límite de elasticidad de los hidrogeles en función de la cantidad adicionada de isoniacida, haciendo uso de las relaciones molares óptimas para la formación de hidrogeles para cada sistema.

En los cuatro sistemas se observa el mismo comportamiento. Cuanto mayor es la cantidad de isoniacida que se introduce en el hidrogel, menor es la resistencia del mismo, como demuestran los valores estimados para el módulo de almacenamiento, el módulo de pérdida y el límite de elasticidad de los hidrogeles, resumidos en las Tablas 7.7-7.10 y deducidos de las Figuras 7.17-7.20.

También en los cuatro sistemas, fue posible la obtención de hidrogeles conteniendo 1 mg de isoniacida por mililitro de hidrogel. En cambio, solo fue posible obtener hidrogeles conteniendo 10 mg de isoniacida en dos de los cuatro sistemas, los formados por **L1** y **L3**. Entre estas dos poliaminas, **L1** da lugar a los hidrogeles más resistentes conteniendo 10 mg de isoniacida, además de ser el sistema en el que menos se debilitan los hidrogeles cuando se adiciona una determinada cantidad del fármaco. En los otros dos sistemas, los constituidos por **L2** y **L5**, no fue posible obtener hidrogeles conteniendo 10 mg de isoniacida, lo cual es particularmente llamativo en el caso de **L5**, poliamina que daba lugar a la formación de los hidrogeles más resistentes (Figura 7.21).

7.7. Conclusiones

Se han preparado y caracterizado con éxito nuevos hidrogeles híbridos basados en GMP, haciendo uso de las poliaminas **L1**, **L2**, **L3** y **L5**, empleando concentraciones de GMP un orden de magnitud inferior a la concentración necesaria para la formación de los mismos hidrogeles pero en ausencia de las poliaminas. En base a ello, se puede afirmar que las poliaminas **L1**, **L2**, **L3** y **L5** favorecen el proceso de formación de hidrogeles de GMP, debido a su capacidad para estabilizar la formación de estructuras de tipo G-quadruplex. En cambio, sorprendentemente, no ha sido posible obtener hidrogeles híbridos empleando la poliamina **L4**, presentando un comportamiento discordante con el resto de poliaminas.

Haciendo uso de la técnica de reología se han podido determinar las condiciones óptimas para la formación de los hidrogeles para cada sistema. En los cuatro sistemas, los hidrogeles más resistentes se han obtenido cuando el número de cargas negativas que aporta la molécula de GMP es igual al número de cargas positivas que porta la poliamina, Es decir, cuando la estructura resultante del hidrogel se puede considerar neutra. Las poliaminas **L3** y **L5** dan lugar a la formación de los hidrogeles más resistentes, presentando límites de elasticidad de 1260 Pa y 1780 Pa, respectivamente. Además, estas dos poliaminas también presentan el mayor intervalo de relaciones molares en que se produce la formación de hidrogeles.

El proceso de formación de los hidrogeles se ha podido seguir mediante resonancia magnética nuclear, estudiando la evolución de los espectros de ^1H de los hidrogeles en función del tiempo. En los cuatro sistemas se observa una disminución en las integrales de los componentes del hidrogel a medida que se produce la formación del mismo, como consecuencia del paso de moléculas desde la fase líquida a la fase sólida del hidrogel. Asimismo, los estudios cinéticos revelaron que la formación de los hidrogeles es extraordinariamente rápida en el sistema GMP-L5, presentando un tiempo de formación del hidrogel de 2-3 minutos, aproximadamente.

Mediante crio-microscopía electrónica, se ha estudiado la morfología de los hidrogeles de los sistemas GMP-L1, GMP-L2, GMP-L3 y GMP-L5. Las imágenes evidencian una morfología similar de los hidrogeles en los cuatro sistemas, revelando una estructura heterogénea, irregular y con un elevado grado de entrecruzamiento.

Finalmente, se ha podido preparar y caracterizar con éxito hidrogeles conteniendo isoniacida, que es un fármaco empleado en el tratamiento de la tuberculosis. Además, en el caso de los sistemas GMP-L1 y GMP-L3 fue posible la obtención de hidrogeles conteniendo 10 mg de isoniacida por mililitro de hidrogel, lo que coincide con la dosis de isoniacida administrada mediante vía oral en algunos tratamientos.

7.8. Bibliografía

- [1] I. Bang. *Biochem. Z.* **1910**, 26, 293–311.
- [2] M. F. Gellert, M. N. Lipsett, D. R. Davies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1962**, 48, 2013–2018.
- [3] V. Sasisekharan, S. Zimmerman, D. R. Davies. *J. Mol. Biol.* **1975**, 92, 171–179.
- [4] S. B. Zimmerman. *J. Mol. Biol.* **1976**, 106, 663–672.
- [5] J. T. Davis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 668–698.
- [6] S. Neidle, S. Balasubramanian. *Quadruplex Nucleic Acids*. The Royal Society of Chemistry, **2006**.
- [7] J. L. Huppert. *Biochimie* **2008**, 90, 1140–1148.
- [8] D. Sen, W. Gilbert. *Nature* **1988**, 334, 364–366.
- [9] W. I. Sundquist, A. Klug. *Nature* **1989**, 342, 825–829.
- [10] J. L. Huppert, S. Balasubramanian. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 2908–2916.
- [11] J. L. Huppert, S. Balasubramanian. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 406–413.
- [12] A. Ambrus, D. Chen, J. Dai, R. A. Jones, D. Yang. *Biochemistry* **2005**, 44, 2048–2058.
- [13] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402–5415.
- [14] J. L. Huppert. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1375–1384.
- [15] D. Rhodes, H. J. Lipps. *Nucleic Acids Res.* **2015**, 43, 8627–8637.
- [16] E. H. Blackburn. *Nature* **1991**, 350, 569–573.
- [17] S. Neidle, G. N. Parkinson. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2003**, 13, 275–283.
- [18] T. Ou, Y. Lu, J. Tan, Z. Huang, K.-Y. Wong, L. Gu. *ChemMedChem* **2008**, 3, 690–713.
- [19] J. W. Szostak, E. H. Blackburn. *Cell* **1982**, 29, 245–255.
- [20] C. W. Greider, E. H. Blackburn. *Cell* **1985**, 43, 405–413.
- [21] C. W. Greider, E. H. Blackburn. *Nature* **1989**, 331–337.
- [22] N. Kim, M. Piatyszek, K. Prowse, C. Harley, M. West, P. Ho, G. Coviello, W. Wright, S. Weinrich, J. Shay. *Science* **1994**, 266, 2011–2015.
- [23] J. W. Shay, S. Bacchetti. *Eur. J. Cancer* **1997**, 33, 787–791.

- [24] L. H. Hurley, R. T. Wheelhouse, D. Sun, S. M. Kerwin, M. Salazar, O. Y. Fedoroff, F. X. Han, H. Han, E. Izbicka, D. D. Von Hoff. *Pharmacol. Ther.* **2000**, 85, 141–158.
- [25] D. Monchaud, M.-P. Teulade-Fichou. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, 6, 627–636.
- [26] D. Monchaud, A. Granzhan, N. Saettel, A. Guédin, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou. *J. Nucleic Acids* **2010**, 1–19.
- [27] A. Granzhan, D. Monchaud, N. Saettel, A. Guédin, J.-L. Mergny, M.-P. Teulade-Fichou. *J. Nucleic Acids* **2010**, 1–11.
- [28] G. W. Collie, G. N. Parkinson. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5867–5892.
- [29] R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, T. *Nature* **1995**, 374, 240–242.
- [30] S. C. Bremmer, J. Chen, A. J. McNeil, M. B. Soellner. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 5482–5484.
- [31] J. Chen, W. Wu, A. J. McNeil. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 7310–7312.
- [32] V. A. Dowling, J. A. M. Charles, E. Nwakpuda, L. B. McGown. *Anal. Chem.* **2004**, 76, 4558–4563.
- [33] B. Escuder, F. Rodríguez-Llansola, J. F. Miravet. *New J. Chem.* **2010**, 34, 1044–1054.
- [34] F. Hapiot, S. Menuel, E. Monflier. *ACS Catal.* **2013**, 3, 1006–1010.
- [35] T. Fukushima, K. Asaka, A. Kosaka, T. Aida. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 2410–2413.
- [36] A. Ajayaghosh, V. K. Praveen. *Acc. Chem. Res.* **2007**, 40, 644–656.
- [37] J. D. Tovar. *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 1527–1537.
- [38] H. Wang, Z. Yang. *Soft Matter* **2012**, 8, 2344–2347.
- [39] A. G. Cheetham, P. Zhang, Y. Lin, L. L. Lock, H. Cui. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 2907–2910.
- [40] T. N. Plank, J. T. Davis. *Chem. Commun.* **2016**, 52, 5037–5040.
- [41] J. Z. Gasiorowski, J. H. Collier. *Biomacromolecules* **2011**, 12, 3549–3558.
- [42] E. C. Wu, S. Zhang, C. A. E. Hauser. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 22, 456–468.
- [43] J. S. Rudra, T. Sun, K. C. Bird, M. D. Daniels, J. Z. Gasiorowski, A. S. Chong, J. H. Collier. *ACS Nano* **2012**, 6, 1557–1564.
- [44] A. Vintiloiu, J.-C. Leroux. *J. Control. Release* **2008**, 125, 179–192.
- [45] A. R. Hirst, B. Escuder, J. F. Miravet, D. K. Smith. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 8002–8018.

- [46] J. W. Steed. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 1379–1383.
- [47] M. C. Koetting, J. T. Peters, S. D. Steichen, N. A. Peppas. *Mater. Sci. Eng. R: Rep.* **2015**, 93, 1–49.
- [48] J. Raeburn, D. J. Adams. *Chem. Commun.* **2015**, 51, 5170–5180.
- [49] K. J. Skilling, F. Citossi, T. D. Bradshaw, M. Ashford, B. Kellam, M. Marlow. *Soft Matter* **2014**, 10, 237–256.
- [50] J. T. Davis, G. P. Spada. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, 36, 296–313.
- [51] L. E. Buerkle, H. A. von Recum, S. J. Rowan. *Chem. Sci.* **2012**, 3, 564–572.
- [52] R. N. Das, Y. P. Kumar, S. Pagoti, A. J. Patil, J. Dash. *Chem. Eur. J.* **2012**, 18, 6008–6014.
- [53] B. Adhikari, A. Shah, H.-B. Kraatz. *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 4802–4810.
- [54] A. Kumar, S. K. Gupta. *J. Phys. Chem. B* **2014**, 118, 10543–10551.
- [55] G. M. Peters, J. T. Davis. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, 45, 3188–3206.
- [56] A. Biswas, S. Malferrari, D. M. Kalaskar, A. K. Das. *Chem. Commun.* **2018**, 54, 1778–1781.
- [57] Y. Yu, D. Nakamura, K. DeBoyace, A. W. Neisius, L. B. McGown. *J. Phys. Chem. B* **2008**, 112, 1130–1134.
- [58] R. Belda, E. García-España, G. A. Morris, J. W. Steed, J. A. Aguilar. *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 7755–7760.
- [59] N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 5938–5943.
- [60] N. Sreenivasachary, J.-M. Lehn. *Chem. Asian J.* **2008**, 3, 134–139.
- [61] M. Reiner. *Physics Today* **1964**, 17, 62–62.

8

**Miméticos de la
Enzima Cu,Zn-SOD**

8.1. Introducción

Especies reactivas del oxígeno

El oxígeno molecular es esencial para la vida de todos los organismos aerobios. Un ser humano puede estar muchos días sin comer, varios días sin beber, pero solamente un pocos minutos sin oxígeno.^[1]

No obstante, los organismos aerobios también están expuestos a la toxicidad del oxígeno. El oxígeno molecular es un agente oxidante fuerte, es decir, tiene una gran tendencia a aceptar densidad electrónica en los orbitales π^* , los cuales se encuentran parcialmente ocupados, siendo al mismo tiempo los orbitales HOMO y LUMO de la molécula (SOMO). Favorablemente para la vida en la tierra, casi la totalidad de biomoléculas orgánicas son diamagnéticas en su estado fundamental. En estas condiciones, la transferencia electrónica no se produce con facilidad. Se dice que la transferencia electrónica está prohibida por el espín. Este hecho es de una importancia biológica extraordinaria, permitiendo que sea posible la vida en la Tierra en condiciones de una atmósfera oxidante.^[1-3]

El oxígeno molecular normalmente se reduce a la molécula de H_2O . Este proceso implica la transferencia de cuatro electrones, el cual tiene lugar en varios pasos consecutivos mediante la formación de especies reducidas intermedias, tales como el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo.^[4,5]

Estas especies de oxígeno intermedias se conocen como especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *Reactive Oxygen Species*), las cuales se resumen en la Tabla 8.1.

Tabla 8.1. Especies reactivas del oxígeno (ROS).

Radicalarias	No radicalarias
Superóxido, $O_2^- \cdot$	Oxígeno singlete, $O_2 (^1\Delta_g)$
Hidroperoxilo, $HO_2 \cdot$	Ozono, O_3
Hidroxilo, $HO \cdot$	Peróxido de hidrógeno, H_2O_2
Alcoxilo, $RO \cdot$	Peróxido de alquilo, RO_2H
Peroxilo, $RO_2 \cdot$	Peroxinitrito, $ONOO^-$

Las especies reactivas del oxígeno son potencialmente dañinas para los organismos vivos. El oxígeno molecular interviene en un elevado número de reacciones bioquímicas, siendo constante la generación de ROS.

Sin embargo, los organismos vivos poseen mecanismos de protección frente a la producción de ROS, especies que se conocen como antioxidantes. La situación en la que los niveles de ROS exceden los niveles de antioxidantes se conoce como estrés oxidativo, escenario que puede ser consecuencia de una generación de ROS superior a la que los mecanismos de protección pueden tolerar y/o a un mal funcionamiento de los mecanismos de protección.^[6-8] El estrés oxidativo está asociado a la aparición de enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Alzheimer,^[9-11] la de Parkinson^[12-14] o la esclerosis lateral amiotrófica,^[15-19] entre otras.

El anión superóxido

El anión superóxido es una especie del oxígeno de naturaleza radicalaria, que se origina cuando se adiciona un electrón a la molécula de dióxígeno. Es decir, es el resultado de la reducción del oxígeno molecular por un electrón, como se detalla en la ecuación 8.1:



En el cuerpo humano, existen distintas fuentes de generación del anión superóxido, siendo la principal de ellas las reacciones del metabolismo aerobio, en concreto las reacciones de oxidación y reducción de la cadena de transporte electrónico.^[20,21] Otras fuentes de generación del anión superóxido que se pueden citar son el sistema inmunitario,^[22,23] como resultado de la activación de los fagocitos, así como las enzimas óxido nítrico sintasa^[24,25] y xantina oxidasa.^[26,27]

El anión superóxido es tóxico, si bien la reactividad del mismo ha sido motivo de discusión en los últimos años, no estando del todo claro si la toxicidad del superóxido se debe a la acción directa del radical sobre los tejidos, o bien a la acción indirecta, mediante la transformación en otras especies, las cuales serían responsables de la toxicidad.

Toxicidad directa

El radical superóxido presenta una mayor ocupación de los orbitales π^* en comparación con el oxígeno molecular. Esto da lugar a que el enlace $O - O$ se debilite, aumentando la longitud del enlace y la reactividad de la molécula. Pero el anión superóxido es de naturaleza paramagnética, de modo que la reacción del mismo con la materia orgánica está prohibida por el espín.^[1]

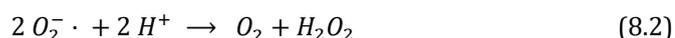
No obstante, en los organismos aerobios no toda la materia es diamagnética. En estos casos, el anión superóxido puede reaccionar directamente con ella. El anión superóxido puede reaccionar con metaloenzimas que contienen un clúster hierro-azufre [$4Fe - 4S$] como la aconitasa, enzima que cataliza la isomerización de citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs. También puede reaccionar con metaloenzimas similares de la familia de las liasas, como la fumarasa A y la fumarasa B, las cuales catalizan la reacción reversible de hidratación y deshidratación de fumarato y malato, y que también participan en el ciclo de Krebs. La reacción del anión superóxido con estas enzimas dará lugar a cambios conformacionales en la estructura de las mismas, pudiendo afectar a la actividad enzimática.^[28-30]

Asimismo, el anión superóxido puede reaccionar con algunos lípidos que son susceptibles de ser oxidados, fenómeno conocido como peroxidación lipídica, que en la mayoría de casos afecta a lípidos poliinsaturados. La peroxidación de lípidos produce daños en la membrana celular, afectando a su función. Además, en el proceso se produce una serie de aldehídos y cetonas tóxicas.^[3,31]

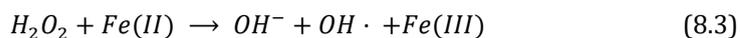
Toxicidad indirecta

El anión superóxido puede reaccionar con distintas especies, dando lugar a la formación de otras ROS, las cuales pueden reaccionar con determinadas biomoléculas orgánicas ocasionando daños celulares.^[2,3]

En medios próticos, el anión superóxido se comporta como un oxidante fuerte con tendencia a la dismutación, resultando en la formación de una molécula de oxígeno molecular y otra de agua oxigenada, según la ecuación 8.2:

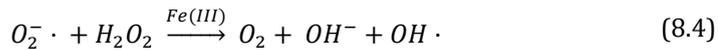


El agua oxigenada es tóxica, lo cual se debe a la reacción de la misma con Fe(II), proceso que se conoce como reacción de Fenton,^[32,33] y que se detalla en la ecuación 8.3:



En este proceso se produce la formación del radical hidroxilo $OH \cdot$, que está considerado como el oxidante biológico más potente, el cual reacciona con casi la totalidad de las biomoléculas orgánicas.^[1]

El radical hidroxilo también se puede generar como producto de la reacción entre el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en un proceso catalizado por Fe(III) y que se encuentra acoplado a la reacción de Fenton, conocido como reacción de Haber–Weiss,^[34] el cual se describe en la ecuación 8.4:



En disolución acuosa, el anión superóxido se protona con facilidad dando lugar a la formación del radical hidroperoxilo $HO_2 \cdot$, el cual es un oxidante mucho más fuerte e inestable frente a la dismutación,^[1] proceso que se detalla en la ecuación 8.5:



El radical superóxido también puede reaccionar con el radical nitrosilo $NO \cdot$, resultando en la formación del anión peroxinitrito $ONOO^-$, como se describe en la ecuación 8.6. El peroxinitrito es un agente oxidante fuerte, que puede originar reacciones de peroxidación de lípidos y proteínas.^[35,36]



La enzima superóxido dismutasa

Como se ha expuesto en el apartado anterior, el anión superóxido es tóxico. Aunque dismuta a una velocidad considerable, siendo esta del orden de $4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$,^[37] no es suficiente como para mantener una concentración de anión superóxido adecuada para que no se produzcan daños celulares.^[38]

Como consecuencia, los organismos aerobios han desarrollado mecanismos de defensa frente a la toxicidad de las especies reactivas del oxígeno, entre los que se encuentran la familia de metaloenzimas superóxido dismutasa (SOD), las cuales se encargan de catalizar la dismutación del anión superóxido a velocidades del orden de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, manteniendo el equilibrio entre la generación y eliminación del anión superóxido.^[39-41] El centro activo de esta familia de metaloenzimas está constituido por un metal de transición electroactivo, el cual se encarga de catalizar la dismutación del anión superóxido mediante un mecanismo de *ping-pong*,^[42] como se representa en la Figura 8.1.

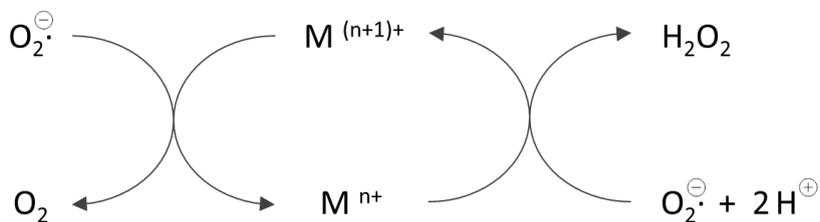
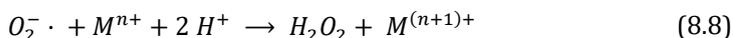
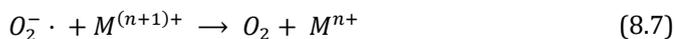


Figura 8.1. Mecanismo de *ping-pong* para la dismutación del anión superóxido, proceso catalizado por la familia de enzimas superóxido dismutasa.

La reacción de dismutación del anión superóxido es un proceso que tiene lugar en dos etapas. En la primera etapa, una molécula de anión superóxido se oxida, resultando en la formación de una molécula de dióxígeno, según la ecuación 8.7. En la segunda etapa, una segunda molécula de superóxido se reduce, dando lugar a la formación de una molécula de agua oxigenada, según la ecuación 8.8.^[1,43]



Existen distintas variedades de la familia de enzimas superóxido dismutasa. Todas ellas realizan la misma función, pero se distinguen en el metal o metales de transición que constituyen el centro activo de la enzima, que puede ser: cobre y zinc (Cu,Zn-SOD), hierro (Fe-SOD), manganeso (Mn-SOD) y níquel (Ni-SOD).^[44]

La primera variedad en ser aislada y estudiada fue la que se encuentra constituida por cobre y zinc (Cu,Zn-SOD). Este tipo de enzimas se encuentra principalmente en el citoplasma de células eucariotas, cloroplastos y periplasma de bacterias Gram negativas. Posteriormente, se aislaron las variedades de la enzima constituidas por hierro (Fe-SOD) y por manganeso (Mn-SOD), que están emparentadas evolutivamente y son similares estructuralmente. La primera de ellas se encuentra en las células procariotas de los organismos anaerobios, mientras que la segunda se encuentra en las mitocondrias de las células de todos los mamíferos. Finalmente, fue aislada la variedad de la enzima que incorpora níquel en el centro activo de la misma (Ni-SOD), la cual se encuentra en algunas cianobacterias marinas, así como en las actinobacterias del género *Streptomyces*.^[12]

Enzima superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD)

De las distintas variedades de enzimas superóxido dismutasa, este trabajo se centra en el diseño de miméticos de la enzima superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu,Zn-SOD).

La enzima Cu,Zn-SOD fue aislada por primera vez en 1938 por el científico ruso David Keilin y por su homólogo polaco Thaddeus Mann.^[45,46] La proteína presentaba un color azul verdoso, lo que sugería la presencia de cobre(II) en su estructura, motivo por el cual recibió el nombre de *Hæmocuprein*, en castellano *Hemocupreína*. En la década de los cincuenta, fueron aisladas distintas enzimas similares: la enzima *Eritrocupreína*,^[47,48] procedente de eritrocitos humanos, así como las enzimas *Cerebrocupreína*^[49] y *Hepatocupreína*,^[50] procedentes de cerebro e hígado, respectivamente.

Aunque se desconocía la función de esta variedad de enzimas, se supuso que necesariamente esta debía de ser la misma, suposición que resultó ser correcta. En 1969, el bioquímico estadounidense Irwin Fridovich, en colaboración con el estudiante de doctorado Joe McCord, demostraron que la función de estas metaloproteínas era la de catalizar la dismutación de anión superóxido.^[51,52] Desde entonces, esta variedad de enzimas es conocida como *superóxido dismutasas*.

Las enzimas de la familia Cu,Zn-SOD son en su mayoría especies de naturaleza dímica, con una masa molecular de unos 32 kDa. Están constituidas por dos subunidades idénticas, y cada subunidad contiene un cobre(II), un zinc(II) y ocho cadenas peptídicas de tipo hoja- β , las cuales forman una estructura de barril cilíndrico conocido como barril- β . La estructura dímica se denota como Cu₂Zn₂SOD, y exhibe una elevada estabilidad debido a la presencia de los cationes cobre(II) y zinc(II), así como a la presencia de interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas entre las dos subunidades (Figura 8.2).^[53]

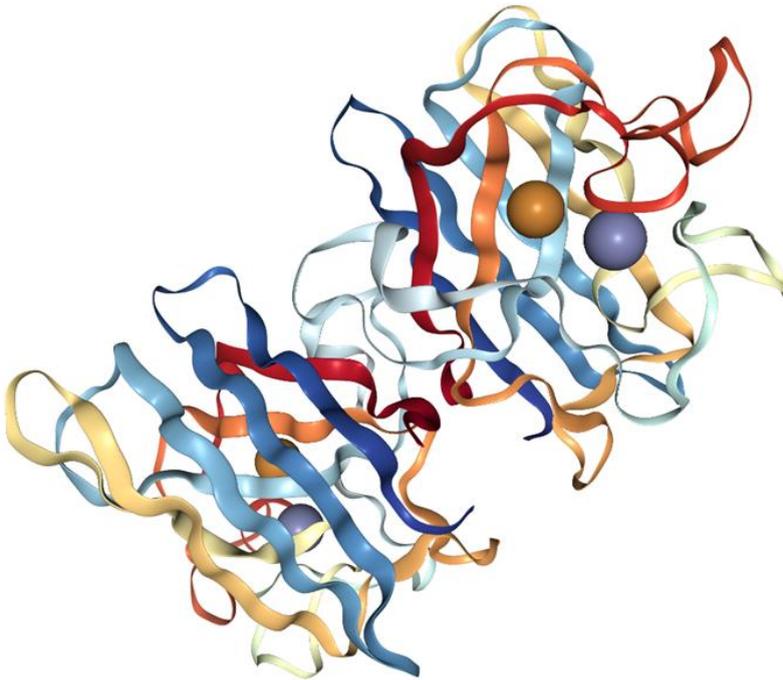


Figura 8.2. Diagrama de cintas de la enzima Cu₂Zn₂SOD, adaptado de la referencia [53], PDB 2SOD.

El cobre es el elemento electroactivo de la enzima, y por lo tanto el centro catalítico de la misma. Cuando el cobre se encuentra en el estado de oxidación +2, la enzima se encuentra en la forma oxidada, estando el cobre coordinado a cuatro residuos histidina: His-44, His-46, His-61 e His-118. El cobre completa la coordinación con una molécula de agua a la que se encuentra débilmente enlazado. El cobre presenta una geometría de coordinación pirámide de base cuadrada altamente distorsionada, en la que la molécula de agua ocupa la posición apical, apuntando hacia el exterior de la cavidad de la proteína.^[1,43]

En cambio, el zinc desempeña una función estructural, permaneciendo la actividad enzimática prácticamente inalterada cuando se reemplaza el mismo por distintos metales de transición como el cobalto(II), cobre(II), cadmio(II) o mercurio(II).^[1] El zinc se encuentra en la parte más interna de la cavidad, inaccesible al disolvente y conectado al cobre mediante la histidina His-61. La coordinación del zinc la completa un grupo carboxilato del aspartato Asp-81 y las histidinas His-69 e His-78, dando lugar a una geometría de coordinación tetraédrica.^[43] En la Figura 8.3 se presenta la estructura del centro activo de la enzima Cu,Zn-SOD.

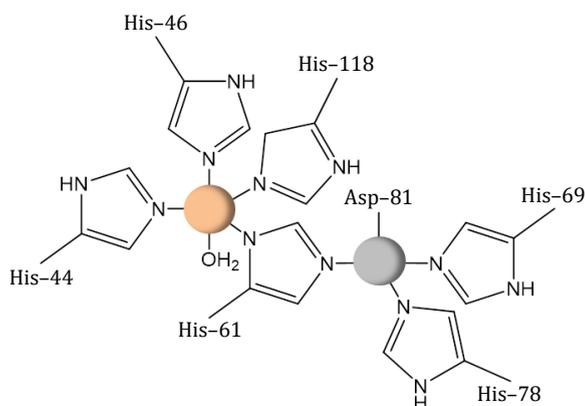


Figura 8.3. Estructura del centro activo de la enzima Cu,Zn-SOD. Cobre(II), en naranja. Zinc(II), en gris.

A lo largo de los años se han propuesto distintos mecanismos para el ciclo catalítico de la enzima Cu,Zn-SOD, todos ellos consecuentes con las principales evidencias experimentales. No obstante, algunos aspectos del mecanismo catalítico continúan siendo motivo de discusión en la actualidad. En la Figura 8.4 se presenta el mecanismo catalítico propuesto por John Tainer y colaboradores, publicado en 1983 en la revista *Nature*,^[54] el cual es el mecanismo más aceptado por la comunidad científica.

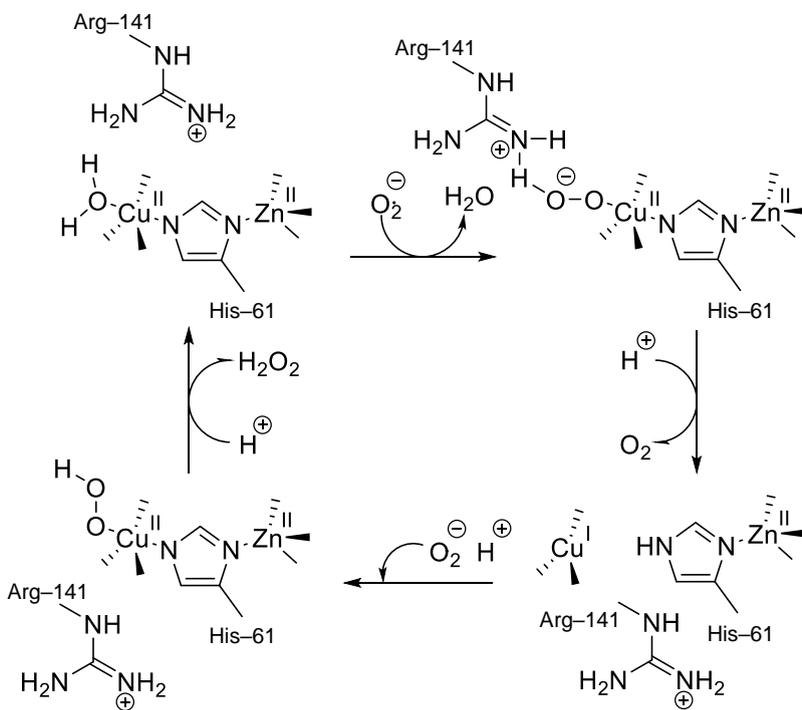


Figura 8.4. Mecanismo catalítico propuesto por John Tainer y colaboradores para la enzima Cu,Zn-SOD, adaptado de la referencia [54].

Miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD

El estrés oxidativo puede estar ocasionado por una producción de anión superóxido superior a la que los mecanismos de defensa pueden hacer frente, pero también puede ser debido a un mal funcionamiento de los mecanismos de defensa. En cualquier caso, el estrés oxidativo está relacionado con la aparición de una serie de enfermedades degenerativas y neurodegenerativas.

Esencialmente existen dos opciones para corregir el estrés oxidativo. La primera de las opciones consiste en suministrar la enzima a modo de fármaco. Pero en muchos casos esto no es posible, debido a la imposibilidad de purificación y obtención de la enzima, así como al elevado coste del proceso. También existe la posibilidad de que el organismo desarrolle inmunogenicidad frente a la enzima. Además, la enzima puede no ser termoestable, degradándose rápidamente. La segunda de las opciones consiste en diseñar miméticos de la enzima para su posterior empleo terapéutico. Como mimético enzimático se entiende aquel sistema más sencillo que la enzima, y que reproduce la estructura y/o las propiedades del centro activo de la misma, al menos parcialmente, presentando además la capacidad de realizar las funciones de la enzima.

El diseño de miméticos enzimáticos permite obtener información acerca del mecanismo de acción de la enzima, así como del funcionamiento de la misma. Asimismo, la síntesis orgánica permite de manera relativamente sencilla la modificación del mimético, adaptando la estructura y las propiedades del mismo a las circunstancias específicas de cada caso.

Los primeros intentos de diseño de miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD fueron realizados por el químico estadounidense Stephen Lippard y colaboradores, durante las décadas de los setenta y de los ochenta,^[55-61] preparando una serie de complejos dinucleares con cobre, algunos de los cuales se presentan en la Figura 8.5. Determinados compuestos incorporan la unidad de imidazol en su estructura, tratando de reproducir el puente imidazolato His-61 presente en el centro activo de la enzima.

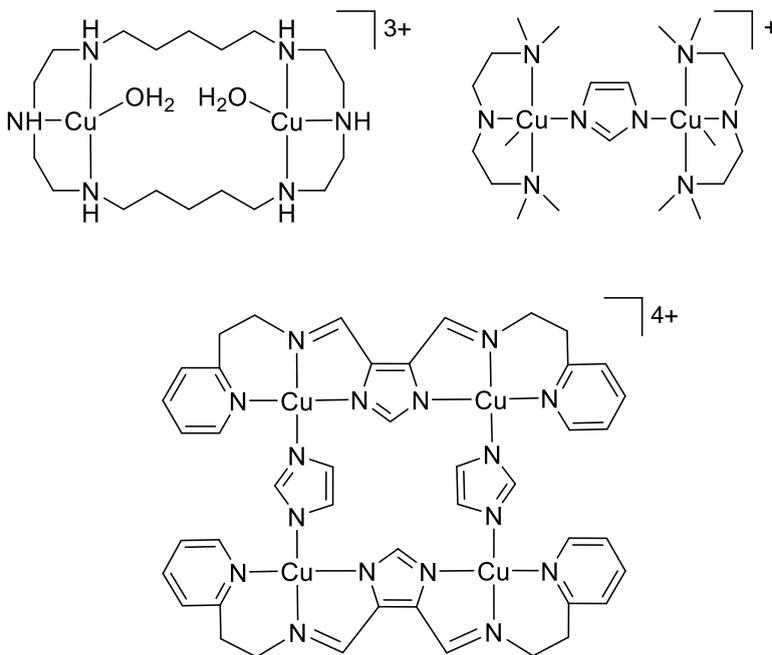


Figura 8.5. Miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD, preparados por Stephen Lippard y colaboradores.

Las investigaciones pioneras de Stephen Lippard y colaboradores inspiraron el desarrollo de un elevado número miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD durante la década de los ochenta y de los noventa. La mayoría de ellos trataban de imitar el centro activo de la enzima mediante la incorporación de una o varias unidades imidazolato en la estructura. Destacan los miméticos desarrollados por Michael Drew y colaboradores,^[62-64] por Cynthia Burrows y colaboradores^[65,66] y por Shunuchi Fukuzumi y colaboradores,^[67] algunos de los cuales se presentan en la Figura 8.6.

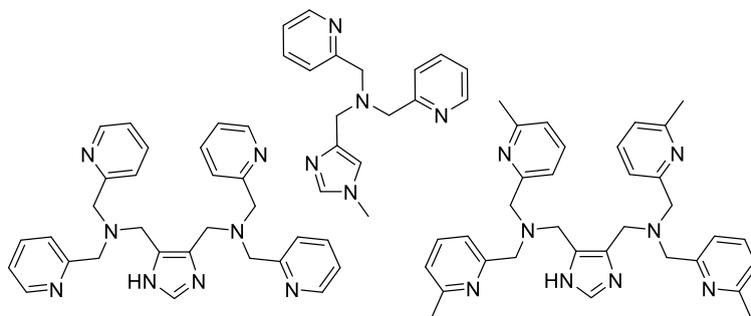
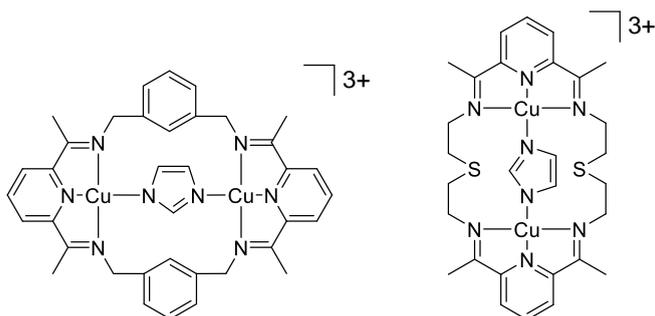
Fukuzumi *et al.*Burrows *et al.*Drew *et al.*

Figura 8.6. Miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD desarrollados por Michael Drew y colaboradores, por Cynthia Burrows y colaboradores, y por Shunuchi Fukuzumi y colaboradores.

Sin embargo, el diseño de compuestos con cierto parecido estructural con el centro activo de la enzima no es la única estrategia existente para mimetizar las funciones de la misma. También es posible diseñar compuestos que sean capaces de formar complejos mononucleares y polinucleares de cobre, sin que necesariamente tengan parecido estructural con el centro activo de la enzima, y que sean aptos para mimetizar las funciones de la enzima.

