



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Química
Instituto de Ciencia Molecular

Complejos de ligandos azamacrocíclicos como miméticos de enzimas con actividad antioxidante

Memoria para la obtención del título de Doctor en Nanociencia y
Nanotecnología por la Universitat de València

Doctorando

D. Álvaro Martínez Camarena

Directores

Dr. D. Enrique García-España Monsonís

Dr. D. Roberto Tejero Toquero

Dr. D. José Miguel Llinares Berenguer

Julio de 2019

València



Dr. D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València, **Dr. D. Roberto Tejero Toquero**, Profesor del Departamento de Química Física de la Universitat de València y **Dr. D. José Miguel Llinares Berenguer**, Profesor del Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada “**Complejos de ligandos azamacrocíclicos como miméticos de enzimas con actividad antioxidante**”, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Ciencia Molecular de la Universitat de València por el graduado **D. Álvaro Martínez Camarena** y que, encontrándose concluida, autorizan su presentación para ser calificada como Tesis Doctoral.

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

En Burjassot, a 1 de julio de 2019

D. Enrique García-España Monsonís

D. Roberto Tejero Toquero

D. José Miguel Llinares Berenguer



D. Álvaro Martínez Camarena, Graduado en Química por la Universitat de València, presenta esta memoria con el título **“Complejos de ligandos azamacrocíclicos como miméticos de enzimas con actividad antioxidante”** en el marco del programa de doctorado en Nanociencia y Nanotecnología (RD 99/2011) con el fin de optar al título de doctor.

Y para que así conste, firma la presente en Burjassot, a 1 de julio de 2019.

D. Álvaro Martínez Camarena

AGRADECIMIENTOS

Escribía Saramago que *el objetivo de un viaje es tan solo el inicio de otro viaje*. La sensación -quizá no objetiva, pero pocas son las sensaciones que se cuentan como tales- es que con este escrito, con esta memoria, se da fin a una etapa y se da inicio a la siguiente.

Entré en este laboratorio en febrero de 2014, de la mano de una ayuda de iniciación a la investigación; y desde aquel momento los trabajos y becas se fueron concatenando hasta llegar hasta este punto en que me encuentro ahora mismo: TFG, TFM y tesis. En este contexto, entre estos tres muros blancos y esa pared de vidrio que transpira calor, he pasado algunos de los mejores y peores momentos de los últimos seis años. Pero lo cierto es que lo que me llevo compensa, por mucho, lo que he perdido.

Bien tempranamente, mi trabajo se desdobló en tres ramas de la investigación -la bioinorgánica, la orgánica y la teórica- que fueron trenzándose y entrecruzándose hasta conjugarse en una sola, en el trabajo que aquí presento. Y cada una de ellas tiene un nombre propio: Enrique, José Miguel y Roberto. Gran parte de la formación científica con que cuento a día de hoy se la debo a cada uno de mis directores de tesis y es a ellos, por lo tanto, a quienes deben ir dirigidas mis primeras palabras de agradecimiento.

En este sentido, debo acordarme de mi cuarta directora, cuyo nombre no aparece reflejado en ningún documento oficial pero sin cuya ayuda habría sido mucho más difícil sacar adelante este trabajo. Moltes gràcies per tot, Conxa.

Pero no solo de ciencia vive el hombre. Durante estos seis años he tenido la oportunidad de conocer a algunas de las mejores personas con las que he tenido la suerte de cruzarme. Ese tipo de influencias que te acompañan tanto dentro, como fuera del laboratorio; las responsables de mantenerte a flote en esta marea de síntesis y ensayos. Dentro de este grupo puedo contar a Isabel y Òscar; pero también a Cristina y a Lluís. A todos ellos les debo mucho más de lo que ellos mismos puedan pensar que me han dado. Y es que sin ellos, nada de esto habría sido posible.

Llegado este punto, me gustaría hacer mención también al resto de compa-

ñeros de grupo de Supramol que me han acompañado en el laboratorio durante estos años. Aquellos que durante todo este tiempo me han ayudado sin dudarlos: Aida, Alberto, Ariadna, Bego, Elena, Inés, Jan, Jorge, Mario, M. Paz, Salva o Teresa. Igualmente, me gustaría hacer extensible el agradecimiento al resto a gente que he ido conociendo en el ICMol y que, en mayor o menor medida, me han acompañado durante todo este tiempo, como Garin, Javi, Marc, Vero o *el Viajero*.

Como contrapunto -y complemento- al trabajo hecho en València, tuve la fortuna de que el contrato que posibilitó la tesis también me permitiese solicitar dos estancias de investigación, que en ambos casos resultaron concedidas. Gracias a ellas pude enriquecerme enormemente a nivel científico, al tiempo que pude comprobar la fragilidad de unos postulados que hoy parecen renacer a lo largo y ancho de Europa. Pero lo que sin duda guardo con más estima de ese tiempo es el haber tenido la oportunidad de conocer a dos personas en particular: a Pedro y a Matteo; principales artífices del éxito de ambas estancias.

La primera de las estancias tuvo lugar en el verano de 2017, en Viena. En ella tuve la suerte de trabajar en el grupo de la profesora Leticia González ampliando mi formación en modelización teórica. Es por ello que me gustaría agradecerle la amabilidad que mostró siempre conmigo, así como su generosidad al cederme un sitio en su grupo y espacio en la siempre codiciada granja. Pero si me acuerdo de Viena, debo también acordarme de Pedro, con quien tuve la suerte de trabajar y aprender. Gran parte del trabajo teórico presente en esta tesis, y del buen recuerdo que guardo de Austria -y su *Wieselburger Bier*-, se lo debo a él.

La segunda de las estancias se realizó en el otoño de 2018, en el laboratorio del profesor Antonio Bianchi, en Florencia. A él le quiero agradecer la generosidad y la paciencia que mostró siempre conmigo; analizando las constantes, discutiendo los calores y digiriendo *le bistecche*. Asimismo, quiero acordarme en este punto de Matteo, con quien tanto tiempo pasé discutiendo sobre constantes de protonación, comida y Salvini; y a quien le debo tan buen recuerdo de la Toscana y de Siena en particular. *Alcun giorno accetterai quanto sono buone le pizze cinesi di Prato*.

Pero más allá de la gente que he sentido más cercana durante este tiempo, lo cierto es que este trabajo no habría sido posible sin la participación de muchas

otras personas que he ido conociendo a lo largo de estos años, y a quienes les quiero agradecer su contribución.

En primer lugar, me gustaría darle las gracias a Manuel García Basallote y su grupo de investigación de la Universidad de Cádiz (especialmente a Andrea y Andrés) por los estudios cinéticos que realizaron y cuya contribución ha resultado fundamental para entender la interacción de ciertos ligandos con el Cu(II).

Asimismo, me gustaría también agradecer a Antonio Domènech su ayuda durante aquellas mañanas de voltamperometrías, así como por despertar en mi el interés por la electroquímica.

Quiero también agradecer el trabajo de una parte habitualmente oculta de la investigación, como son los técnicos y el personal de administración y servicios que participaron en el día a día de este trabajo: Isabel, César, Sales, Salomé, Paco, Fina y Mayte; y especialmente a Mari Carmen, sin la cual el laboratorio habría estado mucho más vacío.

Para finalizar los agradecimientos quiero acordarme de ciertas personas que, aún siendo ajenas a la tesis y al propio trabajo, han hecho posible que haya podido recorrer el camino que aquí acaba.

En primer lugar, debo agradecerlos a vosotros, Dani, Agus y Alba, haber estado siempre ahí, bien fuese para hablar, o para beber; pero siempre a mi lado. Es imposible no acordarme en estos momentos de todos los exámenes que hicimos y estudiamos juntos, de todas las paellas (en *ca' la'uela* y en el descampado de la ETSE) que nos comimos, en las barajas que perdimos o rompimos y todos los momentos que, en definitiva, pasamos juntos. Y es que sin vosotros, no estaría hoy aquí.

Y en segundo lugar quiero acordarme de la tercera pata sobre la que se ha soportado este trabajo, mi familia. Por eso quiero darles gracias a ellos, a mis padres y mi hermano, que me han dado siempre lo mejor con que contaban y me han ayudado a ser quien soy hoy.

Por último, me gustaría agradecer la contribución económica del Ministerio de Ciencia, Investigación y Universidades del Gobierno de España. En este sentido, cabe añadir que esta tesis ha sido realizada dentro del marco del programa de

Formación de Profesorado Universitario (FPU), mediante el contrato para la realización de una tesis doctoral FPU14/05098, así como dos ayudas para la realización de estancias breves EST16/00533 y EST17/00666.

A los que buscan,
aunque no encuentren.

A los que avanzan,
aunque se pierdan.

A los que viven,
aunque se mueran.

Mario Benedetti

Índice general

Índice de figuras	XXXI
Índice de tablas	XXXVI
Abstract	XXXVII
Glosario	XXXIX
1. Introducción	1
1.1. Parte I. El dioxígeno y sus especies	5
1.1.1. El dioxígeno	5
1.1.2. Las especies reactivas de oxígeno	8
1.1.3. Enfermedades asociadas a las ROS	11
1.1.4. El radical superóxido	20
1.2. Parte II. Los sistemas antioxidantes	25
1.2.1. Sistemas antioxidantes endógenos: la SOD	25
1.2.2. Sistemas antioxidantes endógenos: la Catalasa	41
1.2.3. Miméticos de la SOD	44
1.3. Parte III. Una nueva perspectiva	51
1.3.1. Diseño de nuevos miméticos	52
1.3.2. La Química Supramolecular	55
1.3.3. La Nanociencia y la Nanotecnología	58
1.3.4. Diseño de los nuevos ligandos	59

2. Objetivos	63
3. Materials & Methods	69
3.1. Reagents & solvents	71
3.2. Instrumental techniques	71
3.2.1. Calorimetric studies	71
3.2.2. Computational studies	72
3.2.3. Dynamic light scattering	74
3.2.4. Electrochemical measurements	75
3.2.5. Elemental analysis	75
3.2.6. Kinetic experiments	75
3.2.7. Inductively coupled plasma - mass spectrometry	76
3.2.8. Mass spectrometry	77
3.2.9. NMR measurements	77
3.2.10. Catalase activity assay	78
3.2.11. Potentiometric studies	81
3.2.12. Powder X-ray diffraction	85
3.2.13. Single crystal X-ray diffraction	85
3.2.14. Superoxide dismutase activity assay	86
3.2.15. UV-Vis measurements	96
3.2.16. Z-potential determination	96
4. Synthesis & Characterization	97
4.1. Synthesis: A general overview	99
4.2. Synthesis of aromatic spacers	103
4.2.1. Synthesis of spacer V	103
4.2.2. Synthesis of spacer VIII	108
4.3. Synthesis of the ligands	112
4.3.1. Amino group protection with tosyl group	112
4.3.2. Lengthening of lineal polyamines	116
4.3.3. Removal of phthalimide groups	118
4.3.4. Cyclisation	120

4.3.5.	Removal of tosyl and benzyl groups	128
4.3.6.	Alkylation of secondary amines with <i>i</i> Pr groups	135
4.3.7.	Methylation of the secondary amines	137
4.3.8.	Esterification of acid groups	140
4.4.	Synthesis of the amino-nanozymes	142
4.4.1.	Synthesis of the nanoparticles	142
4.4.2.	Functionalisation of the nanoparticles	145
5.	Comportamiento ácido base	151
5.1.	Introducción	153
5.2.	Ligandos mononucleantes	154
5.3.	Ligandos binucleantes	176
6.	Química de coordinación	181
6.1.	Introducción	183
6.2.	Ligandos mononucleantes	184
6.2.1.	Estudios de complejación con Cu(II)	184
6.2.2.	Estudios de complejación con Fe(II)	206
6.3.	Ligandos binucleantes	212
6.3.1.	Estudios de complejación con Cu(II)	212
6.3.2.	Estudios de complejación con Zn(II)	221
6.3.3.	Estudios de complejación mixtos con Cu(II) y Zn(II)	225
7.	Actividad antioxidante	229
7.1.	Introducción	231
7.2.	Influencia de la alquilación	232
7.3.	Influencia de los grupos isopropilo	243
7.4.	Influencia del sustituyente hidroxilo	256
7.5.	Influencia del sustituyente carboxílico	259
7.6.	Influencia de la ampliación de la cadena	261
7.7.	Efecto del uso de nanopartículas	267
7.8.	Actividad SOD de los complejos de Fe(II)	277
7.9.	Estudio de la actividad catalasa	278

8. Conclusions	287
A. Espectros RMN	295
B. Deducción cinética	315
C. Tablas cristalográficas	321
D. Publicaciones	327
Bibliografía	330

Índice de figuras

1.1. Diagrama de orbitales moleculares del dioxígeno en A) su estado fundamental triplete y B) su estado excitado singlete. C) Estructura de resonancia del O ₂ triplete en su estado fundamental. ¹²	7
1.2. Esquema de la formación de las diferentes especies reactivas de oxígeno a partir de dioxígeno triplete. El dioxígeno puede excitarse o reducirse para pasar a formar oxígeno singlete o el radical superóxido, respectivamente. A su vez, el superóxido puede dismutar para dar peróxido de hidrógeno, que puede reaccionar con Fe ²⁺ para formar los radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton. ¹⁶	8
1.3. Representación del efecto del estrés oxidativo sobre un tejido neuronal. .	13
1.4. Representación esquemática del proceso de división proteolítica de la PPA. En la ruta no amiloidógena, la PPA es metabolizada dando lugar a las formas truncadas de la Aβ: Aβ ₁₋₁₆ y Aβ _{17-40/42} . En la vía amiloidógena, en cambio, la degradación de la APP da lugar al péptido Aβ _{1-40/42} que, por interacción con los metales del medio, puede llegar a oligomerizar y, finalmente, formar las fibras Aβ, precursoras de las placas amiloides. ⁶⁹ .	16
1.5. Representación de cuatro de los confórmers determinados para la proteína β-amiloidea (PDB ID 2MXU). ⁷⁴	17
1.6. Imágenes SEM de depósitos de placas β-amiloides sobre tejido vascular de cerebro de ratón. ⁸⁰	17
1.7. Diagrama de orbitales moleculares del anión radical superóxido en su estado fundamental.	20

1.8. Producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en células de mamíferos. ²²	23
1.9. Representación de la estructura del enzima CuZn-SOD, así como de su centro activo. (PDB ID 2JLP) ¹¹¹ Los metales han sido representados como esferas de radio arbitrario.	28
1.10. Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la dismutación de los radicales superóxido cuando es llevado a cabo por la CuZn-SOD. ^{112,113}	29
1.11. Representación de la estructura del enzima MnSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1VEW) ¹²⁰ El átomo de manganeso ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.	32
1.12. Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la dismutación de los radicales superóxido cuando es llevado a cabo por la Mn-SOD. ^{112,121}	33
1.13. Representación de la estructura del enzima FeSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1ISA) ¹²⁶ El átomo de hierro ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.	35
1.14. A) Superposición de las estructuras de la Mn-SOD (en verde) y la Fe-SOD (en ocre) y B) detalle del centro activo de las proteínas superpuestas. En ambas representaciones tan solo se muestra un monómero. PDB ID 1VEW ¹²⁰ para la Mn-SOD y 1ISA ¹²⁶ para la Fe-SOD.	36
1.15. Representación de los potenciales medios de la reducción de los pares Mn^{3+}/Mn^{2+} y Fe^{3+}/Fe^{2+} para los sistemas libres y cuando están coordinados por la Mn-SOD y la Fe-SOD. Adaptación del trabajo de Miller <i>et al.</i> ¹⁰⁵	38
1.16. Representación de la estructura del enzima NiSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1T6U) ¹³³ El átomo de níquel ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.	40
1.17. Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la dismutación de los radicales superóxido cuando es llevado a cabo por la Ni-SOD. ¹³³	41

1.18. Representación de la estructura de la catalasa de eritrocito humano, así como de su centro activo (PDB ID 1DGF). ¹³⁸ El átomo de hierro ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.	43
1.19. Representación de los complejos de Mn(II) con el ligando [15]aneN ₅ y algunos de sus derivados. ^{153,154}	46
1.20. Complejos de Mn(II) con actividad SOD de A) Shen <i>et al.</i> , ¹⁵⁷ B) Valtancoli <i>et al.</i> , ¹⁵⁸ , C) Mahy <i>et al.</i> , ¹⁵⁹ D) Ghosh <i>et al.</i> ¹⁶⁰ y Salvemini ¹⁵⁵	46
1.21. Representación de diversos complejos binucleares de Cu(II) o Cu(II)-Zn(II) descritos por A) Lippard <i>et al.</i> , ¹⁶¹ B) Rey <i>et al.</i> , ¹⁶⁶ C) Lehn <i>et al.</i> ^{162,163} y D) Kiss <i>et al.</i> ¹⁶⁷	47
1.22. Estructura fundamental de un tetraazamacrociclo con sustituyente piridina. ^{68,173-176}	49
1.23. Representación de diversos ligandos desarrollados por el GQS-UV. ¹⁷⁹⁻¹⁸⁴	50
1.24. Representación del diagrama de energía libre a partir de un estado entáptico o uno convencional. ¹⁸⁸	54
1.25. A) Representación de algunos de los criptandos desarrollados por Lehn. B) Esquema del “músculo artificial” desarrollado por Sauvage. ¹⁹⁶⁻¹⁹⁹ . . .	56
1.26. Representación esquemática de un proceso de catálisis supramolecular: la hidrólisis de un fenilacetato llevada a cabo por una ciclodextrina. ²⁰⁶ . . .	57
1.27. Ligandos diseñados, sintetizados y estudiados en la tesis. Los ligandos L1-H , L1-Me₃ y L2-H han sido descritos anteriormente. ^{68,175,176,187,228} . . .	60
3.1. Scheme of the components of the potentiometric system.	81
3.2. Scheme of the O ₂ ^{•-} generation reaction carried out by the xanthine oxidoreductase enzyme. XOR structure was taken from the Protein Data Bank (PDB, ID 1FIQ). ²⁸⁵	87
3.3. Scheme of the reduction reaction for the NBT. Proposal of mechanism. . .	88
3.4. Variation of the absorbance at 560 nm with time in a regular SOD assay. .	90
3.5. Representation of the experimental results for a typical SOD assay (red points) and its theoretical fitting (blue line).	95

4.1. Reaction scheme for the synthesis of macrocycles proposed by Richman and Atkins in 1974. ²⁹¹	99
4.2. General scheme of the synthesis carried out in the present work.	100
4.3. Reaction scheme for the synthesis of the ligands L1 - L4	101
4.4. Reaction scheme for the synthesis of the ligands L5 and L6	102
4.5. Reaction scheme for the synthesis of V	103
4.6. Reaction scheme for the synthesis of II	104
4.7. Reaction scheme for the synthesis of III	105
4.8. Reaction scheme for the synthesis of IV	106
4.9. Reaction scheme for the synthesis of V	107
4.10. Reaction scheme for the synthesis of VIII	108
4.11. Mechanism of reaction proposed for the hydromethylation process. ^{301,302}	109
4.12. Reaction scheme for the synthesis of VII	110
4.13. Reaction scheme for the synthesis of VIII	111
4.14. Mechanism reaction scheme for the tosylation of an amino group.	112
4.15. Mechanism reaction scheme for the alkylation of an amino group during the lengthening of a lineal polyamine.	116
4.16. Mechanism reaction scheme for the removal of the phtalimide groups.	118
4.17. Mechanism reaction scheme for the cyclisation of compound 3	122
4.18. Mechanism reaction scheme for the removal of benzyl groups.	130
4.19. Mechanism reaction scheme for the removal of tosyl groups.	130
4.20. Mechanism reaction scheme for the alkylation of the secondary amines with 2-bromoisopropane.	135
4.21. Mechanism reaction scheme for the methylation reaction following the Eschweiler-Clarke procedure.	138
4.22. Mechanism reaction scheme for the esterification of the acid groups.	140
4.23. Schematic representation of a typical sol-gel process.	143
4.24. Synthetic procedure for the synthesis of boehmite nanoparticles (BNPs).	144
4.25. Experimental (continuous line) and theoretical (discrete values) X-ray powder diffraction pattern of the boehmite nanoparticles.	144
4.26. Experimental size distribution of the oxidic nanoparticles.	145

4.27. Synthetic procedure for the grafting of the acid derivative ligands on the boehmite nanoparticles (BNPs).	146
4.28. Synthetic procedure for the grafting of the hydroxyl derivative ligands on the boehmite nanoparticles.	148
4.29. Experimental ζ -potential of the oxidic nanoparticles. The continuous lines correspond to the non-functionalised nanoparticles. A) The dotted lines correspond to the NPs functionalised with L3-Me₃ and the dotted-dashed ones to the NPs functionalised with L3-H . B) The dotted lines correspond to the NPs functionalised with L5 and the dotted-dashed ones to the NPs functionalised with L6	149
5.1. Diagramas de distribución de los ligandos L1-H , L1-Me₃ y L1-MeiPr₂ , calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama del ligando L1-MeiPr₂ se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 266 nm (línea punteada). [L]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	155
5.2. Espectros ¹ H RMN del ligando L1-Me₃ realizados en D ₂ O de pD 1.45 a 12.45.	158
5.3. Espectros ¹ H RMN del ligando L1-MeiPr₂ realizados en D ₂ O de pD 0.88 a 12.99.	158
5.4. Estructura del catión HL1-MeiPr₂⁺ determinada mediante difracción de rayos X en monocristal.	159
5.5. Secuencia de protonación del grupo de ligandos L1.	160
5.6. Diagramas de distribución de los ligandos L2-H y L2-Me₃ , calculados a partir de las constantes potenciométricas. En los diagramas se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 258 y 273 nm para L2-H y L2-Me₃ , respectivamente (línea punteada). [L]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas. . .	165
5.7. Espectros ¹ H RMN del ligando L2-Me₃ realizados en D ₂ O de pD 0.80 a 11.83.	168
5.8. Representación del equilibrio ceto-enólico del grupo piridol.	169
5.9. Representación de los resultados de la modelización para el equilibrio ceto-enólico del grupo piridol. Nivel de teoría B3LYP-D3/def2-TZVP. . .	170

5.10. Diagramas de distribución de los ligandos L3-H , L3-Me₃ y L4-Me₃ , calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de L3-H se ha superpuesto su absorbancia UV-Vis a 277 nm (línea punteada). [L]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	174
5.11. A) Estructura del catión H ₃ L3-H ³⁺ determinada mediante difracción de rayos X en monocristal. B) Detalle de la ordenación del sistema en la estructura cristalina.	175
5.12. Estructura de los compuestos L7 y L8 . ¹⁸⁰	177
5.13. Diagramas de distribución de los ligandos L5 , L6 , L7 y L8 , calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de los ligandos L5 , L6 y L10 se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 271, 248 y 261 nm, respectivamente (línea punteada). [L]=10 ⁻³ M. Todas las cargas han sido omitidas.	178
5.14. Representación de los espectros de absorción de los ligandos L6 (en amarillo) y L8 (en rojo) a partir de su coeficiente de extinción molar en función de λ. Espectros medidos en agua a pH 7 y 298.1 K.	180
6.1. Diagramas de distribución de los complejos de L1-H , L1-Me₃ y L1-MeiPr₂ con Cu(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. Las cargas han sido omitidas. [L]=[Cu]=10 ⁻³ M.	185
6.2. Diagramas de distribución de los complejos de Cu(II) formados en una disolución que contiene un equivalente de cobre y un equivalente de cada uno de los ligandos del grupo L1 (L1-H , L1-Me₃ y L1-MeiPr₂). [L]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	186
6.3. Representación de las estructuras cristalinas de los complejos de Cu(II): A) [Cu(L1-MeiPr₂)Cl](ClO ₄) y B) [Cu(L1-MeiPr₂)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ · H ₂ O.	188
6.4. Representación de la estructura cristalina de dos complejos de fórmula [Cu(L1-MeiPr₂)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ · H ₂ O unidos a través de una red de puentes de hidrógeno.	189

- 6.5. Espectro de absorción de disoluciones acuosas de $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ (línea roja), $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ (línea naranja punteada) y $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ (línea verde punteada). Todos los espectros han sido medidos a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. $[\text{Cu}]_0 = [\text{L}]_0 = 10^{-3}$ M. 190
- 6.6. Representación de la dependencia con la concentración de ácido de las constantes observadas de velocidad de disociación de: A) $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y B) $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ (círculos negros), $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ (círculos blancos) y mezcla de las dos especies (triángulos). Todas las cinéticas han sido realizadas a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. Para el complejo $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ existe un paso cinético previo demasiado rápido para ser medido incluso mediante las técnicas de *stop-flow*. $[\text{Cu}]_0 = [\text{L}]_0 = 10^{-3}$ M. 191
- 6.7. Representación de la dependencia con el pH de las constantes observadas de velocidad de formación de: A) complejo $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y B) complejo $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$. Todas las cinéticas han sido realizadas a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. $[\text{Cu}]_0 = [\text{L}]_0 = 10^{-3}$ M. 195
- 6.8. Representación de la dependencia con la concentración de ácido (izquierda) y con el pH (derecha) de la constante observada de velocidad para la formación del complejo $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. La línea continua representa el ajuste de los datos a la ecuación 6.7 en el texto principal. 196
- 6.9. Representación de la dependencia con la concentración de ácido (izquierda) y con el pH (derecha) de la constante observada de velocidad para la formación del complejo $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. La línea continua representa el ajuste de los datos a la ecuación 6.7 en el texto principal. 196
- 6.10. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de $[\text{CuL}]^{2+}$ 197
- 6.11. Orbital HOMO correspondiente a la estructura más estable de las especies monoprotonadas: A) HL1-Me_3^+ y B) HL1-MeiPr_2^+ y las diprotonadas C) $\text{H}_2\text{L1-Me}_3^{2+}$ y D) $\text{H}_2\text{L1-MeiPr}_2^{2+}$. En la representación se ha utilizado un valor de isosuperficie de 0.1. 200

6.12. Diagramas de distribución de los complejos de L2-H y L2-Me₃ con Cu(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de L2-H se ha superpuesto su absorbancia UV-Vis a 249 nm (línea punteada). [L]=[Cu]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	202
6.13. Diagramas de distribución de los complejos de L3-H , L3-Me₃ y L4-Me₃ con Cu(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de L3-H se ha superpuesto su absorbancia UV-Vis a 246 nm (línea punteada). [L]=[Cu]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	204
6.14. Representación de la estructura cristalina del complejos dimérico de fórmula [Cu(H-L ₁ L3-H) ₂ (μ-OH)]ClO ₄ , donde ambos cobres se encuentran unidos a través de un anión hidroxilo. Perspectiva oblicua (A) y lateral (B).	205
6.15. Diagramas de distribución de los complejos de L1-H y L1-Me₃ con Fe(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. [L]=[Fe]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	207
6.16. Diagramas de distribución de los complejos de L2-H y L2-Me₃ con Fe(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. [L]=[Fe]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	210
6.17. Diagramas de distribución de los complejos de L3-Me₃ y L4-Me₃ con Fe(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. [L]=[Fe]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	211
6.18. Estructura de los compuestos L7 y L8 . ¹⁸⁰	213
6.19. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para los ligandos L5 , L6 , L7 y L8 en relación 1:1 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama del ligando L5 se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 285 nm (línea punteada roja, transiciones π-π*) y a 590 nm (línea punteada azul, transiciones d-d del metal). En el diagrama del ligando L6 se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 280 nm (línea punteada roja, transiciones π-π*) y a 306 nm (línea punteada verde, transferencia de carga ligando Cu(II)). ³⁵⁹ [L]=[Cu]=10 ⁻³ M. Las cargas han sido omitidas.	215

- 6.20. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:2 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama del ligando **L5** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 285 nm (línea punteada roja, transiciones $\pi-\pi^*$) y a 590 nm (línea punteada azul, transiciones d-d del metal). En el diagrama del ligando **L6** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 281 nm (línea punteada roja, transiciones $\pi-\pi^*$) y a 314 nm (línea punteada verde, transferencia de carga ligando Cu(II)).³⁵⁹ [L]=[Cu]= 10^{-3} M. Las cargas han sido omitidas. 216
- 6.21. Estructuras optimizadas por DFT del complejo Cu(II):**L5** a pH fisiológico (7.40): A) Cu(II):**L5** 1:1, B) Cu(II):**L5** 2:1. Nivel de teoría B3LYP-D3/def2-TZVP. 220
- 6.22. Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:1 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. [L]= 10^{-3} M. Las cargas han sido omitidas. 224
- 6.23. Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:2 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de los ligandos **L5** y **L6** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 259 y 248 nm (línea punteadas rojas). [L]= 10^{-3} M. Las cargas han sido omitidas. . . 225
- 6.24. Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):Zn(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:1:1 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. [L]= 10^{-3} M. Las cargas han sido omitidas. 227
- 7.1. Valores de constante catalítica para los sistemas a) Cu**L15**,³⁶³ b) Cu**L12**,³⁶³ c) Cu**L1-Me**₃, d) Cu**L10**,¹⁸⁰ e) Cu**L1-H**, f) Cu**L9**,¹⁸⁰ g) Cu**L11**,²⁹⁰ h) Cu**L8**,¹⁸⁰ i) Cu**L14**,³⁶⁴ j) Cu**L13**,²⁹⁰ k) Cu**L14**,¹⁸⁰ l) Cu**L1-Me**iPr₂, m) Cu₂**L7**,¹⁸⁰ n) Cu₂**L9**,¹⁸⁰ o) Cu₂**L10**¹⁸⁰ y p) Cu₂**L8**¹⁸⁰. 234

7.2. Ligandos tomados como referencia para la comparativa de la actividad antioxidante de los ligandos estudiados en la presente tesis. Los ligandos L7 , L8 , L9 y L10 han sido tomados de las referencias ^{180,341} , los ligandos L11 y L13 de ²⁹⁰ y los ligandos L12 y L15 de ³⁶³	235
7.3. Voltamperogramas cíclicos de disoluciones de los complejos $[\text{CuL1-H}]^{2+}$ y $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ (miniatura). El registro de los espectros se ha iniciado a 0.25 V en sentido negativo, siendo cambiado a positivo a -0.25 (línea roja), -0.45 (línea ocre) y -0.65 V (línea azul). Todos los voltamperogramas han sido registrados utilizando un electro de lectura de grafito y otro de Ag/AgCl como referencia, con disoluciones 10^{-3} M de complejo en 0.15 M NaClO ₄ a pH 7.4. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1}	237
7.4. Voltamperograma cíclico de una disolución de $[\text{CuL1-H}]^{2+}$ 10^{-3} M en 0.15 M NaClO ₄ a pH 7.4. El registro de los espectros se ha iniciado a 0.25 V en sentido negativo, siendo cambiado a positivo a -0.25 (línea roja) y a -0.45 V (línea ocre). Todos los voltamperogramas han sido registrados utilizando un electro de lectura de grafito y otro de Ag/AgCl como referencia. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1}	238
7.5. Esquema del conjunto de procesos implicados en la electroquímica de los complejos del grupo L1 con Cu.	238
7.6. Voltamogramas cíclicos realizados en disolución desoxigenada (línea azul) o saturada de oxígeno (línea roja) 10^{-3} M de Cu-L1-MeiPr ₂ en 0.15 M NaClO ₄ a pH 7.4. Los barridos han sido realizados en sentido negativo, partiendo de un potencial de 0.25 V. Los voltamperogramas han sido registrados utilizando un electro de lectura de grafito y otro de Ag/AgCl como referencia. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1}	240

7.7. Voltamogramas cíclicos sobre electrodo de grafito, realizados en disolución saturada de oxígeno en 0.15 M NaClO ₄ a pH 7.4 en ausencia de complejos de cobre (línea ocre) y en presencia de Cu(I)L1-H 10 ⁻³ M (línea roja). La línea azul corresponde al voltamograma de la última disolución tras haber sido desoxigenada mediante burbujeo de Ar. Los barridos han sido realizados en sentido negativo, partiendo de un potencial de 0.25 V. Velocidad de barrido 50 mV s ⁻¹	241
7.8. Esquema propuesto para el mecanismo asociativo de dismutación de los radicales superóxido por CuL1-MeiPr ₂ : oxidación del superóxido a O ₂ (1 ^a semireacción) y reducción de una segunda molécula de superóxido a H ₂ O ₂ (2 ^a semireacción).	244
7.9. Representación de la estructuras cristalinas del complejo de Cu(II) [Cu(L1-MeiPr ₂)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂ ·H ₂ O.	246
7.10. Perfil energético (kJ mol ⁻¹ , B3LYP-D3/def2-svp/MDF10) del mecanismo del ciclo catalítico de dismutación del O ₂ ^{•-} cuando es llevado a cabo por el complejo CuL1-MeiPr ₂	249
7.11. Detalle de la trayectoria de QM/MM-MD (B3LYP-D3/def2-svp/MDF10) del complejo CuL1-MeiPr ₂ para las primeras etapas de la segunda semireacción del ciclo catalítico.	251
7.12. A) Esquema de la entrada del superóxido en el complejo CuL1-MeiPr ₂ ·(H ₂ O) (1). La molécula de agua evita la entrada por su misma cara, pero ayuda a estabilizar la molécula de superóxido mediante la formación de puentes de hidrógeno. B) Superposición de las estructuras adoptadas por el complejo CuL1-MeiPr ₂ (H ₂ O) (1) a lo largo de la simulación QM/MM-MD. C) Distancia Cu-N2 (trazo naranja) y Cu-N3 (trazo azul) durante el ciclo catalítico. Unidades en Å.	254
7.13. Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL15, ³⁶³ b) CuL12, ³⁶³ c) CuL1-Me ₃ , d) CuL2-H, e) CuL1-H, f) CuL9, ¹⁸⁰ g) CuL11, ²⁹⁰ h) CuL8, ¹⁸⁰ i) CuL14, ³⁶⁴ j) CuL13, ²⁹⁰ k) CuL7, ¹⁸⁰ l) CuL1-MeiPr ₂ , m) Cu ₂ L7, ¹⁸⁰ n) Cu ₂ L9, ¹⁸⁰ o) Cu ₂ L10 ¹⁸⁰ y p) Cu ₂ L8 ¹⁸⁰	258

7.14. Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL12 , ³⁶³ b) CuL1-Me_3 , c) CuL2-H , d) CuL1-H , e) CuL11 , ²⁹⁰ f) CuL8 , ¹⁸⁰ g) CuL3-H , h) CuL3-Me_3 , i) CuL7 , ¹⁸⁰ j) CuL1-MeiPr_2 , k) CuL4-Me_3 , l) $\text{Cu}_2\text{L7}$, ¹⁸⁰ m) $\text{Cu}_2\text{L9}$, ¹⁸⁰ n) $\text{Cu}_2\text{L10}$ ¹⁸⁰ y o) $\text{Cu}_2\text{L8}$ ¹⁸⁰	260
7.15. Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL1-H , b) CuL5 , c) CuZnL5 , d) CuL8 , ¹⁸⁰ e) CuL7 , ¹⁸⁰ f) CuL1-MeiPr_2 , g) $\text{Cu}_2\text{L15}$, ³⁶³ h) $\text{Cu}_2\text{L7}$, ¹⁸⁰ i) $\text{Cu}_2\text{L5}$, j) $\text{Cu}_2\text{L6}$, k) $\text{Cu}_2\text{L9}$, ¹⁸⁰ l) $\text{Cu}_2\text{L10}$, ¹⁸⁰ m) CuL12 , ³⁶³ y n) $\text{Cu}_2\text{L8}$ ¹⁸⁰	263
7.16. Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) CuL5 , B) $\text{Cu}_2\text{L5}$, C) CuL6 y D) $\text{Cu}_2\text{L6}$. Velocidad de bari- rido 50 mV s^{-1}	264
7.17. Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) CuL5 , B) $\text{Cu}_2\text{L5}$, C) CuL6 y D) $\text{Cu}_2\text{L6}$. Velocidad de bari- rido 50 mV s^{-1} . Se ha llevado a cabo la deconvolución de los datos con el fin de incrementar la resolución de los picos.	265
7.18. Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL2-H , b) CuL1-H , c) CuL3-H , d) CuL3-Me_3 , e) $\text{Cu}_2\text{L7}$, ¹⁸⁰ f) $\text{Cu}_2\text{L5}$, g) $\text{Cu}_2\text{L6}$, h) $\text{Cu}_2\text{L9}$, ¹⁸⁰ i) $\text{Cu}_2\text{L10}$, ¹⁸⁰ j) $\text{Cu}_2\text{L8}$, ¹⁸⁰ k) CuBNP-L3-Me_3 , l) $\text{Cu}_2\text{BNP-L6}$, m) $\text{Cu}_2\text{BNP-L5}$ y n) CuBNP-L3-H	269
7.19. Comparativa entre el valor de las constantes catalíticas de los complejos de los ligandos libres (trama rayada) y el de los complejos soportados sobre nanopartículas de boehmita (color sólido).	270
7.20. Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) Cu(II) , B) CuBNP-L6 , C) $\text{Cu}_2\text{BNP-L6}$ y D) $\text{Cu}_2\text{BNP-L5}$. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1}	271
7.21. Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) CuBNP-L6 , B) $\text{Cu}_2\text{BNP-L6}$. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} . Se ha llevado a cabo la deconvolución de los datos con el fin de incre- mentar la resolución de los picos.	272

7.22. Representación del potencial- ζ determinado para los diferentes sistemas de nanopartículas oxídicas funcionalizadas de los ligandos L5 (línea punteada) y L6 (línea rayada), así como para las propias NPs sin funcionalizar (línea continua).	274
7.23. Comparación entre el valor de la constante catalítica de los complejos L5 y L6 soportados sobre nanopartículas de sílice y de boehmita. Las barras con tramas naranja se corresponden con el valor de la constante catalítica de cada sistema, mientras que los puntos azules representan el valor de su potencial- ζ . Valores determinados para los sistemas a) $\text{Cu}_2\text{BNP-L5}$, b) $\text{Cu}_2\text{BNP-L6}$, c) $\text{Cu}_2\text{SNP-L6}$ y d) $\text{Cu}_2\text{SNP-L5}$	276
7.24. A) Estructura del complejo de referencia EUK-134. ¹⁴⁵ B) Espectro de absorbancia de una disolución de peróxido de hidrógeno 1 M a 298 K. C) Representación de la intensidad de absorción a 219 nm en función del tiempo para una disolución de H_2O_2 1 M (trazo azul) y H_2O_2 1 M en presencia de EUK-134 (50 mM, trazo amarillo).	280
7.25. Representación de la intensidad de absorbancia en función del tiempo medida a 219 nm para diversas muestras de A) ligandos de los grupos libres y soportados sobre nanopartículas, B) disoluciones de ligandos y sistemas de nanopartículas en presencia de Cu(II) y C) disoluciones de ligandos en presencia de Fe(II). En trazo amarillo se muestra el compuesto de referencia EUK-134.	282
7.26. Esquema de la reacción de deshidrogenación de los ligandos de pequeña capacidad mediada por la acción del Fe(II).	283
7.27. Esquema del mecanismo de acción del sistema BNP-L4-Me₃ durante su actuación como doble mimético. Este se puede dividir en cinco etapas fundamentales: A) aproximación del radical superóxido al nanosistema por atracción electrostática, B) dismutación de los radicales superóxido en los centros de Cu(II), C) liberación de H_2O_2 y transferencia de este a los centros de Fe(II), D) dismutación del peróxido de hidrógeno en los centros de Fe(II) y E) liberación de los subproductos del proceso (D).	285
A.1. ¹ H-NMR spectrum of L1-H in D_2O at 298 K.	297

A.2.	^{13}C -NMR spectrum of L1-H in D_2O at 298 K.	297
A.3.	^1H -NMR spectrum of L1-Me in D_2O at 298 K.	298
A.4.	^{13}C -NMR spectrum of L1-Me in D_2O at 298 K.	298
A.5.	^1H -NMR spectrum of L1-Me₃ in D_2O at 298 K.	299
A.6.	^{13}C -NMR spectrum of L1-Me₃ in D_2O at 298 K.	299
A.7.	^1H -NMR spectrum of L1-Me_iPr₂ in D_2O at 298 K.	300
A.8.	^{13}C -NMR spectrum of L1-Me_iPr₂ in D_2O at 298 K.	300
A.9.	^1H -NMR spectrum of L2-H in D_2O at 298 K.	301
A.10.	^{13}C -NMR spectrum of L2-H in D_2O at 298 K.	301
A.11.	^1H -NMR spectrum of L2-Me in D_2O at 298 K.	302
A.12.	^{13}C -NMR spectrum of L2-Me in D_2O at 298 K.	302
A.13.	^1H -NMR spectrum of L2-Me₃ in D_2O at 298 K.	303
A.14.	^{13}C -NMR spectrum of L2-Me₃ in D_2O at 298 K.	303
A.15.	^1H -NMR spectrum of L3-H in D_2O at 298 K.	304
A.16.	^{13}C -NMR spectrum of L3-H in D_2O at 298 K.	304
A.17.	^1H -NMR spectrum of L3-Me₃ in D_2O at 298 K.	305
A.18.	^{13}C -NMR spectrum of L3-Me₃ in D_2O at 298 K.	305
A.19.	^1H -NMR spectrum of L4-Me₃ in D_2O at 298 K.	306
A.20.	^{13}C -NMR spectrum of L4-Me₃ in D_2O at 298 K.	306
A.21.	^1H -NMR spectrum of L5 in D_2O at 298 K.	307
A.22.	^{13}C -NMR spectrum of L5 in D_2O at 298 K.	307
A.23.	^1H -NMR spectrum of L6 in D_2O at 298 K.	308
A.24.	^{13}C -NMR spectrum of L6 in D_2O at 298 K.	308
A.25.	^1H -NMR spectrum of a BNP-L3-H sample in D_2O at 298 K.	309
A.26.	Calibration and interpolation of BNP-L3-H anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Blue dots (●) correspond to the integration of χ and ε signals, while grey dots (●) correspond to the integration of the α signal. Yellow crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals of the BNP samples.	309
A.27.	^1H -NMR spectrum of a BNP-L3-Me₃ sample in D_2O at 298 K.	310

A.28. Calibration and interpolation of BNP-L3-Me₃ anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Blue dots (●) correspond to the integration of χ and ϵ signals, while grey dots (●) correspond to the integration of the α signal. Yellow crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals of the BNP samples.	310
A.29. ¹ H-NMR spectrum of a BNP-L5 sample in D ₂ O at 298 K.	311
A.30. Calibration and interpolation of BNP-L5 anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (●) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (●) to the ϵ signal, dark blue dots (●) to the β signal and violet dots (●) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the BNP samples.	311
A.31. ¹ H-NMR spectrum of a SNP-L5 sample in D ₂ O at 298 K.	312
A.32. Calibration and interpolation of SNP-L5 anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (●) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (●) to the ϵ signal, dark blue dots (●) to the β signal and violet dots (●) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the SNP samples.	312
A.33. ¹ H-NMR spectrum of a BNP-L6 sample in D ₂ O at 298 K.	313
A.34. Calibration and interpolation of BNP-L6 anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (●) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (●) to the ϵ signal, dark blue dots (●) to the β signal and violet dots (●) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the BNP samples.	313
A.35. ¹ H-NMR spectrum of a BNP-L6 sample in D ₂ O at 298 K.	314
A.36. Calibration and interpolation of SNP-L6 anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (●) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (●) to the ϵ signal, dark blue dots (●) to the β signal and violet dots (●) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the SNP samples.	314
B.1. Mecanismo de reacción propuesto para la formación de [CuL] ²⁺	317

Índice de tablas

1.1. Resumen de algunas de las propiedades más importantes (tiempo medio de vida, distancia media y modo de interacción con los sistemas biológicos) de las ROS en células animales. ¹⁶⁻¹⁸	9
3.1. Measurement solutions required for a typical peroxidase activity assay	80
3.2. Measurement solutions required for a typical SOD assay	94
4.1. Results of the quantification of the macrocyclic and Cu(II) (ICP-MS) content on the oxidic nanoparticles. All data in $mol\ g_{NP}^{-1}$	148
4.2. ζ -Potential values determined for the different nanoparticle systems. All measurements were carried out in 10^{-4} M NaClO ₄ at pH 7.4.	149
5.1. Constantes logarítmicas de protonación del ligando L1-H y sus derivados alquílicos (L1-Me₃ y L1-Me_iPr₂) medidas a 298.1 ± 0.1 K en un medio NaClO ₄ 0.15 M.	155
5.2. Variaciones estándar de entalpía (ΔH° , kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando L1-H y su derivado metílico L1-Me₃ , medidos a 298.1 ± 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	161
5.3. Variaciones estándar de entropía ($T\Delta S^\circ$, kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando L1-H y su derivado metílico L1-Me₃ , medidos a 298.1 ± 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	161
5.4. Constantes logarítmicas de protonación del ligando L2-H y su derivado metílico L2-Me₃ medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	165

5.5. Variaciones estándar de entalpía (ΔH° , kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando L2-H y su derivado metílico L2-Me₃ , medidos a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	171
5.6. Variaciones estándar de entropía ($T\Delta S^\circ$, kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando L2-H y su derivado metílico L2-Me₃ , medidos a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	171
5.7. Constantes logarítmicas de protonación de los ligandos L3-H y L3-Me₃ medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	173
5.8. Constantes logarítmicas de protonación del ligando L4-Me₃ medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	174
5.9. Constantes logarítmicas de protonación de los ligandos L5 y L6 medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	177
5.10. Constantes logarítmicas de protonación de los ligandos L7 y L8 medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	178
6.1. Constantes logarítmicas de complejación del ligando L1-H y sus derivados alquílicos (L1-Me₃ y L1-Me₂Pr₂) con Cu(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	185
6.2. Resumen de los parámetros cinéticos derivados del ajuste de los datos mostrados en las Figuras 6.8 y 6.9 mediante la ecuación 6.7.	198
6.3. Constantes logarítmicas de complejación del ligando L2-H y su derivado metílico L2-Me₃ con Cu(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	202
6.4. Constantes logarítmicas de complejación del ligando L3-H y su derivado metílico L3-Me₃ con Cu(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	203
6.5. Constantes logarítmicas de complejación del ligando L4-Me₃ con Cu(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	204
6.6. Constantes logarítmicas de complejación del ligando L1-H y su derivado metílico L1-Me₃ con Fe(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	206
6.7. Constantes logarítmicas de complejación del ligando L2-H y su derivado metílico L2-Me₃ con Fe(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	209
6.8. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L3-Me₃ y L4-Me₃ con Fe(II) medidas a 298.1 \pm 0.1 K en NaClO ₄ 0.15 M.	211

6.9. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L5 y L6 con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.	213
6.10. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L7 y L8 con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M descritas en trabajos anteriores. ^{180,341}	214
6.11. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L5 y L6 con Zn(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.	222
6.12. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L7 y L8 con Zn(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.	223
6.13. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L5 y L6 con Cu(II) y Zn(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 M.	226
6.14. Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos L7 y L8 con Cu(II) y Zn(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 M.	226
7.1. Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos del grupo L1 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.	233
7.2. Resumen de las distancias Cu(II)-N y Cu(II)-O (Å) correspondientes a las estructuras optimizadas de mínima energía del complejo <i>CuL1-MeIPr₂(H₂O)</i> usando los funcionales BP86, B3LYP y M06; así como su desviación respecto a su estructura cristalina. Las desviaciones mayores de un 1 % han sido resaltadas en rojo.	245
7.3. Resumen de las distancias Cu(II)-N y Cu(II)-O (Å) correspondientes a las estructuras optimizadas de mínima energía del complejo <i>CuL1-MeIPr₂(H₂O)</i> añadiendo funciones de dispersión y modificando las bases del funcional B3LYP; así como su desviación respecto a su estructura cristalina. Las desviaciones mayores de un 1 % han sido resaltadas en rojo.	246
7.4. Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos de los ligandos del grupo L2 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.	257

7.5. Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos de los ligandos de los grupos L3 y L4 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.	259
7.6. Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos de los ligandos L5 y L6 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.	262
7.7. Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.	268
7.8. Recopilación de los parámetros más importantes de la actividad SOD y potencial- ζ de los diferentes sistemas de nanopartículas sintetizados . . .	275

ABSTRACT

The imbalance between the generation and clearance of reactive oxygen species (ROS) causes oxidative stress, which is related to a variety of health issues that include neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Alzheimer's disease. In order to remove ROS, living organisms have developed a battery of protective enzymes, such as superoxide dismutases (SODs). Although SOD enzymes have shown therapeutic efficacy, their use has severe drawbacks such as the absence of oral activity, immunogenicity, short half-life and low cell permeability. Therefore, low-molecular weight mimetics may offer better outcomes regarding properties such as lack of antigenicity, good tissue penetrance, high stability, longer half-life in solution, and low production cost. A number of these low molecular SOD mimetics are complexes of polyamine ligands of either cyclic or open-chain topology. In this respect, it has been reported that several mononuclear or binuclear copper complexes of aza-macrocyclic ligands have SOD activities *in vitro* which rank among the highest ones so far reported for synthetic systems. A step forward to improve the activity, the likely-cell uptake and bio-distribution of these low molecular weight mimetics might be their incorporation in non-toxic nanoparticles (NPs). The grafting of the molecules to the surface of the nanoparticles may yield pre-concentration and amplification of the signal.

The work here we present deals with the design, synthesis and study of seven new aza-macrocyclic ligands. The design of the ligands is based on the modification of the fundamental tetraazamacrocycle through three main ways: alkylation of the secondary amines, introduction of new functional groups in the pyridine derivative and elongation of the aza-macrocyclic moiety.

In this thesis, we report the synthesis and characterization of the aforementioned seven new compounds, as well as the functionalization of four of them onto the surface of boehmite and silica NPs. Additionally, here we discuss on the acid base behavior of the ligands, and on their capability to coordinate Cu(II), Zn(II) and/or Fe(II), particularly at physiological pH. Finally, we present the SOD and catalase activity results of the studied complexes, both free in solution and grafted onto the surface of the NPs.

Regarding the results, we should notice that all the studied ligands are capable to coordinate Cu(II), Zn(II) and/or Fe(II) in a quantitative way at physiological pH. Furthermore, the Cu(II) complexes present SOD activity, which is improved with the alkylation of the secondary amines, the addition of electron-withdrawing groups in *para* to the pyridinic moiety and the increase of the amount of coordinating amines in the macrocyclic chain. In addition, functionalization of the complexes onto the surface of boehmite NPs impressively enhance their SOD activity, what may be related with its positively charged surface, as we show in the last chapter of the thesis.

Glosario

Simb.

δ	<i>Desplazamiento químico</i>
λ	<i>Longitud de onda</i>
μ	<i>Coefficiente cristalográfico de absorción</i>
μg	<i>Microgramo</i>
μL	<i>Microlitro</i>
μmol	<i>Micromol</i>
ρ	<i>Densidad</i>
θ	<i>Ángulo de difracción del rayo electromagnético con respecto a los planos de Bragg en difracción de rayos X</i>

A

\AA	<i>Ångström, equivalente a 10^{-10} m</i>
A_{560}	<i>Intensidad de absorbancia medida a 560 nm</i>
$A\beta$	<i>Proteína β-amiloide</i>
Abs	<i>Intensidad de absorbancia</i>
ADN	<i>Ácido desoxiribonucleico</i>
APT	<i>Tensor atómico polar</i>
ARN	<i>Ácido ribonucleico</i>
ATP	<i>Adenina trifosfato</i>

B

BNP	<i>Nanopartículas de boehmita</i>
BP86	<i>Funcional GGA combinación del Becke '88 y el Perdew '86</i>

B3LYP *Funcional híbrido de tres parámetros de Becke Lee-Yang-Parr*

C

ca. *Aproximadamente, cerca de; del latín circa*

Cat *Catalasa*

CCDC *Centro de datos cristalográficos de Cambridge*

CDCl₃ *Cloroformo deuterado*

CHCl₃ *Cloroformo*

CH₂Cl₂ *Diclorometano*

CH₃CN *Acetonitrilo*

CPD I *Compuesto I (forma oxidada de la catalasa)*

CSD *Base de datos estructural de Cambridge*

CuZn-SOD *Superóxido dismutasa de cobre y zinc*

D

d *Doblete*

D₂O *Óxido de deuterio o agua deuterada*

D3 *Término de dispersión de Grimme*

Da *Dalton, unidad de masa atómica*

DCI *Ácido clorhídrico deuterado*

DFT *Teoría del funcional de la densidad*

DLS *Dispersión dinámica de la luz*

DME *Etilenglicol dimetil éter*

DMF *Dimetil formamida*

DMSO *Dimetil sulfóxido*

DMSO-*d*₆ *Dimetil sulfóxido deuterado*

Dq *Décima de la estabilización del campo cristalino en un complejo octaédrico*

E

e. g. *Por ejemplo; del latín exempli gratia*

ECP *Potencial efectivo de core*

ELA *Esclerosis lateral amiotrófica*

et al. *Y otros; del latín et alii*

EtOAc *Acetato de etilo*

EtOH *Etanol*

equiv.	<i>Equivalente(s)</i>
ESI	<i>Ionización por electroespray</i>
ESR	<i>Resonancia electrónica de spin</i>

F

F	<i>Factor de estructura, parámetro cristalográfico</i>
FAD	<i>Dinucleótido de flavina y adenina</i>
Fe-SOD	<i>Superóxido dismutasa de hierro</i>
fs	<i>Femtosegundo</i>

G

G	<i>Guanina</i>
QQS-UV	<i>Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia</i>
GoF	<i>Bondad (calidad) del ajuste de un modelo estadístico</i>

H

HEPES	<i>Tampón ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il) etanosulfónico</i>
HOMO	<i>Orbital molecular ocupado de más alta energía</i>
HPLC	<i>Cromatografía líquida de alta resolución</i>

I

<i>i. e.</i>	<i>Es decir; del latín id est</i>
IC	<i>Porcentaje o concentración de inhibición</i>
IC ₅₀	<i>Concentración necesaria de mimético SOD para reducir la concentración de iones radicales superóxido en disolución a la mitad</i>
ICP-MS	<i>Espectrometría de masas por plasma acoplado inductivamente</i>
ID	<i>Identificador</i>
<i>i</i> Pr	<i>Grupo iso-propilo</i>
ITC	<i>Valoración calorimétrica isotérmica</i>

J

<i>J</i>	<i>Constante de acoplamiento</i>
----------	----------------------------------

K

<i>k</i> _{cat}	<i>Constante catalítica</i>
-------------------------	-----------------------------

kDa	<i>kiloDalton</i>
KMB	<i>Ácido 2-ceto-4-tiometilbutílico o ácido α-cetometiolbutílico</i>

L

LUMO	<i>Orbital molecular vacío de más baja energía</i>
------	--

M

m/z	<i>Relación masa/carga</i>
m	<i>Multiplete</i>
M	<i>Molar</i>
MCPB	<i>Generador de parámetros para centros metálicos</i>
MD	<i>Dinámica molecular</i>
MDF10	<i>Potencial efectivo de "core" de Stuttgart-Dresden</i>
Me	<i>Grupo metilo</i>
MeOH	<i>Metanol</i>
MF ⁺	<i>Monoformazano</i>
mg	<i>Miligramo</i>
mL	<i>Mililitro</i>
Milli-Q	<i>Marca comercial de la Millipore Corporation usada comúnmente para describir agua "ultrapura" de Tipo 1 (de acuerdo con el ISO 3696)</i>
mmol	<i>Milimol</i>
MM	<i>Mecánica molecular</i>
Mn-SOD	<i>Superóxido dismutasa de manganeso</i>
Mo-co	<i>Cofactor de molibdeno</i>
MS	<i>Espectrometría de masas</i>
MsCl	<i>Cloruro de mesilo</i>
Mw	<i>Masa molecular</i>

N

NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato</i>
NaOD	<i>Hidróxido de sodio deuterado</i>
NBT	<i>Nitroazul de tetrazolio</i>
NHE	<i>Electrodo normal de hidrógeno</i>
Ni-SOD	<i>Superóxido dismutasa de níquel</i>
NMR	<i>Resonancia magnética nuclear, también RMN</i>

nm	<i>Nanómetro</i>
NP	<i>Nanopartícula</i>
ns	<i>Nanosegundo</i>

O

$^1\text{O}_2$	<i>Oxígeno singlete</i>
$^3\text{O}_2$	<i>Oxígeno triplete</i>

P

PPA	<i>Proteína precursora amiloidea</i>
PCM	<i>Modelo del continuo polarizable</i>
PDB	<i>Banco de datos de proteínas</i>
PME	<i>Método de separación de partículas de Ewald</i>
ppm	<i>Partes por millón</i>
ps	<i>Picosegundo</i>
PSEN1	<i>Gen encargado de la codificación de la proteína Presenilina-1</i>
PSEN2	<i>Gen encargado de la codificación de la proteína Presenilina-2</i>

Q

q	<i>Cuadruplete</i>
QM	<i>Mecánica cuántica</i>
QM/MM-MD	<i>Método híbrido de cálculo basado en la combinación de técnicas de mecánica cuántica con dinámica molecular</i>

R

R	<i>Factor R, parámetro cristalográfico</i>
RMN	<i>Resonancia magnética nuclear, también NMR</i>
RNS	<i>Especies reactivas de nitrógeno</i>
ROI	<i>Intermedios reactivos de oxígeno</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>
RSMd	<i>Desviación del valor cuadrático medio</i>

S

s	<i>Singlete</i>
SEM	<i>Microscopía electrónica de barrido</i>

SNP	<i>Nanopartículas de sílice</i>
SOD	<i>Superóxido dismutasa</i>
SCSIE	<i>Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental</i>
SXRD	<i>Difracción de rayos X de monocristal</i>

T

t	<i>Triplete</i>
THF	<i>Tetrahidrofurano</i>
tren	<i>Tris(2-aminoetil)amina</i>
TS	<i>Estado de transición</i>
TSP	<i>3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt</i>
TRIS	<i>Tampón tris(hidroximetil)aminoetano</i>

U

u.a.	<i>Unidades arbitrarias</i>
UV-Vis	<i>Ultravioleta-visible</i>

V

v/v	<i>Volumen por volumen</i>
vol	<i>Volumen, litros de O₂ producidos por litro de disolución de H₂O₂ en condiciones normales de presión y temperatura</i>
vs.	<i>Contra, del latín versus</i>

W

w/v	<i>Peso por volumen</i>
-----	-------------------------

X

XOR	<i>Enzima xantina oxidoreductasa</i>
-----	--------------------------------------

Z

Z	<i>Número de moléculas por unidad asimétrica, parámetro cristalográfico</i>
---	---

Capítulo 1

Introducción

PREFACIO

“El sujeto del caso que describo a continuación lo encontré por casualidad en la calle. Era un hombre de unos 65 años, con un notable porte atlético. La agitación de sus extremidades, e incluso de la cabeza y el cuerpo entero, era tal que se había convertido un temblor general. Era completamente incapaz de caminar; tenía el cuerpo tan encorvado, y la cabeza tan echada hacia delante, que le obligaba a avanzar en una especie de carrera continua, empleando su bastón cada cinco o seis pasos [...]. Según decía, había sido marinero, y atribuía su enfermedad a haber estado confinado en una prisión española varios meses, durante los cuales había dormido sobre la tierra húmeda y desnuda. [...] Ahora era un pobre mendigo, necesitado de unos cuidados médicos que no se podía permitir.”^{1,2} De esta forma es como James Parkinson documentaba por primera vez en su *Ensayo sobre la Parálisis Temblorosa* lo que en un inicio denominó como *Shaking Palsy*, pero que no tardaría en conocerse como enfermedad de Parkinson.^{3,4} Lo que este doctor nunca llegó a saber es que su trabajo, publicado en el Londres pre-victoriano de 1817, estaba íntimamente relacionado con el descubrimiento que unas pocas décadas atrás Scheele, Priesley y Lavoisier habían dado a conocer al mundo.

Cuarenta años antes de que J. Parkinson publicara su ensayo, y a las puertas de la Revolución Francesa, tres experimentos realizados en paralelo en distintos países y con distintos procedimientos dieron lugar a una de esas raras coincidencias que de vez en cuando se dan en la historia. Cada uno de los ensayos condujo a un mismo resultado: a la obtención de un nuevo gas, incoloro pero extremadamente inflamable. Sin pretenderlo, acababan de descubrir un nuevo elemento químico; un elemento llamado a tener una importancia fundamental en la enfermedad del Parkinson. Entre 1771 y 1775, el farmacéutico sueco Scheele, el clérigo británico Priesley y el revolucionario francés Lavoisier identificaban por primera vez, y de forma independiente, lo que darían en llamar “aire de fuego”, “aire desflogisticado” u oxígeno.

Tendrían que pasar todavía dos siglos hasta que se pudiese trazar un hilo que conectase ambos conceptos: el oxígeno, a pesar de su importancia biológica, puede ser también una especie extremadamente tóxica. Y es esta toxicidad la que, en caso de actuar sobre el tejido cerebral, puede llegar a causar enfermedades de tipo

neurodegenerativo tales como el Parkinson.⁵⁻⁷

Desde que se descubrió esta relación entre la degeneración neuronal y el daño oxidativo, han sido múltiples las líneas de investigación que han convertido el oxígeno y sus especies reactivas en la diana de su trabajo. Y múltiples han sido también los logros alcanzados hasta el momento.^{8,9}

En la tesis que aquí presentamos pretendemos seguir esta investigación, intentando llegar un paso más allá. El objetivo de este trabajo es, por una parte, sistematizar la relación entre la estructura de los compuestos antioxidantes y su actividad catalítica. Por otra parte, intentaremos utilizar este conocimiento para, con la ayuda de la Química Supramolecular y la Nanotecnología, diseñar nuevos miméticos antioxidantes con una actividad catalítica superior a la lograda hasta el momento.

1.1 PARTE I. EL DIOXÍGENO Y SUS ESPECIES

La relación entre el oxígeno, sus especies reactivas (o tóxicas) y las enfermedades neurodegenerativas es un asunto complejo, lleno de matices, contradicciones e infinitas variables. Debido a la elevada reactividad de sus especies, el oxígeno presenta una doble cara en su interacción con los organismos: por un lado forma parte de numerosos procesos metabólicos y sistemas de defensa frente a virus y cuerpos extraños, mientras que por el otro lado es un elemento clave en la aparición de multitud de enfermedades neurodegenerativas, tales como el Parkinson, el Alzheimer o el Huntington. La complejidad de tal relación con el organismo requiere, por tanto, que iniciemos la explicación por su parte más elemental. Empecemos por el oxígeno molecular.

1.1.1 EL DIOXÍGENO

Al hablar del oxígeno molecular, huelga mencionar su importancia a la hora de dar forma a nuestro hábitat y definir nuestro propio metabolismo. El O_2 es parte fundamental del entorno atmosférico terrestre, así como del acuático;¹⁰ al tiempo que constituye la piedra angular de dos de las reacciones más importantes a nivel biológico: la respiración celular y la fotosíntesis. En este contexto, destaca especialmente el papel que tiene en el metabolismo de los organismos aerobios, donde participa como aceptor final de los electrones en los procesos de obtención energética a través de la oxidación de la materia orgánica. Esta obtención de energía se materializa en la síntesis de ATP.

La simple utilización del dióxígeno como agente oxidante en el metabolismo de los organismos aerobios les confiere una enorme ventaja evolutiva frente a los anaerobios, ya que permite una obtención mucho más eficaz de la energía. Esto es debido a que la utilización del dióxígeno en las rutas metabólicas abre la puerta a nuevos procesos que permiten la oxidación total de los compuestos orgánicos. Por poner un ejemplo, la oxidación de la glucosa a través de un mecanismo anaerobio da lugar a la síntesis de dos moléculas de ATP (derivadas del proceso de glicólisis), mientras que si este mismo proceso tiene lugar mediante un mecanismo aerobio,

la generación de ATP asciende hasta las 30 o 38 moléculas (dos del proceso de glicólisis, dos más del ciclo de Krebs y 34 del sistema de transporte electrónico).¹¹ Es decir, en este caso en particular, el mecanismo aerobio es unas 15 veces más eficiente que el anaerobio.

Ahora bien, la utilización del O₂ en el metabolismo de los organismos aerobios implica que estos se expongan a su propia toxicidad; y es que el oxígeno molecular tiene una gran capacidad oxidante, suficiente como para degradar la materia orgánica. El elemento con que cuentan a su favor los organismos aerobios es que esta gran reactividad está limitada a su vez por una elevada energía de activación. Este hecho convierte la oxidación de los compuestos orgánicos en un proceso impedido cinéticamente, pese a estar termodinámicamente favorecido. Veamos un poco más en detalle a qué se debe este hecho.

La configuración electrónica del oxígeno molecular en su estado fundamental $((\sigma_{2s})^2 (\sigma_{2s}^*)^2 (\sigma_{2p})^2 (\pi_{2s})^4 (\pi_{2s}^*)^2)$ se caracteriza por presentar dos electrones desapareados en el orbital π_{2s}^* (ver Figura 1.1). Esta característica convierte al O₂ en una molécula paramagnética, con configuración de triplete. Este hecho ya es de por sí bastante extraño. Por supuesto, en el laboratorio se pueden generar multitud de moléculas paramagnéticas, triplete y doblete principalmente; pero lo cierto es que en nuestro entorno estas no son muy abundantes. Y por buenas razones. Los electrones desapareados favorecen que estos radicales se establezcan formando enlaces entre ellos.¹² En cambio, el dioxígeno triplete (³O₂) parece ser muy estable incluso sin la ayuda de ningún sustituyente que lo estabilice, lo que no deja de ser extraño teniendo en cuenta que se trata de un compuesto energéticamente muy rico, capaz de reaccionar exotérmicamente con absolutamente todos los elementos de la tabla periódica, a excepción del oro.¹³ No por nada se utiliza como combustible líquido en los propulsores espaciales.¹⁴

¿Cómo es posible, por tanto, que una molécula constituya la quinta parte de la atmósfera terrestre, cuando está constantemente en íntimo contacto con cientos de miles de moléculas con las que le resulta tan favorable (entálpicamente) reaccionar? Es obvio que, fenomenológicamente, la respuesta a esta pregunta es que el O₂ debe presentar enormes barreras de activación para reaccionar con la mayoría

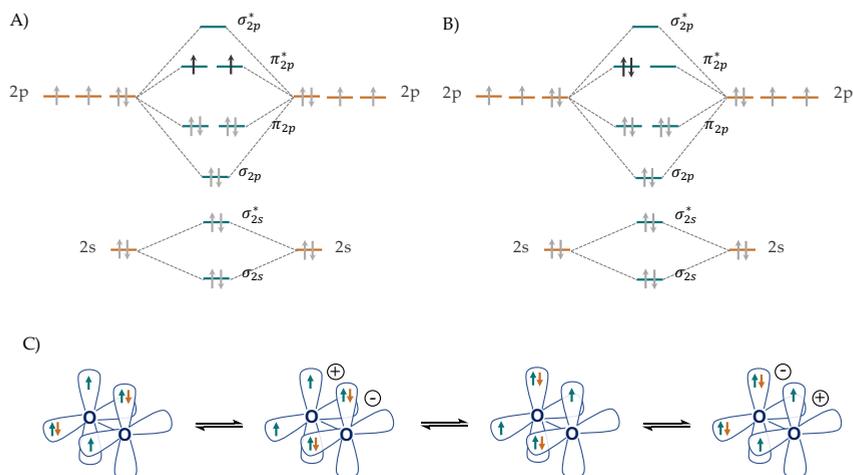


Figura 1.1 – Diagrama de orbitales moleculares del dióxígeno en A) su estado fundamental triplete y B) su estado excitado singlete. C) Estructura de resonancia del O_2 triplete en su estado fundamental.¹²

de los compuestos. Pero, ¿a qué son debidas?

Al analizar la distribución de los orbitales moleculares del 3O_2 se puede observar que la configuración de mínima energía de este compuesto presenta cuatro estructuras resonantes (Figura 1.1C).¹² Es esta estructura de resonancia, junto a la prohibición de espín, la que contribuyen de forma decisiva a estabilizar la forma triplete del dióxígeno; una estabilización que debe romperse bajo un elevado coste energético para poder pasar a su estado singlete.¹⁵ Este mismo motivo justifica la baja reactividad del dióxígeno triplete con la materia orgánica: de igual forma que sucede con el paso del oxígeno triplete a singlete, para que el 3O_2 pueda reaccionar con los compuestos orgánicos debe presentar un estado electrónico singlete, debiendo superar la elevada energía de apareamiento asociada a este proceso.

Esta dificultad del O_2 para reaccionar es de hecho el factor clave que mantiene su abundancia constante en la ecosfera, y por tanto su disponibilidad para permitir la vida aerobia.

Pero no todas las especies de oxígeno son tan poco reactivas. Sin ir más lejos, el propio dióxígeno singlete (1O_2) no presenta la prohibición de espín que sí que

tiene su forma triplete, con lo que la restricción cinética desaparece. Al igual que el $^1\text{O}_2$, existen otras muchas especies de oxígeno con una elevada capacidad para oxidar a la materia orgánica. Son las conocidas como especies reactivas de oxígeno, o ROS.

1.1.2 LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son una familia de compuestos derivados del oxígeno triplete, caracterizadas todas ellas por presentar una elevada reactividad frente a la materia orgánica.^{16,17} Dentro de este conjunto de especies podemos encontrar el ozono (O_3), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) y los productos de reducción del O_2 en su ruta de generación de agua: el anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\bullet).^{19,20} A estos tres últimos compuestos también se los conoce como intermedios reactivos de oxígeno (ROI). En la Figura 1.2 se puede ver un esquema de la formación de las diferentes especies reactivas. Cabe mencionar que en los últimos años algunos autores han ampliado el término de ROS para englobar diferentes compuestos reactivos de nitrógeno, cloro o bromo, tales como el peroxinitrato (O_2NOO^-), el ácido hipocloroso (HOCl) o el ácido hipobromoso (HOBr).²¹ En este trabajo vamos a fo-

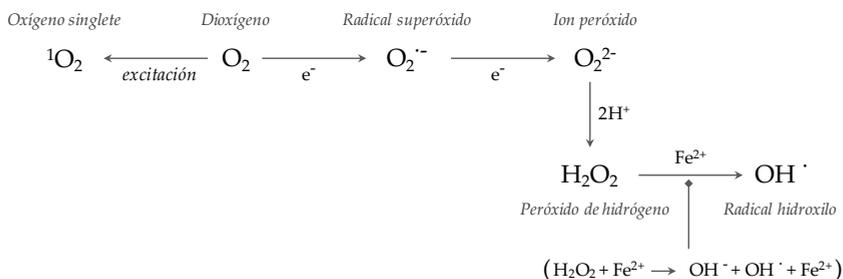


Figura 1.2 – Esquema de la formación de las diferentes especies reactivas de oxígeno a partir de dioxígeno triplete. El dioxígeno puede excitarse o reducirse para pasar a formar oxígeno singlete o el radical superóxido, respectivamente. A su vez, el superóxido puede dismutar para dar peróxido de hidrógeno, que puede reaccionar con Fe^{2+} para formar los radicales hidroxilo a través de la reacción de Fenton.¹⁶

calizar la atención sobre los intermedios reactivos de oxígeno o ROI ($O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 y OH^{\bullet}) por ser las ROS mayoritarias a nivel biológico.

Son dos las propiedades que caracterizan a los ROI: el modo en que son generados, basado en la reducción del dióxígeno, y su elevada reactividad frente a la materia orgánica (ver Tabla 1.1). Y son de hecho estas dos características las que hacen que su presencia esté generalizada en todo el organismo.

Por una parte, el hecho que se puedan formar fácilmente a partir de la reducción del dióxígeno implica que todos aquellos procesos metabólicos basados en esta reacción son susceptibles de ser fuentes de ROI. Así, por ejemplo, la cadena respiratoria mitocondrial es un sistema que lleva asociada a su normal funcionamiento la generación de diferentes tipos de especies reactivas.²⁰ En este caso los ROI son generados como subproductos de un metabolismo ineficiente, del que hablaremos más adelante en este mismo capítulo.

Pero la generación de estas especies no siempre es casual. El hecho que presenten una gran reactividad frente a los compuestos orgánicos los convierte en elementos muy tóxicos, capaces de degradar a la materia orgánica. Este hecho, que *a priori* podría verse como un peligro para los organismos, puede también utilizarse en su propio beneficio. Y es que los ROI pueden ser útiles armas de defensa frente a elementos patógenos.^{22,23} A modo de ejemplo, distintos tipos de células del sistema inmune, como algunos tipos de macrófagos y neutrófilos, contienen en su interior una familia de enzimas conocida como las NADPH oxidasas.²⁴ La función de estas enzimas es generar intencionadamente radicales superóxido y

Tabla 1.1 – Resumen de algunas de las propiedades más importantes (tiempo medio de vida, distancia media y modo de interacción con los sistemas biológicos) de las ROS en células animales.¹⁶⁻¹⁸

ROS	$t_{1/2}$	Distancia	Modo de acción
$O_2^{\bullet-}$	1-4 μ s	30 nm	Reacciona con proteínas Fe-S y dismuta a H_2O_2 .
OH^{\bullet}	1 ns	1 nm	Extremadamente reactivo con todas las biomoléculas.
H_2O_2	>1 ms	>1 μ m	Reactivo ante proteínas y ADN.
1O_2	1-4 μ s	30 nm	Oxida lípidos, proteínas y residuos de G del ADN.

peróxido de hidrógeno con el fin de atacar y eliminar los distintos patógenos que los fagos puedan atrapar.^{24,25} Estas especies, a su vez, reaccionan con elementos del medio, generando ROS mucho más tóxicas, como el ácido hipocloroso o los radicales hidroxilo. La generación de ROS resulta por lo tanto clave para la defensa del organismo frente a diferentes enfermedades. De hecho, aquellos sujetos que tienen estas enzimas inhibidos son muy sensibles a padecer infecciones y suelen morir a una edad temprana.²⁶

Cabe añadir que la función de las especies reactivas de oxígeno va mucho más allá de servir como meros sistemas de defensa. Este tipo de compuestos contribuyen, entre otros, a la homeóstasis celular mediante la eliminación del estrés reductivo, precursor de enfermedades como el cáncer o la miocardiopatía;^{27,28} al tiempo que son elementos clave en la regulación de la señalización celular.^{29,30}

Pero para que los ROI, y por extensión las ROS, puedan funcionar como sistemas de defensa o de autoregulación de los organismos sin que su propia reactividad dañe los tejidos, estos compuestos deben estar sometidos a un riguroso control por parte del metabolismo celular. En el momento en que el balance entre la actividad de los sistemas prooxidantes y los antioxidantes se rompe, aparece el denominado estrés oxidativo. Este estrés oxidativo es el resultado de la acumulación de niveles de ROS superiores a los que los sistemas antioxidantes de la célula pueden eliminar, lo que lleva a provocar un daño irreparable en el entorno en que son producidas, que puede conducir incluso a la propia apoptosis celular.¹⁶

La causa de esta acumulación de ROS en los tejidos puede tener un origen endógeno, fruto por ejemplo de la pérdida de actividad de los sistemas antioxidantes del organismo, o puede ser provocada por factores exógenos. Dentro de este segundo grupo de fuentes de ROS, entre las que se cuenta la radiación UV o el humo, son particularmente interesantes aquellas que se enmarcan dentro del tratamiento de alguna enfermedad. En este sentido, una de las aplicaciones médicas más estudiadas para las especies reactivas de oxígeno es su uso en el tratamiento de tumores, entre las que destaca el uso de derivados porfirínicos en terapia fotodinámica.³¹⁻³³

En cualquier caso, la existencia de estrés oxidativo sobre un tejido provoca de

forma irremediable una degradación del mismo por exposición de las proteínas, lípidos o ADN a su toxicidad. Todo esto conlleva la pérdida de funcionalidad de los tejidos, lo que se suele traducir en la aparición de diversas enfermedades, entre las que cabe destacar las de tipo neurodegenerativo, como el Parkinson, el Alzheimer o el Huntington.

1.1.3 ENFERMEDADES ASOCIADAS A LAS ROS

Un desequilibrio en el balance entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros da lugar al conocido como estrés oxidativo. En los últimos años se ha descubierto que este estrés contribuye a la aparición de diversas patologías, entre las que se incluyen el cáncer,^{34,35} la aterosclerosis,³⁶ la hipertensión,³⁷ la isquemia,³⁸ la diabetes,³⁹ el síndrome de dificultad respiratoria aguda,⁴⁰ la fibrosis pulmonar idiopática,^{41,42} la enfermedad pulmonar obstructiva crónica,⁴³ el asma^{44,45} y diversos desórdenes neurológicos (como Alzheimer,⁴⁶ Parkinson⁶ y Huntington⁴⁷),^{48,49} entre otros.

Pese a esto, cabe decir que el papel de las ROS no es unívoco en estas enfermedades. En ciertas patologías estas especies cumplen tanto un papel como el contrario, y de hecho pueden funcionar tanto promoviendo como previniendo la muerte celular, la inflamación o el envejecimiento.²⁰ En este contexto, cabe destacar tres patologías estrechamente relacionadas con las ROS: el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y el envejecimiento.

ROS y cáncer: una relación de amor-odio

Se conoce genéricamente por el nombre de cáncer al conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación anormal e incontrolada de cualquier tipo de célula del organismo.⁵⁰ En consecuencia, cuando hablamos de cáncer en realidad estamos hablando de más de un centenar de enfermedades diferentes, que tan sólo tiene unos pocos rasgos sintomáticos en común. He aquí que radica una de las mayores dificultades en su tratamiento: la diversidad de factores que causan esta enfermedad implica una diversidad todavía mayor de terapias para combatirlos.

