



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

METALOCICLOS DE Pt(II) COMO AGENTES DE UNIÓN AL ADN

METALOCICLOS DE Pt(II) COMO AXENTES DE UNIÓN AO ADN

Pt(II) METALLACYCLES AS DNA BINDERS

Director: Marcos Daniel García Romero

PAULA NOVO VALENCIA

Curso: 2016/2017 – Convocatoria: julio



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

Dr. MARCOS DANIEL GARCÍA ROMERO, profesor del departamento de Química Fundamental de la Universidade da Coruña,

INFORMA

Que el trabajo titulado “Metalociclos de Pt(II) como agentes de unión al ADN”, presentado por Dña. PAULA NOVO VALENCIA para optar al Grado en Química, ha sido realizado bajo su dirección en los laboratorios del grupo QUIMOLMAT del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA).

AUTORIZA

Su presentación en la Universidade da Coruña.

Y para que así conste firma la presente en A Coruña, a 20 de Julio de 2017.

Fdo. Dr. Marcos D. García Romero

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi tutor, Dr. Marcos D. García Romero, por la gran ayuda, orientación y apoyo que me ha prestado en todo durante esta etapa. De la misma forma, gracias Olaya por tu permanente paciencia, humildad, ayuda y amabilidad, tanto en el laboratorio como en lo personal.

Gracias al Dr. Carlos Peinador Veira por su orientación a la hora de elaborar este proyecto.

Gracias también a Iago y a Arturo por brindarme ayuda siempre que la he necesitado, por vuestros consejos en el laboratorio y por los buenos momentos en el mismo.

En definitiva, gracias todos los miembros del grupo por estos meses que he pasado junto a ellos en el laboratorio. He aprendido mucho, he ganado confianza y he disfrutado haciendo este trabajo de fin de grado.

Finalmente, gracias a mis amigos, y sobre todo a mi familia, por ser la mayor ayuda que he tenido, por todos los valores que me habéis inculcado y por no dejar que me rinda nunca.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

$\Delta\delta$ variación en el desplazamiento químico	$^{13}\text{C-RMN}$ resonancia magnética de carbono
δ desplazamiento químico	1D unidimensional
$^{\circ}\text{C}$ grado centígrado	2D bidimensional
[] concentración	Å ångström (10^{-10} m)
$^1\text{H-RMN}$ resonancia magnética de protón	ADN ácido desoxirribonucleico
d doblete	COSY <i>correlation Spectroscopy</i>
dd doble doblete	HSQC <i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
ESI <i>electrospray ionization</i>	Hz hercio
g gramo	J constante de acoplamiento
HMBC <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>	kJ kilojulio
HR-MS <i>High Resolution Mass Spectrometry</i>	M molaridad
mmol milimol	m multiplete
m/z relación de masa carga	mL mililitro
μL microlitro	RMN resonancia magnética nuclear
ppm partes por millón	s singulete
	T temperatura
	t triplete

ÍNDICE

1. Introducción	1
1.1. Química Supramolecular	1
1.2. Autoensamblaje supramolecular.....	2
1.3. Autoensamblaje supramolecular dirigido por centros metálicos.....	3
1.4. Autoensamblaje supramolecular dirigido por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II).	4
1.5. Autoensamblaje de ligandos derivados del N-monoalquil-4,4'-bipiridinio en torno a centros metálicos de Pd(II) y Pt(II).....	5
1.5.1. Metalociclos como agentes de unión al ADN. Antecedentes.....	6
2. Objetivos	9
3. Discusión de resultados	11
3.1. Estructuración de la discusión	11
3.2. Síntesis de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$	11
3.2.1. Retrosíntesis	11
3.2.2. Síntesis del ligando $L_1 \cdot NO_3$	12
3.2.3. Síntesis del ligando $L_2 \cdot NO_3$	14
3.3. Estudio del autoensamblaje de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$ en torno a los centros metálicos (en)Pd(ONO ₂) ₂ y (en)Pt(ONO ₂) ₂	15
3.3.1. Consideraciones generales.....	15
3.3.2. Autoensamblaje dirigido por el centro metálico de Pd (II)	16

3.3.3.	Autoensamblaje dirigido por el centro metálico de Pt(II) (en)Pt(ONO ₂) ₂	20
3.4.	Estudio de capacidad de las especies metalocíclicas de Pt(II) para actuar como agentes de unión al ADN.....	21
3.4.1.	Dicroísmo circular (DC).....	21
3.4.2.	Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis).....	23
4.	Parte experimental.....	29
4.1.	General.....	29
4.2.	Síntesis de los ligandos L ₁ ·NO ₃ y L ₂ ·NO ₃	30
4.2.1.	Síntesis del ligando L ₁ ·NO ₃	30
4.3.	Autoensamblaje de los ligandos L ₁ ·NO ₃ y L ₂ ·NO ₃ dirigido por los centros metálicos de Pd(II) y Pt(II).....	34
4.3.1.	Autoensamblaje de L ₂ ·NO ₃ dirigido por el complejo (en)Pd(ONO ₂) ₂	34
4.3.2.	Autoensamblaje de L ₂ ·NO ₃ dirigido por el complejo (en)Pt(ONO ₂) ₂	35
4.3.3.	Autoensamblaje de L ₁ ·NO ₃ dirigido por el complejo (en)Pd(ONO ₂) ₂	35
4.3.4.	Autoensamblaje de L ₁ ·NO ₃ dirigido por el complejo (en)Pt(ONO ₂) ₂	36
4.4.	Estudio de la interacción de M _{2b} ·6NO ₃ y M _{1b} ·6NO ₃ con <i>ct</i> -ADN	36
4.4.1.	Preparación de las disoluciones.....	37
4.4.2.	Dicroísmo Circular.....	38
4.4.3.	Valoración UV-Vis	39
	Anexo.....	i

RESUMEN

Con este proyecto se pretende explorar la aplicación de la química supramolecular en la biomedicina, mediante la síntesis de metalociclos de Pt(II) y Pd(II) que actúen como agentes de unión al ADN, y por tanto, con un posible potencial como agentes antitumorales.

Así, en el presente trabajo de fin de grado se ha llevado a cabo la síntesis de dos ligandos derivados del 4,4'-bipiridinio mediante una ruta sintética optimizada y ensayada previamente por el grupo de investigación. A continuación, se realizaron las reacciones de autoensamblaje dirigidas por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) necesarias para obtener los metalociclos correspondientes. Posteriormente, se ha estudiado de la interacción entre los metalociclos de Pt(II) y el *ct*-ADN mediante dos técnicas: dicroísmo circular y espectroscopia UV-Vis. La caracterización de los compuestos se llevó a cabo por RMN (mono y/o bidimensional) y, cuando fue necesario, espectrometría de masas.

Palabras clave: química supramolecular, metalociclo, agentes de unión al ADN, platino, paladio.

ABSTRACT

This project was intended to explore the application of supramolecular chemistry in biomedicine, through the synthesis of Pt(II) and Pd(II) metallacycles that act as DNA binders and, therefore, can display potential antitumor activities.

Herein, we have carried out the synthesis of two ligands derived from 4,4'-bipyridinium through a synthetic route previously developed and optimized by our research group. Then, Pd(II)/Pt(II)-directed self-assembly of those ligands was performed in order to obtain the corresponding metallacycles. Later, the interaction between the obtained Pt(II) metallacycles and *ct*-DNA was studied using two different techniques: circular dichroism and UV-Vis spectroscopy. All the compounds were characterized by NMR experiments (1D and/or 2D), and, when possible, by mass spectroscopy.

Keywords: supramolecular chemistry, metallacycles, DNA binders, platinum, palladium.

RESUMO

Con este proxecto preténdese explorar a aplicación de química supramolecular no eido da biomedicina, a través da síntese de metalociclos de Pt(II) e Pd(II) que actúen como axentes de unión ao ADN, e polo tanto poidan mostrar potencial coma axentes antitumorais.

Así, no presente traballo de fin de grao levouse a cabo a síntese de dous ligandos derivados do 4,4'-bipiridinio, mediante unha ruta sintética optimizada e ensaiada previamente polo grupo de investigación. A continuación, realizáronse as reaccións de autoensamblaxe dirixida por centros metálicos de Pd(II) e Pt(II), necesarias para obter os metalociclos correspondentes. Posteriormente, estudouse a interacción entre os metalociclos de Pt(II) e o *ct*-ADN mediante dúas técnicas: dicroísmo circular e espectroscopia UV-Vis. A caracterización dos compostos levouse a cabo por RMN (mono e/ou bidimensional) e, cando foi necesario, espectrometría de masas.

Palabras chave: química supramolecular, metalociclo, axentes de unión ao ADN, platino, paladio.

1. Introducción

1.1. Química Supramolecular

La Química Supramolecular es una disciplina joven, cuyos orígenes se remontan a finales del siglo XIX, período en el que se asientan los conceptos más básicos de esta área de investigación; entre ellos, destaca la idea de química de coordinación formulada por Alfred Werner (1893), el concepto de *llave-cerradura* introducido por Emil Fischer (1894), y el descubrimiento de las ciclodextrinas (las primeras moléculas huésped) por Villiers y Hebd (1891).

En contraste con la Química Molecular o del enlace covalente, enfocada al hallazgo y dominio de las reglas que gobiernan las estructuras, propiedades y transformaciones de las especies moleculares, el premio nobel francés Jean-Marie Lehn (1987) definió la Química Supramolecular como la “*química más allá de la molécula*”; esto es, la química que estudia “*entidades organizadas de mayor complejidad que resultan de la asociación de dos o más especies químicas que se mantienen unidas por fuerzas intermoleculares*”.¹

Dichas interacciones intermoleculares, de diferentes tipos y fortalezas (enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces de coordinación a centros metálicos, interacciones electrostáticas, interacciones π - π , fuerzas hidrofóbicas, etc.), todas de carácter reversible, juegan un papel crucial en los procesos de reconocimiento molecular; no solamente en entidades biológicas, sino también en sistemas sintéticos.

A pesar de su relativamente corta trayectoria, conviene resaltar la Química Supramolecular como uno de los campos de la Química que ha experimentado un mayor auge en las últimas 3 décadas. Tanto es así, que ya son seis grandes científicos a los que fue otorgado el Premio Nobel de Química en esta área: Donald J. Cram,² Charles Pedersen,³ y Jean-Marie Lehn, concedido por el desarrollo de la Química Supramolecular, y Jean-Pierre

¹ Lehn, J.-M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89.

² Cram, D. J. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 1009.

³ Pedersen, C. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 2495.

Sauvage,⁴ J. Fraser Stoddart,⁵ y Bernard Feringa,⁶ por “*el diseño y síntesis de máquinas moleculares*”.

1.2. Autoensamblaje supramolecular.

Con la Química Supramolecular surge una estrategia de síntesis de estructuras complejas denominada autoensamblaje supramolecular (Figura 1), que presenta una alternativa a la tediosa síntesis tradicional de varias etapas bajo control cinético. Los procesos de autoensamblaje tratan de emular a la naturaleza en la producción de especies tan complejas como el ADN o las proteínas, utilizando un pequeño número de bloques de construcción básicos que permiten la fabricación de una forma espontánea de estructuras de alta complejidad y gran tamaño mediante el uso de interacciones intermoleculares débiles que operan bajo estricto control termodinámico. Una vez más, en palabras de Jean-Marie Lehn, el autoensamblaje supramolecular se define como “*la evolución hacia el confinamiento espacial a través de la interconexión espontánea de unos pocos o varios componentes, resultando en la formación de entidades discretas o extensas a nivel molecular o supramolecular*”.

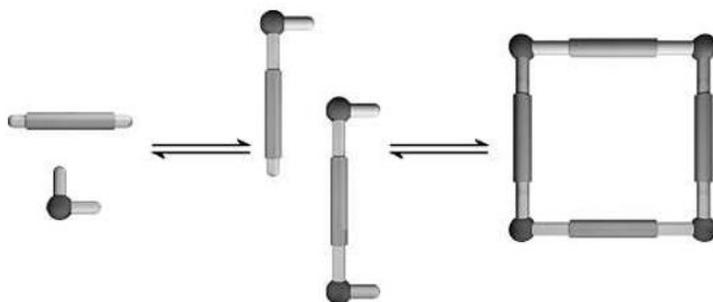


Figura 1. Representación esquemática de un proceso de autoensamblaje supramolecular.⁷

Con respecto a las ventajas del autoensamblaje, destacan su economía en la síntesis (a partir de unas cuantas subunidades repetidas logra la obtención de estructuras grandes y

⁴ Sauvage, J. P.. *Acc. Chem. Res.* **1998**, *31*, 611.

⁵ Balzani, V.; Credi, A.; Raymo, F. M.; Stoddart, J. F. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 3348.

⁶ Browne, W. R.; Feringa, B. L. *Nat. Nanotech.* **2006**, *1*, 25.

⁷ Steed, J. W.; Turner, D. R.; Wallace, K.; en *Core concepts in supramolecular chemistry and nanochemistry*, John Wiley & Sons. **2007**.

complejas), su mencionada gran eficiencia (frente a la síntesis convencional), y la capacidad de autocorrección de cualquier imperfección (inherente al carácter esencialmente reversible de los enlaces).

1.3. Autoensamblaje supramolecular dirigido por centros metálicos.

Introducidas en el contexto del autoensamblaje a principios de la década de los ochenta,⁸ las interacciones metal-ligando han sido usadas extensivamente desde entonces en este tipo de procesos sintéticos, debido a que permiten la obtención de estructuras de gran tamaño bien definidas. Esto es debido a la alta direccionalidad del enlace y al predecible carácter de la esfera de coordinación del metal, sobre todo en comparación con el carácter esencialmente adireccional de otras interacciones intermoleculares mencionadas en esta introducción.

Los centros metálicos más empleados son los metales de transición, en concreto de los grupos principales y de los últimos grupos. Estos cuentan con una serie de características atractivas para dirigir el proceso de autoensamblaje, tales como números de coordinación variable, diferente afinidad por los ligandos, propiedades magnéticas y electrónicas que influyen en las propiedades del producto deseado, y geometrías que les permiten unirse al ligando con facilidad en posiciones específicas. En cuanto a los ligandos habitualmente empleados, éstos serán compuestos orgánicos rígidos que presentan en su estructura átomos dadores de electrones que actúan como punto de reconocimiento y de unión a los centros metálicos. Así, el diseño de ligandos con diferentes geometrías conduce a metalociclos también con geometrías variadas.

⁸ (a) Ogino, H. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1303. (b) Dietrich- Buchecker, C.; Sauvage, J. P.; Kintzinger, J. P. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 5095.

1.4. Autoensamblaje supramolecular dirigido por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II).

Dentro del extenso grupo de los metales de transición que pueden ser utilizados en el contexto del autoensamblaje, el Pd(II) y el Pt(II) ocupan un lugar importante, considerándose el punto de partida a principios de los 90, cuando Fujita⁹ y Stang¹⁰ se embarcan en el diseño de cuadrados supramoleculares aprovechando las oportunidades que ofrecían dichos metales (Figura 2).

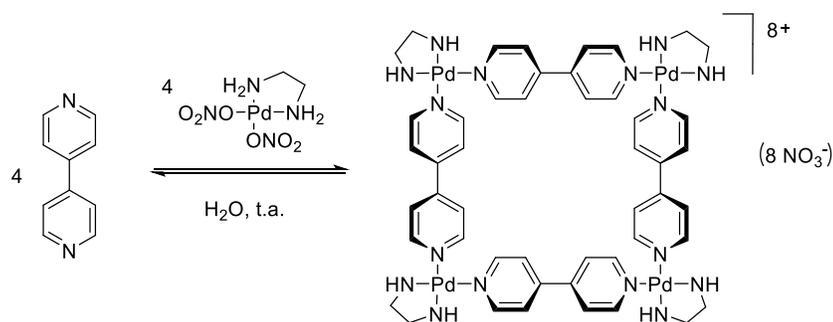


Figura 2. Ejemplo de cuadrado supramolecular sintetizado por Fujita a partir del autoensamblaje de 4,4' bipyridina y un complejo de Pd(II).⁹

Así, los complejos de Pd(II) y Pt(II) presentan una serie de similitudes y diferencias que conviene considerar. Por una parte, ambos metales presentan como estado de oxidación más estable el +2 (también un +4 estable en el caso del platino), estado en el cuentan preferiblemente con una geometría de coordinación planocuadrada y en el que muestran una gran estabilidad frente al aire y al agua. Por otra parte, en lo que se refiere a enlaces de coordinación con ligandos piridínicos, la labilidad cinética de los enlaces Pd-N a temperatura ambiente, hace posible la obtención de la especie termodinámicamente más estable a través de los característicos procesos de autocorrección. Sin embargo, esto dificulta la caracterización de las estructuras debido a la dependencia existente entre la especiación del sistema y la concentración. No ocurre lo mismo con los enlaces Pt-N, los cuales, por lo general, son cinéticamente inertes a

⁹ Fujita, M., Yazaki, J., Ogura, K. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 5645.

¹⁰ Stang, P. J., Cao, D. H. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, *116*, 4981.

temperatura ambiente, aunque se pueden labilizar temporalmente al someterlos a ciertos estímulos externos, para que bajo estas condiciones se produzca el autoensamblaje de los componentes bajo control termodinámico y se obtenga la especie más estable; al cesar estos estímulos, el enlace de coordinación recupera la inercia inicial y la especie continua siendo estable (Figura 3).¹¹

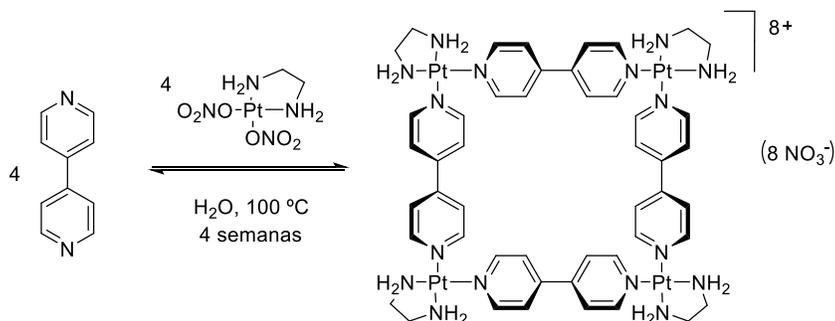


Figura 3. Metalociclo cuadrado obtenido por Fujita mediante autoensamblaje supramolecular de 4,4'-bipiridina y el complejo de Pt(II).¹¹

1.5. Autoensamblaje de ligandos derivados del *N*-monoalquil-4,4'-bipiridinio en torno a centros metálicos de Pd(II) y Pt(II).¹²

Si se tienen en cuenta los trabajos realizados por Fujita¹¹ y Stang,¹⁰ ha de considerarse que, como ligandos, la 4,4'-bipiridina y sus derivados poseen una capacidad π -aceptora baja, por lo que se limita la utilización de los metalociclos resultantes como receptores moleculares, al no maximizarse las potenciales interacciones π - π receptor-sustrato para la formación de complejos de inclusión con sustratos aromáticos adecuados. Por ello, el grupo de investigación en el que se ha realizado el presente trabajo, ha desarrollado una estrategia de autoensamblaje basada en centros metálicos planocuadrados de Pd(II) y Pt(II) y ligandos con estructura de 4,4'-bipiridina, donde la *N*-alquilación con alquil y arilpiridinas de al menos un anillo de piridina del heterociclo, permite aumentar el carácter π -aceptor de los

¹¹ Fujita, M., Yazaki, J., Ogura, K., *Chem. Lett.*, **1991**, 20, 1031.

¹² Peinador, C.; Quintela, J. M.; Blanco, V.; García M. D., en *Molecular Self Assembly: Advances and Applications*; Pan Stanford: Singapore, **2013**, Capítulo 11.

ligandos autoensamblados. De este modo, se garantiza el carácter π -deficiente del metalociclo final, manteniendo el carácter bidentado de los ligandos, al quedar dos nitrógenos libres para su coordinación a centros metálicos (Figura 4).

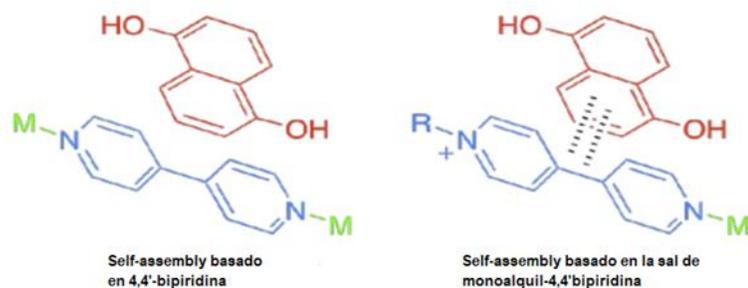


Figura 4. Comparación de reconocimiento molecular entre 4,4'-bipiridina y uno de sus derivados N-monoalquilados.

