



UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Facultade de Ciencias

Grao en Química

Memoria do Traballo de Fin de Grao

Análise da estabilidade termodinámica de complexos de Mn(II) empregados como axentes de contraste en imaxe por resonancia magnética

Análisis de la estabilidad termodinámica de complejos de Mn(II) empleados como agentes de contraste en imagen por resonancia magnética

Analysis of the thermodynamic stability of Mn(II) complexes used as MRI contrast agents

Francisco Pérez Fernández

Curso: 2021 - 2022. Convocatoria: setembro

Director 1: Carlos Platas Iglesias

Director 2: Isabel Brandariz Lendoiro

Memoria do Traballo de Fin de Grao en
Química pola UDC presentada por
D. **Francisco Pérez Fernández** na
Facultade de Ciencias da Universidade
da Coruña.

Setembro, 2022

Agradecementos

Aos meus titores Carlos Platas e Isabel Brandariz, a David Esteban e a Rocío Uzal pola súa dedicación e axuda para o desenvolvemento do traballo e polo estupendo ambiente de traballo que crearon que me fixo sentir sempre moi a gusto.

A Alexandra Elbakyan, polo seu arriscado labor de poñer o coñecemento a disposición da comunidade científica e da poboación xeral, e pola a súa importante contribución aos avances na investigación e á mellora na calidade da divulgación no eido da ciencia.

Índice

I.	RESUMO	1
II.	INTRODUCCIÓN E ANTECEDENTES	6
	II.1. Fundamento da imaxe por resonancia magnética	6
	II.2. Axentes de contraste e toxicidade	7
	II.3. Química do manganeso.....	10
	II.4. Aspectos termodinámicos	11
III.	OBXECTIVOS.....	16
IV.	PROCEDEMENTO EXPERIMENTAL.....	18
	IV.1. Plan de traballo.....	18
	IV.2. Cálculo computacional	18
	IV.3. Equipos, axentes e solventes.....	19
	IV.4. Síntese de L1.....	20
	IV.5. Síntese de L2.....	22
	IV.6. Estudo potenciométrico.....	24
	IV.7. Estudo espectrofotométrico.....	26
V.	RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	27
	V.1 Contribución dos motivos estruturais dos ligandos á estabilidade dos complexos de Mn(II).....	27
	V.1.1 Mesociclos derivados de AAZ.....	28
	V.1.2 Macrociclos derivados de TACN	29
	V.1.3 Macrociclos derivados de ciclono.....	30
	V.1.4 Macrociclos derivados de 15-ane-N5	33
	V.1.5 Ligandos non macrocíclicos	34
	V.1.6 Cálculo computacional	40
	V.2 Caracterización dos ligandos sintetizados	43
	V.3 Estudo termodinámico de L1, L2 e os complexos derivados de Mn(II).....	43
	V.3.1 Estudo potenciométrico.....	43
	V.3.1 Estudo espectrofotométrico.....	46
	V.3.1 Comparativa cos parámetros do estudo bibliográfico	49
VI.	CONCLUSIÓNS.....	51
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	54
VIII.	ANEXOS	65

I.RESUMO

Resumo

Nos últimos anos tense prestado atención ao posible uso de complexos derivados de Mn^{2+} para a súa aplicación en imaxe por resonancia magnética (IRM), unha importante técnica de diagnóstico médico. Un dos factores a ter en conta para a avaliación da idoneidade dos ligandos é a estabilidade termodinámica dos complexos, a fin de que liberen a menor cantidade posible de Mn^{2+} ao organismo.

No presente traballo, recadáronse 181 datos de constantes de estabilidade (valores de $\log K$) de complexos de Mn^{2+} , o que permitiu cuantificar a contribución dos distintos motivos estruturais dos ligandos á estabilidade dos complexos.

Así mesmo, sintetizáronse e caracterizáronse os ligandos ácido 2,2',2'',2''''-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis(azanotriil))tetraacético e ácido 2,2'-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis((piridin-2-ilmetil)azanodiil))diacético. Por último, realizouse un estudo termodinámico das protonacións destes ligandos e da súa complexación con Mn^{2+} mediante métodos potenciométricos e espectrofotométricos.

Palabras chave: imaxe por resonancia magnética, axente de contraste, complexo metálico, constante de estabilidade, manganeso

Resumen

En los últimos años se ha prestado atención al posible uso de complejos derivados de Mn^{2+} para su aplicación en imagen por resonancia magnética (IRM), una importante técnica de diagnóstico médico. Uno de los factores a tener en cuenta para la evaluación de la idoneidad de los ligandos es la estabilidad termodinámica de los complejos, a fin de que liberen la menor cantidad posible de Mn^{2+} al organismo.

En el presente trabajo, se recabaron 181 datos de constantes de estabilidad (valores de $\log K$) de complejos de Mn^{2+} , lo que ha permitido cuantificar la contribución de los distintos motivos estructurales de los ligandos a la estabilidad de los complejos.

Asimismo, se sintetizaron y caracterizaron los ligandos ácido 2,2',2'',2''''-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis(azanotriil))tetraacético y ácido 2,2'-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis((piridin-2-ilmetil)azanodiil))diacético. Por último, se realizó un estudio termodinámico de las protonaciones de estos ligandos y de su complejación con Mn^{2+} mediante métodos potenciométricos y espectrofotométricos.

Palabras clave: imagen por resonancia magnética, agente de contraste, complejo metálico, constante de estabilidad, manganeso

Abstract

In recent years, attention has been devoted to the possible use of complexes derived from Mn^{2+} for their application in magnetic resonance imaging (MRI), which is an important medical diagnosis technique. One of the factors to take into account for the assessment of the suitability of the ligands is the thermodynamic stability of the complexes, for the purpose of releasing as little Mn^{2+} as possible toward the organism.

In the present work, we compiled 181 data of stability constants ($\log K$ values) of Mn^{2+} complexes, which allowed us quantifying the contribution of the different structural motifs of the ligands to complex stability.

Likewise, we synthesized and characterized ligands 2,2',2'',2'''-(((1S,3S)-cyclobutane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetic acid and 2,2'-(((1S,3S)-cyclobutane-1,3-diyl)bis((pyridin-2-ylmethyl)azanediyl))diacetic acid. Finally, we carried out a thermodynamic study of the protonation of these ligands and their complexation with Mn^{2+} through potentiometric and spectrophotometric methods.

Keywords: magnetic resonance imaging, contrast agent, metal complex, stability constant, manganese

II. INTRODUCCIÓN E ANTECEDENTES

II.1. Fundamento da imaxe por resonancia magnética

As técnicas de imaxioloxía empregadas no eido da medicina son técnicas de diagnóstico non invasivas que permiten obter e procesar información dos pacientes sen necesidade de operación cirúrxica. Nas últimas décadas desenvolvéronse con este propósito técnicas como a tomografía de emisión de positróns, a ultrasonografía, a ecocardiografía ou a imaxe por resonancia magnética (IRM) (1). Esta última produce imaxes de alta resolución en calquera plano da anatomía dos tecidos e de procesos celulares empregando radiación non ionizante, de maneira que evita o risco de cancro que presentan as radiografías. Orixinalmente denominábase imaxe por resonancia magnética nuclear, pero a palabra “nuclear” foi eliminada para evitar alarmar os pacientes que puidesen asociala coa radioactividade (2).

O fundamento da IRM consiste na modificación da orientación do spin dos núcleos atómicos, tipicamente de hidróxeno, posto que constitúe arredor do 63% dos átomos do corpo humano. O spin é unha característica que posúen as partículas elementais, os hadróns (protón, neutrón) e os núcleos atómicos que permite explicar o seu comportamento magnético. Clasicamente, o spin foi concibido como un movemento de rotación das partículas cuxo vector de momento angular tería un momento magnético asociado de forma análoga a un electroimán. Se ben isto é impreciso, ofrece unha definición intuitiva que se vai asumir por simplicidade. Este eixo de rotación, en presenza dun campo magnético externo, xira á súa vez arredor do eixo imaxinario das liñas de campo (movemento de precesión) a unha frecuencia característica de cada partícula proporcional á forza magnética (frecuencia de Larmor).

Na ausencia dun campo magnético externo os protóns dispoñen os seus momentos magnéticos de forma aleatoria resultando nun magnetismo total nulo. Na IRM o paciente sométese a un campo magnético permanente. A enerxía térmica dos protóns é suficientemente grande como para que practicamente non se vexan afectados por el (3), pero presentarán unha lixeira tendencia a aliñar os spins en paralelo ao campo magnético externo (estado de menor enerxía), polo que no conxunto da mostra existirá unha magnetización lonxitudinal. A aplicación dun pulso de radiofrecuencia á frecuencia de Larmor dos protóns (campo magnético transitorio) provoca a continuación a progresiva inclinación do seu eixo de rotación describindo unha traxectoria helicoidal. Esta inclinación pode axustarse aos 90° adecuando a

duración do pulso, obtendo así magnetización transversal e aproximando a 0 a lonxitudinal. Ao remate deste pulso o sistema volverá progresivamente ao equilibrio (relaxación), tendo recuperado o 63% da magnetización lonxitudinal e perdido o 63% da transversal para os tempos establecidos como T_1 e T_2 , respectivamente (**Figura 1**). Este cambio na orientación do momento magnético dos protóns por relaxación, e non por aplicación dun campo magnético externo, pode inducir un sinal eléctrico procedente dos protóns a través dunha bobina (lei de indución de Faraday).

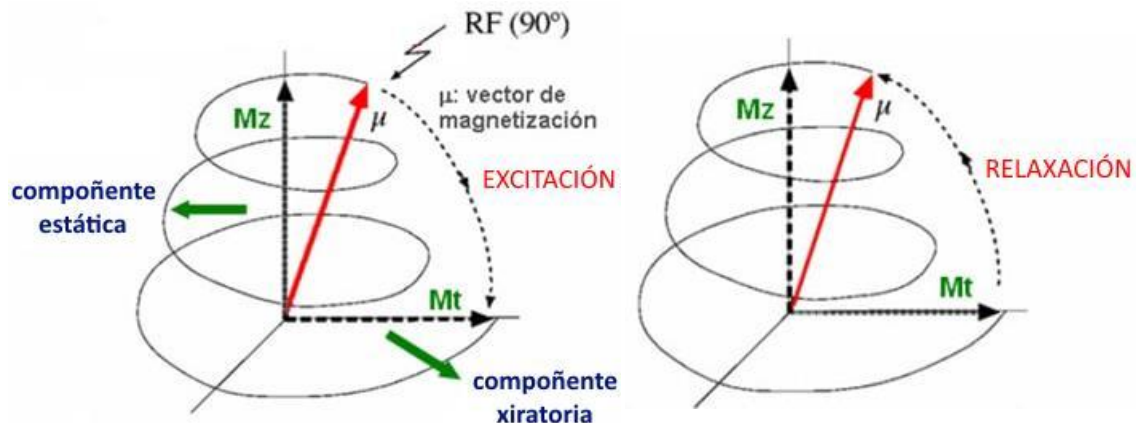


Figura 1. Proceso de excitación e relaxación dos spins en IRM, sendo RF o pulso de radiofrecuencia, M_z a magnetización lonxitudinal e M_t a magnetización transversal.

Este sinal depende de diversos parámetros intrínsecos relacionados coa relaxación, pero tamén extrínsecos, como a intensidade do campo magnético, de maneira que por medio de gradientes de campo se pode determinar espacialmente a procedencia do sinal, obtendo como resultado unha imaxe da distribución da densidade de protóns no espazo dependente do proceso de relaxación. Dado que o pH extracelular dos tumores é xeralmente máis ácido có das células sas (4), presentando así diferentes velocidades de relaxación (5), isto converte a IRM nunha técnica excelente para a detección do cancro. Ademais, o ciclo repítese en numerosas sucesións para mellorar a resolución, optimizando parámetros como o tempo de repetición do ciclo e o de recolección do sinal para facer máxima a distinción entre tecidos en función dos seus tempos de relaxación.

II.2. Axentes de contraste e toxicidade

A miúdo o contraste de sinal que ofrece a IRM entre tecidos tumorais e tecidos sans non abonda para unha diagnose eficiente. Para iso precísase de substancias que o melloren coñecidas como 'axentes de contraste'. Os axentes de contraste de IRM de ^1H interveñen modificando a magnetización ou tempos de relaxación dos protóns de tecidos específicos.

En ausencia de axentes de contraste, a relaxación lonxitudinal vén mediada pola axitación dos protóns que, ao movérense, xeran campos magnéticos puntuais que inflúen nos protóns lindeiros. Dado que o momento magnético do electrón é 658 veces máis forte có do protón, a presenza de substancias paramagnéticas (isto é, con electróns desapareados, de maneira que os momentos magnéticos non se anulan) que sexan capaces de interactuar cos protóns da auga ten un forte efecto na velocidade de relaxación e permite reducir o tempo de repetición do ciclo de magnetización, incrementando o sinal desaxeración. A eficacia do axente de contraste depende deste efecto e exprésase como relaxividade, que se define como o aumento na velocidade de relaxación dos protóns da masa de disolvente para unha concentración de especie paramagnética de 1 mM.

Este é o mecanismo de contraste externo máis aplicado e un dos principais motivos polos que o Gd^{3+} , con 7 electróns desapareados, é un excelente candidato como axente. Porén, o catión libre pode competir co Ca^{2+} afectando á contracción do miocardio, á respiración mitocondrial, á coagulación ou á neurotransmisión (1), e forma precipitados con anións como fosfatos, citratos, hidróxidos e carbonatos que se depositan nos tecidos con efectos tóxicos para o organismo, desencadeando reaccións inflamatorio-fibróticas, motivo polo que todos os medios de contraste baseados en gadolinio o empregan fortemente quelado, resultando de crucial importancia que os complexos sexan termodinámica e sobre todo cineticamente estables (6,7). Os complexos de gadolinio para contraste deixan unha posición libre que permite o enlace coa auga, producíndose un intercambio entre moléculas de auga do medio e enlazadas ao complexo que acelera a relaxación magnética lonxitudinal (2).

Desde a súa aprobación no 1988, aplicáronse máis de 300 millóns de inxeccións de complexos de gadolinio como axente de contraste para IRM (8). Con todo, desde o 2006 tense constancia de centenas de casos de fibrose sistémica nefroxénica (FSN) relacionada coa aplicación de axentes de contraste de Gd (9). A FSN é unha síndrome progresiva que carece de tratamento curativo e produce inflamación das pernas, endurecemento e perda de flexibilidade da pel por fibrose, contracción muscular e limitación do movemento das articulacións, e nos casos severos pode afectar a órganos vitais como os pulmóns, o fígado ou o corazón chegando a producir a morte. Documentouse en pacientes con insuficiencia renal moderada e grave, que poden prolongar o tempo medio de eliminación do complexo por filtración glomerular desde os 90 minutos habituais ata máis de 30 horas.

Considérase que se debe a que isto incrementa as reaccións de transmetalación que se dan no organismo, é dicir, de substitución do centro metálico do complexo por ferro, cobre, cinc ou calcio, quedando o Gd^{3+} libre. O risco estímase nulo en pacientes con insuficiencia renal leve e, respectando as recomendacións actuais, “case inexistente” para a moderada. Aconséllase prescindir da administración de complexos de Gd^{3+} cando sexa posible en pacientes con insuficiencia renal grave, mulleres xestantes e neonatos, debido á inmaduridade dos riles (6). Aínda que segue a ser un motivo de preocupación, o 98% de casos detectáronse tras a aplicación de complexos con ligandos lineais, termodinámica e cineticamente menos estables cóns macrocíclicos e, tras a adaptación das recomendacións, desde o 2009 ata 2017 non hai constancia de casos de FSN (8).

En pacientes sans tamén se ten constancia de pequenos depósitos de Gd^{3+} nos ósos e estruturas cerebrais, aínda que sen síntomas clínicos asociados demostrados no segundo caso. Por tal motivo, recoméndase evitar aplicar varias doses do medio de contraste a un paciente na mesma semana e a Axencia Europea do Medicamento desaconsellou a administración de complexos lineais de gadolinio e revocou as autorizacións dalgúns deles (9).

Estes inconvenientes despertaron interese pola investigación de alternativas aos axentes de contraste baseados en Gd^{3+} que diminúan no posible os riscos asociados, xa de por si baixos, sendo o manganeso o principal candidato. O Mn^{2+} presenta un forte comportamento paramagnético grazas aos seus 5 electróns desapareados, así como un lábil intercambio de moléculas de auga co medio, e as relaxividades observadas aproxímanse ás do Gd^{3+} debido tamén a que a distancia que separa o Mn^{2+} da H_2O é menor (10). Os estudos con Mn^{2+} ofrecen resultados prometedores para mellorar a diagnose por IRM de cancro colorrectal, melanoma de coroides, tumores cerebrais e de pescozo, mesotelioma, cancro de mama e meduloblastoma, comprobándose que as células tumorais absorben máis Mn^{2+} cás normais, incrementando en maior medida a relaxación lonxitudinal as primeiras cás segundas. Actualmente xa se están administrando axentes baseados en Mn^{2+} para a detección de metástases no fígado: Mn-DPDP e CMC-001 (11). O primeiro é un quelato sen posición libre para a auga que disocia lentamente *in vivo* por transmetalación, absorbendo os hepatocitos o Mn^{2+} (2). O CMC-001, recentemente desenvolto, está constituído dun pó de $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ como axente e de L-alanina e vitamina D_3 para facilitar a absorción intestinal (12).

A diferenza dos lantánidos, o manganeso é un constituínte natural do ser humano, que consome aproximadamente 45 mg por kg de vexetais, absorbéndose no intestino un 2-5% do total inxerido en función de factores como a concentración de Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , taninos, vitamina C, vitamina D₃, alanina, ácido oxálico e fibra. O manganeso absorbido únese maioritariamente á α 2-macroglobulina para ser despois expulsado eficientemente polo fígado facendo parte da bile, minimizando a fracción de manganeso libre no torrente sanguíneo que é excretada por vía urinaria. Intervén no funcionamento das mitocondrias e en consecuencia reteñen máis manganeso os órganos con máis mitocondrias, como o fígado, o páncreas e os riles, ofrecendo así un mellor contraste (13). É necesario para o metabolismo de lípidos, hidratos de carbono e proteínas e actúa como cofactor de diversos encimas involucrados no crecemento óseo, inmunidade, dixestión, regulación da glicosa en sangue ou mecanismos fronte aos radicais libres (14). A súa deficiencia está asociada a lesións cutáneas, malformacións óseas, osteoporose, epilepsia e outras enfermidades (15).

Así a todo, a sobreexposición ao manganeso non está libre de efectos prexudiciais. O Mn^{2+} libre actúa como antagonista do Ca^{2+} nalgunhas proteínas transportadoras (10) e a introdución de certas cantidades no organismo por vía parenteral afecta o sistema nervioso central e a musculatura do corazón con efectos cardio-depresivos (14). En ratos probáronse síntomas como letarxia, hipofaxia, perda de peso e actividade locomotora e hepatotoxicidade asociados a altas doses para IRM. A sobreexposición crónica provoca manganismo, unha enfermidade neurodexenerativa similar á síndrome de Parkinson con síntomas como bradiquinesia, rixidez, inestabilidade postural, tremor e déficits cognitivos (16). Aínda que axentes como o CMC-001 palían os efectos tóxicos administrándoo por vía oral, o uso de Mn^{2+} libre ten una eficiencia moi limitada, de maneira que o interese está enfocado ao desenvolvemento de complexos de manganeso estables termodinámica e cineticamente (13) que, ademais de evitar os riscos asociados ao Mn^{2+} libre, incrementen a especificidade por aqueles tecidos que interese resaltar en IRM (17).

II.3. Química do manganeso

O manganeso é un elemento químico pertencente á primeira serie dos metais de transición. É relativamente abundante, constituíndo arredor do 0,085% da codia terrestre. O mineral máis importante no que se atopa é a pirolusita (MnO_2), e tamén se atopa de forma natural formando outros óxidos ou MnCO_3 . O metal pode obterse da pirolusita por redución con Al (18). É duro, de cor prateada azulada e a súa

temperatura de fusión é unha das máis baixas da primeira serie (1519 K). Finamente dividido é pirofórico no aire, pero en pezas debe ser quentado para reaccionar. A súa configuración electrónica no estado fundamental é $[\text{Ar}]4s^23d^5$ e presenta o intervalo máis amplo de estados de oxidación da primeira serie de transición (desde Mn^0 ata Mn^{7+}), sendo os máis estables $\text{Mn}(\text{II})$ e $\text{Mn}(\text{VII})$. Todos os estados de oxidación superiores ao Mn^{2+} son bos oxidantes, e a forma máis común na que poden atoparse é o anión permanganato MnO_4^- .

O Mn^{2+} prodúcese pola perda dos 2 electróns $4s$. É estable fronte á redución e a oxidación e pode formar complexos tetraédricos, planocadrados, bipiramidais trigonais, octaédricos, dodecaédricos, etc. Os complexos octaédricos son caracteristicamente de cor rosa pálido ou incoloros, presentando varias absorcións no rango do visible pero moi febles. O motivo é que a cor dos complexos se debe fundamentalmente a saltos electrónicos entre orbitais d de diferente enerxía, pero o Mn^{2+} ten todos os orbitais $3d$ semioocupados (**Figura 2**), sendo moi improbables os saltos de electróns (absorción) desde os orbitais de menor aos de maior enerxía, xa que os correspondentes estados excitados presentan multiplicidades de espín diferentes ao fundamental (19).

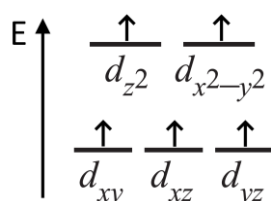


Figura 2. Disposición de electróns nos orbitais $3d$ dos complexos octaédricos de alto spin de Mn^{2+} .

II.4. Aspectos termodinámicos

A meirande parte dos eventos de toxicidade descritos posiblemente poderían terse evitados se a comunidade científica tivese posto máis énfase na inercia cinética durante o desenvolvemento dos primeiros axentes de contraste para IRM, e non tanto na estabilidade termodinámica. Porén, esta última non pode ser ignorada por completo, xa que a combinación de ambos factores é o mellor vaticinador da toxicidade in vivo (2). O factor termodinámico é particularmente relevante se o axente de contraste permanece no organismo un tempo comparable ao da súa vida media de disociación. Dado o recente descubrimento de depósitos de Gd^{3+} no organismo prolongados no tempo, este aspecto cobra maior relevancia.

A estabilidade termodinámica indica a afinidade dos ligandos (L) polo ión metálico (M) en función da porción que se atopa formando o complexo ou dissociada no equilibrio. Esta afinidade pódese cuantificar por medio das constantes de equilibrio de formación (K_f) ou de disociación (K_d), sendo $K_f = 1/K_d$. Nun complexo ao que se van unindo sucesivos ligandos, as constantes de formación individuais veñen definidas polas seguintes expresións (20):



Estas constantes polo xeral diminúen progresivamente debido ao crecente impedimento estérico para a unión de novos ligandos, e tamén a factores coulómicos e estatísticos, aínda que esta progresión pode alterarse se se producen modificacións na xeometría do complexo, cambios de alto a baixo spin, etc.

A partir das constantes de estabilidade de etapa pode calcularse a constante de estabilidade global (β) para unha secuencia dada. Por exemplo, para a reacción $M + 3L \rightleftharpoons ML_3$ a constante global exprésase como $\beta_3 = [ML_3]/[M][L]^3 = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3$. Deste xeito, pode definirse β pola seguinte expresión:

$$\beta_n = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot \dots \cdot K_n$$

Estas constantes poden determinarse por métodos potenciométricos e espectrofotométricos, por citar os máis habituais. A miúdo o seu cálculo pode complicarse debido á cantidade de equilibrios simultáneos que teñen lugar (protonación dos ligandos, protonación do complexo, formación de hidroxocomplexos, hidrólise do metal...), de maneira que se recorre a programas informáticos como *HySS2009* para obter as constantes de equilibrio mediante axuste dos datos experimentais. Desta forma, un parámetro que adoita empregarse como medida da toxicidade asociada ao complexo para metais non anfóteros como o manganeso é a concentración de metal libre ($pM = -\log [M]_{\text{libre}}$) a unhas condicións específicas, habitualmente as propostas por Raymond e colaboradores: $[M]_{\text{total}} = 10^{-6}$ M; $[L]_{\text{total}} = 10^{-5}$ M; $[Ca^{2+}]$, $[Zn^{2+}]$ e $[Cu^{2+}]$ en concentracións fisiolóxicas; pH = 7,4 (10). O pM permite unha comparación máis realista da estabilidade dos complexos en condicións fisiolóxicas, xa que ten en conta, ademais da constante de complexación, os efectos da basicidade dos ligandos.

As constantes de equilibrio dunha reacción fanse máis grandes canto máis favorable é enerxeticamente a formación dos produtos. Esta espontaneidade mídese como enerxía libre de Gibbs (ΔG), e está relacionada co equilibrio químico pola ecuación $\Delta G = -R T \ln \beta$, facéndose ΔG máis negativo cando máis favorable é a reacción.

Á súa vez, a enerxía libre de Gibbs depende de factores entálpicos (ΔH) e entrópicos (ΔS) segundo a expresión $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$, onde a entalpía é máis negativa cando máis calor se libera ao contorno nunha reacción, mentres a diferenza de entropía mide a variación na cantidade de microestados accesibles (“desorde”) nos que pode atoparse o sistema ao producirse a reacción, estando máis favorecidos por probabilidade aqueles estados da materia con máis microestados posibles (21). Así, pódense estudar os factores que inflúen no valor das constantes de equilibrio en base ao seu efecto sobre estes dous parámetros. (**Táboa 1**).

Táboa 1. Factores entálpicos e entrópicos que afectan á estabilidade termodinámica dos complexos.

Factores entálpicos	Factores entrópicos
<ul style="list-style-type: none"> - Forza de enlace. - Efectos na enerxía de estabilización do campo cristalino. - Repulsións estéricas e electrostáticas entre os ligandos. - Entalpía de desolvatación do ión e os ligandos na formación do complexo. - Efectos entálpicos da repulsión entre ligandos coordinados e non coordinados. - Neutralización de cargas por combinación de catións e anións. 	<ul style="list-style-type: none"> - Número e tamaño dos aneis quelatantes. - Liberdade de movemento do ión metálico e os ligandos en disolución (translación...). - Cambios de solvatación na formación do complexo. - Variacións de entropía nos ligandos non coordinados. - Efectos entrópicos da configuración dos ligandos no complexo.