Con el fin de simplificar el número de tratamientos empleados y poder así

abarcando el mayor número de tipos de cáncer distintos, con frecuencia se ha optado por el desarrollo de terapias muy genéricas, como fue en su momento el *cis-platino*.⁵¹ Es en esta misma línea en la que se enmarca el uso de las especies reactivas de oxígeno como agentes antitumorales.^{52,53}

Como se ha indicado a lo largo de este capítulo, se sabe que una acumulación excesiva de ROS en los tejidos deriva en un daño celular incompatible con la supervivencia o el correcto funcionamiento de los mismos. Es por ello que una de las estrategias seguidas hasta el momento en terapia antitumoral se ha centrado en favorecer la presencia (o incluso estimular la producción) de estas especies tóxicas en el entorno del tejido canceroso, contribuyendo de esta forma a su degradación y, en última instancia, a su destrucción.^{52,53} A este respecto, habitualmente los tratamientos siguen una de las dos estrategias posibles: la estimulación de la generación de ROS mediante el suplemento de agentes prooxidantes, o la inhibición de los sistemas antioxidantes que utiliza la célula como sistema de defensa.

Pese a todo ello, esta es una de las enfermedades en que las ROS no juegan un único papel, sino que al mismo tiempo, y en función de las condiciones, su propia presencia puede ser beneficiosa o perjudicial para la proliferación del tumor. En este sentido, desde hace algún tiempo se ha podido asociar el incremento de ROS en células tumorales con la estimulación del crecimiento y la proliferación del propio tumor.⁵⁴⁻⁵⁶

Como se ha señalado previamente, una concentración moderada de ROS es fundamental para mantener la homeóstasis de las células. Así, mediante el control de la concentración de estas especies se pueden modular diversos procesos biológicos como la proliferación celular o su propia diferenciación;⁵⁵ con lo que no es de extrañar que las células cancerígenas estén sometidas a un estrés oxidativo constante que estimule su crecimiento y división.⁵⁴ De hecho, se ha observado que la supresión de los sistemas antioxidantes en estas células favorece el desarrollo de los tumores. En el cáncer de ovario, por ejemplo, se ha podido comprobar que en ensayos *in vivo* el desarrollo de los tumores se acelera al inhibir el enzima superóxido dismutasa de manganeso de sus células (MnSOD, tratado más adelante en este mismo capítulo).⁵⁴ Sin embargo, tras estimular la expresión de MnSOD en

este mismo tejido se observó cómo el tumor frenaba su crecimiento.⁵⁴ Un comportamiento análogo ha sido observado, por ejemplo, durante el tratamiento de distintos tipos de cáncer de páncreas.⁵⁷ Es por todo ello que los compuestos antioxidantes han sido ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer, especialmente en combinación con otros medicamentos anticancerígenos.⁵⁸

Enfermedades neurodegenerativas

El segundo gran grupo de enfermedades en que las especies reactivas de oxígeno cumplen un papel fundamental son las conocidas como enfermedades neurodegenerativas. La característica común que une a todas estas dolencias es la aparición de un daño progresivo sobre el tejido neuronal que conduce a una degradación paulatina del mismo (Figura 1.3) y, en consecuencia, a la pérdida de las funciones motora y cognitiva.⁴⁹ Dentro de este grupo no solo se incluyen las mencionadas enfermedades de Alzheimer, Parkinson o Huntington, sino que este tipo de trastorno abarca también la esclerosis lateral amiotrófica y la ataxia espinocerebelar o degeneración espinocerebelosa.⁵⁹⁻⁶¹

La importancia y repercusión de estas enfermedades en nuestra sociedad es manifiesta. En la actualidad representan uno de los principales problemas de salud en la población de avanzada edad, con más de 7.8 millones de casos en toda Europa (sumando Suiza, Noruega e Islandia a los 27) y más de 50 a nivel mun-

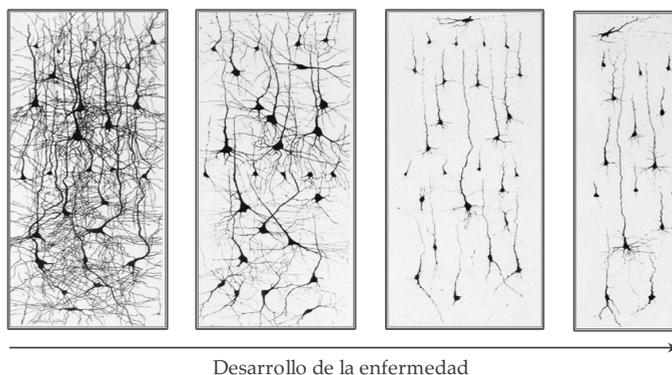


Figura 1.3 – Representación del efecto del estrés oxidativo sobre un tejido neuronal.

dial.^{62,63} De hecho, el Alzheimer se encuentra ya entre una de las seis principales causas de muerte en los Estados Unidos, mientras que el Parkinson, la segunda enfermedad neurodegenerativa más extendida, afecta a entre el 1 y el 2% de la población por encima de los 65 años.^{64,65} El incremento de la esperanza de vida, así como el progresivo envejecimiento de la población, hacen prever que para 2050 se triplique el número de afectados, hasta alcanzar más de 152 millones de casos de demencia en todo el mundo, lo que equivale a la actual población de Rusia.⁶³

A nivel fisiológico, el padecimiento de estas enfermedades se traduce en un deterioro paulatino de las funciones motoras y/o cognitivas, en diferente grado y proporción según el tipo de dolencia. En el caso del Alzheimer, por ejemplo, el elemento más representativo es una temprana pérdida de memoria a la que se le van añadiendo diversas dolencias, hasta llegar a mostrar gran dificultad en el habla, en la ingesta de alimentos o incluso al caminar. En cambio, el Parkinson por ejemplo se caracteriza por implicar problemas en la movilidad (lentitud, rigidez, temblor, cambios en el paso).⁵⁹

Como se ha indicado anteriormente, a nivel biológico estas enfermedades se caracterizan por la degeneración de las células neuronales; proceso que deriva, de forma inevitable, en su propia muerte mediante el mecanismo conocido como apoptosis celular.⁴⁸ Los procesos que inician la ruta apoptótica en estos trastornos son múltiples, pero entre ellos se puede destacar el papel del estrés oxidativo originado por una elevada concentración de ROS. Ahora bien, ¿cuáles son los factores que generan este estrés en el caso del Alzheimer o el Parkinson? Hemos visto que en el caso del cáncer la presencia de las especies reactivas de oxígeno estaba causada por su mediación en la estimulación de la proliferación celular. En cambio, su sobreproducción en las dolencias neuronales responde a causas muy distintas.

El cerebro, el órgano en el que se desarrollan estas enfermedades, es un consumidor nato de oxígeno. Así, pese a suponer poco más del 2% en masa del organismo, consume cerca del 20% del oxígeno total del cuerpo, lo que lo convierte en un elemento especialmente susceptible al estrés oxidativo. Este elevado consumo de oxígeno viene dado por el metabolismo de las neuronas y los astrocitos, que lo utilizan tanto durante los procesos de respiración celular como en la síntesis de

neurotransmisores.⁶⁶⁻⁶⁸ Pero hay ocasiones en que este estrés, habitualmente bajo control por los propios sistemas antioxidantes del organismo, se une al producido por nuevos sistemas generados por una mal metabolismo de las proteínas. Analicemos qué mecanismos llevan a un aumento del estrés oxidativo en el Alzheimer, como caso paradigmático.

Uno de los principales rasgos que caracterizan la enfermedad de Alzheimer es el depósito de unas placas proteicas en el córtex cerebral, en el espacio extracelular, también conocidas como placas amiloides. Como veremos más adelante, la formación de estos aglomerados proteicos es fundamental para que la enfermedad se pueda desarrollar.⁶⁹

La aparición de las placas amiloides, que ya describió Aloïs Alzheimer en 1907, proviene de la degradación metabólica de una proteína transmembrana conocida como proteína precursora amiloide, o PPA; presente principalmente en el sistema nervioso central.⁷⁰ La PPA está constituida por tres segmentos proteicos, de entre los cuales tan solo uno de ellos es responsable de la formación de los aglomerados cuando es liberado: el segmento conocido como β -amiloide (o $A\beta$). Como se puede ver en la Figura 1.4, la degradación de las PPA puede llevarse a cabo a través de dos rutas metabólicas distintas: una primera en que el $A\beta$ es dividido en dos segmentos y una segunda en que este se mantiene intacto. Habitualmente, el proceso metabólico sigue la primera ruta, con lo que el $A\beta$, truncado por la mitad, pierde la capacidad agregante. Esta es la conocida como vía no-amiloidógena. La segunda vía metabólica, conocida como amiloidógena, tiene lugar con mucha menor frecuencia.⁷¹ En esta, la degradación de la PPA se desarrolla manteniendo intacto el segmento $A\beta$, de forma que este es liberado al medio extracelular.⁷² Cabe decir que este hecho no implica, de por sí, la aparición de las placas amiloides. Las proteínas $A\beta$ se encuentran en disolución en pacientes sanos,⁶⁹ y de hecho se piensa que podrían tener un importante papel en funciones tales como la plasticidad sináptica o la memoria.⁷³

La toxicidad de las proteínas $A\beta$ aparece cuando estas se encuentran en su forma aglomerada.⁷⁴ Son dos los factores que contribuyen (o posibilitan) la formación de las placas amiloides. Por un lado, la mutación de un conjunto específi-

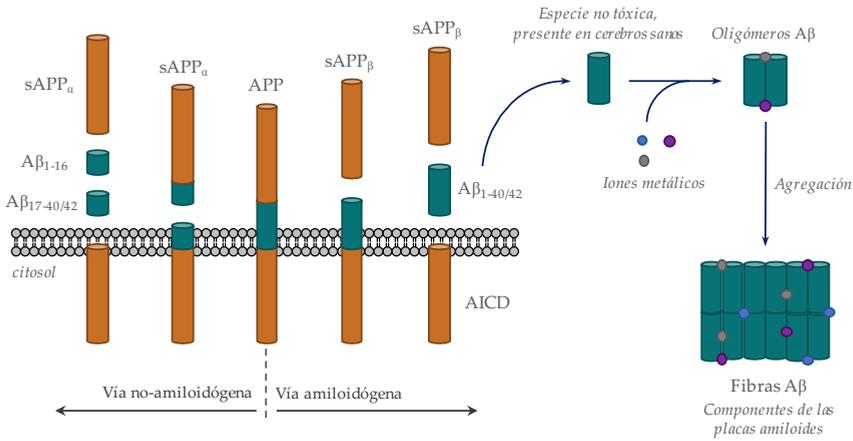


Figura 1.4 – Representación esquemática del proceso de división proteolítica de la PPA. En la ruta no amiloidogena, la PPA es metabolizada dando lugar a las formas truncadas de la Aβ: Aβ₁₋₁₆ y Aβ_{17-40/42}. En la vía amiloidogena, en cambio, la degradación de la APP da lugar al péptido Aβ_{1-40/42} que, por interacción con los metales del medio, puede llegar a oligomerizar y, finalmente, formar las fibras Aβ, precursoras de las placas amiloides.⁶⁹

co de genes, relacionados con las proteínas encargadas de la metabolización de la PPA, entre los que destacan los PSEN1 y PSEN2.^{75,76} Esta mutación conduce a un incremento en la producción de Aβ a través de la estimulación de la vía amiloidogena de degradación de la PPA.⁷⁵ Esto comporta un aumento de la concentración de esta proteína en el entorno extracelular. Por otro lado, el segundo factor que contribuye de forma determinante a la formación de las placas es la presencia de metales en disolución, en especial Cu(II) y Zn(II). Estos elementos funcionan como agregadores de las proteínas β-amiloides, lo que unido a la elevada concentración de estas en el medio, conduce a la formación de una serie de oligómeros de Aβ, insolubles en el medio, precursoros de las fibras Aβ (ver Figura 1.5).^{77,78} La sucesiva agregación de estas fibras lleva a la formación de las placas amiloides (Figura 1.6). Es, de hecho, la presencia de estos metales con actividad redox (cobre, hierro, etc.) en la estructura de los aglomerados proteicos, lo que les confiere gran parte de su toxicidad.^{79,80}

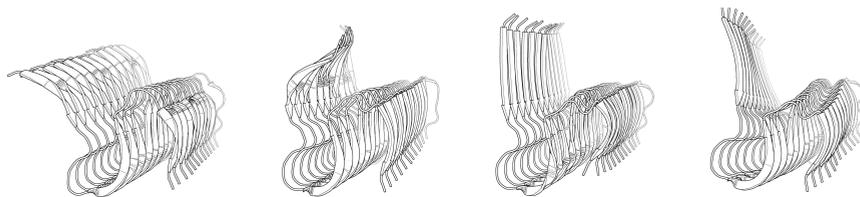


Figura 1.5 – Representación de cuatro de los conformeros determinados para la proteína β -amiloidea (PDB ID 2MXU).⁷⁴

Es en este punto, por fin, donde aparece el estrés oxidativo. La complejación de ciertos metales de transición (Cu(II) y Fe(III) fundamentalmente) por parte de las placas $A\beta$ altera su reactividad redox, lo que les permite participar en la generación de ROS.⁸¹ Así, los propios metales que funcionan como agregadores en las placas amiloides son también capaces de producir catalíticamente superóxido y peróxido de hidrógeno, lo que a su vez da lugar a los tóxicos radicales hidroxilo.⁸² Es este estrés oxidativo, imposible de ser asumido por los sistemas antioxidantes del organismo, el responsable de degradar el tejido neuronal y dar lugar, en última instancia, a la enfermedad de Alzheimer.

En conclusión, y a diferencia del caso del cáncer estudiado anteriormente, la enfermedad de Alzheimer está causada por la combinación de una serie de factores que derivan en una incorrecta metabolización de ciertas proteínas. Esto com-

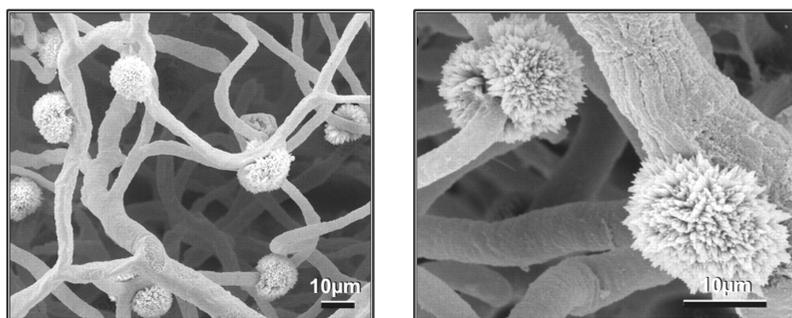


Figura 1.6 – Imágenes SEM de depósitos de placas β -amiloides sobre tejido vascular de cerebro de ratón.⁸⁰

porta una acumulación de los precursores de las fibras A β que, por interacción con metales de transición deficientemente regulados, presentes en el medio, dan lugar a la formación de las placas amiloides. Son estas placas y los metales en ellas complejados los responsables de la generación de ROS en cantidades inasumibles por el organismo, cuya actividad deriva en la degradación del tejido neuronal.

El proceso de generación del Alzheimer, y el mecanismo bioquímico por el cual tiene lugar, sirven para ilustrar el modo de aparición de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, así como el papel que tiene el estrés oxidativo en ellas. En el caso del Parkinson, por ejemplo, es el gen que codifica la α -sinucleína el que muta, aumentando la tendencia de esta proteína a agregar.⁸³ En el caso del Huntington, es la poliglutamina la proteína que presenta la capacidad para formar las placas proteicas.⁸⁴

Envejecimiento y senescencia celular

La tercera gran cuestión sobre la que cabe detenerse al examinar las enfermedades relacionadas con las ROS es el propio envejecimiento.

La reducción tanto en la tasa de natalidad como en la de defunción en los países occidentales está llevando a un envejecimiento progresivo de la población: cada vez hay más personas de avanzada edad en nuestra sociedad. Sin ir más lejos, en 2017 el 19.4 % de la población europea tenía más de 65 años, porcentaje que no para de aumentar (en 2015 el valor era del 17.0 %).⁸⁵ Por supuesto, el principal problema que entraña el envejecimiento de la población no es un simple aumento de la edad, sino el hecho que esta continúa siendo un factor de riesgo fundamental en la mayoría de enfermedades crónicas o déficits funcionales del organismo.⁸⁶

Son diversas las teorías que asocian un incremento de la edad con la aparición de ciertos problemas en el organismo, como cambios en el control del metabolismo o los patrones de expresión génica. Pero entre estos problemas destaca uno en particular: una elevada producción de ROS.⁸⁷⁻⁸⁹ No en vano se ha relacionado la presencia de concentraciones bajas de especies reactivas de oxígeno en el organismo con el incremento en la esperanza de vida.⁹⁰ Este hecho es especialmente significativo ya que, entre los factores que estimulan la senescencia celular (como

el acortamiento de los telómeros o el daño acumulado sobre el ADN), se encuentra la presencia de niveles altos de ROS en las células.⁹¹ Así, mediante el incremento de la concentración de especies reactivas en el entorno celular, se propicia la senescencia de las propias células, lo que contribuye a la aparición de múltiples enfermedades relacionadas con la edad.

* * *

Como hemos podido comprobar, las especies reactivas de oxígeno tienen un papel central en el desarrollo de múltiples enfermedades; pero su participación sigue patrones muy diversos en función de la dolencia que se estudie. Mientras que en algunos trastornos la existencia de ROS implica la degradación de los tejidos, como sucede con el Alzheimer, en otras enfermedades cumplen la función opuesta, llegando incluso a estimular la proliferación celular en el cáncer. Asimismo, en cada caso las ROS son generadas mediante distintos sistemas y por diversas causas. No existe incluso ni unanimidad en el tipo de ROS que actúa en cada enfermedad: el estrés oxidativo es debido al conjunto de especies reactivas que llegan a generarse (radicales hidroxilo, ácido hipocloroso o hipobromoso, diferentes especies nitrogenadas, peróxido de hidrógeno, superóxido y un largo etcétera de compuestos). Llegado este punto cabría preguntarse si hay algún elemento que funcione como nexo de unión entre todos los trastornos derivados de la presencia de ROS en el organismo.

Si observamos el proceso de generación de las especies reactivas de oxígeno en cada una de las dolencias estudiadas podremos encontrar un hecho que parece ser común en todas ellas. Cuando los diferentes sistemas del medio reaccionan con el oxígeno triplete (bien sean los metales de las placas amiloides, bien sean los sistemas de transporte electrónico de las mitocondrias), el primer paso en la generación de ROS es la reducción monoelectrónica del O_2 . En esta primera reacción se produce el radical superóxido o, en caso que la reducción sea doble, el peróxido de hidrógeno. Es a partir de la generación de estos compuestos que empieza una cascada de reacciones que derivan en la aparición de toda una serie de especies mucho más tóxicas, como el radical hidroxilo o los peroxinitritos.

Existe, en consecuencia, un elemento que une a todas las enfermedades tratadas en este apartado. Un compuesto a partir de la cual se generan el resto de especies reactivas de oxígeno y que, en consecuencia, funciona como piedra angular en el desarrollo de la mayoría de enfermedades neurodegenerativas: el radical superóxido.

1.1.4 EL RADICAL SUPERÓXIDO

El radical superóxido es una de las especies reactivas de oxígeno más importantes a nivel biológico, tanto por su implicación en numerosos procesos metabólicos, como por su participación en el desarrollo de diversas enfermedades. Su generación se produce por la reducción monoelectrónica del dióxígeno (reacción 1.1).



Mediante esta primera reducción del dióxígeno se logra aparear tan solo uno de los dos electrones desapareados que presenta, por lo que el producto de esta primera reacción es una especie radicalaria con carga negativa (-1). La configuración electrónica del radical superóxido se muestra en la Figura 1.7.

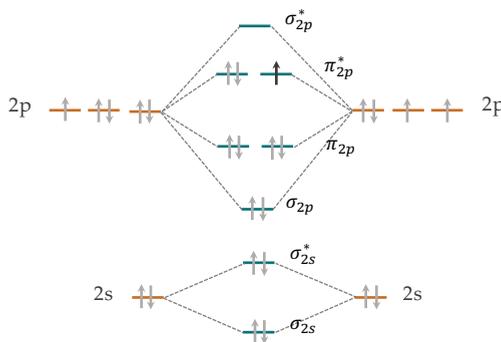


Figura 1.7 – Diagrama de orbitales moleculares del anión radical superóxido en su estado fundamental.

Generación endógena del radical superóxido

A nivel biológico, en los organismos sanos el radical superóxido se genera principalmente a través de dos sistemas: en la cadena respiratoria mitocondrial, como subproducto de la respiración celular, y en el interior de los fagocitos, como sistema de defensa.⁹² Analicemos brevemente cada uno de estos procesos.

Durante la respiración celular, proceso metabólico que tiene lugar en las mitocondrias, los organismos aerobios extraen energía de la oxidación de la materia orgánica usando el O_2 como agente oxidante. En este proceso existe una etapa concreta en que los electrones procedentes de la oxidación de los sustratos orgánicos son utilizados en la síntesis de ATP mediante el uso de los que se conoce como *cadena de transporte electrónico*. En esta, los electrones pasan a través de una serie de complejos proteicos situados en la membrana interna mitocondrial. Es en este punto de la ruta de respiración celular donde tiene lugar la síntesis de los radicales superóxido. La cadena de transporte electrónico no funciona mediante un mecanismo absolutamente eficaz, sino que presenta ciertas fugas electrónicas que llevan a que entre el 1 y el 2% del dióxígeno que se emplea en este proceso metabólico acabe en forma de $O_2^{\bullet-}$. De esta forma, los defectos mecánicos y/o estructurales del proceso de respiración celular llevan a una generación constante de radicales superóxido en el interior mismo de la célula en un proceso que se podría calificar de no intencionado.³⁶

Por otra parte, el segundo mecanismo principal de generación de los radicales $O_2^{\bullet-}$ en organismos sanos toma la perspectiva contraria: en este caso el superóxido se genera de forma completamente intencional y no como defecto de un proceso metabólico. Es el caso de los fagocitos y la NADPH oxidasa. Como se ha comentado anteriormente en este mismo capítulo, los fagocitos son un tipo de célula perteneciente al sistema inmune encargados de capturar y eliminar distintos agentes patógenos del organismo. El mecanismo que siguen a la hora de eliminar los elementos extraños se puede resumir de la siguiente forma. En primer lugar, los agentes patógenos son capturados en una vesícula en el interior del fagocito, una vesícula cuya membrana se encuentra cargada con el complejo proteico de la NADPH oxidasa. Una vez se ha capturado el patógeno, se procede a activar

este sistema de proteínas de forma que empieza a oxidar el NADPH y a utilizar los electrones producto de esta reacción para reducir el dioxígeno a superóxido.²² Este hecho implica una enorme producción de $O_2^{\bullet-}$ durante breves periodos de tiempo. Como veremos en el siguiente apartado, la toxicidad del radical superóxido es relativamente baja, pero en cambio es capaz de generar distintos tipos de ROS mucho más tóxicas, como el ácido hipocloroso o el radical hidroxilo. La generación de estas especies dentro de la vesícula del fagocito da lugar a un estrés oxidativo de tal magnitud que conduce a la degradación del agente patógeno que hubiese capturado en un inicio.³⁶

El superóxido es, por lo tanto, una especie generada en continuo en el metabolismo de los seres vivos; un compuesto que, pese a no presentar una elevada toxicidad, es la raíz de la mayoría de especies reactivas de oxígeno. Analicemos, pues, en qué se basa su toxicidad.

Especies reactivas derivadas del superóxido

Pese a la elevada reactividad que suelen mostrar las especies radicalarias, lo cierto es que el radical superóxido muestra una capacidad de reaccionar con la materia orgánica bastante moderada; especialmente si se compara con la que muestran otras ROS como el radical hidroxilo.⁹³ Aún así, cabe decir que la presencia del $O_2^{\bullet-}$ en el organismo no es completamente inocua, ya que este compuesto presenta cierta capacidad de oxidar a la materia orgánica.^{94,95}

Pero la característica que convierte al radical superóxido en un compuesto tan peligroso para el organismo es su capacidad de generar nuevas especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, mucho más tóxicas que él mismo. Como podemos ver en la Figura 1.8, mediante la generación del superóxido se abre la puerta a la formación de toda una gama de ROS y RNS, como el peroxinitrito ($OONO^-$) o el radical hidroxilo (OH^\bullet), cuya capacidad de reaccionar con la materia orgánica (y por tanto de degradar los tejidos) es mucho mayor. Examinemos un poco más de cerca este entramado de reacciones.

Partiendo de la reducción monoelectrónica del dioxígeno se llega a la formación del radical superóxido, que puede dismutar a su vez (bien espontáneamente,

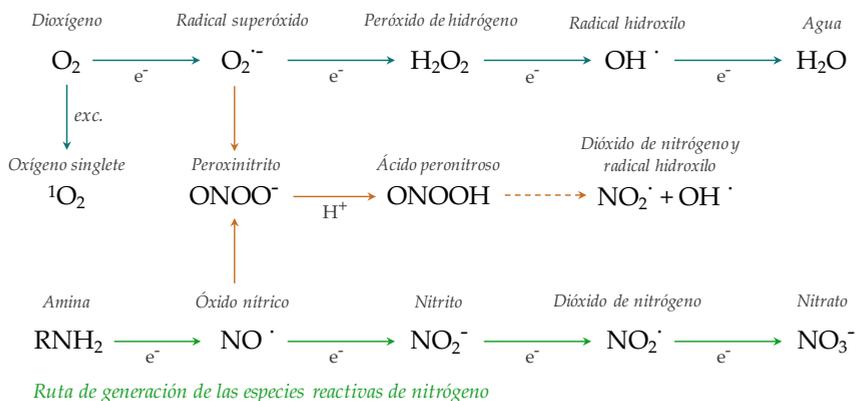
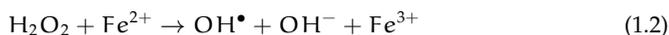
Ruta de generación de las especies reactivas de oxígeno

Figura 1.8 – Producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en células de mamíferos.²²

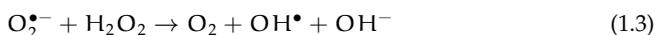
bien ayudado por las superóxido dismutasas) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno (O_2). Llegado este punto, el H_2O_2 se puede descomponer fundamentalmente a través de dos mecanismos. En primer lugar, puede dismutar en agua y dióxígeno por mediación de los enzimas catalasa. En esta ruta de eliminación del peróxido ninguno de los productos presenta ninguna toxicidad. En segundo lugar, el H_2O_2 puede reaccionar con diferentes metales del medio, entre los que destacan los iones Fe(II) y Cu(I) , para dar lugar al radical hidroxilo mediante la conocida como reacción de Fenton (ver ecuación 1.2).⁹⁶



Cabe destacar en este punto la importancia que tiene la generación del radical hidroxilo en un medio orgánico, especialmente por derivar de la presencia de las especies superóxido y peróxido. El radical OH^\bullet es la forma neutra del ion hidroxilo y se caracteriza por ser una especie extremadamente tóxica.⁹⁷ Esta toxicidad se puede explicar atendiendo a la elevada reactividad que presenta tanto frente a compuestos inorgánicos como orgánicos, entre los que destacan ADN, proteínas, lípidos o carbohidratos. De este modo, el OH^\bullet puede llegar a causar daños en los tejidos más allá del alcance de cualquier otra ROS.⁹⁷

Un hecho a destacar de la formación del OH^\bullet es el importante papel que cumple el radical superóxido en su generación. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ no solamente participa como precursor del peróxido de hidrógeno y, en consecuencia, del radical hidroxilo; sino que bajo condiciones de estrés oxidativo, es capaz de degradar la ferritina y liberar el Fe(II) de su interior.⁹⁸ De esta forma, el radical superóxido, por sí solo, posibilita la presencia de todos los agentes necesarios para la formación de los radicales OH^\bullet en disolución.

Por último, cabe mencionar brevemente que el radical OH^\bullet se puede formar a partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 mediante un segundo método, conocido como reacción de Haber-Weiss (ver ecuación 1.3).⁹⁹



Más allá de las especies reactivas de oxígeno, el radical superóxido también puede reaccionar con diversos compuestos nitrogenados para dar lugar a una segunda familia de especies tóxicas. La interacción de la fagocito oxidasa con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ en presencia de óxido nítrico (NO^\bullet) conduce a la formación del peroxinitrito (ONOO^-). Este compuesto, a su vez, puede protonarse en medio ligeramente ácido para dar lugar al ácido peroxinitroso (ONOOH). La característica más importante de esta especie es su inestabilidad en condiciones normales, lo que conduce a su descomposición espontánea en dióxido de nitrógeno (NO_2^\bullet) y, de nuevo, radical hidroxilo (OH^\bullet).²²

A la vista de todos estos hechos, se puede considerar que el radical superóxido es una pieza fundamental dentro de la generación de ROS. Su presencia en los organismos sanos conduce a la formación de un conjunto de especies con una elevada toxicidad, capaces de degradar los tejidos sanos y, en consecuencia, de favorecer el desarrollo de múltiples enfermedades. Es por ello que se considera que la forma más efectiva de eliminar y/o prevenir el estrés oxidativo es a través de la eliminación de los propios radicales superóxido.

Con este fin, los organismos presentan una serie de sistemas de defensa antioxidantes entre los que destaca uno en particular: la familia de la superóxido dismutasa.

1.2 PARTE II. LOS SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Como hemos visto hasta el momento, pese a la nula toxicidad del oxígeno triplete, sus especies excitadas o reducidas (a excepción del agua) presentan una elevada capacidad por reaccionar con la materia orgánica. Esta reactividad las ha llevado a convertirse en elementos centrales en el desarrollo de múltiples enfermedades, entre las que se encuentran el cáncer o las dolencias de carácter neurodegenerativo. Asimismo, entre todas las especies reactivas de oxígeno, cabe destacar una que por su constante producción en el organismo y por ser elemento central en la generación del resto de ROS, requiere una especial atención: el radical superóxido. No es por tanto de extrañar que, ante la importancia de este compuesto, los organismos presenten múltiples sistemas de defensa encargados de su eliminación; de la misma forma que no es extraño que el combate frente a estas enfermedades muchas veces se haya centrado en el diseño de miméticos de estos mismos sistemas de defensa naturales. A lo largo de este apartado del capítulo vamos a analizar cada uno de estos sistemas, empezando por los sistemas antioxidantes endógenos.

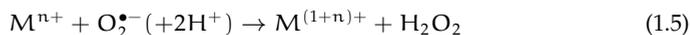
1.2.1 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS: LA SOD

La producción continua de ROS en el organismo y el riesgo que entrañan estas especies hacen necesaria la presencia de una serie de sistemas de defensa antioxidantes que consigan evitar el estrés oxidativo. Algunos de los sistemas más importantes encargados del catabolismo de las ROS, y que pasaremos a analizar a continuación son las familias enzimáticas de la superóxido dismutasa y la catalasa.²⁰ Aún así, cabe mencionar brevemente la existencia de muchos otros sistemas que sobrepasan los límites de estudio de esta tesis, como son el sistema tiorredoxina y tiorredoxina reductasa,¹⁰⁰ las peroxirredoxinasas (que también funcionan como peroxinitrito reductasas) o las metionina sulfóxido reductasas.¹⁰¹⁻¹⁰³

En los organismos aerobios, la eliminación de los radicales superóxido es llevada a cabo por una familia de enzimas conocidos como las superóxido dismutasas (también llamadas SOD). Este sistema de metaloproteínas, que se encarga de ca-

talizar la reacción de dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en O_2 y H_2O_2 , constituye la principal defensa de los organismos frente a las especies reactivas de oxígeno; por lo que ha podido ser identificado a lo largo de todos los reinos biológicos, tanto en células procariotas como eucariotas.¹⁰⁴

En su actividad superóxido dismutasa, la SOD sigue un mecanismo denominado de "ping-pong" para el estado de oxidación del metal.¹⁰⁴ En este, el metal del centro activo del enzima (M) sufre un proceso de reducción, que es seguido rápidamente por otro de oxidación, con el que vuelve a su estado inicial. Asociado a este proceso tiene lugar la degradación de dos moléculas de superóxido: con la reducción inicial del metal se oxida una primera molécula de $O_2^{\bullet-}$ a O_2 , mientras que con la etapa de oxidación (y la vuelta a su estado original) se procede a la reducción de una segunda molécula de superóxido a H_2O_2 . Este proceso se encuentra resumido en las ecuaciones 1.4 y 1.5.¹⁰⁴



A través de este mecanismo la familia de las superóxido dismutasas consigue acelerar la velocidad de dismutación de los radicales superóxido con respecto al del proceso de degradación espontáneo. Con ello se consigue reducir el tiempo de vida media de estas especies hasta en un orden de magnitud,¹⁰⁴ de forma que se minimiza la posibilidad de que reaccione con la materia orgánica.

Ahora bien, cabe decir que lo que conocemos como SOD en realidad no es un solo enzima, sino un conjunto de cuatro familias de metaloproteínas que se diferencian tanto en el elemento metálico que utilizan para llevar a cabo la tarea catalítica, como en el plegamiento de la propia proteína.¹⁰⁵ Así, en función del cofactor empleado podemos encontrar la SOD de Cu y Zn (CuZn-SOD), la SOD de Mn (Mn-SOD), la de Fe (Fe-SOD) o la recientemente descubierta SOD de Ni (Ni-SOD).^{106,107} Analicemos a continuación la estructura y mecanismo de actuación de cada uno de estos sistemas.

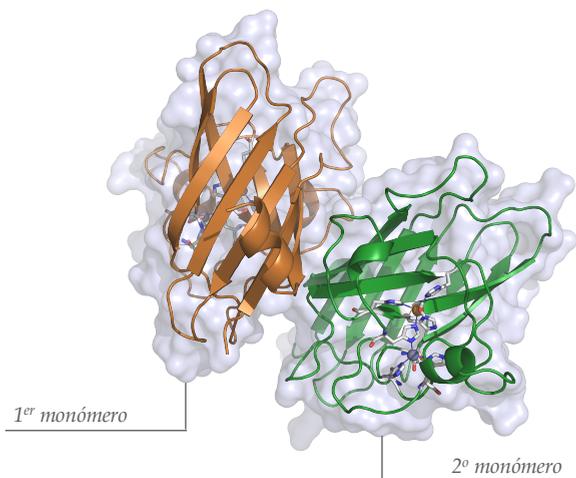
Superóxido dismutasa de Cu y Zn (CuZn-SOD)

El inicio del estudio de las superóxido dismutasas tiene el año 1969 como punto de referencia. Ese año, Joe M. McCord e Irwin Fridovich demostraron que una conocida proteína azul de cobre, la eritrocupreína, era capaz de catalizar la dismutación del radical superóxido.¹⁰⁸ A partir de aquél momento, esta proteína pasaría a conocerse como superóxido dismutasa.

La CuZn-SOD es un enzima dimérico presente en el citosol y el entorno extracelular de las células eucariotas. En esta metaloproteína, cada una de sus unidades monoméricas presenta un sitio activo con un átomo de cobre y otro de zinc, conectados entre sí a través del ligando puente imidazol de una histidina (ver Figura 1.9). Además, en el centro activo el cobre está unido a otras tres histidinas y a una molécula de agua, que se sitúa en la posición apical de una pirámide cuadrada, cuya base está formada a su vez por los cuatro aminoácidos mencionados. Por su parte, el átomo de zinc está coordinado por dos histidinas (además de la que funciona como puente con el Cu), así como a un residuo de aspartato.¹⁰⁹

Durante la reacción de catálisis, cada uno de los metales del centro activo participa en esta de un modo distinto. Por un lado, el cobre es el elemento electroquímicamente activo, encargado de la reducción u oxidación directa de los radicales superóxido. Es por ello que su estado de oxidación varía entre +2 y +1 a lo largo del ciclo catalítico. Por otro lado, se piensa que el zinc juega un papel meramente estructural, con lo que no tiene una implicación directa en la dismutación de los radicales superóxido. De hecho, la substitución de este elemento por otros metales, como Co(II), Cu(II), Cd(II) o Hg(II), tan solo da lugar a una pérdida menor de actividad SOD.¹¹⁰ Actualmente se considera que el papel del zinc en este enzima está relacionado con la estabilización de la propia estructura de la proteína, de forma que permite que esta mantenga su actividad en un amplio intervalo de pH.¹¹¹

Un elemento clave del funcionamiento de la CuZn-SOD radica en el modo de coordinación de la histidina puente en función del estado de oxidación del cobre. Así, durante la primera semirreacción del ciclo catalítico (ec. 1.4), asociada a la reducción del $\text{Cu}^{2+}\text{Zn}^{2+}\text{-SOD}$ a $\text{Cu}^+\text{Zn}^{2+}\text{-SOD}$, se produce la rotura del enlace



Centro activo del enzima:

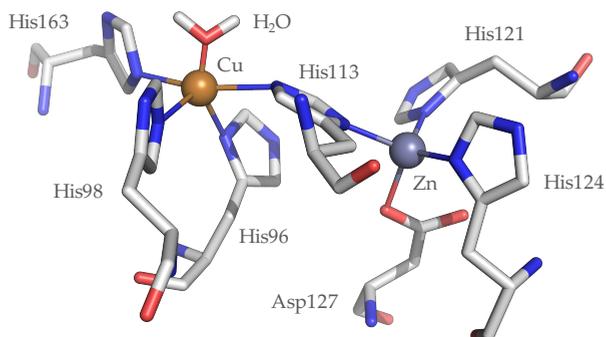


Figura 1.9 – Representación de la estructura del enzima CuZn-SOD, así como de su centro activo. (PDB ID 2JLP)¹¹¹ Los metales han sido representados como esferas de radio arbitrario.

entre esta histidina y el átomo de cobre, con lo que queda unida únicamente al zinc (ver Figura 1.10).¹¹³ Este enlace se vuelve a formar en la segunda semirreacción del ciclo, cuando el Cu(I) retorna a su forma oxidada Cu(II). Cabe añadir que, más allá de esta modificación, las formas oxidada y reducida de la CuZn-SOD no presentan ninguna otra diferencia estructural significativa.^{113,114}

El segundo aspecto que cabe destacar acerca de la estructura de este enzima

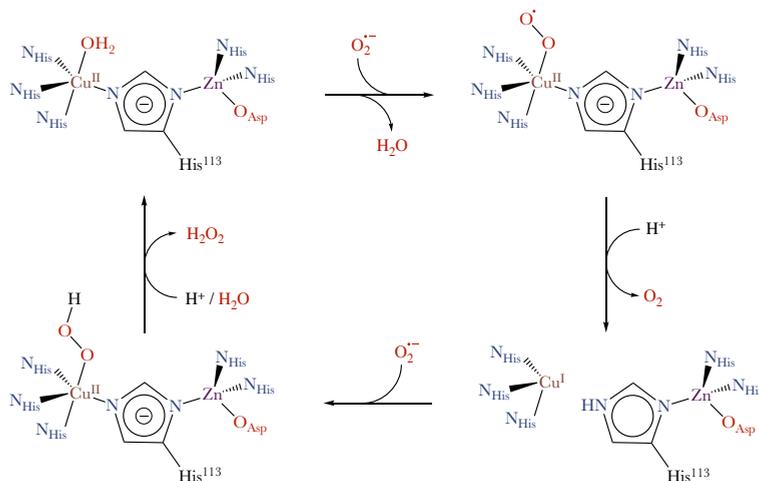


Figura 1.10 – Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la dismutación de los radicales superóxido cuando es llevado a cabo por la CuZn-SOD.^{112,113}

es la forma de su centro activo. El metal con actividad catalítica de este sistema proteico se encuentra situado en el fondo de una cavidad cónica de alrededor de 15 Å de profundidad. El diámetro de la cavidad, que en su superficie llega a los 12 Å, se estrecha progresivamente hasta llegar al entorno inmediato del cobre, donde no llega los 3 Å de ancho.¹¹⁰ El fondo de este pozo tiene de hecho el tamaño adecuado para albergar el radical superóxido. A este respecto, cabe mencionar que el pequeño diámetro del fondo de la cavidad reduce significativamente la exposición del cobre al disolvente. Así, este elemento presenta una superficie de exposición de apenas 5.6 Å², de forma que únicamente la posición lábil del complejo de Cu(II) está expuesta al medio. Por su parte, el átomo de zinc se encuentra completamente enterrado bajo la estructura de la proteína. Cabe por último indicar que esta cavidad es el único acceso de que dispone el radical superóxido para aproximarse al centro activo de la CuZn-SOD.¹¹⁰

Al analizar la estructura del centro activo que se acaba de describir, puede dar la impresión que la estrechez y la profundidad del acceso al sitio reactivo del enzima supone una dificultad añadida al desarrollo de su actividad dismutasa.

Nada más lejos de la realidad. Alrededor del acceso al centro activo, la CuZn-SOD presenta una serie de residuos altamente conservados entre especies, en su mayoría ácido glutámico y lisina, que se encuentran cargados a pH fisiológico. La carga de estos aminoácidos conduce a la generación de un gradiente electrostático a lo largo de la estructura del centro activo, mediante el cual se consigue atraer al radical superóxido (de carga negativa) hacia el interior mismo de la cavidad, hasta el entorno inmediato del cobre.¹¹⁰

Por último, al comparar las diferentes estructuras cristalinas de la CuZn-SOD reportadas en la bibliografía (como por ejemplo las estructuras PDB con código 2JLP¹¹¹ o 1SXA¹¹⁵), se puede observar la existencia de una cadena de moléculas de agua cuya posición es prácticamente invariable en todas ellas. Este conjunto de aguas conecta, a través de una red de enlaces de hidrógeno, al agua de coordinación con el disolvente.

En la actualidad se piensa que esta red de moléculas de agua puede cumplir un papel doble durante el proceso catalítico. Por una parte, pueden servir como ruta de acceso para la difusión de los radicales superóxido al interior del centro activo. Por otro lado, puede también servir para suplir de protones el radical superóxido durante su reducción a peróxido en la segunda etapa del ciclo (ec. 1.5). Por lo tanto, esta red de moléculas de agua puede jugar un papel esencial en el mecanismo catalítico de la CuZn-SOD.^{115,116}

Superóxido dismutasa de Mn (Mn-SOD)

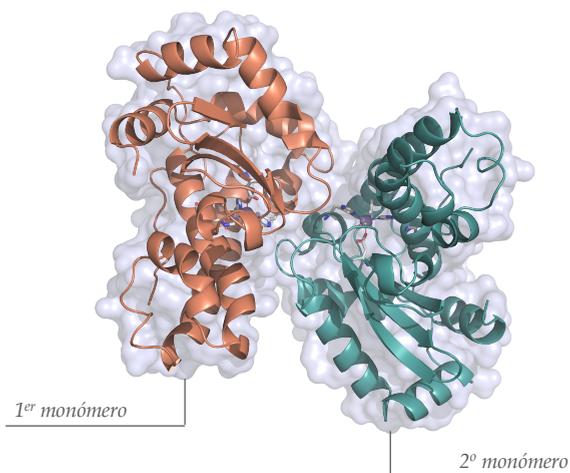
El segundo gran grupo de enzimas dentro de las superóxido dismutasas es el correspondiente a la Mn-SOD, que pasamos a describir a continuación. La Mn-SOD es un tipo de metaloproteína SOD caracterizada por contener un átomo de manganeso en su centro activo. Este enzima, descubierto por I. Fridovich *et al.* en 1970,¹¹⁷ se ha conservado prácticamente invariable durante la evolución de los organismos, motivo por el cual es un enzima ubicuo en la mayoría de reinos biológicos. Pese a ello, su distribución depende del tipo de célula. En los organismos eucariotas, por ejemplo, la Mn-SOD se encuentra en la matriz mitocondrial, mientras que en las bacterias se puede hallar en todo el citosol.

El hecho de que este enzima centre su actividad en el entorno mitocondrial la convierte en el principal sistema antioxidante del organismo, ya que es en este orgánulo donde se genera la mayor parte de los radicales superóxido en la célula.¹¹⁸ De hecho, una alteración de la expresión o la función de este enzima tiene importantes consecuencias sobre la actividad de las mitocondrias o incluso sobre la propia salud de la célula, llevando a la aparición de distintas enfermedades.¹¹⁹

A nivel estructural, la Mn-SOD puede hallarse tanto en su forma dimérica (típicamente en bacterias) como en su forma tetramérica (en eucariotas), conteniendo un solo átomo de Mn por subunidad (Figura 1.11). En cualquier caso, el centro activo del enzima se mantiene invariable independientemente del tipo del organismo en que se encuentre. En este, el átomo de Mn está unido a cuatro ligandos de la proteína (tres histidinas y un residuo de aspartato) y una molécula de agua con una geometría de bipirámide trigonal.¹⁰⁴

De igual modo que sucede en la CuZn-SOD, cuando la dismutación de los radicales superóxido es llevado a cabo por la Mn-SOD, el metal de su centro activo participa en la reacción a través de un mecanismo cíclico de reducción/oxidación. Pero, a diferencia de lo que sucede en el enzima de cobre, en la Mn-SOD el metal no fluctúa entre los estados de oxidación +2 y +1 sino que, al tratarse de manganeso, lo hace entre los estados +3 y +2 (ver Figura 1.12). Esta es la primera de las diferencias en el mecanismo de actuación entre los dos enzimas.

La segunda gran diferencia que podemos encontrar está en el modo de interacción del superóxido con el metal. En el caso de la Mn-SOD, el $O_2^{\bullet-}$ enlaza al manganeso a través de su posición de coordinación insaturada en la primera semirreacción, sin que con ello se produzca la ruptura de ningún enlace ni el desplazamiento del agua de coordinación. En cambio, en el caso de la CuZn-SOD, esta molécula de agua es substituida por el superóxido entrante en la primera semirreacción del ciclo. En todo caso, cabe mencionar que no hay consenso acerca del mecanismo de la segunda semirreacción, donde el Mn^{2+} oxida el superóxido a H_2O_2 .¹²¹ Por un lado, diversos autores defienden el mecanismo asociativo de esfera interna como el método más probable por el que tiene lugar la reacción (ver Figura 1.12).^{112,121} En este, la entrada del radical superóxido en el complejo



Centro activo del enzima:

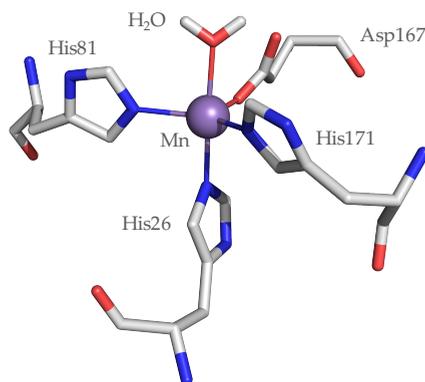


Figura 1.11 – Representación de la estructura del enzima MnSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1VEW)¹²⁰ El átomo de manganeso ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.

de Mn^{2+} se produce a través de la posición insaturada del metal incrementando su índice de coordinación hasta seis. Este modo de unión viene reforzado por la obtención reciente de diversas estructuras cristalinas de MnSOD de *Caenorhabditis elegans* y humanos en el que anión azida (N_3^-) coordina de este modo al manganeso (PDB ID 5AG2 y 5T30).^{122,123} Cabe indicar que el anión azida se ha considerado

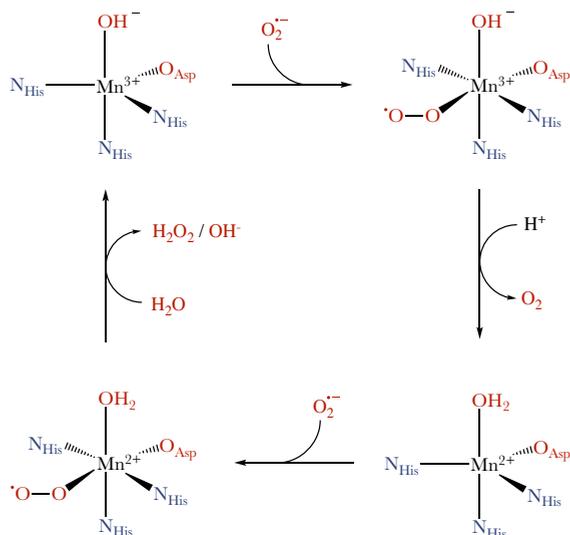


Figura 1.12 – Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la dismutación de los radicales superóxido cuando es llevado a cabo por la Mn-SOD. ^{112,121}

típicamente como un sustrato análogo al radical superóxido en su unión con los enzimas SOD.

Por contra, diversos estudios muestran que los ligandos exógenos no son capaces de unirse al sitio reducido de la Mn-SOD. ¹²⁴ Si este hecho fuese extensible al radical superóxido, se vería reforzada la idea de que la segunda parte del ciclo tiene lugar a través de un mecanismo de esfera externa, en el que el superóxido, al reducirse, tomaría un protón del agua de coordinación, que pasaría a su forma hidroxilada. ^{112,125} Esta hipótesis está apoyada por la elevada afinidad que muestra el anión hidroperoxido por los iones metálicos trivalentes, como es el caso del manganeso en la forma oxidada del enzima. Este hecho debería conducir a la inhibición del enzima, cosa que no se observa. Con todo, a la vista de los últimos trabajos sobre la MnSOD, el mecanismo de esfera externa parece el modo de actuación menos probable para este tipo de sistemas. ¹²¹

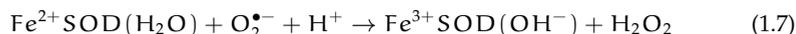
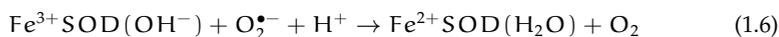
En tercer lugar, la última gran diferencia con respecto al mecanismo de la CuZn-SOD lo encontramos en la propia agua de coordinación. En el caso de la Mn-SOD, esta agua oscila entre su forma neutra y desprotonada en función del

estado de oxidación del metal. De esta forma, el Mn^{3+} se encuentra coordinado por un OH^- que pasa a agua cuando el manganeso se reduce a Mn^{2+} .

Superóxido dismutasa de Fe (Fe-SOD)

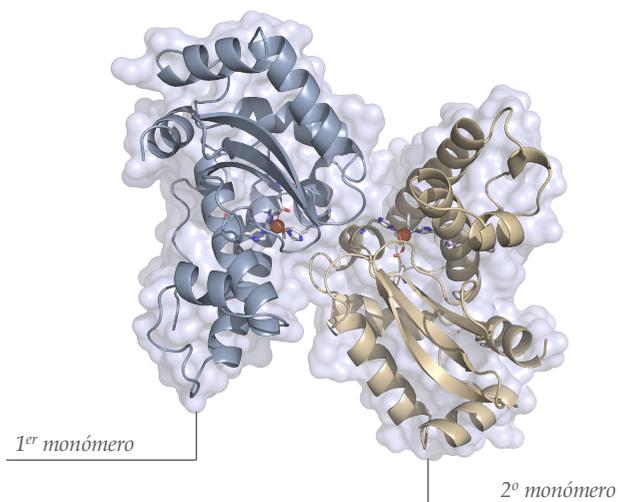
Estructuralmente equivalente a la Mn-SOD, la Fe-SOD es un enzima procariota presente esencialmente en el citosol de las plantas y en algunas bacterias. Como se puede ver en las Figuras 1.13 y 1.14, su estructura proteica es muy similar a la de su equivalente de manganeso: se trata de un dímero formado por la unión de dos monómeros de 22 kDa.¹²⁶ Cada uno de estos monómeros contiene un centro activo independiente, donde un átomo de hierro está coordinado simultáneamente por tres histidinas, un residuo de aspartato y una molécula de agua en una geometría de bipirámide trigonal. En esta, una de las histidinas y el agua de coordinación ocupan las posiciones axiales del complejo, mientras que el resto de residuos se encuentran sobre el plano ecuatorial.¹²⁷

Pero Mn-SOD y Fe-SOD no solo comparten una estructura prácticamente idéntica, sino que su propio mecanismo de actuación difiere en pocos aspectos. De esta forma, la dismutación de los radicales superóxido llevada a cabo por la Fe-SOD puede resumirse en las ecuaciones 1.6 y 1.7.



De nuevo, durante el desarrollo del ciclo catalítico, el metal encargado de llevar a cabo la dismutación de los radicales superóxido sigue un mecanismo de "ping-pong"; donde su estado de oxidación fluctúa entre +3 y +2. En este, la especie reducida de hierro está enlazada al agua de coordinación que pasa a su forma desprotonada con la oxidación del metal. El mecanismo es completamente análogo al de la Mn-SOD mostrado en la Figura 1.12.

A pesar de todo esto, cabe decir que pese a la enorme similitud entre ambos enzimas (tanto desde un punto de vista estructural como de su mecanismo catalítico), ambas metaloproteínas presentan una gran selectividad por su respectivo



Centro activo del enzima:

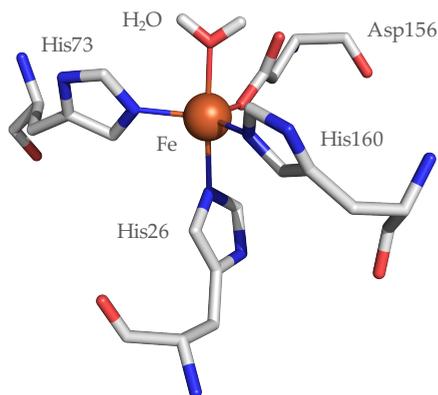


Figura 1.13 – Representación de la estructura del enzima FeSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1ISA)¹²⁶ El átomo de hierro ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.

metal. Es decir, al intercambiar el hierro en la Fe-SOD por un átomo de manganeso, la actividad SOD del sistema no se mantiene, sino que se ve significativamente reducida.¹⁰⁴

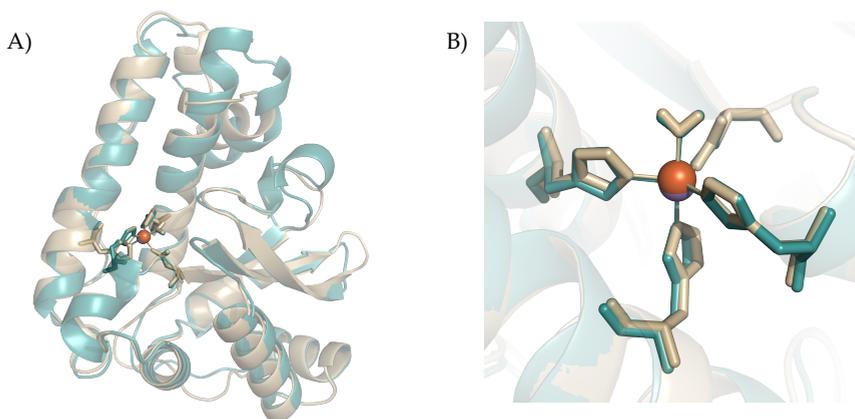


Figura 1.14 – A) Superposición de las estructuras de la Mn-SOD (en verde) y la Fe-SOD (en ocre) y B) detalle del centro activo de las proteínas superpuestas. En ambas representaciones tan solo se muestra un monómero. PDB ID 1VEV¹²⁰ para la Mn-SOD y 1ISA¹²⁶ para la Fe-SOD.

Este hecho puede explicarse atendiendo a los potenciales de reducción relativos de M^{3+} a M^{2+} . En la primera semirreacción del ciclo, la reducción del Mn^{3+} implica la conversión de un sistema d^4 a un d^5 , mientras que en el caso del Fe^{3+} el paso es de un d^5 a un d^6 . El hecho que tanto en la Mn-SOD como en la Fe-SOD ambos metales sean de espín alto conlleva que la introducción del quinto electrón en los orbitales d del manganeso se realiza sobre un orbital vacío, mientras que el sexto electrón que se introduce en el hierro debe compartir espacio con uno de los electrones preexistentes. Este es un factor clave a la hora de entender porqué la reducción de Mn^{3+} a Mn^{2+} es mucho más favorable que la de Fe^{3+} a Fe^{2+} . De hecho, experimentalmente se puede comprobar que los potenciales de reducción (E_m) del Mn^{3+} son entre 300 y 700 mV mayores que los del Fe^{3+} para complejos análogos.¹²⁸

El elevado potencial de reducción del par Mn^{3+}/Mn^{2+} de espín alto explica también su menor reactividad Fenton frente al Fe, lo que convierte al manganeso en un ion metálico más seguro para su uso en situaciones de estrés oxidativo. Por contra, el elevado valor de su E_m conlleva por un lado que sea un elemen-

to ineficiente con respecto a la actividad SOD, y por otro lado que no pueda ser intercambiado por hierro en la Mn-SOD (y viceversa). Veamos por qué.

Para que un sistema pueda presentar actividad SOD, su potencial de reducción debe situarse idealmente a medio camino entre el potencial de cada una de las dos reacciones redox que debe catalizar. En el caso de la superóxido dismutasa, estas reacciones se corresponden con la reducción del superóxido a peróxido, cuyo potencial se establece entorno a los 890 mV frente a un electrodo normal de hidrógeno (NHE), y la reacción de oxidación del superóxido a oxígeno molecular, cuyo potencial de reducción se sitúa entorno a los -160 mV.¹⁰⁵ Un sitio metálico con un potencial demasiado bajo podrá reducir el superóxido, pero no será capaz de extraer de él un electrón. De la misma forma, un metal con un potencial demasiado elevado, podrá oxidar al superóxido, pero no podrá pasar los electrones que haya ganado a una segunda molécula de superóxido. Ambos centros metálicos podrían consumir radicales superóxido, pero tan solo serían capaces de hacerlo estequiométricamente (a no ser que fuesen regenerados por otro sistema de transporte electrónico). Parte de la elegancia y economía bioquímica de las SODs radica en su independencia respecto a fuentes externas aceptoras o dadoras de electrones, lo que les permite funcionar como sistemas de defensa antioxidante autónomos.

El potencial medio de reducción del hexaacuo complejo de Fe^{3+} presenta un valor de 770 mV, situado entre las dos reacciones a catalizar, pero muy por encima del punto medio. En este caso, la tarea que lleva a cabo la estructura proteica de la Fe-SOD se basa en generar el entorno de coordinación adecuado para disminuir el potencial de reducción de su metal unos 400 mV, justo para llegar al valor medio entre las dos reacciones de dismutación. Con ello consigue acercar el potencial del Fe^{3+} al valor teórico con el que se consigue una óptima actividad SOD. Por contra, el potencial del hexaacuo complejo de Mn^{3+} es mucho mayor (1510 mV) que el del Fe^{3+} , con lo que en este caso la Mn-SOD debe generar un entorno capaz de disminuir su valor en un grado mucho mayor que la Fe-SOD.^{129,130}

Este hecho explica porqué al cambiar un metal por el otro en estas enzimas, los sistemas resultantes dejan de ser activos. La representación gráfica de la explicación se muestra en la Figura 1.15. Al introducir un átomo de manganeso en

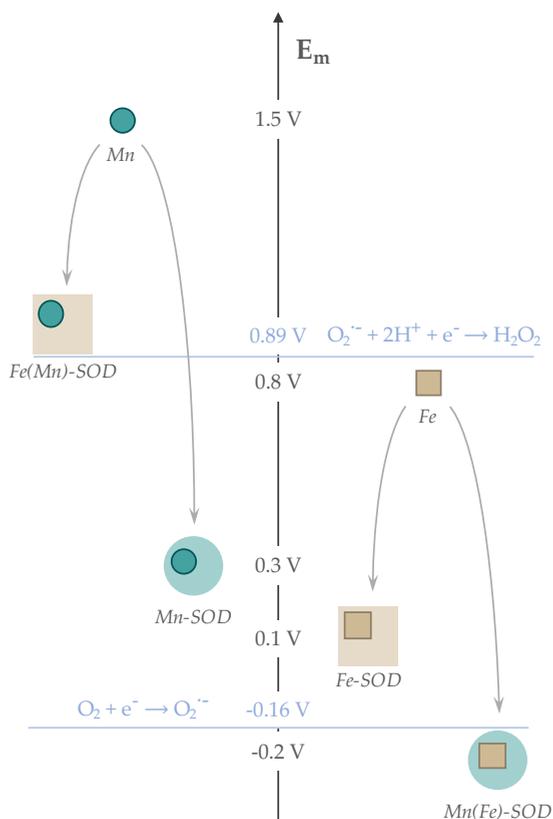
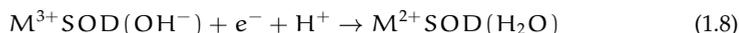


Figura 1.15 – Representación de los potenciales medios de la reducción de los pares Mn^{3+}/Mn^{2+} y Fe^{3+}/Fe^{2+} para los sistemas libres y cuando están coordinados por la Mn-SOD y la Fe-SOD. Adaptación del trabajo de Miller *et al.*¹⁰⁵

el puesto del hierro en la Fe-SOD, la disminución del potencial que causa esta no es suficiente como para introducir el sistema dentro del intervalo de E_m deseado. Del mismo modo, la drástica reducción de potencial que causa la Mn-SOD conlleva que al introducir el átomo de hierro en el lugar del manganeso, se saca al primero del intervalo de E_m válido para que pueda llevar a cabo la dismutación de los radicales superóxido.¹⁰⁵

El distinto efecto que tiene cada proteína (Mn-SOD y Fe-SOD) sobre el potencial de los metales, pese a su enorme similitud estructural, viene dada por las

diferencias en la facilidad con que ambos sistemas protonan el hidroxilo coordinado al metal.^{129,131} Como se ha explicado anteriormente, asociada a la reducción de la forma oxidada M^{3+} , tiene lugar la protonación del grupo OH^- coordinante según la reacción:

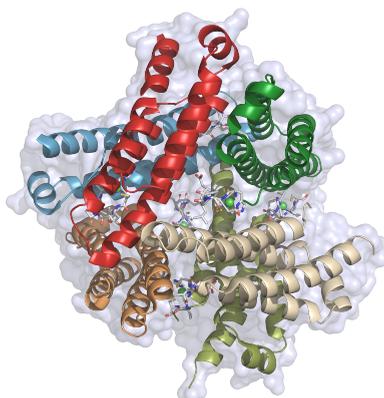


Este hidroxilo es, típicamente, un mejor ligando para el Mn^{3+} (y el Fe^{3+}) que para el Mn^{2+} (o el Fe^{2+}), por lo que evitando su protonación se favorece la forma trivalente del metal. Esta es precisamente la estrategia que siguen las SODs de Mn y Fe para conseguir una mayor o menor disminución del potencial de reducción de los metales que albergan. La Mn-SOD, por un lado, presenta una disposición de aminoácidos en la entrada del centro activo que dificulta la entrada de protones en dirección al hidroxilo coordinante. De esta forma, consigue estabilizar la forma oxidada de su metal, desfavoreciendo su reducción. Este hecho se traduce en una disminución muy importante en el valor del potencial de reducción con respecto al del metal libre. Por otro lado, la Fe-SOD sigue la estrategia contraria. En este caso el centro activo está dispuesto de forma que facilita la entrada de protones al entorno del complejo, favoreciendo la protonación del hidroxilo coordinado al metal. De esta forma, consigue estabilizar el estado M^{3+} (respecto a la forma del metal libre en disolución), pero en mucha menor medida que la Mn-SOD.^{129,131,132}

Superóxido dismutasa de Ni (Ni-SOD)

En último lugar, tras el estudio de las superóxido dismutasas de Cu-Zn, Mn y Fe, resta el estudio de la última de las SODs descubiertas hasta el momento: la de níquel. A diferencia del resto de sistemas descritos hasta el momento, la Ni-SOD solo se ha encontrado únicamente en bacterias *Streptomyces* y algunos tipos de cianobacterias.¹⁰⁴

Desde un punto de vista estructural, en esta metaloproteína hexámera el Ni se encuentra coordinado a través de una pequeña cadena peptídica consistente en una cadena de cisteínas (en forma tiolato) y una histidina (Figura 1.16).^{133,134} De esta forma, esta se convierte en la primera SOD estudiada en que el metal está



Centro activo del enzima:

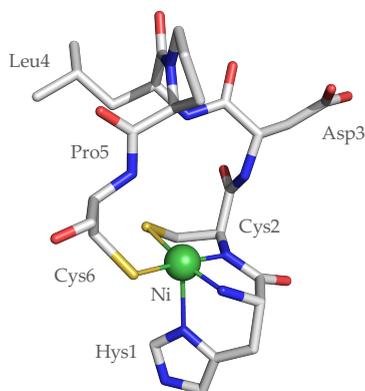


Figura 1.16 – Representación de la estructura del enzima NiSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1T6U)¹³³ El átomo de níquel ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.

coordinado por algo más que histidinas, aspartatos o agua/hidroxilo.

Respecto a su mecanismo de actuación, de momento se sabe que el níquel es el elemento electroquímicamente activo, el cual presenta un estado de oxidación que varía entre +3 y +2 a lo largo del ciclo catalítico.¹³⁵ Pero más allá de este hecho, no se conoce con certeza mucho más de su mecanismo de catálisis. A este respecto cabe mencionar que en 2004 Barondeau *et al.* propusieron el mecanismo de actuación mostrado en la Figura 1.17.¹³³ En este, el superóxido que se une al níquel se estabiliza por la formación de puentes de hidrógeno con el entorno de

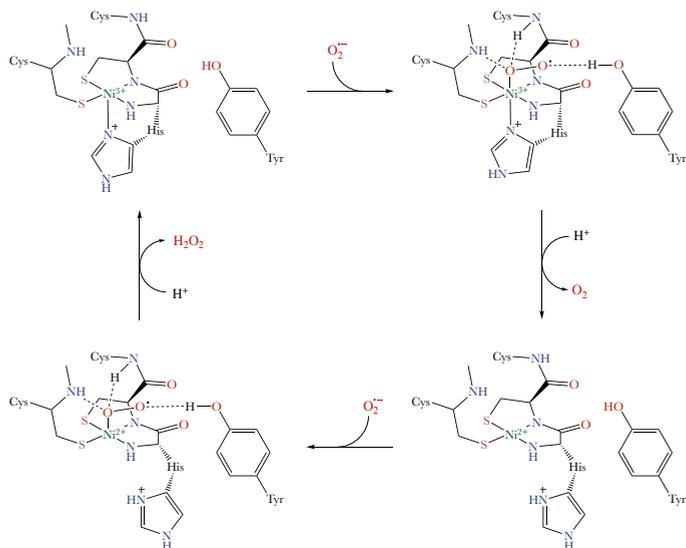


Figura 1.17 – Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la dismutación de los radicales superóxido cuando es llevado a cabo por la Ni-SOD.¹³³

aminoácidos del centro activo. A continuación, el Ni(III) acepta uno de los electrones del superóxido para pasar a su forma reducida de Ni(II), proceso seguido por la liberación del oxígeno generado. Durante la segunda semirreacción del ciclo, una nueva molécula de superóxido entra en el complejo, la cual es estabilizada de nuevo por el mismo sistema de aminoácidos. En este proceso, es el Ni(II) quien le cede uno de sus electrones al superóxido, reduciéndolo a peróxido. Acoplado a esta reacción tiene lugar la transferencia protónica al anión peróxido producido, generando con ello una molécula de H_2O_2 que es rápidamente liberada, volviendo de esta forma al inicio del ciclo.

1.2.2 SISTEMAS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS: LA CATALASA

Mediante la reacción de dismutación del radical superóxido, los enzimas SOD son capaces de evitar el estrés oxidativo derivado directamente de la presencia de estos iones: con su dismutación se evita que puedan formar ROS mucho más tóxicas. Pero su eliminación del medio no implica la desaparición del estrés oxidativo,

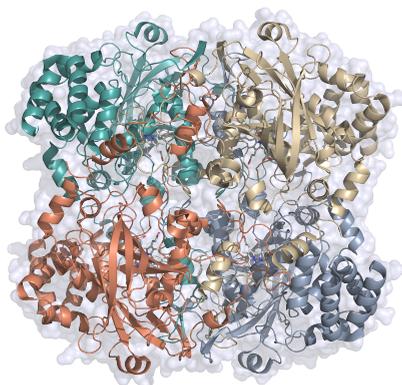
tan solo que este cambie de forma. Para entender este hecho solo hace falta pensar en los productos de la reacción de catálisis para ver que alguno de estos también es una ROS de relevancia biológica.

Durante la dismutación de las especies $O_2^{\bullet-}$ se produce peróxido de hidrógeno como producto de la segunda etapa catalítica. Como hemos visto en apartados anteriores, el H_2O_2 es una de las principales especies reactivas de oxígeno por su capacidad de dar lugar a nuevos compuestos radicalarios de enorme toxicidad. Sin ir más lejos, la reacción del peróxido con Fe(II) da lugar a la formación de radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton.¹³⁶

En consecuencia, para que la eliminación del estrés oxidativo sea efectiva, la actuación de las SODs debe estar acoplada a la de un segundo grupo de enzimas capaces de eliminar el peróxido de hidrógeno. A este grupo de metaloenzimas se las conoce como catalasas.

Las catalasas son un tipo de enzimas ubicuo en los organismos aerobios, incluyendo la mayoría de los tejidos de mamíferos (especialmente hígado y eritrocitos). Dentro de las células, las catalasas se concentran especialmente en los peroxisomas y las mitocondrias, donde se pueden hallar tanto en su forma soluble como fijadas a la membrana. La localización de las catalasas en estos orgánulos cumple un papel estratégico ya que es en ellos donde la producción de H_2O_2 es mayor.¹³⁷

En humanos, las catalasas están formadas por cuatro subunidades idénticas de unos 62 kDa, donde cada uno de los monómeros contiene cuatro dominios distintos y un grupo prostético hemo (ver Figura 1.18).¹³⁸ Los cuatro dominios incluyen: (i) un segmento N-terminal que contiene una histidina distal, aminoácido esencial para la reacción de la catalasa; (ii) un dominio β -cilíndrico que contiene ocho "barriles" β ordenados siguiendo una estructura antiparalela intercalada con seis hélices α , lo que le confiere a la proteína el núcleo hidrófobo necesario para mantener su estructura tridimensional; (iii) un dominio conector que contiene los residuos tirosina que enlazan con el grupo hemo; y finalmente (iv) un dominio en forma de hélice α fundamental para la unión del NADPH.¹³⁹ Esta estructura presenta un elevado grado de conservación entre especies, pese a que la secuencia de aminoácidos no es idéntica entre los distintos tipos de catalasas.



Centro activo del enzima:

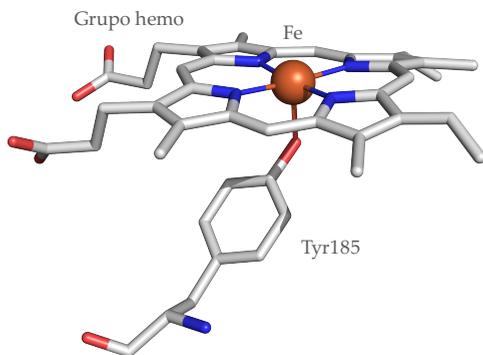
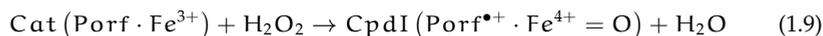
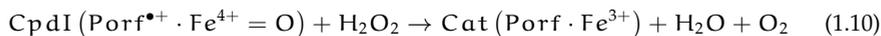


Figura 1.18 – Representación de la estructura de la catalasa de eritrocito humano, así como de su centro activo (PDB ID 1DGF).¹³⁸ El átomo de hierro ha sido representado como una esfera de radio arbitrario.

Durante la reacción enzimática que da lugar a la degradación del H_2O_2 , el centro activo de la catalasa (Cat) es oxidado en primer lugar a un intermedio hipervalente de hierro, conocido en la literatura como Compuesto I (Cpd I); que es devuelto a su forma reducida en la segunda semirreacción de ciclo mediante la interacción con una segunda molécula de peróxido. El proceso seguido se muestra en las ecuaciones 1.9 y 1.10.





La primera reacción del ciclo se caracteriza por la oxidación de la hemoproteína a través de la interacción con una sola molécula de peróxido. Como se muestra en la ecuación 1.9, este proceso da lugar a la formación del Compuesto I (Cpd I), un catión radical de la oxoferril porfirina.¹⁴⁰ Una vez se forma el Cpd I, este reacciona rápidamente con una segunda molécula de H₂O₂ para generar H₂O y O₂ en un proceso redox de dos electrones. En esta reacción, tanto el agua como el oxígeno formados proceden de la misma molécula de peróxido, tal y como se observa del marcaje de sus oxígenos.¹⁴¹ Cabe mencionar por último que este proceso es especialmente eficaz cuando es llevado a cabo por algunos tipos de catalasas, en especial si se compara con otras hemoproteínas como la mioglobina.¹⁴²

1.2.3 MIMÉTICOS DE LA SOD

Pese a la eficacia que presentan los sistemas SOD en la eliminación del radical superóxido, lo cierto es que no son sistemas infalibles. Tanto los genes que los transcriben como los propios enzimas pueden sufrir diferentes mutaciones que los incapacitan en su tarea. Con ello, se pierde la capacidad de combatir el estrés oxidativo, hecho que comporta la aparición de una serie de enfermedades ya comentadas anteriormente. Sin ir más lejos, la mutación de la CuZn-SOD, por ejemplo, se ha relacionado con la aparición de la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o el Alzheimer;^{143,144} mientras que un déficit de Mn-SOD puede resultar mortal por cardiomiopatía o neurogeneración, entre otros.¹⁴⁵ Todos estos hechos llevan a la conclusión que, a fin de frenar el desarrollo de las enfermedades relacionadas con la presencia de estrés oxidativo, la deficiencia de antioxidantes debe ser compensada por la introducción de nuevos sistemas que cumplan su función.

En este sentido, una de las primeras estrategias terapéuticas que se siguieron se basó en la administración de los propios enzimas a modelos animales de cada enfermedad. A modo de ejemplo, diversos autores han intentado tratar el Alzheimer o el Parkinson mediante el uso de CuZn-SOD, Vitamina E o coenzima Q10; sin que esta terapia llegase a mostrar ningún tipo de efecto en el desarrollo de las en-

fermedades.^{67,146,147} Esto es debido a las características intrínsecas de las propias proteínas: su elevado tamaño y densidad de carga, por ejemplo, provocan una extravasación lenta seguida de una eliminación renal rápida.¹⁴⁸ A esto hay que añadir diversos factores que llevan a descartar la posibilidad de usar las metaloproteínas en el tratamiento de estas enfermedades: su administración suele llevar a la aparición de una respuesta inmune severa, no resisten las condiciones químicas del tracto digestivo, con lo que no pueden ser administradas por vía oral; y su coste de producción es muy elevado.¹⁴⁵

De todos estos estudios se deriva una conclusión fundamental: para que el tratamiento con antioxidantes pueda ser efectivo, estos deben estar basados en compuestos de reducido peso molecular, ionóforos y, por supuesto, con actividad antioxidante.^{149,150} Es en el desarrollo de este tipo de sistemas en el que se han centrado los esfuerzos durante las últimas décadas. De esta forma, pese a que recientemente se han descrito sistemas con capacidad SOD en ausencia de un metal activo,¹⁵¹ lo cierto es que la mayor parte del trabajo desarrollado hasta el momento se ha centrado en el estudio de los miméticos de las familias Mn-SOD y CuZn-SOD.¹⁵²

Miméticos de la Mn-SOD

A partir de la década de 1990, diversos autores entre los que destacan Dennis P. Riley, Inés Batinić-Haberle e Irwin Fridovich dieron inicio al desarrollo de nuevos miméticos de la Mn-SOD con la síntesis de complejos azamacrocíclicos o porfirínicos de manganeso. Estos trabajos, de hecho, dieron lugar a algunos de los miméticos de la SOD con un mayor potencial terapéutico desarrollados hasta el momento.

Dentro de este primer grupo de complejos antioxidantes cabe destacar los compuestos basados en la estructura del pentaazaciclopentadecano, estudiados por Riley a finales de los noventa (ver Figura 1.19).^{153,154} Esta familia de complejos destaca especialmente por su elevada eficiencia en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, llegando incluso a fases preclínicas de estudio.¹⁵⁵ Asimismo, cabe destacar que algunos de sus derivados presentan una

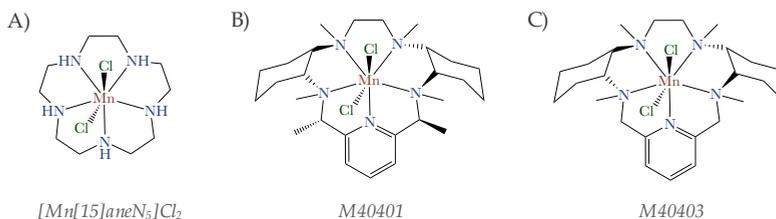


Figura 1.19 – Representación de los complejos de Mn(II) con el ligando [15]aneN₅ y algunos de sus derivados.^{153,154}

constante catalítica de dismutación del superóxidos parecidas a la de algunos enzimas Mn-SOD nativos.¹⁵⁶

Con el tiempo, diversos autores empezaron a introducir una serie de modificaciones sobre la estructura de estos ligandos (ver Figura 1.20). Una de las alteraciones más interesantes es la adición en el macrociclo de cadenas con grupos dadores adicionales. Estos grupos, capaces de coordinar el metal, permiten completar su esfera de coordinación, lo que confiere una mayor estabilidad termodinámica y cinética al complejo resultante. Pero además de contener elementos capaces de coordinar al manganeso, estas cadenas habitualmente también presentan grupos

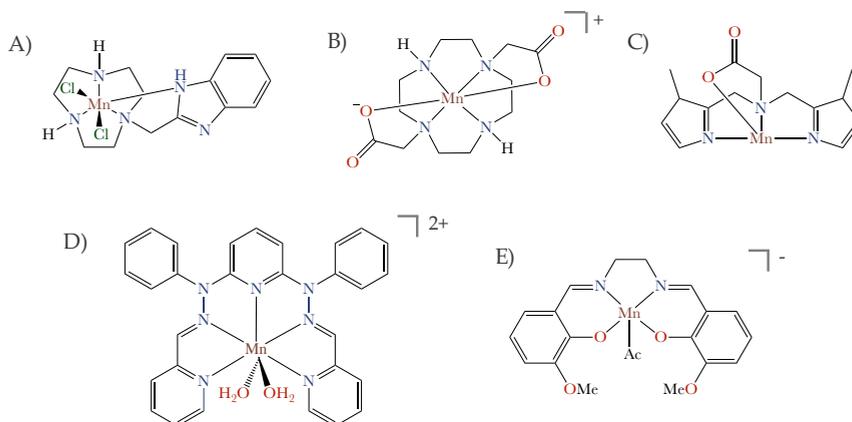


Figura 1.20 – Complejos de Mn(II) con actividad SOD de A) Shen *et al.*,¹⁵⁷ B) Valtancoli *et al.*,¹⁵⁸ C) Mahy *et al.*,¹⁵⁹ D) Ghosh *et al.*¹⁶⁰ y Salvemini¹⁵⁵.

que consiguen generar un entorno hidrófobo en el centro de coordinación (como piridinas, indoles, benzoimidazoles, etc.), hecho que parece favorecer la actividad SOD de los sistemas.¹⁵⁷ Junto con esta modificación, la segunda gran alteración estructural llevada a cabo se basa en la apertura de la cadena.

