



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

FACULTAD DE CIENCIAS

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

*Complejos metálicos de iones de transición con un
ligando macrocíclico reforzado:
¿Nuevos agentes de contraste para IRM?*

*Complexos metálicos de iones de transición con un ligando
macrocíclico reforzado:
Novos axentes de contraste para IRM?*

*Metal complexes of transition metal ions with a
reinforced macrocyclic ligand:
A new class of MRI contrast agents?*

**Directores: Dr. Carlos Platas Iglesias
Dr. Martín Regueiro Figueroa**

LARA LÓPEZ-SARRY ÁLVAREZ

Curso: 2014/2015 – Convocatoria: Septiembre



Dr. **D. Carlos Platas Iglesias**, Profesor Titular, y Dr. **D. Martín Regueiro Figueroa**, Investigador Postdoctoral, pertenecientes al Departamento de Química Fundamental (Área de Química Inorgánica) de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña,

CERTIFICAN:

Que el trabajo descrito en la presente memoria, titulado “*Complejos metálicos de iones de transición con un ligando macrocíclico reforzado: ¿Nuevos agentes de contraste para IRM?*”, fue realizado bajo su dirección por **Dña. Lara López-Sarry Álvarez** en los laboratorios de Química Fundamental de la Universidade da Coruña, y una vez finalizado, autorizan su presentación como *Trabajo de Fin de Grado* para optar al Título de Graduada en Química por la Universidade da Coruña.

Y para que así conste, expiden y firman la presente certificación en A Coruña a 14 de Septiembre de 2015.

Dr. D. Carlos Platas Iglesias

Dr. Martín Regueiro Figueroa

Facultade de Ciencias

Campus da Zapateira, Rúa da Fraga nº 10, 15071, A Coruña

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Carlos Plasas por ofrecerme la posibilidad de formar parte de vuestro grupo de Investigación, admiro mucho vuestro trabajo. Contigo lo difícil resulta "fácil", y esa ilusión que muestras resulta oportunamente contagiosa. Gracias también por el apoyo mostrado a lo largo de todo este tiempo.

Al Dr. Martín Regueiro, por todo lo que me has enseñado a lo largo de estos meses, mostrándome el apasionante mundo de la investigación. También quisiera agradecerte la confianza depositada en mí ya que a la vez has logrado que tuviera más confianza en mí misma, así como todo el apoyo que has mostrado. Puedo decir que me has enseñado muchas cosas, y eso es algo que siempre voy a tener conmigo.

A todos los que formáis parte del grupo de Investigación, quisiera agradecer a todos y cada uno de vosotros la gran acogida que habéis mostrado, considerándome una más del grupo. Hay pequeños detalles, que nunca olvidaré. El ambiente que en vuestro conjunto formáis resulta acogedor y ese mismo ambiente ha hecho que realmente me sintiera cómoda trabajando. A Patricia e Isma, siempre recordaré el ofrecimiento de ese té tan delicioso en momentos agobiantes. A Rosa por sus consejos y ofrecimientos de ayuda en todo momento. A Marta e Isra, por sus ánimos y su disponibilidad en los momentos de duda.

A Jess, mi gran amiga y compañera durante todos estos años, por tu amistad, tu apoyo en todo momento y por formar parte de este camino que no siempre ha sido fácil, tú siempre has estado ahí apoyándome. Y es que "no importan las ramificaciones, carbonos quirales ó centros de insaturación, al fin y al cabo seguiremos siendo isómeros". A Laura, por tratar de buscar siempre una solución a mis pequeños problemillas y por los buenos momentos vividos durante este tiempo. Siempre recordaré el buen equipo que formamos las tres.

A Oscar, por todo tu cariño y comprensión a lo largo de todos estos años en los momentos de estrés (que no han sido pocos). Por escucharme, intentar tranquilizarme y apoyarme, por compaginar nuestros horarios adaptándote a las circunstancias y por ese guiño cómplice que se refleja en tu mirada. "Eres aquel átomo con el que comparto mis electrones de valencia, tú y yo formamos la molécula perfecta"

A mis padres por su paciencia, cariño y gran apoyo en todo momento. A mi hermano, que con sus visitas y conversaciones siempre me transmite su apoyo.

A todos vosotros, Muchas Gracias.

Un pájaro posado en un árbol, nunca tiene miedo porque su confianza no está en la rama, sino en sus propias alas.

ABREVIATURAS

Å	Amstrong
B ₀	Fortaleza del campo aplicado
CB	Cross-bridged
CEST	Transferencia de Saturación por intercambio químico (Chemical Exchange Saturation Transfer)
CYCLAM	1,4,8,11-Tetraazacyclotetradecano
DIACEST	CEST Diamagnetic
DFT	Teoría del funcional de densidad (Density Functional Theory)
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropilmetilamina
d	doblete
E ⁰	Potencial Estándar
ESI	Ionización Electrospray (Electrospray Ionization)
ESI ⁺	Ionización Electrospray Positiva
<i>h</i>	Constante de Planck
Hz	Hercio
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-piperaxina-1-etanosulfónico
HR	Alta Resolución (High Resolution)
IC	Índice de Coordinación
IR	Radiación Infrarroja (Infrared Radiation)
IRM	Imagen por Resonancia Magnética
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>k_{ex}</i>	Velocidad de intercambio
LIS	Desplazamiento Inducido de los Lantánidos (Lanthanide Induced Shift)
m	multiplete
MS	Espectrometría de Masas
MT	Transferencia de Magnetización (Magnetization Transfer)
mV	mili Voltio
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
NHE	Electrodo Normal de Hidrógeno (Normal Hydrogen Electrode)
OTf	Triflato
p.e	punto de ebullición
PA	Para Análisis

PARACEST

ppm

PS

Rf

RMN

T_1

T_2

TBA

ν

ν_a

ν_s

δ

δ_a

γ

τ_m

$\Delta\omega$

CEST Paramagnético (Paramagnetic CEST)

partes por millón

Para Síntesis

Radiofrecuencia

Resonancia Magnética Nuclear

Tiempo de relajación longitudinal

Tiempo de relajación transversal

Tetrabutilamonio

frecuencia de resonancia

Tensión asimétrica

Tensión simétrica

Desplazamiento químico

Flexión asimétrica

Razón giromagnética

Tiempo de vida media

Diferencia de frecuencia

Índice

1. RESUMEN	4
1. RESUMO	2
1. ABSTRACT.....	3
2. INTRODUCCIÓN	4
2.1. Imagen por Resonancia Magnética (IRM).....	4
2.1.1. Mecanismo de la Imagen de Resonancia Margnética (IRM)	4
2.1.2. Agentes de contraste en Imagen por Resonancia Magnética	6
2.3. Agentes CEST como alternativa a los agentes de contraste tradicionales.....	8
2.3.1. Mecanismo de Actuación de los Agentes CEST.....	10
2.3.2. Compuestos diamagnéticos como agentes CEST	12
2.3.3. Complejos de lantánidos como agentes CEST.....	12
2.3.4. Complejos de metales de transición como agentes PARACEST	14
2.4. Agentes de Contraste con Propiedades Redox Activas	16
3. ANTECEDENTES, INTERÉS Y PLANTEAMIENTO	18
4. OBJETIVOS.....	22
5. CRONOGRAMA.....	23
6. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	24
6.1. Disolventes y Reactivos	24
6.2. Síntesis del ligando 2,2'-(1,4,8,11-tetraazabiciclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diil)diacetamida (L ¹).	26
6.3 Síntesis de los complejos.....	26
6.3.1 Síntesis de [ZnL ¹](CF ₃ SO ₃) ₂	27
6.3.2 Síntesis de [NiL ¹](CF ₃ SO ₃) ₂	28
6.3.2. Síntesis de [CoL ¹](ClO ₄) ₃ ·3H ₂ O.....	29
5.3.2. Síntesis de [MnL ¹](ClO ₄) ₂	29
6.4. Técnicas de Caracterización	31
6.4.1. Análisis Elemental:.....	31
6.4.2. Espectroscopia Infrarroja:.....	31
6.4.3. Espectrometría de Masas:	31
6.4.4. Cálculos DFT:	31
6.4.5. Medidas de pH:	32
6.4.6. RMN ¹³ C y ¹ H:	32
6.4.7. Experimentos CEST:	32
6.4.8. Medidas de Voltametría Cíclica	33

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
7.1. Síntesis del ligando.....	34
7.2 Síntesis de los complejos metálicos.....	34
7.3 Caracterización de los complejos: Espectrometría de masas y espectroscopía IR	36
7.4. Espectroscopía de RMN.....	38
7.5. Estudios redox	40
7.6. Cálculos DFT	42
7.7. Experimentos CEST	43
8. CONCLUSIONES	45
8. CONCLUSIÓN.....	46
8. CONCLUSIONS	47

1. RESUMEN

En el *Trabajo de Fin de Grado* recogido en la presente memoria se ha preparado y caracterizado un ligando macrocíclico reforzado en posesión de dos grupos acetamida (L^1). Esta plataforma ha sido empleada para la formación de complejos con los iones de transición Mn^{2+} , Co^{3+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} . La síntesis de los complejos requirió en general el uso de condiciones enérgicas (temperaturas elevadas y tiempos de reacción prolongados), así como la ausencia de contraiones con capacidad coordinante como el anión cloruro. La estructura en disolución de los mismos ha sido estudiada tanto por espectroscopia de RMN como por cálculos DFT, los cuales revelan geometrías octaédricas distorsionadas. Los complejos paramagnéticos de los iones divalentes de Co^{2+} y Ni^{2+} con sistemas tetraazamacrocíclicos reforzados provistos de grupos colgantes acetamida presentan un interés particular en cuanto su aplicación como agentes de contraste tipo CEST, debido a la presencia de protones susceptibles de sufrir fenómenos de intercambio con las moléculas de agua del disolvente. Estudios preliminares demuestran que el complejo de Ni^{2+} proporciona efecto CEST al saturar la frecuencia de resonancia de los protones acetamida. Además los complejos de Co^{2+}/Co^{3+} presentan una ventaja adicional, dado que se espera que puedan utilizarse como sistema PARACEST con respuesta redox, donde el agente de contraste sería activo en su forma divalente e inactivo en la forma trivalente. Se realizó un estudio electroquímico y de RMN del complejo de Co^{3+} con el fin de evaluar la capacidad del ligando para estabilizar el estado de oxidación divalente de este ion metálico en disolución acuosa y así valorar su posible aplicación como sonda redox en sistemas biológicos. El ligando en efecto estabiliza al ion cobalto en sus estados de oxidación divalente y trivalente, ya que el complejo $[Co(L^1)]^{3+}$ muestra un voltamograma cíclico quasireversible con un potencial de semionda de -197 mV (con respecto al electrodo de referencia Ag/AgCl).

1. RESUMO

No *Traballo de Fin de Grao* recollido na presente memoria, preparouse e caracterizouse un ligando macrocíclico reforzado en posesión de dous grupos acetamida (L^1). Dita plataforma empregouse para a formación de complexos cos ións de transición Mn^{2+} , Co^{3+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} . A síntese dos complexos requiriu en xeral o emprego de condicións enérxicas (temperaturas elevadas e tempos de reacción longos), así como a ausencia de contraíons con capacidade coordinativa como o anión cloruro. A estrutura en disolución dos mesmos foi estudada tanto por espectroscopia de RMN como por cálculos DFT, que poñen de manifesto xeometrías octaédricas distorsionadas. Os complexos paramagnéticos dos ións divalentes de Co^{2+} e Ni^{2+} con sistemas tetraazamacrocíclicos reforzados provistos de grupos colgantes acetamida presentan un interese particular na súa aplicación como axentes de contraste tipo CEST, debido a presenza de protóns susceptibles de sufrir fenómenos de intercambio coas moléculas de auga do disolvente. Estudos preliminares demostran que o complexo de Ni^{2+} proporciona efecto CEST ao saturar a frecuencia de resonancia dos protóns acetamida. Ademais os complexos de Co^{2+}/Co^{3+} presentan unha vantaxe adicional, xa que se espera que poidan empregarse como sistemas PARACEST con resposta redox, onde o axente de contraste sexa activo na súa forma divalente e inactivo na forma trivalente. Realizouse un estudo electroquímico e de RMN do complexo de Co^{3+} co fin de avaliar a capacidade do ligando para estabilizar o estado de oxidación divalente deste ion metálico en disolución acuosa e así determinar a súa posible aplicación como sonda redox en sistemas biolóxicos. O ligando estabiliza o ion de cobalto nos seus estados de oxidación divalente e trivalente, xa que o complexo $[Co(L^1)]^{3+}$ mostra un voltamograma cíclico cuasereversible cun potencial de semionda de -197 mV (con respecto ao electrodo de referencia Ag/AgCl).

1. ABSTRACT

The Project described in this report presents the synthesis and characterization of a reinforced macrocyclic ligand containing two acetamide pendant arms (L^1). This macrocyclic platform was used to prepare complexes with the transition metal ions Mn^{2+} , Co^{3+} , Ni^{2+} and Zn^{2+} . The synthesis of the complexes required very harsh conditions (high temperatures and long reaction times), as well as the absence of strongly coordinating anions such as chloride. The structure of the complexes in solution was investigated by using NMR spectroscopy and DFT calculations, which revealed distorted octahedral geometries. The paramagnetic complexes of the divalent Co^{2+} and Ni^{2+} ions with reinforced tetraazamacrocyclic ligands containing acetamide pendants are particularly interesting for their potential application as CEST contrast agents, thanks to the presence of protons that may undergo chemical exchange with the bulk water. Preliminary studies show that the Ni^{2+} complex provides a sizeable CEST effect upon saturation of the resonance due to the acetamide protons. Furthermore, the Co^{2+}/Co^{3+} complexes present an additional potential application as redox-responsive PARACEST agents, where the complex with the trivalent ion is silent and that of Co^{2+} provides CEST response. We carried out a NMR and electrochemical study to assess the ability of the ligand to stabilize Co^{2+} , and thus test the potential of this compound as a redox probe in biological systems. Indeed, the ligand stabilized cobalt in both the divalent and trivalent oxidation states, as the $[Co(L^1)]^{3+}$ complex presents a quasireversible cyclic voltammogram with a half-wave potential of -197 mV (versus Ag/AgCl).

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Imagen por Resonancia Magnética (IRM)

La imagen por resonancia magnética (IRM) es una técnica no invasiva para la adquisición de imágenes, utilizada en la medicina clínica para examinar casi todo tipo de órganos y tejidos para el diagnóstico de diversas enfermedades.¹

La IRM es un método tomográfico cuyas principales ventajas sobre otros métodos de imagen son: a) su capacidad multiplanar, con la posibilidad de obtener cortes o planos primarios en cualquier dirección del espacio; b) su elevada resolución de contraste, que es cientos de veces mayor que la de cualquier otro método de imagen, c) la ausencia de efectos nocivos conocidos al no utilizar radiaciones ionizantes, y d) la amplia versatilidad que proporciona el manejo del contraste. El contraste de la imagen obtenida en la IRM es una proyección de intensidad en tres dimensiones de la señal de RMN de los protones de las moléculas de agua presentes en un volumen determinado de tejido. Depende esencialmente de las diferencias de intensidad de las señales de protón del agua en los diferentes tejidos y de los tiempos de relajación longitudinal (T_1) o transversal (T_2) de dichos protones.

Debido a que la relación señal/ruido es una limitación básica de la IRM, se han ideado varios protocolos experimentales para potenciar y amplificar el contraste de las imágenes. Con este fin se han diseñado agentes de contraste cuya función es acentuar las intensidades obtenidas y mejorar su especificidad.²

2.1.1. Mecanismo de la Imagen de Resonancia Margnética (IRM)

En el ámbito clínico un sujeto inmobilizado se somete a un campo magnético de modo que los núcleos activos en RMN de ^1H que provienen de las moléculas de agua presentes en el organismo resuenen a una frecuencia particular. Esta frecuencia depende de dos factores, la fortaleza del campo aplicado (B_0) y la razón giromagnética del núcleo en estudio, que en el caso del ^1H equivale a $\gamma = 26,752 \times 10^7 \text{ rad s}^{-1}\text{T}^{-1}$.² Los niveles energéticos de los espines del núcleo bajo la acción del campo magnético estático no

(1) The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging. (Eds: Merbach, A. E.; Helm, L.; Tóth, É.), Second Edition, Wiley, Chichester, **2013**.

(2) Bottrill, M.; Kwok, L.; Long, N. J. Lanthanides in magnetic resonance imaging. *Chem. Soc. Rev.* **2006**, 35, 557-571.

Introducción

estarán degenerados, de tal manera que se ocupan siguiendo la distribución de Boltzmann, en donde la mayoría de los núcleos ocupen el nivel de más bajo en energía (o estado α) en el cual los espines están paralelos al campo magnético B_0 , y la fracción minoritaria restante orienta sus espines antiparalelamente al campo B_0 , ocupando el estado de mayor energía (o estado β , **Figura 1 a**).