Desde o punto de vista estrutural, están favorecidos os ligandos de menor tamaño debido a que producen menor tensión na competición polo espazo da esfera de coordinación. Os quelatos (ligandos con máis de unha posición de coordinación co metal) e, máis aínda, os macrociclos (ligandos que forman un anel pechado con máis de tres átomos dadores) forman complexos máis estables debido a factores entálpicos (menor enerxía de desolvatación, efectos indutivos,...) e fundamentalmente entrópicos (maior número de moléculas resultantes da formación do complexo), sempre que non se xeren grandes tensións estruturais (19).

Factores que favorecen a estabilidade dos complexos con contribucións dependentes do ión central e dos ligandos son o Principio de Pearson e a enerxía de estabilización do campo cristalino (EECC). O Principio de Pearson formula que os

metais brandos (de maior tamaño e menor estado de oxidación) teñen maior afinidade polos ligandos brandos (de maior tamaño e menos electronegativos), e os metais duros (nos que se incluíría o Mn^{2+}) polos ligandos duros (bases fortes, con átomos dadores como N, O ou F) (20).

Pola súa banda, a EECC débese, segundo o modelo da Teoría de Campo Cristalino, á diferenza de enerxía (Δ) entre orbitais d en función das direccións polas que se aproximan os ligandos, de maneira que nos complexos octaédricos os orbitais $d_{x^2-y^2}$ e d_{z^2} aumentan de enerxía mentres que d_{xy} , d_{xz} e d_{yz} se estabilizan con respecto a un hipotético campo esférico da mesma carga. Este desdoblamento varía en función do ligando (segundo a serie espectroquímica) e da natureza e estado de oxidación do ión central (22). Cada electrón presenta unha contribución á EECC directamente proporcional a Δ_{oct} . Esta contribución é negativa para os electróns situados nos orbitais de menor enerxía e é positiva e un 50% máis grande para os de maior enerxía. Canto máis negativa é a EECC máis estable é o complexo (23).

Agás excepcións, das que a única común é o $[Mn(CN)_6]^{4-}$, o Mn^{2+} forma complexos de alto spin: aqueles nos que a enerxía de desdoblamento non é superior á da repulsión entre os electróns dun mesmo par, de modo que os electróns semioocupan os orbitais de maior enerxía antes de ocupar os de menor enerxía. A serie de Irving-Williams reflicte que nos complexos de alto spin ao desprazarse cara a dereita na táboa periódica desde o Mn^{2+} a estabilidade termodinámica varía seguindo a orde $Mn^{2+} < Fe^{2+} < Co^{2+} < Ni^{2+} < Cu^{2+} > Zn^{2+}$. Isto débese a que o Mn^{2+} ten unha configuración d^5 , é dicir, unha EECC nula, e a continuación vaise facendo cada vez máis negativa ao incorporar electróns aos orbitais de menor enerxía. Esta tendencia invértese para o Cu^{2+} e o Zn^{2+} . Non obstante, o Cu^{2+} forma os complexos máis estables por efecto Jahn-Teller (19).

Outro factor que tamén contribúe neste sentido e afecta á estabilidade desde o punto de vista do ión central, é a relación entre carga e radio atómico (potencial iónico). O radio diminúe a medida que aumenta o número de protóns no núcleo atómico sen engadir novas capas de electróns. Así, para ións coa mesma carga, ao desprazarse cara a dereita nos metais de transición adoita aumentar o potencial iónico (23).

Se ben non se debe obviar que os factores cinéticos priman sobre os termodinámicos e que, a diferenza do gadolinio, o manganeso si é un oligoelemento natural do organismo, isto supón un desafío para o deseño de complexos estables de

Mn^{2+} , posto que outros ións metálicos endóxenos como o Cu^{2+} ou o Zn^{2+} poden competir polos ligandos formando complexos máis estables, e incluso o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , malia formaren complexos menos estables que o Mn^{2+} , poden tamén liberalo ao torrente sanguíneo ao atopárense en concentracións relativamente elevadas (2). A isto súmase que, con respecto ao Gd^{3+} , o Mn^{2+} non só forma complexos menos estables, senón tamén moito menos inertes (10).

III.OBXECTIVOS

Os modelos baseados en relacións cuantitativas entre estruturas e propiedades (QSPR polas súas siglas en inglés) asumen que a similitude nos parámetros estruturais que poidan afectar a unha propiedade dá lugar a unha similitude nas propiedades que presentan diferentes compostos (24). Aplicando este modelo mediante métodos computacionais, téñense obtido con éxito relacións entre constantes de equilibrio en complexos de Gd^{3+} e descritores estruturais dos ligandos (25,26). Estas relacións entre descritores estruturais e estabilidade termodinámica permiten predicir de forma aproximada a estabilidade de novos complexos que poidan ser descritos a partir dos parámetros contemplados.

Así, no presente traballo propóñense dous obxectivos diferenciados. Por unha banda, a realización dunha ampla procura bibliográfica de constantes de equilibrio para complexos de Mn^{2+} co gallo de obter unha expresión matemática que relacione a estrutura en 2D dos ligandos coa súa estabilidade termodinámica.

Por outra banda, os ligandos lineais con ciclobutano 1,2- ou 1,3-substituído a modo de espazador son obxecto de estudo para o desenvolvemento de axentes de contraste de Gd^{3+} e Mn^{2+} para IRM (27). O ciclobutano proporciona unha rixidez moi elevada ao ligando e os seus dous grupos amino ofrecen unha boa plasticidade para o deseño de ligandos configurados á vontade (28). A incorporación de elementos estruturais altamente constrictivos aos ligandos demostrou para o Gd^{3+} ser capaz de acadar elevadas estabilidades termodinámicas e inercias cinéticas equiparables ás dos complexos macrocíclicos (29).

En consecuencia, o segundo obxectivo que se propuxo para este traballo foi a síntese e caracterización de dous ligandos derivados do (1S,3S)-ciclobutano-1,3-diamina. Os ligandos sintetizados foron o ácido 2,2',2'',2'''-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis(azanotriil))tetraacético (**L1**) e o ácido 2,2'-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis((piridin-2-ilmetil)azanodiil))diacético (**L2**) (**Figura 3**). Tras completar a súa síntese, determináronse as constantes de estabilidade dos complexos de Mn^{2+} mediante métodos potenciométricos e espectrofotométricos co obxecto de valorar a idoneidade do espazador ciclobutano 1,3-substituído para a coordinación a este ión metálico.

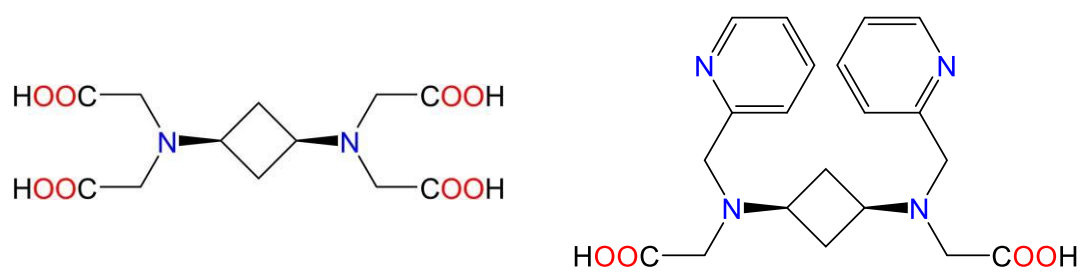


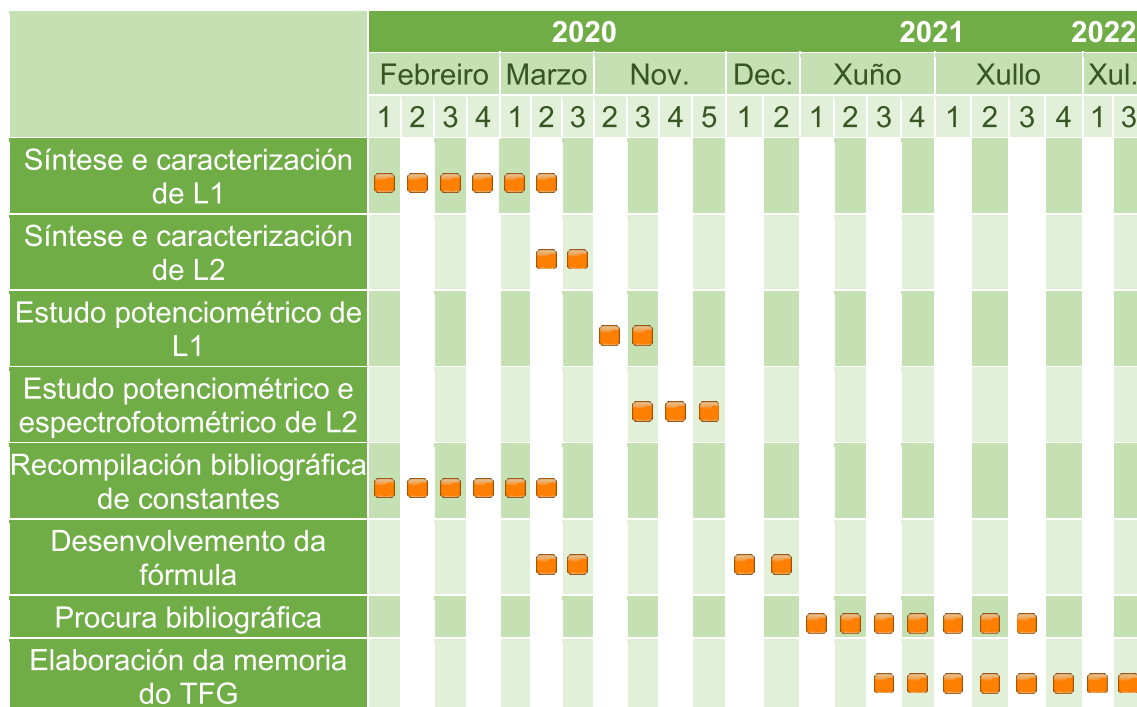
Figura 3. Estruturas dos ligandos sintetizados **L1** (esquerda) e **L2** (dereita).

IV. PROCEDEMENTO EXPERIMENTAL

IV.1. Plan de traballo

A continuación amósase a liña cronolóxica de actividades que se seguiu para o desenvolvemento do presente traballo (**Táboa 2**).

Táboa 2. Diagrama de Gantt das actividades seguidas para o desenvolvemento do TFG.



IV.2. Cálculo computacional

Para a obtención dunha expresión matemática que relacione as constantes de equilibrio dos complexos de Mn^{2+} coa estrutura dos ligandos, realizouse unha busca bibliográfica de constantes de equilibrio con condicións de temperatura e forza iónica especificadas a partir da que se recompilaron 281 datos de K_{MnL} . Estes datos foron cribados en función da posibilidade de extraer información útil deles: por exemplo, non interesa parametrizar unha gran cantidade de aminoácidos por establecer interaccións moi febles co Mn^{2+} inaplicables para IRM, nin parametrizar ligandos con descritores únicos, xa que a metodoloxía utilizada emprega a acumulación de datos para cada descriptor como método consistente de axuste da súa contribución.

Asignéronselles descritores aos ligandos en función dos motivos estruturais de interese tendo en conta que o número de grupos dadores que poden contribuir á

estabilidade do complexo está limitado polo número de coordinación do Mn^{2+} , habitualmente 6 ou 7, e excepcionalmente 8, e realizouse un axuste de mínimos cadrados non lineais co programa informático *MacromathScientist*, versión 2.0. Elimínouse unha certa cantidade de datos anómalos e repetiuse o cálculo, empregándose un total de 181 constantes de equilibrio para a expresión final.

IV.3. Equipos, axentes e solventes

Análise elemental

A análise elemental obtívose por combustión no analizador elemental ThermoQuest Flash EA 1112 localizado nos Servizos de Apoio á Investigación (SAI) da Universidade da Coruña.

Cromatografía líquida de presión media (MPLC)

Para a MPLC utilizouse un equipo Puriflash XS 420 con columna reversa Puriflash 15C18HP e detector UV situado no Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA) da Universidade da Coruña.

Espectroscopia infravermella

Os espectros de infravermello rexistráronse no espectrofotómetro FT-IR Nicolet iS 10 de Thermo Scientific, equipado con Thermo Scientific Smart iTR, localizado no Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA) da Universidade da Coruña.

Espectrometría de masas

Os espectros de masas de alta resolución rexistráronse mediante a técnica de ionización por electrospray (ESI) en modo positivo ou negativo baseados no tempo de voo (TOF) nun espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Discovery con HPLC de Thermo Accela, localizado nas instalacións dos Servizos de Apoio á Investigación (SAI).

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN 1H e RMN ^{13}C dos ligandos e intermediarios rexistráronse nun Bruker Avance III 300 situado no Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA), ou cos equipos Bruker Avance 400 e Bruker Avance 500 situados nos Servizos de Apoio á Investigación (SAI).

Espectroscopia electrónica de absorción (UV-Vis)

Os espectros de absorción no rango do UV-Vis rexistráronse nun espectrofotómetro Uvikon-XS (Bio-Tek Instruments) de dobre feixe, localizado na Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña.

Liofilización

As solucións acuosas foron liofilizadas nun equipo Biobase BK-FD10 Series situado no Centro de Investigacións Científicas Avanzadas (CICA) da Universidade da Coruña.

Axentes e solventes

Todos os reactivos e solventes empregados para a síntese dos ligandos foron adquiridos de Aldrich Chemical Co, a excepción do (1S,3S)-ciclobutano-1,3-diamina, comprado a abcr GmbH.

IV.4. Síntese de L1

Para a síntese de **L1**, pesáronse 0,2037 g de (1S,3S)-ciclobutano-1,3-diamina (1,2166 mmol) e 0,4205 g de K_2CO_3 (3,0427 mmol) e engadíronse a un matraz con 1,1 mL de tert-butil-2-bromoacetato (7,3 mmol), empregando 25 mL de CH_3CN como disolvente, co obxectivo de obter o intermedio tetra-tert-butil 2,2',2'',2'''-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis(azanotriil))tetra-acetato (**L1a**) (**Figura 4**). Tras 24 horas de reacción con axitación a temperatura ambiente obtívose unha disolución incolora cun precipitado branco en suspensión.

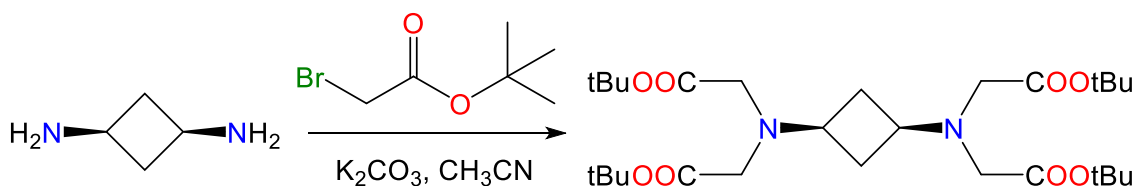


Figura 4. Esquema de reacción para a obtención do intermedio **L1a**.

Fíxose un seguimento da reacción mediante cromatografía de capa fina en alúmina comparando o (1S,3S)-ciclobutano-1,3-diamina (basificado con Et_3N para facilitar a disolución en $CHCl_3$) coa disolución de reacción, empregando como disolvente cromatográfico unha mestura 1:9 de $CHCl_3$:MeOH. Reveláronse as aminas co reactivo de Dragendorff. Apenas houbo retención nos dous casos e observouse a amina de partida de cor laranxa e a mestura de reacción incolora (aínda que deixando un rastro moi tenue no bordo), o cal é indicativo de que houbo reacción.

Extraéronse unhas gotas da disolución para espectrometría de masas de ESI positivo (**Anexo VIII.1**), obténdose os resultados ao cabo de 48 horas. Tamén se practicou espectrometría de masas de ESI negativo, con valores absolutos de intensidade moi reducidos indicativos de que non se formaron anións (**Anexo VIII.2**). Detívose a reacción e aprecíase que no transcurso desas 48 horas a mestura de

reacción pasou de incolora a amarelo limón. Filtrouse a mestura de reacción, concentrouse en rotavapor, fixéronse 3 extraccións con $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ en proporción 3:1 (v:v) e eliminouse a auga residual da fase orgánica con Na_2SO_4 . Tras filtrar e concentrar no rotavapor obtívose un aceite ámbar claro e pouco viscoso. Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e RMN ^{13}C DEPT (*melloramento sen distorsión por transferencia de polarización*, polas siglas en inglés) sinalan un exceso de tBu e $-\text{CH}_2-$, indicio de tert-butil-2-bromoacetato sobranste.

O produto purificouse mediante MPLC en fase normal con columna de alúmina neutral de 40-60 μm de tamaño de partícula e fase móbil variable desde CH_2Cl_2 ata $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ 90:10 (v:v). Fíxose seguimento da cromatografía detectando a dispersión da luz como absorción no UV-Vis ($\lambda = 200\text{-}400\text{ nm}$). A partir dos espectros de RMN ^1H seleccionáronse as fraccións que contiñan exclusivamente o produto de interese, leváronse a sequidade, quedando un precipitado de cor abrancazada, e caracterizouse o produto (0,1862 g; 0,34 mmol; rendemento: 28%).

Espectrometría de masas (ESI⁺): m/z (I%): 543,3625 (100) $[\text{C}_{28}\text{H}_{51}\text{N}_2\text{O}_8]^+$. **Espectroscopia de infravermello** (ATR, $\bar{\nu}$ [cm^{-1}]): 1738; 1713 $\nu(\text{C}=\text{O})$. **RMN ^1H** (500 MHz, CDCl_3) δ 3,41 (s, 8H); 2,30 – 2,18 (m, 2H); 1,76 (b, 4H); 1,44 (s, 36H). **RMN ^{13}C** (101 MHz, CDCl_3) δ 170,8; 81,0; 52,4; 50,3; 34,0; 28,3 (*Anexo VIII.3*).

A continuación procedeuse a hidrolizar **L1a** para obter o produto **L1**. Deixouse reaccionar durante 3 horas en 30 mL de $\text{HCOOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v:v) a 80 °C en montaxe de refluxo (**Figura 5**).

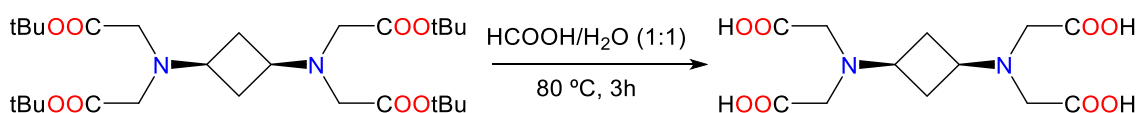


Figura 5. Esquema de reacción para a obtención do ligando **L1**.

A mestura de reacción adquiriu un aspecto turbio. Lavouse con auga varias veces para eliminar o ácido fórmico e liofilizouse, quedando un sólido branco e laminado (0,1709 g; 0,34 mmol; rendemento: 99%).

Análise elemental: 41,94% C; 5,45% H; 8,03% N. Os valores calculados para $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O} \cdot 0,75\text{HCOOH}$ son 42,33% C; 5,71% H; 7,74% N. **Espectrometría de masas** (ESI⁻): m/z (I%): 317,0990 (100) $[\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_8]^-$. **Espectroscopia de infravermello** (ATR, $\bar{\nu}$ [cm^{-1}]): 1731; 1626 $\nu(\text{C}=\text{O})$. **RMN ^1H** (500 MHz, D_2O , pH 1,70) δ

3,95 (s, 8H); 3,87 (t, $^3J = 8,1$ Hz, 2H); 2,78-2,72 (m, 4H). **RMN ^{13}C** (126 MHz, D_2O , pH 1,70) δ 169,1; 54,2; 52,3; 29,8 (Anexo VIII.4).

IV.5. Síntese de L2

Para a síntese de **L2**, pesáronse 0,2007 g de (1S,3S)-ciclobutano-1,3-diamina (1,26 mmol) e, para disolvelo en 3,6 mL de MeOH, basificouse con 0,462 mL de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) (2,65 mmol). Esta solución engadiuse por goteo mediante unha montaxe de refluxo a un matraz de fondo redondo con 11 mL de MeOH e 0,240 mL de picolinaldehído (2,52 mmol). A adición durou 2 horas e ao rematar apreciouse que a mestura de reacción pasou dunha cor marrón alaranxada a marrón escuro.

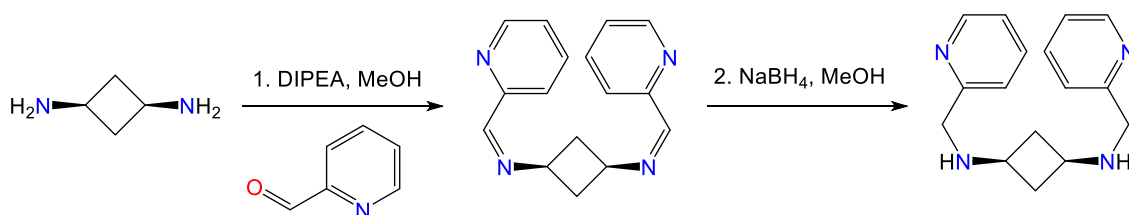


Figura 6. Esquema de reacción para a obtención do intermedio **L2a**.

Unha vez arrefriada, e co matraz nun baño de xeo, engadíronse aos poucos 0,0576 g de $NaBH_4$ e, tras observarse que non todo o produto quedou retido en cromatografía de capa fina en alúmina con $MeOH:CH_2Cl_2$ 1:10 (v:v), engadíronse outros 0,0311 g de $NaBH_4$ (2,34 mmol en total), apreciándose nas dúas adicións unha tenue formación de burbullas (Figura 6). Ao evaporarse o disolvente, observouse que como resultado da reacción se obtivo un sólido branco (previsiblemente compostos borados) e outro vermello escuro. Separáronse os boratos resultantes do intermedio de interese (1S,3S)-N1,N3-bis(picolin-2-ilmetil)ciclobutano-1,3-diamina (**L2a**) mediante decantación, empregando 50 mL dunha disolución de KOH (pH = 10,7) como fase acuosa e 30 mL de $CHCl_3$ como fase orgánica, observándose que a inferior (orgánica) adquiría unha tonalidade vermella. Tras eliminar a auga residual da fase orgánica con $NaSO_4$, filtrar e eliminar o disolvente obtívose un sólido marrón (0,2183 g; 0,81 mmol; rendemento: 64%). Ao disolver o produto en $CHCl_3$ e practicar unha cromatografía de capa fina de alúmina con $CH_2Cl_2:MeOH$ 95:5 (v:v) como eluínate, observouse unha longa cola, que podería estar relacionada con impurezas.

Espectrometría de masas (ESI⁺): m/z (I%): 269,1756 (24,81) [$C_{16}H_{21}N_4$]⁺. **RMN 1H** (300 MHz, $CDCl_3$) δ 8,52 (d, $^3J = 3,0$ Hz, 2H); 7,60 (td, $^4J = 1,8$ Hz, $^3J = 7,7$ Hz, 2H); 7,30 – 7,21 (m, 2H); 7,16 – 7,07 (m, 2H); 3,80 (s, 4H); 3,06 – 2,89 (m, 2H);

2,63 – 2,46 (m, 2H); 2,11 (b, 2H); 1,54 – 1,34 (m, 2H). **RMN ¹³C** (75,5 MHz, CDCl₃) δ 159,9; 149,4; 136,6; 122,4; 122,0; 52,9; 47,2; 39,4 (*Anexo VIII.5*).

Para a síntese do intermedio di-tert-butil 2,2'-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis((piridin-2-ilmetil)azanodiil))diacetato (**L2b**) (**Figura 7**), engadiuse por goteo en atmosfera inerte de argon unha solución de tert-butil-2-bromoacetato (0,3173 g; 1,63 mmol) en 5 mL de CH₃CN seco a unha solución que contiña o intermedio **L2a** obtido na etapa anterior e 0,5621 g de K₂CO₃ (4,07 mmol) en 20 mL de CH₃CN. Deixouse reaccionar ata o día seguinte axitando a temperatura ambiente. De novo, observouse unha cola longa ao practicar unha cromatografía nas mesmas condicións. Filtrouse o carbonato e concentrouse a sequidade, obténdose un aceite marrón escuro. En espectrometría de masas de ESI positivo non se observaron restos de **L1a** e obtívose un espectro de RMN ¹³C cos sinais de interese claros.

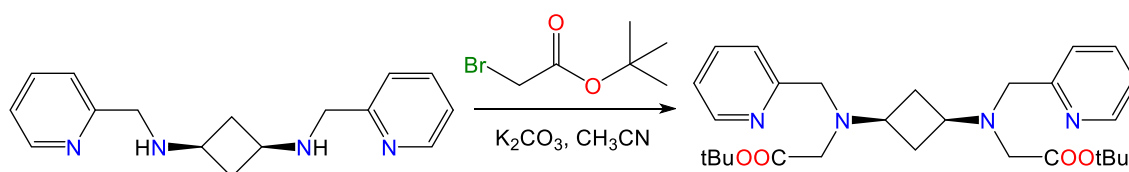


Figura 7. Esquema de reacción para a obtención do intermedio **L2b**.

Espectrometría de masas (ESI⁺): *m/z* (I%): 497,3114 (100) [C₂₈H₄₁N₄O₄]⁺. **RMN ¹H** (400 MHz, CDCl₃) δ 8,52 – 8,49 (m, 2H); 7,62 (td, ⁴J = 1,8 Hz, ³J = 7,6 Hz, 2H); 7,49 (d, ³J = 7,8 Hz, 2H); 7,14 – 7,09 (m, 2H); 3,87 (s, 4H); 3,20 (s, 4H); 3,17 – 3,10 (m, 2H); 2,25 – 2,15 (m, 2H), 1,74 – 1,64 (m, 2H); 1,43 (s, 18H). **RMN ¹³C** (101 MHz, CDCl₃) δ 170,8; 159,9; 149,1; 136,5; 123,4; 122,0; 81,0; 57,2; 52,7; 50,9; 34,3; 23,3 (*Anexo VIII.6*).

A continuación procedeuse a hidrolizar **L2b** para obter o ligando **L2** (**Figura 8**). Para este propósito, deixouse reaccionar durante 24 horas en 40 mL de HCOOH:H₂O 1:1 (v:v) a 80 °C en montaxe de refluxo. Lavouse con auga varias veces para eliminar o ácido fórmico, purificouse o produto por MPLC en fase reversa (C18AQ – 6 g) (H₂O:CH₃CN) e liofilizouse. O produto tiña o aspecto dun sólido marrón (0,1417 g; 0,37 mmol; rendemento: 45%).

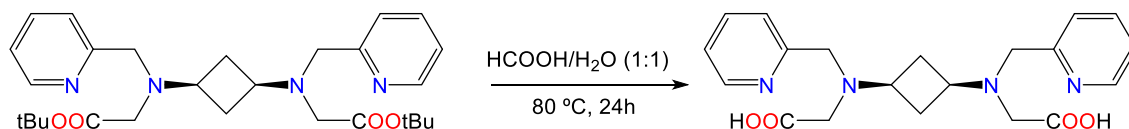


Figura 8. Esquema de reacción para a obtención do ligando **L2**.

