



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Grado en Química

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

**Sondas mitocondriales de especies oxigenadas reactivas
basadas en viológenos**

**Sondas mitocondriais de especies osixenadas reactivas
baseadas en violóxenos**

**Viologen-based mitochondrial probes for reactive
oxygenated species**

Alejandro Vila García

Curso: 2020 - 2021.

Convocatoria: Julio

Director 1: Marcos Daniel García Romero

Director 2: Elena Pazos Chantrero

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a mis directores, el Dr. Marcos D. García Romero y la Dra. Elena Pazos Chantrero por permitirme participar en este proyecto, guiándome y posibilitando continuar mi formación como químico.

Gracias a todos los integrantes de QUIMOLMAT 5, en especial a Iago y a Lili el tiempo que me han dedicado, todo lo que me han enseñado y por los buenos momentos pasados en el laboratorio. A Mauro, por acortar las horas tanto en el laboratorio como fuera de él.

Gracias a todos mis compañeros por compartir estos largos años de los que solo me llevo cosas positivas.

Por último, agradecer a mi familia el apoyo incondicional, a mis amigos esos momentos de descanso tan necesarios y a Claudia, su paciencia y el estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

Índice

RESUMEN	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS	4
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. Funcionamiento mitocondrial: la cadena de transporte electrónico.....	7
1.2. Especies reactivas de oxígeno en la mitocondria.....	8
1.3. Sondas mitocondriales productoras de ROS.....	8
1.3.1. Transportador mitocondrial.....	9
1.3.2. Unidad moduladora de ROS.....	10
1.3.3. Unidad transductora.....	11
1.4. Química Supramolecular, formación de interruptores (supra)moleculares.....	12
1.5. Uso de moléculas dirigidas a la mitocondria como terapia contra el cáncer.....	13
2. OBJETIVOS	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
3.1. Aspectos generales.....	15
3.1.1. Planificación sintética.....	15
3.1.2. Caracterización estructural mediante RMN.....	15
3.1.3. Caracterización estructural mediante espectrometría de masas.....	16
3.2. Síntesis y caracterización del modelo simplificado de la sonda 1^{3+}	16
3.2.1. Síntesis de 1^{3+}	16
3.2.2. Caracterización estructural del compuesto 1^{3+}	17
3.3. Síntesis y caracterización de la sonda fluorescente 2^{3+}	23
3.3.1. Síntesis de 2^{3+}	23
3.2.2. Caracterización estructural de la sonda fluorescente 2^{3+}	25
3.5. Estudio de la formación de complejos supramoleculares entre la sonda mitocondrial modelo 1^{3+} y los macrociclos CB[7] y CB[8] mediante RMN.....	27
3.5.1. Aspectos generales.....	27
3.5.2. Determinación del peso molecular de los macrociclos CB[7] y CB[8].....	28
3.5.3. Complejo de inclusión $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$	29
3.5.4. Complejo de inclusión $1^{3+} \subset \text{CB}[8]$	33

4. APARTADO EXPERIMENTAL	36
4.1. General	36
4.2. Síntesis	37
4.2.1. Síntesis del compuesto modelo 1^{3+}	37
4.2.2. Síntesis de la sonda mitocondrial 2^{3+}	39
4.3. Estudio de la interacción entre el compuesto modelo 1^{3+} y los CB[n]s.....	42
4.3.1. Valoración de los macrociclos CB[7] y CB[8]	42
4.3.2. Análisis del complejo supramolecular $1^{3+}\subset\text{CB}[7]$	42
4.3.3 Análisis del complejo supramolecular $1^{3+}\subset\text{CB}[8]$	44
5. CONCLUSIONES	45
CONCLUSIÓN	46
CONCLUSIONS	47
6. BIBLIOGRAFÍA	48
7. ANEXOS	51

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son fundamentales en la señalización celular de múltiples procesos, como por ejemplo la expresión génica o la apoptosis. Asimismo, se ha reportado una relación entre el aumento de ROS intracelular y diversas patologías, como el cáncer o el Alzheimer. Debido a esto, el desarrollo de herramientas que permitan monitorizar y regular los niveles de ROS mitocondrial se ha convertido en un objetivo importante y necesario en el campo de la biomedicina.

El presente trabajo de fin de grado se centra en la síntesis y caracterización de intermedios en la preparación de nuevas sondas mitocondriales. En particular, se presenta la síntesis de una nueva especie que presenta la *N,N'*-4,4'-bipiridina como unidad productora de ROS, un grupo alquiltrifenilfosfonio como transportador mitocondrial y el fluoróforo TAMRA como unidad transductora. Además, se presenta la síntesis de un modelo simplificado de esta sonda, carente de la unidad fluorogénica, con el que se realiza un estudio cualitativo de su asociación con receptores macrocíclicos de la familia de los cucurbiturilos.

Palabras clave: sondas mitocondriales, especies reactivas de oxígeno, viológeno, química supramolecular, química biológica, trifenilfosfonio, cucurbit[*n*]urilos.

RESUMO

As especies reactivas de osíxeno (ROS) son fundamentais na sinalización celular de múltiples procesos, como por exemplo da expresión xénica ou da apoptose. Ademais, tense reportado unha relación entre o aumento da ROS intracelular e diversas patoloxías como o cancro ou o Alzheimer. Debido a isto, o desenvolvemento de ferramentas que permitan monitorizar e regular os niveis das ROS mitocondriáis converteuse nun obxectivo importante e necesario no campo da biomedicina.

O presente traballo de fin de grao céntrase na síntese e caracterización de intermedios na preparación de novas sondas mitocondriáis. En particular, preséntase a síntese dunha nova especie que presenta a *N,N'*-4,4'-bipiridina como unidade produtora de ROS, un grupo alquiltrifenilfosfonio como transportador mitocondrial e o fluoróforo TAMRA como unidade transdutora. Ademais, preséntase a síntese dun modelo simplificado desta sonda, carente da unidade fluoroxénica, có que se realiza un estudo cualitativo da súa asociación con receptores macrocíclicos da familia dos cucurbiturilos.

Palabras chave: sondas mitocondriáis, especies reactivas de osíxeno, violóxeno, química supramolecular, química biolóxica, trifenilfosfonio, cucurbit[*n*]urilos.

ABSTRACT

The reactive oxygen species (ROS) are essential in cell signalling of multiple processes, such as gene expression or apoptosis. In addition, a relationship between the increase in intracellular ROS and various pathologies, such as cancer or Alzheimer's, has been reported. Due to this, the development of tools to monitor and regulate mitochondrial ROS levels has become an important and necessary objective in the field of biomedicine.

This TFG focuses on the synthesis and characterization of intermediates in the preparation of new mitochondrial probes. In particular, the synthesis of a new species is presented. This probe includes *N,N'*-4,4'-bipyridine as a ROS-producing unit, an alkyl triphenyl phosphonium group as a mitochondrial targeting, and the TAMRA fluorophore as a transducer unit. Furthermore, the synthesis of a simplified model of this probe, lacking the fluorogenic unit, is presented, with which a qualitative study of its association with macrocyclic receptors of the cucurbituril family is carried out.

Key words: mitochondrial probes, reactive oxygen species, viologen, supramolecular chemistry, biological chemistry, triphenylphosphonium, cucurbit[*n*]urils.

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

¹³C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono
¹H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
³¹P-RMN	Resonancia magnética nuclear de fósforo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
B_p	4,4'-bipiridina
CB[7]	Cucurbit[7]urilo
CB[8]	Cucurbit[8]urilo
CB[<i>n</i>]	Cucurbiturilos de <i>n</i> unidades de glicourilo
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Correlación espectroscópica
d	Doblete
dd	Doble doblete
DOSY	Espectroscopía de orden difusional
DEPT	Mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilamina
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
eq	Equivalentes
Et₂O	Dietiléter
FADH₂	Flavín adenín dinucleótido
g	Gramo

h	Horas
J	Constante de acoplamiento
HMBC	Correlación de enlace múltiple heteronuclear
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HR-ESI-MS	Espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray.
HSQC	Correlación heteronuclear de cuanto simple
m	multiplete
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MPTP	1-metil-4-fenil,6-tetrahidropiridina
m/z	Relación masa/carga
NADH	Nicotín adenín dinucleótido
nm	Nanómetro
q	Cuadruplete
Redox	Reducción-oxidación
RMN	Resonancia magnética nuclear
ROS	Especies reactivas de oxígeno
s	Singlete
S_N2	Sustitución nucleofílica bimolecular

TAMRA, SE	Carboxitetrametilrodamina, Succinimidil Ester
t	Triplete
ta	Temperatura ambiente
TFA	Ácido trifluoroacético
TFG	Trabajo de fin de grado
TPP⁺	Trifenilfosfonio
t_r	Tiempo de retención
UV-VIS	Ultravioleta-Visible
V	Viológeno
°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
δ	Desplazamiento químico
ε	Coefficiente de extinción molar

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Funcionamiento mitocondrial: la cadena de transporte electrónico

Las mitocondrias son los orgánulos celulares encargados de la producción de la mayor parte de la energía necesaria para el funcionamiento de los organismos eucariotas. Esta energía se obtiene de la degradación de ácidos grasos y carbohidratos y se almacena en forma de ATP mediante el proceso de fosforilación oxidativa.¹

Su estructura consta de un sistema de dobles membranas; la externa, encargada de aislar el orgánulo del citosol, y la membrana mitocondrial interna, que separa el espacio intermembrana de la matriz. En esta última se sitúan los 5 complejos proteicos que forman parte de la cadena de transporte electrónico (**Figura 1**), responsable de la producción de ATP.^{1,2}

Durante la oxidación de carbohidratos y lípidos se generan las coenzimas reducidas NADH y FADH₂, capaces de ceder electrones a los complejos presentes en la membrana mitocondrial interna. Estos electrones van a ser transportados, en función del potencial de reducción, por los distintos complejos hasta llegar al oxígeno, que es el último aceptor de la cadena. Al aceptar dos electrones, el oxígeno toma dos protones del medio formando H₂O.^{1,2}

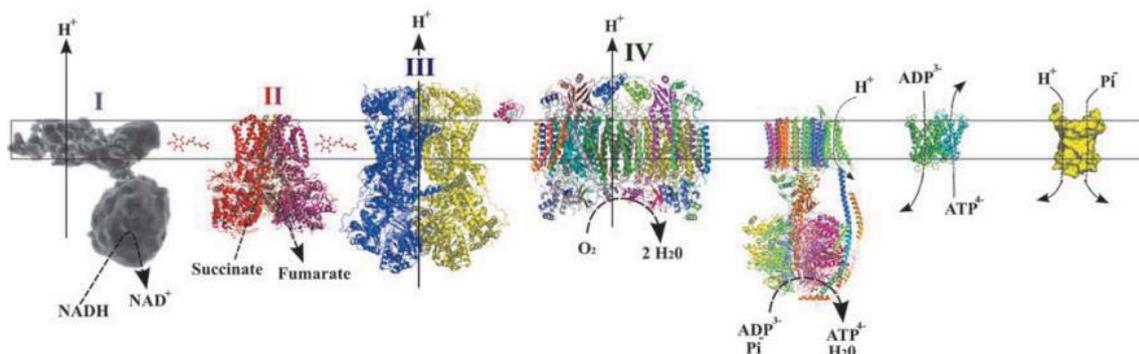


Figura 1. Cadena de transporte electrónico mitocondrial.³

Cuando los electrones llegan a los complejos I, III y IV de la cadena, se emplea la energía liberada en las reacciones redox para generar un bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Esto genera un gradiente electroquímico (fuerza protón-motriz) entre ambas caras de la membrana interna. Como la membrana interna es impermeable a los protones, precisan canales de proteínas para regresar a la matriz. El quinto complejo de la cadena, la ATP sintasa, aprovecha este movimiento de retorno de los protones para generar ATP a partir de ADP e iones fosfato.^{1,2}

1.2. Especies reactivas de oxígeno en la mitocondria

Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “*Reactive Oxygen Species*”), presentan un papel fundamental en el correcto funcionamiento de la célula. Actúan como segundos mensajeros, regulando procesos intra y extracelulares tales como la apoptosis, la expresión génica, la diferenciación o la proliferación celular.

La cadena de transporte mitocondrial es la principal fuente de ROS de la célula.³ Durante su correcto funcionamiento, entre el 1 y el 2% del oxígeno es reducido formando el anión superóxido (O_2^-),⁴ que dismuta rápidamente a H_2O_2 de forma espontánea o catalizado por distintas enzimas.⁵

Si bien son necesarias para el correcto funcionamiento de la célula, las ROS contribuyen también al daño oxidativo de la célula, generando malfuncionamiento y dañando ADN lípidos y proteínas.⁴ Para evitar esto, las células presentan distintas herramientas que disminuyen el estrés oxidativo. Estas pueden ser enzimas, como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa, o compuestos no enzimáticos con actividad antioxidante (vitamina E, ascorbato, transferrina, etc.).³ De esta forma, se puede definir el estrés oxidativo como el desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad antioxidante de la célula para prevenir el daño.

Un aumento en las ROS se ha relacionado con distintos tipos de cáncer y con diversas patologías cardiovasculares y neurológicas, entre ellas el Alzheimer.^{4,5} Debido a esto, la mitocondria se ha convertido en una de las dianas terapéuticas más importantes, promoviendo el diseño de una gran variedad de moléculas dirigidas a la matriz tales como fármacos, antioxidantes, sondas o reguladores redox.^{5,6}

1.3. Sondas mitocondriales productoras de ROS

Para entender el funcionamiento del estrés oxidativo en la mitocondria se antoja necesario el diseño de moléculas capaces de modular los niveles de ROS de forma específica y rápida, así como de reportar los cambios producidos. Para ello, como requisito fundamental, estas sondas productoras de ROS deben ser capaces además de acumularse en la matriz de forma selectiva.^{5,7}

Así, podremos distinguir distintas partes esenciales en estas sondas que pasaremos a discutir a continuación: un *transportador mitocondrial*, una *unidad bioactiva productora de ROS* y una *unidad transductora* que permita la observación de los cambios producidos en la actividad mitocondrial.⁵

1.3.1. Transportador mitocondrial

Existen distintas estrategias para lograr la acumulación de un compuesto en la matriz mitocondrial. Una de las más destacadas consiste en el acoplamiento de un catión lipofílico a la molécula bioactiva. Así, el grupo de cationes más estudiados, y el utilizado en el presente trabajo, es el de los derivados de alquil trifenilfosfonio (TPP⁺). En función de la hidrofobicidad del compuesto y el potencial de membrana de la mitocondria, estos transportadores pueden elevar hasta 1000 veces la concentración del compuesto en la matriz mitocondrial con respecto al medio extracelular (**Figura 2**).⁵ La utilización extendida de este transportador mitocondrial se debe a diversas razones:^{5,7}

- Presenta una elevada estabilidad química y metabólica en sistemas biológicos.
- Su incorporación y purificación son sencillas.
- No absorbe radiación UV-Vis, no absorbe en el NIR y no presenta fluorescencia.
- Presentan una gran capacidad para ser acumulados en la mitocondria.
- Toxicidad baja.

Estudios realizados con este tipo de sondas *in vivo* han indicado una rápida acumulación (menor de 5 minutos), así como un mecanismo de autorregulación farmacocinético (**Figura 2**) que permite que los niveles en sangre y la mitocondria sean seguros. Todo esto convierte a los derivados del TPP⁺ en transportadores mitocondriales ideales para el desarrollo de fármacos y otras moléculas bioactivas.⁸

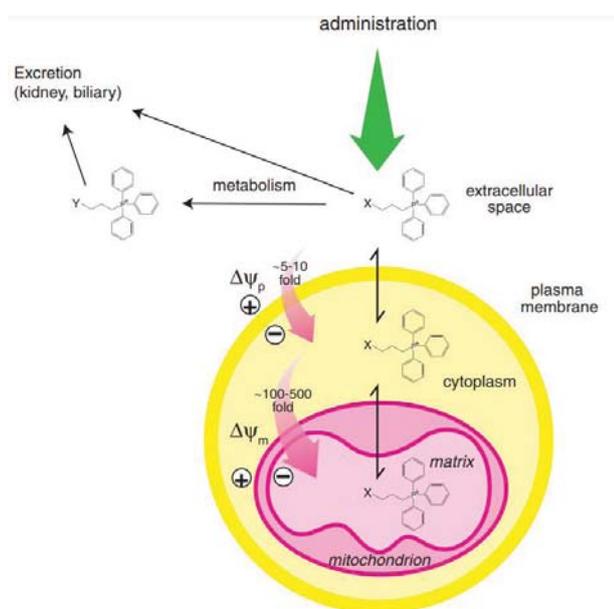


Figura 2. Mecanismo de acumulación en la matriz de moléculas con el transportador mitocondrial TPP⁺. Δψ_p representa el potencial de la membrana plasmática y Δψ_m el potencial de membrana mitocondrial interna. Se aprecia también el mecanismo de regulación farmacocinético.⁷

La acumulación en la mitocondria se debe, en primer lugar, a que los compuestos que presenten el transportador TPP⁺ se ven atraídos por la matriz mediante una fuerte atracción electrostática. Esto es posible debido al gradiente de protones que genera un potencial de membrana negativo en la matriz (150-160 mV). Como la carga positiva de la sonda se encuentra deslocalizada sobre una gran superficie hidrófoba, estos compuestos son capaces no solo de acercarse a la membrana mitocondrial, sino también de atravesarla con facilidad acumulándose en la matriz. Esta acumulación sigue la ecuación de Nernst que relaciona la carga del compuesto, el potencial de membrana y la concentración.^{5,7}

1.3.2. Unidad moduladora de ROS

La función de esta unidad será la de alterar los niveles de ROS mitocondrial, bien disminuyéndolos o aumentándolos según su naturaleza. En el presente trabajo de fin de grado se acoplará el transportador mitocondrial con derivados de viológeno (V^{2+} , sales disustituidas de *N,N'*-4,4'-bipiridinio).⁶ Como veremos, estas moléculas presentan un ciclo redox capaz de interactuar con la cadena de transporte electrónico, aumentando de esta forma el nivel de ROS intracelular.⁶

En medios ricos en electrones, los viológenos son capaces de experimentar dos reducciones monoelectrónicas sucesivas y reversibles a potenciales accesibles (**Figura 3**). Así, la especie dicatión V^{2+} puede aceptar un electrón del medio formando el monocatión radical V^{+} , que a su vez puede volver a reducirse dando lugar a la especie neutra V . Dentro de la matriz mitocondrial, estos compuestos van a aceptar un electrón de la cadena de transporte formando el monocatión radical. Este va a reaccionar rápidamente con el oxígeno recuperándose el dicatión y produciendo superóxido (**Figura 4**). Se puede decir, por tanto, que las características de los viológenos les permiten generar ROS de forma catalítica.^{6,9}

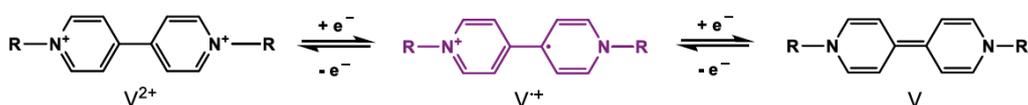


Figura 3. Ciclo redox de las moléculas derivadas del viológeno.