Miméticos de la CuZn-SOD

El segundo gran grupo de complejos con actividad SOD son los conocidos como miméticos de la CuZn-SOD. En estos, se ha intentado imitar el comportamiento de la superóxido dismutasa de cobre y zinc, habitualmente intentando reconstruir estructuralmente el propio centro activo del enzima. De esta forma, en la bibliografía se puede encontrar un gran abanico de compuestos binucleares (tanto con dos átomos de cobre como con uno de cobre y otro de zinc), formando estructuras en que ambos metales se encuentran conectados a través de un puente imidazol (ver Figura 1.21).¹⁶¹⁻¹⁶⁷

Sin embargo, la obtención de miméticos funcionales de la SOD no tiene porqué conseguirse únicamente a través de miméticos estructurales. Dicho de otra forma,

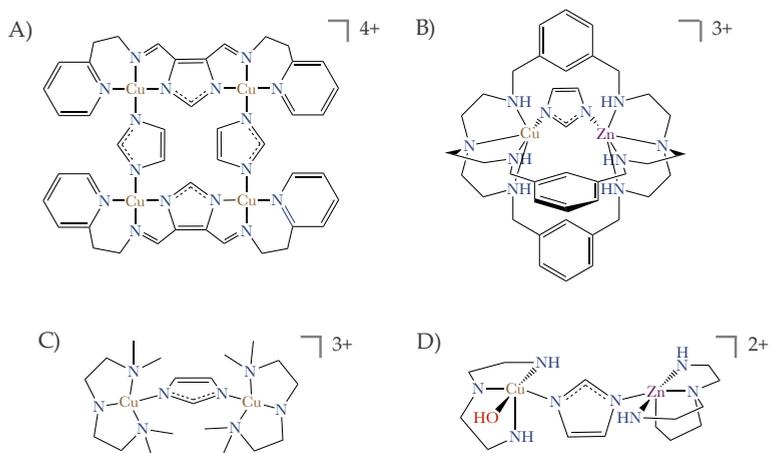


Figura 1.21 – Representación de diversos complejos binucleares de Cu(II) o Cu(II)-Zn(II) descritos por A) Lippard *et al.*,¹⁶¹ B) Rey *et al.*,¹⁶⁶ C) Lehn *et al.*^{162,163} y D) Kiss *et al.*¹⁶⁷.

la creación de un complejo estructuralmente muy similar al centro activo de la SOD no tiene porqué implicar que este sea igual de activo en su actividad dismutasa. Un ejemplo que respalda esta afirmación lo encontramos en la introducción del puente imidazolato en la estructura de los complejos. Pese a que el residuo histidina puede participar activamente en la captación de protones cuando no se encuentra enlazado al átomo de cobre, lo cierto es que su función en el centro activo de la CuZn-SOD es principalmente estructural. Es por ello que la contribución de este residuo al ciclo catalítico del enzima es bastante limitado. Pese a ello, el grupo imidazol ha sido ampliamente utilizado en el diseño de nuevos miméticos de la CuZn-SOD, como se puede ver en las estructuras mostradas en la Figura 1.21.

Por contra, determinados factores estructurales cuyo papel es decisivo en la eficacia del ciclo catalítico (como son el gradiente de potencial que favorece la difusión de los radicales superóxido hacia el centro de la cavidad reactiva, o la disposición del enzima para facilitar la transferencia de protones al peróxido) han recibido mucha menos atención o incluso no han sido tratados en absoluto.

En esta línea, en los últimos años se ha desarrollado una serie de familias de miméticos de la CuZn-SOD que, pese a no guardar una clara similitud estructural con el centro activo del enzima, presentan una elevada actividad SOD. De esta forma, el espectro de complejos se ha ampliado de los sistemas binucleares a mono- y trinucleares.¹⁶⁸⁻¹⁷² Dentro de estas líneas de trabajo, una de las más desarrollada hasta el momento se basa en el uso de ligandos azamacrocíclicos.

Ligandos azamacrocíclicos

Durante los últimos años se ha observado que los ligandos basados en una estructura tetraazamacrocíclica (Figura 1.22) presentan una serie de características muy interesantes desde el punto de vista de la eliminación del estrés oxidativo. Por un lado, son capaces de bloquear la formación de placas β -amiloides mediante la complejación de los metales libres en disolución (que, como hemos visto, funcionan como agentes agregantes).¹⁷⁷ Y por otro lado, son capaces de alterar el potencial de reducción de los metales que complejan, llevándolos a valores válidos para llevar a cabo la dismutación de los radicales superóxido.^{146,178}

A partir de esta estructura básica se ha desarrollado todo un conjunto de complejos miméticos, entre los cuales podemos encontrar algunos sistemas con una elevada actividad SOD tanto *in vitro* como *in vivo*. En este contexto, el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (GQS-UV) ha diseñado, sintetizado y estudiado durante los últimos 15 años un gran número de miméticos de la SOD (ver Figura 1.23), entre los que se encuentran algunos de los complejos con una mayor actividad descrita hasta el momento.

Algunas de las modificaciones estructurales llevadas a cabo por este grupo de investigación se han basado en la elongación de la cadena poliamínica, de forma que la presencia de un mayor número de aminas permite que estos azamacrociclos puedan coordinar simultáneamente más de un átomo metálico; o la introducción de brazos con capacidad coordinante en el propio macrociclo. Cabe añadir que la mayoría de estos compuestos pueden funcionar tanto como miméticos de la Mn-SOD como de la CuZn-SOD.^{179–184}

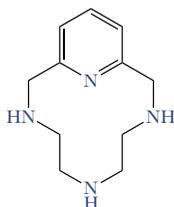


Figura 1.22 – Estructura fundamental de un tetraazamacrociclo con sustituyente piridina.^{68,173–176}

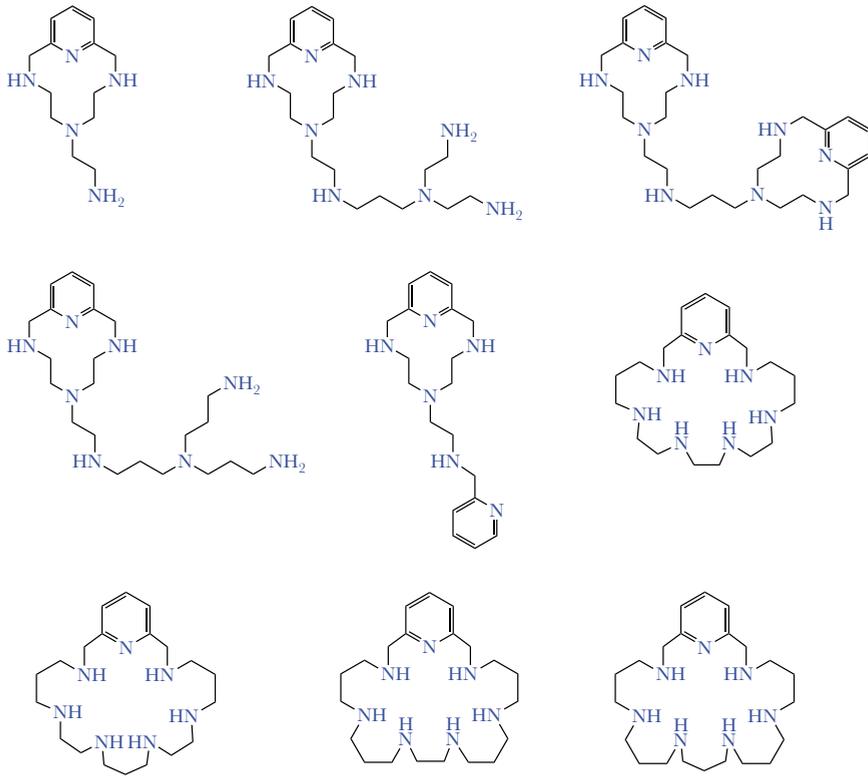


Figura 1.23 – Representación de diversos ligandos desarrollados por el GQS-UV.¹⁷⁹⁻¹⁸⁴

1.3 PARTE III. UNA NUEVA PERSPECTIVA

Una vez vista la importancia de los miméticos de las SODs, así como su estado actual de desarrollo, cabe preguntarse si se puede ir más allá. ¿Se puede obtener un conocimiento exhaustivo y sistemático sobre cómo afecta la modificación estructural del macrociclo fundamental, mostrado en la Figura 1.22, a su actividad antioxidante? ¿Podemos utilizar este conocimiento para generar sistemas todavía más eficaces? ¿Se puede imitar el funcionamiento del centro activo de la CuZn-SOD, más allá de intentar modificar el entorno de coordinación del metal (atrayendo a los radicales superóxido al centro activo, por ejemplo)?

Todas estas son preguntas fundamentales que cabe hacerse para poder diseñar mejores miméticos de la SOD y constituyen, por lo tanto, el foco de trabajo de esta tesis. Más adelante veremos que diferentes autores se han aproximado a algunas de estas cuestiones, especialmente desde el punto de vista de la modificación del ligando. La introducción de brazos con capacidad coordinante, por ejemplo, ha sido ampliamente discutida por E. García-España *et al.*,^{181,182,184} por lo que es un campo lo suficientemente trillado como para no entrar en él. Por otra parte, autores como D. Meyerstein o K. N. Green han trabajado sobre el efecto de la alquilación de las aminas o la introducción de grupos hidroxilo en la piridina sobre la estabilización de sus complejos metálicos.^{68,185-187} Pero en este caso, ante la falta de estudios que combinen ambas modificaciones, la profundización en las mismas todavía puede aportar resultados interesantes que complementen el resto del trabajo llevado a cabo en la tesis.

La profundización en el conocimiento de los miméticos de la SOD va a llevarse a cabo mediante la síntesis y estudio de un conjunto de ligandos nuevos. Para ello, la estrategia escogida se basa en la modificación del azamacrociclo piridínico básico, mostrado en la Figura 1.22, atendiendo a unos principios básicos de diseño. A lo largo de este apartado de la *Introducción* se va a proceder a describir los factores a tener en cuenta en el diseño de nuevos miméticos, las herramientas con que contamos para ello y, por último, los ligandos que van a estudiarse.

1.3.1 DISEÑO DE NUEVOS MIMÉTICOS

A la hora de enfrentarse al reto de diseñar una familia nueva de compuestos, la tarea debe plantearse atendiendo a un conjunto de factores que van a delimitar sus características fundamentales. En el caso de los miméticos de la SOD estos factores se reducen a cuatro.

Estabilización del ion metálico

Como hemos visto, el elemento electroquímicamente activo tanto en los miméticos de las SODs como en los propios enzimas es el átomo metálico del complejo. Por tanto, el primer punto del diseño de los nuevos sistemas debe hacer referencia al modo de coordinación con el metal.

Durante la reacción de dismutación del superóxido, el metal encargado de llevar a cabo la catálisis debe pasar de forma cíclica entre su forma oxidada y reducida. Por tanto, la primera característica que debe cumplir el ligando a diseñar es que sea capaz de complejar el átomo metálico en sus dos formas accesibles.

Sin embargo, cabe especificar que la afinidad entre los elementos del sistema debe estar comprendida dentro de unos valores frontera. Por un lado, si la interacción entre ligando y metal es muy débil (bien sea con la forma reducida de este último, bien sea con su forma oxidada), cabe la posibilidad que parte del metal se libere al medio. Este hecho implicaría no solo una pérdida de actividad SOD por parte del sistema, sino que podría también conducir a un aumento del estrés oxidativo, vista la capacidad de ciertos metales por dar lugar a reacciones de Fenton.^{16,96} Por otra parte, una interacción demasiado intensa entre el ligando y el metal en cualquiera de sus formas (oxidada o reducida) podría estabilizar demasiado el complejo, boqueando el ciclo catalítico. La intensidad de interacción entre ambos elementos del sistema debe por lo tanto estar comprendida dentro de unos valores límite de estabilidad.

En este mismo sentido, cabe tener también en cuenta la influencia del ligando sobre el potencial redox del metal. Como hemos visto a lo largo de este capítulo, para que el mimético de la SOD pueda presentar actividad dismutasa, el valor del potencial de reducción de su metal debe estar comprendido entre el de las reac-

ciones que debe catalizar. Así, para que el sistema a diseñar pueda llevar a cabo eficazmente la dismutación del $O_2^{\bullet-}$, el potencial de reducción del metal debe estar alrededor de los 0.35 V frente a NHE (resultado de la semisuma de los potenciales formales de reducción y oxidación del superóxido). Sin embargo, cabe mencionar que autores entre los que se cuenta a D. Salvemini recomiendan que los miméticos presenten potenciales ligeramente más elevados de este 0.35 V, con el fin de favorecer la reacción de oxidación inicial del superóxido. De esta forma, se desfavorece la segunda semirreacción del ciclo catalítico y con ello la generación de peróxido de hidrógeno (y por tanto de las ROS derivadas de este, como el hipoclorito o el peroxinitrato).¹³⁶

Geometría de coordinación

El segundo punto clave a considerar en el diseño del mimético de la SOD, y todavía estrechamente relacionado con la estructura del centro metálico, tiene que ver con la geometría y las tensiones estructurales del mismo.

Al analizar el centro activo de las diferentes formas de la SOD, se puede observar que en todas ellas los ligandos enlazados al metal presentan una gran rigidez conformacional. De esta forma, es el metal el que debe adaptarse a la forma del centro de coordinación y no al revés. El hecho que el centro de coordinación no tome la geometría ideal del metal conduce de forma inevitable a la aparición de una serie de tensiones estructurales en el mismo, lo que conlleva la desestabilización parcial del complejo metálico. A este estado tensionado de mayor energía se le conoce como estado entático, y constituye un elemento clave a la hora de entender parte de la eficacia del enzima para llevar a cabo la catálisis.

Como se puede ver en la Figura 1.24, la desestabilización parcial del complejo metálico que conlleva el estado entático reduce la diferencia energética entre este y el estado de transición de la reacción en comparación con un complejo convencional. Una menor barrera energética implica una mayor velocidad de catálisis, por lo que a través de la adición de tensiones estructurales en el centro de coordinación del enzima se consigue acelerar de velocidad de dismutación del superóxido.

En consecuencia, una característica a tener en cuenta a la hora de diseñar nue-

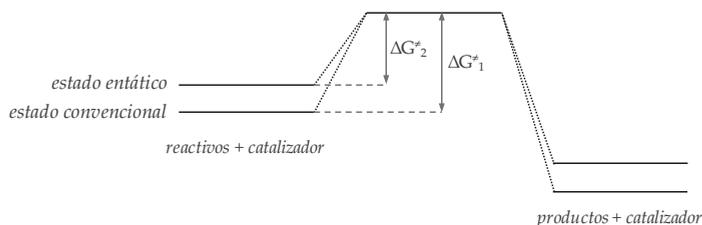


Figura 1.24 – Representación del diagrama de energía libre a partir de un estado entático o uno convencional.¹⁸⁸

vos miméticos de la SOD es que sean capaces de coordinar el metal con la suficiente rigidez para inducir a la aparición de un estado entático.

Índice de coordinación del metal

La tercera característica que debe presentar el centro de coordinación del mimético de la SOD tiene que ver con el índice de coordinación del metal. Como hemos visto a lo largo de este capítulo, el metal de los distintos enzimas de la Superóxido Dismutasa presenta un índice de coordinación relativamente bajo, sin alcanzar en ningún caso la saturación. De esta forma se facilita la entrada de sustratos en el entorno de coordinación, acelerando con ello la velocidad de catálisis. En consecuencia, es necesario que el ligando que se diseñe no sea capaz de saturar las posiciones de coordinación del metal si se quiere mejorar su actividad dismutasa.

Presencia de residuos auxiliares

El cuarto de los factores a tener en cuenta tiene que ver con el entorno del centro de coordinación, más que con el complejo metálico en sí mismo. El sitio activo de las SODs es mucho más amplio que su solo centro metálico. Alrededor de él, estas enzimas cuentan con un conjunto de residuos que orientan y/o favorecen la entrada del superóxido al sitio activo del enzima o que facilitan el transporte protónico, por poner algunos ejemplos. Este entorno de reacción cumple un papel fundamental en la eficacia que muestran las metaloproteínas en su actividad

catalítica.

Es por ello que la introducción de grupos que logren estabilizar y/u orientar el $O_2^{\bullet-}$ en el centro activo del mimético puede ser una estrategia óptima a seguir a la hora de mejorar la actividad del sistema.

* * *

Una vez se han planteado los factores clave a tener en cuenta a la hora de diseñar nuevos miméticos de la SOD, y antes de pasar a presentar los ligandos diseñados atendiendo a estos principios, cabe describir brevemente las herramientas con que contamos para desarrollar nuestro trabajo.

Ante la experiencia del grupo de investigación en que se ha desarrollado esta tesis, el área del conocimiento en que se enmarca este trabajo y las tendencias actuales en química, son dos las herramientas escogidas en nuestra aproximación al diseño de agentes antioxidantes: la Química Supramolecular y la Nanociencia.

1.3.2 LA QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

Para entender qué es la Química Supramolecular probablemente haga falta retrotraerse al concepto más amplio que engloba la Química. Es fácil oír a Jean-Marie Lehn en sus charlas definir a esta como un puente entre la Física y la Biología, como un intento por explicar cómo puede surgir la complejidad a partir de partículas simples.¹⁸⁹ La Química, en su visión más general, se centra en “el estudio de las entidades que se obtienen mediante la combinación de átomos, las moléculas. La Química Supramolecular es un paso más allá, es el estudio de cómo las moléculas interaccionan entre ellas.”¹⁹⁰ La idea general que hay detrás de este concepto es que las moléculas son entidades únicas, pero que rara vez se encuentran aisladas en el mundo real; siempre están interaccionando con su entorno. Esta interacción, que tiene lugar a través de la formación de enlaces débiles, lleva a la aparición de nuevos sistemas con nuevas propiedades; que pueden resultar de gran interés para el desarrollo de catalizadores, sistemas de reconocimiento celular, etc.

La Química Supramolecular es, por lo tanto, un área del conocimiento multidisciplinar cuyo centro de gravedad lo constituye la Química, pero con unos lími-

tes que se extienden hasta la Física y la Ciencia de los Materiales por un lado, y hasta la Biología y la Medicina por el otro.¹⁹¹

Los estudios en Química Supramolecular se inician alrededor de los años 60 con Charles J. Pedersen, Donald J. Cram y Jean-Marie Lehn como pioneros en la materia. Su trabajo, centrado en el estudio de distintos tipos de macrociclos (como los éteres corona o los criptandos mostrados en la Figura 1.25), supuso el punto de inicio en el desarrollo de compuestos capaces de usar las interacciones intermoleculares para el reconocimiento de especies en disolución.¹⁹²⁻¹⁹⁵ Este trabajo les granjearía, de hecho, el premio Nobel de 1987 en Química por “el desarrollo y uso de moléculas que presentan una alta selectividad debida a interacciones estructuralmente específicas”.

Años después, el desarrollo de esta área de la Química originaría, entre otras muchas aplicaciones, lo que darían en llamarse como máquinas moleculares: sistemas supramoleculares que, a través de las interacciones entre moléculas, consiguen generar movimiento por mediación de estímulos externos (como puede ser la propia luz solar).^{198,200-205} Por este trabajo, Jean-Pierre Sauvage (discípulo del propio Jean-Marie Lehn), sir J. Fraser Stoddart y Bernard L. Feringa serían galardonados en 2016 con el Premio Nobel de Química.

Pero más allá de estas llamativas aplicaciones, el trabajo de Lehn, Cram y Pedersen abrió la puerta a un campo de trabajo mucho más amplio. Entre las líneas de investigación iniciadas a partir de su trabajo se puede destacar la síntesis de compuestos capaces de transportar iones a través de membranas celulares, el au-

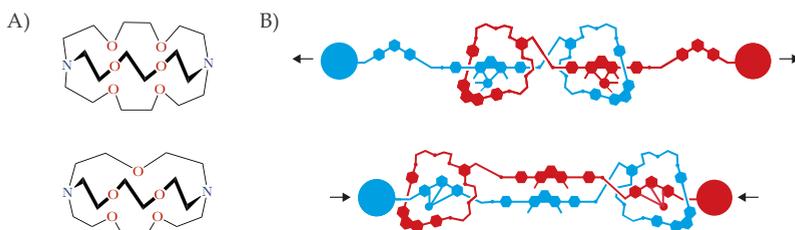


Figura 1.25 – A) Representación de algunos de los criptandos desarrollados por Lehn. B) Esquema del “músculo artificial” desarrollado por Sauvage.¹⁹⁶⁻¹⁹⁹

toensamblaje de moléculas para dar lugar a construcciones mucho más complejas, el reconocimiento molecular de sustratos en disolución o, la más importante desde el punto de vista de esta tesis, la catálisis supramolecular.

La catálisis supramolecular sienta sus bases sobre dos principios fundamentales: el reconocimiento selectivo de ciertas especies y la aceleración de su velocidad de reacción. Así, este tipo de catalizadores son capaces de unirse eficaz y selectivamente a un sustrato del medio para, a continuación, transformarlo dando lugar a los productos de la reacción.

Un ejemplo de catálisis supramolecular lo podemos encontrar en la hidrólisis del fenilacetato cuando esta es llevada a cabo por ciclodextrinas, representada en la Figura 1.26.²⁰⁶ Las ciclodextrinas son un conjunto de polisacáridos que se caracteriza por formar estructuras cilíndricas con una cavidad interior hidrófoba. A través de su cavidad estos polisacáridos son capaces de interaccionar (y alojar en su interior) aquellos compuestos apolares presentes en el medio que tengan el tamaño apropiado, como el anillo de benceno. De esta forma, si el fenilacetato está presente en disolución, este tiende a introducirse en la cavidad de la ciclodextrina, dejando expuesto hacia el exterior el grupo acetato; que puede ser a su vez atacado por uno de los grupos hidroxilos de la propia ciclodextrina. Mediante este proceso, el sustrato puede ser hidrolizado a fenol y acetato con una velocidad unas 20 veces superior con respecto a la reacción no catalizada.²⁰⁶

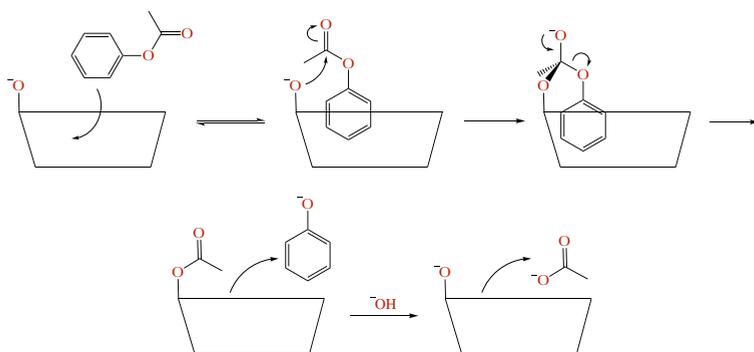


Figura 1.26 – Representación esquemática de un proceso de catálisis supramolecular: la hidrólisis de un fenilacetato llevada a cabo por una ciclodextrina.²⁰⁶

1.3.3 LA NANOCIENCIA Y LA NANOTECNOLOGÍA

Como prácticamente cualquier área de la ciencia, el estudio del mundo nanométrico tradicionalmente se ha encarado desde dos perspectivas opuestas pero complementarias: desde la observación pasiva o la manipulación activa. Este es el concepto fundamental que diferencia a la Nanociencia de la Nanotecnología. Por una parte, la Nanociencia es la rama del conocimiento centrada en el estudio de todos aquellos procesos fundamentales que tienen lugar a escala nanométrica, es decir, entre 1 y 100 nm. Por otra parte, la Nanotecnología es el área que se encarga de la manipulación de los materiales en esa misma escala.

El inicio de ambas áreas se remonta a 1959, con algunos de los tratados y charlas más importantes del físico estadounidense Richard Feynman.^{207,208} En ellos se reconocía por primera vez el potencial de la manipulación de átomos y moléculas a escala nanométrica, al tiempo que se postulaba un concepto que con el tiempo llegaría a tener una enorme repercusión; y es que los materiales a escala nanométrica poseen propiedades físicas únicas.²⁰⁹

Sobre este principio, en los últimos 20 o 30 años se ha desarrollado un enorme número de aplicaciones en áreas tan diversas como la electrónica, la farmacia, la biomedicina o la construcción. Así, la aplicación de la Nanociencia y la Nanotecnología a la Física o la Química tradicionales ha dado lugar a la generación de superconductores y los llamados *quantum dots*,²¹⁰⁻²¹² la nanoingeniería de manipulación genética y proteómica,^{213,214} el reconocimiento específico de estructuras de ADN²¹⁵ o la generación de técnicas de microscopía a nivel atómico, como la microscopía de efecto túnel²¹⁶.

Una de las nanoestructuras más ampliamente estudiadas en el ámbito de la terapia antioxidante son las nanopartículas.²¹⁷ De hecho, a lo largo de las últimas décadas se ha desarrollado todo un conjunto de este tipo de nanoestructuras de diferente naturaleza, incluyendo óxido de silicio, óxidos metálicos, nanocristales, lípidos, polímeros, dendrímeros o *quantum dots*.²¹⁸

La gran variedad de nanopartículas desarrolladas hasta el momento ha llevado a que sean usadas con distintas finalidades en terapia antioxidante. Por un lado, autores como R. Martin *et al.* han mostrado que pueden usarse como siste-

mas antioxidantes en sí mismas, como es el caso de distintos sistemas de naturaleza inorgánica de oro y platino.²¹⁹ Por otro lado, pueden actuar no como agentes antioxidantes en sí mismos, sino como transportadores o direccionadores de los fármacos que sí presentan actividad antioxidante. Dentro de este segundo grupo podemos encontrar diferentes tipos sistemas de encapsulación de los miméticos en disolución, como pueden ser liposomas o nanogeles,²²⁰⁻²²² o también sistemas de soporte de los ligandos, como nanopartículas mesoporosas de sílice.²²³

Pero las aplicaciones en terapia van mucho más allá de la propia actuación como antioxidantes o como transportadores de miméticos. Autores como B. Klajnert *et al.* han utilizado dendrímeros para reducir la agregación de las placas β -amiloides,²²⁴ por ejemplo; mientras que otros autores, como Li *et al.* han hecho uso de diferentes tipos de *quantum dots* para la monitorización de diversas enfermedades.^{225,226}

A la vista de estos trabajos, puede resultar de gran interés para el diseño de nuevos miméticos de la SOD el hecho de soportarlos en nanopartículas no tóxicas. De esta forma, mediante su funcionalización en la superficie de sistemas nanoestructurados se puede favorecer la aparición de efectos de preconcentración (lo que implicaría una mejora de la actividad SOD de los complejos), así como un incremento de la biodistribución de los sistemas.²²⁷

1.3.4 DISEÑO DE LOS NUEVOS LIGANDOS

Una vez visto el trabajo en miméticos de la SOD llevado a cabo hasta el momento (especialmente en el GQS-UV), los factores a tener en cuenta durante el desarrollo de nuevos sistemas con actividad SOD, así como las herramientas con que contamos para tal fin; tan solo queda proceder al diseño de los compuestos a estudiar en la tesis.

Son dos los objetivos principales a tener en cuenta en el desarrollo de los nuevos miméticos. Por un lado, se pretende profundizar en el conocimiento sobre el modo en que las diferentes modificaciones de la estructura de ligando pueden afectar a la actividad SOD del sistema final. Por otro lado, se persigue aprovechar estas características, así como las herramientas que proporciona la Nanociencia,

para generar miméticos de la SOD con una capacidad catalítica mejorada con respecto a los sintetizados hasta el momento.

Con todos estos elementos en mente, se ha procedido al diseño, síntesis y estudio de siete nuevos ligandos, mostrados en la Figura 1.27.

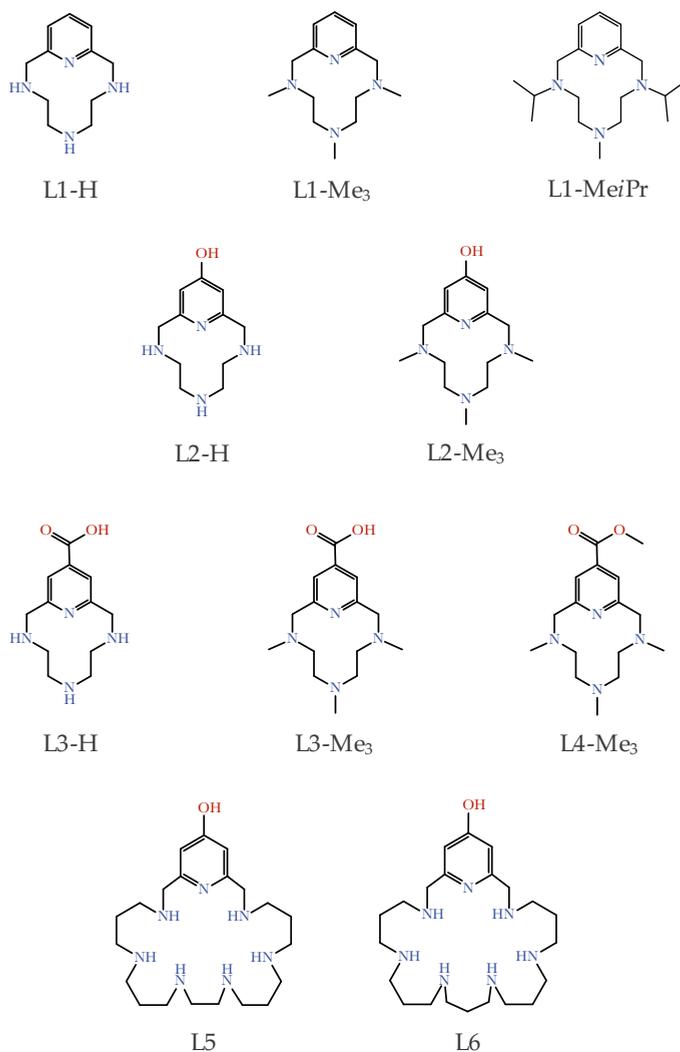


Figura 1.27 – Ligandos diseñados, sintetizados y estudiados en la tesis. Los ligandos L1-H, L1-Me₃ y L2-H han sido descritos anteriormente. ^{68,175,176,187,228}

Para el desarrollo de los nuevos ligandos se ha tomado como punto de partida la estructura de los azamacrociclos piridínicos estudiados por el GQS-UV. En concreto, la estructura base elegida ha sido la del tetraazamacrofanano **L1-H** (ver Figura 1.27), desarrollado originalmente por R. Mertens *et al.*¹⁷³⁻¹⁷⁵ Si eliminamos la posibilidad de añadir brazos coordinantes, esta estructura presenta principalmente tres elementos susceptibles de ser modificados con el fin de alterar su capacidad SOD: el grado de alquilación de las aminas, la naturaleza del anillo piridínico y el número de aminas o el tamaño del anillo macrocíclico. Por lo tanto, es sobre estos tres motivos estructurales sobre los que se ha centrado la primera parte del trabajo, el análisis sistemático de la relación estructura-actividad de los miméticos azamacrocíclicos.

La primera modificación estructural de **L1-H** llevada a cabo se ha basado en la alquilación de sus aminas secundarias. Como han demostrado diversos autores, la solvatación de los complejos metálicos tiene un papel fundamental en su estabilidad y, en consecuencia sobre su capacidad antioxidante.^{68,185,186} Por este motivo, se ha procedido a aumentar la hidrofobicidad del ligando mediante la introducción de dos grupos alquílicos diferentes en su estructura (metilo e isopropilo), para dar lugar a los ligandos **L1-Me₃** y **L1-MeIiPr₂**. Cabe decir que el ligando **L1-Me₃** ya había sido sintetizado anteriormente en el GQS-UV.²²⁸

El segundo elemento clave en la estabilización de los complejos es el anillo piridínico. Mediante el aumento o la reducción de carga sobre el nitrógeno de la piridina se puede estabilizar o desestabilizar las especies de coordinación de estos miméticos potenciales. En este sentido, se ha decidido substituir el hidrógeno situado en *para* a este nitrógeno con dos grupos de naturaleza opuesta: un hidroxilo, capaz de aportar carga al sistema aromático, y un carbonilo, capaz de retirarla. De esta forma, se han sintetizado los ligandos **L2-H** (ya sintetizado por Green *et al.*)^{68,187} y **L3-H**. Asimismo, con el fin de sistematizar el estudio de la alquilación entre las diferentes familias de ligandos, se ha procedido a la metilación de estos dos compuestos, dando lugar a sus derivados **L2-Me₃**, **L3-Me₃** y **L4-Me₃**.

En tercer lugar, con la síntesis de **L5** y **L6** se ha completado la tercera modificación estructural propuesta: la ampliación tanto del tamaño de la cadena como del

número de aminas disponibles para la complejación de los metales. Esta modificación, en la línea de trabajos anteriores del GQS-UV, busca incrementar la actividad antioxidante del sistema mediante un aumento del número de átomos metálicos coordinados simultáneamente al ligando.^{179,180}

A través de estas tres modificaciones estructurales se puede obtener un conocimiento sistemático de la influencia del ligando sobre la actividad de los miméticos, pero este es solamente el primero de los objetivos fundamentales de la tesis. La adición de los grupos hidroxilo y carbonilo a la estructura del ciclo aromático añade una propiedad a estos ligandos: su capacidad por ser soportados sobre la superficie de nanopartículas oxídicas. Así, a través de este procedimiento se va a poder comprobar el efecto que tiene su funcionalización sobre un material nanoestructurado. Las nanopartículas escogidas están basadas en óxidos metálicos de aluminio y silicio, más concretamente boehmita γ -AlO(OH) y sílice. Este tipo de materiales han sido escogidos debido a su carácter inocuo y su estabilidad en agua.^{229,230}

Capítulo 2

Objetivos

En base al desarrollo actual de miméticos de la SOD y la importancia de su mejora vistos durante la introducción, esta tesis se ha decidido organizar entorno a dos elementos fundamentales. Por un lado, con este trabajo se pretende profundizar en el conocimiento sobre el modo en que las diferentes modificaciones de la estructura de ligando pueden afectar a la actividad SOD del sistema final. Por otro lado, se persigue aprovechar estas características, así como las herramientas que proporciona la Nanociencia, para generar miméticos de la SOD con una capacidad catalítica mejorada con respecto a los sintetizados hasta el momento.

En este contexto, el trabajo desarrollado en esta tesis ha sido organizado entorno a siete objetivos principales.

Objetivo 1. *Diseño, síntesis y caracterización de los azamacrociclos L1-H a L6.*

El primer objetivo de la tesis se centra en el desarrollo de los nuevos ligandos descritos en la introducción. De esta forma, por un lado se van a optimizar las rutas sintéticas ya descritas para análogos estructurales y, por otro lado, se van a diseñar nuevos procedimientos sintéticos para aquellos compuestos o intermedios que no dispongan de uno.

La caracterización de los ligandos se va a realizar mediante técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía de masas y análisis elemental.

Objetivo 2. *Síntesis y caracterización de las nanopartículas de boehmita.*

Previamente al anclaje de los ligandos sobre su superficie, se va a proceder la síntesis de las nanopartículas de boehmita. Su caracterización se va a realizar mediante técnicas de difracción de rayos-X en polvo, dispersión dinámica de la luz y medida de potencial ζ .

Objetivo 3. *Funcionalización de las nanopartículas con los ligandos sintetizados y caracterización de los sistemas.*

Los ligandos L3-H, L3-Me₃, L5 y L6 serán anclados a la superficie de nanopartículas de boehmita. Asimismo, los ligandos L5 y L6 serán también funcionaliza-

dos sobre la superficie de nanopartículas de sílica.

El grado de funcionalización será estudiado mediante técnicas de RMN, análisis elemental y espectroscopía de masas acoplada a inducción por plasma.

Objetivo 4. *Caracterización del comportamiento ácido-base en disolución acuosa de los ligandos sintetizados.*

En primer lugar, se determinarán las constantes de protonación de los ligandos sintetizados mediante técnicas potenciométricas como paso previo a cualquier estudio posterior. Una vez determinadas, se utilizarán para calcular los diagramas de distribución de especies en función del pH, lo que servirá para conocer el grado de protonación de los sistemas a pH fisiológico.

En último lugar, se procederá a la identificación de cada especie presente en disolución, así como a su secuencia de protonación, haciendo uso de técnicas de resonancia magnética nuclear, espectroscopía de UV-Vis, difracción de rayos-X, calorimetría y cálculos teóricos.

Objetivo 5. *Estudio de la capacidad de coordinación de los ligandos sintetizados con iones metálicos de la primera serie de transición.*

Como paso previo al estudio de la capacidad antioxidante SOD de los sistemas sintetizados, se procederá a la determinación de las constantes de complejación en disolución acuosa de los ligandos con Cu(II), Zn(II) y/o Fe(II) mediante el uso de técnicas potenciométricas. Estas constantes se usarán para calcular posteriormente los diagramas de distribución de especies en función del pH con el fin de conocer el complejo mayoritario presente a pH fisiológico.

Por último, se identificarán las distintas especies presentes en disolución y los diferentes modos de coordinación mediante el uso de espectroscopía de UV-Vis, difracción de rayos-X, estudios cinéticos y cálculos teóricos.

Objetivo 6. *Determinación y estudio de la actividad superóxido dismutasa de los complejos miméticos estudiados.*

Tras el estudio del modo de complejación de los sistemas sintetizados con

Cu(II), Zn(II) y Fe(II), se procederá a la determinación de la actividad superóxido dismutasa tanto para los sistemas libres en disolución como para los complejos soportados en nanopartículas. Esta evaluación se llevará a cabo mediante el uso del método indirecto de McCord-Fridovich.

Los estudios de actividad antioxidante se completarán con el estudio en profundidad de su comportamiento en disolución mediante un análisis del perfil electroquímico de los sistemas y la modelización del ciclo catalítico del complejo de cobre $[\text{Cu}(\text{L1-Me}^i\text{Pr}_2)]^{2+}$.

Objetivo 7. *Determinación y estudio de la actividad catalasa de los complejos miméticos estudiados.*

El último objetivo de la tesis está enfocado al estudio de la actividad catalasa de los sistemas sintetizados, tanto libres en disolución como soportados en nanopartículas oxídicas.

Chapter 3

Materials & Methods

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the european doctoral degree.

Nota: Este capítulo ha sido escrito expresamente en inglés con la finalidad de obtener el grado europeo de doctor.

3.1 REAGENTS & SOLVENTS

All the reagents were provided by the suppliers Sigma-Aldrich, TCI or Across.

The employed solvents in this work (acetone, acetonitrile, chloroform, dichloromethane, diethyl ether, dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide, dimethyl glycol, ethanol, ethyl acetate, hexane, methanol, tetrahydrofuran) were provided by Fisher, VWR, Scharlau and Across and they were used without further purification. In addition, some of the solvents were dried (*e. g.* acetonitrile) using the purification system SPS-800 (*MBRAUM SPS Systems*). The water was twice distilled and passed through a Quantum® EX Polishing Cartridge (QTUM000EX) in a Millipore apparatus to obtain the Milli-Q water.

The precipitation of the hydrochloride salts was carried out using dry ethanol Seccosolv® (max. 0.01 % H₂O).

3.2 INSTRUMENTAL TECHNIQUES

3.2.1 CALORIMETRIC STUDIES

The thermodynamic parameters for the protonation of the ligands (enthalpy and entropy terms) were determined in 0.15 M NaClO₄ by means of an automated system composed of a Thermometric AB thermal activity monitor (model 2277) equipped with a perfusion-titration device and a Hamilton Pump (model Microlab M) coupled with a 0.250 mL gastight Hamilton syringe (model 1750 LT). The microcalorimeter was checked by determining the enthalpy of the reaction of a strong base (0.1 M NaOH) with a strong acid (0.1 M HCl). The value obtained (-56.7(2) kJ mol⁻¹) was in agreement with the literature values.²³¹

In a typical experiment, a NaOH solution (0.15 M, addition volumes 15 µL) was added to acidic solutions of the ligand (5×10^{-3} M, 1.2 mL). Corrections for heats of dilution were applied. The corresponding enthalpies of reaction were determined from the calorimetric data by means of the HypCal program.²³² ΔH° and $T\Delta S^\circ$ values were determined for the protonation of the ligands **L1-H**, **L1-Me₃**, **L2-H** and **L2-Me₃**.

3.2.2 COMPUTATIONAL STUDIES

Quantum mechanical calculations

Quantum mechanical calculation were used in this work for the study of the protonation of the piridolic ring, the optimisation of the protonated structures of the ligands and the modelling of the catalytic cycle of Cu(II)-L1-MeiPr₂. All the gas-phase optimizations were done using the Becke three-parameter Lee-Yang-Parr hybrid functional (B3LYP)²³³⁻²³⁵ and the Pople-style basis set²³⁶ 6-31G(d,p) for all atoms except for the copper atom for which the Los Alamos effective core potential LANL2DZ²³⁷⁻²³⁹ (in which *ab initio* effective core potentials have been generated to replace the Coulomb, core orthogonality, and exchange effects of the chemically inert core electrons) was employed. *Ab initio* calculations were performed without any symmetry constraints, and the effects of the solvent were included (water, $\epsilon = 78.39$) self-consistently through the polarisable continuum model (PCM).^{240,241} The influence of dispersion terms was also taken into account by means of the Grimme's dispersion (IOp(3/124=30)) correction.²⁴²

On the other hand, the generation of the catalytic cycle model for the [Cu(L1-MeiPr₂)(H₂O)]²⁺ system required a more accurate approach. Previous to the hybrid QM/MM-MD study, the structure corresponding to the complex was subjected to a conformational analysis. With this purpose, the determined crystal structure (now available in The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)²⁴³ (id. 1827336)²⁴⁴) was used as starting geometry for the ground state geometry optimization. As initial benchmarking, the GGA functional BP86^{233,245}, the Becke three-parameter Lee-Yang-Parr hybrid functional (B3LYP)²³³⁻²³⁵, and the GGA meta-hybrid functional M06²⁴⁶ of Truhlar and Zhao were tested. The influence of the dispersion was also taken into account by means of the Grimme's dispersion (D3) correction.²⁴² All the gas-phase optimizations were carried out using the Ahlrichs' basis set def2-SV(P)²⁴⁷ for all atoms except for copper for which we used the MDF10 Stuttgart-Dresden effective core potential.²⁴⁸ A larger basis set (def2-TZV(P)) for all atoms except copper was also tested to check its influence over the geometry. Vibrational frequencies were computed on each stationary point for

identification of either transition states (TS) (single imaginary frequency) or intermediates (all frequencies positive) in the potential energy surface. The zero-point correction was calculated and applied to all the stationary structures. The atomic polar tensor (APT) charges and the spin density were also computed for each stationary structure in order to elucidate the oxidation state of the metal ion and the dioxygen molecules. Gaussian 09 C.01 software package²⁴⁹ was employed for the calculations while gMolden²⁵⁰ and PyMol²⁵¹ were used for visual inspection and to create the molecular graphics.

Molecular dynamics and hybrid quantum mechanics simulations

The QM-optimized geometry of $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ was embedded in a box of 4175 TIP3P water molecules²⁵² that extended 20 Å away from any solute atom and two Cl^- ions were added to ensure electrical neutrality. The system was relaxed by energy minimization in three consecutive steps (3x5000 cycles) in which after the first 1000 cycles the minimization method was switched from steepest descent to conjugate gradient. The resulting system was heated from 100 to 300 K during 20 ps with the position of the solute atoms restrained (20 kcal mol⁻¹ Å⁻²) using the weak-coupled algorithm for the temperature regulation and with fixed volume (NVT ensemble). These harmonic restraints were gradually reduced in five steps until they were completely removed. In the latter equilibrating step, the pressure was fixed (NPT ensemble). The system was further simulated under the same conditions up to a total time of 200 ps with 2 fs steps. The coordinates of the system were printed every 10 ps for further analysis. The cut-off distance for the non-bonded interactions was 10 Å and periodic boundary conditions were used. Electrostatic interactions were treated by using the smooth particle mesh Ewald (PME) method²⁵³ with a grid spacing of 1 Å. The SHAKE algorithm²⁵⁴ was applied to all bonds involving hydrogen atoms. The molecular dynamics (MD) simulation protocol made use of the pmemd_cuda.SPFP module in the AMBER16 suite of programs.²⁵⁵ All the MD simulations were performed using one NVIDIA CPUs.

The square pyramid coordination sphere of the $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ sys-

tem was described using the MCPB (Metal Centre Parameter Builder)²⁵⁶ module within Amber16. Briefly, the force field parameters (bond, angle, dihedral, electrostatic, van der Waals terms) were obtained at the B3LYP/6-31G*²⁵⁷ level of theory and the punctual charges were derived by fitting the electrostatic potential according to the Merz-Singh-Kollman^{258,259} scheme. Some additional parameters for the coordination sphere of **L1-MeiPr₂** were taken from previous works.²⁶⁰⁻²⁶²

The final equilibrated snapshots of [Cu(**L1-MeiPr₂**)(H₂O)]²⁺ within the box of TIP3P water molecules obtained in the former MD simulation step were subjected to a hybrid quantum mechanics/molecular mechanics (QM/MM-MD) simulation. All the QM/MM-MD calculations were performed within the *sander* module of AMBER16, which also includes a complete treatment of long-range electrostatic interactions. The external ORCA package²⁶³ was used for the quantum mechanical calculations. The QM region encompassed the complex and the different diatomic oxygen species, whereas the MD region included all the remaining solvent and counter ions. Therefore, no covalent bond had been cut when defining the QM/MM-MD boundary. The inner QM region was treated at the B3LYP-D3/def2-SV(P) level of theory. A electrostatic cut-off of 10 Å was employed for the evaluation of the electrostatic interactions. All the simulations were run up to 2 ps (2000 steps, 1 fm/step) at 300 K. The system coordinates were printed every 10 steps for further analysis. The MD and QM/MM-MD simulation trajectories were analysed using the cpptraj module²⁶⁴ within Amber16.

3.2.3 DYNAMIC LIGHT SCATTERING

The average size of the nanoparticles was determined by photon correlation microscopy, also known as dynamic light scattering. This technique is based on the brownian motion of the nanoparticles, which depends mainly on its size, and its effect on the dispersion of the light.

The studies were carried out using a Malvern Mastersizer 2000 instrument at the Institute of Materials Science, University of Valencia.

3.2.4 ELECTROCHEMICAL MEASUREMENTS

Cyclic voltammetry experiments were performed in aqueous solution at pH 7.4 using a concentration of 10^{-3} M of the system of study. For the study of the metal complexes, equimolar amounts of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and the ligand were dissolved in 50 mM TRIS, previously degassed with nitrogen for 10 min, and then the voltammograms were recorded.

Electrochemical experiments were performed with BAS CV 50W and Metrohm PGSTAT 101 Autolab equipment in a conventional three-compartment cell with a glassy-carbon working electrode. Prior to the series of experiments, the working electrode was cleaned and activated. Before each run, the electrode was polished with an aqueous suspension of alumina on a soft surface, dried, and cleaned. AgCl (3 M NaCl)/ Ag and a platinum-wire auxiliary electrode completed the three-electrode configuration. The cyclic voltammograms were recorded at scan rates of 10-100 mV/s. The pH was adjusted to 7.4 by adding appropriate amounts of aqueous 0.1 M HCl and/or NaOH solutions.

3.2.5 ELEMENTAL ANALYSIS

The elemental analysis of the synthesised compounds was carried out by the Central Service of Support for Experimental Research (SCSIE) of the University of Valencia with a Carlo-Elba CHNS1100 Elemental Analyzer. All samples were measured in triplicate.

3.2.6 KINETIC EXPERIMENTS

Depending on the time scale of the reaction, the kinetic measurements were carried out either with an Applied Photophysics SX17MV stopped-flow instrument provided with a PDA-1 diode array detector or with a Cary 50-Bio spectrophotometer equipped with a thermostated multi-cell holder accessory. In both cases, the spectral changes over a selected wavelength range were measured and fitted to different kinetic models with the SPECFIT program,²⁶⁵ which provides the values of the rate constants and the electronic spectra of the different species for the

model proposed.

The kinetic studies of Cu(II)-L complex decomposition were carried out under pseudo-first-order conditions of acid excess, and the solutions containing Cu^{2+} and the corresponding ligand in a 1:1 molar ratio, the pH was adjusted using NaOH and HClO_4 solutions. In all cases, the equilibrium speciation curves were used to select the starting pH of the solution so that it contains only a major complex species. Experiments with **L1-Me₂Pr₂** were carried out at 298.1 ± 0.1 K using 0.15 M NaClO_4 as supporting electrolyte. However, because of the higher stability of the Cu(II) complexes of **L1-Me₃**, the concentrations of acid required to achieve complete decomposition were larger than for **L1-Me₂Pr₂**. Moreover, the kinetics experiments were carried out using 1 M NaClO_4 as supporting electrolyte.

For the kinetic studies on complex formation, a $5.0 \cdot 10^{-4}$ M solution of the ligand at a given pH value was mixed in the stopped-flow instrument with a solution at the same pH containing the same concentration of Cu^{2+} . Pseudo-first order conditions were not employed to make complexation slow enough to be measured and also to avoid complications caused by the possibility of formation of complexes with different stoichiometries.

Experiments were carried out at 298.1 ± 0.1 K using 0.15 M NaClO_4 as supporting electrolyte at several values of the initial pH for the metal and ligand solutions (pH range between 2.0 - 5.5). Under these conditions, complex formation can be easily monitored, and Cu^{2+} initially exists almost exclusively as the aqua-complex, thus facilitating the interpretation of the kinetic data because there is not any contribution of Cu^{2+} hydroxo complexes to the rate of complex formation.

The kinetic experiments were carried out by the group of professor Manuel García Basallote, from the University of Cádiz. I would particularly like to acknowledge Andrea Liberato for her great work.

3.2.7 INDUCTIVELY COUPLED PLASMA - MASS SPECTROMETRY

Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry (ICP-MS, 7900, Agilent Technologies) was used for the quantification of the amount of Cu^{2+} complexed to the nanosystems. The studies were carried out by the technical staff of the Central

Service for Experimental Research (SCSIE).

In a typical experiment an aqueous solution of $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ at pH 7 was added to a known amount of functionalised boehmite nanoparticles. The concentration of the grafted ligand was previously determined by NMR and/or elemental microanalysis. The Cu^{2+} salt was added in excess over the nanoparticles in order to saturate all the coordination positions, according to the distribution diagrams obtained by the potentiometric studies. The pH was increased to 10 to make the BNPs precipitate. Then, the BNPs were washed with water and centrifuged to eliminate the copper excess. The concentration of Cu^{2+} in this solution was analysed by ICP-MS. Finally, the BNPs were taken to acidic pH to re-disperse them and free the complexed copper. The BNPs were then centrifuged again and the amount of copper in the acidic solution was analysed by ICP-MS. The analysis provided the amount of copper coordinated to the ligand grafted on BNPs. Measurements were made in triplicate.

3.2.8 MASS SPECTROMETRY

The mass spectrometry analysis (ESI-MS) was carried out by the Central Service for Experimental Research (SCSIE) of the University of Valencia using ESQUIRE 3000 PLUS Ion Trap Mass Spectrometer attached to an AGILENT 1100 (HPLC-MS) high-performance liquid chromatograph, coupled to a electro-spray ionisation (ESI) source.

3.2.9 NMR MEASUREMENTS

All the synthesised ligands, as well as its synthetic intermediates and the functionalised nanoparticles, were characterised by nuclear magnetic resonance using Bruker Advance DPX300 (Bruker magnet of 300 MHz, 7T) and a Bruker Advance DRX500 (Bruker magnet of 500 MHz, 11.7T) spectrometers located at the Central Service for Experimental Research (SCSIE) of the University of Valencia. The spectrometers operate at 300.13 and 500.13 MHz for ^1H and at 75.47 and 125.77 MHz for ^{13}C , respectively.

Appropriate deuterated solvents were used to acquire the NMR experiments.

3-(Trimethylsilyl)propionic-2,2,3,3-d₄ acid sodium salt (TSP) was used as a reference standard for the acid-base NMR titration studies ($\delta = 0$ ppm for ¹H and $\delta = 0$ ppm for ¹³C). Adjustments to the desired pD were made using drops of DCl or NaOD solutions. The pD was calculated from the measured pH values using the correlation, $pD = pH_{\text{reading}} + 0.4$.²⁶⁶

The NMR studies were also used in order to quantify the amount of ligand grafted on the nanoparticles after its functionalisation. For each BNPs sample, 6 solutions with a concentration of the ligands ranging from 0.1 to $5 \cdot 10^{-3}$ M and 3 solutions with *ca.* 10 mg of the functionalised nanoparticles were prepared and their ¹H NMR spectrum was measured. All solutions were prepared employing deuterium oxide as solvent and using TSP as internal reference. The pH of the solutions was adjusted to ~ 1 using drops of DCl or NaOD solutions. Once the spectra were recorded, the integration of the proton signals of the ligands provided the amount of grafted organic molecules on the nanoparticles surface.

MestReNova 11.0.2 was used for data processing and visualisation of the all the obtained spectra.²⁶⁷

3.2.10 CATALASE ACTIVITY ASSAY

The capacity to remove hydrogen peroxide of the systems was measured by means of a UV-Vis spectrometer. Since H₂O₂ presents an absorbance band at 210 nm, its decomposition can be followed by determining the absorbance variation with time at this wavelength.

Kinetic constant determination

In order to calculate the catalytic constant of the dismutation reaction carried out by the studied complexes, a mathematical approach should be done. Concentration of H₂O₂ can be determined by means of the Lambert-Beer equation (eq. 3.1). Therefore, by determining the absorbance variation with time, it might be possible to obtain the rate constant for the catalytic reaction (eq. 3.2 to 3.7).



$$A_{210} = \epsilon_{210}l[\text{H}_2\text{O}_2] \quad (3.2)$$

$$\frac{dA_{210}}{dt} = \epsilon_{210}l \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} \quad (3.3)$$

$$\frac{1}{\epsilon_{210}l} \frac{dA_{210}}{dt} = \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} \quad (3.4)$$

It should be noted that for short reaction times, when there is a large excess of hydrogen peroxide the reaction follows a zero-order kinetics. Under this conditions, peroxide concentration can also be approximated to the initial one.

$$v = k_{1.1}[\text{ML}][\text{H}_2\text{O}_2] \approx k_{1.1}[\text{ML}][\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad (3.5)$$

$$\frac{1}{\epsilon_{210}l} \frac{d[\text{H}_2\text{O}_2]}{dt} = -k_{1.1}[\text{ML}][\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad (3.6)$$

$$k_{1.1} = -\frac{1}{\epsilon_{210}l[\text{ML}][\text{H}_2\text{O}_2]} \frac{dA_{210}}{dt} \quad (3.7)$$

Methodology

Previous solutions

The following solutions were required for a typical catalase activity assay:

– *Hydrogen peroxide 1 M TRIS buffer*

It was prepared a 1/10 (v/v) hydrogen peroxide (30% w/v, 100 vol, CAS 7722-84-1) solution diluting 10 mL of the commercial peroxide solution in 90 mL of TRIS buffer (50 mM, pH 7.4).

– *KMnO₄ solution 0.05 M*

The KMnO₄ solution needed for the H₂O₂ titration was prepared by dissolving 0.79 g of the salt (CAS 7722-64-7) in 100 mL of H₂O.

– *Metallic scavenger solution in TRIS buffer*

3 Solutions were prepared in TRIS buffer (50 mM, pH 7.4). It is recommended the preparation of the following concentrations for the previous metallic

scavenger solution: 0.3, 1 and 3 mM (cuvette concentrations 15, 50 and 150 μM). These concentrations should be modified depending on the scavenger activity.

Experimental procedure

Each peroxidase activity assay consists of three types of measurement: two kinds of blank and the study of the samples. Mixture composition for each measured solution is shown in Table 3.1. All three types of mixtures are composed by TRIS buffer and variable concentrations of H_2O_2 and the scavenger solution; depending on the decomposition we pretend to determine (just the H_2O_2 spontaneous one or rather that induced by the metallic scavenger).

Table 3.1 – Measurement solutions required for a typical peroxidase activity assay

Solution	V_{TRIS} (μL)	V_{scav.} (μL)	V_{H₂O₂} (μL)
Blank 1	3000	-	-
Blank 2	2950	-	50
Scav. sol.	2800	150	50

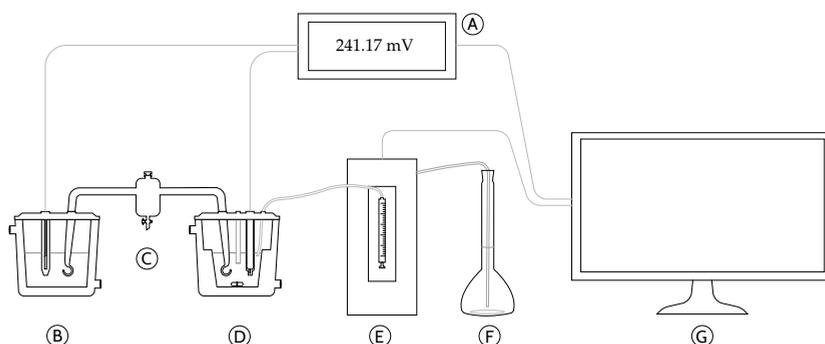
For the first blank, 3 mL of the TRIS buffer were used in order to obtain the UV-Vis system baseline. In the second blank, 2.95 mL of the TRIS solution were mixed with 50 μL of the hydrogen peroxide one in order to check the H_2O_2 species stability in solution. Finally, the activity of the samples was measured in triplicate by mixing 2.8 mL of the TRIS buffer, 50 μL of H_2O_2 and 150 μL of the solutions of the scavengers.

In order to check the validity of the assays, additional kinetics were performed employing the described methodology. First of all, the activity of each scavenger was tested without the addition of any metal, using the same conditions than those used with the metallic solutions. Second, solutions of the studied metals were studied without the addition of any azamacrocycle. No peroxidase activity was found in both cases. Finally, the well-known H_2O_2 scavenger EUK-134 was used in order to validate the assays.^{145,268,269}

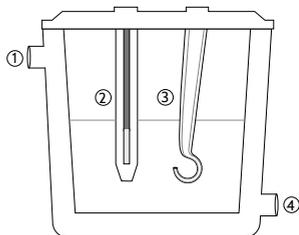
3.2.11 POTENTIOMETRIC STUDIES

Potentiometric system

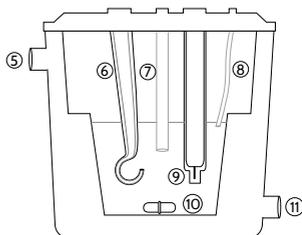
The potentiometric measurements were carried out using an automatic potentiometer. The potentiometric system employed (Figure 3.1) is based on two cells—one for the measurement of the samples and the other one used as reference—connected by a Wilhelm salt bridge. The ends of the ionic regulator adopt a J shape to avoid gravitational flows.



Reference cell (B)



Measurement cell (D)



Index

- A - pH-Meter
- B - Reference cell
- C - Saline bridge Wilhelm
- D - Measurement cell
- E - Automatic burette
- F - NaOH solution 0.1 M
- G - Informatic system

Reference cell (B)

- 1 - Thermostated flow inlet
- 2 - Reference electrode Ag/AgCl Crison 52 40
- 3 - Saline bridge Wilhelm
- 4 - Thermostated flow outlet

Measurement cell (D)

- 5 - Thermostated flow inlet
- 6 - Saline bridge Wilhelm
- 7 - Ar gas inlet
- 8 - HCl/NaOH inlet
- 9 - Measurement electrode Crison 52 50
- 10 - Magnet/Stirring system
- 11 - Thermostated flow outlet

Figure 3.1 – Scheme of the components of the potentiometric system.

A Crison 52 50 electrode was used as measurement electrode while the Crison 52 40 Ag/AgCl one was employed as reference. Standardised solutions 0.1 M of HCl and NaOH –to which the CO₂ had previously been removed– were used for the titrations. The NaOH and HCl additions to the measurement cell were carried out by an Automatic Crison burette micro BU 20 31. Both reference and measurement cells were thermostated at 298.1 ± 0.1 K by a Haake EK 51 water bath. All titrations were carried out using 0.15 M NaClO₄ as supporting electrolyte.

Calibration of the electrodes

The calibration of the electrodes was carried out in advance to the performance of any potentiometric measurement. The calibration process was based in the titration of a strong acid (0.1 M HCl standardised with TRIS) using a strong base (0.1 M NaOH). Both electrode calibration and potentiometric measurements were collected and analysed using the PASAT package.²⁷⁰ By means of the Gran method^{271,272} the PASAT can determine the standard potential of the solution (E°), the ionic product of water (pK_w) and the exact concentration of the titrant solution. Through the difference for the NaOH concentration values calculated using the acid and the basic zones can also be determined the carbonation degree, which should remain below 1 %.

Data acquisition

Potentiometric data was automatically taken by PASAT package.²⁷⁰ This program was in charge of both the titrant additions over the measurement cell and the output potentiometric data lecture and record. For each aliquot of titrant added, a minimum of 10 lectures were done. When standard deviation (σ) and drift (difference between the first and last values) were below the maximum limits accepted (< 0.05 for both parameters), the potential value was recorded and a new aliquot was added. In case σ and/or drift exceeded the selection criteria, additional lectures were done up to they were met. The top value of 100 lectures *per* addition was establish.

Potentiometric titrations were performed within the pH range between 2.0 and

11.0, employing a sample concentration around 0.05 M. A minimum of 10 points were measured for each equilibrium constant to be determined. Potentiometric titrations were done at least in duplicate for each ligand/complex.

Data management

Equilibrium constants were calculated by means of the potentiometric data by the Superquad and Hyperquad programs.^{273,274} Both programs employ the Levenberg-Marquard method for the least-square non-linear fitting of the raw data and the equilibrium constants determination.

Both Superquad and Hyperquad use the same mathematical derivation to determine the equilibrium constants using the potentiometric data. Thermodynamic definition of a formation constant is the coefficient of activities between reagents and products (eq. 3.9). Working in aqueous media with a high ionic concentration (such as 0.15 M NaClO₄) simplifies the equation, reducing the coefficient of activities to just a coefficient of concentrations (eq. 3.10).



$$K_a = \frac{a_{\text{A}^-} \cdot a_{\text{H}_3\text{O}^+}}{a_{\text{HA}}} \quad (3.9)$$

$$K_a = \frac{[\text{A}^-] \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HA}]} \quad (3.10)$$

Since determining experimentally the concentration of each species at equilibrium is a complex work, the concentration of just one of the species can be measured at equilibrium and then relate it with the stability constants and the initial concentrations of the system. The concentration quantification of one of the species at equilibrium may be carried out by measuring the difference between the well-known potential of a reference electrode and that measured by another electrode whose potential should be function of the target species concentration.

The compound chosen with such purpose is the hydrogen ion (H⁺). Thus, using the Nernst equation (eq. 3.11), concentration of H⁺ can be related –and,

therefore, its value might be determined– with the measured potential for each addition of titrant.

$$E = E^{\circ'} + \frac{RT}{nF} \ln[H^+] \quad (3.11)$$

The last unknown variable of the Nernst equation (the standard potential of the solution or $E^{\circ'}$) should be determined periodically –at least each day of work– due to its strong dependence with the experimental conditions of the measurement. In fact, the standard potential of the solution is not just a simple variable, but a combination of different potentials:

$$E^{\circ'} = E^{\circ} + E_J + E_{\text{asym}} \quad (3.12)$$

where E° corresponds to the formal potential, E_J is the junction potential and E_{asym} is the asymmetry potential; which depends on time. It should be noted that the value of the junction potential, or E_J , depends on the hydrogen ion concentration; showing a large influence on $E^{\circ'}$ for the pH below 2.0. The standard potential of the solution was experimentally determined during the calibration of the electrode, explained at the *Calibration of the electrodes* section.

According to the mathematical derivative, Hyperquad software works following five basic principles:

- (a) Formation of each species is ruled by an equilibrium constant.
- (b) Each electrode behaves according to the Nernst equation.
- (c) Systematic errors are minimised in the experimental work.
- (d) The independent variable –the titrant volume added– is not subjected to error. Deviations for the independent variable and the measured potential follow a normal distribution.
- (e) A starting system should be introduced as a model at the beginning, as well as a suggested –estimative– value for the constants.

Finally, Hyss program²⁷⁵ was employed in order to represent the distribution species diagrams from the equilibrium constants.

3.2.12 POWDER X-RAY DIFFRACTION

The crystalline characterization of the boehmite nanoparticles was carried out by the SCSIE of the University of Valencia using a powder diffractometer D5005 model Bruker brand. The system is based on a graphite monochromator for filtering Cu-K α radiation ($\lambda=1.5418 \text{ \AA}$), with a divergence slit angle of 1° , an anti-scatter slit angle in the diffracted beam of 1° , and a receiving slit width of 0.5 mm.

Boehmite samples were recorded for diffraction angles in the $15\text{-}65^\circ 2\theta$ range with a step-size of $0.08^\circ 2\theta$ and a counting time of 3 s per step.

3.2.13 SINGLE CRYSTAL X-RAY DIFFRACTION

Single-crystal X-ray diffraction (SXRD) data for the analysed structures were collected on a Xcalibur diffractometer (Agilent Technologies, Sapphire 3 CCD detector) using a single wavelength X-ray source with MoK α radiation, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ and 120(1) K in all cases. The selected single crystals were mounted using Paratone-N hydrocarbon oil²⁷⁶ on the top of a loop fixed on a goniometer head and immediately transferred to the diffractometer. Data collection, analytical absorption correction, and data reduction were performed with the Oxford program suite CrysAlisPro.²⁷⁷ An empirical absorption correction was applied using spherical harmonics, implemented in SCALE3 ABSPACK scaling algorithm.²⁷⁷

The crystal structures were solved using direct methods with SHELXT,²⁷⁸ and were refined by full-matrix least-squares methods on F^2 with SHELXL2014. All programs used during the crystal structure determination process are included in the OLEX2 software.²⁷⁹ All the non-hydrogen atoms were anisotropically refined. Hydrogen atoms were introduced in calculated positions and their coordinates were refined according to a riding model, with the exception of the solvent water molecules. In some cases, analysis of the F map allows to localize the water hydrogen atoms. CCDC 1827335-1827337 contains some of the supplementary crystallographic data, which can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre.²⁴³ The resolution of the structures was carried out by Javier Pitarch-Jarque and Salvador Blasco.

3.2.14 SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY ASSAY

A brief preliminary discussion

Since it is critical that any method able to quantify the superoxide scavenging activity should work in a rapid and quantitative way, major efforts have been undertaken to find a procedure with such characteristics. Independently of the different techniques that can be used in the measurement of the antioxidant activity (spectroscopy, chromatographic or electrochemical),²⁸⁰ the SOD evaluation methods fall into two distinct categories depending on the way the activity is determined: direct or indirect.

The direct techniques, those that measure directly the spectrophotometric decay of the superoxide anion, allow accurate measurements of the diminution rates of $O_2^{\bullet-}$; but, despite this accuracy, they are unsuitable for reactions with slow rate constants (with $k_{cat} < 10^{5.5} M^{-1} s^{-1}$, at pH 7.4) and require appropriate equipment.²⁸¹ The two main methods that can be found in this category are stopped-flow kinetic analysis and pulse radiolysis.¹⁵⁴

On the other hand, indirect methods do not measure directly the catalytic constant rate, but they permit to work in wider ranges of activity.¹⁵⁴ For this reason, some of the most used methods to study the $O_2^{\bullet-}$ scavenging activity are indirect, such as the KMB (α -ketomethylbutyric acid) technique, which is based on the ESR (electron spin resonance) measurement of the ethane produced in the reaction of the superoxide anions with KMB.²⁸¹

One of the indirect methods most widely used is the assay employed in this work and reported by McCord and Fridovich in 1971 for the first time.²⁸¹⁻²⁸⁴

The McCord-Fridovich method

The McCord-Fridovich method is based on the coupling of two systems: (a) a system capable to generate superoxide radicals and (b) a system able to detect these ions and then generate a measurable signal. If a third system with SOD activity is introduced in the solution, this signal should be somehow modified due to the scavenging of the superoxide radicals. Therefore, through the determination

of such variation, the superoxide dismutase activity of the latter system can be quantified.

The $O_2^{\bullet-}$ generator system employed is the xanthine/xanthine oxidoreductase pair. Xanthine oxidoreductase (XOR) is a molybdoflavin enzyme that catalyses the terminal two reactions in purine degradation in primates.²⁸⁶ It consists of a homodimer of ~300 kD in which each subunit contains four redox centres: a molybdenum cofactor (Mo-co), one flavine adenosine dinucleotide (FAD) site and two Fe/S clusters. In this system, the generation of the $O_2^{\bullet-}$ species (Figure 3.2) starts with the oxidation of xanthine to uric acid by the XOR, what provides the electron flux needed for the reduction of molecular oxygen into the superoxide radicals.

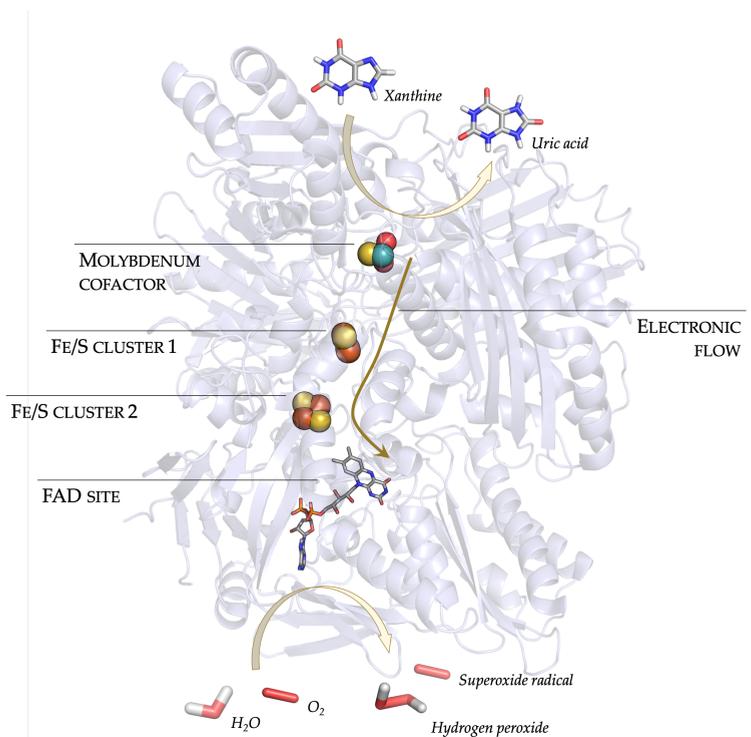
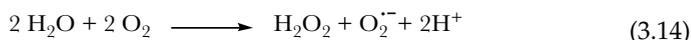
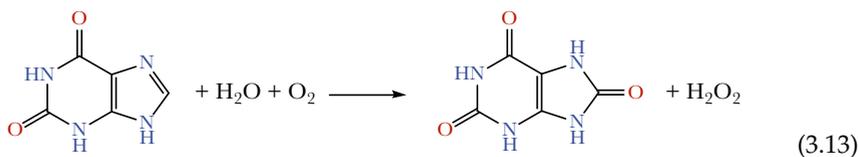


Figure 3.2 – Scheme of the $O_2^{\bullet-}$ generation reaction carried out by the xanthine oxidoreductase enzyme. XOR structure was taken from the Protein Data Bank (PDB, ID 1FIQ).²⁸⁵

Thus, is the XOR Mo-co site who carries out the oxidation reaction of the xanthine substrate, while O_2 reduction to the peroxide or superoxide species occur at the FAD. The two Fe/S clusters provide the route for electron flux between the Mo-co and the FAD.^{285,287,288} The entire process takes place according to reactions 3.13 and 3.14.



Secondly, the chosen system capable of reacting with the superoxide species generating then a measurable signal, is the nitroblue tetrazolium chloride (NBT)/-monoformazane (MF^+) pair (see Figure 3.3). When NBT reacts with the superoxide radicals generated by the xanthine oxidoreductase, it is reduced to monoformazane. Monoformazane has an absorbance band at 560 nm not shown by its oxidized form. Following the variation of the absorption intensity with the time, the $\text{O}_2^{\cdot-}$ generation rate produced by the xanthine/xanthine oxidoreductase system

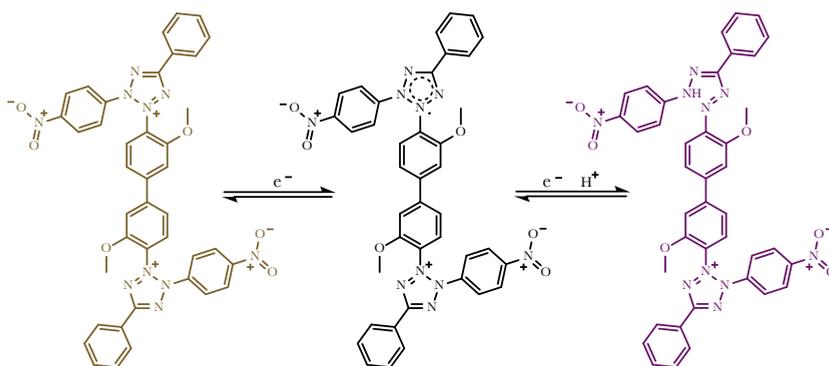


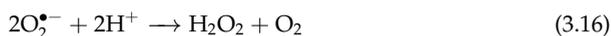
Figure 3.3 – Scheme of the reduction reaction for the NBT. Proposal of mechanism.

can be indirectly determined.

When a compound –with superoxide dismutase activity– is added to the solution, will establish a competition with the NBT/MF⁺ system for the scavenging of the O₂^{•-} species. The partial elimination of the superoxide radicals by this compound will produce the decrease of the NBT reduction rate into MF⁺. Thus, the higher the concentration and the antioxidant activity of the SOD system, the greater the diminution of the MF⁺ formation rate; which can be quantified through the measurement of the absorbance intensity at 560 nm with time. By means of this kinetic determination, and on the basis of the mathematical derivation shown in the next section, the catalytic constant and the IC₅₀ value of the studied O₂^{•-} scavenger can be calculated .

Discussion of the SOD assay mechanism

The NBT reduction process to MF⁺ in presence of the O₂^{•-} scavenger system comprises several reactions and a complex kinetics, for which a mechanism was proposed in 2004 by Casella *et al.* and whose procedure was developed by Salvador Blasco in his Ph.D. thesis.^{289,290} At the beginning of the sequence of reactions, the system xanthine / xanthine oxidoreductase produces superoxide radicals (eq. 3.15) that undergo self-degradation via a bimolecular reaction (eq. 3.16) but also reacts with NBT to produce MF⁺ (eq. 3.17). In presence of the O₂^{•-} scavenger, superoxides also interacts with the superoxide radicals (eq. 3.18) catalysing its dismutation to O₂ and H₂O₂. This latter species could give rise to the formation of ROS when reacting with the studied metal complexes; being responsible for a new path for the formation of MF⁺ (eq. 3.19). The residual amount of ROS generated by this reaction may be disregarded because in the presence of the O₂^{•-} scavenger all superoxide is rapidly dismutated in solution to give a very little steady-state concentration.²⁸⁹





In order to reduce the number of variables involved in the reaction mechanism, the experimental conditions of the assay have been optimized, simplifying the entire process. First, the xanthine oxidoreductase concentration has been adjusted to generate a constant and intense enough $\text{O}_2^{\bullet-}$ flow. In the same way, the NBT concentration used was high enough to convert its reaction in a catalytic –and not in a stoichiometric– process. Both factors contribute to give a linear absorbance increase during the assay due to the formation of MF^+ , *i.e.*, the superoxide concentration in solution remains stationary during the assay. This point can be observed when representing the value of A_{560} with time (Figure 3.4). The representation, which follows the regular pattern of a SOD activity assay, shows the variation of the

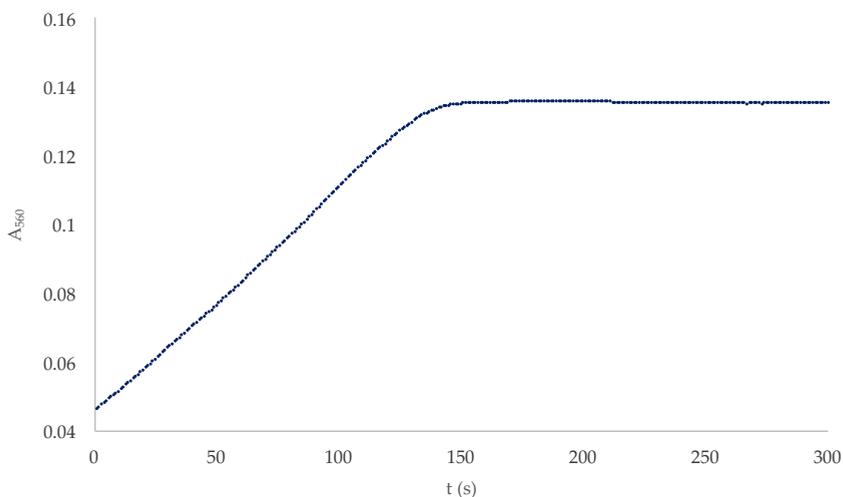


Figure 3.4 – Variation of the absorbance at 560 nm with time in a regular SOD assay.

absorbance at 560 nm of a xanthine and NBT solution when a doses of xanthine oxidoreductase has been added at time 0.