Espectrometría de masas (ESI⁻): *m/z* (I%): 383,1725 (100) [C₂₀H₂₃N₄O₄]⁻. **Espectroscopia de infravermello (ATR, $\bar{\nu}$ [cm⁻¹]):** 1716 *v*(C=O); 1623 e 1591 *v*(C=N)/

$\nu(\text{C}=\text{C})$. **RMN ^1H** (500 MHz, D_2O , pH 4,33) δ 8,61 (d, $^3\text{J} = 5,1$ Hz, 2H); 8,07 (td, $^4\text{J} = 1,7$ Hz, $^3\text{J} = 7,8$ Hz, 2H); 7,66 – 7,61 (m, 4H); 4,40 (s, 4H); 3,71 – 3,63 (m, 2H); 3,58 (s, 4H); 2,52 – 2,44 (m, 2H); 2,21 – 2,13 (m, 2H). **RMN ^{13}C** (126 MHz, D_2O , pH 4,33) δ 172,3; 150,5; 147,0; 140,9; 125,8; 125,3; 56,4; 54,3; 51,8; 31,3 (Anexo VIII.7).

IV.6. Estudo potenciométrico

Leváronse a cabo valoracións potenciométricas nunha cela de dobre parede a través da que se fixo circular auga a 25 °C. O interior da cela homoxeneizouse cunha barra magnética e empregouse unha bureta automática Crison microBu 2030 cunha xiringa de 2,5 mL para engadir valorante. A diferenza de potencial, E , rexistrouse empregando un pH-metro Crison micropH 2000 conectado a un eléctrodo de vidro (Radiometer pH2G211) e un eléctrodo de referencia (Radiometer REF201). Axustouse a forza iónica, I , de todas as disolucións utilizadas con NaCl a $I = 0,15$ M.

Para poder determinar a concentración de protón en cada punto das valoracións potenciométricas cómpre levar a cabo un calibrado do sistema electródico. Para iso mídese a diferenza de potencial, E , de disolucións de concentración de protóns coñecida, $[\text{H}^+]$, xa que ambas cantidades se relacionan mediante a ecuación de Nernst ($E = E^0 + s \log [\text{H}^+]$) e así poden determinarse o potencial formal, E^0 , e a pendente, s . Con estes parámetros e a diferenza de potencial dunha disolución calquera pódese determinar a concentración de protóns desa disolución sempre que I e T se manteñan.

Para o calibrado valorouse HPO_4^{2-} con HCl, dado que se coñecen as constantes do ácido fosfórico. Así, calcúlanse as concentracións de protón e obtéñense os parámetros de calibrado (30).

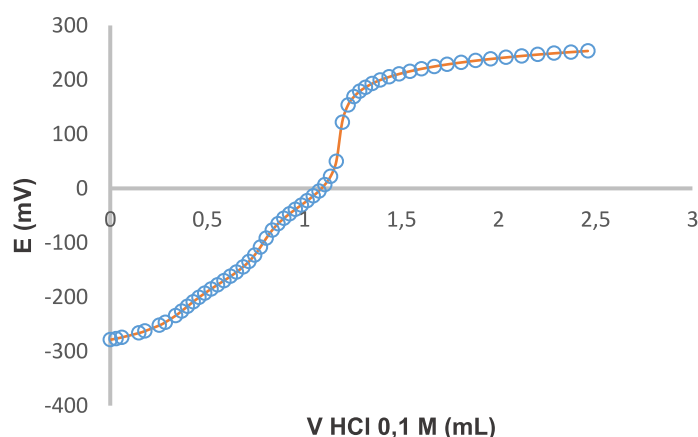


Figura 9. Valoración potenciométrica de $4,06 \cdot 10^{-5}$ mol L1 con HCl 0,1 M partindo de medio básico e dun volumen de 12,1 mL. $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C.

Para a determinación das constantes de protonación de **L1** realizouse unha valoración con NaOH do ligando en medio ácido, e dúas con HCl do ligando en medio basificado con NaOH (exemplo na **Figura 9**). No caso de **L2** fíxose unha única valoración con HCl. Para a determinación das constantes de complexación engadiuse a relación estequiométrica de Mn^{2+} ao ligando en medio ácido a fin de evitar a formación de precipitados como o $\text{Mn}(\text{OH})_2$ e valorouse con NaOH. O diagrama de Pourbaix que se amosa na **Figura 10** indica que o catión Mn^{2+} é moderadamente ácido, precipitando en forma de hidróxido a pH próximo a 7. Dada a insolubilidade do hidróxido, as valoracións de pH realizadas na presenza de Mn^{2+} non poden comezar a pH básico. Este proceso levouse a cabo dúas veces para **MnL1** e unha para **MnL2**. As valoracións tardaron en completarse entre 1 hora e 2,5 horas, acadándose o equilibrio de **L1** e **L2** en poucos segundos tras a adición de valorante.

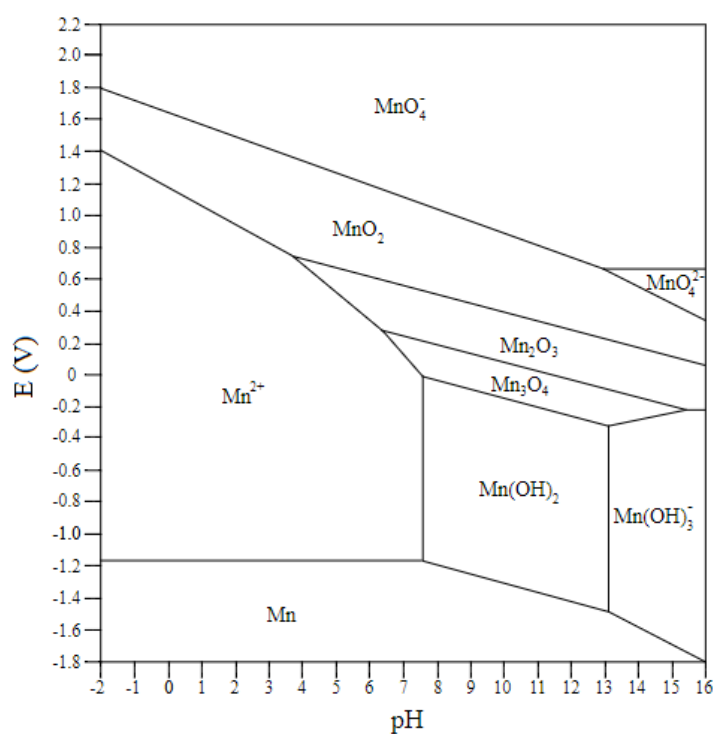


Figura 10. Diagrama de Pourbaix do Mn a 25 °C.

Dado que a partir da análise elemental se puido determinar a presenza de ácido fórmico no produto, valorouse o ácido fórmico co obxectivo de incluílo como un pK coñecido no cálculo das constantes. A partir das valoracións potenciométricas e usando os parámetros de calibrado determináronse as constantes empregando o programa *Hyperquad* (31).

IV.7. Estudo espectrofotométrico

Dada a absorbencia no espectro UV-Vis que lle confiren os aneis aromáticos a **L2**, as constantes de protonación de **L2** e de complexación de **MnL2** foron tamén determinadas mediante o método espectrofotométrico, o que permite comparar valores co método potenciométrico. A forza iónica axustouse a $I = 0,15$ M con NaCl. As medidas tomáronse a 25 °C nun espectrofotómetro Uvikon-XS (Bio-Tek Instruments) de dobre feixe, seleccionándose o rango de 230 a 290 nm de lonxitude de onda como o intervalo de traballo.

Para iso, preparáronse cubetas de cuarzo con paso óptico de 1 cm con **L2** a distintos pH a partir da adición de HCl ou da preparación de tampóns acético/acetato, fosfato/hidroxenofosfato, hidroxenofosfato/dihidroxenofosfato, bórax/ácido clorhídrico ou bórax/hidróxido sódico. Deste xeito rexistráronse os espectros de absorbencia a 42 pH diferentes no intervalo 1,6 a 9,3. O tratamento dos datos fíxose co software *HySS* (32).

Para a determinación da constante de complexación preparáronse 17 cubetas con **L2**, Mn e tampón acético/acetato a distintos pH no intervalo 3,3 a 6,9, posto que en medio moi ácido os protóns compiten co Mn polo ligando facendo desprezable a cantidade de complexo que se forma e en medio moi básico o equilibrio desprázase no sentido oposto cara a formación completa de **MnL2**. En todos os casos agardouse varios minutos para tomar as medidas para que se acadase o equilibrio.

V.RESULTADOS E DISCUSIÓN

V.1 Contribución dos motivos estruturais dos ligandos á estabilidade dos complexos de Mn(II)

Para o cálculo computacional dunha expresión matemática que relacione o equilibrio dos complexos de Mn^{2+} coa estrutura dos ligandos, estes foron parametrizados de acordo con descritores estruturais correspondentes cos grupos dadores de carga que puidesen coordinar co centro metálico.

Táboa 3. Significado das abreviaturas para os descritores estruturais empregados no presente traballo.

Abreviatura	Significado
NR ₂	nitróxeno dador non macrocíclico
AH ₂	- CH ₂ - Amida primaria
ARH	- CH ₂ - Amida secundaria
AR ₂	- CH ₂ - Amida terciaria
OH	hidroxilo
Phe	2-metilfenol
PheNO ₂	2-metil-4-nitrofenol
PheOMe	2-metil-4-metoxifenol
C	- CH ₂ - COOH
C _α	- CRH - COOH (monosubstituído en alfa)
Pho	metilfosfonato
Phosphi	metilfosfinato
Pic	ácido 2-picolínico
Py	2-metilpiridina
Sulph	etilsulfonamida
Alken*	espazador etilo alquilado nun carbono
Prop*	espazador etilo substituído por propilo
But*	espazador etilo substituído por ciclobutilo
Cy*	espazador etilo substituído por ciclohexilo
NR ₂ O*	osíxeno dador en substitución dun nitróxeno macrocíclico
An*	o nitróxeno dador forma parte dun grupo anilina
NPY*	o nitróxeno dador forma parte dun anel de piridina
Amd*	substitución dun nitróxeno amínico por un nitróxeno amídico nun macrociclo
Im*	substitución dun nitróxeno amínico por un nitróxeno imínico nun macrociclo

Nos datos recadados incluíronse constantes de catro familias de macrociclos: os pentaazamacrociclos derivados do 15-ane-N5 (1,4,7,10,13-pentaazaciclopentadecano), os tetraazamacrociclos derivados do ciclono (1,4,7,10-tetraazaciclododecano), os triazamacrociclos derivados do TACN (1,4,7-triazaciclononano) e os pseudomacrociclos da familia de AAZ (6-amino-6-metilperhidro-1,4-diazepina). Empregáronse, respectivamente, as abreviaturas A₉, A₁₂, A₁₅ e A_{AAZ} para as contribucións á estabilidade dos complexos de Mn^{2+} ponderadas. Na **Táboa 3** recóllense as abreviaturas dos descritores estruturais empregados. Aqueles indicados con asterisco correspóndense con modificacións sobre as estruturas definidas a partir dos descritores previos, isto é, se nun ligando derivado do ciclono un dos N dadores foi substituído por un O, empregáronse os descritores A₁₂ e

NR₂O, e de maneira equivalente para os ligandos non macrocíclicos os descritores 3 NR₂ e NR₂O indican que o ligando presenta dous N dadores e un O dador en substitución do terceiro N.

Deste xeito, empregouse o programa informático *MacromathScientist* para calcular as constantes que permitan predicir a estabilidade dos complexos de Mn²⁺ segundo a expresión matemática seguinte:

$$\log K_{MnL} = \sum_i n_i \cdot \Delta \log K_i + A_{MnL},$$

Onde n_i indica o número de repeticións dun motivo ou modificación estrutural e K_i a constante asociada ao motivo ou modificación calculada polo programa informático *MacromathScientist*. O segundo termo, A_{MnL} , correspóndese coa constante asociada ao macrociclo se é o caso.

V.1.1 Mesociclos derivados de AAZ

Os mesociclos derivados de AAZ teñen sido amplamente investigados polo seu potencial uso para IRM como complexos de Gd³⁺. No presente traballo recadáronse datos de estabilidade termodinámica con Mn²⁺ para os seguintes ligandos (**Figura 11**).

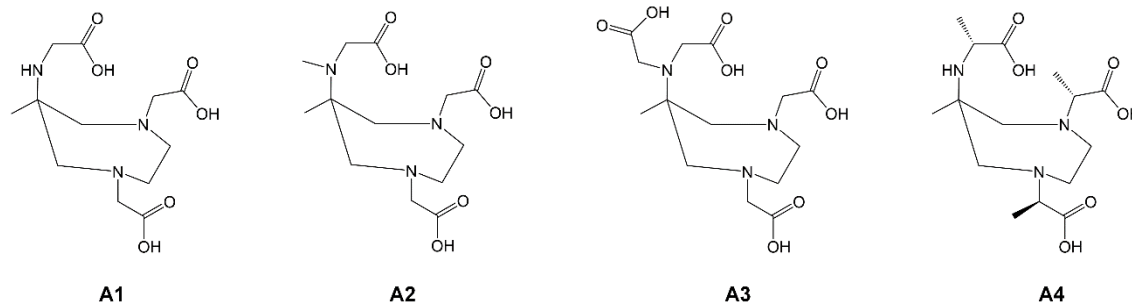


Figura 11. Estructuras dos ligandos derivados de AAZ (**A1-A4**) empregados para o cálculo computacional.

O ligando heptadentado **A3** presenta unha elevada estabilidade (**Táboa 4**), namentres que os restantes, hexadentados, presentan valores máis baixos, se ben resulta de interese que o Mn adoita presentar números de coordinación 6 ou 7 e estes ligandos deixan unha posición libre para a coordinación do Mn²⁺ cunha molécula de auga, o cal podería ter utilidade en IRM (33).

Táboa 4. Descritores e estabilidade bibliográfica ($\log K_{MnL} \text{ exp}$) e calculadas por *MacroMathScientist* ($\log K_{MnL} \text{ calc}$) para os ligandos derivados de AAZ (**A1-A4**).

Ligando	Descritores	Ref.	$\log K_{MnL} \text{ exp}$	$\log K_{MnL} \text{ calc}$
A1	AAAZ + 3 C	(33)	11	11,42
A2	AAAZ + 3 C	(33)	11,43	11,42
A3	AAAZ + 4 C	(33)	14,19	14,03
A4	AAAZ + 3 C _α	(33)	10,67	10,41

V.1.2 Macrociclos derivados de TACN

Recadáronse datos de estabilidade de 14 ligandos da familia dos triazamacrociclos derivados de TACN, nos que unha modificación estrutural habitual é a substitución dun átomo de N por un O dador (**Figura 12**).

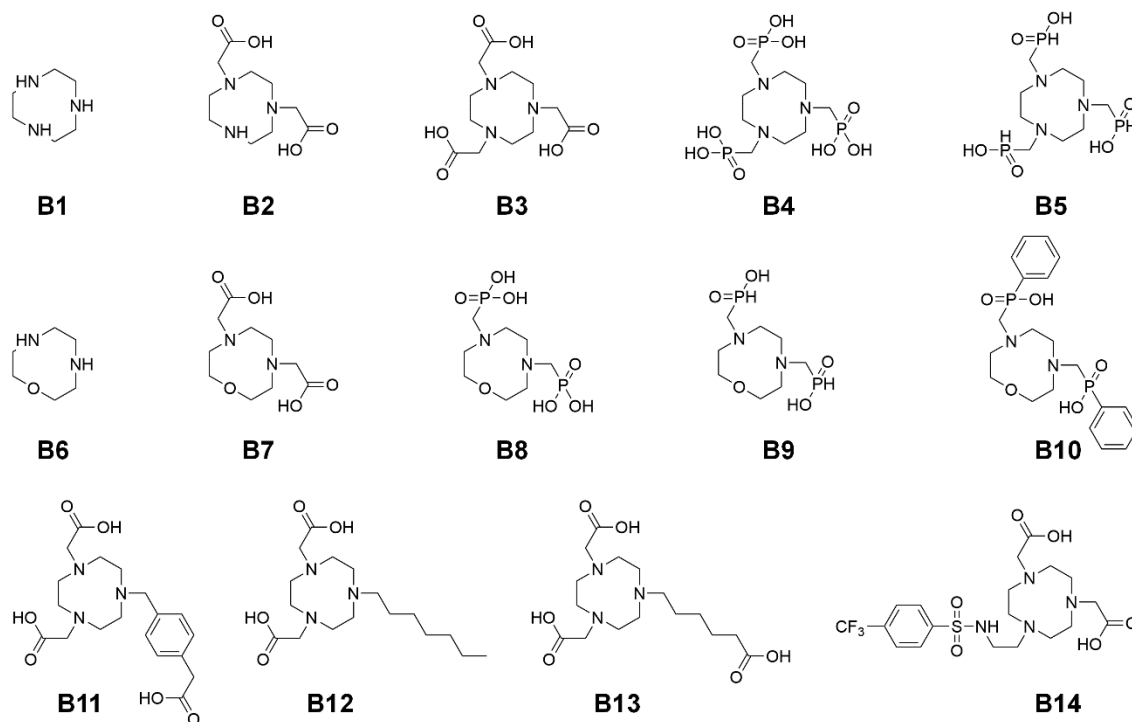


Figura 12. Estructuras dos ligandos derivados de TACN (**B1-B14**) empregados para o cálculo computacional.

Se ben os motivos estruturais engadidos aos macrociclos poden acadar valores altos de estabilidade, coma no caso de **B3** (**Táboa 5**), debe considerarse que esta familia presenta unha limitación para a súa estabilidade. De forma xeral pode establecerse que a maior número de átomos dadores que poidan coordinar co Mn^{2+} , maior será a estabilidade, pero os complexos derivados destes ligandos non sobrepasan o índice de coordinación 6.

Táboa 5. Descritores e estabilidade bibliográfica ($\log K_{MnL}$ exp) e calculadas por *MacroMathScientist* ($\log K_{MnL}$ calc) para os ligandos derivados de TACN (**B1-B14**).

Ligando	Descritores	Ref.	$\log K_{MnL}$ exp	$\log K_{MnL}$ calc
B1	A_9	(34)	5,8	6,44
B2	$A_9 + 2 C$	(35)	11,56	11,64
B3	$A_9 + 3 C$	(36)	14,9	14,25
		(37)	16,3	14,25
		(37)	14,3	14,25
		(38)	14,3	14,25
		(39)	15,6	14,25
B4	$A_9 + 3 Pho$	(40)	16,6	14,50
B5	$A_9 + 3 Phosphi$	(41)	5,32	6,18
B6	$A_9 + NR_2O$	(42)	3	4,08

B7	$A_9 + NR_2O + 2 C$	(42)	7,73	9,29
		(43)	7,43	9,29
B8	$A_9 + NR_2O + 2 Pho$	(43)	10,61	9,45
B9	$A_9 + NR_2O + 2 Phosphi$	(43)	4,3	3,91
B10	$A_9 + NR_2O + 2 Phosphi$	(43)	4,82	3,91
B11	$A_9 + 2 C$	(44)	9,9	11,64
B12	$A_9 + 2 C$	(44)	10,98	11,64
B13	$A_9 + 2 C$	(44)	10,15	11,64
B14	$A_9 + 2 C + Sulph$	(39)	15,29	14,68

V.1.3 Macrociclos derivados de cicleno

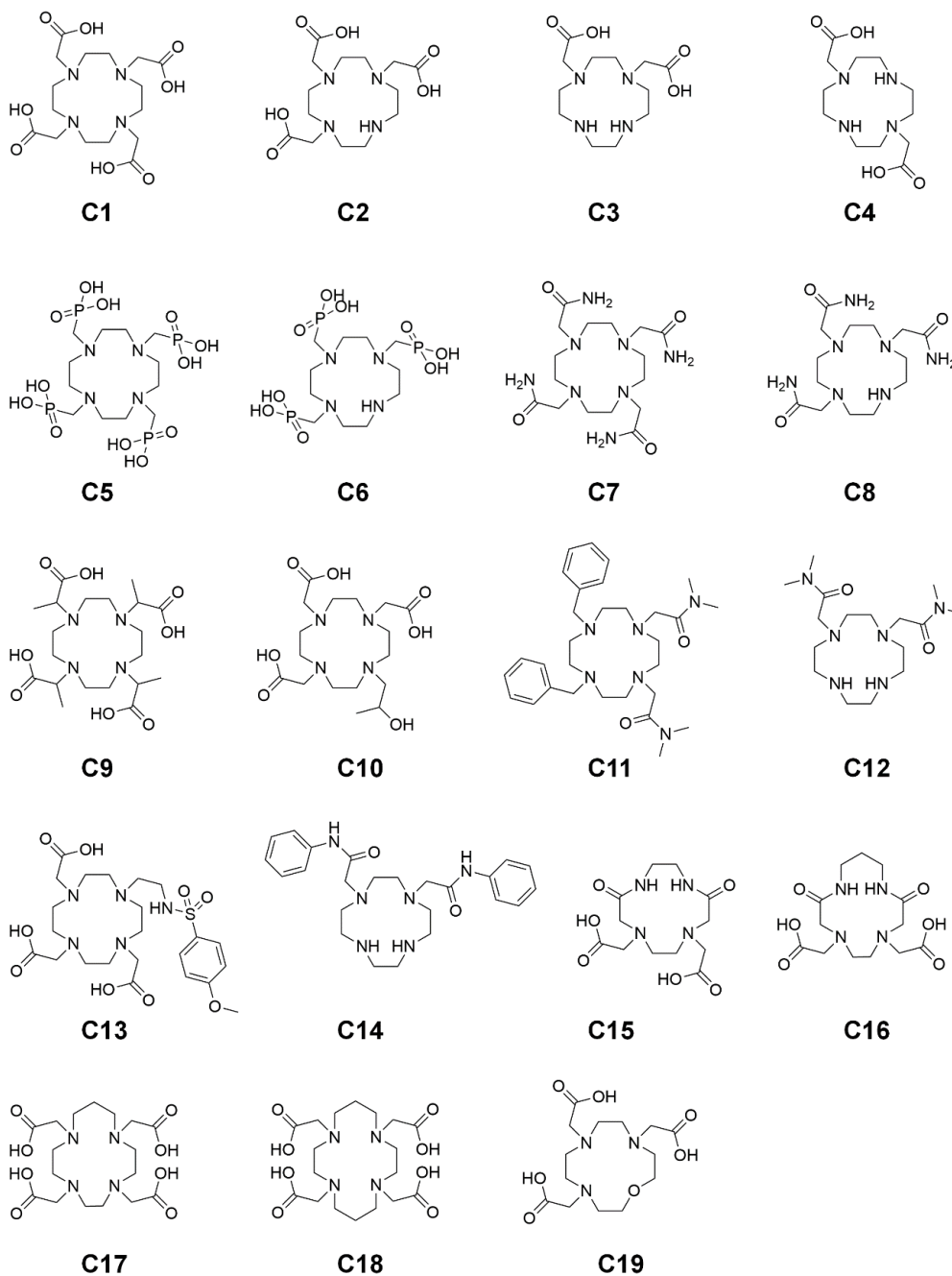


Figura 13. Estructuras de algúns ligandos derivados do cicleno (**C1-C19**) empregados para o cálculo computacional.

Os tetraazamacrociclos son o grupo de macrociclos máis estudados como ligandos para o Mn^{2+} , recadándose constantes de estabilidade de 32 estruturas diferentes (**Figura 13**).

Unha das variacións estruturais máis frecuentes é a substitución dun dos nitróxenos do anel por un nitróxeno piridínico (**Figura 14**), o que conforma a familia dos derivados concretamente de pyclen (**C20**).

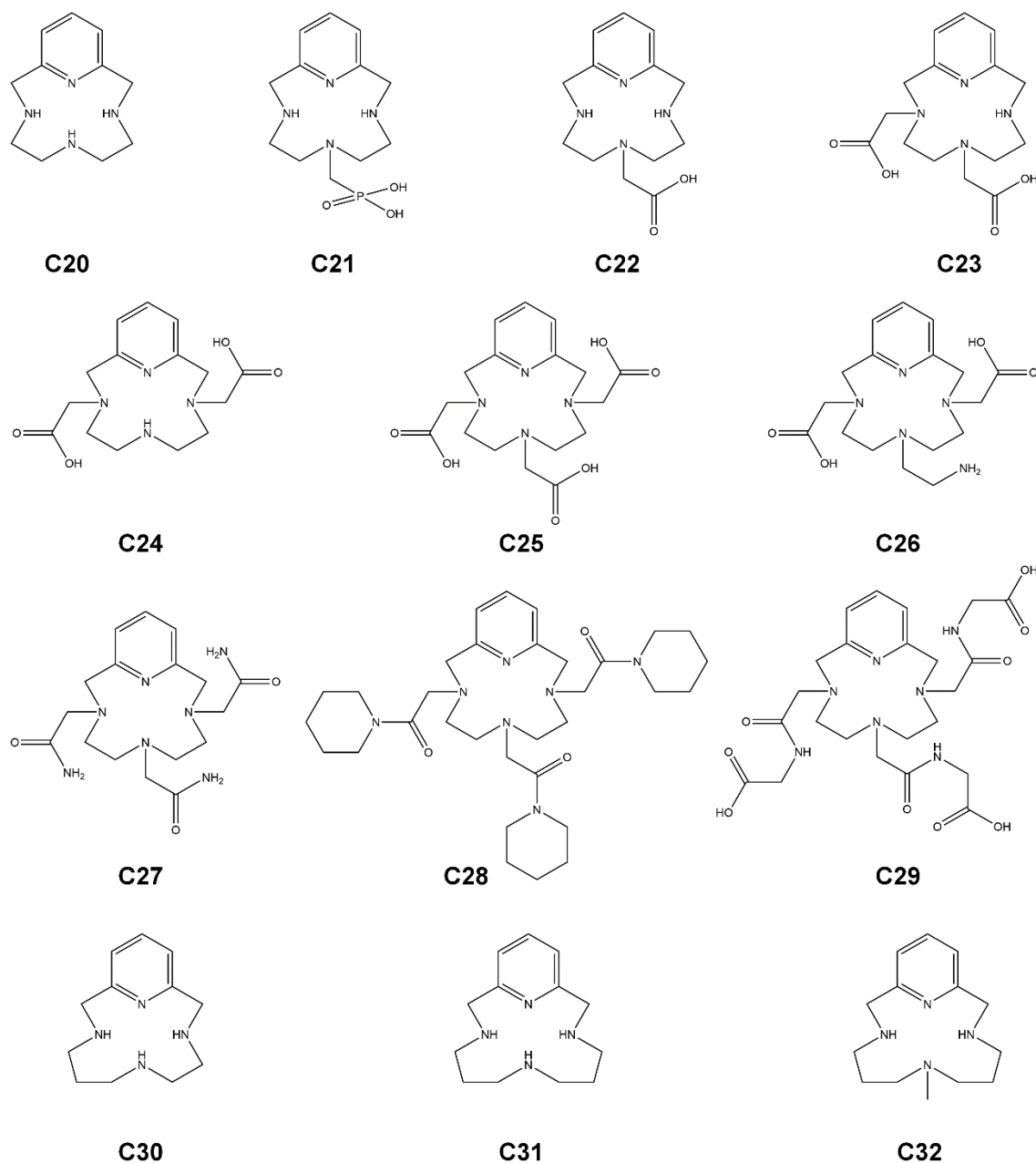


Figura 14. Estructuras dalgúns ligandos derivados do cicleno (**C20-C32**) empregados para o cálculo computacional.