Estudios realizados con el paraquat (dimetilviológeno) indican que el aumento de ROS mitocondrial se debe a la interacción de la molécula con los complejos I y III de la cadena respiratoria; siendo el complejo III el principal mediador.¹⁰

Esta capacidad para interactuar con la cadena respiratoria se ha observado en diversos derivados del viológeno y es función del potencial de reducción de las distintas especies.⁶

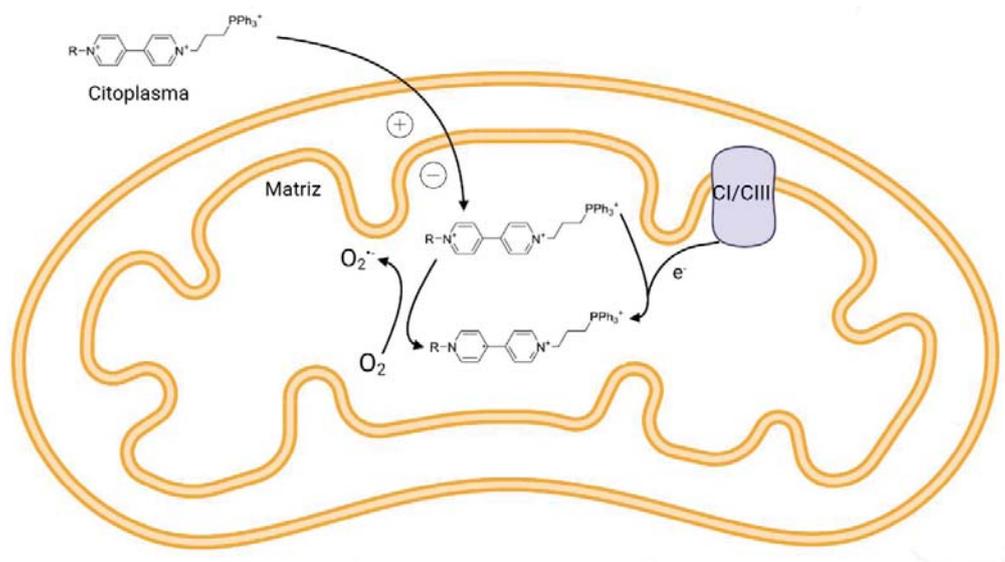


Figura 4. Internalización del compuesto con el transportador mitocondrial TPP⁺, interacción con los complejos I y II (CI/CIII) de la cadena de transporte y generación de ROS intramolecular.

1.3.3. Unidad transductora

Las unidades transductoras tendrán como finalidad la señalización de los cambios producidos en el entorno, en este caso la modulación de niveles mitocondriales de ROS. Así, las más utilizadas son moléculas fluorescentes al ser selectivas, sensibles, fáciles de manipular y permitir una monitorización en tiempo real.¹¹

En nuestro caso, es bien conocido el hecho que los derivados de viológeno son capaces de producir fenómenos de quencheo dinámico o estático de una gran diversidad de fluoróforos.¹² Este fenómeno se debe no solo a choques intermoleculares capaces de desactivar no radiativamente el estado excitado del fluoróforo (quencheo dinámico), sino también a la formación de un complejo de transferencia de carga entre el viológeno (molécula π deficiente) y la fracción fluorescente (molécula π excedente), lo que resulta en un fenómeno de quencheo estático. Una vez esta molécula se internaliza en la mitocondria y se reduce, la capacidad para quenchar fluorescencia disminuye, haciendo posible monitorizar dicho cambio. En el caso de las sondas de ROS, es posible la unión de fluoróforos selectivos para distintas especies reactivas, lo que constituye una herramienta de gran utilidad para el estudio.¹¹

1.4. Química Supramolecular, formación de interruptores (supra)moleculares

La química supramolecular se basa en el ensamblaje de distintas moléculas mediante fuerzas intermoleculares reversibles, es decir, bajo estricto control termodinámico.¹² En el caso de los derivados del viológeno, es posible la unión receptor-sustrato a macrociclos formando estructuras tipo pseudorotaxano. Este tipo de complejos están formados por la unión de un macrociclo a una molécula lineal.

Uno de los macrociclos más empleados en la formación de estructuras supramoleculares con los viológenos son los cucurbiturilos (CB[n], $n = 5,6,7,8,\dots$) (**Figura 5**). Estos macrociclos están compuestos por n unidades repetidas de glicourilo unidas mediante puentes de metileno, formando así, un macrociclo con una cavidad hidrófoba rígida y dos aperturas opuestas, capaces de alojar en su interior una gran diversidad de sustratos.^{12,13}

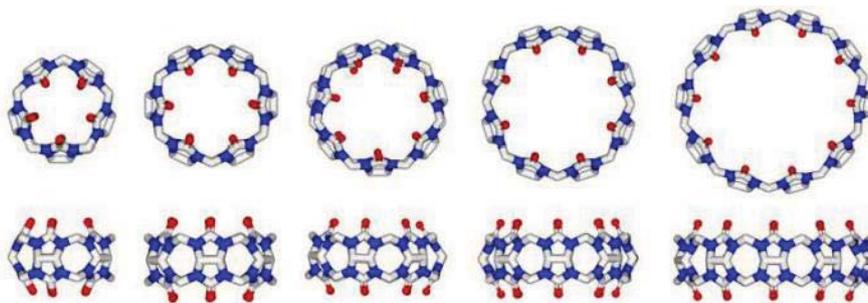


Figura 5. Representación tridimensional de distintos macrociclos CB[n] donde $n = 5, 6, 7, 8, 10$ respectivamente.¹³

Los derivados del viológeno son excelentes sustratos para los CB[n]s ($n = 7,8$), ya que los cationes del piridinio establecen interacciones favorables ión-dipolo con los grupos carbonilo del CB[n]. De este modo, la fracción de anillos aromáticos queda alojada en el interior de la cavidad hidrofóbica, en la cual encajan perfectamente. Esta fuerte interacción da lugar a constantes de asociación mayores a 10^4 M^{-1} .¹⁴

En el caso particular del CB[7], utilizado en el presente trabajo, dicha asociación puede dar lugar a comportamientos moleculares más interesantes, como el mostrado en la **Figura 6**, en el que un estímulo ácido-base provoca el movimiento de la unidad macrocíclica desde una cadena alifática al núcleo de bipyridinio.

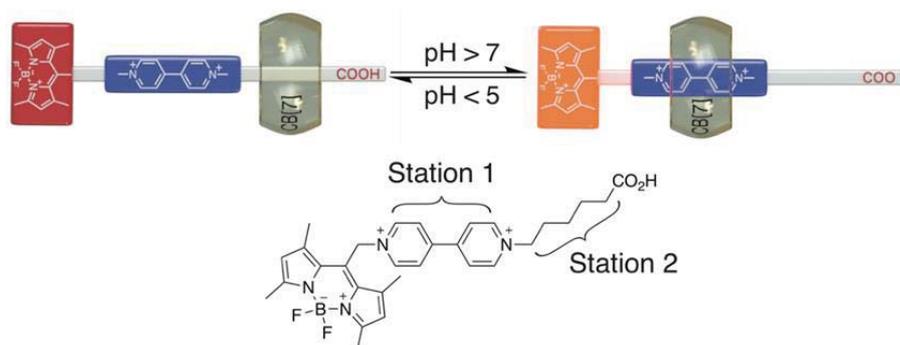


Figura 6. Ejemplo de complejo receptor-sustrato CB[7]:V²⁺ (pseudorotaxano) con respuesta al pH.¹⁵

Cuando se forma un complejo supramolecular receptor-sustrato, las propiedades químicas, físicas y biológicas de los dos componentes se modifican.¹⁶ Así, por ejemplo, el uso de CB[n]s es capaz de disminuir la toxicidad y efectos secundarios de diversos fármacos y otros compuestos con actividad biológica¹⁷ como, por ejemplo, de los fármacos de platino¹⁸ o del MPTP (neurotoxina utilizada para construir modelos de Parkinson).^{15,16}

Un ejemplo relevante en nuestro caso se relaciona con el más simple de los viológenos, el paraquat (*N,N'*-4,4'-dimetilviológeno), un herbicida ampliamente utilizado que causa cientos de miles de muertes al año.¹⁷ Así, se demostró que el uso de CB[7] es capaz de reducir la toxicidad del paraquat significativamente, tanto al ser suministrado junto este, como al ser administrado en las dos horas siguientes del envenenamiento. En este caso, el CB[7] disminuye la captación de paraquat, la generación de ROS y la inducción de la apoptosis.¹⁷

1.5. Uso de moléculas dirigidas a la mitocondria como terapia contra el cáncer

Este TFG forma parte de un proyecto combinado con el área de biología. En esa parte del trabajo se evaluará la citotoxicidad de distintos compuestos modelos relacionados con el herbicida paraquat en 3 líneas celulares distintas: Raw 264.7, HeLa y A549, dos de ellas de células de carcinoma.

Las ROS tienen un papel importante en la fisiopatología del cáncer, interviniendo en el desarrollo, proliferación y metástasis.⁴ Como las células de carcinoma presentan un potencial de membrana mayor que el de las células sanas, es posible provocar una acumulación selectiva de moléculas bioactivas en células cancerígenas.^{4,5} Esto abre la puerta al desarrollo de fármacos y distintas estrategias para hacer frente a la lucha contra el cáncer.^{7,19}

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente TFG se engloba dentro de un proyecto más general llevado a cabo dentro del grupo de investigación QUIMOLMAT, encaminado al desarrollo de un nuevo tipo de sondas mitocondriales productoras de ROS, y la influencia de los receptores CB[7] y CB[8] en su funcionamiento (**Figura 7**).

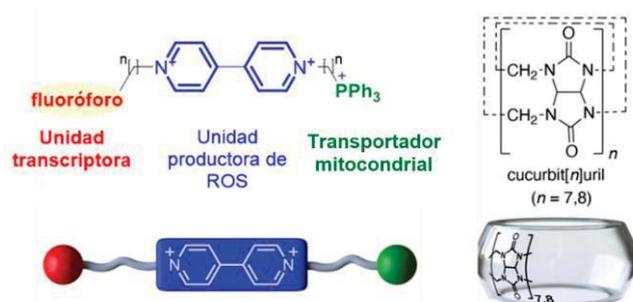
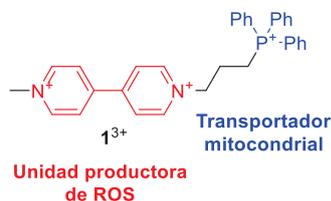


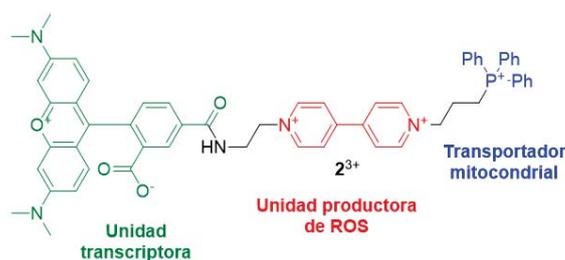
Figura 7. Representación de las sondas generadoras de ROS diseñadas y de los receptores CB[7]/[8].

De esta forma, se presentan como objetivos específicos del presente TFG:

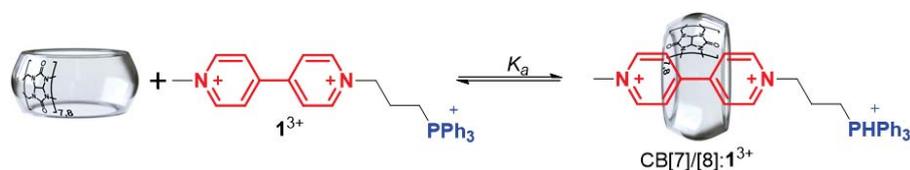
1. Síntesis del compuesto 1^{3+} como modelo simplificado de sonda mitocondrial productora de ROS:



2. Síntesis, purificación y determinación estructural de la sonda mitocondrial 2^{3+} :



3. Estudio de la interacción receptor-sustrato entre el compuesto modelo 1^{3+} y los macrociclos CB[7] y CB[8]:

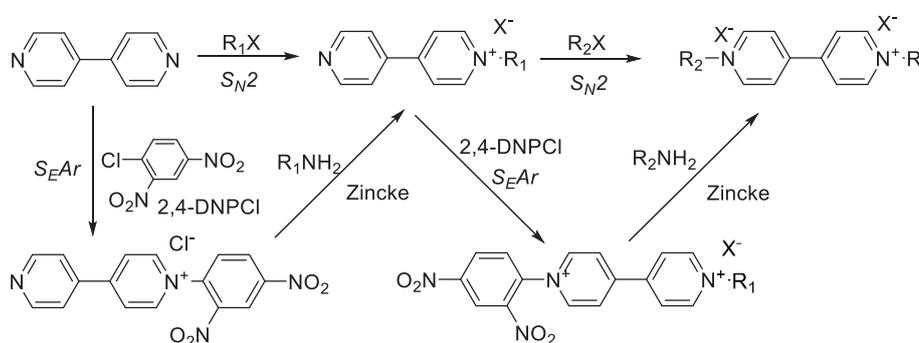


3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Aspectos generales

3.1.1. Planificación sintética

La síntesis de derivados asimétricamente sustituidos de viológeno está bien estudiada (**Esquema 1**)²⁰ y puede llevarse a cabo satisfactoriamente a través de etapas sucesivas de alquilación de la 4,4'-bipiridina (**B_P**), mediante la reacción de Zincke de sales de 4,4'-bipiridinio activadas con grupos 2,4-dinitrofenilo y aminas o mediante una combinación de ambos procesos.



Esquema 1. Estrategia sintética para la preparación de derivados de viológeno asimétricamente sustituidos.

Según lo indicado, la síntesis de los cationes objetivo **1³⁺** y **2³⁺** seguirá la aproximación más directa basada en la reacción de **B_P** con agentes alquilantes adecuados.

3.1.2. Caracterización estructural mediante RMN

La caracterización de todas las moléculas reportadas en el presente trabajo se llevó a cabo mediante la interpretación de los espectros de RMN monodimensionales (¹H, ¹³C y ³¹P) y bidimensionales (COSY, HSQC y HMBC).

Para realizar la caracterización primero se intentó asignar las señales del espectro de RMN de ¹H mediante su desplazamiento químico y multiplicidad. Posteriormente se asignaron las señales del espectro de RMN de ¹³C por su desplazamiento y tipo de núcleo con ayuda del DEPT. En el caso de que la molécula presente fósforo en su estructura, el espectro de RMN de ³¹P nos indica si existe en la muestra más de una molécula distinta que presente fósforo.

Para comprobar que la asignación inicial es correcta, y para asignar aquellas señales en las que existe duda, se utilizaron los espectros bidimensionales. El COSY (espectroscopia de correlación homonuclear) aporta información sobre protones acoplados escalarmenente entre sí y, en consecuencia, de los que hidrógenos que se encuentran sobre carbonos adyacentes. El HSQC (Correlación heteronuclear de cuanto simple) correlaciona protones directamente unidos a heteronucleos de ^{13}C , indicando el carbono sobre el que se sitúan los distintos hidrógenos. Por último, el HMBC (correlación heteronuclear a través de múltiples enlaces) correlaciona los núcleos de ^1H con heteronucleos de ^{13}C separados entre 2 y 4 enlaces químicos. Es especialmente útil para asignar carbonos cuaternarios y para completar y comprobar la asignación realizada.²¹

3.1.3. Caracterización estructural mediante espectrometría de masas

La caracterización de las moléculas se complementó mediante la técnica de espectrometría de masas. Aunque esta técnica ofrece información estructural debido a la fragmentación de la molécula en iones, en el presente trabajo se utilizó únicamente para comprobar la formación de las moléculas finales, comparando la masa molecular obtenida del espectrómetro con la masa esperada para el compuesto. En este caso la ionización de la molécula se realiza mediante electrospray (ESI).²²

3.2. Síntesis y caracterización del modelo simplificado de la sonda 1^{3+}

3.2.1. Síntesis de 1^{3+}

La síntesis de la sonda más sencilla, la cual carece de unidad transductora, se realizó en dos etapas consecutivas de sustitución nucleófila S_N2 . Debido al buen carácter nucleófilo de la \mathbf{B}_P , ésta es capaz de desplazar grupos salientes buenos, como el bromuro, dando lugar a este tipo de reacciones que conducen a la consiguiente sal de piridinio. Así, la primera etapa consistió en la adición del bromuro de (3-bromopropil)trifenilfosfonio comercial sobre la \mathbf{B}_P , en acetonitrilo a reflujo y con agitación (**Figura 8**).

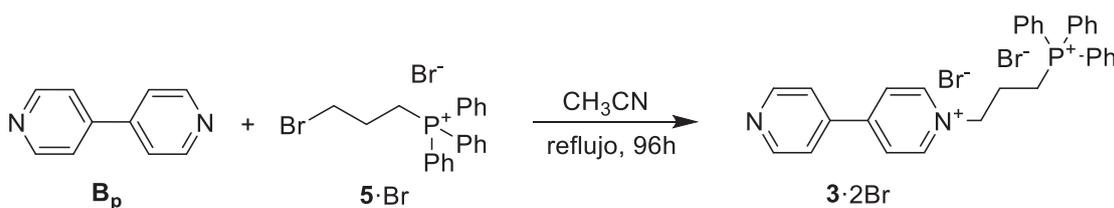


Figura 8. Síntesis del intermedio $3 \cdot 2\text{Br}$.

La elaboración de este tipo de compuestos es relativamente sencilla ya que, al presentar un mayor número de cargas que los reactivos, su polaridad va a ser más elevada. Mediante un cambio de la polaridad del medio, se provoca la precipitación selectiva del producto que se obtiene con una pureza elevada.

Pasadas 92h, la reacción se dejó enfriar hasta temperatura ambiente y el producto se precipitó con Et₂O, se filtró y se lavó con MeCN. Mediante RMN de ¹H y de ³¹P se comprobó la formación del compuesto esperado **3·2Br**, el cual se obtuvo con un rendimiento del 81%.

De forma análoga, la segunda etapa de la síntesis (**Figura 9**) consistió en la metilación del producto **3·2Br**, mediante la adición de un exceso de ioduro de metilo en MeCN a temperatura ambiente y con agitación. Tras 72 horas de reacción, se observó la aparición de un precipitado rojo, este se filtró y se lavó con MeCN y Et₂O. Por RMN de ¹H y de ³¹P se confirmó la obtención de la sonda modelo **1³⁺**.

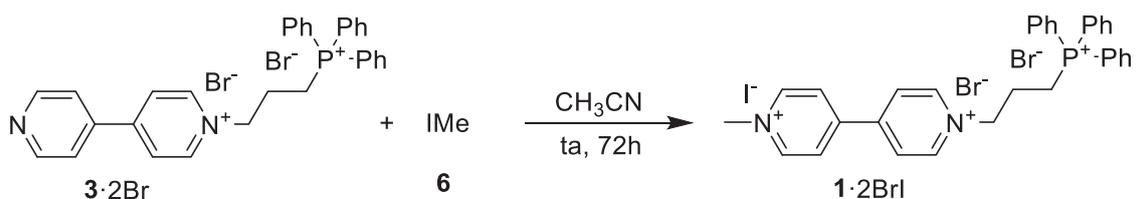


Figura 9. Síntesis del compuesto modelo **1·2Br**.

El rendimiento obtenido en esta segunda etapa fue bastante elevado (78%) en unas condiciones de reacción suaves, temperatura ambiente, que ejemplifican el elevado carácter electrófilo del MeI.

3.2.2. Caracterización estructural del compuesto **1³⁺**

En lo referente a la sonda modelo **1³⁺**, el espectro de RMN de ³¹P (**Figura 32**. Anexos) muestra una única señal a 23.2 ppm, en buen acuerdo con el grupo funcional alquiltrifenilfosfonio.

Por otra parte, en el espectro de RMN de ¹H en D₂O del compuesto **1³⁺** (**Figura 10**), se observan las señales características del esqueleto de bipyridinio asimétricamente sustituido: 4 dobletes por 2H (en este caso las señales de H_b y H_e aparecen como un multiplete aparente entre 9.04 y 8.97 ppm).