En el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, coordinado por el profesor Enrique García-España, se han preparado una serie de macrociclos poliamínicos que incorporan una o varias unidades de piridina en su estructura, alguno de los cuales se presentan en la Figura 8.7. Estos macrociclos dan lugar a la formación de complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II), exhibiendo una capacidad notable para la mimesis de la enzima Cu,Zn-SOD.^[68-70]

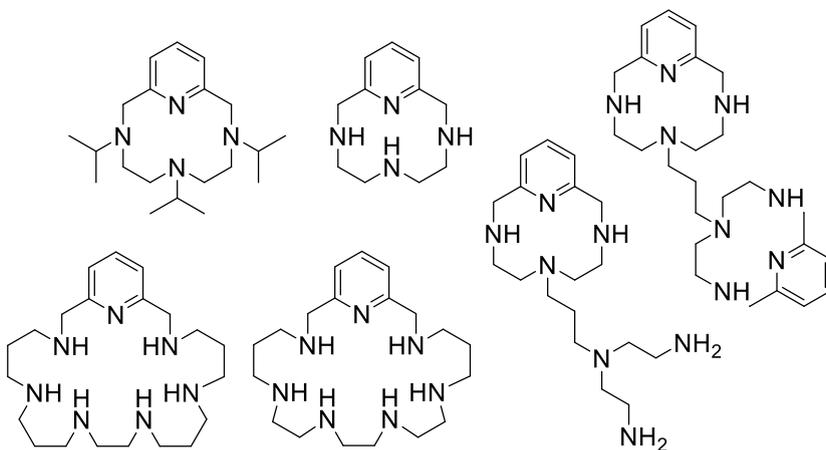


Figura 8.7. Macrociclos desarrollados en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia.

En base a los antecedentes bibliográficos, así como a los estudios previos llevados a cabo en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, en este trabajo se propone como miméticos de la enzima Cu,Zn-SOD los complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II) de los macrociclos **L4** y **L5**.

Los macrociclos **L4** y **L5** son similares a los compuestos **PY32323** y **PY33333** (Figura 8.8). Estos dos compuestos basados en piridina han sido desarrollados previamente en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia, y se encuentran constituidos por una unidad de piridina en lugar de una unidad de pirazol. Estudios previos han demostrado que los macrociclos basados en piridina **PY32323** y **PY33333** presentan una gran capacidad para mimetizar la enzima Cu,Zn-SOD.^[68]

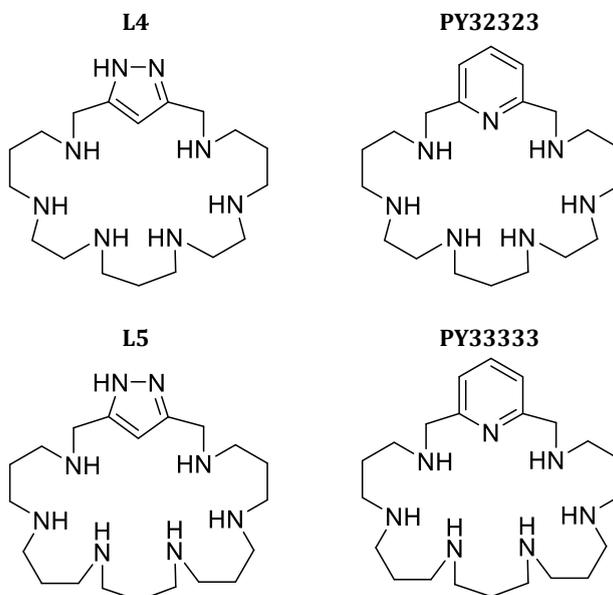


Figura 8.8. En la izquierda, estructura de los macrociclos basados en pirazol: **L4** y **L5**. En la derecha, estructura de los macrociclos análogos basados en piridina: **PY32323** y **PY33333**.

8.2. Electroquímica

El potencial de reducción es una de las propiedades químicas más importantes a tener en cuenta a la hora de diseñar miméticos de la enzima superóxido dismutasa, pues para valores de pH fisiológico este debe ser menos negativo que el potencial de reducción del par O_2/O_2^- ($E = -0.33 V$), pero menos positivo que el potencial de reducción del par O_2^-/H_2O_2 ($E = +0.89 V$).^[5] Por este motivo, se realizaron los estudios de electroquímica de los sistemas Cu(II)-L4 y Cu(II)-L5, para relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1, obteniendo los voltamperogramas, los cuales se presentan en la Figura 8.9.

Los voltamperogramas cíclicos de los cuatro sistemas exhiben un perfil muy homogéneo, presentando un primer hombro catódico (C1), que varía entre $-0.38 V$ y $-0.52 V$ dependiendo del sistema estudiado, seguido de un segundo pico catódico de reducción (C2) que se encuentra a valores de $-0.75 V$ aproximadamente. En el barrido anódico posterior se detecta un primer pico anódico de *stripping* (A2) a valores de $-0.10 V$ aproximadamente, seguido de una segunda onda anódica de oxidación débil (A1), que varía entre $-0.05 V$ y $+0.18 V$ dependiendo del sistema estudiado.

La señal catódica C1 y la señal anódica A1 se encuentran acopladas, correspondiéndose con un proceso que implica la participación de un electrón, en base a la similitud de la intensidad que presentan ambos picos. No obstante, la separación entre picos excede lo que se puede esperar de un proceso reversible, lo que sugiere desviaciones con respecto al comportamiento típico de un proceso reversible y/o la presencia de reacciones químicas acopladas.

El proceso catódico C2 se encuentra acoplado con el pico anódico A2, el cual presenta el perfil simétrico típico característico de un proceso de disolución oxidativa, donde el cobre metálico depositado previamente sobre la superficie del electrodo, debido al proceso catódico C2 se oxida. Curiosamente, la intensidad de corriente por mol del proceso C2 es similar en los sistemas mononucleares y en los sistemas dinucleares, indicando que en el caso de los sistemas dinucleares la reducción de los dos centros de cobre tiene lugar de manera simultánea e independiente.

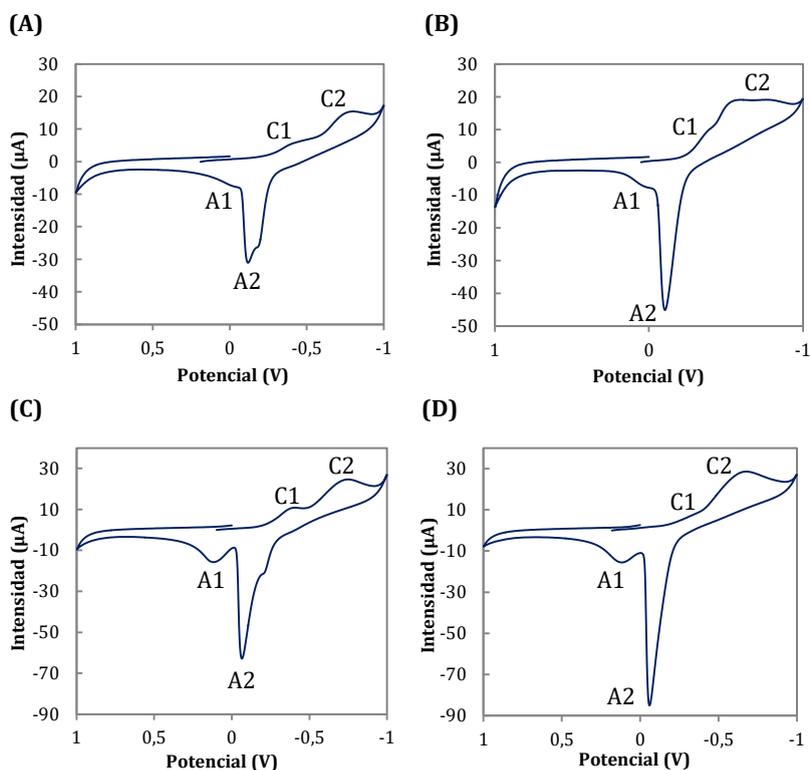
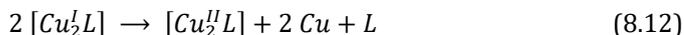
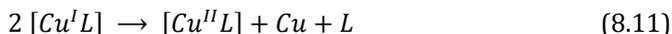


Figura 8.9. Voltamperogramas cíclicos de los distintos sistemas. (A) Cu(II):L4 1:1. (B) Cu(II):L5 1:1. (C) Cu(II):L4 2:1. (D) Cu(II):L5 2:1. Velocidad de barrido de 50 mV/s. $[\text{L}] = 10^{-3}$ M.

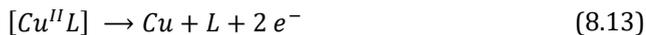
En los cuatro sistemas, la voltamperometría se puede interpretar en términos de la coexistencia de dos mecanismos de reducción. El primero de ellos está asociado al proceso C1/A1, el cual involucra la reducción de Cu(II) a Cu(I), como se muestra en las ecuaciones 8.9 y 8.10, para sistemas mononucleares y sistemas dinucleares respectivamente:



Posteriormente, estas especies dismutan, según las ecuaciones 8.11 y 8.12, para sistemas mononucleares y dinucleares respectivamente:



Finalmente, tiene lugar un proceso de reducción que involucra dos electrones por cada cobre, en el que las especies $Cu^{II}L$ y $Cu_2^{II}L$ se reducen para dar lugar a cobre metálico, el cual se corresponde con el proceso C2/A2, que se representa en las ecuaciones 8.13 y 8.14, para sistemas mononucleares y dinucleares respectivamente:



Los valores de potencial formal de electrodo de la pareja C1/A1 se calculan como la semisuma de los potenciales de los picos C1 y A1. Estos están relacionados con la actividad superóxido dismutasa de los distintos sistemas, puesto que el proceso C1/A1 involucra la reducción de Cu(II) a Cu(I), que es la etapa fundamental en el ciclo catalítico de la enzima SOD. En la Tabla 8.2 se resumen los valores del potencial formal de electrodo para cada uno de los sistemas.

Tabla 8.2. Potencial formal de electrodo para los sistemas Cu(II)-**L4** y Cu(II)-**L5**, para las relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1.

Sistema	Potencial (V)	Reacción
Cu L4	- 0.25	$[Cu^{II}L4] \rightarrow [Cu^I L4] + e^-$
Cu ₂ L4	- 0.14	$[Cu_2^{II}L4] \rightarrow [Cu_2^I L4] + 2 e^-$
Cu L5	- 0.23	$[Cu^{II}L5] \rightarrow [Cu^I L5] + e^-$
Cu ₂ L5	- 0.10	$[Cu_2^{II}L5] \rightarrow [Cu_2^I L5] + 2 e^-$

Para ambos macrociclos, los potenciales para los sistemas dinucleares son menos negativos que los correspondientes para los sistemas mononucleares. En cualquier caso, estos valores se encuentran comprendidos entre los valores del potencial de reducción del par O_2/O_2^- ($E = -0.33 V$) y del potencial de reducción del par O_2^-/H_2O_2 ($E = +0.89 V$), por lo que los sistemas Cu**L4**, Cu₂**L4**, Cu**L5** y Cu₂**L5** se encuentran capacitados para llevar a cabo la dismutación del anión superóxido, al menos desde el punto de vista electroquímico.

8.3. Evaluación de la Actividad Superóxido Dismutasa

La evaluación de la actividad superóxido dismutasa se realizó haciendo uso del método indirecto McCord–Fridovich,^[51,52] empleando como indicador azul de tetrazolio,^[71,72] el cual se encuentra descrito con detalle en la sección *Material y Métodos*. El tratamiento de los resultados fue llevado a cabo empleando el programa informático SuperSOD, que ha sido desarrollado por el Dr. Salvador Blasco, procedimiento que también se encuentra descrito detalladamente en la sección *Material y Métodos*, el cual proporciona los valores de IC_{50} y de la constante catalítica (k_{cat}) para cada sistema.

En la Tabla 8.3 se resumen los valores de IC_{50} y de la constante catalítica (k_{cat}) para cada sistema, junto con los valores disponibles en la bibliografía para la enzima Cu,Zn–SOD y para el catión cobre(II) libre en solución acuosa. También se incluyen los resultados disponibles en la bibliografía para los complejos dinucleares de cobre(II) de los macrociclos **PY32323** y **PY33333**, de los que se ha hablado anteriormente (Figura 8.8). Además, con el objetivo de facilitar la discusión de los resultados, se incluyen los valores de los potenciales formales de electrodo determinados mediante los estudios de electroquímica, examinados en la sección anterior.

Tabla 8.3. Evaluación de la actividad superóxido dismutasa, haciendo uso del método indirecto McCord-Fridovich.

Sistema	IC_{50} (μM)	k_{cat} ($10^6 M^{-1} s^{-1}$)	Potencial (V)	Referencia
L4	-	-	-	-
CuL4	7.34(4)	0.4	- 0.25	-
Cu₂L4	0.06(1)	53.0	- 0.14	-
L5	-	-	-	-
CuL5	5.90(3)	0.5	- 0.23	-
Cu₂L5	0.03(1)	104.0	- 0.10	-
Cu₂Zn₂SOD	0.010(2)	430.0	+0.08	[69,70,73]
Cu(ClO₄)₂	1.1(1)	2.7	-0.09	[69,70,73]
Cu₂PY32323	0.22(4)	13.5	-0.25	[68]
Cu₂PY33333	0.11(2)	27.0	-0.08	[68]

Como se observa en la Tabla 8.3, en ausencia de cobre, **L4** y **L5** no presentan actividad SOD. Este comportamiento coincide con lo esperado, pues la actividad electroquímica de ambos macrociclos en ausencia de cobre es nula.

En cambio, los complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II) de ambos macrociclos sí que presentan actividad SOD, siendo en ambos casos los complejos dinucleares mucho más activos, como se deduce de los valores de IC_{50} más pequeños, así como de los valores de la constante catalítica, que son dos órdenes de magnitud más elevados en el caso de los complejos dinucleares, en comparación con los complejos mononucleares. La mayor actividad de los complejos dinucleares frente a los complejos mononucleares es atribuible al hecho de que la introducción de un segundo átomo de cobre supone la aparición de vacantes en la esfera de coordinación de los átomos de cobre. Esto favorece la actividad catalítica, pues para que tenga lugar la catálisis es necesario la existencia de vacantes en la esfera de coordinación del metal, o la presencia de una posición lábil en la coordinación del centro metálico.

Asimismo, tanto para los complejos mononucleares como para los dinucleares, los sistemas formados por **L5** dan lugar a una mayor actividad SOD, en comparación con **L4**. Este hecho se puede atribuir a la mayor flexibilidad de la poliamina que constituye **L5**, en comparación con **L4**, lo cual puede facilitar los reordenamientos moleculares necesarios durante el ciclo catalítico, resultando en una mayor actividad catalítica.^[74] Además, este comportamiento es similar en el caso de los sistemas formados por los macrociclos basados en piridina, donde el compuesto **PY33333** (análogo a **L5**) exhibe una mayor actividad SOD que el **PY32323** (análogo a **L4**).^[68]

En comparación con los distintos sistemas dinucleares de los macrociclos basados en piridina **PY32323** y **PY33333**, los complejos dinucleares de cobre(II) de **L4** y **L5** exhiben mayor actividad SOD, presentando valores de IC_{50} y de la constante catalítica en el mismo orden que la propia enzima, constituyendo dos de los mejores resultados que se hayan descrito en la bibliografía.^[67-69,75-77]

En la Figura 8.10 se representan los valores de la constante catalítica para los distintos sistemas formados por los macrociclos basados en piridina y en pirazol, haciendo uso de los datos de la Tabla 8.3. Esto permite una mejor comprensión de los resultados, observando directamente el efecto de la sustitución de la unidad de piridina por la unidad de pirazol, así como el efecto de la introducción de una poliamina más flexible en el macrociclo, ambos resultando en un aumento de la constante catalítica, y por lo tanto en un aumento de la actividad SOD.

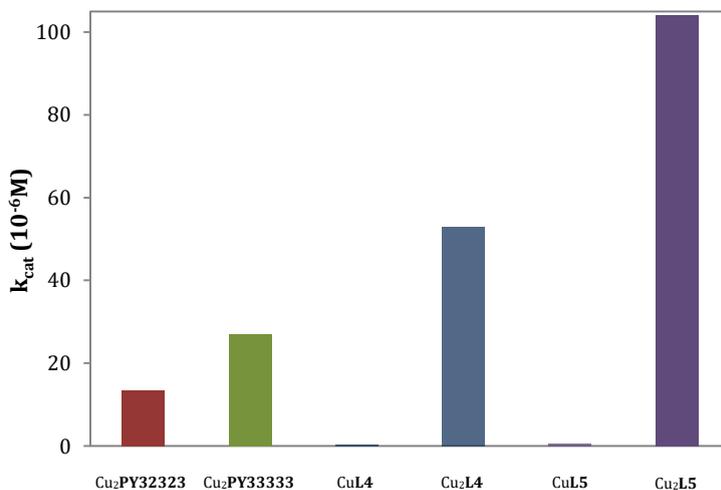


Figura 8.10. Representación de la constante catalítica (k_{cat}) de los distintos sistemas, empleando los datos de la Tabla 8.3.

8.4. Conclusiones

Se ha estudiado con éxito la respuesta electroquímica de los sistemas Cu(II)-**L4** y Cu(II)-**L5**, para relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1, dando lugar a potenciales de reducción comprendidos entre los valores del potencial de reducción del par $O_2/O_2^{\cdot-}$ ($E = -0.33 V$), y del potencial de reducción del par $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ ($E = +0.89 V$). En consecuencia, los complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II) de los macrociclos **L4** y **L5** se encuentran capacitados para llevar a cabo la dismutación de anión superóxido desde el punto de vista electroquímico.

Empleando el método indirecto McCord-Fridovich, se ha evaluado la actividad SOD de los macrociclos **L4** y **L5** en ausencia de cobre(II), así como de los sistemas Cu(II)-**L4** y Cu(II)-**L5**, para las relaciones molares Cu(II):L 1:1 y 2:1. Ambos macrociclos no presentan actividad SOD en ausencia de cobre(II), resultado que concuerda con la actividad electroquímica nula de ambos macrociclos en ausencia de cobre(II). En cambio, los complejos mononucleares y dinucleares de cobre(II) de ambos macrociclos sí que presentan actividad superóxido dismutasa, siendo mucho más activos los complejos dinucleares, los cuales presentan una capacidad para la catálisis del anión superóxido comparable a la de la enzima nativa, como así lo demuestran los valores de IC_{50} y de la constante catalítica, constituyendo dos de los mejores resultados que se hayan descrito en la bibliografía.

8.5. Bibliografía

- [1] M. Vallet, J. Faus, E. García-España, J. Moratal. *Introducción a La Química Bioinorgánica*. Editorial Síntesis, **2003**.
- [2] B. Halliwell. *Annu. Rev. Nutr.* **1996**, 16, 33–50.
- [3] J. S. Valentine, D. L. Wertz, T. J. Lyons, L.-L. Liou, J. J. Goto, E. B. Gralla. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1998**, 2, 253–262.
- [4] B. G. Malmstrom. *Annu. Rev. Biochem.* **1982**, 51, 21–59.
- [5] P. M. Wood. *Biochem. J.* **1988**, 253, 287–289.
- [6] T. F. Slater. *Biochem. J.* **1984**, 222, 1–15.
- [7] H. Sies. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1986**, 25, 1058–1071.
- [8] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, **2015**.
- [9] M. De Leo, S. Borrello, M. Passantino, B. Palazzotti, A. Mordente, A. Daniele, V. Filippini, T. Galeotti, C. Masullo. *Neurosci. Lett.* **1998**, 250, 173–176.
- [10] Y. Christen. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, 71, 621S–629S.
- [11] K. J. Barnham, A. I. Bush. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2008**, 12, 222–228.
- [12] D. P. Riley. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2573–2588.
- [13] P. A. Kocatürk, M. C. Akbostanci, F. Tan, G. Ö. Kavas. *Pathophysiology* **2000**, 7, 63–67.
- [14] R. L. Miller, M. James-Kracke, G. Y. Sun, A. Y. Sun. *Neurochem. Res.* **2009**, 34, 55–65.
- [15] D. R. Rosen, T. Siddique, D. Patterson, D. A. Figlewicz, P. Sapp, A. Hentati, D. Donaldson, J. Goto, J. P. O'Regan, H.-X., Deng. *Nature* **1993**, 362, 59–62.
- [16] H.-X. Deng, A. Hentati, J. A. Tainer, Z. Iqbal, A. Cayabyab, W.-Y. Hung, E. D. Getzoff, P. Hu, B. Herzfeldt, R. P. Roos. *Science* **1993**, 261, 1047–1051.
- [17] D. W. Cleveland, J. D. Rothstein. *Nat. Rev. Neurosci.* **2001**, 2, 806–819.
- [18] R. M. F. Cardoso, M. M. Thayer, M. DiDonato, T. P. Lo, C. K. Bruns, E. D. Getzoff, J. A. Tainer. *J. Mol. Biol.* **2002**, 324, 247–256.
- [19] J. S. Valentine, P. J. Hart. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 3617–3622.
- [20] G. Du, A. Mouithys-Mickalad, F. E. Sluse. *Free Radic. Biol. Med.* **1998**, 25, 1066–1074.

- [21] S. Raha, B. H. Robinson. *Trends Biochem. Sci.* **2000**, 25, 502–508.
- [22] J. A. Badwey, M. L. Karnovsky. *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, 49, 695–726.
- [23] C. Dahlgren, A. Karlsson. *J. Immunol. Methods* **1999**, 232, 3–14.
- [24] Y. Xia, V. L. Dawson, T. M. Dawson, S. H. Snyder, J. L. Zweier. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1996**, 93, 6770–6774.
- [25] Y.-R. Chen, C.-L. Chen, A. Yeh, X. Liu, J. L. Zweier. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 13159–13168.
- [26] G. R. Hodges, M. J. Young, T. Paul, K. U. Ingold. *Free Radic. Biol. Med.* **2000**, 29, 434–441.
- [27] R. Harrison. *Free Radic. Biol. Med.* **2002**, 33, 774–797.
- [28] D. H. Flint, J. F. Tuminello, M. H. Emptage. *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 22369–23376.
- [29] D. H. Flint, R. M. Allen. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2315–2334.
- [30] P. R. Gardner. *Biosci. Rep.* **1997**, 17, 33–42.
- [31] H. Esterbauer, H. Zollern. *Free Radic. Biol. Med.* **1989**, 7, 197–203.
- [32] H. J. H. Fenton. *J. Chem. Soc., Trans.* **1894**, 65, 899–910.
- [33] W. H. Koppenol. *Free Radic. Biol. Med.* **1993**, 15, 645–651.
- [34] V. F. Haber, J. Weiss. *Naturwissenschaften* **1932**, 20, 948–950.
- [35] C. Szabó. *Toxicol. Lett.* **2003**, 140–141, 105–112.
- [36] C. Szabó, H. Ischiropoulos, R. Radi. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 662–680.
- [37] B. H. J. Bielski, D. E. Cabelli, R. L. Arudi, R. B. Alberta. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **1985**, 14, 1041–1100.
- [38] J. A. Imlay. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 755–776.
- [39] D. Klug, J. Rabani, I. Fridovich. *J. Biol. Chem.* **1972**, 247, 4839–4842.
- [40] G. Rotilio, R. C. Bray, E. M. Fielden. *Biochim. Biophys. Acta Enzymol.* **1972**, 268, 605–609.
- [41] I. Fridovich. *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 97–112.
- [42] R. H. Holm, P. Kennepohl, E. I. Solomon. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2239–2314.
- [43] I. Bertini, H. B. Gray, S. J. Lippard, J. S. Valentine. *Bioinorganic Chemistry*. University Science Books, **1994**.
- [44] I. A. Abreu, D. E. Cabelli. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins and Proteomics.* **2010**, 1804, 263–274.
- [45] T. Mann, D. Keilin. *Nature* **1938**, 142, 148–148.

- [46] T. Mann, D. Keilin. *Proc. Roy. Soc. Ser. B. Biol. Sci.* **1938**, 126, 303–315.
- [47] J. R. Kimmel, H. Markowitz, D. M. Brown. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 46–50.
- [48] H. Markowitz, G. E. Cartwright, M. M. Wintrobe. *J. Biol. Chem.* **1959**, 234, 40–45.
- [49] H. Porter, J. Folch, J. Beggrovs, S. Ainsworth. *J. Neurochem.* **1957**, 1, 260–271.
- [50] M. S. Mohamed, D. M. Greenberg. *J. Gen. Physiol.* **1953**, 37, 433–439.
- [51] J. M. McCord, I. Fridovich. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6049–6055.
- [52] J. M. McCord, I. Fridovich. *J. Biol. Chem.* **1969**, 244, 6056–6063.
- [53] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, K. M. Beem, J. S. Richardson, D. C. Richardson. *J. Mol. Biol.* **1982**, 160, 181–217.
- [54] J. A. Tainer, E. D. Getzoff, J. S. Richardson, D. C. Richardson. *Nature* **1983**, 306, 284–287.
- [55] G. Kolks, C. R. Frihart, H. N. Rabinowitz, S. J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 5720–5721.
- [56] C.-L. O’Young, J. C. Dewan, H. R. Lilenthal, S. J. Lippard. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 7291–7300.
- [57] P. K. Coughlin, J. C. Dewan, S. J. Lippard, E. Watanabe, J.-M. Lehn. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 265–266.
- [58] G. Kolks, C. R. Frihart, P. K. Coughlin, S. J. Lippard. *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 2933–2940.
- [59] G. Kolks, S. J. Lippard, J. V. Waszczak, H. R. Lilenthal. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, 104, 717–725.
- [60] P. K. Coughlin, A. E. Martin, J. C. Dewan, E. Watanabe, J. E. Bulkowski, J.-M. Lehn, S. J. Lippard. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1004–1009.
- [61] P. K. Coughlin, S. J. Lippard. *Inorg. Chem.* **1984**, 23, 1446–1451.
- [62] M. G. B. Drew, C. Cairns, A. Lavery, S. M. Nelson. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1980**, 1122–1124.
- [63] M. G. B. Drew, M. McCann, S. M. Nelson. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1981**, 1868–1878.
- [64] M. G. B. Drew, S. M. Nelson, J. Reedijk. *Inorg. Chim. Acta* **1982**, 64, L189–L191.
- [65] C. A. Salata, M. T. Youinou, C. J. Burrows. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 9278–9279.

- [66] C. A. Salata, M. T. Youinou, C. J. Burrows. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 3454–3461.
- [67] H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh, S. Fukuzumi. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 5733–5741.
- [68] R. Belda, S. Blasco, B. Verdejo, H. R. Jiménez, A. Domènech, C. Soriano, J. Latorre, C. Terencio, E. García-España. *Dalton Trans.* **2013**, 42, 11194–11204.
- [69] L. Guijarro, M. Inclán, J. Pitarch-Jarque, A. Domènech, J. U. Chicote, S. Treffer, E. García-España, A. García-España, B. Verdejo. *Inorg. Chem.* **2017**, 56, 13748–13758.
- [70] Á. Martínez-Camarena, A. Liberato, E. Delgado-Pinar, A. G. Algarra, J. Pitarch-Jarque, J. M. Llinares, M. Á. Mañez, A. Domènech, M. G. Basallote, E. García-España. *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 10961–10973.
- [71] C. Beauchamp, I. Fridovich. *Anal. Biochem.* **1971**, 44, 276–287.
- [72] R. A. Greenwald. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*. CRC Press, **1986**.
- [73] U. Weser, L. M. Schubotz, E. Lengfelder. *J. Mol. Catal.* **1981**, 13, 249–261.
- [74] A. Maroz, G. F. Kelso, R. A. J. Smith, D. C. Ware, R. F. Anderson. *J. Phys. Chem. A* **2008**, 112, 4929–4935.
- [75] D. Li, S. Li, D. Yang, J. Yu, J. Huang, Y. Li, W. Tang. *Inorg. Chem.* **2003**, 42, 6071–6080.
- [76] J. Ceolin, J. D. Siqueira, F. M. Martins, P. C. Piquini, B. A. Iglesias, D. F. Back, G. Manzoni de Oliveira. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, 32, 4218–4232.
- [77] Q. Tang, J.-Q. Wu, H.-Y. Li, Y.-F. Feng, Z. Zhang, Y.-N. Liang. *Appl. Organomet. Chem.* **2018**, 32, 4297–4311.

9

**Interacción con
Oligonucleótidos**

9.1. Introducción

El ADN (ácido desoxirribonucleico)^[1] es la biomolécula que contiene codificada la información genética de todos los seres vivos que se conocen, así como la de algunos virus. La secuencia de este polímero define muchas características del organismo, desde sus rasgos físicos hasta la susceptibilidad hacia determinadas enfermedades.

El descubrimiento del ácido desoxirribonucleico tuvo lugar en 1869, cuando Friedrich Miescher identificó por primera vez lo que denominó *nucleína*, debido a que se encontraba en el núcleo de los glóbulos blancos de procedencia humana.^[2] Luego, el término *nucleína* fue cambiado a *ácido nucleico*, para finalmente ser nombrado como *ácido desoxirribonucleico*. Cincuenta años más tarde, el bioquímico ruso Phoebus Levene propuso que los ácidos nucleicos estaban constituidos por una serie de nucleótidos, los cuales a su vez están constituidos por una base nitrogenada, una molécula de azúcar y un grupo fosfato.^[3] Treinta años más tarde, el químico austríaco Erwin Chargaff enunció que entre especies distintas, los mismos nucleótidos no se repiten en el mismo orden, si bien la relación entre bases nitrogenadas es casi idéntica.^[4]

Todo este conocimiento, combinado con los excelentes trabajos de cristalografía de rayos X llevados a cabo por los investigadores británicos Maurice Wilkins^[5,6] y Rosalind Franklin,^[7,8] permitió al científico estadounidense James Watson y a su homólogo británico Francis Crick proponer una estructura acertada para la molécula de ácido desoxirribonucleico, en un artículo titulado *Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*, publicado en la revista *Nature* en 1953.^[1]

Nucleósidos y nucleótidos

Las bases nucleicas son las unidades básicas de los ácidos nucleicos, las cuales pueden ser púricas (o purínicas) o pirimídicas (o pirimidínicas). Las principales bases púricas son la adenina (A) y la guanina (G), mientras que las principales bases pirimídicas son la citosina (C), la timina (T) y el uracilo (U), las cuales se presentan en la Figura 9.1.^[9-11]

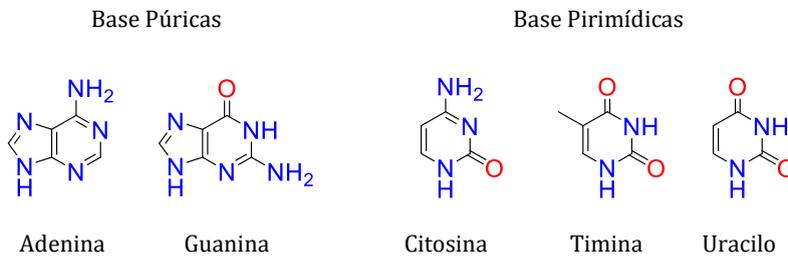


Figura 9.1. Principales bases nucleicas púricas y pirimídicas.

Las bases nucleicas se pueden unir al C1' de una unidad de pentosa (ribosa o desoxirribosa, según sea ácido ribonucleico o ácido desoxirribonucleico) dando lugar a la formación de un *enlace glicosídico*, resultando en la formación de los denominados *nucleósidos*. En total, se conocen más de ochenta nucleósidos distintos, constituidos por derivados de las cinco nucleobases enunciadas. Los nucleósidos a su vez se pueden unir a un grupo mono-, di- o trifosfato, a partir del C5' de la unidad de pentosa, dando lugar a la formación de los *nucleótidos*. Este proceso se representa en la Figura 9.2.^[9-11]

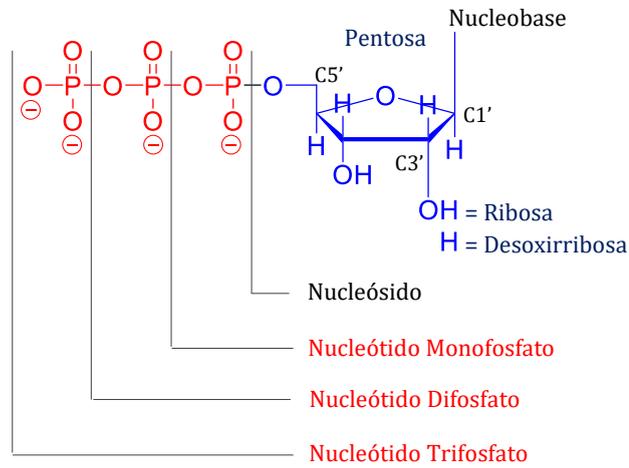
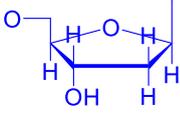
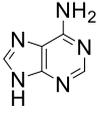
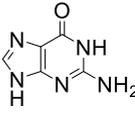
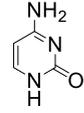
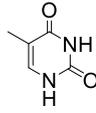
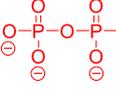
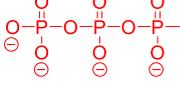


Figura 9.2. Esquema de la estructura de los nucleósidos y de los nucleótidos.

En la Tabla 9.1 se resumen las cuatro bases nucleicas que constituyen el ácido desoxirribonucleico, así como las abreviaturas de los principales nucleótidos que lo forman.

Tabla 9.1. Principales nucleótidos que constituyen el ácido desoxirribonucleico.

				
Desoxirribosa	Adenosina	Guanina	Citosina	Timina
	5'-dAMP	5'-dGMP	5'-dCMP	5'-dTMP
	5'-dADP	5'-dGDP	5'-dCDP	5'-dTDP
	5'-dATP	5'-dGTP	5'-dCTP	5'-dTTP

Estructura primaria del ácido desoxirribonucleico

Los ácidos nucleicos son polímeros que están formados por la condensación de distintos nucleótidos a través de las posiciones 3'-hidroxilo y 5'-hidroxilo de la unidad de pentosa de los nucleótidos, mediante la formación un enlace fosfodiéster, como se representa en la Figura 9.3. Esta secuencia de nucleótidos es lo que recibe el nombre de *estructura primaria* del ácido nucleico, la cual sigue siempre el sentido $5' \rightarrow 3'$.^[9-11]

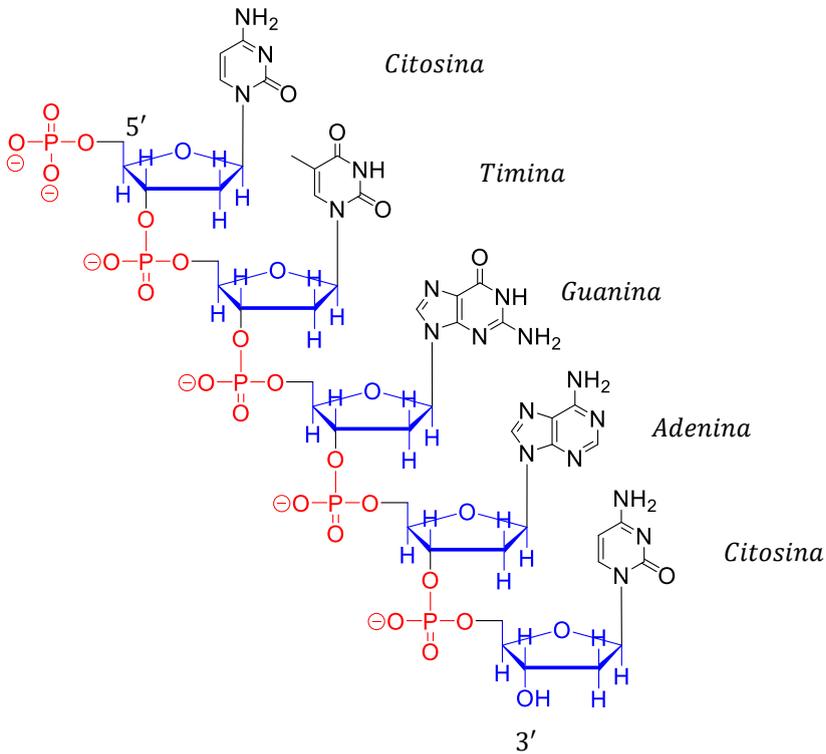


Figura 9.3. Estructura primaria para la secuencia de ácido desoxirribonucleico $5' - CTGAC - 3'$.