Se ben esta substitución pode incrementar lixeiramente a estabilidade (**Táboa 6**), debe considerarse que ese N non admite a adición doutros motivos estruturais, como os ácidos carboxílicos que outorgan a **C1** unha das estabilidadeas máis elevadas atopadas na bibliografía, o que suxire que o Mn^{2+} pode estar coordinando con todos os nitróxenos do anel e máis cos catro brazos carboxílicos, adoptando un índice de coordinación 8. Recentemente atopouse evidencia experimental de que, polo menos no estado sólido, o complexo de **C1** é efectivamente octacoordinado (45).

Táboa 6. Descritores e estabilidadeas bibliográficas ($\log K_{MnL}$ exp) e calculadas por *MacroMathScientist* ($\log K_{MnL}$ calc) para os ligandos derivados de cicleno (**C1-C32**).

Ligando	Descritores	Ref.	$\log K_{MnL}$ exp	$\log K_{MnL}$ calc
C1	$A_{12} + 4 C$	(46)	19,44	20,29
		(46)	19,44	20,29
		(47)	19,89	20,29
		(48)	19,33	20,29
		(49)	20,202	20,29
C2	$A_{12} + 3 C$	(46)	19,43	17,68
		(47)	19,4	17,68
		(48)	19,34	17,68
C3	$A_{12} + 2 C$	(50)	15,68	15,08
		(50)	15,22	15,08
		(47)	16,13	15,08
C4	$A_{12} + 2 C$	(51)	14,66	15,08
		(50)	14,64	15,08
		(50)	15,07	15,08
		(47)	14,54	15,08
C5	$A_{12} + 4 Pho$	(52)	18,98	20,62
C6	$A_{12} + 3 Pho$	(52)	17,45	17,93
C7	$A_{12} + 4 AH_2$	(52)	11,96	11,66
C8	$A_{12} + 3 AH_2$	(52)	11,69	11,21
C9	$A_{12} + 4 C_\alpha$	(52)	18,37	18,94
C10	$A_{12} + 3 C + OH$	(47)	17,89	17,95
C11	$A_{12} + 2 AR_2$	(53)	11,54	11,97
C12	$A_{12} + 2 AR_2$	(54)	10,72	11,97
		(48)	12,64	11,97
C13	$A_{12} + 3 C_\alpha + Sulph$	(46)	20,1	19,70
C14	$A_{12} + 2 ARH$	(55)	10,72	11,50
C15	$A_{12} + 2 C + 2Amd$	(56)	5,07	6,67
C16	$A_{12} + 2 C + 2Amd + Prop$	(56)	5,1	3,50
C17	$A_{12} + 4 C + Prop$	(49)	16,74	17,12
C18	$A_{12} + 4 C + 2 Prop$	(49)	11,272	13,95
C19	$A_{12} + 3 C + NR_2O$	(57)	16,09	15,33
		(52)	13,88	15,33
C20	$A_{12} + NPy$	(58)	8,81	10,24
C21	$A_{12} + NPy + Pho$	(59)	14,06	12,93
C22	$A_{12} + NPy + C$	(59)	11,54	12,84
C23	$A_{12} + NPy + 2 C$	(60)	15,53	15,45
C24	$A_{12} + NPy + 2 C$	(60)	17,09	15,45
C25	$A_{12} + NPy + 3 C$	(61)	18,59	18,05
		(52)	16,83	18,05
C26	$A_{12} + NPy + 2 C + NR_2$	(46)	16,64	18,05
		(62)	19,01	16,77
C27	$A_{12} + NPy + 3 AH_2$	(52)	11,94	11,58
		(46)	11,78	11,58
C28	$A_{12} + NPy + 3 AR_2$	(52)	14,05	13,38
C29	$A_{12} + NPy + 3 ARH$	(52)	13,2	12,68
C30	$A_{12} + NPy + Prop$	(58)	7,29	7,07
C31	$A_{12} + NPy + 2 Prop$	(58)	5,477	3,90
C32	$A_{12} + NPy + 2 Prop$	(58)	3,7	3,90

V.1.4 Macrociclos derivados de 15-ane-N5

Os macrociclos derivados de 15-ane-N5 favorecen a formación de complexos heptacoordinados con Mn^{2+} , o que resulta nunha esfera de coordinación en forma de bipirámide pentagonal na que os nitróxenos do macrociclo se dispoñen no plano ecuatorial, quedando as dúas posicións perpendiculares libres (63). Na **Figura 15** reproducense as estruturas dos 17 ligandos empregados no cálculo.

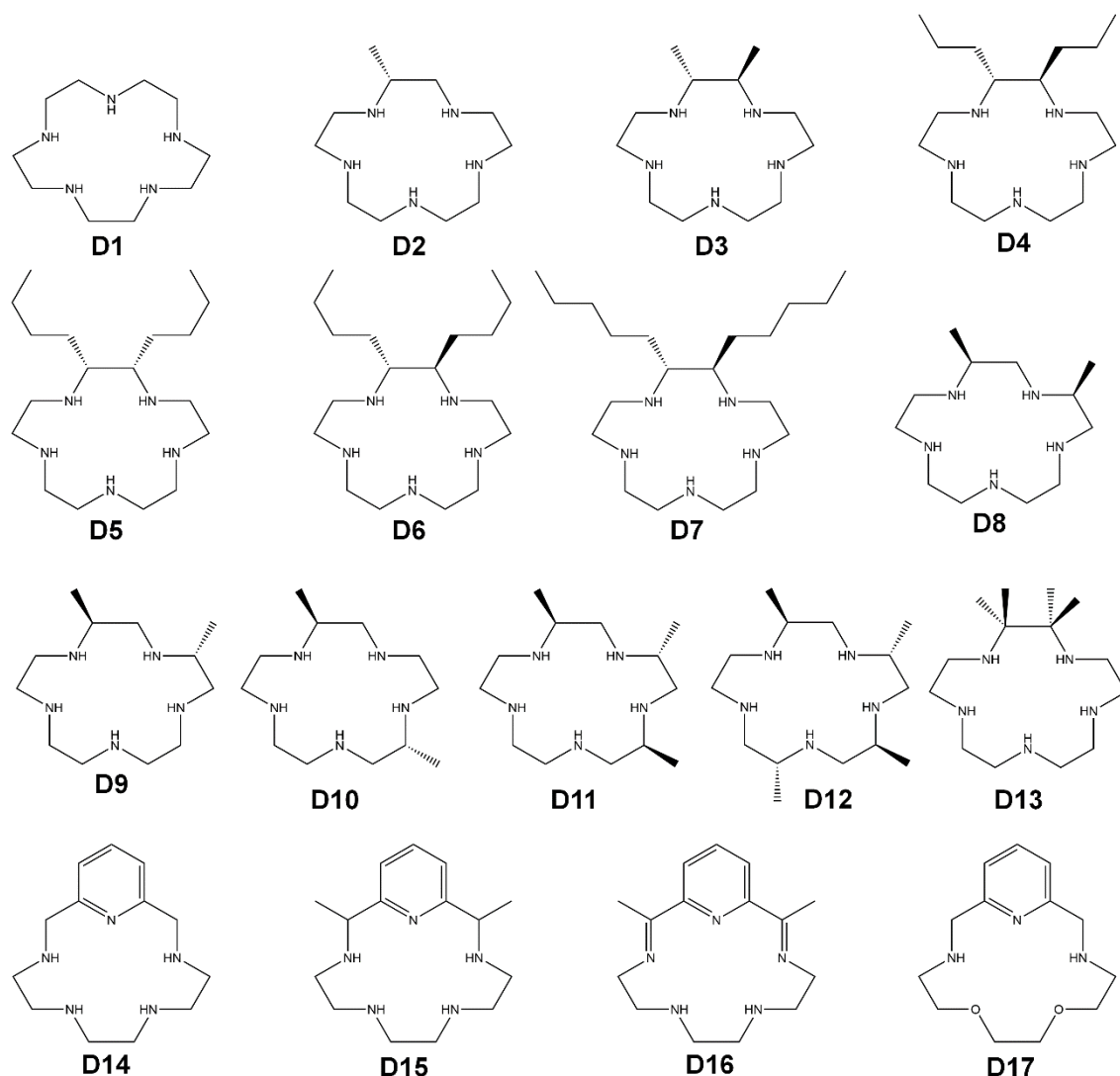


Figura 15. Estruturas dos ligandos derivados de 15-ane-N5 (D1-D17) empregados para o cálculo computacional.

Estes ligandos presentan estabilidades xeralmente menores caos tetraazamacrociclos estudados (**Táboa 7**). De xeito preliminar á comparación das contribucións asociadas aos macrociclos, debe terse en conta que, se ben os ligandos **D14-D17** presentan modificacións estruturais no anel, ningún dos pentaazamacrociclos estudados dispón de grupos funcionais engadidos que poidan

incrementar a estabilidade debida ao anel, a diferenza dos ligandos estudados no grupo dos derivados do cicleno.

Táboa 7. Descritores e estabilidades bibliográficas ($\log K_{MnL}$ exp) e calculadas por *MacroMathScientist* ($\log K_{MnL}$ calc) para os ligandos derivados de 15-ane-N5 (**D1-D17**).

Ligando	Descritores	Ref.	$\log K_{MnL}$ exp	$\log K_{MnL}$ calc
D1	A ₁₅	(64)	10,55	10,93
		(65)	10,85	10,93
D2	A ₁₅	(65)	11,02	10,93
D3	A ₁₅	(65)	11,09	10,93
D4	A ₁₅	(65)	10,19	10,93
D5	A ₁₅	(65)	11,09	10,93
D6	A ₁₅	(65)	11,65	10,93
D7	A ₁₅	(65)	10,74	10,93
D8	A ₁₅	(65)	10,19	10,93
D9	A ₁₅	(65)	10,46	10,93
D10	A ₁₅	(65)	10,88	10,93
D11	A ₁₅	(65)	11,97	10,93
D12	A ₁₅	(65)	10,93	10,93
D13	A ₁₅	(65)	11,48	10,93
D14	A ₁₅ + NPy	(65)	11,64	11,30
		(66)	11,12	11,30
		(64)	10,89	11,30
		(66)	11,12	11,30
D15	A ₁₅ + NPy	(67)	10,96	11,30
		(66)	11,46	11,30
D16	A ₁₅ + NPy + 2Im	(67)	10,5	10,90
		(66)	10,5	10,90
D17	A ₁₅ + NPy + 2NR ₂ O	(64)	7,18	6,58

V.1.5 Ligandos non macrocíclicos

A fin de obter unha correlación entre descritores estruturais e constantes de equilibrio que abranguese un intervalo amplo, incluíronse ligandos de baixa estabilidade como por exemplo diversos aminoácidos (**E3-E7;E9-E12**) cuxas estruturas están recollidas na **Figura 16**.

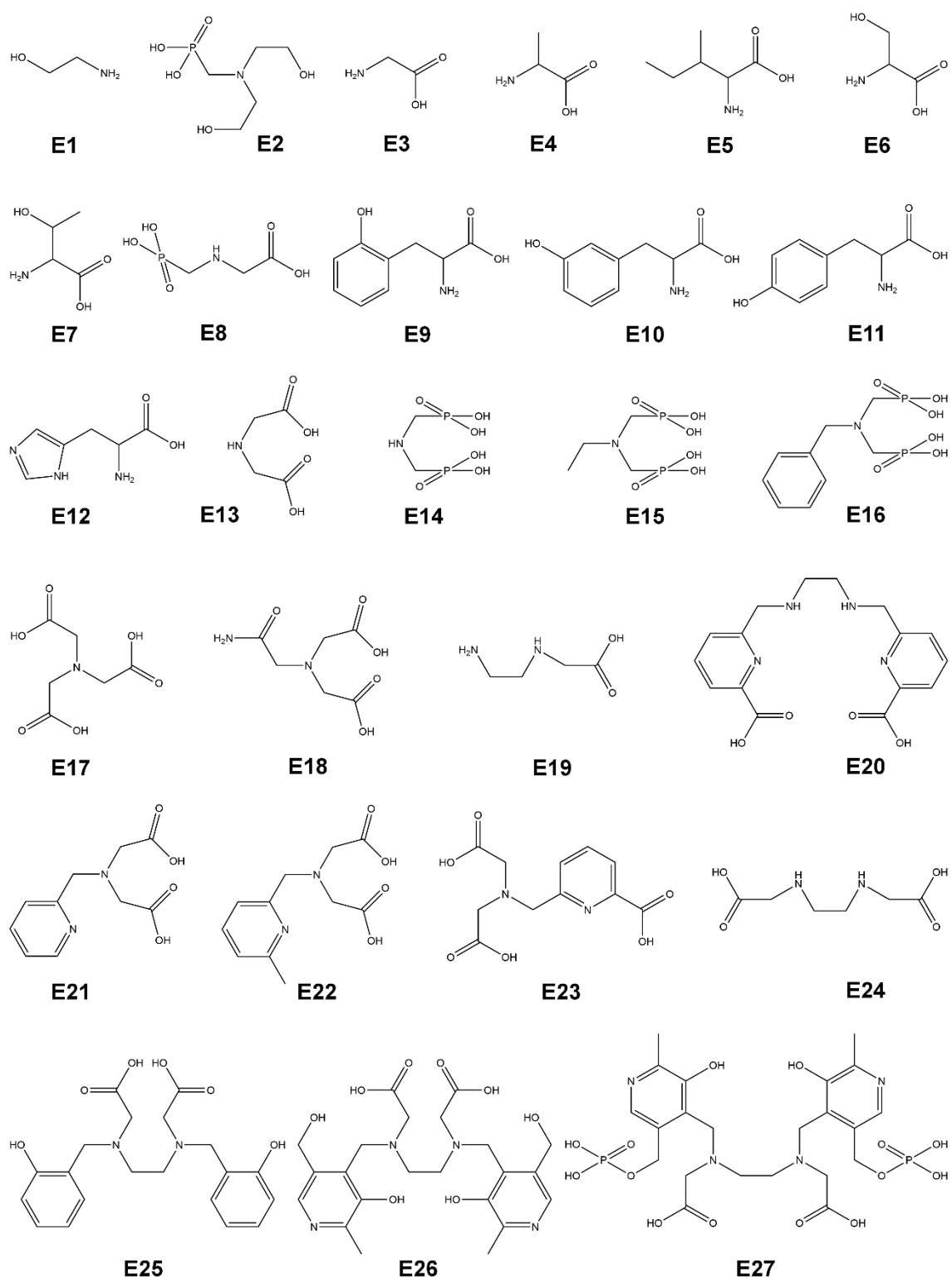


Figura 16. Estruturas dalgúns ligandos non macrocíclicos (E1-E27) empregados para o cálculo computacional.

Con todo, e dado que o propósito do presente traballo está enfocado cara a utilidade práctica para IRM, a meirande parte dos ligandos non macrocíclicos empregados teñen interese desde este punto de vista, particularmente aqueles da familia de NTA (E17) ou EDTA (E28).

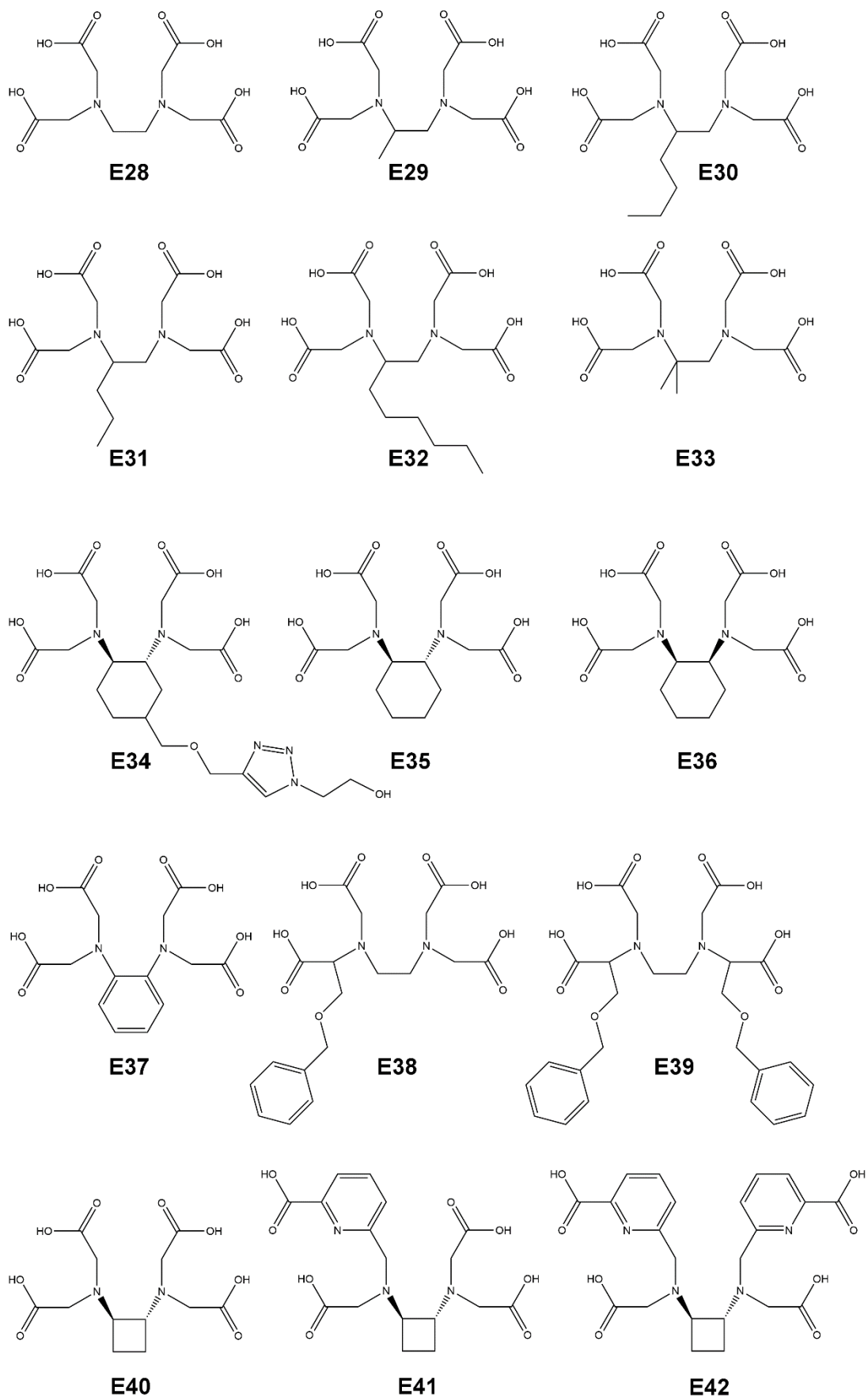


Figura 17. Estructuras dalgúns ligandos non macrocíclicos (E28-E42) empregados para o cálculo computacional.

Algúns das modificacións máis frecuentes son a alquilación do espazador etilo (**E29-E33**) ou a súa substitución por propilo (**E51-E52**), ciclobutilo (**E40-E42**) ou ciclohexilo (**E34-E36; E47-E50**), como pode observarse na **Figura 17** e na **Figura 18**.

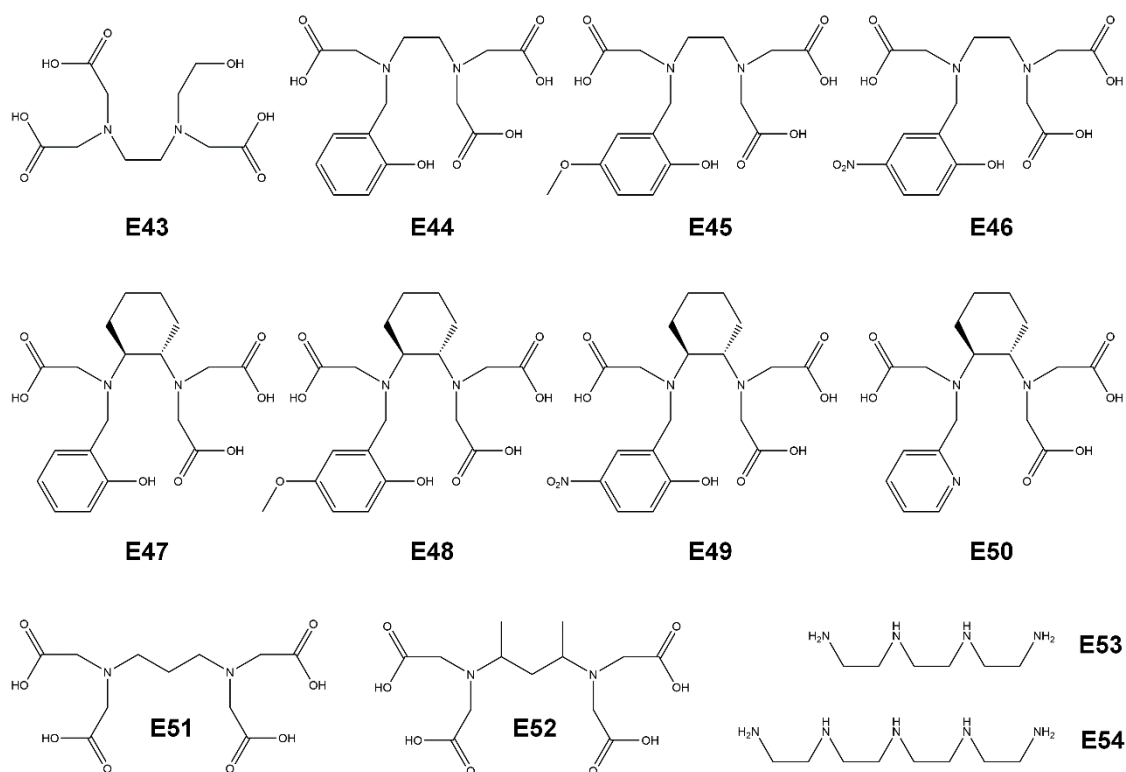


Figura 18. Estruturas dalgúns ligandos non macrocíclicos (**E43-E54**) empregados para o cálculo computacional.

Tamén se recompilaron constantes de varios ligandos con apéndices picolínicos (**E61-E66**) (**Figura 19**).

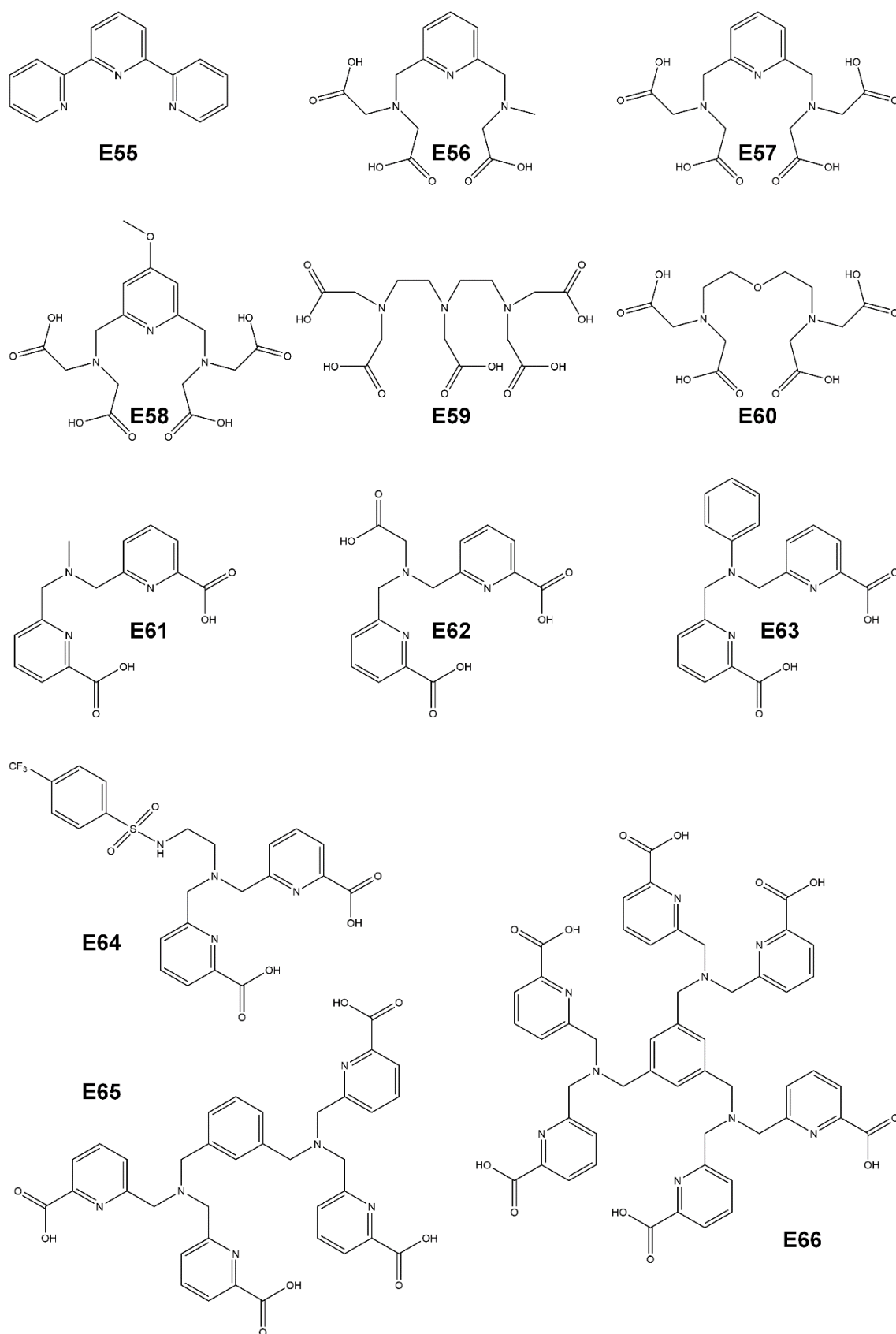


Figura 19. Estructuras dalgúns ligandos non macrocíclicos (E55-E66) empregados para o cálculo computacional.