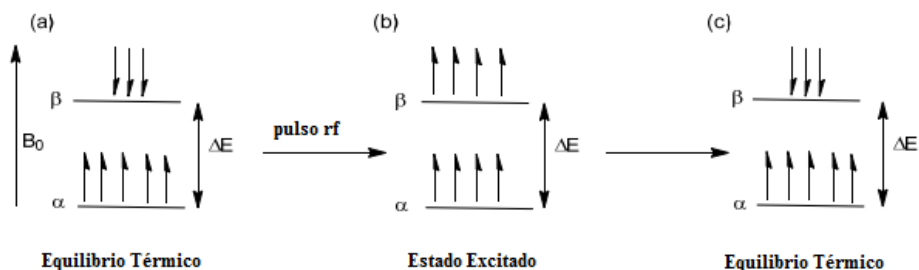


Figura 1. Diagrama que muestra la distribución de los espines nucleares en un campo magnético B_0 : (a) Distribución de Boltzmann con la mayoría de los espines en el nivel energético α , de menor energía; (b) Estado excitado después de la aplicación de un pulso de radiofrecuencia (rf) y (c) Retorno al equilibrio térmico.³

Las poblaciones de los núcleos en estado de equilibrio térmico pueden ser redistribuidas entre los dos niveles energéticos mediante la aplicación de un pulso de radiofrecuencia (rf) con una energía apropiada $\Delta E = h\nu$ (donde h es la constante de Planck y ν es la frecuencia de resonancia).^{4,5} En otras palabras, este pulso de radiofrecuencia debe ocurrir a la frecuencia de Larmor (ν , donde $\nu = \gamma B_0$) del sistema.⁴ Una vez que el pulso es aplicado, las poblaciones de los núcleos en los estados α y β se igualan, de modo que se elimina la señal correspondiente; esta situación se conoce como coherencia de fases o saturación del sistema (**Figura 1 b**). Después de un cierto tiempo, el sistema retorna al equilibrio térmico y la distribución de Boltzmann es reestablecida (**Figura 1 c**). El tiempo en el cual el sistema retorna al equilibrio térmico después de irradiar con un pulso de radiofrecuencia de 90° se denomina relajación, definiéndose dos tiempos de relajación denotados como T_1 (longitudinal) y T_2 (transversal).⁶

(3) Lewis, M. M. New Ligands for Lanthanides and Transition Metals toward Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents (2014). Electronic Thesis and Dissertation Repository.

(4) Bakhmutov, V. I. Practical NMR Relaxation for Chemists; John Wiley & Sons, West Sussex, England, **2004**; 1-202.

(5) Britton, M. M. Magnetic resonance imaging of chemistry. *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, *39*, 4036-4043.

(6) Caravan, P. Strategies for increasing the sensitivity of gadolinium based MRI contrast agents. *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, *35*, 512-523.

Introducción

2.1.2. Agentes de contraste en Imagen por Resonancia Magnética

El uso de agentes de contraste que incrementen las velocidades de relajación de los protones en agua (T_1 y/o T_2), ha mejorado considerablemente la calidad de las imágenes obtenidas mediante IRM. El funcionamiento de los agentes de contraste utilizados en IRM se basa en la interacción de éstos con los protones de las moléculas de agua presentes en el organismo, modificando sus tiempos de relajación, o bien alterando el nivel de magnetización de los protones del agua.¹

Los agentes de contraste son especies paramagnéticas que pueden ser empleados para alterar los tiempos de relajación T_1 o T_2 de los protones del agua, y consecuentemente la intensidad de la señal de RMN, mediante el uso de las secuencias de pulsos adecuadas. Aquellos agentes de contraste que aumentan la velocidad de relajación longitudinal en el tejido, en comparación con el valor transversal, se clasifican como agentes de contraste T_1 (la velocidad de relajación longitudinal se define como $1/T_1$).⁵ Estos agentes mejoran la imagen IRM generando un incremento de intensidad de la señal, de modo que también son conocidos como agentes de contraste positivos. Por el contrario, los agentes de contraste que actúan sobre T_2 son denominados agentes de contraste negativos porque reducen la intensidad de la señal del tejido objeto de estudio, aumentando la velocidad de relajación transversal ($1/T_2$).⁵ Dado que $T_1 \gg T_2$ para la mayoría de los tejidos, generalmente el efecto del agente de contraste sobre T_1 es mucho mayor que sobre T_2 . En la práctica, se suelen diseñar agentes que actúen sobre T_1 ya que es más fácil detectar un efecto positivo en la intensidad de la señal.

Generalmente, los agentes de contraste que se utilizan en IRM son pequeños complejos metálicos, pudiendo tratarse de una entidad macrocíclica albergando en el interior de su cavidad el metal, o bien quelatos lineales. Los metales empleados para esta aplicación deben presentar carácter paramagnético, superparamagnético o ferromagnético. Los agentes ferromagnéticos contienen partículas de óxido de hierro que originan una disminución del tiempo de relajación transversal T_2 , mientras que los agentes paramagnéticos causan un decrecimiento en el valor del tiempo de relajación longitudinal T_1 .⁵

Introducción

El primer agente de contraste aprobado para su uso *in vivo* fue el complejo de Gd^{3+} gadopentetato de meglumina (NMG) $_2[Gd(dtpa)(H_2O)]^{-2}$ (Magnevist®), que apareció en el mercado en 1988. Un año después, apareció el gadoterato de meglumina $[Gd(dota)(H_2O)]^{-}$ (Dotarem®). Posteriormente fueron aprobados otros complejos por la FDA (por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) derivados de los ligandos $dtpa^{5-}$ y $dota^{4-}$. La **Figura 2** muestra los diferentes agentes aprobados para uso clínico, todos ellos conteniendo ligandos de tipo poliaminocarboxilato.

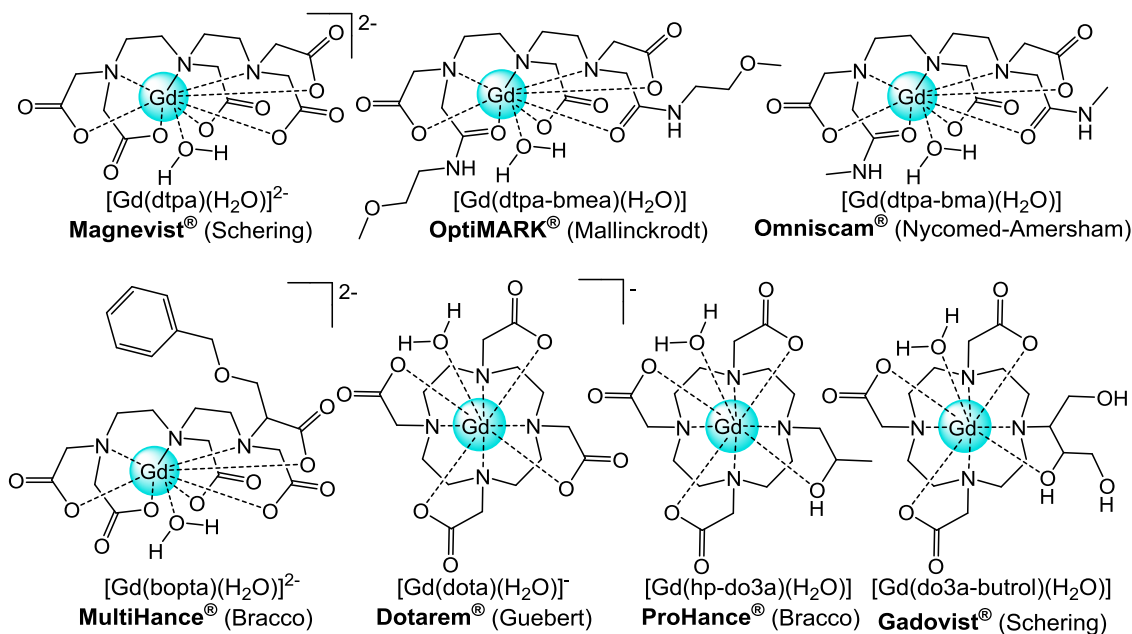


Figura 2. Quelatos de Gd^{3+} utilizados como agentes de contraste en IRM.⁷

Este primer agente de contraste contiene al ion gadolinio, un ion lantánido con siete electrones desapareados en sus orbitales 4f, que dan lugar a un estado fundamental 8S simétrico que hace que este ion sea un excelente agente de relajación (debido a su relajación lenta del espín de los electrones).⁸ Sin embargo, su empleo plantea una gran problemática, puesto que no puede ser inyectado en la sangre debido a su elevada toxicidad, ya que tiene tendencia a formar hidrocomplejos y precipitar a pH fisiológico; también puede enlazarse con los grupos dadores de las proteínas desplazando a otros iones metálicos de las enzimas, por ejemplo el Ca^{2+} (ya que tiene un radio iónico similar). Por todo esto, para poder utilizar el Gd^{3+} como agente de contraste se

(7) Idée, J. M.; Port, M.; Robic, C.; Medina C.; Sabatou M.; Corot C. J. Role of thermodynamic and kinetic parameters in gadolinium chelate stability. *Magn. Reson. Imaging.*, **2009**, *30*, 1249-1258.

(8) Werner, E. J.; Datta, A.; Jocher, C. J.; Raymond, K. N. High-Relaxivity MRI Contrast Agents: Where Coordination Chemistry Meets Medical Imaging. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **2008**, *47*, 8568-8580.

Introducción

administra como complejo con ligandos polidentados que proporcionen una estabilidad termodinámica elevada y, sobre todo, inercia cinética a pH fisiológico, a fin de que durante el tiempo que permanezca en el organismo el quelato se mantenga intacto y no disocie.⁶ Por otra parte, en general se prefiere utilizar como agentes de contraste complejos no iónicos, que sean muy solubles en agua para dar disoluciones que tengan una baja osmolaridad. Finalmente, los agentes de contraste deben contener al menos una molécula de agua coordinada al ion metálico. Esta molécula de agua intercambia con las moléculas de agua del entorno, dando lugar a un aumento de sus velocidades de relajación.

2.3. Agentes CEST como alternativa a los agentes de contraste tradicionales

Debido a las limitaciones e inconvenientes que presentan los agentes de contraste de gadolinio, recientemente se han estudiado alternativas para la mejora del contraste en IRM. Una de las propuestas más interesantes surgió a raíz del trabajo de Ward y Balaban publicado en el año 2000.⁹ Estos autores propusieron un nuevo tipo de agentes de contraste que funcionan empleando el mecanismo de transferencia de saturación por intercambio químico o CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer). Estudios más recientes se refieren a este efecto como Transferencia de Saturación (ST, saturation transfer) o Transferencia de Magnetización (MT). La misión que desempeñan estos agentes de contraste CEST, se basa en el intercambio de los protones presentes en el propio agente de contraste con aquellos que forman parte de las moléculas de agua. Este intercambio de protones debe de ocurrir entre dos entornos magnéticamente diferentes. Cabe destacar que el contraste generado por MT puede surgir por simple relajación transversal o bien por una combinación de relajación transversal e intercambio químico.

El requisito indispensable para que un compuesto pueda ser considerado como agente CEST viene dado por la siguiente expresión, que asegura un régimen de intercambio lento entre los dos conjuntos de protones magnéticamente no equivalentes (los de las moléculas de agua y los del agente CEST):

$$k_{ex} \leq \Delta\omega \quad (\text{Ec.1})$$

(9) Ward, K. M.; Aletras, A. H.; Balaban, R.S. A New Class of Contrast Agents for MRI Based on Proton Chemical Exchange Dependent Saturation Transfer (CEST). *J. Magn. Reson.*, **2000**, *143*, 79-87.

Introducción

En dicha ecuación se refleja que la velocidad de intercambio k_{ex} (afectada por el pH, temperatura y el entorno del iónico medio), debe ser inferior a la diferencia de frecuencia existente entre los dos entornos ($\Delta\omega$, expresada en rad s^{-1}). Consecuentemente, esto implica que el tiempo de vida media τ_m de los protones que sufren intercambio químico ($\tau_m = 1/k_{ex}$) debe situarse en torno a 10^{-5} - 10^{-2} s.^{10,11} De esta expresión se deduce que una diferencia de frecuencias elevada permitirá observar efecto CEST con una velocidad de intercambio más rápida. Otra ventaja asociada a valores altos de $\Delta\omega$ es el aumento de la selectividad del pulso de irradiación, que evita la saturación directa del agua y minimiza los problemas derivados de la heterogeneidad de susceptibilidad magnética del medio biológico.

Por otro lado, como el mecanismo CEST compite con los procesos de relajación (**Figura 3**), para conseguir que el efecto deseado domine sobre el otro, y por tanto generar alteraciones en el espectro de RMN, es preciso que la velocidad de intercambio químico (sin llegar a superar a $\Delta\omega$) sea mayor que la velocidad de relajación. De no ser así el sistema se relajaría retornando a la situación de equilibrio térmico con la distribución de Boltzmann, de tal forma que la distribución de los espines no se mantendría el tiempo suficiente para que se puedan observar los efectos de saturación en el correspondiente espectro de RMN. Es importante mencionar que el efecto CEST depende de un gran número de variables tales como la concentración del soluto, el pH, la temperatura, la intensidad del campo, y de la potencia empleada en la presaturación.

A pesar de la elegancia de los agentes CEST, estos compuestos presentan dos limitaciones importantes que han impedido hasta la fecha su aplicación clínica. En primer lugar, el efecto TM observado depende no solo del pH del entorno, sino de la concentración local del agente. Esto hace muy difícil distinguir en una imagen de RM el verdadero origen del contraste observado. Para evitar este inconveniente, Balaban propuso la utilización de agentes CEST con dos o más conjuntos de protones en intercambio con el agua, de manera que la relación de los efectos CEST proporcionados por los diferentes tipos de protones resulte independiente de la concentración del agente. En segundo lugar, el escaso número de núcleos en intercambio por agente CEST hace

(10) Viswanathan, S.; Kovacs, Z.; Green, K. N.; Ratnakar, S. J.; Sherry, A. D. Alternatives to Gadolinium-Based Metal Chelates for Magnetic Resonance Imaging *.Chem.Rev.*, **2010**, *110*, 2960-3018.

(11) Sherry, A. D.; Wu, Y. The importance of water exchange rates in the design of responsive agents for MRI *.Curr.Opin.Chem.Biol.*, **2013**, *17*, 167-174.

Introducción

que resulte necesario administrar dosis muy elevadas (>100 mM en algunos casos) para observar el efecto CEST con una resolución espacial apreciable.

2.3.1. Mecanismo de Actuación de los Agentes CEST

Tal y como muestra la **Figura 3**, un agente CEST contiene al menos dos conjuntos de protones en intercambio. Aquí, el conjunto de protones A representa los protones intercambiables del agua de la masa de disolvente, mientras que el conjunto B representa los pertenecientes al agente de contraste. En la situación de equilibrio, los núcleos dentro de los dos conjuntos siguen la distribución de Boltzmann. El pulso de presaturación se aplica a la frecuencia de resonancia de los protones pertenecientes al grupo B (pool B), provocando la saturación de dichos protones y la promoción de algunos núcleos al nivel de energía superior. Esta saturación se transfiere a los protones A (los del agua) por el intercambio químico que se establece entre ambos conjuntos de protones. Como resultado se aprecia una reducción de la intensidad de la señal debida a los protones de las moléculas de agua (A). Después de cierto tiempo, los núcleos de los protones A retornan a la situación de equilibrio. Como puede verse en la **Figura 3**, la relajación puede ser un proceso que compite con el intercambio químico. Por lo tanto, el efecto CEST sólo se ve si los protones del grupo B tienen tiempos de relajación largos con respecto a sus valores de intercambio químico.

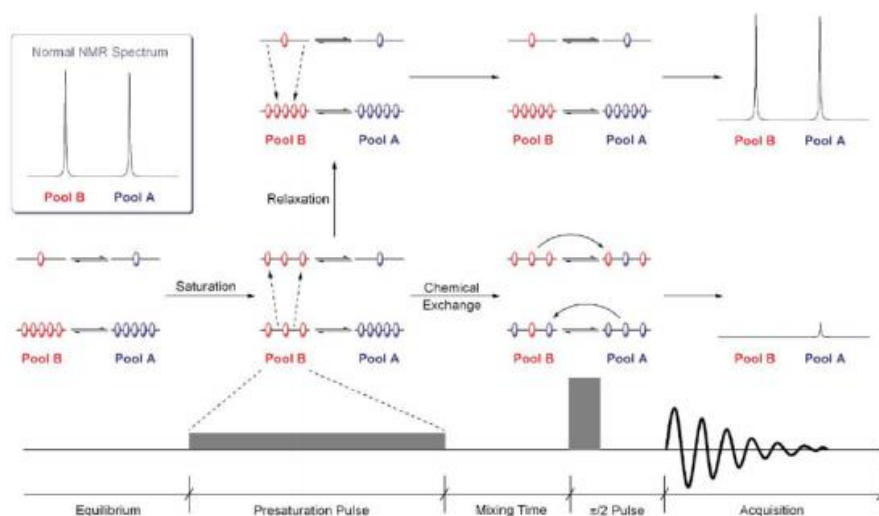


Figura 3. Representación esquemática del proceso de relajación en competición con el mecanismo CEST.¹²

(12) Woods, M.; Woessner, D. E.; Sherry, A. D. Paramagnetic lanthanide complexes as PARACEST agents for medical imaging. *Chem. Soc. Rev.*, **2006**, 35, 500-511.