1.5.1. Metalociclos como agentes de unión al ADN. Antecedentes.

Hoy en día, uno de los objetivos prioritarios de la Química Supramolecular se centra en el diseño de especies metalocíclicas con fines terapéuticos. En concreto, la gran importancia del ADN como almacén de la información genética de la mayoría de las especies, ha impulsado la idea de diseñar especies metalosupramoleculares que actúen como agentes de unión al ADN, con el objetivo de combatir enfermedades tales como el cáncer. Sintéticamente, la utilización del autoensamblaje supramolecular frente a la síntesis covalente clásica presenta grandes ventajas, al permitir la preparación de supraestructuras de tamaño comparable al de biomoléculas con una gran facilidad, e implementando además una gran modularidad en la estrategia sintética, que permite utilizar bloques de construcción de forma y tamaño muy variables para la obtención de agregados muy complejos pero con una morfología fácilmente predecible.¹³

En comparación con el *cis*-platino y otros agentes extensamente empleados en el tratamiento de pacientes con cáncer, que se unen de forma covalente (y por tanto irreversiblemente) al ADN, las especies supramoleculares presentan dos ventajas esenciales: interactúan con el ADN mediante enlaces no covalentes y son capaces, *a priori*, de distinguir las diferentes estructuras terciarias del mismo; entre las dichas

¹³ Hannon, M. J. *Chem. Soc. Rev.*, **2007**, 36, 280.

estructuras, destaca la G-quadruplex, conformada por secuencias ricas en guanina, y que tienen un papel como dianas de los fármacos antitumorales.¹⁴

En base al descubrimiento de la actividad citotóxica del cuadrado supramolecular sintetizado por Fujita (Figura 3), al unirse al ADN *calf thymus* (ct-ADN) y al ADN G-quadruplex, y capaz de inhibir la telomerasa,¹⁵ algunos miembros del grupo han realizado los siguientes estudios:

- Diseño de un metalociclo mediante del autoensamblaje de un ligando basado en el 2,7-diazapireno y el centro metálico de (en)Pt(ONO₂)₂, y el consecuente estudio de su citotoxicidad frente al ADN nativo.¹⁶ Se demostró que la metalosupramolécula interacciona con el ADN con una constante de asociación dos órdenes de magnitud superior a la del ligando libre: $7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ y $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Además, mediante ensayos con PCR se evidenció la interferencia del metalociclo en la expresión del ADN *in vitro*; el compuesto mostró también actividad citotóxica en cuatro líneas celulares del cáncer humano, con valores de IC₅₀ entre 3.1 y 19.2 μM .

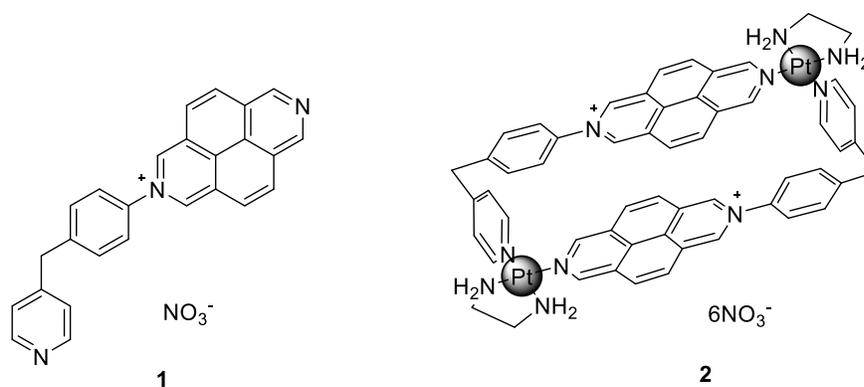


Figura 5. Estructura del ligando basado en el diazapireno 2,7-diazapireno (1) y del metalociclo con el centro metálico de Pt(II) (2).²⁴

¹⁴ Georgiades, S. N.; Abd Karim, N. H.; Suntharalingam, K.; Vilar, R. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2010**, *49*, 4020.

¹⁵ Kieltyka, R.; Englebienne, P.; Fakhoury, J.; Autexier, C.; Moitessier, N.; Sleiman, H. F., *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 10040.

¹⁶ Terenzi, A.; Ducani, C.; Blanco, V.; Zerzankova, L.; Westendorf, A. F.; Peinador, C.; Hannon, M. J.. *Chemistry-A European Journal*, **2012**, *18*, 10983.

- Síntesis de tres cuadrados supramoleculares de Pt(II) de dimensiones ligeramente crecientes y prueba de su actividad citotóxica frente a células cancerígenas, al unirse a ADN nativo y G-quadruplex, inhibiendo significativamente la expresión de aquellos genes susceptibles a la formación de G-quadruplex en sus regiones promotoras. Se ha comprobado que la caja de menores dimensiones presenta una mayor selectividad ante el denominado gen c-Kit, pero presenta una menor actividad citotóxica.¹⁷

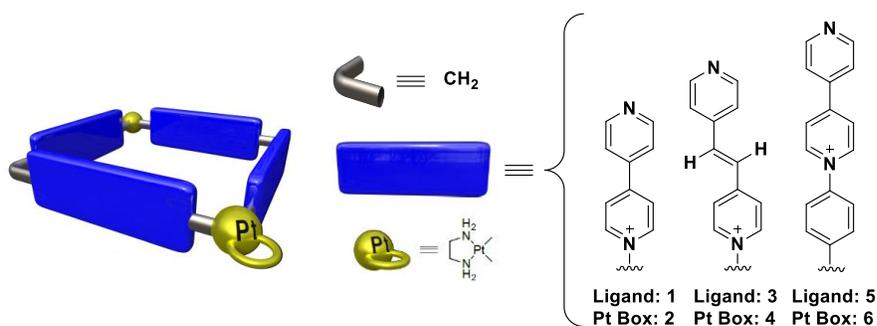


Figura 6. Representación esquemática de las cajas supramoleculares de Pt(II) y estructura de los ligandos 4,4'-bipiridina.¹⁷

¹⁷ Domarco, O., Lötsch, D., Schreiber, J., Dinhof, C., Van Schoonhoven, S., García, M. D., Terenzi, A., *Dalton Trans.*, **2017**, 46, 329.

2. Objetivos

Según lo expuesto en la introducción, el autoensamblaje dirigido por centros metálicos de Pd(II) y Pt(II) es una potente herramienta para la síntesis de supramoléculas con un amplio potencial aplicativo. En este contexto, se plantea aquí la síntesis de ligandos basados en *N*-monoalquil-4,4'-bipiridinio, el estudio de su autoensamblaje dirigido por Pd(II)/Pt(II), y la ejemplificación del uso de los metalociclos obtenidos como receptores moleculares o agentes de unión al ADN. De esta forma, se plantean los siguientes objetivos concretos:

- a) Síntesis y caracterización estructural de dos ligandos derivados de *N*-monoaril-4,4'-bipiridinio (L_1^+ y L_2^+ , Figura 7).

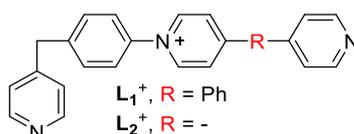


Figura 7. Estructura de los ligandos L_1^+ y L_2^+ empleados en el presente trabajo.

- b) Autoensamblaje en medio acuoso de los ligandos $L_1 \cdot \text{NO}_3$ y $L_2 \cdot \text{NO}_3$ en torno a centros metálicos de Pt(II) y Pd(II). Obtención y caracterización estructural de los metalociclos rectangulares resultantes $M_{1a,b} \cdot 6\text{NO}_3$ y $M_{2a,b} \cdot 6\text{NO}_3$ (Figura 8).

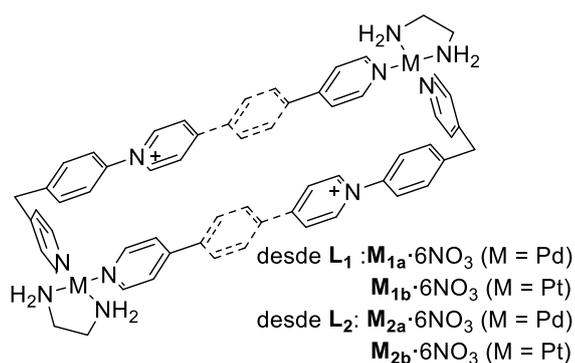


Figura 8. Estructura de los metalociclos objetivo $M_{1a,b} \cdot 6\text{NO}_3$ y $M_{2a,b} \cdot 6\text{NO}_3$.

- c) Estudio de la capacidad de las especies metalocíclicas $M_{1b} \cdot 6\text{NO}_3$ y $M_{2b} \cdot 6\text{NO}_3$ para actuar como agentes de unión al ADN, estudio que se realizará mediante dicroísmo circular y ultravioleta-visible.

3. Discusión de resultados

3.1. Estructuración de la discusión

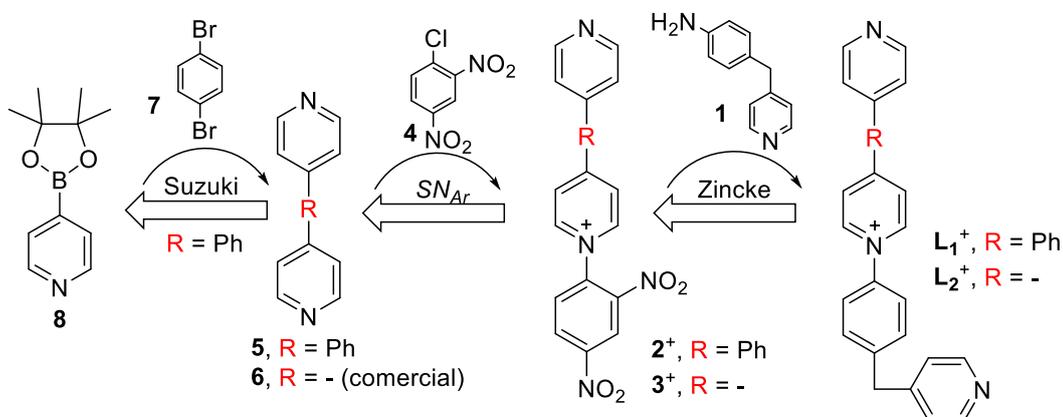
Según lo establecido en los objetivos, la discusión de resultados de este trabajo se dividirá en los siguientes bloques:

- I. Síntesis y caracterización estructural de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$.
- II. Obtención y caracterización mediante RMN de los metalociclos $M_{1a,b} \cdot 6NO_3$ y $M_{2a,b} \cdot 6NO_3$ en medio acuoso mediante autoensamblaje dirigido por los centros metálicos (en)Pd(ONO₂)₂ y (en)Pt(ONO₂)₂.
- III. Estudio de la capacidad de los metalociclos de tipo Pt₂L₂ $M_{1b} \cdot 6NO_3$ y $M_{2b} \cdot 6NO_3$ como potenciales agentes de unión al ADN.

3.2. Síntesis de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$

3.2.1. Retrosíntesis

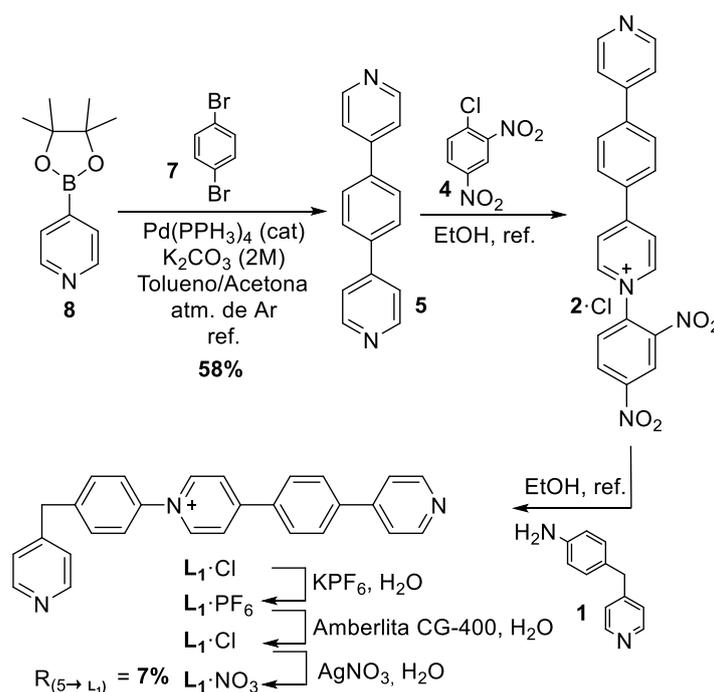
Los ligandos objetivo presentan en común una estructura angular, con dos unidades de piridina en sus extremos disponibles para su coordinación a centros metálicos, y un tercer anillo piridínico arilado que les conferirá un marcado carácter π -deficiente. Así, L_1^+ y L_2^+ se diferencian únicamente en la longitud de sus lados largos, con L_1^+ presentando un anillo fenileno extra en comparación con L_2^+ .



Esquema 1: Retrosíntesis propuesta para la obtención de los ligandos bidentados L_1^+ y L_2^+ .

Según lo mostrado en el Esquema 1, la síntesis de los ligandos utiliza en ambos casos como etapa clave la reacción de Zincke¹⁸ entre las sales de piridinio **2**·Cl y **3**·Cl con la amina 4-(piridin-4-ilmetil)anilina (**4**). Dichas sales de piridinio pueden ser obtenidas, a su vez, mediante sustitución nucleófila aromática¹⁹ con 2,4-dinitroclorobenceno de los derivados de bipyridina **5** y **6**. Mientras que la 4,4'-bipyridina **6** es comercial, el compuesto **5** debe ser preparado por reacción de Suzuki-Miyaura²⁰ entre el pinacol éster del ácido 4-piridinilborónico (**8**) y 1,4-dibromometano (**7**). Se ha de especificar que si bien los ligandos L_1^+ y L_2^+ son obtenidos según la ruta sintética mostrada como los correspondientes cloruros, éstos deberán transformarse en los correspondientes nitratos mediante reacciones de intercambio iónico. El uso de L_1^+ y L_2^+ como nitratos implica la no interferencia de los aniones en las reacciones de autoensamblaje, además de garantizar una solubilidad adecuada de los compuestos en medio acuoso.

3.2.2. Síntesis del ligando $L_1 \cdot NO_3$



Esquema 2. Esquema sintético seguido para la preparación de $L_1 \cdot NO_3$.

¹⁸ Zincke, Th. Justus Liebigs. *Ann. Chem.* **1903**, 330, 361.

¹⁹ Li, J. L. *Name Reactions: A collection of Detailed Reaction Mechanisms*, **2006**, third edition, 637.

²⁰ Miyaura, N.; Suzuki, A. *Chem. Rev.* **1995**, 95, 2457.

En el Esquema 2 se muestra la secuencia sintética empleada para la síntesis del ligandos $L_1 \cdot NO_3$.

Así, en la primera etapa se hará reaccionar el 1,4-dibromobenceno (**7**) con el éster pinacolínico del ácido 4-piridinborónico (**8**), en condiciones de acoplamiento cruzado de Suzuki-Miyaura, con $Pd(PPh_3)_4$ como fuente de Pd^0 catalítico y K_2CO_3 como base. Como resultado, tras la correspondiente cromatografía en columna (poner condiciones de purificación siempre que se hayan utilizado) el compuesto precursor **5** con un rendimiento del 58%. En el 1H -RMN para este compuestos se observan 3 señales, debido a la simetría del compuesto. La señal con el mayor desplazamiento se corresponde con los cuatro protones equivalentes en posición α al nitrógeno de los dos anillos de piridina, la siguiente señal a los cuatro protones aromáticos del anillo fenilénico, y la señal con el menor desplazamiento se corresponde con los cuatro protones equivalentes en la posición β al nitrógeno de las unidades piridínicas. Además, el análisis mediante HR-ESI-MS del compuesto muestra el pico correspondiente al ion molecular a 233.1082, confirmando la obtención del compuesto **5**.

Siguiendo con la ruta sintética planteada, La reacción de *S_NAr* entre el compuesto **5** y el 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (**4**) en EtOH a reflujo permite la obtención de la sal **2**·Cl con un rendimiento del 75%, virtualmente pura y que fue caracterizada por su 1H -RMN, en buen acuerdo con el reportado.²¹

La activación del anillo piridínico de **2**·Cl por la presencia de la unidad 2,4-dinitrobencénica, hace que esta sal pueda reaccionar fácilmente con nucleófilos nitrogenados, lo que permite la obtención del ligando $L_1 \cdot Cl$ a través de su reacción de Zincke con la 4-(4-piridilmetil)anilina (**1**). Esta reacción consiste en la apertura del anillo de piridina por el ataque nucleófilo del grupo amina, y el posterior cierre de dicho anillo en las etapas posteriores, regenerándose el anillo piridínico y liberándose como subproducto la 2,4-dinitroanilina.

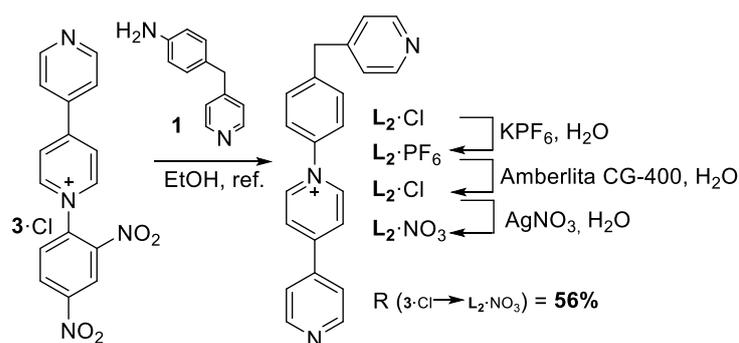
Tras la obtención de $L_1 \cdot Cl$, ésta fue sometida a una serie de reacciones de metátesis para su conversión en la sal objetivo $L_1 \cdot NO_3$. Así, el primer cambio de contraíón

²¹ Alvariño Bouza, C. *Autoensamblaje de nuevos metalociclos, complejos de inclusión y moléculas mecánicamente entrelazadas*. Tesis Doctoral, Universidade da Coruña, **2015**.

permitirá la obtención del ligando como sal de hexafluorofosfato ($L_1 \cdot PF_6$), mediante precipitación por saturación de una disolución acuosa del $L_1 \cdot Cl$ con KPF_6 . Esto hace posible, además, eliminar posibles impurezas asociadas a la reacción de Zincke. Tras un tratamiento intermedio con la resina Amberlita CG-400 para obtener nuevamente el ligando como sal de cloruro ($L_1 \cdot Cl$) mediante intercambio iónico, se obtiene el ligando como nitrato ($L_1 \cdot NO_3$) mediante la reacción en medio acuoso con una cantidad estequiométrica de $AgNO_3$, la cual se ve favorecida por la precipitación del $AgCl$ (sal muy poco soluble en agua). Estos procesos permiten la obtención de la sal objetivo con un rendimiento global desde el precursor $2 \cdot Cl$ del 7%. Las sales $L_1 \cdot PF_6$ y $L_1 \cdot NO_3$ fueron caracterizadas por 1H -RMN, ^{13}C -RMN, COSY, HMBC y HSQC, a excepción del $L_1 \cdot PF_6$, que también fue caracterizado por HR-ESI-MS.

Atendiendo a los espectros de 1H -RMN, la etapa de alquilación provocará una disminución en la simetría del compuesto, y esto se traducirá en la presencia de un mayor número de señales con respecto a los espectros de los precursores. Las señales correspondientes a los protones aromáticos, tanto de las unidades piridínicas como del anillo fenilénico, aparecen comprendidas entre 9 y 7 ppm; la señal de los protones en α al nitrógeno cargado positivamente es la más desapantallada (disminuye significativamente la densidad de carga sobre los grupos metilénicos), seguidas por las de los protones en β al nitrógeno y por las de los protones fenilénicos. La señal más desapantallada (en torno a 4.10 ppm) es el singulete correspondiente al grupo metileno. Mediante espectrometría de masas se pudo confirmar la formación de las sales esperadas, al coincidir prácticamente el pico del ión molecular calculado con el obtenido.

3.2.3. Síntesis del ligando $L_2 \cdot NO_3$



Esquema 3. Esquema sintético seguido para la preparación de $L_2 \cdot NO_3$.

Para la síntesis $L_2 \cdot NO_3$ se empleó la secuencia sintética mostrada en el Esquema 3, muy similar a la empleada para $L_1 \cdot NO_3$. En este caso se parte del compuesto $3 \cdot Cl$, previamente sintetizado por un miembro del grupo de investigación. Dicho compuesto se somete directamente a la reacción de Zincke y a los posteriores cambios de contraión, para obtener el ligando $L_2 \cdot NO_3$ con un rendimiento global desde $3 \cdot Cl$ del 56%. El ligando $L_2 \cdot NO_3$ se caracteriza mediante 1H -RMN y HR-ESI-MS, mostrando datos espectroscópicos coincidentes con los descritos en la bibliografía.²²

3.3. Estudio del autoensamblaje de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$ en torno a los centros metálicos (en) $Pd(ONO_2)_2$ y (en) $Pt(ONO_2)_2$

3.3.1. Consideraciones generales

En lo que se refiere al uso prospectivo de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$ en el contexto del autoensamblaje dirigido por los centros metálicos (en) $Pd(ONO_2)_2$ y (en) $Pt(ONO_2)_2$ en medio acuoso, deben hacerse una serie de consideraciones iniciales.