The MF^+ formation takes place through reactions 3.17 and 3.19. The equation for the speed of the reaction 3.17 (eq. 3.20) can be simplified (eq. 3.21) considering that the concentration of NBT high enough to remain constant.

$$v_{1.17} = k_{1.17}[O_2^{\bullet-}][NBT] \quad (3.20)$$

$$v_{1.17} = k_{1.17}^{ap}[O_2^{\bullet-}] \quad (3.21)$$

The rate of reaction 3.19 depends on the affinity of superoxide radical for the metal scavenger but, either way, its rate equation can be defined as an undetermined fraction of the main MF^+ formation reaction (eq. 3.17):

$$v_{1.19} = f k_{1.17}^{ap}[CuLO_2] \quad (3.22)$$

Since reaction 3.18 can be considered as a fast equilibrium (at least faster than reactions 3.17 and 3.19), concentration of $O_2^{\bullet-}$, CuL and $CuLO_2$ are ruled by the affinity constant K and the mass balance of superoxide and metal complex. During the assay the concentration of the superoxide radical remains very low, so the fraction of complex bounded to this radical can be considered much lower than the total complex, $[CuL]_{tot}$. Therefore, it can be written:

$$[CuL] + [CuLO_2] \approx [Cu]_{tot} \quad (3.23)$$

$$[O_2^{\bullet-}] + [CuLO_2] \approx [O_2^{\bullet-}]_{tot} \quad (3.24)$$

$$[O_2^{\bullet-}] = \frac{[O_2^{\bullet-}]_{tot}}{1 + K[CuL]_{tot}} \quad (3.25)$$

$$[CuLO_2] = \frac{[O_2^{\bullet-}]_{tot}K[Cu]_{tot}}{1 + K[CuL]_{tot}} \quad (3.26)$$

Thus, global formation rate of MF^+ is given by the sum of rates $v_{1.5}$ and $v_{1.7}$:

$$v = v_{1.17} + v_{1.19} = k_{1.17}^{\text{ap}}([\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{tot}} + f[\text{CuLO}_2]_{\text{tot}}) \quad (3.27)$$

$$v = k_{1.17}^{\text{ap}}[\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{tot}} \frac{1 + fK[\text{CuL}]_{\text{tot}}}{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}} \quad (3.28)$$

The Lambert-Beer law allows us to relate $[\text{MF}^+]$ with absorbance:

$$\frac{\delta(A_{560})}{\delta t} = \epsilon_{560} l \frac{\delta[\text{MF}^+]}{\delta t} \quad (3.29)$$

Combining equations 3.28 and 3.29:

$$\frac{\delta(A_{560})}{\delta t} = S = S_0 \frac{1 + fK[\text{CuL}]_{\text{tot}}}{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}} \quad (3.30)$$

were $S_0 = \epsilon_{560} \cdot l \cdot k_{1.5}^{\text{ap}} \cdot [\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{tot}}$. Finally, the inhibition (IC) percentage can be defined as the activity decrease with regard to the solution without the studied SOD system:

$$\text{IC} = \frac{S_0 - S}{S_0} = \frac{(1 - f)K[\text{CuL}]_{\text{tot}}}{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}} \quad (3.31)$$

Thereby, the antioxidant activity of a SOD mimic can be evaluated by measuring the A_{560} variation with time for a mixture of xanthine/XOR/NBT and the metallic scavenger for concentrations of the latter ranging from 0 to $\sim 50 \mu\text{M}$.

Methodology

Previous solutions

The following solutions were required for a typical SOD assay:

- *Xanthine solution 0.217 mM in HEPES buffer*

Xanthine substrate (3.3 mg, CAS 69-89-6) was dissolved in 1 mL of HEPES buffer (50 mM, pH 7.4) with a drop of NaOH 0.1 M. Once the xanthine was dissolved, HEPES buffer was added to the solution up to the 90 mL. Its pH was then corrected to 7.4 and the final volume adjusted to 100 mL. The solution should be used in the following 36 h.

– *NBT solution 73.38 μM in the xanthine solution*

The NBT (1.8 mg, CAS 298-83-9) was dissolved in 30 mL of the previous xanthine/HEPES solution. In this case, the amount of the NBT solution depended on the number of ligand solutions it should be measured in the assay. 2.4 mL of the NBT solution were required for each ligand concentration to be measured, thus the 30 mL served for 7 different concentrations of ligand. For an assay of 9 concentrations, it is recommended to prepare 35 mL of the NBT solution (2.1 mg of NBT). The solution should be used in the following 4 h due to the photo-degradation risk.

– *Xanthine oxidase 0.42 UIN/mL in HEPES buffer*

A 1/11 v/v xanthine oxidoreductase (CAS 9002-17-9) solution was prepared diluting 300 μL of the commercial enzyme solution in 3 mL of HEPES buffer (50 mM, pH 7.4). Just like in the case of the NBT solution, the XOR volume to prepare depends on the amount of metal scavenger samples that should be studied. Each CuL concentration implies a minimum consumption of 0.3 mL of the enzyme solution. Thus, for a 7 solutions study it is recommended to prepare 3 mL of XOR solution, while 4 mL were required for a 9 samples assay. The XOR solution should be kept in an ice bath and should be used immediately after preparation.

Due to the incapability to know the exact XOR concentration, its adequacy was determined by measuring the A_{560} variation with time, which should range between $8 \cdot 10^{-4}$ and $14 \cdot 10^{-4}$ UA/s for the non-containing scavenger solutions. If the value is out of range, the solution concentration should be corrected by the addition of XOR or HEPES, depending on the case.

– *Metallic scavenger solutions in TRIS buffer*

They were prepared 7 (to 9) solutions in TRIS buffer (50 mM, pH 7.4). It is recommended the preparation of the following concentrations for the previous metallic scavenger solution: 1, 2, 5, 7, 10, 20, 50, 70 y 100 μM (cuvette concentrations 0.1, 0.2, 0.5, 0.7, 1, 2, 5, 7 y 10 μM). This concentrations should be modified depending on the scavenger activity.

Experimental procedure

Each SOD assay consisted of three types of measurement: two kinds of blank and the samples. Mixture composition for each measure solution is show in Table 3.2. All three types of solutions are composed by 800 μL of the NBT/xanthine solution and another 200 μL which could contain a mixture of the XOR enzyme, the metallic scavenger and/or the TRIS buffer; depending on the activity we pretend to determine (just the activity of the XOR or rather the one corresponding to the SOD mimetics).

Table 3.2 – Measurement solutions required for a typical SOD assay

Solution	V_{TRIS} (μL)	V_{scav.} (μL)	V_{NBT/Xanth.} (μL)	V_{XOR} (μL)
Blank 1	200	-	800	-
Blank 2	100	-	800	100
Scav. sol.	-	100	800	100

Firstly, a blank should be carried out in order to remove the substrates absorbance from the spectrum. Thus, the spectrum of a solution composed by 800 μL of NBT/xanthine solution and 200 μL of TRIS buffer was measured.

After the first blank was carried out, a second one was performed in order to know the XOR solution activity and to correct its concentration (just in case it was needed). The kinetics measurement for a solution containing 800 μL of NBT/xanthine solution, 100 μL of TRIS buffer and another 100 μL of XOR was performed. Each kinetics was done in triplicate.

The third kind of measures is based on the addition of the SOD mimetic solution to a mixture containing NBT/xanthine and XOR and the determination of its $\text{O}_2^{\bullet-}$ scavenging activity. Thereby, it was performed the kinetic measurements for a solution containing 800 μL of NBT/xanthine solution, 100 μL of the SOD mimetic and another 100 μL of XOR for each CuL concentration. Each kinetics was done in triplicate.

All kinetic measurements were carried out according to the following experimental conditions:

Temperature: 25 °C

pH: 7.4

λ_{lecture} : 560 nm

Total kinetics time: 120 s

Time between lectures: 1 s

Cuvette optical path: 1 cm

Calculations

According to the discussion shown in the *Mechanism discussion of the SOD assay* section, inhibition of MF^+ formation is directly related with the metallic scavenger activity, and it can be determined through the difference in the slope values shown for the blank and the SOD mimetics measurements. Thus, by subtracting the slope value determined for the metallic scavenger to the measured when no complex was added for each concentration studied –and then normalising– gives rise to

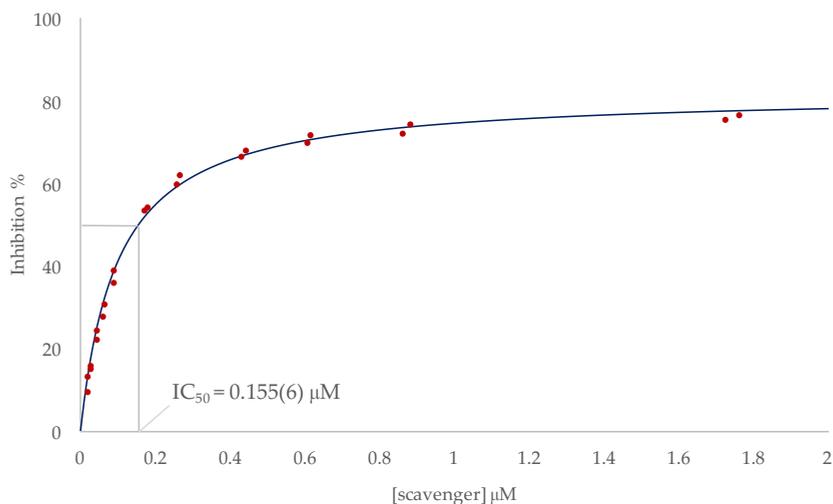


Figure 3.5 – Representation of the experimental results for a typical SOD assay (red points) and its theoretical fitting (blue line).

a representation of the SOD mimetic inhibition in function of its concentration. Fitting data to the equation 3.31, IC_{50} and k_{cat} can be determined, as shown in Figure 3.5.

3.2.15 UV-VIS MEASUREMENTS

The pH values were measured with a Metrohm 713 pH meter and adjustments of the hydrogen ion concentration of the solutions were made with diluted HCl and NaOH solutions. UV-Vis absorption spectra were recorded on an Agilent 8453 spectroscopy system.

3.2.16 Z-POTENTIAL DETERMINATION

The electric potential of the interfacial surface between the nanoparticles and the dispersion medium, also known as ζ -potential, was carried out using a Malvern Mastersizer 2000 instrument at the Institute of Materials Science, University of Valencia.

Chapter 4

Synthesis & Characterization

Note: This chapter has intentionally been written in English in order to obtain the european doctoral degree.

Nota: Este capítulo ha sido escrito expresamente en inglés con la finalidad de obtener el grado europeo de doctor.

4.1 SYNTHESIS: A GENERAL OVERVIEW

Since Jack E. Richman and Thomas J. Atkins published in the mid seventies the synthetic procedure of what they named "nitrogen analogs of crown ethers",²⁹¹ their methodology for the synthesis of azamacrocycles has been widely used in different fields of chemistry and biochemistry. Just as an example, the procedure they developed has been employed with such diverse purposes as the development of luminescent probes for biomedical analyses,²⁹² the synthesis of biomimetic compounds^{68,228} or the improvement of the catalytic activity of metal complexes.²⁹³

Originally, the Richman-Atkins synthesis was presented as a faster and higher yield method to obtain cyclic amines, with a medium-large ring size. Indeed, this approach was based on the condensation of a bis- ρ -toluenesulfonamide sodium salt with bis-tosylates, bis-mesylate or bis-halides as good leaving groups under high dilution conditions (see Figure 4.1).²⁹¹ In this reaction, the sulfonamide sodium salt should be obtained *in situ* using NaH as a strong base. It should be noted that the tosyl groups have a double function in this reaction: they increase the acidity of hydrogen in the amines, which enhances the nucleophilic character of nitrogen, while contributing to preorganise the reaction intermediates due to its bulky nature, leading to intramolecular cyclisation as opposed to intermolecular

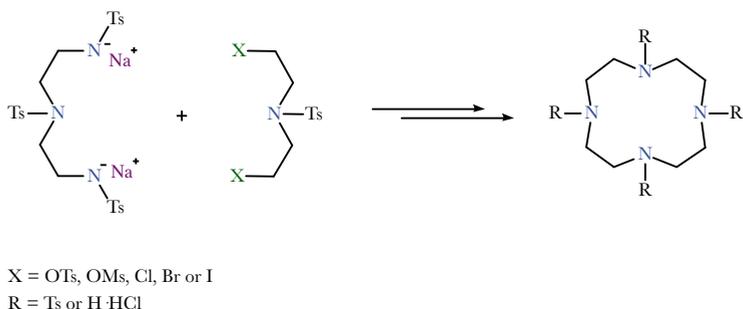


Figure 4.1 – Reaction scheme for the synthesis of macrocycles proposed by Richman and Atkins in 1974.²⁹¹

oligomerisation.²⁹⁴

Nowadays, a wide range of modifications of the Richman-Atkins reaction can be found in literature. The procedure we used in this work is based on one of the main variations of this synthetic route developed by our group in the nineties: the reaction of a bis-*p*-toluenesulfonamide with an aryl bis-halide moiety (instead of a second polyaminic chain),²⁹⁵ which works as spacer linking both terminal sulfonamides of the polyaminic chain. In this thesis we have adapted this methodology, which essential synthetic pathway is shown in Figure 4.2. The synthetic strategy followed in the work was therefore structured around four main steps: (1) protection of the amino groups with tosyl chloride, (2) cyclisation of the polyaminic chains with the aromatic spacer, (3) removal of the protective groups and, finally, (4) modification of the final polyazacyclophane through the alkylation of the amines, esterification of the acid groups and so forth.

Beyond the general scheme described, three key points should be taken into account in this synthetic process. First of all, two of the three aromatic spacers used are not commercially available, so they had to be synthesised. The first part of this chapter is focused on the description of these reactions and their corresponding synthetic procedures. Second, the synthesis of compounds **L5** to **L6** requires extra steps between the tosylation and the cyclisation reactions for the elongation of the chains. Their experimental procedures and characterisations are explained in the second part of the chapter. Finally, the third part of the chapter is devoted the description to the synthetic procedure of the oxidic nanoparticles, as well as to the graft of some ligands onto its surface.

A detailed scheme of the synthetic procedure is shown in Figures 4.3 and 4.4.

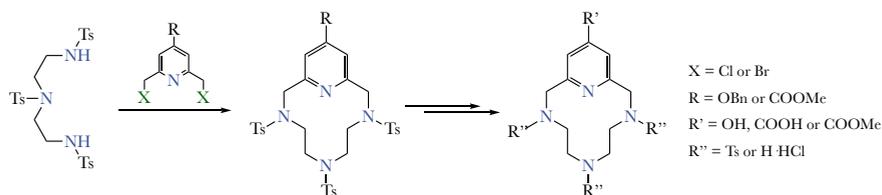


Figure 4.2 – General scheme of the synthesis carried out in the present work.

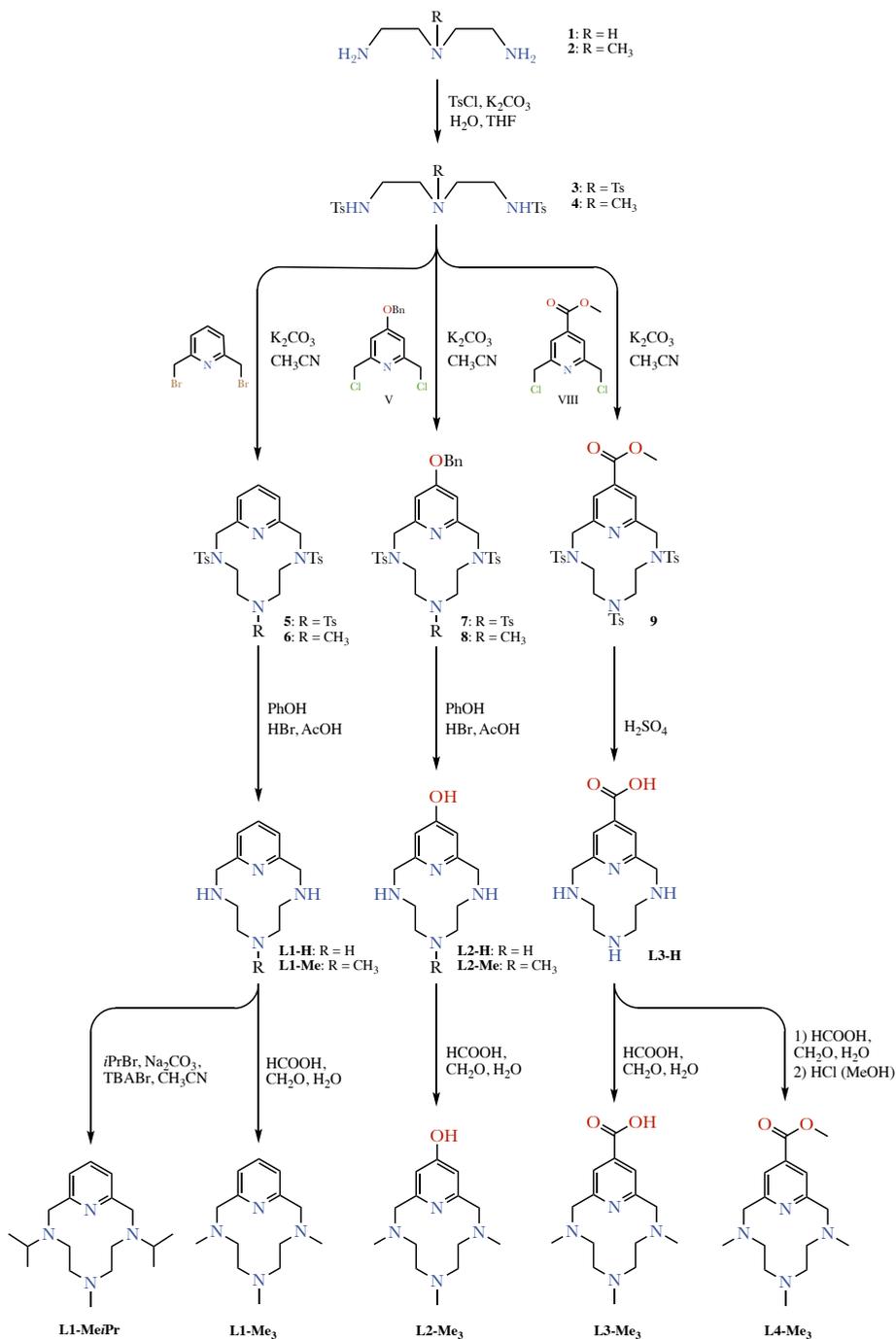
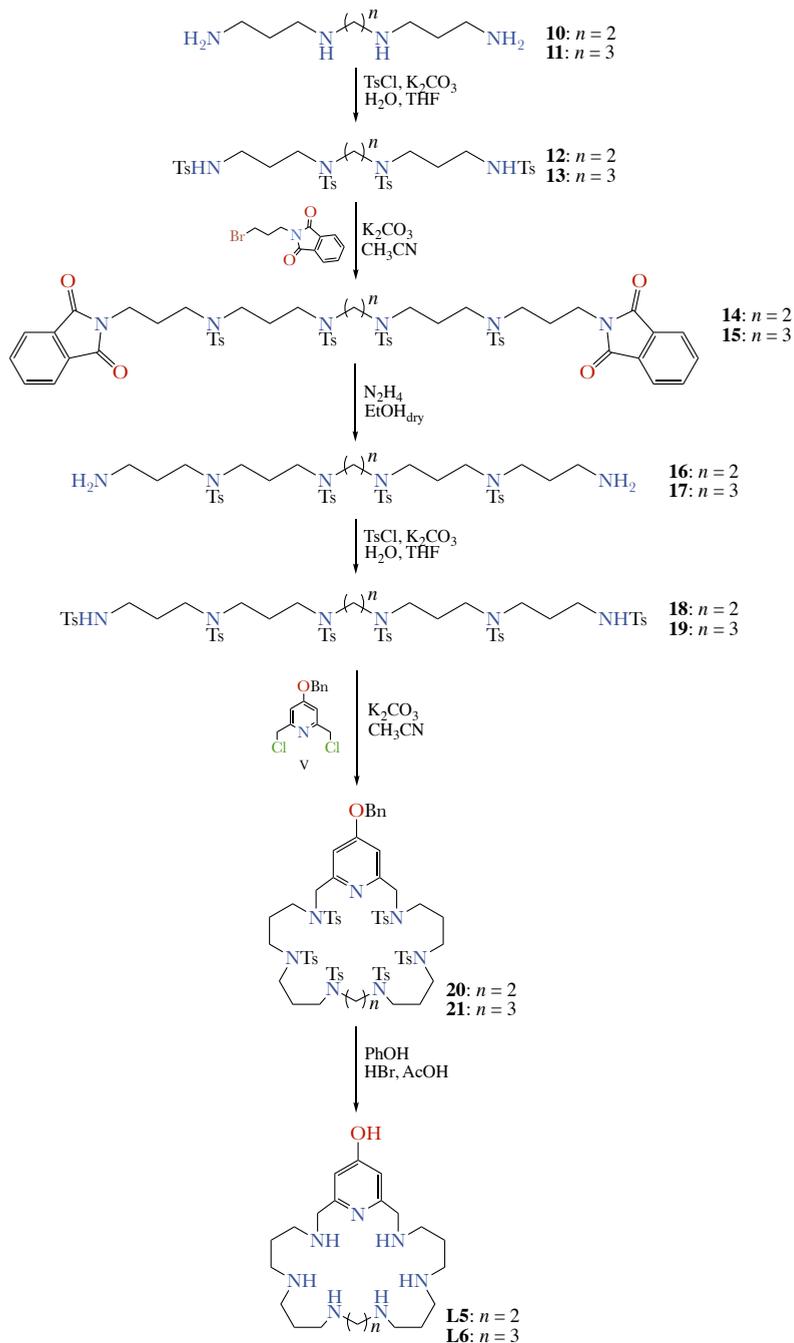


Figure 4.3 – Reaction scheme for the synthesis of the ligands L1 - L4.

Figure 4.4 – Reaction scheme for the synthesis of the ligands **L5** and **L6**.

4.2 SYNTHESIS OF AROMATIC SPACERS

Before the synthesis of the chains was carried out, it was necessary to synthesise the pyridinic spacers used during the cyclisation reactions. The synthesis for both aromatic compounds (spacers **V** and **VIII**) are shown below.

4.2.1 SYNTHESIS OF SPACER **V**

In order to synthesise the first spacer (**V**, see Figure 4.5), chelidamic acid (**I**) was used as starting material. Following the procedure described by Froidevaux²⁹⁶ and Chauvin,²⁹⁷ the diacid was esterified under acidic conditions in ethanol, obtaining the diethyl 4-hydroxypyridine-2,6-dicarboxylate (**II**) in 78 % yield. Preventing possible nucleophilic side reactions, the hydroxyl group at the 4-position of **II** was then blocked by reaction with benzyl bromide in presence of potassium carbonate, obtaining **III** in 86 % yield.^{296,298} Both ester groups were reduced with sodium borohydride to obtain the corresponding diol (**IV**) with a good yield (91 %), as described by Busto.²⁹⁸ Finally, the hydroxyl groups were substituted by reaction with thionyl chloride in 97 % isolated yield.^{299,300}

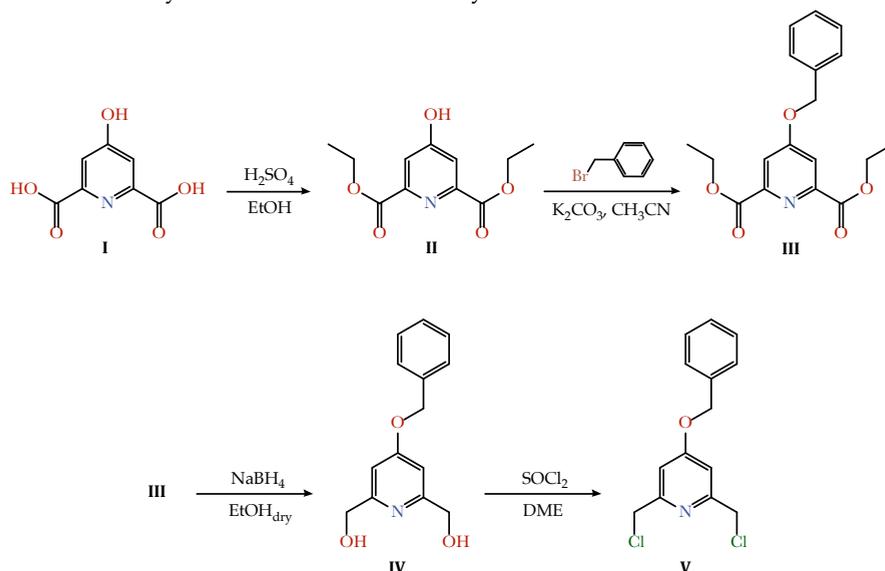
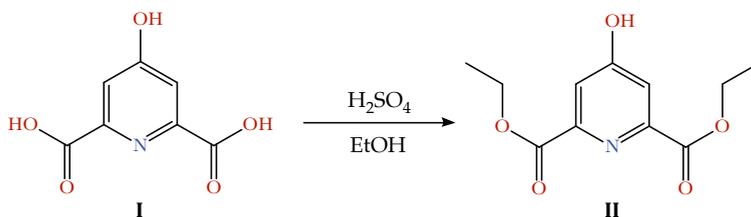


Figure 4.5 – Reaction scheme for the synthesis of **V**.

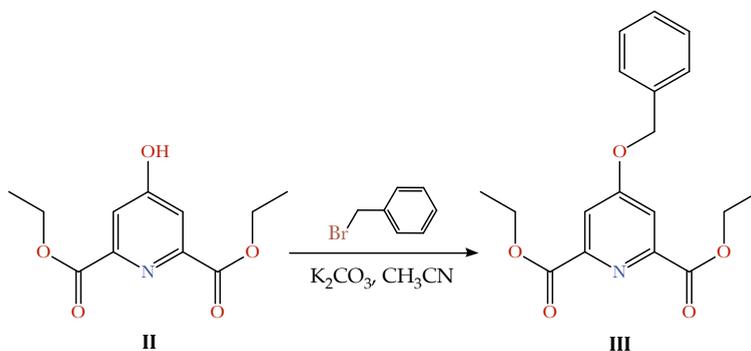
Synthesis of diethyl 4-hydroxypyridine-2,6-dicarboxylate (II).^{296,297}**Figure 4.6** – Reaction scheme for the synthesis of **II**.

Synthetic procedure. Chelidamic acid (**I**, 5.00 g, 27.31 mmol) were dissolved in ethanol (175 mL), and 0.29 mL of concentrated H₂SO₄ was added. The solution was heated at reflux for 48 h and then neutralized using a saturated aqueous solution of Na₂CO₃. The ethanol was evaporated under reduced pressure and the resulting aqueous solution was extracted with CH₂Cl₂ (4 x 100 mL). The combined organic phases were dried with anhydrous Na₂SO₄, the solid was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. Finally, 75 mL of hexane were added to the solid and the resulting suspension was heated to reflux for an hour in order to separate the target compound from the one which presents the hydroxyl group alkylated. The mixture was filtered to obtain **II** as a white solid (4.88 g, 78 %).

Characterization of II:

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.29 (s, 2H), 4.47 (q, *J* = 7.1 Hz, 4H), 1.41 (t, *J* = 7.1 Hz, 6H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 120.0, 63.7, 14.5.

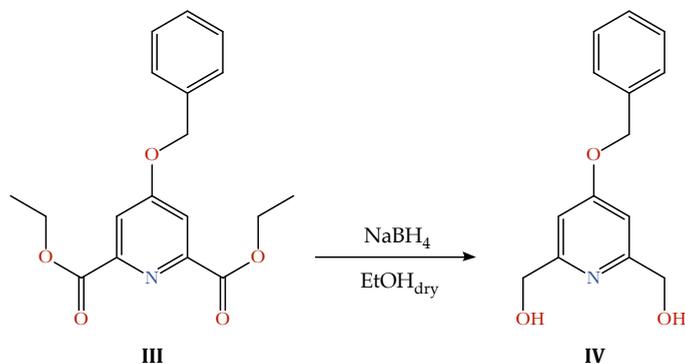
Synthesis of diethyl 4-(benzyloxy)pyridine-2,6-dicarboxylate (III).^{296,298}**Figure 4.7** – Reaction scheme for the synthesis of **III**.

Synthetic procedure. Over a solution of **II** (2.80 g, 11.62 mmol) in dried acetonitrile (150 mL) were successively added K₂CO₃ (2.98 g, 18.59 mmol) and benzyl bromide (2.07 mL, 17.43 mmol). The mixture was heated at reflux during 2 h, and then it was cooled down to room temperature and filtered over vacuum in order to remove the carbonate salts. The solvent was evaporated to dryness under reduced pressure and the residue was crystallized by using hexane to give **III** (3.32 g, 86 %) as a white solid with a good yield (3.32 g, 86 %).

Characterization of III:

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.87 (s, 2H), 7.45-7.36 (m, 5H), 5.23 (s, 2H), 4.48 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 1.45 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 167.0, 165.1, 150.7, 135.2, 129.3, 129.2, 128.2, 115.0, 71.2, 62.8, 14.6.

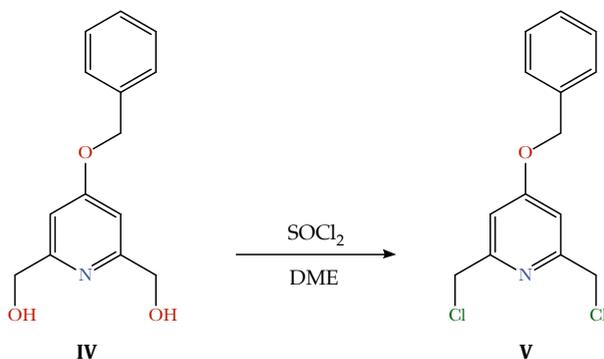
Synthesis of 4-(benzyloxy)-2,6-bis(hydroxymethyl)pyridine (IV).²⁹⁸**Figure 4.8** – Reaction scheme for the synthesis of IV.

Synthetic procedure. Over a solution of **III** (0.33 g, 1 mmol) in dried ethanol (20 mL), NaBH₄ (0.23 g, 6 mmol) was carefully added. The mixture was stirred at 40 ~ 50 °C under an argon atmosphere for 5 h and then the reaction was quenched adding H₂O (25 mL). The mixture was concentrated and the residual aqueous solution was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic phases were dried over anhydrous Na₂SO₄, the solid was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. Compound **IV** was obtained as a white solid (0.22 g, 91 %).

Characterization of IV:

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.41-7.32 (m, 5H), 6.79 (s, 2H), 5.11 (s, 2H), 4.69 (s, 4H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 166.7, 160.9, 135.9, 129.2, 128.9, 127.9, 106.3, 70.5, 64.8.

Synthesis of 4-(benzyloxy)-2,6-bis(chloromethyl)pyridine (V).^{299,300}**Figure 4.9** – Reaction scheme for the synthesis of **V**.

Synthetic procedure. Compound **IV** (1.61 g, 6.56 mmol) was suspended in 1,2-dimethoxyethane (DME, 50 mL) and thionyl chloride (10.48 mL, 0.14 mol) was added. After stirring overnight, the acidic solution was neutralized with a saturated solution of NaHCO₃ and the resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 60 mL). The combined organic phases were dried with anhydrous Na₂SO₄, the solid was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. Compound **V** was obtained as a white solid (1.80 g, 97 %).

Characterization of **V**:

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.44-7.35 (m, 5H), 7.03 (s, 2H), 5.15 (s, 2H), 4.60 (s, 4H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 167.0, 158.4, 135.7, 129.2, 129.0, 128.1, 109.2, 70.6, 46.9.

4.2.2 SYNTHESIS OF SPACER VIII

The synthesis of the second spacer (**VIII**, see Figure 4.10) was carried out by addition of hydroxymethyl radical onto protonated nicotinate, yielding bis-2,6-hydroxymethyl compound **VII** in 21 % yield.^{301–305} This reaction is based on previous works of F. Minisci *et al.*,^{301,306} who reported the introduction of alkyl groups into pyridines (as well as quinolines and acridines) by redox systems consisting in reductive ions (Fe^{2+} , Cu^{2+} , etc.) and peroxides. In this case, it was chosen FeCl_2 as a reductive agent and the peroxydisulfate $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ as a peroxide containing compound.

According to the work of Minisci^{301,306} and Itokawa,^{302,307} it has been proposed a reaction mechanism for the synthesis of **VII** (see Figure 4.11) which is based on four main steps. In first place, the ferrous salt reacts with the peroxydisulfate giving rise to the radical $\text{SO}_4^{\bullet-}$. Once this species is generated, it reacts with the methanol solvent producing the methoxy radical which can bond to the protonated isonicotinic ester, generating the monohydroxymethyl isonicotinic radical. Finally, the rearomatization of this intermediate radical could take place through several possibilities: oxidation or reduction by metal salts (such as in the proposed mechanism), oxidation by the radical source, abstraction of an H atom by intermediate radicals, etc. It may also be that a single mechanism is not responsible for the rearomatization process in all cases.³⁰¹

As reported,^{301,306,307} the substitution with alkyl radicals (hydroxymethyl groups in our case) take place at the parts of lower electron density, which are the C2 and C4 position of pyridines. Since the C4 position is protected by the ester group, the

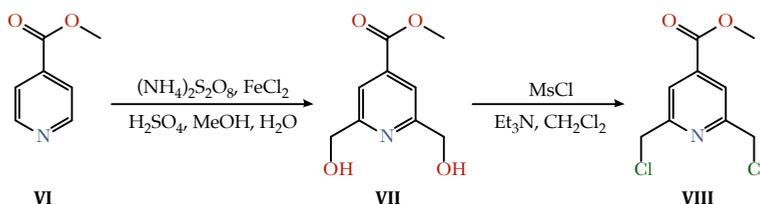


Figure 4.10 – Reaction scheme for the synthesis of **VIII**.

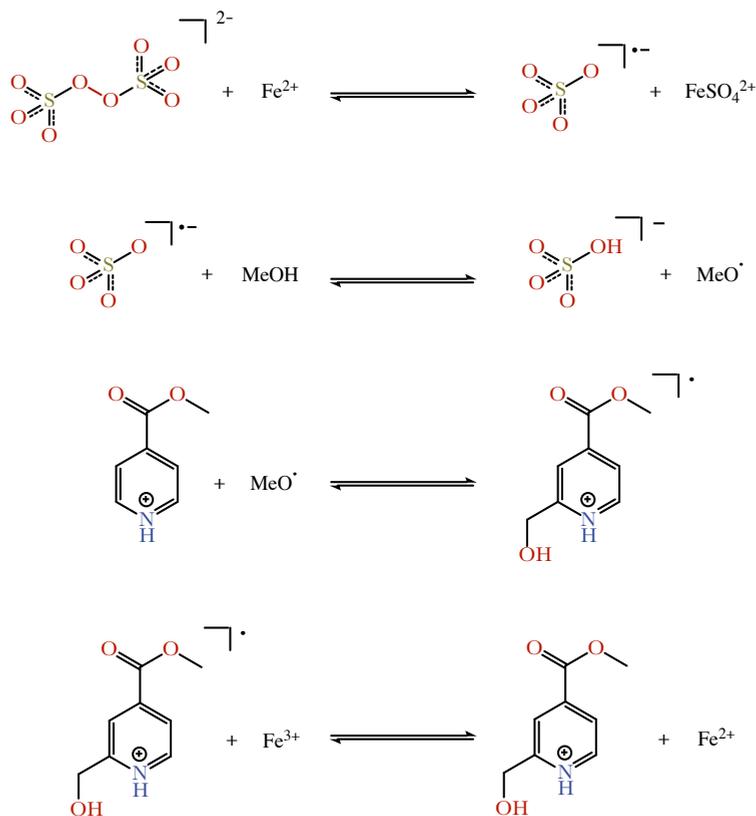


Figure 4.11 – Mechanism of reaction proposed for the hydromethylation process.^{301,302}

reaction is selective for the alkylation of the pyridine in *ortho* to its nitrogen. Additionally, it should be also remarked that this reaction has been carried out in acidic conditions by reason of keeping protonated the pyridinic nitrogen. Consequently, it should increase the nucleophilic reactivity of the C2 aromatic carbon atoms.

Finally, as last step of the spacer synthetic process, a methanesulfonylation in refluxing dichloromethane yielded the bis-2,6-chloromethyl compound **VIII** in 46 % yield.³⁰⁴

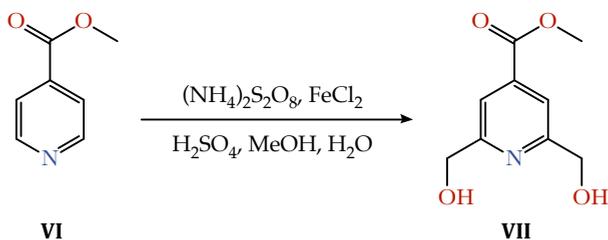
Synthesis of methyl 2,6-bis(hydroxymethyl)isonicotinate (VII).^{304,305}

Figure 4.12 – Reaction scheme for the synthesis of **VII**.

Synthetic procedure. Methyl isonicotinate (**VI**, 3.00 g, 21.88 mmol) was dissolved in 100 mL of methanol and the solution was acidified with concentrated H_2SO_4 (0.5 mL, 9.38 mmol). A suspension of FeCl_2 (1.09 g, 5.47 mmol) in 50 mL of water was added to the solution of **VI** and then, the mixture was heated up to reflux. Once the suspension reached the boiling temperature, ammonium peroxydisulfate (49.9 g, 0.219 mol) in 100 mL of water was added dropwise. After 36 hours at reflux the reaction was cooled down and then concentrated under reduced pressure. The mixture was neutralized using a saturated aqueous solution of Na_2CO_3 and the solid residues were filtered off. The aqueous solution was extracted with EtOAc (5 x 70 mL) and the solution of the combined organic phases was evaporated to dryness under reduced pressure.

At that point, the solid residue was formed by a mixture of the di-, mono- and the non-hydroxymethylated compounds, besides undesired products such as dimeric species. In order to eliminate those products that are not the dialkylated one, the yellow solid was dissolved in 50 mL of water and the impurities were extracted with a mixture of 70 % hexane and 30 % chloroform (10 x 50 mL). Finally, the bis-2,6-hydroxymethyl compound **VII** was extracted from the aqueous solution using EtOAc (5 x 70 mL). The combined organic phases of ethyl acetate were dried with anhydrous Na_2SO_4 , the solid was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure.

Compound **VII** was obtained as a yellow solid (0.90 g, **21 %**).

Characterization of **VII**:

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 7.80 (s, 2H), 5.58 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 4.62 (d, $J = 5.9$ Hz, 4H), 3.92 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$), δ (ppm): 166.0, 163.2, 138.3, 117.4, 64.3, 53.2.

Synthesis of methyl 2,6-bis(chloromethyl)isonicotinate (**VIII**).³⁰⁴

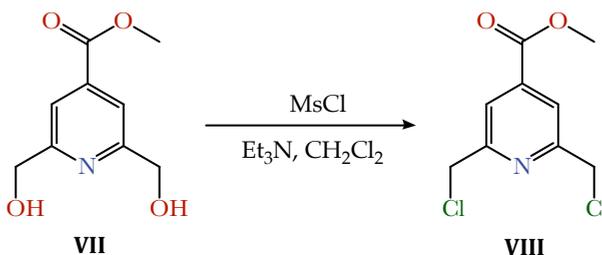


Figure 4.13 – Reaction scheme for the synthesis of **VIII**.

Synthetic procedure. Compound **VII** (1.10 g, 5.58 mmol) was suspended in dichloromethane (60 mL) and triethylamine (1.85 mL, 13.39 mmol) and mesyl chloride (1.04 mL, 13.39 mol) were added. After stirring overnight at reflux, the acidic solution was neutralized with a saturated solution of NaHCO_3 (~50 mL) and the resulting mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 60 mL). The combined organic phases were dried with anhydrous Na_2SO_4 , the solid was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. Compound **VIII** was obtained as a white solid (0.60 g, 46 %).

Characterization of **VIII**:

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.95 (s, 2H), 4.68 (s, 4H), 3.94 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 164.8, 157.6, 139.8, 121.5, 52.9, 46.0.

4.3 SYNTHESIS OF THE LIGANDS

4.3.1 AMINO GROUP PROTECTION WITH TOSYL GROUP

The protection of the primary and secondary amino groups with *p*-tolylsulfonyl chloride, reported for first time by Emil Fischer,³⁰⁸ was carried out in the synthesis of the azamacrocycles due to the benefits it provides. First of all, it allows the monofunctionalization of primary amines; second, it lends conformational rigidity to the structure (favouring cyclisation over polymerization in the process); third, it facilitates the purification of the cycles through crystallization in EtOH and, finally, it is a good leaving group that can be easily removed.^{309,310} For all that, the tosyl group was used for the synthesis of compounds **3**, **4**, **12**, **13**, **18** and **19**.

General procedure

The polyamine to be tosylated (*ca.* 17 mmol) was dissolved in 200 mL of THF and the resulting solution was merged with 50 mL of K_2CO_3 (1.2 equiv. *per* amino group) in water. A solution of *p*-tolylsulfonyl chloride (1.1 equiv. *per* amino group) in 50 mL of THF was added dropwise over the first solution under intense stirring. The conditions were kept for 24 h and then the organic solvent was evaporated under reduced pressure. The resulting aqueous solution was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 50 mL) and the combined organic phases were dried with anhydrous Na_2SO_4 . The solid was filtered and the solvent evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was suspended in ethanol and refluxed for 2 h, obtaining a white solid that was filtered and washed with ethanol.

Mechanism

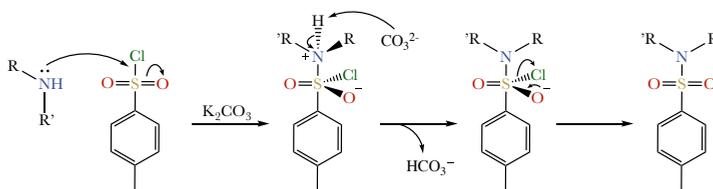
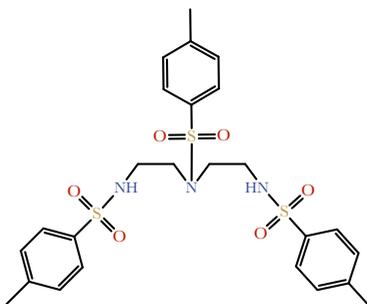


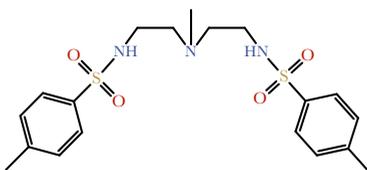
Figure 4.14 – Mechanism reaction scheme for the tosylation of an amino group.

Characterization of the tosylated chains*1,4,7-Tris(ρ -tolylsulfonyl)-1,4,7-triazaheptane (3)*

Yield: 93 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.76 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.61 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.31 (d, $J = 7.8$ Hz, 4H), 7.30 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.30 (s, 2H), 3.22 – 3.08 (m, 8H), 2.43 (s, 9H).

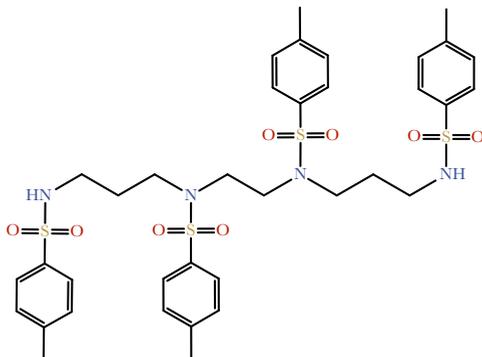
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 143.6, 136.6, 130.0, 129.8, 127.3, 127.2, 50.5, 42.6, 21.6.

4-Methyl-1,7-bis(ρ -tolylsulfonyl)-1,4,7-triazaheptane (4)

Yield: 94 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.79 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 2.92 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 2.40 (s, 6H), 2.32 (t, $J = 6.0$ Hz, 4H), 1.93 (s, 3H).

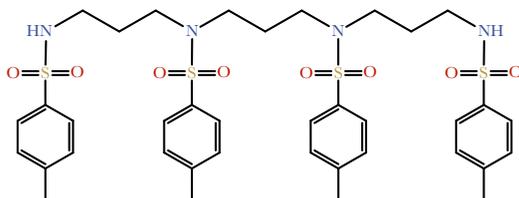
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 143.6, 137.2, 130.1, 127.6, 56.4, 41.0, 21.9.

1,5,8,12-Tetrakis(p-tolylsulfonyl)-1,5,8,12-tetraazadodecane (12)

Yield: 90 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 5.25 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.23 (s, 4H), 3.16 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H), 2.98 (dt, $J = 6.9, 6.4$ Hz, 4H), 2.44 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 1.79 (p, $J = 6.6$ Hz, 4H).

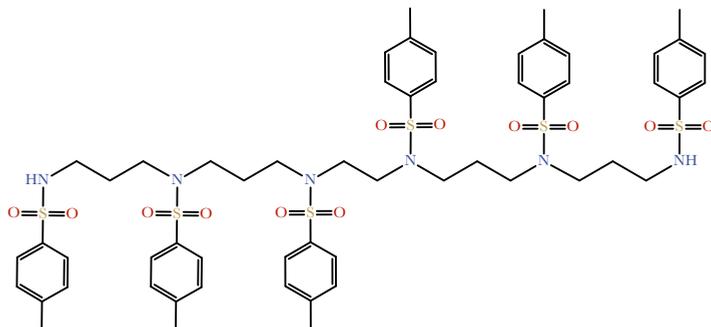
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 144.3, 143.8, 137.2, 135.5, 130.4, 130.2, 127.6, 127.4, 49.3, 47.5, 40.4, 29.4, 22.0.

1,5,9,13-Tetrakis(p-tolylsulfonyl)-1,5,9,13-tetraazatridecane (13)

Yield: 91 %

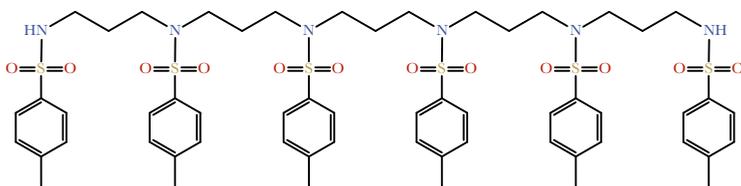
$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.73 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.63 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.33 (d, $J = 8.1$ Hz, 4H), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 4H), 5.35 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.16-3.07 (m, 8H), 3.02-2.96 (m, 4H), 2.43 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 1.92 – 1.73 (m, 6H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 140.3, 135.9, 130.3, 130.2, 127.5, 127.4, 47.9, 46.8, 40.5, 29.6, 28.9, 21.9.

1,5,9,12,16,20-Hexakis(p-tolylsulfonyl)-1,5,9,12,16,20-hexaazaicosane (18)**Yield:** 93 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.69 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.66 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.64 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.30 (d, $J = 8.2$ Hz, 4H), 7.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 5.37 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.29 (s, 4H), 3.14-3.08 (m, 12H), 2.96 (dt, $J = 6.4, 6.1$ Hz, 4H), 2.43 (s, 6H), 2.42 (s, 6H), 2.37 (s, 6H), 1.95 – 1.73 (m, 8H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 143.7, 137.2, 129.5, 128.5, 51.2, 40.4, 28.1, 25.0, 21.5.

1,5,9,13,17,21-Hexakis(p-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaazaheneicosane (19)**Yield:** 75 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.64 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.63 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.25 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 5.37 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.19 – 3.04 (m, 16H), 2.98 – 2.92 (m, 4H), 2.42 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 1.99 – 1.73 (m, 10H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 146.0, 143.6, 137.3, 135.9, 130.3, 130.1, 127.5, 127.4, 47.9, 47.8, 47.7, 40.7, 29.9, 21.9.

4.3.2 LENGTHENING OF LINEAL POLYAMINES

The elongation of the polyamines from 12 (or 13) to 20 (or 21) atoms *per chain*, was carried out through a modification of the Gabriel synthesis.³¹¹ This reaction is based on the nucleophilic attack of the tosylated (and therefore activated) amine of the polyaminic chain to the electrophilic α -carbon of the *N*-(3-bromopropyl)phthalimide. The reaction has been carried out in acetonitrile, in presence of potassium carbonate with the aim of removing the hydrobromic acid generated.

The following lengthening procedure was used in the synthesis of compounds **14** and **15**.

General procedure

The tosylated polyamine (6.14 mmol), K_2CO_3 (5 equiv. *per amino group to be alkylated*) and *N*-(3-bromopropyl)phthalimide (1.2 equiv. *per amino group to be alkylated*) were suspended in 100 mL of dry acetonitrile. The resulting mixture was heated to reflux for 30 h and then cooled down and filtered off. The solvent of the solution was evaporated to dryness under reduced pressure, obtaining a brown oil which was suspended in refluxing ethanol. Finally, the pure product was obtained as a white solid by filtration of the suspension.

Mechanism

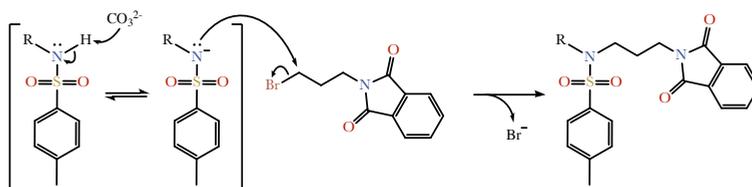
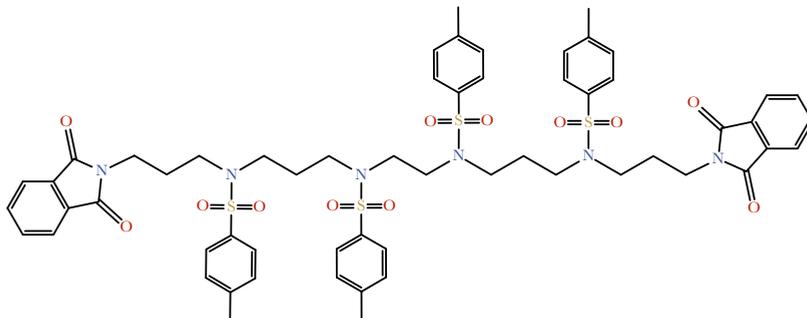


Figure 4.15 – Mechanism reaction scheme for the alkylation of an amino group during the lengthening of a lineal polyamine.

Characterization of the lengthened polyamines

1,18-Phthalimido-4,8,11,15-tetrakis(*p*-tolylsulfonyl)-4,8,11,15-tetraazaoctadecane (**14**)

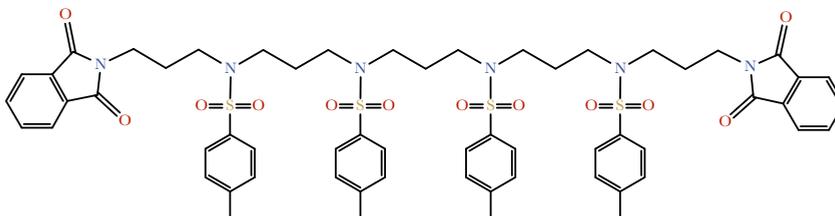


Yield: 34 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.88 - 7.73 (m, 8H), 7.69 - 7.61 (m, 8H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 7.26 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 3.65 (t, J = 7.1 Hz, 4H), 3.31 (s, 4H), 3.20 - 3.12 (m, 12H), 2.41 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 1.98-1.87 (m, 8H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 168.6, 143.9, 136.4, 134.3, 132.5, 130.3, 130.2, 127.7, 127.6, 123.6, 46.8, 36.0, 28.2, 21.9.

1,19-Phthalimido-4,8,12,16-tetrakis(*p*-tolylsulfonyl)-4,8,12,16-tetraazononadecane (**15**)



Yield: 65 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.81 (dd, J = 5.5, 3.0 Hz, 4H), 7.69 (dd, J = 5.5, 3.1 Hz, 4H), 7.65 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.62 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.29 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.26 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 3.66 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 3.19 - 3.09 (m, 16H), 2.41 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 1.99 - 1.80 (m, 10H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 168.6, 143.8, 136.4, 134.4, 132.5, 130.2, 127.6, 123.6, 47.1, 36.0, 29.1, 28.2, 21.9.

4.3.3 REMOVAL OF PHTALIMIDE GROUPS

The deprotection of the terminal amines by removing the phthalimide groups is based, as well as the lengthening reaction, in a modification of the Gabriel synthesis reported for the first time in 1926 by Ing and Manske.³¹² The reaction carried out in this work is based in the nucleophilic attack of the hydrazine (N_2H_4) to the carbonyl groups of the phthalic system.

The described procedure was used to synthesise compounds **16** and **17**.

General procedure

The lengthened chain (3.13 mmol) was suspended in 200 mL of dry ethanol and then 2.59 mL of hydrazine monohydrate (16 equiv. *per* phthalimidic group to remove) were added to the stirring mixture. The suspension was heated at reflux for 24 h and then cooled down. The solvent was evaporated under reduced pressure after the addition of water (*ca.* 20 mL) and the resulting solid was resuspended in 100 mL of CH_2Cl_2 and stirred for 2 h. The white solid which came up in the suspension (mainly phthalic acid) was filtered off. The solution was dried with anhydrous Na_2SO_4 and the solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The pure product was obtained as a white solid.

Mechanism

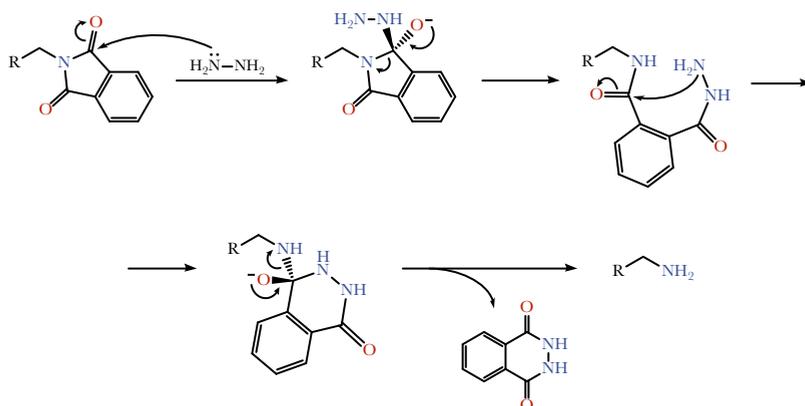
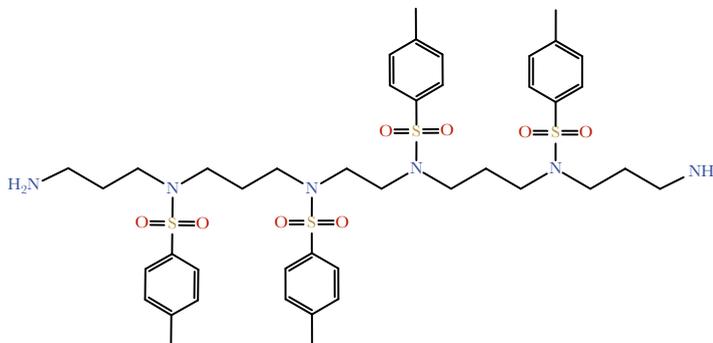
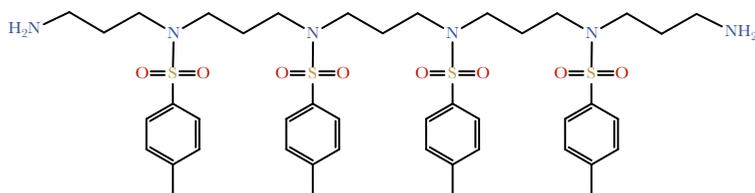


Figure 4.16 – Mechanism reaction scheme for the removal of the phthalimide groups.

Characterization of the deprotected polyamines*5,9,12,16-Tetrakis(p-tolylsulfonyl)-1,5,9,12,16,20-hexaazaicosane (16)***Yield:** 98 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.70 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 4H), 7.33 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 7.29 (d, $J = 8.0$ Hz, 4H), 3.32 (s, 4H), 3.15 (m, 12H), 2.73 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H), 2.43 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.92 (p, $J = 7.4$ Hz, 4H), 1.67 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 144.1, 143.7, 136.4, 135.6, 130.4, 130.2, 127.7, 127.6, 49.7, 48.6, 47.2, 39.3, 32.5, 29.1, 21.9.

5,9,13,17-Tetrakis(p-tolylsulfonyl)-1,5,9,13,17,21-hexaazaicosane (17)**Yield:** 97 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 7.66 (d, $J = 8.3$ Hz, 8H), 7.31 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H), 7.29 (d, $J = 7.3$ Hz, 4H), 3.13 (m, 16H), 2.75 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H), 2.42 (s, 6H), 2.41 (s, 6H), 1.91 (m, 6H), 1.69 (p, $J = 6.7$ Hz, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, CDCl_3), δ (ppm): 143.9, 143.8, 136.4, 136.1, 130.3, 130.2, 127.6, 47.2, 39.3, 32.3, 29.3, 21.9.

4.3.4 CYCLISATION

The synthetic procedure for the cyclisation of the tosylated chains is based on a modification of the work carried out by J. E. Richman and T. J. Atkins in the mid nineteen seventies.^{291,295} The reaction, whose mechanism can be found in Figure 4.17, consist in the nucleophilic attack of an activated amine –in the tosylated chain– to the benzylic carbon of a pyridine derivative.

Attending to the synthetic procedure and the reaction mechanism showed in Figure 4.17, there are two key points to be considered in this reaction: the presence of the tosyl groups in the polyaminic chain and the dilution conditions. Tosyl groups have a decisive paper both from a reactive as from a conformational point of view. The bonding of a sulfonyl group to the amines involves an increment of its acidity, making them more reactive for a nucleophilic attack. But due to its bulkiness, the tosyl groups also provide a high rigidity to the polyaminic chain which favours its preorganisation during the cyclisation reaction. Indeed, once one of the secondary amines reacts with the benzylic carbon of the pyridine derivative, the steric repulsions caused by the tosyl groups leads to a folding of the polyamine, arranging all the structure and disposing the second terminal amine of the chain close to the unreacted benzylic carbon of the pyridine. Thus, the shorter the polyaminic chain is and the higher the number of tosyl groups it contains, the more favoured the formation of monomers *versus* polymers is.^{309,310}

The second key point in the cyclisation reaction is the use of high dilution conditions. The use of elevated dilution rates for the reaction, as well as the dropwise addition of the spacer over the solution containing the chain, has the purpose of avoiding high local concentrations of reagents. In this way, the formation of the monomers is favoured with respect to that of polymers.

Finally, it should be noted that the reaction has been carried out in acetonitrile, in presence of potassium carbonate with the aim of removing the hydrobromic acid (or the hydrochloric one, depending on the spacer) generated during the reaction.

The described procedure was used to synthesise compounds **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **20**, **21**, **22** and **23**.

General procedure

The tosylated chain (2.64 mmol) and K_2CO_3 (5 equiv. *per* amine group to be alkylated) were suspended in anhydrous acetonitrile (150 mL) and the resulting mixture was stirred and heated to reflux. Then, the pyridine derivative was dissolved in 50 mL of anhydrous acetonitrile with a 1 : 1.1 (tosylated chain : pyridine derivative) molar ratio and added dropwise very slowly (with a rate of *ca.* 20 mL/h) over the first suspension. The mixture was kept at reflux under inert atmosphere for 24 h. Once the reaction time had elapsed, it was cooled down and the solid was filtered off. The solvent of the resulting solution was evaporated under reduced pressure. At this point, the synthetic procedure diverges in the purification methodology depending on the compound that is being synthesised.

For compounds **5** and **7**, the oil obtained in the previous procedure was suspended in ethanol and refluxed for 4 h. Then, the solid was filtered off and washed with cold ethanol. The products were obtained as a white solid in a good yield.

The purification of compounds **6** and **8** presents some differences regarding to the previous methodologies due to the lack of the tosyl group in the central amine of the polyaminic chain. The absence of this bulky group entails a decrease in the rigidity of the polyamine, so the generation of polymers is favoured and, therefore, the purification of the azamacrocycles become more complicated. Hence, the purification method for compounds **6** and **8** was based in the suspension of the oil in hot ethanol and the heating of the mixture at reflux during 4 h. However, in this case the filtration was carried out at hot temperature keeping all labware around 60 ~ 80 °C to avoid the precipitation of subproducts. In this case, both products **6** and **8** were obtained as pale yellow solids.

Compound **9** was purified by washing and stirring the impure oil in warm methanol, keeping the resulting mixture at reflux. After 4 h, the suspension was filtered off and the solid was washed with cold methanol. For this purification, methanol was used instead of ethanol in order to avoid the transesterification process in the ester system. The product was obtained as a white solid.

Finally, the purification of compounds **20** and **21** was achieved by column chromatography using silica gel as stationary phase and mixtures of CH_2Cl_2 :acetone

as eluents. Throughout the purification, the polarity of the mobile phase was increased by acetone up to 3% of acetone. The products were obtained as white solids.

Mechanism

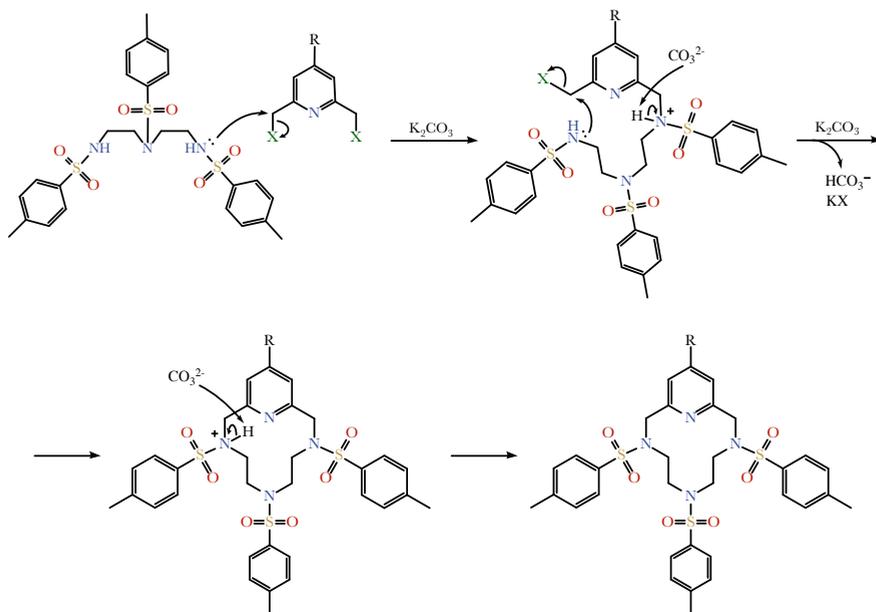
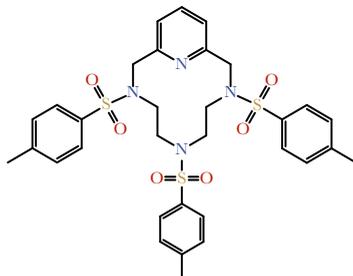


Figure 4.17 – Mechanism reaction scheme for the cyclisation of compound 3.

Characterization of the cyclic polyamines

3,6,9-Tris(*p*-tolylsulfonyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (5)



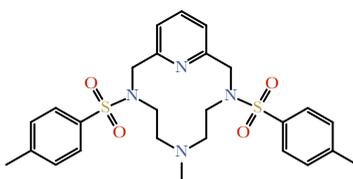
Yield: 72 %

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.75 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.65 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.42 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 8.0 Hz, 4H), 7.27 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.28 (s, 4H), 3.32 (s, *J* = 7.7 Hz, 4H), 2.85-2.65 (m, 4H), 2.44(s, 6H), 2.40(s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 155.3, 143.8, 143.5, 139.0, 136.0, 135.3, 130.0, 129.8, 127.2, 127.1, 124.2, 55.0, 53.5, 50.3, 47.4

MS (ESI) *m/z*: 669.2 g mol⁻¹, corresponding to [M+H⁺].

6-(*N*-Methyl)-3,9-bis(*p*-tolylsulfonyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (6)

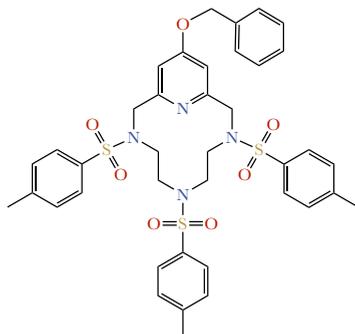


Yield: 16 %

¹H NMR (300.1 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 7.78 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.77 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 4H), 7.25 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 4.30 (s, 4H), 3.08 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H), 2.44-2.37 (m, 4H), 2.41 (s, 6H), 2.06 (s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ (ppm): 158.3, 144.7, 134.0, 130.5, 127.9, 33.8, 23.9, 21.4.

MS (ESI) *m/z*: 529.2 g mol⁻¹, corresponding to [M+H⁺].

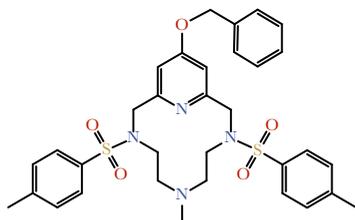
1⁴-Benciloxy-3,6,9-tris(*p*-tolylsulfonyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (7)

Yield: 92 %

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.71 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.41 – 7.28 (m, 11H), 6.99 (s, 2H), 5.10 (s, 2H), 4.21 (s, 4H), 3.31 (t, J = 7.7 Hz, 4H), 2.83 – 2.63 (m, 4H), 2.44 (s, 6H), 2.43 (s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 166.8, 156.8, 143.8, 143.5, 135.3, 135.0, 130.0, 129.8, 128.8, 128.5, 127.7, 127.2, 127.2, 111.2, 70.3, 55.0, 50.3, 47.4, 21.6.

MS (ESI) m/z : 775.3 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

1⁴-Benciloxy-6-(*N*-methyl)-3,9-bis(*p*-tolylsulfonyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (8)

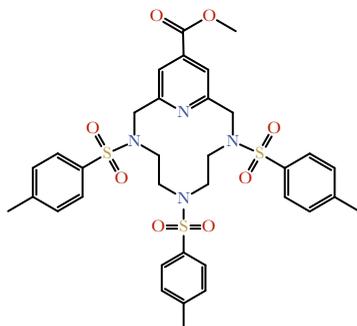
Yield: 35 %

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.72 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.47 – 7.35 (m, 5H), 7.32 (d, J = 8.5 Hz, 4H), 6.80 (s, 2H), 5.03 (s, 2H), 4.29 (s, 4H), 3.21 – 3.06 (m, 4H), 2.41 (s, 6H), 2.39 – 2.31 (m, 4H), 2.20 (s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 167.1, 156.9, 143.9, 136.5, 135.6, 130.2, 129.2, 128.9, 128.1, 127.6, 110.9, 70.6, 54.9, 52.9, 44.4, 43.7, 31.3, 21.9.

MS (ESI) m/z : 635.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

*Methyl 3,6,9-tris(*p*-tolylsulfonyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane-1⁴-carboxylate (9)*



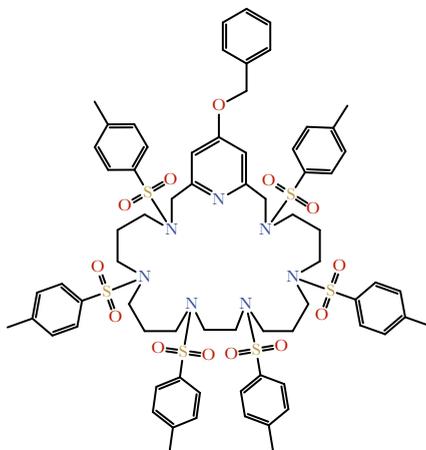
Yield: 94 %

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.94 (s, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.66 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.28 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 4.36 (s, 4H), 3.96 (s, 3H), 3.32 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 2.98 – 2.76 (m, 4H), 2.45 (s, 6H), 2.41 (s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 164.6, 156.7, 143.9, 143.6, 140.5, 135.9, 135.1, 130.0, 129.8, 127.2, 127.1, 123.4, 54.9, 53.0, 50.2, 47.7, 21.6, 21.5.

MS (ESI) *m/z*: 727.2 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

*1*⁴-Benciloxy-3,7,11,14,18,22-hexakis(*p*-tolylsulfonyl)-3,7,11,14,18,22-hexaaza-1(2,6)-pyridinecyclotricosane (**20**)



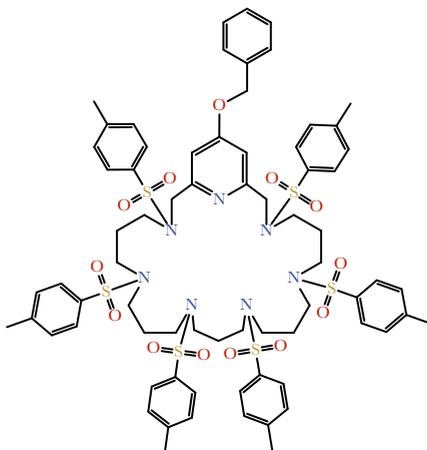
Yield: 73 %

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.68 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.64 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.44 – 7.28 (m, 9H), 7.24 (d, *J* = 6.0 Hz, 8H), 6.91 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.27 (s, 4H), 3.27 (s, 4H), 3.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 4H), 3.05 (t, *J* = 6.8 Hz, 4H), 3.02 – 2.90 (m, 8H), 2.42 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 2.36 (s, 6H), 1.74 (m, 8H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 166.7, 158.5, 144.0, 143.8, 143.7, 136.8, 136.0, 135.8, 135.3, 130.3, 130.2, 130.1, 129.1, 128.3, 127.8, 127.6, 127.5, 108.9, 70.4, 54.4, 49.1, 48.4, 48.2, 47.7, 29.6, 29.1, 21.9, 21.9.

MS (ESI) *m/z*: 1444.2 g mol⁻¹, corresponding to [M+Na]⁺.

*1*⁴-Benciloxy-3,7,11,15,19,23-hexakis(*p*-tolylsulfonyl)-3,7,11,15,19,23-hexaaza-1(2,6)-pyridinecyclotetracosane (**21**)



Yield: 62 %

¹H NMR (300.1 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 7.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 4H), 7.56 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H), 7.43 – 7.23 (m, 17H), 6.92 (s, 2H), 5.01 (s, 2H), 4.27 (s, 4H), 3.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 3.13-2.91 (m, 16H), 2.41 (s, 6H), 2.39 (s, 6H), 2.37 (s, 6H), 2.00 – 1.86 (m, 2H), 1.81-1.66 (m, 8H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 172.2, 158.6, 143.8, 137.5, 136.7, 136.1, 135.9, 130.2, 130.1, 129.1, 128.3, 127.6, 127.6, 127.6, 70.2, 54.3, 47.8, 31.0, 30.8, 29.9, 29.5, 28.9, 21.9.

MS (ESI) *m/z*: 1458.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+Na]⁺.

4.3.5 REMOVAL OF TOSYL AND BENZYL GROUPS

Since the sulfonamide groups –resulting from the protection reaction of secondary amines with tosyl chlorides– are extremely stable systems, the development of a method for their rapid and quantitative hydrolysis has been challenging for years.³¹³ In this sense, several attempts have been done based, all of them, in reductive or strongly acidic conditions such as the use of Li and NH₃ carried out by Heathcock *et al.*³¹⁴ in the eighties, the photosensitized electron-transfer reaction of Ayadim *et al.*³¹⁵ who used *hν*, EtOH, H₂O, NaBH₄ and 1,2-dimethoxybenzene as reagents; or the Kudav's detosylation,³¹⁶ who employed a combination of HClO₄ and AcOH.

In this work the detosylation reaction has been carried out following the reaction developed by Snyder *et al.* in the fifties.^{317,318} The reaction was based on the cleavage of the sulfonamide systems under strong acidic conditions generated by a mixture of hydrobromic acid, acetic acid and phenol. The reaction was carried out under refluxing conditions from 24 to 48 h. Due to the formation of bromine in the course of the reaction, it was necessary to add an active enough bromine acceptor to protect the amines. This was the role of the phenol during the reaction, whose activity as radical scavenger might contribute to increase the rate of reaction as well as to prevent the breakdown of the benzylic bonds.³¹⁷ A further analysis of the reaction mechanism is shown in Figures 4.18 and 4.19. It should be noticed that these conditions are not valid for the detosylation of compound **9** due to the presence of the ester group in its structure, susceptible to being esterified by the phenolic molecules. Instead, in order to deprotect **9**, we have substituted hydrobromic acid by sulfuric acid and avoided the use of acetic acid and phenol, following the Lázár's procedure.³¹⁹ These conditions, stronger than the previous ones, were kept only for 5 h and at 110 °C.

On the other hand, the removal of the benzyl group requires reductive conditions (using hydrogenolysis with Pd/C, Et₃SiH and MeOH),³²⁰ an oxidative medium (generated by CrO₃/AcOH, ozone, NBS, etc; which produce the corresponding phenyl acetate that can be easily hydrolysed)³²¹ or acidic conditions³²². The procedure chosen to remove the tosyl groups should be strong enough to depro-

tect the hydroxyl group in *para* to the pyridine nitrogen in compounds **7**, **8**, **20** and **21**.³²² Therefore, in order to remove all the protecting groups just in one step, the reaction time for compounds with the benzyloxi group were extended up to 48 h, according to the slower kinetics of the benzyl deprotection.

The following procedure was used to synthesise compounds **L1-H**, **L1-Me**, **L2-H**, **L2-Me**, **L3-H**, **L5** and **L6**.

General procedure

Procedure for compounds with a H or an O-benzyl group in para to the pyridine nitrogen (compounds L1-H, L1-Me, L2-H, L2-Me, L5 and L6.)

The cyclic chain (0.79 mmol) and phenol (12.7 equiv. *per* protecting group) were suspended in HBr-AcOH 33 % (12.7 L *per* protecting group). The mixture was heated at 90 °C and for further 24 h (48 h for the compounds with the O-Benzyl groups) and then cooled down. The resulting suspension was filtered and washed several times with anhydrous EtOH to give the product as a white solid in a salt form.

Procedure for compounds with a methylic ester group in para to the pyridine nitrogen (compound L3-H)

The cyclic ligand (0.69 mmol) was dissolved in H₂SO₄ (30 equiv. *per* protecting group) and the resulting solution was stirred at 110 °C for 5 h. After cooling the mixture, it was added dropwise over 100 mL of dry ethanol. The product in a salt form was precipitated by the addition of 100 mL of diethyl ether to the ethanolic solution. Finally, the suspension was filtered and washed several times with anhydrous EtOH.

The detosylation could have partially hydrolysed the ester group so, in order to obtain the pure acid compound, the obtained salt was dissolved in 20 mL of Milli-Q water in presence of 25 µL of HCl and the resulting solution was refluxed for 24 h. With the purpose of avoiding possible interferences in the later studies, the sulphate anions were precipitated by the addition of BaCl₂ (1 equiv. *per* mo-

lecule of ligand) to the cold aqueous solution and the generated BaSO_4 salt was filtered off. The solvent was evaporated under reduced pressure to obtain the hydrolysed compound as a pale brown salt in the hydrochloride salt form.

Mechanisms

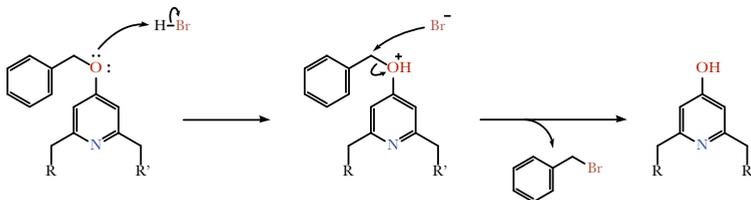


Figure 4.18 – Mechanism reaction scheme for the removal of benzyl groups.

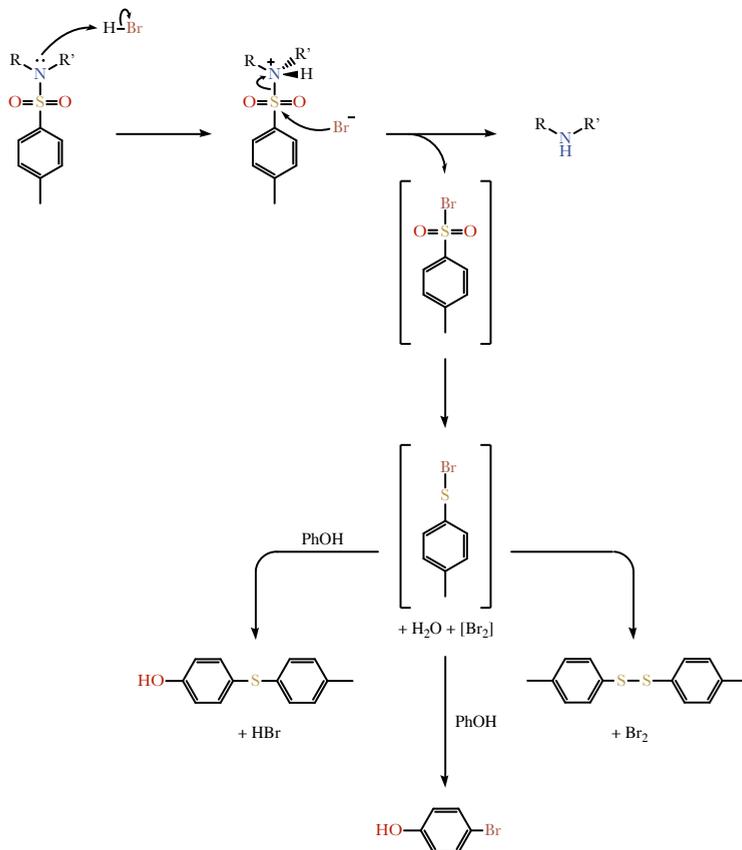
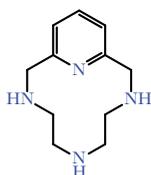


Figure 4.19 – Mechanism reaction scheme for the removal of tosyl groups.