Estructura secundaria del ácido desoxirribonucleico

Al igual que las proteínas, los ácidos nucleicos presentan además de una estructura primaria, una *estructura secundaria* y una *estructura terciaria*, como consecuencia del apareamiento de las nucleobases mediante la formación de enlaces de hidrógeno, así como la formación de interacciones de apilamiento π - π . La estructura secundaria hace referencia al plegamiento regular local de las cadenas, como consecuencia de las interacciones citadas, mientras que la estructura terciaria hace referencia a la disposición tridimensional de la molécula de ácido nucleico en un espacio reducido.^[9-11]

La estructura secundaria de la molécula de ácido desoxirribonucleico consiste en una doble hélice, la cual se encuentra constituida por dos cadenas complementarias entre sí que se disponen de modo antiparalelo, enfrentándose el extremo 5' de una de las cadenas con el extremo 3' de la otra cadena, estableciéndose uniones entre las unidades de guanina y las de citosina, así como entre las unidades de adenina y las de timina.^[9-11] No obstante, la molécula de ADN presenta un elevado grado de polimorfismo, siendo capaz de adoptar distintas conformaciones, dependiendo de factores tales como la secuencia de oligonucleótidos, el grado de hidratación, los iones y/o proteínas presentes en el medio, así como la concentración del ácido nucleico en el medio, entre otros.^[12]

En los organismos vivos se ha detectado la existencia de tres conformaciones en forma de doble hélice: *A-ADN*, *B-ADN*, y *Z-ADN*, las cuales se representan en la Figura 9.4.

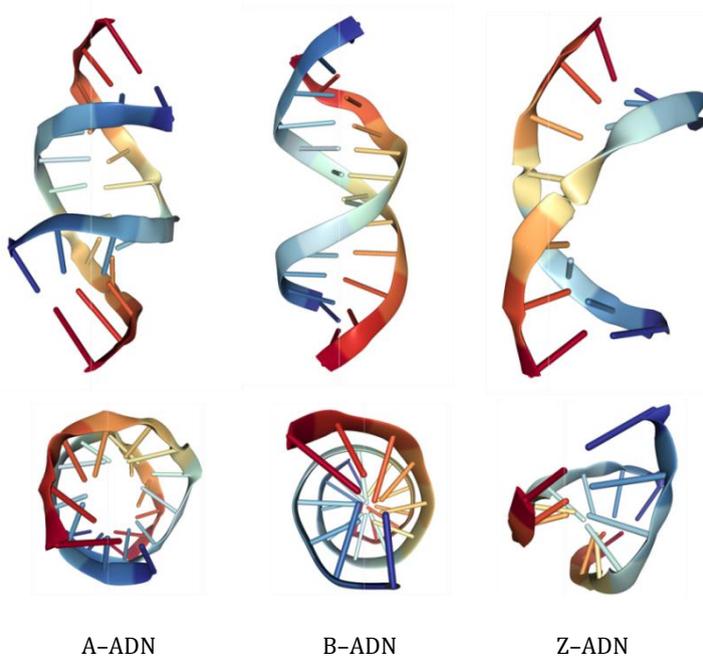


Figura 9.4. Representación desde distintos puntos de vista de la estructura de las distintas conformaciones en forma de doble hélice. A-ADN adaptada de la referencia [13], PDB 5MVT. B-ADN adaptada de la referencia [14], PDB 1BNA. Z-ADN adaptada de la referencia [15], PDB 6DWT.

La mayor parte del ADN se encuentra en la conformación B, la cual coincide con la estructura propuesta por James Watson y Francis Crick en 1953. Las conformaciones A-ADN y B-ADN son dextrógiras, es decir el sentido de la hélice es a derechas, aunque la conformación A es más ancha y más corta que la B. En cambio, la conformación Z-ADN es levógira, siendo el sentido de la hélice a izquierdas, caracterizándose por ser más estrecha y más larga que las otras dos conformaciones, así como por el zigzag de las cadenas.^[16]

Además de las distintas conformaciones en forma de doble hélice, se conoce un elevado número de estructuras secundarias del ADN.^[17] Estas estructuras se originan como resultado de la asociación no canónica de las bases nucleicas, dando lugar a estructuras de mayor complejidad, tales como *ADN triplex*,^[18] *motivos-i*^[19] o *G-quadruplex*,^[20] cuyas estructuras se representan en la Figura 9.5.

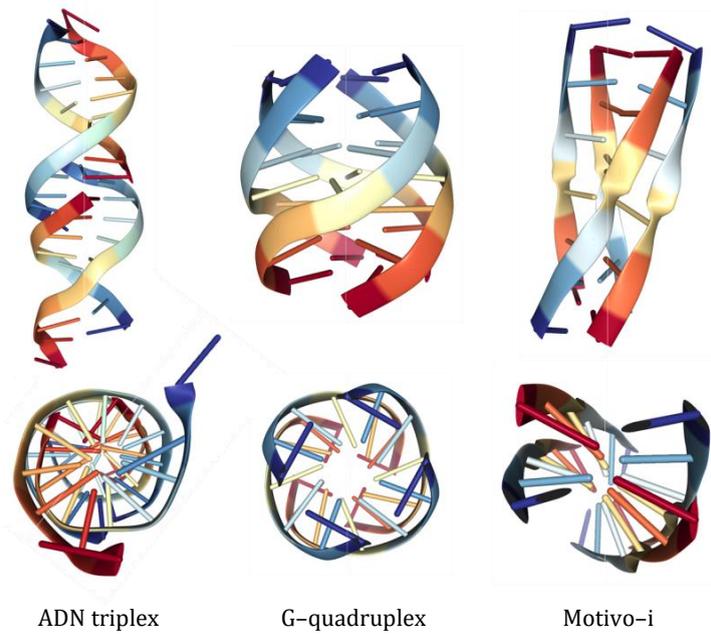


Figura 9.5. Representación desde distintos puntos de vista de la estructura de distintas conformaciones no canónicas. ADN triplex adaptado de la referencia [21], PDB 1D3R. Motivo-i adaptado de la referencia [22], PDB 225D. G-quadruplex adaptado de la referencia [23], PDB 139D.

Estas estructuras secundarias están implicadas en distintas funciones biológicas, interaccionando con proteínas involucradas en los procesos de replicación y recombinación de la molécula de ADN, y participando en los procesos de reparación del material genético.^[24]

En la sección *Formación de Hidrogeles con 5'-Guanosina Monofosfato* se ha discutido la formación de estructuras G-quadruplex *in vivo*, así como la importancia biológica de las mismas. La zona con mayor concentración de estructuras G-quadruplex son los telómeros, que son los extremos de los cromosomas. El control de la longitud de los telómeros resulta clave en el ciclo celular, estando relacionado con la inmortalización de la célula y la tumorigénesis. No obstante, las estructuras G-quadruplex también se encuentran presentes en regiones promotoras de determinados oncogenes, que son genes que han mutado y que contribuyen al desarrollo de un determinado cáncer.^[25-29] Por este motivo, los mecanismos de mantenimiento de la longitud del telómero, así como la regulación de la expresión oncogénica, se han convertido en dianas para el diseño de nuevos fármacos antitumorales.^[30-33]

Principalmente, las investigaciones se han centrado en el desarrollo de pequeñas moléculas orgánicas capaces de estabilizar estructuras G-quadruplex, con el objetivo de inhibir la acción de la enzima telomerasa,^[34,35] pues distintos estudios han demostrado que la estabilización de estructuras G-quadruplex inhibe la acción de la enzima telomerasa,^[36,37] lo que resulta particularmente interesante para el desarrollo de nuevas moléculas orgánicas con propiedades terapéuticas.

Interacción con secuencias de oligonucleótidos

En este capítulo se procede, mediante el empleo de distintas técnicas experimentales, al estudio de la interacción de los escorpiandos **L6-L8** con distintas secuencias de oligonucleótidos, las cuales se resumen en la Tabla 9.2.

Tabla 9.2. Características de las secuencias de oligonucleótidos que se han empleado en los estudios de interacción con los escorpiandos **L6-L8**.

Modelo	Conformación	Secuencia
ds26	ADN dúplex	5' – CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG – 3'
HTelo	ADN quadruplex	5' – AGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG – 3'
ckit1	ADN quadruplex	5' – AGGGAGGGCGCTGGGAGGAGGG – 3'

La secuencia ds26 es un modelo de ADN de doble hebra, el cual presenta la conformación dextrógira de B-ADN, de la que se ha hablado anteriormente. En cambio, las otras dos secuencias de oligonucleótidos son modelos de estructuras de tipo G-quadruplex, las cuales difieren en la secuencia de nucleótidos que la componen, así como en el empaquetamiento de la estructura.

La secuencia HTelo es un modelo de estructura G–quadruplex que se encuentra en determinadas regiones de ADN telomérico humano, la cual exhibe una conformación unimolecular paralela y cuya estructura se representa en la Figura 9.6.

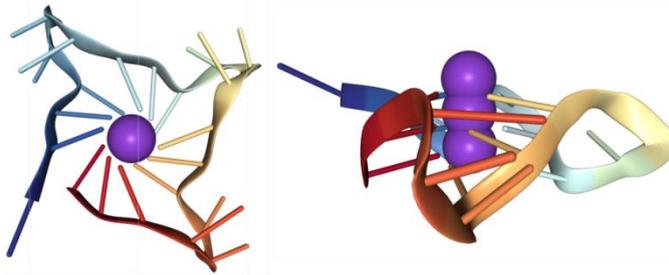


Figura 9.6. Representación desde distintos puntos de vista de la estructura de la secuencia HTelo, adaptada de la referencia [38], PDB 1KF1.

En cambio, la secuencia ckit1 es un modelo de estructura G–quadruplex oncogénico, en concreto de la región promotora oncogénica denominada ckit1. Esta secuencia adopta una conformación unimolecular antiparalela y su estructura se representa en la Figura 9.7.

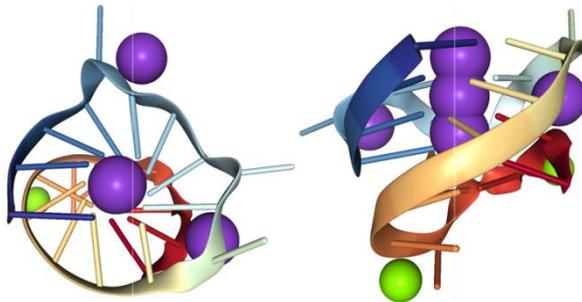


Figura 9.7. Representación desde distintos puntos de vista de la estructura de la secuencia ckit1, adaptada de la referencia [39], PDB 3QXR.

9.2. Valoraciones Fluorimétricas Directas

La presencia de unidades fluorescentes en los receptores **L7** y **L8** permite evaluar directamente la interacción de los mismos con las distintas secuencias de oligonucleótidos, de las que se ha hablado en la sección *Introducción*. Para ello, se registra el espectro de emisión de fluorescencia del receptor a medida que se adicionan cantidades crecientes de una disolución de oligonucleótido, de concentración conocida, sobre una disolución acuosa del receptor.

En la Figura 9.8 se presentan los resultados para la interacción de **L7** con los dos modelos de tipo quadruplex HTelo y ckit1, y con el modelo de tipo dúplex ds26. En los tres sistemas se observa la misma respuesta, produciéndose un descenso de la intensidad de emisión de fluorescencia a medida que se adiciona oligonucleótido, siendo este descenso más acusado para el caso de la secuencia ckit1. Asimismo, en los tres sistemas se observa un ligero desplazamiento batocrómico que acompaña al descenso de intensidad de emisión de fluorescencia, el cual varía en el intervalo $\Delta\lambda = 9 - 13 \text{ nm}$, dependiendo de la secuencia de oligonucleótido.

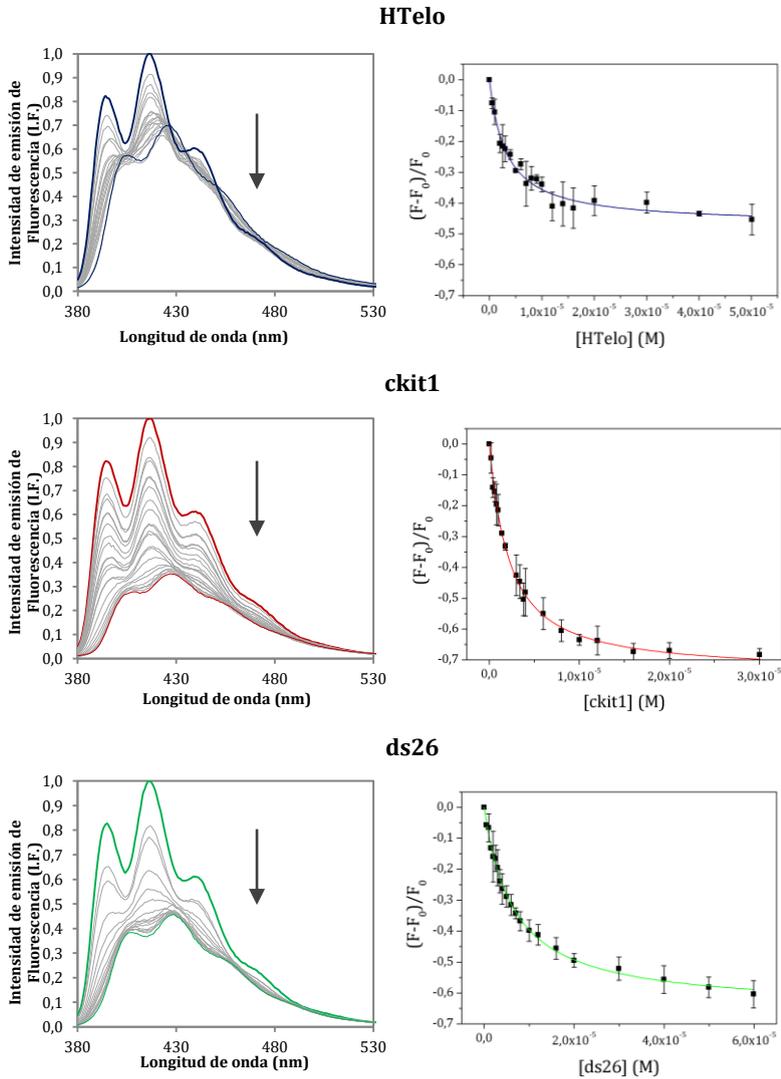


Figura 9.8. En la parte izquierda, evolución del espectro de emisión de fluorescencia de **L7** a medida que se adiciona oligonucleótido. En la parte derecha, representación de la intensidad de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de emisión $\lambda = 416 \text{ nm}$, en función de la concentración de oligonucleótido añadido. Longitud de onda de excitación $\lambda = 350 \text{ nm}$.

En la Figura 9.9 se presentan los resultados para la interacción de **L8** con las distintas secuencias de oligonucleótido. La adición de los modelos de tipo quadruplex da lugar a una respuesta similar, observándose un discreto desplazamiento batocrómico hacia longitudes de onda menores. La adición de las primeras alícuotas de oligonucleótido da lugar a un ligero aumento y descenso sucesivo de la intensidad del máximo de emisión, hasta que finalmente se produce un descenso de la intensidad de emisión de fluorescencia.

En cambio, la adición de la secuencia de tipo dúplex da lugar a una respuesta distinta, observándose un aumento de la intensidad de emisión de fluorescencia a medida que se adicionan cantidades crecientes de oligonucleótido, hasta alcanzar un valor máximo de intensidad de emisión de fluorescencia, a partir del cual se produce un descenso de la intensidad de emisión de fluorescencia, similar al que tiene lugar para la interacción del mismo receptor pero con las dos secuencias de tipo quadruplex.

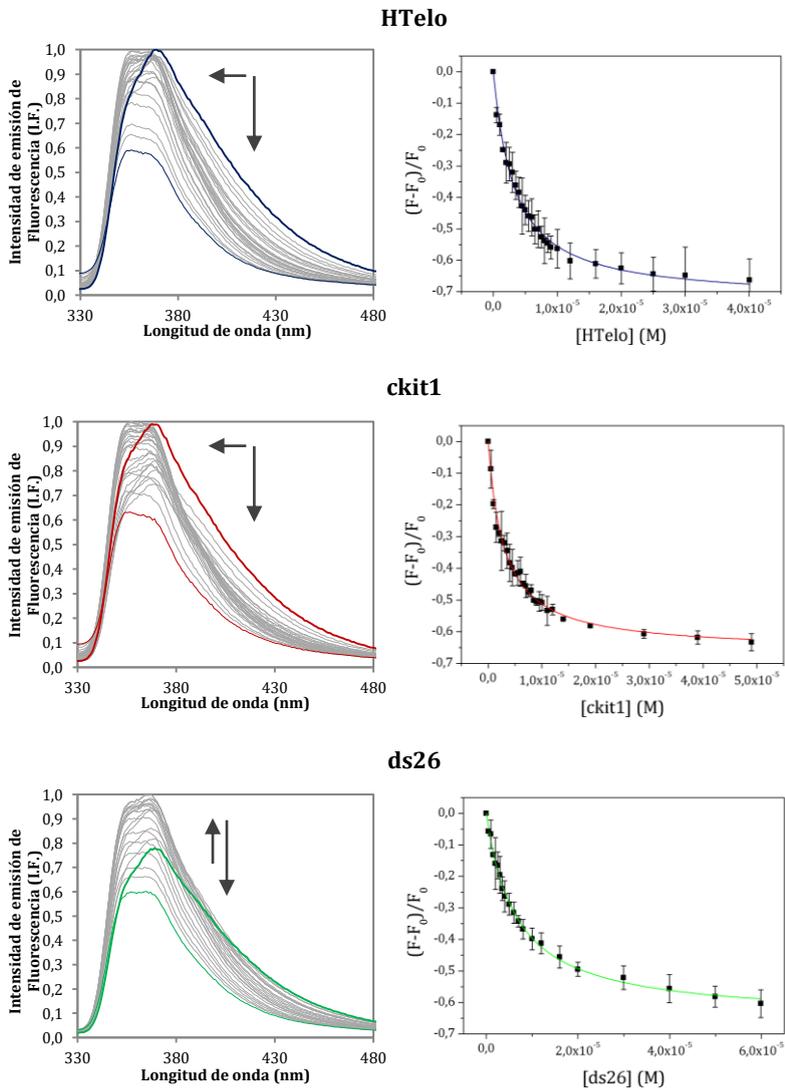


Figura 9.9. En la parte izquierda, evolución del espectro de emisión de fluorescencia de **L8** a medida que se adiciona oligonucleótido. En la parte derecha, representación de la intensidad de emisión de fluorescencia a la longitud de onda de emisión $\lambda = 425 \text{ nm}$, en función de la concentración de oligonucleótido añadido. Longitud de onda de excitación $\lambda = 295 \text{ nm}$.

La representación de la intensidad de emisión de fluorescencia en función de la concentración de oligonucleótido permite estimar el valor de las constantes de estabilidad de los sistemas poliamina-oligonucleótido. En la Tabla 9.3 se resumen los valores de los logaritmos de las constantes de estabilidad de los distintos sistemas que se han estudiado, determinados haciendo uso del Método Intrínseco, el cual se encuentra descrito con más detalle en la sección *Material y Métodos*.

Tabla 9.3. Logaritmos de las constantes de estabilidad determinados para los distintos sistemas poliamina-oligonucleótido, empleando el Método Intrínseco.

Oligonucleótido	L7	L8
HTelo	2.1(3)	4.3(3)
ckit1	4.4(2)	2.2(2)
ds26	5.0(2)	2.1(2)

En el caso del escorpiando **L7**, el cual incorpora en su estructura una unidad de antraceno, los valores de la constante de estabilidad más altos se obtienen con el modelo dúplex ds26 y con el modelo quádruplex oncogénico ckit1, los cuales son tres y dos órdenes de magnitud superiores a la constante de estabilidad con el modelo quadruplex telomérico HTelo, respectivamente. El grado de interacción con cada una de las secuencias que se han estudiado, ordenado de mayor a menor, sería el siguiente: ds26 > ckit1 >> HTelo. Aunque en base a los resultados no se puede decir que **L7** muestre preferencia por la interacción con el modelo dúplex frente a los modelos quadruplex, sí que se observa preferencia frente a uno de los modelos quadruplex con respecto al otro, lo cual seguramente es consecuencia del distinto empaquetamiento de las secuencias HTelo y ckit1.

En cambio, en el caso del escorpiando **L8**, similar a **L7** pero constituido por una unidad de TPA, el comportamiento es completamente opuesto. Los valores de la constante de estabilidad más altos se obtienen con el modelo quadruplex telomérico HTelo, la cual es dos órdenes de magnitud superior a la constante de estabilidad con los modelos dúplex ds26 y quadruplex oncogénico ckit1. El grado de interacción con las secuencias, ordenado de mayor a menor, sería el opuesto al deducido para el caso anterior: HTelo >> ckit1 > ds26. Esto evidencia una preferencia por la interacción con el modelo quádruplex telomérico HTelo frente al modelo dúplex ds26, lo que resulta particularmente interesante. Además, de nuevo se observa discriminación entre modelos quadruplex, advirtiéndose la preferencia por la interacción con uno de los modelos quadruplex frente al otro.

En la Figura 9.10 se representan los valores de los logaritmos de las constantes de estabilidad que se presentan en la Tabla 9.3, lo que facilita la comparación y la discusión de los resultados.

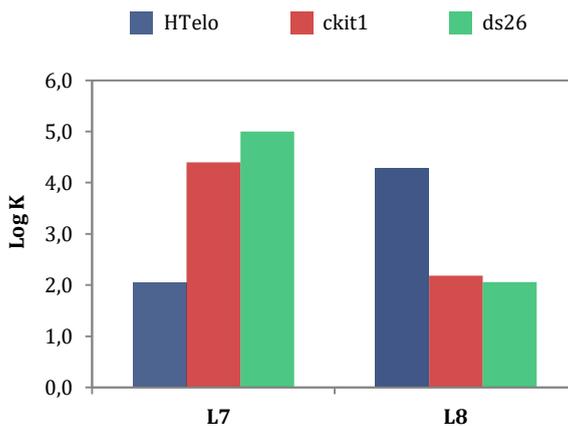


Figura 9.10. Representación de los logaritmos de las constantes de estabilidad, haciendo uso de los datos que se resumen en la Tabla 9.3.

9.3. Desnaturalización Térmica–FRET

Los ensayos de desnaturalización térmica se realizaron con el propósito de estudiar la estabilización y/o desestabilización de las mismas secuencias de oligonucleótido que en la sección anterior, como consecuencia de la interacción con los escorpiandos **L6–L8**.

La metodología consiste en registrar el espectro de emisión de fluorescencia a medida que se incrementa la temperatura, lo que permite obtener el valor de la temperatura de desnaturalización del oligonucleótido, así como la variación de la temperatura de desnaturalización como consecuencia de la interacción con un determinado compuesto. El procedimiento se encuentra descrito con más detalle en la sección *Material y Métodos*. Cuando el valor de la variación de la temperatura de desnaturalización es positivo se entiende que el compuesto produce una estabilización de la estructura del oligonucleótido, mientras que cuando el valor es negativo produce el efecto contrario.

En la Tabla 9.4 se presentan los valores de la variación de la temperatura de desnaturalización (ΔT_m) de las secuencias de oligonucleótidos HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L6–L8**. En la Figura 9.11 se representan los valores resumidos en la Tabla 9.4, lo que permite la comparación entre sistemas de una manera más sencilla.

Tabla 9.4. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de oligonucleótidos HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L6–L8**.

Poliamina	Oligonucleótido	[Poliamina]/[Oligonucleótido]		
		2	5	10
L6	HTelo	0.5	0.3	0.6
	ckit1	0.1	0.1	0.1
	ds26	-0.2	-0.1	0.0
L7	HTelo	1.5	3.4	6.0
	ckit1	1.0	1.8	2.2
	ds26	0.0	0.0	0.3
L8	HTelo	0.7	2.5	5.2
	ckit1	0.1	0.1	0.4
	ds26	-0.2	-0.3	-0.2

En el caso de **L6**, no se observa ni estabilización ni desestabilización de las secuencias para ninguna de las relaciones estudiadas. En cambio, para **L7** y **L8**, similares a **L6** pero incorporando las unidades de antraceno y de TPA en su estructura respectivamente, el comportamiento es distinto. Esto sugiere un papel determinante de estas unidades en la interacción con las secuencias de oligonucleótido. En ambos casos, con el modelo dúplex ds26 no se observa ni estabilización ni desestabilización, exhibiendo los valores de ΔT_m más altos con el modelo quádruplex HTelo. Además, en el caso de **L7** se observa una ligera estabilización de la secuencia ckit1, que no se observa para **L8**.

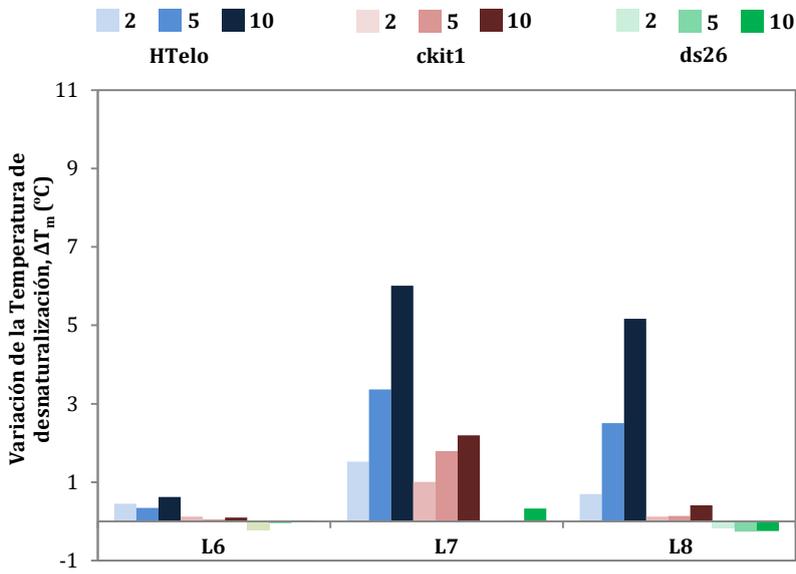


Figura 9.11. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias de oligonucleótidos HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L6-L8**.

¿Cómo influye la coordinación con cobre(II) y zinc(II) en la interacción con las secuencias de oligonucleótidos?

Realizados los ensayos de desnaturalización térmica para **L6-L8**, se procedió a la realización de los mismos para los complejos mononucleares de cobre(II) y zinc(II) de **L6-L8**, con el objetivo de estudiar el efecto que tiene la coordinación con ambos metales sobre la interacción con las distintas secuencias de oligonucleótido.

En la Tabla 9.5 se presentan los valores de ΔT_m para los oligonucleótidos HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L6**, así como de los sistemas Cu(II)-**L6** y Zn(II)-**L6**, mientras que en la Figura 9.12 se representan los valores de ΔT_m resumidos en la Tabla 9.5.

Tabla 9.5. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L6**, así como de los sistemas Cu(II)-**L6** y Zn(II)-**L6**.

Sistema	Oligonucleótido	[Sistema]/[Oligonucleótido]		
		2	5	10
L6	HTelo	0.5	0.3	0.6
	ckit1	0.1	0.1	0.1
	ds26	-0.2	-0.1	0.0
CuL6	HTelo	-0.2	0.6	0.6
	ckit1	0.4	0.9	1.4
	ds26	0.0	0.0	0.1
ZnL6	HTelo	0.4	0.2	0.1
	ckit1	0.1	0.5	0.3
	ds26	-0.1	0.0	-0.1

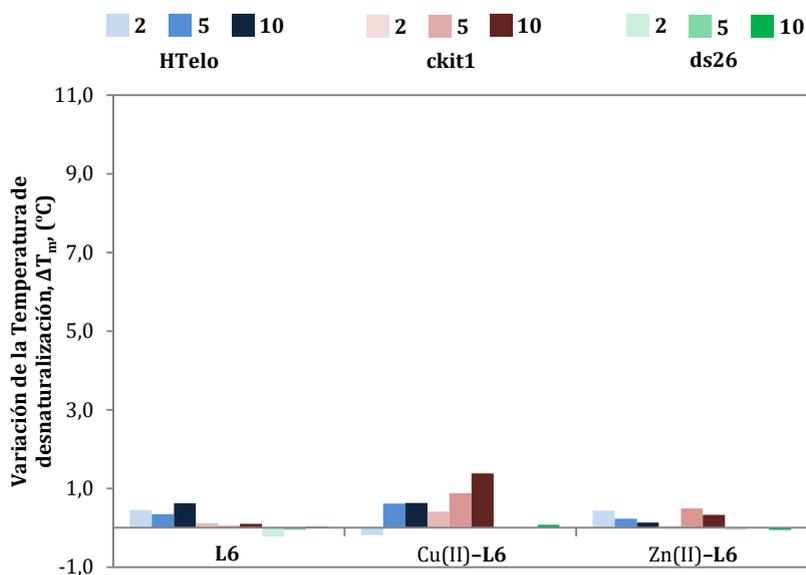


Figura 9.12. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L6**, así como de los sistemas Cu(II)-**L6** y Zn(II)-**L6**.

Los sistemas Cu(II)-**L6** y Zn(II)-**L6** presentan valores de ΔT_m similares a los determinados para **L6**, no observándose cambios notables en la estabilización para ninguna de las secuencias que se han estudiado. En este caso, la formación de los complejos de cobre(II) y zinc(II) no tiene efecto sobre la interacción de **L6** con las secuencias estudiadas.

En la Tabla 9.6 se presentan los valores de ΔT_m para los oligonucleótidos HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L7**, así como de los sistemas Cu(II)-**L7** y Zn(II)-**L7**. En la Figura 9.13 se representan los valores de ΔT_m que se resumen en la Tabla 9.6.

Tabla 9.6. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L7**, así como de los sistemas Cu(II)-**L7** y Zn(II)-**L7**.

Sistema	Oligonucleótido	[Sistema]/[Oligonucleótido]		
		2	5	10
L7	HTelo	1.5	3.4	6.0
	ckit1	1.0	1.8	2.2
	ds26	0.0	0.0	0.3
CuL7	HTelo	1.7	4.3	10.0
	ckit1	0.9	2.1	5.5
	ds26	0.1	0.1	0.4
ZnL7	HTelo	0.1	0.2	0.3
	ckit1	1.2	1.8	2.1
	ds26	-0.1	-0.1	-0.1

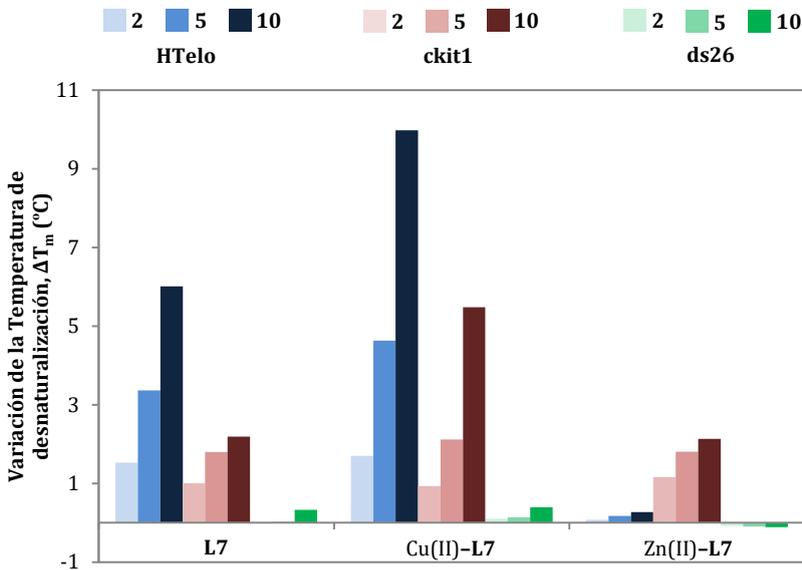


Figura 9.13. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de L7, así como de los sistemas Cu(II)-L7 y Zn(II)-L7.

En este caso, dependiendo del metal y del oligonucleótido, se observa un comportamiento distinto. Para el modelo dúplex, la coordinación con cobre(II) y con zinc(II) no da lugar a cambios en la estabilización de la secuencia. En cambio, la formación de complejos de cobre(II) da lugar a un aumento de la estabilización para las dos secuencias quadruplex, mientras que la coordinación con zinc(II) resulta en una disminución de la estabilización para la secuencia telomérica HTelo, pero no da lugar a cambios para la secuencia oncogénica ckit1.

En la Tabla 9.7 se presentan los valores de ΔT_m para los oligonucleótidos HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L8**, así como de los sistemas Cu(II)-**L8** y Zn(II)-**L8**, mientras que en la Figura 9.14 se representan los valores de ΔT_m que se resumen en la Tabla 9.7.

Tabla 9.7. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L8**, así como de los sistemas Cu(II)-**L8** y Zn(II)-**L8**.

Sistema	Oligonucleótido	[Sistema]/[Oligonucleótido]		
		2	5	10
L8	HTelo	0.7	2.5	5.2
	ckit1	0.1	0.1	0.4
	ds26	-0.2	-0.3	-0.2
CuL8	HTelo	-0.1	0.0	0.3
	ckit1	0.4	0.1	0.7
	ds26	0.1	0.0	0.0
ZnL8	HTelo	0.0	0.1	0.2
	ckit1	0.6	0.7	1.3
	ds26	-0.1	-0.1	-0.1

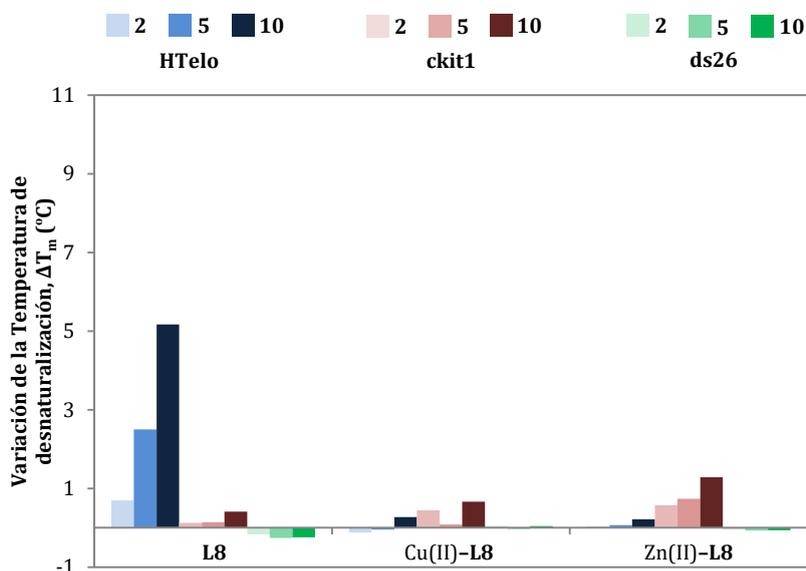


Figura 9.14. Variación de la temperatura de desnaturalización ΔT_m (°C) para las secuencias HTelo, ckit1 y ds26, después de la adición de 2, 5 y 10 equivalentes de **L8**, así como de los sistemas Cu(II)-**L8** y Zn(II)-**L8**.

Dependiendo del oligonucleótido, se advierte un comportamiento distinto. Para las secuencias ds26 y ckit1 no se observa variación en los valores de ΔT_m como consecuencia de la coordinación con cobre(II) y con zinc(II). En cambio, para el modelo HTelo la coordinación con ambos metales da lugar a una disminución de los valores de ΔT_m con respecto a los determinados para **L8**, disminuyendo la estabilización de la secuencia, y por lo tanto afectando a la interacción de la poliamina con dicha secuencia.

9.4. Ensayo de Proliferación Celular por MTT: Estudio de la Citotoxicidad

Los ensayos de viabilidad celular se realizaron empleando la línea celular de glioblastoma multiforme LN229, derivada de tumores sólidos. En la Figura 9.15 se representa el porcentaje de células LN229 vivas después de haber sido tratadas con distintas cantidades de L6-L8.

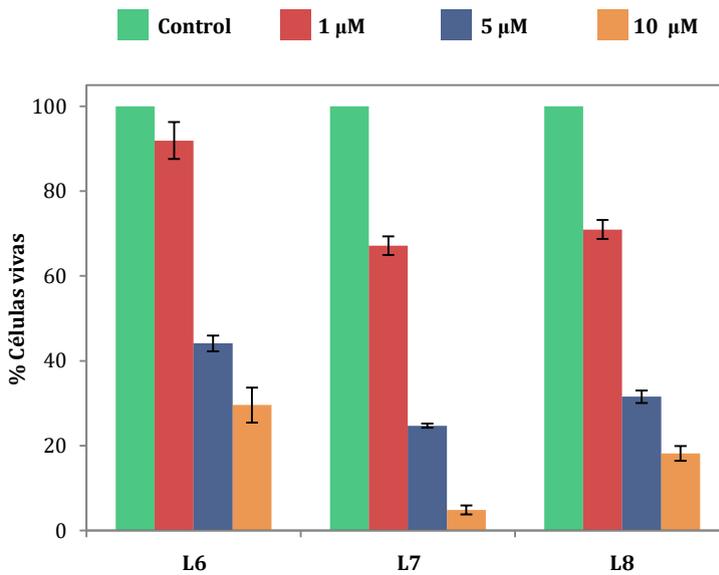


Figura 9.15. Porcentaje de células vivas después de ser tratadas con disoluciones acuosas de L6-L8 de concentraciones 1, 5 y 10 µM. Incubadas durante 48 horas.