Introducción

El mecanismo de actuación de los agentes CEST presenta una gran ventaja en comparación con los agentes de contraste convencionales, dado que proporciona la capacidad de activar y desactivar el efecto de contraste¹⁰ ya sea eliminando el pulso de presaturación o bien variando la frecuencia de éste. Además, pueden ser activados de forma selectiva, de modo que solamente actúe sobre los protones intercambiables, sin afectar a aquellos presentes en las moléculas de agua.

Generalmente el efecto CEST se refleja por medio de los denominados espectros Z o espectros CEST, en los que se representa la intensidad de la señal del agua normalizada con respecto a la intensidad de la misma en ausencia de un pulso de presaturación (M_z/M_0). Este espectro es obtenido tras saturar selectivamente un conjunto de protones con un pulso de radiofrecuencia, originándose una señal (M_s), y consecuentemente generando una primera imagen (**Figura 4**).¹⁰ Sin embargo, se necesita otra imagen porque el contraste obtenido está limitado por una baja relación señal/ruido. Por tanto, se aplica un pulso similar en el lado opuesto de la resonancia del agua (M_0), de modo que esta segunda imagen no presenta efecto CEST. Las imágenes obtenidas después de la aplicación de ambos pulsos se restan para obtener la propia imagen CEST. El efecto CEST se representa como el porcentaje de reducción de la señal del agua en función de la frecuencia de saturación (**Ecuación 2**):¹⁰

$$\text{Effecto CEST (\%)} = (1 - M_s / M_0) \times 100 \quad (\text{Ec.2})$$

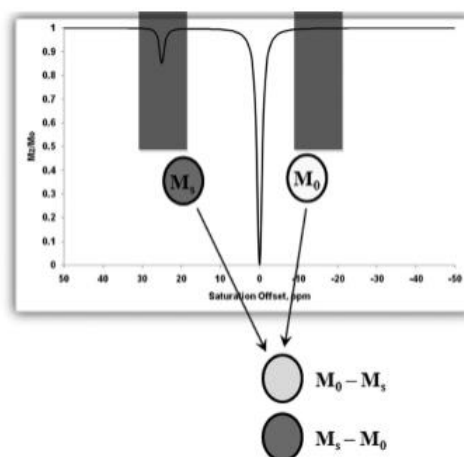


Figura 4. Ejemplo de un espectro CEST para un sistema de dos conjuntos de protones intercambiables. El conjunto de protones A se observa a 0 ppm (moléculas de agua) y el conjunto B (protones intercambiables del agente CEST) a 25 ppm.¹⁰

2.3.2. Compuestos diamagnéticos como agentes CEST

Reciben el nombre de DIACEST los agentes CEST que son sustancias con carácter diamagnético. Estos compuestos son normalmente pequeñas moléculas en posesión de protones intercambiables, tales como azúcares, aminoácidos o compuestos heterocíclicos (**Figura 5**).¹²

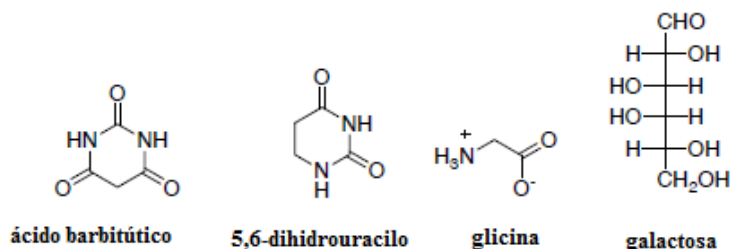


Figura 5. Ejemplos de compuestos DIACEST

El principal inconveniente que plantean este tipo de agentes CEST es la pequeña diferencia de frecuencia que presenta la señal de sus protones intercambiables con respecto a la señal del agua ($\Delta\omega$). Esta diferencia suelen tomar valores de $\Delta\omega < 6$ ppm, lo que provoca la saturación directa de la señal del agua al aplicar el pulso de presaturación y aumenta los problemas derivados de la heterogeneidad de susceptibilidad magnética del medio biológico.^{12,10} Debido a estos valores de $\Delta\omega$, se requieren velocidades de intercambio muy bajas para satisfacer la **ecuación 1**. Como consecuencia, se necesita una concentración del agente en cuestión demasiado elevada para poder obtener una reducción significativa de la intensidad de la señal del agua.

2.3.3. Complejos de lantánidos como agentes CEST

Los principios de actuación de los agentes CEST han sido fundamentales en el descubrimiento de otros agentes de contraste conocidos como agentes de contraste paramagnéticos (PARACEST). En comparación con los metales de transición, que tienen sus electrones desapareados en los orbitales d, los electrones desapareados de los lantánidos residen en sus orbitales 4f, que no solapan apreciablemente con los orbitales del ligando. Como consecuencia, el enlace metal ligando(s) en los complejos de los

Introducción

lantánidos tiende a ser iónico. Debido a su gran tamaño, suelen adoptar índices de coordinación elevados (8-12). Sin embargo, la geometría de su entorno de coordinación depende en mayor medida de factores estéricos que de factores electrónicos.

Las propiedades magnéticas de los lantánidos varían a lo largo del período puesto que cada metal contiene un número diferente de electrones desapareados, y por tanto, posee un momento magnético y susceptibilidad magnética distinta. Esto último influye en la dirección y magnitud de interacción entre el campo magnético y el momento magnético. La susceptibilidad magnética también gobierna los denominados desplazamientos inducidos por los lantánidos (LIS, Lanthanide Induced Shifts), y es aquí donde se encuentra la mayor ventaja de los agentes PARACEST en comparación con los agentes DIACEST. Los desplazamientos paramagnéticos inducidos por los iones lantánidos proporcionan valores elevados de $\Delta\omega$ que permiten velocidades de intercambio mayores, lo que origina un incremento en el número de espines saturados transferidos al agua y una mayor efectividad del agente de contraste.¹¹

A pesar de la mayor velocidad de intercambio que admiten los agentes PARACEST debido a los mayores valores de $\Delta\omega$, el sistema debe satisfacer la condición de intercambio lento.¹⁴ Como resultado, los agentes de contraste tradicionales como los complejos de Gd^{3+} no pueden considerarse como agentes PARACEST, ya que en general presentan velocidades de intercambio demasiado rápidas que impiden que se cumpla esta última condición.

Al igual que sucede en los agentes DIACEST, y en contra de lo que ocurre con los agentes de contraste convencionales, no es estrictamente necesario que los agentes PARACEST contengan moléculas de agua coordinadas al centro metálico, puesto que este tipo de contraste puede obtenerse mediante la presaturación de los protones intercambiables pertenecientes a grupos amida, alcohol... Un ejemplo de lantánido PARACEST es el complejo Eu^{3+} -DOTAM-gly-Et, en el cual la velocidad de intercambio de la molécula de agua coordinada es suficientemente lento para generar efecto CEST debido al gran valor de $\Delta\omega$ (**Figura 6a**). El complejo Dy^{3+} -DOTAM por

Introducción

su parte proporciona efecto CEST tanto mediante saturación de la molécula de agua coordinada como de los protones NH de los grupos amida del ligando (**Figura 6b**).¹³

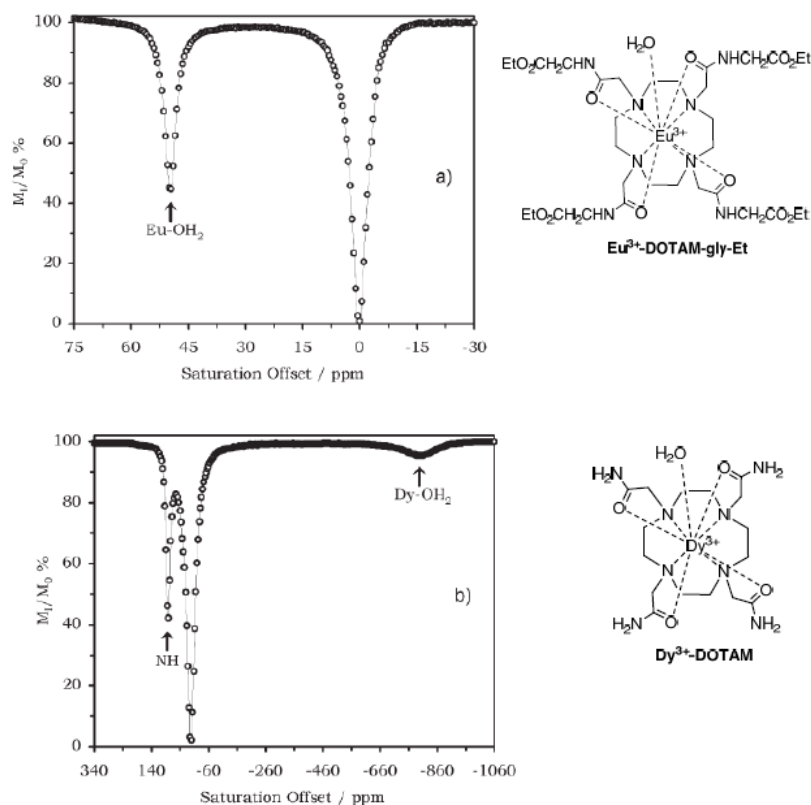


Figura 6. (a) Espectro CEST de Eu³⁺-DOTAM-gly-Et [63mM] en disolución acuosa a pH 7. (b) Espectro CEST de DyDOTAM³⁺ mostrando efectos a 80 ppm y -720 ppm debidos a los protones NH del ligando y la molécula de agua coordinada, respectivamente¹³

2.3.4. Complejos de metales de transición como agentes PARACEST

Hasta hace poco, los iones lantánidos trivalentes (Ln³⁺) fueron los únicos iones metálicos paramagnéticos usados como agentes PARACEST. Sin embargo, es bien sabido que muchos iones metálicos de transición tienen propiedades magnéticas que hacen posible un desplazamiento químico de protones intercambiables de los ligandos dentro del complejo, compatibles en muchos casos con un ensanchamiento limitado de

(13) Zhang, S.; Winter, P.; Wu, K.; Sherry, A. D. A. Novel Europium (III)-Based MRI Contrast Agent. *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, *123*, 1517-1518.

Introducción

las señales correspondientes.^{14,15} A pesar de estas propiedades favorables, el descubrimiento de la utilidad de los metales de transición como agentes CEST es un hallazgo relativamente reciente que en todo caso supone una alternativa a los iones lantánidos como agentes PARACEST. Los requisitos necesarios para que un complejo de transición se comporte como agente CEST no difieren mucho de los criterios ya mencionados para el caso de los lantánidos, exceptuando la consideración adicional de la diversidad de números de oxidación presentes en los metales de transición. Otro aspecto a tener en cuenta es el menor tamaño de los iones de transición, el cual origina índices de coordinación menores, (a menudo IC=6), en comparación con IC= 8-12 para el caso de los lantánidos. Los metales de transición que hasta ahora han suscitado un mayor interés debido a sus propiedades biológicas y paramagnéticas incluyen Co(II)^{16,17}, Ni(II)¹⁸ y Fe(II)¹⁹ (**Figura 7**).

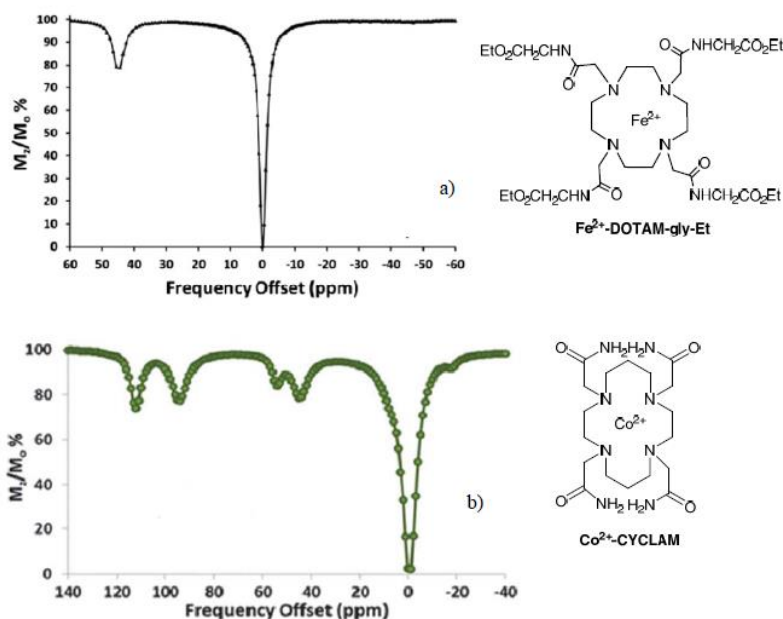


Figura 7. Ejemplo de dos metales de transición que exhiben efecto CEST debido a protones de tipo amida.^{17,40}

(14) Bertini, I.; Luchinat, C. *Physical Bioinorganic Chemistry Series, Vol. 3: NMR of Paramagnetic Molecules in Biological Systems*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company, Inc; Menlo Park: **1986**.

(15) Bertini, I.; Luchinat, C.; Parigi, G.; Pierattelli, R. *NMR Spectroscopy of Paramagnetic Metalloproteins*. *Chem Bio Chem.*, **2005**, *6*, 1536–1549.

(16) Dorazio, S. J.; Olatunde, A. O.; Sperryak, J. A.; Morrow, J. R. CoCEST: cobalt(II) amide-appended paraCEST MRI contrast agents. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 10025-10027.

(17) Tsitovich, P. B.; Sperryak, J. A.; Morrow, J. R. A Redox-Activated MRI Contrast Agent that Switches Between Paramagnetic and Diamagnetic States. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 13997-14000.

(18) Olatunde, A. O.; Dorazio, S. J.; Sperryak, J. A.; Morrow, J. R. The NiCEST Approach: Nickel(II) ParaCEST MRI Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 18503-18505.

(19) Tsitovich, P. B.; Morrow, J. R. Macrocyclic ligands for Fe(II) paraCEST and chemical shift MRI contrast agents. *Inorg. Chim. Acta.*, **2012**, *393*, 3-11.

2.4. Agentes de Contraste con Propiedades Redox Activas

El desarrollo de estos nuevos tipos de agentes PARACEST está motivada en parte por sus características únicas que permiten diseñar agentes que presenten respuesta a diferentes parámetros de interés biológico tales como el pH, la temperatura, la presencia de determinados metabolitos,^{20,21,22} la actividad de ciertas enzimas,²³ la actividad redox²⁴ o la presión parcial de oxígeno.^{25,26,27} Un tema de creciente interés es el

desarrollo de sondas con respuesta redox, que presentan un gran potencial en aplicaciones biomédicas de imagen; Entre sus posibles aplicaciones se encuentran el diagnóstico y tratamiento terapéutico de enfermedades, incluyendo el cáncer y enfermedades cardíacas.²⁸ Los agentes de contraste a desarrollar para este tipo de aplicaciones deben tener valores de potenciales redox en el tejido en el intervalo -100 a -300 mV.²⁹

El ion Gd^{3+} , que se utiliza en la mayoría de sondas utilizadas en IRM, no presenta otros estados de oxidación accesibles en medios acuosos. Sin embargo, metales de transición tales como el manganeso, el hierro y el cobalto, puede existir de forma estable en estados de oxidación diferentes. Un elegante enfoque de esta aplicación, es el empleo de agentes de contraste que utilizan la pareja de estados de oxidación

(20) Ren, J.; Trokowski, R.; Zhang, S.; Malloy, C.R.; Sherry, A.D. Imaging the tissue distribution of glucose in livers using a PARACEST sensor. *Magn Reson Med.*, **2008**, *60*, 1047–1055.

(21) Aime, S.; Delli, C.; Daniela, F.; Fedeli, F.; Terreno, E. A paramagnetic MRI-CEST agent responsive to lactate concentration. *J Am Chem Soc.*, **2002**, *124*, 9364–9365.

(22) Hammell, J.; Buttarazzi, L.; Huang, C.H.; Morrow, J.R. Eu(III) Complexes as Anion-Responsive Luminescent Sensors and Paramagnetic Chemical Exchange Saturation Transfer Agents. *Inorg Chem.*, **2011**, *50*, 4857–4867.

(23) Yoo, B.; Raam, M. S.; Rosenblum, R. M.; Pagel, M.D. Enzyme-responsive PARACEST MRI contrast agents: a new biomedical imaging approach for studies of the proteasome. *Contrast Media Mol Imaging.*, **2007**, *2*, 189–198.

(24) Ratnakar, S. J.; Viswanathan, S.; Kovacs, Z.; Jindal, A. K.; Green, K. N.; Sherry, A. D. Europium(III) DOTA-tetraamide Complexes as Redox-Active MRI Sensors. *J Am Chem Soc.*, **2012**, *134*, 5798–5800.

(25) Song, B.; Wu, Y.; Yu, M.; Zhao, P.; Zhou, C.; Kiefer, G. E.; Sherry, A. D. A europium(iii)-based PARACEST agent for sensing singlet oxygen by MRI. *Dalton Trans.*, **2013**, *42*, 8066–8069.

(26) Carreau, A.; Hafny-Rahbi, B.; Matejuk, A.; Grillon, C.; Kieda, C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? small molecules and hypoxia. *J. Cell. Mol. Med.*, **2011**, *15*, 1239–1253.

(27) Verma, A. Oxygen sensing in tumors. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, **2006**, *9*, 366–378.