Como los protones en posición α al nitrógeno del heterociclo se encuentran más desapantallados que los β , debido al efecto de la carga positiva, se puede asignar asimismo el multiplete aparente con los protones H_b y H_e y los dos siguientes dobletes con los hidrógenos en posición β (H_c y H_d). En este espectro no es posible diferenciar entre las señales de H_c y H_d , asignándose tentativamente teniendo en cuenta que la cadena unida al grupo TPP^+ podría retirar más densidad de carga de estos protones que el grupo metilo. Por lo tanto, el doblete a 8.49 ppm correspondería con H_c mientras que el siguiente, a 8.45 ppm, lo haría con el protón H_d . Las tres señales siguientes, que se encuentran entre 7.86 y 7.62 ppm, integran por 3 protones, para la primera señal, y por 6, para cada una de las siguientes y, por tanto, se corresponden con los 15 hidrógenos del grupo PPh_3^+ . Se puede asignar la primera señal con H_k , protón en posición *para* al fósforo, pero para diferenciar entre las otras dos señales se recurre al COSY.

Por último, en la región alifática del espectro, el singlete a 4.40 ppm correspondiente a 3H se asigna claramente a los protones H_a del grupo metilo, mientras que las otras tres señales se asignan a los protones de la cadena de metilenos que conecta el TPP^+ con los anillos de piridina ($H_{f,g,h}$). De esta cadena, la señal de mayor desplazamiento se corresponde con el hidrógeno unido al carbono que se encuentra enlazado directamente con el N^+ (H_f) y la señal de menor desplazamiento corresponde con el hidrógeno del carbono central de la cadena, que no se encuentra unido a heteroátomos (H_g). Esta asignación se comprobó con los espectros bidimensionales.

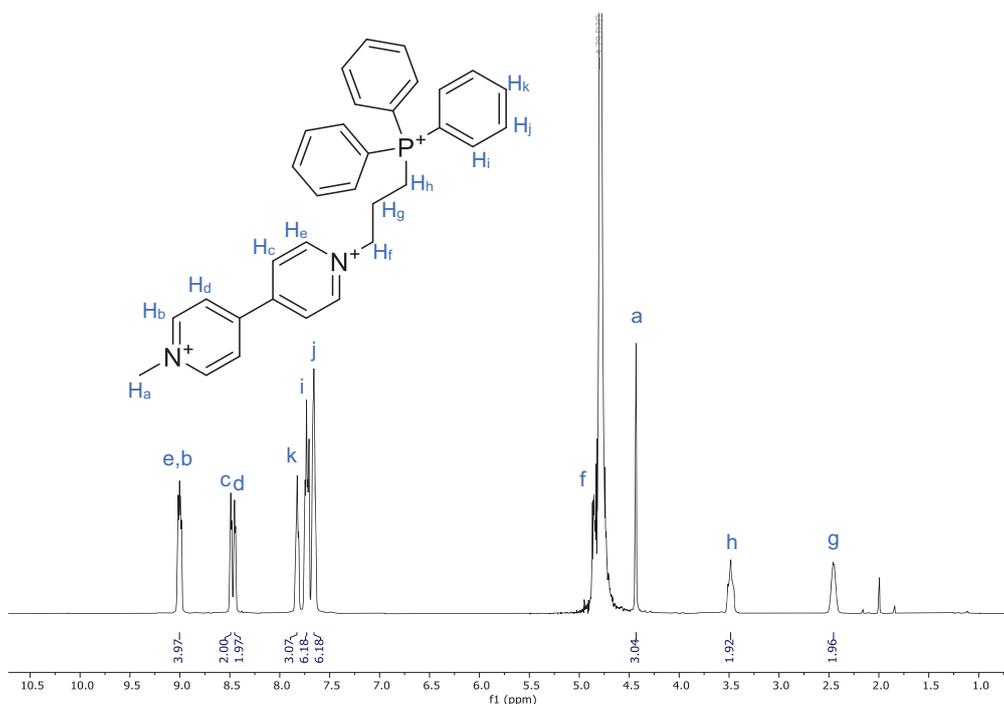


Figura 10. Espectro de RMN de ¹H del compuesto modelo **13⁺**.

En el espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 11**), se observa que varias de las señales presentan un desdoblamiento debido a la existencia del átomo de ^{31}P , núcleo activo en RMN y que presentará acoplamiento escalar con el núcleo observado, produciendo un desdoblamiento grande en las señales de los átomos próximos al fósforo (como en $\text{C}_{11,10}$). Asimismo, en el experimento DEPT para la muestra se comprueba que existen 4 señales cuaternarias: las dos de la bipyridina ($\text{C}_{4,5}$) y un doblete a 117.0 ppm para los C_{11} del grupo trifenilfosfonio que, como se ha comentado anteriormente, se desdoblan. En la zona de C_{sp^3} hay 3 señales que se corresponden con los grupos metileno $\text{C}_{8,9,10}$ y una señal para el único grupo metilo existente C_1 . Para diferenciar entre el resto de los carbonos de la molécula se recurrirá, como veremos, a los correspondientes experimentos HSQC y HMBC.

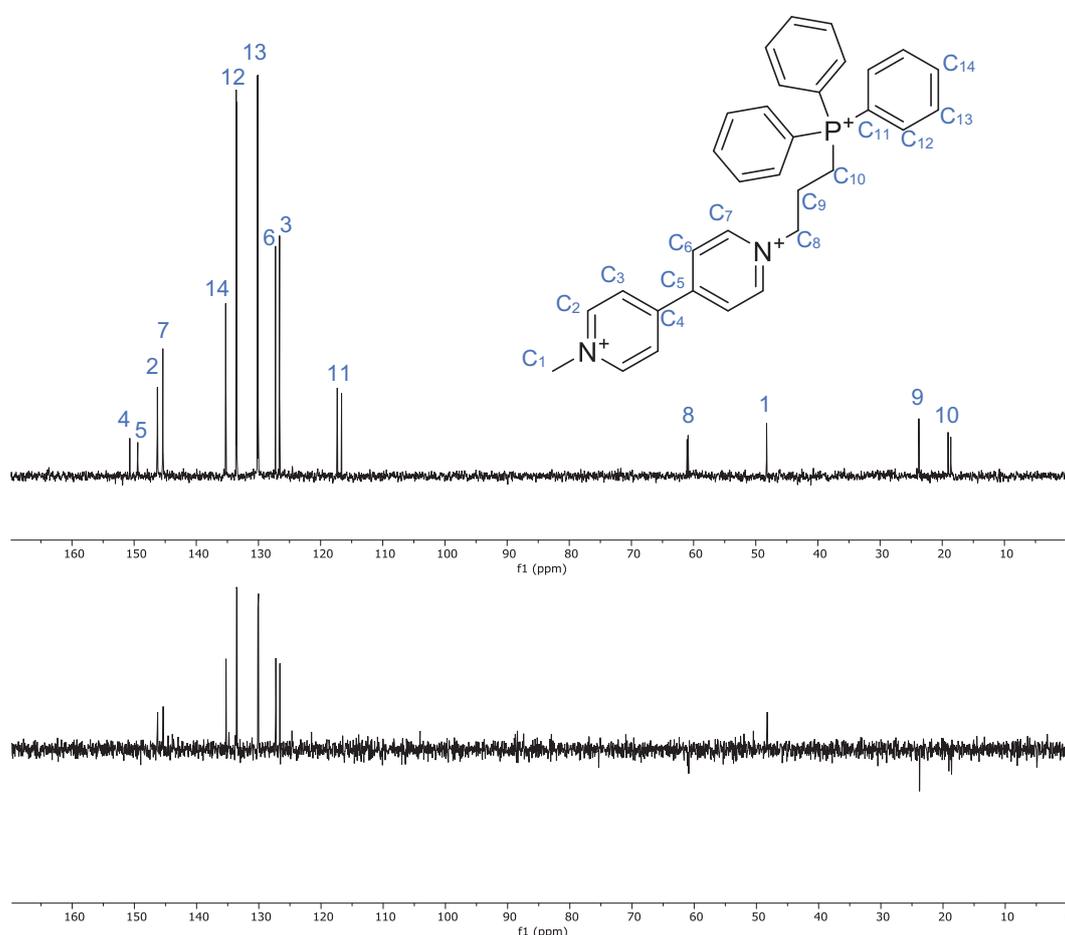


Figura 11. Espectro de RMN de ^{13}C y DEPT del catión modelo 1^{3+} .

En lo referido al experimento COSY para el producto, este relaciona los hidrógenos contiguos, observándose en la diagonal el acoplamiento de un hidrógeno consigo mismo y por encima y por debajo de ésta los acoplamientos entre núcleos distintos. Así, en la **Figura 12** se observan 4 puntos de cruce distintos e independientes.

1 y **2** se corresponden respectivamente con los acoplamientos entre las señales de H_h y H_f con la señal de H_g . Este cruce indica que la señal a 2.45 ppm se corresponde con H_g , tal y como se esperaba. En **3** se marca el acoplamiento entre la señal k y la señal j , sabiendo que H_k son los hidrógenos en posición *para*- al fósforo, este cruce nos indica que j se corresponde con los protones en *meta*- H_j . Por último, **4** y **5** muestra que la primera señal (e,b) acopla tanto con c como con d indicando que se corresponde con dos señales superpuestas.

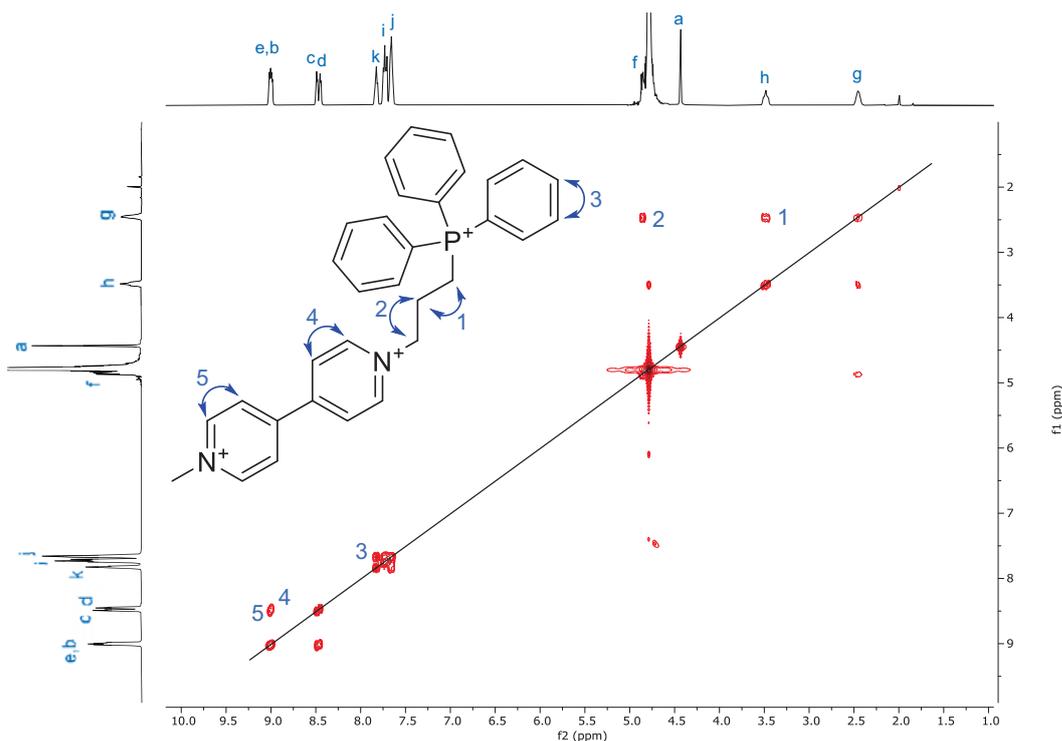


Figura 12. COSY del catión modelo 1^{3+} .

El HSQC (**Figura 13**) indica sobre qué carbono se encuentra unido cada hidrógeno. Así, en base las asignaciones previamente discutidas para los espectros de RMN de 1H y de ^{13}C , los puntos de cruce permiten establecer las consiguientes correlaciones entre éstos. Por ejemplo, una vez hecha la asignación de los protones, se pueden asignar los carbonos del grupo TPP^+ . De esta forma, el punto de cruce **5** relaciona el protón H_j (posición *meta*-) con el carbono a 130.2 ppm (C_{13}), **6** muestra el acoplamiento entre H_i (posición *orto*-) con C_{12} (133.5 ppm) y **7** permite asignar H_k (posición *para*-) con la señal de carbono a 135.4 (C_{14}). Con el resto de los puntos de cruce, y conociendo la asignación de los protones, se pueden asignar las señales de los carbonos que se encuentren unidos a cada hidrógeno.

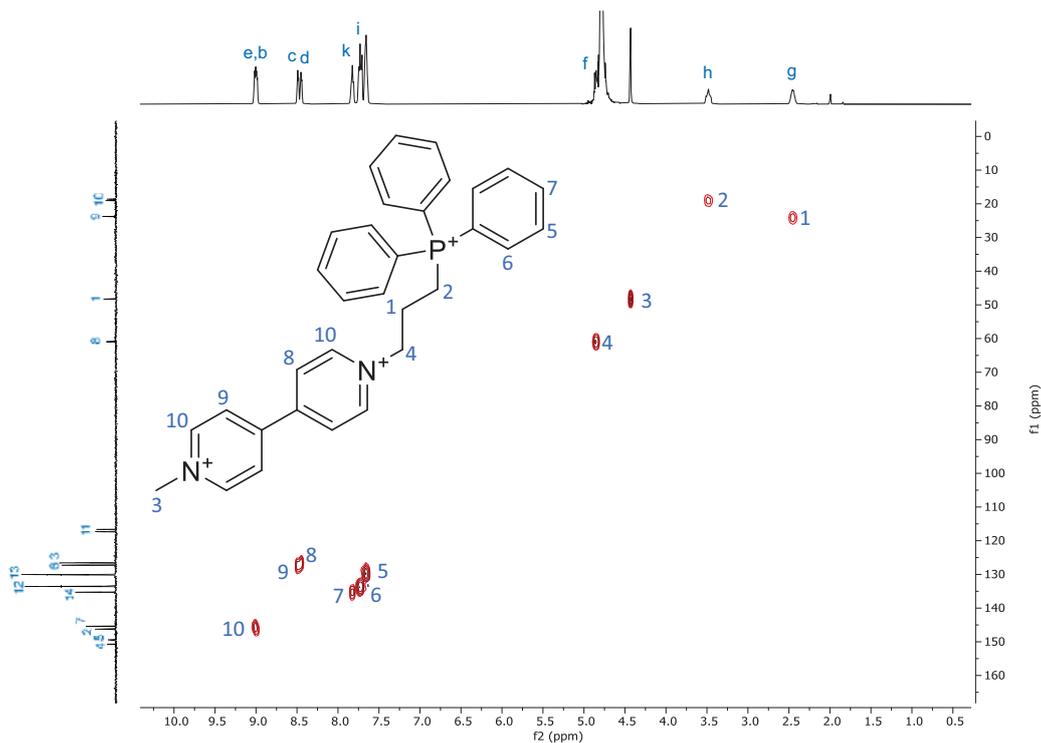


Figura 13. HSQC del catión modelo 1^{3+} .

Para completar la elucidación se utilizó el HMBC, esta técnica da información sobre el acoplamiento entre $^{13}\text{C} \leftrightarrow ^1\text{H}$ a 2-4 enlaces de distancia. Pese a que es una técnica que ofrece una gran cantidad de información, el elevado número de puntos de cruce dificulta su representación gráfica sobre la molécula. Es por esto por lo que, solamente se explicarán los puntos de cruce que aporten información fundamental para elucidar la estructura del compuesto. Así, los cruces marcados como **1** y **2** en la **Figura 14** permiten diferenciar entre los carbonos en α a los nitrógenos, C_2 y C_7 , respectivamente. Así, **1** correlaciona los hidrógenos del metilo H_a y el carbono C_2 , mientras que **2** muestra el acoplamiento del protón de la cadena alquílica H_f con el carbono C_7 . Por último, los puntos de cruce **3** y **4** relacionan los protones en β al N^+ , H_c y H_d , con los carbonos cuaternarios C_4 y C_5 , respectivamente. El resto de los puntos de cruce permiten comprobar que la asignación planteada inicialmente era correcta.

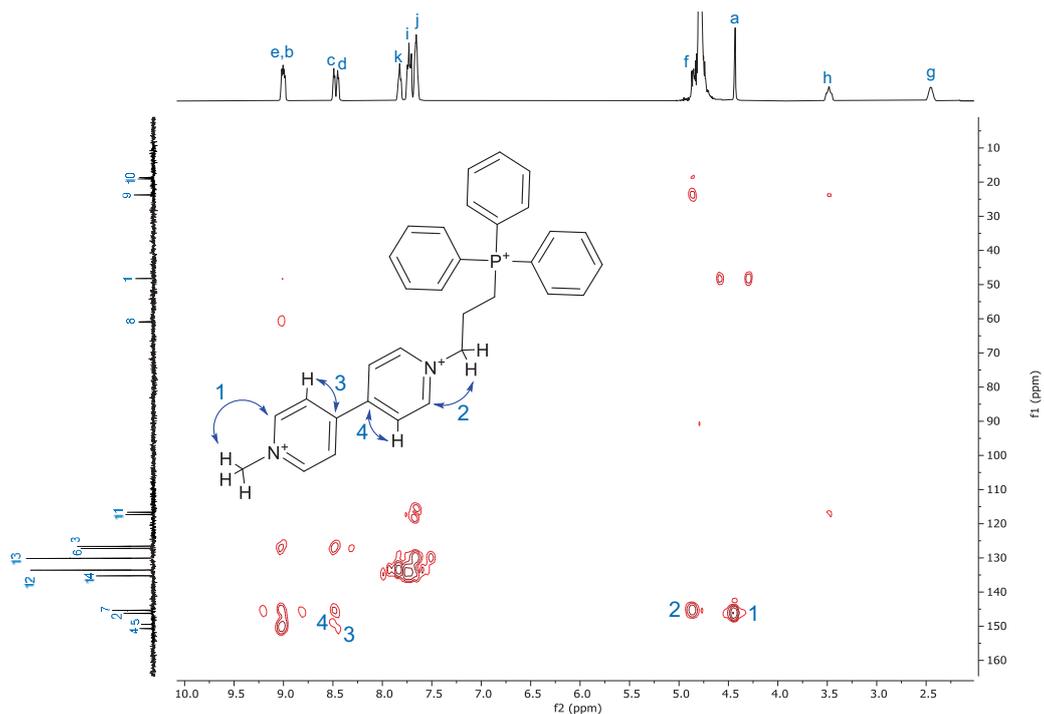


Figura 14. HMBC del catión modelo 1^{3+} .

La caracterización estructural por RMN del compuesto $1 \cdot 2\text{BrI}$ se complementó con el estudio de la muestra mediante HR-ESI-MS (**Figura 15**). En este caso, se encontraron varios picos relacionados con el compuesto. Así, el pico de relación masa/carga 158.409, se corresponde con la relación calculada para el compuesto $[\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{P}]^{3+}$ (m/z (teórico) = 158.410). El pico de mayor intensidad, que presenta una relación masa/carga de 602.134, se corresponde con el compuesto que presenta ioduro como contraión $[[\text{C}_{32}\text{H}_{32}\text{IN}_2\text{P}]^{2+}$ (m/z (teórico) = 602.134).