Las tres poliaminas presentan una elevada toxicidad para concentraciones de 5 μM , como se deduce del número de células vivas después de ser tratadas con las poliaminas, el cual es inferior al 50%.

Los ensayos de viabilidad celular permiten calcular el valor del IC_{50} para cada una de las poliaminas, parámetro que se define como la concentración de poliamina necesaria para dar lugar a una reducción del 50% de la viabilidad celular, y que se muestra en la Tabla 9.8.

Tabla 9.8. Valores de IC_{50} para cada una de las poliaminas.

Poliamina	IC_{50} (μM)
L6	4.61(3)
L7	1.81(1)
L8	2.80(4)

Ordenando las poliaminas de más a menos citotóxicas, se tiene la siguiente tendencia: **L7** > **L8** > **L6**. El receptor **L7**, el cual incorpora antraceno, es el más citotóxico de los tres receptores, lo cual seguramente sea debido a la presencia del mismo, pues la unidad de antraceno es un intercalador excelente. En cambio, el escorpiando **L6**, que es el único de los tres que no se encuentra funcionalizado con una unidad intercaladora, es el menos citotóxico de los tres. Estos resultados ponen de manifiesto que la mayor toxicidad de **L7** y **L8** es atribuible a la presencia de unidades intercaladoras en la estructura de los mismos.

9.5. Conclusiones

Se ha estudiado la interacción de **L6-L8** con distintas secuencias de oligonucleótido, de tipo dúplex y quadruplex, mediante distintas técnicas, tales como espectroscopía de emisión de fluorescencia y ensayos de desnaturalización térmica-FRET.

Los estudios de espectroscopia de emisión de fluorescencia evidencian un comportamiento distinto para **L7** y **L8**. El escorpiando **L7**, que tiene una unidad de antraceno en su estructura, presenta una mayor afinidad por la secuencia dúplex ds26 y por la secuencia quadruplex ckit1, sin exhibir una preferencia clara para interaccionar con modelos dúplex o quadruplex. En cambio, el escorpiando **L8**, que tiene una unidad de TPA en su estructura, presenta un mayor grado de interacción con el modelo quadruplex HTelo, siendo la constante de estabilidad dos órdenes de magnitud superior a la constantes calculadas con los otros dos modelos. Por lo tanto, **L8** es selectivo con uno de los modelos quádruplex frente al modelo dúplex. Además, para ambos receptores, sorprendentemente se observa una discriminación entre los dos modelos quadruplex, advirtiéndose la preferencia por la interacción con uno de los modelos quadruplex frente al otro, lo cual seguramente es consecuencia de la distinta conformación que adoptan los modelos HTelo y ckit1.

Los estudios de desnaturalización térmica-FRET exponen que las unidades de antraceno y de TPA presentan un papel determinante en la interacción con las secuencias de oligonucleótido estudiadas. Así, mientras que para **L6** no se observa ni la estabilización ni la desestabilización de ninguna de las secuencias estudiadas, en el caso de **L7** y **L8**, los cuales incorporan unidades intercaladoras en su estructura, se observa una notable estabilización del modelo quádruplex HTelo, además de una ligera estabilización del modelo ckit1 para el caso de **L7**.

Asimismo, mediante estudios de desnaturalización térmica-FRET, se ha estudiado el efecto de la coordinación con cobre(II) y con zinc(II) sobre la interacción de las poliaminas con las distintas secuencias de oligonucleótido. Los resultados ponen de manifiesto que cuando el receptor no estabiliza ni desestabiliza la secuencia de oligonucleótido, la coordinación con ambos metales no tiene efecto sobre la interacción, pues no se producen cambios en los valores de la temperatura de desnaturalización. En cambio, cuando el receptor da lugar a variaciones en la temperatura de desnaturalización, la coordinación con cobre(II) suele dar lugar a un aumento de la variación de la temperatura de desnaturalización, mientras que la coordinación con zinc(II) siempre da lugar a una disminución de la variación de la temperatura de desnaturalización. Este comportamiento discrepante entre cobre(II) y zinc(II) puede estar asociado a que, para el pH en el que se realizaron los ensayos, todo el cobre se encuentra complejado, mientras que en el caso del zinc esto no es así. Una explicación posible para este comportamiento es que el zinc(II) libre en disolución interfiere en la interacción entre la poliamina y el oligonucleótido, dando lugar a una disminución en la estabilización de la secuencia (ΔT_m).

Finalmente, se ha estudiado la citotoxicidad de **L6-L8** mediante la realización de un ensayo de proliferación celular por MTT. Los tres escorpiandos exhiben una elevada toxicidad para concentraciones de 5 μM . No obstante, los receptores **L7** y **L8**, que incorporan unidades intercaladoras en su estructura, son los que presentan una mayor citotoxicidad. En base a ello, se puede decir que las unidades de antraceno y de TPA también presentan un papel determinante en la citotoxicidad de los compuestos.

9.6. Bibliografía

- [1] J. D. Watson, F. H. C. Crick. *Nature* **1953**, 171, 737–738.
- [2] F. Miescher. *Med. Chem. Unters.* **1871**, 4, 441–460.
- [3] P. A. Levene. *J. Biol. Chem.* **1919**, 40, 415–424.
- [4] S. Zamenhof, L. B. Shettles, E. Chargaff. *Nature* **1950**, 165, 756–757.
- [5] M. H. F. Wilkins, A. R. Stokes, H. R. Wilson. *Nature* **1953**, 171, 738–740.
- [6] M. H. F. Wilkins, W. E. Seeds, A. R. Stokes, H. R. Wilson. *Nature* **1953**, 172, 759–762.
- [7] R. E. Franklin, R. G. Gosling. *Nature* **1953**, 171, 740–741.
- [8] F. R. E. Franklin, R. G. Gosling. *Nature* **1953**, 172, 156–157.
- [9] G. M. Blackburn, M. J. Gait, D. Loakes, D. M. Williams. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. The Royal Society of Chemistry, **2006**.
- [10] T. M. Devlin. *Textbook of Biochemistry. With Clinical Correlations*. Wiley, **2011**.
- [11] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, G. J. Gatto, L. Stryer. *Biochemistry*. W.H. Freeman & Company, **2015**.
- [12] M. Kaushik, S. Kaushik, K. Roy, A. Singh, S. Mahendru, M. Kumar, S. Chaudhary, S. Ahmed, S. Kukreti. *Biochem. Biophys. Rep.* **2016**, 5, 388–395.
- [13] J. S. Hardwick, D. Ptchelkine, A. H. El-Sagheer, I. Tear, D. Singleton, S. E. V. Phillips, A. N. Lane, T. Brown. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2017**, 24, 544–552.
- [14] H. R. Drew, R. M. Wing, T. Takano, C. Broka, S. Tanaka, K. Itakura, R. E. Dickerson. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, 78, 2179–2183.
- [15] C. Hou, O. V. Tsodikov. *Acta Cryst. D* **2019**, 75, 32–40.
- [16] P. Belmont, J. F. Constant, M. Demeunynck. *Chem. Soc. Rev.* **2001**, 30, 70–81.
- [17] T. Biver. *Coord. Chem. Rev.* **2013**, 257, 2765–2783.
- [18] M. Duca, P. Vekhoff, K. Oussedik, L. Halby, P. B. Arimondo. *Nucleic Acids Res.* **2008**, 36, 5123–5138.
- [19] H. A. Day, P. Pavlou, Z. A. E. Waller. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 4407–4418.

- [20] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd, S. Neidle. *Nucleic Acids Res.* **2006**, 34, 5402–5415.
- [21] S. Rhee, Z. Han, K. Liu, H. T. Miles, D. R. Davies. *Biochemistry* **1999**, 38, 16810–16815.
- [22] K. Gehring, J.-L. Leroy, M. Guéron. *Nature* **1993**, 363, 561–565.
- [23] Y. Wang, D. J. Patel. *J. Mol. Biol.* **1993**, 234, 1171–1183.
- [24] G. Wang, K. M. Vasquez. *DNA Repair* **2014**, 19, 143–151.
- [25] S. Rankin, A. P. Reszka, J. Huppert, M. Zloh, G. N. Parkinson, A. K. Todd, S. Ladame, S. Balasubramanian, S. Neidle. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 10584–10589.
- [26] A. K. Todd, S. M. Haider, G. N. Parkinson, S. Neidle. *Nucleic Acids Res.* **2007**, 35, 5799–5808.
- [27] T. A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley. *FEBS J.* **2010**, 277, 3459–3469.
- [28] J. Choi, T. Majima. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, 40, 5893–5909.
- [29] L. Yuan, T. Tian, Y. Chen, S. Yan, X. Xing, Z. Zhang, Q. Zhai, L. Xu, S. Wang, X. Weng. *Sci. Rep.* **2013**, 3, 1811–1819.
- [30] H. Han, L. H. Hurley. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, 21, 136–142.
- [31] S. Balasubramanian, S. Neidle. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 345–353.
- [32] S. Neidle. *J. Med. Chem.* **2016**, 59, 5987–6011.
- [33] R. Rigo, M. Palumbo, C. Sissi. *Biochim. Biophys. Acta, General Subjects* **2017**, 1861, 1399–1413.
- [34] S. Sharma, E. Raymond, H. Soda, D. Sun, S. G. Hilsenbeck, A. Sharma, E. Izbicka, B. Windle, D. D. Von Hoff. *Ann. Oncol.* **1997**, 8, 1063–1074.
- [35] P. J. Perry, L. R. Kelland. *Expert Opin. Ther. Pat.* **1998**, 8, 1567–1586.
- [36] A. M. Zahler, J. R. Williamson, T. R. Cech, D. M. Prescott. *Nature* **1991**, 350, 718–720.
- [37] J.-L. Mergny, C. Hélène. *Nat. Med.* **1998**, 4, 1366–1367.
- [38] G. N. Parkinson, M. P. H. Lee, S. Neidle. *Nature* **2002**, 417, 876–880.
- [39] D. Wei, G. N. Parkinson, A. P. Reszka, S. Neidle. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 4691–4700.

10

Conclusions

Note: This chapter has been written in English in order to obtain the International Mention.

Conclusion 1: Synthesis and characterization of new [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles

Two new families of [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles were prepared and characterized successfully. The synthesis was based on the Richmann–Atkins procedure, while the characterization of the azamacrocycles was performed by using different techniques as nuclear magnetic resonance, ESI mass spectrometry and elemental microanalysis.

The first family is formed by five ligands constituted by the 1*H*-pyrazole ring as spacer and different lineal polyamines: **L1–L5**. **L1–L3** present four amine groups in their structure while **L4** and **L5** present six amino groups in their structure.

The second family is formed by three scorpion-like ligands composed by the 1*H*-pyrazole ring as spacer and the tripodal polyamine tris(2-aminoethyl)amine, either alone or functionalised with fluorescent moieties: **L6–L8**.

Conclusion 2: Acid–base behaviour of the new [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles in aqueous solution

The acid–base behaviour of the new [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles was studied by means of pH–metric titrations and UV–vis spectroscopy. Fluorescence emission experiments were also performed for the case of the scorpion-like compounds having fluorescent moieties in their structure. We determined the protonation constants in aqueous solution for all of the azamacrocycles. Furthermore, in some cases we were able to suggest a sequence for the amine protonation.

The first family of [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles show the same number of protonation constants as amino groups in their structure in the pH range available for the pH–metric titrations; **L1–L3** have four protonation constants while **L4** and **L5** display six protonation constants.

The second family of [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles exhibit three protonation constants. It was not possible to detect the protonation of the tertiary amines in any of the azamacrocycles studied in the pH range available for pH–metric titrations. The protonation of the nitrogen from the TPA moiety for **L8** was also not measurable in the pH range of study. While **L7** is emissive at acidic pH when the secondary amine groups are protonated, at higher pH values it bears a quenching of the fluorescence emission owing to a PET process from the lone pair of the amines to the excited anthracene unit. However, the fluorescence emission of **L8** is enhanced at basic pH due to an aggregation process (AIE).

Although the pyridinic nitrogen of the 1*H*-pyrazole ring may bear an additional protonation step, we have not detected such a protonation constant in the pH range available for pH–metric titrations in any of the azamacrocycles.

Conclusion 3: Coordination chemistry of the new [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles in aqueous solution and solid state

The coordination chemistry of the new [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles was studied by means of pH-metric titrations, UV-vis spectroscopy, HR-ESI mass spectrometry, electron paramagnetic resonance and fluorescence experiments, revealing different behaviour depending on the structure of the azamacrocycle. We determined the stability constants for the copper(II) and zinc(II) complexes in aqueous solution for all of the azamacrocycles. As expected, the copper(II) complexes were found to be more stable than the zinc(II) analogue complexes.

L1-L3 displayed similar behaviour for M(II):L 1:1 molar ratios, forming both monomeric mononuclear and dimeric dinuclear complexes, predominating the formation of dimeric dinuclear complexes. This behaviour is different to that previously reported for analogous compounds having the pyridine or benzene moiety as spacers instead of 1*H*-pyrazole, which lead to the formation exclusively of monomeric mononuclear species. Moreover, **L1** and **L2** showed the formation of tetranuclear dimeric copper(II) complexes, while **L3** exhibited the formation of trinuclear dimeric copper(II) complexes, noticing different behaviour for higher Cu(II):L molar ratios.

L4 and **L5** showed the formation of mononuclear and dinuclear monomeric species for M(II):L 1:1 and 2:1 molar ratios, respectively. This behaviour disagrees with that found for **L1-L3** and with the previously reported one for similar [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles, but agrees with the described for analogous compounds having the pyridine moiety as spacer.

L6–L8 scorpiand-like compounds led to the formation of mononuclear monomeric complexes for M(II):L 1:1 molar ratios, which coincides with that found for pyridine-based scorpiand-like analogous compounds.

We obtained two crystal structures for **L2** corresponding to $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{4+}$ and $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_2]^{2+}$ species, which confirm the formation of dinuclear dimeric species both in aqueous solution and in the solid state. Furthermore, we obtained two surprising crystal structures of **L2** having seven and nine copper atoms revealing an architecture built by a network of hydroxo bridges and/or carbonates. Therefore, these metal complexes seemed well suited for capturing atmospheric carbon dioxide giving rise to pillarplexes-like molecular architectures.

We obtained one crystal structure for **L6** that includes the $[\text{CuHL}_6]^{3+}$ species and demonstrates the formation of mononuclear monomeric species both in aqueous solution and in the solid state. However, by adding an excess of hydrobromic acid we obtained one crystal structure for **L6** corresponding to one dinuclear dimeric copper(II) complex with the CH from both 1*H*-pyrazole moieties brominated. In this complex, the copper(II) presents an exo-coordination being coordinated in a monodentate way by the 1*H*-pyrazole units of both azamacrocycles and completing their coordination by four bromide anions, two of them behaving as bridging ligands between the metal centres.

On the other hand, we have obtained three crystal structures of the as far as we know was the first ever reported [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycle **PZ333**, previously synthesised and studied in our group. Two structures are metal-organic type cages and correspond to tetranuclear copper(II) and mixed copper(II)-palladium(II) complexes, while the other one corresponds to trinuclear copper(II) complexes which interestingly incorporate an oxalate anion.

Conclusion 4: Hydrogel formation with guanosine-5'-monophosphate

Guanosine-5'-monophosphate aqueous solutions can form hydrogels in a process which starts with the self-organization of four GMP molecules and a cation leading to the formation of a planar structure called G-tetrad. These structures can further self-assemble leading to the formation of G-quadruplex structures and usually forming hydrogels. We evaluated the potential of the azamacrocycles **L1-L5** to increase the self-assembly ability of guanosine-5'-monophosphate in aqueous solution as well as the possible use of the hydrogels as biocompatible materials by introducing the drug isoniazid.

We prepared and characterized successfully new GMP hydrogels with the azamacrocycles **L1, L2, L3** and **L5**, employing GMP concentrations one magnitude order lower than those normally needed at room temperature. This study proved that **L1, L2, L3** and **L5** promote hydrogel formation by stabilization of G-quadruplex structures. However, surprisingly and unlike the rest of the azamacrocycles, it was not possible to obtain hydrogels with **L4**.

Rheology experiments allowed us to determine the optimal conditions for hydrogel formation for the GMP-**L1**, GMP-**L2**, GMP-**L3** and GMP-**L5** systems, which were achieved when the negative charges of GMP were matched by the positive charges of the azamacrocycle. Rheology experiments also demonstrated that the stronger hydrogels were obtained for the GMP-**L3** and GMP-**L5** systems, which also displayed the greater GMP:polyamine molar ratio range for hydrogel formation.

The kinetics of the hydrogel formation was studied by means of nuclear magnetic resonance for the GMP-L1, GMP-L2, GMP-L3 and GMP-L5 systems, revealing an extraordinarily fast hydrogel formation for the GMP-L5 system. Cryo-microscopy scanning electron technique was employed to investigate the morphology of the hydrogels for the GMP-L1, GMP-L2, GMP-L3 and GMP-L5 systems, showing irregular and cross-linked structure for all of them.

We demonstrated that it was possible to introduce 1 mg of isoniazid per mL of hydrogel for the GMP-L1, GMP-L2, GMP-L3 and GMP-L5 systems without disrupting the hydrogel structure. These soft materials were found to be stable at temperature values higher than the human body temperature. Furthermore, we were able to introduce successfully 10 mg of isoniazid per mL of hydrogel for the GMP-L1 and GMP-L3 systems, which agrees with the normal dose of isoniazid when given via oral.

Conclusion 5: Evaluation of the superoxide dismutase activity

The superoxide dismutase proteins are a family of enzymes that remove the superoxide anion by catalysing its dismutation into dioxygen and hydrogen peroxide. The imbalance between the production of superoxide anions and the ability of the enzyme to remove them is known as oxidative stress and is related with degenerative processes. We evaluated the antioxidant ability of the copper(II) mononuclear and dinuclear complexes of the azamacrocycles **L4** and **L5** by means of the McCord–Fridovich assay as well as their electrochemical behaviour.

The reduction potential of the Cu(II)–**L4** and Cu(II)–**L5** systems for Cu(II):L 1:1 and 2:1 molar ratios at physiological pH was found to be in the required range, being intermediate between the reduction potential values of the $O_2/O_2^{\cdot-}$ (-0.33 V) and $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ ($+0.89\text{ V}$) couples. Both **L4** and **L5** did not exhibit any electrochemical activity in the absence of the copper(II) cation.

The mononuclear and dinuclear complexes of both Cu(II)–**L4** and Cu(II)–**L5** systems showed superoxide dismutase activity, while **L4** and **L5** did not exhibit any activity, which agrees with the electrochemistry. Especially, the dinuclear complexes of both the Cu(II)–**L4** and Cu(II)–**L5** systems showed a very remarkable superoxide dismutase activity as the IC_{50} and k_{cat} calculated values for them are comparable with those for the native enzyme, which constitutes as far as we know two of the best results reported so far in the literature.

Conclusion 6: Interaction with oligonucleotides

The DNA biomolecule contains the genetic information of all known organisms and many viruses. The design of new small molecules capable to interact with DNA has been an interesting research topic for many years. Among the wide variety of small molecules with the potential to interact with DNA are the azamacrocycles. We studied the interaction of the scorpiand-like azamacrocycles **L6–L8** with three oligonucleotide sequences; one of them was a duplex DNA model (ds26) while the other two sequences were telomeric (HTelo) and oncogenic (ckit1) quadruplex models. We also evaluated the cytotoxicity of the scorpiand-like azamacrocycles by means of the MTT assay.

Fluorescence experiments showed the opposite behaviour for the azamacrocycles **L7** and **L8**, which are similar but having the anthracene and the TPA moieties, respectively. **L7** exhibited the highest stability constant values with the duplex model ds26 and with the oncogenic quadruplex model ckit1, and no selectivity was observed. However, **L8** showed the highest stability constant values with the telomeric quadruplex model HTelo, and we noticed a remarkable selectivity towards the telomeric quadruplex model. Moreover, surprisingly both **L7** and **L8** discriminate between telomeric and oncogenic quadruplex models.

FRET melting experiments proved that none of the scorpiand-like azamacrocycles stabilize or destabilize the ds26 duplex sequence. FRET melting experiments also demonstrated that the anthracene and the TPA units play a key role in the interaction with the oligonucleotide sequences as **L6** did not stabilize or destabilize any sequence, while **L7** and **L8** led to considerable stabilization of the HTelo telomeric quadruplex model.

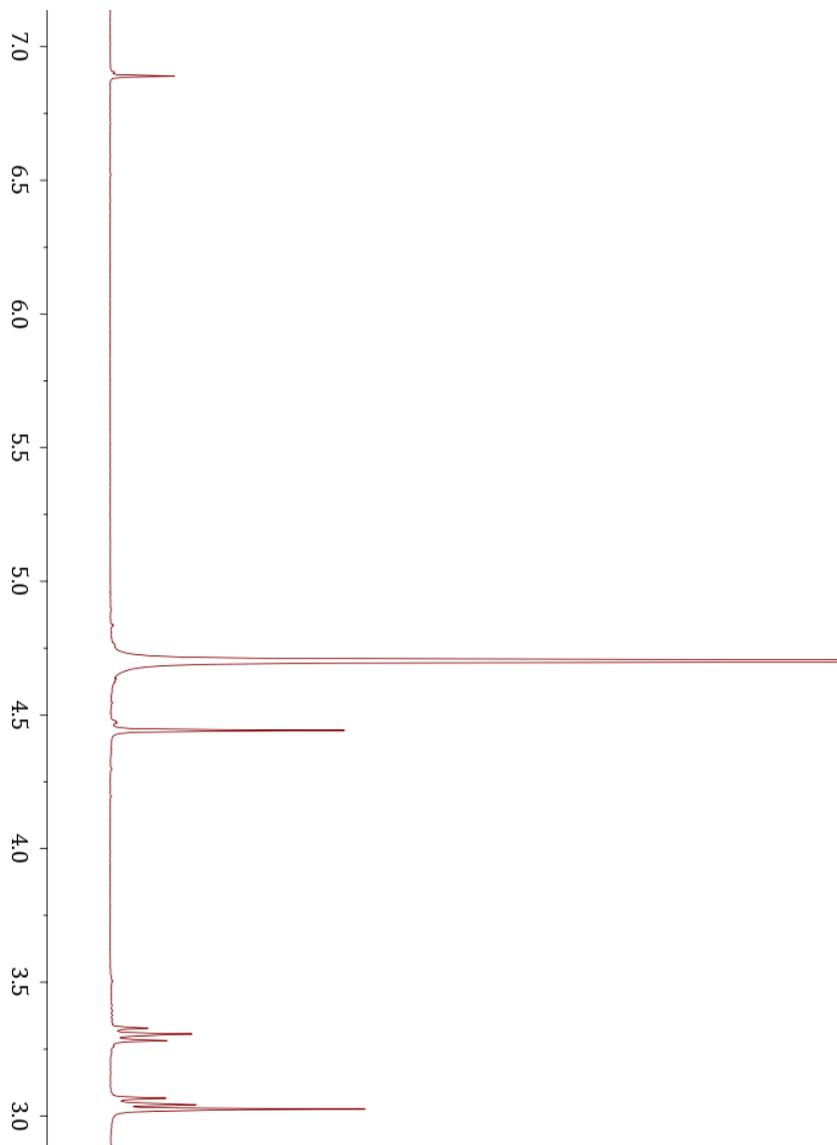
The influence of the copper(II) and zinc(II) coordination on the interaction with the oligonucleotide sequences was evaluated by means of FRET melting experiments. Coordination with both copper(II) and zinc(II) has no effect when the non-complexed azamacrocycle does not stabilize or destabilize the oligonucleotide sequence. However, when the non-complexed azamacrocycle stabilizes the oligonucleotide sequence, copper(II) coordination usually leads to an increase on the oligonucleotide stabilization while zinc(II) coordination always leads to a decrease of the oligonucleotide stabilization.

The cytotoxicity of the scorpion-like azamacrocycles **L6–L8** was investigated by using the MTT assay. The three compounds displayed a remarkable cytotoxicity giving IC_{50} values in the low micromolar range, varying from 4.6 μM for **L6** to 1.8 μM for **L7**. The fluorescent anthracene and triphenylamine units in **L7** and **L8** must have an important effect on cytotoxicity, since they are both clearly more cytotoxic than **L6**.

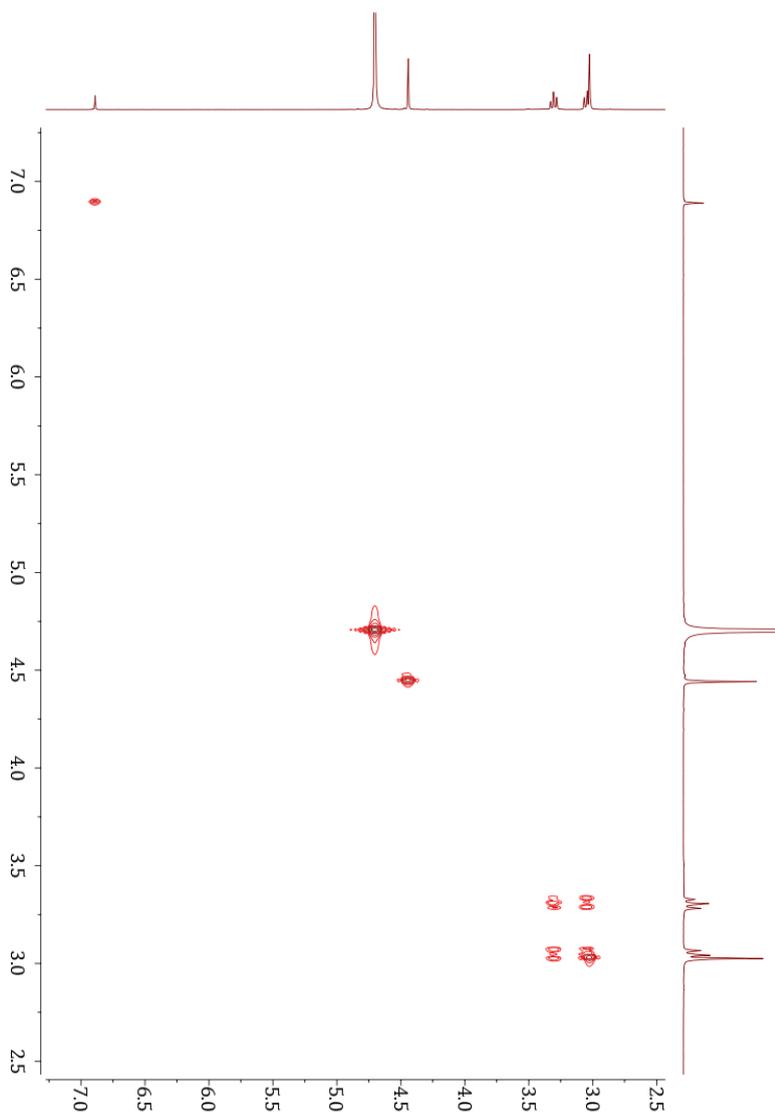
Therefore as a final conclusion, it can be said that the new [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles **L1–L8** have shown to have a remarkable potential in different biomedical applications including the preparation of new biocompatible materials, the development of new superoxide dismutase mimics and the discrimination between oligonucleotide sequences. Further investigation will be undertaken to evaluate the *in vitro* and *in vivo* capacity of these [1+1] 1*H*-pyrazole azamacrocycles in a biomedical context.

Annex A

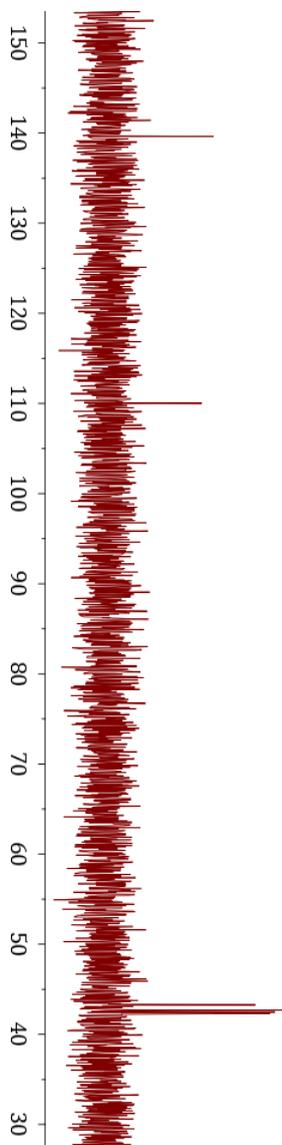
Nuclear Magnetic Resonance



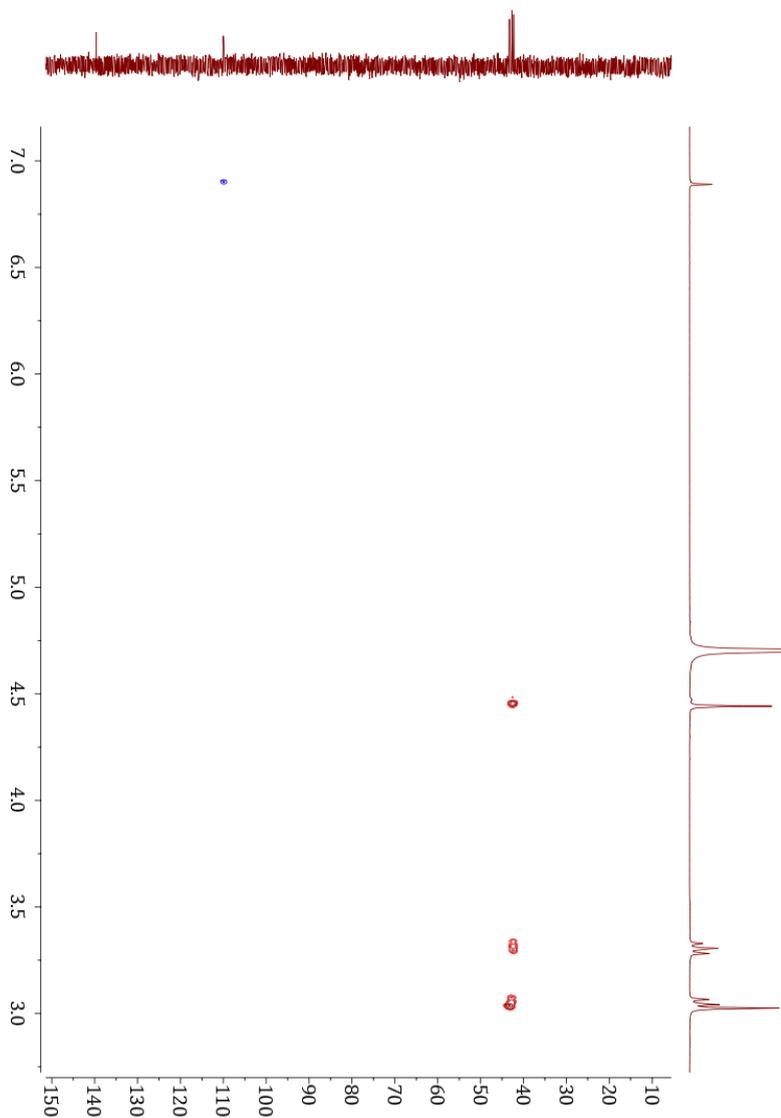
Annex A.1. ^1H NMR spectrum of L1 in D_2O .



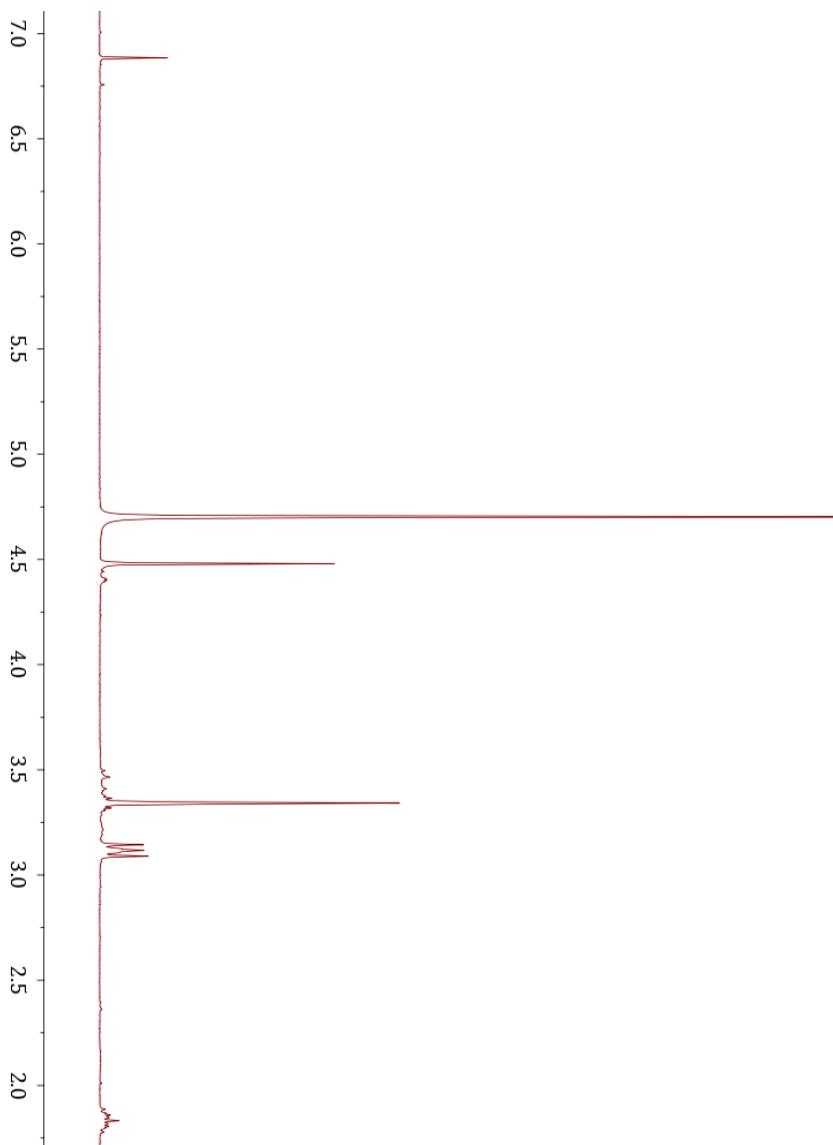
Annex A.2. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of **L1** in D₂O.



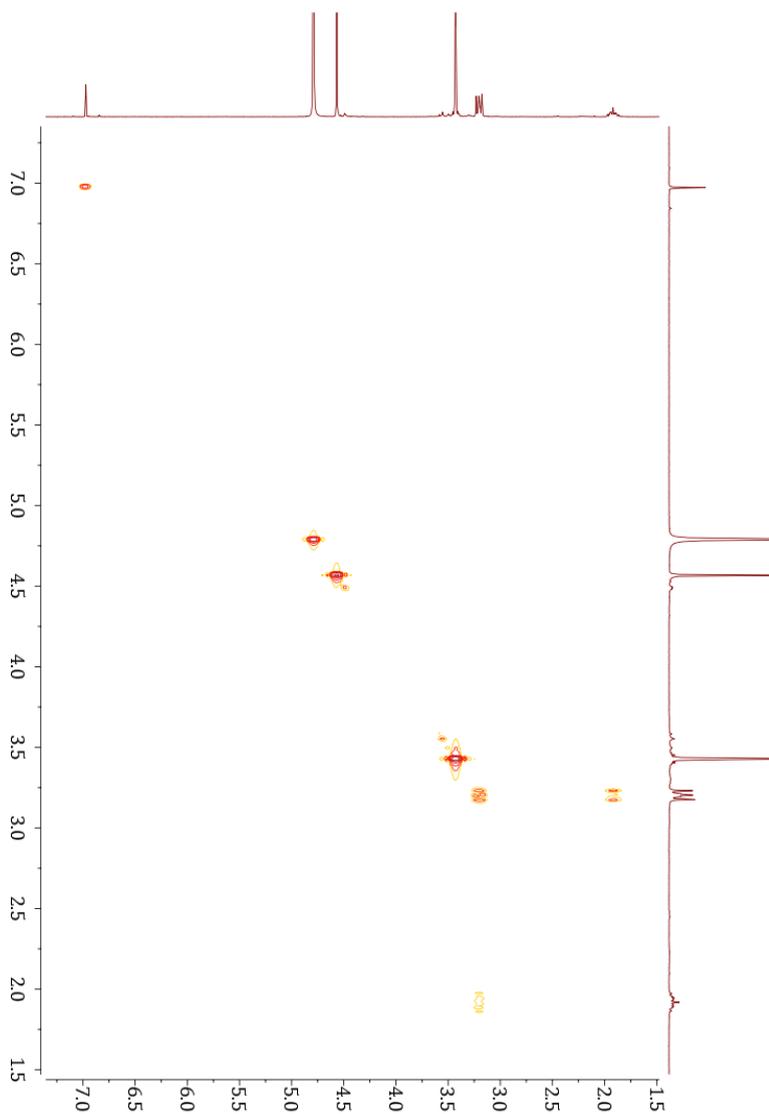
Annex A.3. ^{13}C NMR spectrum of **L1** in D_2O .