(28) Sarsour, E. H.; Kumar, M. G.; Chaudhuri, L.; Kalen, A. L.; Goswami, P. C.; Bernhagen, J.; Castro, C.; Chumakov, P. M.; Fukai, T.; Ishikawa, F.; et al. Redox control of the cell cycle in health and disease. *Antioxid and Redox Signal.*, **2009**, *11*, 2985–3011.

(29) Banerjee, R. Redox outside the Box: Linking Extracellular Redox Remodeling with Intracellular Redox Metabolism. *J Biol Chem*; **2012**, *287*, 4397–4402.

Mn^{2+}/Mn^{3+} para originar un cambio en la capacidad de relajación T_1 ^{30,31} Los complejos de alto espín de Mn^{2+} pueden producir relajatividades que son comparables a los mejores complejos de Gd^{3+} , mientras que el Mn^{3+} se comporta como un agente de relajación más pobre. Otra pareja redox que ha suscitado gran interés es la formada por Co^{2+}/Co^{3+} , que presenta la posibilidad de cambio de un estado paramagnético a otro diamagnético.¹⁶

Se pueden resaltar los siguientes requisitos para que un agente de contraste de IMR con actividad resox sea útil:³¹

- Un potencial redox accesible a los agentes reductores con relevancia biológica como el glutatión (GSH).
- Existencia de un ligando que estabilice los dos estados de oxidación de manera que la reducción u oxidación no origine la descomposición del complejo.
- Un fuerte cambio en la señal tras la activación del agente, que de forma ideal debe proporcionar un aumento de la señal en presencia de la patología (sonda de encendido).
- Cinética rápida de respuesta con respecto a la escala de tiempo de imagen.

(30) Aime, S.; Botta, M.; Gianolio, E.; Terreno, E. A p(O₂)-responsive MRI contrast agent based on the redox switch of manganese(II/III)-porphyrin complexes *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 747–750.

(31) Loving, G. S.; Mukherjee, S.; Caravan, P. P. Redox-Activated Manganese-Based MR Contrast Agent. *JACS.*, **2013**, *135*, 4620-4623.

3. ANTECEDENTES, INTERÉS Y PLANTEAMIENTO

La caracterización del efecto CEST ha suscitado un gran interés desde su desarrollo inicial llevado a cabo por Ward, Aletras y Balaban⁸. Posteriormente, el grupo de Van Zjl³² estudió el aumento en la especificidad y eficacia del intercambio empleando macromoléculas que poseían un gran número de protones intercambiables con desplazamientos químicos similares, como la poli-L-lisina, el ácido poliuridílico (poli(rU)) y algunos dendrímeros. Casi simultáneamente Zhang y Sherry^{13,33} y Aime³⁴ desarrollaron una nueva generación de agentes CEST paramagnéticos (PARACEST), en los que la frecuencia de los protones intercambiables estaba más alejada (aproximadamente 50 ppm) con respecto a la resonancia del agua. Aunque el desarrollo de agentes CEST es un campo que todavía se encuentra en sus inicios, ya se han publicado una gran diversidad de artículos que presentan complejos de lantánidos que proporcionan efecto CEST. En cambio, el conocimiento actual acerca de agentes CEST con metales de transición es más limitado. Aun así, existen diversos estudios, entre los que cabe mencionar la investigación desarrollada por Janet Morrow y colaboradores, que propusieron distintos complejos macrocíclicos de Fe²⁺,^{35,36,37,38,39} Ni²⁺^{17,18} y Co²⁺^{16,17,36}, como alternativas a los compuestos de Ln³⁺. Algunos ejemplos estudiados se muestran en la **Figura 9**.

(32) Snoussi, K.; Bulte, J.W. M.; Gueron, M.; Van Z., Peter C. M. Sensitive CEST agents based on nucleic acid imino proton exchange: detection of poly (rU) and of a dendrimer-poly (rU) model for nucleic acid delivery and pharmacology. *Magn Reson Med.*, **2003**, 49, 998-1005.

(33) Zhang, S.; Trokowsky, R.; Sherry, A. D. A Paramagnetic CEST Agent for Imaging Glucose by MRI. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 5288-15289.

(34) Aime, S.; Barge, A.; Delli Castelli, D.; Fedeli, F.; Mortillaro, A.; Nielsen, F. U.; Terreno, E. Paramagnetic Lanthanide(III) complexes as pH-sensitive chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agents for MRI applications. *Magn. Reson. Med.*, **2002**, 47, 639-648.

(35) Dorazio, S. J.; Tsitovich, P. B.; Sifers, K. E.; Sperryak, J. A.; Morrow, J. R. Iron(II) PARACEST MRI Contrast Agents. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133, 14154-14156.

(36) Olatunde, A. O.; Cox, J. M.; Daddario, M. D.; Sperryak, J. A.; Benedict, J. B.; Morrow, J. R. Seven-Coordinate Co(II), Fe(II) and Six-Coordinate Ni(II) Amide-Appended Macrocyclic Complexes as ParaCEST Agents in Biological Media. *Inorg. Chem.*, **2014**, 53, 8311-8321.

(37) Dorazio, S. J.; Morrow, J. R. Iron(II) Complexes Containing Octadentate Tetraazamacrocycles as ParaCEST Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents. *Inorg. Chem.* **2012**; 51, 7448-7450.

(38) Dorazio, S. J.; Morrow, J. R. The Development of Iron(II) Complexes as ParaCEST MRI Contrast Agents. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 2006-2014.

(39) Dorazio, S. J.; Tsitovich, P. B.; Gardina, S. A.; Morrow, J. R. The reactivity of macrocyclic Fe(II) paraCEST MRI contrast agents towards biologically relevant anions, cations, oxygen or peroxide. *J. Inorg. Biochem.*, **2012**, 117, 212-219.

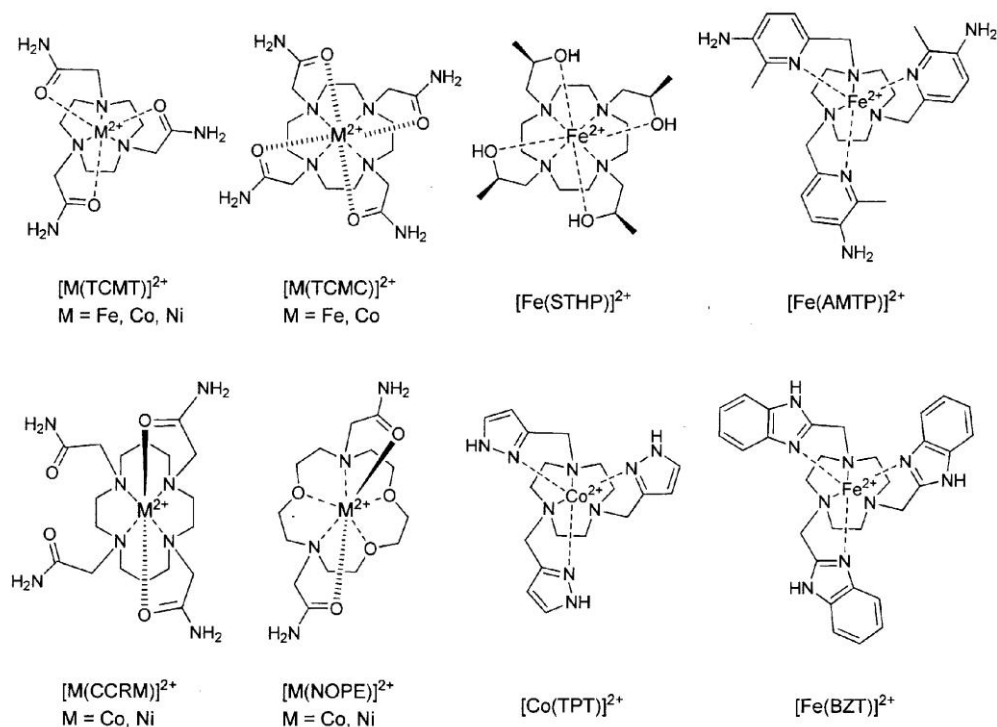


Figura 9. Antecedentes de agentes PARACEST basados en metales de transición divalentes.⁴⁰

En el transcurso de la revisión bibliográfica en busca de potenciales agentes PARACEST que presenten respuesta redox nos llamaron la atención los trabajos de Hubin⁴¹ y Wong,⁴² que estudiaron los complejos de Co^{3+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} con el ligando 2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diil)diacetamida (L^1 , **Figura 10**). En su trabajo, Hubin presentó estudios de voltametría cíclica que indicaban que el estado de oxidación Co^{2+} era perfectamente accesible, si bien estos experimentos se realizaron en disoluciones de acetonitrilo y no en disolución acuosa. En consecuencia, pensamos que los complejos de $\text{Co}^{2+}/\text{Co}^{3+}$ con este ligando podrían utilizarse como sistema PARACEST con respuesta redox, donde el agente de contraste sería activo en su forma divalente e inactivo en la forma trivalente (**Figura 10**).

(40) Dorazio, S. J.; Olatunde, A. O.; Tsitovich, P. B.; Morrow, J. R. Comparison of Divalent Transition Metal Ion ParaCEST MRI Contrast Agents. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2014**, *19*, 191-205.

(41) Lichty, J.; Allen, S.M.; Grillo, A. I.; Archibald, S. J.; Hubin, T. J. Synthesis and characterization of the cobalt(III) complexes of two pendant-arm cross-bridged cyclams. *Inorg. Chim. Acta.*, **2004**, *357*, 615–618.

(42) Niu, W.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Zakharov, L. N.; Incarvito, C. D.; Rheingold, A. L. Copper(II) and zinc(II) complexes of amide pendant-armed cross-bridged tetraamine ligands. *Polyhedron*, **2004**, *23*, 1019–1025.

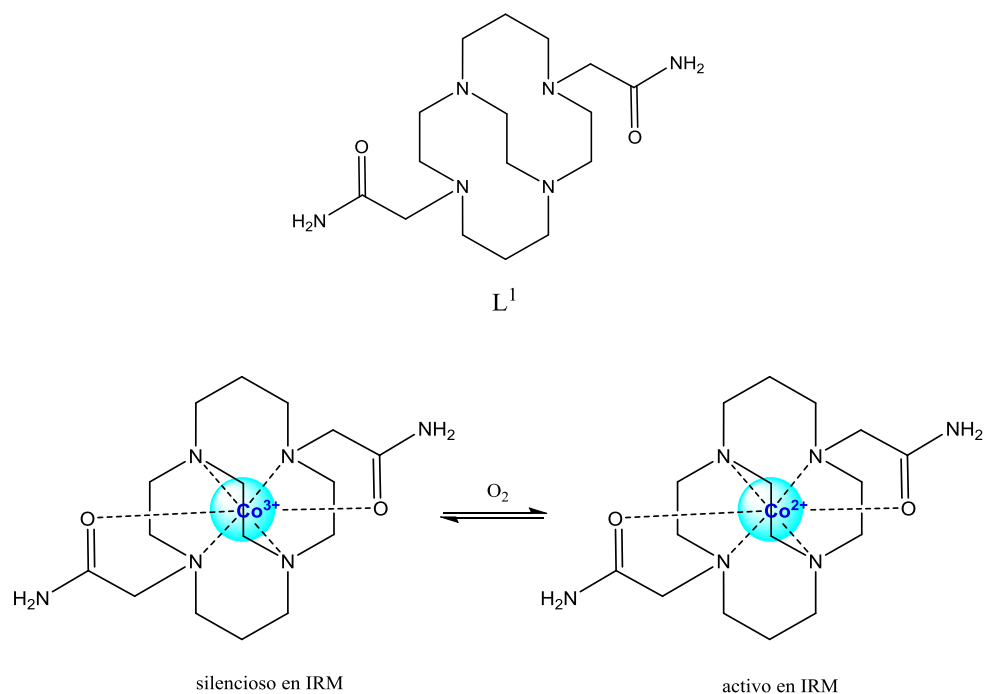


Figura 10: Estructura del ligando L¹ que se estudia en el presente trabajo y esquema muestra el carácter silencioso o activo en MRI de los complejos de Co³⁺ y Co²⁺ respectivamente.

La bibliografía proporciona una gran variedad de ligandos derivados de la plataforma 2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano que han sido utilizados para la complejación de diferentes iones metálicos, incluyendo iones de transición tales como Cu²⁺,⁴³ Fe²⁺,⁴⁴ Mn²⁺,⁴⁴ y Zn²⁺,⁴⁵ o iones lantánidos.⁴⁶ Este tipo de ligandos son extremadamente básicos y algunos de ellos han sido descritos como “esponjas protónicas”.^{41,43,47,48,49,50} Estos sistemas son difíciles de complejar con la mayoría de los

(43) Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Hill, D. C.; Reed, D. P.; Rogers, M. E.; Condon, J.S.; Fagan, M. A.; Calabrese, J. C.; Lam, K. C.; Guzei, I. A.; et al. Synthesis and Characterization of Cross-Bridged Cyclams and Pendant-Armed Derivatives and Structural Studies of Their Copper(II) Complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 10561-10572.

(44) Hubin, T. J.; McCormick, J. M.; Collinson, S. R.; Buchalova, M.; Perkins, C. M.; Alcock, N. W.; Kahol, P. K.; Raghunathan, A.; Busch, D. H. New Iron(II) and Manganese(II) Complexes of Two Ultra-Rigid, Cross-Bridged Tetraazamacrocycles for Catalysis and Biomimicry *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, *122*, 2512-2522.

(45) Niu, W.; Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Lam, K.C.; Rheingold, A. L. Two novel zinc(II) complexes of the 1,8-cross-bridged cyclam ligand and their structures. *Inorg. Chem. Com.*, **1999**, *2*, 361-363.

(46) Rodríguez-R., A.; Esteban-G., D.; Tripier, R.; Tircso, G.; Garda, Z.; Toth, I.; de Blas, A.; Rodríguez-B., T.; Platas-I., C. Lanthanide(III) Complexes with a Reinforced Cyclam Ligand Show Unprecedented Kinetic Inertness. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17954-17957

(47) Weisman, G. R.; Rogers, M. E.; Wong, E. H.; Jasinski, J. P.; Paight, E. S. Cross-bridged cyclam. Protonation and lithium cation (Li⁺) complexation in a diamond-lattice cleft. *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, *112*, 8604-8605.

(48) Hubin, T. J.; McCormick, J. M.; Alcock, N. W.; Clase, J.; Busch, D. H. Crystallographic Characterization of Stepwise Changes in Ligand Conformations as Their Internal Topology Changes and

metales en condiciones próticas, debido a la tendencia de los átomos de nitrógeno del macrociclo a captar los protones del medio. Estudios previos ^{44,48,49} demostraron que este problema se puede solucionar normalmente adicionando una base y, a menudo, utilizando condiciones de reacción enérgicas. El uso de las condiciones adecuadas permite en cualquier caso la preparación de gran variedad de complejos de metales de transición. ^{41,51}

Otra característica única de estos complejos es su elevada inercia cinética con respecto a su disociación en condiciones muy agresivas. ^{41,44,51} Estos factores hacen que este tipo de ligandos sean buenos candidatos para formar complejos con posibles aplicaciones relacionadas con la química de coordinación, tales como catálisis, química radiofarmacéutica...

El ligando L¹ presenta un total de seis potenciales átomos dadores, lo que lo convierte en un candidato ideal para formar complejos octaédricos o pseudo-octaédricos con iones de metales de la primera serie de transición. Dada la capacidad de ciertos complejos de Ni²⁺ con ligandos que contienen grupos acetamida para proporcionar efecto PARACEST ¹⁷, encontramos interesante ensayar la complejación de este ion metálico por el ligando L¹, así como la del complejo de Zn²⁺, ya que su carácter diamagnético es de esperar que facilite su estudio mediante espectroscopia de RMN. Finalmente, nos pareció interesante abordar la complejación del ion Mn²⁺, con objeto de valorar la aplicación del complejo como agente de contraste en caso de poseer una molécula de agua coordinada.

Two Novel Cross-Bridged Tetraazamacrocyclic Copper(II) Complexes. *Inorg.Chem.*, **1999**, 38 , 4435-4446.

(49) Hubin, T. J.; McCormick, J. M.; Alcock, N. W. Topologically Constrained Manganese(III) and Iron(III) Complexes of Two Cross-Bridged Tetraazamacrocycles. *Inorg. Chem.*, **2001**, 40, 435-444.

(50) Bencini, A.; Bianchi, A.; Bazzicalupi, C.; Ciampolini, M.; Fusi, V.; Micheloni, M.; Nardi, N.; Paoli, P.; Valtancoli, B. Proton inclusion properties of a new azamacrocycle. Synthesis, characterization and crystal structure of [H₃L][Cl]₃·2H₂O (L = 4,10-dimethyl-1,4,7,10-tetraazabicyclo[5.5.2]tetradecane). *Supramol. Chem.*, **1994**, 3, 141-146.

(51) Hubin, T. J.; McCormick, J. M.; Collinson, S. R.; Busch, D. H.; Alcock, N. W. Ultra rigid cross-bridged tetraazamacrocycles as ligands-the challenge and the solution . *Chem Comm.*, **1998**, 16, 1675-1676.