Estes últimos amosan constantes de equilibrio altas que se aproximan ás dos derivados de EDTA e que indican unha contribución elevada á estabilidade dos complexos derivados de Mn^{2+} por parte dos grupos picolinato que actúan como dadores bidentados (**Táboa 8**).

Táboa 8. Descritores e estabilidades bibliográficas ($\log K_{MnL}$ exp) e calculadas por *MacroMathScientist* ($\log K_{MnL}$ calc) para os ligandos non macrocíclicos (**E1-E66**).

Ligando	Descritores	Ref.	$\log K_{MnL}$ exp	$\log K_{MnL}$ calc
E1	NR ₂ + OH	(68)	0,81	1,59
E2	NR ₂ + Pho + 2 OH	(69)	4,61	4,53
E3	NR ₂ + C	(70)	2,8	3,93
		(71)	2,6	3,93
E4	NR ₂ + C	(72)	2,5	3,93
		(72)	3,02	3,93
E5	NR ₂ + C	(73)	2,49	3,93
E6	NR ₂ + C	(72)	2,5	3,93
		(72)	2,89	3,93
E7	NR ₂ + C	(72)	2,58	3,93
E8	NR ₂ + C + Pho	(74)	5,5	6,62
E9	NR ₂ + C	(75)	2,73	3,93
E10	NR ₂ + C	(75)	2,85	3,93
E11	NR ₂ + C	(75)	3,14	3,93
E12	NR ₂ + C	(72)	3,32	3,93
		(72)	3,00	3,93
E13	NR ₂ + 2 C	(74)	4,72	6,53
E14	NR ₂ + 2 P	(74)	6,26	6,70
E15	NR ₂ + 2 P	(76)	6,94	6,70
E16	NR ₂ + 2 P	(76)	6,54	6,70
E17	NR ₂ + 3 C	(72)	7,27	9,14
		(53)	7,44	9,14
E18	NR ₂ + 2 C + AH ₂	(77)	4,72	6,98
		(72)	4,93	6,98
E19	2 NR ₂ + C	(77)	3,63	5,25
E20	2 NR ₂ + 2 Pic	(78)	10,63	11,82
E21	NR ₂ + Py + 2 C	(72)	7,05	7,16
		(72)	7,06	7,16
E22	NR ₂ + Py + 2 C	(79)	6,6	7,16
E23	NR ₂ + Pic + 2 C	(80)	9,59	11,12
E24	2 NR ₂ + 2 C	(72)	7,05	7,86
E25	2 NR ₂ + 2 C + 2 Phe	(81)	14,78	13,82
E26	2 NR ₂ + 2 C + 2 Phe	(82)	12,56	13,82
E27	2 NR ₂ + 2 C + 2 Phe	(83)	15,1	13,82
E28	2 NR ₂ + 4 C	(84)	13,88	13,06
		(85)	12,46	13,06
		(86)	12,61	13,06
		(72)	14,04	13,06
E29	2 NR ₂ + 4 C + Alken	(87)	15,28	15,40
E30	2 NR ₂ + 4 C + Alken	(72)	15,59	15,40
E31	2 NR ₂ + 4 C + Alken	(72)	15,60	15,40
E32	2 NR ₂ + 4 C + Alken	(72)	15,51	15,40
E33	2 NR ₂ + 4 C + Alken	(87)	15,31	15,40
E34	2 NR ₂ + 4 C + Cy	(88)	13,8	15,33
E35	2 NR ₂ + 4 C + Cy	(85)	14,32	15,33
		(72)	17,48	15,33
E36	2 NR ₂ + 4 C + Cy	(89)	14,19	15,33
		(90)	14,69	15,33
		(91)	16,78	15,33
		(88)	16,78	15,33
E37	2 NR ₂ + 4 C + 2 An	(72)	11,4	11,46
		(92)	11,79	11,46
		(93)	11,37	11,46
E38	2 NR ₂ + 3 C + C _α	(84)	13,5	12,73
E39	2 NR ₂ + 2 C + 2 C _α	(84)	13,8	12,39

E40	2 NR ₂ + 4 C + But	(94)	10,26	11,61
E41	2 NR ₂ + 3 C + But + AR ₂	(94)	14,71	10,06
E42	2 NR ₂ + 2 C + But + 2 AR ₂	(94)	15,81	8,50
E43	2 NR ₂ + 3 C + OH	(95)	11,41	10,72
E44	2 NR ₂ + 3 C + Phe	(86)	13,07	13,45
E45	2 NR ₂ + 3 C + PheOMe	(86)	13,32	12,83
E46	2 NR ₂ + 3 C + PheNO ₂	(86)	11,29	11,34
E47	2 NR ₂ + 3 C + Cy + Phe	(86)	14,16	15,71
E48	2 NR ₂ + 3 C + Cy + PheOMe	(86)	14,61	15,10
E49	2 NR ₂ + 3 C + Cy + PheNO ₂	(86)	13,66	13,61
E50	2 NR ₂ + 3 C + Cy + Py	(96)	14,14	13,36
E51	2 NR ₂ + 4 C + Prop	(72)	9,99	9,90
E52	2 NR ₂ + 4 C + Prop	(97)	10,97	9,90
E53	4 NR ₂	(72)	4,90	5,30
E54	5 NR ₂	(98)	6,55	6,62
E55	3 NR ₂ + 3 NPy	(72)	4,44	5,08
E56	3 NR ₂ + 3 C + NPy	(92)	11,97	12,15
E57	3 NR ₂ + 4 C + NPy	(92)	14,13	14,76
E58	3 NR ₂ + 4 C + NPy	(92)	13,89	14,76
E59	3 NR ₂ + 4 C	(72)	15,6	14,39
		(72)	15,2	14,39
		(99)	15,13	14,39
		(100)	15,5	14,39
		(101)	15,6	14,39
		(72)	15,78	14,39
E60	3 NR ₂ + 4 C + NR ₂ O	(102)	13,57	12,03
E61	NR ₂ + 2 Pic	(78)	10,13	10,50
E62	NR ₂ + 2 Pic + C	(54)	13,19	13,10
E63	NR ₂ + 2 Pic + An	(54)	9,55	9,70
E64	NR ₂ + 2 Pic + Sulph	(39)	13,53	13,53
E65	NR ₂ + 2 Pic	(78)	11,6	10,50
E66	NR ₂ + 2 Pic	(78)	10,99	10,50

V.1.6 Cálculo computacional

A partir da base de datos bibliográficos exposta, obtivéronse os parámetros que permiten predicir a estabilidade dos complexos de Mn²⁺ substituíndo os seus valores na expresión $\log K_{MnL} = \sum_i n_i \cdot \Delta \log K_i + A_{MnL}$ (Táboa 9).

Táboa 9. Parámetros obtidos para o cálculo da estabilidade termodinámica de complexos de Mn²⁺ en función dos motivos estruturais dos ligandos.

Descritor	Valor da constante	Desviación estándar
A _{AAZ}	3,61	0,60
A ₉	6,44	0,32
A ₁₂	9,87	0,29
A ₁₅	10,93	0,24
Descritor	Valor de log K _i	Desviación estándar
NR ₂	1,32	0,12
AH ₂	0,45	0,17
ARH	0,81	0,31
AR ₂	1,05	0,26
OH	0,26	0,41
Phe	2,98	0,29
PheNO ₂	0,88	0,77
PheOMe	2,37	0,77
C	2,60	0,08
C _α	2,27	0,17
Pho	2,69	0,16
Phosphi	-0,08	0,29
Pic	4,59	0,21

Py	0,63	0,54
Sulph	3,03	0,64
Alken	2,34	0,51
Prop	-3,17	0,28
But	-1,45	0,66
Cy	2,26	0,35
NR ₂ O	-2,36	0,33
An	-0,80	0,27
NPY	0,37	0,22
Amd	-4,20	0,39
Im	-0,40	0,40

Obsérvase así o importante efecto para a estabilidade dos complexos que teñen os macrociclos derivados de cicleno e de 15-ane-N5 e a idoneidade dos primeiros, xa que presentan máis posibilidades de adición de motivos estruturais que contribúan á estabilidade do complexo e capacidade de acadar un índice de coordinación co Mn²⁺ de 8, mentres que o anel 15-ane-N5 non pode exceder a heptacoordinación debido á mencionada configuración espacial que adopta o complexo en forma de bipirámide pentagonal. Ademais, presenta limitacións para engadir novos motivos estruturais.

Por outra banda, modificacións estruturais como a substitución de espazadores de etilo por espazadores de propilo e, especialmente, de nitróxenos amínicos por amídicos diminúen severamente a estabilidade dos complexos (**Figura 20**). En menor medida tamén o fan outras modificacións como a substitución de N dadores por O ou de espazadores etilo por ciclobutilo. A adición de fosfitos e hidroxilos apenas ten efecto sobre a estabilidade, en contraste con outros motivos entre os que destacan os fosfatos, fenóis, sulfonamidas e, especialmente, picolínatos. Neste sentido, esta información é de utilidade de cara a investigación de futuros ligandos que formen complexos estables, tendo presente para aplicación en IRM debe considerarse tamén a basicidade dos ligandos, posto que a pH fisiolóxico os protóns poden ter importantes efectos competitivos, e particularmente os factores cinéticos que non son obxecto de estudo no presente traballo.

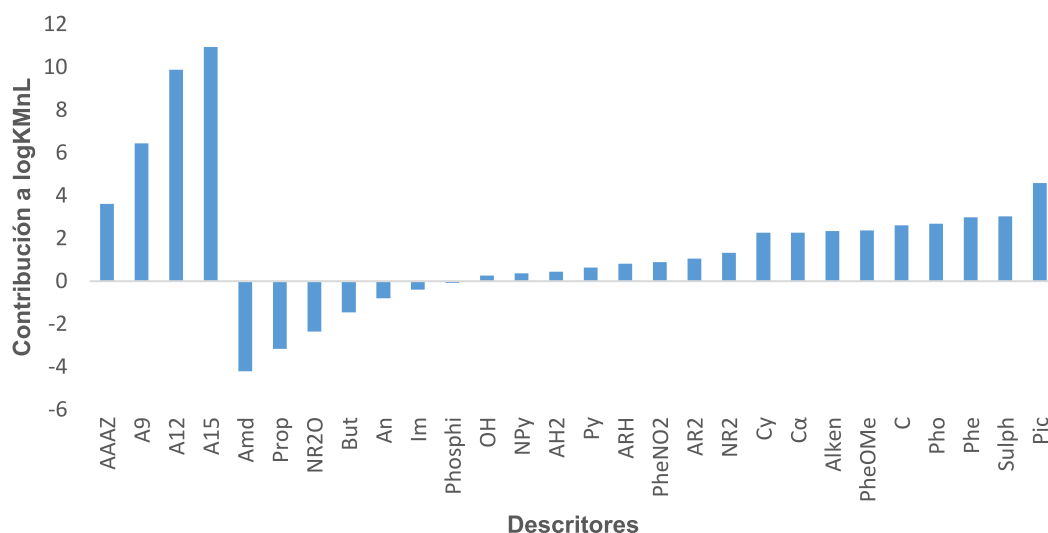


Figura 20. Contribución a log K_{MnL} dos motivos estruturais estudados.

Para avaliar a robustez da análise, comparáronse as constantes de equilibrio calculadas segundo estes parámetros e as experimentais obtidas da bibliografía, observándose unha excelente correlación, cun R^2 de 0,9939. Na **Figura 21** obsérvase como os ligandos non macrocíclicos empregados comprenden un amplo rango de constante de equilibrio, a maioría de derivados de TACN presentan estabilidade máis ben baixas, os de AAZ e 15-ane-N5 ocupan posicións intermedias e diversos ligandos derivados de cicleno distínguense de todos os demais pola súa elevada estabilidade.

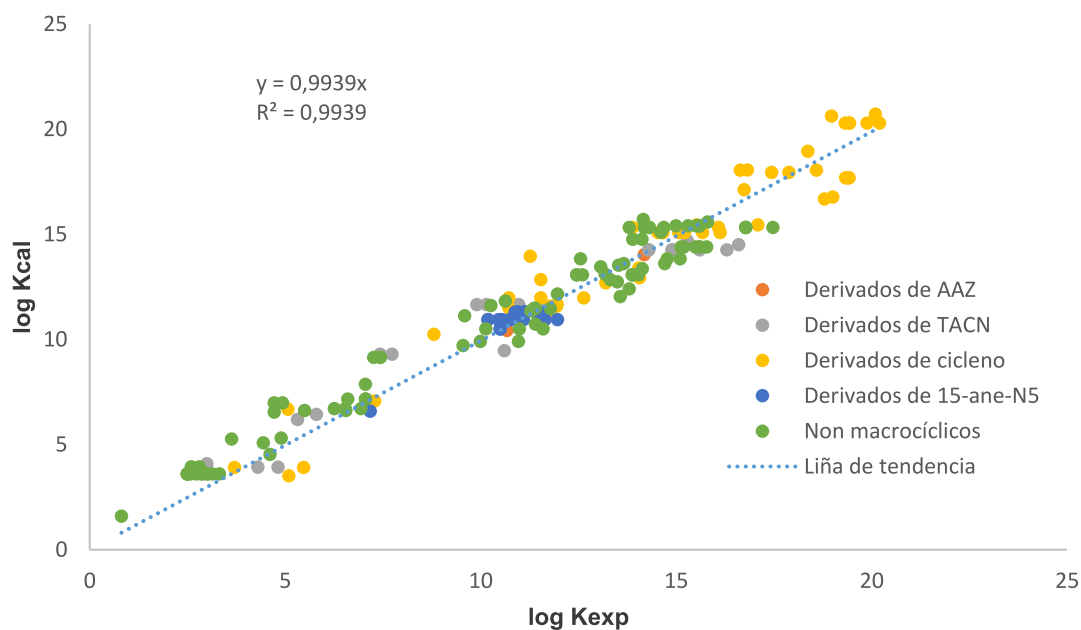


Figura 21. Diagrama de dispersión dos valores bibliográficos de estabilidade para os complexos de Mn^{2+} ($\log K_{exp}$) fronte aos valores calculados a partir dos parámetros obtidos con *MacroMathScientist* ($\log K_{cal}$).

Este traballo tamén permite detectar datos anómalos e así inducir posibles erros nos datos bibliográficos ou índices de coordinación inesperados para aqueles datos que se desvíen excesivamente. Da matriz de 181 datos, só 8 se diferencian en máis de 2 puntos sendo o máximo é de 2,67 para o ligando **C18**. Isto suxire que, ou ben o complexo non emprega para a súa formación todos os motivos estruturais do ligando tidos en consideración, ou ben a constante de estabilidade publicada pode ser incorrecta e debe tomarse con cautela.

V.2 Caracterización dos ligandos sintetizados

O rendemento global das sínteses de **L1** e **L2** foron similares, do 28% e 29% respectivamente, e débense fundamentalmente á síntese dos intermedios **L1a**, **L2a**, **L2b**, posto que as últimas etapas de hidrólise son procesos cun rendemento practicamente cuantitativo. No caso da hidrólise de **L1a** para obter **L1**, do 99%. O rendemento de etapa de **L2b** para dar a **L2** non se puido determinar e determinouse na súa vez o de **L2a** para formar **L2**, do 45%.

Comprobouse mediante RMN ^1H e RMN ^{13}C a formación dos complexos de interese, tal e como se pode visualizar nos *Anexos*. En IR observáronse picos en 1626 e 1731 cm^{-1} no caso de **L1** correspondentes coas tensións C=O dos grupos carbonilo, así como unha banda arredor dos 3000 cm^{-1} asociada ás tensións C-H. Para **L2**, observouse un sinal en 1716 cm^{-1} correspondente ás tensións C=O, así como sinais de 1623 cm^{-1} e 1591 cm^{-1} asociados ás tensións C=C e C=N dos aneis piridínicos e, novamente, unha banda arredor dos 3000 cm^{-1} asociada aos grupos C-H.

Confirmouse tamén con espectrometría de masas (ESI $^-$) a formación de **L1**, cun sinal de m/z de 317,0990 correspondente coa fórmula química empírica $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_8^-$, e a formación de **L2**, cun sinal de m/z de 383,1725 correspondente con $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_8^-$.

V.3 Estudo termodinámico de L1, L2 e os complexos derivados de Mn(II)

V.3.1 Estudo potenciométrico

A partir das valoracións potenciométricas descritas no procedemento experimental, determinouse con *Hyperquad* o valor das constantes de protonación dos ligandos **L1** e **L2**, correspondéndose as de **L1** coa media das tres valoracións realizadas (**Táboa 10**).

Táboa 10. Constantes de protonación dos ligandos **L1** e **L2** obtidas por métodos potenciométricos ($I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C).

	L1	L2
$\log K_1^H$	$9,49 \pm 0,03$	$8,08 \pm 0,02$
$\log K_2^H$	$7,17 \pm 0,02$	$5,92 \pm 0,04$
$\log K_3^H$	$2,34 \pm 0,02$	$2,61 \pm 0,2$
$\log \beta_3^H$	18,997	16,61

Estes datos indican que **L1** é máis propenso a protonarse ca **L2**, é dicir, máis básico, o que a pH fisiolóxico pode implicar unha maior liberación de manganeso por competición dos protóns. Estes valores tamén reflicten que, como cabe esperar, conforme se van engadindo protóns ao ligando as sucesivas protonacións van facéndose menos favorables. Nas valoracións potenciométricas observáronse distintos saltos de pH, correspondentes coas sucesivas protonacións. Mediante o programa *Hyperquad* poden compararse de maneira visual os valores de pH calculado e experimental das distintas valoracións potenciométricas. Na **Figura 22** exemplifícase isto nunha das valoracións de **L1**.

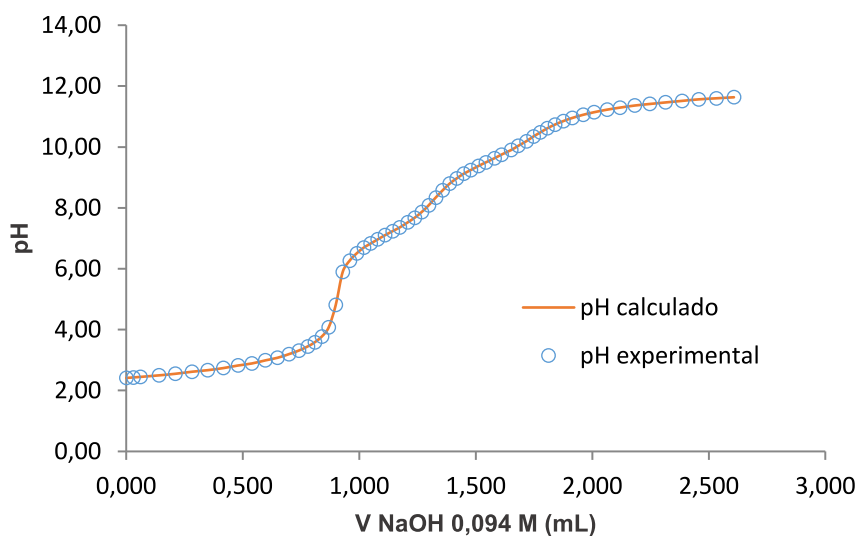


Figura 22. Comparativa da curva de pH calculada en *Hyperquad* e os valores de pH medidos durante a valoración de $4,00 \cdot 10^{-5}$ mol **L1** con NaOH 0,094 M partindo de medio ácido e dun volumen de 10 mL. $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C.

O programa tamén permite visualizar a especiación ao longo das valoracións potenciométricas, observándose no exemplo anterior como as distintas especies de ligando **L1** van sucedéndose desde a máis protonada (LH_3) ata a completamente desprotonada a medida que se valora con base (**Figura 23**).

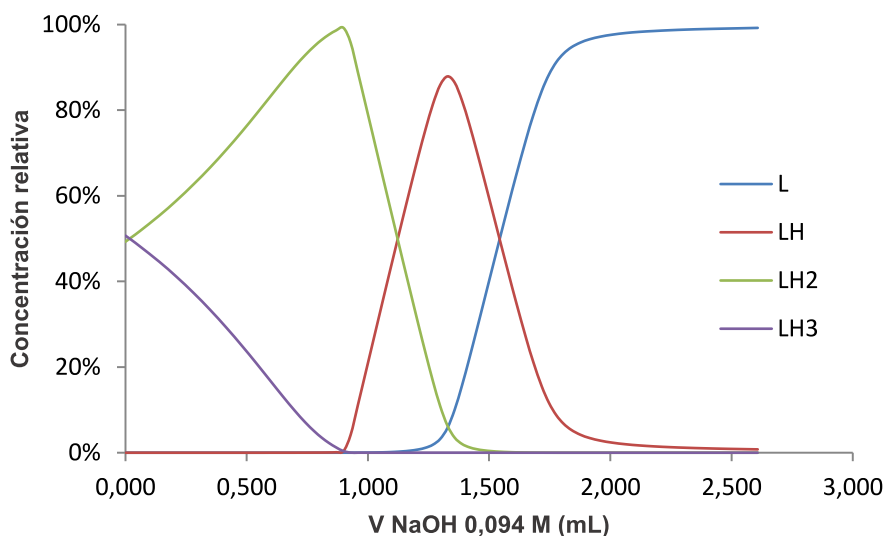


Figura 23. Diagrama de especiación calculado por *Hyperquad* para as distintas protonacións de **L1** (L, LH, LH₂, LH₃) durante a valoración de $4,00 \cdot 10^{-5}$ mol **L1** con NaOH 0,094 M partindo de medio ácido e dun volumen de 10 mL. $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C.

En canto á estabilidade termodinámica dos complexos derivados de Mn^{2+} , determinouse con *Hyperquad* a partir das valoracións potenciométricas que $\log K_{MnL1} = 10,78 \pm 0,04$ e $\log K_{MnL2} = 8,80 \pm 0,06$, o que sitúa os nosos ligandos lonxe dos pK de entre 15 e 20 observados durante a exploración bibliográfica para moitos derivados de cicleno, e máis inestables tamén ca outros derivados de EDTA (**E28**). Isto implica que os ligandos **L1** e **L2** non están entre os máis apropiados para a súa aplicación en IRM de acordo cos factores termodinámicos. Porén, debe considerarse a relevancia doutros factores non estudados no presente traballo coma os cinéticos para avaliar a súa idoneidade.

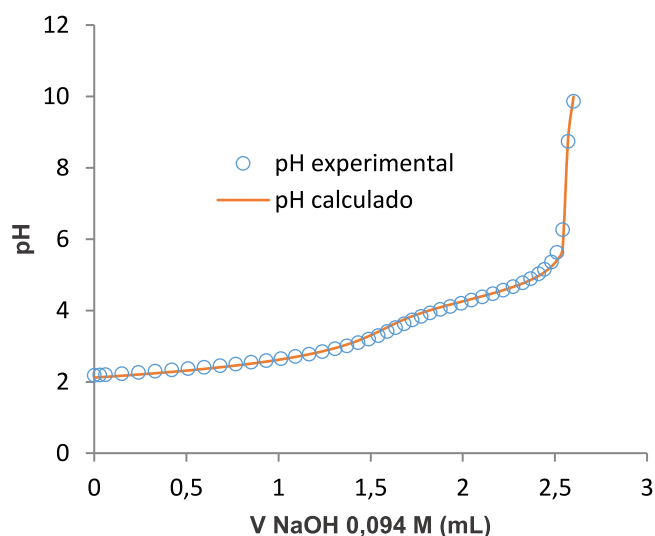


Figura 24. Comparativa da curva de pH calculada en *Hyperquad* e os valores de pH medidos durante a valoración de $4,00 \cdot 10^{-5}$ mol **MnL1** con NaOH 0,094 M partindo de medio ácido e dun volumen de 16,2 mL. $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C.

O axuste do programa pode visualizarse, novamente, comparando os datos de pH calculados e observados durante as valoracións potenciométricas. No exemplo da **Figura 24**, valorouse potenciométricamente a formación de **MnL1**, observándose un gran salto de pH no momento da formación.

V.3.1 Estudo espectrofotométrico

Grazas aos aneis de piridina, **L2** puido estudarse mediante o método espectrofotométrico. Recadáronse 42 medidas a distintos pH no rango de traballo de 230 a 290 nm de lonxitude de onda, observándose un aumento da absorbencia nos pH máis ácidos, é dicir, ao irse protonando **L2**. Pode observarse un máximo próximo a 260 nm correspondente ao dobre pico desta lonxitude de onda característico das piridinas (**Figura 25**). Este pico de absorbencia sitúase no rango do ultravioleta, o que se corresponde coa observación de que as disolucións preparadas eran incoloras.

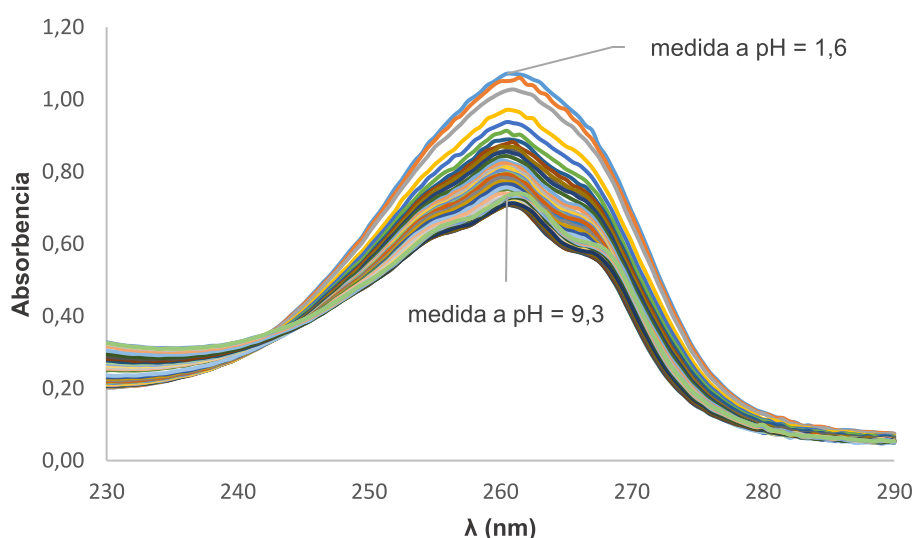


Figura 25. Espectros de absorción ultravioleta do ligando **L2** obtidos a distintos valores de pH. $[L2]_{total} = 7,93 \cdot 10^{-5} M$; $I = 0,15 M NaCl$; $T = 25 ^\circ C$.