Characterization of the deprotected macrocycles*3,6,9-Triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (L1-H) · 3HBr***Yield:** 58 %

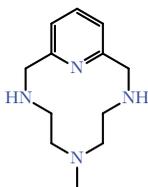
$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, D_2O), δ (ppm): 8.05 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.69 (s, 4H), 3.53 – 3.44 (m, 4H), 3.44 – 3.34 (m, 4H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, D_2O), δ (ppm): 149.8, 140.3, 123.9, 49.1, 44.3, 43.5.

MS (ESI) m/z : 207.0 g mol^{-1} , corresponding to $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Elemental analysis: *Calculated for* $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_4 \cdot (\text{HBr})_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{1.5}$: C, 27.75; H, 5.08; N, 11.77.

Found: C, 28.06; H, 4.69; N, 11.53.

6-(N-Methyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (L1-Me) · 3HBr**Yield:** 65 %

$^1\text{H NMR}$ (300.1 MHz, D_2O), δ (ppm): 7.99 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.63 (s, 4H), 3.38-3.26 (m, 4H), 2.66 (t, $J = 5.5$ Hz, 4H), 2.45 (s, 3H).

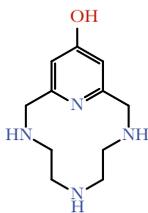
$^{13}\text{C NMR}$ (75.5 MHz, D_2O), δ (ppm): 149.8, 140.2, 122.7, 53.0, 50.5, 46.2, 42.2.

MS (ESI) m/z : 221.2 g mol^{-1} , corresponding to $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Elemental analysis: *Calculated for* $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4 \cdot (\text{HBr})_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_{0.2}$: C, 30.89; H, 5.05; N, 12.01.

Found: C, 31.00; H, 4.64; N, 11.70.

3,6,9-Triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphan-1⁴-ol (**L2-H**) · 3HBr



Yield: 78 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.01 (s, 2H), 4.56 (s, 4H), 3.48 – 3.41 (m, 4H), 3.38 – 3.30 (m, 4H).

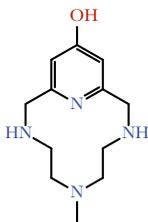
¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 166.1, 151.4, 111.2, 49.0, 44.5, 43.5.

MS (ESI) *m/z*: 223.0 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calculated for* C₁₁H₁₈N₄O·(HBr)₃·(H₂O)_{3.6}: C, 29.46; H, 5.38; N, 10.15.

Found: C, 29.41; H, 4.50; N, 10.24.

6-(*N*-Methyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphan-1⁴-ol (**L2-Me**) · 3HBr



Yield: 82 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 6.94 (s, 2H), 4.52 (s, 4H), 3.35 – 3.27 (m, 4H), 2.68 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H), 2.46 (s, 3H).

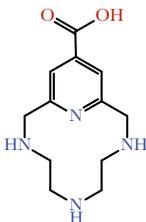
¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 166.5, 151.5, 110.3, 52.9, 50.4, 46.0, 42.0.

MS (ESI) *m/z*: 236.9 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calculated for* C₁₂H₂₀N₄O·(HBr)₃: C, 30.09; H, 4.84; N, 11.70.

Found: C, 30.13; H, 4.01; N, 11.63.

3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane-1⁴-carboxylic acid (**L3-H**) · H₂SO₄ · 2.4HCl



Yield: 71 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.94 (s, 2H), 4.76 (s, 4H), 3.73 – 3.66 (m, 4H), 3.65 – 3.58 (m, 4H).

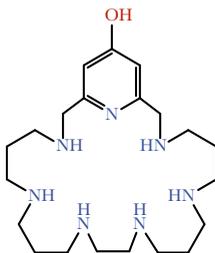
¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 167.1, 151.7, 141.0, 122.3, 49.7, 44.0, 42.3.

MS (ESI) *m/z*: 251.0 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: Calculated for C₁₂H₁₈N₄O₂ · (H₂SO₄) · (HCl)_{2.4}: C, 32.64; H, 5.14; N, 12.69.

Found: C, 32.75; H, 5.52; N, 12.61.

3,7,11,14,18,22-Hexaaza-1(2,6)-pyridinecyclotricosan-1⁴-ol (**L5**) · 6HBr



Yield: 68 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 6.92 (s, 2H), 4.39 (s, 4H), 3.60 (s, 4H), 3.41 – 3.26 (m, 16H), 2.39 – 2.17 (m, 8H).

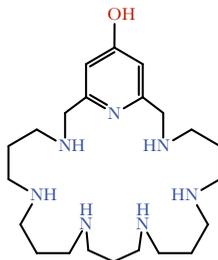
¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 165.8, 152.5, 110.8, 51.2, 45.3, 45.0, 44.4, 44.1, 44.0, 22.8, 22.7.

MS (ESI) *m/z*: 408.3 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: Calculated for C₂₁H₄₁N₇O · (HCl)₆ · (H₂O)_{2.5}: C, 37.57; H, 7.81; N, 14.60.

Found: C, 37.74; H, 7.56; N, 14.33.

3,7,11,15,19,23-Hexaaza-1(2,6)-pyridinecyclotetracosan-1⁴-ol (L6) · 6HBr



Yield: 88 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 6.93 (s, 2H), 4.41 (s, 4H), 3.43 – 3.26 (m, 20H), 2.44 – 2.16 (m, 10H).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 152.4, 110.8, 51.1, 45.0, 44.7, 44.2, 23.1, 22.7, 21.9.

MS (ESI) *m/z*: 422.2 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calculated for* C₂₂H₄₃N₇O · (HBr)₆ · (H₂O)_{5.5}: C, 26.26; H, 6.01; N, 9.74.

Found: C, 26.44; H, 5.19; N, 9.39.

4.3.6 ALKYLATION OF SECONDARY AMINES WITH *i*Pr GROUPS

The alkylation reaction carried out in this work is based on the nucleophilic attack of a secondary amine to the alkyl bromide 2-bromoisopropane, following a nucleophilic substitution mechanism (Figure 4.20). In this work the procedure reported by Meijer with slight variations was followed.³²³

It should be noted the use of sodium carbonate during the reaction, which is necessary to eliminate the hydrobromic acid generated in the substitution; and the employ of tetrabutylammonium bromide, used as phase-transfer catalyst between the solid and liquid phases.

The following procedure was used to synthesise compound **L1-Me*i*Pr₂**.

General procedure

L1-Me·3HCl (0.400 g, 0.86 mmol), 2-bromoisopropane (0.646 mL, 6.9 mmol), Na₂CO₃ (0.638 g, 6.02 mmol) and tetrabutylammonium bromide (0.002 g, 0.006 mmol) were suspended in dry CH₃CN (10 mL) and the mixture was left to reflux (~ 82 °C) under a N₂ atmosphere for 48 h with stirring. After cooling, the Na₂CO₃ was removed by vacuum filtration and the solvent was evaporated to dryness. The crude product was purified by silica column chromatography using a mixture of CH₂Cl₂/methanol to afford the product as a light brown oil. The product was taken into dry ethanol (2 mL) and acidified with HCl/ dioxane until pH 1. The suspension was then centrifuged to obtain the pure product as the corresponding hydrochloride salt.

Mechanism

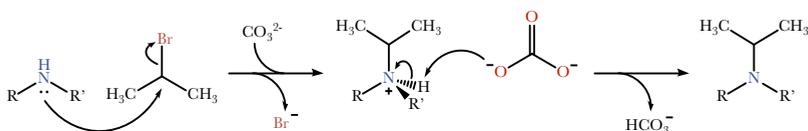
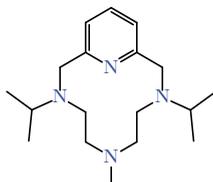


Figure 4.20 – Mechanism reaction scheme for the alkylation of the secondary amines with 2-bromoisopropane.

Characterization of the alkylated macrocycle

6-(*N*-Methyl)-3,9-bis(*N*-isopropyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (**L1-MeiPr₂**)
· 3.3HCl



Yield: 42%

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 8.01 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 4.95-4.38 (m, 4H), 3.96 (hept, *J* = 6.6 Hz, 2H), 3.72-4.31 (m, 4H), 2.43 (broad s, 3H), 3.05 – 2.00 (m, 4H), 1.47 (d, *J* = 6.6 Hz, 12H).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 150.5, 140.6, 122.9, 60.5, 54.9, 53.2, 51.6, 40.3, 16.7.

MS (ESI) *m/z*: 305.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calculated for* C₁₈H₃₂N₄·(HCl)_{3.3}·(H₂O)₄·C₄H₈O₂: C, 44.24; H, 8.81; N, 10.53.

Found: C, 44.47; H, 8.51; N, 10.65.

4.3.7 METHYLATION OF THE SECONDARY AMINES

The methylation procedure carried out in this work is based in a slight variation of the Eschweiler-Clarke reaction.^{324,325} The synthetic procedure, based on the use of formaldehyde and formic acid for the alkylation of the amines, presents two key characteristics that make it particularly suitable for the methylation of our compounds: its selectivity for the methylation of amino groups versus other nucleophile ones, which allows the synthesis of tertiary amines from secondary ones; and the non-continuity of the reaction towards the production of quaternary amine groups.²²⁸

The reaction is based on the attack of a non-tertiary amine to the carbonyl of a protonated formaldehyde molecule, generating an intermediate iminium ion. Then, the iminium cation reacts with the formic acid to give a methylated amine, releasing carbon dioxide gas in the meantime. A further analysis of the reaction mechanism can be found in Figure 4.21.

The following procedure was used to synthesise compounds **L1-Me₃**, **L2-Me₃** and **L3-Me₃**.

General procedure

The deprotected macrocycle (0.57 mmol), formic acid (46 equiv. *per* amine to be alkylated) and formaldehyde (46 equiv. *per* amine to be alkylated) were dissolved in 5 mL of Milli-Q water and stirred at 100 °C for 5 days. Then the solvent and both liquid reagents (the acid and the aldehyde) were evaporated under reduced pressure. Once reached dryness, the salt of the methylated pure compound was obtained as a pale brown solid.

It should be noticed that the starting compound for each methylation is not always that precursor which presents all aliphatic amines as secondary. This approach is valid for compounds belonging to the groups L1 and L3, but not for those of the group L2. In this case, the formation of an intramolecular hydrogen bond with a particularly high stability (see *Chapter 5 - Acid base behavior*) makes it necessary the use of the mono-methylated compound **L2-Me** as precursor for the methylation reaction.

Mechanism

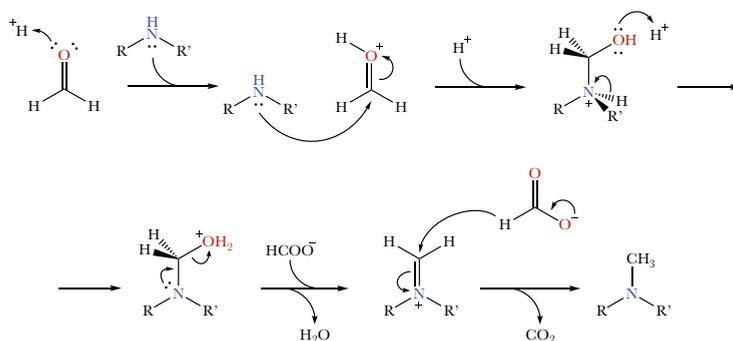
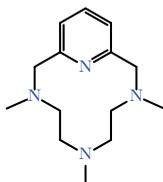


Figure 4.21 – Mechanism reaction scheme for the methylation reaction following the Eschweiler-Clarke procedure.

Characterization of methylated compounds

3,6,9-Tris(*N*-methyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane (**L1-Me₃**) · 3HCl



Yield: >98 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.91 (t, I = 7.8 Hz, 1H), 7.40 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 4.64 (s, 4H), 3.37 (t, J = 5.6 Hz, 4H), 3.10 (s, 6H), 2.52 – 2.41 (m, 4H), 2.32 (s, 3H).

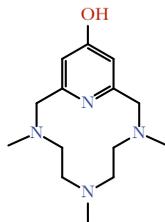
¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 149.19, 140.11, 122.40, 60.98, 56.14, 51.98, 44.29, 40.99.

MS (ESI) m/z: 249.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: Calculated for C₁₄H₂₄N₄·(HCl)₃: C, 47.00; H, 7.61; N, 15.66.

Found: C, 47.12; H, 7.48; N, 15.69.

3,6,9-Tris(*N*-methyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphan-1⁴-ol (**L2-Me₃**) · 3HCl



Yield: >98 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 8.23 (s, 1H), 6.96 (s, 2H), 4.62 (s, 4H), 3.53 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H), 3.17 (s, 6H), 2.92 – 2.71 (m, 4H), 2.56 (s, 3H).

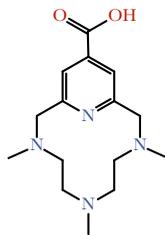
¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 165.6, 150.8, 110.5, 60.5, 55.1, 51.9, 44.4, 41.3.

MS (ESI) *m/z*: 265.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calcd for* C₁₁H₁₈N₄O · (HCl)₃ · (H₂O)₂ · (NaCl)_{3.9}: C, 26.4; H, 4.9; N, 8.8.

Found: C, 26.7; H, 4.9; N, 8.5.

3,6,9-Tris(*N*-methyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane-1⁴-carboxylic acid (**L3-Me₃**) · 3HCl



Yield: >98 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 7.98 (s, 2H), 4.84 (s, 4H), 3.50 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H), 3.23 (s, 6H), 2.69 – 2.40 (m, 4H), 2.42 (s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 160.0, 150.5, 121.8, 60.9, 56.4, 52.0, 44.5, 41.0.

MS (ESI) *m/z*: 293.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calcd for* C₁₅H₂₄N₄O₂ · (HCl)₃: C, 44.84; H, 6.77; N, 13.95.

Found: C, 44.70; H, 6.90; N, 14.00.

4.3.8 ESTERIFICATION OF ACID GROUPS

The esterification of the acid group in **L3-Me₃** has been carried out by a Fisher (or a Fischer–Speier) reaction procedure. This reaction, reported for the first time in 1895 by Emil Fisher and Arthur Speier, is based on the nucleophilic attack of a primary or secondary alcohol to a carboxylic acid in presence of an acid catalyst under refluxing conditions.^{326,327}

During the reaction, the acid catalyst contributes to activate the carbon atom of the carboxylic acid group, favouring the nucleophilic attack of the alcohol. Although several types of acids could be used as catalysts, such as sulfuric acid or scandium(III) trisulfate (a Lewis acid), we have chosen hydrochloric acid in order to have the same counterion (chloride) in all the salts instead of a mixture of them.

The following procedure was used to synthesise compound **L4-Me₃**.

General procedure

The salt of the compound to be esterified (0.57 mmol) and 50 μL of HCl were dissolved in MeOH. The resulting mixture was refluxed for 72 h and then, after cooling down the solution, the solvent was evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was suspended in 50 mL of acetone and 0.5 mL of HCl/dioxane and the mixture was stirred for 1 h. Finally, the suspension was filtered off obtaining the salt of the esterified compound as a pale brown solid.

Mechanism

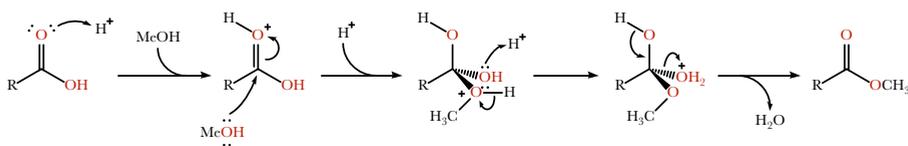
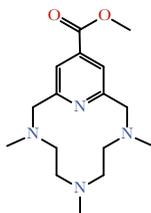


Figure 4.22 – Mechanism reaction scheme for the esterification of the acid groups.

Characterization of esterified compound

Methyl 3,6,9-tris(N-methyl)-3,6,9-triaza-1(2,6)-pyridinecyclodecaphane-1⁴-carboxylate (L4-Me₃) · 3HCl



Yield: >98 %

¹H NMR (300.1 MHz, D₂O), δ (ppm): 8.01 (s, 2H), 4.82 (s, 4H), 3.99 (s, 3H), 3.49 (t, *J* = 5.5 Hz, 4H), 3.21 (s, 6H), 2.73 – 2.47 (m, 4H), 2.42 (s, 3H).

¹³C NMR (75.5 MHz, D₂O), δ (ppm): 166.0, 150.7, 140.9, 121.8, 60.8, 56.2, 53.5, 52.0, 44.4, 41.0.

MS (ESI) *m/z*: 307.1 g mol⁻¹, corresponding to [M+H]⁺.

Elemental analysis: *Calculated for* C₁₆H₂₆N₄O₂·(HCl)₃: C, 46.22; H, 7.03; N, 13.47.

Found: C, 46.19; H, 7.21; N, 13.50.

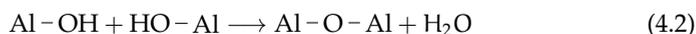
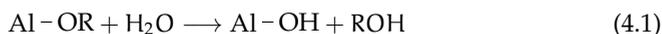
4.4 SYNTHESIS OF THE AMINO-NANOZYMES

The synthesis of the nanostructured systems carried out in this work may be divided in two main parts: (1) synthesis of the boehmite nanoparticles and (a) functionalisation of both the boehmite and the silica nanoparticles with the azamacrocyclic ligands. This third part of the chapter is devoted to the synthetic procedure and characterisation of the nanosystems.

4.4.1 SYNTHESIS OF THE NANOPARTICLES

The procedure undertaken in the present work for the synthesis of the boehmite nanoparticles is based in the classic sol-gel process, widely used in material science.³²⁸ This chemical procedure, employed in the production of solid materials such as dens films or tough ceramics,³²⁹ typically relies on the hydrolysis of metal alkoxides, which form a colloidal solution, and its subsequent gelling (see Figure 4.23).

In this reaction, the first step of the synthetic process starts with the hydrolysis of the metal compound by a hydrolytic agent present in the reaction medium, commonly water (see eq. 4.1). Coupled to this reaction, it is also initiated the polycondensation of the metal monomers into small colloidal particles, which remain dispersed in solution (eq. 4.2 and 4.3). This system, consisting in a stable suspension of colloidal solid particles in a continuous liquid solution, is also known as *sol*. The entire process can be catalysed by the addition of an acid or a base to the aqueous medium, such as nitric acid (used in this work).



At this point, the colloidal solution evolves towards a gel-like system through the connexion between the small particles, generating a diphasic structure based on a solid phase and the liquid solvent. The morphology of the solid phase can range from discrete particles to polymer networks and, depending on its later

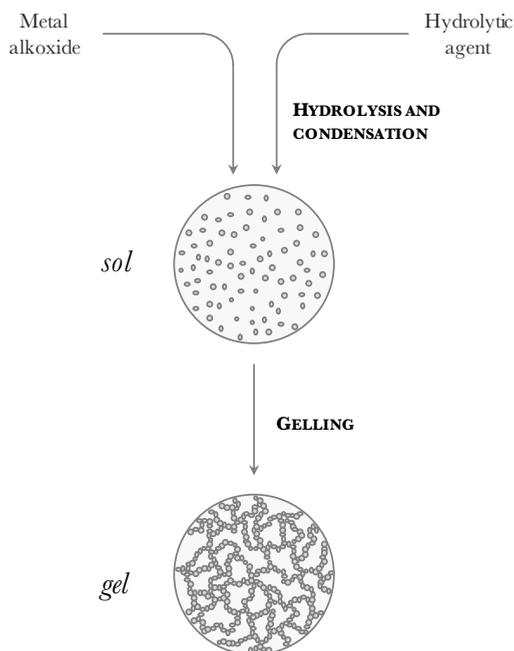


Figure 4.23 – Schematic representation of a typical sol-gel process.

treatment, may lead to the obtainment of different solid materials (aerogels, ceramics, etc.). In our synthesis, the removal of the solvent and the application of high temperatures to the gel provides a dry composite consistent in an inorganic microstructure.

Finally, it should be noted that the silica nanoparticles were provided by deference of Drs. Juan Pastor and Rafael Abargues from INTENANOMAT of the Scientific Park of the University of Valencia.

Synthetic procedure

In order to synthesise the boehmite nanoparticles (Figure 4.24), 146 mL of Milli-Q water were heated to 80 °C for an hour (until the stabilisation of the temperature) and then aluminum *tert*-butoxide (20.00 g, 81.2 mmol) was added, increasing the temperature of the suspension to 85 °C. The reaction mixture was completed with the addition of 1.12 ml of HNO₃ after one hour. The resulting mixture

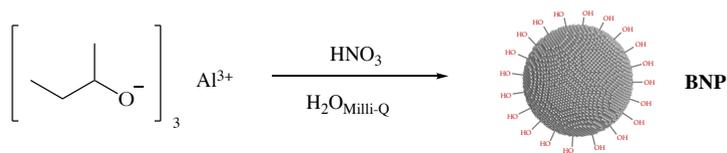


Figure 4.24 – Synthetic procedure for the synthesis of boehmite nanoparticles (BNPs).

was stirred for 5 days at 95 °C and then the solvent was removed by evaporation under reduced pressure. The solid was dried at 120 °C for 24 h, powdered and washed with a EtOH:H₂O 90:10 mixture.

Characterisation of the nanoparticles

The characterisation of the boehmite nanoparticles (BNPs) has been carried out by powder X-ray diffraction and dynamic light scattering.

The X-ray diffraction pattern presents peaks at around 14.60, 28.10, 38.10, 48.90, 55.20, 64.10, 65.10 and 72.00 values of 2 θ° , characteristics of the crystalline structure of γ -boehmite. As shown in Figure 4.25, the experimental pattern matches with the theoretical spectrum. It should be noted that the experimental peaks present a broad shape due to the small diameter of the nanoparticles.

On the other hand, the DLS studies show an average nanoparticle diameter of 58.16 nm, as we can observe in Figure 4.26. It can also be found a small portion of particles with a size smaller than 10 nm as well as an small group of agglomerates

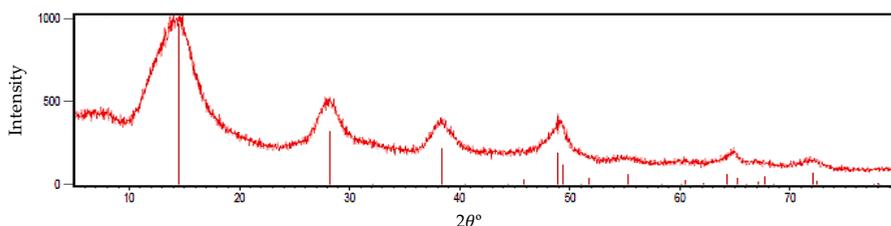


Figure 4.25 – Experimental (continuous line) and theoretical (discrete values) X-ray powder diffraction pattern of the boehmite nanoparticles.

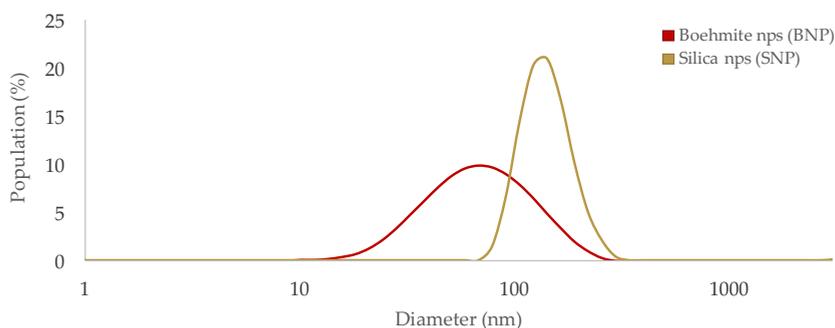


Figure 4.26 – Experimental size distribution of the oxidic nanoparticles.

which present particle diameters bigger than 100 nm. Finally, the DLS measurements of the silica nanoparticles show an average nanoparticle diameter of 177.4 nm, as also shown in Figure 4.26.

4.4.2 FUNCTIONALISATION OF THE NANOPARTICLES

The functionalisation of the nanoparticles, in other words the process whereby the ligands are grafted on the oxidic nanoparticles through covalent bonds, was carried out using different synthetic and characterisation techniques, depending on the chemical features of each ligand. This section of the chapter is focused on the grafting procedure of the ligands and the characterisation of the obtained nanosystems.

Synthetic procedure

Grafting of the acid derivatives systems (L3-H and L3-Me₃)

The grafting of the compounds that present an acid moiety in *para* to the pyridine nitrogen was carried out through a nucleophilic attack to its carbonyl group and the formation of the correspondent amide group. In order to have an effective nucleophilic attack it was necessary previous functionalisation of the boehmite surface since the nanoparticles themselves cannot carry it out. The compound chosen as bonding agent between the nanoparticles and the ligands was the (3-aminopropyl)triethoxysilane. This molecule is composed on one side by a silane

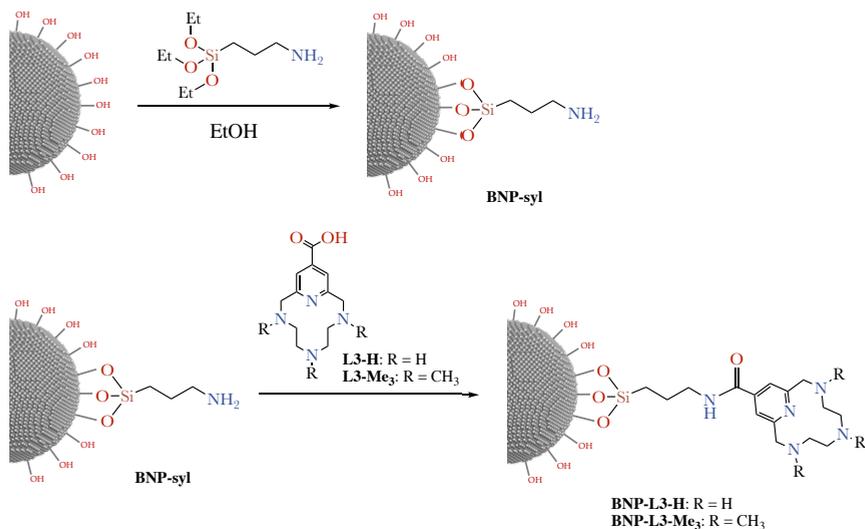


Figure 4.27 – Synthetic procedure for the grafting of the acid derivative ligands on the boehmite nanoparticles (BNPs).

group, which can react with the hydroxylated surface of the boehmite, bonding the molecule by three points; and on the other side by a primary amine, capable to perform the nucleophilic attack to the carbonyl of the ligand to get the amide. Therefore, as shown in Figure 4.27, the functionalisation of the ligands was carried out in two successive steps: (1) the grafting of the silane compound to the boehmite surface and (2) the bond of the azamacrocyclic ligand to the functionalised intermediate.

In order to carry out the functionalisation, 0.7 mL (2.99 mmol) of (3-aminopropyl)triethoxysilane and 488 mg of boehmite nanoparticles were suspended in 14 mL of dry ethanol. The suspension was refluxed under an Ar/N₂ atmosphere for 48 h and then, it was centrifuged and washed several times with a mixture of EtOH (15 mL), CH₂Cl₂ (5 mL) and H₂O (2.5 mL).

Once the nanoparticles were functionalised with the silane-propylamine, 170 mg of them were resuspended in 8 mL of EtOH with 0.65 mol of the azamacrocyclic salt and 50 μL of conc. HCl. The reaction was refluxed for 20 h under Ar/N₂ atmosphere and the suspension was then centrifuged and washed several times

with a mixture of EtOH (15 mL), CH₂Cl₂ (5 mL) and H₂O (2.5 mL).

Grafting of the hydroxyl derivatives systems (L5 and L6)

Compounds with a hydroxyl group in *para* to the pyridine nitrogen were functionalised both onto the boehmite and the silica nanoparticles through an alcoholic condensation. This reaction (see Figure 4.28) is based on the alcoholic condensation between the deprotonated oxygen of a pyridol group to hydroxyl moieties of the nanoparticle surface, forming a np(M)-O-L bond, where M could represent Al or Si. The mechanism follows a variation of the Williamson ether synthesis,^{330,331} where instead of a halide, is a protonated hydroxyl group (a water molecule) who works as leaving group.

It should be noted that functionalisation of compound **L2-H** and its derivatives (**L2-Me** and **L2-Me₃**) was also attempted, but there was no success. The inability to achieve such reaction is probably related with the formation of internal hydrogen bonds which may stabilise the ketonic form of the deprotonated pyridol, preventing any functionalisation. For more details see *Chapter 5 - Acid base behaviour*.

To functionalise the nanoparticles, 0.15 mmol of the salt of the ligand, 9 equivalents of Na₂CO₃ and 498.7 mg of oxidic nanoparticles were suspended in 20 mL of ethanol. The mixture was refluxed for 48 h under an Ar/N₂ atmosphere and the resulting suspension was centrifuged and washed several times with a mixture of EtOH (15 mL), CH₂Cl₂ (5 mL) and H₂O (2.5 mL).

Characterisation of the functionalised nanoparticles

The macrocyclic content of the material was quantified by means of three complementary techniques: elemental microanalysis, ICP-MS analysis and ¹H NMR spectroscopy. The details of the determination methodologies and procedures can be found in the *Chapter 3 - Materials and Methods*. The results for the quantification of the organic matter grafted on the nanosystems (as well as the amount of Cu(II) they are able to coordinate) are collected in Table 4.1, while the NMR spectrum of the functionalised NPs as well as the calibration fittings can be found in Figures A.25 - A.34, in Annex A.

Table 4.1 – Results of the quantification of the macrocyclic and Cu(II) (ICP-MS) content on the oxidic nanoparticles. All data in $\text{mol g}_{\text{NP}}^{-1}$.

Systems	NMR	ICP-MS	Elem. An.	Final
BNP-L3-H	$1.03(5) \cdot 10^{-4}$ *	$0.79(6) \cdot 10^{-4}$	-	$0.91(17) \cdot 10^{-4}$
BNP-L3-Me₃	$1.13(11) \cdot 10^{-4}$	-	-	$1.13(11) \cdot 10^{-4}$
BNP-L5	$0.35(4) \cdot 10^{-4}$	$0.34(3) \cdot 10^{-4}$	$0.564(6) \cdot 10^{-4}$	$0.35(4) \cdot 10^{-4}$
SNP-L5	$0.25(2) \cdot 10^{-4}$	$0.22(2) \cdot 10^{-4}$	$0.31(2) \cdot 10^{-4}$	$0.23(2) \cdot 10^{-4}$
BNP-L6	$2.18(2) \cdot 10^{-4}$	-	$2.24(15) \cdot 10^{-4}$	$2.21(4) \cdot 10^{-4}$
SNP-L6	$0.36(3) \cdot 10^{-4}$	$0.30(2) \cdot 10^{-4}$	$0.5(3) \cdot 10^{-4}$	$0.33(3) \cdot 10^{-4}$

* Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

Finally, as the last characterisation step, the ζ -potential of both functionalised and non-functionalised, oxidic nanoparticles was determined. The obtained values can be found in Table 4.2. As we can see in Figure 4.29, representation of the nanoparticles by their charge distribution gives rise to two main groups: the silica based nanoparticles, which average surface potential is -18.1 mV, and the boehmite based nanoparticles, which surface potential is 32.1 mV. Functionalisation of the nanoparticles with L5 or L6 causes slight modification on their surface potential maintaining, in general terms, the sign of the charge of the nanoparticles.

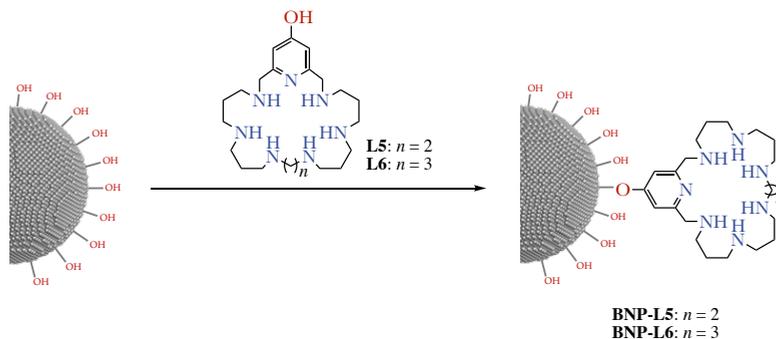
**Figure 4.28** – Synthetic procedure for the grafting of the hydroxyl derivative ligands on the boehmite nanoparticles.

Table 4.2 – ζ -Potential values determined for the different nanoparticle systems. All measurements were carried out in 10^{-4} M NaClO_4 at pH 7.4.

Systems	ζ -potential (mV)
BNP	32.1(8)*
SNP	-18.1(9)
BNP-L3-H	17(1)
BNP-L3-Me₃	12.7(4)
BNP-L5	23.9(2)
SNP-L5	-14.9(2)
BNP-L6	35(2)
SNP-L6	-5.6(2)

* Values in parentheses are standard deviations in the last significant figure.

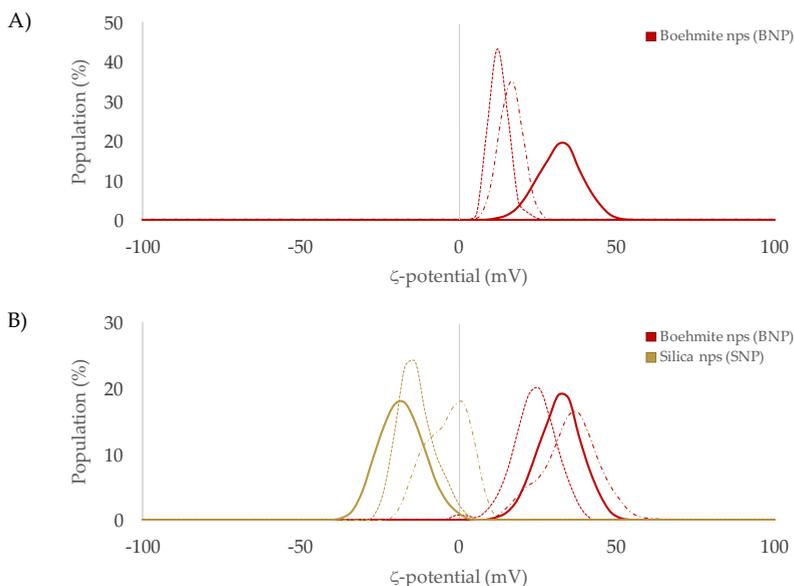


Figure 4.29 – Experimental ζ -potential of the oxidic nanoparticles. The continuous lines correspond to the non-functionalised nanoparticles. A) The dotted lines correspond to the NPs functionalised with **L3-Me₃** and the dotted-dashed ones to the NPs functionalised with **L3-H**. B) The dotted lines correspond to the NPs functionalised with **L5** and the dotted-dashed ones to the NPs functionalised with **L6**.

Capítulo 5

Comportamiento ácido base

5.1 INTRODUCCIÓN

Una de las características que, desde un punto de vista químico, puede tener una mayor influencia sobre el comportamiento en disolución de los ligandos sintetizados es la presencia en su estructura de un elevado número de grupos susceptibles de ser protonados. En concreto, estos sistemas presentan entre 3 y 6 grupos amino y un grupo piridina con un carácter fundamentalmente básico capaces de variar su composición protónica en función del pH de la disolución. La importancia de que los nitrógenos del macrociclo estén protonados –o no lo estén– radica en que puede condicionar su capacidad de interaccionar con otros sustratos del medio, como aniones, biomoléculas o, como es nuestro caso, iones metálicos. La carga total del macrociclo, las repulsiones electrostáticas que se generen en la cavidad aza-macrocíclica del ligando, la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares o, en una mayor medida, la disponibilidad de los pares solitarios de los nitrógenos amínicos son factores fundamentales que determinan la capacidad de complejación de los ligandos hacia átomos metálicos y cuya importancia se ve modulada por el pH del medio de trabajo.

Así mismo, los ligandos estudiados en esta tesis presentan elementos susceptibles de ser protonados más allá de los propios de una estructura aza-macrocíclica. Los grupos hidroxilo o ácido carboxílico con que se han funcionalizado las piridinas de los fanos, por ejemplo, pueden contribuir a la complejación de metales por parte de los ligandos en función de su estado de protonación.

Por todo ello, previamente al estudio del modo de coordinación de los ligandos con los metales de interés y al análisis de su actividad antioxidante, es preciso realizar un estudio de su comportamiento ácido-base. Con el fin de obtener las constantes y modos de protonación de cada uno de los sistemas macrocíclicos se ha hecho uso de diversas técnicas, entre las que destacan los estudios potenciométricos y las valoraciones seguidas por espectroscopía UV-Vis y RMN.

En el presente capítulo de la tesis se procederá a la presentación de los resultados relativos a los estudios ácido-base de los sistemas sintetizados, así como a la discusión de los mismos. En función de su similitud estructural su descripción se dividirá en dos grandes bloques: ligandos mono- y binucleantes.

5.2 LIGANDOS MONONUCLEANTES

Dentro del grupo de ligandos clasificados como *ligandos mononucleantes* podemos encontrar el conjunto de compuestos sintetizados en la presente tesis que tienen como característica común la presencia de un anillo macrocíclico compuesto por 12 átomos, tres de los cuales corresponden a grupos amino y un cuarto a un nitrógeno piridínico. Sobre esta composición básica se constituye el grupo formado por los ligandos **L1-H** a **L3-H** y sus derivados metílicos e isopropílicos.

A través de las valoraciones potenciométricas realizadas a los compuestos sintetizados se han podido calcular sus constantes de protonación, que a su vez se utilizaron para representar los diagramas de distribución de especies de cada ligando en función del pH. Estos estudios fueron completados con una serie de valoraciones ácido-base seguidas por UV-Vis, RMN y/o ITC, así como con la obtención de estructuras de rayos X y la modelización computacional de los sistemas. La combinación de estas técnicas permitió determinar las secuencias de protonación de cada ligando y conocer los posibles cambios estructurales que pueden sufrir en función del pH.

A la hora de exponer los resultados obtenidos en el capítulo, se va a seguir una subclasificación en función del grupo piridínico al que pertenezca cada ligando: grupo L1 (o grupo *piridina*), grupo L2 (o grupo *piridol*) y grupo L3 y L4 (o grupo *piridina carboxílica*). De esta forma se puede llevar a cabo un análisis sistemático del efecto de la alquilación sobre las diferentes familias de fanos, seguido de un análisis sobre el efecto de los diferentes sustituyentes del grupo piridina; siempre desde el punto de vista de los efectos sobre su comportamiento ácido-base.

Grupo L1 o grupo *piridina*

En primer lugar, el grupo L1 (o grupo *piridina*) –constituido por los ligandos **L1-H**, **L1-Me₃** y **L1-Me₂Pr₂**– se caracteriza por la presencia en sus ligandos de 4 posiciones susceptibles de ser protonadas, correspondientes a tres aminas y al nitrógeno de la piridina. Los valores logarítmicos de las constantes de protonación de este grupo se encuentran en la Tabla 5.1, mientras que los diagramas de distribución se pueden hallar en la Figura 5.1.

Tabla 5.1 – Constantes logarítmicas de protonación del ligando **L1-H** y sus derivados alquílicos (**L1-Me₃** y **L1-Me_iPr₂**) medidas a 298.1 ± 0.1 K en un medio NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L1-H^b	L1-Me₃	L1-Me_iPr₂
$L + H \rightleftharpoons HL$	10.54(1) ^c	10.88(1)	11.25(1)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	7.96(1)	7.37(1)	7.345(7)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	1.90(1)	-	-

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Datos tomados de la bibliografía.¹⁷⁶ ^c Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

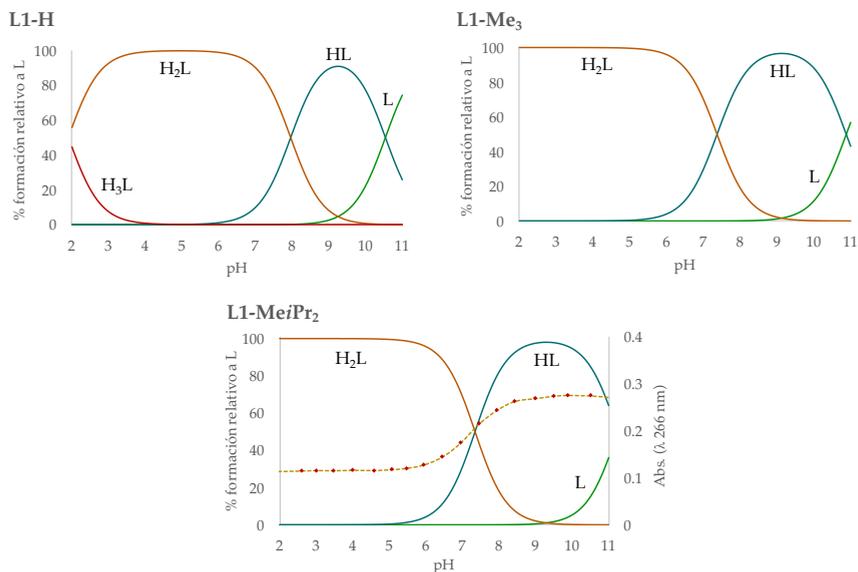


Figura 5.1 – Diagramas de distribución de los ligandos **L1-H**, **L1-Me₃** y **L1-Me_iPr₂**, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama del ligando **L1-Me_iPr₂** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 266 nm (línea punteada). $[L]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

Como muestra el análisis de los datos, mediante las técnicas potenciométricas descritas se han podido determinar entre 2 y 3 constantes de protonación por

ligando dentro de los límites del intervalo de pH de trabajo para los electrodos empleados (2.0 - 11.0).

Si se comparan las constantes sucesivas para un mismo ligando se puede observar una tendencia a la disminución progresiva de su valor. Este hecho es coherente con la bibliografía existente y fácilmente explicable si se tienen en cuenta cuatro factores clave: (a) la acumulación de carga de mismo signo asociada a la protonación sucesiva de los grupos amino entorno al anillo macrocíclico de los ligandos, (b) la presencia de interacciones intramoleculares, tales como enlaces de hidrógeno, (c) la influencia del efecto inductivo y (d) la posible contribución de factores adicionales como el efecto estadístico –residual en este tipo de ligandos frente al electrostático–.^{332–336}

Un análisis más detallado de las constantes entre los distintos compuestos muestra tres hechos adicionales a destacar: (1) el elevado valor de la primera constante de cada compuesto, (2) la tendencia al alza de esta con la alquilación y el incremento de volumen de los sustituyentes amínicos y (3) la tendencia de signo contrario de las constantes correspondientes a la segunda protonación.

El elevado valor de la primera constante de protonación de los sistemas sugiere una gran estabilidad de la especie monoprotonada, la cual se forma en todos los ligandos a pH muy básico y predomina en disolución hasta pH neutro (ver los diagramas de distribución de la Figura 5.1). El hecho que las aminas de estos compuestos se protonen a un pH más básico que el de la mayoría de aminas –ver a modo de ejemplo el trabajo de D. Meyerstein¹⁸⁵ o de nuestro propio grupo³³⁷– y en un intervalo de pH más amplio sugiere la aparición de interacciones intramoleculares adicionales que contribuyen a la estabilización de esta estructura monoprotonada. En este mismo sentido se puede interpretar la segunda característica observada: el hecho que la primera constante de protonación sea más elevada para una amina terciaria –en el ligando **L1-MeiPr₂**, por ejemplo– que para una secundaria –ligando **L1-H**–, o lo que es lo mismo, que la basicidad de las aminas en disolución acuosa aumente con su alquilación. Esta tendencia se opone al comportamiento ampliamente descrito en la bibliografía^{186,337,338} y sugiere que las nuevas interacciones deben estar favorecidas por la alquilación de las aminas.

Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de los factores que contribuyen a esta estabilización extra se han realizado una serie de estudios adicionales. En primer lugar se ha procedido a la medición del espectro de absorción de una disolución de ligando a diferentes pH. En el caso que el protón introducido en la estructura del macrociclo interacciona con la piridina, la nube electrónica del anillo aromático del ligando se debería ver perturbada y en consecuencia debería producirse un cambio en la banda correspondiente a las transiciones $\pi - \pi^*$ que aparecen sobre los 260 nm. Para el ligando **L1-Me*i*Pr₂**, al superponer la variación del máximo de absorbancia de la piridina sobre su diagrama de distribución (Figura 5.1) puede verse un aumento de la absorción asociado a la aparición de la especie monoprotonada. Esta variación en la absorbancia parece indicar la implicación de la piridina en la estabilización del protón.

Los estudios UV-Vis se han complementado con la medición del espectro de RMN de disoluciones a diferente pH de los ligandos **L1-Me₃** y **L1-Me*i*Pr₂** (Figuras 5.2 y 5.3). Se han escogido estos dos compuestos debido a que son aquellos que más fácilmente permiten el estudio de la secuencia de protonación gracias a los grupos metilo e isopropilo de las aminas.

El análisis de los espectros de RMN de los ligandos se puede realizar a través de las señales que sufren una variación del desplazamiento químico más significativa al variar el pH: la correspondiente a los protones aromáticos (β), a los del metilo de la amina central (γ) y a los de los grupos metilo o isopropilo de las aminas laterales (κ y η , respectivamente). El estudio de los espectros de RMN muestra, en primer lugar, un comportamiento opuesto de las señales de los protones γ y κ/η . Al pasar de pD 12.5, donde la especie mayoritaria según los diagramas de distribución debería ser la desprotonada, a pD 9, donde debería predominar la monoprotonada, se puede observar un desplazamiento a campo bajo de los protones del metilo central (γ). Este hecho se puede relacionar con la retirada de densidad de carga asociada a la protonación de la correspondiente amina del macrociclo. Por su parte, los protones de los grupos alquilo de las aminas laterales (κ y η) no se ven apenas afectados por esta primera reacción. Es en la segunda protonación cuando estos hidrógenos presentan una mayor variación de desplazamiento químico. Al

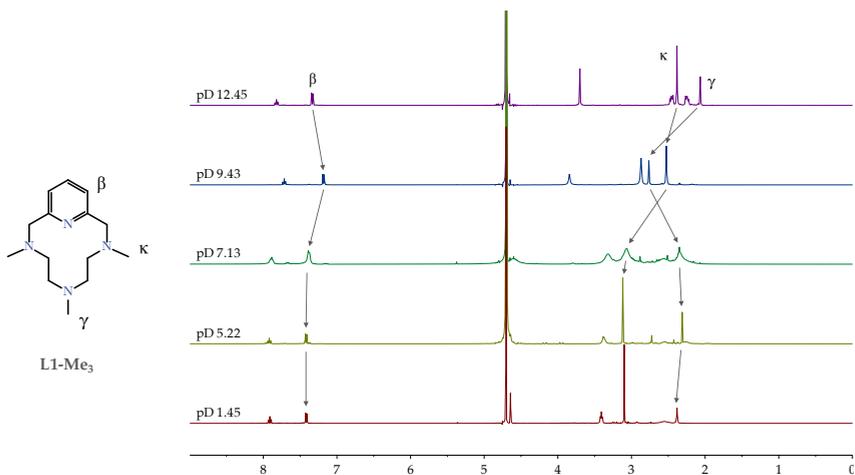


Figura 5.2 – Espectros ^1H RMN del ligando **L1-Me₃** realizados en D_2O de pD 1.45 a 12.45.

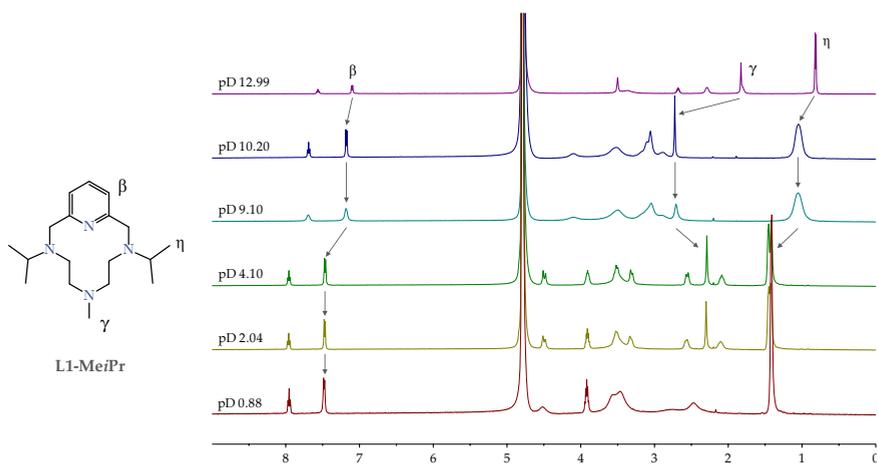


Figura 5.3 – Espectros ^1H RMN del ligando **L1-MeIPr₂** realizados en D_2O de pD 0.88 a 12.99.

pasar de pD 9 a valores inferiores a 7 se observa el desplazamiento a campo alto de los protones γ (desprotonación parcial de la amina central) y la variación a campo bajo de los protones κ y η (protonación parcial de las aminas laterales).

Por su parte, los protones aromáticos (β) muestran variaciones de despla-

miento químico menores, caracterizándose principalmente por un movimiento de la señal a campo bajo asociado a la segunda reacción de protonación. Esta variación implica que, con la adición de un segundo protón a la estructura del macrociclo, el centro aromático gana densidad electrónica; por lo que debe de perder la interacción que mantenía con el primer protón adicionado.

Cabe decir que la hipótesis de la formación del enlaces de hidrógeno intramolecular viene respaldada por la obtención de una estructura cristalina del ligando **L1-MeiPr₂** y su estudio mediante difracción de rayos X en monocristal (Figura 5.4). La resolución de esta estructura muestra una unidad asimétrica de **[HL1-MeiPr₂]₂(ClO₄)₂·H₂O** (grupo espacial *P21/n*) consistente en dos cationes **HL1-MeiPr₂⁺** neutralizados por contraiones perclorato. Una molécula de agua completa la celda. En la estructura obtenida, los tres grupos alquilo están localizados en *cis* con respecto a los demás, mientras que el protón de la amina central está enlazado al nitrógeno de la piridina. Por último, la primera protonación se localiza sobre la amina central formando un enlace de hidrógeno con el nitrógeno de la piridina ($d_{N-H...N} = 1.85 \text{ \AA}$)

La conclusión que se puede extraer del análisis conjunto de las valoraciones y la estructura de rayos X sobre la secuencia de protonación de los ligandos se ha representado gráficamente en la Figura 5.5. El primer protón introducido en la estructura enlaza –principalmente– la amina central del macrociclo, estabilizándose por la formación de un enlace de hidrógeno entre él mismo y el nitrógeno de la

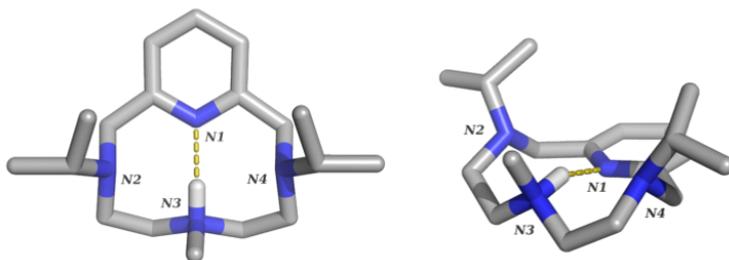


Figura 5.4 – Estructura del catión **HL1-MeiPr₂⁺** determinada mediante difracción de rayos X en monocristal.

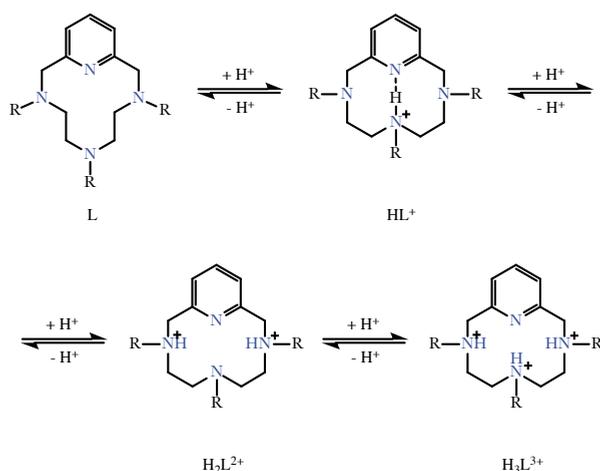


Figura 5.5 – Secuencia de protonación del grupo de ligandos L1.

piridina. La segunda protonación introduce una carga positiva adicional sobre el macrociclo, generando un conjunto de repulsiones electrostáticas con la suficiente intensidad como para romper el enlace de hidrógeno previamente formado. Esto provoca la relocalización de los protones, situándose ahora sobre las aminas laterales. Es posible que esta especie esté estabilizada por la formación de interacciones intramoleculares entre los hidrógenos de las aminas protonadas y los nitrógenos de las aminas que no lo están. Por último, la tercera protonación introduce el hidrógeno correspondiente sobre la única amina que queda libre, la central.

Atendiendo a la secuencia de protonación encontrada se pueden explicar las peculiaridades de las constantes potenciométricas descritas al inicio del apartado. Así, la estabilización adicional aportada por las interacciones intramoleculares de la estructura puede explicar el elevado valor para esta primera constante de protonación, así como el predominio de esta especie en un amplio intervalo de pH. En segundo lugar, cuanto menor sea el efecto de la solvatación sobre la amina central (retirada de carga por parte de las moléculas de agua del disolvente), más intenso será este enlace interno. Este hecho explica porqué al alquilar estas aminas y al aumentar la hidrofobicidad de los grupos alquilo, su primera constante de protonación aumenta y la segunda disminuye.

En vista de estas conclusiones, la solvatación de los sistemas puede tener una influencia determinante en el comportamiento de los compuestos protonados. Así pues, con el fin de completar los estudios anteriormente analizados, estudiar la influencia del disolvente y acabar de definir el comportamiento en disolución de los sistemas se llevó a cabo la medida calorimétrica de las reacciones de protonación.

Respecto a los estudios termodinámicos, los resultados del cálculo de las entalpías de reacción, así como de las variaciones entrópicas encontradas para las protonaciones de los sistemas descritos se pueden encontrar en las Tablas 5.2 y 5.3. Cabe decir que la realización de estos estudios tuvo lugar durante la segun-

Tabla 5.2 – Variaciones estándar de entalpía (ΔH° , kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando **L1-H** y su derivado metílico **L1-Me₃**, medidos a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L1-H	L1-Me₃
$L + H \rightleftharpoons HL$	-42.6(2) ^b	-31.3(5)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	-44.6(3)	-39.2(6)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	-3.1(4)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

Tabla 5.3 – Variaciones estándar de entropía ($T\Delta S^\circ$, kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando **L1-H** y su derivado metílico **L1-Me₃**, medidos a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L1-H	L1-Me₃
$L + H \rightleftharpoons HL$	17.6(2) ^b	30.8(5)
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	0.8(3)	-2.9(6)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	7.7(4)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

da de las estancias disfrutadas en el doctorado, a cargo del Ministerio de Ciencia del Gobierno de España, y llevada a cabo en el laboratorio del Prof. Dr. Antonio Bianchi en la Universidad de Florencia, Italia.

Un primer análisis de los resultados correspondientes a **L1-H** revela un valor exotérmico de los calores de reacción asociados a sus tres protonaciones; siendo el segundo de ellos ligeramente mayor que el primero y el último prácticamente atérmico. Este comportamiento termodinámico se reproduce en su derivado metílico **L1-Me₃**. Cabe decir que el calor de reacción encontrado para la protonación de estas aminas –alrededor de - 40 kJ/mol– es coherente al que se puede encontrar en la bibliografía para sistemas similares.²³¹ Por otra parte, al comparar los resultados de los distintos ligandos, se observa que con el aumento del carácter hidrófobo del sistema (al aumentar el número de grupos alquílicos), el valor de las entalpías de reacción disminuye, mientras que el valor de las variaciones entrópicas aumenta. Esta es una tendencia general observada previamente en sistemas poliamínicos.³³⁹

A la hora de razonar estos resultados podemos empezar explicando la primera reacción de protonación para el sistema estructuralmente más sencillo, el ligando **L1-H**, tomando como punto de referencia las conclusiones obtenidas de las valoraciones UV-Vis y RMN. De esta forma podemos asumir que la introducción de un primer protón en el ligando tiene lugar sobre su amina central, quedando estabilizado el sistema por la formación de un enlace de hidrógeno entre el protón introducido y el nitrógeno de la piridina. La constitución de este nuevo enlace N-H y el consiguiente enlace de hidrógeno explican el valor tan negativo de la entalpía para esta reacción. A este hecho puede contribuir también el efecto que tiene el protón introducido en la amina sobre la distribución de densidad de carga de la misma: la retirada de carga asociada a esta protonación tiene un efecto de polarización sobre el enlace N-H previo, lo que se traduce en un fortalecimiento de las interacciones con las moléculas de agua del entorno, *i. e.*, en una mayor solvatación del sistema.

Desde el punto de vista de la variación entrópica, la nueva conformación estructural que adopta el ligando conlleva dos consecuencias adicionales: (1) la generación de una estructura más rígida –o con menos grados de libertad– y (2) el

cambio en la orientación de los pares solitarios de las aminas, que ahora pasarán a estar dirigidos hacia el interior del macrociclo; todo ello sin implicar necesariamente la polarización del medio acuoso, como sería esperable por la introducción de una carga. Estas hipótesis se ven respaldadas por los cálculos mostrados más adelante. El resultado de estos hechos es la desolvatación parcial del ligando, lo que conlleva un aumento de la entropía asociada a la reacción. A la vista de los valores obtenidos, este efecto no llega a ser compensado en su totalidad por la rigidez inducida sobre el ligando, con lo que el balance entrópico total resulta positivo.

La explicación de los valores de entalpía y entropía de reacción para la primera protonación de **L1-H** puede ser también válido para explicar los resultados termodinámicos de **L1-Me₃**, previa introducción de ciertos matices. El hecho que una amina terciaria se protone no tiene prácticamente efecto sobre su solvatación, de forma que la variación entálpica debida al reforzamiento de los enlaces de hidrógeno con el disolvente debería desaparecer. Esta podría ser la causa de la disminución del valor absoluto del valor entálpico de las protonaciones al aumentar el número de aminas metiladas del macrociclo, que pasa de -42.6 kJ/mol para **L1-H** a -31.3 para **L1-Me₃**. Por el mismo motivo la variación entrópica aumenta al perder capacidad de interacción con el disolvente tras la alquilación con metilos, pasando de 17.6 kJ T/mol para **L1-H** a 30.79 para **L1-Me₃**.

La segunda protonación de los ligandos tiene un comportamiento termodinámico muy parecido a la primera, motivado a su vez por causas similares. La formación de un nuevo enlace N-H sin la generación de tensiones internas debidas a las repulsiones electrostáticas puede explicar el valor y signo de los valores entálpicos. A este resultado puede contribuir así mismo el incremento del número e intensidad de las interacciones con el disolvente –o de solvatación– causada por el mayor número de aminas protonadas. Esta explicación es válida para los dos ligandos, teniendo en cuenta el efecto ya comentado que causan los grupos metilo sobre la solvatación de las aminas.

En último lugar, en relación a la tercera reacción de protonación, los discretos valores termodinámicos del sistema se pueden relacionar con el incremento de

las repulsiones termodinámicas generadas con la introducción del tercer protón en el anillo macrocíclico, a las que se une la ruptura de los enlaces de hidrógeno intramoleculares. Estos hechos llegan a compensar la contribución entálpica favorable de la protonación de la tercera amina para dar lugar a un calor de reacción próximo a cero.

En conclusión, el análisis de los estudios calorimétricos proporciona resultados coherentes con la secuencia de protonación hallada a través de los estudio UV-Vis y RMN, actuando en consecuencia como refuerzo experimental de los mismos. A través de ellos se puede observar el papel que juega la solvatación de las aminas en la estabilización de su protonación, pudiendo llegar a explicar el hecho que al alquilarlas aumente la constante de protonación: al metilar las aminas estas pierden capacidad de interacción con el disolvente, por lo que la adición de un primer protón a esta estructura estará muy favorecido por ser la única interacción accesible. De igual forma, la influencia del disolvente sirve también para explicar la menor constante de reacción para la segunda protonación de los compuestos: las repulsiones generadas en la estructura no pueden ser compensadas por el efecto de la solvatación del disolvente, por lo que la adición de un segundo protón debe ser menos favorable. Por último, las tensiones introducidas en la estructura con la adición del tercer protón –así como la ruptura de las interacciones intramoleculares que comporta– compensan en su totalidad el calor de la formación de un nuevo enlace covalente, llegando incluso a suponer constantes de protonación no detectables por potenciometría a causa de su reducido valor.

Grupo L2 o grupo piridol

La familia del grupo L2 o *grupo piridol* –constituida por los ligandos **L2-H** y **L1-Me₃**– presenta una estructura fundamental muy similar a la ya descrita para el grupo L1, con alguna modificación que hace especialmente interesante el estudio de sus modos de protonación.

Al igual que los ligandos del *grupo piridina*, los compuestos del grupo L2 presentan cuatro posiciones susceptibles de ser protonadas en el anillo macrocíclico –tres grupos amino y el nitrógeno de la piridina–. Pero estos ligandos disponen

adicionalmente de un grupo hidroxilo situado en posición *para* al nitrógeno piri-dínico que podría ser susceptible de protonarse o, incluso, modular el modo en que las propias aminas se protonan.

El estudio de estos sistemas se ha iniciado con la determinación de sus constantes de protonación mediante técnicas potenciométricas. Los logaritmos de sus constantes de protonación pueden hallarse en la Tabla 5.4, mientras que la representación de los diagramas de distribución de especies en función del pH se encuentran en la Figura 5.6.

A través de las medidas anteriormente descritas se han podido determinar entre 3 y 4 constantes de protonación para los ligandos del grupo L2 en el intervalo

Tabla 5.4 – Constantes logarítmicas de protonación del ligando **L2-H** y su derivado metílico **L2-Me₃** medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^a	L2-H	L2-Me ₃
$\text{H}_{-1}\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}(\text{H}_{-1}\text{L})$	10.89(2) ^b	10.94(3)
$\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L})$	8.85(1)	8.14(4)
$\text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}$	5.50(1)	4.75(6)
$\text{H}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}$	2.27(3)	-

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

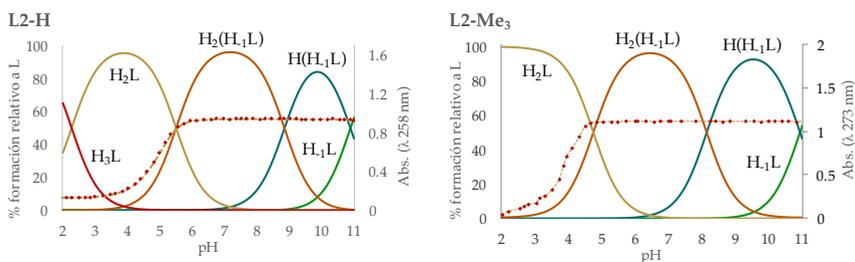


Figura 5.6 – Diagramas de distribución de los ligandos **L2-H** y **L2-Me₃**, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En los diagramas se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 258 y 273 nm para **L2-H** y **L2-Me₃**, respectivamente (línea punteada). $[\text{L}]=10^{-3}\text{M}$. Las cargas han sido omitidas.

del pH de trabajo (2.0 - 11.0). El análisis de estas constantes ofrece una perspectiva general coherente con la bibliografía existente y que se acerca a la ya descrita para los ligandos del grupo L1.³³²⁻³³⁶

En términos generales se puede observar cómo el valor de las constantes para un mismo ligando desciende progresivamente al avanzar en su protonación. Al igual que para el grupo anterior, esto se puede explicar desde el punto de vista de la introducción de cargas -y por tanto de la aparición de repulsiones de tipo electrostático que dificultan la introducción en el macrociclo de nuevos protones-, así como del punto de vista del efecto inductivo de la solvatación, la aparición de interacciones intramoleculares y el efecto estadístico.

Mediante un análisis más detallado de los datos se puede observar que el valor de la primera constante de protonación es, como el de los ligandos del grupo L1, particularmente elevado, aumentando con la alquilación de las aminas. Este hecho, unido a la tendencia de signo contrario de la segunda protonación, sugiere la presencia también en este tipo de ligandos de interacciones intramoleculares que estabilicen esta primera especie protonada. La última analogía con los resultados del grupo L1 parte del hecho que, al igual que sucedía con **L1-Me₃** y **L1-Me₂Pr₂**, no se ha podido determinar la última constante de protonación del ligando trimetilado **L1-Me₃**. Esto puede ser debido a la menor solvatación que presentan estos ligandos y, en consecuencia, a la menor estabilización de sus especies protonadas.

Pese a esto, cabe destacar ciertas diferencias entre las constantes del grupo L2 y las analizadas para el L1. En primer lugar, los compuestos piridólicos presentan una constante más que los piridínicos en los intervalos de pH estudiados. La conclusión lógica de este hecho es que una de las constantes determinadas debe corresponder a la protonación del grupo hidroxilo de la piridina. En segundo lugar, los valores de todas las constantes -y especialmente los de la primera protonación- son mayores que los correspondientes a los ligandos equivalentes del grupo L1. Este hecho implica que la interacción intramolecular asociada a la primera protonación del ligando es más intensa en el grupo L2, lo que otorga una estabilización extra a la especie monoprotonada.

Con el fin de comprobar experimentalmente estas hipótesis se ha procedido

a la realización de una serie de valoraciones seguidas por espectroscopía UV-Vis y RMN siguiendo el procedimiento ya descrito para los ligandos del grupo L1. Los resultados de los estudios de absorbancia se han representado en la Figura 5.6, superponiendo el máximo de la banda de la piridina sobre el diagrama de distribución de especies de cada compuesto. Para todos los ligandos se produce un aumento importante de la absorción al proceder a la protonación del ligando pero, a diferencia de lo observado en el ligando **L1-Me₂Pr₂**, este aumento no está asociado a la formación de la primera sino de la segunda especie protonada.

Por su parte, el análisis de los espectros de RMN de **L2-Me₃** medidos a diferente pH también ofrece resultados particularmente interesantes (ver Figura 5.7). En términos generales, se puede observar cómo las señales de los protones metílicos de la amina central (ϕ) sufren un desplazamiento a campo bajo con la primera protonación (al pasar de pD 12 (o superior) a 10), hecho que se puede relacionar con la protonación de su correspondiente amina. Este es un comportamiento muy similar al observado para el grupo L1 pero, a diferencia de lo que sucedía en este, al protonar por segunda vez el ligando, no se produce el desplazamiento de esta señal a campo alto. Por el contrario, al pasar de pD 10 a 7 la señal de los protones metílicos centrales pasa a un desplazamiento químico todavía mayor, en el mismo sentido que empiezan a mover su señal los metilos de las aminas laterales. Estos hechos sugieren que con la introducción del segundo protón en la estructura del macrociclo el enlace $N-H \cdots N_{\text{piridina}}$ no llega a romperse sino que se ve reforzado, al tiempo que empiezan a protonarse las aminas laterales. No es hasta la tercera reacción de protonación –al pasar de pD 7 a 4– que se puede observar el desplazamiento a campo alto de la señal de los protones ϕ (desprotonación de la amina central), así como el paso a campo bajo de la señal aromática (α) y de la correspondiente a los protones de los metilos laterales (γ). En último lugar, mencionar que al bajar a pD 1 el espectro de **L2-Me₃** no muestra una variación significativa de sus señales.

La combinación de los resultados de los estudios UV-Vis y RMN ofrece una visión de los modos de protonación de los ligandos muy interesante en comparación con la secuencia de protonación del grupo L1. Ambos tipos de estudio parecen in-

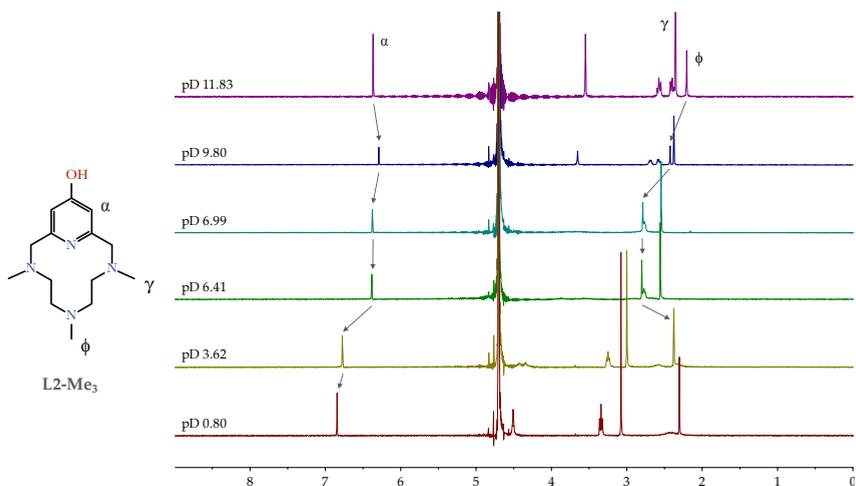


Figura 5.7 – Espectros ^1H RMN del ligando **L2-Me₃** realizados en D_2O de pD 0.80 a 11.83.

dicar que no es hasta la tercera reacción que se protona el oxígeno del piridol, sobre pH 4 ~ 5, lo cual supone un pH de protonación inusualmente bajo para este tipo de grupos. Es más, este resultado supone considerar que la protonación de dos grupos amino secundarios del ligando tiene lugar preferentemente a la de un grupo alcohol desprotonado.

Las conclusiones obtenidas a partir de estos resultados se pueden explicar si se tienen en cuenta dos procesos que suceden de forma simultánea e interrelacionada: la formación del enlace de hidrógeno intramolecular entre la amina central protonada y el grupo piridina, ya comentada, y la presencia de un equilibrio ceto-enólico en el grupo piridol.

A la vista de los resultados de las valoraciones UV-Vis y RMN realizadas, el grupo OH presenta su forma desprotonada ya a pH 4, siendo esta la forma mayoritaria del grupo piridol a partir de este valor de pH. En estos compuestos, el hecho que el oxígeno no esté protonado implica que los dos electrones que establecían el enlace O-H ahora estén disponibles para formar parte de la nube electrónica de la piridina. De esta forma, con la desprotonación del grupo piridol tiene lugar una redistribución de carga de toda la zona aromática, tal y como se muestra en la

Figura 5.8, formando un equilibrio resonante entre sus formas cetónica y enólica. La existencia de este equilibrio ha sido postulada previamente por otros autores, como J. M. Zeigler o K. Green.^{187,340}

Con el fin de estudiar más en profundidad el equilibrio ceto-enólico del grupo piridol, así como para comprobar la idea que su presencia aporta un plus de estabilidad al sistema, se ha procedido a su modelización a través de técnicas basadas en la computación cuántica. Desde el punto de vista estructural, existen tres posibilidades a la hora de situar un protón en el sistema: (1) sobre el oxígeno del piridol, (2) sobre el nitrógeno de la piridina o (3) sobre una amina contigua que forme un enlace de hidrógeno con el nitrógeno piridínico. A través del análisis de los resultados, representados en la Figura 5.9, se puede observar que la opción más favorable energéticamente es aquella en que el protón se sitúa sobre el nitrógeno piridínico. Las otras dos estructuras posibles muestran una diferencia energética de alrededor de 40 kJ/mol con esta primera opción: protonar el oxígeno de sistema da lugar a una estructura 41.95 kJ/mol menos estable, mientras que hacerlo en una amina contigua genera un sistema con una estabilidad 44.65 kJ/mol menor. Estos resultados apoyan la presencia de un equilibrio entre las formas cetónica y enólica del grupo piridol en disolución, al tiempo que señalan al nitrógeno de la piridina como la posición más reactiva desde el punto de vista de la protonación; siempre y cuando su oxígeno esté desprotonado.

La existencia del equilibrio ceto-enólico mostrado por el grupo piridol explica las peculiaridades de las constantes de protonación encontradas para los ligandos del grupo L2. En primer lugar, la redistribución electrónica a lo largo de la zona aromática implica un incremento de la densidad de carga negativa sobre el nitró-

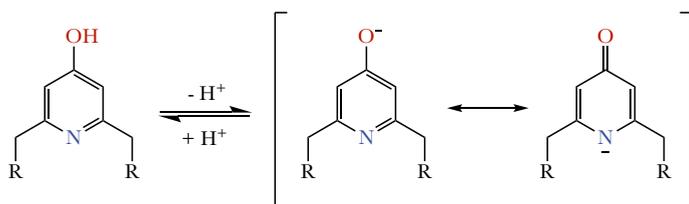


Figura 5.8 – Representación del equilibrio ceto-enólico del grupo piridol.

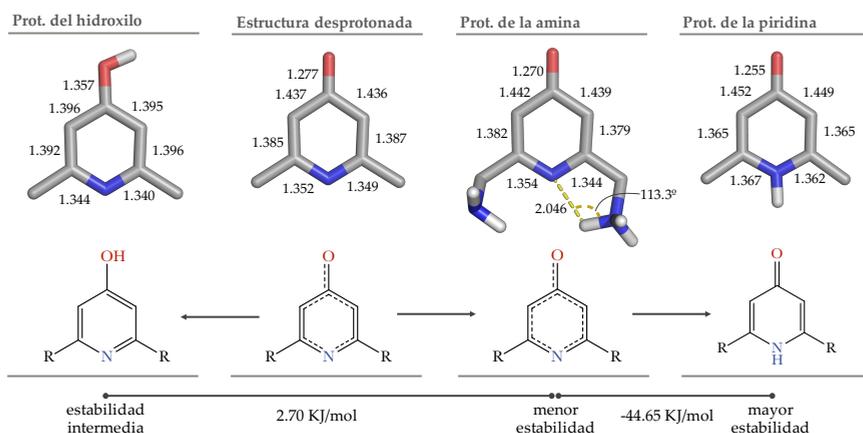


Figura 5.9 – Representación de los resultados de la modelización para el equilibrio ceto-enólico del grupo piridol. Nivel de teoría B3LYP-D3/def2-TZVP.

geno de la piridina, como se muestra en la representación del equilibrio en la Figura 5.8. Este hecho puede explicar porqué la especie monoprotionada es más estable en estos compuestos: un nitrógeno piridínico con mayor carga negativa implica el fortalecimiento del enlace de hidrógeno que mantiene con el protón de la amina central. En segundo lugar, el incremento de la fuerza de este enlace explica el amplio intervalo de pH en que el grupo hidroxilo se encuentra desprotonado: con su protonación tiene lugar la pérdida de densidad sobre el nitrógeno piridínico, lo que implica el debilitamiento del enlace de hidrógeno que forma.

Una vez definida la secuencia de protonación de los ligandos piridólicos, al igual que se ha hecho con el grupo L1, se ha procedido al estudio de su comportamiento termodinámico. Los resultados de las calorimetrías realizadas puede encontrarse en las Tablas 5.5 y 5.6.

Los valores de entalpías y entropías de protonación determinados, así como la tendencia que muestran con la alquilación las aminas, son coherentes con los datos reportados en la bibliografía.^{231,339} El análisis de los datos revela un comportamiento termodinámico muy similar al anteriormente analizado para el grupo L1, compartiendo sus características principales: (1) valor negativo de todas sus entalpías de reacción, (2) incremento de la entalpía con la segunda protona-

Tabla 5.5 – Variaciones estándar de entalpía (ΔH° , kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando **L2-H** y su derivado metílico **L2-Me₃**, medidos a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L2-H	L2-Me₃
$H_{-1}L + H \rightleftharpoons H(H_{-1}L)$	-40.2(7) ^b	-38.8(3)
$H(H_{-1}L) + H \rightleftharpoons H_2(H_{-1}L)$	-41.0(8)	-39.0(3)
$H_2(H_{-1}L) + H \rightleftharpoons H_2L$	-22(2)	-10.3(4)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	-4(2)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

Tabla 5.6 – Variaciones estándar de entropía ($T\Delta S^\circ$, kJ/mol) determinadas para la protonación del ligando **L2-H** y su derivado metílico **L2-Me₃**, medidos a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L2-H	L2-Me₃
$H_{-1}L + H \rightleftharpoons H(H_{-1}L)$	21.9(7) ^b	23.6(3)
$H(H_{-1}L) + H \rightleftharpoons H_2(H_{-1}L)$	9.5(8)	7.5(3)
$H_2(H_{-1}L) + H \rightleftharpoons H_2L$	9(2)	16.8(4)
$H_2L + H \rightleftharpoons H_3L$	9(2)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

ción, (3) calor próximo a cero de la última reacción, (4) disminución del calor de reacción con la metilación de los ligandos y (5) incremento de la variación entrópica con la alquilación metílica de las aminas. De la misma forma, la justificación para cada una de estas observaciones es fundamentalmente la misma. El valor negativo de las entalpías de reacción es debido a la formación del enlace N-H, así como a la red de puentes de hidrógeno asociada a esta protonaciones. Por su parte, el valor próximo a cero para el último calor es causado por la ruptura de estos enlaces intramoleculares. Por último, las variaciones de los valores de entalpía y

entropía para una misma reacción al metilar las aminas está relacionado con la interacción con el disolvente y su mayor o menor facilidad por solvatar las aminas protonadas. Un análisis más exhaustivo de los resultados se puede encontrar en el apartado anterior para el grupo L1.