4. OBJETIVOS

De acuerdo con lo expuesto en el apartado anterior, en el presente Trabajo Fin de Grado se plantearon los siguientes objetivos:

1. Síntesis del ligando receptor (L^1) y la formación de sus complejos metálicos con los iones de transición Co^{3+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , seleccionando las condiciones de síntesis más adecuadas para su preparación (influencia del disolvente, efecto del contraión, adición de una base...).
2. Caracterización de los complejos sintetizados mediante las técnicas habituales que incluyen: análisis elemental, espectroscopia RMN (1H y ^{13}C), espectroscopia vibracional IR y espectrometría de masas (ESI).
3. Estudio electroquímico del complejo de Co^{3+} para evaluar la capacidad del ligando para estabilizar el estado de oxidación divalente de este ion metálico en disolución acuosa.
4. Evaluación del posible potencial de los complejos sintetizados como agentes de contraste tipo PARACEST. Dentro de los sistemas objeto de estudio, los complejos de Co^{2+} y Ni^{2+} presentan mayor interés ya que sus propiedades paramagnéticas los convierten en candidatos más apropiados para esta finalidad.

5. CRONOGRAMA

El plan de trabajo se distribuye en cinco tareas que a su vez engloban distintas actividades.

- Actividades previas y búsqueda bibliográfica.
- Síntesis de los compuestos
 - Intentos de síntesis de los complejos.
 - Síntesis de los triflato complejos.
 - Síntesis de los perclorato complejos.
- Estudios redox y de RMN, así como análisis de resultados.
- Cálculos DFT.
- Elaboración de la memoria escrita.

El tiempo empleado en cada tarea, así como la distribución de las horas empleadas, se recoge en el diagrama de Gantt expuesto a continuación.

	Febrero				Marzo				Abril					Mayo				Junio				Julio					Agosto				Sept						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	1	2					
Actividades previas																																					
Síntesis del ligando L1																																					
Intentos de síntesis de complejos																																					
Síntesis de los triflato complejos																																					
Síntesis de los perclorato complejos																																					
Estudios Redox																																					
Cálculos DFT																																					
Estudio RMN																																					
Redacción memoria																																					
Horas presenciales	10	16	6	19	20	18	14	12	16	6		12	8	10	10	6	11	10									6	6	14	12	18					14	14
Horas no presenciales									4	4						6	6										8	10	10	6	6						
Total (horas)	366																																				

6. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

6.1. Disolventes y Reactivos

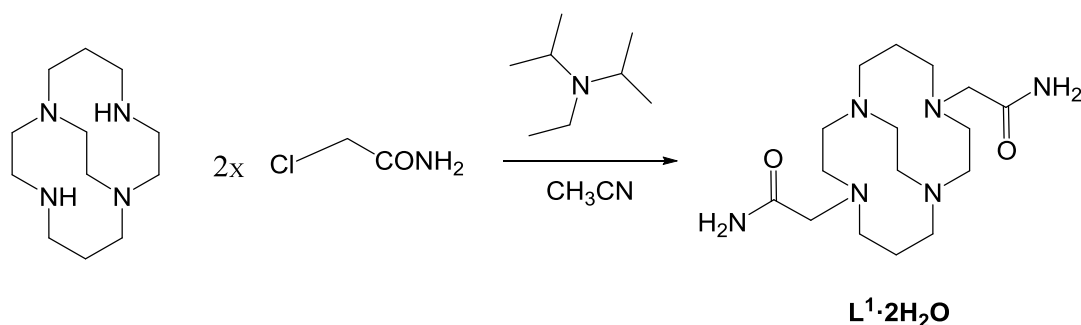
Los reactivos y disolventes empleados en este trabajo se utilizaron tal y como se recibieron de fuentes comerciales sin ninguna purificación adicional.

Disolventes	Casa Comercial
Agua destilada (mili-Q)	
MeOH, 99, 5% PS	PANREAC
CHCl ₃ , 99, 9% PS	PANREAC
CH ₃ CN, 99,7% PS	PANREAC
Et ₂ O, 99,7% PS	PANREAC
2-propanol	PANREAC
1-butanol	PANREAC
<i>N,N</i> -diisopropiletilamina, ≥ 99%	SIGMA ALDRICH
<i>N,N</i> -dimetilformamida, ≥98%	FLUKA
D ₂ O, 99,90% D	EURISO
ND ₄ OD, solución en D ₂ O, 20% p/p, D mín. 99,5%	ALDRICH
NaOH, 1M, PRS	PANREAC
DCl, solución en D ₂ O, 20% p/p, D mín. 99,5%	ALDRICH

Procedimientos Experimentales

Reactivos	Casa Comercial
ZnCl ₂ , ≥ 98%	FLUKA
Zn(CF ₃ SO ₃) ₂ , 98%	SIGMA ALDRICH
Ni(CF ₃ SO ₃) ₂ , 98%	SIGMA ALDRICH
Mn(ClO ₄) ₂ ·6H ₂ O, 99%	SIGMA ALDRICH
Co(ClO ₄) ₂ ·6H ₂ O, 98%	SIGMA ALDRICH
MnCl ₂ ·4H ₂ O	SIGMA ALDRICH
CoCl ₂ ·4H ₂ O	SIGMA ALDRICH
2-cloroacetamida ≥ 98%	SIGMA ALDRICH
Cross-bridged cyclam	CHEMATECH
Na ₂ S ₂ O ₄	PANREAC
(TBA) (ClO ₄) ⁻ ≥ 98%	SIGMA ALDRICH
Hepes ≥ 99, 5%	SIGMA ALDRICH
NaCl, PA	PANREAC

6.2. Síntesis del ligando 2,2'-(1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecano-4,11-diil)diacetamida (L^1).



La síntesis del ligando L^1 se llevó a cabo siguiendo un procedimiento algo diferente del que se recoge en la bibliografía.⁴³ Una mezcla de cross-bridged cyclam (0,4185 g, 1,8488 mmol) y *N,N*-diisopropiletilamina (0,9557 g, 7,3952 mmol) en acetonitrilo (10 mL) se agitan durante 30 min y luego se añade 2-cloroacetamida (0,3462 g, 3,6976 mmol). La mezcla de reacción se calienta a reflujo con agitación durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se deja alcanzar temperatura ambiente, se filtra a vacío y el precipitado blanco obtenido se lava con acetonitrilo (3x7 mL) y se seca a vacío. Sólido blanco. **Rdto:** 0,6283, 66%. **Análisis elemental:** %C: 51,16, %H: 9,51, %N: 22,22. Calculado para $C_{16}H_{32}N_6O_2 \cdot 2H_2O$: %C 51,04, %H 9,64, % N 22,32%. **Espectrometría de masas** (ESI⁺, CH₃OH): m/z 341,27 ($[C_{16}H_{33}N_6O_2]^+$). **Espectroscopia de infrarrojo** (ATR): ν 1672 cm^{-1} (C=O). ¹H NMR (D₂O, pD 7.0, 500 MHz, 25 °C, TMS): δ 3,39 (m, 2H), 3,28 (d, 2H, ²J = 16.8 Hz), 3,00 (m, 10H), 2,87 (m, 2H), 2,60 (m, 8H), 1,94 (m, 2H), 1,52 ppm (m, 2H). ¹³C RMN (D₂O, pD 7.5; 125,8 MHz, 25 °C, TMS): δ 176,3, 59,6, 56,7, 55,8, 54,2, 48,9, 48,6, 23,1 ppm.

6.3 Síntesis de los complejos

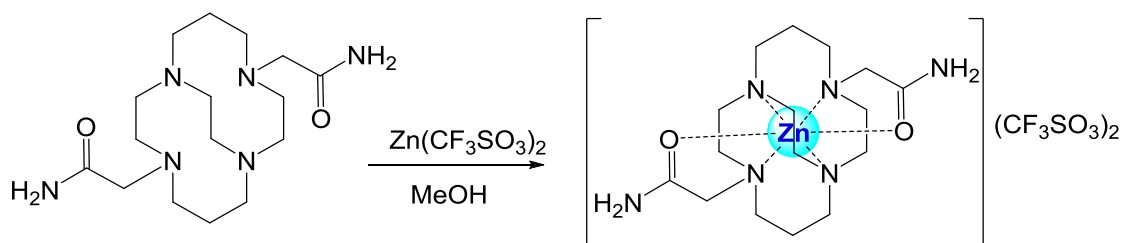
Los complejos de L^1 se prepararon siguiendo los procedimientos que se describen más abajo. A continuación se recogen las condiciones de síntesis y cantidades empleadas en todos los intentos de síntesis llevados a cabo (**Tabla I**), si bien se describen detalladamente únicamente los procedimientos de las síntesis que resultaron exitosas.

Procedimientos Experimentales

Tabla I. Condiciones, reactivos utilizados y rendimientos obtenidos en la preparación de los complejos

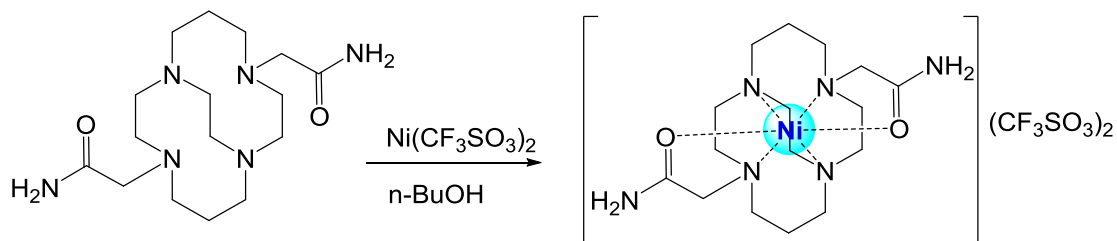
Complejo	Ligando (mg)	Disolvente	DIPEA (μL)	Sal metálica (mg)	Rto %
$[\text{Zn}(\text{L}^1)]\text{Cl}_2$	51	<i>n</i> -BuOH	-	0,0192 ZnCl_2	-
$[\text{Zn}(\text{L}^1)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$	51	<i>n</i> -BuOH	-	0,0528 $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$	-
$[\text{Ni}(\text{L}^1)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$	51	<i>n</i> -BuOH	-	0,0490 $\text{Ni}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$	64
$[\text{Zn}(\text{L}^1)]\text{Cl}_2$	50	MeOH	-	0,0192 ZnCl_2	-
$[\text{Mn}(\text{L}^1)]\text{Cl}_2$	51	<i>n</i> -BuOH	-	0,0275 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-
$[\text{Mn}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_2$	52	<i>n</i> -BuOH	-	0,0498 $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	61
$[\text{Mn}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_2$	51	MeOH	94,8	0,0494 $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-
$[\text{Co}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_2$	53	<i>n</i> -BuOH, DMF	-	0,0494 $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	72
$[\text{Co}(\text{L}^1)]\text{Cl}_2$	50	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}$ (4:1)	-	0,0320 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-
$[\text{Zn}(\text{L}^1)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$	50	MeOH	46,5	0,0486 $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$	34
$[\text{Co}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_2$	51	MeOH	47	0,0496 $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-

6.3.1 Síntesis de $[\text{ZnL}^1](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$



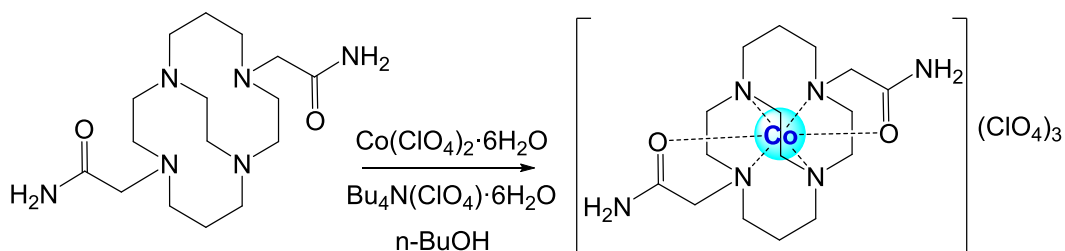
Se disuelve el ligando L^1 (0,0502 g; 0,133 mmoles) en 10 mL de MeOH, a continuación se añaden 46,5 μL de DIPEA y la disolución resultante se calienta durante 5 min. Transcurrido este tiempo, se añade la sal metálica $\text{Zn}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (0,0486 g, 0,134 mmol) disuelta en MeOH (10 mL). La disolución incolora resultante se calienta a reflujo durante 7 días. Transcurrido este tiempo, se deja alcanzar temperatura ambiente y se evapora el disolvente en el rotavapor. Al residuo pastoso obtenido, se le realizan tres lavados con CHCl_3 (3x7 mL) y se seca en la línea de vacío. Sólido blanco. **Rdto:** 0,0324, 34 %. **Análisis Elemental:** %C: 38,70 %H: 5,05, %N: 15,25. Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_6\text{ZnO}_8\text{S}_2$: %C: 31,00, %H: 4,63, %N: 12,03. **Espectroscopia de infrarrojo** (ATR, cm^{-1}): 3218 $\nu(\text{N-H})$, 1671 $\nu(\text{C=O})$, 1243 $\nu_a(\text{S=O})$, 1026 $\nu_s(\text{S=O})$, 1161 $\nu_s(\text{CF}_3)$, 630 $\delta_a(\text{SO}_3)$. **Espectrometría de masas de alta resolución** (HR-ESI⁺, CH_3OH) m/z : 202,0933 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_2\text{Zn}]^{2+}$: 202.0934).

6.3.2 Síntesis de $[\text{NiL}^1](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$



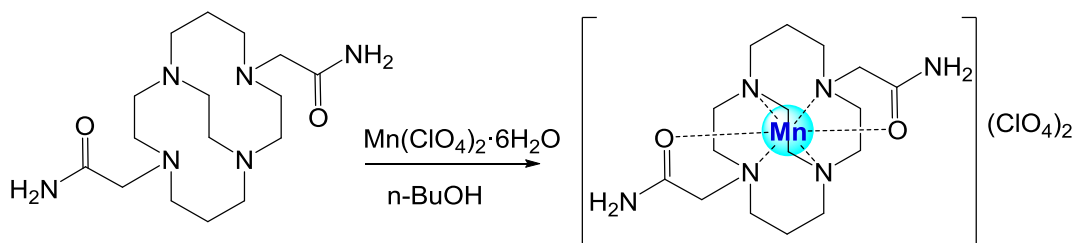
Se suspenden 0,0506 g de L^1 (0,134 mmoles) en 10 mL de n-BuOH y se calienta a reflujo hasta su completa disolución, momento en el cual se añade la sal metálica $\text{Ni}(\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (0,0490 g, 0,134 mmol) disuelta en n-BuOH (4 mL). Al finalizar dicha adición, la disolución presenta una tonalidad amarilla, pero al cabo de 20 min la disolución torna a color rosa. Esta disolución rosácea se calienta a reflujo durante 15 días. Transcurrido este tiempo, se deja alcanzar temperatura ambiente y se evapora el disolvente en el rotavapor. Sobre el residuo aceitoso obtenido, se adiciona agua mili-Q y la mezcla resultante se lleva a sequedad. Esta operación se repite dos veces hasta observar un residuo menos aceitoso. Por último, se seca en la línea de vacío. Sólido rosa. **Rdto:** 0,0608 g, 64%. **Análisis Elemental:** %C: 31,33 %H: 4,63, %N: 12,05. Calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{F}_6\text{N}_6\text{NiO}_8\text{S}_2$: %C: 31,00, %H: 4,63, %N: 12,03. **Espectroscopia de infrarrojo** (ATR, cm^{-1}): 3290 ν (N-H), 1666 ν (C=O), 1239 ν_a (S=O), 1025 ν_s (S=O), 1154 ν_s (CF_3), 632 δ_a (SO_3). **Espectrometría de masas de alta resolución** (HR-ESI⁺, CH_3OH) m/z : 199,0984 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_2\text{Ni}]^{2+}$: 199,0965), 397,1856 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_2\text{Ni}]^+$: 397,1856).

6.3.2. Síntesis de $[\text{CoL}^1](\text{ClO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$



Se calienta a reflujo una suspensión del ligando L^1 (0,0487 g; 0,129 mmoles) en 10 mL de n-BuOH hasta su completa disolución y a continuación se añade la sal metálica $\text{Co}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0494 g, 0,134 mmol) disuelta en 2mL de n-BuOH. Tras la aparición de un precipitado azul se añade la cantidad necesaria de DMF hasta la completa disolución del sólido. Transcurridos 10 días, se añade $\text{Bu}_4\text{N}(\text{ClO}_4)$ (0,0663 g; 0,194 mmoles) y al cabo de 20 min se retira la reacción y la mezcla de color morado se filtra a vacío recogiéndose un precipitado rojo-rosáceo. **Rdto:** 0,0722g, 72%. **Análisis Elemental:** %C: 25,51 %H: 5,15, %N: 11,38. Calculado para $\text{C}_{16}\text{H}_{38}\text{Cl}_3\text{CoN}_6\text{O}_{17}$: %C: 25,56, %H: 5,09, %N: 11,38. **Espectroscopia de infrarrojo (ATR, cm^{-1}):** 3270 ν (N-H), 1768 ν (C=O), 1081 ν_a (Cl-O), 621 δ_a (ClO_4). **Espectrometría de masas de alta resolución (HR-ESI+, CH_3OH) m/z :** 199.0914 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{CoN}_6\text{O}_2]^{2+}$:199,0915), 397,1756 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{30}\text{CoN}_6\text{O}_2]^+$: 397,3886).