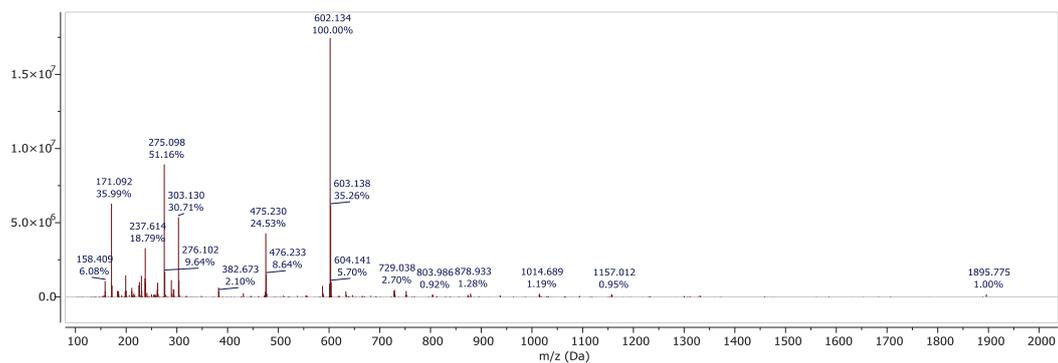


Figura 15. Espectro de masas del compuesto modelo 1 .

Con los datos obtenidos mediante RMN y HR-ESI-MS, se puede concluir inequívocamente que la molécula obtenida se trata de la sonda mitocondrial modelo 1^{3+} y que la asignación de las señales de RMN es la correcta.

3.3. Síntesis y caracterización de la sonda fluorescente 2³⁺

3.3.1. Síntesis de 2³⁺

En este caso, la sonda mitocondrial 2³⁺ presenta una unidad transductora fluorescente. Su síntesis se realizó en tres etapas. La primera de ellas fue el acoplamiento del transportador mitocondrial sobre la **B_p** visto anteriormente (**Figura 8**).

En la segunda etapa (**Figura 16**) se introdujo una cadena alquílica que presenta una amina libre en su extremo sobre la que poder adicionar la unidad transductora. La reacción de sustitución nucleófila, de tipo S_N2, se llevó a cabo mediante la adición del hidrobromuro de 2-bromoetilamina, en exceso, al producto obtenido en la primera etapa (**3·2Br**) en MeCN a reflujo y con agitación.

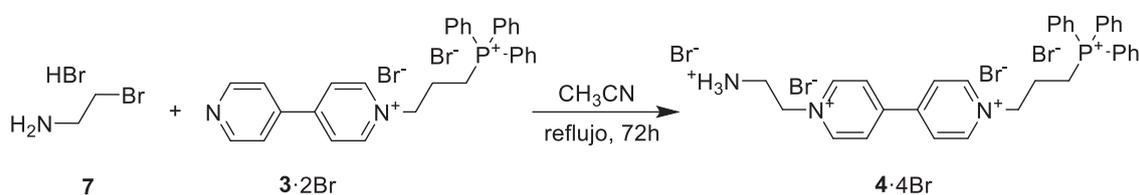


Figura 16. Síntesis del intermedio **4·4Br**.

Pasadas 72h desde el inicio de la reacción, se observó un precipitado que se filtró en caliente y se lavó con MeCN. Mediante RMN de ¹H y de ³¹P, se comprobó la formación del compuesto esperado **4·4Br**. Como la reacción no se completó en el tiempo transcurrido, las aguas del filtrado se dejaron reaccionando y se elaboraron tras 11 días, obteniendo un rendimiento total del 19%. Este rendimiento bajo se debe a que la reacción no se completó, ya que se observó el reactivo de partida **3²⁺** en cromatografía en capa fina (CCF).

Una vez conseguido el extremo amino, se realizó el acoplamiento del fluoróforo 5-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), utilizando para ello la 5-carboxitetrametilrodamina succinimidil éster (TAMRA, SE) (**Figura 17**). La reacción se llevó a cabo en *N,N*-dimetilformamida (DMF) como disolvente y con diisopropiletilamina (DIEA) como base, agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. Esta reacción se trata de una adición-eliminación de la amina al ácido activado con el grupo succinimidilo.

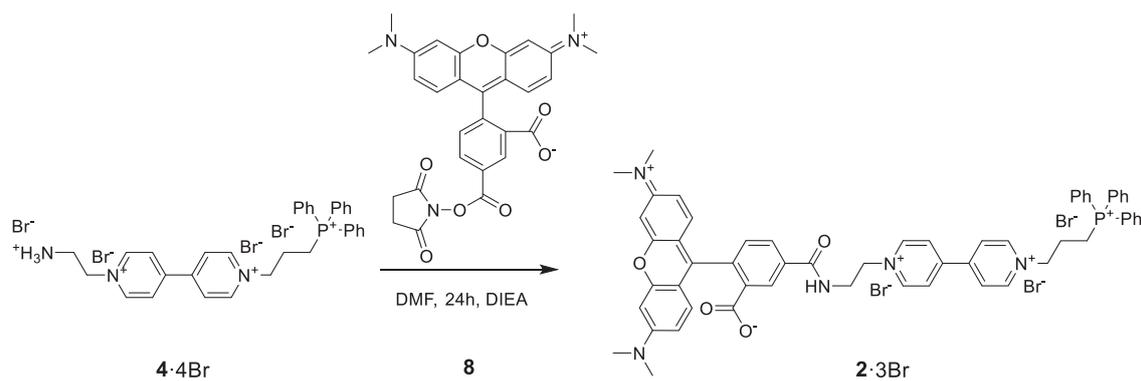


Figura 17. Síntesis de la sonda mitocondrial **2·3Br**.

Tras intentar elaborar el producto con extracciones líquido-líquido sin éxito, la sonda mitocondrial **2³⁺** se purificó mediante HPLC semipreparativo en fase reversa, utilizando una mezcla de H₂O/MeCN con TFA al 0.1% como eluyente y midiendo la absorbancia a 220 y 360 nm, ya que a 360 nm únicamente se observa la absorción de la fracción del TAMRA y no de los otros cromóforos de la molécula (**Figura 18**).

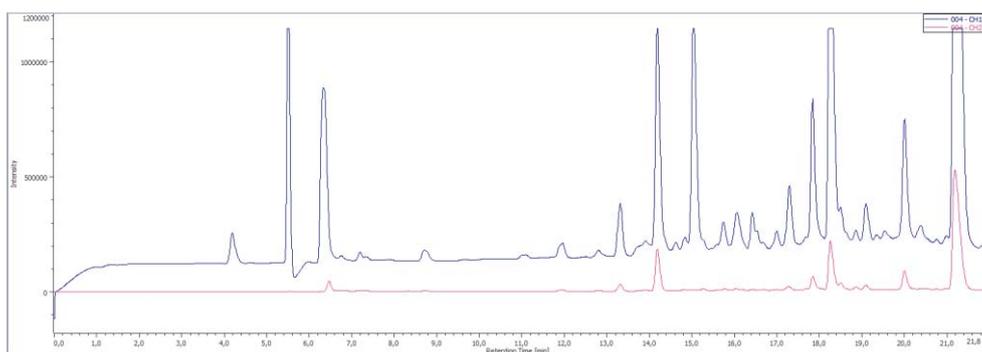


Figura 18. Cromatograma a 220 (azul) y 360 nm (rosa) del crudo de la reacción en que el pico con tiempo de retención 18.3 min se corresponde al producto deseado **2·3TFA**.

El cromatograma obtenido a 360 nm mostró 4 picos con tiempo de retención 14.2, 18.3, 20.0 y 21.3 min. Estas alícuotas se analizaron en mediante HPLC-MS, lo que permitió identificar el producto deseado en el pico de 18.3 min. Una vez identificado el producto, este se liofilizó y se procedió a realizar su caracterización espectroscópica.

El rendimiento obtenido para el compuesto **2·3TFA** fue del 12%. Este rendimiento bajo se debe a que la reacción no se completó, hecho que se comprobó por CCF, y a la pérdida de producto en el proceso de purificación por HPLC.

3.2.2. Caracterización estructural de la sonda fluorescente 2^{3+}

En lo referente a la sonda mitocondrial 2^{3+} , el espectro de RMN de ^{31}P (**Figura 33. Anexos**) muestra una única señal a 22.9 ppm, en buen acuerdo con la presencia del grupo TPP^+ .

En cuanto al espectro de RMN de ^1H en D_2O del compuesto 2^{3+} (**Figura 19**), se observan los 4 dobletes de la B_p , esta vez bien resueltos (*j, g, i y h*), que se asignan a partir de los espectros bidimensionales como se explicó en el caso de 1^{3+} . En la región aromática, donde en el anterior compuesto encontrábamos las señales del grupo PPh_3^+ , se observan dos señales con una integración de 18H que corresponden a los 15 hidrógenos del grupo trifenilfosfonio ($\text{H}_{a,b,c}$) y a 3 hidrógenos de la fracción de TAMRA ($\text{H}_{o,p,r}$). Mediante el uso del COSY (**Figura 34. Anexos**) se correlacionan espacialmente las señales *m, n* y \tilde{n} indicándonos que sus hidrógenos se localizan sobre el mismo anillo aromático, esto ocurre de la misma manera para *s, u* y *v*. Además, en este caso, en la región alifática nos encontramos con las señales de los protones de los grupos metileno de la cadena alquímica que une la fracción de B_p con el grupo amino ($\text{H}_{i,k}$) y con el grupo PPh_3^+ ($\text{H}_{d,e,f}$), esta asignación se realizó con ayuda del COSY. A mayores se obtiene una señal muy intensa perteneciente a los cuatro grupos metilo de la unidad de TAMRA.

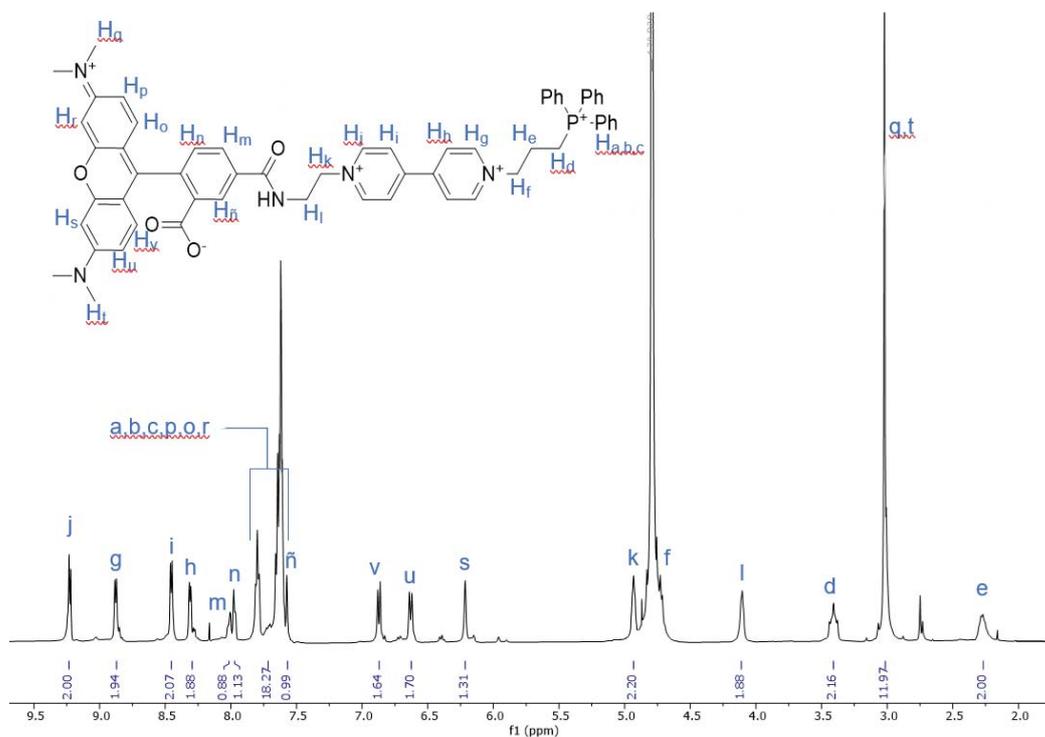


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H del compuesto 2^{3+} .

El espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 20**) presenta una asignación compleja debido a la existencia de un elevado número de carbonos cuaternarios unidos entre sí (que no presentan señales claras en el HMBC). Debido a esto, la asignación del espectro de RMN de ^{13}C se realiza de forma parcial. Así, fue sencillo asignar las señales de los carbonos que corresponden al fragmento estructural correspondiente al catión 1^{3+} (C_1 - C_{13}), por analogía con lo discutido para este compuesto, pudiéndose corroborar mediante los espectros de RMN bidimensionales (**Figuras 34,35,36. Anexos**). Mediante el HSQC se pudo asignar la mayoría de las señales de carbono que se encuentran enlazados a un hidrógeno de señal conocida ($\text{C}_{14,15,19,18,29,35, 33, 36, 37}$). A mayores de estas señales, se pudieron asignar las pertenecientes a los grupos carbonilo debido a su desplazamiento ($\text{C}_{16,23}$) y las señales de $\text{C}_{34,28}$ que se observan claramente en el HMBC. Para el resto de las señales no se puede dar una asignación fiable, aun así, la asignación parcial es capaz de corroborar la obtención del compuesto esperado.

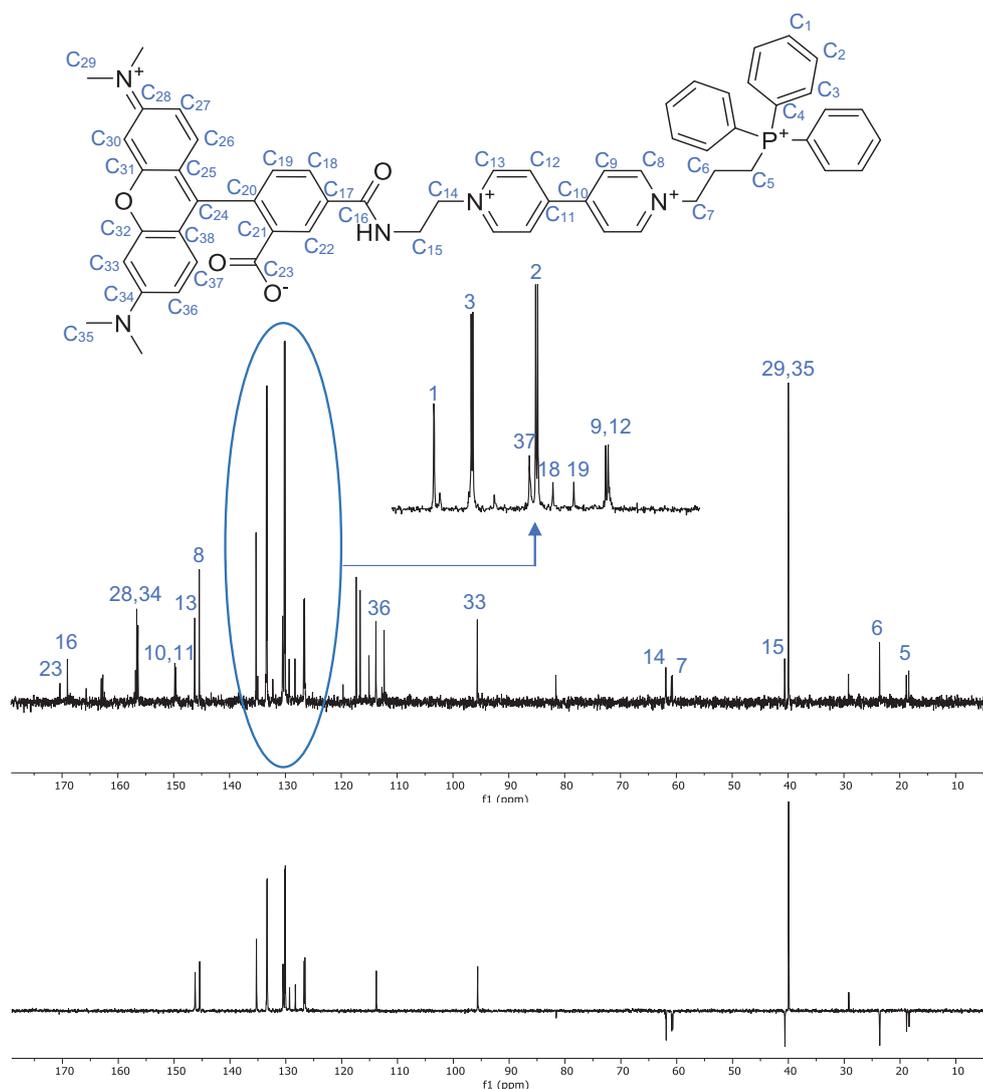


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C y DEPT del compuesto 2^{3+} .

La caracterización estructural por RMN del compuesto **2**·3TFA se complementó con el estudio de la muestra mediante HR-ESI-MS (**Figura 21**). Así, se pudieron observar picos con valor de $m/z = 305.372$ para el compuesto con carga 3+: $[C_{58}H_{55}N_5O_4P]^{3+}$ (m/z (teórico) = 305.466) y el pico para la relación m/z de 514.572, correspondiente al aducto del compuesto **2** y un anión trifluoroacetato $[C_{60}H_{55}F_3N_5O_6P]^{2+}$ (m/z (teórico) = 514.692).

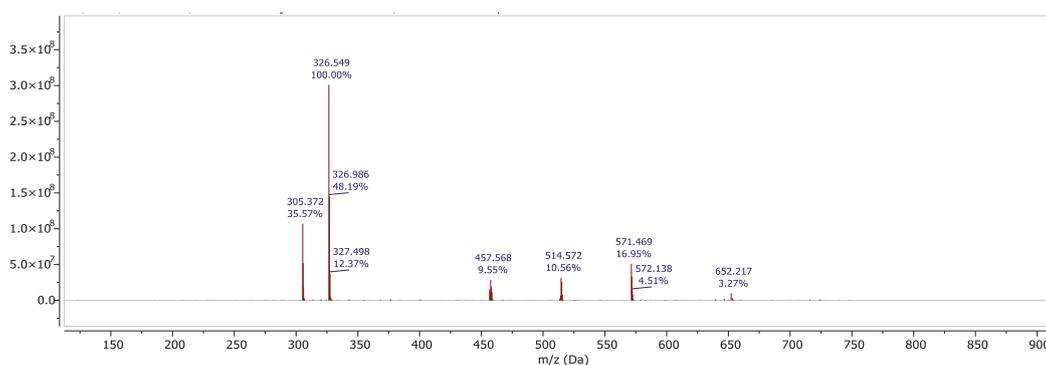


Figura 21. Espectro de masas del compuesto **2**³⁺.

Con los datos obtenidos mediante RMN y HR-ESI-MS, se puede concluir inequívocamente que la molécula obtenida se trata de la sonda mitocondrial **2**·3TFA.

3.5. Estudio de la formación de complejos supramoleculares entre la sonda mitocondrial modelo **1**³⁺ y los macrociclos CB[7] y CB[8] mediante RMN

3.5.1. Aspectos generales

El estudio de la interacción entre **1**³⁺ y los macrociclos comerciales CB[7] y CB[8] se realizó de forma cualitativa mediante RMN de ¹H y de ³¹P y espectroscopia DOSY ("Diffusion ordered spectroscopy").

En general, en el estudio de procesos de equilibrio, se debe tener en cuenta que la información que se puede extraer de los experimentos de, por ejemplo, RMN estará relacionada con la velocidad de intercambio entre componentes en la escala de tiempo de la técnica. Tendríamos así dos situaciones extremas, **equilibrio rápido**, cuando se observan señales promedio para las distintas especies (por ejemplo, sustrato libre y complejo), o **equilibrio lento**, cuando se pueden observar resonancias diferenciadas asociadas a cada especie en el equilibrio. Cuando lo que tenemos es una situación intermedia en la escala de tiempos de la técnica, hablamos de una situación de **coalescencia**, que puede estar más o menos cercana a un proceso rápido o lento, en donde las señales aparecerán más o menos resueltas dependiendo de la temperatura

(o cualquier otro factor que afecte a la velocidad del proceso) y de la distancia en Hz entre las señales observadas para las especies a uno y otro lado del equilibrio. Aunque la cantidad y calidad de los datos obtenidos de los experimentos planteados dependerá del régimen observado, por lo general se puede obtener información importante: 1) **desplazamientos químicos relativos** de las especies complejadas respecto a los de las especies libres, que nos pueden indicar no solo si se ha producido la complejación de forma cualitativa, si no también ayudarnos en la determinación de la constante termodinámica para el proceso. 2) **estequiometría** de los procesos, permitiéndonos observar, por ejemplo, con el CB[7], si se forman estructuras de tipo [2]- o [3]pseudorotaxano (estequiometrías 1:1 o 1:2, **Figura 22**). 3) **modo de inserción**, que estaría referido a la disposición relativa del sustrato 1^{3+} con respecto a la cavidad de los receptores CB[7] y CB[8].