Por una parte, la estructura de los ligandos es asimétrica, con dos unidades de piridina en los extremos del lado largo y corto de sus estructuras disponibles para la coordinación a centros metálicos. Por otra parte, la arilación de una tercera unidad de piridina en el lado largo les asegura un carácter π -deficiente. Estos hechos permiten predecir que el autoensamblaje de estos ligandos bidentados con los centros metálicos plano-cuadrados mencionados resultará potencialmente en metalociclos rectangulares con cavidades deficientes en electrones.

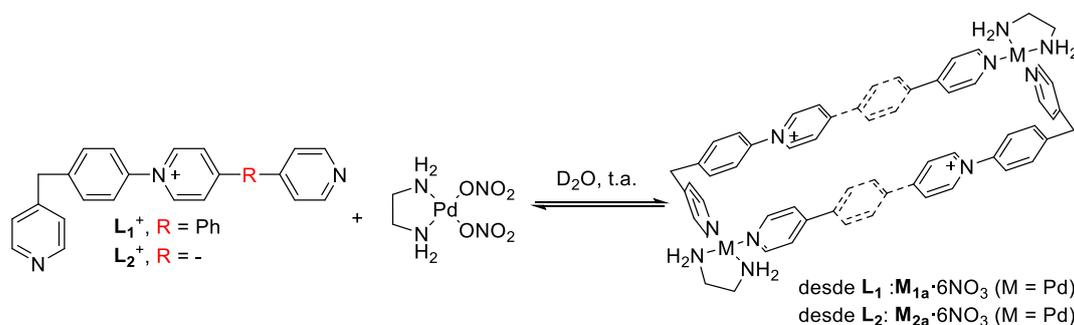
En cuanto a los centros metálicos utilizados, ambos presentan dos posiciones *cis*-lábilas con ligandos nitrato fácilmente desplazables, y las otras dos posiciones *cis*-bloqueadas mediante un quelato con etilendiamina. Por un lado, es bien sabido que los enlaces de coordinación Pd-N(piridina) son por lo general lábiles cinéticamente a temperatura ambiente, lo que hace que los procesos de ensamblaje con el centro metálico escogido ocurran bajo control termodinámico a dicha temperatura. Por ello, es importante resaltar que las especies formadas en estos procesos dependerán de aquellos

²² Pía Portomeñe, E.; *Complejación y extracción de PAHs en medio acuoso con receptores autoensamblados* de Pd(II) y Pt(II). Tesis Doctoral, Universidade da Coruña, 2012.

factores que puedan afectar al equilibrio (temperatura, concentración de componentes, disolvente). En este contexto, es de esperar que a altas concentraciones de los componentes, el sistema pueda equilibrarse hacia la formación de especies oligoméricas, las cuales maximizan el número de uniones metal-ligando. A medida que se disminuye la concentración de los componentes, los factores entrópicos cobran mayor fuerza, favoreciéndose la formación de especies metalocíclicas discretas. Si se sigue aumentando la dilución del sistema, llegará un momento que los factores entrópicos y la complejación competitiva de moléculas de disolvente pesen tanto, que los componentes prefieran permanecer libres antes que formando enlaces de coordinación. En lo que se refiere al centro de Pt(II) utilizado, se ha de considerar aquí que los enlaces Pt-N son inertes a temperatura ambiente, siendo necesario el uso de condiciones más agresivas para el autoensamblaje, pero permitiendo que una vez formados los metalociclos, éstos puedan ser aislados y caracterizados mediante, por ejemplo, espectrometría de masas.

De esta forma, la optimización de las condiciones de autoensamblaje en medio acuoso para los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$ en torno al centro metálico $(en)Pd(ONO_2)_2$ permitirán establecer los rangos de concentraciones en los que dicho autoensamblaje produce especies metalocíclicas discretas. Una vez optimizadas dichas condiciones, se procederá a la síntesis de los correspondientes análogos de Pt(II) mediante autoensamblaje asistido por energía de microondas de $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$ con $(en)Pt(ONO_2)_2$. Una vez caracterizados las especies Pt_2L_2 formadas, estas serán utilizadas para los consiguientes estudios de interacción con ADN.

3.3.2. Autoensamblaje dirigido por el centro metálico de Pd (II)



Esquema 4. Esquema sintético seguido para la preparación de $M_{1a} \cdot 6NO_3$ y $M_{2a} \cdot 6NO_3$.

Como se ha establecido previamente, los estudios de autoensamblaje con el complejo **4** se llevarán a cabo a temperatura ambiente.

Es habitual moverse en un rango de concentraciones de entre 0.1 y 10 mM en los estudios de autoensamblaje supramolecular. Estudios realizados a través de ^1H -RMN muestran que empleando concentraciones de ligando y complejo metálico menores que 0.1 mM, se obtendrán mayoritariamente ambos precursores libres en disolución; por el contrario, por encima de 10 mM, lo que se observará serán mayoritariamente especies oligoméricas en disolución y, como en el caso anterior, la presencia del metalociclo será minoritaria. Esta reacción demanda 2 equivalentes de ligando y de complejo metálico para la formación de 1 equivalente de metalociclo rectangular de tipo Pd_2L_2 .

3.3.2.1. Obtención del metalociclo $\text{M}_{1a}\cdot 6\text{NO}_3$

Para la obtención del metalociclo rectangular $\text{M}_{1a}\cdot 6\text{NO}_3$ a concentración 2.0 mM, se añade a temperatura ambiente un equivalente del complejo metálico $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$ a una disolución 4.0 mM de ligando $\text{L}_1\cdot\text{NO}_3$ en D_2O .

La caracterización por ^1H -RMN de este metalociclo permitirá observar cambios notables en el desplazamiento de las señales (Tabla 1) al comparar los espectros del ligando y del complejo metálico libres (Figura 9), los cuales confirmarán la formación del metalociclo deseado.

Tabla 1. Diferencias en los desplazamientos de las señales de ^1H -RMN del metalociclo con respecto al ligando $\text{L}_2\cdot\text{NO}_3$ libre.

	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
$\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	+0.10	-0.04	-0.12	-0.13	-0.14	-0.25	-0.29	-0.20	-0.05	+0.17	+0.29

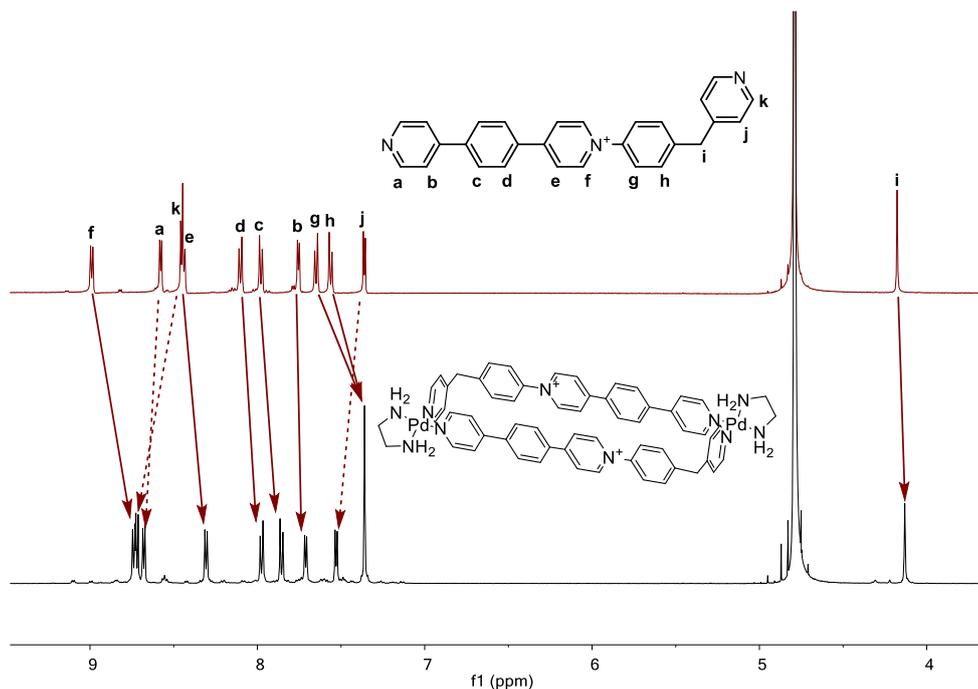


Figura 9. Espectros parciales solapados de ^1H -RMN de (a) ligando $\text{L}_1\cdot\text{NO}_3$ libre y (b) metalociclo $\text{M}_{1a}\cdot 6\text{NO}_3$. Las flechas continuas indican las señales que se apantallan y las discontinuas aquellas que se apantallan, tras la reacción de autoensamblaje.

Se puede concluir que 1.25 y 2.5 mM son las concentraciones más adecuadas para la reacción de autoensamblaje, ya que a dichas concentraciones aparece el metalociclo como especie mayoritaria.

3.3.2.2. Obtención del metalociclo $\text{M}_{2a}\cdot 6\text{NO}_3$

La reacción de autoensamblaje del ligando $\text{L}_2\cdot\text{NO}_3$ con el complejo $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$, 2 equivalentes de cada especie y ambas en concentración 2.5 mM, dará lugar a una disolución 1.25 mM del metalociclo rectangular $\text{M}_{2a}\cdot 6\text{NO}_3$, cuyo espectro de ^1H -RMN muestra un desplazamiento de las señales similar al observado al comparar los espectros de $\text{M}_{1a}\cdot 6\text{NO}_3$ y del ligando $\text{L}_1\cdot\text{NO}_3$ (Tabla 2 y Figura 10).

Tabla 2. Diferencias en los desplazamientos de las señales de ^1H -RMN del metalociclo con respecto al ligando $\text{L}_2\cdot\text{NO}_3$ libre.

	a	b	c	d	e	f	g	h	i
$\Delta\delta \text{ } ^1\text{H}$ (ppm)	+0.14	-0.04	-0.11	-0.18	-0.10	-0.22	-0.03	+0.16	+0.08

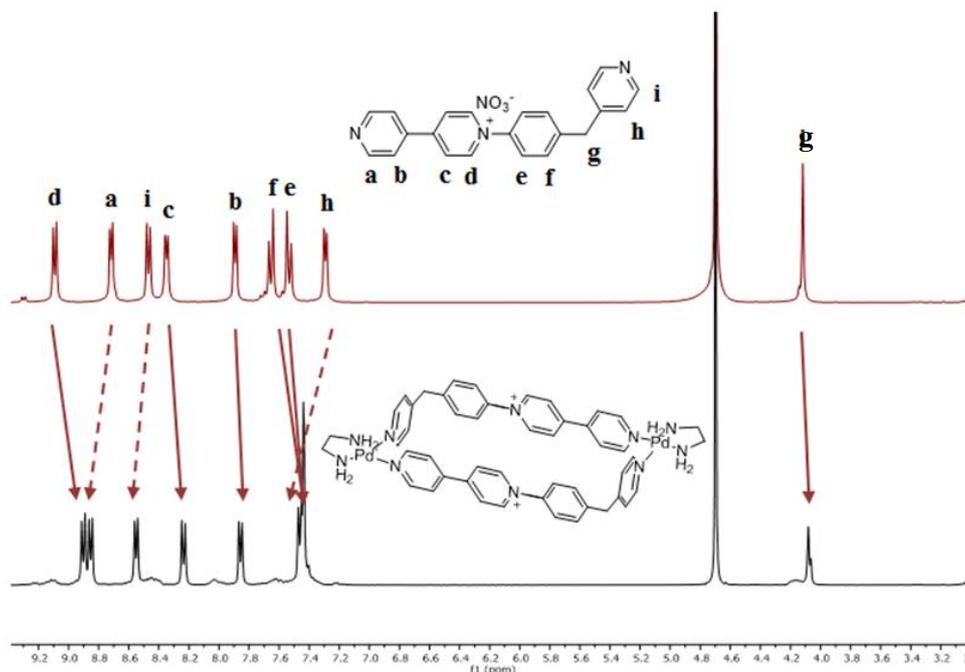


Figura 10. Espectros parciales solapados de ^1H -RMN de (a) ligando $\text{L}_2\cdot\text{NO}_3$ libre y (b) metalociclo $\text{M}_{2a}\cdot 6\text{NO}_3$. Las flechas continuas indican las señales que se apantallan y las discontinuas aquellas que se apantallan, tras la reacción de autoensamblaje.

Una vez confirmada la formación del metalociclo, se llevará a cabo un estudio de autoensamblaje en D_2O del ligando $\text{L}_2\cdot\text{NO}_3$ dirigido por el complejo $(\text{en})\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$ a diferentes concentraciones, en concreto cinco concentraciones comprendidas entre 10 y 0.10 mM. La Figura 11 recoge los espectros parciales de ^1H -RMN del metalociclo rectangular c a dichas concentraciones, y en base a lo razonado anteriormente acerca de la presencia de precursores libres o de especies oligoméricas, se puede concluir que 1.25 y 2.5 mM son las concentraciones más adecuadas para la reacción de autoensamblaje.

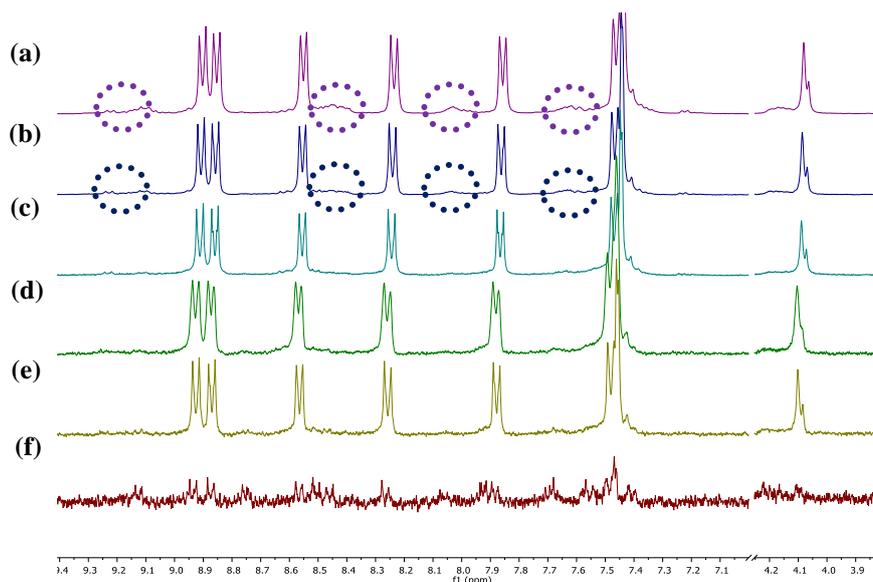
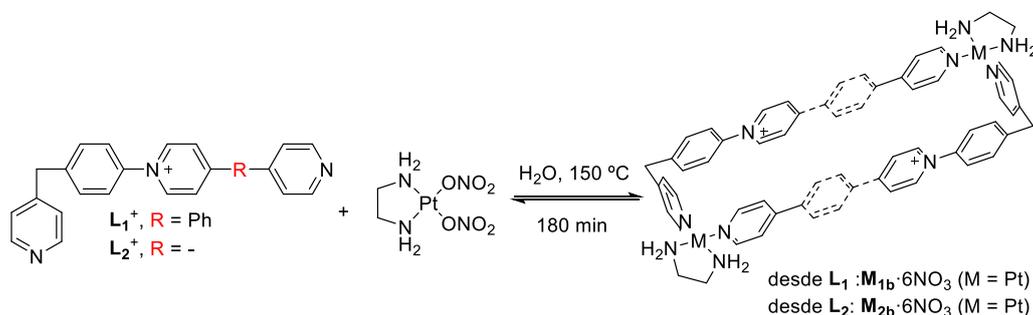


Figura 11. Espectros parciales solapados de ^1H -RMN del metalociclo $\text{M}_{2a}\cdot 6\text{NO}_3$ a diferentes concentraciones (a) 10 mM, (b) 5 mM, (c) 2.5 mM, (d) 1,25 mM, (e) 0,75 mM y (f) 0,10 mM.

3.3.3. Autoensamblaje dirigido por el centro metálico de Pt(II) (*en*)Pt(ONO₂)₂

Teniendo en cuenta (*en*)Pt(ONO₂)₂ que el complejo es más inerte que el complejo (*en*)Pd(ONO₂)₂, las reacciones de autoensamblaje de los metalociclos $\text{M}_{1b}\cdot 6\text{NO}_3$ y $\text{M}_{2b}\cdot 6\text{NO}_3$ con este último se han realizado mediante energía asistida por microondas, en unas condiciones óptimas fijas (Esquema 5): a 150 °C durante 180 minutos y dentro del rango de concentraciones previamente establecido para los análogos de Pd(II) $\text{M}_{1a}\cdot 6\text{NO}_3$ y $\text{M}_{2a}\cdot 6\text{NO}_3$.



Esquema 5. Esquema sintético seguido para la preparación de $\text{M}_{1b}\cdot 6\text{NO}_3$ y $\text{M}_{2b}\cdot 6\text{NO}_3$.

Según lo expuesto, los metalociclos $\text{M}_{1b}\cdot 6\text{NO}_3$ y $\text{M}_{2b}\cdot 6\text{NO}_3$ fueron preparados a partir de disoluciones *stock* en D₂O de los correspondientes ligandos $\text{L}_1\cdot \text{NO}_3$ y

$L_2 \cdot 6NO_3$, combinadas con la cantidad estequiométrica necesaria tomada de una disolución *stock* de $(en)Pt(ONO_2)_2$ en D_2O . Las dos disoluciones de ligando más centro metálico fueron entonces calentadas en las condiciones indicadas, lo que permitió el autoensamblaje de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ a 1.25 mM y $M_{2b} \cdot 6NO_3$ a 2.50 mM. Los cambios observados en los espectros de 1H -RMN de los metalociclos con respecto a los ligandos libres, y la analogía de dichos espectros con los obtenidos para las especies de Pd (II) $M_{1a} \cdot 6NO_3$ y $M_{2a} \cdot 6NO_3$, confirman la formación de las especies Pt_2L_2 esperadas.

3.4. Estudio de capacidad de las especies metalocíclicas de Pt(II) para actuar como agentes de unión al ADN

El estudio de la interacción de los metalociclos con el oligonucleótido de ADN dúplex (*ct*-ADN) se ha llevado a cabo mediante dos técnicas espectroscópicas: dicroísmo circular y espectroscopia UV-Vis.

3.4.1. Dicroísmo circular (DC)

Esta técnica espectroscópica se basa en la medida de la diferencia entre la absorción de luz polarizada circularmente a la izquierda y a la derecha por compuestos ópticamente activos, como lo es el ADN.²³

Para el registro de los espectros de DC de cada metalociclo ($M_{2b} \cdot 6NO_3$ y $M_{1b} \cdot 6NO_3$), se ha mantenido constante la concentración del ADN, y se ha variado la concentración de la especie metalocíclica correspondiente. Se pretende observar de esta forma los cambios en la quiralidad de la biomolécula en presencia de los compuestos preparados. Así, teniendo en cuenta que los metalociclos no son moléculas quirales, en los espectros registrados solo deberían observarse dos bandas características del *ct*-ADN: una negativa a 258 nm y una positiva a 275 nm, y ninguna asociada a los metalociclos. Sin embargo, en ambos espectros aparece una banda inducida asociada al aducto metalociclo-ADN, el cual implica una conformación de éste diferente a la del ADN inicial. Así, cada uno de los cambios de conformación del ADN (cambios en su helicidad) quedarán registrados en el espectro de DC, sensible a estas alteraciones, y

²³ Hammes, G. G.; *Spectroscopy for the biological sciences*. John Wiley & Sons, 2005.

permitirán confirmar de forma cualitativa la interacción del ADN con los metalociclos (Figura 12 y Figura 13).

En el caso del metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (Figura 12), se observa como la adición de cantidades crecientes del metalociclo al *ct*-ADN produce como resultado la disminución de la banda positiva de la biomolécula a 275 nm, y la aparición de dos bandas inducidas en torno a 320-350 nm, prueba de la interacción del metalociclo con la biomolécula. Dichas banda inducidas, propias únicamente de la absorción de luz por parte del aducto, se verá más adelante que permitirán el cálculo de la constante de asociación entre $M_{1b} \cdot 6NO_3$ mediante espectroscopía UV-Vis. Sin embargo, se ha de comentar que a partir de la adición de $2.50 \mu M$ de metalociclo empiezan a aparecer resultados erráticos en la banda propia del ADN y en la inducida, resultados probablemente asociados a la precipitación del aducto metalociclo-ADN en la cubeta durante el proceso de medida.