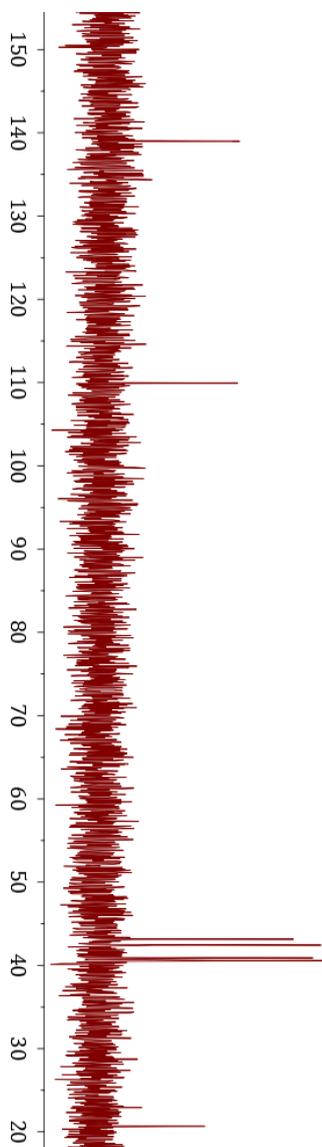
Annex A.4. ^1H - ^{13}C NMR HSCQ spectrum of L1 in D_2O .



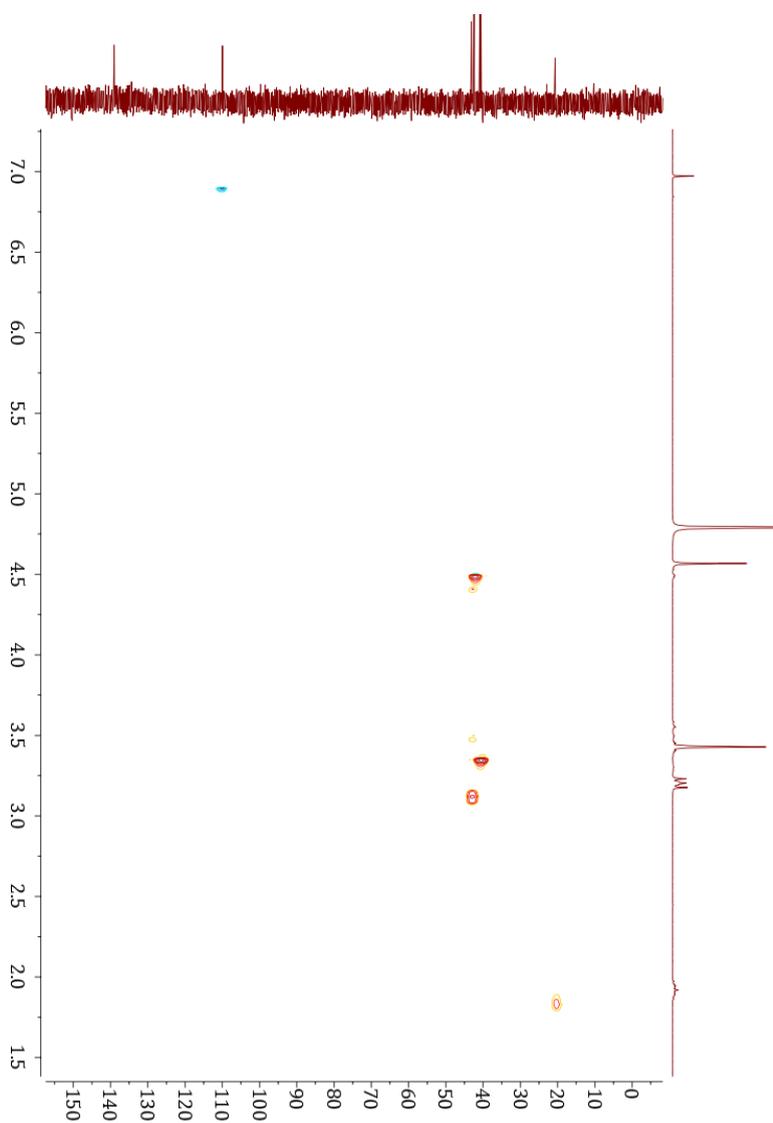
Annex A.5. ^1H NMR spectrum of L2 in D_2O .



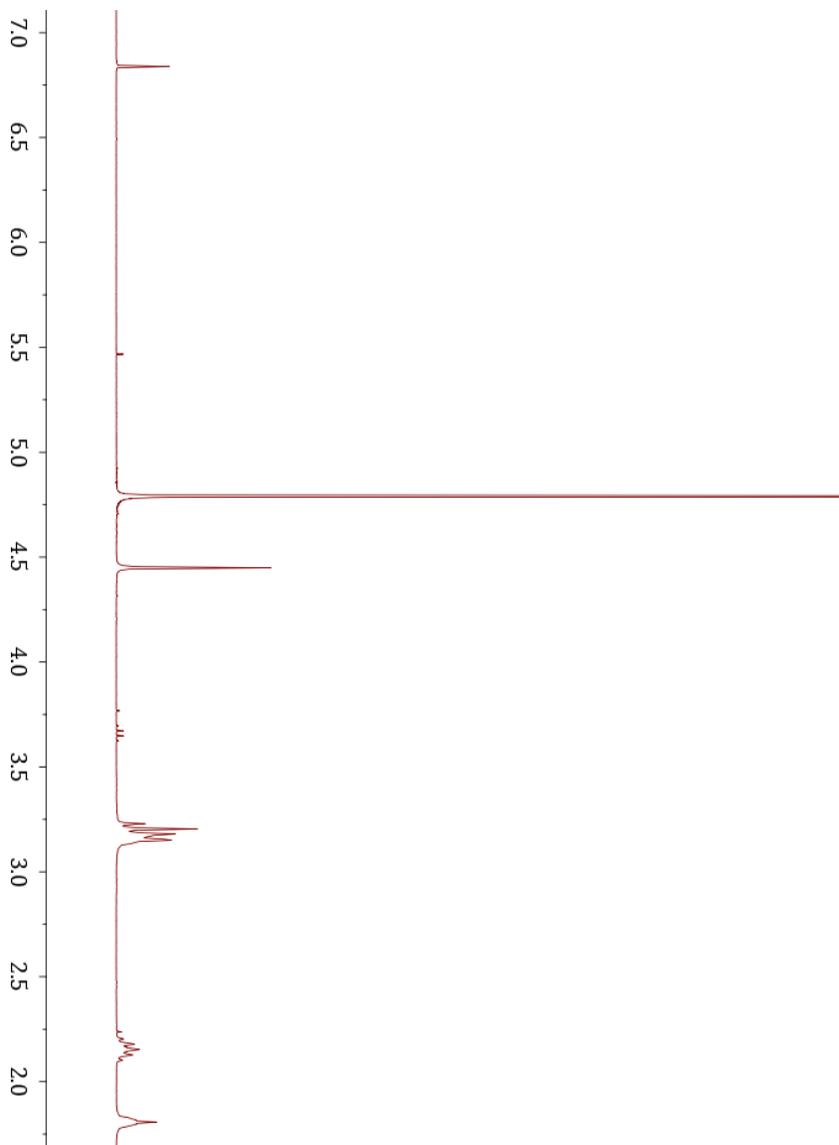
Annex A.6. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of L2 in D₂O.



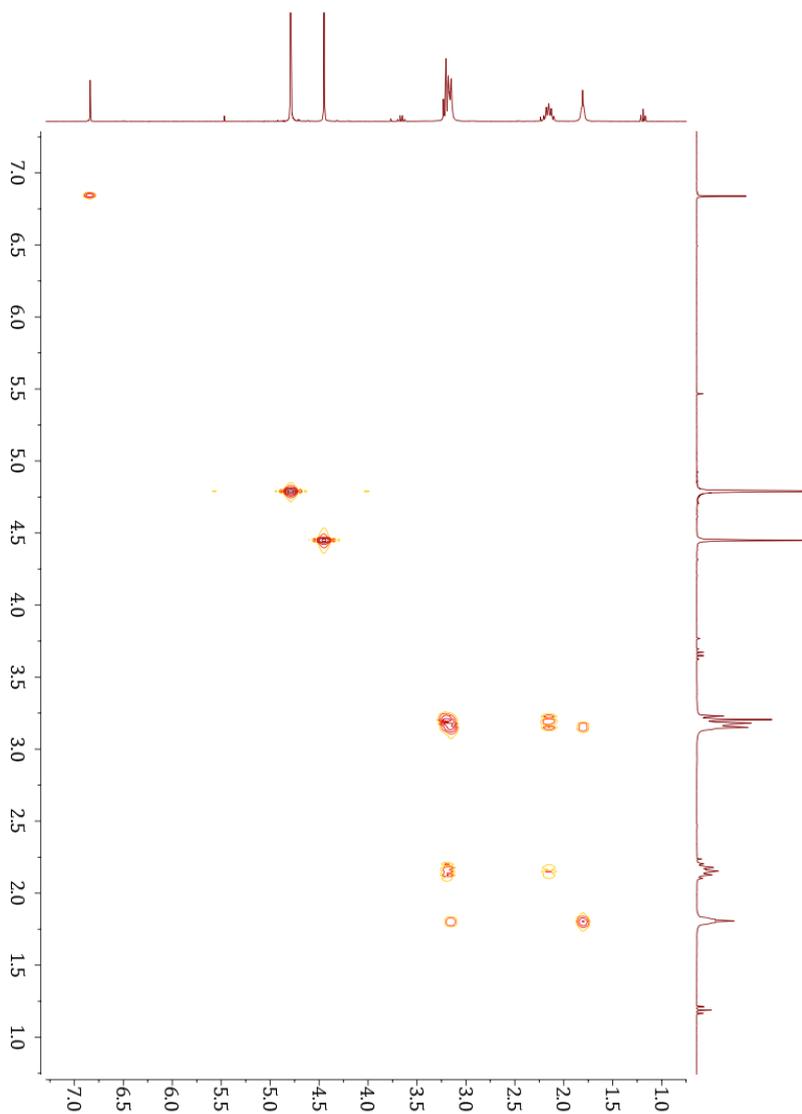
Annex A.7. ^{13}C NMR spectrum of L2 in D_2O .



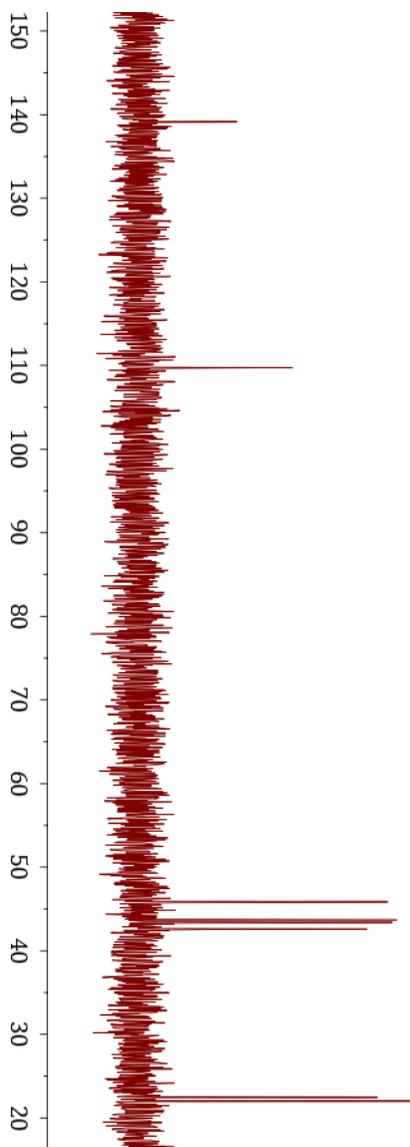
Annex A.8. ^1H - ^{13}C NMR HSCQ spectrum of L2 in D_2O .



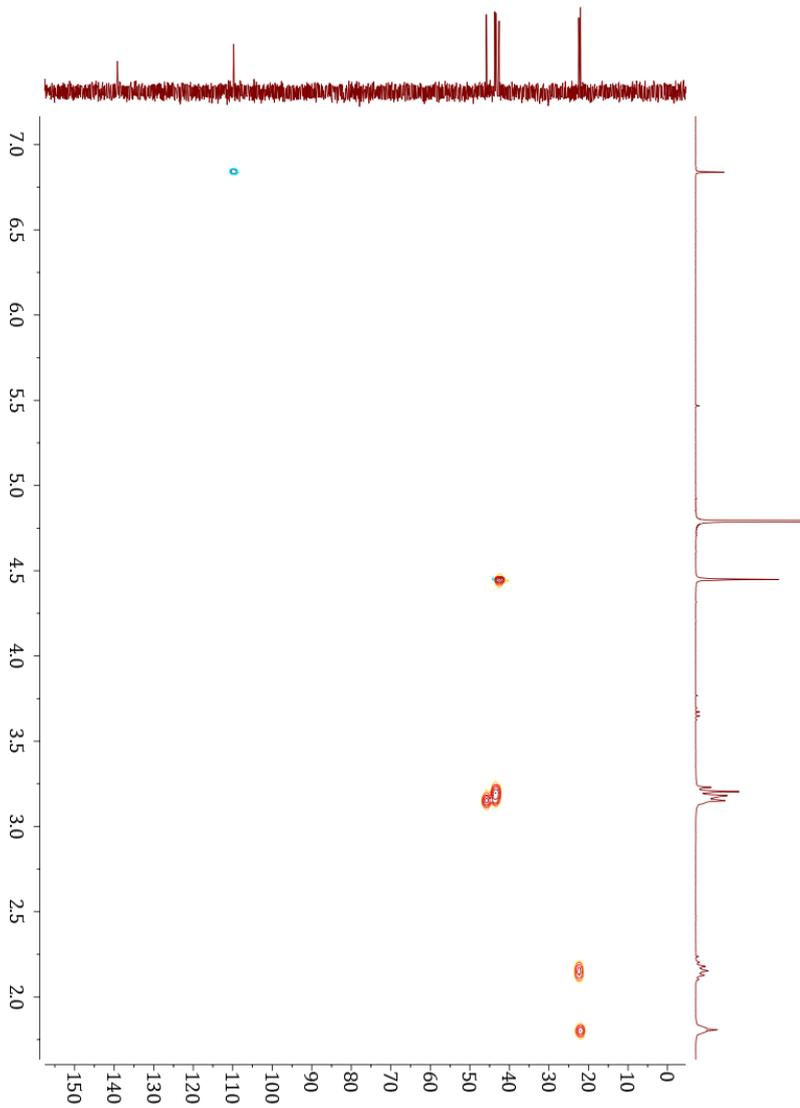
Annex A.9. ^1H NMR spectrum of L3 in D_2O .



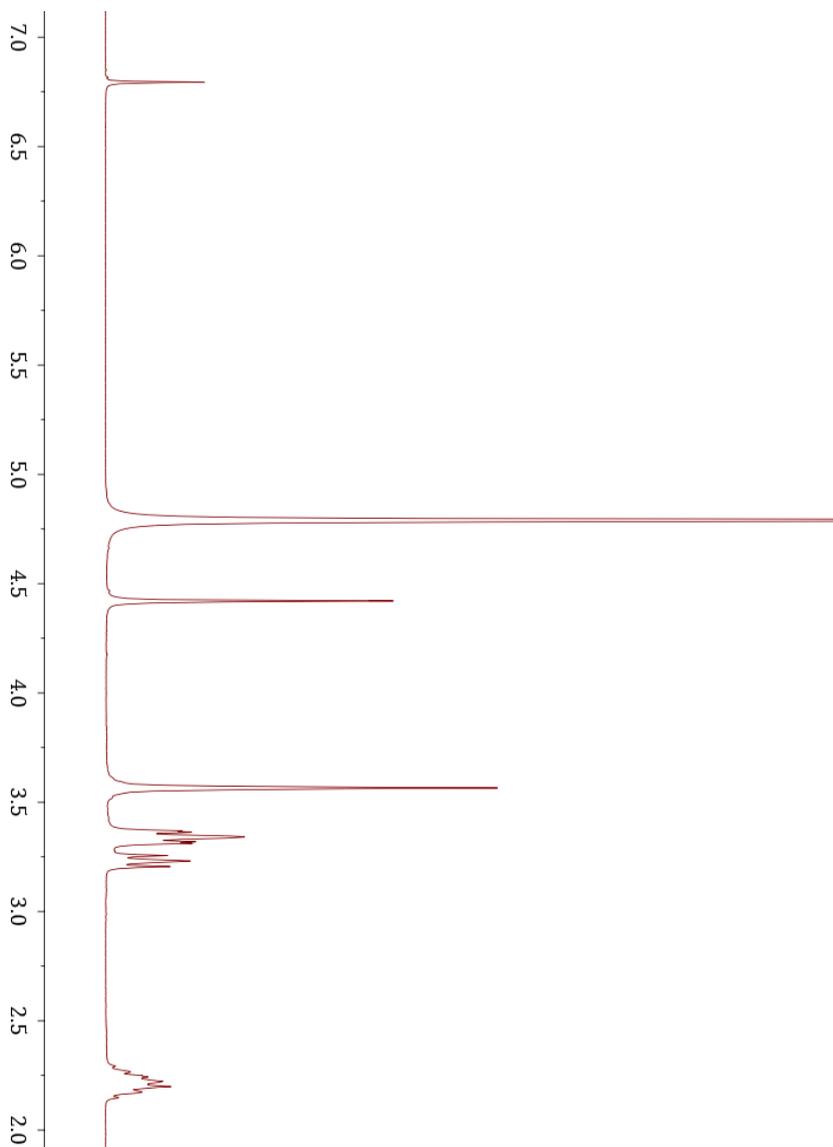
Annex A.10. ^1H - ^1H NMR COSY spectrum of **L3** in D_2O .



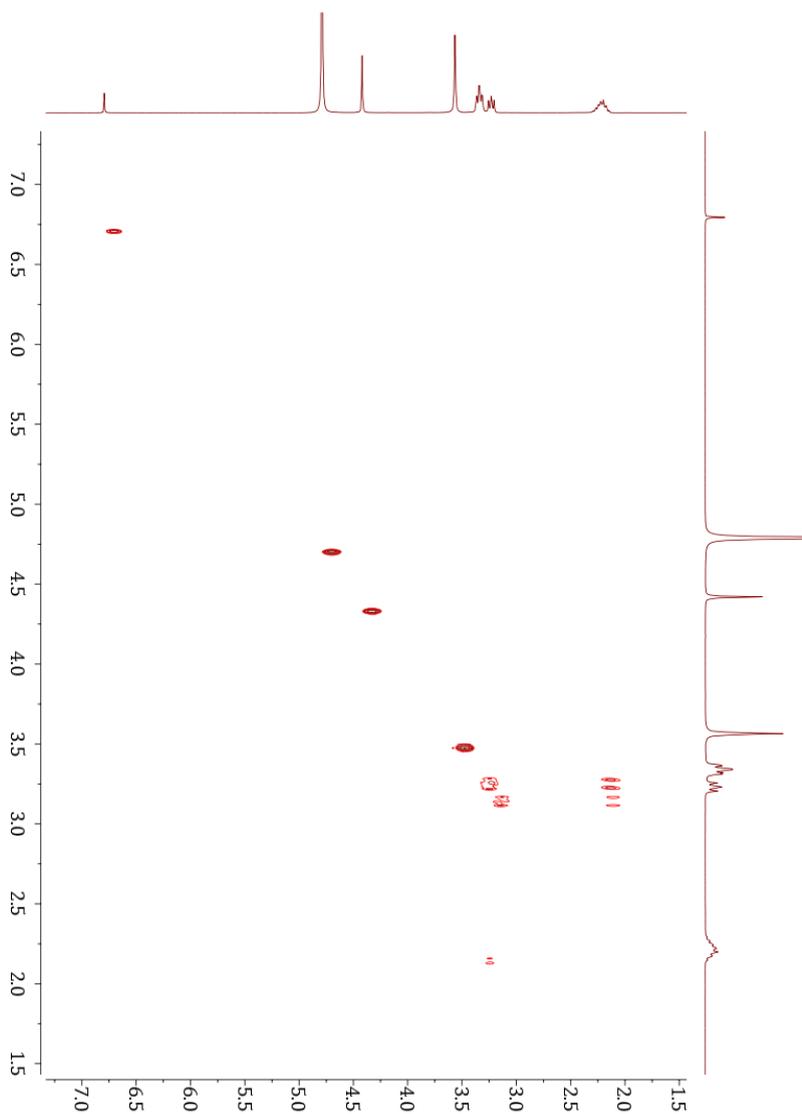
Annex A.11. ^{13}C NMR spectrum of L3 in D_2O .



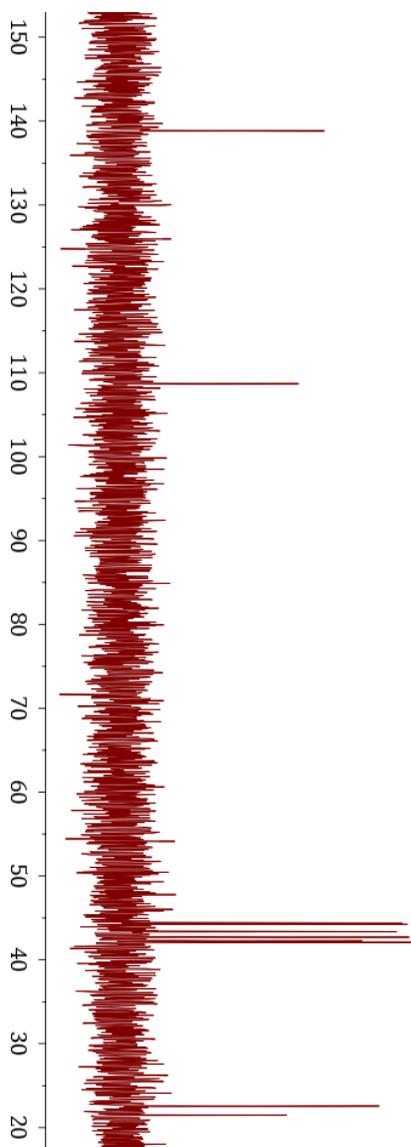
Annex A.12. ^1H - ^{13}C NMR HSCQ spectrum of L3 in D_2O .



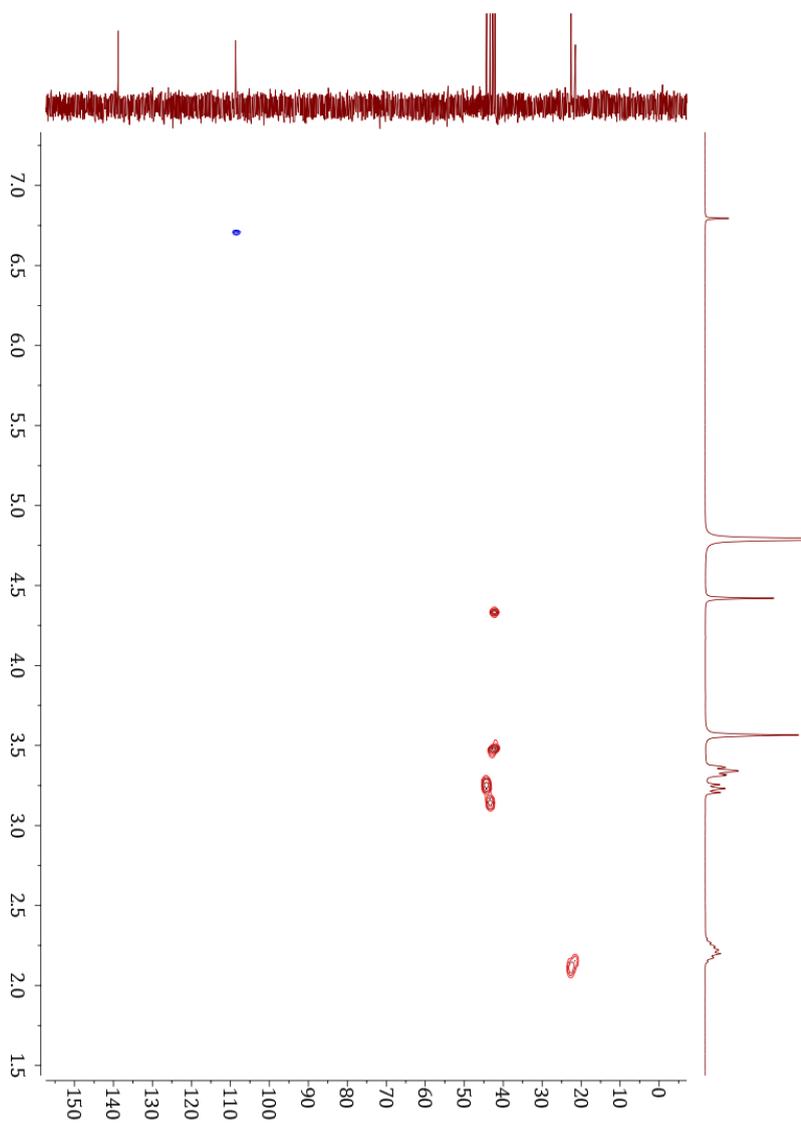
Annex A.13. ^1H NMR spectrum of L4 in D_2O .



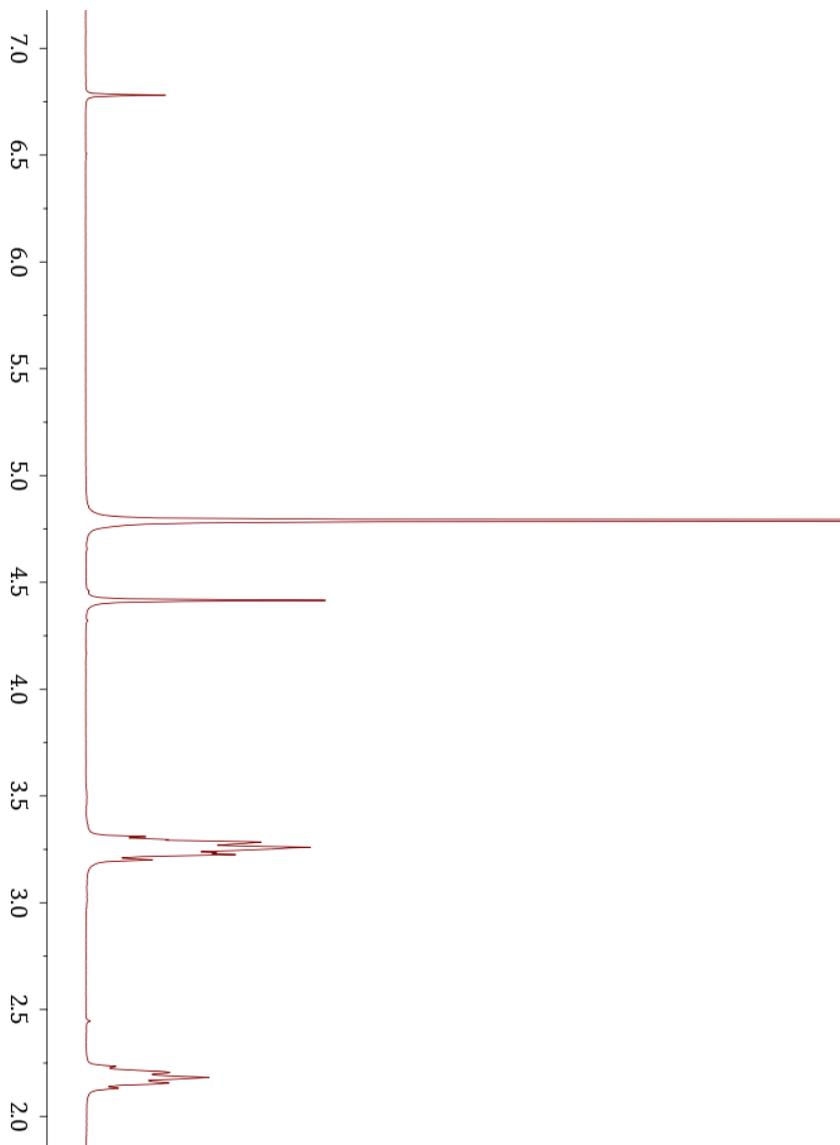
Annex A.14. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of **L4** in D₂O.



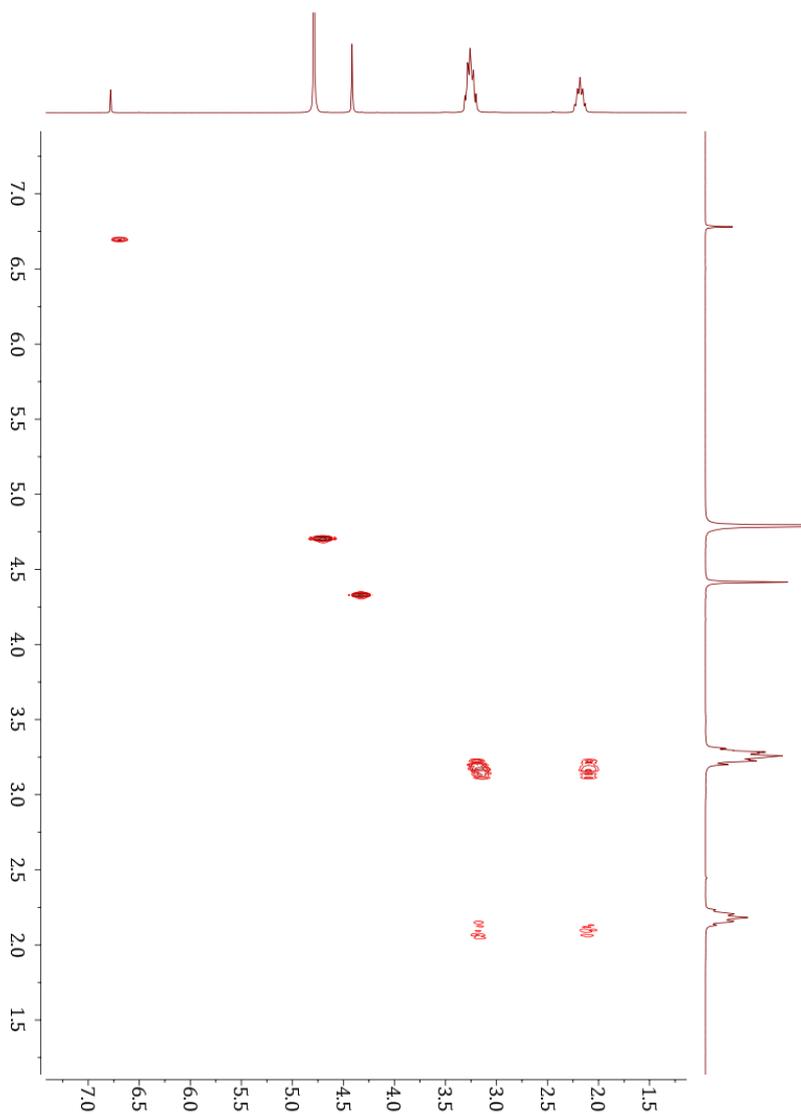
Annex A.15. ^{13}C NMR spectrum of L4 in D_2O .



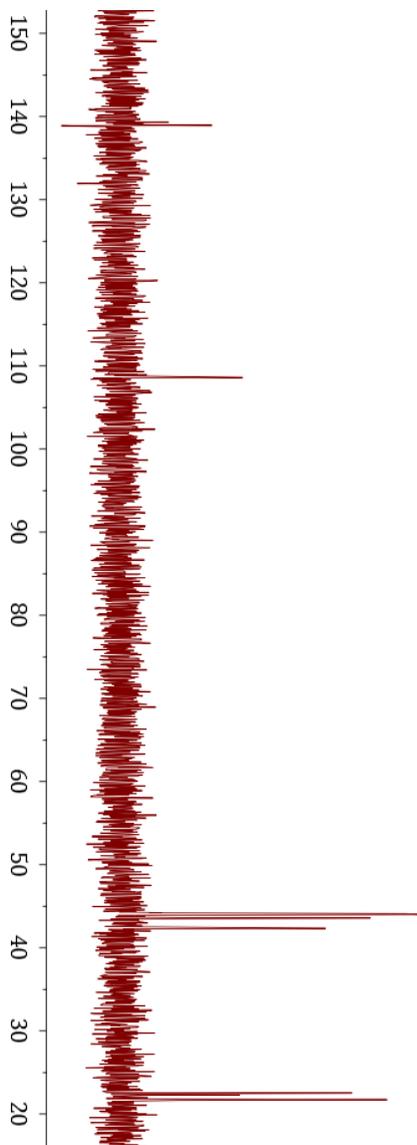
Annex A.16. ^1H - ^{13}C NMR HSCQ spectrum of L4 in D_2O .



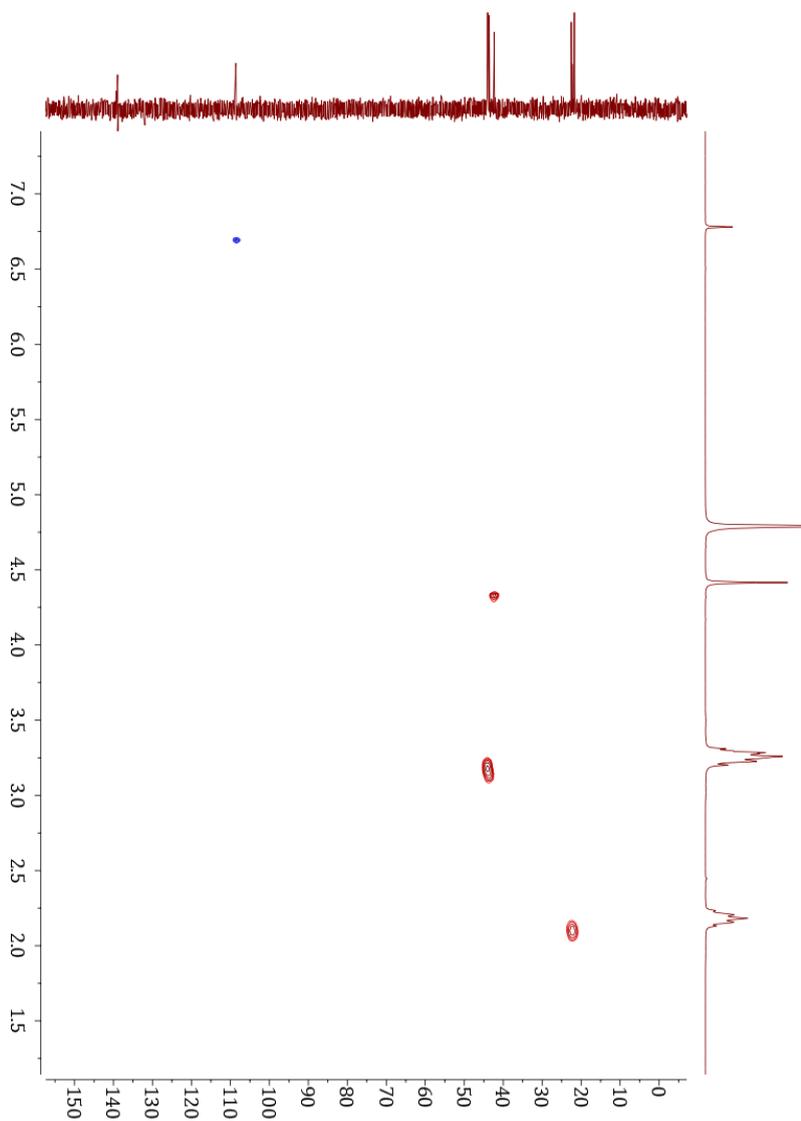
Annex A.17. ^1H NMR spectrum of L5 in D_2O .