O software puido diferenciar a contribución á absorbencia total de cada unha das especies de **L2** mediante a determinación dos coeficientes de absorptividade no rango das lonxitudes de onda para o que se recolleron os datos (**Figura 26**).

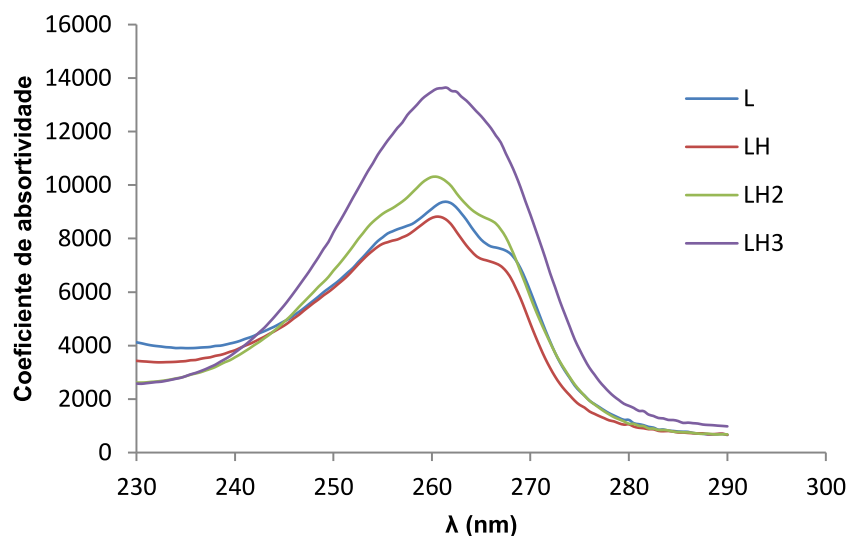


Figura 26. Absortividade no ultravioleta calculada para as distintas especies de **L2** en función do seu grao de protonación (L, LH, LH₂, LH₃).

Así, a partir das concentracións de cada especie coñecidas aos diferentes pH, o programa puido calcular as constantes de protonación de **L2** mediante o método espectrofotométrico (**Táboa 11**).

Táboa 11. Constantes de protonación do ligando **L2** obtidas por métodos espectrofotométricos ($I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C).

	L2
$\log K_1^H$	$7,98 \pm 0,02$
$\log K_2^H$	$5,74 \pm 0,02$
$\log K_3^H$	$2,65 \pm 0,02$
$\log \beta_3^H$	16,37

Estes resultados son congruentes cos obtidos mediante o método potenciométrico, presentando variacións menores a 0,2 unidades de pK^H . Pode visualizarse o axuste que realiza *Hyperquad* comparando os datos de absorbencia experimentais para o conxunto das medicións realizadas a unha lonxitude de onda dada (Figura 27).

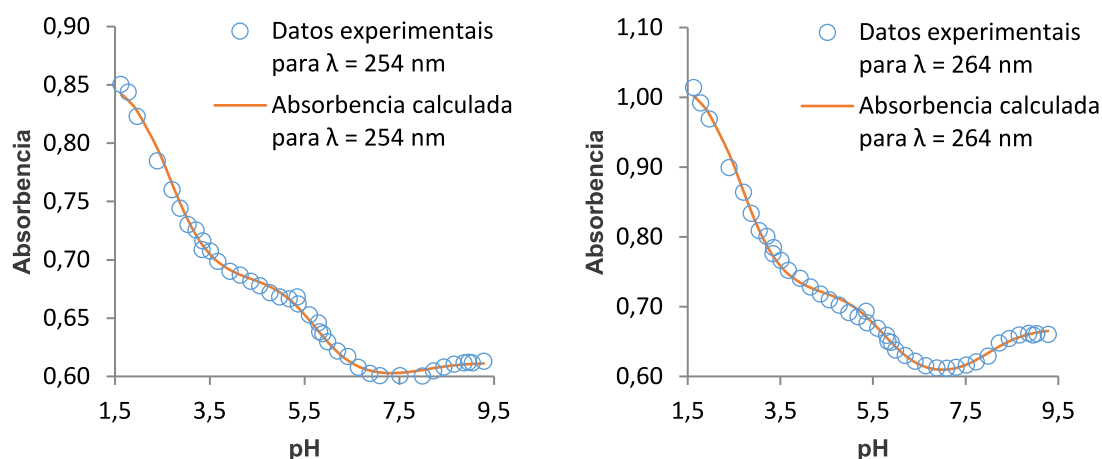


Figura 27. Exemplos a $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 264$ nm do axuste da curva de absorbancia de **L2** calculada en *Hyperquad* e os valores de absorbancia medidos a distintos pH. $[\text{L2}]_{\text{total}} = 7,93 \cdot 10^{-5}$ M; $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C.

No tocante á estabilidade termodinámica dos complexos de Mn^{2+} , tomáronse 16 medidas a diferentes pH a partir de concentracións equimolares de Mn^{2+} e **L2**, observándose unha diminución da absorbancia total para os pH máis básicos, é dicir, aqueles nos que complexo está formado. Na **Figura 28** representáanse 12 destas medidas, desbotándose as catro tomadas a pH máis ácidos posto que practicamente non hai complexo formado. A formación de complexo obsérvase a partir de $\text{pH} = 3,91$, ata formarse case por completo a $\text{pH} = 6,91$, o que supón que a pH fisiolóxico = 7,4 o complexo está completamente formado. Obsérvase nos sucesivos espectros que conforme aumenta o pH se produce un desprazamento do máximo de absorción, coñecido como desprazamento batocrómico, por efecto da formación do complexo, así como unha diminución da intensidade, o que recibe o nome de efecto hipocrómico.

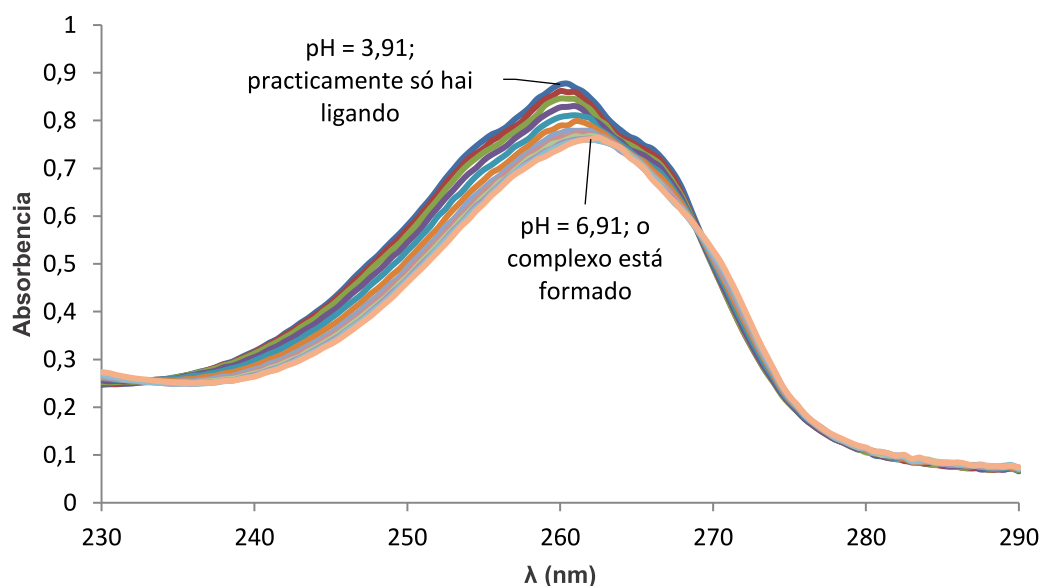


Figura 28. Espectros de absorción ultravioleta dunha mestura equimolar de Mn^{2+} e **L2** obtidos a distintos valores de pH. $[\text{Mn}^{2+}]_{\text{total}} = 9,11 \cdot 10^{-5}$ M; $[\text{L2}]_{\text{total}} = 8,67 \cdot 10^{-5}$ M; $I = 0,15$ M NaCl; $T = 25$ °C.

Así, o programa é capaz de diferenciar a contribución debida a cada unha das especies presentes no conxunto das medidas: **MnL2**, e as distintas especies de **L2** en función do seu grao de protonación. Na **Figura 29** tómase como exemplo a medida espectrofotométrica para a disolución preparada a pH = 4,75 e visualízase o refinado dos datos experimentais realizado mediante *Hyperquad*.

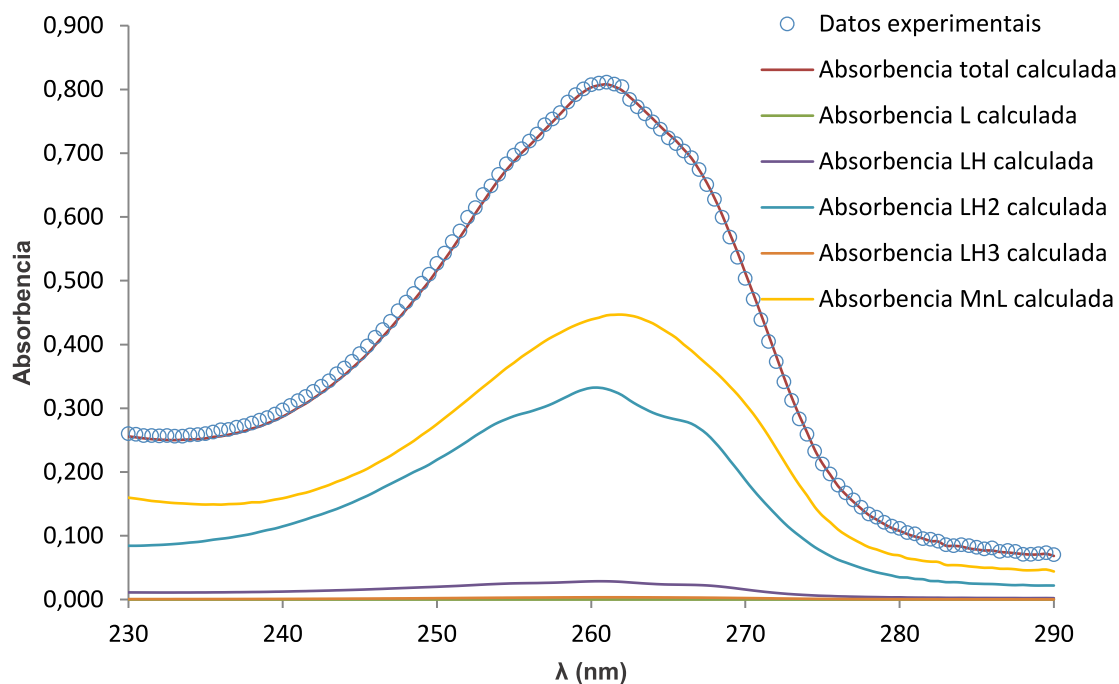


Figura 29. Absorbancia ultravioleta calculada para o complexo **MnL2** (MnL), para as distintas especies derivadas de **L2** en función do grao de protonación (L, LH, LH₂, LH₃) e para o conxunto da mestura, en comparación dos datos de absorbancia obtidos experimentalmente. $[Mn^{2+}]_{total} = 9,11 \cdot 10^{-5} M$; $[L2]_{total} = 8,67 \cdot 10^{-5} M$; $I = 0,15 M NaCl$; $T = 25 \text{ }^{\circ}C$.

A partir das concentracións relativas destas especies aos diferentes pH, o programa é capaz de determinar a estabilidade termodinámica do complexo, obténdose como resultado que $\log K_{MnL2} = 8,82 \pm 0,02$. Este resultado varía en tan só dúas centésimas con respecto ao dato conseguido mediante o método potenciométrico, de maneira que se comproba que os dous métodos ofrecen resultados moi próximos.

V.3.1 Comparativa cos parámetros do estudo bibliográfico

Para o estudo bibliográfico empregáronse datos de estabilidade termodinámica de tres ligandos co espazador etilo modificado por un espazador ciclobutilo 1,2- substituído. Os ligandos sintetizados **L1** e **L2** deseñáronse utilizando, en cambio, un espazador ciclobutilo 1,3- substituído. Se empregamos o mesmo descritor en ambos

casos, podemos describir o ligando **L1** como $2 \text{NR}_2 + \text{But} + 4 \text{C}$, e o ligando **L2** como $2 \text{NR}_2 + \text{But} + 2 \text{C} + 2 \text{Py}$, diferenciándose polo tanto por dous motivos estruturais, de carboxilo no caso de **L1** e de piridina para **L2**. Así, puideron calcularse os valores estimados de pK_{MnL} a partir dos parámetros obtidos (**Táboa 12**).

Táboa 12. Datos de estabilidade termodinámica para **L1** e **L2** obtidos experimentalmente ($\log K_{\text{MnL exp}}$) mediante métodos potenciométricos (Pot) e espectrofotométricos (Espectr) comparados cos calculados a partir dos parámetros derivados do estudo bibliográfico.

		$\log K_{\text{MnL exp}}$	$\log K_{\text{MnL calc}}$
L1	Pot	$10,78 \pm 0,04$	11,61
L2	Espectr	$8,80 \pm 0,06$	7,67
		$8,82 \pm 0,02$	7,67

As predicións sitúanse arredor de 1 punto de diferenza de pK_{MnL} calculado con respecto ao experimental, o cal se atopa dentro do esperable. Destes datos despréndese que a modificación do espazador etilo por ciclobutilo 1,2- substituído ou 1,3- substituído non aparenta amosar grandes diferenzas. Por outro lado, os parámetros son capaces de predicir acertadamente unha diminución da estabilidade ao substituír dous carboxilos por dúas piridinas, se ben a predición é dunha variación de 3,9 puntos de $\log K_{\text{MnL}}$ fronte á experimental de 2,0.

VI. CONCLUSIONES

En base aos resultados do presente traballo, pódense extraer as seguintes conclusións:

- Os ligandos ácido 2,2',2'',2'''-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis(azanotriil))tetraacético (**L1**) e ácido 2,2'-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis((piridin-2-ilmetil)azanodiil))diacético (**L2**) foron sintetizados con éxito con rendementos do 28% e 29% respectivamente.
- Determináronse mediante métodos potenciométricos as constantes de protonación de **L1** e **L2** e as constantes de complexación con Mn^{2+} para os dous ligandos, así como as constantes de protonación e complexación relativas a **L2** mediante métodos espectrofotométricos, comprobándose satisfactoriamente unha boa similitude para as obtidas mediante distintos métodos.
- **L1** e **L2** amosan estabilidades termodinámicas menores en comparación con outros ligandos da súa mesma familia, o que converte esoutros ligandos en mellores candidatos para a súa aplicación en imaxe por resonancia magnética (IRM). Con todo, debe terse en conta a importancia doutros factores non estudados, fundamentalmente os cinéticos, para avaliar a súa idoneidade.
- A partir dunha ampla procura bibliográfica de constantes de estabilidade termodinámica de complexos derivados de Mn^{2+} obtivéronse parámetros que permiten aproximarse mediante unha fórmula matemática ao valor das constantes de estabilidade de complexos formados a partir de ligandos cos motivos estruturais estudados.
- Esta análise cuantitativa permite detectar datos anómalos induciendo posibles erros no cálculo das constantes de estabilidade termodinámica ou índices de coordinación inesperados.
- Valórase positivamente o grao de acerto dos parámetros obtidos para predicir a estabilidade dos complexos de **L1** e **L2**.
- De acordo con estas predicións, os espazadores de ciclobutano 1,3- substituídos amosaron contribucións á estabilidade similares ás dos complexos dos espazadores de ciclobutano 1,2- substituídos.

CONCLUSIONES

En base a los resultados del presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los ligandos ácido 2,2',2'',2'''-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis(azanotriil))tetraacético (**L1**) y ácido 2,2'-(((1S,3S)-ciclobutano-1,3-diil)bis((piridin-2-ilmetil)azanodiil))diacético (**L2**) han sido sintetizados con éxito con rendimientos del 28% y 29% respectivamente.
- Se determinaron mediante métodos potenciométricos las constantes de protonación de **L1** y **L2** y las constantes de complejación con Mn^{2+} para los dos ligandos, así como las constantes de protonación y complejación relativas a **L2** mediante métodos espectrofotométricos, comprobándose satisfactoriamente una buena similitud para las obtenidas mediante distintos métodos.
- **L1** y **L2** muestran estabilidades termodinámicas menores en comparación con otros ligandos de su misma familia, lo que convierte a estos últimos en mejores candidatos para su aplicación en imagen por resonancia magnética (IRM). Aun así, debe tenerse en cuenta la importancia de otros factores no estudiados, fundamentalmente los cinéticos, para evaluar su idoneidad.
- A partir de una amplia búsqueda bibliográfica de constantes de estabilidad termodinámica de complejos derivados de Mn^{2+} se han obtenido parámetros que permiten aproximarse mediante una fórmula matemática al valor de las constantes de estabilidad de complejos formados a partir de ligandos con los motivos estructurales estudiados.
- Este análisis cuantitativo permite detectar datos anómalos induciendo posibles errores en el cálculo de las constantes de estabilidad termodinámica o índices de coordinación inesperados.
- Se valora positivamente el grado de acierto de los parámetros obtenidos para predecir la estabilidad de los complejos de **L1** y **L2**.
- De acuerdo con estas predicciones, los espaciadores de ciclobutilo 1,3-sustituidos han mostrado contribuciones a la estabilidad similares a las de los complejos espaciadores de ciclobutilo 1,2- sustituidos.

CONCLUSIONS

Based on the results of the present report, the following conclusions can be drawn:

- The ligands 2,2',2'',2'''-(((1S,3S)-cyclobutane-1,2-diyl)bis(azanetriyl))tetraacetic acid (**L1**) and 2,2'-(((1S,3S)-cyclobutane-1,3-diyl)bis((pyridin-2-ylmethyl)azanediyl))diacetic acid (**L2**) were successfully synthesized with 28% and 29% yields, respectively.
- Protonation constants of **L1** and **L2** and its complexation constants with Mn^{2+} were determined through potentiometric methods, as well as protonation and complexation constants regarding **L2** through spectrophotometric methods, with satisfactory agreement between the values obtained through different methods.
- **L1** and **L2** show lower thermodynamic stabilities compared to other ligands of their same family, which makes the latter better candidates for their application in magnetic resonance imaging (MRI). Nonetheless, the importance of other non-studied factors, mainly kinetic ones, should be considered in order to assess their suitability.
- Starting from a wide literature research of thermodynamic stability constants of complexes derived from Mn^{2+} , we obtained parameters that allow estimating through a mathematical formula the values of the stability constants of complexes formed with ligands containing the studied structural motifs.
- This quantitative analysis allows us to detect abnormal data deducing possible errors in the calculation of thermodynamic stability constants or unexpected coordination numbers.
- We value positively the degree of success of the parameters obtained for predicting the stability of **L1** and **L2** derived complexes.
- According to these predictions, complexes derived from 1,3-substituted cyclobutyl spacers have shown similar contributions to the stability regarding those derived from 1,2-substituted cyclobutyl spacers.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Laurent S, Henoumont C, Stanicki D, Boutry S, Lipani E, Belaid S, et al. MRI Contrast Agents: From Molecules to Particles. 2017. 122 p.
2. Merbach A, Helm L, Tóth É. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Second Edition. The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging: Second Edition. 2013.
3. Hanson LG. Is quantum mechanics necessary for understanding magnetic resonance? Concepts Magn Reson Part A Bridg Educ Res. 2008;32(5):329–40.
4. Zhang X, Lin Y, Gillies RJ. Tumor pH and its measurement. Journal of Nuclear Medicine. 2010;51(8):1167–70.
5. Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science (1979). 1971;171(3976):1151–3.
6. Carrasco Muñoz S, Calles Blanco C, Marcin J, Fernández Álvarez C, Lafuente Martínez J. Contrastes basados en gadolinio utilizados en resonancia magnética. Radiología. 2014;56(S1):21–8.
7. Baranyai Z, Pálincás Z, Uggeri F, Maiocchi A, Aime S, Brücher E. Dissociation kinetics of open-chain and macrocyclic gadolinium(III)- aminopolycarboxylate complexes related to magnetic resonance imaging: Catalytic effect of endogenous ligands. Chemistry - A European Journal. 2012;18(51):16426–35.
8. Malikova H, Holesta M. Gadolinium contrast agents – are they really safe? Journal of Vascular Access. 2017;18(64):s1–7.
9. Garcia J, Liu SZ, Louie AY. Biological effects of MRI contrast agents: gadolinium retention, potential mechanisms and a role for phosphorus. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. 2017;375(2107).
10. Ashbrook S, Andrews S. Contrast Agents for MRI: Experimental Methods. 2018. 1–597 p.

11. Wen L, Shi X, He L, Han D. Manganese-Enhanced Magnetic Resonance Imaging for Detection and Characterization of Colorectal Cancers. *Tomography*. 2018;4(2):78–83.
12. Albiin N, Kartalis N, Bergquist A, Sadigh B, Brismar TB. Manganese chloride tetrahydrate (CMC-001) enhanced liver MRI: Evaluation of efficacy and safety in healthy volunteers. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*. 2012;25(5):361–8.
13. Pan D, Schmieder AH, Wickline SA, Lanza GM. Manganese-based MRI contrast agents: Past, present, and future. *Tetrahedron*. 2011;67(44):8431–44.
14. Jørgensen JT, Rief M, Brismar TB, Wagner M, Albiin N. A new manganese-based oral contrast agent (CMC-001) for liver MRI: Pharmacological and pharmaceutical aspects. *Acta radiol*. 2012;53(7):707–13.
15. Crossgrove J, Zheng W. Manganese toxicity upon overexposure. *NMR Biomed*. 2004;17(8):544–53.
16. Gálosi R, Szalay C, Aradi M, Perlaki G, Pál J, Steier R, et al. Identifying non-toxic doses of manganese for manganese-enhanced magnetic resonance imaging to map brain areas activated by operant behavior in trained rats. *Magn Reson Imaging*. 2017;37:122–33.
17. Pan D, Caruthers SD, Senpan A, Schmieder AH, Wickline SA, Lanza GM. Revisiting an old friend: Manganese-based MRI contrast agents. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3(2):162–73.
18. Cotton FA, Wilkinson G. *Química inorgánica avanzada*. 2nd ed. Editorial Limusa-Wiley; 1969.
19. Housecroft CE, Sharpe AG. *Inorganic Chemistry*. 4th ed. Pearson; 2012.
20. Ribas Gispert J. *Coordination Chemistry*. Wiley-VCH; 2008.
21. Kozliak EI, Lambert FL. “Order-to-Disorder” for Entropy Change? Consider the Numbers! *The Chemical Educator*. 2005;(January):24–5.
22. Rodgers GE. *Química inorgánica*. MC Graw Hill; 1995.

23. Basolo F, Johnson RC. Química de los compuestos de coordinación. Editorial Reverté; 1967.
24. Oprisiu I, Winiwarter S. In Silico ADME Modeling [Internet]. Systems Medicine. Elsevier Inc.; 2021. 208–222 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11532-6>
25. Dioury F, Duprat A, Dreyfus G, Ferroud C, Cossy J. QSPR prediction of the stability constants of gadolinium(III) complexes for magnetic resonance imaging. *J Chem Inf Model*. 2014;54(10):2718–31.
26. Qi YH, Zhang QY, Xu L. Correlation analysis of the structures and stability constants of gadolinium(III) complexes. *J Chem Inf Comput Sci*. 2002;42(6):1471–5.
27. Porcar Tost O. Chiral cyclobutane scaffolds: their application in the the development of new functionalized organogelators, organocatalysts and MRI contrast agents. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa) [Internet]. 2017; Available from: <http://www.tdx.cat/handle/10803/458683>
28. Olivares Montia JA. Application of the cyclobutane scaffold to the preparation and study of new foldamers, cell penetrating peptides and MRI contrast agents. TDX (Tesis Doctorals en Xarxa) [Internet]. 2018; Available from: <http://www.tdx.cat/handle/10803/666764>
29. Tircső G, Regueiro-Figueroa M, Nagy V, Garda Z, Garai T, Kálmán FK, et al. Approaching the Kinetic Inertness of Macrocyclic Gadolinium(III)-Based MRI Contrast Agents with Highly Rigid Open-Chain Derivatives. *Chemistry - A European Journal*. 2016;22(3):896–901.
30. Caneda-Martínez L, Valencia L, Fernández-Pérez I, Regueiro-Figueroa M, Angelovski G, Brandariz I, et al. Toward inert paramagnetic Ni(II)-based chemical exchange saturation transfer MRI agents. *Dalton Transactions*. 2017;46(43):15095–106.
31. Gans P, Sabatini A, Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs. *Talanta*. 1996;43(10):1739–53.

32. Alderighi L, Gans P, Ienco A, Peters D, Sabatini A, Vacca A. Hyperquad simulation and speciation (HySS): A utility program for the investigation of equilibria involving soluble and partially soluble species. *Coord Chem Rev.* 1999;184(1):311–8.
33. Tei L, Gugliotta G, Fekete M, Kálmán FK, Botta M. Mn(ii) complexes of novel hexadentate AAZTA-like chelators: A solution thermodynamics and relaxometric study. *Dalton Transactions.* 2011;40(9):2025–32.
34. Chaudhuri P, Wieghardt K. The Chemistry of 1,4,7-Triazacyclononane and Related Tridentate Macrocyclic Compounds. *Progress in Inorganic Chemistry.* 2007;35:329–436.
35. Lázár I, Király R, Takács Z. Synthesis, potentiometric and ^1H NMR study of protonation and complex formation of 1,4,7-triazacyclononane-1,4-diacetate. *J Coord Chem.* 2000;51(3):293–304.
36. Cortes S, Brucher E, Geraldés CFGC, Sherry AD. Potentiometry and NMR Studies of 1,5,9-Triazacyclododecane- $\text{N},\text{N}',\text{N}''$ -triacetic Acid and Its Metal Ion Complexes. *Inorg Chem.* 1990;29(1):5–9.
37. Drahoš B, Kubíček V, Bonnet CS, Hermann P, Lukeš I, Tóth É. Dissociation kinetics of Mn^{2+} complexes of NOTA and DOTA. *Dalton Transactions.* 2011;40(9):1945–51.
38. Bevilacqua A, Gelb RI, Hebard WB, Zompa LJ. Equilibrium and Thermodynamic Study of the Aqueous Complexation of 1,4,7-Triazacyclononane- N,N' ; N'' -triacetic Acid with Protons, Alkaline-Earth-Metal Cations, And Copper(II). *Inorg Chem.* 1987;26(16):2699–706.
39. Uzal-Varela R, Rodríguez-Rodríguez A, Martínez-Calvo M, Carniato F, Lalli D, Esteban-Gómez D, et al. Mn^{2+} Complexes Containing Sulfonamide Groups with pH-Responsive Relaxivity. *Inorg Chem.* 2020;59(19):14306–17.
40. Kabachnik MI, Medved TY, Polikarpov YM, Pasechnik MP. Synthesis and investigation of a new chelating agent — $\text{N},\text{N}',\text{N}''$ -tris(dihydroxyphosphorylmethyl)-1,4,7-triazacyclononane. *Izv Akad Nauk SSSR, Ser Khim.* 1984;(4):835–843.