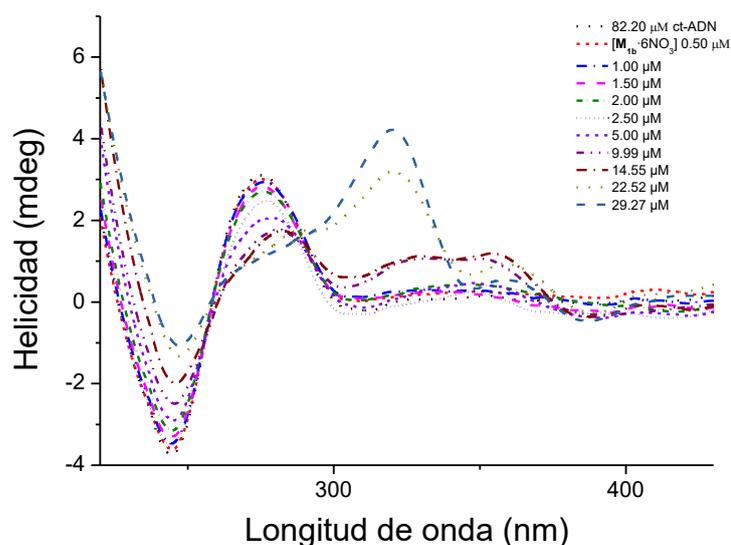


Figura 12. Espectro de DC de *ct*-ADN con adiciones crecientes del metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$.

En el caso del metalociclo $M_{2b} \cdot 6NO_3$ (Figura 13), se observa claramente que, al aumentar la concentración de metalociclo, se modifica la banda positiva del ADN a 275 nm, que disminuye su intensidad y acaba teniendo helicidad negativa a altas concentraciones de $M_{2b} \cdot 6NO_3$. Además, aparece una banda inducida a 334 nm, banda que implica una modificación en la conformación helicoidal del ADN al formarse el aducto con el metalociclo. Aunque, como en el caso anterior para el metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$, los espectros de diocroísmo circular permiten establecer de una forma

cualitativa la presencia de interacción entre *ct*-ADN y metalociclo, en el caso de $M_{2b} \cdot 6NO_3$ la banda inducida a 334 nm no permitirá el cálculo de la constante de asociación, al absorber dicho metalociclo en la misma región del espectro electromagnético que el ADN.

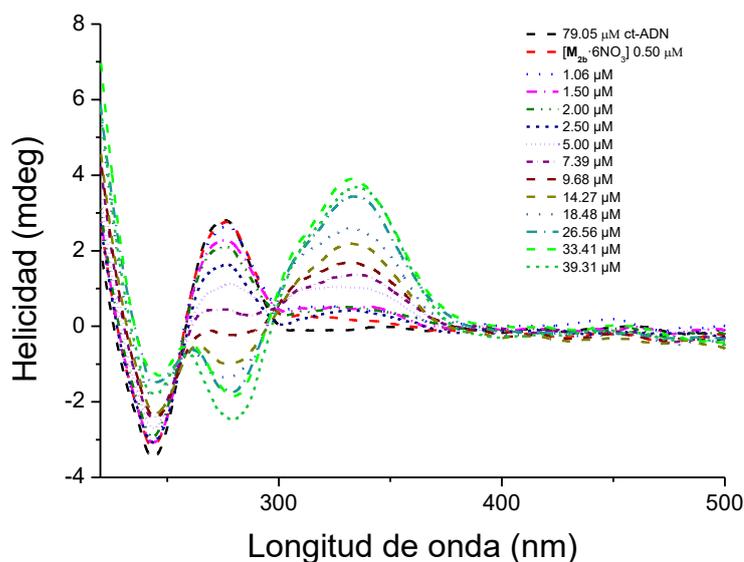


Figura 13. Espectro de DC de *ct*-ADN con adiciones crecientes del metalociclo $M_{2b} \cdot 6NO_3$.

3.4.2. Espectroscopia Ultravioleta-Visible (UV-Vis)

Con el fin de tratar de establecer de una forma más cuantitativa la presencia de interacción entre los metalociclos preparados y el *ct*-ADN, se recurrió a la utilización de la espectroscopia de ultravioleta-visible. En primer lugar se deberán establecer diferencias en los espectros de absorción del aducto *ct*-DNA-metalociclo y las especies por separado, tratando de buscar una banda de absorción propia del aducto que permita, a través de la correspondiente valoración, establecer la fortaleza de la asociación entre biomolécula y agente de unión. Así, se debe cumplir como primera condición que en el espectro ultravioleta-visible aparezca una banda de absorción propia del aducto que permita relacionar la concentración de éste en el equilibrio con una absorbancia medible. Como se ha observado en los experimentos de dicroísmo circular, dichas bandas inducidas para los aductos *ct*-ADN-metalociclo existen para M_{1b} y M_{2b} , en torno a 320-350 nm.

Una vez establecida la banda propia del aducto que pueda ser analizada, el denominador común de los experimentos para ambos metalociclos sería realizar una valoración, manteniendo constante la concentración de la especie metalocíclica correspondiente mientras se varía la del ADN (se evitaría así la agregación y potencial precipitación del aducto que si se hiciese al revés). En el caso más sencillo, donde la banda inducida por la asociación, y por tanto propia únicamente del complejo ADN-metalociclo, se encontrase aislada; la representación de la absorbancia del aducto frente a la concentración de metalociclo nos permitiría la obtención del valor de la constante de asociación mediante métodos de ajuste ampliamente reportados como, por ejemplo, el método de Thordarson.^{24,25}

El caso de los metalociclos M_{1b} y M_{2b} la situación es más compleja. Así, en el caso del metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$, la banda inducida en torno a 320-350 nm se encuentra solapada parcialmente con una propia del metalociclo con máximo en $\lambda_{max} = 332$ nm. Para solventar este problema, y poder tener en cuenta la contribución a la banda de absorción del aducto por parte del metalociclo libre, en primer lugar se procedió a la determinación de la absorptividad molar, ϵ , del metalociclo M_{1b} libre en disolución tampón de Tris, mediante el registro de los correspondientes espectros del metalociclo a diferentes concentraciones (Figura 14).

²⁴ Thordarson, P. *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 1305.

²⁵ El programa de ajuste bindfit se encuentra disponible gratuitamente en la dirección web: <http://app.supramolecular.org/bindfit/>

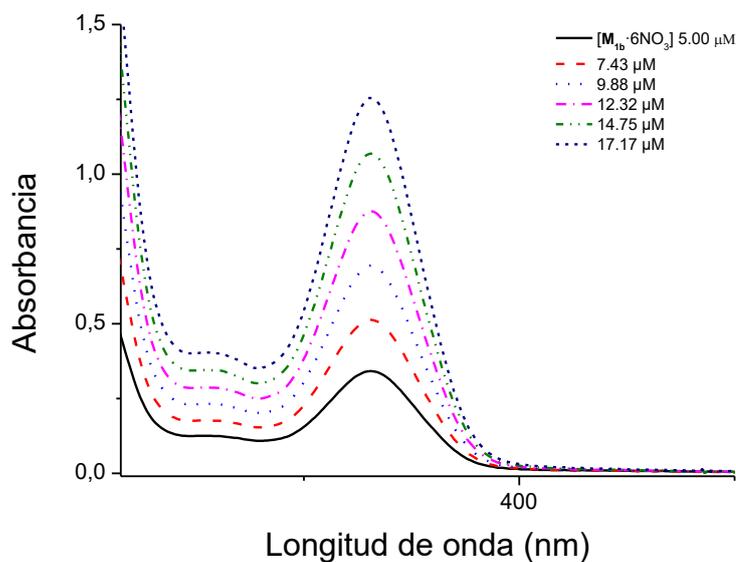


Figura 14. Espectros de UV-Vis para $M_{1b} \cdot 6NO_3$ en el rango de concentraciones 5.00-17.17 μM .

De esta forma, aplicando la Ley de Lambert-Beer ($A = \epsilon lc$, siendo l el camino óptico, A la absorbancia y c la concentración del $M_{1b} \cdot 6NO_3$), tomando los valores de concentración de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ en el máximo a 332 nm se pudo obtener un valor de ϵ de $73808 M^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Posteriormente, se lleva a cabo la valoración UV-Vis mostrada en la Figura 15. En el punto de $[ADN] = 0$, se toma un valor de $A = 0.89801$, y teniendo en cuenta el valor previamente calculado de ϵ y despejando de la expresión de Lambert-Beer, se obtiene una concentración inicial de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ de $1.22 \cdot 10^{-5} M$.

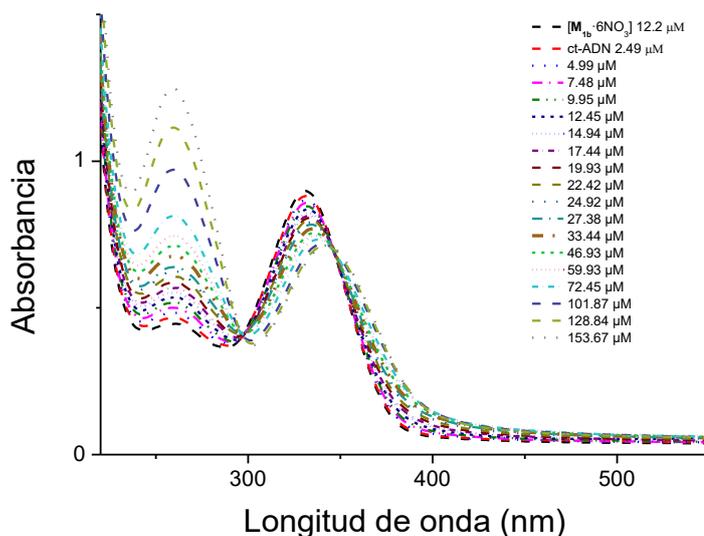


Figura 15. Espectros de UV-Vis de la valoración de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ a $[M_{1b} \cdot 6NO_3] = 12.2 \mu M$ con ct-ADN en el rango de concentraciones 2.49-153.67 μM de la biomolécula.

La utilización del método de Thordason permite introducir los valores de la concentración inicial de metalociclo y coeficiente de absorción del mismo a la longitud de onda de la banda solapada con aquella propia del aducto, permitiendo tener en cuenta la interferencia de una banda en la otra. De la representación de los datos obtenidos para la disminución de la absorbancia de la banda a $\lambda_{max} = 332 \text{ nm}$ frente a la $[ct\text{-ADN}]$ se obtiene la gráfica mostrada en la Figura 16. Los valores de la constante se obtuvieron mediante el ajuste de los datos empleando la ecuación $[DNA]/|\epsilon_a - \epsilon_f| = [DNA]/|\epsilon_b - \epsilon_f| + 1/(|\epsilon_b - \epsilon_f| \times K_b)^{17}$, donde $\epsilon_a = A_{observada}/[Pt\text{-box}]$, ϵ_b es el coeficiente de extinción molar del ADN unido al metalociclo de platino y ϵ_f es el coeficiente de extinción molar del metalociclo de platino libre determinado por la curva de calibración del metalociclo de platino aislado en disolución acuosa, siguiendo la ley de Lambert-Beer. Por medio de dicha ecuación se puede estimar el valor de la $K_a = 2.94 \cdot 10^4 \pm 0.192 \cdot 10^4 M^{-1}$.

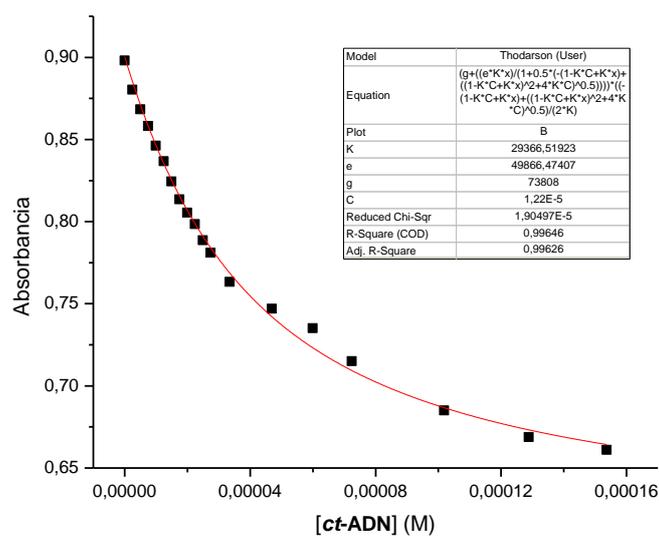


Figura 16. Representación de la absorbancia del aducto $ct\text{-ADN-M}_{1b} \cdot 6\text{NO}_3$ frente a la $[ct\text{-ADN}]$, y ajuste de los datos obtenido mediante el método de Thordarson.

Desafortunadamente, el caso del metalociclo M_{2b} es todavía más complejo, ya que en el caso de este metalociclo, la banda inducida $\lambda_{\text{max}} = 334 \text{ nm}$ propia del aducto con el $ct\text{-ADN}$, se ve solapada no sólo con una banda de absorción del metalociclo libre, sino con la absorción propia del $ct\text{-ADN}$, lo que imposibilita el cálculo de la constante de asociación mediante el método anteriormente explicado.

4. Parte experimental

4.1. General

Se han utilizado reactivos comerciales sin ninguna purificación adicional. El agua empleada, de calidad mili-Q, fue obtenida mediante un aparato Millipore Gradient A1.

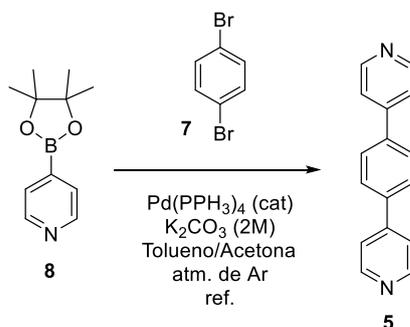
El seguimiento de las reacciones de síntesis se ha realizado mediante cromatografía en capa fina, haciendo uso de cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F254 y radiación ultravioleta (254 y 360 nm) como revelador. En la cromatografía en columna a presión se empleó gel de sílice Merck 60(230-400 mesh).

La caracterización mediante RMN se realizó con los espectrómetros Bruker Avance 500 (500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C con criosonda dual para ^1H y ^{13}C en experimentos de alta sensibilidad y sonda inversa BBI en experimentos a baja temperatura), y Bruker Avance 300 (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C). Para la preparación de las muestras a analizar, se han empleado agua deuterada (D_2O), cloroformo deuterado (CDCl_3) y acetonitrilo deuterado (CD_3CN), y se utilizó como referencia la señal del disolvente protonado residual. Los análisis por EM se realizaron en el SAI (Servicios de Apoyo á Investigación) de la Universidade da Coruña, empleando el espectrómetro LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite para ES de alta y baja resolución. Los espectros de UV-Vis fueron registrados mediante un espectrómetro monohaz Perkin Elmer Lambda 900. Los espectros de DC se registraron en un espectrómetro Jasco J-185, empleando cubetas de cuarzo con 1 cm de paso óptico y con las siguientes condiciones y parámetros: temperatura de 25 °C, rango 500-200 nm, ancho de banda: 1.0 nm, lapso de tiempo: 0.5 s, repeticiones: 4.

4.2. Síntesis de los ligandos $L_1 \cdot NO_3$ y $L_2 \cdot NO_3$

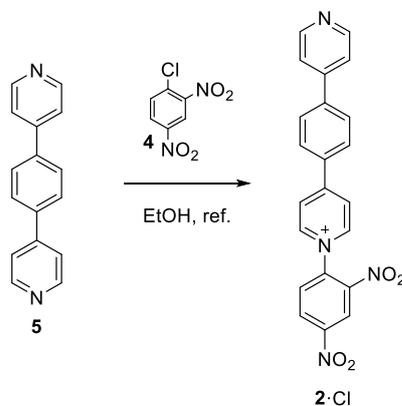
4.2.1. Síntesis del ligando $L_1 \cdot NO_3$

4.2.1.1. 1,4-di(piridin-4-il)benzeno **5**



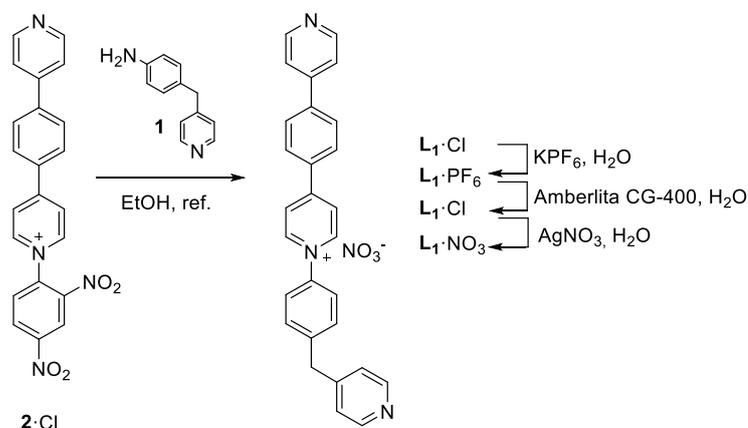
Se prepara una mezcla de éster pinacólico del ácido 4-piridinborónico (**8**, 765.8 mg, 3.73 mmol), 1,4- dibromofenilo (**7**, 403.1 mg, 1.71 mmol) y K_2CO_3 (1407 mg, 10.2 mmol), y se suspende en tolueno/metanol 4:1 (50 mL). Tras desgasificar esta mezcla con argón durante 10 min, se añade una cantidad catalítica de $Pd(PPh_3)_4$ y se calienta a ebullición durante 20 horas bajo atmósfera de argón. Tras enfriar a temperatura ambiente, el crudo se concentra en el rotavapor y se purifica mediante cromatografía en columna empleando AcOEt /MeOH 9:1 como eluyente. Se reúnen las fracciones que contienen el producto y se elimina el disolvente bajo presión reducida obteniéndose **5** como un sólido blanquecino (363 mg, 91 %). 1H -RMN (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8.70 (d, $J = 4.7$ Hz, 4H), 7.78 (s, 4H), 7.56 (d, $J = 6.2$ Hz, 4H). HR-ESI-MS (m/z) calculado para $[C_{16}H_{12}N_2]^+$ 233.1073; encontrado 233.1082.

4.2.1.2. *.Cloruro de 1-(2,4-dinitrofenil)-4-(4-(piridin-4-il)fenil)piridin-1-
io (2·Cl)*



Una disolución del producto **5** (333.8 mg, 1.437 mmol) en EtOH (89 mL) se calienta con agitación a 80°C. Una vez disuelto, se añade en intervalos de 10 minutos una disolución de 1-cloro-2,4-dinitrobenceno (203.1mg, 1.003 mmol) en 11 mL de EtOH. La mezcla resultante se calienta a 120°C durante 20 horas. Una vez finalizada la reacción, la mezcla se filtra a succión con 80 mL de CH₂Cl₂ y se lava con otros 40 mL de CH₂Cl₂. El precipitado amarillo obtenido se redissuelve en una mezcla 1:1 H₂O/MeOH (40 mL) y se concentra a sequedad en el rotavapor para obtener la sal **2·Cl** como un sólido beige (253.3 mg, 58%). ¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ 9.39 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 9.09 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.94 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H), 8.60 (d, *J* = 6.9 Hz, 4H), 8.26 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 8.17 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 8.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.79 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H).

4.2.1.3. *Nitrato de 4-(4-(piridin-4-il)fenil)-1-(4-(piridin-4-ilmetil)fenil)piridin-1-io ($L_1 \cdot NO_3$)*

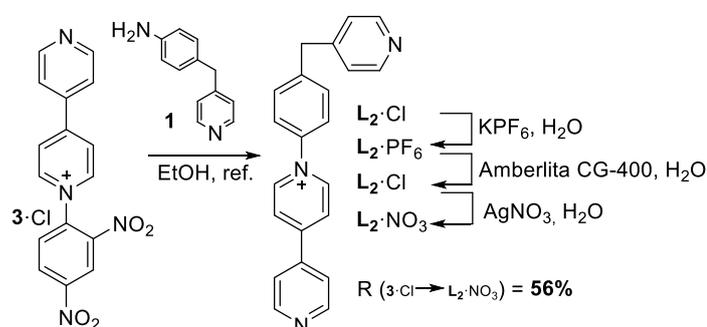


Se disuelve la **2·Cl** (495.6 mg, 1.140 mmol) en EtOH (25 mL), y se añade 4-(4-aminobencil)piridina (210.8mg, 1.144 mmol). La mezcla anaranjada se deja reaccionando a 113°C durante 36 horas. Tras completarse la reacción, la mezcla se concentra bajo presión reducida. El crudo resultante se redisuelve en una mezcla 4:16 H₂O/MeOH (60 mL) y se extrae con AcOEt (140 mL). Se concentra la fase acuosa a sequedad y se lleva a cabo la purificación del **1·Cl** mediante cromatografía en columna (SiO₂, CH₃CN/NaCl (aq.) (0.6 M)/ MeOH 4:1:1). Se juntan las fracciones que contienen el producto, se concentran en el rotavapor, se lavan con EtOH, y tras filtrar a succión y concentrar de nuevo, el sólido se disuelve en una mezcla 7:3 H₂O/MeOH (10 mL); se añade KPF₆ a la disolución hasta saturarla, dejando la mezcla en agitación durante 20 horas. Se forma un precipitado amarillo que se filtra y se lava con H₂O (50 mL). Este precipitado se redisuelve en 6 mL de CH₃CN y se concentra en el rotavapor para obtener el **L₁·PF₆** como un sólido blanco (54.1 mg; 9 %). ¹H-RMN (300 MHz, CD₃CN). δ 8.93 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 8.73 (d, $J = 5.4$ Hz, 2H), 8.55 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 8.49 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 8.18 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.05 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.77 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 5.3$ Hz, 2H), 4.21 (s, 2H).