5.3.2. Síntesis de $[\text{MnL}^1](\text{ClO}_4)_2$



Se suspende el ligando L^1 (0,518 g; 0,138 mmoles) en 10 mL de n-BuOH y se calienta a reflujo hasta su completa disolución, momento en el cual se añade la sal metálica $\text{Mn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,0498 g; 0,138 mmoles) disuelta en n-BuOH (4mL). Transcurridos 3 días se retira la reacción, se deja enfriar y la mezcla de tonalidad arenosa se filtra a

Procedimientos Experimentales

vacío a través de placa filtrante. El precipitado marrón se lava con n-BuOH (3x7 mL) y se descarta, mientras que el filtrado amarillo se concentra a sequedad para dar un sólido marrón. **Rdto:** 0,0498, 61 %. **Espectroscopia de infrarrojo** (ATR, cm^{-1}): 3350 $\nu(\text{N-H})$, 1659 $\nu(\text{C=O})$, 1060 $\nu_{\text{a}}(\text{Cl-O})$, 621 $\delta_{\text{a}}(\text{ClO}_4)$. **Espectrometría de masas de alta resolución** (HR-ESI⁺, CH₃OH) m/z : 197,5978 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_2\text{Mn}]^{2+}$: 197.5978), 394.1883 (calculado para $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{N}_6\text{O}_2\text{Mn}]^+$: 394,1884).

6.4. Técnicas de Caracterización

6.4.1. Análisis Elemental: Los porcentajes de carbono, nitrógeno e hidrógeno se determinaron por combustión en un analizador elemental ThermoQuest Flash 1112.

6.4.2. Espectroscopia Infrarroja: Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro infrarrojo *Perkin-Elmer Bruker Vector 22* provisto del accesorio ATR de diamante modelo Golden Gate de la marca Specac, mediante la técnica de ATR o “*Attenuated Total Reflectance*”, o bien empleando un espectrofotómetro *FTIR Satellite Mattson* con pastillas de KBr.

6.4.3. Espectrometría de Masas: Los espectros de masas, tanto de alta como de baja resolución, se registraron utilizando un espectrómetro *LC-Q-q-TOF Applied Biosystems QSTAR Elite*, mediante la técnica de electrospray en modo positivo.

6.4.4. Cálculos DFT:

El estudio computacional se llevó a cabo utilizando los recursos del Centro de Supercomputación de Galicia (CESGA). Todos los cálculos se realizaron usando la Teoría del Funcional de Densidad (DFT), junto con el funcional de densidad híbrido de Tao, Perdew, Staroverov y Scuseria (TPSSH),⁵² el conjunto base de valencia triple (triple- ξ) de Ahlrichs que incluye funciones de polarización (tzvp)⁵³ y los paquetes informáticos del programa Gaussian 09 (Revisión D.01).⁵⁴ Los mínimos de energía obtenidos como resultado de las optimizaciones de las geometrías se caracterizaron mediante el correspondiente análisis de frecuencias. Todos los cálculos se realizaron en

(52) Tao, J.; Perdew, J. P.; Staroverov, V. N.; Scuseria, Gustavo, E. Climbing the Density Functional Ladder: Nonempirical Meta-Generalized Gradient Approximation Designed for Molecules and Solids. *Phys. Rev. Lett.*, **2003**, *91*, 146401-146401.

(53) Schaefer, A.; Huber, C.; Ahlrichs, R. Fully optimized contracted Gaussian basis sets of triple zeta valence quality for atoms Li to Kr *J. Chem. Phys.*, **1994**, *100*, 5829-5835.

(54) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Scalmani, G.; Barone, V.; Mennucci, B.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Caricato, M.; Li, X.; Hratchian, H. P.; Izmaylov, A. F.; Bloino, J.; Zheng, G.; Sonnenberg, J. L.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Vreven, T.; Montgomery, Jr., J. A.; Peralta, J. E.; Ogliaro, F.; Bearpark, M.; Heyd, J. J.; Brothers, E.; Kudin, K. N.; Staroverov, V. N.; Kobayashi, R.; Normand, J.; Raghavachari, K.; Rendell, A.; Burant, J. C.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Cossi, M.; Rega, N.; Millam, N. J.; Klene, M.; Knox, J. E.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Martin, R. L.; Morokuma, K.; Zakrzewski, V. G.; Voth, G. A.; Gaussian 09. Revision D.01, Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Farkas, Ö.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cioslowski, J.; Fox, D. J. Gaussian, Inc., Wallingford CT, **2009**.

disolución acuosa. Los efectos del disolvente se tuvieron en consideración empleando el modelo de continuo polarizado, en particular la variante IEFPCM.⁵⁵ Los desplazamientos de RMN de ^{13}C se calcularon usando el método GIAO,⁵⁶ tomando como referencia el tetrametilsilano.

6.4.5. Medidas de pH:

Las medidas de pH se realizaron a temperatura ambiente empleando el pH-metro CRISON GLP 22 y un electrodo de pH CRISON 5209.

6.4.6. RMN ^{13}C y ^1H :

Para la caracterización de los complejos sintetizados por RMN, se disolvieron las cantidades necesarias de cada complejo en 0,6 mL de D_2O o H_2O para fijar una concentración de 20 - 30 mM. Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN se realizaron en los Servicios de Apoyo a la Investigación de la Universidade da Coruña (SAI), y se registraron empleando el espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker AVANCE 300, equipado con una sonda triple TBI y sonda QNP. Los desplazamientos químicos fueron determinados en escala de partes por millón (ppm), con constantes de acoplamiento (J) en Hercios (Hz).

6.4.7. Experimentos CEST:

Para la realización de los experimentos CEST se prepararon disoluciones de concentración 20 mM de la misma forma que para la adquisición de los espectros de ^1H convencionales. Con el fin de simular las condiciones fisiológicas, a estas disoluciones se les añadieron las cantidades necesarias de NaCl para obtener una concentración del mismo de 0,15 M, así como las porciones requeridas de tampón HEPES (Ácido 4-(2-hidroxi-etil)-piperaxina-1-etanosulfónico) para una concentración de 20mM.

(55) Tomasi, J.; Mennucci, B.; Cammi, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. *Chem. Rev.*, **2005**, *105*, 2999-3093.

(56) Wolinski, K.; Hilton, J. F.; Pulay, P. Efficient implementation of the gauge-independent atomic orbital method for NMR chemical shift calculations. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8251-8260.

6.4.8. Medidas de Voltametría Cíclica

Estas medidas se ha realizado en el laboratorio de Química Física de esta facultad, con un equipo potenciostato/galvanostato 797 VA Computrace de la casa Metrohm (Herisau, Suiza) usando una celda de tres electrodos. Se utilizó un electrodo de carbono vítreo de disco rotatorio (RDE) como electrodo de trabajo. Como contraelectrodo se empleó un electrodo de barra de platino. Los potenciales fueron medidos empleando un electrodo de referencia Ag/AgCl relleno de una disolución de KCl de concentración 3 mol L^{-1} . Se utilizó una velocidad de agitación de 2000 rpm. Las disoluciones se purgaron con nitrógeno de alta pureza (99,999%) durante 30 s antes el registro de los voltamogramas. Los potenciales iniciales y finales se fijaron a 0,2 V, efectuándose barridos hasta -0,6 V con una velocidad de barrido de 50 mV/s. Las disoluciones de los complejos para las mediciones de voltametría cíclica se prepararon con una concentración de 1,5 mM de $[\text{CoL}^1](\text{ClO}_4)_3$ conteniendo 0,1 M KCl. El pH de la disolución se ajustó a 6,96 con NaOH acuoso.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

7.1. Síntesis del ligando

La síntesis del ligando L^1 , detallada en la *Parte Experimental*, implica la reacción entre el macrociclo precursor “ciclám cross-bridge” y la 2-cloroacetamida empleando DIPEA como base. Los datos de análisis elemental de L^1 indican que se ha obtenido químicamente puro ajustándose a la fórmula química $L^1 \cdot 2H_2O$. El procedimiento sintético utilizado es ligeramente diferente al empleado por Rheingold y colaboradores, que emplearon K_2CO_3 como base.⁵⁵ En las condiciones empleadas el ligando precipita en el medio de reacción, lo que facilita su aislamiento. La presencia de la banda de tensión $\nu(C=O)$ característica del grupo carbonilo a 1672 cm^{-1} en el espectro IR de este compuesto, confirma la incorporación de la cadena colgante acetamida a la plataforma macrocíclica. El espectro MS-ESI⁺ en metanol de L^1 muestra el pico esperado a $m/z = 341,27$ correspondientemente al ion pseudomolecular $[HL^1]^+$ con una intensidad de pico base del 100%.

El espectro de RMN de 1H registrado en D_2O muestra un conjunto de señales no muy bien definidas en el intervalo 1.5 – 3.5 ppm. Por su parte, el espectro de ^{13}C muestra las 8 señales esperadas, de entre las que se pueden identificar fácilmente la correspondiente al carbono del grupo carbonilo a 176.3 ppm y la debida al carbono en posición β con respecto a los átomos de nitrógeno del macrociclo.

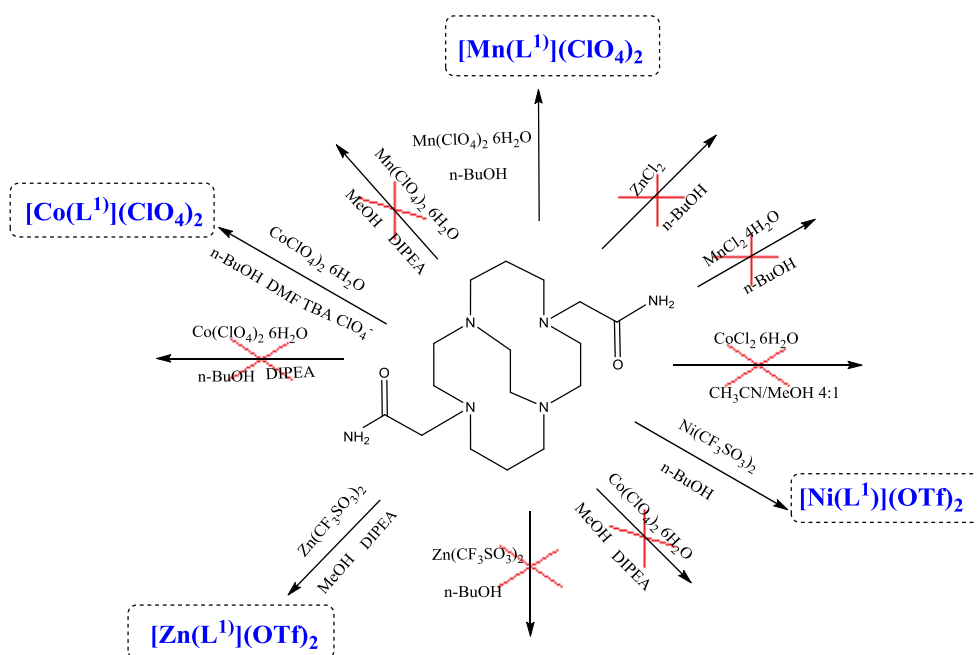
7.2 Síntesis de los complejos metálicos

Se han realizado distintos ensayos para la preparación de los complejos metálicos, cuyas condiciones experimentales se encuentran recogidas en la *Parte Experimental*. Estos ensayos se resumen en el **Esquema I**. La preparación de complejos metálicos con ligandos de tipo cross-bridged presenta a menudo dificultades asociadas a cinéticas de complejación lentas, que se deben por un lado a la rigidez de estos ligandos, y a su carácter de esponjas protónicas, que hace que la protonación del ligando compita con el proceso de complejación. Por ello, se realizaron experimentos de síntesis empleando diferentes disolventes (MeOH, n-BuOH o acetonitrilo) y contraiones (Cl^- , ClO_4^- y $CF_3SO_3^-$), en presencia o ausencia de base.

Discusión de Resultados

Ninguno de los intentos de preparar los complejos usando las sales de cloruro resultó ser exitoso. La espectrometría de masas ESI⁺ proporciona información valiosa sobre el progreso de la reacción de complejación. Los espectros registrados de las mezclas de reacción en las que se usaron cloruro como contraión están dominados por el pico a $m/z = 341,27$ debida al ligando protonado. Esto sugiere que los contraiones coordinados promueven la formación de complejos exocíclicos, en los que el ion metálico se encuentra probablemente coordinado a las cadenas colgantes y completa su coordinación con ligandos aniónicos. La formación de estos complejos exocíclicos es probable que inhiba la formación del complejo endocíclico deseado.

Esquema I. Síntesis de los complejos de metales de transición (Zn, Mn, Ni, Co) con el ligando L¹.



En cuanto al efecto del disolvente, los resultados obtenidos indican que el n-BuOH (p. e. 117,4 °C) es un disolvente más adecuado que el MeOH (p. e. 64,7 °C), presumiblemente debido a que su mayor punto de ebullición permite aumentar la temperatura del medio de reacción, favoreciendo así la formación del complejo. Finalmente, la adición de base no resultó necesaria para la preparación de los complejos en la mayor parte de los casos.

La reacción del ligando con Co(ClO₄)₂ resultó en la formación del complejo de Co³⁺ sin necesidad de añadir ningún agente oxidante. Es probable que el complejo de

Discusión de Resultados

Co^{2+} formado en el medio de reacción se oxida por el oxígeno atmosférico en disolución.

7.3 Caracterización de los complejos: Espectrometría de masas y espectroscopía IR

Los complejos metálicos se aislaron en forma de sales de perclorato (Mn^{2+} y Co^{3+}) o triflato (Ni^{2+} y Zn^{2+}). Los espectros de masas ESI^+ de alta resolución de los complejos de los iones divalentes muestran los picos debidos a las entidades $[\text{M}(\text{L}^1)]^{2+}$ y, en el caso de los complejos de Mn^{2+} y Ni^{2+} , los debidos a las unidades $[\text{M}(\text{L}^1-\text{H})]^+$ ($\text{M} = \text{Mn}$ o Ni). El excelente acuerdo entre los patrones isotópicos experimentales y calculados (**Figuras 11-12**) confirma la formación de los complejos deseados. Por su parte, el complejo de Co muestra picos debidos a las entidades $[\text{Co}(\text{L}^1-\text{H})]^{2+}$ y $[\text{Co}(\text{L}^1-2\text{H})]^+$ (**Figura 12**), demostrando la formación del complejo con el ion metálico en estado de oxidación +III.

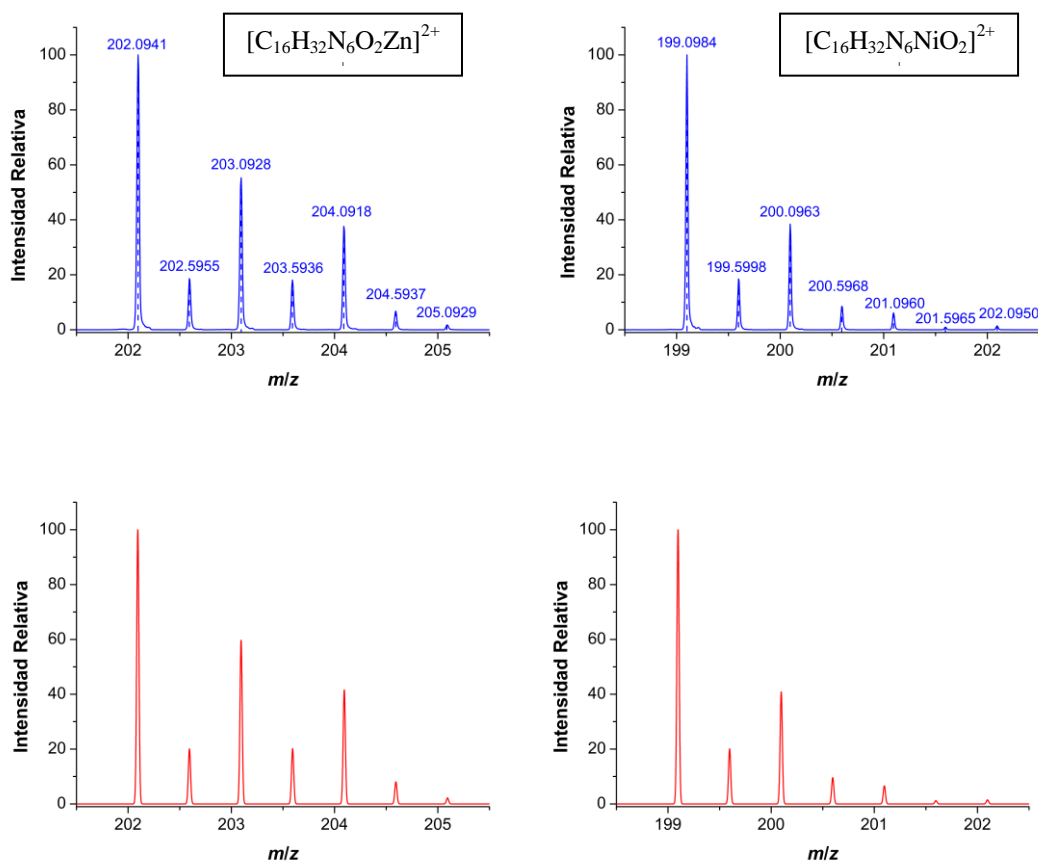


Figura 11. Espectros de masas ESI^+ de alta resolución experimentales (azul) y calculados (rojo) que muestran los picos debidos a las entidades $[\text{Zn}(\text{L}^1)]^{2+}$ y $[\text{Ni}(\text{L}^1)]^{2+}$.