41. Bazakas K. Synt hesis and Complexing Properties of Polyazamacrocycles with Pendant. *Distribution*. 1995;1133–7.
42. Cabral MF, Costa J, Delgado R, da Silva JJRF, Vilhena MF. Protonation and metal complexation studies on some oxa-diaza macrocyclic ligands. *Polyhedron*. 1990;9(23):2847–57.
43. Drahoš B, Pniok M, Havlíčková J, Kotek J, Císařová I, Hermann P, et al. Mn²⁺ complexes of 1-oxa-4,7-diazacyclononane based ligands with acetic, phosphonic and phosphinic acid pendant arms: Stability and relaxation studies. *Dalton Transactions*. 2011;40(39):10131–46.
44. de Sá A, Bonnet CS, Geraldes CFGC, Tóth É, Ferreira PMT, André JP. Thermodynamic stability and relaxation studies of small, triaza-macrocyclic Mn(II) chelates. *Dalton Transactions*. 2013;42(13):4522–32.
45. Uzal-Varela R, Pérez-Fernández F, Valencia L, Rodríguez-Rodríguez A, Platas-Iglesias C, Caravan P, et al. Thermodynamic Stability of Mn(II) Complexes with Aminocarboxylate Ligands Analyzed Using Structural Descriptors. *Inorg Chem*. 2022;61(35):14173–86.
46. Takács A, Napolitano R, Purgel M, Bényei AC, Zékány L, Brücher E, et al. Solution structures, stabilities, kinetics, and dynamics of DO3A and DO3A-sulphonamide complexes. *Inorg Chem*. 2014;53(6):2858–72.
47. Bianchi A, Calabi L, Giorgi C, Losi P, Mariani P, Palano D, et al. Thermodynamic and structural aspects of manganese(II) complexes with polyaminopolycarboxylic ligands based upon 1,4,7,10-tetraazacyclododecane (cyclen). Crystal structure of dimeric [MnL]₂·2CH₃OH containing the new ligand 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 2001;(6):917–22.
48. Forgács A, Tei L, Baranyai Z, Tóth I, Zékány L, Botta M. A Bisamide Derivative of [Mn(1,4-DO2A)] - Solution Thermodynamic, Kinetic, and NMR Relaxometric Studies. *Eur J Inorg Chem*. 2016;2016(8):1165–74.
49. Chaves S, Delgado R, da Silva JJRF. The stability of the metal complexes of cyclic tetra-aza tetra-acetic acids. *Talanta*. 1992;39(3):249–54.

50. Garda Z, Forgács A, Do QN, Kálmán FK, Timári S, Baranyai Z, et al. Physico-chemical properties of Mn(II) complexes formed with cis- and trans-DO2A: thermodynamic, electrochemical and kinetic studies. *J Inorg Biochem.* 2016;163:206–13.
51. Failli P, Bani D, Bencini A, Cantore M, Mannelli LDC, Ghelardini C, et al. A novel manganese complex effective as superoxide anion scavenger and therapeutic agent against cell and tissue oxidative injury. *J Med Chem.* 2009;52(22):7273–83.
52. Garda Z, Molnár E, Kálmán FK, Botár R, Nagy V, Baranyai Z, et al. Effect of the nature of donor atoms on the thermodynamic, kinetic and relaxation properties of Mn(II) complexes formed with some trisubstituted 12-membered macrocyclic ligands. *Front Chem.* 2018;6(AUG):1–14.
53. Anderegg G. Critical survey of stability constants of NTA complexes. *Pure and Applied Chemistry.* 1984;54(12):2693–758.
54. Forgács A, Pujales-Paradela R, Regueiro-Figueroa M, Valencia L, Esteban-Gómez D, Botta M, et al. Developing the family of picolinate ligands for Mn²⁺ complexation. *Dalton Transactions.* 2017;46(5):1546–58.
55. Forgács A, Tei L, Baranyai Z, Esteban-Gómez D, Platas-Iglesias C, Botta M. Optimising the relaxivities of Mn²⁺ complexes by targeting human serum albumin (HSA). *Dalton Transactions.* 2017;46(26):8494–504.
56. Inoue MB, Oram P, Andreu-de-Riquer G, Inoue M, Borbat P, Raitsimring A, et al. Transition Metal Complexes of 12- and 13-Membered Functionalized Macrocycles, Dioxotetraazacycloalkanediacetates. *Inorg Chem.* 1995;34(13):3528–35.
57. Amorim MTS, Delgado R, da Silva JJRF, Cândida M, Vaz TA, Vilhena MF. Metal complexes of 1-oxa-4,7,10-triazacyclododecane-N,N',N''-triacetic acid. *Talanta.* 1988;35(9):741–5.
58. Costa J, Delgado R. Metal complexes of macrocyclic ligands containing pyridine. *Inorg Chem.* 1993;32(23):5257–65.
59. Drahoš B, Kotek J, Císařová I, Hermann P, Helm L, Lukeš I, et al. Mn²⁺ Complexes with 12-Membered pyridine based macrocycles bearing carboxylate

- or phosphonate pendant arm: Crystallographic, thermodynamic, kinetic, redox, and $^1\text{H}/^{17}\text{O}$ relaxation studies. *Inorg Chem.* 2011;50(24):12785–801.
60. Garda Z, Molnár E, Hamon N, Barriada JL, Esteban-Gómez D, Váradi B, et al. Complexation of Mn(II) by Rigid Pyclyen Diacetates: Equilibrium, Kinetic, Relaxometric, Density Functional Theory, and Superoxide Dismutase Activity Studies. *Inorg Chem.* 2021;60(2):1133–48.
61. Delgado R, Quintino S, Teixeira M, Zhang A. Metal complexes of a 12-membered tetraaza macrocycle containing pyridine and N-carboxymethyl groups. *Journal of the Chemical Society - Dalton Transactions.* 1997;(1):55–63.
62. Botár R, Molnár E, Trencsényi G, Kiss J, Kalman FK, Tircso G, et al. Stable and inert Mn(II)-based and pH responsive contrast agents Stable and inert Mn(II)-based and pH responsive contrast agents. *J Am Chem Soc.* 2020;
63. Drahoš B, Kotek J, Hermann P, Lukeš I, Tóth É. Mn²⁺ complexes with pyridine-containing 15-membered macrocycles: Thermodynamic, kinetic, crystallography, and $^1\text{H}/^{17}\text{O}$ relaxation studies. *Inorg Chem.* 2010;49(7):3224–38.
64. Drahoš B, Kotek J, Hermann P, Lukeš I, Tóth É. Mn²⁺ complexes with pyridine-containing 15-membered macrocycles: Thermodynamic, kinetic, crystallography, and $^1\text{H}/^{17}\text{O}$ relaxation studies. *Inorg Chem.* 2010;49(7):3224–38.
65. Riley DP, Henke SL, Lennon PJ, Weiss RH, Neumann WL, Rivers WJ, et al. Synthesis, Characterization, and Stability of Manganese(II) C-Substituted 1,4,7,10,13-Pentaazacyclopentadecane Complexes Exhibiting Superoxide Dismutase Activity. *Inorg Chem.* 1996;35(18):5213–31.
66. Dees A, Zahl A, Puchta R, van Eikema Hommes NJR, Heinemann FW, Ivanović-Burmazović I. Water exchange on seven-coordinate Mn(II) complexes with macrocyclic pentadentate ligands: Insight in the mechanism of Mn(II) SOD mimetics. *Inorg Chem.* 2007;46(7):2459–70.
67. Lieb D, Friedel FC, Yawer M, Zahl A, Khusniyarov MM, Heinemann FW, et al. Dinuclear seven-coordinate Mn(II) complexes: Effect of manganese(II)-hydroxo species on water exchange and superoxide dismutase activity. *Inorg Chem.* 2013;52(1):222–36.

68. Hancock RD. The chelate effect in complexes with ethanolamine. *Inorganica Chim Acta*. 1981;49(C):145–8.
69. Baseggio AA, Grassi RL. Stability constants of the complexes of Zn(II) and Mn(II) with N,N'-bis(2-hydroxyethyl) aminomethyl. *Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry*. 1981;43(12):3275–6.
70. Mui KK, McBryde WAE, Nieboer E. The stability of some metal complexes in mixed solvents. *Can J Chem*. 1974;52(10):1821–33.
71. Hopgood D, Leussing DL. Kinetic and Equilibrium Studies of Formation of N-Salicylidene-glycinato Complexes. The Promnastic¹ Effect of the Divalent Ions of Magnesium, Manganese, Zinc, Cadmium, and Lead. *J Am Chem Soc*. 1969;91(14):3740–50.
72. Smith RM, Martell AE. *Critical Stability Constants*. Vols. 1–6, New York: Plenum Press.
73. Sigel H, Fischer BE, Farkas E. Metal Ion Promoted Hydrophobic Interactions between Nucleotides and Amino Acids. Mixed-Ligand Adenosine 5'-Triphosphate/Metal Ion(II)/L-Leucinate Systems and Related Ternary Complexes. *Inorg Chem*. 1983;22(6):925–34.
74. Motekaitis RJ, Martell AE. Metal chelate formation by n-phosphonomethylglycine and related ligands. *J Coord Chem*. 1985;14(2):139–49.
75. Kiss T, Gergely A. Complex-forming properties of tyrosine isomers with transition metal ions. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. 1984;(9):1951–7.
76. Belskii FI, Goryunova IB, Petrovskii P v., Medved TY, Kabachnik MI. Chelating properties of imino-bis(methylphosphonic) acids. *Bulletin of the Academy of Sciences of the USSR Division of Chemical Science*. 1982;31(1):93–100.
77. Nakon R. Free metal ion depletion by “Good’s” buffers. *Anal Biochem*. 1979;95(2):527–32.
78. Forgács A, Regueiro-Figueroa M, Barriada JL, Esteban-Gómez D, de Blas A, Rodríguez-Blas T, et al. Mono-, Bi-, and Trinuclear Bis-Hydrated Mn²⁺

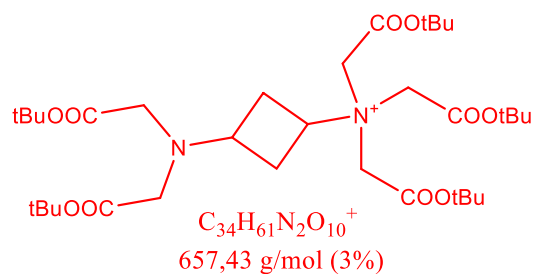
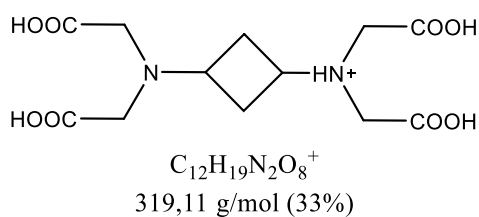
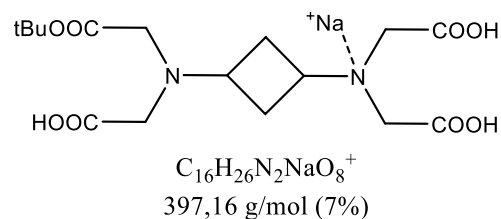
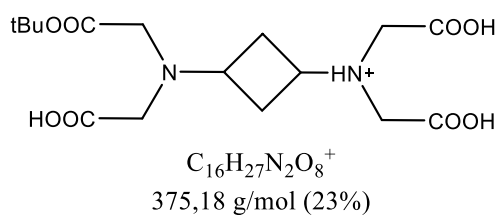
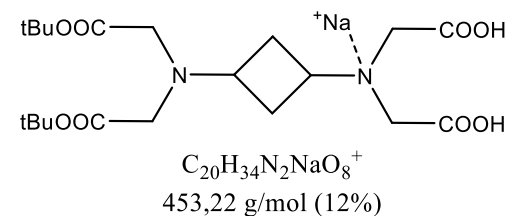
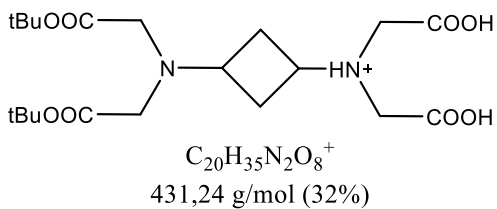
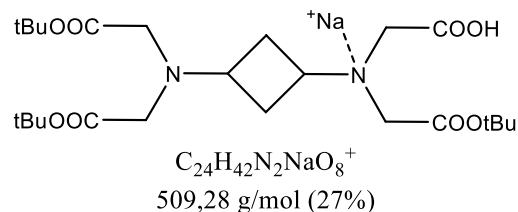
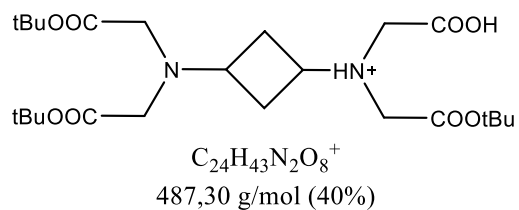
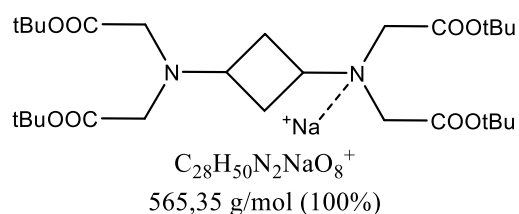
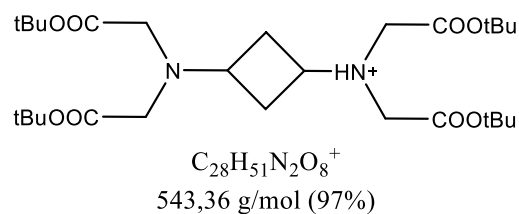
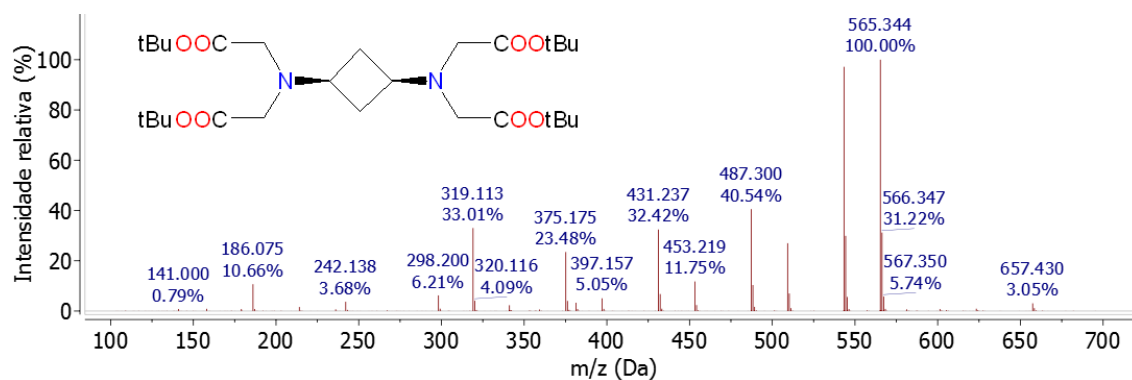
- Complexes as Potential MRI Contrast Agents. *Inorg Chem.* 2015;54(19):9576–87.
79. Anderegg G. Pyridine derivatives as complexing agents XII.: Thermodynamics of Complex Formation with 2-Pyridylmethyl-iminodiacetic Acid and its 6-Methyl Substituted Derivative. *J Coord Chem.* 1981;11(3):171–5.
80. Pujales-Paradela R, Carniato F, Uzal-Varela R, Brandariz I, Iglesias E, Platas-Iglesias C, et al. A pentadentate member of the picolinate family for Mn(ii) complexation and an amphiphilic derivative. *Dalton Transactions.* 2019;48(2):696–710.
81. L'Eplattenier FL, Murase I, Martell AE. New Multidentate Ligands. VI. Chelating Tendencies of N,N'-Di(2-hydroxybenzyl)ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid. *J Am Chem Soc.* 1967;89(4):837–43.
82. Rocklage SM, Sheffer SH, Cacheris WP, Quay SC, Ekkehardt Hahn F, Raymond KN. Structural and Thermodynamic Characterization of Manganese (II) N,N'-Dipyridoxylethylenediamine-N,N'-diacetate. A Novel Manganese(II) Chelate. *Inorg Chem.* 1988;27(20):3530–4.
83. Rocklage SM, Cacheris WP, Quay SC, Hahn FE, Raymond KN. Manganese(ii) N,n'-dipyridoxylethylenediamine-n,n'-diacetate 5,5'-bis(phosphate): Synthesis and Characterization of a Paramagnetic Chelate For Magnetic Resonance Imaging Enhancement. *Inorg Chem.* 1989;28(3):477–85.
84. Aime S, Anelli PL, Botta M, Brocchetta M, Canton S, Fedeli F, et al. Relaxometric evaluation of novel manganese(II) complexes for application as contrast agents in magnetic resonance imaging. *Journal of Biological Inorganic Chemistry.* 2002;7(1–2):58–67.
85. Kálmán FK, Tircsó G. Kinetic inertness of the Mn 2+ complexes formed with AAZTA and some open-chain EDTA derivatives. *Inorg Chem.* 2012;51(19):10065–7.
86. Gale EM, Mukherjee S, Liu C, Loving GS, Caravan P. Structure-redox-relaxivity relationships for redox responsive manganese-based magnetic resonance imaging probes. *Inorg Chem.* 2014;53(19):10748–61.

87. Novak V, Lucansky J, Svcekova M, Majer J. Neue Komplexe. XXXII. Synthese und Studium der Eigenschaften der 2-Methyl-1,2-diaminopropan-N,N,N',N'-tetraessigsäure. *Chem zvesti*. 1978;32(1):19–26.
88. Bjerrum J, Schwarzenbach G, Sillen LG. Stability Constants of Metal-Ion Complexes: Part I. Inorganic Ligands; 1957.
89. Molnár E, Váradi B, Garda Z, Botár R, Kálmán FK, Tóth É, et al. Remarkable differences and similarities between the isomeric Mn(II)-cis- and trans-1,2-diaminocyclohexane-N,N,N',N'-tetraacetate complexes. *Inorganica Chim Acta* [Internet]. 2018;472(li):254–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2017.07.071>
90. Gale EM, Mukherjee S, Liu C, Loving GS, Caravan P. Structure–redox–relaxivity relationships for redox responsive manganese-based Magnetic Resonance Imaging probes. *Inorg Chem*. 2014;53(19):10748–61.
91. Anderegg G. Komplexe XL. Die Protonierungskonstanten einiger Komplexe in verschiedenen wässrigen Salzmedien (NaClO₄, (CH₃)₄NCl, KNO₃). *Helv Chim Acta*. 1967;50(8):2333–40.
92. Pota K, Garda Z, Kálmán FK, Barriada JL, Esteban-Gómez D, Platas-Iglesias C, et al. Taking the next step toward inert Mn²⁺ complexes of open-chain ligands: The case of the rigid PhDTA ligand. *New Journal of Chemistry*. 2018;42(10):8001–11.
93. Nakasuka N, Kunimatsu M, Matsumura K, Tanaka M. Complexation of o-Phenylenediaminetetraacetic Acid with Some Bivalent First-Row Transition-Metal Ions in Aqueous Solution. *Inorg Chem*. 1985;24(1):10–5.
94. Porcar-Tost O, Pallier A, Esteban-Gómez D, Illa O, Platas-Iglesias C, Tóth É, et al. Stability, relaxometric and computational studies on Mn²⁺-complexes with ligands containing a cyclobutane scaffold. *Dalton Transactions*. 2021;50(3):1076–85.
95. Yuchi A, Wada H, Nakagawa G. Use of Ligand Buffers in the Determination of the Stability Constants of Metal Complexes with Ion-Selective Electrodes. *Analytical Sciences*. 1985;1(1):19–22.

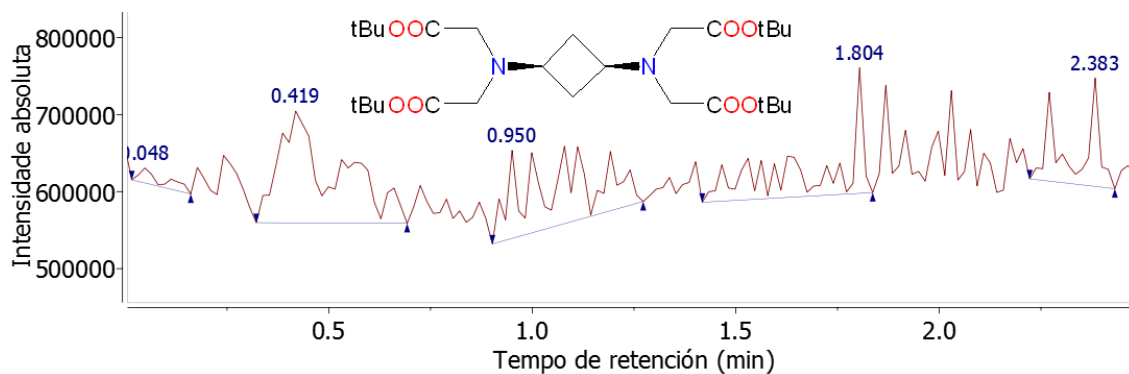
96. Gale EM, Atanasova IP, Blasi F, Ay I, Caravan P. A Manganese Alternative to Gadolinium for MRI Contrast. *J Am Chem Soc.* 2015;137(49):15548–57.
97. Novak V, Svickova M, Dvorakova E, Valaskova I, Majer J. Neue Komplexe XLIII. Azidobasische und chelatbildende Eigenschaften der Eigenschaften der rac-2,4-Diaminopentan-N,N,N', N' -tetraessigsäure. *Chem zvesti.* 1981;35(4):481–9.
98. Paoletti P, Vacca A. Thermochemical studies. Part XIII. Heats and entropies of reaction of tetraethylenepentamine with protons and bivalent transition-metal ions. *J Chem Soc.* 1964;(0):5051–7.
99. Durham EJ, Ryskiewich DP. The acid dissociation constants of diethylenetriaminepentaacetic acid and the stability constants of some of its metal chelates. *J Am Chem Soc.* 1958;80(18):4812–7.
100. Chelate M, Constants S. Metal Chelate Stability Constants of Aminopolycarboxylate Ligands. *Anal Chem.* 1960;32(2):249–56.
101. Anderegg G, Nägeli P, Müller F, Schwarzenbach G. Komplexe XXX. *Helv Chim Acta.* 1959;42(3):827–36.
102. Negri R, Baranyai Z, Tei L, B. Giovenzana GB, Platas-Iglesias C, Bényei AC, et al. Lower denticity leading to higher stability: structural and solution studies of Ln(III)–OBETA complexes. *Inorg Chem.* 2014;53(23):12499–511.