El ligando **L₁·PF₆** (54.1 mg) se suspende en una mezcla 4:1 H₂O/MeOH (5.6 mL), se añade la resina intercambiadora de iones Amberlita CG-400 (927.5 mg) y se agita hasta la completa disolución del compuesto. Se elimina la resina por filtración con una mezcla 8:2 H₂O/MeOH y el filtrado se concentra en el rotavapor para obtener el **L₁·Cl** como un

sólido amarillento (33.5 mg, 78%). Se disuelve $L_1 \cdot Cl$ (33.5 mg, 0.0768 mmol) se disuelve en una mezcla 1:1 $H_2O/MeOH$ 1:1 (50 mL), se añade $AgNO_3$ (13 mg, 0.0769 mmol) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 12 horas protegiendo el medio de reacción de la luz. Se filtra sobre una capa de Celite® y el filtrado se concentra en el rotavapor para obtener $L_1 \cdot NO_3$ como un sólido amarillento (34 mg, 96%). 1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ 8.99 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 8.58 (sa, 2H), 8.49-8.41 (m, 4H), 8.10 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 7.98 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.36 (sa, 2H), 4.18 (s, 2H). ^{13}C -RMN (125 MHz, CD_3OD) δ 156.8 (C), 150.0 (CH), 149.3 (CH), 148.4 (C), 145.0 (CH), 144.2 (C), 143.5 (C), 140.1 (C), 137.5 (C), 132.7 (C), 128.7 (CH), 128.0 (CH), 127.6 (CH), 127.5 (CH), 124.9 (CH), 123.0 (CH), 121.6 (CH), 60.9 (CH_2). HR-ESI-MS (m/z) calculado para $[C_{28}H_{22}N_3]^+$ 400.1808; encontrado 400.1820.

4.2.1.4. Nitrato de 1-(4-(piridin-4-ilmetil)fenil)-[4,4'-bipiridin]-1-ilo $L_2 \cdot NO_3$



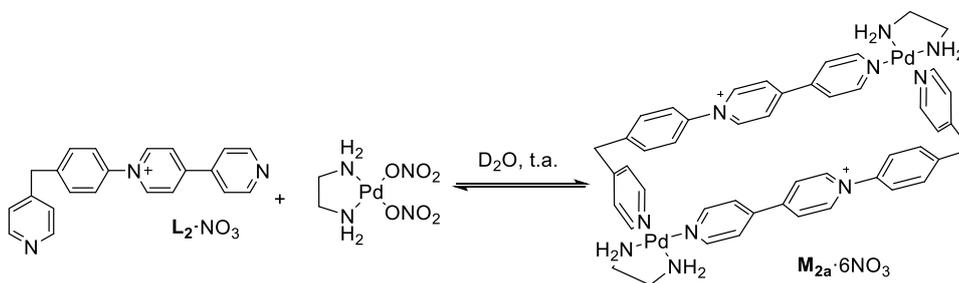
Una suspensión de *N*-(2,4-dinitrofenil)-4,4'-bipiridina (119.9 mg, 0.334 mmol) y 4-(4-aminobencil)piridina (166 mg, 0.837 mmol) en EtOH (50 mL) se calienta a ebullición durante 15 h. La mezcla se concentra en el rotavapor y se redisuelve en la mínima cantidad de H_2O mili-Q para llevar a cabo la extracción con AcOEt (60 mL). Se concentra la fase acuosa casi hasta sequedad y se añade KPF_6 hasta saturar la disolución, y se agita durante un día. Se filtra el precipitado amarillo obtenido con H_2O mili-Q, se redisuelve en la mínima cantidad de CH_3CN y se lleva a sequedad en el rotavapor. Se obtiene el $L_2 \cdot PF_6$ como un sólido blanco (182.4 mg, 70 %). 1H -RMN (300 MHz, CD_3CN) δ 9.01 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H), 8.90 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 8.54 (d, $J = 6.0$ Hz,

2H), 8.48 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 7.88 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.29 (d, $J = 5.6$ Hz, 2H), 4.18 (s, 2H). HR-ESI-MS (m/z) calculado para $[\text{C}_{22} \text{H}_{18} \text{N}_3]^+$ 324.1495; encontrado 324.1510.

El ligando $\text{L}_2 \cdot \text{PF}_6$ se suspende en H_2O mili-Q (26 mL), se añade una resina intercambiadora de iones Amberlita CG-400 (575.7 mg) y se agita hasta la completa disolución del sólido. Se elimina la resina por filtración con una mezcla 8:2 $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ y el filtrado se concentra en el rotavapor para obtener el $\text{L}_2 \cdot \text{Cl}$ como un sólido amarillento (131.6 mg, 90 %). Posteriormente, el ligando $\text{L}_2 \cdot \text{Cl}$ se disuelve en 54 mL de H_2O mili-Q, se añade AgNO_3 (61.9 mg, 0.364 mmol), se protege el medio de reacción de la luz y se deja agitando a temperatura ambiente durante un día. Se filtra la mezcla sobre una capa de Celite® y el filtrado se concentra en el rotavapor para obtener $\text{L}_2 \cdot \text{NO}_3$ (126.3 mg, 89 %). ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ 9.18 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 8.81 (d, $J = 5.5$ Hz, 2H), 8.56 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 8.44 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 7.99 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 7.75 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 5.0$ Hz, 2H), 4.21 (s, 2H).

4.3. Autoensamblaje de los ligandos $\text{L}_1 \cdot \text{NO}_3$ y $\text{L}_2 \cdot \text{NO}_3$ dirigido por los centros metálicos de Pd(II) y Pt(II)

4.3.1. Autoensamblaje de $\text{L}_2 \cdot \text{NO}_3$ dirigido por el complejo (en) $\text{Pd}(\text{ONO}_2)_2$

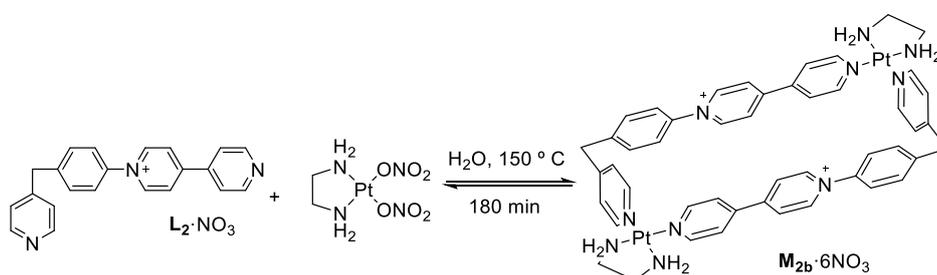


En un vial se prepara una disolución *stock* 20 mM del ligando $\text{L}_2 \cdot \text{NO}_3$ (19.2 mg, 0,0497 mmol) en D_2O (5 mL) a la que se adiciona el complejo **3** (14.5 mg, 0,0499 mmol). Se deja reaccionando a temperatura ambiente para obtener el metalociclo $\text{M}_{2a} \cdot 6\text{NO}_3$ en una concentración 10 mM. ^1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ 9.00 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 8.95 (d, $J = 6.5$ Hz, 4H), 8.64 (d, $J = 6.1$ Hz, 4H), 8.33 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H),

7.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 4H), 7.55 (d, $J = 6.3$ Hz, 8H), 7.53 (s, 4H), 4.17 (s, 4H), 2.94 (s, 8H).

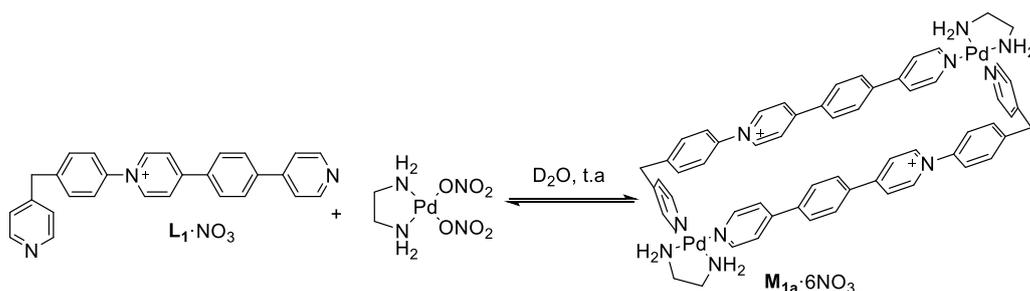
Para el estudio del rango de concentraciones de trabajo [0.10-10] mM, se prepararán las disoluciones correspondientes mediante dilución de la disolución *stock* de ligando $L_2 \cdot NO_3$.

4.3.2. Autoensamblaje de $L_2 \cdot NO_3$ dirigido por el complejo $(en)Pt(ONO_2)_2$



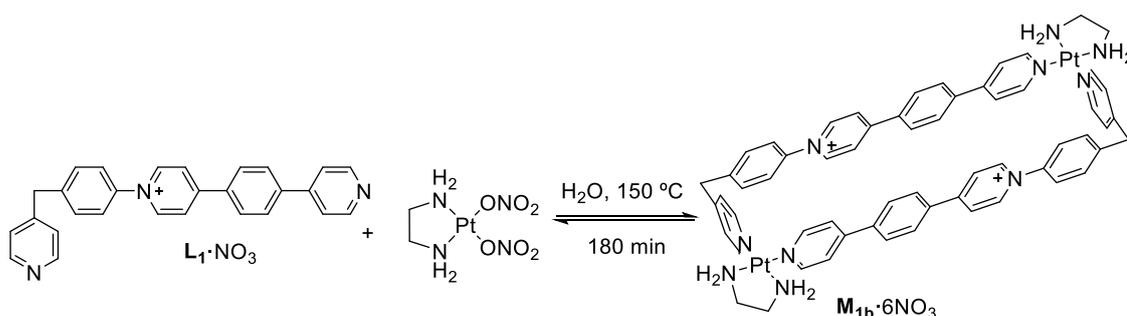
En un tubo de microondas se prepara una disolución del ligando $L_2 \cdot NO_3$ (4,8 mg, 0,0125 mmol) junto con el complejo **3** (4.7 mg, 0,0124 mmol) a la que se adiciona H_2O (19 mL). Esta disolución se somete a un calentamiento en el horno microondas a 150 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, la disolución se concentra a sequedad en el rotavapor, obteniéndose el metalociclo $M_{2b} \cdot 6NO_3$ como un sólido parduzco (17 mg, 89 %). 1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ 9.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 8.98 (d, $J = 6.9$ Hz, 4H), 8.67 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H), 8.36 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 7.94 (d, $J = 6.1$ Hz, 4H), 7.55 (s, 12H), 4.20 (s, 8H), 2.86 (s, 8H).). HR-ESI-MS (m/z) calculado para $[M-4PF_6]^{4+}$ 362.0733, encontrado 362.0740.

4.3.3. Autoensamblaje de $L_1 \cdot NO_3$ dirigido por el complejo $(en)Pd(ONO_2)_2$



En un vial se prepara una disolución del ligando $L_1 \cdot NO_3$ (1.6 mg, 0.0035 mmol) en D_2O (6 ml) a la que se adiciona el complejo **3** (1.4 mg, 0.0048 mmol). La reacción tiene lugar a temperatura ambiente, obteniéndose el metalociclo $M_{1a} \cdot 6NO_3$ a una concentración 2.0 mM. 1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ 8.79 – 8.70 (m, 8H), 8.68 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 8.31 (d, $J = 7.1$ Hz, 4H), 7.97 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.86 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.71 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 7.53 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 7.36 (s, 8H), 4.13 (s, 4H), 2.93 (s, 4H). ^{13}C -RMN (125 MHz, D_2O) δ 155.6 (C), 155.1 (C), 151.2 (CH), 149.7 (CH), 143.7 (CH), 143.4 (C), 140.2 (C), 139.0 (C), 134.6 (C), 130.3 (CH), 128.7 (CH), 128.4 (CH), 127.0 (CH), 124.7 (CH), 123.9 (CH), 46.6 (CH₂), 46.6 (CH₂) 40.0 (CH₂).

4.3.4. Autoensamblaje de $L_1 \cdot NO_3$ dirigido por el complejo $(en)Pt(ONO_2)_2$



En un tubo de microondas se prepara una disolución del ligando $L_1 \cdot NO_3$ (3.4 mg, 0,0074 mmol) en H_2O (19 mL) a la que se adiciona el complejo **3** (2.8 mg, 0,0096 mmol). Esta disolución se somete a un calentamiento en el horno microondas a 150 °C durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, la disolución se concentra a sequedad en el rotavapor, obteniéndose el $M_{1b} \cdot 6NO_3$ como un sólido parduzco (12 mg, 97%). 1H -RMN (300 MHz, D_2O) δ 9.01 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 8.98 (d, $J = 6.9$ Hz, 4H), 8.67 (d, $J = 6.3$ Hz, 4H), 8.36 (d, $J = 6.8$, 4H), 7.94 (d, $J = 6.1$ Hz, 4H), 7.55 (d, $J = 8.5$ Hz, 12H), 7.71 (d, $J = 5.9$ Hz, 4H), 7.53 (d, $J = 6.8$ Hz, 4H), 7.36 (s, 8H), 4.13 (s, 4H), 2.86 (s, 8H). HR-ESI-MS (m/z) calculado para $[M-2PF_6]^{+2}$ 945.1427, encontrado 945.1463.

4.4. Estudio de la interacción de $M_{2b} \cdot 6NO_3$ y $M_{1b} \cdot 6NO_3$ con *ct*-ADN

La zona de trabajo ha de esterilizarse previamente para evitar cualquier contaminación que pueda afectar al *ct*-ADN.

4.4.1. Preparación de las disoluciones.

4.4.1.1. Preparación de la disolución tampón Tris

En un matraz aforado se añaden 2.5 mL de una disolución de Tris 0.5 M, 5 mL de una disolución de KCl 0.5 M y se complete con H₂O hasta 25 mL, obteniéndose una disolución tampón 50 mM en Tris-HCl y 100 mM en KCl (pH 7.5).

4.4.1.2. Preparación de las disoluciones stock de *ct*-ADN, $M_{1b} \cdot 6NO_3$ y $M_{2b} \cdot 6NO_3$

En la Tabla 2 se recogen los datos relativos a la preparación de las disoluciones *stock* de *ct*-ADN y de los metalociclos de Pt(II) que se emplearán en las medidas.

Tabla 2. Datos de la preparación de las disoluciones *stock* de *ct*-ADN, $M_{1b} \cdot 6NO_3$ y $M_{2b} \cdot 6NO_3$.

	Volumen <i>stock ct</i> - ADN (μL)	Masa $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (mg)	Masa $M_{2b} \cdot 6NO_3$ (mg)	Volumen disolución tampón (μL)	[2x] (μM)
Disolución <i>stock</i> de <i>ct</i> -ADN	500	-	-	5000	1505
Disolución <i>stock</i> de $M_{1b} \cdot 6NO_3$	-	-	0.72	2000	235
Disolución <i>stock</i> de $M_{2b} \cdot 6NO_3$	-	0.72	-	2000	235

4.4.1.3. Preparación de otras tres disoluciones de metalociclo y *ct*-ADN

Se preparan otras dos disoluciones, denominadas 2X, de metalociclo y *ct*-ADN con el objetivo de mantener constante la concentración de uno de ellos en función de la técnica utilizada (Tabla 3): en DC se mantendrá constante la concentración de *ct*-ADN, mientras que en la valoración UV-Vis se mantendrá constante la del metalociclo correspondiente.

Tabla 3. Datos de la valoración por DC del metalociclo $M_{2b} \cdot NO_3$.

	Volumen stock <i>ct</i> -ADN (μ L)	Volumen stock $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (μ L)	Volumen stock $M_{2b} \cdot 6NO_3$ (μ L)	Volumen disolución tampón Tris (μ L)	[2x] (μ M)
Disolución 2X de <i>ct</i> -ADN	63	-	-	887	100
Disolución 2X de $M_{1b} \cdot 6NO_3$	-	170	-	830	50
Disolución 2X de $M_{2b} \cdot 6NO_3$	-	-	215	785	50

4.4.2. Dicroísmo Circular

En la cubeta de medida 1837 μ L de disolución tampón Tris y 63 μ L de la disolución *stock* del *ct*-ADN. Una vez realizada la primera medida, se van añadiendo sucesivas alícuotas de disolución *stock* del metalociclo en cuestión, y a su vez el mismo volumen de la disolución de *ct*-ADN destinada a mantener la concentración de la doble hélice constante. En las Tablas 4 y 5 se recogen los volúmenes añadidos durante las medidas efectuadas.

Tabla 4. Datos de la valoración por DC del metalociclo $M_{2b} \cdot NO_3$.

[<i>ct</i> -ADN] (μ M)	[$M_{2b} \cdot 6NO_3$] (μ M)	Volumen total añadido de $M_{2b} \cdot 6NO_3$ (μ L)	Volumen añadido de $M_{2b} \cdot 6NO_3$ (μ L)	Volumen 2X <i>ct</i> -ADN (μ L)	Volumen total (μ L)
79,05	0,00	0	0,00	0,00	1900,00
79,05	0,51	4,1	4,10	4,10	1908,20
79,05	1,01	8,2	4,10	4,10	1916,40
79,05	1,50	12,32	4,12	4,12	1924,64
79,05	2,00	16,48	4,16	4,16	1932,96
79,05	2,50	20,68	4,20	4,20	1941,36
79,05	5,00	42,2	21,52	21,52	1984,40
79,05	7,39	63,72	21,52	21,52	2027,44
79,05	9,68	85,24	21,52	21,52	2070,48
79,05	14,27	131,24	46,00	46,00	2162,48
79,05	18,48	177,24	46,00	46,00	2254,48
79,05	26,56	277,24	100,00	100	2454,48
79,05	33,41	377,24	100,00	100	2654,48
79,05	39,31	477,24	100,00	100	2854,48

Tabla 5. Datos de la valoración por DC del metalociclo $M_{1b} \cdot NO_3$.

[ct -ADN] (μM)	[$M_{1b} \cdot 6NO_3$] (μM)	Volumen total añadido de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (μL)	Volumen añadido de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (μL)	Volumen 2X ct -ADN (μL)	Volumen total (μL)
82,20	0,00	0	0,00	0,00	1900,00
82,20	0,50	4,34	4,34	4,34	1908,68
82,20	1,00	8,72	4,38	4,38	1917,44
82,20	1,50	13,14	4,42	4,42	1926,28
82,20	2,00	17,6	4,46	4,46	1935,20
82,20	2,50	22,1	4,50	4,50	1944,20
82,20	4,99	45,24	23,14	23,14	1990,48
82,20	9,99	94,99	49,75	49,75	2089,98
82,20	14,55	144,99	50,00	50,00	2189,98
82,20	22,52	244,99	100,00	100,00	2389,98
82,20	29,27	344,99	100,00	100,00	2589,98

4.4.3. Valoración UV-Vis

Se sigue el mismo procedimiento que para las medidas de DC. En las Tabla 6 se recogen los datos relativos a la valoración UV-Vis del metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$.

Tabla 6. Datos de la valoración por UV-Vis del metalociclo $M_{1b} \cdot NO_3$.

[ct -ADN] (μM)	[$M_{2b} \cdot 6NO_3$] (μM)	Volumen total añadido de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (μL)	Volumen añadido de $M_{1b} \cdot 6NO_3$ (μL)	Volumen 2X ct-ADN (μL)	Volumen total (μL)
24,96	0,00	0,00	0,00	0,00	2000,00
24,96	2,50	3,21	3,21	3,21	2006,43
24,96	4,99	6,45	3,24	3,24	2012,90
24,96	7,49	9,71	3,26	3,26	2019,41
24,96	9,96	12,95	3,24	3,24	2025,90
24,96	12,45	16,25	3,30	3,30	2032,50
24,96	14,95	19,57	3,32	3,32	2039,14
24,96	17,45	22,91	3,34	3,34	2045,83
24,96	19,94	26,28	3,36	3,36	2052,56
24,96	22,44	29,66	3,39	3,39	2059,33
24,96	24,93	33,07	3,41	3,41	2066,15
24,96	27,40	36,47	3,40	3,40	2072,94
24,96	33,47	44,90	8,43	8,43	2089,81

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, se han cumplido los siguientes objetivos establecidos para este trabajo de fin de grado:

1. Se han sintetizado con éxito los dos ligandos derivados de N-monoaril-4,4'-bipiridina $\mathbf{L}_1 \cdot \text{NO}_3$ y $\mathbf{L}_2 \cdot \text{NO}_3$, con rendimientos globales del 7 y 56%, respectivamente. Todos los análisis realizados confirmaron su obtención.