Discusión de Resultados

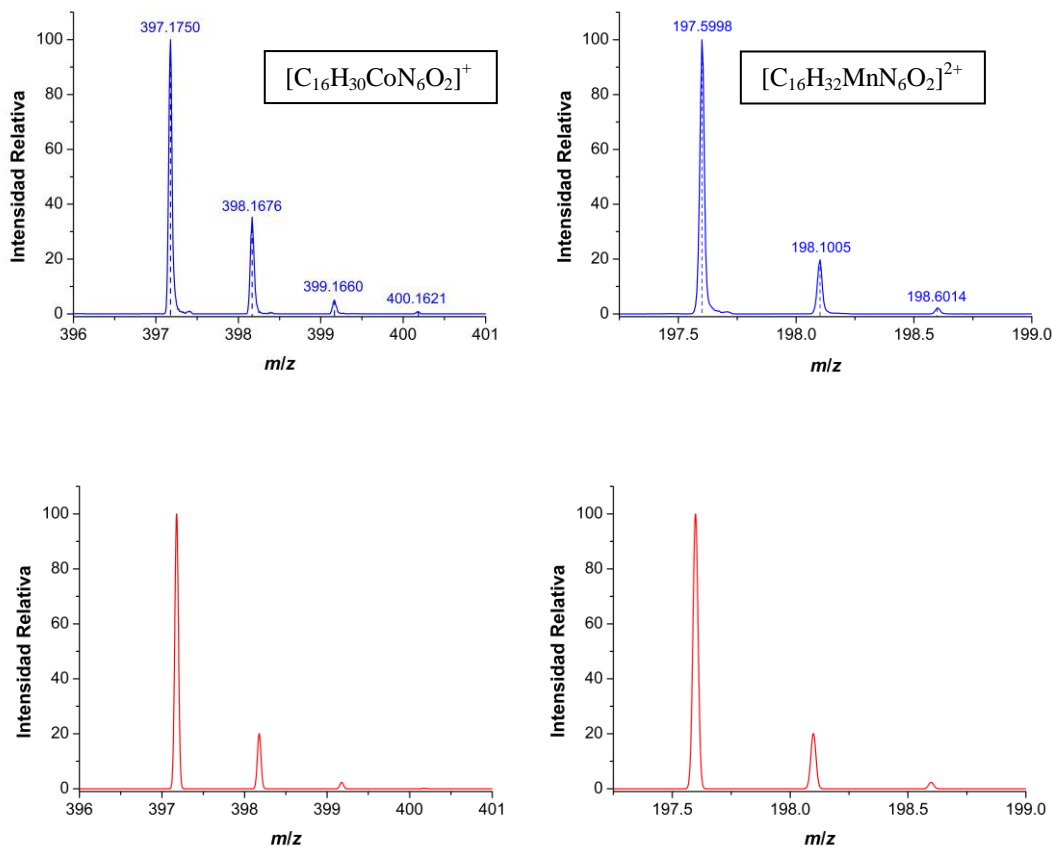


Figura 12. Espectros de masas ESI⁺ de alta resolución experimentales (azul) y calculados (rojo) que muestran los picos debidos a las entidades [Co(L¹-2H)]⁺ y [Mn(L¹-H)]²⁺.

Los espectros de IR de los complejos de los iones divalentes, registrados mediante la técnica ATR, muestran una banda intensa debida a la vibración del grupo carbonilo a 1671 (Zn), 1666 (Ni) y 1659 (Mn) cm⁻¹ que presentan desplazamientos hacia números de onda más bajos con respecto al ligando libre (1672 cm⁻¹). Este desplazamiento es muy pequeño en el caso del complejo de Zn²⁺, pero significativo en los casos de Ni y Mn, lo cual indica la coordinación de los grupos amida a estos iones metálicos. Por su parte, el espectro del complejo de Co³⁺ presenta esta banda a números de onda mucho mayores (1768 cm⁻¹), probablemente debido al mayor estado de oxidación del ion metálico.

Los espectros de IR de los triflato complejos [Ni(L¹)](CF₃SO₃)₂ y [Zn(L¹)](CF₃SO₃)₂ presentan las bandas características del anión triflato:⁵⁷ las tensiones asimétrica y simétrica de los enlaces S=O a unos 1240 y 1025 cm⁻¹, respectivamente, la

(57) Lawrance, G. A. Coordinated Trifluoromethanesulfonate and fluorosulfate. *Chem Rev.*, **1986**, 86, 17-33.

Discusión de Resultados

tensión simétrica de los grupos $-\text{CF}_3$ a unos 1160 cm^{-1} , y la flexión asimétrica del grupo $-\text{SO}_3^-$ alrededor de 630 cm^{-1} (**Tabla II**). En el caso de los perclorato complejos $[\text{Mn}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_2$ y $[\text{Co}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_3$ se observa la tensión asimétrica de los enlaces Cl-O a unos 1070 cm^{-1} y la flexión asimétrica a 621 cm^{-1} .⁵⁸ La primera aparece como una banda ancha que resulta poco informativa. Sin embargo, la banda a 621 cm^{-1} es bastante aguda, y no se encuentra desdoblada, lo que sugiere que el anión perclorato no se encuentra coordinado al ion metálico.

Tabla II. Principales bandas (cm^{-1}) observadas en los espectros IR de los complejos metálicos de L^1 .

	$[\text{Mn}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_2$	$[\text{Co}(\text{L}^1)](\text{ClO}_4)_3$	$[\text{Ni}(\text{L}^1)](\text{OTf})_2$	$[\text{Zn}(\text{L}^1)](\text{OTf})_2$
$\nu(\text{C}=\text{O})$	1659	1768	1666	1671
$\nu_a(\text{S}=\text{O})$	-	-	1239	1243
$\nu_s(\text{S}=\text{O})$	-	-	1025	1026
$\nu_s(\text{CF}_3)$	-	-	1154	1161
$\delta_a(\text{SO}_3)$	-	-	632	630
$\nu_a(\text{Cl}-\text{O})$	1060	1081	-	-
$\delta_a(\text{ClO}_4)$	621	621	-	-

7.4. Espectroscopía de RMN

Los espectros de RMN de ^1H de los complejos diamagnéticos de Co^{3+} y Zn^{2+} registrados en D_2O a $\text{pH} \sim 7.5$ presentan un gran número de señales solapadas en el intervalo 1,6 – 3,8 (Zn) y 2,0 – 4,2 (Co), resultando poco informativos. Por su parte, el espectro de ^{13}C del complejo de Zn^{2+} presenta las 8 señales esperadas para una simetría efectiva C_2 en disolución acuosa (**Figura 13**). La señal debida al grupo carbonilo sufre un pequeño apantallamiento, desplazándose de 176.3 ppm en el ligando libre a 176.1 en el complejo. El carbono en posición β con respecto a los nitrógenos amina del macrociclo también sufre un ligero apantallamiento de 23.1 ppm a 22.7 ppm. Los restantes carbonos de la unidad macrocíclica sufren sin embargo desplazamientos importantes a campo bajo, lo que demuestra la formación del complejo (**Tabla III**). La asignación del espectro de RMN del complejo se realizó empleando cálculos teóricos (método GIAO, TPSSh/tzvp), tal y como se describe en la *Sección Experimental*.

(58) Nakamoto K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, **1972**, 142–154.

Discusión de Resultados

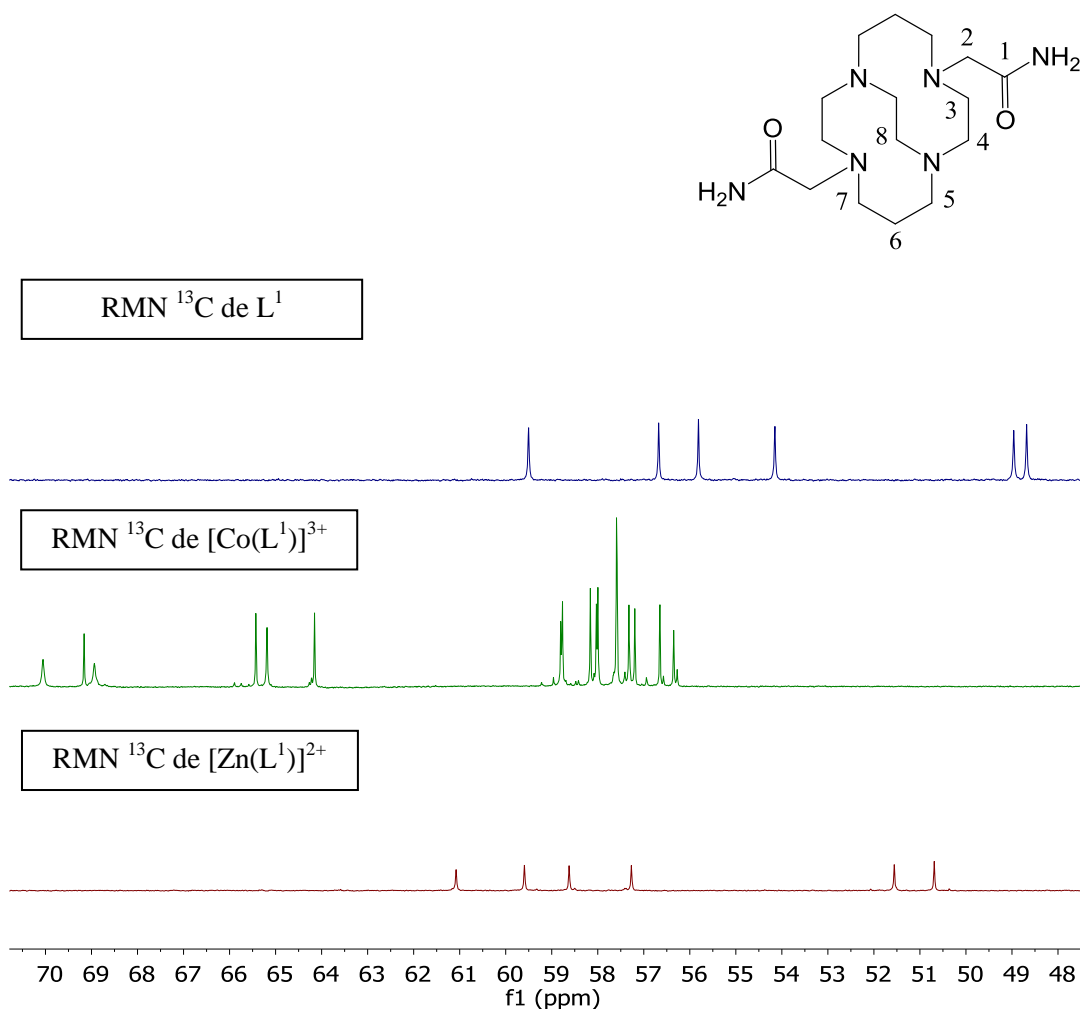


Figura 13. Región central de los espectros de RMN de ^{13}C del ligando L^1 (arriba) y de los complejos $[\text{Co}(\text{L}^1)]^{3+}$ y $[\text{Zn}(\text{L}^1)]^{2+}$ (D_2O , pH ~ 7.5 , 25°C).

Tabla III. Desplazamientos químicos en ^{13}C (δ , ppm) observados para el ligando L^1 y el complejo $[\text{Zn}(\text{L}^1)]^{2+}$ en D_2O a pH ~ 7.5 y valores estimados usando cálculos DFT.

	L^1	$[\text{Zn}(\text{L}^1)]^{2+}$ (exp)	$[\text{Zn}(\text{L}^1)]^{2+}$ (Cald)
C1	176.3	176.1	178.6
C2	56.7	59.6	64.4
C3	48.6	50.7	54.7
C4	54.1	57.3	59.4
C5	59.6	61.1	65.5
C6	23.0	22.7	28.3
C7	55.8	58.6	62.8
C8	48.9	51.6	55.8

En el caso del complejo de Co^{3+} , el espectro de RMN de ^{13}C es más complicado, mostrando tres señales para los carbonos del grupo carbonilo y el carbono β con respecto a los nitrógenos amina del macrociclo. Esto sugiere la presencia en disolución

Discusión de Resultados

de tres especies complejas, o bien dos formas una con simetría C_2 y la segunda con simetría C_1 . La región 56-59 ppm muestra también un gran número de señales compatible con la presencia de al menos dos especies complejas en disolución (**Figura 13**).

7.5. Estudios redox

Con objeto de evaluar la estabilidad relativa de los estados de oxidación +III y +II del cobalto complejoado por L^1 se realizaron medidas de voltametría cíclica usando una disolución acuosa 1,5 mM del complejo $[Co(L^1)]^{3+}$ conteniendo 0,1 M KCl. El voltamograma cíclico registrado muestra una onda cuasireversible ($\Delta E_p = 114$ mV) con un potencial de semionda de -197 mV con respecto a Ag/AgCl (**Figura 14**). Este potencial corresponde a +13 mV en la escala del electrodo normal de hidrógeno.⁵⁹ Este potencial es interesante para la aplicación de este compuesto como sonda redox en sistemas biológicos, pues el potencial de reducción del par glutatión/glutatión disulfuro (GSH/GS-SG) (-220 mV)⁶⁰ anticipa la reducción del complejo $[Co(L^1)]^{3+}$ al análogo en estado de oxidación divalente.

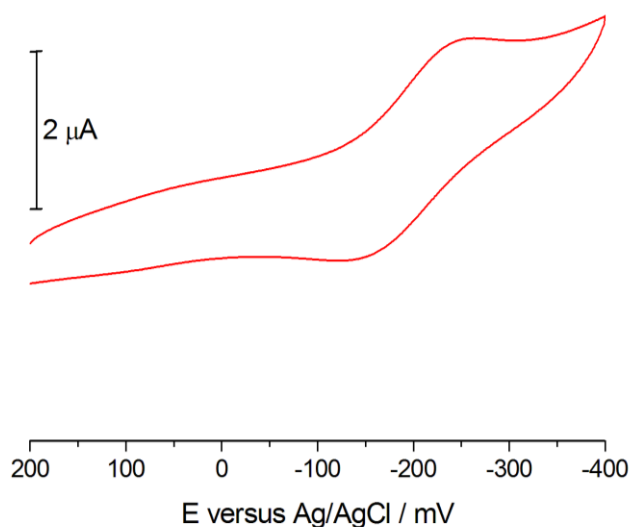


Figura 14: Voltamograma cíclico registrado utilizando una disolución acuosa 1,5 mM de $[Co(L^1)]^{3+}$ (0,1 M KCl, pH 7.0) utilizando una velocidad de barrido de 50 mV/s.

(59) Friis, E. P.; Andersen, J. E. T.; Madsen, L. L.; Bonander, N.; Moller, P.; Ulstrup. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its Cys3Ser mutant at single-crystal gold surfaces investigated by cyclic voltammetry and atomic force microscopy. *J. Electrochim. Acta*, **1998**, *43*, 1114-1122.

(60) Jocelyn, P. C. The Standard Redox Potential of Cysteine-Cystine from the Thiol-Disulphide Exchange Reaction with Glutathione and Lipoic Acid, *Eur. J. Biochem.*, **1967**, *2*, 327-331.

Discusión de Resultados

Con objeto de estudiar la reactividad redox del complejo $[\text{Co}(\text{L}^1)]^{3+}$ se realizó un estudio de RMN de ^1H . Para ello se preparó una disolución 20 mM del complejo en H_2O , que presenta una coloración roja intensa. A continuación se añadió un exceso de ditionito sódico, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, un agente reductor suave ($E^\circ = -0.66 \text{ V vs NHE a pH 7}$).⁶¹ La adición del agente reductor provoca un cambio inmediato del color de la disolución, que se tornó amarillo pálido (**Figura 15**). El correspondiente espectro de RMN de protón muestra una serie de señales relativamente anchas en el intervalo -42 a +178 ppm. Los desplazamientos químicos observados son característicos de complejos paramagnéticos de Co^{2+} , en los que las señales de protón sufren fuertes desplazamientos de contacto debido a la presencia de los electrones desapareados del ion metálico (**Figura 15**). Estos resultados confirman los estados de oxidación divalente y trivalente del cobalto son accesibles, y por tanto la utilidad potencial del complejo $[\text{Co}(\text{L}^1)]^{3+}$ como sensor redox.