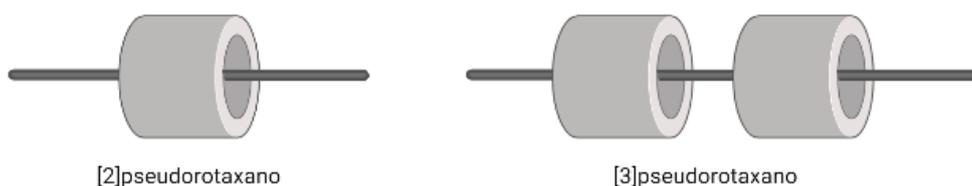


Figura 22. Representación de [2]- y [3] pseudorotaxanos (estequiometrías 1:1 o 1:2).

Otra técnica de RMN de gran utilidad para estudiar estos procesos dinámicos de complejación es el DOSY, que se aplicará en este trabajo al caso de la interacción de 1^{3+} con CB[7], y en el que se mide la difusión de las moléculas al relacionar su coeficiente de difusión (D) con el espectro de RMN de ^1H .²³ Si el compuesto forma un complejo de inclusión se observará un único coeficiente de difusión, mientras que si no es así se observarán dos, correspondientes a las especies libres.

3.5.2. Determinación del peso molecular de los macrociclos CB[7] y CB[8]

Para preparar adecuadamente las disoluciones de los macrociclos CB[7] y CB[8] es necesario realizar una valoración de cada uno. Esto es debido a que estos reactivos, aunque comerciales, presentan en su estructura un número indeterminado de moléculas de H_2O y HCl provenientes del proceso de síntesis.

Así, estas valoraciones se realizaron mediante medidas de absorbancia en UV-Vis de una disolución 2.5 mM de cobaltoceno sobre la que se añaden cantidades crecientes de macrociclo. Al añadir el macrociclo correspondiente, se produce la complejación del cobaltoceno lo que provoca una disminución de la absorbancia en el máximo para esta especie ($\lambda_{\text{max}} = 261 \text{ nm}$). Según se añade el macrociclo a la disolución, se observan dos

tendencias distintas: la absorbancia disminuye linealmente al añadir una cantidad de equivalentes del macrociclo inferior al número de equivalentes de cobaltoceno en disolución y, una vez la cantidad de macrociclo supera el punto de equivalencia entre ambos, la absorbancia se mantiene constante. Calculando el punto de corte entre ambas rectas es posible conocer el punto de equivalencia y, a partir de este, la masa molecular del macrociclo correspondiente.²⁴

3.5.3. Complejo de inclusión $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$

Como se ha comentado en el apartado 3.5.1., cuando se forma el complejo supramolecular se produce una modificación de los desplazamientos químicos de RMN para las especies asociadas respecto a las especies libres, que aporta una gran cantidad de información sobre el complejo de inclusión. Así, para la realización de este estudio, se registraron los espectros de RMN de ^1H y de ^{31}P del sustrato 1^{3+} con 0.5, 1 y 2 eq. de CB[7] y éstos se compararon con el de 1^{3+} para observar las modificaciones en los desplazamientos químicos.

El estudio del sustrato con el macrociclo CB[7] comenzó con el análisis de los espectros de RMN de ^{31}P (**Figura 23**). En estos se aprecia que el desplazamiento de la señal de 1^{3+} se modifica cuando forma el complejo supramolecular. En el espectro con 0.5 equivalentes de CB[7] se observan ambas señales, como resultado de un régimen de equilibrio lento. Sin embargo, con la adición de un equivalente, solo se obtiene una señal que indica que todo el sustrato se encuentra complejoado.

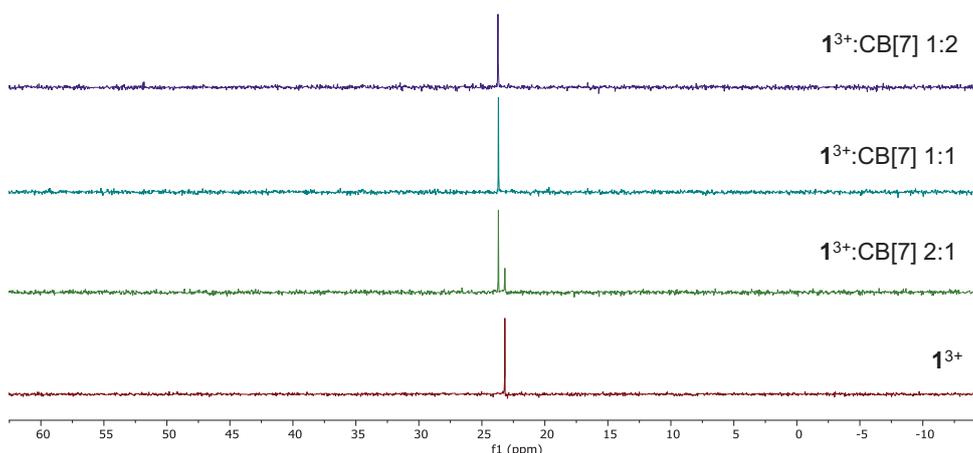


Figura 23. Comparación de los espectros de RMN de ^{31}P para el complejo $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$ con distintas cantidades de CB[7].

Al comparar los espectros de RMN de ^1H (**Figura 24**) del sustrato libre con los obtenidos para el complejo supramolecular con un equivalente de CB[7], se puede conocer de manera cualitativa donde se sitúa el macrociclo con respecto a la molécula. En este caso, se observa un gran apantallamiento de las señales *b* y *c* y un ligero apantallamiento de la señal *a*. Esto nos indica que el receptor se sitúa preferentemente sobre los dos anillos de bipyridina, donde los nitrógenos establecen interacciones ión- dipolo con los grupos carbonilos del CB[7]. De esta forma, los hidrógenos en posición β al N ocupan la parte central de la cavidad mientras que los que se encuentran en posición α , se sitúan cerca de los portales. Esta observación concuerda con lo descrito en bibliografía.¹⁴ El resto de los hidrógenos que quedan fuera del macrociclo ven sus señales desapantalladas.

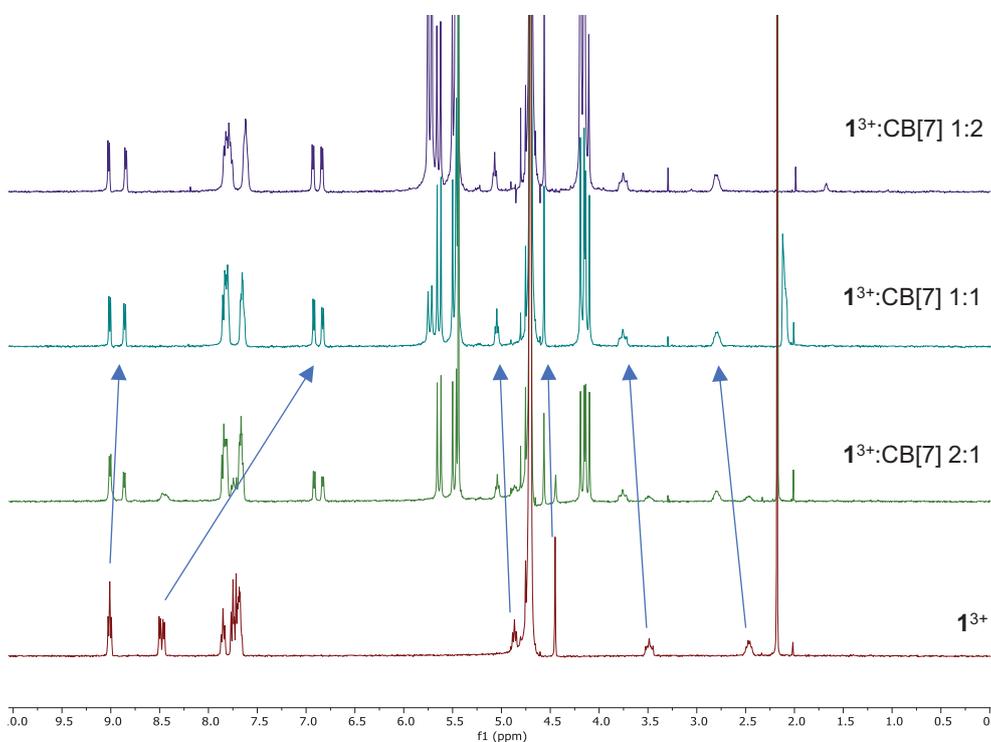


Figura 24. Comparación de espectros de RMN de ^1H para el complejo $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$ a distintos equivalentes de macrociclo.

Para conocer la velocidad del equilibrio de formación del complejo, nos fijamos en las señales del espectro con 0.5 equivalentes de CB[7], donde se aprecia claramente que aparecen dos juegos de señales: las señales pertenecientes al sustrato libre y al complejo supramolecular. Esto indica que la velocidad de formación del complejo supramolecular es lenta en la escala de tiempos de RMN.

Por último, podemos obtener información sobre si la estequiometría del complejo varía al añadir una mayor cantidad de equivalentes de CB[7]. Como el desplazamiento de las señales en el espectro con 2 equivalentes de macrociclo no se modifica con respecto al que presenta un único equivalente, podemos confirmar que la estequiometría máxima de este complejo es 1:1, por lo que no se forman estructuras supramoleculares del tipo [3]pseudorotaxano.

Asignación estructural de $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$:

En el caso de la relación de la sonda 1^{3+} con un equivalente de CB[7] se realiza la caracterización estructural mediante RMN de ^1H y de ^{13}C mono- y bidimensional. Así, al analizar el RMN de ^1H (**Figura 25**), se distinguen claramente las señales de 1^{3+} vistas anteriormente y aparecen, a mayores, 5 señales pertenecientes al CB[7]. En el COSY del complejo (**Figura 37. Anexos**) se ve como las señales *g* y *l* acoplan entre sí al igual que lo hacen *h* y *m*. Para diferenciar entre los protones que se localizan hacia el interior de la cavidad y los que se localizan hacia el exterior se recurrió a bibliografía.¹³

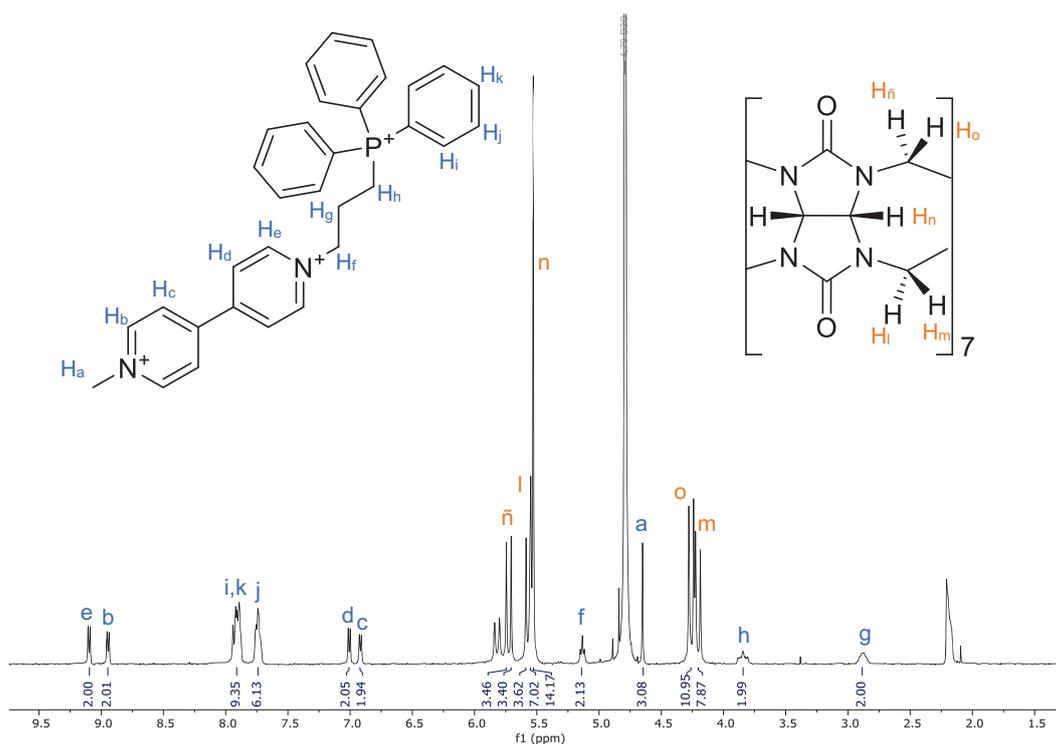


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H del complejo $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$.

En el RMN de ^{13}C (**Figura 26**) se asignaron las señales del sustrato vistas en la caracterización estructural de 1^{3+} , las señales del macrociclo se asignaron fácilmente mediante el HSQC ya que conocemos la asignación de los hidrógenos. Debido a la presencia del sustrato en el interior de la cavidad del macrociclo, los carbonos carbonílicos de cada unidad de glicourilo presentan un entorno químico distinto, este hecho se aprecia en menor medida en la señal 17-18 que manifiesta un cierto desdoblamiento.

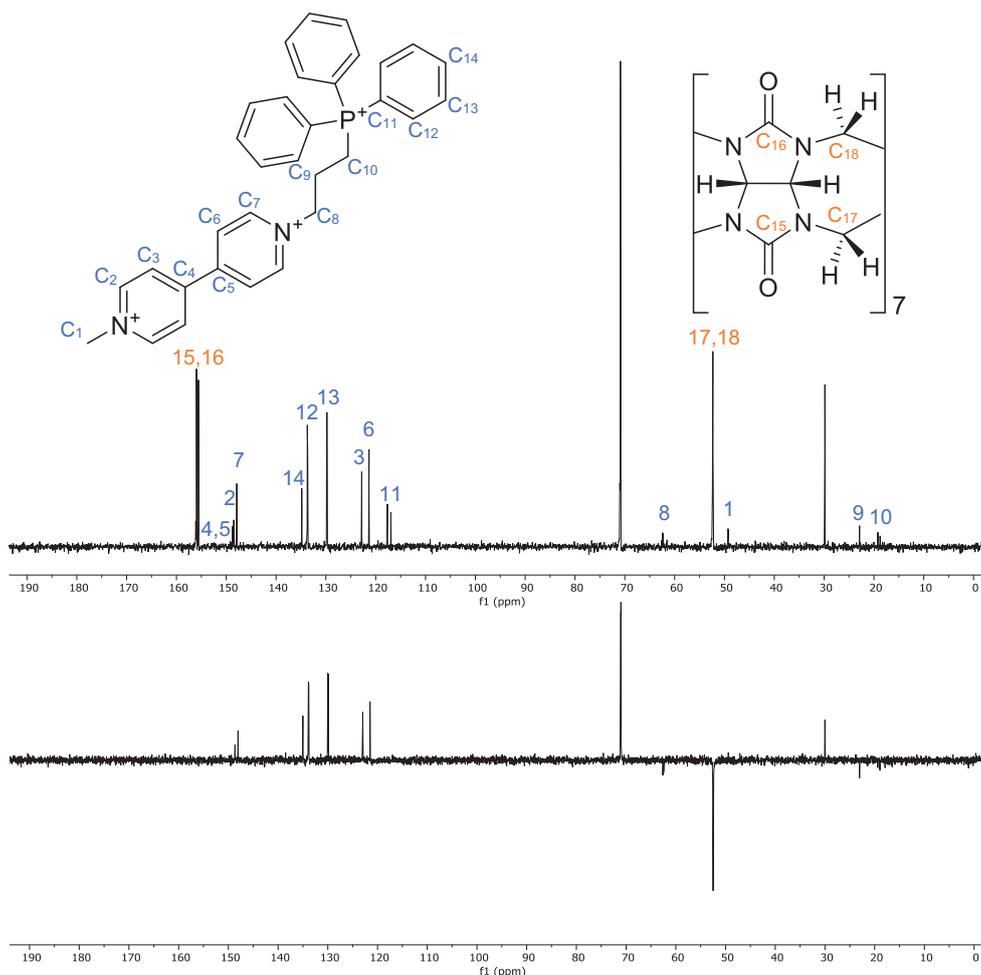


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C /DEPT del complejo 1^{3+} -CB[7].

En el caso de la mezcla entre un equivalente de CB[7] y 1^{3+} se realizó un DOSY (**Figura 27**), en el que se aprecia un único coeficiente de difusión. Como el coeficiente de difusión depende, entre otros factores, del tamaño, forma, masa y carga de la molécula,²³ el hecho de que la sonda y el macrociclo difundan a la misma velocidad implica que se encuentran formando un complejo supramolecular.

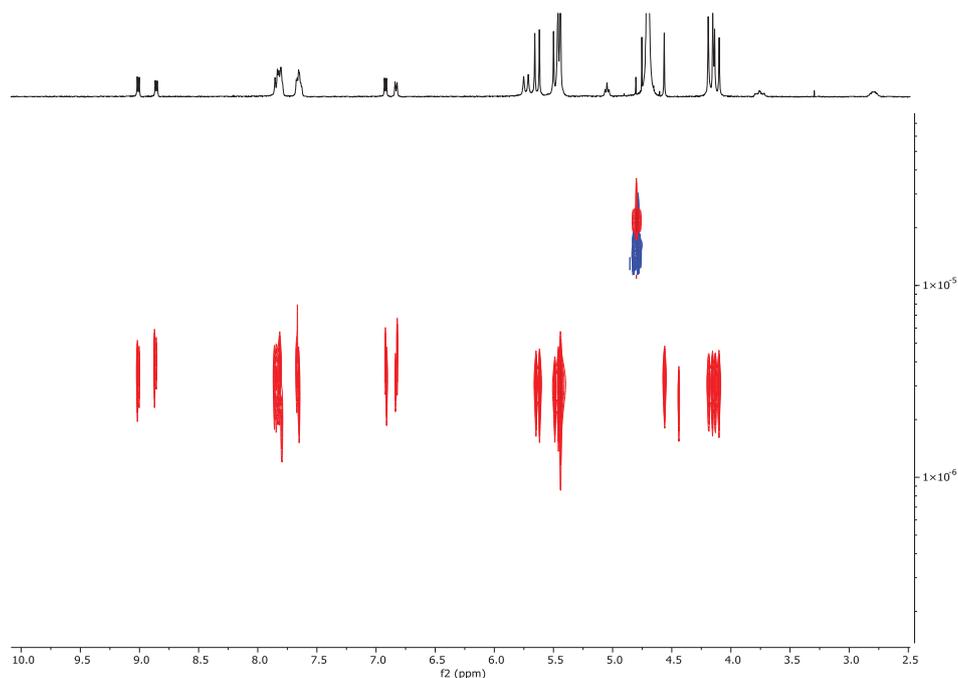


Figura 27. DOSY del complejo 1^{3+}-CB[7] .

La caracterización estructural por RMN del complejo supramolecular 1^{3+}-CB[7] se complementó con el estudio de la muestra mediante HR-ESI-MS (**Figura 39. Anexos**)²³ encontrando el pico correspondiente a $[\text{C}_{74}\text{H}_{74}\text{N}_{30}\text{O}_{14}\text{P}]^{3+}$ (m/z : 545.857).