Pese a que las tendencias internas de los grupos L1 y L2 sean iguales, un análisis comparativo entre sus resultados muestra la existencia de ciertas diferencias. La más evidente es la presencia de un calor de reacción adicional en el grupo L2, el cual puede ser asignado a la protonación del grupo hidroxilo del piridol. Su valor, cercano a los -22 kJ/mol, es significativamente menor al correspondiente para la protonación de las aminas (alrededor de -40 kJ/mol), hecho que puede ser explicado teniendo en cuenta su efecto sobre el macrociclo: al protonar el oxígeno, el equilibrio ceto-enólico del piridol es bloqueado en su forma enólica, que presenta una densidad de carga menor sobre el nitrógeno piridínico. Este hecho se traduce en una pérdida de intensidad de las interacciones intramoleculares dadas y por tanto en una neutralización parcial de su calor de reacción.

Una comparación más detallada de los resultados de ambos grupos muestra unos valores de entalpía de reacción iguales o ligeramente menores para el grupo L2, mientras que sus variaciones entrópicas son ligeramente mayores. Ambas diferencias termodinámicas pueden ser explicadas atendiendo a la desolvatación parcial del oxígeno asociada al bloqueo de la forma cetónica del piridol con la protonación del macrociclo. La menor entalpía de los ligandos del grupo L2 puede ser debida a la pérdida de intensidad de los enlaces del oxígeno con el agua del disolvente, mientras que la mayor entropía puede ser explicada por la pérdida de influencia sobre la ordenación del disolvente.

En conclusión, los resultados calorimétricos son coherentes con el análisis del resto de técnicas empleadas en el estudio de la protonación de los ligandos, así como con los datos reportados en la bibliografía para sistemas similares. Por todo ello, estos estudios refuerzan las conclusiones obtenidas sobre la secuencia de protonación de los ligandos con L2, así como la existencia de un equilibrio ceto-enólico para el grupo piridol de los ligandos que condiciona el comportamiento en disolución de estas especies.

Grupo L3/4 o grupo piridina carboxílica

El tercer grupo de ligandos comprendido dentro de los compuestos mononucleantes es el L3/4. Este grupo comprende todos aquellos ligandos que contienen un grupo ácido carboxílico o un grupo éster metílico en *para* al nitrógeno de la piridina, por lo que también recibe la denominación de grupo *piridina carboxílica*.

Al igual que en los dos grupos estudiados anteriormente, los ligandos del grupo L3 están compuestos de un anillo aza-macrocíclico con cuatro posiciones protonables (tres aminas y el nitrógeno piridínico). Pero este grupo contiene, además, un grupo ácido carboxílico que puede ser también protonado. Por contra, **L4-Me₃** tan sólo contiene tres posiciones protonables, correspondientes a las tres aminas del macrociclo.

El estudio de estos ligandos se ha iniciado con la determinación potenciométrica de sus constantes de protonación, cuyos valores se pueden encontrar en las Tablas 5.7 y 5.8. Los diagramas de distribución en función del pH calculados a partir de estas constantes se hallan representados en la Figura 5.10.

Mediante los estudios descritos se han podido determinar tres constantes de protonación para los ligandos de la familia L3, mientras que para **L4-Me₃** tan solo se han podido encontrar dos.

Una breve comparativa de las constantes determinadas para cada ligando muestra un comportamiento ácido-base muy parecido al mostrado por el grupo L1, tanto en lo relativo al valor de las constantes como a su variación con la alquilación

Tabla 5.7 – Constantes logarítmicas de protonación de los ligandos **L3-H** y **L3-Me₃** medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^a	L3-H	L3-Me₃
$\text{H}_{-1}\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}(\text{H}_{-1}\text{L})$	10.70(1) ^b	10.90(2)
$\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L})$	8.08(1)	7.73(4)
$\text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}$	2.88(2)	2.90(6)

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

Tabla 5.8 – Constantes logarítmicas de protonación del ligando **L4-Me₃** medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L4-Me₃
$L + H \rightleftharpoons HL$	9.85(3) ^b
$HL + H \rightleftharpoons H_2L$	9.14(4)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

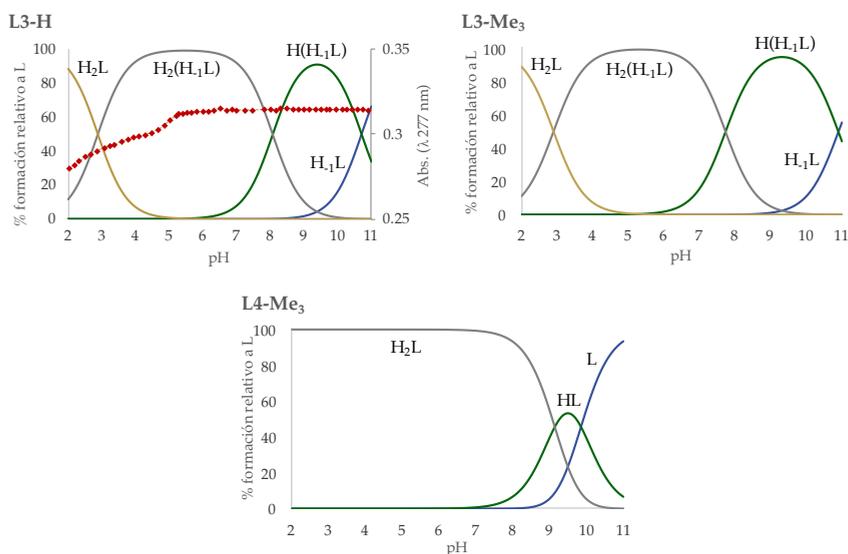


Figura 5.10 – Diagramas de distribución de los ligandos **L3-H**, **L3-Me₃** y **L4-Me₃**, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de **L3-H** se ha superpuesto su absorbancia UV-Vis a 277 nm (línea punteada). $[L]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

de los ligandos. Así, tanto la primera como la segunda constante de protonación de **L3-H** y de **L3-Me₃** son muy próximas a los valores mostrados por sus análogos **L1-H** y **L1-Me₃**: una primera constante sobre las 10.7 unidades logarítmicas y una segunda sobre las 7.7. De hecho, la motivación de dichos valores puede atribuirse

a las causas ya descritas para los grupos L1 y L2: la aparición de repulsiones de tipo electrostático por la protonación de las aminas (lo que dificulta la introducción en el macrociclo de nuevos protones), el efecto inductivo de la solvatación, la aparición de interacciones intramoleculares y el efecto estadístico.

La principal diferencia entre el comportamiento del grupo L1 y el del L3 es la presencia de una tercera constante de protonación en este último grupo. Esta tercera constante, cuyo valor es idéntico para ambos ligandos **L3-H** y **L3-Me₃**, puede atribuirse a la protonación del grupo ácido, como muestran los estudios de UV-Vis (ver Figura 5.10). Este hecho explica, a su vez, porqué no ha sido posible determinarla para **L4-Me₃**, cuyo carboxilato presenta la forma éster, que no es protonable.

Cabe añadir en último lugar que, pese a no haber podido determinar la constante de formación del compuesto $\text{H}_3\text{L3-H}^{3+}$ por encontrarse fuera de los límites de trabajo de la técnica, sí que hemos podido probar la existencia de esta especie en disolución mediante la resolución de dos estructuras cristalinas (ver Figura 5.11). Ambos cristales presentan una estructura muy similar, variando únicamente en la naturaleza de los contraiones. Esta diferencia da lugar a los dos cristales de fórmulas $[\text{H}_3\text{L3-H}]\text{Cl}_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_3$ y $[\text{H}_3\text{L3-H}]\text{ClO}_4 \cdot \text{Cl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

En la Figura 5.11 se puede observar cómo en estos cristales el sistema se encuentra estabilizado por la interacción de sus tres aminas protonadas con un mismo cloruro a través de la formación de enlaces iónicos ($d_{\text{N-H}\cdots\text{Cl}^-} \approx 2.4 \text{ \AA}$). Por

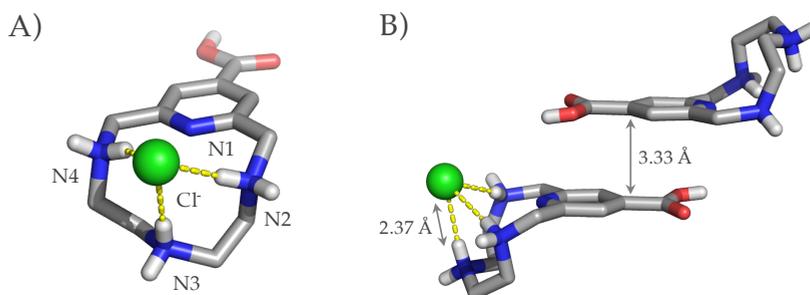


Figura 5.11 – A) Estructura del catión $\text{H}_3\text{L3-H}^{3+}$ determinada mediante difracción de rayos X en monocristal. B) Detalle de la ordenación del sistema en la estructura cristalina.

último, cabe destacar el modo en que el compuesto protonado se ordena en el cristal. Como se puede ver en la Figura 5.11B, el ligando se dispone en la estructura cristalina por parejas, las cuales interaccionan entre sí mediante la formación de interacciones de π -stacking al enfrentarse sus respectivas unidades aromáticas ($d_{\pi \dots \pi} \approx 3.3 \text{ \AA}$).

5.3 LIGANDOS BINUCLEANTES

El segundo gran grupo de compuestos estudiados en la presente tesis es el de los denominados como *ligandos binucleantes*. Dentro de este conjunto están incluidos todos aquellos compuestos que no forman parte del grupo descrito en el apartado anterior, cuya característica principal es la presencia de un macrociclo hexaamínico de entre 25 y 26 átomos de longitud en su estructura. Desde el punto de vista de su comportamiento ácido-base destaca la presencia de seis grupos amino en la cadena macrocíclica, a los que se suman los elementos del grupo piridina susceptibles de participar en la protonación del ligando, esto es, el nitrógeno de la propia piridina y el grupo hidroxilo en *para* a este. El conjunto de ligandos binucleantes comprende los compuestos **L5** y **L6**.

Con el fin de conocer las propiedades ácido-base de estos ligandos y determinar sus constantes y secuencia de protonación se ha procedido de forma análoga a la ya descrita para el grupo anterior de compuestos, o *ligandos mononucleantes*. Así, mediante las técnicas potenciométricas adecuadas se han podido determinar las constantes de protonación de los ligandos, a través de las cuales se ha calculado su diagrama de distribución de especies en función del pH. Con el fin de comprender con una mayor profundidad su secuencia de protonación, los estudios potenciométricos se han completado con valoraciones seguidas por UV-Vis. En último lugar, cabe decir que los resultados obtenidos se han comparado con los correspondientes a sus análogos estructurales más cercanos hallados en la bibliografía (Figura 5.12).¹⁸⁰

Los valores logarítmicos de las constantes de protonación obtenidas por potenciometría se encuentran en las Tablas 5.9 y 5.10), mientras que la representación de los diagramas de distribución se puede hallar en la Figura 5.13.

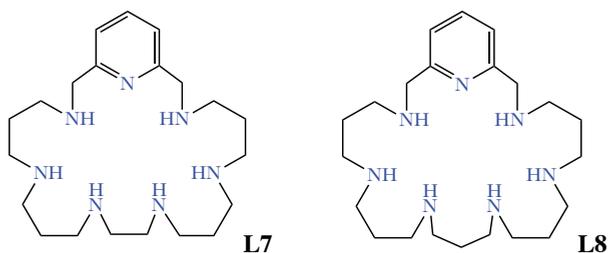


Figura 5.12 – Estructura de los compuestos L7 y L8.¹⁸⁰

Mediante los estudios potenciométricos ha sido posible determinar siete constantes de protonación para ambos ligandos estudiados, L5 y L6. Los valores obtenidos para sus constantes de protonación se encuentran en el rango comprendido entre 10.68 y 4.14 unidades logarítmicas para L5 y entre 10.03 y 5.09 para L6.

El análisis de los datos muestra un comportamiento de protonación típico de las poliaminas cíclicas basado en la acumulación de densidad de carga, en las repulsiones electrostáticas entre grupos amonio, en el efecto inductivo derivado de la solvatación de las aminas, en la formación de interacciones intramoleculares y en el efecto estadístico (de forma análoga a la ya comentada para los ligandos anteriores).^{180,341} La diferencia en el valor de las constantes entre ligandos se puede

Tabla 5.9 – Constantes logarítmicas de protonación de los ligandos L5 y L6 medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^a	L5	L6
$\text{H}_{-1}\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}(\text{H}_{-1}\text{L})$	10.68(2) ^b	10.03(2)
$\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L})$	10.11(2)	9.98(1)
$\text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3(\text{H}_{-1}\text{L})$	9.36(1)	8.99(2)
$\text{H}_3(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_4(\text{H}_{-1}\text{L})$	7.97(1)	7.94(2)
$\text{H}_4(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_5(\text{H}_{-1}\text{L})$	6.13(1)	6.61(2)
$\text{H}_5(\text{H}_{-1}\text{L}) + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}$	5.81(1)	6.03(2)
$\text{H}_5\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_6\text{L}$	4.14(2)	5.09(4)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

Tabla 5.10 – Constantes logarítmicas de protonación de los ligandos **L7** y **L8** medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^a	L7 ^c	L8 ^c
$\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{HL}$	10.67(1) ^b	10.67(1)
$\text{HL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{L}$	9.85(1)	9.41(1)
$\text{H}_2\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{L}$	8.60(1)	8.24(5)
$\text{H}_3\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_4\text{L}$	7.49(1)	7.35(7)
$\text{H}_4\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_5\text{L}$	7.12(1)	6.98(9)
$\text{H}_5\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons \text{H}_6\text{L}$	4.99(2)	5.87(2)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^c Datos tomados de la bibliografía.¹⁸⁰

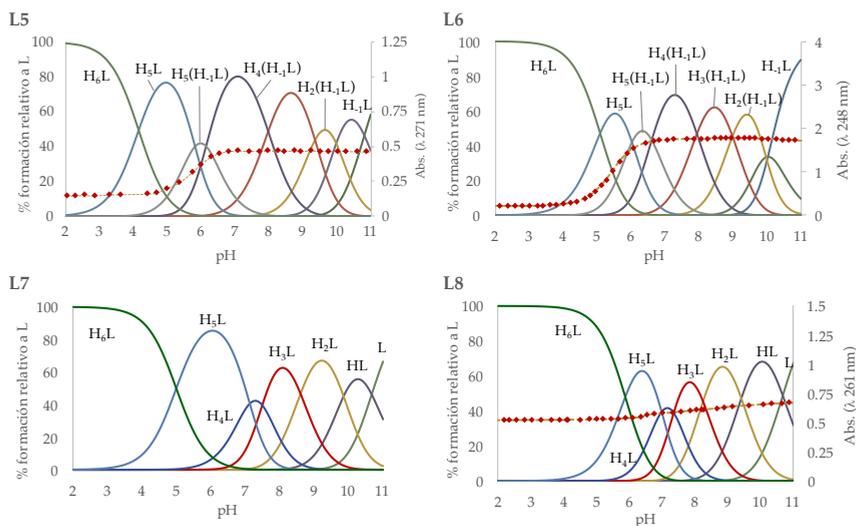


Figura 5.13 – Diagramas de distribución de los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8**, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de los ligandos **L5**, **L6** y **L10** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 271, 248 y 261 nm, respectivamente (línea punteada). $[\text{L}] = 10^{-3}$ M. Todas las cargas han sido omitidas.

analizar atendiendo a los dos elementos que varían entre sus estructuras: el número de carbonos de la cadena aza-macro-cíclica y el sustituyente en *para* al nitrógeno de la piridina.

Al comparar las constantes entre tipos de cadenas –L5 con L6 y L7 con L8– puede observarse que los ligandos con la cadena etilénica (L5 y L7) tienden a presentar valores más elevados para sus primeras constantes de protonación, siendo este un patrón que se ve invertido para las últimas protonaciones. Este hecho puede ser explicado atendiendo a la distancia entre grupos amino en cada ligando y su efecto sobre las interacciones intramoleculares: mientras que distancias cortas –cadenas etilénicas– favorecen la estabilización de las primeras protonaciones por la formación de puentes de hidrógeno entre aminas, las distancias más largas –cadenas propilénicas– minimizan las repulsiones electrostáticas en las últimas reacciones de protonación.³³⁷

Por otro lado, la comparación entre ligandos con diferente grupo piridínico pero misma cadena –L5 con L7 y L6 con L8– muestra el efecto del hidroxilo sobre la secuencia de protonación. De esta forma se puede observar cómo, a excepción de la correspondiente a la primera protonación de L6, las primeras constantes de los ligandos piridólicos –L5 y L6– son mayores que las de sus análogos piridínicos –L7 y L8–, mientras que a partir de la cuarta constante esta tendencia se invierte. El grupo hidroxilo por tanto tiene una clara influencia sobre la protonación del ligando. Con el fin de explicar de qué modo participa en la estabilización de las especies protonadas es necesario conocer a qué reacción de protonación está asociada la suya propia. Para ello se llevaron a cabo una serie de valoraciones seguidas por UV-Vis cuyo resultado se ha superpuesto al diagrama de distribución de cada ligando (ver Figura 5.13).

Los resultados de las valoraciones realizadas muestran una disminución de la intensidad de absorción correspondiente a la banda de la piridina (medida a λ 271 nm) al bajar de pH 7 a 5 para ambos ligandos piridólicos (L5 y L6); variación que no se observa en L8. Como ya se ha visto en el apartado anterior, esta disminución de la absorbancia está relacionada con la protonación del hidroxilo del grupo piridol. La superposición de los diagramas de distribución con la variación de la

absorbancia muestra que dicha protonación está asociada a la formación de la especie H_5L^{5+} . Es en dicha reacción de protonación, de hecho, donde la tendencia en el valor de las constantes se invierte. De acuerdo con estos resultados, la forma cetónica del piridol –con la densidad de carga negativa concentrada en el nitrógeno piridínico– tiene un efecto estabilizante sobre las primeras protonaciones de sus ligandos, en comparación con aquellos piridínicos. Este hecho hace que las primeras constantes de **L5** y **L6** sean mayores que las de **L7** y **L8**. Es en el momento en que el piridol es protonado que se pierde la contribución extra a la estabilización que aportaba, con lo que las constantes de protonación toman valores más bajos. Este es un hecho análogo al observado para los ligandos del grupo L2.

En último lugar, a modo de caracterización, la comparación de los espectros de absorbancia de los ligandos **L6** y **L8** puede proporcionar información interesante sobre sus estructuras aromáticas (Figura 5.14). Así, la representación de los coeficientes de extinción molar en función de la longitud de onda muestra un aumento de la intensidad de absorción del anillo piridínico con la adición del grupo hidroxilo a su estructura. Así mismo, se puede también observar un ligero efecto hipsocrómico al pasar sus máximos de absorción de 261 nm para **L8** a 258 nm para **L6**. Este resultado es coherente con los cálculos teóricos obtenidos para este sistema, así como con los resultados reportados en la bibliografía.¹⁸⁷

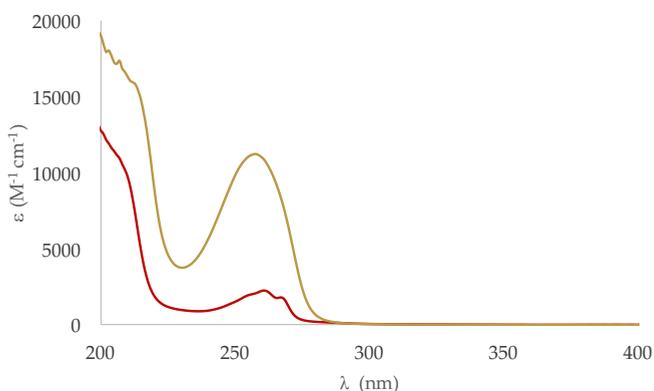


Figura 5.14 – Representación de los espectros de absorción de los ligandos **L6** (en amarillo) y **L8** (en rojo) a partir de su coeficiente de extinción molar en función de λ . Espectros medidos en agua a pH 7 y 298.1 K.

Capítulo 6

Química de coordinación

6.1 INTRODUCCIÓN

La bioquímica de los sistemas de defensa antioxidantes está protagonizada por los metaloenzimas, conjunto de proteínas enzimáticas cuya actividad catalítica es llevada a cabo por metales que se encuentran coordinados en su centro activo. Las diferentes especies de superóxido dismutasas o de peroxidasas, sin ir más lejos, contienen átomos de Cu(II) o Mn(II), por ejemplo, encargados de llevar a cabo tanto la función catalítica de eliminación de las ROS como, en ciertos casos, tareas de estabilización estructural.

Como ya se ha descrito anteriormente en la introducción de la presente tesis, la estructura química de los aza-macrociclos sintetizados presenta una serie de características que los hacen especialmente interesantes en su tarea de mimetizar funcionalmente los metaloenzimas antioxidantes. En primer lugar, presentan un conjunto de átomos quelantes en su estructura, como son los grupos amino, capaces de complejar ciertos átomos metálicos. Asimismo, en los ligandos mononucleantes estos átomos se disponen formando un macrociclo cuya cavidad interna es aproximadamente del mismo tamaño que el radio iónico de los metales de la primera serie de transición. Por último, el elemento principal de complejación, presumiblemente el anillo aza-macrocíclico, presenta un número insuficiente de grupos quelantes para saturar la esfera de coordinación de los metales que pueda complejar. Este hecho permite tanto la unión de sustratos en sus posiciones lábiles como la capacidad de establecer ciclos redox –imprescindibles en su tarea catalítica–.

Por todo ello, previamente al estudio de la actividad antioxidante de los sistemas, es interesante determinar su modo de interacción con algunos de los iones metálicos de mayor interés. En el presente capítulo se muestran los resultados obtenidos para los estudios de complejación de los ligandos sintetizados con algunos de los metales con mayor potencial antioxidante: Cu(II) y Fe(II). Asimismo, debido a su presencia en el centro activo de la Cu,Zn-SOD, se ha estudiado también el efecto de la coordinación del Zn(II) en los ligandos de gran capacidad –L5 y L6–.

El procedimiento experimental empleado para estos estudios es similar al ya descrito en la determinación del comportamiento ácido-base de los receptores. De

esta forma, mediante el uso de técnicas potenciométricas se ha podido determinar el valor de las distintas constantes de complejación con los metales de interés, estudios que se han completado con la realización de valoraciones seguidas por UV-Vis y la resolución de estructuras cristalográficas mediante el uso de difracción de rayos X. En el caso de la interacción entre los ligandos del grupo L1 con Cu(II) se ha procedido a un estudio más completo de la cinética de formación y comportamiento electroquímico de los correspondientes sistemas debido a la mayor complejidad de los grupos alquílicos empleados.

Atendiendo a la naturaleza de los receptores, los resultados obtenidos se han expuesto en el capítulo divididos en dos grandes bloques. En primer lugar, y de forma similar al capítulo de ácido-base, se presenta el estudio de los ligandos mononucleantes, subdividido a su vez en función de la naturaleza del anillo piridínico. Para este conjunto de ligandos se han estudiado los metales Cu(II) y Fe(II). En segundo lugar se puede encontrar el apartado de los ligandos binucleantes, para los que se ha estudiado Cu(II) y Zn(II).

6.2 LIGANDOS MONONUCLEANTES

6.2.1 ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN CON CU(II)

Grupo L1 o grupo piridina

En primer lugar se ha estudiado la interacción del conjunto de ligandos **L1-H**, **L1-Me₃** y **L1-Me_iPr₂**, comprendidos dentro del grupo L1 o *grupo piridina*, con Cu(II). En la Tabla 6.1 se pueden encontrar los valores logarítmicos de las constantes de formación determinadas, mientras que los correspondientes diagramas de distribución se puede hallar en la Figura 6.1.

La especiación de los sistemas es relativamente simple, pudiéndose observar la formación de los complejos mononucleares [CuL]²⁺ así como de sus especies mono- y dihidroxiladas tanto para **L1-Me₃** como para **L1-Me_iPr₂**. Las constantes de estabilidad siguen la tendencia **L1-H** > **L1-Me₃** > **L1-Me_iPr₂**, es decir, cuanto más voluminoso e hidrófobo es el sustituyente alquílico de las aminas, menor son las constantes de estabilidad de sus complejos. Este decaimiento de la estabilidad

Tabla 6.1 – Constantes logarítmicas de complejación del ligando **L1-H** y sus derivados alquílicos (**L1-Me₃** y **L1-Me_iPr₂**) con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L1-H ^b	L1-Me ₃	L1-Me _i Pr ₂
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuL}]$	17.78(2) ^c	16.44(3)	14.04(1)
$[\text{CuL}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuL}(\text{OH})] + \text{H}$	-8.68(8)	-8.53(4)	-8.11(3)
$[\text{CuL}(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuL}(\text{OH})_2] + \text{H}$	-10.7(1)	-11.31(8)	-10.04(8)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Datos tomados de la bibliografía.¹⁷⁶ ^c Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

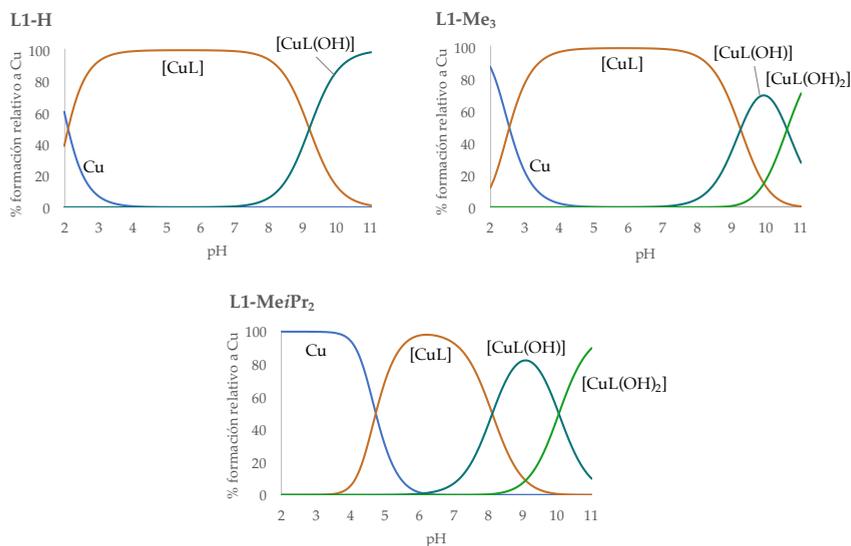


Figura 6.1 – Diagramas de distribución de los complejos de **L1-H**, **L1-Me₃** y **L1-Me_iPr₂** con Cu(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. Las cargas han sido omitidas. $[\text{L}]=[\text{Cu}]=10^{-3}\text{M}$.

de los complejos asociada a la alquilación de los grupos amino secundarios ha sido reportada anteriormente por D. Meyerstein *et al.*,¹⁸⁵ entre otros,³³⁷ y explicada en términos del empobrecimiento de la capacidad dadora σ de las aminas debido a la reducción en el número de enlaces de hidrógeno de tipo $\text{M-N-H} \cdots \text{O}$ con el agua

del disolvente, así como por el incremento de las dimensiones del complejo. El efecto sobre los complejos de la pérdida de solvatación de las aminas es similar al observado con las primeras constantes de protonación de los ligandos, aspecto este ya discutido en el capítulo anterior de esta tesis.

A pesar que los valores de las constantes indican una menor estabilidad para los ligandos con las aminas alquiladas, para que la comparación pueda ser válida, se debe tener en cuenta la afinidad de los ligandos por los protones. Con este fin se han calculado los porcentajes de formación de cada uno de los sistemas descritos en una disolución teórica que contiene 1 equivalente de Cu(II) y 1 equivalente de cada uno de los receptores a comparar. El diagrama de distribución resultante, representado en la Figura 6.2, muestra que bajo las condiciones descritas un 80 % de Cu(II) está complejado con **L1-H**, mientras que el 20 % restante se encuentra interaccionando con **L1-Me₃**. Por su parte, la cantidad de Cu(II) coordinada a **L1-Me₃Pr₂** es estadísticamente despreciable ($< 0.01\%$). En cualquier caso, la relativa baja estabilidad del complejo $[\text{CuL1-Me}_3\text{Pr}_2]^{2+}$ no tiene porqué ser desfavorable para que este pueda tener actividad antioxidante. Cuando este proceso catalítico

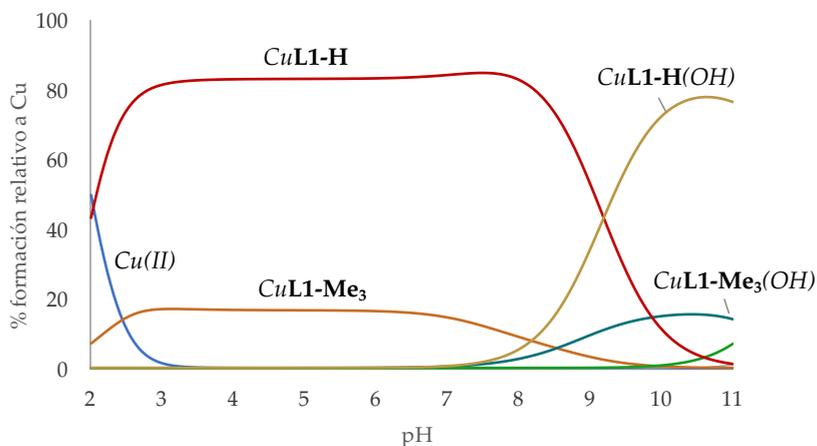


Figura 6.2 – Diagramas de distribución de los complejos de Cu(II) formados en una disolución que contiene un equivalente de cobre y un equivalente de cada uno de los ligandos del grupo L1 (**L1-H**, **L1-Me₃** y **L1-Me₃Pr₂**). $[\text{L}]=10^{-3}\text{M}$. Las cargas han sido omitidas.

es llevado a cabo por los complejos de cobre, este elemento oscila entre sus estados de oxidación II y I en un ciclo redox que está asociado a la reacción de dismutación de los radicales superóxido. Por lo tanto, si uno de los dos estados del cobre está excesivamente estabilizado, se corre el riesgo que el proceso entero se pueda llegar a bloquear.

En último lugar, cabe hacer mención a la diferente facilidad que muestran los complejos por hidrolizarse. Como podemos ver en la Tabla 6.1, la alquilación de las aminas de los ligandos implica que el logaritmo de la constante de hidrólisis de sus complejos de Cu(II) toma valores cada vez más positivos; es decir, la tendencia a la hidrólisis se hace mayor. Este hecho se traduce en un aumento de la acidez del agua coordinada. Si comparamos esta tendencia con la de la estabilidad de los complejos, podemos observar que son opuestas; y pese a ello, los razonamientos que explican ambos comportamientos están estrechamente relacionados. Como hemos visto, la alquilación del ligando conduce a una solvatación deficiente de sus complejos, lo que implica la despolarización de sus enlaces de coordinación y por lo tanto la reducción de su estabilidad. De esta forma, la disminución de densidad de carga que aportan las aminas al metal conlleva un aumento de la densidad de carga que el propio metal retira del agua de coordinación. Si esta retirada de carga es mayor, el enlace O-H del agua se encuentra más polarizado, por lo que el agua es más ácida. Es por todo ello que con la alquilación del ligando se produce un incremento de la capacidad del agua por ceder sus protones, con lo que se favorece la forma hidroxilada de los complejos.

La profundización en la comprensión estructural de los complejos de Cu(II) que se forman ha sido posible gracias a la obtención de dos estructuras cristalinas del sistema $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ (ver Figura 6.3). Estos cristales, cuya principal diferencia radica en los contraiones presentes en la estructura, fueron obtenidos mediante evaporación lenta de soluciones acuosas de $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2$ y $\text{L1-MeiPr}_2 \cdot 3\text{HCl}$. En función de si el medio de cristalización contenía o no exceso de NaCl, se obtuvieron cristales de fórmula $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)\text{Cl}](\text{ClO}_4)$ (1), donde el cloruro está coordinado al cobre en su posición vacante (Figura 6.3a); o de fórmula $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2), en que una molécula de agua ocupa la posición

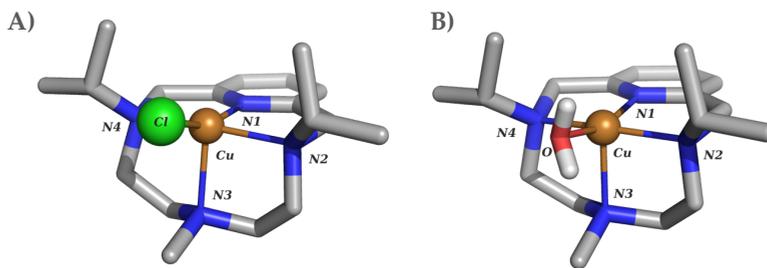


Figura 6.3 – Representación de las estructuras cristalinas de los complejos de Cu(II):
 A) $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)\text{Cl}](\text{ClO}_4)$ y B) $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

del cloruro de la primera estructura (Figura 6.3b). La resolución de las estructuras muestra una geometría de pirámide de base cuadrada para ambos centros metálicos ($\tau_5 = 0.007^*$ para la estructura con el cloruro y 0.023 para la estructura con el agua de coordinación), donde el nitrógeno central de la cadena poliamínica ocupa la posición axial. Esta es de hecho la distancia de enlace más larga para ambos complejos (2.19 Å para **1** y 2.20 Å para **2**), mientras que la más corta es la correspondiente al enlace Cu-piridina (1.93 Å para **1** y 1.95 Å para **2**).

Una característica clave en las estructuras de los complejos es la conformación que adopta el ligando cuando coordina al Cu(II), en comparación a cuando se encuentra libre en disolución. Así, la interacción del metal con el ligando induce el plegamiento de este último, hecho que puede ser medido teniendo en cuenta al ángulo formado entre el plano del anillo piridínico y los nitrógenos alifáticos y cuyo valor ronda los 73.3 ° en el caso del complejo **1** y los 82.2 ° en el caso de **2**. Respecto los ligandos que completan la esfera de coordinación del cobre, un Cl^- en el caso de **1** y una molécula de H_2O en el caso de **2**, ambos ocupan la posición ecuatorial de los complejos, situándose en *trans* al nitrógeno de la piridina. Es asimismo destacable el entorno hidrófobo en que se hallan, siendo rodeados por

* τ_5 = Es un parámetro, propuesto por Addison *et al.* en 1984,³⁴² que establece el porcentaje de geometría de bipirámide trigonal o de pirámide de base cuadrada que presenta una estructura, en una escala que varía entre cero y uno. Así, cuanto más cercano a cero sea el valor de τ_5 , mayor será la componente de pirámide de base cuadrada de la estructura. Por el contrario, valores cercanos a uno se corresponden con geometrías cercanas a la bipirámide trigonal.

los sustituyentes alquílicos.

Por último, cabe mencionar que, pese a que el complejo **1** ha sido cristalizado como unidades aisladas, en **2** cada complejo está unido con otros centros metálicos a través de una red de puentes de hidrógeno en la que están implicadas las aguas de coordinación, dos moléculas de agua del disolvente y los contraiones perclorato (ver Figura 6.4).

Con el fin de completar los estudios potenciométricos y cristalográficos de los complejos de Cu(II), se ha procedido a estudiar el otro aspecto que puede resultar clave para entender su química en disolución: la cinética de formación y descomposición de los complejos.

En primer lugar se llevaron a cabo los estudios cinéticos sobre la velocidad de formación y descomposición de los complejos de Cu(II) por parte de los ligandos del grupo L1. Estos estudios fueron realizados por el grupo del profesor Manuel García Basallote, de la Universidad de Cádiz. La presencia y concentración de los diferentes complejos en disolución fue determinada mediante el registro del espectro de absorción de disoluciones 10^{-3} M de Cu(II) y ligando en relación 1:1 a

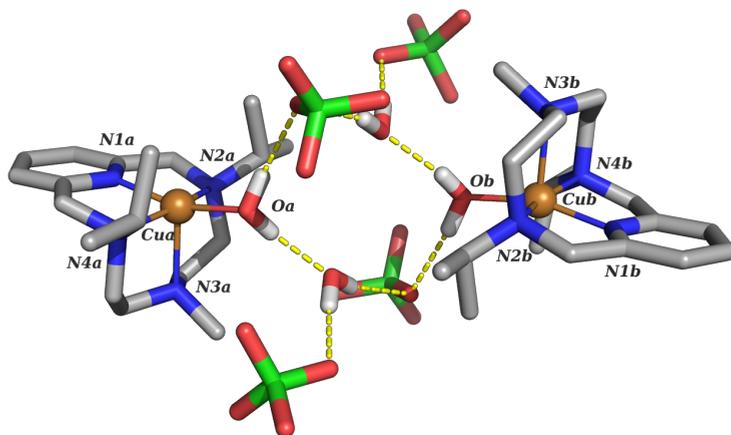


Figura 6.4 – Representación de la estructura cristalina de dos complejos de fórmula $[\text{Cu}(\text{L1-Me}i\text{Pr}_2)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ unidos a través de una red de puentes de hidrógeno.

diferentes tiempos tras la mezcla de reactivos. Los espectros finales de los complejos se encuentran representados en la Figura 6.5. En ellos se puede observar cómo la formación de los complejos Cu(II)-L puede ser seguida por la aparición de una banda de absorción a 690 nm para $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y a 705 nm para $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$, ambos valores cercanos al encontrado en la bibliografía –y reproducido en las medidas del ensayo– de 695 nm para $[\text{CuL1-H}]^{2+}$.¹⁷⁶ Cabe destacar el desplazamiento a longitudes de onda mayores (750 nm) de la banda asociada al complejo $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$, hecho que puede ser fácilmente relacionado con el mayor carácter dador π por parte del ligando hidroxilo.

Con el fin de simplificar la explicación se tratarán en primer lugar los resultados cinéticos relativos a la reacción de disociación. De igual forma a lo descrito en la bibliografía para complejos poliamínicos similares,¹⁷⁶ la adición de un exceso de ácido a disoluciones de Cu-L1 produce la descomposición de los complejos metálicos de acuerdo con la ecuación 6.1, cuya cinética puede ser seguida fácilmente a través de la desaparición de la banda de absorción situada a 700 nm. La disociación de los complejos $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ resultó ser un proceso relativamente lento, hecho que facilitó su monitorización mediante espectrometría UV-vis convencional. Las variaciones observadas en los espectros se han

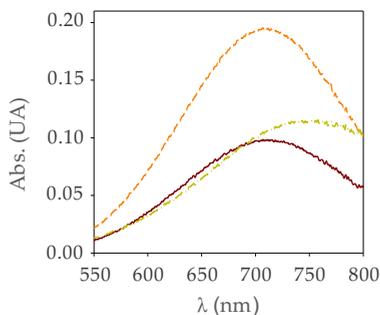
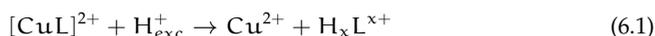


Figura 6.5 – Espectro de absorción de disoluciones acuosas de $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ (línea roja), $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ (línea naranja punteada) y $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ (línea verde punteada). Todos los espectros han sido medidos a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. $[\text{Cu}]_0 = [\text{L}]_0 = 10^{-3}$ M.

podido ajustar de forma satisfactoria a una ecuación de tipo exponencial para ambos complejos, dando lugar a valores de k_{obs} que muestran una dependencia lineal con la concentración de ácido (ec. 6.2, Figura 6.6). Mediante los ajustes indicados se ha podido determinar el valor de las constantes de segundo orden para la disociación de los complejos, siendo estas de $k = (4.61 \pm 0.17) \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y de $k = (1.96 \pm 0.02) \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$.



$$k_{\text{obs}} = k[\text{H}^+] \quad (6.2)$$

Estos resultados indican que, mediante la introducción de los grupos isopropilo (más voluminosos que los metilo) en la estructura de los ligandos, se produce una reducción de alrededor de 20 veces en la velocidad de descomposición de sus complejos de Cu(II). Por otra parte, los estudios de disociación de las especies $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ mostraron que, como paso previo a su descomposición, es-

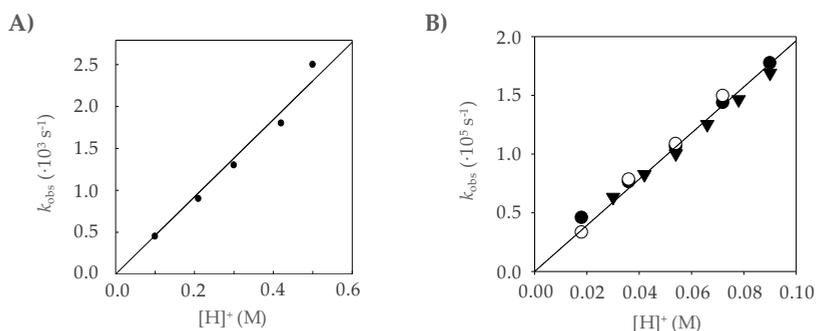


Figura 6.6 – Representación de la dependencia con la concentración de ácido de las constantes observadas de velocidad de disociación de: A) $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y B) $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ (círculos negros), $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ (círculos blancos) y mezcla de las dos especies (triángulos). Todas las cinéticas han sido realizadas a $298.1 \pm 0.2 \text{ K}$ en presencia de NaClO_4 0.15 M. Para el complejo $[\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{OH})]^+$ existe un paso cinético previo demasiado rápido para ser medido incluso mediante las técnicas de *stop-flow*. $[\text{Cu}]_0 = [\text{L}]_0 = 10^{-3} \text{ M}$.

tos complejos pasan primero a la forma no-hidroxilada $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$; proceso que tiene lugar dentro de los tiempos de mezcla de la técnica de flujo detenido (ca. 1.7 ms).

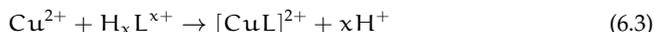
La ley de la velocidad mostrada en la ecuación 6.2 puede ser interpretada en términos del mecanismo general propuesto en primer lugar por Margerum³⁴³ –siendo posteriormente perfeccionado por Chung *et al.*–^{344,345} para la disociación de complejos poliamínicos mediada por ácido. De acuerdo con este mecanismo, los nitrógenos amínicos se disocian de los iones metálicos sin que se produzca inicialmente su substitución por una molécula de agua. Este proceso da como resultado la generación de un intermedio activado susceptible de sufrir ataques tanto por parte del disolvente como de protones presentes en el medio. En el caso bajo estudio, la ausencia de una intersección significativamente distinta de cero en el ajuste de los datos indica que la descomposición de los complejos tiene lugar exclusivamente a través de la ruta del ataque protónico.

Llegado este punto puede ser interesante comparar los resultados cinéticos obtenidos con aquellos publicados en la bibliografía para el complejo de Cu(II) con el ligando no-alquilado **L1-H**.¹⁷⁶ A pesar que $[\text{CuL1-H}]^{2+}$ se descompone siguiendo una dependencia de segundo orden con respecto a la concentración de ácido, hecho que implica la existencia de una etapa limitante asociada a la ruptura del segundo enlace Cu-N, los valores de k_{obs} determinados para concentraciones de H^+ similares a las usadas para **L1-Me₃** y **L1-MeiPr₂** son cerca de dos órdenes de magnitud superiores. Este hecho puede resultar sorprendente dada la similitud de las estructuras y los espectros de absorción entre los tres complejos. Sin embargo, los valores determinados para $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ son del orden de los encontrados para la descomposición de especies $[\text{CuHL}]^{3+}$ en ligandos de tipo escorpiando derivados del *tren*.³⁴⁶ Cabe destacar que estos complejos también presentan cinéticas de descomposición de primer orden con respecto a la concentración de protones. En este caso, los cambios en las cinéticas con respecto al macrociclo no-alquilado **L1-H** fueron interpretados en términos del mecanismo típico comentado anteriormente y se relacionaron con la diferente distorsión estructural inducida por la presencia del grupo dador protonado en la cadena colgante. La

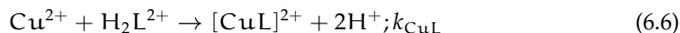
observación de efectos cinéticos similares para $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ sugiere que la desaceleración en el proceso de descomposición esta probablemente más relacionada con el efecto de la alquilación que con la protonación de los grupos dadores no-coordinados.

Con respecto a las cinéticas de formación de los complejos de Cu(II) con los ligandos **L1-Me₃** y **L1-MeiPr₂**, estas fueron realizadas en un medio moderadamente ácido bajo condiciones de no-pseudo primer orden mediante la mezcla de disoluciones del ion metálico y del ligando en un ratio molar 1:1. Los estudios se realizaron en el intervalo de pH comprendido entre *ca.* 2.0 y 5.5 evitando la adición de ningún tampón ya que este, como se ha observado previamente, puede perturbar significativamente en los resultados cinéticos. Esto puede ser debido a la interacción entre el propio tampón y el ion metálico o las especies protonadas de ligando.³⁴⁷⁻³⁵¹ A pesar de la similitud entre los ligandos **L1-Me₃** y **L1-MeiPr₂**, los resultados de los estudios cinéticos de complejación para ambos ligandos son significativamente distintas. Mientras que las cinéticas de **L1-Me₃** requirieron del uso de técnicas de flujo detenido, las del ligando **L1-MeiPr₂** se pudieron seguir mediante espectrometría convencional de UV-vis debido a su cinética de formación más lenta. Por lo tanto, de igual modo a lo observado para la descomposición de los complejos, parece que los efectos estéricos asociados a la presencia de los dos grupos isopropilo en la estructura de los ligandos puede también causar una disminución de su velocidad de formación.

La formación de los complejos (ec. 6.3) tiene lugar en una sola etapa cinética para ambos ligandos, coincidiendo su espectro final con el de las respectivas especies $[\text{CuL}]^{2+}$. Cabe destacar que la formación de los complejos se ha observado incluso a valores de pH cercanos a 2. Pero, mientras que este dato está de acuerdo con la distribución de especies de **L1-Me₃** mostrada en la Figura 6.1 (la cual anticipaba la formación de cantidades significativas de $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ a estos valores de pH); la formación de $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$ bajo estas condiciones sugiere que su correspondiente constante de formación (Tabla 6.1) puede haber sido subestimada, probablemente a causa de que presenta una cinética extremadamente lenta en medio fuertemente ácido.



A la hora de realizar el ajuste de los datos a una ecuación cinética se probó en primer lugar el ajuste a un solo proceso de segundo orden, de primer orden tanto con respecto al ion metálico como al ligando. Los valores resultantes para las constantes de velocidad obtenidos mostraron un cierto grado de dependencia con respecto al valor de pH, hecho que concuerda con la existencia de un equilibrio ácido-base previo a la reacción de formación de los complejos y más rápido que esta. En cualquier caso, debido a la ausencia de tampón durante las medidas, la concentración de protones puede haber sufrido una variación significativa durante el curso de la reacción, hecho que puede haber implicado cambios en el valor de k_{obs} en función del pH. Por este motivo, los datos cinéticos fueron ajustados al modelo propuesto en las ecuaciones 6.4 a 6.6, considerando de este modo todos los pre-equilibrios ácido-base relevantes de protonación del ligando; seguido de la determinación de la velocidad de formación de los complejos a través de la reacción de Cu(II) con H_2L^{2+} (la cual es la especie predominante del ligando en las condiciones de trabajo).



Durante el ajuste de las ecuaciones se tomaron los valores potenciométricos de las constantes de protonación de los ligandos, los cuales fueron fijados, al tiempo que se mantuvo libre la concentración de protones con el tiempo. Pese a esto, el valor de k_{obs} continuó mostrándose dependiente del pH a valores bajos de este (ver Figura 6.7). La representación de los datos sugiere la presencia de una reacción de protonación adicional con un valor de $\log K$ entre 2.5 - 3.5. Sin embargo, si se introduce una hipotética especie H_3L^{3+} , se obtienen resultados insatisfactorios con el modelo cinético. En concreto, la toma en consideración de este equilibrio adicional

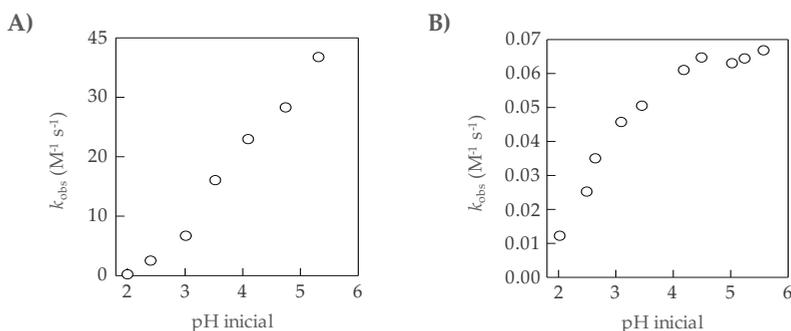


Figura 6.7 – Representación de la dependencia con el pH de las constantes observadas de velocidad de formación de: A) complejo $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ y B) complejo $[\text{CuL1-MeiPr}_2]^{2+}$. Todas las cinéticas han sido realizadas a $298.1 \pm 0.2 \text{ K}$ en presencia de NaClO_4 0.15 M . $[\text{Cu}]_0 = [\text{L}]_0 = 10^{-3} \text{ M}$.

da un valor de $K_{\text{H}_3\text{L}}$ de *ca.* 3.0 para **L1-Me₃** y de *ca.* 2.6 para **L1-MeiPr₂**. De hecho, los valores de $K_{\text{H}_3\text{L}}$ obtenidos por el ajuste de los datos da lugar a constantes suficientemente grandes como para que sus respectivos equilibrios de protonación pudiesen haber sido observados experimentalmente en los estudios potenciométricos.

Con el fin de descartar cualquier posibilidad de que la dependencia de la constante de velocidad con el pH fuese causada por los cambios en la concentración de protones en las medidas cinéticas, se decidió reemplazar los valores de k_{obs} de la Figura 6.7 por los estimados mediante el método de estados iniciales. Las Figuras 6.8 y 6.9 muestran los cambios obtenidos en las constantes de velocidad en función del pH para ambos ligandos. Estas representaciones muestran de nuevo la existencia de un equilibrio ácido-base que no puede ser asignado a la propia protonación del ligando. Es por ello que se tomó en consideración la posibilidad que la dependencia de la constante observada de complejación con el pH fuese causada por la existencia de un equilibrio ácido-base correspondiente a una reacción intermedia, de modo que la formación del complejo tuviese lugar a través del mecanismo propuesto en la Figura 6.10. Para la elaboración de este modelo se han tenido en cuenta una serie de consideraciones basadas en los resultados ob-

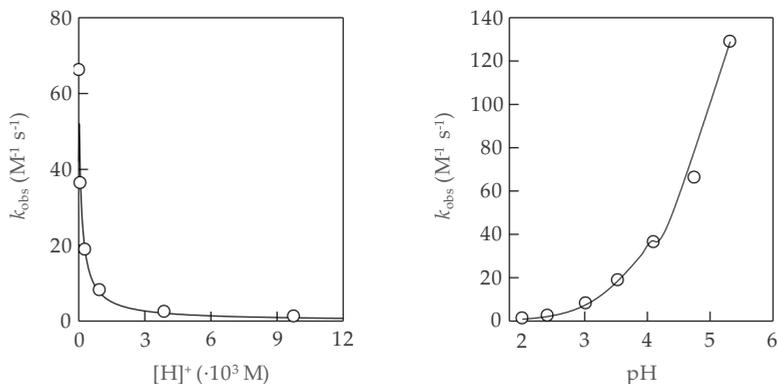


Figura 6.8 – Representación de la dependencia con la concentración de ácido (izquierda) y con el pH (derecha) de la constante observada de velocidad para la formación del complejo $[\text{CuL1-Me}_3]^{2+}$ a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. La línea continua representa el ajuste de los datos a la ecuación 6.7 en el texto principal.

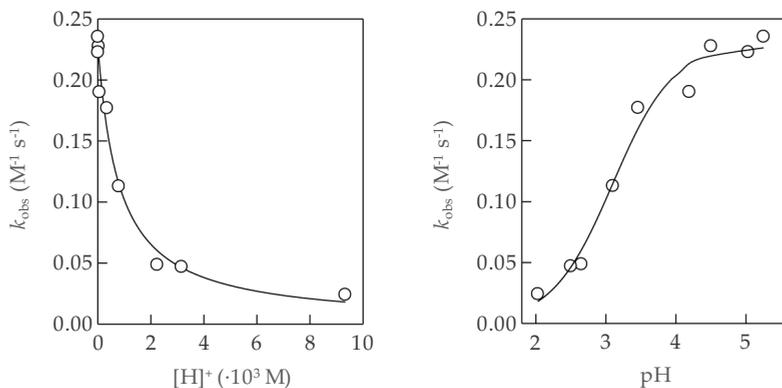


Figura 6.9 – Representación de la dependencia con la concentración de ácido (izquierda) y con el pH (derecha) de la constante observada de velocidad para la formación del complejo $[\text{CuL1-Me;Pr}_2]^{2+}$ a 298.1 ± 0.2 K en presencia de NaClO_4 0.15 M. La línea continua representa el ajuste de los datos a la ecuación 6.7 en el texto principal.

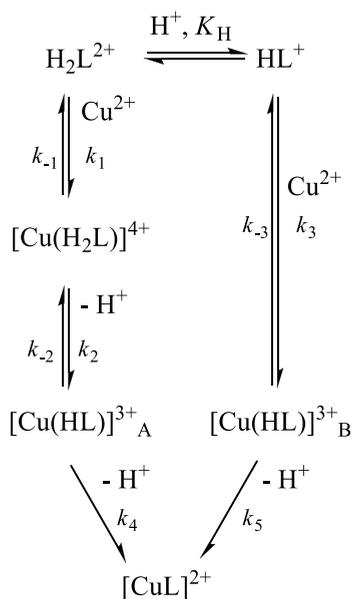


Figura 6.10 – Mecanismo de reacción propuesto para la formación de $[CuL]^{2+}$

servados hasta el momento. En primer lugar, en el mecanismo de formación de los complejos se tiene en cuenta la presencia de un equilibrio previo entre las especies HL^+ y H_2L^{2+} . El equilibrio correspondiente a la primera protonación de L ha sido ignorado a causa de la concentración despreciable de su forma totalmente desprotonada en las condiciones de trabajo. En segundo término, se considera que el Cu(II) puede reaccionar tanto con la forma mono-, como con la forma diprotonada del ligando para llegar a formar la especie $[CuL]^{2+}$ a través de dos mecanismos paralelos. De esta forma, por un lado la reacción del cobre con H_2L^{2+} da lugar a las especies $[CuH_2L]^{4+}$ y $[CuHL]^{3+}_A$, las cuales mantienen entre ellas un equilibrio ácido-base; mientras que la reacción de Cu(II) con HL^+ da lugar a la formación de $[CuHL]^{3+}_B$. En tercer lugar, se considera que la formación de la especie final $[CuL]^{2+}$ tiene lugar mediante una reorganización de los intermedios protonados $[CuHL]^{3+}_A$ y $[CuHL]^{3+}_B$.

El hecho que no haya sido observada la acumulación de ningún intermedio de reacción sugiere la idea que la reacción tiene lugar en una sola etapa cinética, por

lo que se puede considerar que todos los intermedios se forman bajo condiciones de estado estacionario. Esto conduce a la deducción de la ecuación de la velocidad mostrada en el Anexo B, de la que se obtiene la ecuación de la constante de velocidad:

$$k_{\text{obs}} = \frac{ac + (a + b)[H]}{([H] + K_H)([H] + c)} \quad (6.7)$$

donde $a = \frac{k_3k_5K_H}{k_{-3} + k_5}$, $b = K_1K_2k_4$ y $c = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_{-1}k_{-2}}$. y $k_1 = \frac{b}{c}$. A pesar que estos tres parámetros incluyen componentes de diferentes constantes de equilibrio y velocidad, su valor se puede asociar a una de las dos rutas de formación de los complejos de Cu(II) (a través de la especie HL^+ o a través de la H_2L^{2+}). Así, mientras que "a" puede servir como indicador de la contribución de la ruta de HL^+ , ya que tan sólo presenta constantes cinéticas de esta; los parámetros "b" y "c" se pueden corresponder con la contribución de la ruta de H_2L^{2+} por idéntico motivo. Asimismo, la constante de velocidad mecanísticamente relevante es k_1 , que toma el valor $k_1 = \frac{b}{c}$. Los valores de los parámetros "a", "b", "c" y k_1 obtenidos a través del ajuste de los datos representados en las Figuras 6.8 y 6.9 mediante el uso de la ecuación 6.7 han sido recopilados en la Tabla 6.2.

De estos resultados se puede extraer una observación muy interesante: mientras que ambos parámetros "a" y "b" toman valores elevados para las cinéticas de formación de complejos de Cu(II) por parte de **L1-Me₃**, para el ligando **L1-Me_iPr₂** el valor de "a" es despreciable. Esto significa que, mientras que para **L1-Me₃** los

Tabla 6.2 – Resumen de los parámetros cinéticos derivados del ajuste de los datos mostrados en las Figuras 6.8 y 6.9 mediante la ecuación 6.7.

Parámetro	L1-H^a	L1-Me₃	L1-Me_iPr₂
a (s ⁻¹)	-	$(4.05 \pm 0.08) \cdot 10^{-4}$	-
b (s ⁻¹)	-	$(7.9 \pm 0.4) \cdot 10^{-3}$	$(1.8 \pm 0.2) \cdot 10^{-4}$
c (M)	-	$(1.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-4}$	$(8 \pm 1) \cdot 10^{-4}$
k_1 (M ⁻¹ s ⁻¹)	0.011 ± 0.0002	46 ± 4	0.22 ± 0.004

^aDatos tomados de la bibliografía.¹⁷⁶

complejos se forman a través tanto de la forma monoprotonada del ligando como de la diprotonada, en el caso de **L1-MeiPr₂** la complejación con Cu(II) se produce exclusivamente a través de la forma H_2L^{2+} . La ausencia de una ruta válida de complejación para $HL1-MeiPr_2^+$ indica que el efecto estérico asociado a la presencia de los grupos isopropilo evita la formación de especies capaces de evolucionar hacia los complejos CuL.

Con respecto a la naturaleza de los intermedios formados inicialmente en ambas rutas, $[CuH_2L]_A^{4+}$ y $[CuHL]_B^{3+}$, sería razonable pensar que responden a especies en que el ligando actúa como monodentado. Es previsible que estas especies se formen a través de la interacción del orbital HOMO del ligando con el LUMO del Cu(II), por lo que la composición de los orbitales en estos ligandos puede proporcionar información útil acerca de sus correspondientes intermedios. El análisis de los orbitales HOMO para las formas diprotonadas de ambos ligandos **L1-Me₃** y **L1-MeiPr₂** (ver Figura 6.11C y D) muestra que estos se encuentran localizados principalmente sobre la amina central terciaria N3. Por el contrario, el correspondiente estudio de los HOMO para las formas monoprotonadas de los ligandos (ver Figura 6.11A y B) muestra que los orbitales en estos casos se encuentran localizados en los pares solitarios de las aminas de N2 y N4, apuntando hacia el centro de la cavidad. Por lo tanto, en la aproximación del Cu(II) a la estructura HL^+ es de esperar que los grupos isopropilo en $HL1-MeiPr_2^+$ generen un impedimento estérico mucho mayor que los grupos metilo de $HL1-Me_3^+$, por lo que es razonable pensar en el bloqueo de esta ruta a causa de los mismos. De esta forma, a pesar que la imagen general del mecanismo es, evidentemente, mucho más compleja, mediante este análisis se puede explicar la participación despreciable de HL^+ en la ruta de complejación de Cu(II) por parte de **L1-MeiPr₂**.

Por otra parte, los valores de k_1 mostrados en la Tabla 6.2 merecen también algún comentario adicional. En primer lugar, cabe destacar el valor significativamente mayor de este parámetro para los ligandos **L1-Me₃** y **L1-MeiPr₂** que en el caso de **L1-H**. A pesar que la etapa determinante en la velocidad de formación los complejos corresponde a un estado posterior en los ligandos alquilados, k_1 está relacionada con la complejación de Cu(II) por parte de H_2L^{2+} , donde el ligando

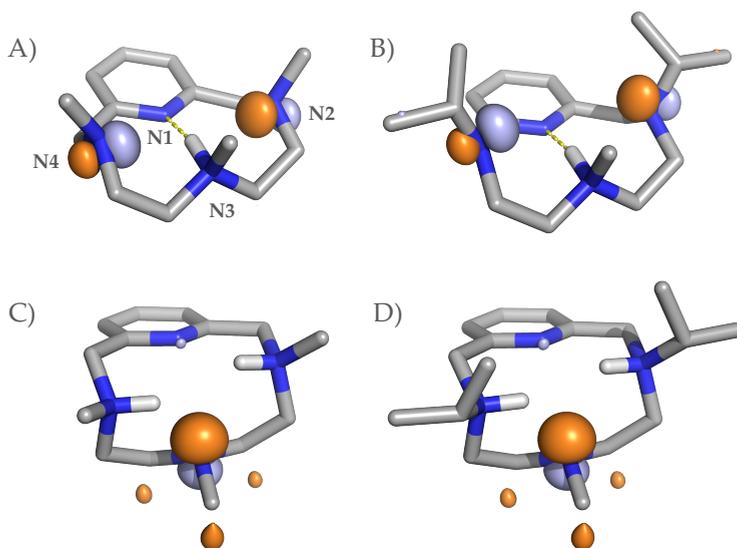


Figura 6.11 – Orbital HOMO correspondiente a la estructura más estable de las especies monoprotonadas: A) HL1-Me_3^+ y B) HL1-MeiPr_2^+ y las diprotonadas C) $\text{H}_2\text{L1-Me}_3^{2+}$ y D) $\text{H}_2\text{L1-MeiPr}_2^{2+}$. En la representación se ha utilizado un valor de isosuperficie de 0.1.

actúa como quelante monodentado. De esta forma, k_1 representa una medida directa de la velocidad de formación del primer enlace Cu-N. Como sería esperable, el valor de este parámetro decrece cuando aumentan los impedimentos estéricos en el ligando, de forma análoga al análisis de las constantes de estabilidad de los complejos. Esta reacción tiene lugar previsiblemente a través del mecanismo de Eigen-Wilkins,³⁵² basado en una formación temprana de un complejo de esfera externa, seguida de una segunda etapa en que las aguas de coordinación del metal son substituidas por las aminas del ligando. Este proceso está regulado por dos parámetros: la constante de equilibrio K_{ex} para la formación del complejo de esfera externa y la constante cinética k_{int} para el intercambio del agua por el ligando en la complejación del metal. Así, la constante de velocidad total de la reacción tiene un valor cercano al de producto $K_{\text{ex}} \cdot k_{\text{int}}$,³⁵³ siendo este del orden de $4.4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ para el Cu(II) en disolución acuosa.³⁵⁴ La enorme diferencia entre

el valor de la constante de intercambio de las aguas de coordinación del Cu(II) acuoso y k_1 no puede ser justificada exclusivamente por la repulsión electrostática entre las cargas del metal y la especie H_2L^{2+} , ya que el valor de la constante de formación el complejo de esfera externa (K_{ex}) entre dos especies con carga +2 es del orden de $7.4 \cdot 10^{-3}$,³⁵⁵ lo que debería dar lugar a una k_1 de varios órdenes de magnitud mayor que la observada experimentalmente. Todo ello sugiere que el valor tan bajo determinado para k_1 puede ser debido a los impedimentos estéricos presentes en las especies H_2L^{2+} . Este análisis es coherente con las observaciones de Rorabacher, según las cuales la velocidad de complejación por parte de una amina se ve reducida en el sentido $NH_3 > RNH_2 > R_2NH > R_3N$; así como con la alteración en la naturaleza de R al pasar de ser un grupo metilo a uno etilo.³⁵⁶ Si se considera que el primer enlace Cu-N se forma a través de la amina metilada central de la cadena alifática, tal y como muestran los diferentes estudios realizados, la diferencia en el valor de k_1 entre **L1-Me**₃ y **L1-Me**₁**Pr**₂ puede indicar un efecto adicional de los sustituyentes de los nitrógenos adyacentes.

En último lugar, cabe decir que no ha sido posible resolver el valor de k_1 para **L1-H**. Pese a esto, el limitado efecto de los impedimentos estéricos en este receptor y la mayor estabilidad mostrada por los complejos $[CuL1-H]^{4+}$ hacen suponer un valor de k_1 mayor que el determinado para sus análogos alquilados. En este mismo sentido, la constante de velocidad determinada experimentalmente de $0.011 M^{-1} s^{-1}$ para la complejación de Cu(II) por parte de H_2L1-H^{2+} implica que la etapa limitante en esta reacción no se corresponde con la formación del primer enlace Cu-N.

Grupo L2 o grupo piridol

Siguiendo con el estudio de los complejos de Cu(II), tras el grupo L1 se procedió a analizar la capacidad de interacción por parte de los ligandos del grupo L2 o grupo piridol. Cabe recordar que dentro de este conjunto de ligandos podemos encontrar aquellos análogos estructurales del grupo L1 en los que la piridina ha sido substituida por un grupo piridólico. Comprendidos en este conjunto se encuentran los compuestos **L2-H** y **L2-Me**₃. En la Tabla 6.3 se pueden encontrar

los valores logarítmicos de las constantes de complejación determinadas, mientras que los correspondientes diagramas de distribución se pueden hallar en la Figura 6.12.

Mediante el estudio potenciométrico de los ligandos del grupo L2 se han podido determinar tres constantes de complejación con Cu(II), correspondientes a la formación del complejo mononuclear $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]$ y sus especies monoprotonada y monohidroxilada $[\text{CuL}]$ y $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]$.

Como se puede observar en la Tabla 6.3, la principal diferencia en el modo de complejación de Cu(II) mostrada por este grupo, en comparación con los ligandos del grupo L1, es el elevado valor de sus constantes de estabilidad. Al comparar

Tabla 6.3 – Constantes logarítmicas de complejación del ligando **L2-H** y su derivado metílico **L2-Me₃** con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^a	L2-H	L2-Me ₃
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuL}]$	13.87 ^b	3.6(1)
$\text{Cu} + \text{H}_{-1}\text{L} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	19.35(3)	22.94(8)
$[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	-9.42(5)	-7.16(9)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

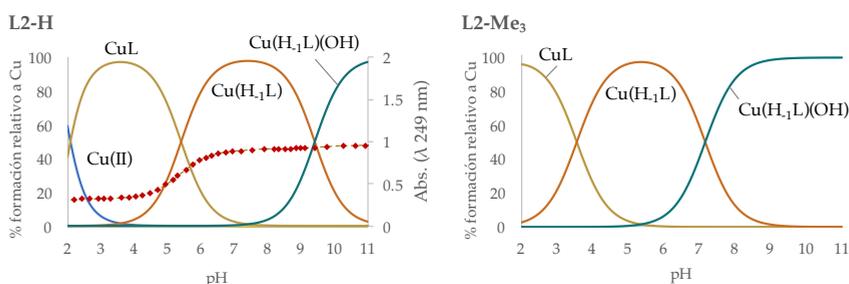


Figura 6.12 – Diagramas de distribución de los complejos de **L2-H** y **L2-Me₃** con Cu(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de **L2-H** se ha superpuesto su absorbancia UV-Vis a 249 nm (línea punteada). $[\text{L}]=[\text{Cu}]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

las constantes de formación de los complejos $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L}_2)]$ con las equivalentes de formación de $[\text{CuL}_1]$ se puede observar una diferencia de varias unidades logarítmicas entre ellas. A modo de ejemplo se pueden comparar los sistemas **L1-Me₃** y **L2-Me₃**: mientras que la formación del sistema $[\text{CuL1-Me}_3]$ presenta una constante de 16.44 unidades logarítmicas, la de su equivalente $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L2-Me}_3)]$ es de 22.94. Es decir, al introducir un grupo hidroxilo en para el nitrógeno de la piridina hemos aumentado hasta seis órdenes de magnitud el valor de su constante de complejación.

El efecto del piridol se puede explicar atendiendo al equilibrio cetoenólico observado anteriormente en el capítulo de *Comportamiento ácido base*. La temprana desprotonación del hidroxilo piridólico posibilita la redistribución de carga en el segmento aromático, pudiéndose localizar ahora sobre el propio nitrógeno. Esta elevada densidad electrónica mejora la capacidad dadora del propio nitrógeno, con lo que contribuye a la estabilización de los complejos de Cu(II). Esta explicación viene reforzada por el hecho que, asociada a la reacción de formación de estos complejos, se produzca la desprotonación del grupo hidroxilo (ver Figura 6.12).

Grupo L3/4 o grupo piridina carboxílica

En último lugar, se ha procedido al estudio de la capacidad de complejación de los ligandos **L3-H**, **L3-Me₃** y **L4-Me₃** con Cu(II). Las constantes potenciométricas de formación de dichos complejos se pueden encontrar en las Tablas 6.4 y 6.5, mientras que los diagramas de distribución correspondientes se hallan en la Figura 6.13.

Tabla 6.4 – Constantes logarítmicas de complejación del ligando **L3-H** y su derivado metílico **L3-Me₃** con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M.

Reacción ^a	L3-H	L3-Me₃
$\text{Cu} + \text{H}_{-1}\text{L} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	17.61(2) ^b	16.35(4)
$[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	-9.07(2)	-9.24(6)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

Tabla 6.5 – Constantes logarítmicas de complejación del ligando **L4-Me₃** con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L4-Me₃
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuL}]$	16.64(4) ^b

^a Las cargas han sido omitidas. ^b El valor en paréntesis indica el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

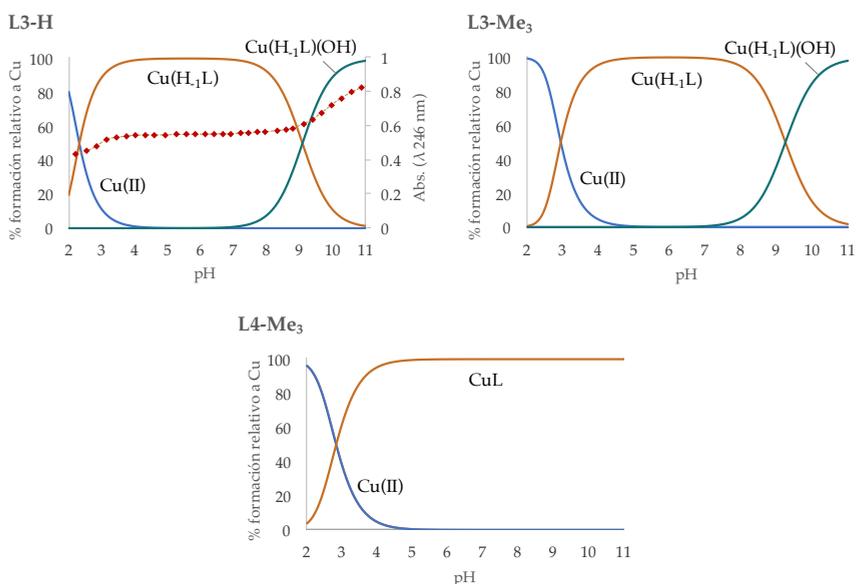


Figura 6.13 – Diagramas de distribución de los complejos de **L3-H**, **L3-Me₃** y **L4-Me₃** con Cu(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de **L3-H** se ha superpuesto su absorbancia UV-Vis a 246 nm (línea punteada). $[\text{L}]=[\text{Cu}]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

Un primer análisis de las constantes determinadas muestra que para los compuesto de la familia L3 se han podido determinar dos constantes de complejación, correspondientes a la formación de las especies $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]$ y $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]$; mientras que para **L4-Me₃** tan solo se ha podido determinar la constante de esta-

bilidad del complejo $[\text{CuL4-Me}_3]$. Pese a ello, cabe indicar que la especiación de los complejos de este último ligando puede estar sujeta a un error significativo, debido a la tendencia del grupo éster a hidrolizarse a pH básico.

Al comparar las constantes de estos ligandos con las determinadas para los sistemas de los grupos L1 y L2, se puede observar el efecto del grupo carboxilo sobre la complejación de Cu(II). La capacidad electroattractora de este grupo conlleva la reducción de la capacidad dadora del nitrógeno piridínico, hecho que deriva en la desestabilización de los complejos y por tanto en una ligera reducción de sus constantes de estabilidad.

Con respecto a la protonación del grupo carboxilo, el seguimiento de la banda de absorción de la piridina en función del pH muestra la pérdida de este hidrógeno simultáneamente a la formación del primer complejo (ver Figura 6.13). Este comportamiento recuerda al observado en el grupo L2, y su explicación puede ser equivalente: la eliminación de este hidrógeno puede contribuir a aumentar la densidad de carga negativa sobre el nitrógeno piridínico, contribuyendo a la estabilización de los complejos de Cu(II). La segunda variación en la intensidad de absorción de la piridina, la cual tiene lugar a pH superior a 9, puede asociarse a la formación del complejo hidroxilado.

Más allá de estos resultados, cabe mencionar que se ha podido cristalizar un complejo dímico, cuya formación no ha podido ser determinada por potenciometría. En esta estructura, mostrada en la Figura 6.14, se puede observar cómo dos

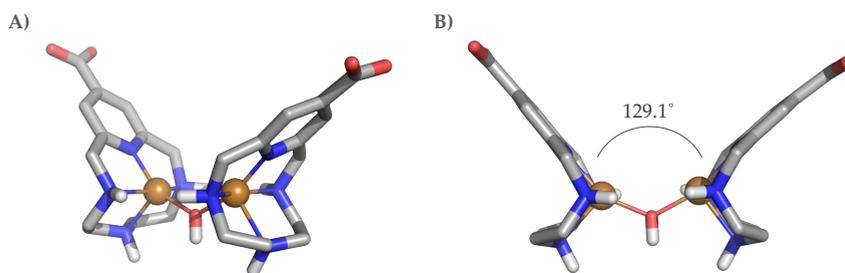


Figura 6.14 – Representación de las estructura cristalina del complejos dimérico de fórmula $[\{\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L3-H})\}_2(\mu\text{-OH})]\text{ClO}_4$, donde ambos cobres se encuentran unidos a través de un anión hidroxilo. Perspectiva oblicua (A) y lateral (B).

complejos de Cu(II) se unen a través de un anión hidroxilo que ocupa la quinta posición coordinante de cada átomo metálico. En cada uno de los complejos, el cobre está coordinado por los cuatro nitrógenos del macrociclo y por el mencionado hidroxilo puente en una geometría de pirámide de base cuadrada ($\tau_5 = 0.06$).

6.2.2 ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN CON Fe(II)

Grupo L1 o grupo piridina

El segundo metal cuya complejación por parte de los ligandos de pequeña capacidad ha sido estudiada es el Fe(II). Como se ha explicado en el *Capítulo I - Introducción* de la tesis, el Fe(II) forma parte del centro activo de un isoenzima de la superóxido dismutasa presente en diversos organismos, principalmente en bacterias.³⁵⁷ Asimismo, este metal es capaz de presentar actividad catalasa/peroxidasa en función de su entorno de coordinación. Es por todo ello que puede ser un candidato muy interesante a ser estudiado de cara a ensayar la actividad antioxidante de sus complejos.

Las constantes de complejación determinadas para el Fe(II) con los ligandos del grupo L1 se pueden encontrar en la Tabla 6.6, mientras que los diagramas de distribución de especies se hallan en la Figura 6.15. Cabe añadir que, pese a no encontrarse en la memoria, también se ha estudiado la interacción del ligando **L1-Me**₁**Pr**₂ con Fe(II), mostrando ausencia de complejo formado a pH fisiológico.

Mediante los estudios potenciométricos se han podido determinar entre dos

Tabla 6.6 – Constantes logarítmicas de complejación del ligando **L1-H** y su derivado metílico **L1-Me**₃ con Fe(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L1-H	L1-Me ₃
$\text{Fe} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{FeL}]$	12.68(2) ^b	9.72
$[\text{FeL}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{FeL}(\text{OH})] + \text{H}$	-6.94(5)	-9.08(4)
$[\text{FeL}(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{FeL}(\text{OH})_2] + \text{H}$	-	-10.58(5)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

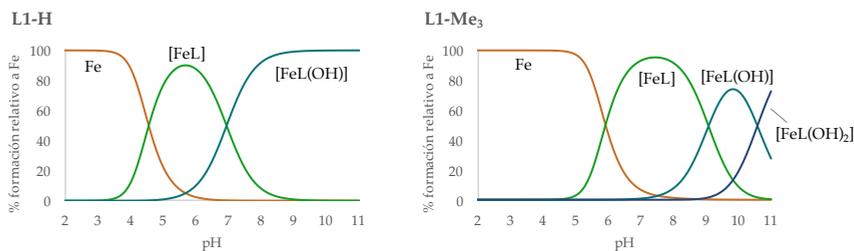


Figura 6.15 – Diagramas de distribución de los complejos de **L1-H** y **L1-Me₃** con Fe(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. $[L]=[Fe]=10^{-3}M$. Las cargas han sido omitidas.

y tres constantes de complejación con Fe(II) para los ligandos del grupo L1 **L1-H** y **L1-Me₃**. De igual modo que en los complejos de Cu(II), la especiación de estos sistemas no es demasiado compleja, pudiéndose observar para todos los ligandos la formación de la especie mononuclear $[FeL]^{2+}$, así como su complejo monohidroxilado $[FeL(OH)]^+$. Cabe mencionar la presencia de la especie dihidroxilada $[FeL(OH)_2]$ para **L1-Me₃**.

De forma análoga a lo observado en la coordinación con Cu(II), las constantes de formación de los complejos de Fe(II) siguen la tendencia **L1-H** > **L1-Me₃**. Es decir, la metilación de las aminas implica la reducción de la estabilidad de los correspondientes complejos de Fe(II). Como ya se ha explicado para los complejos cúpricos, la menor estabilidad aportada por los ligandos metilados está relacionada con la reducción de la solvatación de las aminas ante la pérdida de su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con las aguas del entorno.