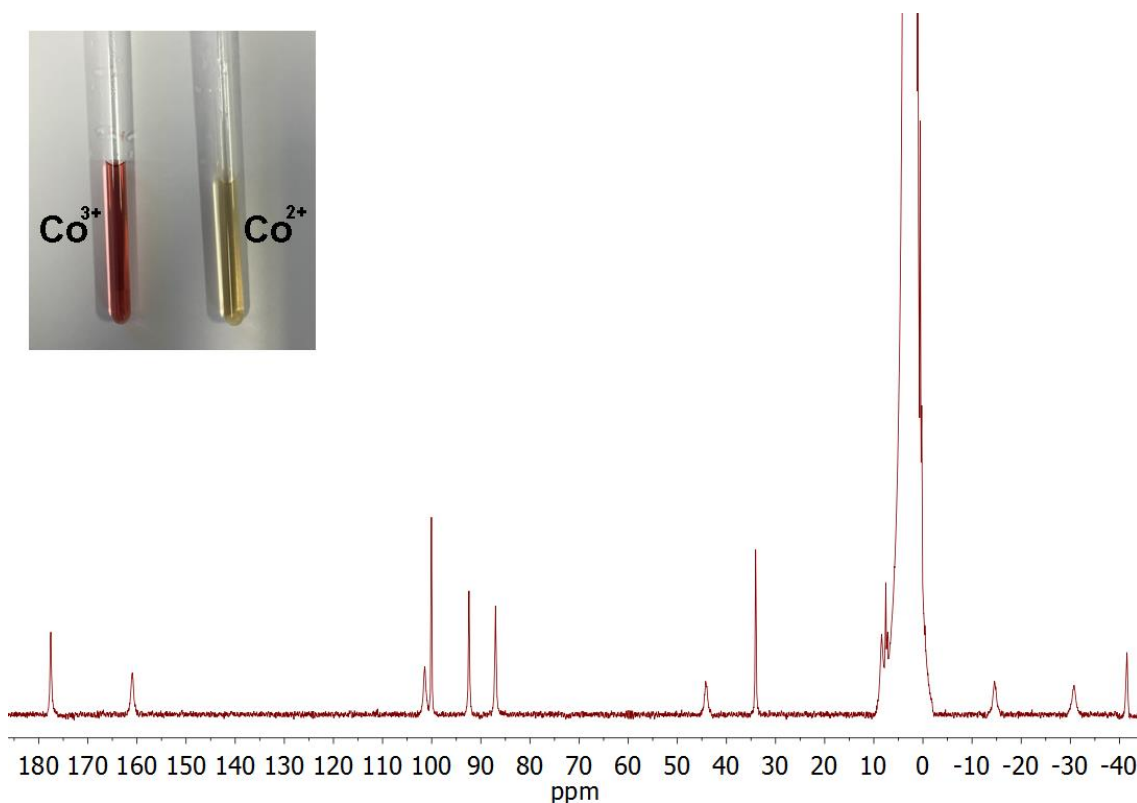


Figura 15: Espectro de RMN de ^1H registrado a una disolución acuosa de $[\text{Co}(\text{L}^1)]^{3+}$ (20 mM) registrado tras la adición de un exceso de ditionito sódico, e imagen donde se muestra el cambio de color del complejo de Co^{3+} tras la reducción. La señal debida al disolvente se ha troncado para conseguir una mejor visualización.

(61) MayheW, S.G. The redox potential of dithionite and sulfur dioxide(1-) from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase. *Eur. J. Biochem.*, **1978**, *85*, 535-547.

Discusión de Resultados

7.6. Cálculos DFT

Ante la ausencia de monocristales adecuados para su estudio por rayos-X, se procedió a realizar un estudio estructural de los complejos presentados en esta memoria usando cálculos DFT (véase Parte Experimental para más detalles). Todos los complejos presentan estructuras similares, en las que el ligando adopta una geometría *cis*-V que proporciona cuatro átomos de nitrógeno con sus pares solitarios situados de forma convergente.⁶² Las unidades biciclo[6.6.2] del esqueleto del ligando adoptan conformaciones [2233]/[2233],⁶³ con los anillos quelato de seis miembros en disposición silla. Los entornos de coordinación de los iones metálicos pueden describirse como octaédricos distorsionados en todos los casos.

Tabla IV. Distancias de enlace (Å) de los entornos de coordinación de los iones metálicos obtenidos mediante cálculos DFT para los sistemas $[M(L^1)]^{2+}$ (M = Mn, Co, Ni o Zn) y $[Co(L^1)]^{3+}$

		N ₁ ,N ₂	N ₃ ,N ₄	O ₁ ,O ₂
Mn ²⁺	DFT	2,357	2,502	2,197
Co ²⁺	DFT	2,160	2,126	2,121
Co ³⁺	DFT	2,008	1,973	1,925
Ni ²⁺	DFT	2,112	2,081	2,097
Zn ²⁺	DFT	2,163	2,137	2,153
Zn ²⁺	Rayos-X	2.147	2.087	2.099

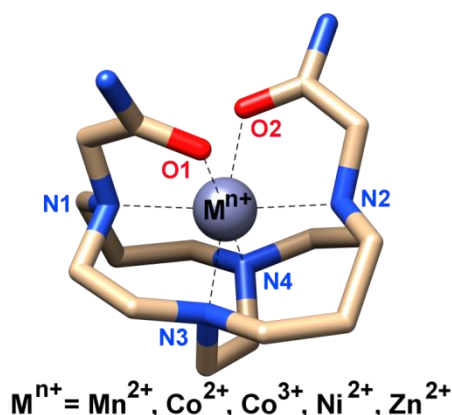


Figura 16. Estructura de los complejos $[M(L^1)]^{2+}$ (M = Mn, Co, Ni o Zn) y $[Co(L^1)]^{3+}$ obtenidas mediante cálculos DFT al nivel TPSSh/tzvp.

(62) Niu, W. Wong, E. H.; Weisman, G. R.; Hill, D. C.; Tranchemontagne, D. J.; Lam, K.C.; Sommer, R. D.; Zakharov, L. N.; Rheingold, A. L. Inside or outside a ligand cleft? Synthetic, structural, and kinetic inertness studies of zinc, cadmium, and mercury complexes of cross-bridged cyclam and cyclen. *Dalton Trans*, **2004**, 3536-3547.

(63) a) Meyer, M.; Dahaoui-Gindrey, V.; Lecomte, C.; Guillard, R. Conformations and coordination schemes of carboxylate and carbamoyl derivatives of the tetraazamacrocycles cyclen and cyclam, and the relation to their protonation states. *Coord. Chem. Rev.*, **1998**, 178-180, 1313-1405; b) Dale, J. Exploratory calculations of medium and large rings. 1. Conformational minima of cycloalkanes. *J. Acta Chem. Scand.*, **1973**, 27, 1115-1129.

Discusión de Resultados

Las distancias de enlace calculadas para el complejo de Zn^{2+} se desvían menos de 0,06 Å con respecto a los valores experimentales observados en la estructura de rayos-X.⁶⁴ Para los iones divalentes, las distancias de enlace disminuyen al proceder hacia la derecha en la serie de transición desde Mn a Ni, para aumentar a continuación para el complejo de Zn^{2+} . Tal y como cabía esperar en función de su menor radio iónico, el complejo de Co^{3+} presenta distancias metal-dador significativamente más cortas que el análogo de Co^{2+} : los radios iónicos de Shannon para los iones hexacoordinados son 0,745 Å (Co^{2+} , configuración de espín alto) y 0,545 Å (Co^{3+} , configuración de espín bajo).⁶⁴

7.7. Experimentos CEST

El espectro de protón del complejo $[Ni(L^1)](CF_3SO_3)_2$, debido a su carácter paramagnético, presenta señales de gran anchura que no permiten su asignación inequívoca. A pesar de ello, se ha podido identificar las señales debidas a los protones intercambiables de los grupos amida a unos 45 y 71 ppm con respecto a la señal del disolvente, por simple comparación de los espectros correspondientes registrados en D_2O y H_2O . Estas señales no se observan en el disolvente deuterado, ya que estos protones del grupo amida se encuentran en intercambio con el disolvente, en cambio, si es posible localizarlos en H_2O . Una vez localizada la posición de los protones intercambiables, se procedió a la adquisición de los experimentos CEST (**Figura 17**). Para ello se utilizó una disolución 20 mM del complejo que contenía 0,15 M NaCl y una concentración 20 mM de HEPES (pH 7,4). Los resultados muestran que la señal del agua disminuye su intensidad en un 17% cuando se irradia a 71 ppm en comparación con la intensidad observada cuando el pulso de radiofrecuencia se localiza a -71 ppm (tomando como referencia la señal del agua). Por su parte, la señal a 45 ppm proporciona una disminución de la señal del agua de un 14%. Estos resultados demuestran que el complejo $[Ni(L^1)]^{2+}$ es capaz de actuar como agente de contraste CEST in vitro.

(64) Shannon, R. D. Revised effective ionic radii and systematic studies of interatomic distances in halides and chalcogenides. *Acta Cryst.*, **1976**, A32, 751-767.

Discusión de Resultados

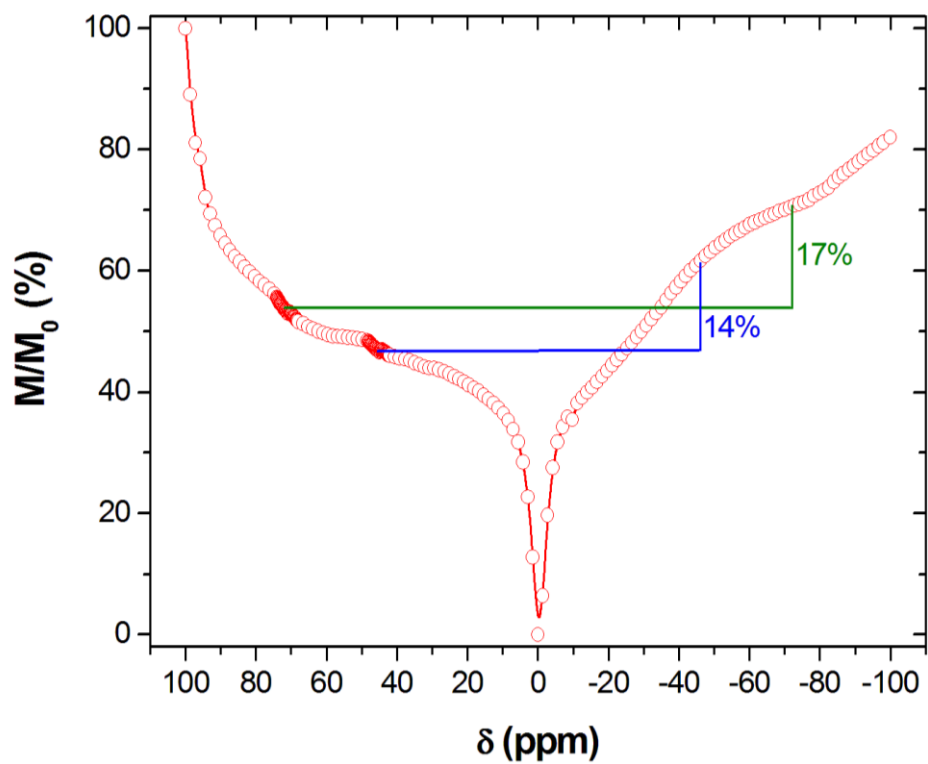


Figura 17. Espectro CEST registrado utilizando una disolución acuosa del complejo $[\text{Ni}(\text{L}^1)](\text{CF}_3\text{SO}_3)_2$ (20 mM) conteniendo NaCl (0.15 M) y tampón HPES (20 mM). La potencia del pulso de saturación fue de 36 db, y la duración de dicho pulso se estableció en 10 s.

8. CONCLUSIONES

En el presente Trabajo de Fin de Grado se han sintetizado y caracterizado triflato complejos de Ni^{2+} y Zn^{2+} , así como perclorato complejos de Co^{3+} y Mn^{2+} con un ligando macrocíclico reforzado. Se ha podido observar que la formación de los complejos endocíclicos se ve favorecida por el uso de contraiones no coordinates y disolventes con punto de ebullición alto (n-Butanol). La formación de estos complejos se ha confirmado a partir de los datos de análisis elemental, espectroscopia IR y espectrometría de masas de alta resolución. Su excelente concordancia entre los patrones isotópicos experimentales y calculados, evidencia la formación de los complejos deseados.

La caracterización del complejo de Zn^{2+} por espectroscopia de RMN de ^{13}C , indica que el núcleo de carbono del ligando sufre significativos desplazamientos químicos de las señales hacia campo alto con respecto a la complejación con el ion metálico. Las señales debidas al grupo carbonilo, así como las de los carbonos en posición β con respecto a los nitrógenos amida de la unidad macrocíclica están apantalladas con respecto al ligando libre. Sin embargo, los restantes carbonos de la unidad macrocíclica sufren un desapantallamiento. En el caso del complejo de Co^{3+} , el espectro de RMN de ^{13}C , sugiere la presencia en disolución de tres especies complejas, o bien dos formadas, una con simetría C_2 y la segunda con simetría C_1 .

Con objeto de estudiar el comportamiento redox del complejo de Co^{3+} , se llevaron a cabo experimentos de voltametría cíclica. Se observó una onda de reducción quasireversible con un potencial de semionda de +13 mV con respecto al NHE, el cual demuestra que este sistema es interesante para el diseño de pruebas redox en sistemas biológicos.

La aplicación de cálculos DFT para la optimización de las geometrías de los complejos revela entornos de coordinación de los iones metálicos pseudo-octaédricos, en donde el ligando adopta una geometría *cis*-V, y las unidades biciclo[6.6.2] del esqueleto del ligando adoptan conformaciones [2233]/[2233].

Por último, estudios preliminares mostraron que el complejo para complejo $[\text{Ni}(\text{L}^1)]^{2+}$ proporciona un significativo efecto CEST in vitro.

8. CONCLUSIONES

No presente Traballo de Fin de Grao, sintetizáronse e caracterizáronse triflato complexos de Ni^{2+} e Zn^{2+} , así como perclorato complexos de Co^{3+} e Mn^{2+} cun ligando macrocíclico reforzado. Observouse que a formación dos complexos endocíclicos favorécese polo emprego de contraíóns non coordinantes e disolventes con punto de ebullición elevado (n-Buanol). A formación destes complexos confirmouse a partir dos datos de análise elemental, espectroscopia IR e espectrometría de masas de alta resolución. A súa excelente concordancia entre os patróns isotópicos experimentales e calculados, manifesta a formación dos complexos deseados.

A caracterización do complexo divalente de Zn^{2+} por espectroscopia de RMN de ^{13}C , indica que o núcleo de carbono do ligando sofre significativos desprazamentos químicos das sinais cara campo alto con respecto a complexación co ión metálico. As sinais debidas ao grupo carbonilo, así como as dos carbonos en posición β con respecto aos nitróxenos amida da unidade macrocíclica están apantalladas con respecto ao ligando libre. Sen embargo, os restantes carbonos da unidade macrocíclica sofren un desapantallamento. No caso do complexo de Co^{3+} , o espectro de RMN de ^{13}C , suxire a presenza en disolución de tres especies complexas, ou ben dúas formadas, unha con simetría C_2 e a segunda con simetría C_1 .

Con obxecto de estudar o comportamento redox do complexo de Co^{3+} , leváronse a cabo experimentos de voltametría cíclica. Observouse unha onda de redución cuasereversible cun potencial de semionda de +13 mV con respecto ao NHE, o cal demostra que este sistema é interesante para o deseño de probas redox en sistemas biolóxicos.

A aplicación de cálculos DFT para a optimización das xeometrías dos complexos revela entornos de coordinación dos ións metálicos pseudo-octaédricos, onde o ligando adopta una xeometría *cis*-V, e as unidades biciclo[6.6.2] do esqueleto do ligando adoptan conformaciones [2233]/[2233].

Por último, estudos preliminares mostraron que o complexo $[\text{Ni}(\text{L}^1)]^{2+}$ proporciona un significativo efecto CEST in vitro.

8. CONCLUSIONS

In this Project, Ni^{2+} and Zn^{2+} triflate complexes and Co^{3+} and Mn^{2+} perchlorate complex of a reinforced macrocyclic ligand have been synthesized. We observed that the formation of the endocyclic complex is favored by the using non-coordinating anions and solvents with a high boiling point (n- butanol). The formation of these complexes has been confirmed from the results obtained from elemental analysis, IR spectroscopy and high-resolution mass spectrometry measurements. The excellent agreement between experimental and calculated isotopic patterns evidenced the formation of the desired complexes.

The characterization of the Zn^{2+} complex by ^{13}C NMR spectroscopy indicates that the carbon nuclei of the ligand suffer significant chemical shifts upon complexation to the metal ion. The signals due to the carbonyl groups and the carbon atoms in β position with respect to the amide nitrogen of the macrocycle are slightly shielded upon complex formation. However, the remaining carbon atoms of the macrocyclic unit suffer important downfield shifts. In the case of Co^{3+} complex, the ^{13}C NMR spectrum suggests the presence in solution of either three complex species, or two forms one with C_2 symmetry and the second one with C_1 symmetry.

In order to the study redox behavior of the Co^{3+} complex, cyclic voltammetry experiments were carried out. We observed a quasireversible reduction wave with a half-wave potential of +13 mV with respect to NHE, which demonstrates that this system is interesting for the design of redox probes in biological systems.

The application of DFT calculations for the optimization of complex geometries reveals pseudo-octahedral coordination environments for all metal ions, with the ligand adopting a *cis-V* geometry and the bicyclo[6.6.2] units of the ligand skeleton presenting [2233]/[2233] conformations.

Finally, preliminary CEST studies showed that the $[\text{Ni}(\text{L}^1)]^{2+}$ complex provides a sizeable CEST effect in vitro.