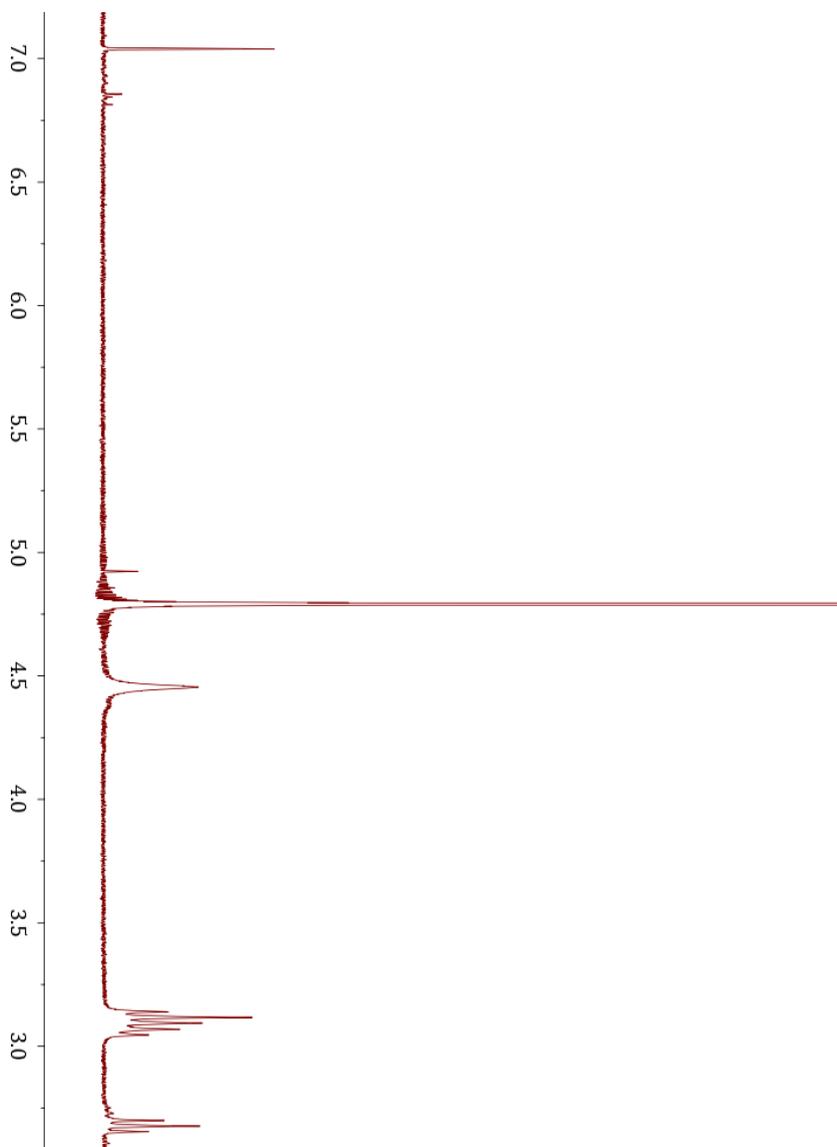
Annex A.18. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of L5 in D₂O.



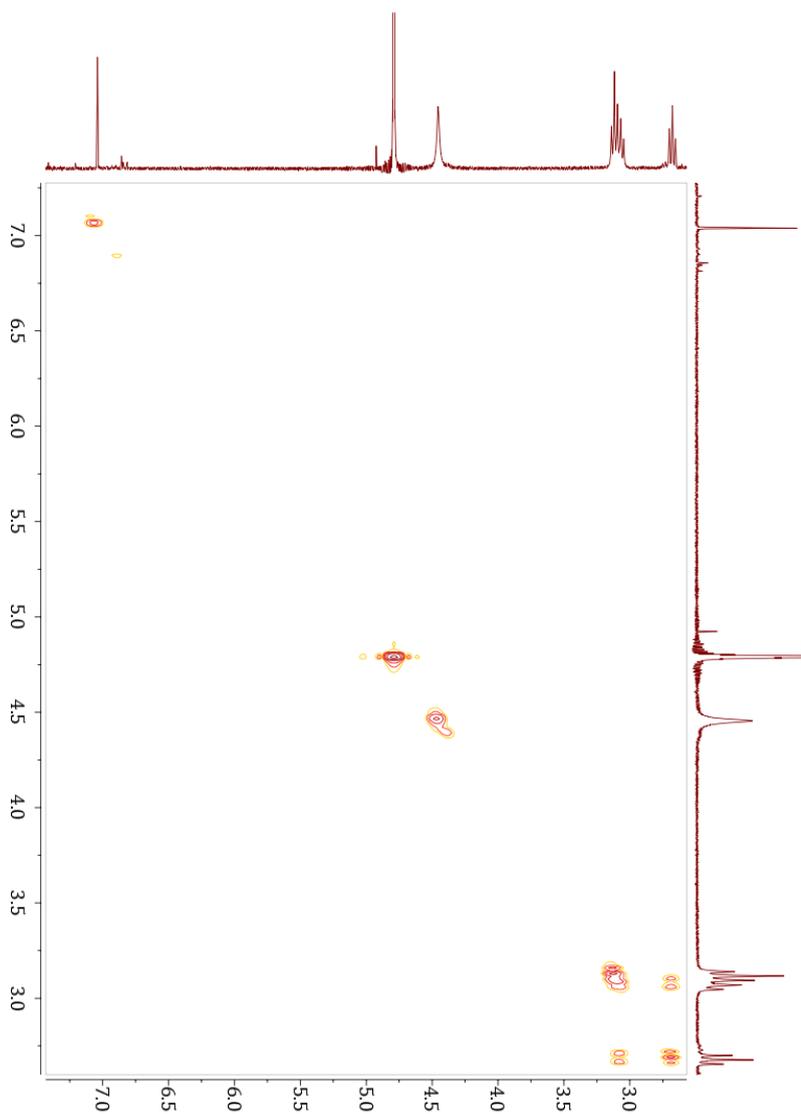
Annex A.19. ^{13}C NMR spectrum of L5 in D_2O .



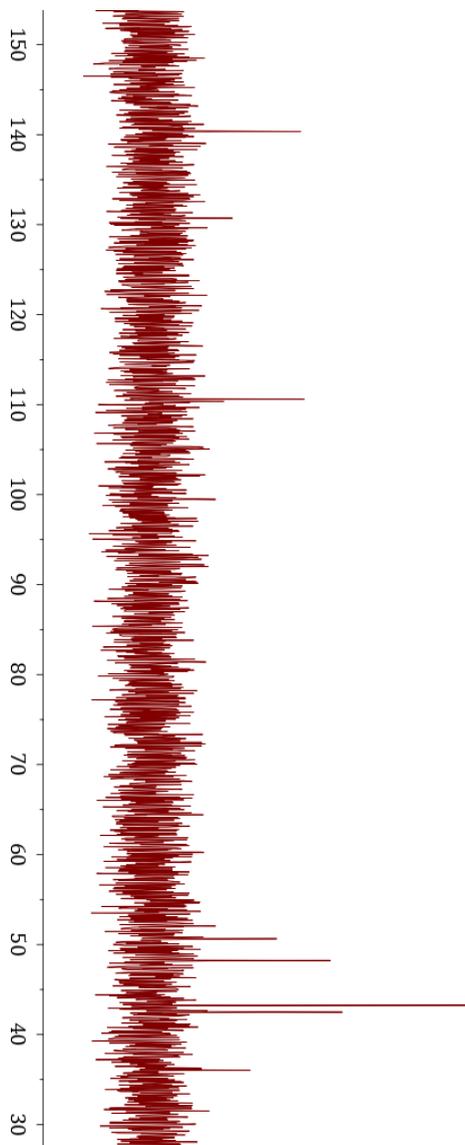
Annex A.20. ¹H-¹³C NMR HSCQ spectrum of L5 in D₂O.



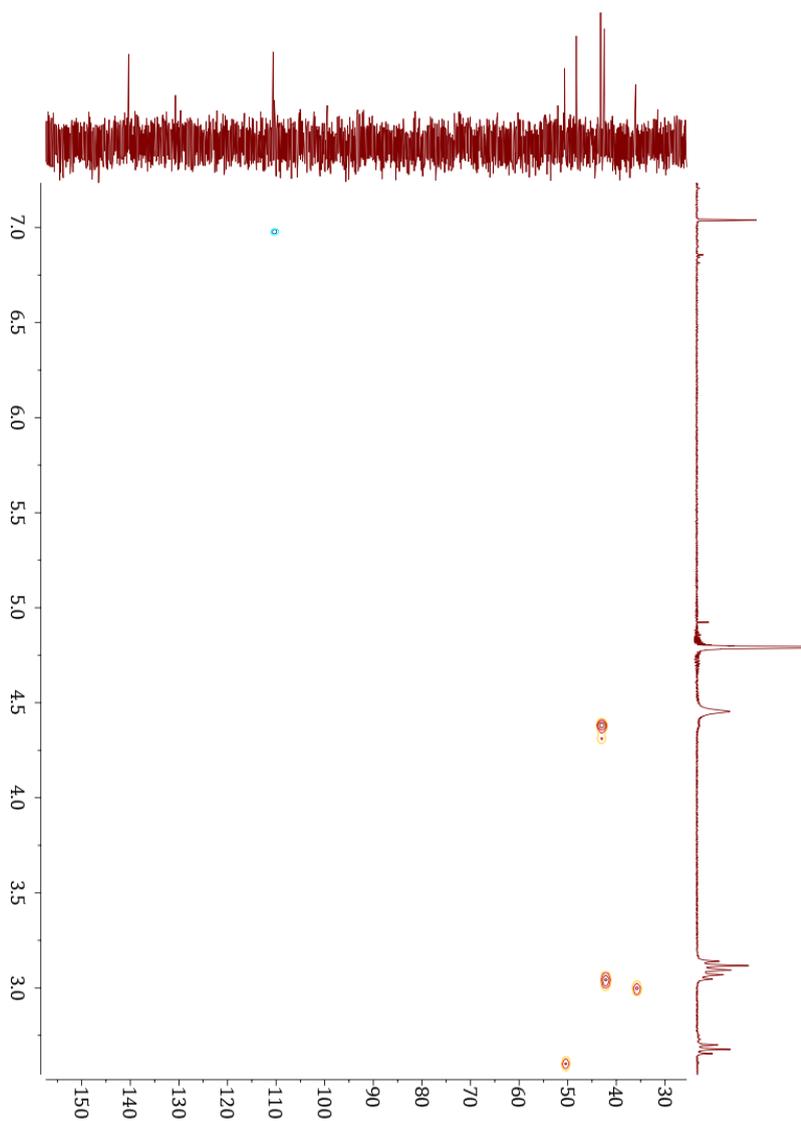
Annex A.21. ^1H NMR spectrum of **L6** in D_2O .



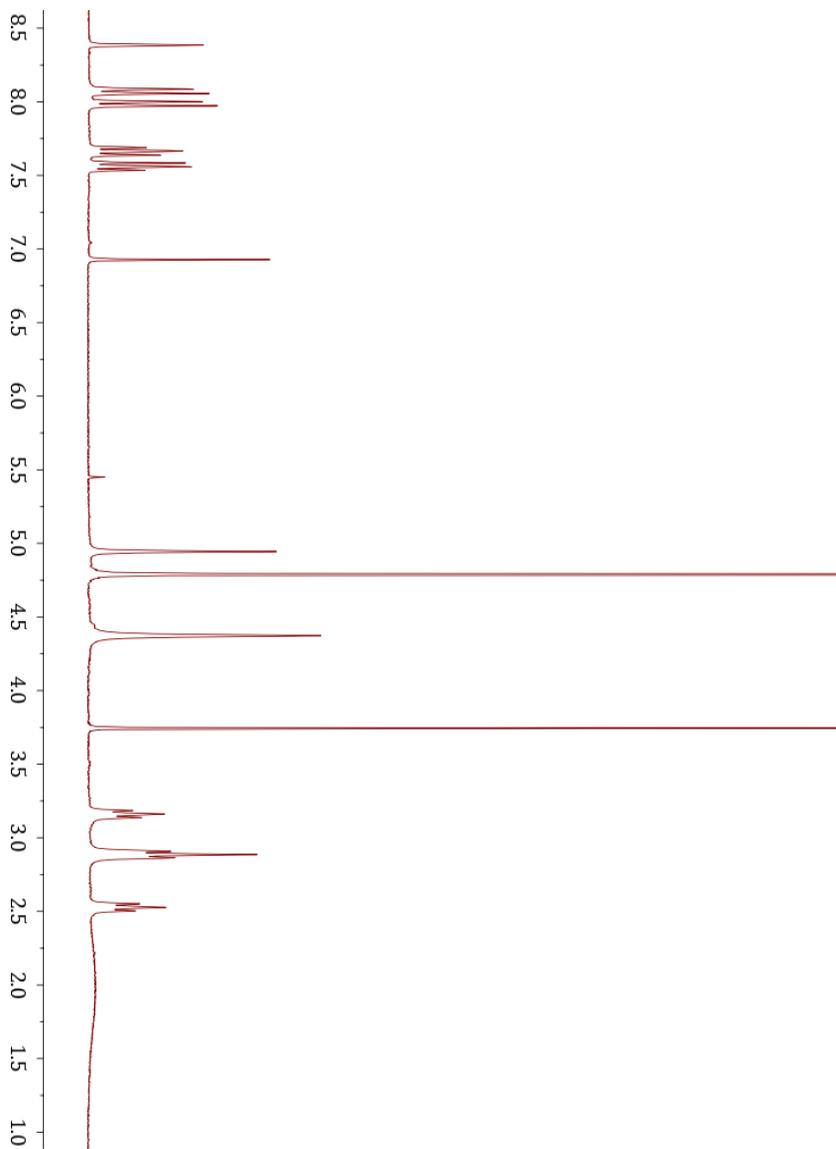
Annex A.22. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of L6 in D₂O.



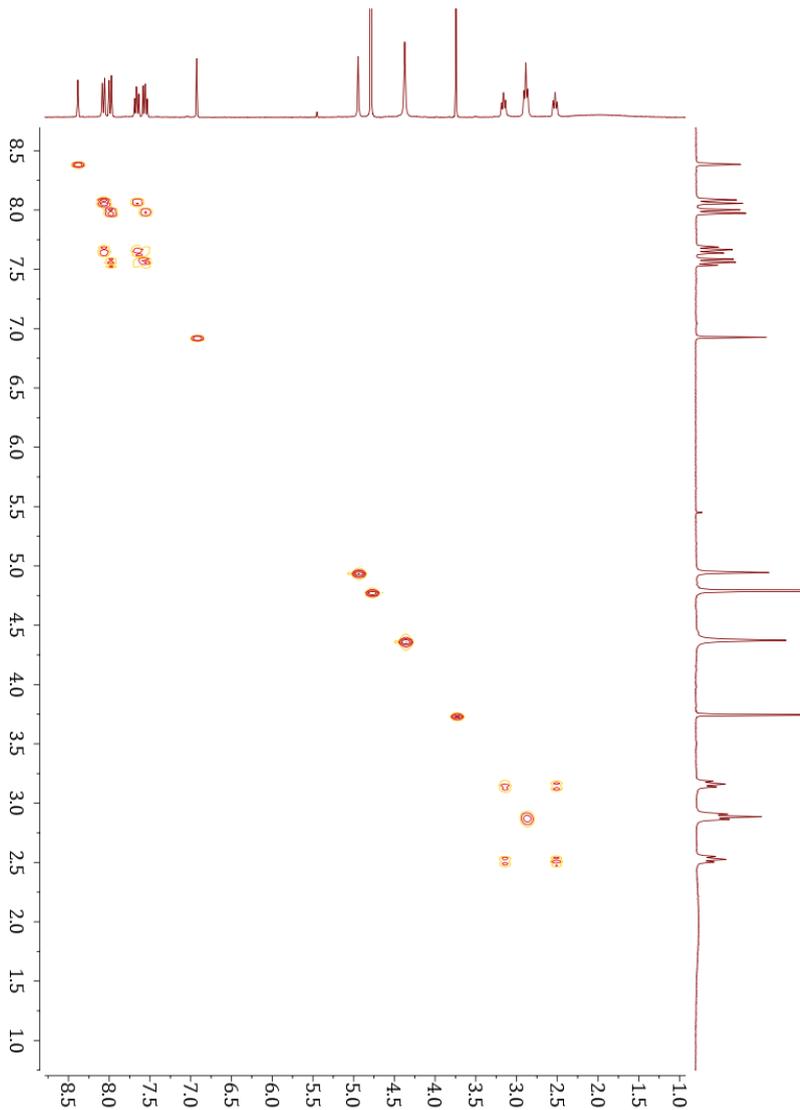
Annex A.23. ^{13}C NMR spectrum of L6 in D_2O .



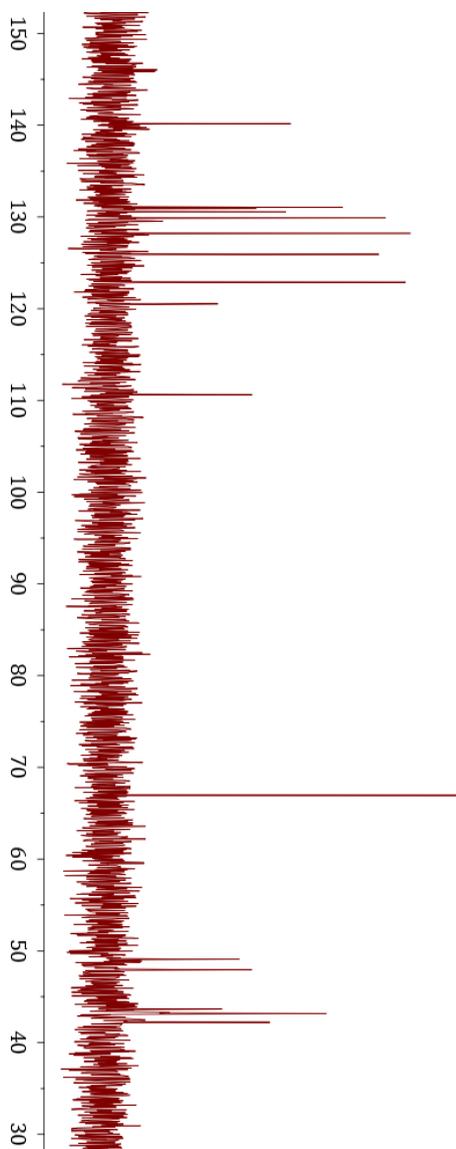
Annex A.24. ^1H - ^{13}C NMR HSCQ spectrum of **L6** in D_2O .



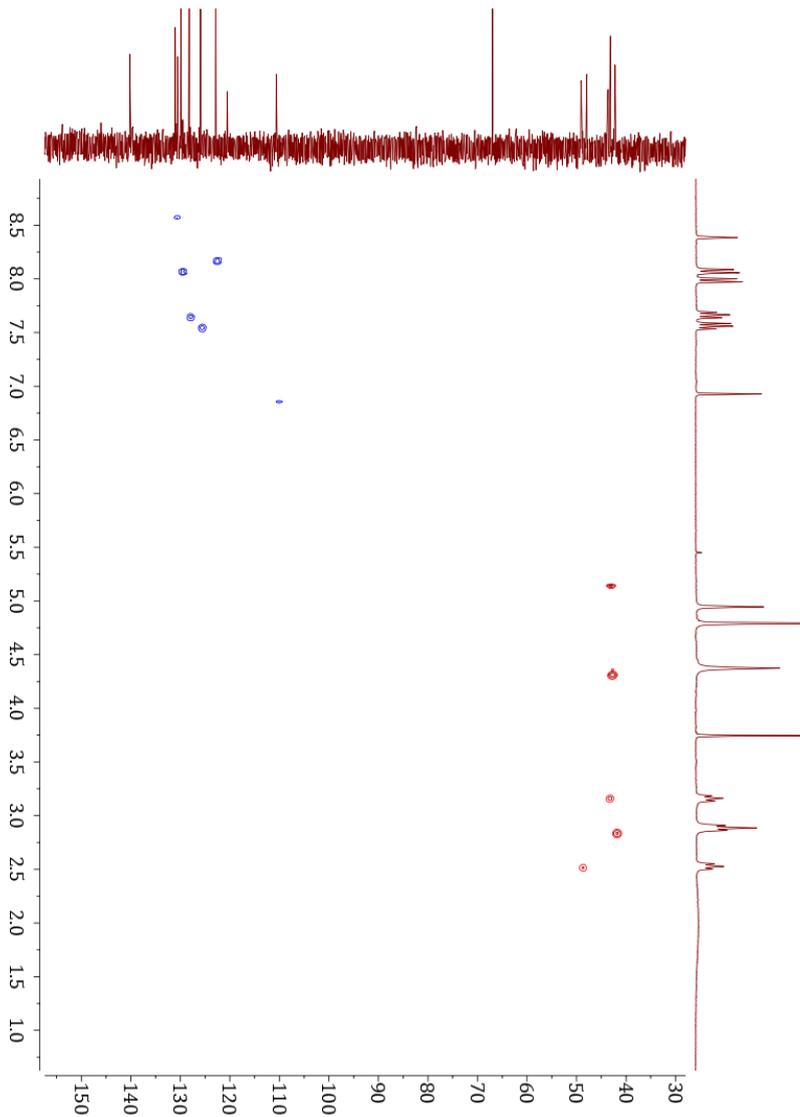
Annex A.25. ^1H NMR spectrum of **L7** in D_2O .



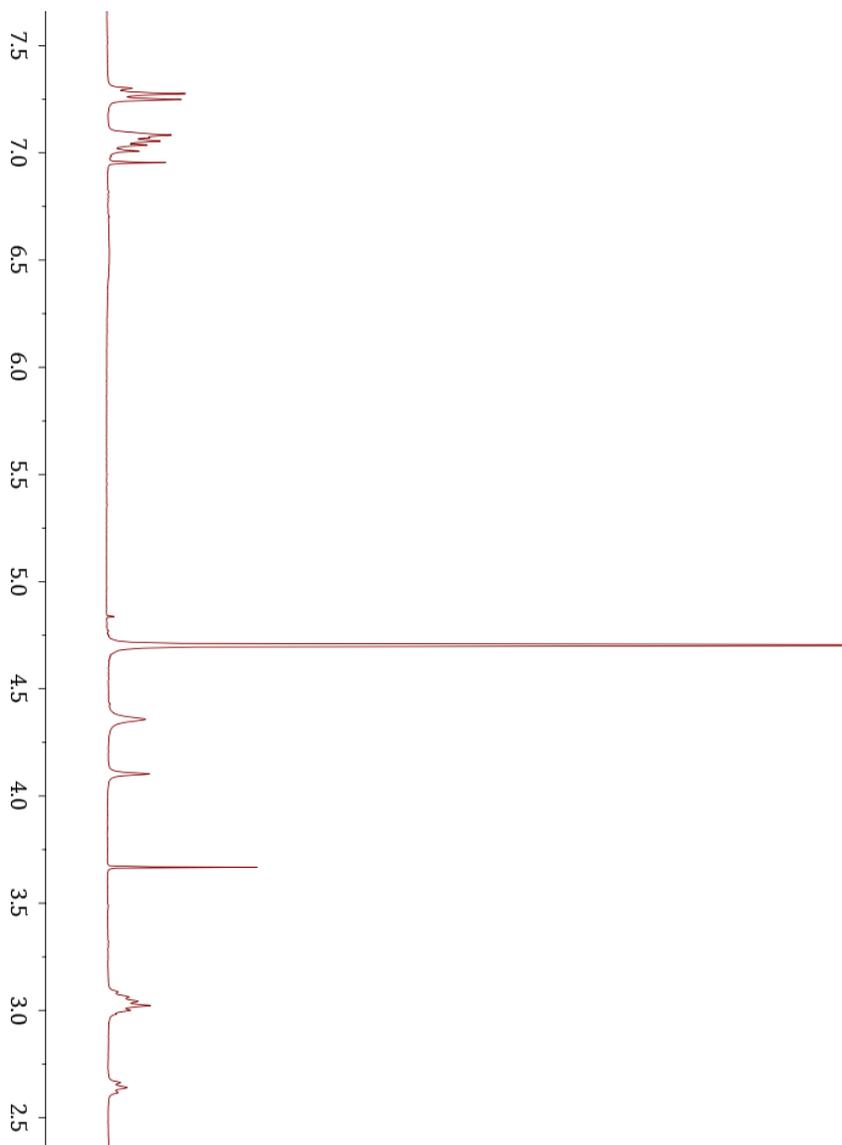
Annex A.26. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of L7 in D₂O.



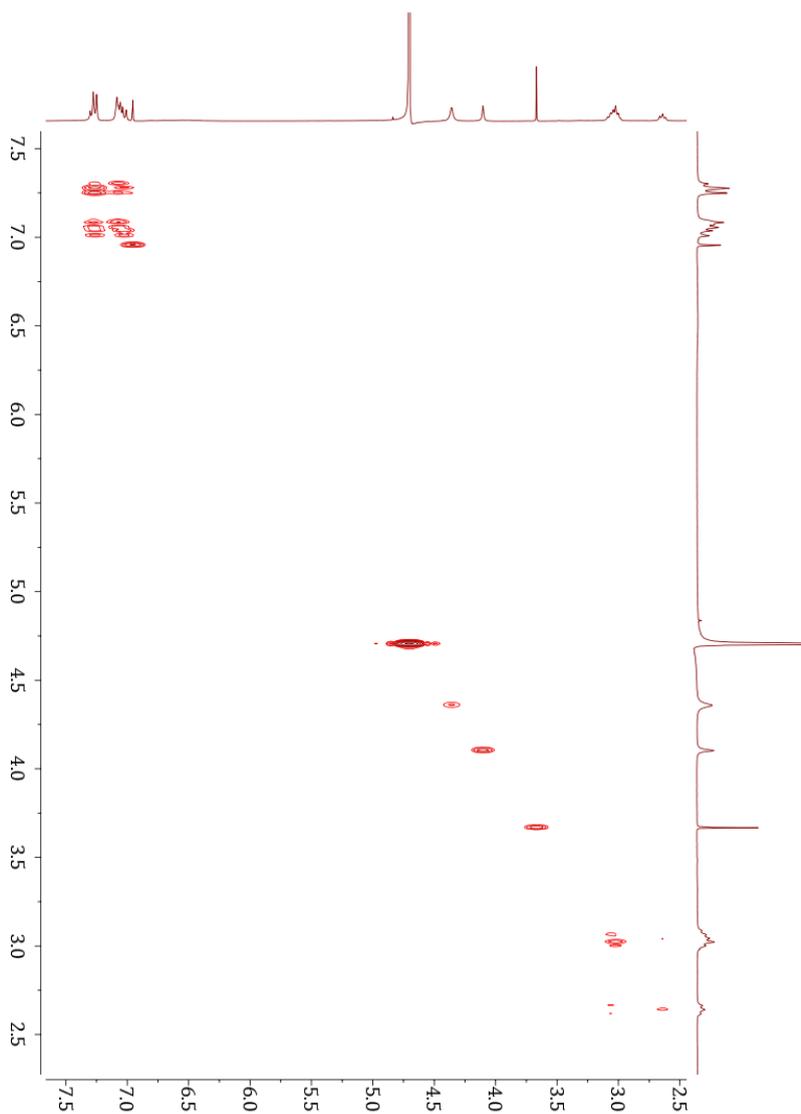
Annex A.27. ^{13}C NMR spectrum of L7 in D_2O .



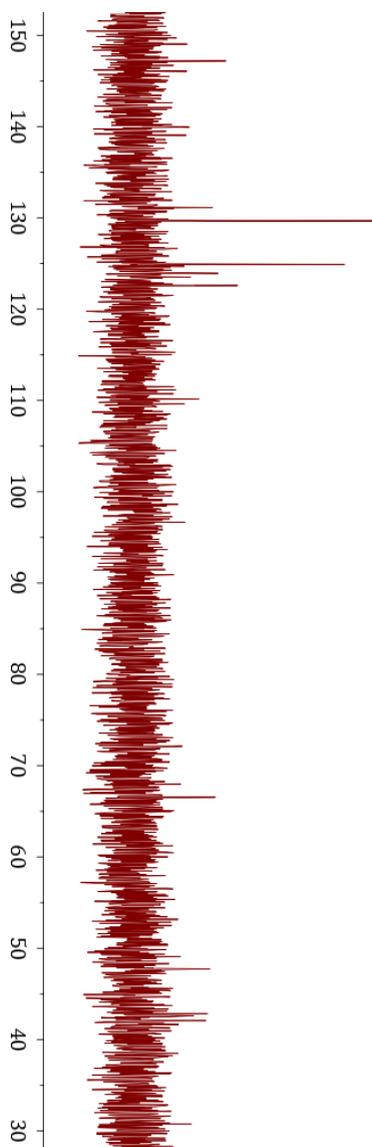
Annex A.28. ¹H-¹³C NMR HSCQ spectrum of L7 in D₂O.



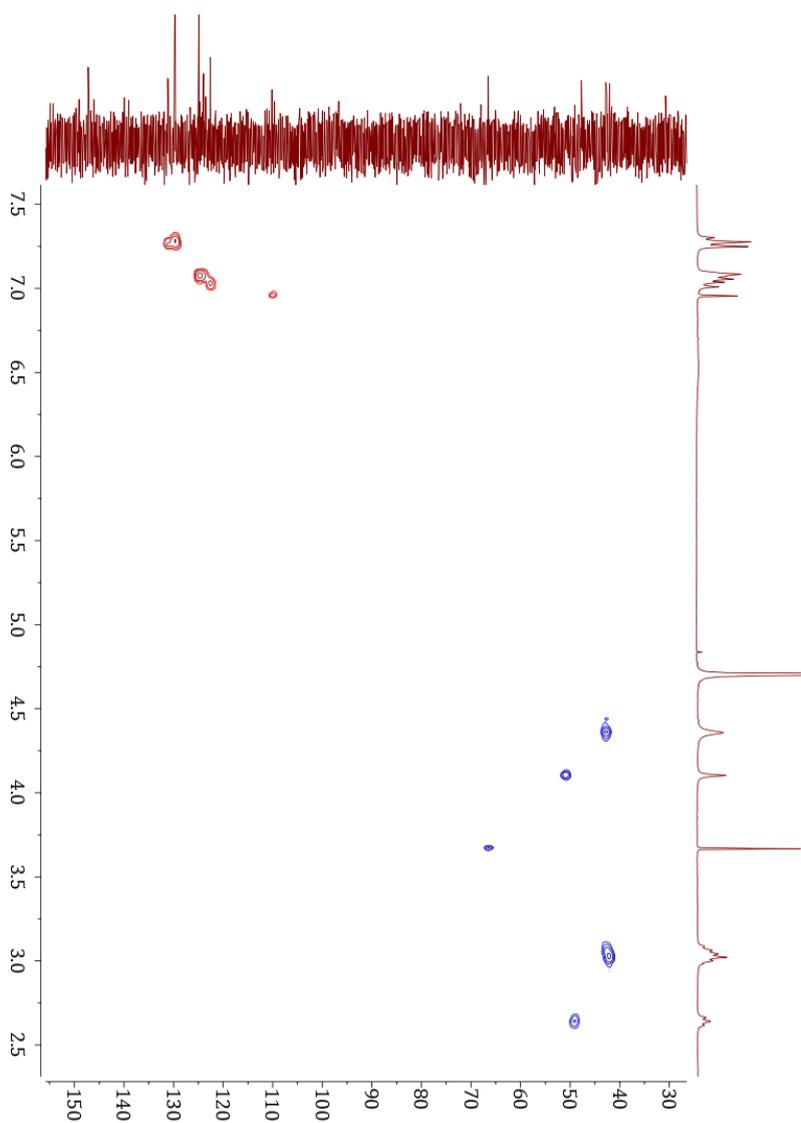
Annex A.29. ^1H NMR spectrum of **L8** in D_2O .



Annex A.30. ¹H-¹H NMR COSY spectrum of **L8** in D₂O.



Annex A.31. ^{13}C NMR spectrum of **L8** in D_2O .

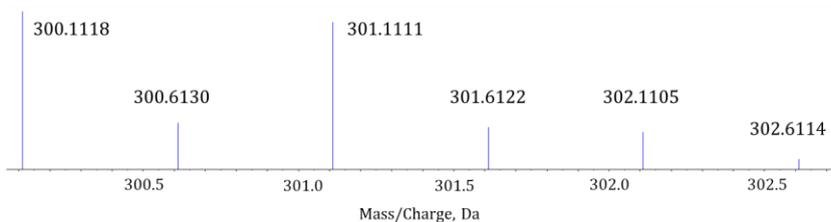
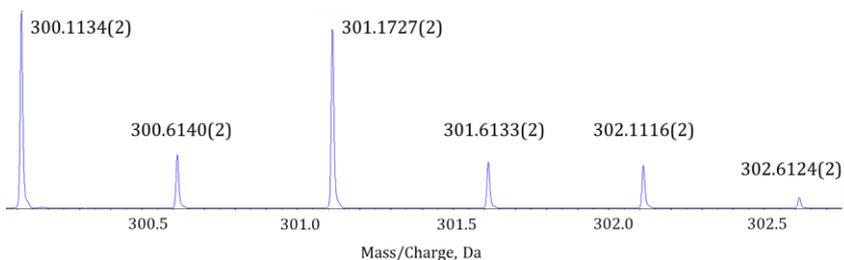


Annex A.32. ^1H - ^{13}C NMR HSCQ spectrum of **L8** in D_2O .

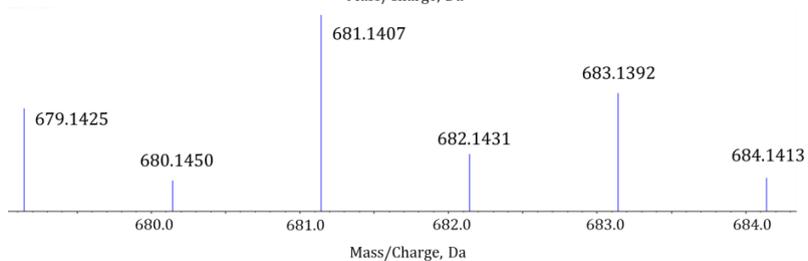
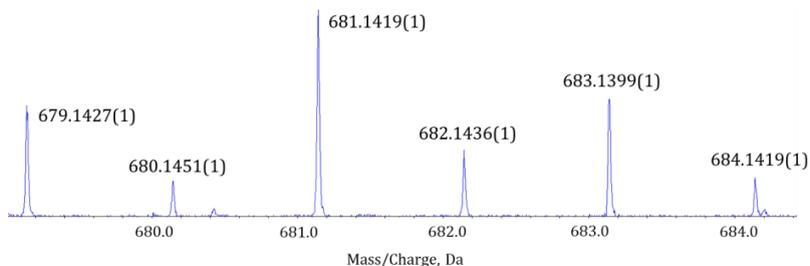
Anexo B

Espectrometría

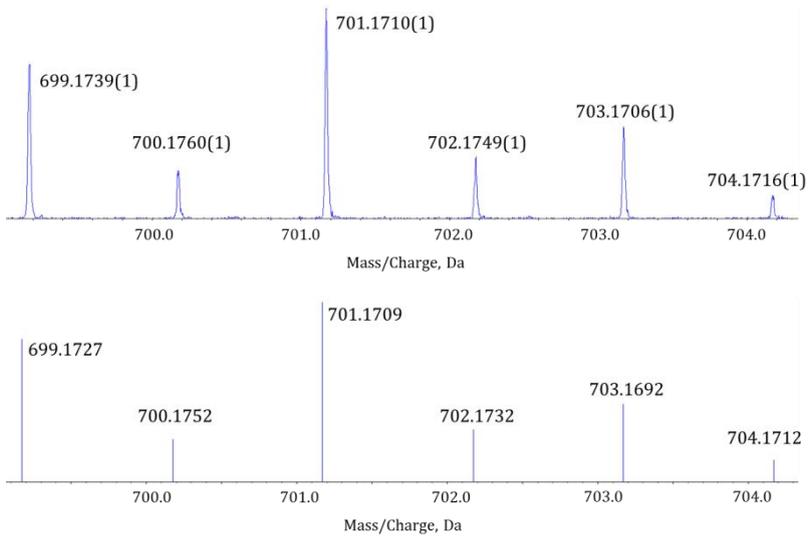
HR-ESI-Masas



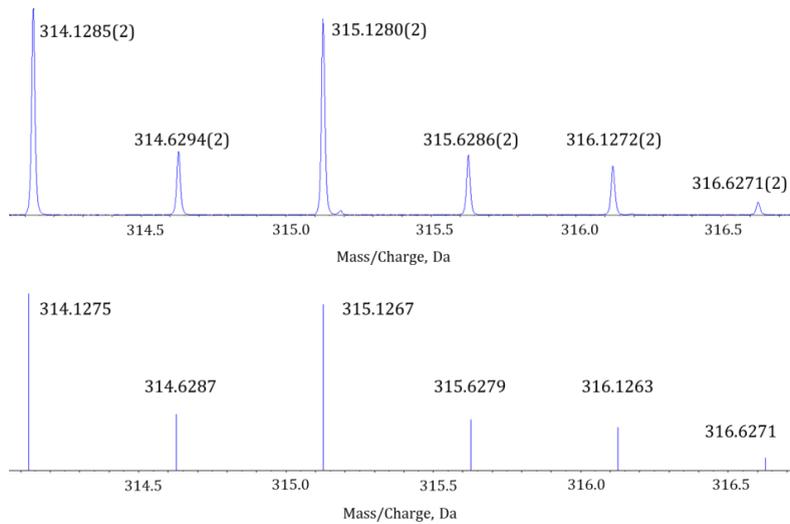
Anexo B.1. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-2L1}_2]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



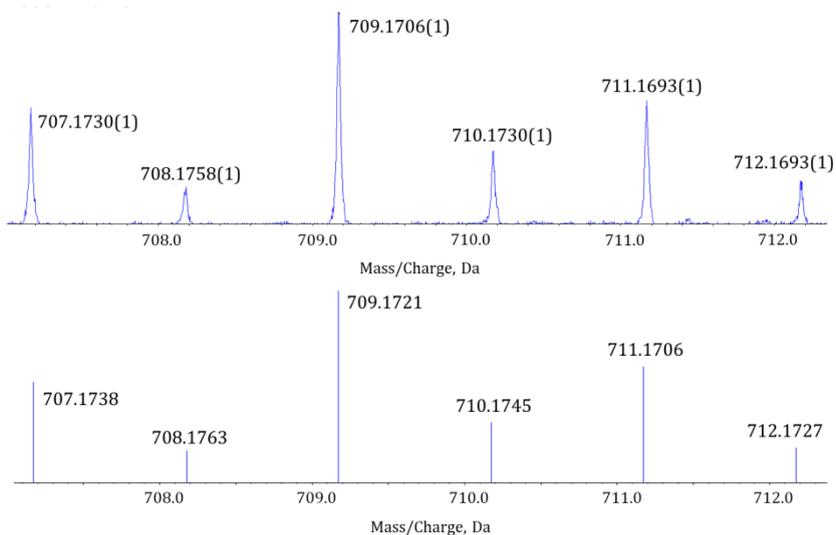
Anexo B.2. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-2L1}_2(\text{Br})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



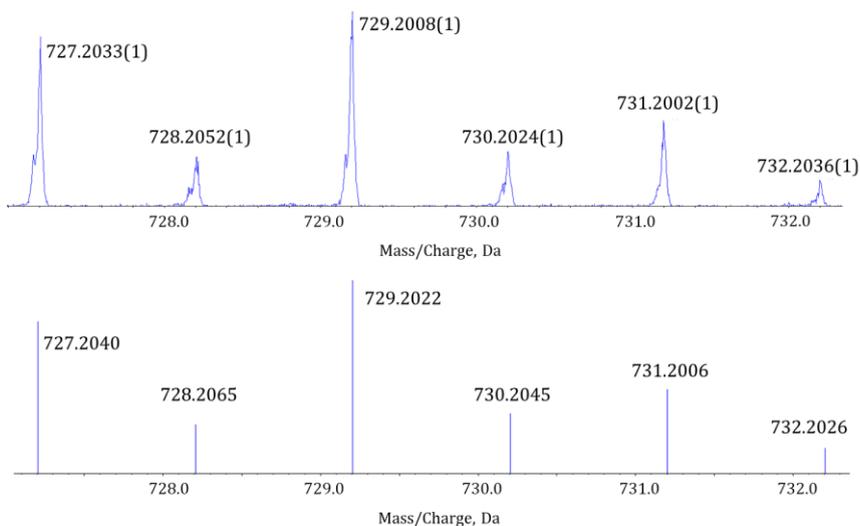
Anexo B.3. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie [Cu₂H-2L1₂(ClO₄)]⁺, en H₂O/CH₃OH (50/50 vol/vol).