El conjunto de resultados obtenidos mediante las distintas técnicas verifica la interacción de 1^{3+} con CB[7] para formar un complejo supramolecular de tipo [2]pseudorotaxano.

3.5.4. Complejo de inclusión 1^{3+}-CB[8]

De forma análoga a lo explicado para la interacción con CB[7], para la realización del estudio con CB[8] se registraron los espectros de RMN de ^1H y de ^{31}P del sustrato 1^{3+} con 0.5 y 1 eq del receptor y éstos se comparan con los del sustrato libre para observar las modificaciones.

En el caso del sustrato con el macrociclo CB[8] no se obtuvo un espectro de ^{31}P -RMN interpretable. Por el contrario, al comparar los espectros de RMN de ^1H para las distintas relaciones de macrociclo (**Figura 28**) se obtiene un resultado muy similar al obtenido con CB[7]. Así, la principal diferencia es que en el espectro de 0.5 equivalentes, en vez de obtener los dos juegos de señales explicados anteriormente, se obtienen señales en coalescencia que indican una velocidad intermedia en la escala de tiempo de RMN.

Debido a que el CB[8] presenta un tamaño mayor que el CB[7], es capaz de alojar en su interior dos sustratos distintos, un dador π y un aceptor π . En el caso de los

compuestos que nos ocupan, el CB[8] es capaz de alojar la fracción del viológeno del compuesto 1^{3+} (π deficiente) dejando espacio suficiente para que entre en la cavidad uno de los fenilos del grupo trifenilfosfonio (π excedente). Este efecto se observa en el anchamiento de las señales del TPP⁺ y puede ser la razón de que no se obtenga un RMN de ^{31}P interpretable, al intercambiarse los distintos anillos de fenilo en el TPP⁺ en el interior de la cavidad.

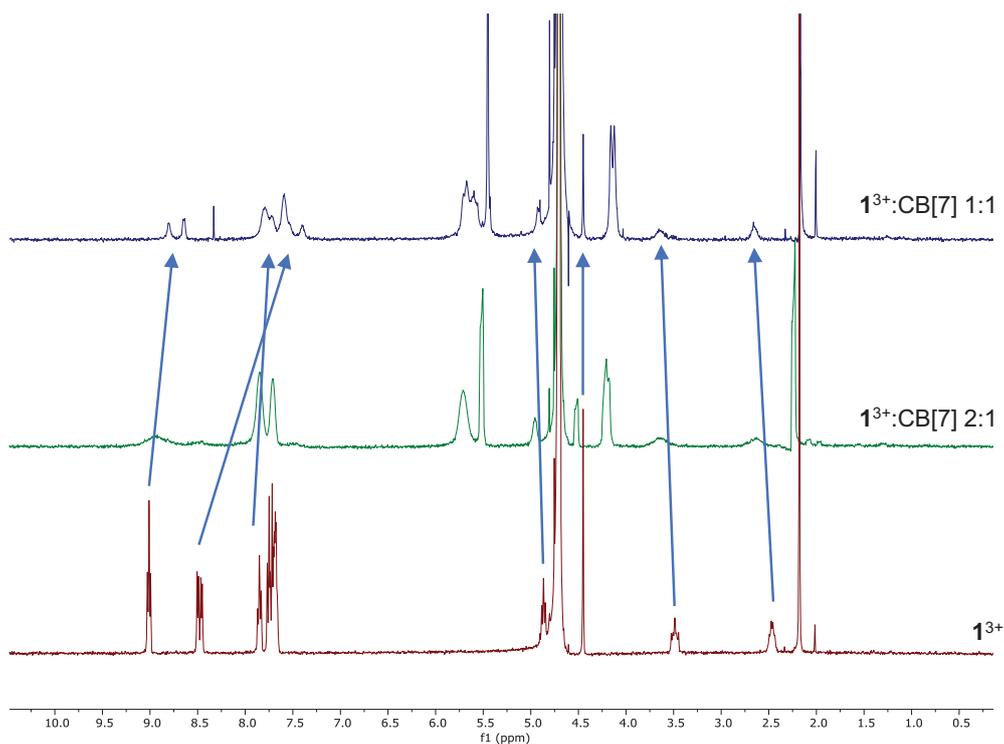


Figura 28. Comparación de los espectros de RMN de ^1H para el complejo $1^{3+}\text{@CB}[8]$ a distintas cantidades de CB[8].

Asignación estructural de $1^{3+}\text{@CB}[8]$:

Como en el caso anterior, se realizó la caracterización estructural mediante RMN de ^1H y de ^{13}C mono- y bidimensional para la mezcla de la sonda 1^{3+} con un equivalente de CB[8]. Así, el espectro de ^1H -RMN (**Figura 29**) es muy similar al visto anteriormente en el caso del CB[7].

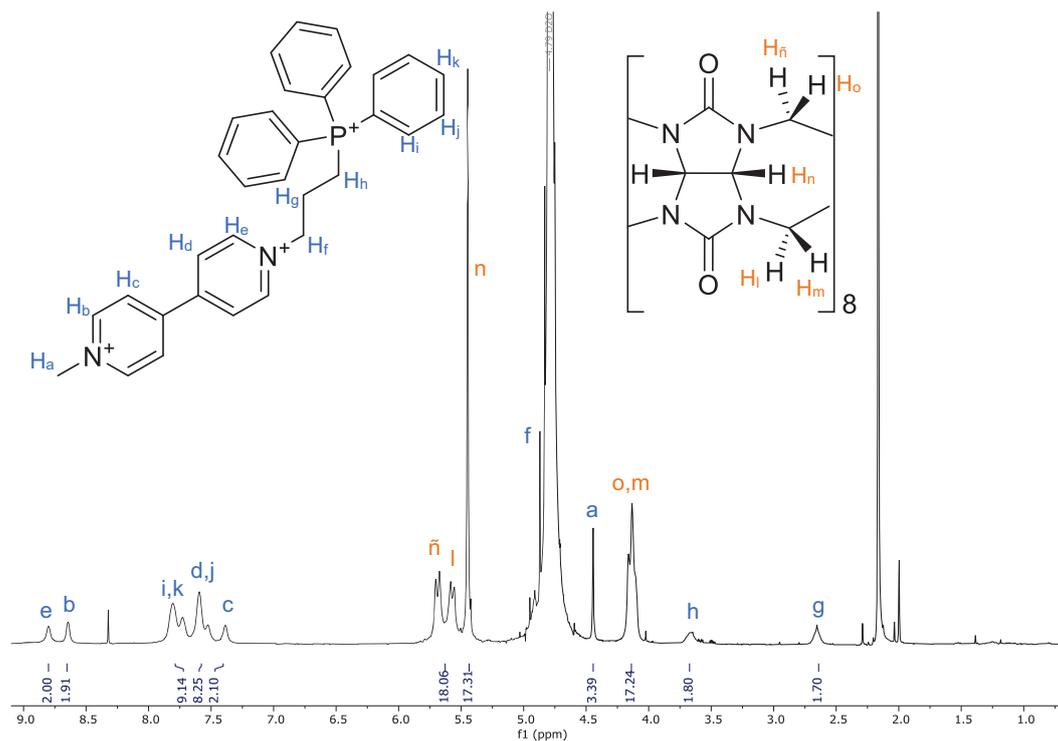


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H del complejo $1^{3+}\text{-CB}[8]$.

En el resto de los espectros obtenidos (RMN de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC) existe una gran diferencia entre la intensidad de las señales del macrociclo y las del receptor. Debido a esto, no se apreciaron de forma clara las señales del sustrato, lo que imposibilita el análisis de estos espectros.

La caracterización estructural por RMN del complejo supramolecular $1^{3+}\text{-CB}[8]$ se complementó con el estudio de la muestra mediante HR-ESI-MS (**Figura 40**. Anexos) encontrando el pico correspondiente a $[\text{C}_{80}\text{H}_{80}\text{N}_{34}\text{O}_{16}\text{P}]^{3+}$ (m/z : 601.207).

El conjunto de resultados obtenidos mediante las distintas técnicas verifica la interacción de 1^{3+} con CB[8] para formar un complejo supramolecular de tipo [2]pseudorotaxano.

4. APARTADO EXPERIMENTAL

4.1. General

Todos los reactivos comerciales fueron utilizados sin realizar una purificación adicional. El agua utilizada en síntesis y elaboraciones es de calidad Milli-Q, obtenida a partir de un aparato Millipore Gradient A10.

El seguimiento de todas las reacciones en disolución se realizó mediante cromatografía de capa fina, utilizando cromatofolios de gel de sílice Merck 60 F₂₅₄ y empleando radiación ultravioleta (254 y 360 nm) para el revelado. Como mezcla eluyente en las cromatografías se empleó una mezcla polar de disolventes (H₂O, MeCN, MeOH) con NaCl.

La comprobación de la formación del producto, así como de la ausencia de reactivos de partida tras la elaboración se realizó mediante RMN de ¹H y RMN de ³¹P empleando un espectrómetro Bruker Avance 300 (300 MHz). La caracterización de los productos se lleva a cabo mediante un espectrómetro Bruker Avance 500 (500 MHz para ¹H y 125 MHz para ¹³C). Para la preparación de las muestras de RMN se utilizaron disolventes deuterados (D₂O) utilizando la señal residual del disolvente protonado como señal de referencia.

Para la obtención de la masa de los productos se empleó un espectrómetro Applied Biosystems QSTAR Elite con analizador híbrido LC-Q-q-TOF para ESI de baja y alta resolución.

La purificación por HPLC en fase reversa se llevó a cabo en un Agilent 1200 series con una columna semipreparativa Aeris 5 µm PEPTIDE XB-C18 100 Å (250 x 10.0 mm) de Phenomenex. El cromatograma se registró a 220 y 360 nm y se utilizaron como eluyentes dos disoluciones: A: H₂O, TFA 0,1% y B: CH₃CN, TFA 0,1%. Las masas de los picos purificados se comprobaron mediante inyección directa en un equipo Bruker amaZon speed Toxtyper.

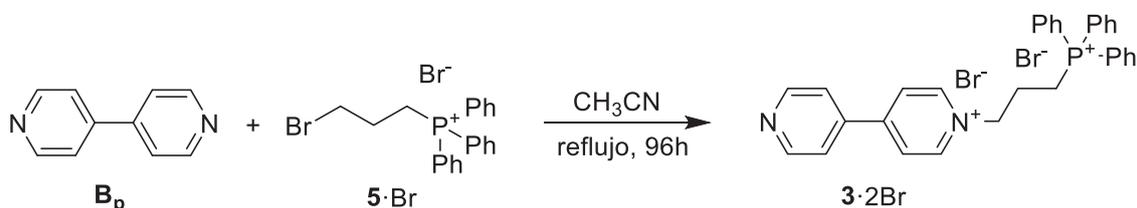
La liofilización de las muestras purificadas por HPLC se realizó en un liofilizador Telstar, Cryodos -80.

Los espectros de UV-Vis fueron registrados en un equipo Jasco V-650 spectrometer.

4.2. Síntesis

4.2.1. Síntesis del compuesto modelo 1³⁺

Síntesis del intermedio 3·2Br



En un balón de reacción se disolvieron 879.7 mg de 4,4'-bipiridina (**B_p**, 5.63 mmol, 5 eq.) en 50 mL de acetonitrilo. Posteriormente, se adicionaron 506.6 mg de bromuro de (3-bromopropil)trifenilfosfonio (**5·Br**, 1.09 mmol, 1 eq.). La mezcla se dejó reaccionar durante 96h a reflujo con agitación. Pasado este tiempo, se atemperó el balón y se añadieron 50 mL de Et_2O lo que provocó la precipitación selectiva de un sólido amarillo. El precipitado se filtró a vacío y se lavó con 30 mL de Et_2O . Se obtuvieron 553.5 mg de **3·2Br** (81%).

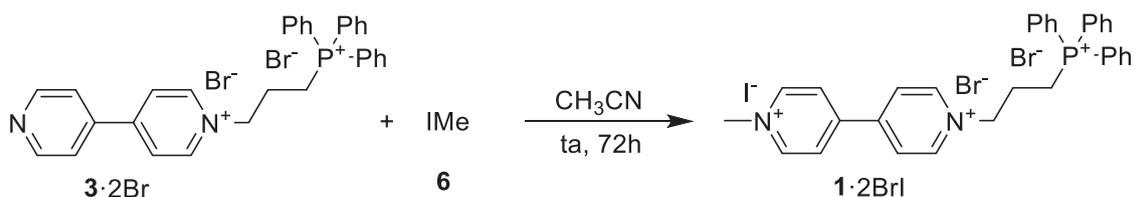
¹**H-RMN** (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.91 (d, $J = 6.7$ Hz, 2H), 8.78 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 8.41 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 7.92 – 7.69 (m, 17H), 4.83 (d, 2H, solapado con la señal del disolvente) 3.55 – 3.47 (m, 2H), 2.55 – 2.44 (m, 2H).

¹³**C-RMN** (126 MHz, D_2O) δ (ppm): 150.7 (C), 149.4 (C), 146.3 (CH), 145.4 (CH), 135.3 (d, $J = 3.1$ Hz, CH), 133.5 (d, $J = 10.4$ Hz, CH), 130.1 (d, $J = 12.8$ Hz, CH), 127.3 (CH), 126.6 (CH), 117.0 (d, $J = 87.6$ Hz, C), 61.0 (d, $J = 20.0$ Hz, CH_2), 48.3 (CH_3), 23.8 (CH_2), 18.9 (d, $J = 55.2$ Hz, CH_2).

³¹**P-RMN** (300 MHz, D_2O) δ (ppm): 23.9

HR-ESI-MS (m/z) calculada para $[[\text{C}_{31}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{P}]\text{Br}]^+$: 539.125. (m/z) obtenida: 539.126.

Síntesis del compuesto modelo 1^{3+} :



Se disolvieron 143.5 mg obtenidos de $3 \cdot 2\text{Br}$ (0.23 mmol, 1 eq.) en 50 mL de MeCN y se añadieron 1.43 mL de yoduro de metilo (**6**, 23.1 mmol, 100 eq.). El crudo se dejó reaccionar 72h con agitación a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se observó un precipitado rojo que se filtró a vacío y se lavó con 30 ml Et₂O obteniéndose un sólido polvoriento naranja. Se obtuvieron 138 mg del compuesto modelo $1 \cdot 2\text{BrI}$ (78%).

¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 9.04 – 8.96 (m, 4H), 8.49 (d, $J = 5.1$ Hz, 2H), 8.45 (d, $J = 5.2$ Hz, 2H), 7.80 – 7.86 (m, 3H), 7.76 – 7.70 (m, 6H), 7.69 – 7.63 (m, 6H), 4.85 (d, 2H, solapado con la señal del disolvente), 4.43 (s, 3H), 3.53 – 3.44 (m, 2H), 2.50 – 2.40 (m, 2H).

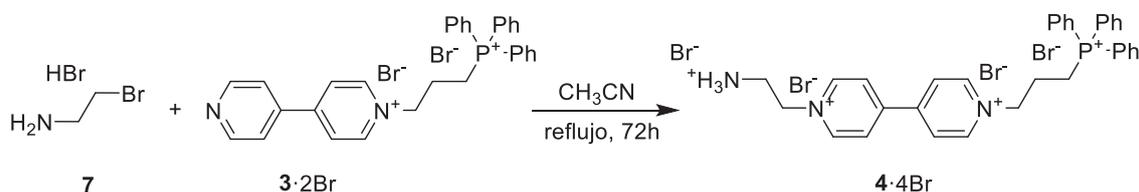
¹³C-RMN (126 MHz, D₂O) δ (ppm): 150.7 (C), 149.4 (C), 146.3 (CH), 145.4 (CH), 135.3 (d, $J = 3.1$ Hz, CH), 133.5 (d, $J = 10.3$ Hz, CH), 130.1 (d, $J = 12.8$ Hz, CH), 127.3 (CH), 126.6 (CH), 117.0 (d, $J = 87.6$ Hz, C), 61.0 (d, $J = 20.5$ Hz, CH₂), 48.3 (CH₃), 23.8 (d, $J = 2.2$ Hz, CH₂), 18.9 (d, $J = 55.2$ Hz, CH₂).

³¹P-RMN (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 23.2.

HR-ESI-MS (m/z) calculada para [C₃₂H₃₂N₂P]³⁺: 158.410. (m/z) obtenida: 158.409.

4.2.2. Síntesis de la sonda mitocondrial 2³⁺

Síntesis del intermedio 4·4Br



Se disolvieron en 50 mL de MeCN 243.7 mg de 3·2Br obtenidos en la síntesis de 1 (0.39 mmol, 1 eq.) y se añadieron 173.4 mg de hidrobromuro de 2-bromoetilamina (7, 0.85 mmol, 2.2 eq.). La mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 72 horas. Pasado este tiempo se observó la aparición de un precipitado blanco amarillento que se filtró en caliente y se lavó con 30 mL de MeCN frío. El crudo de reacción se dejó reaccionando durante 11 días tras los cuales se elaboró del mismo modo. Se obtuvieron en total 61.7 mg de 4·4Br (19%).

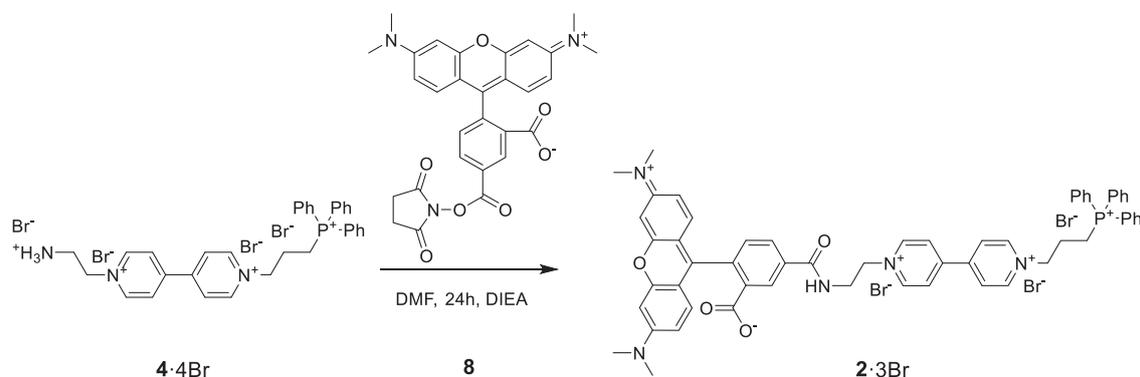
¹H-RMN (500 MHz, D₂O) δ (ppm): 9.20 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 9.07 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 8.60 (d, *J* = 11.7 Hz, 2H), 8.54 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H) 7.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H), 7.79 – 7.64 (m, 12H), 5.07 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 4.92 – 4.86 (m, 2H), 3.75 (q, *J* = 6.2 Hz, 2H), 3.56 – 3.47 (m, 2H), 2.47 (dd, *J* = 14.5, 7.6 Hz, 2H).

¹³C-RMN (126 MHz, D₂O) δ (ppm): 150.8 (C), 150.1 (C), 146.0 (CH), 145.3 (CH), 135.1 (d, *J* = 2.8 Hz, CH), 133.4 (d, *J* = 10.2 Hz, CH), 130.0 (d, *J* = 12.8 Hz, CH), 127.4 (CH), 127.3 (CH), 116.8 (d, *J* = 88.0 Hz, C), 60.9 (d, *J* = 20.8 Hz, CH₂), 57.8 (CH₂), 38.8 (CH₂) 23.6 (CH₂), 18.7 (d, *J* = 55 Hz, CH₂).

³¹P-RMN (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 23.2

HR-ESI-MS (m/z) calculada para [[C₃₃H₃₅N₃P] Br₂]⁺: 664.091. (m/z) obtenida: 664.092.