2. Se han preparado los cuatro metalociclos rectangulares dinucleares $\mathbf{M}_{1a,b} \cdot 6\text{NO}_3$ y $\mathbf{M}_{2a,b} \cdot 6\text{NO}_3$, de tipo M_2L_2 , pudiendo confirmar este hecho en base a los espectros de RMN registrados de las cuatro especies metalocíclicas, en buen acuerdo con lo esperado.

3. Mediante las técnicas DC y UV-Vis se ha podido confirmar la interacción entre el *ct*-ADN y los metalociclos de Pt(II), $\mathbf{M}_{1b} \cdot 6\text{NO}_3$ y $\mathbf{M}_{2b} \cdot 6\text{NO}_3$; en particular:

a. El DC confirma cualitativamente la interacción esperada al observarse una banda inducida en los espectros registrados para cada uno de los metalociclos, resultado de un cambio de quiralidad del *ct*-ADN por extensión o contracción de la hebra al producirse la interacción con los metalociclos en cuestión.

b. En el caso de $\mathbf{M}_{2b} \cdot \text{NO}_3$, la realización de una valoración con *ct*-ADN por UV-Vis permite: a) corroborar la aparición de un *aducto* que refleja la interacción esperada, con una banda asociada a dicho compuesto cuya absorción aumenta al incrementar la concentración de ADN en el medio, y b) la estimación del valor de la constante de asociación (K_a) del *aducto*, obteniéndose un valor de $2.94 \cdot 10^4 \pm 0.192 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ para la interacción entre el $\mathbf{M}_{2b} \cdot \text{NO}_3$ y el *ct*-ADN.

c. El solapamiento de las bandas de absorción para $\mathbf{M}_{1b} \cdot \text{NO}_3$, el *ct*-ADN y *aducto*, dificulta la obtención de la constante de asociación para este agregado mediante UV-vis, no realizándose dicha estimación en el presente trabajo.

CONCLUSIONS

According to the results reported in this work, the following objectives have been achieved:

1. The *N*-monoaryl-4,4'-bipyridine-based ligands, $L_1 \cdot NO_3$ and $L_2 \cdot NO_3$, were successfully synthesized with overall yields of 7 and 56 %, respectively. The characterization tests carried out for these compounds were in good agreement with the expected results.

2. Four dinuclear rectangular metallacycles, $M_{1a,b} \cdot 6NO_3$ and $M_{2a,b} \cdot 6NO_3$, were prepared and characterized by means of NMR spectroscopy, with the obtained results in good agreement with those expected

3. Through CD and UV-Vis techniques it was possible to confirm the interaction between *ct*-DNA and the obtained Pt(II) metallacycles, $M_{1b} \cdot 6NO_3$ y $M_{2b} \cdot 6NO_3$; particularly:

a. CD qualitatively confirms the expected interaction, by the occurrence of induced bands in the registered spectra for the adducts, due to a chirality change on the *ct*-DNA, with the strand extended or contracted as a result of the interaction with the metallacycles.

b. UV-Vis titration for $M_{2b} \cdot 6NO_3$ allows to: a) corroborate the existence of an *aduct* which reflects the expected interaction, with an associated band of the aggregate which appears with an absorption that increases at the same time as the DNA concentration does at the medium, and b) the estimation of the association constant $K_a = 2.94 \cdot 10^4 \pm 0.192 \cdot 10^4 M^{-1}$ for the *ct*-AND- $M_{2b} \cdot NO_3$ aggregate.

c. The overlapping between the absorption bands for the three species $M_{1b} \cdot NO_3$, *ct*-ADN and adduct, hinders the estimation of the association constant for the *ct*-AND- $M_{1b} \cdot NO_3$ aggregate, which was not calculated in this work.

CONCLUSIONES

De acordo cos resultados obtidos, cumpríronse os seguintes obxectivos establecidos para este traballo de fin de grado:

1. Sintetizáronse con éxito os dous ligandos derivados de *N*-monoaril-4,4'-bipiridina $L_1 \cdot NO_3$ e $L_2 \cdot NO_3$, con rendementos globais do 7 e 56 %, respectivamente. Todos as análises realizadas confirmaron a súa obtención.

2. Preparáronse os catro metalociclos rectangulares dinucleares $M_{1a,b} \cdot 6NO_3$ e $M_{2a,b} \cdot 6NO_3$, de tipo M_2L_2 , podendo confirmar este feito en base a os espectros de RMN rexistrados para as catro especies, en bo acordo co esperado.

3. Mediante as técnicas de DC e UV-Vis púidose confirmar a interacción entre *ct*-ADN e os metalociclos de Pt(II), $M_{1b} \cdot 6NO_3$ e $M_{2b} \cdot 6NO_3$; en particular:

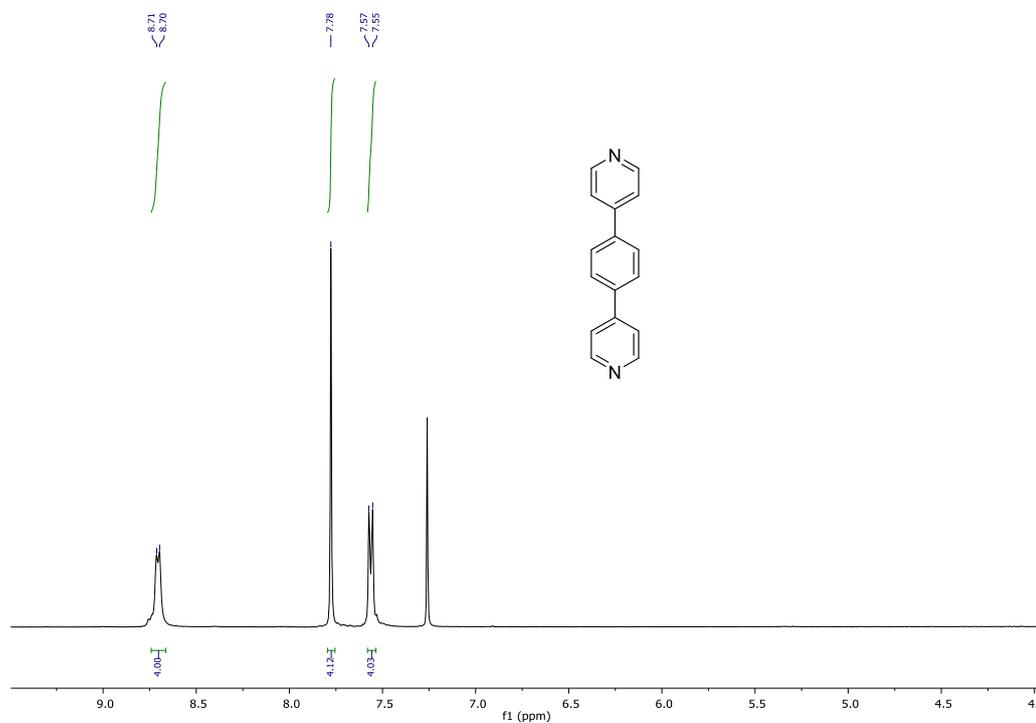
a. O DC confirma cualitativamente a interacción esperada, ao observarse unha banda inducida nos espectros rexistrados para cada un dos metalociclos, resultado dun cambio de quiralidade do *ct*-ADN por extensión ou contracción da hélice ao producirse a interacción cos metalociclos en cuestión.

b. No caso de $M_{2b} \cdot NO_3$, a realización de unha valoración con *ct*-ADN por UV-Vis permite: a) corroborar a aparición dun aducto que reflexa a interacción esperada, con unha banda asociada a este composto cuxa absorción aumenta ao incrementar a concentración de ADN no medio, e b) a estimación do valor da constante de asociación (K_a) do *aducto*, obténdose un valor de $2.94 \cdot 10^4 \pm 0.192 \cdot 10^4 M^{-1}$ para a interacción entre el $M_{2b} \cdot NO_3$ e o *ct*-ADN.

c. O solapamento das bandas de absorción para $M_{1b} \cdot NO_3$, *ct*-ADN e aducto, dificulta a obtención da constante de asociación para este agregado mediante UV-vis, non realizándose esta estimación no presente traballo.

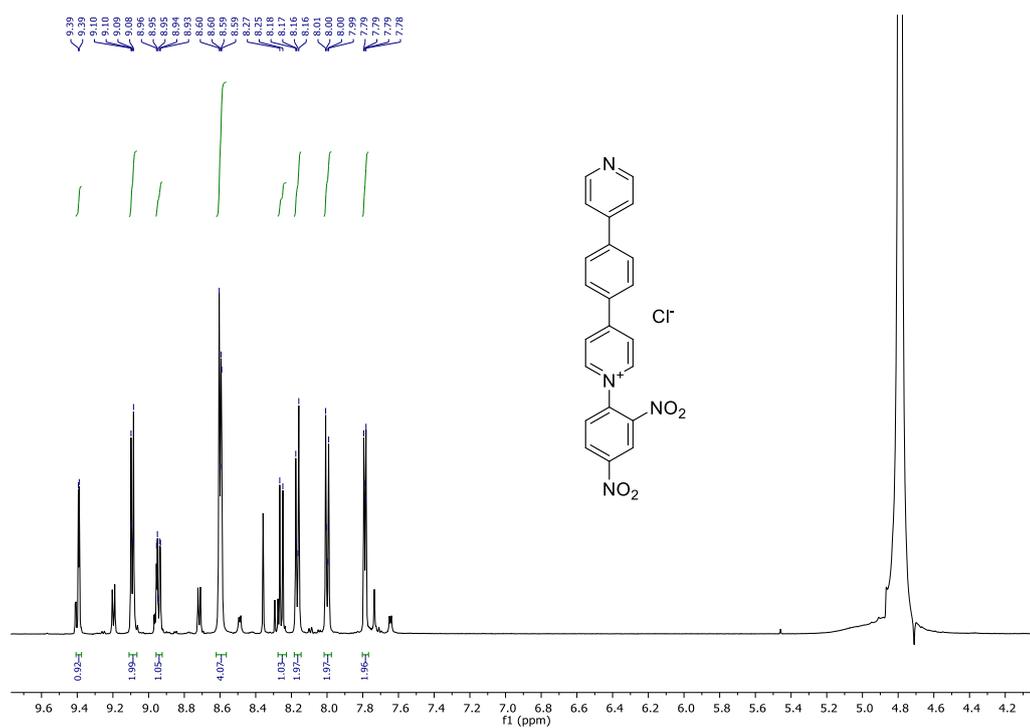
Anexo

Compuesto 5



Espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) de **5**.

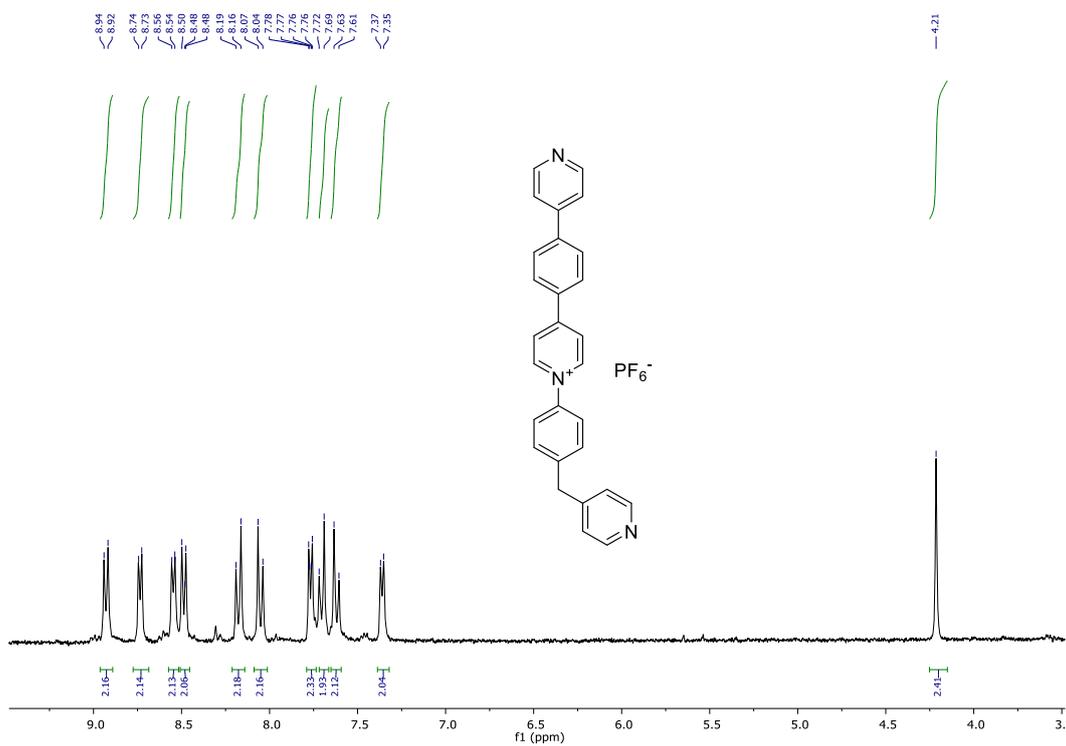
Compuesto 2·Cl



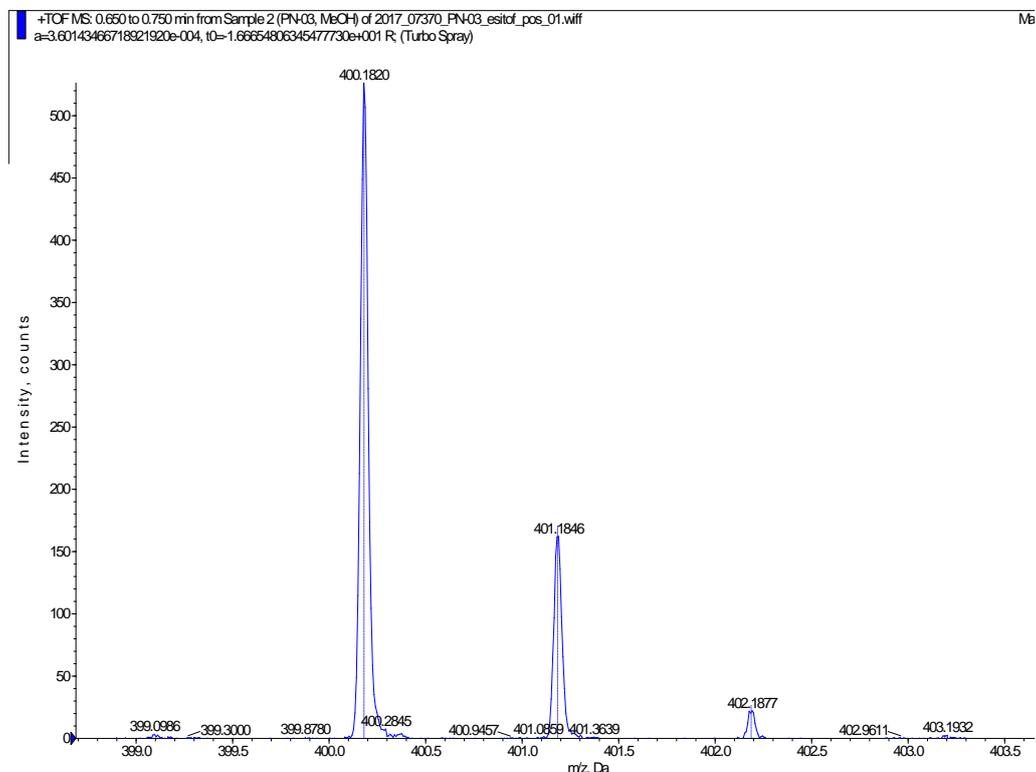
Espectro de ^1H -RMN (500 MHz, D_2O) de **2·Cl**.

ii

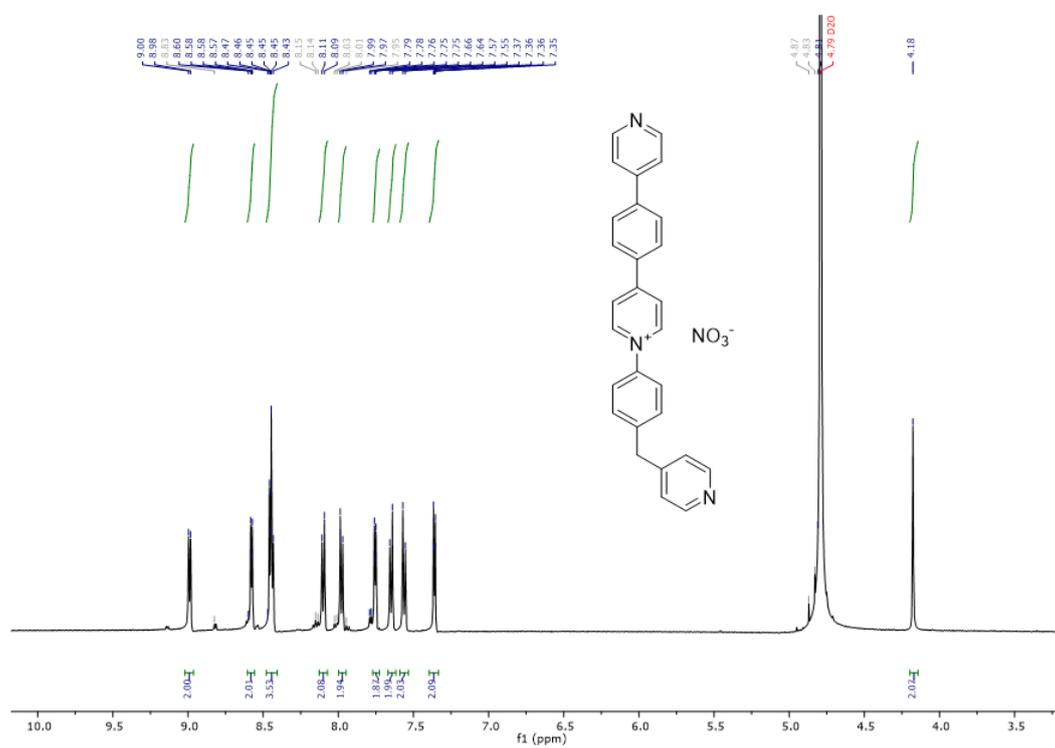
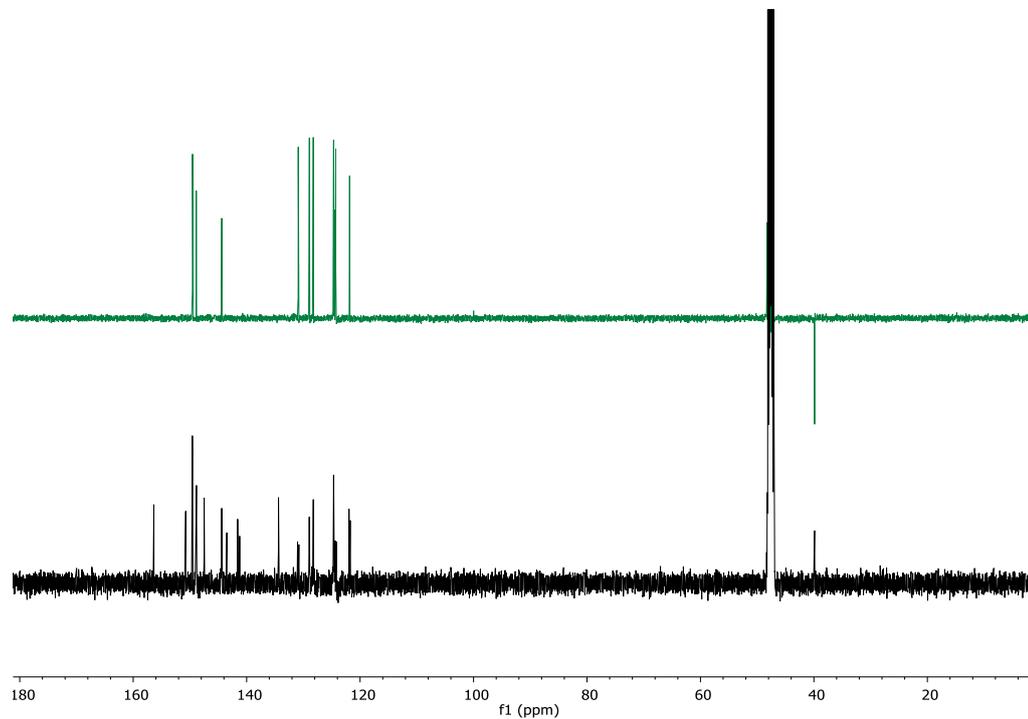
Ligando $L_1 \cdot PF_6$

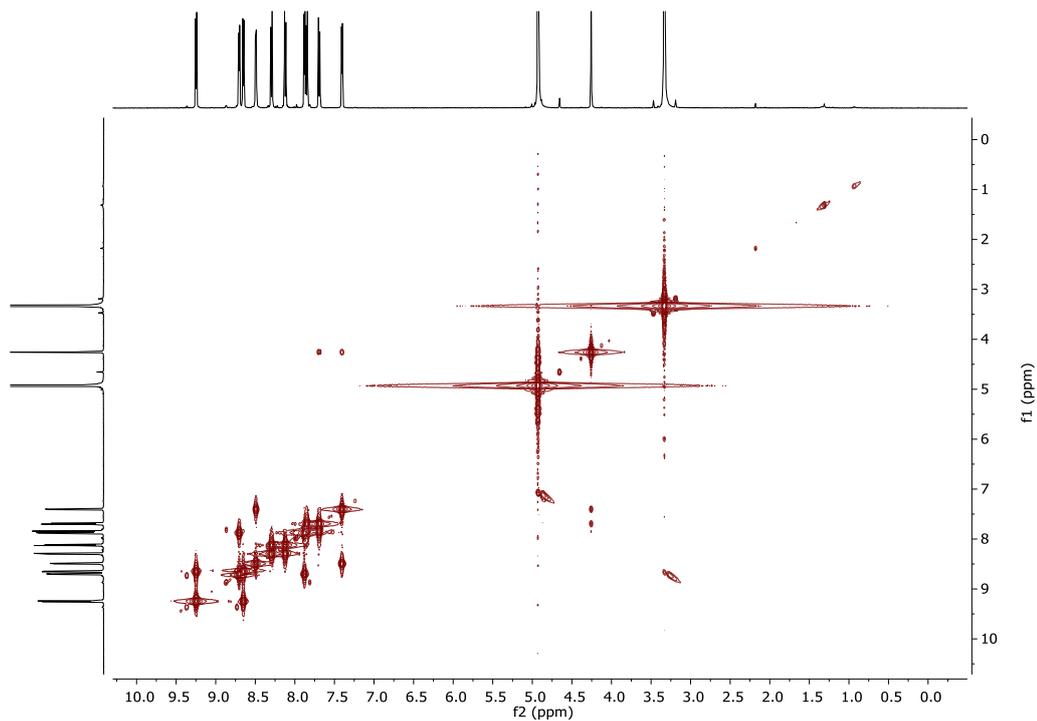


Espectro de 1H -RMN (300 MHz, CD_3CN) de $L_1 \cdot PF_6$.