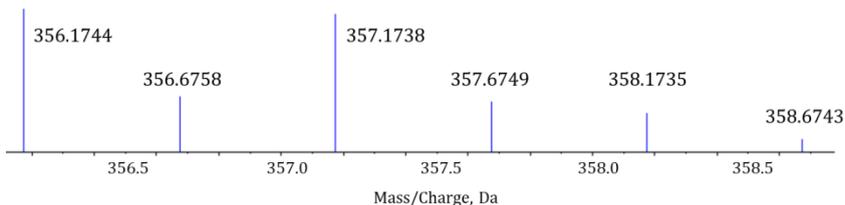
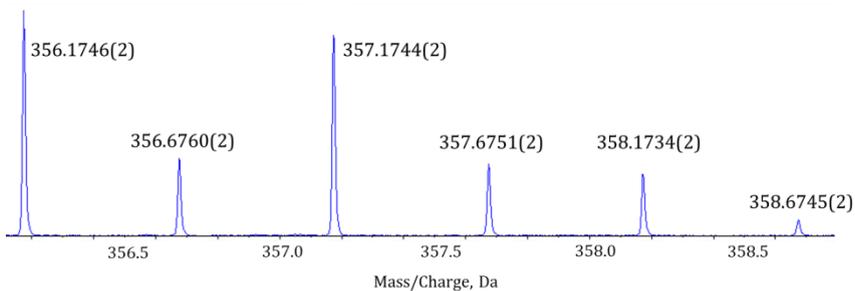
Anexo B.4. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie [Cu₂H-2L2₂]²⁺, en H₂O/CH₃OH (50/50 vol/vol).



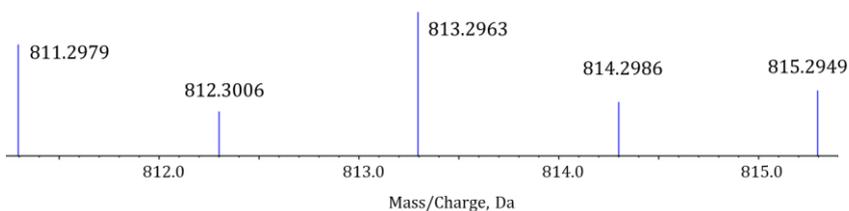
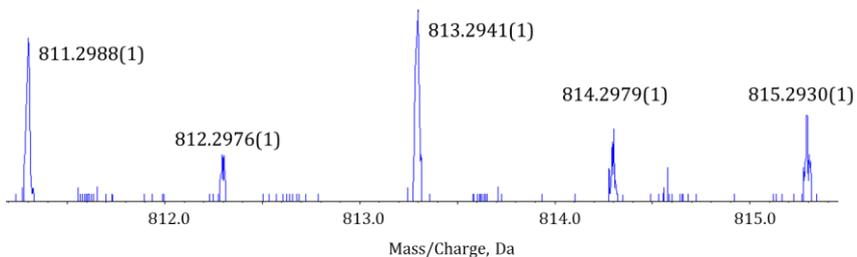
Anexo B.5. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-2L2}_2(\text{Br})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



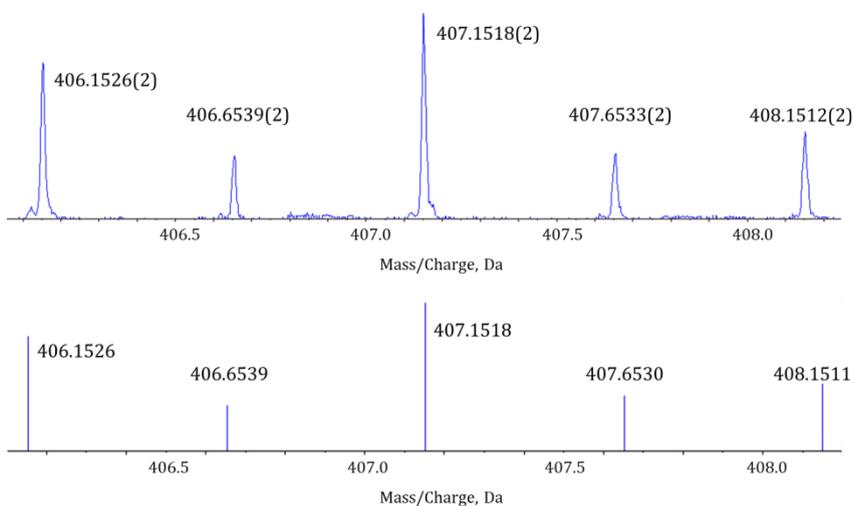
Anexo B.6. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-2L2}_2(\text{ClO}_4)]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



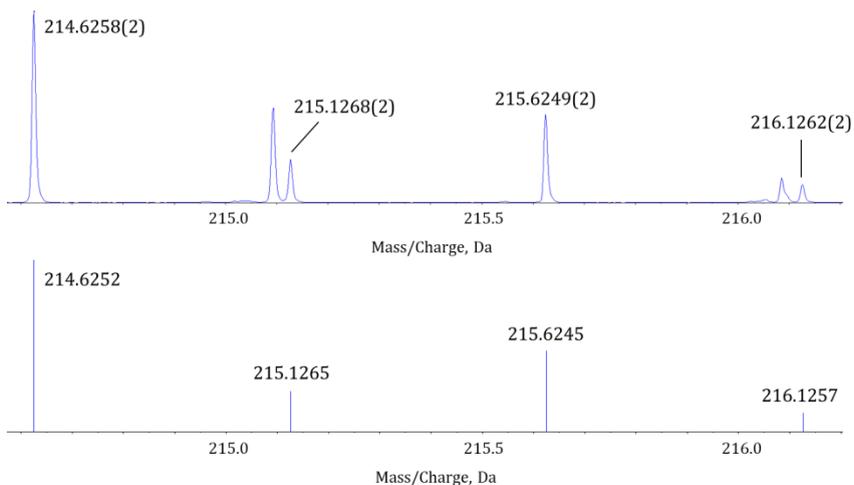
Anexo B.7. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_3]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



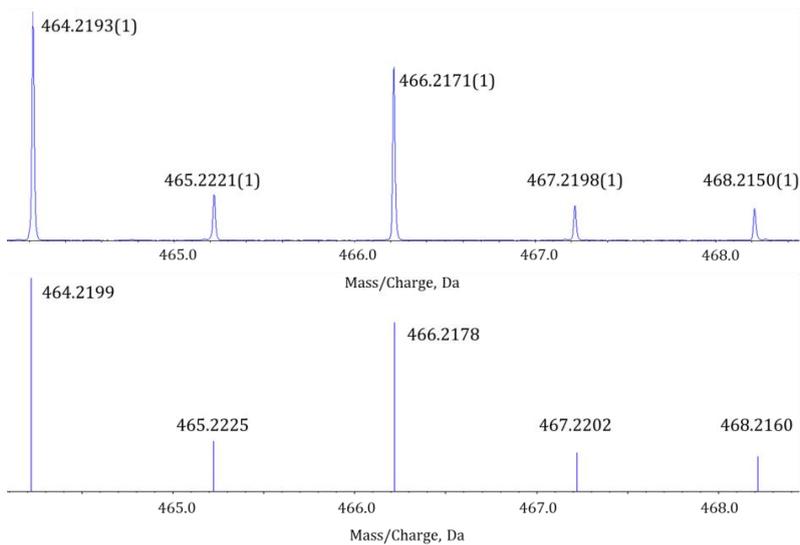
Anexo B.8. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_3(\text{ClO}_4)]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



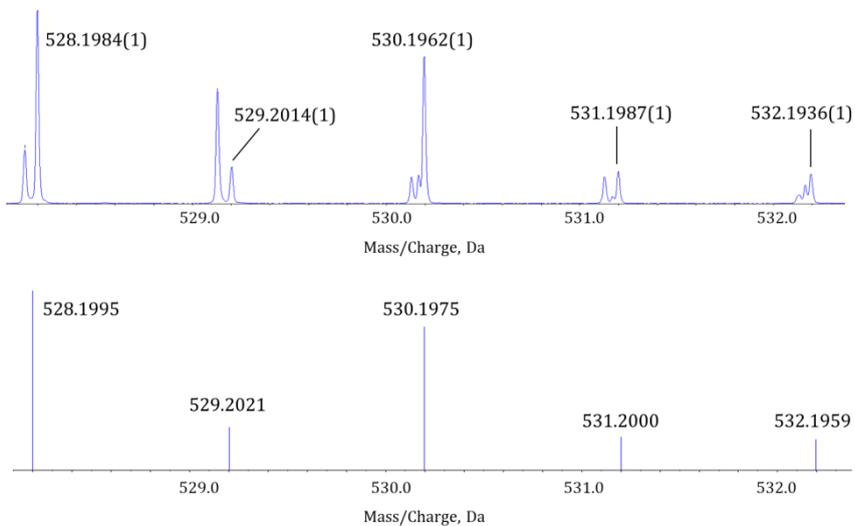
Anexo B.9. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-1L3}_2(\text{ClO}_4)]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



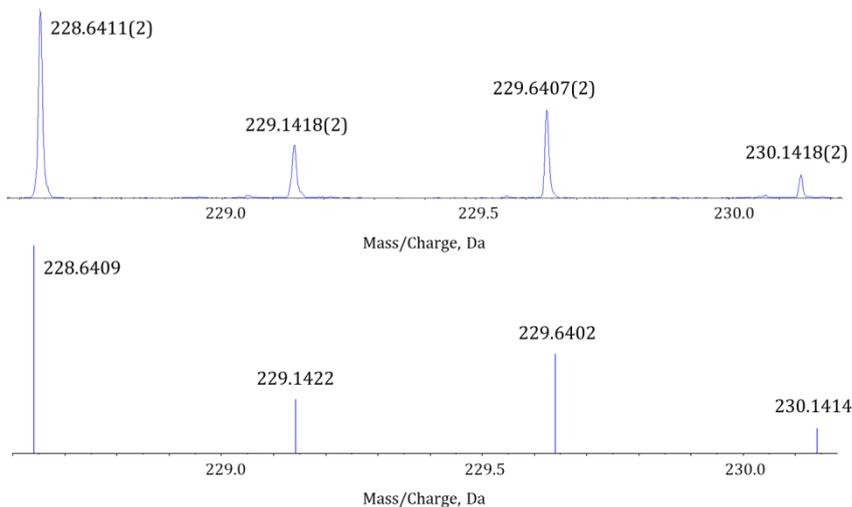
Anexo B.10. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL4}]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



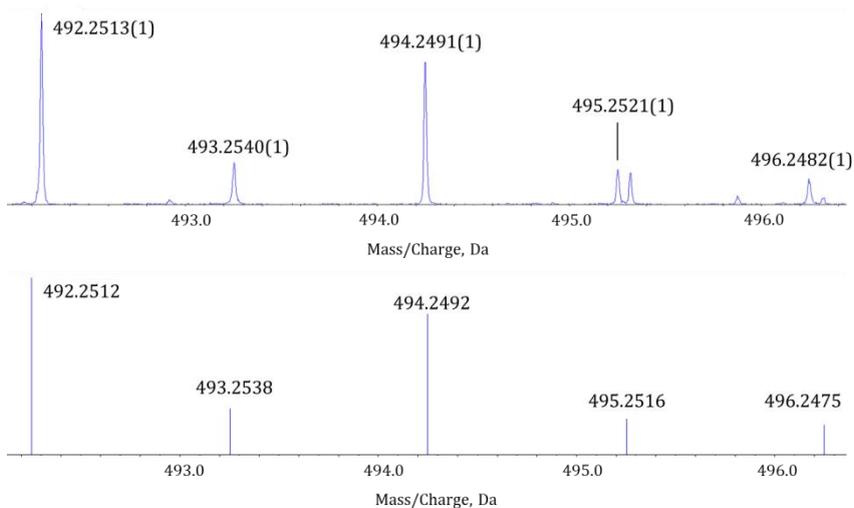
Anexo B.11. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL}_4(\text{Cl})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



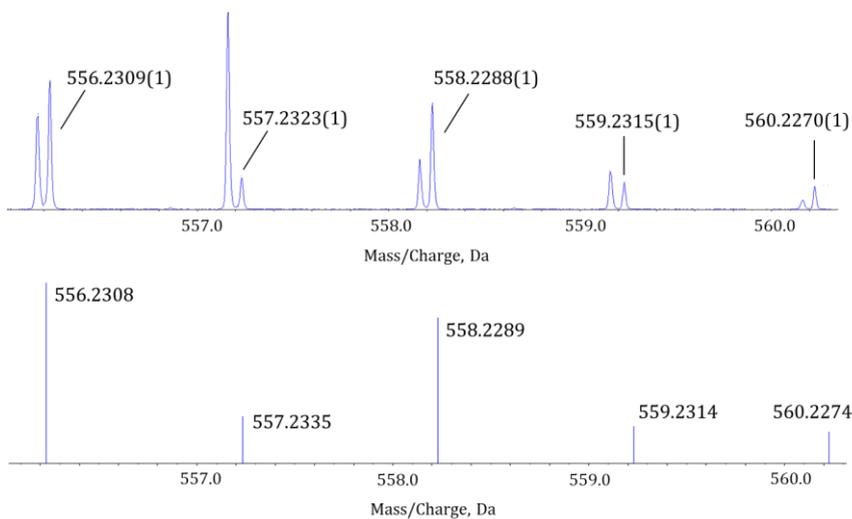
Anexo B.12. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL}_4(\text{ClO}_4)]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



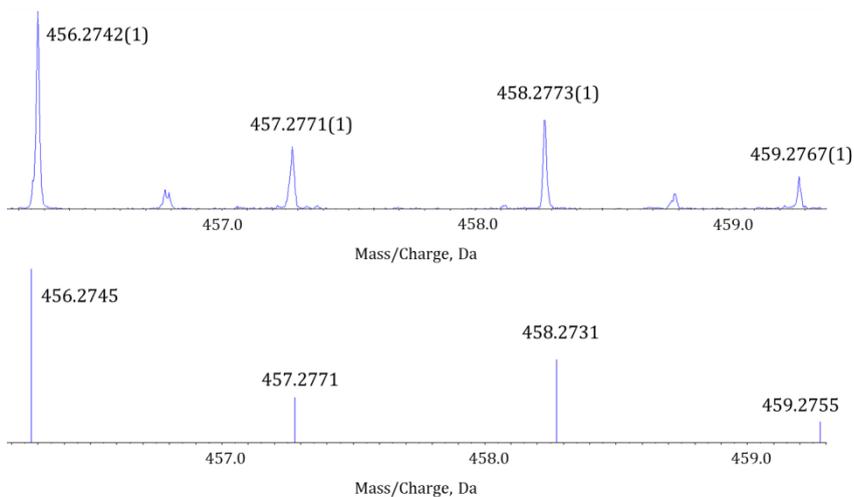
Anexo B.13. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL5}]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



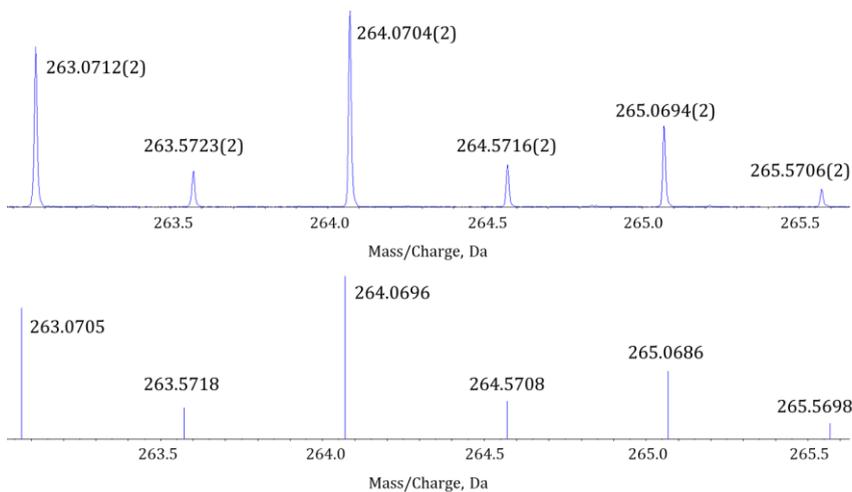
Anexo B.14. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL5}(\text{Cl})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



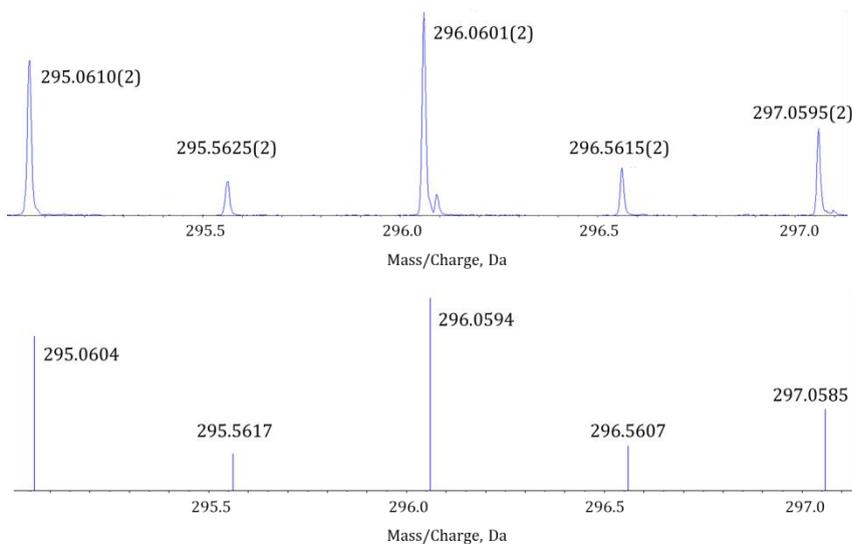
Anexo B.15. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL5}(\text{ClO}_4)]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



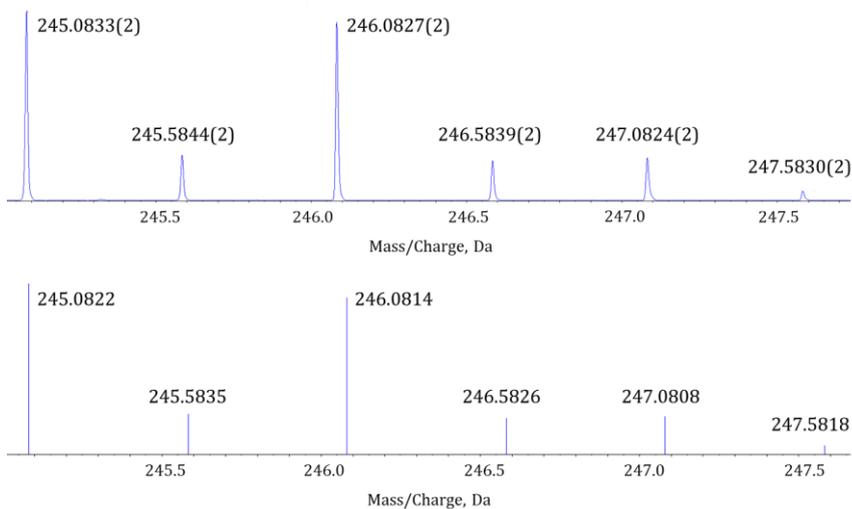
Anexo B.16. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuH}_{-1}\text{L5}]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



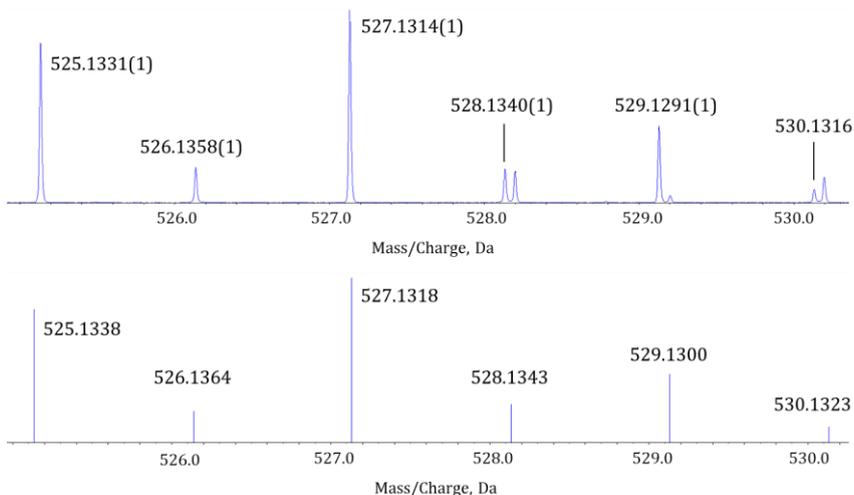
Anexo B.17. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-1L}_4(\text{Cl})]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



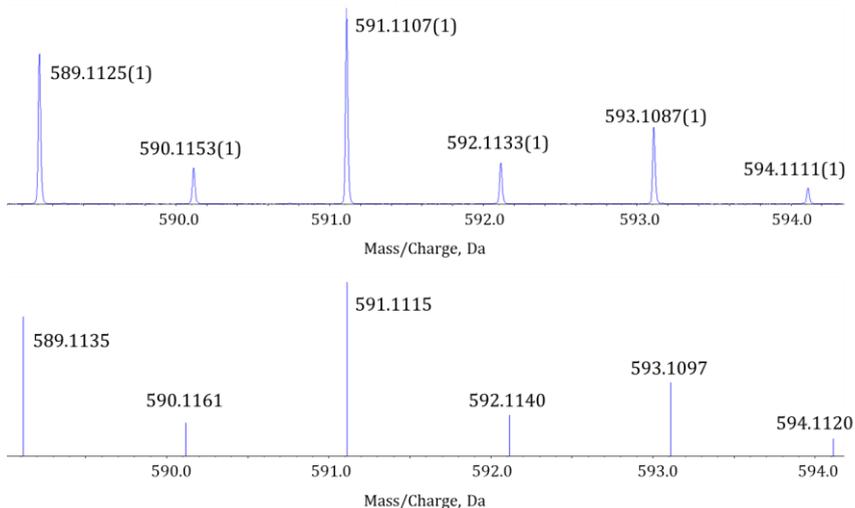
Anexo B.18. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-1L}_4(\text{ClO}_4)]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



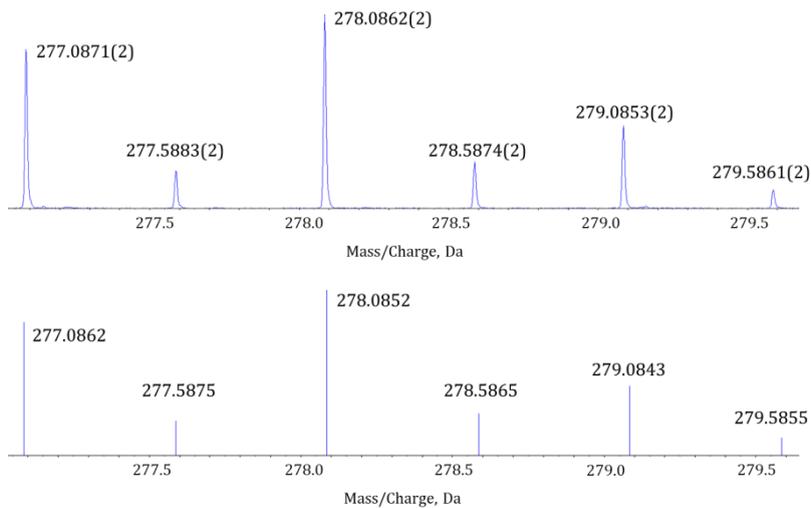
Anexo B.19. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_4]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



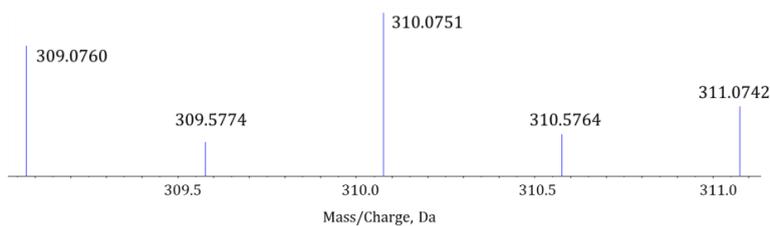
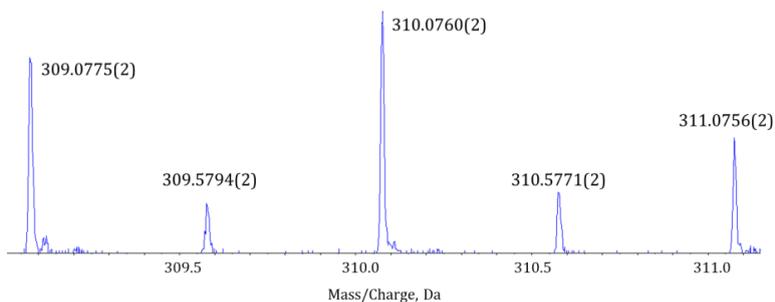
Anexo B.20. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_2\text{L}_4(\text{Cl})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



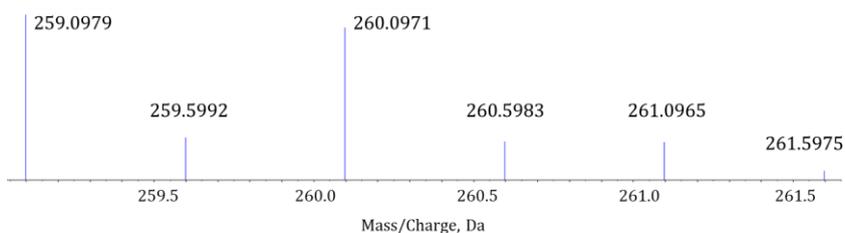
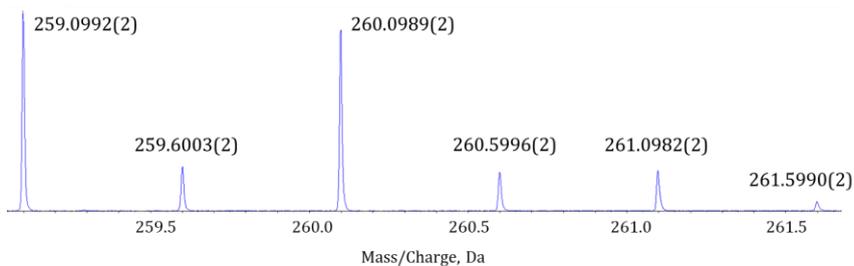
Anexo B.21. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-}_2\text{L}_4(\text{ClO}_4)]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



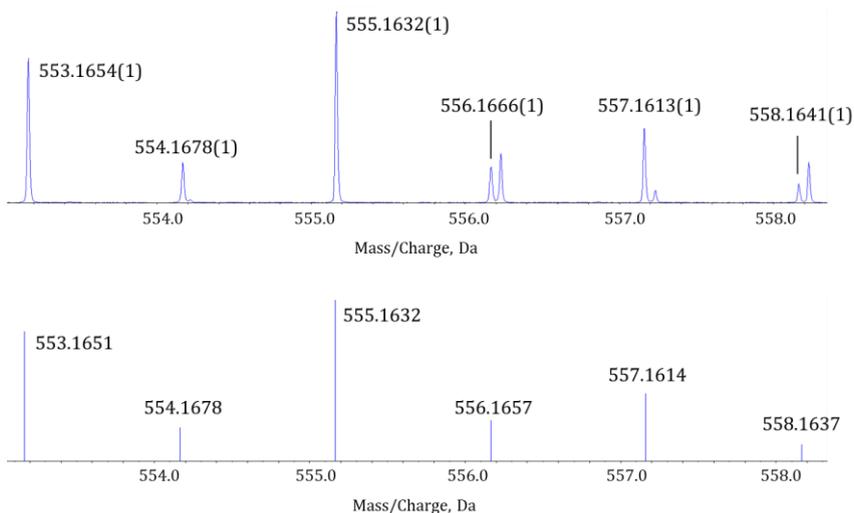
Anexo B.22. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H-}_1\text{L}_5(\text{Cl})]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



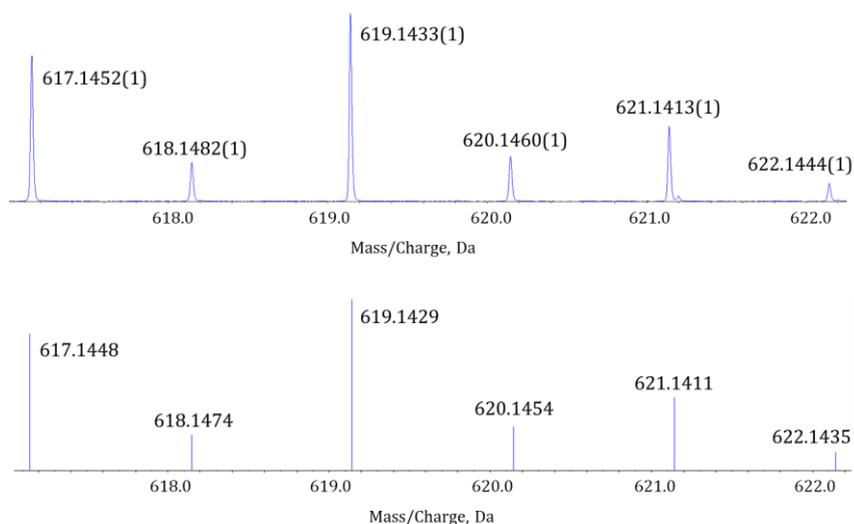
Anexo B.23. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_{-1}\text{L5}(\text{ClO}_4)]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



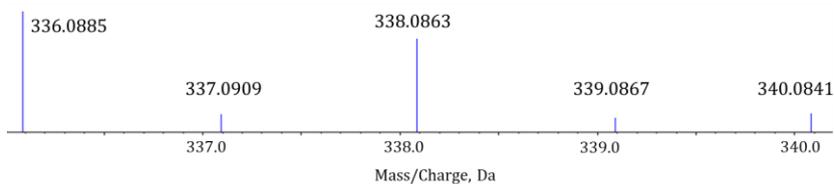
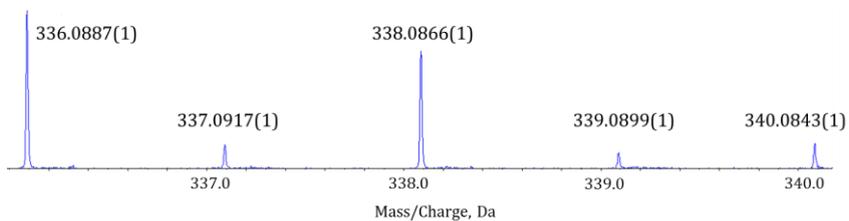
Anexo B.24. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Cu}_2\text{H}_{-2}\text{L5}]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



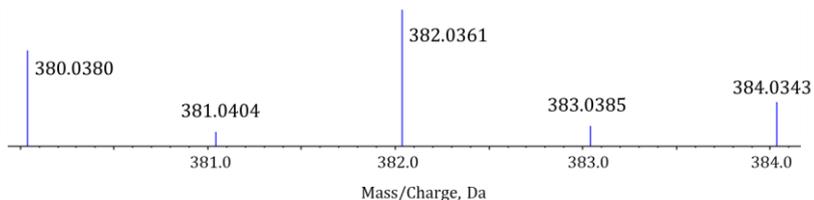
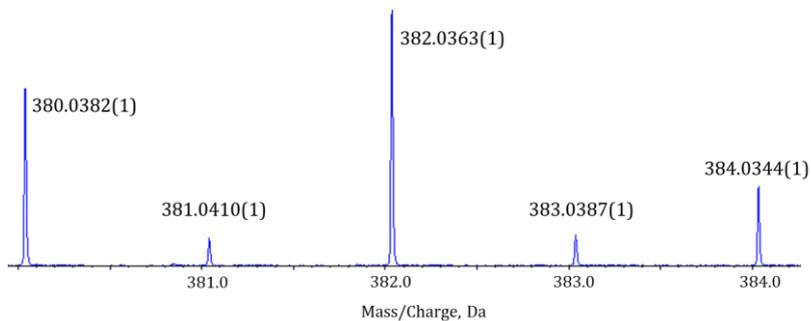
Anexo B.25. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Cu_2H-2L_5(Cl)]^+$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



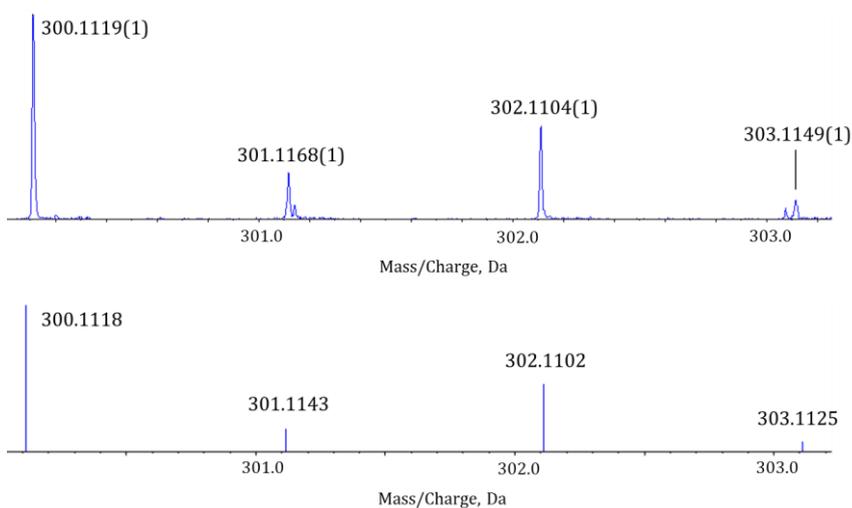
Anexo B.26. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Cu_2H-2L_5(ClO_4)]^+$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