Síntesis de la sonda mitocondrial **2**³⁺



Se disolvieron 47.5 mg de 5-TAMRA, SE (**8**, 0.090 mmol, 1.2 eq.) en 330 μ L de DMF. Se añadieron los 61.7 mg de **4·4Br** (0.075 mmol, 1 eq) y se arrastraron al balón con 7.25 mL de DMF. Con 1.5 mL de DMF se arrastró el TAMRA de las paredes del balón. Se añadió 0.764 ml de DIEA 0.195 M (0.15 mmol, 2 eq.) lo que provocó un cambio de color y la solubilización completa del compuesto que se dejó reaccionando a temperatura ambiente. 24h después se apreció un cambio de color y se confirmó por CCF la formación del producto.

La sonda mitocondrial **2**³⁺ se purificó mediante HPLC en fase reversa. Para preparar la muestra, se llevó el crudo de reacción a sequedad. Posteriormente, se disolvió en la mínima cantidad de una mezcla MeCN/H₂O 1:1 de calidad ultrapura (5 mL) y se añadieron unas gotas de TFA para protonar completamente el compuesto. Como eluyentes se emplearon dos disoluciones: A: H₂O, TFA 0,1% y B: CH₃CN, TFA 0,1% y se registró el cromatograma a 220 y 360 nm ya que a 360 nm únicamente se observa la absorción de la fracción del TAMRA y no de los otros cromóforos de la molécula.

El método utilizado se optimizó para separar correctamente los picos de interés del cromatograma. Para ello se realizaron inyecciones de 15 μ L modificando el porcentaje de la mezcla eluyente. El método empleado comienza con un 20% de B (MeCN, 0.1% TFA) que se mantiene durante 4 minutos, a continuación, aumenta linealmente la proporción de B hasta el 60% en 29 minutos, finalmente se lava la columna durante 8 minutos a un 95% de B; tras el lavado se estabiliza la columna 6 minutos volviendo a las condiciones iniciales.

Una vez optimizado el método, se aumentó el volumen de las inyecciones paulatinamente comprobando que el pico de interés se podía separar correctamente del resto. La identificación del pico se realizó mediante una inyección directa en el espectrómetro de masas obteniendo que el t_r del compuesto **2**-3TFA es de 18.3 min. Una vez purificado, el compuesto se liofilizó obteniendo 11.7 mg de un sólido rosa oscuro (12%)

$^1\text{H-RMN}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.23 (d, $J = 6.2$ Hz, 2H), 8.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 8.45 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 8.31 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 8.02 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.97 (d, $J = 5.7$ Hz, 1H), 7.82–7.59 (m, 18H), 7.57 (s, 1H), 6.87 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.63 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.21 (s, 1H), 4.93 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.72 (d, 2H, solapado con la señal del disolvente), 4.13 – 4.07 (m, 2H), 3.46 – 3.36 (m, 2H), 3.02 (s, 12H), 2.30 – 2.25 (m, 2H).

$^{31}\text{P-RMN}$ (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 22.9

R-ESI-MS (m/z) calculada para $[[\text{C}_{33}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{P}] \text{Br}_2]^+$: 664.091. (m/z) obtenida: 664.092.

4.3. Estudio de la interacción entre el compuesto modelo 1^{3+} y los CB[n]s

El estudio de la formación de los complejos supramoleculares entre los macrociclos CB[7] y CB[8] y el compuesto 1^{3+} se llevó a cabo mediante la técnica de espectroscopía de RMN. Para ello se preparó una serie de tubos de RMN con distintas relaciones entre el sustrato y el receptor. Posteriormente, se compararon los espectros obtenidos.

4.3.1. Valoración de los macrociclos CB[7] y CB[8]

Para la valoración por UV-Vis se prepararon 3.352 ml de una disolución 2.5 mM de hexafluorofosfato de cobaltocenio (2.8 mg). 105 μ L de esta disolución se llevaron a 15 mL de H₂O para obtener una disolución $1.435 \cdot 10^{-2}$ mM de absorbancia aproximada 0.5 ($\epsilon_{\text{cobaltocenio}} = 34200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Se preparó una disolución de CB[7] pesando 1.4 mg del compuesto que se disolvió en 3 mL de la disolución diluida de cobaltocenio para mantener constante la concentración del sustrato durante la valoración. Tras la realización de un blanco (H₂O), se añadieron sobre 2.5 mL de la disolución $1.435 \cdot 10^{-2}$ mM de cobaltocenio volúmenes crecientes de la disolución de CB[7], lo que provocó el descenso de la absorbancia a 261 nm. Finalizada la valoración, se representan los valores de absorbancia frente a la concentración de macrociclo añadido obteniéndose dos tendencias: una de ellas pertenecientes a las adiciones previas al punto de equivalencia, que presentan una disminución lineal de la señal, y otra en las adiciones posteriores al punto de equivalencia, que muestra una recta de saturación. A partir del punto de equivalencia se puede conocer la masa molecular del macrociclo.

4.3.2. Análisis del complejo supramolecular $1^{3+} \subset \text{CB}[7]$

Se prepararon 5 mL de una disolución del compuesto modelo 1^{3+} con una concentración 1 mM. Se prepararon 800 μ L de otra disolución de 1^{3+} con el macrociclo CB[7], la concentración de esta disolución es 1 mM para 1^{3+} y 6 mM para el CB[7]. A partir de estas dos disoluciones stock se prepararon 4 tubos de RMN con distintas relaciones de equivalencia, tal y como se muestra en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Equivalentes y volúmenes de los tubos de RMN del estudio de la unión de 1^{3+} con CB[7].

Relación de equivalentes CB[7]/1	V disolución 1(μ L)	V disolución 1-CB[7](μ L)
0	500	0
0,5	500	45
1	500	100
2	500	250

Con los tubos preparados se registraron los espectros de RMN de ^1H y de ^{31}P . A mayores, se realizó un estudio completo (espectros de RMN monodimensionales, bidimensionales, DOSY, HR-ESI-MS) para la relación 1:1 entre los dos compuestos.

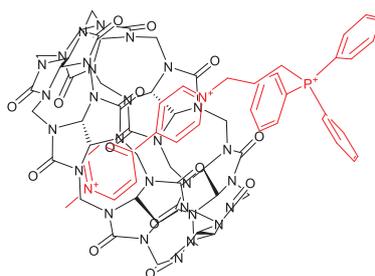


Figura 30. Representación de la interacción de 1^{3+} con CB[7].

^1H -RMN (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 9.10 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 8.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 7.96 – 7.86(m 9H), 7.77 – 7.70 (m, 6H), 7.01 (d, $J = 6.4$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 6.3$ Hz, 2H), 5.82 (d, $J = 15.3$ Hz, exceso CB[7]), 5.73 (d, $J = 15.5$ Hz, 7H), 5.57 (d, $J = 15.5$ Hz, 7H), 5.53 (s, 14H), 5.13 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 4.65 (s, 3H), 4.26 (d, $J = 15.4$ Hz, 7H), 4.21 (d, $J = 15.4$ Hz, 7H), 3.90 – 3.78 (m, 2H), 2.93 – 2.83 (m, 2H).

^{13}C -RMN (126 MHz, D_3O) δ (ppm): 156.0 (C), 155.6 (C), 148.7 (C), 148.5 (CH), 147.9 (CH), 134.85 (CH), 133.7 (d, $J = 10.2$ Hz, CH), 129.8 (d, $J = 12.9$ Hz, CH), 122.81 (CH) 121.34 (CH) 117.31 (d, $J = 87.7$ Hz, C), 70.9 (CH), 62.4 (d, $J = 21.4$ Hz, CH_2), 52.4 (CH_2), 52.3 (CH_2), 49.3 (CH_3), 29.8 (interferencia), 22.9 (CH_2), 19.0 (d, $J = 54.1$ Hz, CH_2).

^{31}P -RMN (400 MHz, D_2O) δ (ppm): 23.7

HR-ESI-MS (m/z) calculada para $[\text{C}_{74}\text{H}_{74}\text{N}_{30}\text{O}_{14}\text{P}]^{3+}$: 545.857. (m/z) obtenida: 545.857.

4.3.3 Análisis del complejo supramolecular 1^{3+} -CB[8]

Se preparó 1 mL de una disolución de 1^{3+} con el macrociclo CB[8], con una concentración 1 mM para 1^{3+} y 2 mM para CB[8]. Con esta disolución y la del compuesto 1^{3+} , preparada para el estudio con CB[7], se prepararon 2 tubos de RMN a distintas relaciones de equivalencia (**Tabla 2**).

Tabla 2. Equivalentes y volúmenes de los tubos de RMN del estudio de la unión de 1^{3+} con el CB[8].

Relación de equivalentes CB[8]/1	V disolución 1(μ L)	V disolución 1-CB[8](μ L)
0,5	300	300
1	300	600

Se registraron los espectros de RMN de ^1H y de ^{31}P de ambas mezclas. Para la relación 1:1 se realizó un estudio completo (espectros de RMN monodimensionales, bidimensionales y HR-ESI-MS. En este caso, la diferencia de intensidad entre las señales del macrociclo y del sustrato impidió la correcta interpretación de los espectros de RMN de ^{13}C , de ^{31}P y de los espectros bidimensionales.

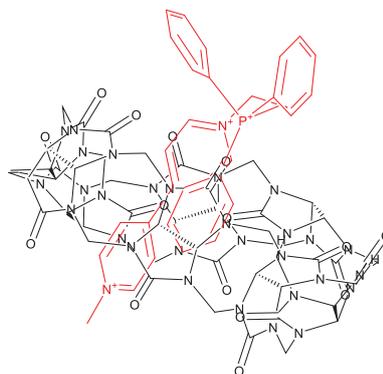


Figura 31. Representación de la interacción de 1^{3+} con el CB[8], donde se observa la formación de un heteroternario.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O) δ (ppm): 8.80 (s, 2H), 8.64 (s, 2H), 7.90 – 7.46 (m 17H), 7.39 (s, 2H), 5.69 (d, $J = 15.4\text{Hz}$, 8H), 5.57 (d, $J = 14.6\text{ Hz}$, 8H), 5.45 (s, 16H), 4.87 (d, 2H, solapado con el disolvente), 4.44 (s, 3H), 4.22 – 4.05 (m, 16H), 3.73 – 3.60 (m, 2H), 2.65 (s, 2H).

HR-ESI-MS (m/z) calculada para $[\text{C}_{80}\text{H}_{80}\text{N}_{34}\text{O}_{16}\text{P}]^{3+}$: 601.879. (m/z) obtenida: 601.875.

5. CONCLUSIONES

Las sondas mitocondriales reguladoras de ROS son una herramienta de gran utilidad para ampliar el conocimiento sobre el metabolismo mitocondrial y el papel del daño oxidativo producido por las ROS. En el presente trabajo se ha desarrollado y caracterizado una sonda mitocondrial y un modelo simplificado de la misma sin unidad transductora, con las que poder desarrollar futuras investigaciones. Las conclusiones concretas que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

1. Se ha sintetizado el modelo de sonda mitocondrial 1^{3+} a partir de la B_p y agentes alquilantes adecuados.
2. Mediante el uso de diversas técnicas de RMN, se ha confirmado la formación de un complejo supramolecular del tipo [2]pseudorotaxano entre 1^{3+} y los macrociclos CB[7] y CB[8]. Se ha determinado de manera cualitativa la velocidad del equilibrio y se ha establecido el sitio de unión entre ambas moléculas.
3. Se ha sintetizado la sonda mitocondrial fluorescente 2^{3+} mediante la alquilación de la B_p y la adición del 5-TAMRA, SE.
4. Se ha realizado la purificación de la sonda mitocondrial 2^{3+} mediante HPLC en fase reversa.
5. Se ha realizado con éxito la caracterización estructural de ambos productos y complejos supramoleculares mediante las técnicas de RMN de 1H , ^{13}C y ^{31}P monodimensionales y RMN de 1H y ^{13}C bidimensionales, completando la caracterización con HR-ESI-MS.

CONCLUSIÓNS

As sondas mitocondriais reguladoras de ROS son unha ferramenta de gran utilidade para ampliar o coñecemento do metabolismo mitocondrial, e o papel do dano oxidativo producido polas ROS. No presente traballo desenvolvéronse e caracterizáronse unha sonda mitocondrial e un modelo simplificado da mesma sen a unidade transdutora, coas que poder realizar futuras investigación. As conclusión concretas que se poden extraer deste traballo son as seguintes:

1. Sintetizouse o modelo de sonda mitocondrial 1^{3+} a partires da B_p e axentes alquilantes adecuados.
2. Mediante o uso de diversas técnicas de RMN, confirmouse a formación dun complexo supramolecular do tipo [2]pseudorotaxano entre 1^{3+} e os macrociclos CB[7] e CB[8]. Determinouse de forma cualitativa a velocidade do equilibrio e estableceuse o sitio de unión entre ambas moléculas.
3. Sintetizouse a sonda mitocondrial fluorescente 2^{3+} mediante a alquilación da B_p e a posterior a adición do 5-TAMRA, SE.
4. Realizouse a purificación da sonda mitocondrial 2^{3+} mediante HPLC en fase reversa.
5. Caracterizáronse estruturalmente con éxito ambos produtos e complexos supramoleculares mediante as técnicas de RMN de 1H , ^{13}C e ^{31}P monodimensionais e RMN de 1H e ^{13}C bidimensionais, completando a caracterización con HR-ESI-MS.

CONCLUSIONS

ROS regulatory mitochondrial probes are a very useful tool to expand the knowledge about mitochondrial metabolism, and the role of oxidative damage produced by ROS. In the present work, a mitochondrial probe, and a simplified model of it without a transducer unit have been developed and characterized, with which to carry out future research. The specific conclusions that can be drawn from this work are the following:

1. The 1^{3+} mitochondrial probe model has been synthesized from B_p and suitable alkylating agents.

1. The 1^{3+} mitochondrial probe model has been synthesized from B_p and suitable alkylating agents.
2. Using various NMR techniques, the formation of a supramolecular complex of the type [2]pseudorotaxane between 1^{3+} and the macrocycles CB [7] and CB [8] has been confirmed. The equilibrium speed has been qualitatively determined and the binding site between the two molecules has been established.
3. The fluorescent mitochondrial probe 2^{3+} has been synthesized by alkylating B_p and adding 5-TAMRA, SE.
4. The purification of the mitochondrial probe 2^{3+} has been carried out using reversed phase HPLC.
5. The structural characterization of both products and supramolecular complexes has been successfully carried out using the techniques of one-dimensional 1H -, ^{13}C -, and ^{31}P -NMR and two-dimensional 1H - and ^{13}C -NMR, completing the characterization with HR-ESI-MS.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Cooper, G. M.; Hausman, R. E. *La Célula*, séptima edición.; 2017.
- (2) Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P.; Kaiser, C. A. *Biología Celular y Molecular*, quinta edición.
- (3) Rigoulet, M.; Yoboue, E. D.; Devin, A. *Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling*; 2011.
- (4) Perillo, B.; di Donato, M.; Pezone, A.; di Zazzo, E.; Giovannelli, P.; Galasso, G.; Castoria, G.; Migliaccio, A. ROS in Cancer Therapy: The Bright Side of the Moon. *Experimental and Molecular Medicine*. Springer Nature February 1, 2020, pp 192- 203
- (5) Zielonka, J.; Joseph, J.; Sikora, A.; Hardy, M.; Ouari, O.; Vasquez-Vivar, J.; Cheng, G.; Lopez, M.; Kalyanaraman, B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. *Chemical Reviews*. American Chemical Society August 9, 2017, pp 10043–10120.
- (6) Robb, E. L.; Gawel, J. M.; Aksentijević, D.; Cochemé, H. M.; Stewart, T. S.; Shchepinova, M. M.; Qiang, H.; Prime, T. A.; Bright, T. P.; James, A. M.; Shattock, M. J.; Senn, H. M.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Selective Superoxide Generation within Mitochondria by the Targeted Redox Cyclor MitoParaquat. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *89*, 883–894.
- (7) Smith, R. A. J.; Hartley, R. C.; Murphy, M. P. Mitochondria-Targeted Small Molecule Therapeutics and Probes. *Antioxidants and Redox Signaling*. December 15, 2011, pp 3021–3038.
- (8) Porteous, C. M.; Logan, A.; Evans, C.; Ledgerwood, E. C.; Menon, D. K.; Aigbirhio, F.; Smith, R. A. J.; Murphy, M. P. Rapid Uptake of Lipophilic Triphenylphosphonium Cations by Mitochondria in Vivo Following Intravenous Injection: Implications for Mitochondria-Specific Therapies and Probes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **2010**, *1800* (9), 1009–1017.
- (9) McCune, J. A.; Kuehnel, M. F.; Reisner, E.; Scherman, O. A. Stimulus-Mediated Ultrastable Radical Formation. *Chem* **2020**, *6* (7), 1819–1830.

- (10) Drechsel, D. A.; Patel, M. Differential Contribution of the Mitochondrial Respiratory Chain Complexes to Reactive Oxygen Species Production by Redox Cycling Agents Implicated in Parkinsonism. *Toxicological Sciences* **2009**, *112* (2), 427–434.
- (11) Xu, Z.; Xu, L. Fluorescent Probes for the Selective Detection of Chemical Species inside Mitochondria. *Chemical Communications* **2016**, *52* (6), 1094–1119.
- (12) Steed, J. W.; Atwood, J. L. *Supramolecular Chemistry*; Wiley, 2009.
- (13) Cong, H.; Ni, X. L.; Xiao, X.; Huang, Y.; Zhu, Q. J.; Xue, S. F.; Tao, Z.; Lindoy, L. F.; Wei, G. Synthesis and Separation of Cucurbit[n]urils and Their Derivatives. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2016**, pp 4335–4364.
- (14) Gadde, S.; Kaifer, A. E. *Cucurbituril Complexes of Redox Active Guests*; 2011.
- (15) Li, S.; Chen, H.; Yang, X.; Bardelang, D.; Wyman, I. W.; Wan, J.; Lee, S. M. Y.; Wang, R. Supramolecular Inhibition of Neurodegeneration by a Synthetic Receptor. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2015**, *6* (12), 1174–1178. <https://doi.org/10.1021/acsmedchemlett.5b00372>.
- (16) Yin, H.; Zhang, X.; Wei, J.; Lu, S.; Bardelang, D.; Wang, R. Recent Advances in Supramolecular Antidotes. *Theranostics*. Ivyspring International Publisher January 1, 2021, pp 1513–1526.
- (17) Zhang, X.; Huang, Q.; Zhao, Z. Z.; Xu, X.; Li, S.; Yin, H.; Li, L.; Zhang, J.; Wang, R. An Eco- and User-Friendly Herbicide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2019**, *67* (28), 7783–7792.
- (18) Wheate, N. J.; Day, A. I.; Blanch, R. J.; Arnold, A. P.; Cullinane, C.; Grant Collins, J. Multi-Nuclear Platinum Complexes Encapsulated in Cucurbit[n]uril as an Approach to Reduce Toxicity in Cancer Treatment. *Chemical Communications* **2004**, *4* (12), 1424–1425.
- (19) Manetta, A.; Gamboa, G.; Nasser, A.; Podnos, Y. D.; Emma, D.; Dorion, G.; Rawlings, L.; Carpenter, P. M.; Bustamante, A.; Patel, J.; Rideout, D. *Novel Phosphonium Salts Display in Vitro and in Vivo Cytotoxic Activity against Human Ovarian Cancer Cell Lines 1*; 1996; Vol. 60.