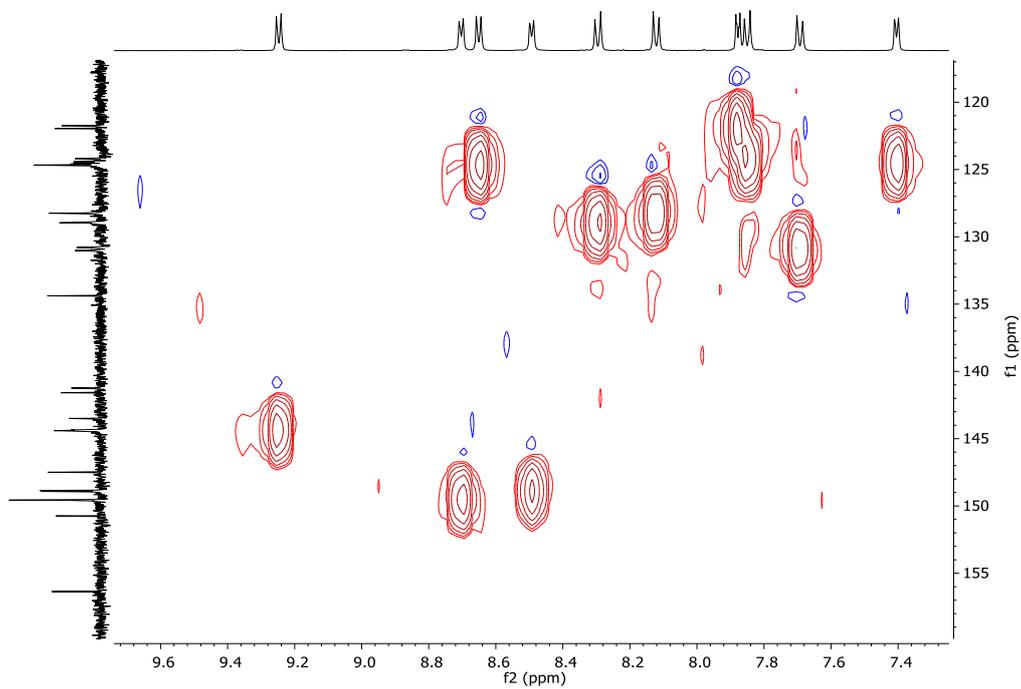


Espectro de HR-ESI-MS del ligando $L_1 \cdot PF_6$.

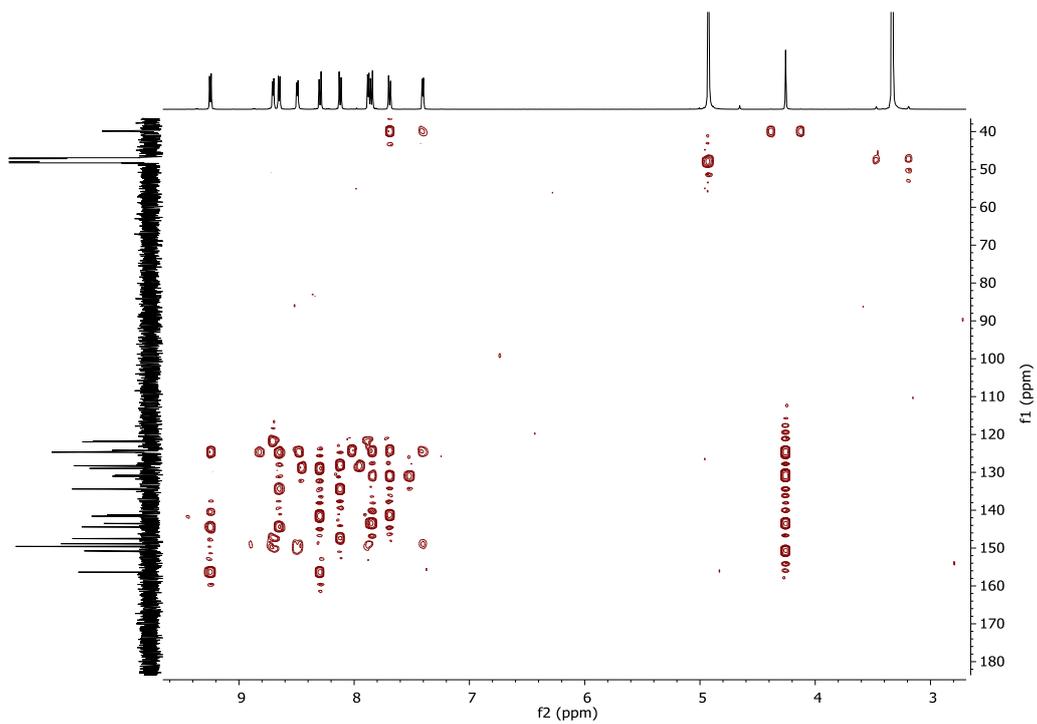
Ligando $L_1 \cdot NO_3$ Espectro de 1H -RMN (300 MHz, D_2O) de $L_1 \cdot NO_3$.Espectro de ^{13}C -RMN (arriba) y DEPT (abajo) de $L_1 \cdot NO_3$.



Experimento COSY realizado para el $L_1 \cdot NO_3$.

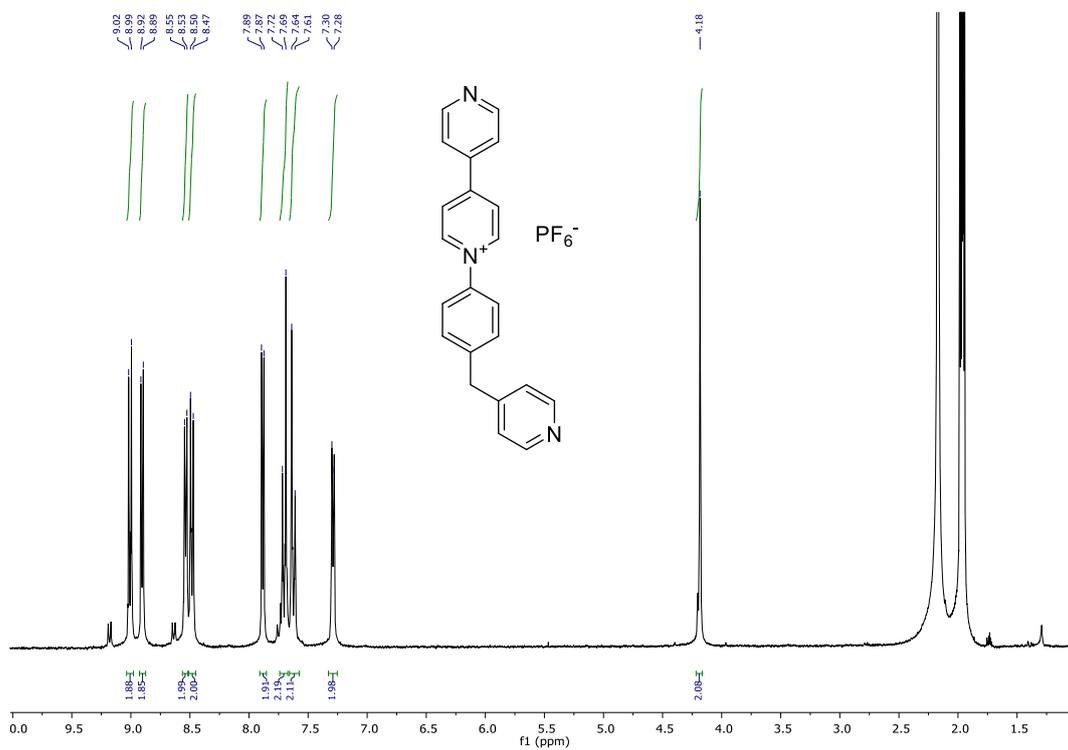


Experimento HSQC realizado para el $L_1 \cdot NO_3$.

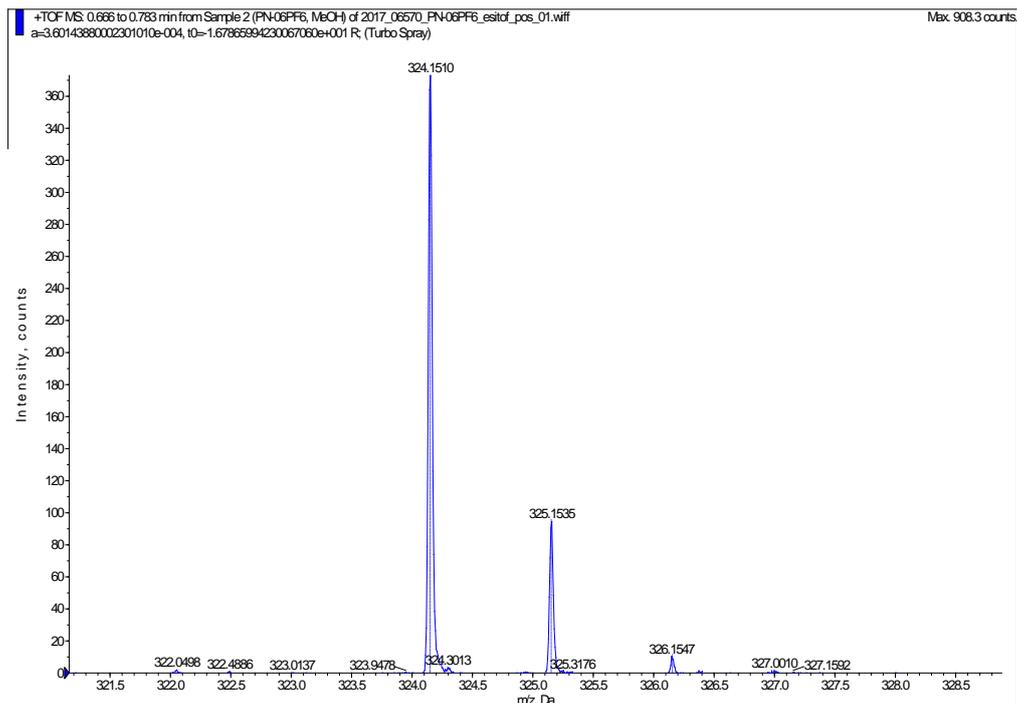
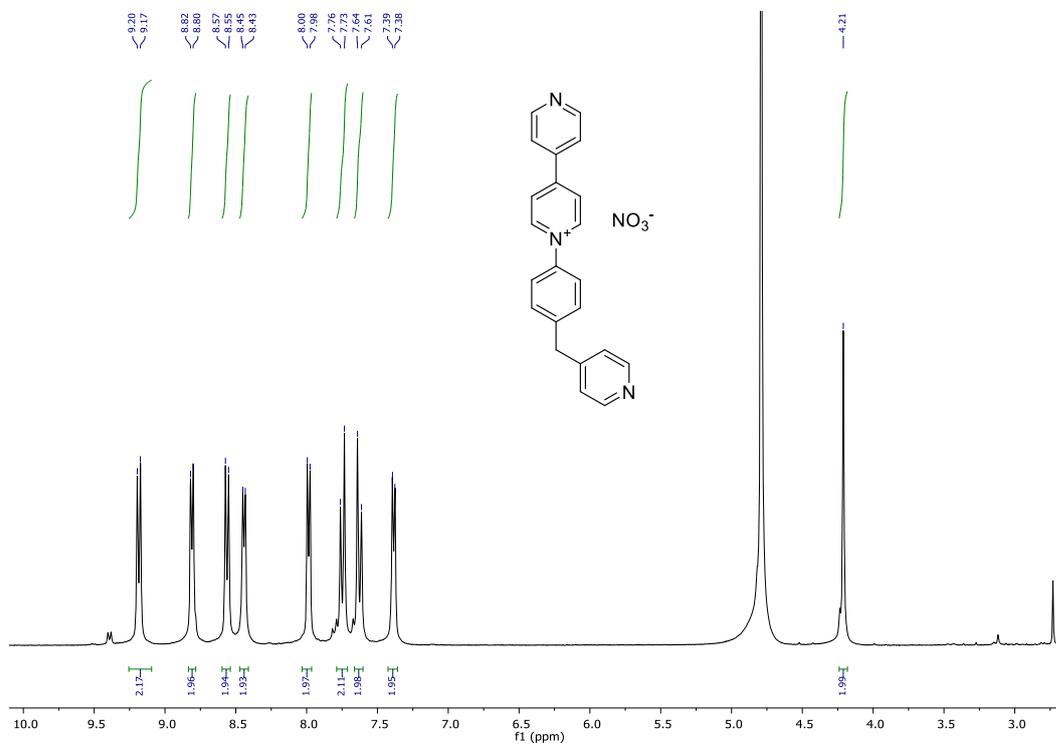


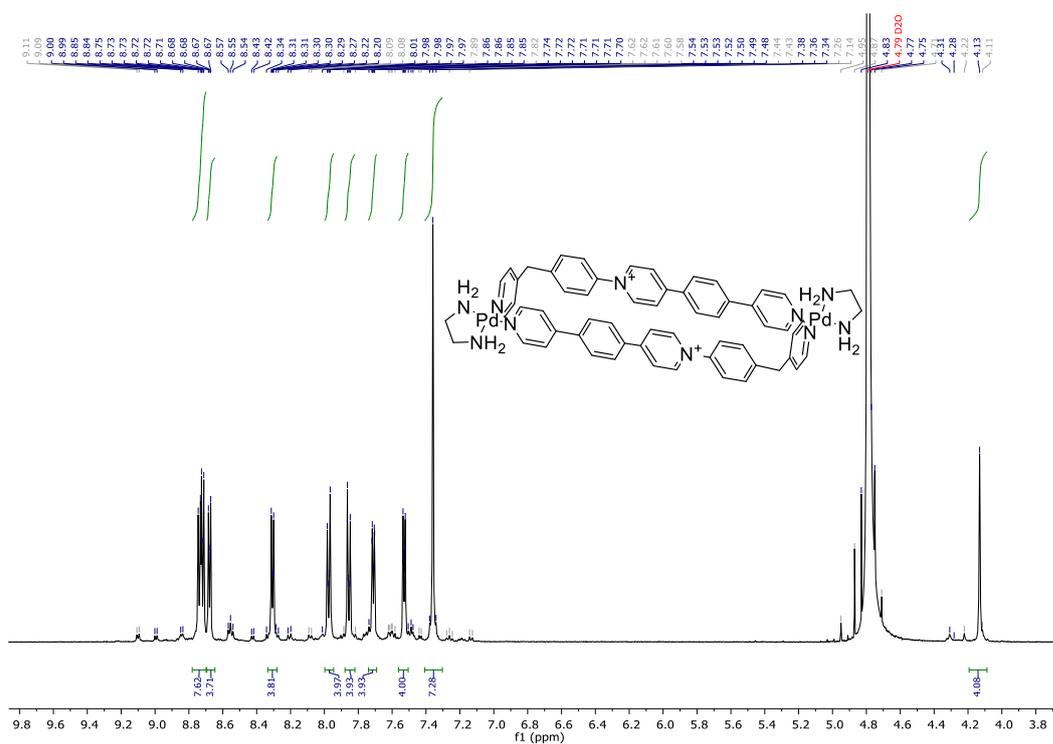
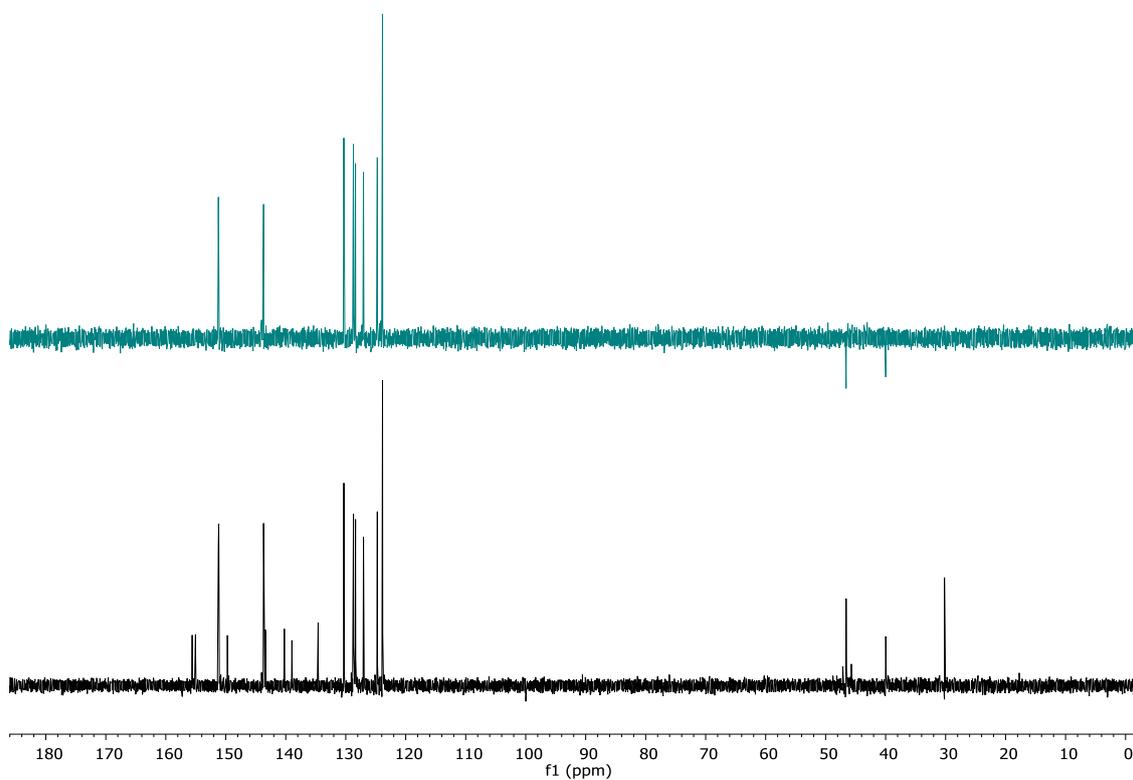
Experimento HMBC realizado para el $L_1 \cdot NO_3$.