Al comparar las constantes de los complejos de Fe(II) (Tabla 6.6) con las equivalentes de Cu(II) estudiadas anteriormente (Tabla 6.1) podemos observar una importante diferenciación en sus valores. Mientras que la constante de estabilidad para el Cu(II) se encuentra alrededor de las 16 ~ 17 unidades logarítmicas cuando este forma complejos con **L1-H** y **L1-Me₃**, estos valores se ven reducidos hasta alrededor de las 13 o incluso 10 unidades para el Fe(II). Pese a ello, su valor es lo suficientemente elevado como para que sus complejos predominen en un amplio intervalo de pH. Esta reducida estabilidad de los complejos de Fe(II), y en especial

la del complejo con **L1-Me₃**, se ve reflejada en los diagramas de distribución de especies (Figura 6.15). En estos se puede observar cómo la formación de los complejos tiene lugar a un pH relativamente alto (4 ~ 5), especialmente para la especie trimetilada, para la que a pH fisiológico (7.40) todavía existe un 3 % de Fe(II) libre.

La mayor estabilidad de los complejos de Cu(II) frente a los de Fe(II) forma parte de lo esperable si tenemos en cuenta los efectos de la solvatación de los iones metálicos y la estabilización del campo cristalino, resumido todo ello en la conocida como serie de Irving-Williams.³⁵⁸ En esta se establece que la estabilidad de los complejos con metales divalentes de la primera serie de transición sigue la tendencia $Mn(II) < Fe(II) < Co(II) < Ni(II) < Cu(II) > Zn(II)$. En el caso concreto que nos ocupa, Fe(II) frente a Cu(II), son principalmente tres los factores que determinan el diferente valor de las constantes de estabilidad. En primer lugar, el menor radio iónico del Cu(II) en comparación con el que muestra el Fe(II) para el mismo estado de oxidación convierte al primero en un ion más duro que el segundo. Ello comporta una mayor polarización de los átomos coordinantes por parte del cobre y, en consecuencia, una mayor transferencia de carga de estos hacia el metal, lo que aporta una estabilización extra a los complejos. En segundo lugar, la estabilización del campo cristalino juega también un papel fundamental a la hora de explicar la serie. Para los complejos octaédricos de estos metales, todos ellos de campo débil a excepción del Mn(II) (que no presenta estabilización de campo), el valor de estabilización Dq es cada vez más negativo al aumentar en la serie: $-4 Dq$ para Fe(II), $-8 Dq$ para Co(II) o $-12 Dq$ para Ni(II). Es decir, al avanzar en esta primera serie de transición el efecto del campo favorece la estabilización de los complejos metálicos. Este efecto se invierte al llegar al Cu(II), cuya estabilización en un campo puramente octaédrico es de $-6 Dq$. Pese a ello, con esta contribución del campo las especies de Cu(II) todavía se verían favorecidas con respecto a las de Fe(II). Pero el factor determinante que acaba de explicar la tendencia general de la serie de Irving-Williams y, en particular, el mayor valor de las constantes de estabilización determinadas para los complejos de Cu(II), es la distorsión de Jahn-Teller que presentan estos últimos. La elongación de los enlaces de coordinación en posición axial contribuye de forma decisiva a la estabilización de los orbitales

d de este metal y, por extensión, a la de los complejos en sí mismos. De esta forma, mediante la contribución conjunta de los tres factores detallados (radio iónico del metal, contribución del campo cristalino y efecto de Jahn-Teller) se puede explicar la gran estabilidad de los complejos de Cu(II) en comparación con los de Fe(II).

Grupo L2 o grupo piridol

Siguiendo con el estudio de los complejos de Fe(II), tras el grupo L1 se procedió a analizar la capacidad de interacción por parte de los ligandos del grupo L2 o *grupo piridol*. Cabe recordar que dentro de este conjunto de ligandos podemos encontrar aquellos análogos estructurales del grupo L1 en los que la piridina ha sido substituida por un grupo piridol. Comprendidos en este conjunto se encuentran los compuestos **L2-H** y **L2-Me₃**. En la Tabla 6.7 se pueden encontrar los valores logarítmicos de las constantes de complejación determinadas, mientras que los correspondientes diagramas de distribución se pueden hallar en la Figura 6.16.

Mediante los estudios potenciométricos se han podido determinar cuatro constantes de complejación para **L2-H**, y tan solo dos para **L2-Me₃**. De forma análoga al grupo L1, los ligandos piridólicos muestran una especiación relativamente sencilla al complejar Fe(II). Se ha podido observar para los tres ligandos del grupo la formación tanto de la especie mononuclear [Fe(H₋₁L)] como la monohidroxilada [Fe(H₋₁L)(OH)], así como las formas mono- y diprotonada [FeH(H₋₁L)] y [FeH₂(H₋₁L)] para **L2-H**.

Tabla 6.7 – Constantes logarítmicas de complejación del ligando **L2-H** y su derivado metílico **L2-Me₃** con Fe(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L2-H	L2-Me₃
[FeH(H ₋₁ L)] + H ⇌ [FeH ₂ (H ₋₁ L)]	4.18(3) ^b	-
[Fe(H ₋₁ L)] + H ⇌ [FeH(H ₋₁ L)]	5.09(2)	-
Fe + H ₋₁ L ⇌ [Fe(H ₋₁ L)]	15.39(3)	10.77(3)
[Fe(H ₋₁ L)] + H ₂ O ⇌ [Fe(H ₋₁ L)(OH)] + H	-7.12(3)	-9.15(5)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

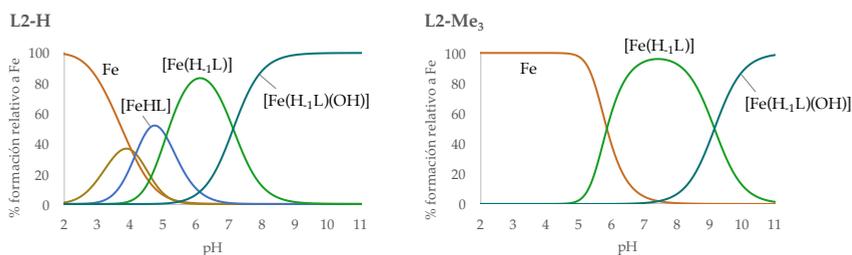


Figura 6.16 – Diagramas de distribución de los complejos de **L2-H** y **L2-Me₃** con Fe(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. $[L]=[Fe]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

En relación a las constantes de estabilidad, estas siguen las diferentes tendencias ya observadas en los estudios anteriores, por lo que no es necesario un análisis detallado de las mismas. En primer lugar, se puede observar que al metilar las aminas se reduce el valor de las constantes; efecto este asociado a la menor solvatación de las mismas. En segundo lugar, el grupo L2 en conjunto presenta constantes mayores de complejación con Fe(II) que el grupo L1. Por poner algún ejemplo, se puede comparar el valor de 12.68 unidades logarítmicas mostrado por **L1-H** con el de 15.39 de **L2-H**, o el valor de 9.72 determinado para **L1-Me₃** con el 10.77 de su análogo piridólico **L2-Me₃**. Como sucedía con los complejos de Cu(II), esto se puede explicar en términos de la mayor capacidad dadora del nitrógeno piridólico derivada del equilibrio cetoenólico del mismo. Por último, la comparación de las constantes determinadas para Fe(II) en comparación con las de Cu(II) muestra una reducción en su valor, explicable de igual modo que para el grupo L1 por la influencia del radio iónico del metal, la estabilización del campo cristalino y el efecto Jahn-Teller.

Grupo L3/4 o grupo piridina carboxílica

En tercer lugar, tras el estudio de la interacción de los ligandos pertenecientes a los grupos L1 y L2 con Fe(II), queda analizar la capacidad de interacción de los ligandos del grupo piridina carboxílica. En este caso, ante el limitado interés de los complejos Fe-**L3-H** (ver *Capítulo 7 - Actividad antioxidante*), y la escasez de

ligando con que contábamos, se decidió proceder al estudio de especiación con Fe(II) únicamente de los ligandos trimetilados (**L3-Me₃** y **L4-Me₃**). En la Tabla 6.8 se pueden encontrar los valores logarítmicos de las constantes de complejación determinadas, mientras que los correspondientes diagramas de distribución se pueden hallar en la Figura 6.17.

Mediante los estudios potenciométricos se han podido determinar tres constantes de complejación para ambos ligandos estudiados. De forma análoga a los grupos L1 y L2, los ligandos de los grupos L3 y L4 muestran una especiación relativamente sencilla al complejar Fe(II). Se ha podido observar para los tres ligandos del grupo la formación tanto de la especie mononuclear [Fe(H₋₁L)] como la monohidroxilada [Fe(H₋₁L)(OH)], así como su forma monoprotonada [FeH(H₋₁L)].

Tabla 6.8 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L3-Me₃** y **L4-Me₃** con Fe(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L3-Me₃	L4-Me₃
[Fe(H ₋₁ L)] + H ⇌ [FeH(H ₋₁ L)]	6.42(4) ^b	7.6(1)
Fe + H ₋₁ L ⇌ [Fe(H ₋₁ L)]	10.02(2)	9.3(1)
[Fe(H ₋₁ L)] + H ₂ O ⇌ [Fe(H ₋₁ L)(OH)] + H	-9.44(4)	-9.2(1)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

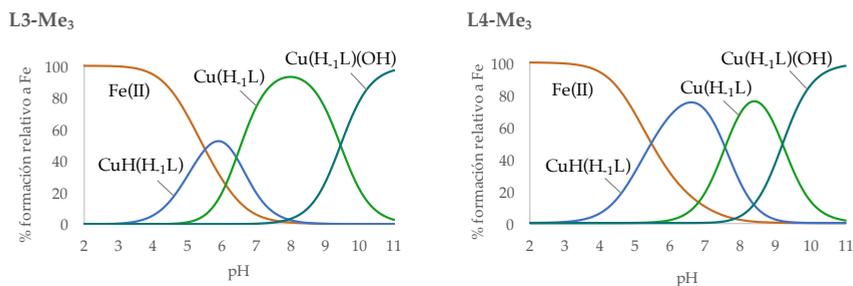


Figura 6.17 – Diagramas de distribución de los complejos de **L3-Me₃** y **L4-Me₃** con Fe(II), calculados a partir de las constantes potenciométricas. [L]=[Fe]=10⁻³M. Las cargas han sido omitidas.

El estudio de la capacidad de complejación de **L3-Me₃** y **L4-Me₃** con Fe(II) muestra una serie de tendencias ya observadas para el resto de ligandos analizados, cuya motivación se puede explicar en los mismos términos. En primer lugar, se puede observar que las constantes de formación del complejo [Fe(H₋₁L)] son muy similares para ambos ligandos, tal y como ya sucedía con la complejación de Cu(II). De esto se puede deducir que tanto el grupo carboxílico como el éster situados en para al nitrógeno piridínico tienen una influencia similar sobre la estabilización de los complejos metálicos. En segundo lugar, se puede destacar el reducido valor de las constantes de formación del complejo [Fe(H₋₁L)] en comparación con las relativas a la formación de los complejos cúpricos (diferencia de alrededor de 7 unidades logarítmicas). Como ya se ha visto, este hecho se puede explicar atendiendo a la influencia del radio iónico del metal, la estabilización del campo cristalino y el efecto Jahn-Teller. Por último, al comparar estas constantes con las determinadas para el resto de familias de ligandos muestra que **L3-Me₃** y **L4-Me₃** presentan una afinidad por el Fe(II) bastante similar a la del grupo L1, de forma análoga a lo observado para los complejos de Cu(II).

6.3 LIGANDOS BINUCLEANTES

6.3.1 ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN CON CU(II)

En el caso de los ligandos binucleantes (o hexaazapiridinofanos), se han seleccionado para su estudio los metales Cu(II) y Zn(II). Las constantes de complejación de los ligandos **L5** y **L6** con el Cu(II), así como las de los análogos **L7** y **L8** (ver Figura 6.18) descritas en la bibliografía,^{180,341} se recogen en las Tablas 6.9 y 6.10, respectivamente. Los diagramas de distribución en función del pH se pueden encontrar en las Figuras 6.19 y 6.20.

Los estudios potenciométricos de los sistemas Cu(II)-L muestran la formación de diferentes tipos de especies mono- y binucleares en función del grupo piridínico presente en el receptor macrocíclico. Por un lado, los ligandos piridólicos (**L5** y **L6**) presentan las especies mononucleares de estequiometría [CuH_x(H_yL)]^{(2+x+y)+} con valores de x comprendidos entre 0 y 5 y valores de y que varían de -1 a 0, así como las especies binucleares [Cu₂H(H₋₁L)]⁴⁺ y [Cu₂(H₋₁L)]³⁺. Respecto

Tabla 6.9 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L5** y **L6** con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L5	L6
$[\text{CuH}_4(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_5(\text{H}_{-1}\text{L})]$	3.79(6) ^b	4.13(2)
$[\text{CuH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_4(\text{H}_{-1}\text{L})]$	5.04(7)	5.22(2)
$[\text{CuH}_2(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]$	4.35(7)	6.30(4)
$[\text{CuH}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_2(\text{H}_{-1}\text{L})]$	6.16(4)	7.34(4)
$[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	8.24(4)	9.22(6)
$\text{Cu} + \text{H}_{-1}\text{L} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	23.56(4)	19.25(4)
$[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	-10.11(5)	-10.71(3)
$\text{Cu} + [\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})] \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})]$	8.80(4)	6.95(6)
$[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	-7.26(6)	-6.89(2)
$[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2] + \text{H}$	-8.20(6)	-9.90(1)
$\text{Cu} + \text{H}(\text{H}_{-1}\text{L}) \rightleftharpoons [\text{CuH}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	21.11	18.44(6)
$2\text{Cu} + \text{H}(\text{H}_{-1}\text{L}) \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	26.44(4)	-
$\text{Cu} + [\text{CuH}(\text{H}_{-1}\text{L})] \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{H}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	5.33(4)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

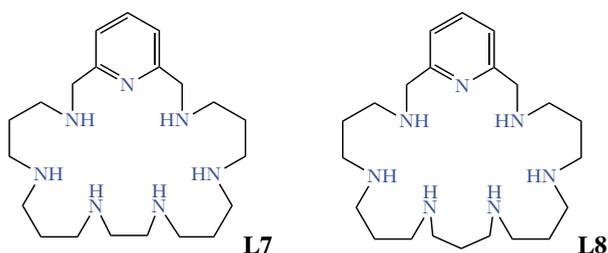


Figura 6.18 – Estructura de los compuestos **L7** y **L8**.¹⁸⁰

las especies hidroxiladas es también posible detectar la formación de los complejos mono- y binucleares de estequiometría $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]$, $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]^{2+}$ y $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2]^+$. Por su parte, los ligandos piridínicos (**L7**³⁴¹ y **L8**¹⁸⁰) presentan las especies mononucleares $[\text{CuH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$ con valores de x comprendidos entre 0 y 4, así como las especies binucleares $[\text{Cu}_2\text{L}]^{4+}$ y $[\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$. En los dia-

Tabla 6.10 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L7** y **L8** con Cu(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 0.15 M descritas en trabajos anteriores.^{180,341}

Reacción ^a	L7 ^b	L8 ^c
$[\text{CuH}_3\text{L}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_4\text{L}]$	4.69(2) ^d	3.82(2)
$[\text{CuH}_2\text{L}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_3\text{L}]$	4.65(2)	6.13(2)
$[\text{CuHL}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuH}_2\text{L}]$	7.56(3)	7.44(2)
$[\text{CuL}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuHL}]$	9.53(3)	9.75(3)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuL}]$	18.34(3)	17.22(6)
$\text{Cu} + [\text{CuL}] \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}]$	11.69(3)	7.96(6)
$[\text{Cu}_2\text{L}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Cu}_2\text{L}(\text{OH})] + \text{H}$	-7.72(3)	-7.26(6)

^aLas cargas han sido omitidas. ^bDatos tomados de la bibliografía.³⁴¹

^cDatos tomados de la bibliografía.¹⁸⁰ ^dLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

gramas de distribución mostrados en las Figuras 6.19 y 6.20 se puede observar que, mientras que para un ratio molar Cu(II):L 1:1 en el rango de pH de trabajo (de 2.0 a 11.0) tan solo existen en disolución las especies mononucleares, para un ratio 2:1 las especies binucleares son mayoritarias a partir de pH 4 para los ligandos **L5** y **L7** y por encima de pH 6 para **L6** y **L8**. Cabe indicar que la forma H_{-1}L del ligando corresponde a la especie con el hidroxilo piridólico desprotonado. El motivo por el que todos los complejos de **L5** y **L6** coordinan a través de esta forma del ligando se verá más adelante, en los estudios de UV-Vis.

Al comparar el valor de las constantes de complejación con Cu(II) que presentan los distintos ligandos (Tablas 6.9 y 6.10) se pueden identificar dos diferencias clave en su modo de coordinación con este metal. En primer lugar se puede observar que las constantes de formación de los complejos mononucleares son más elevadas en el caso de los receptores piridólicos que en los piridínicos. En segundo lugar, estas mismas constantes son también mayores en el caso de los ligandos con la cadena central etilénica frente aquellos que tienen únicamente cadenas propilénicas. Analicemos cada una de estas características en detalle.

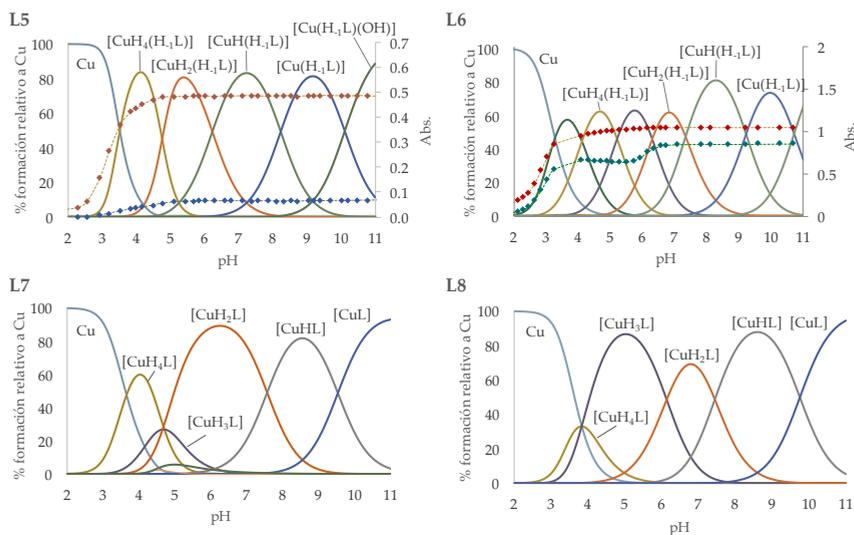


Figura 6.19 – Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:1 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama del ligando **L5** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 285 nm (línea punteada roja, transiciones π - π^*) y a 590 nm (línea punteada azul, transiciones d-d del metal). En el diagrama del ligando **L6** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 280 nm (línea punteada roja, transiciones π - π^*) y a 306 nm (línea punteada verde, transferencia de carga ligando Cu(II)).³⁵⁹ [L]=[Cu]= 10^{-3} M. Las cargas han sido omitidas.

Los ligandos **L5** y **L6**, es decir, aquellos con un hidroxilo en *para* al nitrógeno de la piridina, presentan constantes de complejación con cobre mayores que las de sus análogos piridínicos. Especialmente llamativo es el caso de la reacción de complejación por parte de los ligandos en su forma completamente desprotonada, llegando a presentar una diferencia de varias unidades logarítmicas entre los ligandos piridínicos y los piridólicos (los valores de logK para esta reacción son de 23.65(4) para **L5** y de 19.25(4) para **L6**, mientras que para **L7** y **L8** son, respectivamente, de 18.34(3) y 17.22(6)). Esta tendencia en el valor de las constantes recuerda a la de la primera reacción de protonación de los ligandos piridólicos (grupo L2). Esta familia de compuestos presenta una primera constante de proto-

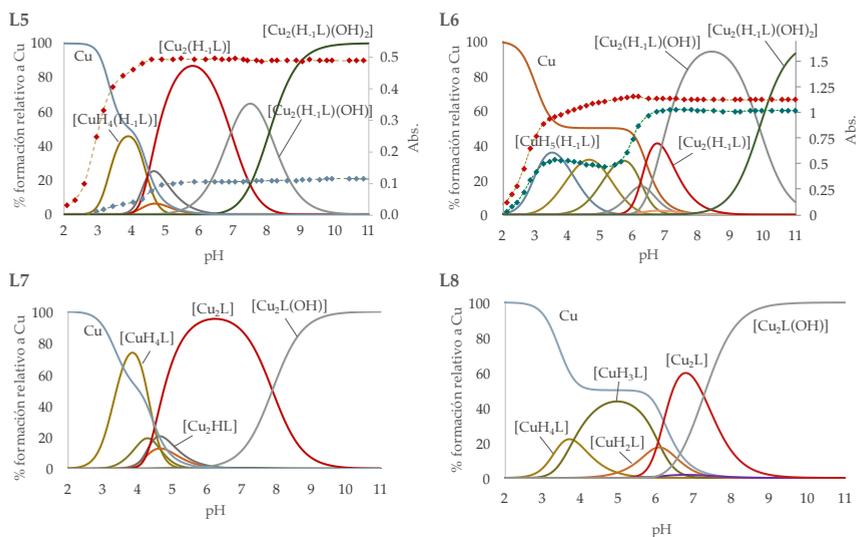


Figura 6.20 – Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:2 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama del ligando **L5** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 285 nm (línea punteada roja, transiciones π - π^*) y a 590 nm (línea punteada azul, transiciones d-d del metal). En el diagrama del ligando **L6** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 281 nm (línea punteada roja, transiciones π - π^*) y a 314 nm (línea punteada verde, transferencia de carga ligando Cu(II)).³⁵⁹ $[L]=[Cu]=10^{-3}M$. Las cargas han sido omitidas.

nación más elevada que la de sus análogos piridínicos, hecho que, como vimos, está relacionado con la estabilización de la forma ceto en el equilibrio ceto-enólico por la participación del nitrógeno piridínico en esta primera reacción. Un efecto similar puede estar sucediendo en la complejación del Cu(II). A falta de estructuras cristalinas de los complejos, la medición del espectro de absorción en función del pH de disoluciones de Cu(II):L puede proporcionar cierta información adicional.

Los complejos de Cu(II) que estamos estudiando presentan dos bandas con la suficiente intensidad como para poder ser monitorizadas por espectroscopía UV-Vis: una localizada a 285 nm, relacionada con la absorción del grupo piridol; y otra a 590 nm, correspondiente a las transiciones d-d del metal. Al seguir la banda

del grupo aromático para mezclas Cu(II):L5 1:1 (Figura 6.19), se puede observar una sola variación de la absorbancia, asociada a la formación del primer complejo metálico, sobre pH 3. Este hecho sugiere que el primer cobre que se une a la estructura lo hace a través del nitrógeno piridínico. De forma similar a la primera protonación de los ligandos, esta interacción conlleva la retirada de carga en el ciclo aromático por parte del metal, favoreciendo la forma cetónica en el equilibrio ceto-enólico del grupo piridol. El seguimiento de la banda de 590 nm, por su parte, no proporciona ninguna información adicional en este sentido ya que la aparición de absorbancia a esta longitud de onda asociada a la formación de los complejos de Cu(II) forma parte de lo esperable. La medición de las mismas bandas para mezclas Cu(II):L5 1:2 mostrada en la Figura 6.20 muestra un comportamiento similar. Con todo ello podemos deducir que el primer átomo de Cu(II) coordina preferentemente a través de la piridina debido a su mayor capacidad donora π , estabilizando la forma ceto. Este análisis espectroscópico puede explicar la mayor afinidad de los ligandos piridólicos por el cobre.

Por otro lado, el mayor valor de las constantes de complejación de los ligandos con una cadena etilénica (L5 y L7) se puede explicar atendiendo a la disposición más favorable a la coordinación con Cu(II) que presenta la alternancia de estas cadenas con las propilénicas, en comparación con los ligandos constituidos únicamente por estas últimas; tal y como viene descrito en los trabajos de B. P. Hay y R. D. Hancock.³⁶⁰ Según recogieron estos autores, los macrociclos en que sus aminas están separadas por una secuencia alterna de cadenas etilénicas y propilénicas generan un entorno de coordinación especialmente favorable para los cationes metálicos de reducido tamaño iónico, como Ni(II) o Cu(II), en oposición a los ligandos en que sus aminas están separadas únicamente por cadenas etilénicas o propilénicas. Cabe mencionar que este efecto se invierte para los metales con un elevado radio iónico como Hg(II), Pb(II) o Ba(II), para los que la alternancia de cadenas resulta desfavorable en su complejación.

Más allá de las diferencias en los valores que presentan las constantes, puede ser también interesante desde un punto de vista estructural conocer el índice y modo de coordinación del Cu(II) en su interacción con los ligandos estudiados,

tanto para los complejos mononucleares como para los binucleares. Esto se puede conseguir mediante un estudio exhaustivo de los valores de las constantes determinadas, así como del resultado de las valoraciones seguidas por espectroscopía UV-Vis. En este sentido, debemos tener en cuenta que protones e iones de Cu(II) son especies que en disolución compiten por las mismas posiciones reactivas, las aminas, por lo que para conocer el índice de coordinación del metal en los complejos mononucleares tan solo es necesario prestar atención al número de nitrógenos que se protonan con cierta facilidad. Cuando para añadir un protón al complejo sea necesario romper un enlace de coordinación, la constante asociada a dicha protonación deberá presentar un valor significativamente menor que el de la protonación equivalente en ausencia de metal. Dicho de otra forma, si la constante de protonación del complejo, $[\text{CuH}_x(\text{H}_{-1}\text{L})]^{(1+x)+}$, es del mismo orden o superior a la constante de protonación del ligando libre, $\text{H}_{2+x}(\text{H}_{-1}\text{L})^{(1+x)+}$, se puede inferir que la adición del protón tiene lugar sobre una amina no implicada en la coordinación del metal. En el caso contrario, cuando su valor es significativamente menor, se puede concluir que esta protonación tiene lugar sobre una amina implicada en un enlace de coordinación. Cabe indicar que para que las constantes puedan ser comparables, las especies implicadas en tales equilibrios deben tener la misma carga global referente a las aminas. Es por ello que la variable x debe tomar el mismo valor en la estequiometría del complejo, $[\text{CuH}_x(\text{H}_{-1}\text{L})]^{(1+x)+}$, que en la del ligando libre a comparar, $\text{H}_{2+x}(\text{H}_{-1}\text{L})^{(1+x)+}$.

Empecemos el análisis por el ligando **L6**, cuyos complejos mononucleares presentan un comportamiento más sencillo que los de **L5**. Atendiendo al criterio descrito anteriormente se puede observar cómo las cuatro constantes de protonación del complejo de **L6** $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]^+$, 9.22, 7.34, 6.30 y 5.22, son muy similares a las de las especies $\text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L})^+$, $\text{H}_3(\text{H}_{-1}\text{L})^{2+}$, $\text{H}_4(\text{H}_{-1}\text{L})^{3+}$ y H_5L^{5+} ; 8.99, 7.94, 6.61 y 5.09, respectivamente.** Con ello se puede deducir que en este complejo existen al me-

**El valor de la constante de protonación del complejo $[\text{CuH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]^{4+}$ no es comparable con la del ligando $\text{H}_5(\text{H}_{-1}\text{L})^{4+}$ sino con la de H_5L^{5+} . Esto es debido a que la protonación de esta primera especie no tiene lugar sobre una amina del macrociclo, sino sobre el oxígeno del grupo piridólico. Es en la especie H_5L^{5+} en la que tiene lugar la quinta protonación de un grupo amino y, por tanto, la que es comparable con la protonación de $[\text{CuH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]^{4+}$. Para más información,

nos cuatro aminas cuya protonación no implica ruptura de enlace de coordinación, es decir, que no están interaccionando directamente con el Cu(II). Por lo tanto, tan solo dos de las seis aminas secundarias del macrociclo forman parte de la esfera de coordinación del Cu(II), a las que se debe sumar el nitrógeno piridínico que, como hemos visto anteriormente, también está interaccionando con el metal. Atendiendo a estas conclusiones es razonable pensar que la interacción por parte de L6 con el Cu(II) se establezca a través de la piridina y las dos aminas adyacentes al anillo aromático por ser estas las más accesibles. La esfera de coordinación del metal se completa probablemente con dos moléculas de agua. Este modo de coordinación es similar al encontrado por E. García-España *et al.* para el complejo mononuclear de Cu(II) con el análogo L7.¹⁸⁰

Por su parte, dilucidar el entorno de coordinación del Cu(II) en su complejo mononuclear con L5 entraña unas dosis de especulación algo mayores que para el ligando anterior. En este caso podemos observar que la primera constante de protonación del complejo metálico $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]^+$, cuyo valor es 8.24, es ya sensiblemente menor que la correspondiente a la reacción de protonación del ligando libre $\text{H}_2(\text{H}_{-1}\text{L})^+$: 9.36. Con las siguientes dos protonaciones se produce una importante disminución de su valor, pasando de ser 7.97 y 6.13 para el ligando libre a 6.16 y 4.35 para el complejo metálico. En ambos casos, la diferencia es prácticamente de dos unidades logarítmicas. Con la última reacción de protonación esta tendencia se invierte, tomando un valor muy similar (e incluso algo mayor) la constante de protonación del complejo metálico $[\text{CuH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]^{4+}$ que la de la correspondiente especie protonada H_5L^{5+} : 5.09 del complejo frente a 4.14 del ligando libre. Atendiendo a estos datos se puede deducir que ya la primera protonación del complejo mononuclear implica la ruptura de un enlace de coordinación. Pero ello no tiene necesariamente que ser debido a que todos los nitrógenos del ligando estén interaccionando con el Cu(II), ya que en tal caso su índice de coordinación sería de siete (algo bastante complicado para este elemento). Esta temprana ruptura de enlaces coordinantes que sugieren las tres primeras protonaciones de $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]^+$ hacen pensar, más bien, que el complejo mononuclear no implica aminas contiguas sino

acudir al Capítulo V. Comportamiento ácido base.

de diferentes zonas del ligando: el plegamiento del ligando necesario para acercar las diferentes aminas al metal dificultaría la protonación de los nitrógenos no coordinantes. Así, las primeras protonaciones del complejo implicarían la ruptura de ciertos enlaces con el metal, no porque fuesen estas las aminas a ser protonadas, sino porque la adición de hidrógenos sobre la estructura conllevaría la reordenación del sistema y por tanto la ruptura de ciertos enlaces de coordinación. Esta observación viene confirmada por el valor de la última constante de protonación comparable, la correspondiente a las especies $[\text{CuH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]^{4+}$ y H_5L^{5+} . La gran similitud en sus valores implica que para protonar esta amina no es necesario romper un enlace de coordinación. Esta conclusión es coherente con el hecho que el ligando no coordine al metal a través de todas las aminas posibles, sino que la reordenación de la estructura asociada a las primeras reacciones permite protonar más fácilmente las aminas no coordinantes. En conclusión, en el complejo mononuclear de Cu(II) con L5, el ligando interacciona con el metal a través de cuatro de las seis aminas disponibles en su estructura, además del nitrógeno piridínico (ver Figura 6.21(a)).

El diferente comportamiento que muestran los ligandos L5 y L6 a la hora de formar los complejos mononucleares de Cu(II) puede ser explicado por la presencia de la cadena etilénica en el macrociclo del primero y la ausencia de ella en el segundo. Como ya se ha mencionado anteriormente, la existencia de cadenas

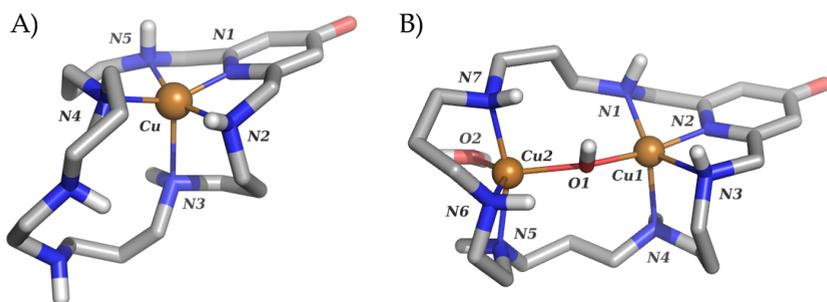


Figura 6.21 – Estructuras optimizadas por DFT del complejo Cu(II):L5 a pH fisiológico (7.40): A) Cu(II):L5 1:1, B) Cu(II):L5 2:1. Nivel de teoría B3LYP-D3/def2-TZVP.

etilénicas en la estructura del ligando, así como su alternancia con propilénicas, favorecen la formación de los complejos para metales de pequeño radio iónico.³⁶⁰ Por otra parte, las cadenas propilénicas dificultan la correcta orientación de las aminas contiguas en este mismo tipo de sistemas. De este modo se puede explicar la tendencia de **L5** a formar complejos metálicos con un índice de coordinación de cinco en oposición a **L6**, que tan solo llega a formarlos de tres. Y este mismo hecho puede explicar la mayor constante de formación del complejo $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]^+$ de **L5**, que presenta un valor de 23.56, en comparación con la de **L6**, cuyo valor es más de cuatro unidades logarítmicas menor, de 19.35.

En último lugar, en referencia a los complejos binucleares, ambos ligandos presentan un comportamiento muy similar en su complejación con Cu(II). Cabe destacar la ausencia de especies protonadas en estos sistemas, indicio de que todas las aminas se encuentran interaccionando con el metal; así como la presencia de varias especies hidroxiladas. La existencia de estas últimas puede estar motivada por su implicación en la formación de puentes hidroxilo entre los cobres, en que una misma molécula de OH^- coordina simultáneamente los dos átomos metálicos del complejo. En este mismo sentido parece señalar la modelización teórica de los sistemas. Al estudiar las estructuras de mínima energía de los complejos mediante QM/MM-MD, se llega a la conformación mostrada en la Figura 6.21(b).

6.3.2 ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN CON ZN(II)

El segundo metal de interés a estudiar con los ligandos de gran capacidad es el Zn(II). Como se ha explicado en el *Capítulo I - Introducción*, este metal forma parte del centro activo de los enzimas SOD-1 y SOD-3 en humanos, donde se piensa que mantiene un papel fundamentalmente estructural. Así pues, pese a su escaso interés desde el punto de vista de su química redox y, por tanto, de su capacidad de mimetizar el comportamiento de estos enzimas SOD; puede resultar interesante su modo de coordinación en presencia de Cu(II).

Las constantes de complejación determinadas para los ligandos **L5** y **L6** con Zn(II), así como las de los análogos **L7** y **L8** descritas en la bibliografía,¹⁸⁰ se encuentran en las Tablas 6.11 y 6.12, respectivamente. Los diagramas de distribución

Tabla 6.11 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L5** y **L6** con Zn(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L5	L6
$[\text{ZnH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnH}_4(\text{H}_{-1}\text{L})]$	6.32(3) ^b	-
$[\text{ZnH}(\text{H}_{-1}\text{L})] + 2\text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]$	12.78(2)	-
$[\text{ZnH}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnH}_2(\text{H}_{-1}\text{L})]$	-	6.96(3)
$[\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnH}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	7.83(1)	9.76(2)
$\text{Zn} + \text{H}_{-1}\text{L} \rightleftharpoons [\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	14.65(2)	9.84(6)
$[\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	-9.96(3)	-
$[\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2] + \text{H}$	-10.93(3)	-
$\text{Zn} + [\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	-3.51(3)	-3.13(3)
$[\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2] + \text{H}$	-8.81(3)	-9.74(6)
$[\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_3] + \text{H}$	-10.25(4)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

en función del pH se pueden encontrar en las Figuras 6.22 y 6.23.

De igual forma a lo observado con el Cu(II), los estudios potenciométricos de los sistemas Zn(II)-L muestran la formación de diferentes tipos de especies mono- y binucleares en función del grupo piridínico presente en el receptor macrocíclico. Por un lado, los ligandos piridólicos (**L5** y **L6**) presentan las especies mononucleares de estequiometría $[\text{ZnH}_x(\text{H}_y\text{L})]^{(2+x+y)+}$ con valores de x comprendidos entre 0 y 4 y valores de y que varían de -1 a 0. Respecto las especies hidroxiladas es también posible detectar la formación de los complejos mono- y binucleares de estequiometría $[\text{Zn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]$ y $[\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_x]^{(3-x)+}$, con valores de x comprendidos entre 1 y 3. Por su parte, los ligandos piridínicos (**L7** y **L8**)¹⁸⁰ presentan las especies mononucleares $[\text{ZnH}_x\text{L}]^{(2+x)+}$ con valores de x comprendidos entre 0 y 3, así como las especies binucleares $[\text{Zn}_2\text{L}]^{4+}$, $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})]^{3+}$ y $[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2]^{2+}$. En los diagramas de distribución mostrados en las Figuras 6.22 y 6.23 se puede observar que, mientras que para un ratio molar Zn(II):L 1:1 en el rango de pH de trabajo (de 2.0 a 11.0) tan solo existen en disolución las especies mononucleares, para un ratio 2:1 las especies binucleares son mayoritarias a partir de pH 7 ~ 8.

Tabla 6.12 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L7** y **L8** con Zn(II) medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO₄ 0.15 M.

Reacción ^a	L7	L8
$[\text{ZnH}_2\text{L}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnH}_3\text{L}]$	6.97(4) ^b	-
$[\text{ZnHL}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnH}_2\text{L}]$	6.65(6)	6.99(3)
$[\text{ZnL}] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{ZnHL}]$	9.28(3)	8.24(4)
$\text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{ZnL}]$	10.76(4)	10.32(4)
$\text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{ZnL}(\text{OH})] + \text{H}$	0.01(5)	0.21(6)
$[\text{ZnL}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{ZnL}(\text{OH})] + \text{H}$	-10.75(7)	-10.11(7)
$2\text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}]$	15.69(5)	-
$\text{Zn} + [\text{ZnL}] \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}]$	4.93(6)	-
$2\text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})] + \text{H}$	8.10(2)	6.36(6)
$2\text{Zn} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2] + \text{H}$	-1.80(3)	-2.03(1)
$[\text{Zn}_2\text{L}] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})] + \text{H}$	-7.59(5)	-
$[\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})] + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{Zn}_2\text{L}(\text{OH})_2] + \text{H}$	-9.90(3)	-8.39(6)

^a Las cargas han sido omitidas. ^b Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

En términos generales, el modo de complejación con Zn(II) por parte de los ligandos estudiados es muy similar al observado para el Cu(II), aunque cabe destacar la existencia de importantes diferencias entre ellos. La principal es el valor de las constantes. La formación de los complejos de Cu(II) presenta constantes de formación mucho más elevadas que los de Zn(II), pudiendo llegar esta diferencia hasta las diez unidades logarítmicas (diez ordenes de magnitud en el valor de las constantes). A modo de ejemplo, en las Tablas 6.11 y 6.12 podemos observar que, mientras que la formación del primer complejo de Cu(II) con el ligando totalmente desprotonado (relación Cu(II):L 1:1) presenta una constante logarítmica de 23.65(4) para **L5** y de 19.25(4) para **L6**, los valores de las constantes equivalentes para Zn(II) son diez unidades logarítmicas menores (14.65(2) para **L5** y 9.84(6) para **L6**). Este hecho se puede explicar si tenemos en cuenta que el Zn(II) no presenta la contribución de estabilidad del campo cristalino al tener una capa de valencia con una configuración d¹⁰. Cabe también mencionar que el menor valor observado

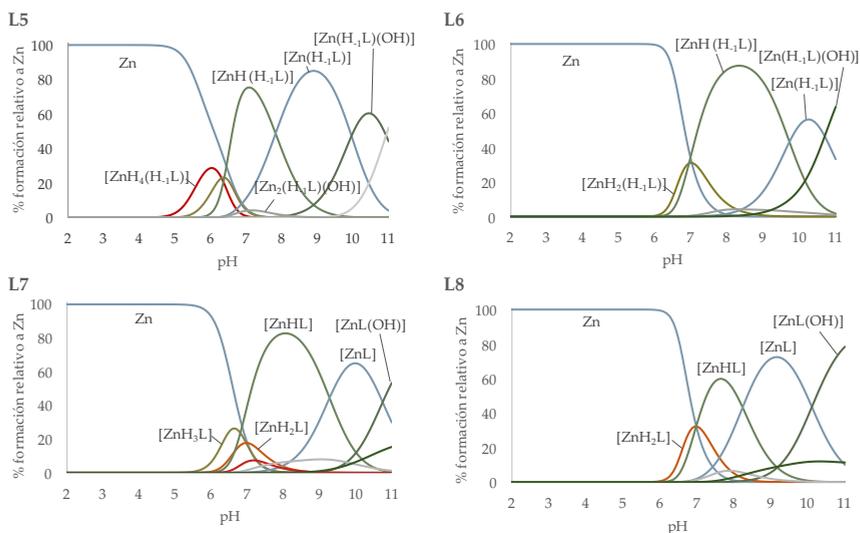


Figura 6.22 – Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para los ligandos L5, L6, L7 y L8 en relación 1:1 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. $[L]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

para las constantes con Zn(II) en comparación con las de Cu(II) es coherente con la serie de Irving-Williams, ya mencionada anteriormente.³⁵⁸ La segunda gran diferencia deriva de la primera: el reducido valor de las constantes de formación de los complejos de Zn(II) causa que sus complejos no se empiecen a formar hasta pH 5 ~ 6, llegándose a encontrar la mayor parte de este metal libre en disolución en valores de pH cercanos a 7. Por contra, los ligandos estudiados empiezan formar sus complejos con Cu(II) ya a pH 2 ~ 3, pudiendo encontrar menos de un 3% de metal libre a pH fisiológico.

Más allá de estas diferencias, el resto del comportamiento en disolución de los complejos de Zn(II) es muy similar al descrito para los sistemas de Cu(II). Así, podemos observar que los ligandos con sustituyente piridólico presentan constantes de complejación con Zn(II) mayores que los piridínicos, de la misma forma que los ligandos con cadena etilénica forman complejos más estables que los que están constituidos únicamente por cadenas propilénicas. La explicación de este comportamiento, de igual forma sucedía con el Cu(II), viene dada por la mayor aportación

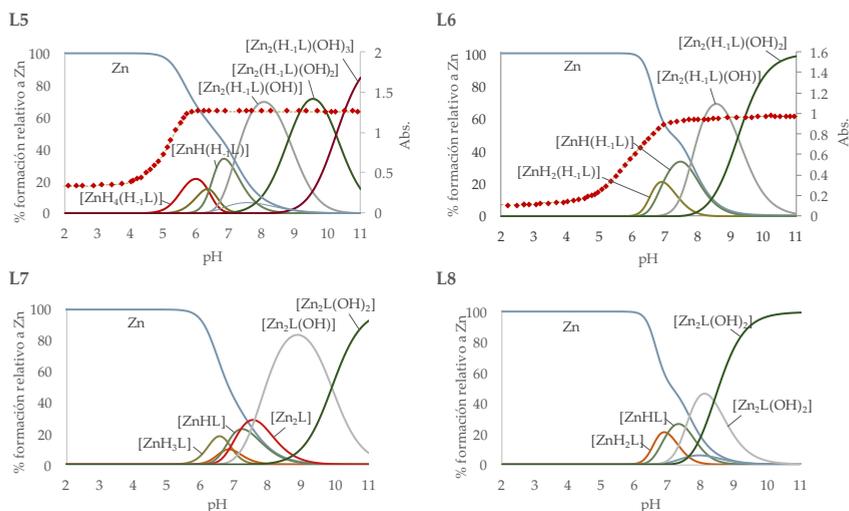


Figura 6.23 – Diagramas de distribución de los sistemas Zn(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:2 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. En el diagrama de los ligandos **L5** y **L6** se ha superpuesto la absorbancia UV-Vis a 259 y 248 nm (línea punteadas rojas). $[L]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

de carga dada por el sustituyente piridólico, así como por la mayor disponibilidad espacial a la coordinación en las cadenas etilénicas.

6.3.3 ESTUDIOS DE COMPLEJACIÓN MIXTOS CON Cu(II) Y Zn(II)

En último lugar, tras los estudios de complejación con Cu(II) y Zn(II) de forma independiente, se ha procedido a estudiar la capacidad por parte de los ligandos de gran capacidad para formar complejos mixtos: especies de coordinación en que el ligando coordina simultáneamente un átomo de Cu(II) y otro de Zn(II). Las constantes determinadas para los ligandos **L5** y **L6** con Zn(II), así como las de los análogos **L7** y **L8** descritas en la bibliografía,¹⁸⁰ se encuentran en las Tablas 6.13 y 6.14, respectivamente. Los diagramas de distribución en función del pH se pueden encontrar en la Figura 6.24.

Mediante los estudios potenciométricos ha sido posible determinar tres cons-

Tabla 6.13 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L5** y **L6** con **Cu(II)** y **Zn(II)** medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 M.

Reacción ^a	L5	L6
$[\text{CuZnH}_2(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuZnH}_3(\text{H}_{-1}\text{L})]$	-	5.58(4)
$[\text{CuZnH}(\text{H}_{-1}\text{L})] + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuZnH}_2(\text{H}_{-1}\text{L})]$	-	7.11(4)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{H}_{-1}\text{L} + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuZnH}(\text{H}_{-1}\text{L})]$	-	33.54(5)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{H}_{-1}\text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	19.93(5)	17.42(5)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{H}_{-1}\text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2] + 2\text{H}$	12.19(3)	9.10(5)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{H}_{-1}\text{L} + 3\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_3] + 3\text{H}$	1.20(7)	-

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

Tabla 6.14 – Constantes logarítmicas de complejación de los ligandos **L7** y **L8** con **Cu(II)** y **Zn(II)** medidas a 298.1 ± 0.1 K en NaClO_4 M.

Reacción ^a	L7	L8
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H} \rightleftharpoons [\text{CuZnHL}]$	-	30.23(6)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} \rightleftharpoons [\text{CuZnL}]$	23.26(9)	-
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})] + \text{H}$	18.57(2)	14.55(3)
$\text{Cu} + \text{Zn} + \text{L} + 2\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons [\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_2] + 2\text{H}$	5.34(6)	6.24(3)

^aLas cargas han sido omitidas. ^bLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa.

tantes de formación de complejos heterobinucleares de **Cu(II)** y **Zn(II)** para el ligando **L5** y cinco para **L6**, el análisis de las cuales permite obtener tres características a destacar. En primer lugar, no se observa la formación de la especie $[\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})]^{3+}$ para ninguno de los dos ligandos. Este hecho es comprensible si tenemos en cuenta que estos ligandos tan solo coordinan el **Zn(II)** mayoritariamente a partir de pH 6, dando lugar a partir de pH 7 a las especies hidroxiladas $[\text{Zn}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})_x]^{(3-x)+}$ (ver Figuras 6.22 y 6.23). En segundo lugar, cabe destacar el predominio de las especies mononucleares de **Cu(II)** hasta pH 7 ~ 8, a partir del cual se empiezan a formar las especies mixtas de **Cu(II)** **Zn(II)**. Esto se puede

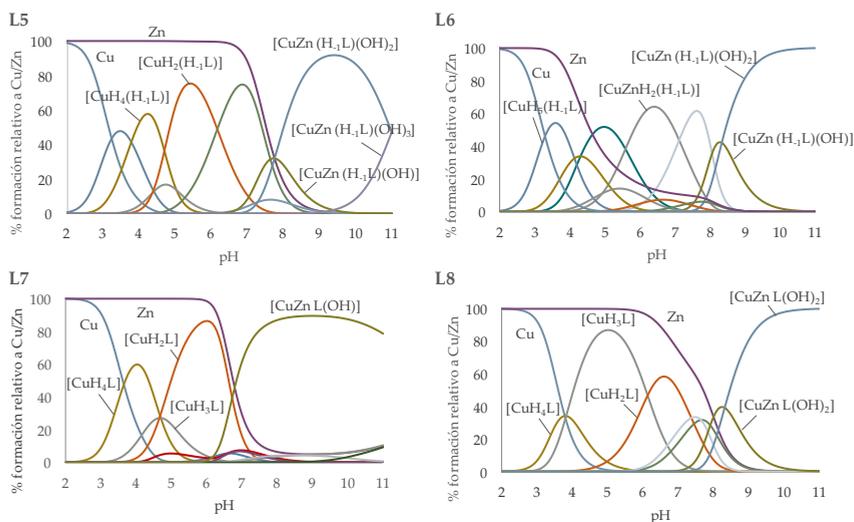


Figura 6.24 – Diagramas de distribución de los sistemas Cu(II):Zn(II):L para los ligandos **L5**, **L6**, **L7** y **L8** en relación 1:1:1 como función del pH en disolución acuosa, calculados a partir de las constantes potenciométricas. $[L]=10^{-3}$ M. Las cargas han sido omitidas.

entender si tenemos en cuenta la baja estabilidad de los complejos de Zn(II) en comparación con los de Cu(II), así como el pH tan tardío en el que se empiezan a formar. Por último, al comparar las constantes de **L5** y **L6** entre ellas se puede comprobar las distintas especies a las que dan lugar. Mientras que el primero tan solo presenta especies mixtas hidroxiladas, **L6** también da lugar a tres complejos con hasta tres protones en su estructura. Este hecho es previsible si tenemos en cuenta el reducido valor de las constantes de complejación de este ligando, así como el mayor valor de las constantes de protonación de sus complejos metálicos; todo ello derivado de la inestabilidad que las cadenas propilénicas generan en la coordinación de Cu(II) y Zn(II).

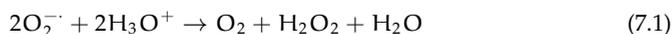
Capítulo 7

Actividad antioxidante

7.1 INTRODUCCIÓN

El último capítulo de resultados de la tesis está dedicado al estudio de la actividad antioxidante de los sistemas sintetizados. Hasta el momento se ha realizado una descripción de la síntesis de los ligandos, así como de los sistemas nanoestructurados; se ha establecido su comportamiento ácido base en disolución y se ha determinado el modo en que los diferentes ligandos interactúan con Fe(II), Cu(II) y/o Zn(II). Resta, por tanto, el estudio de su capacidad para catalizar diferentes reacciones de eliminación de ROS.

Tal y como se ha explicado en el *Capítulo I - Introducción*, el propósito principal de la tesis es sintetizar un conjunto de compuestos y sistemas nanoestructurados capaces de imitar la actividad de la superóxido dismutasa; es decir, con capacidad de catalizar la reacción de dismutación de los iones radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (ver reacción 7.1). Por ello, una parte fundamental del trabajo realizado ha sido la profundización en los aspectos que influyen en su actividad SOD a través de su modificación estructural.



Ahora bien, tal y como podemos ver en la reacción 7.1, la eliminación de los radicales O_2^- conlleva la generación de peróxido de hidrógeno, especie a su vez tóxica. Es por ello que, más allá de limitar el trabajo al estudio de la capacidad de estos compuestos por eliminar los radicales superóxido, se ha procedido también al estudio de su posible actividad catalasa.

A lo largo de este capítulo vamos a profundizar en la actividad antioxidante de los sistemas sintetizados sobre la base de dos principios. En primer lugar, de la misma forma que el estudio del modo de complejación de los ligandos con los metales de interés se fundamentó en los estudios de protonación previos, para estudiar la capacidad catalítica de estos sistemas partiremos de los propios estudios de coordinación. En segundo lugar, el análisis de los resultados no va a seguir una descripción sistemática de la actividad de cada familia de compuestos, lo que podría dar una imagen monótona y confusa de los resultados, sino que se va a in-

tentar ir resolviendo las preguntas que se plantearon en un inicio de la tesis; sobre la actividad SOD de los complejos de Cu(II) y Fe(II):

- a) ¿Cómo influye la alquilación de las aminas?
- b) ¿De qué modo afecta el volumen de los sustituyentes alquílicos?
- c) ¿Qué influencia tiene un aumento del carácter dador del nitrógeno piridínico?
- d) ¿Qué influencia tiene un aumento del carácter electro-atrayente del nitrógeno piridínico?
- e) ¿Cómo afecta el aumento del tamaño de la cadena macrocíclica?
- f) ¿Tiene algún efecto sobre la actividad SOD de los complejos de Cu(II) el hecho que estos se encuentren soportados sobre sistemas nanoestructurados?
- g) ¿Los resultados de actividad antioxidante para los complejos de Cu(II) son extensibles a los de Fe(II)?
- h) ¿Alguno de los sistemas estudiados presenta actividad catalasa?

7.2 INFLUENCIA DE LA ALQUILACIÓN

Empecemos por el principio. ¿Cómo influye la alquilación de las aminas sobre la actividad SOD de los complejos de Cu(II)?

Un posible modo de aproximación a esta pregunta puede ser partir de la estructura del azamacrociclo que hemos tomado como base para la tesis, **L1-H**, y analizar el efecto que tiene sobre la constante catalítica de sus complejos de Cu(II) la alquilación de sus aminas. Tras comprobar que todos los ligandos del grupo L1 (**L1-H**, **L1-Me₃** y **L1-Me₂Pr₂**) coordinan cuantitativamente el Cu(II) a pH fisiológico (pH = 7.40), se procedió al estudio de su actividad SOD mediante el método de determinación indirecta de McCord-Fridovich.²⁸¹⁻²⁸⁴ Los valores de constante catalítica e IC₅₀ de cada sistema determinados mediante este método se encuentran en la Tabla 7.1. Para un mayor detalle del procedimiento experimental empleado, así como de su fundamento teórico, se puede visitar el capítulo *Materials and Methods*.

Tabla 7.1 – Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos del grupo L1 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.

Complejo	IC ₅₀ (μM)	k_{cat} ($\cdot 10^6$ M ⁻¹ s ⁻¹)
Cu-L1-H	2.1(4) ^a	1.7
Cu-L1-Me ₃	2.9(6)	1.2
Cu-L1-Me _i Pr ₂	0.26(5)	13.7
Cu(ClO ₄) ₂ ^b	1.1(1)	2.7
CuZn-SOD ^b	0.010(2)	430

^a Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^b Datos tomados de la bibliografía.³⁶¹

El análisis de los valores de IC₅₀ y constante catalítica de los sistemas Cu-L1 no muestra una clara tendencia a que la alquilación de los sistemas aumente su actividad catalítica: mientras que los sistemas Cu-L1-H y Cu-L1-Me₃ presentan una actividad SOD relativamente baja y muy parecida entre sí, con valores de IC₅₀ comprendidos entre 2 y 3 μM, el sistema con los sustituyentes isopropílicos (Cu-L1-Me_iPr₂) muestra una actividad unas nueve veces superior, con un IC₅₀ de 0.26 μM. No parece haber, pues, una clara correlación entre la alquilación de las aminas secundarias y la capacidad catalítica SOD de los complejos de Cu(II). Cabe mencionar en todo caso que el valor de actividad catalítica de CuL1-Me_iPr₂ es especialmente elevado si lo comparamos con los valores que podemos encontrar en la bibliografía, particularmente si consideramos que este complejo tan solo contiene un átomo de Cu(II) en su estructura (Ver Figura 7.1).^{136,362}

Una posible explicación a la diferente actividad SOD la podemos encontrar al comparar las constantes de estabilidad de los respectivos complejos de Cu(II).

Un elemento clave que determina la actividad SOD de un complejo metálico es la facilidad con que el propio metal puede realizar el ciclo redox. Al ser este el encargado de reducirse u oxidarse durante las diferentes reacciones del ciclo catalítico, como más fácilmente pueda pasar entre sus estados de oxidación, más rápidamente podrá llevar a cabo la dismutación de los radicales superóxido. La

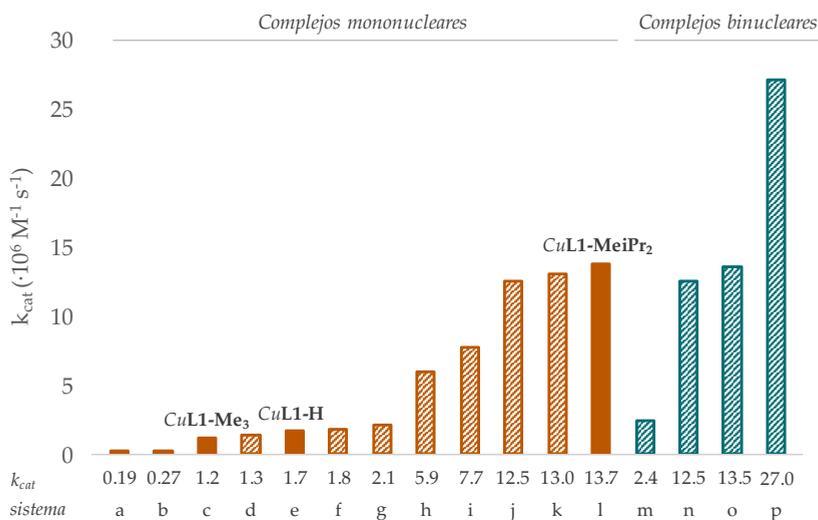
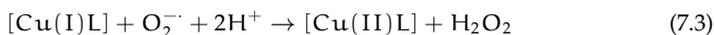


Figura 7.1 – Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL15,³⁶³ b) CuL12,³⁶³ c) CuL1-Me₃, d) CuL10,¹⁸⁰ e) CuL1-H, f) CuL9,¹⁸⁰ g) CuL11,²⁹⁰ h) CuL8,¹⁸⁰ i) CuL14,³⁶⁴ j) CuL13,²⁹⁰ k) CuL14,¹⁸⁰ l) CuL1-MeiPr₂, m) Cu₂L7,¹⁸⁰ n) Cu₂L9,¹⁸⁰ o) Cu₂L10¹⁸⁰ y p) Cu₂L8¹⁸⁰.

reacción general de la catálisis se muestra en las reacciones 7.2 y 7.3, donde se han omitido las cargas de los complejos metálicos.^{365–367}



Uno de los aspectos más importantes a considerar a la hora de establecer la facilidad con que un metal pasa entre sus diferentes estados de oxidación es el grado de estabilización de sus especies. Cuanto más favorecido esté uno de estos estados, más difícil será que pueda acceder al resto de ellos, dificultando así su participación en un ciclo catalítico redox. En el caso que nos ocupa, la estabilización viene dada principalmente por el entorno de coordinación del metal, es decir, por el ligando que lo coordina. Por tanto, cuanto mayor sea la constante de forma-

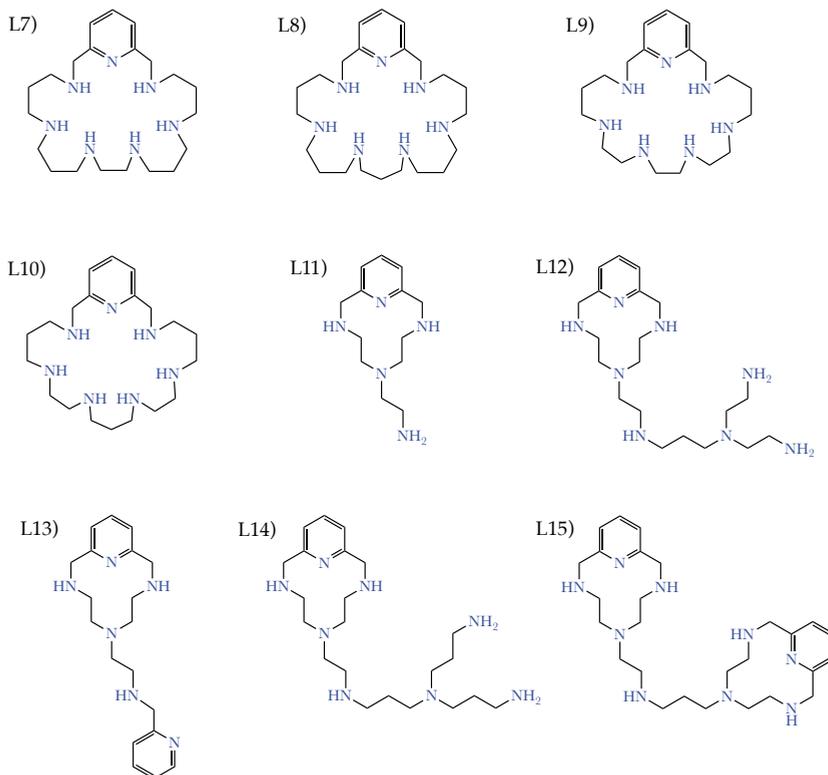


Figura 7.2 – Ligandos tomados como referencia para la comparativa de la actividad antioxidante de los ligandos estudiados en la presente tesis. Los ligandos **L7**, **L8**, **L9** y **L10** han sido tomados de las referencias^{180,341}, los ligandos **L11** y **L13** de²⁹⁰ y los ligandos **L12** y **L15** de³⁶³.

ción del complejo de Cu(II) con los ligandos estudiados, más estabilizada estará esta forma de cobre y más desfavorecido el ciclo catalítico llevado a cabo por el complejo.

Si analizamos la constante de formación de la especie [CuL] para los distintos ligandos podemos observar que tanto para **L1-H** como para **L1-Me₃** presenta valores relativamente elevados, sobretodo si los comparamos con el correspondiente para el ligando **L1-Me₂Pr₂**. Mientras que la constante determinada para los dos primeros ligandos es de 17.78 y 16.44 unidades logarítmicas, respectivamente, para **L1-Me₂Pr₂** disminuye hasta las 14.04; casi 4 unidades por debajo de **L1-H**. Esta

observación es coherente con los resultados de actividad antioxidante, atendiendo a la explicación dada anteriormente. El ligando de los sustituyentes isopropílicos forma complejos con Cu(II) significativamente menos estables que sus dos análogos, con lo que en este caso el metal puede oscilar entre sus estados Cu(II) y Cu(I) mucho más fácilmente que cuando está coordinado a **L1-H** o **L1-Me₃**.

Un aspecto importante a considerar más allá de la estabilidad relativa de los complejos de Cu(II), aunque directamente relacionada con esta, es su potencial de reducción a pH fisiológico. Para que cualquier sistema redox pueda funcionar como catalizador de la dismutación de los radicales superóxido, debe presentar un valor de potencial comprendido entre el del par $O_2/O_2^{\bullet-}$, de -0.33 V, y el del par $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$, de 0.89 V con respecto al electrodo normal de hidrógeno (NHE).^{110,368} Es por ello que, con el fin de completar los estudios de caracterización de los complejos de Cu(II) con los ligandos del grupo L1, se llevó a cabo el estudio voltamperométrico de estas especies tanto en medio oxigenado como en disoluciones previamente desoxigenadas. El análisis de los resultados obtenidos para estas últimas disoluciones, representados en la Figura 7.3, muestra para el complejo $[CuL1-H]^{2+}$ la presencia de un pico catódico muy débil sobre los 0.00 V (C_1), seguido de una segunda señal mucha más intensa a -0.50 V. Esta segunda señal parece en realidad el solapamiento de dos picos consecutivos, C_{21} y C_{22} . Por su parte, en el subsiguiente *scan* anódico se puede observar el pico correspondiente a la oxidación de los depósitos de cobre sobre la superficie del electrodo, a -0.05 V (A_{Cu}), seguido de un hombro a 0.10 V (A_1). Al reducir el valor máximo del potencial de barrido hasta los 0.50 V, el pico de la oxidación del Cu(0) depositado desaparece, quedando tan sólo las señales C_1/A_1 , en lo que parece un par reversible de un sólo electrón a juzgar por la diferencia de potencial entre los picos catódico y anódico (alrededor de 60 mV para velocidades de barrido bajas, ver Figura 7.4). De acuerdo con estas observaciones, el proceso general de reducción se basa en el paso de la especie Cu(II)L a Cu(0) a través de una rápida reducción del intermedio Cu(I)L.

Con respecto a los ligandos alquilados, **L1-Me₃** muestra un comportamiento muy similar al descrito para **L1-H**, mientras que **L1-Me₂Pr₂** difiere esencialmente en la mayor estabilización de la especie Cu(I)L. En este caso, de hecho, fue posible

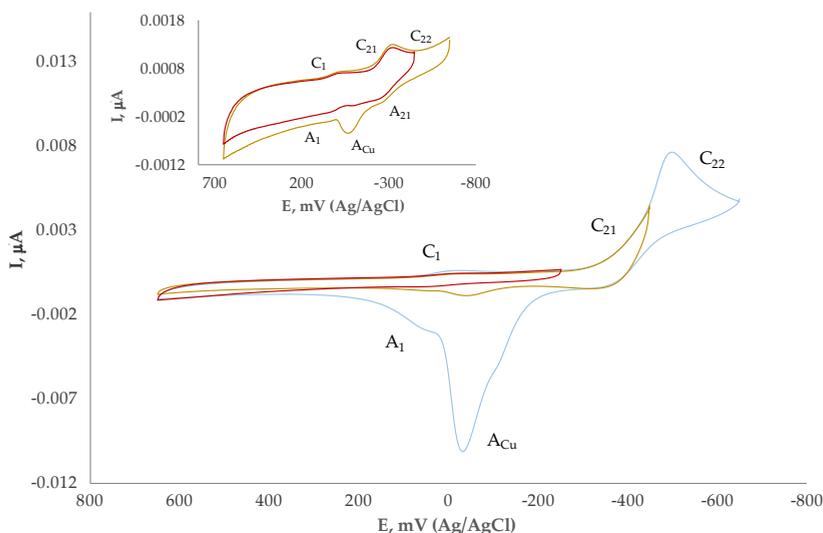


Figura 7.3 – Voltamperogramas cíclicos de disoluciones de los complejos $[\text{CuL1-H}]^{2+}$ y $[\text{CuL1-Me}i\text{Pr}_2]^{2+}$ (miniatura). El registro de los espectros se ha iniciado a 0.25 V en sentido negativo, siendo cambiado a positivo a -0.25 (línea roja), -0.45 (línea ocre) y -0.65 V (línea azul). Todos los voltamperogramas han sido registrados utilizando un electro de lectura de grafito y otro de Ag/AgCl como referencia, con disoluciones 10^{-3} M de complejo en 0.15 M NaClO_4 a pH 7.4. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} .

definir correctamente el par C_{21}/A_{21} , para el se encontró un valor de potencial de pico medio de -0.30 V, como se muestra en la Figura 7.3.

Los resultados de los estudios voltamperométricos pueden ser interpretados de acuerdo con el esquema de la Figura 7.5, cuyo eje central gira entorno a la reducción de la especie Cu(II)L a su forma análoga Cu(I)L (par C_2/A_2). De acuerdo con los resultados, una parte del complejo Cu(II)L se disocia en una mezcla de complejos de Cu(II)Cl_x que, del mismo modo que Cu(II)L , mantiene un equilibrio con su forma reducida Cu(I)Cl_y , en este caso a través del par C_1/A_1 . Por último, parte de Cu(I)L puede ser reducido a Cu(0) mediante el proceso irreversible C_{22} . Estos resultados son consistentes con los descritos anteriormente por D. Meyerstein,¹⁸⁵ según los cuales la alquilación de las aminas tiene un efecto estabilizante sobre el estado de oxidación +1 del cobre. El potencial formal del par

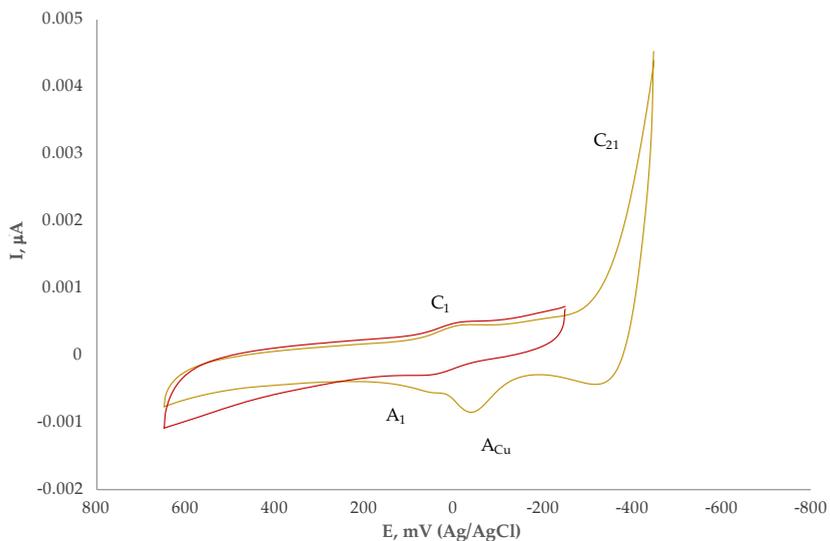


Figura 7.4 – Voltamperograma cíclico de una disolución de $[\text{CuL1-H}]^{2+} 10^{-3} \text{ M}$ en 0.15 M NaClO_4 a pH 7.4. El registro de los espectros se ha iniciado a 0.25 V en sentido negativo, siendo cambiado a positivo a -0.25 (línea roja) y a -0.45 V (línea ocre). Todos los voltamperogramas han sido registrados utilizando un electrodo de lectura de grafito y otro de Ag/AgCl como referencia. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} .

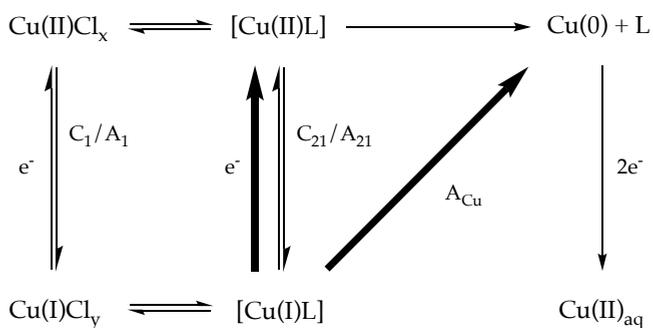


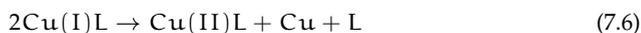
Figura 7.5 – Esquema del conjunto de procesos implicados en la electroquímica de los complejos del grupo L1 con Cu.

Cu(II)L/Cu(I)L para el ligando **L1-MeiPr₂** (-0.30 V vs Ag/AgCl) es coherente con la actividad SOD determinada, pero la similitud entre el perfil voltamperométrico entre los tres complejos sugiere que las diferencias entre ellos deben derivar de factores cinéticos.

Tales diferencias pueden ser atribuidas a la dismutación del complejo de Cu(I)L generado electroquímicamente. De esta forma, para los tres complejos, la especie Cu(II)L experimenta una primera reacción reversible de reducción de un solo electrón (reacción 7.4), seguida de una reducción irreversible a Cu(0) a potenciales más negativos (reacción 7.5) que a su vez compite con la reacción de oxidación del Cu(I) a Cu(II).



La reacción global de este proceso queda de la siguiente forma:



Tanto para **L1-H** como para **L1-Me₃** la dismutación es rápida de forma que su perfil voltamperométrico corresponde, principalmente, a un proceso de reducción de dos electrones (ver Figura 7.3). En cambio, el proceso de dismutación en el complejo de **L1-MeiPr₂** (reacción 7.6) es relativamente lento, de forma que la especie intermedia Cu(I)L es estable el suficiente tiempo como para presentar un par Cu(II)L/Cu(I)L bien definido (ver Figura 7.6).

Por otra parte, cuando los estudios voltamperométricos se realizan en un medio saturado de O₂, los resultados cambian significativamente. En ausencia de los complejos de cobre, el oxígeno molecular (O₂) se reduce a través de un proceso aparentemente irreversible a *ca.* -0.65 V (C_{ox}). En la bibliografía se describe este proceso como una reducción que sucede en varias etapas, bastante complicadas, y que empieza con la reducción del O₂ para dar el anión radical superóxido, tal y como se muestra en la ecuación 7.7.³⁶⁹

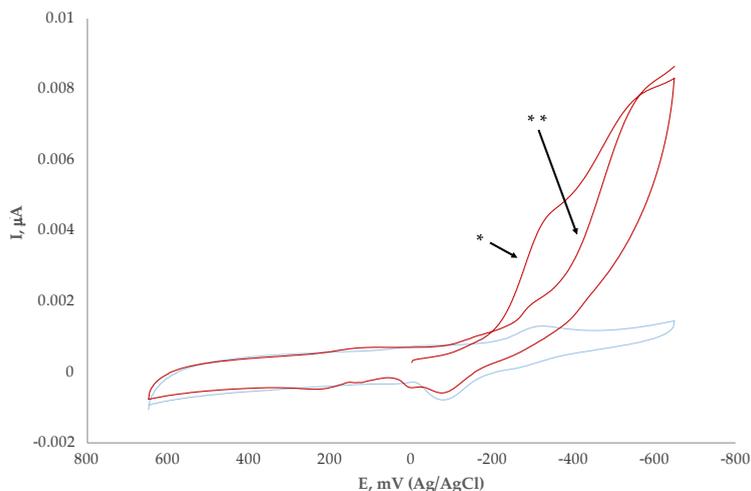


Figura 7.6 – Voltamogramas cíclicos realizados en disolución desoxigenada (línea azul) o saturada de oxígeno (línea roja) 10^{-3} M de Cu-L1-Me i Pr $_2$ en 0.15 M NaClO $_4$ a pH 7.4. Los barridos han sido realizados en sentido negativo, partiendo de un potencial de 0.25 V. Los voltamperogramas han sido registrados utilizando un electrodo de lectura de grafito y otro de Ag/AgCl como referencia. Velocidad de barrido 50 mV s $^{-1}$.



Esta reacción viene seguida de una hidratación del superóxido, que compite con su propia reacción de dismutación. La hidratación del $\text{O}_2^{\bullet -}$ da lugar a los radicales hidropéroxido (HO_2^{\bullet}) e hidroxilo (HO^{\bullet}), los cuales, a su vez, pueden generar nuevas moléculas de peróxido de hidrógeno (H_2O_2).³⁶⁹

En presencia de los complejos de L1-H y L1-Me $_3$ con cobre, las señales C_2 y C_{ox} se mezclan formando una única banda, como se puede ver en la Figura 7.7; pero su intensidad no es mucho mayor de la suma de los picos de C_2 y C_{ox} medidos por separado. Este hecho sugiere que, en caso de existir, no hay importantes efectos electrocatalíticos a tener en cuenta. La situación es completamente diferente para L1-Me i Pr $_2$. Para los complejos de este ligando se observa un importante aumento de la intensidad asociada a las bandas catódicas (ver Figura 7.6).

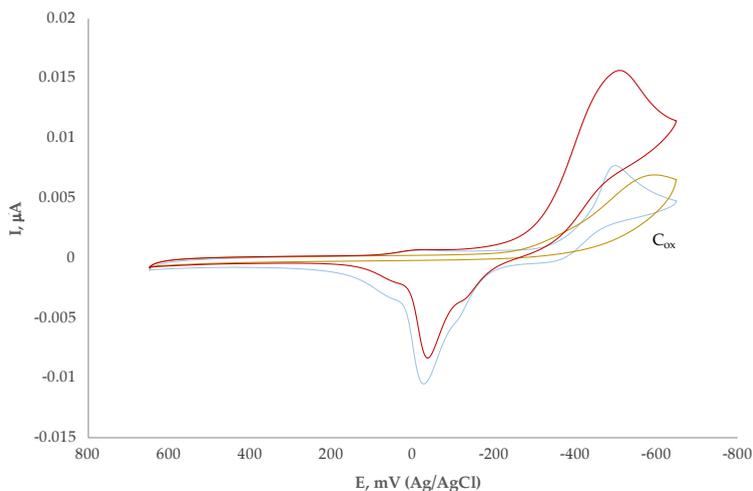
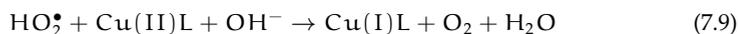


Figura 7.7 – Voltamogramas cíclicos sobre electrodo de grafito, realizados en disolución saturada de oxígeno en 0.15 M NaClO₄ a pH 7.4 en ausencia de complejos de cobre (línea ocre) y en presencia de Cu(I)L1-H 10⁻³ M (línea roja). La línea azul corresponde al voltamograma de la última disolución tras haber sido desoxigenada mediante burbujeo de Ar. Los barridos han sido realizados en sentido negativo, partiendo de un potencial de 0.25 V. Velocidad de barrido 50 mV s⁻¹.

Cabe destacar un detalle bastante interesante del voltamperograma del complejo CuL1-MeiPr₂, y es el hecho que los picos de reducción cambian de forma al pasar del primer barrido, donde parecen haber dos señales superpuestas, una a -0.4 y otra a -0.6 V (señaladas por un * en la Figura 7.6); al segundo barrido, donde aparecen de nuevo los picos del cobre, pero seguidos de una aumento de la intensidad de la banda de reducción del oxígeno (marcada con **). Una posible explicación a este hecho la podemos encontrar si asumimos que la reducción inicial de Cu(II)L, mediada por un solo electrón, produce la especie Cu(I) (reacción 7.4), quien a su vez puede catalizar la primera etapa de la reducción del O₂ (reacción 7.7) para generar el radical superóxido de acuerdo con la reacción:



Finalmente, esta especie de $O_2^{\bullet-}$ se puede protonar rápidamente, formando el radical hidroperóxido. Debido a la baja estabilidad del complejo de Cu(I) con **L1-H** y **L1-Me₃**, es posible que bajo condiciones electroquímicas la dismutación del complejo Cu(I)L (reacción 7.6) sea más rápida que la propia reacción 7.8 para estos ligandos, lo que explicaría porqué no se detecta señal electroquímica. En cambio, la mayor estabilidad de los complejos de Cu(I) con el ligando isopropílico puede conllevar que su velocidad de dismutación sea considerablemente menor, dándole la posibilidad de catalizar diferentes reacciones de reducción del oxígeno. De esta forma, el mayor tiempo de vida de estas especies de Cu(I) les podría permitir imitar la actividad de la SOD, bajo condiciones electroquímicas, de acuerdo a las reacciones:



La diferente actividad SOD mostrada por los complejos de Cu(II) puede, por tanto, estar relacionada con su cinética de dismutación bajo condiciones electroquímicas. Las distintas características cinéticas que presentan los sistemas estudiados pueden estar relacionadas, a su vez, con la alquilación de las aminas, así como con las restricciones estéricas impuestas por los grupos isopropilo de **L1-Me_iPr₂**. Ahora bien, ¿cuál es el efecto real de estos grupos? ¿Qué influencia tienen sobre el propio ciclo de dismutación de los radicales superóxido? En definitiva, ¿cómo afecta el volumen de los sustituyentes alquílicos a la actividad SOD de los complejos de Cu(II)? Para poder responder a estas preguntas deberemos profundizar en el propio mecanismo de la catálisis, más allá del estudio de la estabilización relativa de los complejos de Cu(II) y Cu(I).