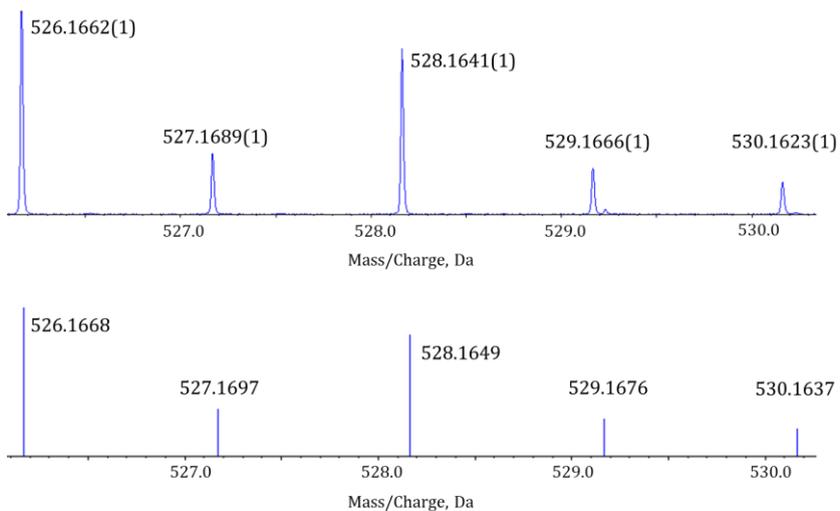
Anexo B.27. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL6}(\text{Cl})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



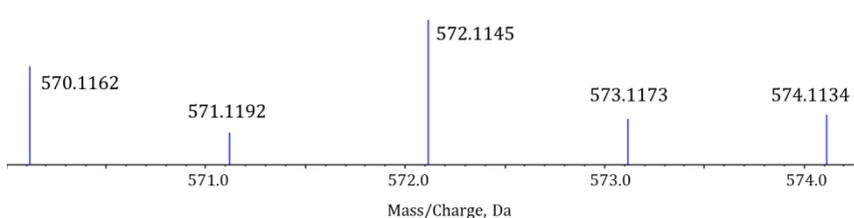
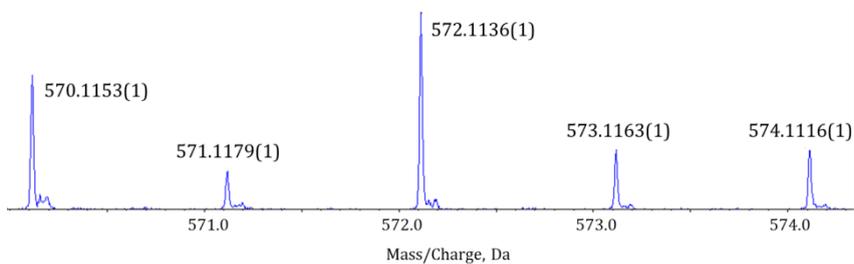
Anexo B.28. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL6}(\text{Br})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



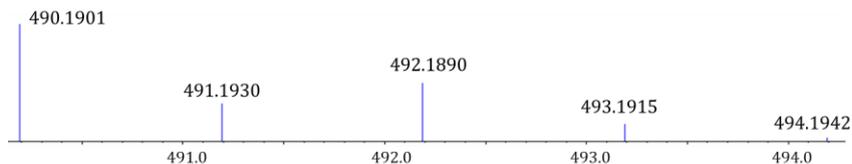
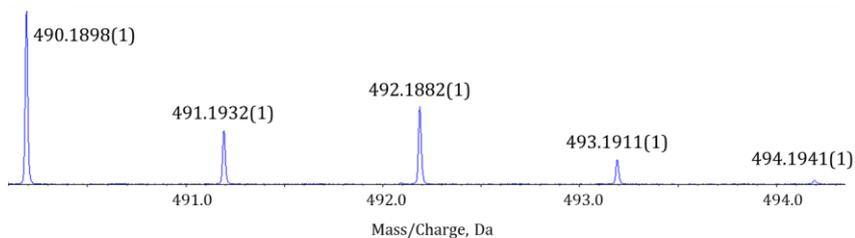
Anexo B.29. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuH-1L6}]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



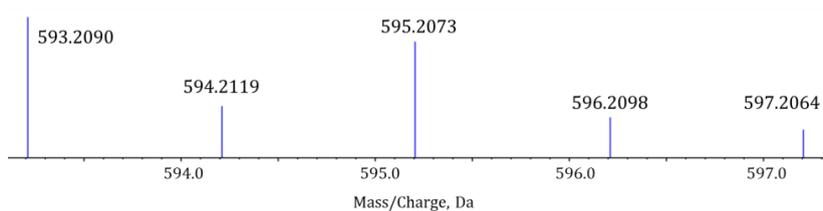
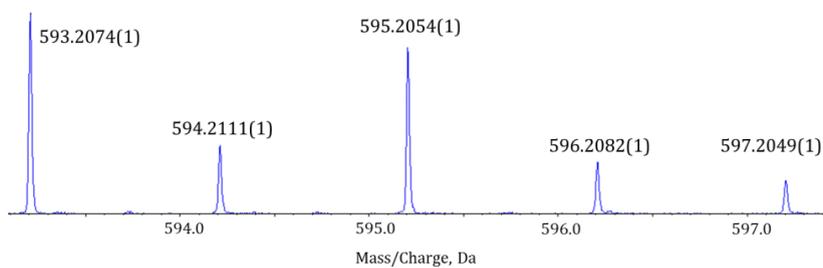
Anexo B.30. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL7(Cl)}]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



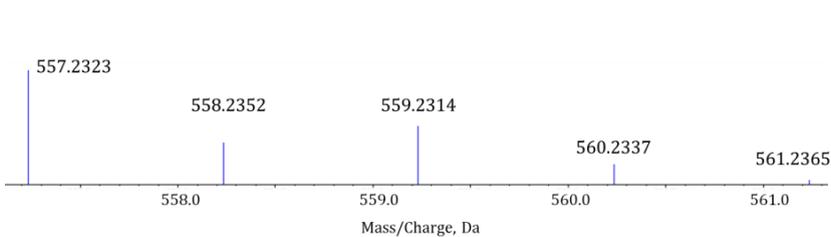
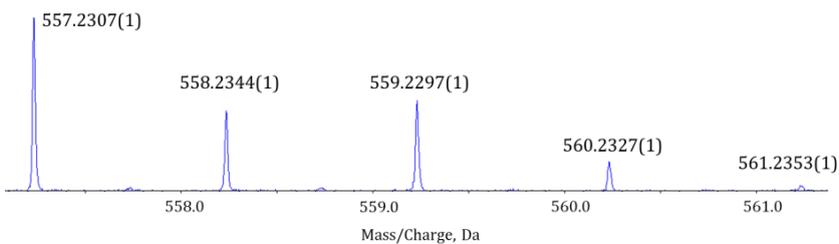
Anexo B.31. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL7}(\text{Br})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



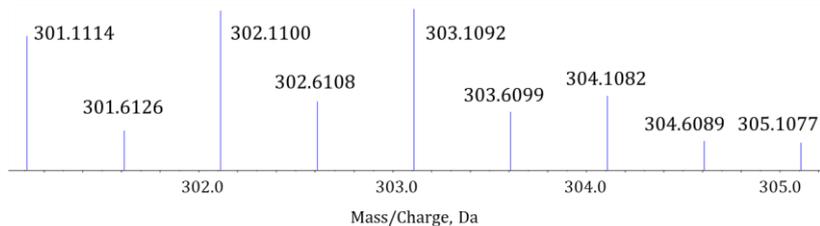
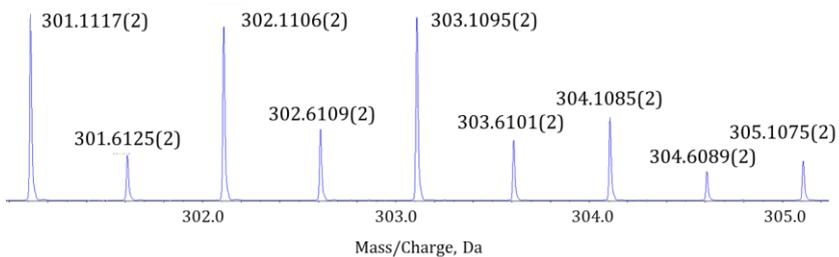
Anexo B.32. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuH-1L7}]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



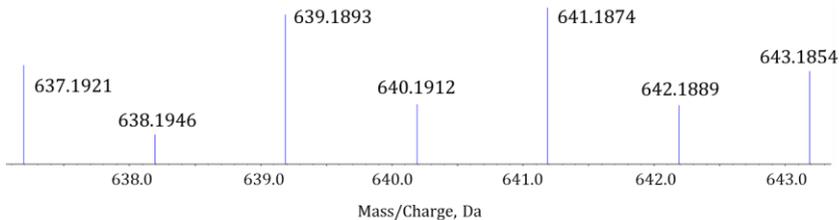
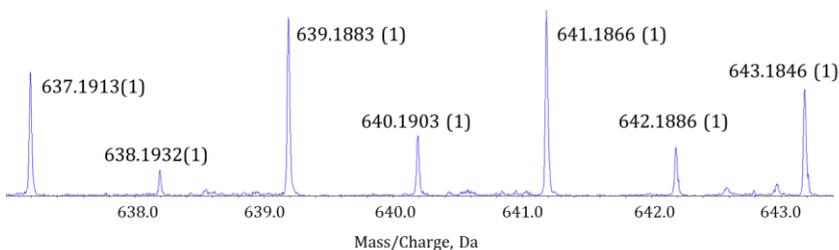
Anexo B.33. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuL8}(\text{Cl})]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



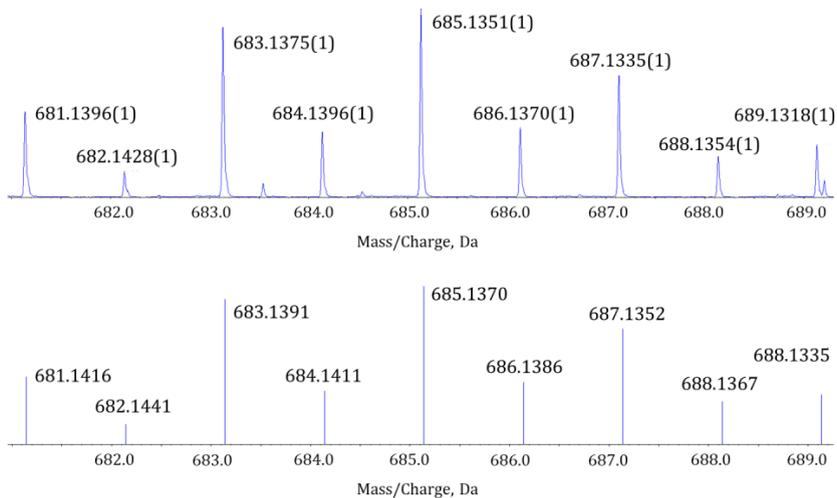
Anexo B.34. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{CuH}_{-1}\text{L8}]^+$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



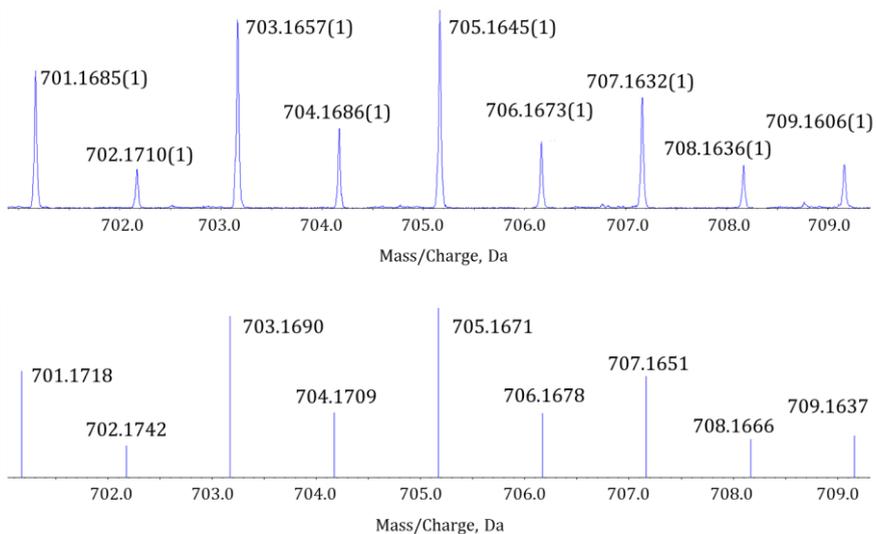
Anexo B.35. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Zn_2H-2L1_2]^{2+}$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



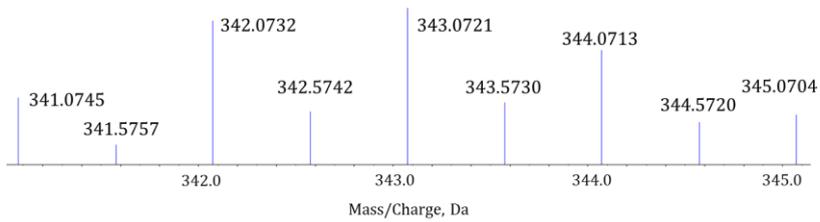
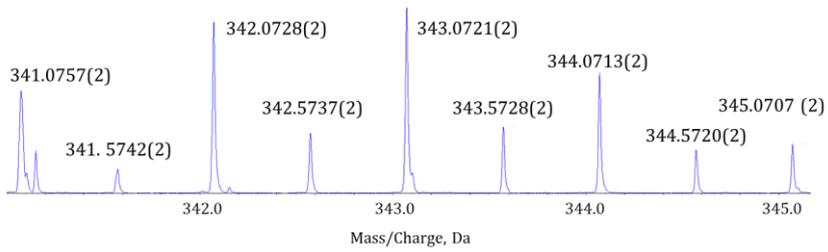
Anexo B.36. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Zn_2H-2L1_2(Cl)]^+$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



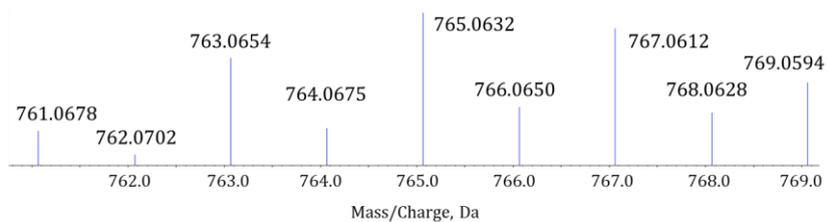
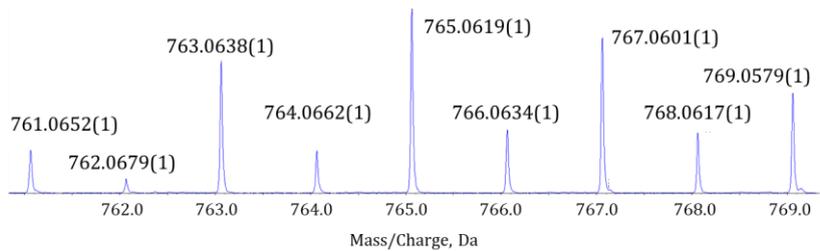
Anexo B.37. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Zn_2H_2L1_2(Br)]^+$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



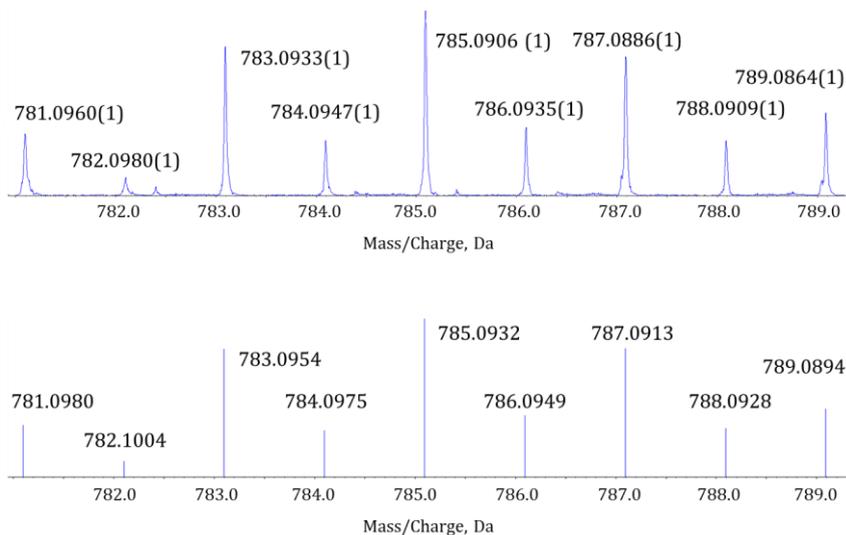
Anexo B.38. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Zn_2H_2L1_2(ClO_4)]^+$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



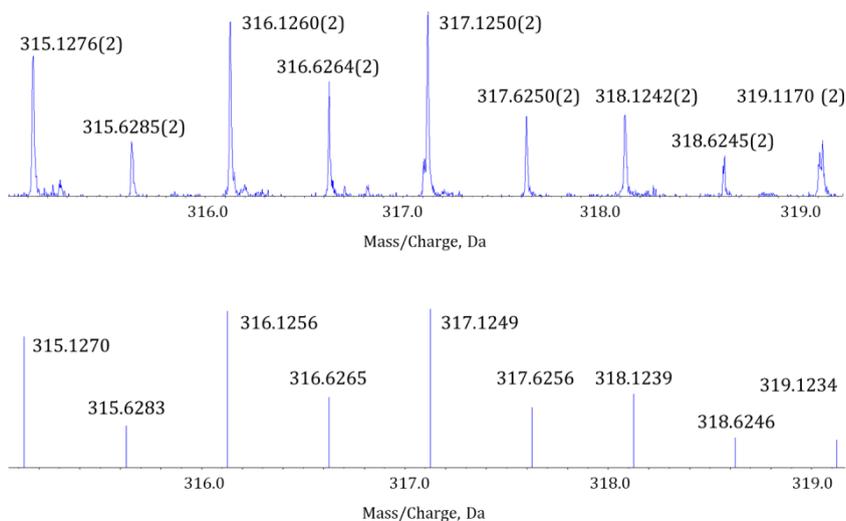
Anexo B.39. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Zn}_2\text{H-1L1}_2(\text{Br})]^{2+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



Anexo B.40. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[\text{Zn}_2\text{H-1L1}_2(\text{Br})]^{+}$, en $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$ (50/50 vol/vol).



Anexo B.41. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Zn_2H-1L1_2(Br)(ClO_4)]^+$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).



Anexo B.42. Espectro HR-ESI-Masas experimental (arriba) y simulado (abajo) de la especie $[Zn_2H-2L2]^{2+}$, en H_2O/CH_3OH (50/50 vol/vol).

Anexo C

Datos Cristalográficos

Anexo C.1. Datos cristalográficos de las estructuras cristalinas **1** y **2**.

Datos Cristalográficos	1	2
Fórmula Empírica	C ₂₄ H ₅₄ N ₁₂ Cu ₂ Cl ₄ O ₂₀	C ₂₄ H _{50.5} N ₁₂ Cu ₂ Cl ₂ O _{2.5}
Peso Molecular (g/mol)	1099.66	745.25
Temperatura (K)	293(2)	293(2)
Sistema Cristalino	Triclínico	Monoclínico
Grupo Espacial	P ₋₁	P2 ₁ /a
a (Å)	9.2355(5)	16.7810(5)
b (Å)	11.6706(7)	9.13400(10)
c (Å)	11.9460(9)	21.3720(6)
α (°)	112.721(6)	90(0)
β (°)	99.370(5)	95.9810(10)
γ (°)	109.507(5)	90(0)
V (Å ³)	1054.56(13)	3258.02(14)
Z	1	4
Densidad (g/cm ³)	1.732	1.519
μ (mm ⁻¹)	1.353	1.515
F (000)	568	1562
Reflexiones Totales	6985	13931
Reflexiones Únicas	3703	4405
Restricciones	4	55
Parámetros	284	444
R1, F > 4σ	0.0318	0.0600
wR2	0.0796	0.1964
Goof	1.064	1.039

Anexo C.2. Datos cristalográficos de las estructuras cristalinas **3, 4 y 5.**

Datos Cristalográficos	3	4	5
Fórmula Empírica	C ₃₀ H ₆₀ N ₁₂ Cu ₃ Cl ₂ O ₁₅	C ₁₄ H ₂₈ N ₆ Cu ₂ Cl _{1.7} Br _{0.3} O ₇	C ₂₈ H ₆₃ N ₁₂ Cu ₂ Pd ₂ Cl ₃ BrO _{14.5}
Peso Molecular (g/mol)	1090.42	603.75	1326.08
Temperatura (K)	120.00(10)	120.00(10)	120.00(10)
Sistema Cristalino	Monoclínico	Ortorrómbico	Monoclínico
Grupo Espacial	P21/n	Pnma	C2/m
a (Å)	12.7127(2)	11.1587(5)	26.281(2)
b (Å)	26.2995(5)	22.0003(10)	19.3353(11)
c (Å)	13.3740(3)	17.5957(7)	12.8713(12)
α (°)	90(0)	90(0)	90(0)
β (°)	104.559(2)	90(0)	133.107(15)
γ (°)	90(0)	90(0)	90(0)
V (Å ³)	4327.84(15)	4319.7(3)	4775.13(11)
Z	4	8	4
Densidad (g/cm ³)	1.674	1.857	1.844
μ (mm ⁻¹)	1.664	2.785	2.696
F (000)	2260	2459	2668
Reflexiones Totales	25472	24668	12285
Reflexiones Únicas	8270	5546	4225
Restricciones	5	8	17
Parámetros	593	302	317
R1, F > 4σ	0.0474	0.0440	0.0788
wR2	0.1226	0.1167	0.2463
Goof	1.047	1.036	1.044

Anexo C.3. Datos cristalográficos de las estructuras cristalinas **8** y **9**.

Datos Cristalográficos	8	9
Fórmula Empírica	C ₁₁ H ₂₅ N ₆ CuBr ₃ O	C ₂₂ H ₅₆ N ₁₂ Cu ₂ Cl ₄ Br ₈ O ₂₀
Peso Molecular (g/mol)	560.62	1716.89
Temperatura (K)	293(2)	293(2)
Sistema Cristalino	Monoclínico	Triclínico
Grupo Espacial	P2 ₁ /c	P ₋₁
a (Å)	9.3938(2)	8.2821(5)
b (Å)	9.9091(3)	8.5494(4)
c (Å)	19.6853(6)	18.9143(9)
α (°)	90(0)	93.377(4)
β (°)	99.464(2)	99.561(4)
γ (°)	90(0)	103.936(5)
V (Å ³)	1807.45(9)	1274.92(12)
Z	4	1
Densidad (g/cm ³)	2.060	2.236
μ (mm ⁻¹)	7.850	7.392
F (000)	1100	838
Reflexiones Totales	13413	10949
Reflexiones Únicas	3820	4062
Restricciones	3	22
Parámetros	203	317
R1, F > 4σ	0.0339	0.0683
wR2	0.1031	0.2151
GooF	1.243	1.058

Anexo C.4. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina 3.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu1 - N2	1.939(3)	N2 - Cu1 - N3	79.2(1)
Cu1 - N3	2.077(3)	N2 - Cu1 - N12	142.5(1)
Cu1 - N12	2.127(3)	N2 - Cu1 - N7	93.4(1)
Cu1 - N7	1.960(3)	N2 - Cu1 - N4	116.2(1)
Cu1 - N4	2.212(2)	N3 - Cu1 - N12	98.3(1)
Cu2 - N8	1.962(3)	N3 - Cu1 - N7	166.4(1)
Cu2 - N9	2.143(3)	N3 - Cu1 - N4	97.9(1)
Cu2 - N5	2.213(2)	N12 - Cu1 - N7	80.6(1)
Cu2 - N6	2.061(3)	N12 - Cu1 - N4	101.3(1)
Cu2 - N1	1.952(3)	N7 - Cu1 - N4	95.7(1)
Cu3 - N10	2.018(3)	N8 - Cu2 - N9	80.2(1)
Cu3 - N11	2.036(3)	N8 - Cu2 - N5	97.8(1)
Cu3 - O1	2.453(2)	N8 - Cu2 - N6	165.7(1)
Cu3 - O2	1.953(2)	N8 - Cu2 - N1	92.8(1)
Cu3 - O3	1.986(2)	N9 - Cu2 - N5	96.8(1)
		N9 - Cu2 - N6	99.4(1)
		N9 - Cu2 - N1	145.6(1)
		N5 - Cu2 - N6	96.5(1)
		N5 - Cu2 - N1	117.5(1)
		N6 - Cu2 - N1	79.4(1)
		N10 - Cu3 - N11	99.3(1)
		N10 - Cu3 - O1	87.5(1)
		N10 - Cu3 - O2	173.3(1)
		N10 - Cu3 - O3	90.3(1)
		N11 - Cu3 - O1	98.5(1)
		N11 - Cu3 - O2	87.3(1)
		N11 - Cu3 - O3	170.2(1)
		O1 - Cu3 - O2	90.1(1)
		O1 - Cu3 - O3	83.6(1)
		O2 - Cu3 - O3	83.2(1)

Anexo C.5. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina 4.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu1 - N1	1.929(2)	N1 - Cu1 - N8	93.4(1)
Cu1 - N8	1.929(2)	N1 - Cu1 - N9	171.5(1)
Cu1 - N9	2.061(2)	N1 - Cu1 - N6	81.7(1)
Cu1 - N6	2.061(2)	N1 - Cu1 - Br1	101.8(1)
Cu1 - Br1	2.777(2)	N8 - Cu1 - N9	81.7(1)
Cu2 - N2	1.935(2)	N8 - Cu1 - N6	171.5(1)
Cu2 - N3	2.083(2)	N8 - Cu1 - Br1	101.8(1)
Cu2 - N12	2.083(2)	N9 - Cu1 - N6	102.4(1)
Cu2 - N7	1.935(2)	N9 - Cu1 - Br1	86.0(1)
Cu2 - Br2	2.905(2)	N6 - Cu1 - Br1	86.0(1)
Cu3 - N4	2.018(2)	N2 - Cu2 - N3	80.9(1)
Cu3 - N5	2.027(2)	N2 - Cu2 - N12	172.7(1)
Cu3 - O1	1.926(2)	N2 - Cu2 - N7	93.6(1)
Cu3 - O2	1.935(2)	N2 - Cu2 - Br2	106.5(1)
		N3 - Cu2 - N12	104.3(1)
		N3 - Cu2 - N7	172.7(1)
		N3 - Cu2 - Br2	79.8(1)
		N12 - Cu2 - N7	80.9(1)
		N12 - Cu2 - Br2	79.8(1)
		N7 - Cu2 - Br2	106.5(1)
		N4 - Cu3 - N5	98.7(1)
		N4 - Cu3 - O1	169.2(1)
		N4 - Cu3 - O2	94.1(1)
		N5 - Cu3 - O1	90.6(1)
		N5 - Cu3 - O2	164.0(1)
		O1 - Cu3 - O2	77.7(1)

Anexo C.6. Distancias de enlace (Å) y ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina 5.

Distancias de enlace (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Pd1 - N1	1.951(6)	N1 - Pd1 - N8	96.8(4)
Pd1 - N8	1.961(8)	N1 - Pd1 - N9	176.0(4)
Pd1 - N9	2.090(9)	N1 - Pd1 - N6	79.8(4)
Pd1 - N6	2.078(9)	N8 - Pd1 - N9	79.3(4)
Cu1 - N10	2.089(5)	N8 - Pd1 - N6	176.5(4)
Cu1 - N11	2.089(5)	N9 - Pd1 - N6	104.2(4)
Cu1 - O1	1.983(5)	N10 - Cu1 - N11	102.1(3)
Cu1 - O2	1.983(5)	N10 - Cu1 - O1	88.2(3)
Cu1 - Cl1	2.940(5)	N10 - Cu1 - O2	169.7(3)
Cu2 - N4	2.041(5)	N10 - Cu1 - Cl1	93.3(3)
Cu2 - N5	2.041(5)	N11 - Cu1 - O1	169.7(3)
Cu2 - O1	1.990(5)	N11 - Cu1 - O2	88.2(3)
Cu2 - O2	1.990(5)	N11 - Cu1 - Cl1	93.3(3)
		O1 - Cu1 - O2	81.6(3)
		O1 - Cu1 - Cl1	87.3(3)
		O2 - Cu1 - Cl1	87.3(3)
		N4 - Cu2 - N5	98.6(3)
		N4 - Cu2 - O1	171.1(3)
		N4 - Cu2 - O2	90.1(3)
		N5 - Cu2 - O1	90.1(3)
		N5 - Cu2 - O2	171.1(3)
		O1 - Cu2 - O2	81.2(3)

Anexo C.7. Distancias de enlace (Å) seleccionadas para la estructura cristalina **6**.

Distancias de enlace (Å)		Distancias de enlace (Å)	
Cu1 - N1	1.977	Cu5 - N3	2.051
Cu1 - N8	1.921	Cu5 - N4	2.013
Cu1 - O3	1.979	Cu5 - O7	2.354
Cu1 - O10	2.013	Cu5 - O8	1.918
Cu1 - Cl1	2.675	Cu5 - Cl2	2.325
Cu2 - N5	2.001	Cu6 - N2	1.958
Cu2 - N6	2.039	Cu6 - O8	1.954
Cu2 - O1	2.397	Cu6 - O9	1.950
Cl2 - O2	1.985	Cu6 - O10	2.020
Cu2 - O3	1.959	Cu6 - Cl1	2.894
Cu3 - N7	1.957	Cu7 - N9	2.045
Cu3 - O2	1.907	Cu7 - N10	1.972
Cu3 - O3	2.022	Cu7 - O9	1.983
Cu3 - O4	2.636	Cu7 - O10	1.928
Cu3 - O5	1.914	Cu7 - O11	2.356
Cu4 - N11	2.064		
Cu4 - N12	2.072		
Cu4 - O5	1.951		
Cu4 - O6	2.343		
Cu4 - Cl3	2.302		

Anexo C.8. Ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina **6**.

Ángulos de enlace (°)		Ángulos de enlace (°)	
N1 - Cu1 - N8	171.1	N7 - Cu3 - O2	166.7
N1 - Cu1 - O3	93.8	N7 - Cu3 - O3	84.9
N1 - Cu1 - O10	87.6	N7 - Cu3 - O4	95.5
N1 - Cu1 - Cl1	94.0	N7 - Cu3 - O5	94.7
N8 - Cu1 - O3	85.8	O2 - Cu3 - O3	81.9
N8 - Cu1 - O10	92.8	O2 - Cu3 - O4	86.2
N8 - Cu1 - Cl1	94.9	O2 - Cu3 - O5	98.5
O3 - Cu1 - O10	178.6	O3 - Cu3 - O4	88.1
O3 - Cu1 - Cl1	91.5	O3 - Cu3 - O5	178.7
O10 - Cu1 - Cl1	88.5	O4 - Cu3 - O5	93.2
N5 - Cu2 - N6	85.1	N11 - Cu4 - N12	84.5
N5 - Cu2 - O1	100.2	N11 - Cu4 - O5	175.2
N5 - Cu2 - O2	96.1	N11 - Cu4 - O6	86.2
N5 - Cu2 - O3	168.2	N11 - Cu4 - Cl3	85.7
N6 - Cu2 - O1	85.5	N12 - Cu4 - O5	95.0
N6 - Cu2 - O2	178.8	N12 - Cu4 - O6	91.5
N6 - Cu2 - O3	97.2	N12 - Cu4 - Cl3	169.5
O1 - Cu2 - O2	94.7	O5 - Cu4 - O6	98.6
O1 - Cu2 - O3	91.5	O5 - Cu4 - Cl3	94.4
O2 - Cu2 - O3	81.6	O6 - Cu4 - Cl3	91.8

Anexo C.8. Ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina 6.

Ángulos de enlace (°)		Ángulos de enlace (°)	
N3 - Cu5 - N4	86.3	N9 - Cu7 - N10	85.7
N3 - Cu5 - O7	95.1	N9 - Cu7 - O9	176.5
N3 - Cu5 - O8	92.7	N9 - Cu7 - O10	95.2
N3 - Cu5 - Cl2	170.3	N9 - Cu7 - O11	82.9
N4 - Cu5 - O7	84.9	N10 - Cu7 - O9	96.8
N4 - Cu5 - O8	176.0	N10 - Cu7 - O10	170.2
N4 - Cu5 - Cl2	86.1	N10 - Cu7 - O11	89.6
O7 - Cu5 - O8	99.1	O9 - Cu7 - O10	82.8
O7 - Cu5 - Cl2	90.3	O9 - Cu7 - O11	94.6
O8 - Cu5 - Cl2	94.5	O10 - Cu7 - O11	100.2
N2 - Cu6 - O8	94.2		
N2 - Cu6 - O9	169.0		
N2 - Cu6 - O10	87.8		
N2 - Cu - Cl1	89.3		
O8 - Cu6 - O9	96.8		
O8 - Cu6 - O10	175.9		
O8 - Cu6 - Cl1	101.1		
O9 - Cu6 - O10	81.3		
O9 - Cu6 - Cl1	87.8		
O10 - Cu6 - Cl1	82.5		

Anexo C.9. Distancias de enlace (Å) seleccionadas para la estructura cristalina 7.

Distancias de enlace (Å)	
Cu1 - O1	2.118
Cu1 - O2	2.118
Cu1 - O3	2.024
Cu1 - O4	2.027
Cu1 - O5	2.024
Cu1 - O6	2.027
Cu2 - N1	1.994
Cu2 - O1	1.921
Cu2 - O3	2.408
Cu2 - O8	1.930
Cu2 - O10	1.979
Cu3 - N2	1.998
Cu3 - O1	1.917
Cu3 - O4	2.363
Cu3 - O12	1.944
Cu3 - O14	1.980
Cu4 - N5	2.008
Cu4 - N6	2.030
Cu4 - O7	2.327
Cu4 - O8	1.939
Cu4 - O9	1.979
Cu5 - N3	2.007
Cu5 - N4	2.016
Cu5 - O11	2.534
Cu5 - O12	1.949
Cu5 - O13	1.948

Anexo C.10. Ángulos de enlace (°) seleccionados para la estructura cristalina 7.

Ángulos de enlace (°)		Ángulos de enlace (°)	
O1 - Cu1 - O2	180.0	N2 - Cu3 - O1	86.9
O1 - Cu1 - O3	90.1	N2 - Cu3 - O4	102.2
O1 - Cu1 - O4	89.6	N2 - Cu3 - O12	96.5
O1 - Cu1 - O5	89.9	N2 - Cu3 - O14	166.5
O1 - Cu1 - O6	90.4	O1 - Cu3 - O4	85.4
O2 - Cu1 - O3	89.9	O1 - Cu3 - O12	173.7
O2 - Cu1 - O4	90.4	O1 - Cu3 - O14	89.7
O2 - Cu1 - O5	90.1	O4 - Cu3 - O12	88.7
O2 - Cu1 - O6	89.6	O4 - Cu3 - O14	90.6
O3 - Cu1 - O4	90.6	O12 - Cu3 - O14	88.3
O3 - Cu1 - O5	180.0	N5 - Cu4 - N6	87.0
O3 - Cu1 - O6	89.5	N5 - Cu4 - O7	91.9
O4 - Cu1 - O5	89.5	N5 - Cu4 - O8	171.3
O4 - Cu1 - O6	180.0	N5 - Cu4 - O9	90.9
O5 - Cu1 - O6	90.6	N6 - Cu4 - O7	87.1
N1 - Cu2 - O1	86.5	N6 - Cu4 - O8	89.3
N1 - Cu2 - O3	101.9	N6 - Cu4 - O9	172.2
N1 - Cu2 - O8	96.3	O7 - Cu4 - O8	95.8
N1 - Cu2 - O10	168.8	O7 - Cu4 - O9	85.5
O1 - Cu2 - O3	84.5	O8 - Cu4 - O9	93.8
O1 - Cu2 - O8	172.3	N3 - Cu5 - N4	86.2
O1 - Cu2 - O10	91.1	N3 - Cu5 - O11	92.2
O3 - Cu2 - O8	87.9	N3 - Cu5 - O12	89.8
O3 - Cu2 - O10	88.7	N3 - Cu5 - O13	172.4
O8 - Cu2 - O10	87.5	N4 - Cu5 - O11	88.4
		N4 - Cu5 - O12	172.7
		N4 - Cu5 - O13	91.4
		O11 - Cu5 - O12	97.9
		O11 - Cu5 - O13	80.5
		O12 - Cu5 - O13	93.3

Anexo D

Publicaciones

Publicaciones en las que se ha participado

- [1] J. González-García, S. Tomić, A. Lopera, L. Guijarro, I. Piantanida, E. García-España. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, 13, 1732–1740.
- [2] J. Pitarch-Jarque, R. Belda, F. Lloret, J. Ferrando-Soria, P. Navarro, A. Lopera, E. García-España. *Dalton Trans.* **2015**, 44, 3378–3383.