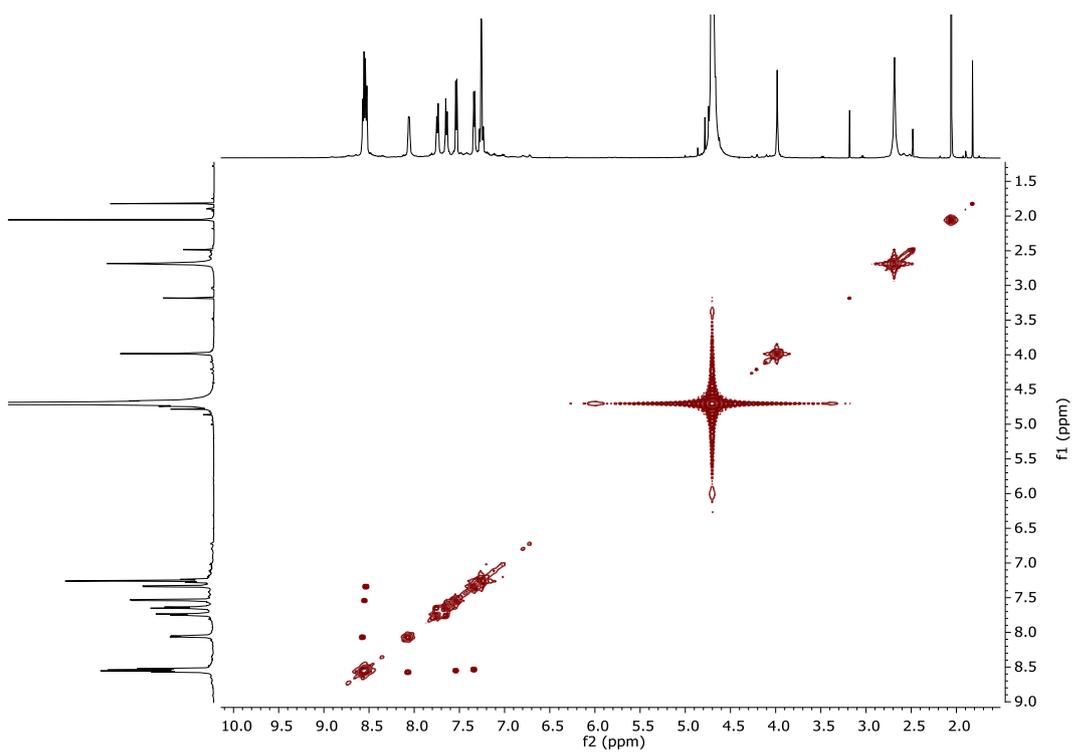
Ligando $L_2 \cdot PF_6$



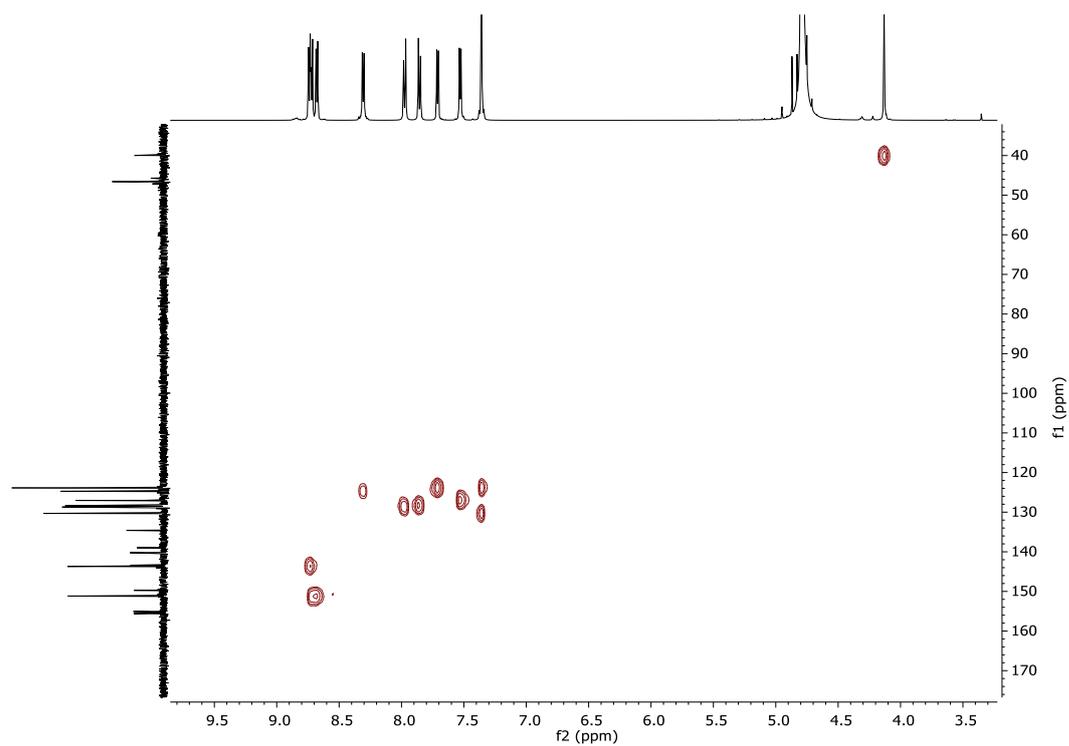
Espectro de 1H -RMN (300 MHz, CD_3CN) de $L_2 \cdot PF_6$.

Espectro de HR-ESI-MS del ligando $L_2 \cdot PF_6$ Ligando $L_2 \cdot NO_3$ Espectro de 1H -RMN (300 MHz, D_2O) de $L_2 \cdot NO_3$.

Metalociclo $M_{1a} \cdot 6NO_3$ Espectro de 1H -RMN (300 MHz, D_2O) de una disolución 2.0 mM de $M_{1a} \cdot 6NO_3$.Espectro de ^{13}C -RMN (arriba) y DEPT (abajo) de $M_{1a} \cdot NO_3$.

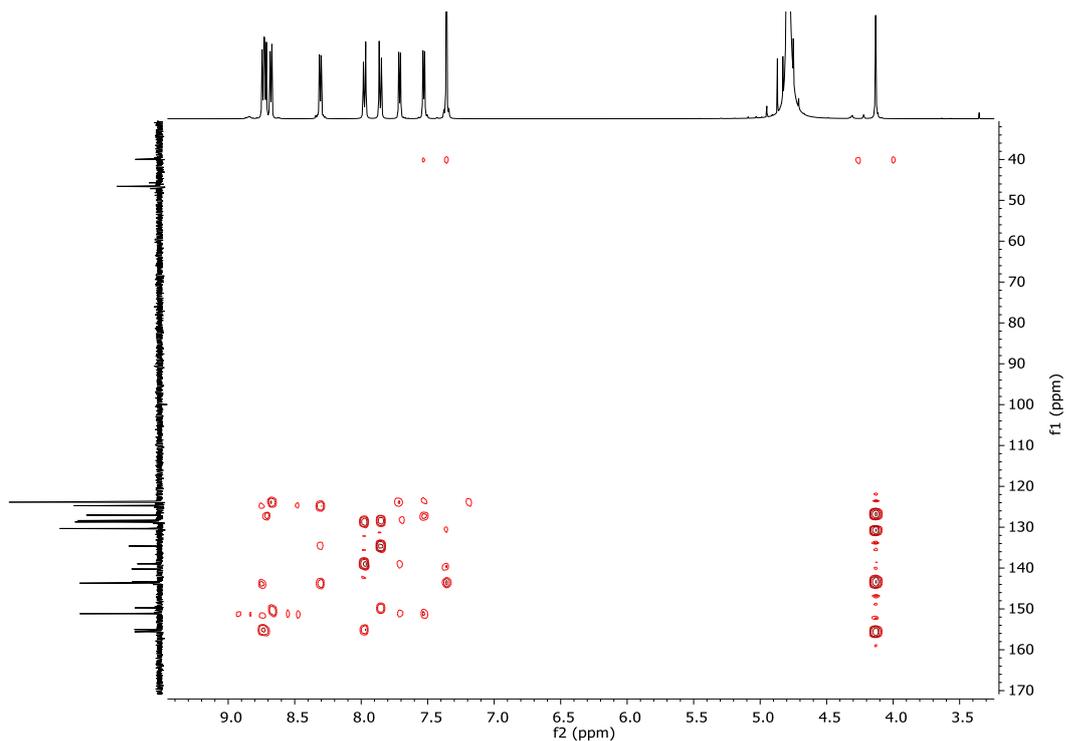


Experimento COSY realizado para el $M_{1a} \cdot 6NO_3$.



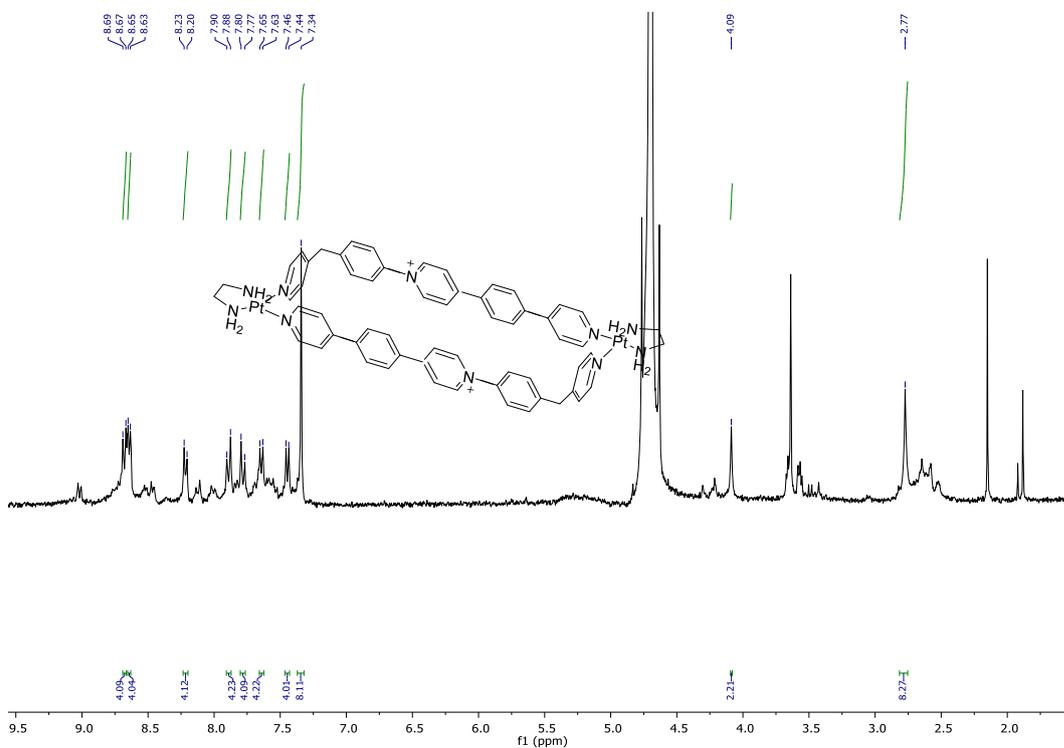
Experimento HSQC realizado para el $M_{1a} \cdot 6NO_3$.

X



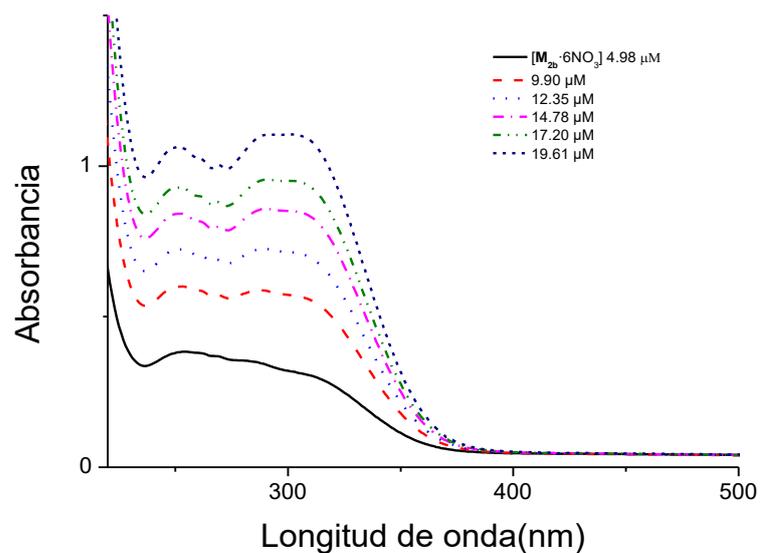
Experimento HMBC realizado para el $M_{1a} \cdot 6NO_3$.

Metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$

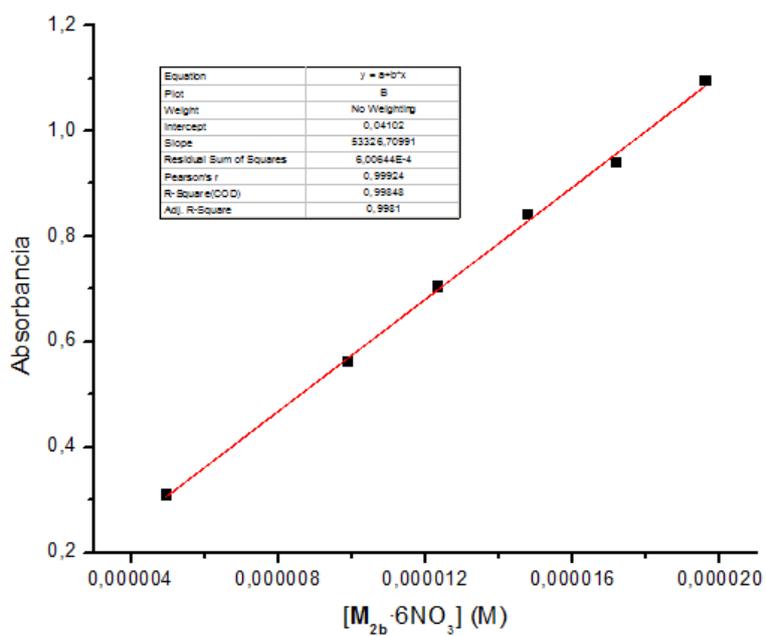


Espectro de 1H -RMN (300 MHz, D_2O) de una disolución 1.25 mM de $M_{1b} \cdot 6NO_3$.

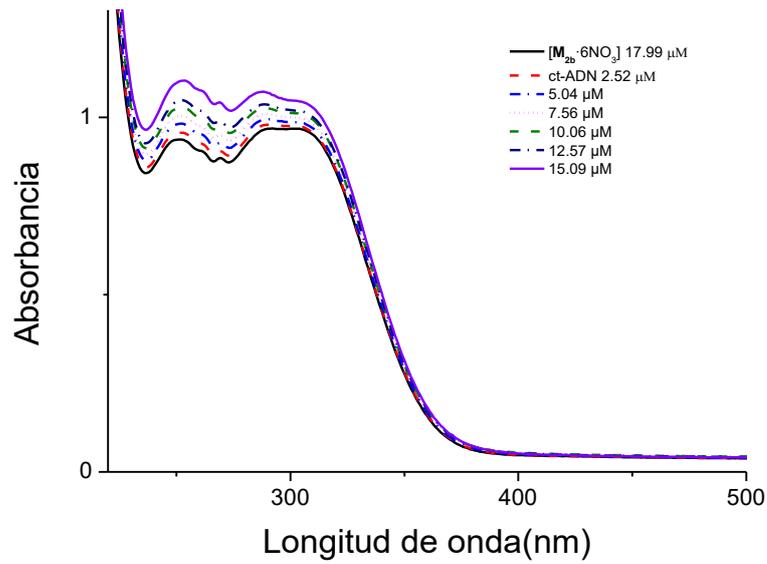
Lambert-Beer, espectro de absorción UV-Vis y valoración UV-Vis del $M_{2b} \cdot 6NO_3$



Espectros de UV-Vis para $M_{2b} \cdot 6NO_3$ en el rango de concentraciones 4.98-19.61 μM .

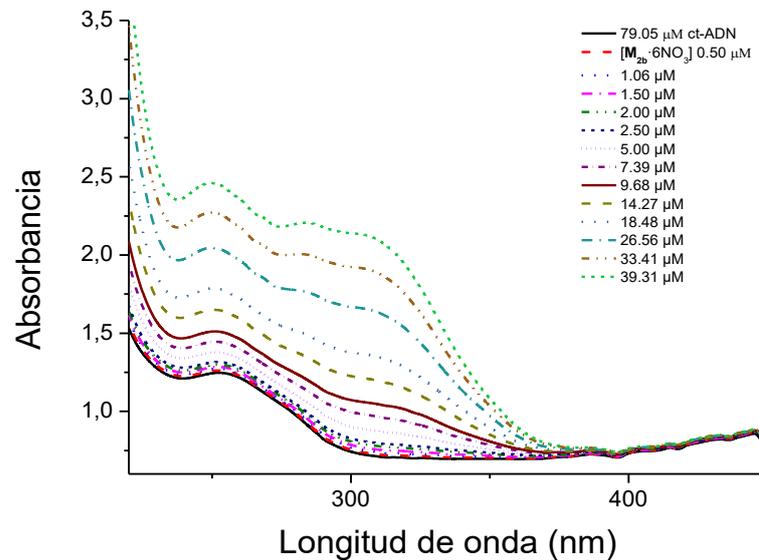


Gráfica de Lambert-Beer para $M_{2b} \cdot 6NO_3$ tomando los valores de concentración en el máximo ($\lambda=300$ nm).



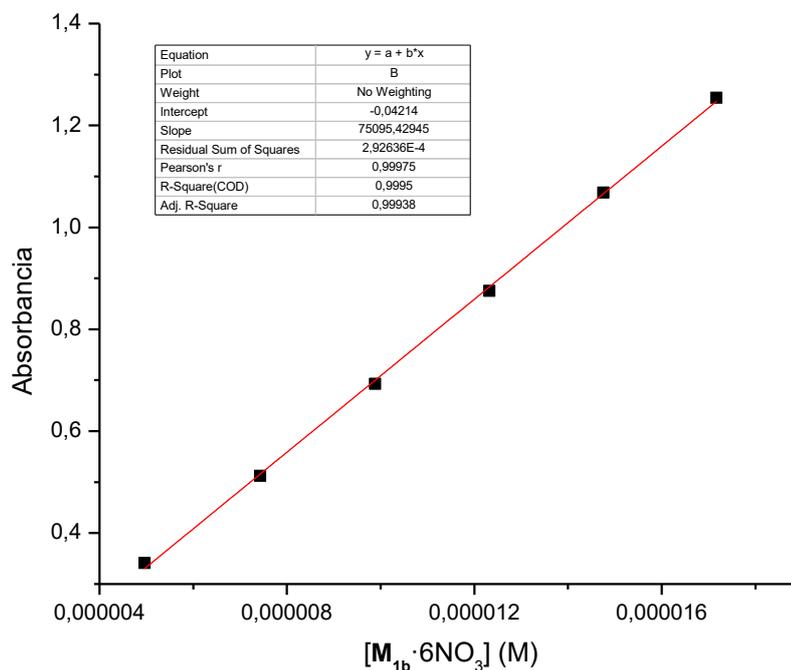
Espectros de UV-Vis de la valoración de $M_{2b} \cdot 6NO_3$ a $[M_{2b} \cdot 6NO_3] = 17.99 \mu M$ con *ct*-ADN en el rango de concentraciones 2.52-15.09 μM de la biomolécula.

Espectros UV del experimento de DC para $M_{2b} \cdot 6NO_3$



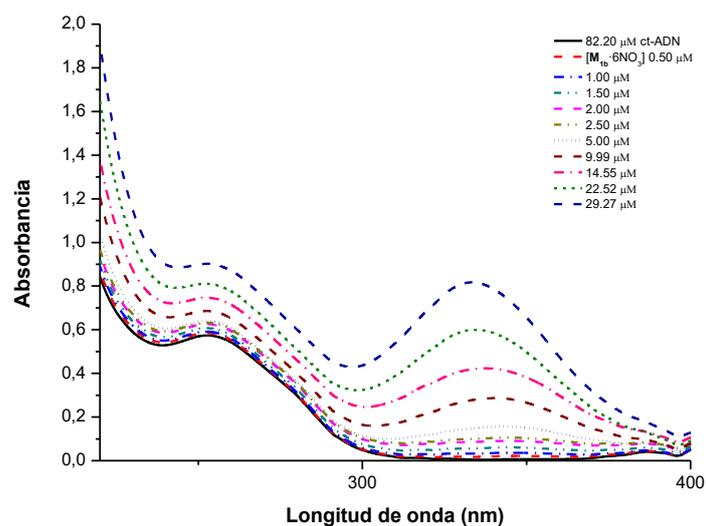
Espectros UV derivados del experimento de DC del *ct*-ADN con adiciones crecientes del metalociclo $M_{2b} \cdot 6NO_3$.

Lambert-Beer del $M_{1b} \cdot 6NO_3$



Gráfica de Lambert-Beer para $M_{1b} \cdot 6NO_3$ tomando los valores de concentración en el máximo ($\lambda=332$ nm).

Espectro UV del experimento de DC para $M_{1b} \cdot 6NO_3$



Espectros UV derivados del experimento de DC del *ct*-ADN con adiciones crecientes del metalociclo $M_{1b} \cdot 6NO_3$.