VIII.ANEXOS

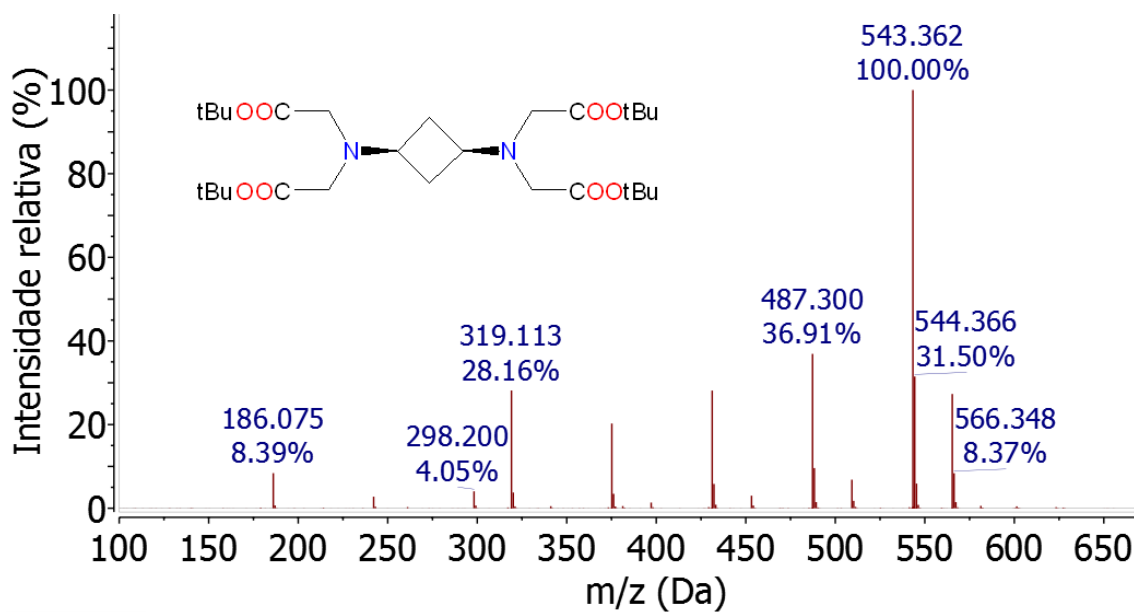
VIII.1. Espectrometría de masas de ESI positivo (L1a) antes de purificar

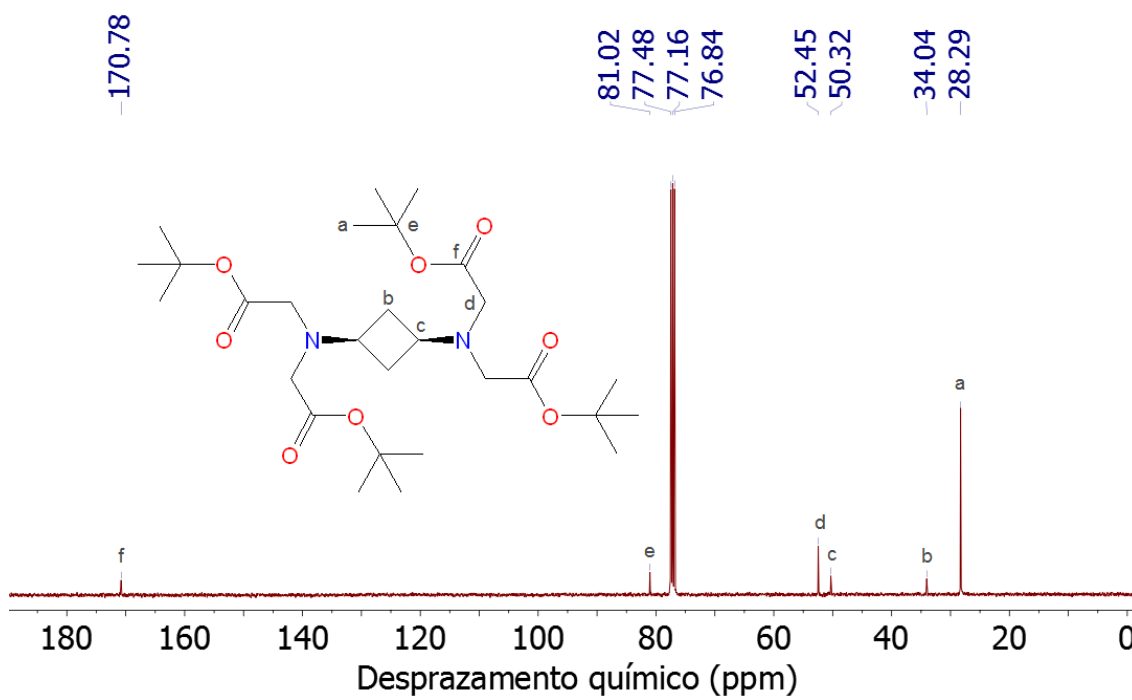
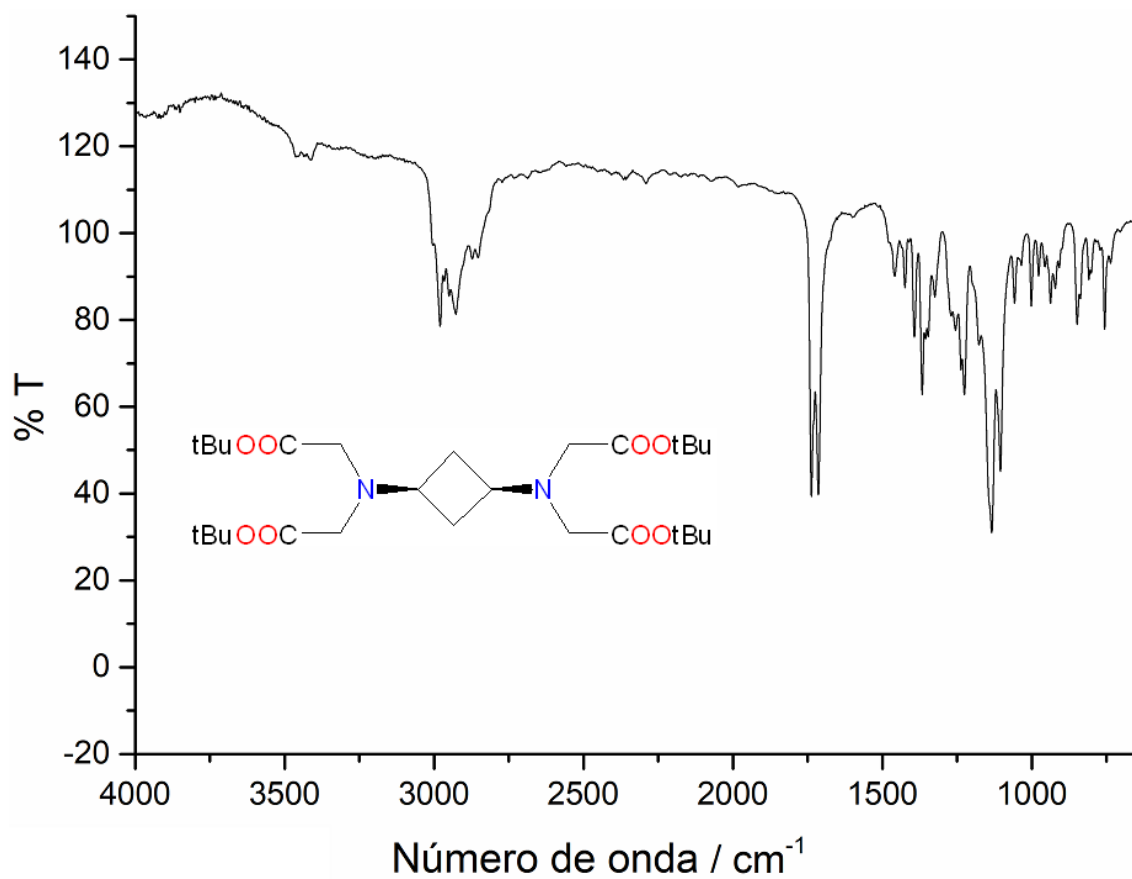


VIII.2. Espectrometría de masas de ESI negativo (L1a) antes de purificar

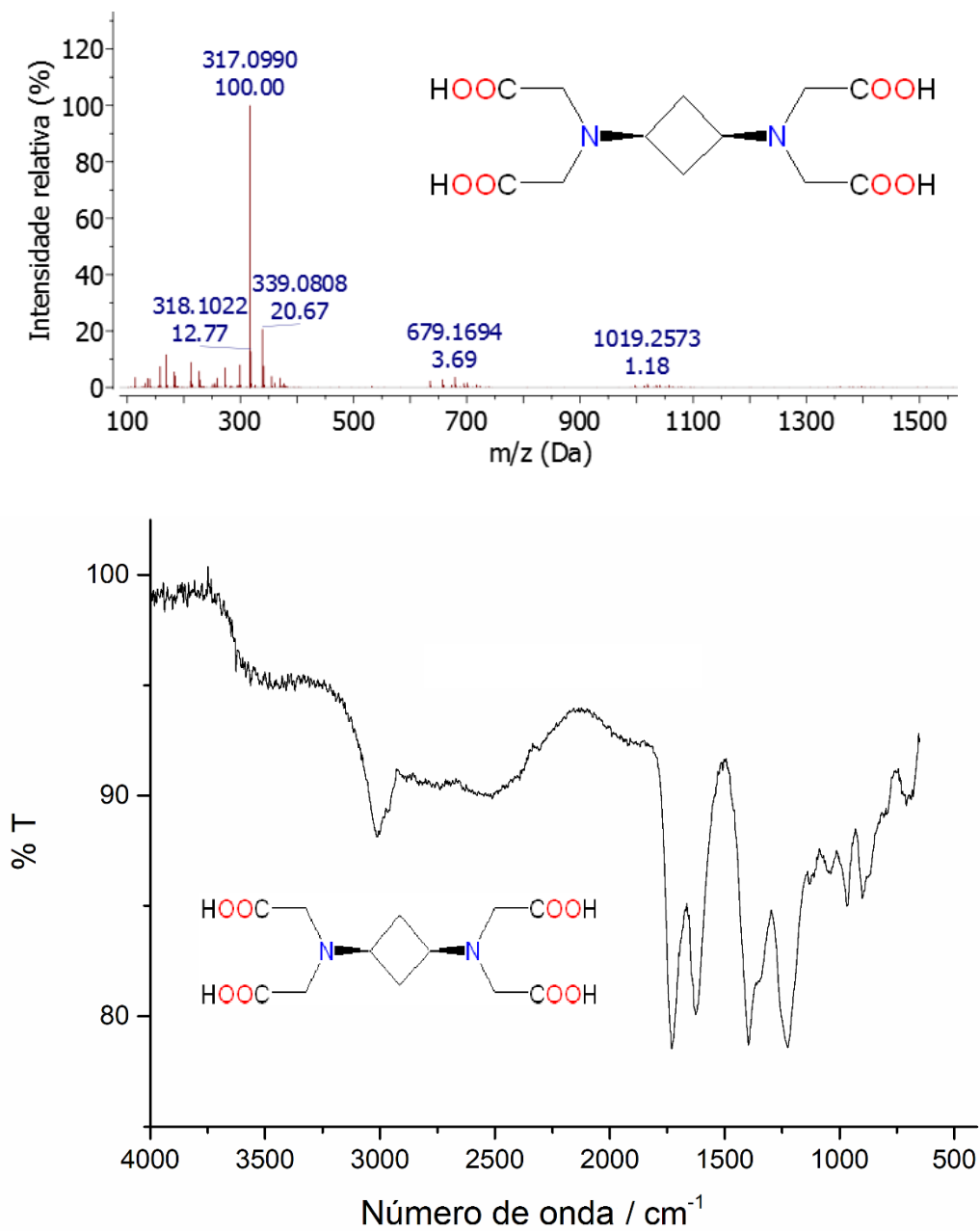


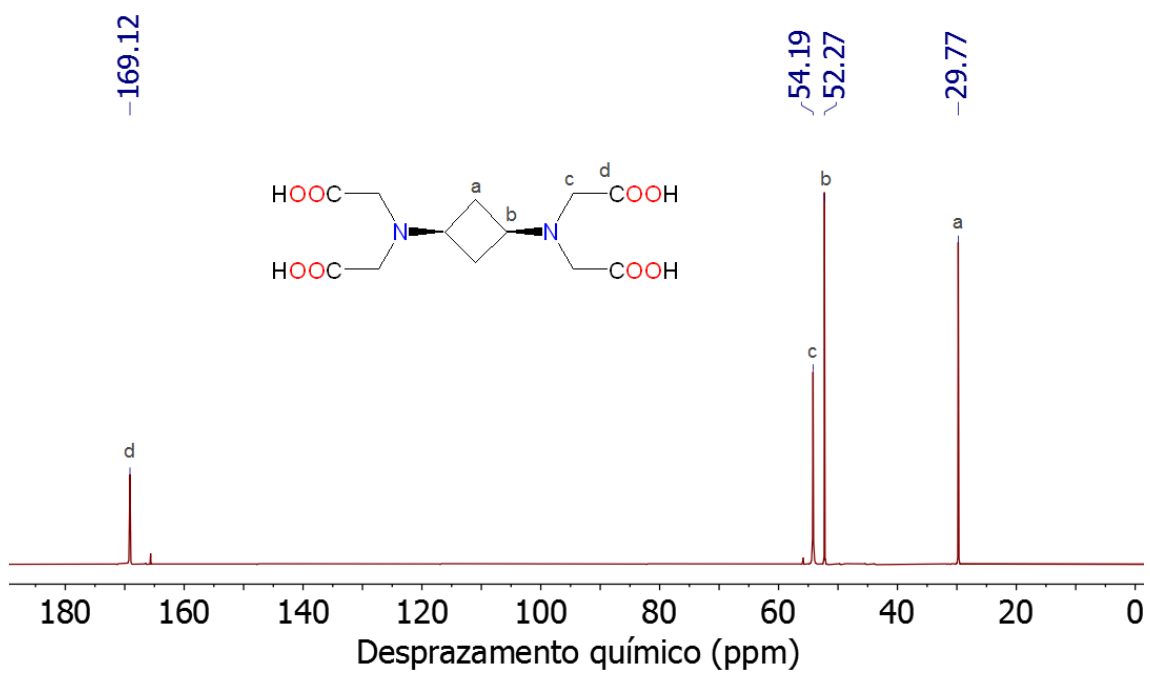
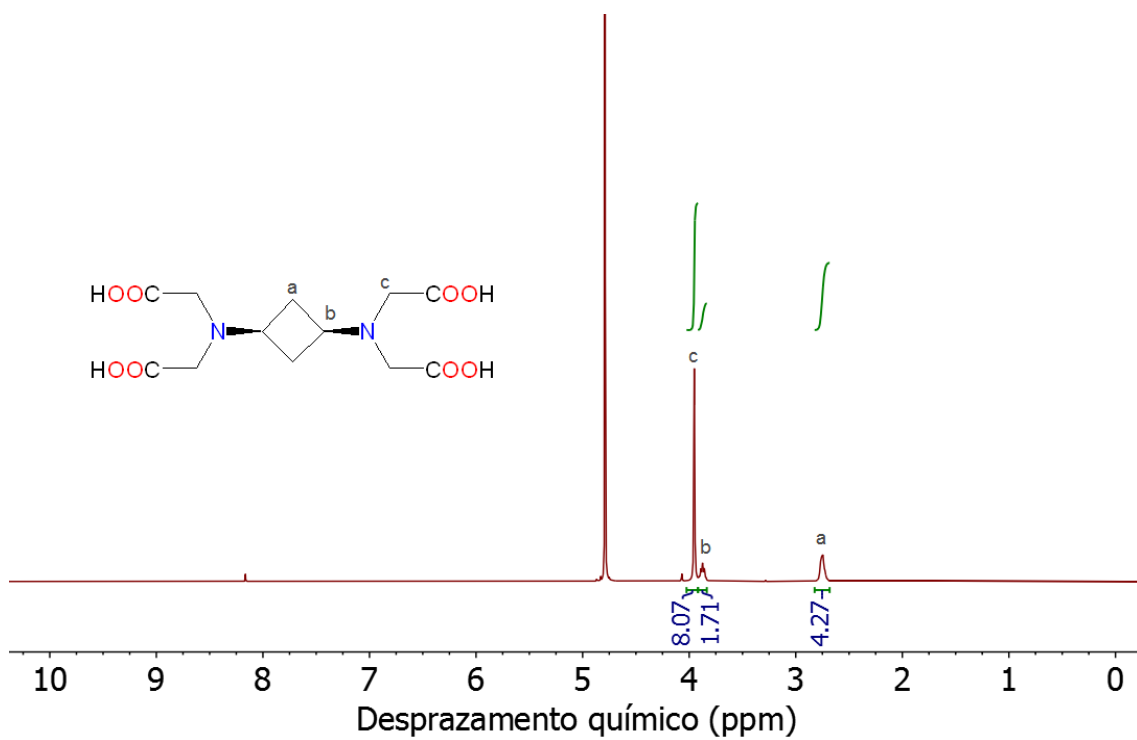
VIII.3. Caracterización de L1a



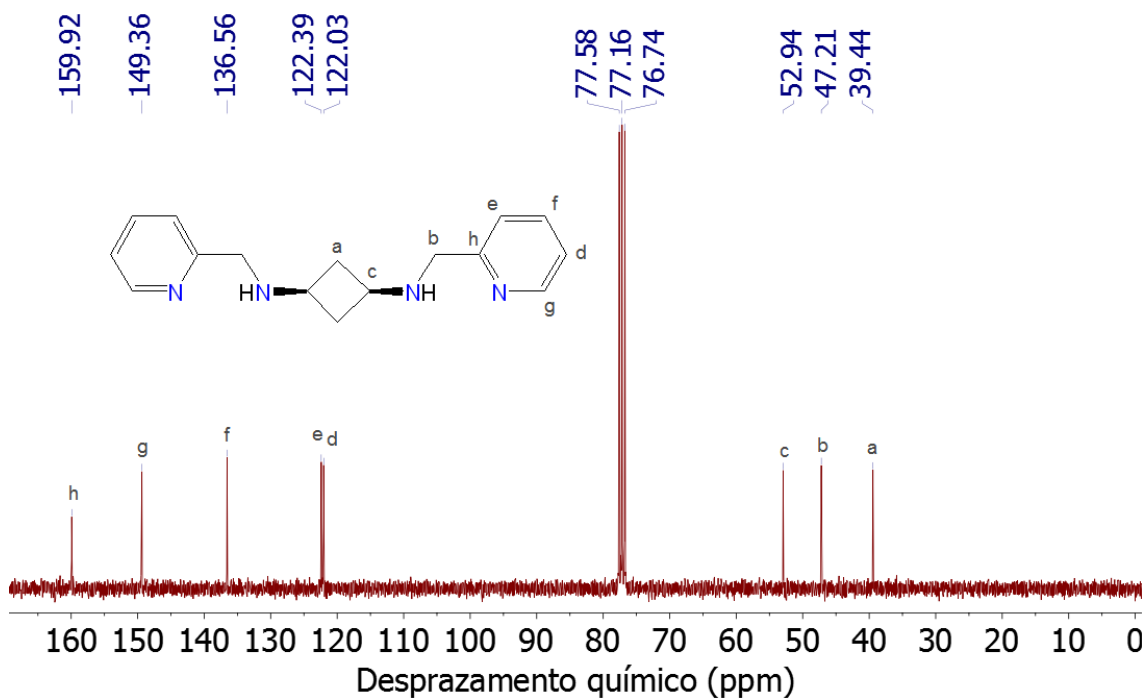
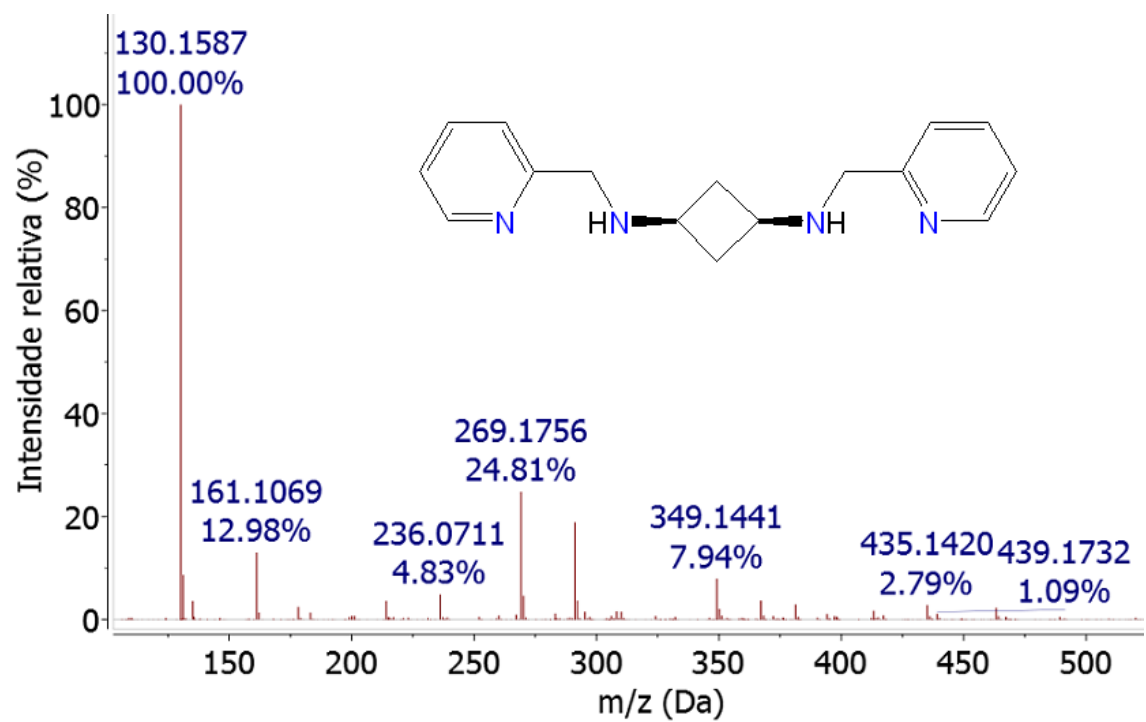


VIII.4. Caracterización de L1

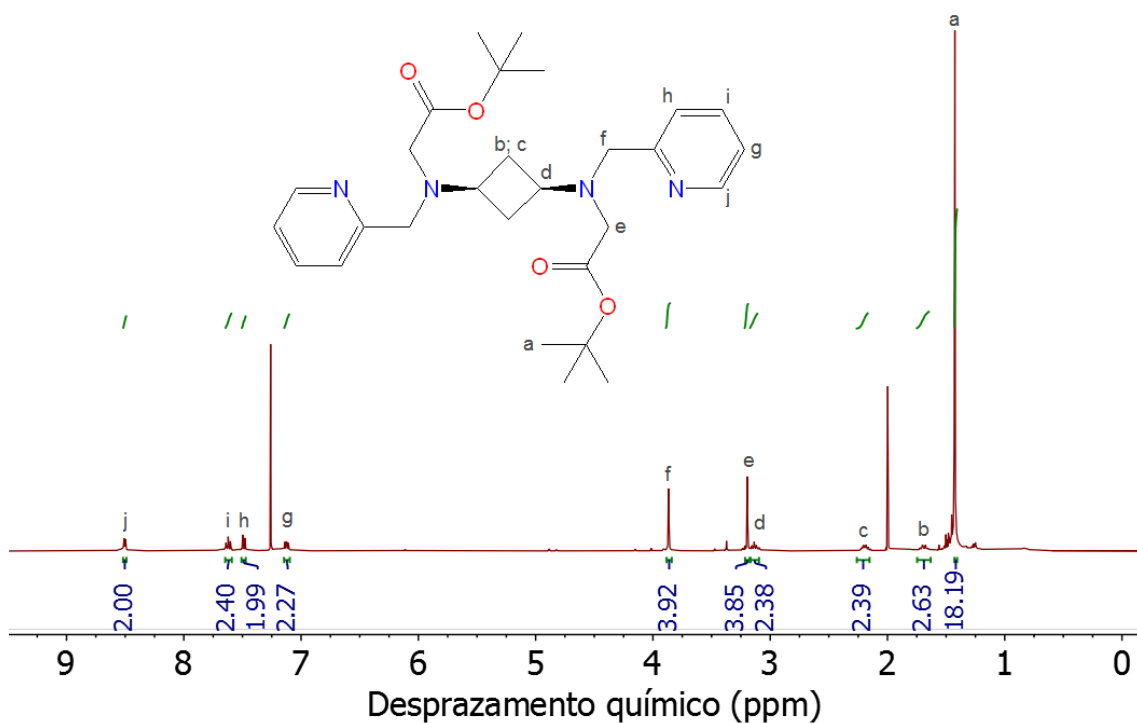
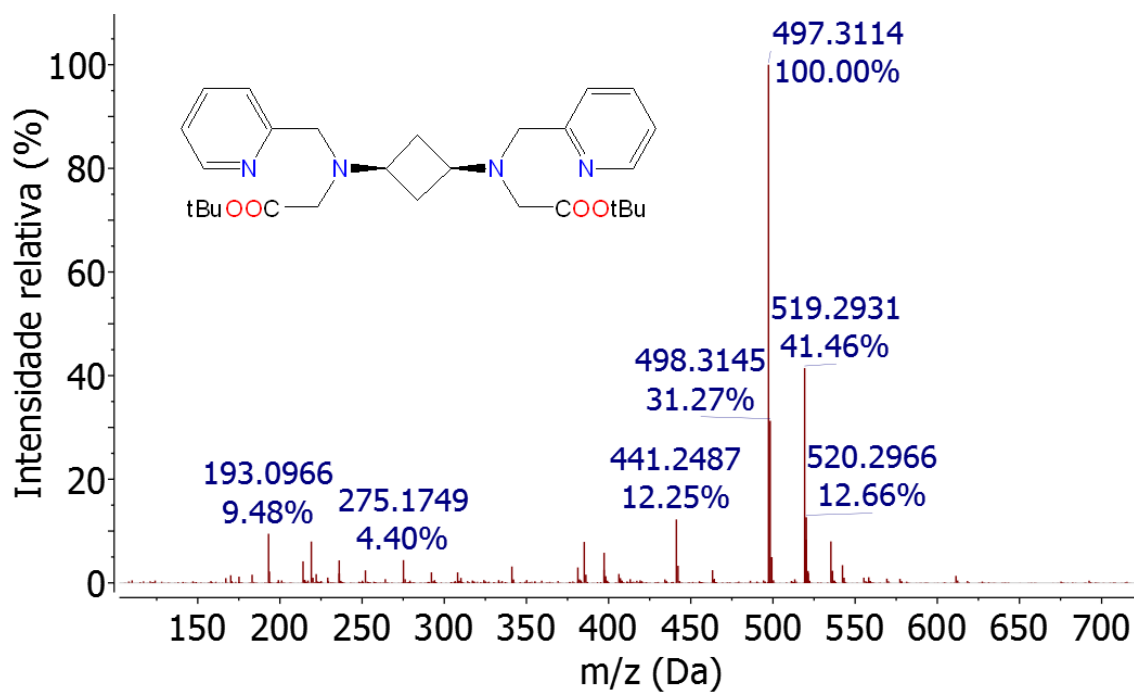


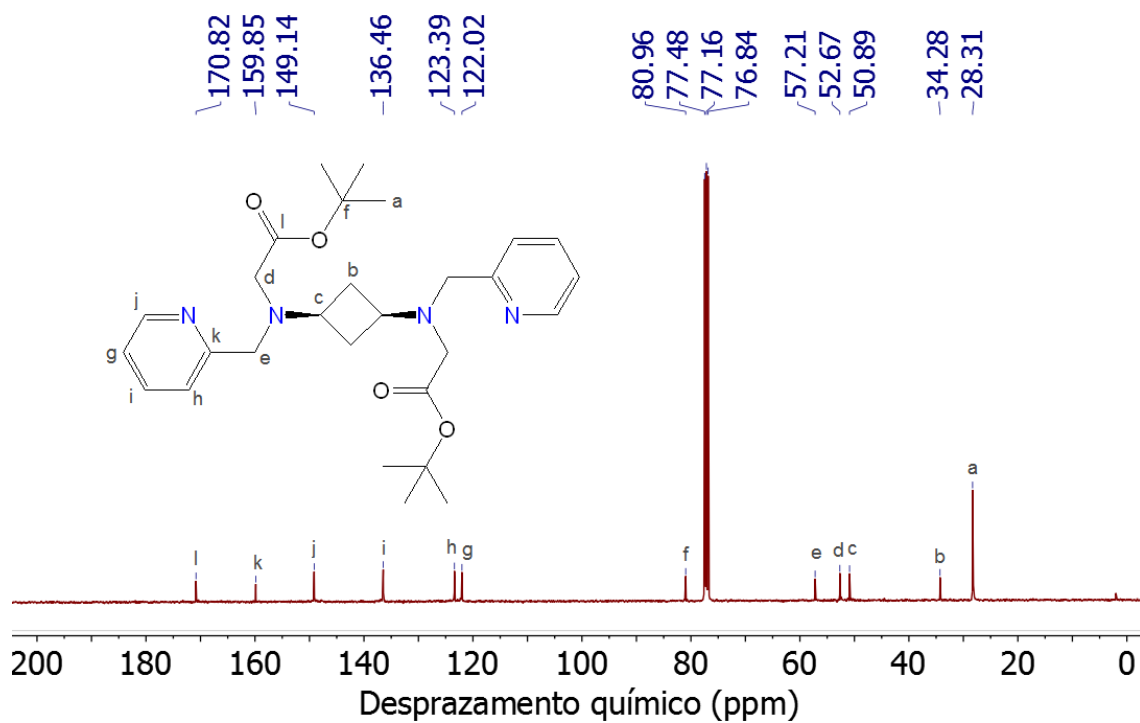


VIII.5. Caracterización de L2a



VIII.6. Caracterización de L2b





VIII.7. Caracterización de L2