- (20) Domarco, O.; Neira, I.; Rama, T.; Blanco-Goómez, A.; García, M. D.; Peinador, C.; Quintela, J. M. Synthesis of Non-Symmetric Viologen-Containing Ditopic Ligands and Their Pd(II)/Pt(II)-Directed Self-Assembly. *Organic and Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (17), 3594–3602.
- (21) Randazzo, A. *Guía Práctica Para La Interpretación de Espectros de RMN: Ejercicios Para La Determinación Estructural de Pequeñas Molécula Orgánicas*, 1ª Ed.; Loghia: Napoles, 2018.
- (22) De Hoffmann, E. (2005). Mass Spectrometry. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- (23) Huo, R.; Wehrens, R.; van Duynhoven, J.; Buydens, L. M. C. Assessment of Techniques for DOSY NMR Data Processing. In *Analytica Chimica Acta*; Elsevier, 2003; Vol. 490, pp 231–251.
- (24) Yi, S.; Kaifer, A. E. Determination of the Purity of Cucurbit[n]uril (n = 7, 8) Host Samples. *Journal of Organic Chemistry* **2011**, *76* (24), 10275–10278.

7. ANEXOS

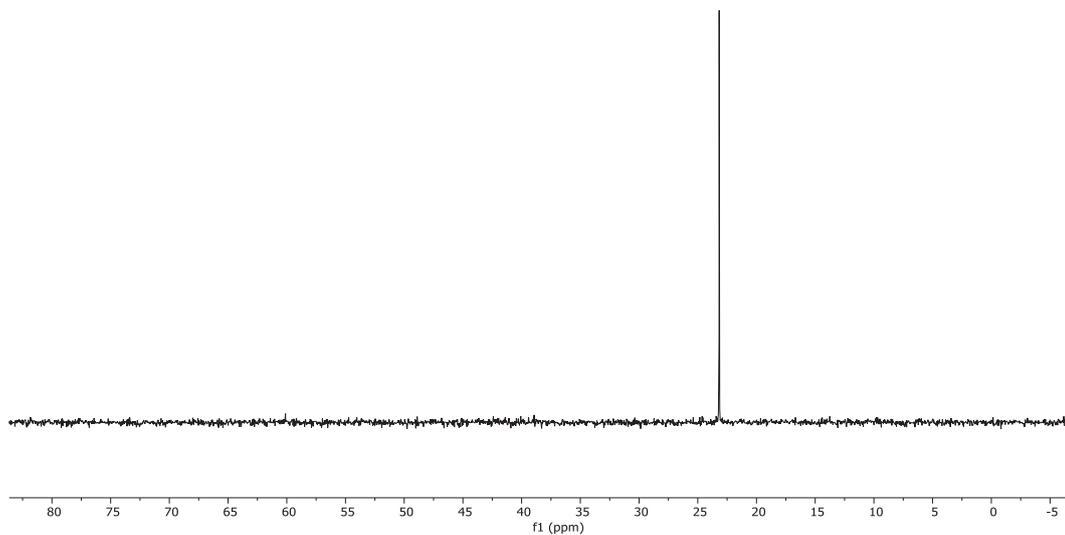


Figura 32. Espectro de RMN de ^{31}P del compuesto modelo 1^{3+} .

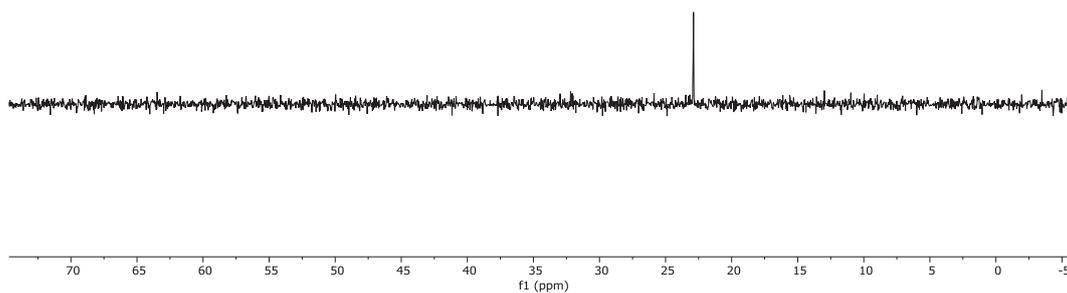


Figura 33. Espectro de RMN de ^{31}P del compuesto 2^{3+} .

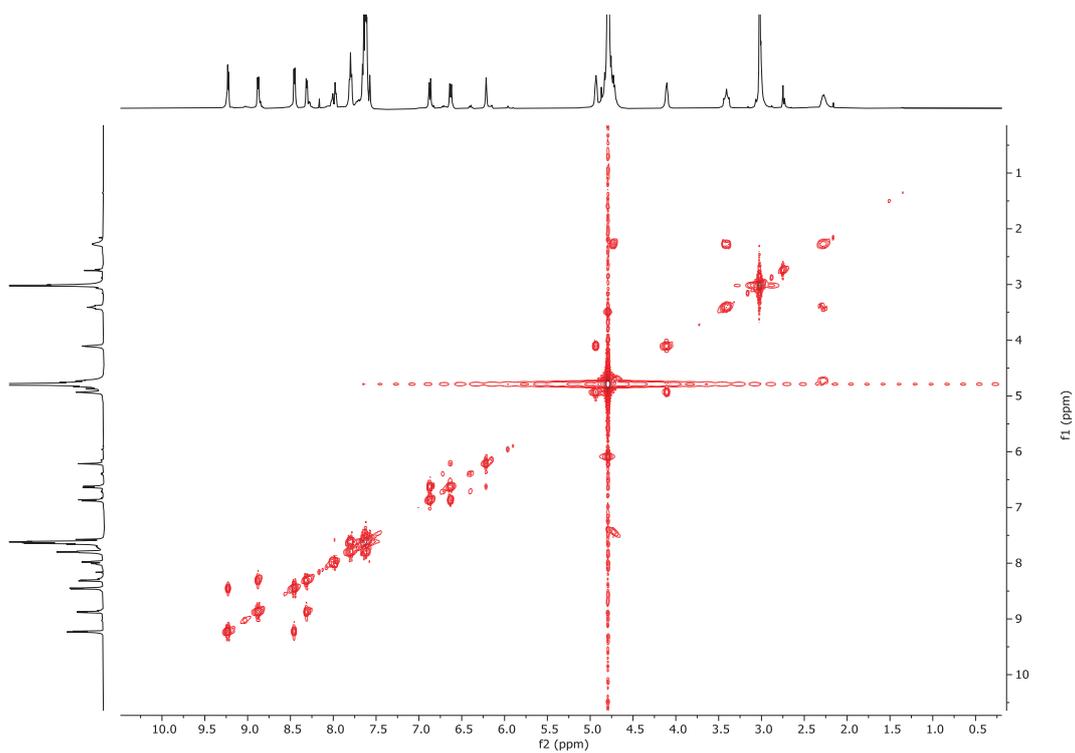


Figura 34. COSY del compuesto 2^{3+} .

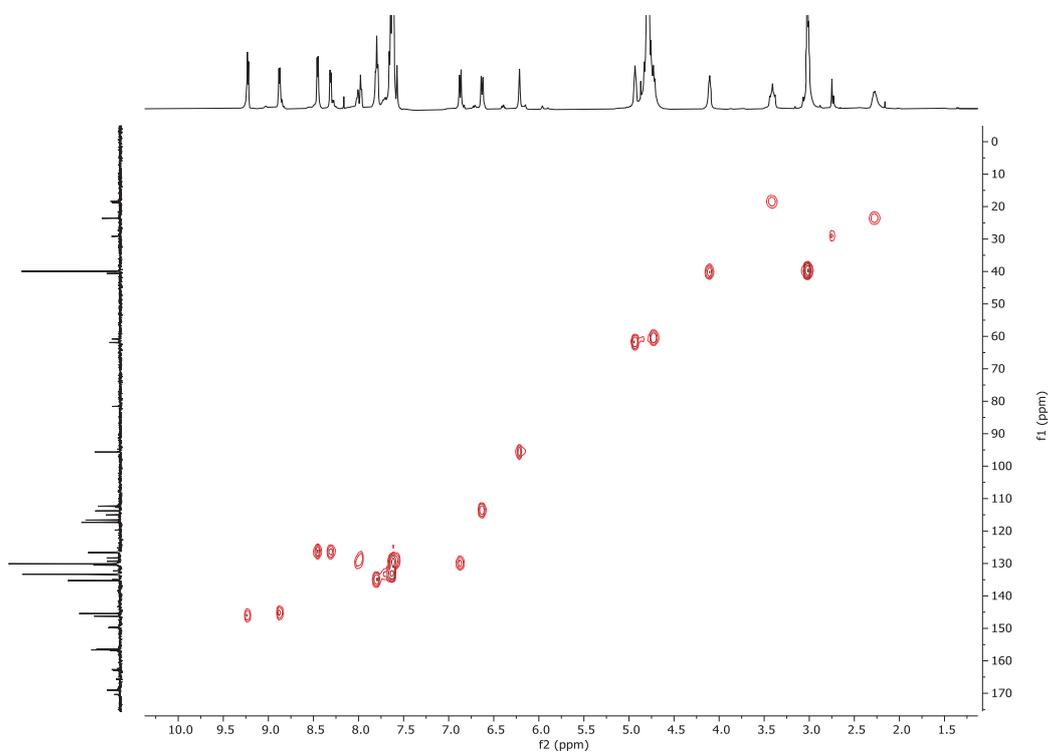


Figura 35. HSQC del compuesto 2^{3+} .

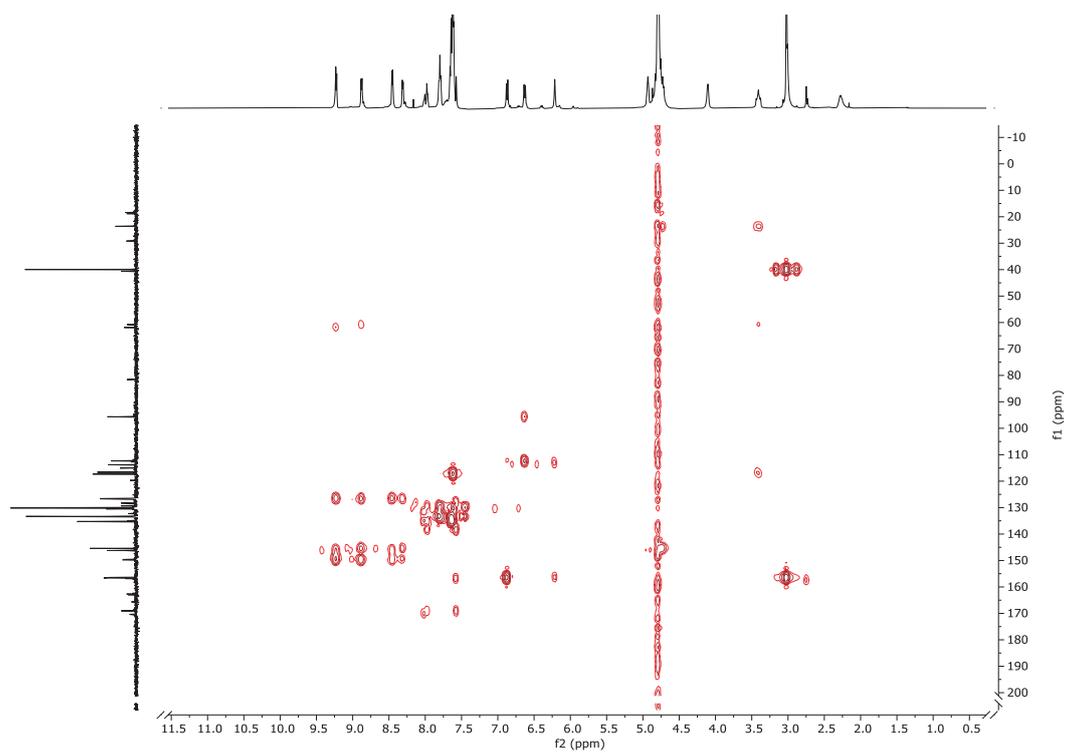


Figura 36. HMBC del compuesto 2^{3+} .

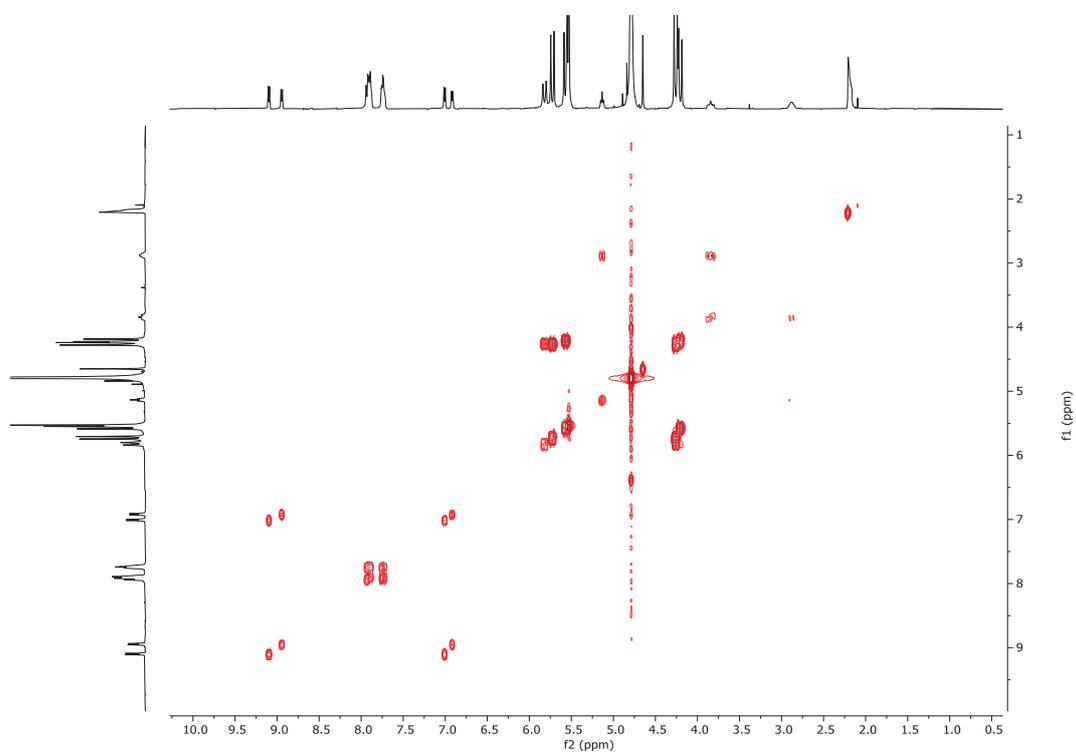


Figura 37. COSY del complejo supramolecular 1^{3+} -CB[7].

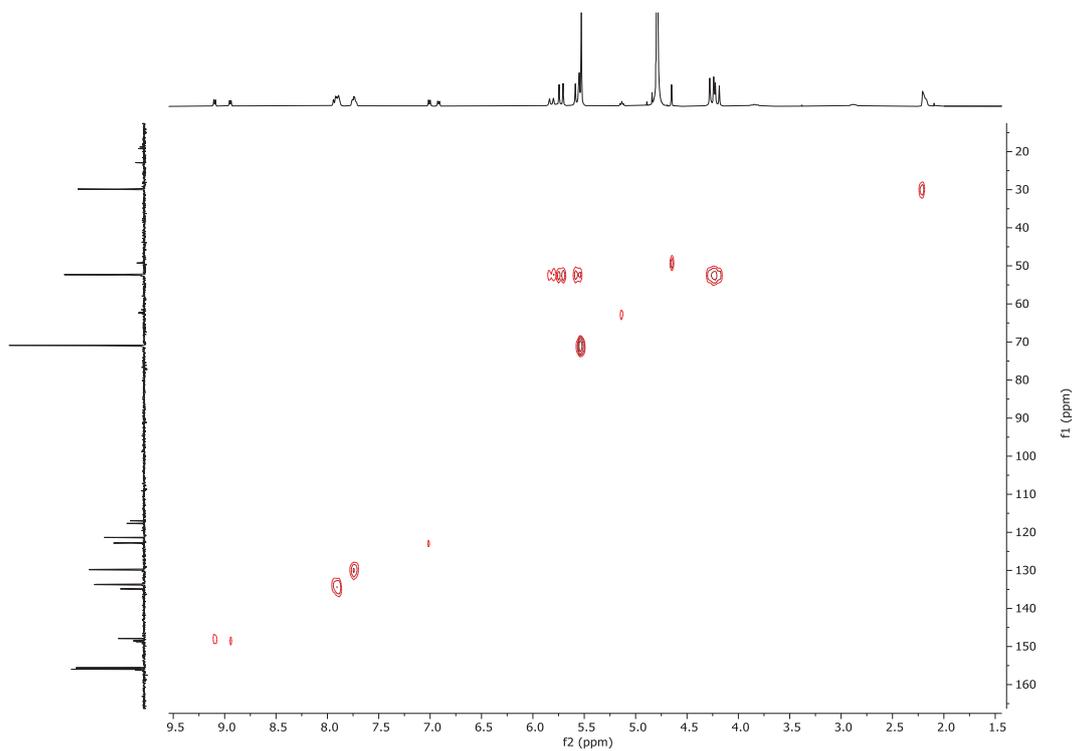


Figura 38. HSQC del complejo supramolecular 1^{3+} -CB[7].

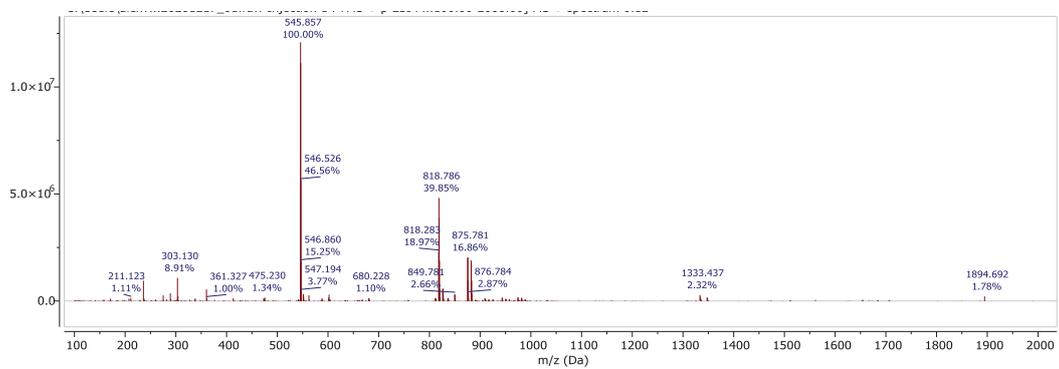


Figura 39. Espectro de masas del complejo supramolecular 1^{3+} -CB[7].

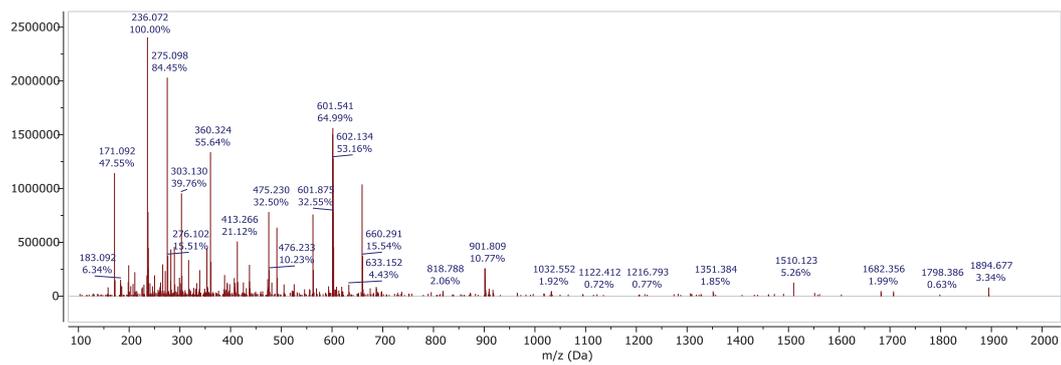


Figura 40. Espectro de masas del complejo supramolecular $1^{3+}CB[8]$.