7.3 INFLUENCIA DE LOS GRUPOS ISOPROPILO

Como hemos visto en el apartado anterior, el complejo de Cu(II) con el ligando isopropílico **L1-Me_iPr₂** presenta una mayor actividad SOD que la mayoría de compuestos mononucleares reportados en la bibliografía y a mucha distancia de sus análogos estructuralmente más similares: **L1-H** y **L1-Me₃**. Asimismo, a lo largo de este capítulo se ha podido también comprobar que esta elevada capacidad antioxidante parece estar mucho más relacionada con el impedimento estérico que generan los sustituyentes alquílicos de las aminas que con el hecho de que estas se encuentren alquiladas.

Más allá de los estudios de carácter experimental descritos hasta el momento, la necesidad de profundizar en el papel que juegan los grupos isopropilo en este ciclo catalítico hizo preciso recurrir al estudio teórico del mismo. De esta forma, se procedió al uso de técnicas de Mecánica Cuántica y Métodos Híbridos (QM y QM/MM-MD) para generar un modelo del ciclo catalítico cuando este es llevado a cabo por el complejo *CuL1-Me_iPr₂*. Cabe mencionar que la realización de estos estudios tuvo lugar durante la primera de las estancias disfrutadas durante el doctorado, a cargo del Ministerio de Ciencia del Gobierno de España, y realizada en el laboratorio de la profesora Dra. Leticia González en la Universidad de Viena, Austria, en estrecha colaboración con el Dr. Pedro A. Sánchez-Murcia.

A modo de premisa, antes del inicio del estudio teórico deben tenerse en consideración dos elementos clave del ciclo catalítico a simular. El primero es que, como se ha indicado en el apartado anterior, la reacción de dismutación de los radicales $O_2^{\bullet-}$ tiene lugar a través de las reacciones fundamentales ec. 7.2 y 7.3.³⁶⁵⁻³⁶⁷ La segunda consideración a tener en cuenta es el tipo de mecanismo a través del cual el radical puede unirse al centro metálico. Existen tres posibilidades a este respecto: (i) por sustitución de uno de los enlaces de coordinación del Cu(II) con una amina o el agua ecuatorial, (ii) por incremento del índice de coordinación del metal hasta seis o (iii) sin la formación de un enlace directo con el Cu(II). Estas opciones son también conocidas como mecanismo disociativo, asociativo (o de esfera interna) y de esfera externa, respectivamente.³⁷⁰ De hecho, cada SOD presenta un mecanismo distinto: mientras que la CuZn-SOD sigue un proceso disociativo,

los enzimas mononucleares de Mn y Fe, por ejemplo, muestran un mecanismo asociativo.^{104,105}

Partiendo de estas dos premisas, se ha propuesto el ciclo de la Figura 7.8 como el mecanismo de reacción más probable y en consecuencia, como aquél a ser modelizado. Según este mecanismo, el radical $O_2^{\bullet-}$ se une al complejo $CuL1-MeiPr_2$ a través de la posición de coordinación vacante (complejo A). Una vez el superóxido reduce el Cu(II) a Cu(I), el oxígeno es liberado, dando lugar al complejo B (con Cu(I)). Es entonces cuando un segundo radical superóxido puede entrar para formar el complejo C y, de esta forma, oxidar el Cu(I) a Cu(II). Finalmente, el peróxido generado se libera de la esfera de coordinación del metal, devolviendo el complejo de Cu(II) a su estado inicial. Puesto que la formación de la especie H_2O_2 requiere de la toma de dos H^+ , se asume que la protonación de O_2^{2-} es un paso

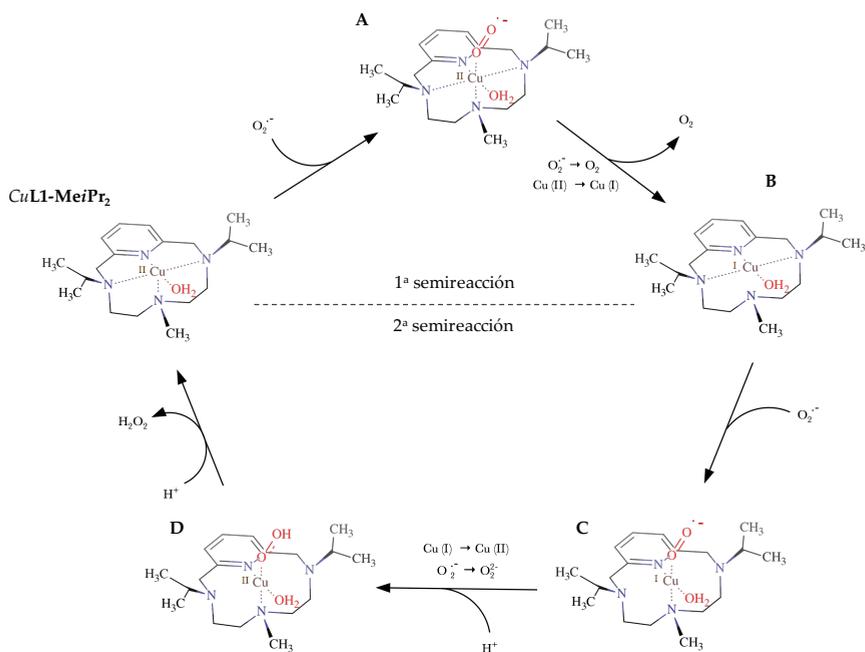


Figura 7.8 – Esquema propuesto para el mecanismo asociativo de dismutación de los radicales superóxido por $CuL1-MeiPr_2$: oxidación del superóxido a O_2 (1ª semireacción) y reducción de una segunda molécula de superóxido a H_2O_2 (2ª semireacción).

fundamental para la salida de este compuesto de la esfera de coordinación (complejo D). A pesar de todo esto, la secuencia exacta de sucesos, así como el detalle de su mecanismo, son elementos todavía desconocidos. Cabe añadir que durante los cálculos de modelización se ha contemplado también la idea que la entrada del superóxido y su posterior reducción u oxidación tuviese lugar a través de un mecanismo disociativo o de esfera externa.

La primera etapa del estudio teórico estuvo destinada a la selección del conjunto de bases y métodos de cálculo que generasen el modelo más preciso del complejo $CuL1-MeiPr_2$. Este estudio pudo llevarse a cabo gracias a la resolución de las estructuras cristalinas que se obtuvieron de este mismo complejo, descritas en el capítulo de *Química de coordinación*, y que se tomaron como referencia para este análisis comparativo o *benchmarking*. Para este estudio se seleccionaron los funcionales BP86, B3LYP y M06. Los parámetros estructurales de mayor importancia de los modelos teóricos generados, así como breve comparación con los determinados para su estructura cristalina, se pueden encontrar en las Tablas 7.2 y 7.3.

Ya para el conjunto de bases más pequeño (Tabla 7.2) todas las distancias cal-

Tabla 7.2 – Resumen de las distancias Cu(II)-N y Cu(II)-O (Å) correspondientes a las estructuras optimizadas de mínima energía del complejo $CuL1-MeiPr_2(H_2O)$ usando los funcionales BP86, B3LYP y M06; así como su desviación respecto a su estructura cristalina. Las desviaciones mayores de un 1 % han sido resaltadas en rojo.

Complejo	R-X	BP86		B3LYP		M06	
		d (Å)	% desv	d (Å)	% desv	d (Å)	% desv
Cu-N1	1.935	1.955	1.03	1.958	1.19	1.952	0.88
Cu-N2	2.102	2.167	3.09	2.151	2.33	2.117	0.71
Cu-N3	2.191	2.186	-0.23	2.203	0.55	2.163	-1.28
Cu-N4	2.103	2.165	2.95	2.151	2.28	2.114	0.52
Cu-O	1.977	2.138	8.14	2.125	7.49	2.123	7.38
RMSd (Å)	-	0.201		0.184		0.174	
τ_5	0.024	0.094		0.061		0.063	

Tabla 7.3 – Resumen de las distancias Cu(II)-N y Cu(II)-O (Å) correspondientes a las estructuras optimizadas de mínima energía del complejo $\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{H}_2\text{O})$ añadiendo funciones de dispersión y modificando las bases del funcional B3LYP; así como su desviación respecto a su estructura cristalina. Las desviaciones mayores de un 1 % han sido resaltadas en rojo.

Complejo	R-X	B3LYP		B3LYP-D3 (SVP)		B3LYP-D3 (TZVP)	
	d (Å)	d (Å)	% desv	d (Å)	% desv	d (Å)	% desv
Cu-N1	1.935	1.958	1.19	1.954	0.98	1.984	0.67
Cu-N2	2.102	2.151	2.33	2.131	1.38	2.119	0.81
Cu-N3	2.191	2.203	0.55	2.184	-0.32	2.174	-0.78
Cu-N4	2.103	2.151	2.28	2.129	1.24	2.119	0.76
Cu-O	1.977	2.125	7.49	2.103	6.37	2.128	7.64
RMSd (Å)	-	0.184		0.170		0.155	
τ_5	0.024	0.063		0.048		0.065	

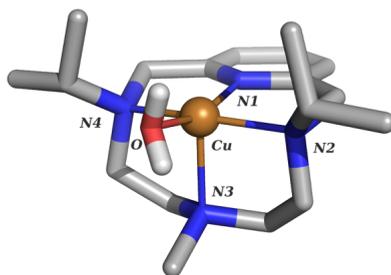


Figura 7.9 – Representación de la estructuras cristalinas del complejo de Cu(II) $[\text{Cu}(\text{L1-MeiPr}_2)(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

culadas son razonablemente coherentes con aquellas determinadas experimentalmente por rayos-X (con valores de RMSd inferiores a 0.20). Asimismo, en todos los modelos generados, las distancias entre el cobre y los nitrógenos alquilados (N2 y N4) difieren en menos de un 3 % con respecto al modelo experimental; mientras que la distancia Cu-piridina apenas se diferencia en un 1 %. En oposición a estos hechos, la distancia Cu-O presenta desviaciones algo mayores, pudiendo llegar

hasta al 8 %, y que pueden estar motivadas por el efecto del empaquetamiento cristalino.

Más allá de las distancias relativas en el centro de coordinación, otro factor que puede resultar de utilidad para analizar la correcta modelización del complejo es su índice geométrico (τ_5). Este parámetro, propuesto por Addison *et al.* en 1984,³⁴² establece el porcentaje de geometría de bipirámide trigonal o de pirámide de base cuadrada que presenta una estructura, en una escala que varía entre cero y uno. Así, cuanto más cercano a cero sea el valor de τ_5 , mayor será la componente de pirámide de base cuadrada de la estructura. Por el contrario, valores cercanos a uno se corresponden con geometrías cercanas a la bipirámide trigonal. Tanto la estructura experimental del complejo $CuL1-MePr(H_2O)$ (cuyo índice geométrico es de 0.024) como sus modelos teóricos presentan geometrías esencialmente de pirámide de base cuadrada. Sin embargo, el uso de los funcionales híbridos B3LYP o M06 proporciona resultados más consonantes con los datos cristalográficos.

Una vez estudiada la precisión que proporciona cada funcional utilizando conjuntos de bases pequeños, se procedió a la ampliación de los mismos mediante la introducción de nuevas funciones. La primera a tener en cuenta fue la corrección de la dispersión de Grimm.²⁴² Mediante la introducción de esta corrección, la desviación con respecto a la estructura cristalina se redujo hasta en un 50 % usando B3LYP/def2-SVP. A modo de ejemplo, la diferencia entre las distancias experimental y teórica del enlace Cu-N2 pasó de ser de 0.048 Å a 0.026 Å. Esta observación es coherente con lo reportado en trabajos anteriores en que se observa una infravaloración de los términos de dispersión por parte del funcional B3LYP.³⁷¹ Por otra parte, la ampliación del conjunto de bases del funcional se completó con la introducción de bases de valencia adicionales (o triple zeta).^{247,372-374} Como se puede ver en la Tabla 7.3, la adición de estas bases extra apenas tuvo una influencia marginal sobre la geometría optimizada del complejo, debido a que sobre el átomo metálico se usa un potencial efectivo de *core* o ECP.

En consecuencia, como resultado de este análisis de los funcionales o *benchmarking*, el método B3LYP-D3/def2-SVP fue el seleccionado para llevar a cabo los estudios de modelización del ciclo catalítico.

Tras la selección del funcional y el conjunto de bases a utilizar durante los estudios teóricos se procedió con la modelización del ciclo catalítico propiamente dicha. El resultado de estos estudios en fase gas se muestran en la Figura 7.10. Como se ha descrito anteriormente, este ciclo catalítico consiste en dos semirreacciones irreversibles. En la primera, el centro metálico es reducido a Cu(I) al tiempo que una molécula de superóxido se oxida a oxígeno molecular (Figura 7.10B); mientras que en la segunda parte una nueva molécula de superóxido oxida el metal a Cu(II) en un proceso en que ella misma es reducida a peróxido. Esta segunda semirreacción requiere de la adición de dos protones a la estructura del O_2^{2-} (Figura 7.10D). Conceptualmente, cada una de las semirreacciones se estructura entorno a tres procesos fundamentales:

- i) Aproximación del radical superóxido a la esfera de coordinación del metal.
- ii) Enlace del $O_2^{\bullet-}$ al metal, proceso asociado a la reacción redox.
- iii) Salida del producto de reacción.

El modelo teórico mostrado en la Figura 7.10 sugiere que la primera semirreacción del ciclo catalítico tiene lugar a través de un proceso sin barreras energéticas de consideración, de forma análoga a lo observado anteriormente para la SOD.³⁶⁵⁻³⁶⁷ Así, a lo largo de esta primera semirreacción tan solo se han podido determinar dos estados de transición, ambos con valores energéticos bajos, fácilmente superables a temperatura ambiente por la propia agitación térmica (1.34 kJ mol^{-1} para el estado de transición $TS_{1 \rightarrow 1A}$ y 2.54 kJ mol^{-1} para $TS_{1A \rightarrow 1B}$).

En esta primera parte de la reacción el radical superóxido se introduce en el sistema a través de la formación de un complejo anión- π metaestable, dando lugar al sistema **1A** en un proceso exotérmico ($-7.59 \text{ kJ mol}^{-1}$). Asociada a la formación de esta estructura tiene lugar una ampliación del índice de coordinación del Cu(II), que pasa de 5 a 6, hecho que implica un mecanismo de reacción asociativo para esta primera semirreacción. El intermedio hexacoordinado **1A** formado presenta una geometría de coordinación de octaedro distorsionado, donde los nitrógenos N2 y N4 ocupan las posiciones axiales.

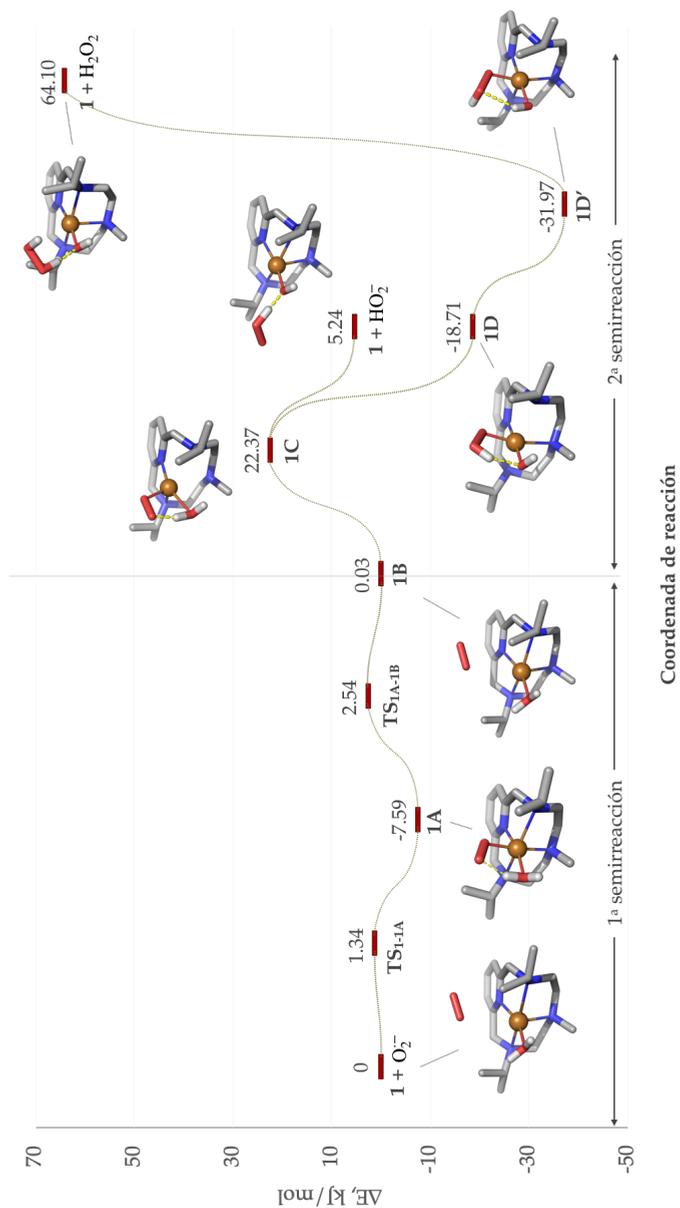


Figura 7.10 – Perfil energético (kJ mol⁻¹, B3LYP-D3/def2-svp/MDF10) del mecanismo del ciclo catalítico de dismutación del O₂⁻ cuando es llevado a cabo por el complejo CuL1-MeIPr₂.

Cabe destacar en último lugar la contribución del agua de coordinación a la estabilización del aducto $CuL1-MeiPr_2(H_2O) : O_2^{\bullet-}$. Cuando el radical superóxido se encuentra coordinando el metal, el oxígeno que no enlaza directamente el cobre forma un enlace de hidrógeno con el agua de coordinación, como se puede ver en la Figura 7.10.

Una vez liberada la molécula de oxígeno del complejo de Cu(I) empieza la segunda semirreacción del ciclo catalítico, donde una nueva molécula de superóxido es reducida a peróxido. Un elemento clave a tener en cuenta durante esta parte de la reacción es el hecho que el sistema toma dos protones de moléculas de agua para poder generar el compuesto H_2O_2 . Por lo tanto, previamente a la modelización de esta parte del ciclo es necesario llevar a cabo un estudio QM/MM-MD del sistema con el fin de seleccionar el conjunto de moléculas de agua más accesibles que puedan aportar estos protones. Como se ha descrito en el capítulo de *Materials and Methods*, este cálculo consiste en la modelización de un sistema formado por el complejo $CuL1(H_2O)-MeiPr_2$ y una molécula de superóxido, todo ello dentro de una caja de agua de 20 Å a 300 K, a lo largo de 200 ps.

A los pocos picosegundos de iniciar la simulación ya se puede observar cómo el superóxido se aproxima al centro metálico desde el anillo de piridina del ligando (Figura 7.11A), estableciendo un enlace de coordinación con el Cu(I) (Figura 7.11B). Como se puede ver en la Figura 7.11C, y de forma análoga a lo observado durante la primera semirreacción, el segundo oxígeno del superóxido forma un enlace de hidrógeno con el agua coordinada al cobre. Es precisamente a través de esta disposición que tiene lugar la primera protonación del superóxido, que se encuentra ya reducido a peróxido (Figura 7.11D). El protón implicado en el enlace de hidrógeno con el $O_2^{\bullet-}$ es cedido por el agua coordinada, originando el intermedio hidroxilado **1D** en un proceso favorable energéticamente (**1D** se encuentra estabilizado en $-41.08 \text{ kJ mol}^{-1}$ con respecto a **1C**). La alternativa a este mecanismo es que la primera protonación siga un proceso de esfera externa. Es decir, que una vez el superóxido se ha reducido a peróxido, se produzca su salida del complejo de coordinación y a continuación su protonación. A la vista de los resultados obtenidos mediante los cálculos mostrados en la Figura 7.10 este proceso está mu-

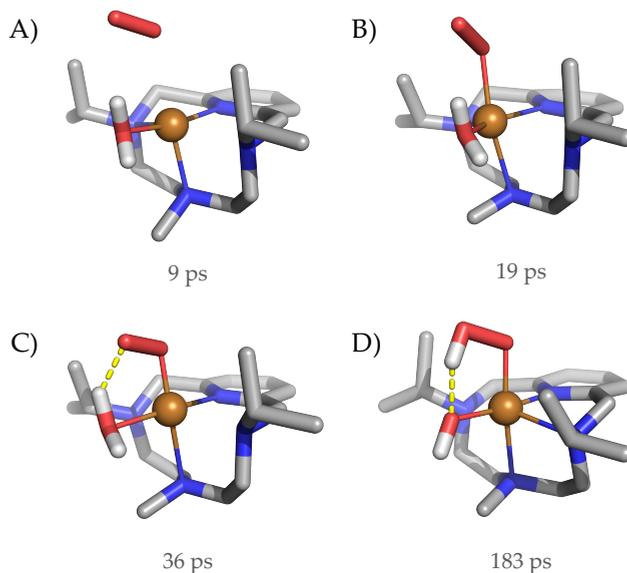


Figura 7.11 – Detalle de la trayectoria de QM/MM-MD (B3LYP-D3/def2-svp/MDF10) del complejo $CuL1-MeiPr_2$ para las primeras etapas de la segunda semirreacción del ciclo catalítico.

cho menos favorecido energéticamente que el anterior ($-17.13 \text{ kJ mol}^{-1}$ respecto a **1C**). De todo ello se puede deducir que la protonación del peróxido sigue un mecanismo asociativo, donde el agua coordinada al cobre en **1C** cumple el papel de fuente suministradora de protones, dando lugar al intermedio hidroxilado **1D**. La existencia de este intermedio hidroxilado recuerda a la estructura de la Mn-SOD observada, entre otras, en diferentes estructuras cristalinas de *E. coli* (PDB id. 1IX9 and 1IXB);³⁷⁵ y cuya forma oxidada del metal presenta un hidroxilo completando su esfera de coordinación, en lugar de una molécula de agua.¹⁰⁴ Este supuesto ha sido apoyado posteriormente por cálculos teóricos de QM tanto para la Fe-SOD como para la Mn-SOD,^{370,376} confirmando la idea que la forma predominante de Mn(III)-SOD es la especie hidroxilada.¹²¹

Tras la reducción del superóxido a peróxido y la adición del primer hidrógeno a esta última especie, queda completar el ciclo con la segunda protonación del

HO_2^- y su consiguiente salida del complejo. Para esta segunda reacción de protonación la fuente suministradora de protones debe ser el agua del disolvente. Este hecho contrasta con el modo en que tiene lugar en el propio enzima de la SOD, donde son los residuos de histidina del centro activo quienes aportan el hidrógeno necesario para dar lugar a la especie H_2O_2 .^{377,378} En un primer momento, la interacción de un agua de la primera esfera de solvatación del complejo con el oxígeno enlazado al cobre produce una estabilización extra del sistema ($-31.97 \text{ kJ mol}^{-1}$, Figura 7.10D'); pero el paso de su protón al peróxido ayuda a la salida del H_2O_2 del complejo, siendo esta protonación de carácter endergónico ($+64.10 \text{ kJ mol}^{-1}$). En cualquier caso, es probable que este elevado valor energético se vea compensado por la regeneración del complejo $\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{H}_2\text{O})$, así como por los distintos factores entrópicos implicados en el proceso pero que no se han tenido en cuenta en el propio cálculo.

Como se puede observar, el complejo de cobre resultante de este proceso no es exactamente el mismo que con el que se ha iniciado el ciclo catalítico. Mientras que la estructura inicial del complejo contenía una molécula de agua completando la esfera de coordinación del Cu(II), en la estructura resultante del ciclo esta posición la ocupa un anión hidroxilo. Ahora bien, atendiendo a los resultados experimentales de especiación de L1-MeiPr_2 en disolución, mostrados en la Figura 6.1, se puede observar que a pH fisiológico el complejo mayoritario es $\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{H}_2\text{O})$ (84%). Por lo tanto, se puede pensar que tras la finalización del ciclo catalítico, el hidroxilo coordinado al cobre es protonado automáticamente, regenerando el sistema $\text{CuL1-MeiPr}_2(\text{H}_2\text{O})$.

En resumen, la modelización teórica de esta segunda semirreacción del ciclo catalítico parece indicar que la primera protonación del peróxido se produce siguiendo un mecanismo de tipo asociativo, mientras que la segunda tiene lugar a través de la primera esfera de solvatación del complejo.

Cabe por último analizar cómo se ve modificada la geometría del complejo de coordinación a lo largo de esta segunda semirreacción. A diferencia de lo que sucede durante la primera mitad del ciclo catalítico, el cobre de los complejos **1C** y **1D** de la segunda parte presenta un índice de coordinación de cuatro, con significati-

vas diferencias en función de su estado de oxidación y del grado de protonación del peróxido. Uno de los cambios más importantes en la estructura del propio complejo es el modo en que el ligando coordina el metal. Así, mientras que en **1C** **L1-MeiPr₂** compleja al cobre a través del nitrógeno piridínico N1 y una de las aminas laterales (N4), en **1D** lo hace a través de N1 y la amina metilada N3. Este cambio conformacional puede ser cuantificado mediante la determinación del índice geométrico del sistema (τ_4). Este parámetro, desarrollado por Yang *et al.* en 2007 a partir de los trabajos de Addison, permite conocer el grado de distorsión en la geometría de un complejo tetracoordinado en función de sus ángulos de enlace dentro de una escala que va de 0 a 1: valores de τ_4 cercanos a 0 suponen una geometría planocuadrada, mientras que valores próximos a 1 indican que el complejo adopta una geometría tetraédrica.^{342,379} Si se calcula el valor del índice τ_4 para las estructuras **1C** y **1D** se puede observar una importante variación de su geometría conforme avanza la reacción. Mientras que **1C** presenta un valor de τ_4 de 0.61, lo que implica una geometría tetraédrica altamente distorsionada, el correspondiente valor para **1D** es de 0.12, lo que puede relacionarse con una geometría planocuadrada ligeramente distorsionada. De esta forma, asociada a la reducción del radical superóxido en **1C** existe un cambio conformacional del aducto que conduce a una geometría planocuadrada desde una tetraédrica altamente distorsionada.

Del análisis de estos resultados teóricos se pueden extraer una serie de conclusiones bastante interesantes acerca del elevado carácter antioxidante de **CuL1-MeiPr₂(H₂O)**. En primer lugar, la modelización del sistema muestra cómo el elevado volumen de los grupos isopropilo tiene un doble efecto sobre el mecanismo del ciclo catalítico: por un lado desestabiliza los complejos de Cu(II) y por otro orienta el radical superóxido en la dirección óptima de interacción con el complejo (Figura 7.12A). En segundo lugar, los cálculos permiten también determinar el papel fundamental que juega el agua de coordinación en todo este proceso como agente estabilizante del radical superóxido y como fuente de protones en la segunda parte del ciclo catalítico. Analicemos con un poco más de detalle cada uno de estos puntos.

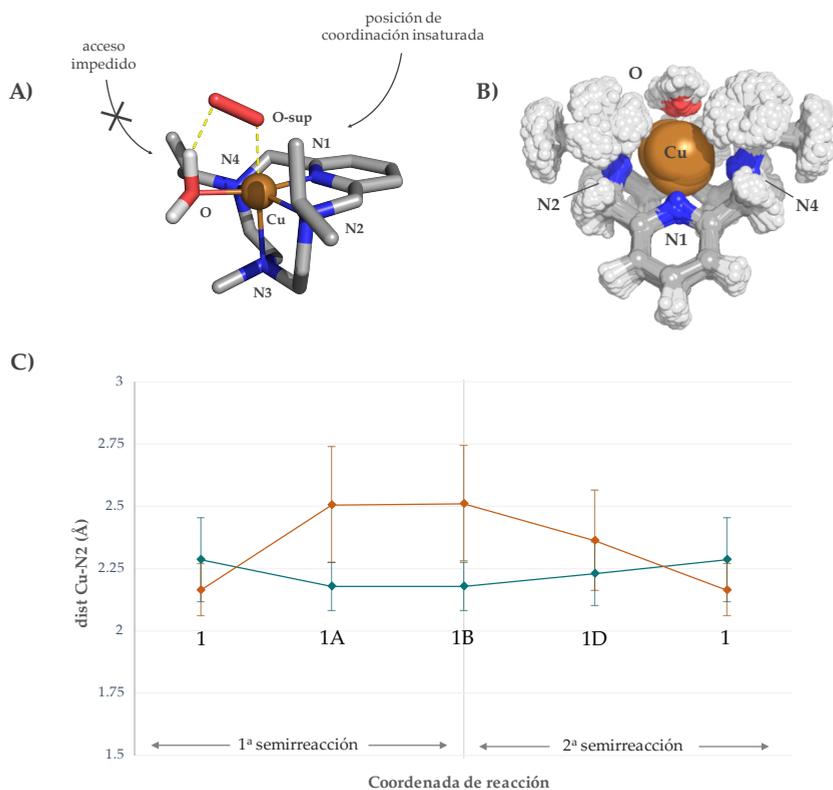


Figura 7.12 – A) Esquema de la entrada del superóxido en el complejo $CuL1-MeiPr_2 \cdot (H_2O)$ (1). La molécula de agua evita la entrada por su misma cara, pero ayuda a estabilizar la molécula de superóxido mediante la formación de puentes de hidrógeno. B) Superposición de las estructuras adoptadas por el complejo $CuL1-MeiPr_2(H_2O)$ (1) a lo largo de la simulación QM/MM-MD. C) Distancia $Cu-N2$ (trazo naranja) y $Cu-N3$ (trazo azul) durante el ciclo catalítico. Unidades en \AA .

Tal y como hemos visto en el capítulo de *Química de Coordinación* de la tesis, la alquilación de las aminas con grupos *iPr* reduce el valor de las constantes de complejación con cobre. Este efecto se puede observar también durante la propia modelización de los sistemas. Al superponer las diferentes conformaciones que adopta $CuL1-MeiPr_2(H_2O)$ a lo largo de la dinámica (alrededor de 200 ps, Figura 7.12B) se puede observar que el cobre no está fijo en un punto concreto del complejo, sino que su posición presenta una cierta dispersión; evidencia de la mayor

labilidad de los enlaces N-Cu. Este efecto desestabilizante de los grupos isopropilo se puede observar aún más claramente en el gráfico de la Figura 7.12C, donde se representa la distancia de los enlaces N2-Cu y N3-Cu a lo largo del ciclo catalítico. Tanto en la estructura $CuL1-Me_iPr_2(H_2O)$ (1) como sobretodo en las **1A** y **1B** el enlace N2-Cu tiene un valor considerablemente mayor de los que suele ser habitual para este tipo de interacciones. Asimismo, la distancia de este enlace presenta una gran dispersión a lo largo de todo el ciclo, muestra de la baja intensidad de la interacción de estas aminas con el átomo metálico. Esto se puede explicar atendiendo al impedimento estérico generado por los grupos isopropilo, que convierte las posiciones N2 y N4 en las más lábiles del complejo. Como contraposición de este hecho podemos observar que la distancia N3-Cu, correspondiente a la amina metilada para la que no existen estas repulsiones estéricas, muestra valores significativamente menores y con una dispersión mucho más discreta que el enlace N2-Cu ($d_{N2-Cu} \approx 2.46 \pm 0.22 \text{ \AA}$ frente a $d_{N3-Cu} \approx 2.19 \pm 0.11 \text{ \AA}$ en las estructuras **1A**, **1B** y **1D**).

La segunda gran contribución de los grupos isopropilo tiene que ver con su efecto sobre el perfil energético del ciclo catalítico. Su naturaleza hidrofóbica, el impedimento estérico que generan y su incapacidad de establecer cualquier tipo de enlace con el superóxido evitan la formación de aductos excesivamente estables entre catalizador y sustrato. Con ello se consigue que las estructuras de mínima energía de la reacción (**1A** y **1D**) se encuentren en pozos energéticos de poca profundidad, agilizando con ello el avance de la misma.

Cabe añadir en último lugar que el efecto de los grupos isopropilo no se limita a reducir la estabilidad de los complejos de cobre, sino que tiene otra función adicional: generar una ruta que dirige la molécula de superóxido entrante a la posición óptima de interacción con el sistema metálico. Como se puede ver en la Figura 7.12B, el elevado volumen de estos grupos impide que el radical superóxido se pueda acercar más que de una sola forma al cobre: en paralelo al eje N1-Cu-O. De este modo se facilita la interacción del radical con el agua coordinada al metal, que resulta ser clave en todo este proceso.

Ahora bien, ¿qué papel juega el agua de coordinación en el ciclo catalítico es-

tudiado? Los resultados de la modelización muestran que la molécula de agua coordinada al cobre cumple con tres funciones clave a lo largo de todo este ciclo. En primer lugar, genera una direccionalidad en la ruta de acceso al complejo, delimitada por otra parte por los grupos isopropilo (Figura 7.12A). La presencia de la molécula de agua en una de las dos puertas de acceso al complejo conlleva que el superóxido sólo se pueda acercar al cobre por la entrada situada sobre la piridina; preorganizando de esta forma al propio sustrato en su interacción con el catalizador. En segundo lugar, sirve como contrapunto al efecto desestabilizante de estos mismos grupos isopropilo. A través de la formación de enlaces de hidrógeno con el radical superóxido, contribuye a la estabilización de los complejos **1A** y **1C**, facilitando la interacción del $O_2^{\bullet-}$ con el cobre antes que la repulsión estérica con los isopropilos logre expulsar a los productos de la reacción del entorno de coordinación del metal. En tercer lugar, cataliza la primera reacción de protonación del peróxido. El enlace de hidrógeno que se establece entre superóxido y agua coordinada no solamente estabiliza el sistema, sino que lo predispone facilitando la primera transferencia protónica (Figura 7.11).

En conclusión, la elevada actividad SOD mostrada por los complejos *CuL1-MeⁱPr₂(H₂O)*, en oposición a la del resto de análogos estructurales del grupo L1, se puede explicar atendiendo principalmente a tres factores: (i) la disminución de la estabilidad de los complejos causada por los grupos isopropilo, (ii) el entorno hidrófobo y las repulsiones estéricas que se encuentra la molécula de superóxido en su complejación con el sistema, lo que facilita la expulsión de los productos de reacción; y (iii) la predisposición estructural del sistema, que organiza la entrada del sustrato al complejo metálico, al tiempo que favorece su estabilización cuando interacciona con el cobre y su protonación en la segunda parte del ciclo.

7.4 INFLUENCIA DEL SUSTITUYENTE HIDROXILO

Hasta el momento, a lo largo de este capítulo hemos estudiado la influencia de los sustituyentes alquílicos de las aminas sobre la actividad antioxidante SOD de los complejos de Cu(II), pero esta es tan solo una de las modificaciones estructurales posibles a realizar sobre el ligando. En los dos próximos apartados anali-

zaremos el efecto que tiene sobre esta misma actividad la introducción de nuevos grupos funcionales sobre la piridina, de forma que se altere la densidad electrónica de su nitrógeno, dándole un carácter más o menos electrón-dador. Empezaremos este análisis por el efecto de introducir un grupo hidroxilo en *para* al nitrógeno piridínico, o lo que es lo mismo, estudiando el comportamiento de los ligandos del grupo L2.

La constante catalítica e IC_{50} determinados para los ligandos **L2-H** y **L2-Me₃** se pueden encontrar en la Tabla 7.4, mientras que la representación gráfica de los resultados, así como el valor de diversos análogos estructurales, se puede hallar en la Figura 7.13.

En el caso de la familia de ligandos del grupo L2, tan solo se ha podido observar actividad antioxidante para **L2-H**. Para el ligando **L2-Me₃** no se observó una reducción significativa de la concentración de radicales superóxido a ninguna concentración de trabajo. En cualquier caso, como se puede observar en la Tabla 7.4 y la Figura 7.13, los valores de actividad antioxidante de **L2-H** son bastante modestos, con una constante de apenas $1.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Esto sitúa a este complejo de Cu(II) en la parte baja de la comparación con los demás miméticos azamacrocíclicos. Pese a esto, cabe decir que este ligando presenta unos valores cercanos a los mostrados por sus análogos estructurales del grupo L1 (los ligandos **L1-H** o

Tabla 7.4 – Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos de los ligandos del grupo L2 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.

Complejo	IC_{50} (μM)	k_{cat} ($\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Cu- L2-H	2.38(2) ^a	1.5
Cu- L2-Me₃	-	-
Cu(ClO ₄) ₂ ^b	1.1(1)	2.7
CuZn-SOD ^b	0.010(2)	430

^a Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^b Datos tomados de la bibliografía.³⁶¹

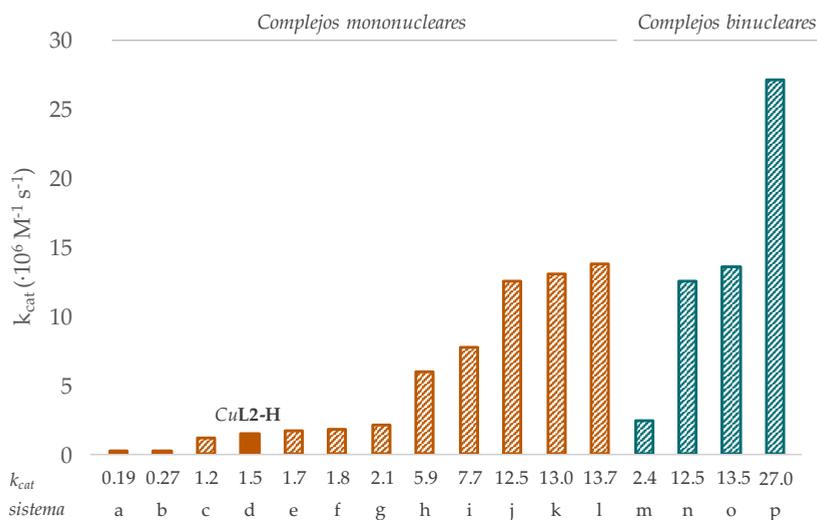


Figura 7.13 – Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL15,³⁶³ b) CuL12,³⁶³ c) CuL1-Me₃, d) CuL2-H, e) CuL1-H, f) CuL9,¹⁸⁰ g) CuL11,²⁹⁰ h) CuL8,¹⁸⁰ i) CuL14,³⁶⁴ j) CuL13,²⁹⁰ k) CuL7,¹⁸⁰ l) CuL1-MeiPr₂, m) Cu₂L7,¹⁸⁰ n) Cu₂L9,¹⁸⁰ o) Cu₂L10¹⁸⁰ y p) Cu₂L8¹⁸⁰.

incluso L1-Me₃).

Con estos resultados se evidencia que la presencia del grupo hidroxilo en *para* al nitrógeno piridínico no supone un incremento de la actividad SOD de los complejos de Cu(II) estudiados. Y de hecho, puede que la tendencia llegue a ser incluso de signo contrario, como sucede con L1-Me₃. De cualquier manera, estos resultados se correlacionan con las constantes de estabilidad de los complejos determinadas en el capítulo anterior. En estos se observa que la presencia del hidroxilo en posición 4 en la piridina, y en concreto el equilibrio ceto-enólico que este grupo origina, aumentan la estabilidad de los complejos de Cu(II), dificultando con ello el necesario paso de Cu(II) a Cu(I) del ciclo catalítico. No es extraño, por tanto, que los complejos del grupo L2 tengan igual o menor actividad que los equivalentes del grupo L1.

Ahora bien, ¿qué sucede cuando invertimos el carácter de la piridina? ¿Qué efecto tiene el hecho de que sustituyamos un grupo que incrementa la presencia de

carga sobre el nitrógeno piridínico por otro que la reduce? Todo ello lo podremos estudiar en el siguiente apartado.

7.5 INFLUENCIA DEL SUSTITUYENTE CARBOXÍLICO

Continuando con el estudio del efecto que tiene la alteración de las propiedades dadoras de la piridina sobre la actividad antioxidante SOD de los complejos de Cu(II), seguidamente se va analizar el comportamiento de los ligandos de los grupos L3 y L4. Estos compuestos presentan un grupo carboxílico o un éster metílico en *para* al nitrógeno de la piridina, grupos que se caracterizan por su capacidad de retirar carga del anillo aromático al que se encuentran unidos.

Los resultados de actividad antioxidante SOD determinados para esta familia de ligandos se pueden encontrar en la Tabla 7.5, mientras que la representación gráfica de los resultados, así como el valor de diversos análogos estructurales, se puede hallar en la Figura 7.14.

En el caso de los grupos L3 y L4, ha sido posible determinar la constante catalítica y el IC_{50} de los complejos de Cu(II) de todos los ligandos, obteniendo valores de alrededor de $10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para **L3-H** y **L3-Me₃** y de $4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para **L4-Me₃**.

Si comparamos estos valores de actividad antioxidante SOD con los determi-

Tabla 7.5 – Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos de los ligandos de los grupos L3 y L4 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.

Complejo	IC_{50} (μM)	k_{cat} ($\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
Cu- L3-H	0.36(1) ^a	9.7
Cu- L3-Me₃	0.29(3)	12.3
Cu- L4-Me₃	0.09(1)	40.3
Cu(ClO ₄) ₂ ^b	1.1(1)	2.7
CuZn-SOD ^b	0.010(2)	430

^a Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^b Datos tomados de la bibliografía.³⁶¹

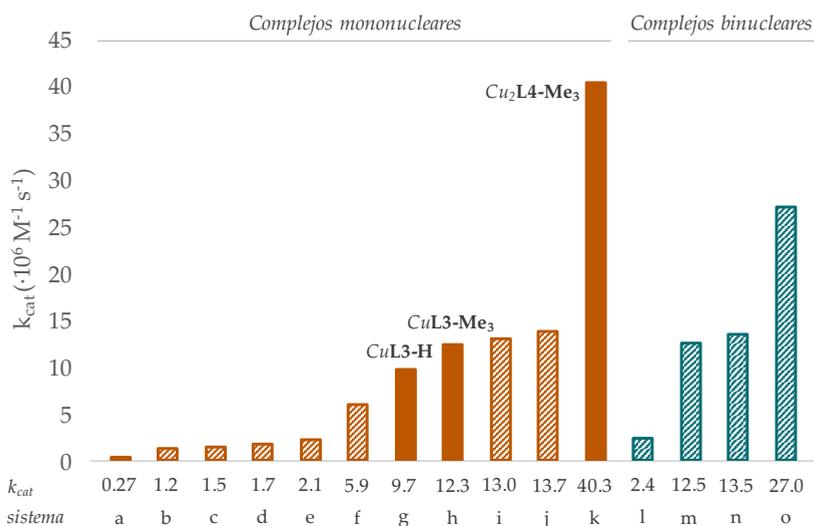


Figura 7.14 – Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL12,³⁶³ b) CuL1-Me₃, c) CuL2-H, d) CuL1-H, e) CuL11,²⁹⁰ f) CuL8,¹⁸⁰ g) CuL3-H, h) CuL3-Me₃, i) CuL7,¹⁸⁰ j) CuL1-MeiPr₂, k) CuL4-Me₃, l) Cu₂L7,¹⁸⁰ m) Cu₂L9,¹⁸⁰ n) Cu₂L10¹⁸⁰ y o) Cu₂L8¹⁸⁰.

nados para los distintos miméticos que hemos estudiado hasta el momento, podemos observar que los tres ligandos estudiados, y en especial **L4-Me₃**, presentan valores muy elevados de capacidad catalítica. De hecho, si comparamos la constante catalítica de **L3-H** con la de su análogo **L1-H**, en que no se ha modificado la piridina, podemos observar que su valor es 6 veces el de este último ($1.7 \cdot 10^6$ de **L1-H** frente a $9.7 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$ de **L3-H**). Lo mismo sucede con su forma trimetilada. Al añadir el grupo ácido carboxílico a la piridina de **L1-Me₃** multiplicamos la constante catalítica de su complejo de cobre por un factor 10, pasando de $1.2 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$ de **L1-Me₃** a $12.3 \cdot 10^6$ de **L3-Me₃**. Pese a ello, tampoco en el grupo L3 parece haber una clara diferencia en cuanto a actividad se refiere entre los ligandos alquilado y sin alquilar. Esto se observa en que tanto las constantes catalíticas de sus complejos (9.7 y $12.3 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$), como el IC₅₀ determinado (0.29 y $0.36 \mu M$), no muestran diferencias significativas.

Mención especial requiere el ligando **L4-Me₃**. La actividad de su complejo de

Cu(II) presenta valores de constante catalítica muy superiores no sólo a los de sus análogos de los grupos L1 y L2, sino que también se destaca por encima de los compuestos del grupo L3, con una constante de $40.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ y un IC_{50} de $0.09 \mu\text{M}$. Estos valores son incluso mayores (menores en el caso del IC_{50}) que los determinados para los sistemas binucleares (ver Figura 7.14).

Todos estos resultados son coherentes con lo estudiado en los capítulos anteriores. La menor estabilidad de los complejos de Cu(II) con los ligandos de los grupos L3 y L4, en comparación con la determinada para los ligandos del grupo L1, permite que el cobre pueda oscilar entre sus estados de oxidación +1 y +2 más fácilmente; siendo este un factor clave, como ya se ha indicado, para que sus complejos puedan catalizar la reacción de dismutación del radical superóxido.

7.6 INFLUENCIA DE LA AMPLIACIÓN DE LA CADENA

Tras analizar cómo influye la modificación de los sustituyentes amínicos y *para*-piridínicos de los azamacrociclos propuestos sobre la actividad SOD de sus complejos de Cu(II), resta por estudiar el efecto de una tercera modificación de su estructura: la ampliación de la cadena macrocíclica. Como se ha descrito en la *Introducción*, la ampliación de la cadena poliamínica de los ligandos con el fin de mejorar la actividad SOD de sus complejos ha sido una estrategia ya empleada anteriormente por distintos autores.^{180,341} La idea que subyace tras esta modificación se basa en el supuesto de que al aumentar el número de aminas disponibles para formar enlaces de coordinación, aumentará el número de átomos metálicos complejados simultáneamente al ligando. Parece evidente pensar que sistemas con un mayor número de átomos con función catalítica deben presentar una mayor actividad antioxidante SOD.

En este sentido, tras el estudio de la actividad de los complejos de Cu(II) con los ligandos de pequeña capacidad, se ha procedido a repetir los estudios con los ligandos L5 y L6. Tras comprobar que ambos ligandos coordinan cuantitativamente al Cu(II) a pH fisiológico, llegando a formar especies mayoritarias binucleares en caso de que haya una relación molar 1:2 L:Cu(II), se ha procedido a estudiar su capacidad catalítica SOD. Estos ensayos se han realizado siguiendo el procedimien-

Tabla 7.6 – Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos de los ligandos L5 y L6 con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.

Complejo	IC ₅₀ (μM)	k _{cat} (·10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹)
Cu-L5	1.4(5) ^a	2.5
CuZn-L5	1.6(2)	2.1
Cu ₂ -L5	0.8(1)	4.1
Cu ₂ -L6	0.37(4)	9.3
Cu ₂ -L7 ^b	1.2(2)	2.4
Cu ₂ -L8 ^b	0.11(2)	27.0
Cu(ClO ₄) ₂ ^c	1.1(1)	2.7
CuZn-SOD ^c	0.010(2)	430

^a Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^b Datos tomados de la bibliografía.¹⁸⁰ ^c Datos tomados de la bibliografía.³⁶¹

to descrito anteriormente para el resto de ligandos, basado en una modificación del método de McCord-Fridovich.²⁸¹⁻²⁸⁴ Los valores de las constantes catalíticas y de IC₅₀ determinados se muestran en la Tabla 7.6, junto con valores de algunos compuestos miméticos similares de la bibliografía, mientras que la representación gráfica de estos resultados se muestra en la Figura 7.15.

Mediante el ensayo descrito se han podido determinar los parámetros de actividad SOD (k_{cat} e IC₅₀) de los complejos de Cu(II). Todas las constantes catalíticas determinadas presentan un valor del orden de 10⁶ M⁻¹s⁻¹, siendo algo mayores para los complejos binucleares de Cu(II).

Del análisis de estos resultados se desprenden principalmente dos observaciones. En primer lugar, y como era de suponer, cuando los ligandos L5 y L6 coordinan simultáneamente dos átomos con capacidad catalítica a pH fisiológico (los complejos binucleares de Cu(II)) muestran una constante catalítica más elevada que cuando solo coordinan un átomo de cobre (los sistemas mononucleares y los mixtos de Cu(II) y Zn(II)). Este hecho es razonable teniendo en cuenta que, en

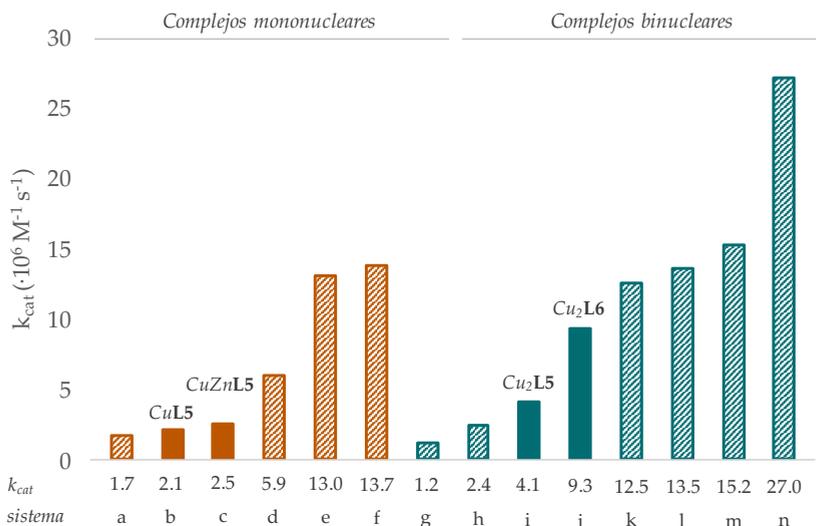


Figura 7.15 – Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL1-H, b) CuL5, c) CuZnL5, d) CuL8,¹⁸⁰ e) CuL7,¹⁸⁰ f) CuL1-MeiPr₂, g) Cu₂L15,³⁶³ h) Cu₂L7,¹⁸⁰ i) Cu₂L5, j) Cu₂L6, k) Cu₂L9,¹⁸⁰ l) Cu₂L10,¹⁸⁰ m) CuL12,³⁶³ y n) Cu₂L8¹⁸⁰.

principio, ambos centros metálicos pueden ser capaces de catalizar la reacción de dismutación de los radicales superóxido. Pero existe un factor adicional que puede contribuir en este sentido: en los complejos mononucleares de estos ligandos, el metal dispone de un elevado número de aminas accesibles, por lo que su esfera de coordinación habitualmente está saturada. Este hecho dificulta su participación en un ciclo catalítico. Por contra, en los ligandos binucleares, la falta grupos amino implica que varias posiciones de coordinación del cobre se encuentren insaturadas u ocupadas por moléculas de agua. Con ello se facilita la participación de estos metales en el ciclo de dismutación de los radicales superóxido. Cabe añadir que la diferente actividad mostrada por los compuestos mono- y binucleares está de acuerdo con lo observado anteriormente para sistemas similares.^{180,363}

En segundo lugar, al comparar estos ligandos con sus análogos bibliográficos piridínicos (L7 y L8) se observa que las constantes de los complejos piridínicos son significativamente menores, a excepción de los complejos CuZn-L5 y CuZn-L7. Este efecto es equivalente al ya comentado para la familia de compuestos L2. La

mayor capacidad dadora del anillo piridólico, en oposición al piridínico, favorece la formación de complejos de Cu(II) más estables y por tanto más impedidos a la hora de realizar el ciclo redox entre las formas Cu(II) y Cu(I). Es por ello que, pese a presentar valores de actividad antioxidante SOD relativamente elevados con respecto a gran parte de la bibliografía, su actividad es algo baja si se compara con la familia de compuestos binucleares piridínicos (ligandos L8 a L10, ver Figura 7.15).

Con el fin de profundizar en la comprensión de estos complejos de cobre, se ha llevado a cabo el estudio de su comportamiento electroquímico. Los voltamperogramas cíclicos obtenidos tanto para los complejos en relación molar L:Cu 1:1 como 1:2 se muestran en la Figura 7.16.

Al analizar los resultados se puede ver que todos los complejos muestran un perfil electroquímico similar. Durante el barrido catódico inicial, se puede observar la presencia de un pico de reducción a *ca.* -0.45 V vs. Ag/AgCl (C_1), precedido por una banda más o menos marcada sobre los -0.30 V (C^*). Estos picos son segui-

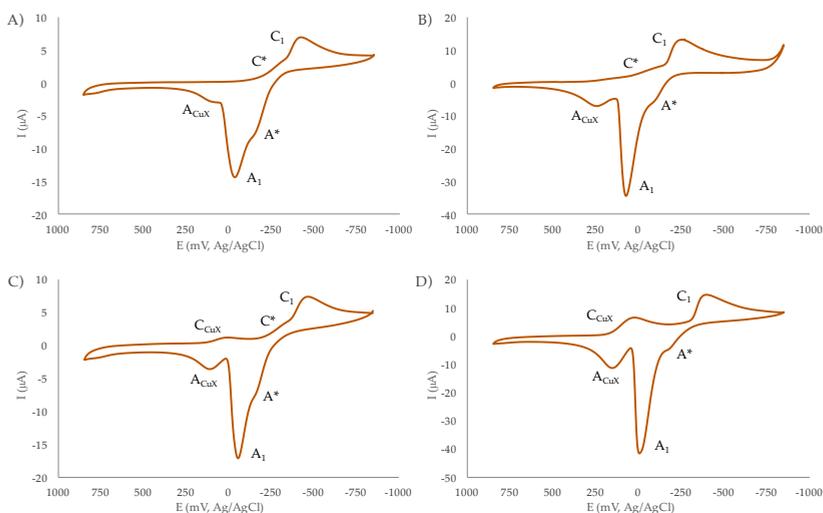


Figura 7.16 – Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) $CuL5$, B) Cu_2L5 , C) $CuL6$ y D) Cu_2L6 . Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} .

dos, durante el barrido anódico, por un intenso pico de oxidación a -0.10 V (A_1), acompañada por un hombro a -0.25 V (A^*). La señal de A_1 es seguida por una banda relativamente ancha a 0.15 V (A_{CuX}) que se puede relacionar con el pico de reducción que aparece sobre los 0.05 V durante el segundo y sucesivos barridos catódicos.

Tanto el par C_1/A_1 como el C_{CuX}/A_{CuX} se pueden relacionar fácilmente con algunos de los procesos vistos durante los estudios de electroquímica del grupo L1. El primer par, el C_1/A_1 , corresponde a la reducción de Cu(II) a Cu(0) y viceversa, con la consiguiente deposición de cobre metálico sobre los electrodos. Por su parte, el par C_{CuX}/A_{CuX} se puede relacionar con el proceso reversible Cu(II)/Cu(I) de los complejos de haluros de cobre.

Al delimitar el intervalo de potenciales de barrido a la región comprendida entre -0.10 y -0.30 V, es posible aislar el par C^*/A^* para todos los complejos, a excepción de para el sistema Cu_2L5 . De hecho, para este complejo tan solo se ha podido observar el pico catódico, lo que denota un comportamiento irreversible

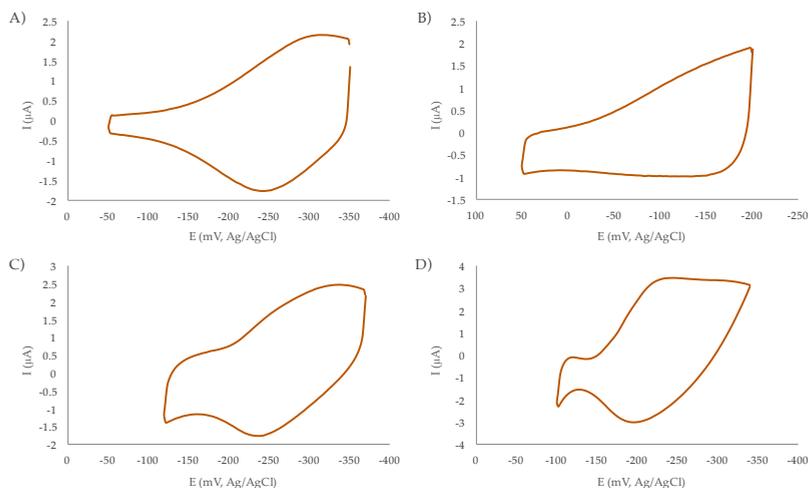


Figura 7.17 – Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) $CuL5$, B) Cu_2L5 , C) $CuL6$ y D) Cu_2L6 . Velocidad de barrido 50 $mV s^{-1}$. Se ha llevado a cabo la deconvolución de los datos con el fin de incrementar la resolución de los picos.

por parte de este sistema (ver Figura 7.17). Cabe hacer mención a una característica interesante de estos sistemas, y es que al añadir un segundo átomo de cobre a los complejos mononucleares, no se observa un desdoblamiento del par C^*/A^* , como sería de esperar atendiendo al distinto entorno de coordinación de los dos átomos metálicos. Por el contrario, se produce un aumento de la intensidad del pico catódico C_1 , de forma que en los sistemas Cu_2L5 y Cu_2L6 esta es aproximadamente dos veces la mostrada por los complejos $CuL5$ y $CuL6$.

Pese a que el mecanismo de reducción del Cu(II) en disolución acuosa puede ser complicado,³⁸⁰⁻³⁸² el perfil electroquímico descrito para los complejos de los ligandos binucleantes se pueden interpretar atendiendo a los trabajos realizados anteriormente con sistemas macrocíclicos de cobre.³⁸³⁻³⁸⁵ Esta interpretación se puede resumir en cuatro puntos principales:

- a) El Cu(II) tanto de los sistemas mono- como de los binucleares es reducido a cobre metálico en un proceso (C_1) mediado por la participación de dos electrones. Este proceso es similar al observado en ausencia de receptores (*vide infra*), lo que sugiere que la reducción tiene lugar a través de un mecanismo por el cual la disociación de los complejos precede a la propia reducción del cobre.
- b) En el caso de los sistemas binucleares, ambos centros metálicos se reducen al mismo tiempo y de forma independiente, es decir, sin que haya comunicación electrónica entre ellos.
- c) La oxidación de los depósitos metálicos durante el proceso A_1 favorece la formación de los complejos Cu(I)-haluro, los que son oxidados a continuación de la forma Cu(II)-haluro.
- d) A este mecanismo se le une un tercer proceso competitivo que implica la reducción monoelectrónica del Cu(II) a Cu(I) en los complejos macrocíclicos.

Este mecanismo general implica que, bajo condiciones electroquímicas, la ruta de reducción del Cu(II) está dominada por el proceso dielectrónico de generación de Cu(0). Pese a ello, es posible que bajo condiciones bioquímicas este par se vea

desfavorecido en beneficio de la ruta Cu(II)/Cu(I); como sería de esperar vista la actividad SOD de los complejos. Este hecho está respaldado por los potenciales formales de reducción del par C*/A* (-0.265 V para CuL5, -0.14 para Cu₂L5, -0.27 para CuL6 y -0.23 para Cu₂L6), definido como la semisuma de sus valores de potencial.

Así, se ha podido observar que los complejos de Cu(II) de los sistemas binucleantes no presentan una actividad SOD reseñable, especialmente si se compara con la mostrada por el resto de sistemas azamacrocíclicos. Ahora bien, el objetivo que se persigue con la introducción del grupo hidroxilo en la piridina de los compuestos L7 y L8 no es un aumento de su actividad SOD *per se*, sino ganar la capacidad de anclarlos sobre la superficie de nanopartículas oxídicas. Analicemos por tanto el comportamiento de estos ligandos cuando se encuentran funcionalizados sobre estos sistemas nanoestructurados.

7.7 EFECTO DEL USO DE NANOPARTÍCULAS

Tras el estudio de la actividad antioxidante de los complejos libres en disolución se procedió a la determinación de la actividad de los sistemas soportados en nanopartículas. Recordemos, llegado este punto, los distintos sistemas nanoestructurados que se han estudiado.

Tomando como elemento central la actividad antioxidante de los sistemas sintetizados, a la hora de estudiar el uso de nanopartículas oxídicas y su efecto sobre la actividad de los complejos soportados se pueden considerar dos variables: la naturaleza de la superficie de la nanopartícula, y la del ligando que se encuentra soportado. Con respecto a la primera variable, se ha hecho uso de nanopartículas de boehmita y de sílice, ambas nanopartículas de naturaleza oxídica, pero que a nivel "macroscópico" se diferencian fundamentalmente en el signo de su carga superficial. Con respecto a la segunda variable, se ha alterado la naturaleza del macrociclo mediante la alquilación de sus aminas y la elongación de la propia cadena, de forma análoga a lo estudiado hasta el momento con los sistemas libres. Empecemos analizando la actividad SOD de los nanosistemas de boehmita.

Los estudios de actividad antioxidante de tipo SOD se han llevado a cabo uti-

Tabla 7.7 – Resumen de los parámetros más importantes de la actividad SOD de los complejos con Cu(II). Los resultados han sido obtenidos mediante el ensayo de McCord-Fridovich.

Complejo	IC ₅₀ (μM)	k _{cat} (·10 ⁶ M ⁻¹ s ⁻¹)
Cu-L3-H	0.36(1) ^a	9.7
Cu-L3-Me ₃	0.29(3)	12.3
Cu ₂ -L5	0.8(1)	4.1
Cu ₂ -L6	0.37(4)	9.3
Cu-BNP-L3-H	0.071(6)	51.1
Cu-BNP-L3-Me ₃	0.155(6)	22.6
Cu ₂ -BNP-L5	0.10(3)	33.7
Cu ₂ -BNP-L6	0.12(1)	28.7
Cu(ClO ₄) ₂ ^b	1.1(1)	2.7
CuZn-SOD ^b	0.010(2)	430

^a Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^b Datos tomados de la bibliografía.³⁶¹

lizando el mismo procedimiento que para los sistemas libres, ya descrito en el capítulo *Materials and Methods*. Los resultados correspondientes a la constante catalítica y el IC₅₀ obtenidos para estos sistemas, así como una breve recopilación de los determinados para los sistemas análogos no soportados, se encuentran en la Tabla 7.7; mientras que su representación gráfica se halla en la Figura 7.18.

Al analizar estos resultados podemos observar que todos los sistemas nanoestructurados presentan una actividad SOD muy elevada, con constantes catalíticas del orden de 10⁷ M⁻¹s⁻¹ y valores de IC₅₀ situados entorno a 0.1 μM. De hecho, al comparar estos valores con los de la bibliografía podemos observar que se encuentran entre los miméticos con mayor capacidad catalítica que hayan sido descritos, como se puede observar gráficamente en la Figura 7.18. Mientras que las constantes catalíticas de la mayoría de complejos no funcionalizados presentan valores de alrededor de 10⁶ M⁻¹s⁻¹, las de los nanosistemas son un orden de magnitud superior. Es más, su actividad es tan sólo unas diez veces inferior a la del propio enzima

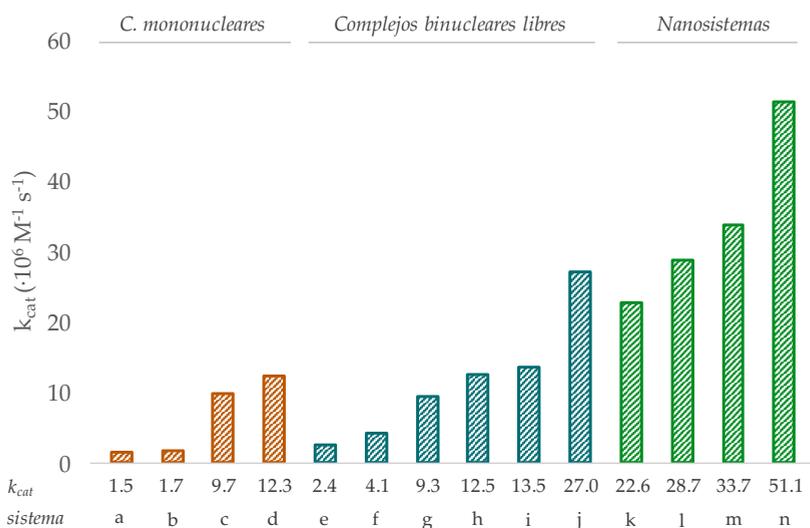


Figura 7.18 – Valores de constante catalítica para los sistemas a) CuL2-H, b) CuL1-H, c) CuL3-H, d) CuL3-Me₃, e) Cu₂L7,¹⁸⁰ f) Cu₂L5, g) Cu₂L6, h) Cu₂L9,¹⁸⁰ i) Cu₂L10,¹⁸⁰ j) Cu₂L8,¹⁸⁰ k) CuBNP-L3-Me₃, l) Cu₂BNP-L6, m) Cu₂BNP-L5 y n) CuBNP-L3-H.

CuZn-SOD ($4.3 \cdot 10^8 M^{-1}s^{-1}$)³⁶¹ con lo que, en cuanto a actividad antioxidante se refiere, estas nanopartículas funcionalizadas se encuentran a medio camino entre los miméticos enzimáticos clásicos y el propio enzima a mimetizar: a un orden de magnitud de cada uno de ellos.

Visto en contexto, el resultado es todavía más llamativo. Los miméticos enzimáticos no solamente no pierden actividad antioxidante al ser soportados sobre nanopartículas de boehmita, sino que esta se ve multiplicada. Este hecho se puede ver claramente en la Figura 7.19. El caso más llamativo es el del complejo binuclear de cobre con el ligando L5, cuya constante catalítica pasa de $4.1 \cdot 10^6$ a $33.7 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$. Es decir, soportando este ligando sobre nanopartículas de boehmita conseguimos aumentar 8.2 veces la actividad de sus complejos.

Por otra parte, no parece haber una clara diferenciación entre los sistemas mono- y binucleares. El sistema CuL3-Me₃ presenta una constante catalítica similar a la de los sistemas binucleares ($22.6 \cdot 10^6$ del primero frente a 28.7 y $33.7 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$ de Cu₂L6 y Cu₂L5, respectivamente), mientras que el complejo también

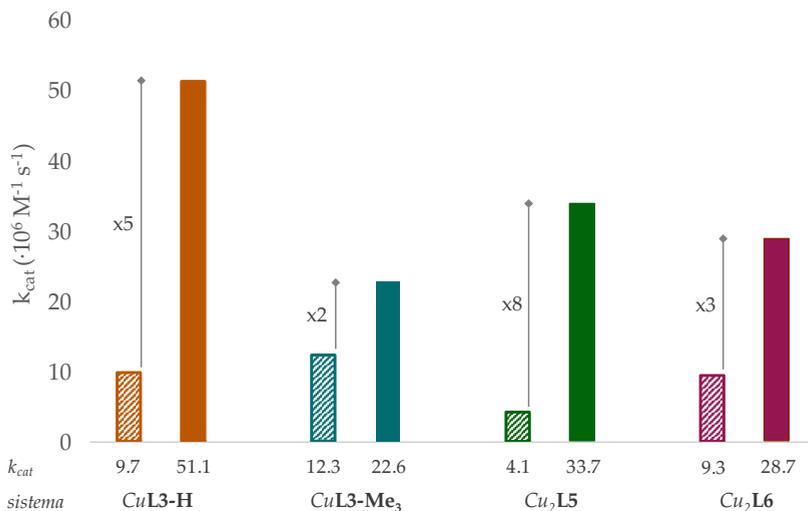


Figura 7.19 – Comparativa entre el valor de las constantes catalíticas de los complejos de los ligandos libres (trama rayada) y el de los complejos soportados sobre nanopartículas de boehmita (color sólido).

mononuclear $CuL3-Me_3$ destaca claramente sobre los demás con una constante de $51.1 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$. Asimismo, tampoco parece influir el distinto grado de funcionalización de los sistemas sintetizados sobre la actividad SOD de los sistemas finales. Mientras que el sistema **BNP-L6** presenta $2.18 \cdot 10^{-4}$ moles de ligando por gramo de nanopartícula, el contenido de mimético en **BNP-L5** es un orden de magnitud inferior ($0.35 \cdot 10^{-4} mol_{L5} g_{NP}^{-1}$) pero, pese a este hecho, sus constantes catalíticas son muy similares (28.7 frente a $33.7 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$, respectivamente). Del mismo modo, pese a que **L3-H** y **L3-Me₃** se encuentran soportados sobre las nanopartículas de boehmita con un grado de funcionalización muy similar (1.03 y $1.13 \cdot 10^{-4} mol_L g_{NP}^{-1}$), la actividad catalítica del primero es casi el doble de la del segundo (51.1 frente a $22.6 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$).

Es evidente, pues, que el soporte de los miméticos enzimáticos sobre nanopartículas de boehmita incrementa su capacidad de eliminar radicales superóxido del medio independientemente de su grado de funcionalización y de la naturaleza del ligando, pero ¿a qué se puede atribuir este efecto?

Una posible explicación podría ser que, más allá del complejo soportado, las propias nanopartículas también tuviesen actividad antioxidante, pero esta opción queda rápidamente descartada al no haberse observado indicios que apuntasen en tal dirección durante la medida de los blancos. Ni al trabajar con nanopartículas no funcionalizadas ni al hacerlo con aquellas que contienen ligando en su superficie (pero no Cu(II)) se ha observado una disminución de la concentración de radicales superóxido mediante el ensayo de McCord-Fridovich. El incremento de esta actividad debe de estar en consecuencia relacionado con un efecto de la nanopartícula sobre el complejo metálico o sobre el propio medio de reacción.

Si el efecto de la nanopartícula tiene lugar sobre el complejo metálico, esta influencia debe verse reflejada en el perfil redox de los complejos. Con el objetivo de verificar este punto, se han llevado a cabo los estudios electroquímicos de los complejos de cobre con los sistemas L5 y L6 soportados en boehmita, cuyos voltamperogramas se encuentran en la Figura 7.20.

De igual modo a lo observado para el resto de complejos de cobre, al analizar los voltamperogramas de los sistemas *CuBNP-L5* y *CuBNP-L6* en sus diferentes

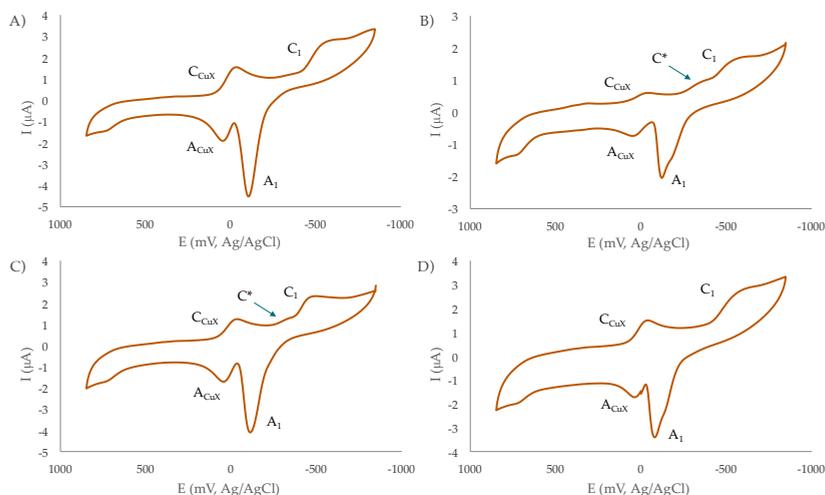


Figura 7.20 – Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) Cu(II), B) *CuBNP-L6*, C) *Cu₂BNP-L6* y D) *Cu₂BNP-L5*. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} .

ratios molares se puede observar la presencia de los dos pares característicos del cobre en el medio de estudio: (a) el par C_1/A_1 , correspondiente al proceso de reducción del Cu(II) a Cu(0); y (b) el par C_{CuX}/A_{CuX} , relacionado con el proceso de reducción monoelectrónico del Cu(II). Pero más allá de estas dos señales, se detecta la presencia de un pico catódico adicional (C^*), sobre los -0.35 V de potencial. Esta nueva señal se corresponde con el par Cu(II)/Cu(I) del cobre que se encuentra complejoado por los ligandos. Cabe decir que este pico tan solo se ha podido determinar en los sistemas *CuBNP-L6* y *Cu₂BNP-L6*, sin observarse en las nanopartículas funcionalizadas con **L5**.

Cuando el barrido se limita al intervalo de potenciales de -0.10 a -0.40 V, se observa que el nuevo par C^*/A^* presenta de hecho un comportamiento reversible (ver Figura 7.21). Al calcular el potencial formal de reducción de los complejos soportados en las nanopartículas, se comprueba que este pasa a tomar valores ligeramente más negativos: -0.31 V para *CuBNP-L6* y -0.275 V para *Cu₂BNP-L6*, en contraste con los -0.27 V de *CuL6* y los -0.23 V de *Cu₂L6*.

A la vista de los resultados aportados por los estudios electroquímicos, no parece que el soporte de los ligandos sobre las nanopartículas de boehmita implique un efecto lo suficientemente importante sobre los complejos como para justificar el incremento en su actividad SOD.

Llegado este punto es lógico pensar en una posible contribución del efecto de

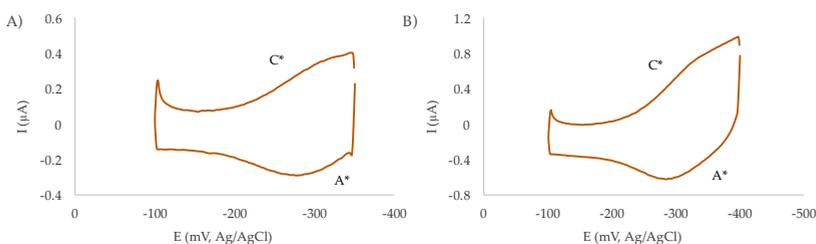


Figura 7.21 – Voltamperogramas cíclicos medidos en electrodo de grafito de disoluciones 10^{-3} M de A) *CuBNP-L6*, B) *Cu₂BNP-L6*. Velocidad de barrido 50 mV s^{-1} . Se ha llevado a cabo la deconvolución de los datos con el fin de incrementar la resolución de los picos.

multivalencia. Ahora bien, tal y como viene descrito en la actualidad tal efecto, este no es completamente aplicable al sistema que estamos estudiando.²²⁷ Según explican C. Fasting *et al.*,²²⁷ la multivalencia se define como un conjunto de conexiones supramoleculares entre sistemas en que, mediante la suma de interacciones de poca intensidad, se logra formar un complejo muy estable y de carácter reversible. Este es el sistema que utilizan los virus, por ejemplo, para adherirse a las células huésped y poder introducirse en estas mediando endocitosis o, yendo a un terreno más mundano, el mecanismo de funcionamiento del velcro. Puesto que la interacción entre catalizador y sustrato en la reacción de dismutación del radical superóxido tiene lugar en relación 1:1, no parece que el efecto de multivalencia pueda tener un papel significativo en su mecanismo de acción más allá de poder ser una posible fuente de protones durante la segunda etapa del ciclo catalítico (reducción del superóxido a peróxido asociada a la oxidación del Cu(I) a Cu(II)).

A la vista de estos hechos, la influencia de la nanopartícula sobre el incremento de la actividad SOD de los complejos soportados debe ir más allá de un posible efecto sobre el propio catalizador. Si analizamos de nuevo la caracterización de las nanopartículas de boehmita funcionalizadas, observaremos un rasgo común entre todos los sistemas sintetizados: el signo positivo de su carga superficial. Ya la propia boehmita presenta carga positiva, de forma que al anclar sobre su superficie los azamacrociclos sintetizados y complejarlos con Cu(II), esta toma valores todavía mayores. Un resumen de los valores determinados lo podemos ver en la Figura 7.22. Todos los sistemas estructurados en base a nanopartículas de boehmita estudiados en la presente tesis presentan valores de potencial- ζ de entre 24 y 35 mV. ¿Puede que sea, por tanto, la carga superficial positiva de las nanopartículas la característica que estimule la actividad antioxidante de los nanosistemas?

Esta hipótesis no es descabellada, teniendo en cuenta la carga negativa de los radicales superóxido. Es posible que una densidad de carga superficial positiva sobre los nanosistemas acelere la velocidad de difusión de los iones $O_2^{\cdot-}$ hacia su superficie, aumentando la concentración aparente de estos radicales en el entorno próximo de los complejos. Este potencial positivo en el entorno del catalizador recuerda, de hecho, a la estructura del centro activo de la CuZn-SOD. Como se ha

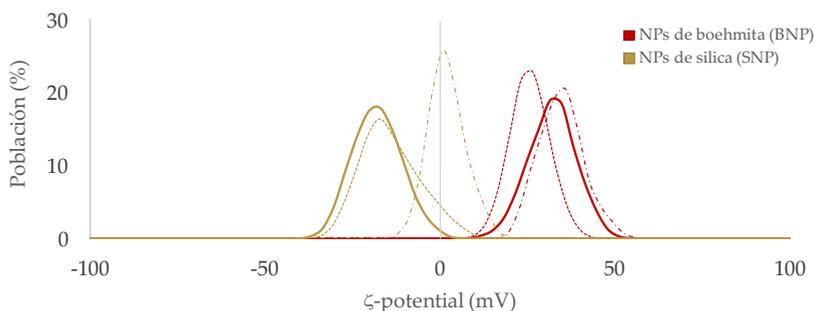


Figura 7.22 – Representación del potencial- ζ determinado para los diferentes sistemas de nanopartículas oxídicas funcionalizadas de los ligandos L5 (línea punteada) y L6 (línea rayada), así como para las propias NPs sin funcionalizar (línea continua).

explicado en la *Introducción* de la tesis, el centro activo de este enzima se dispone en forma de cavidad relativamente estrecha, entorno a la cual el enzima presenta un conjunto de residuos de arginina. A través de estos se consigue generar un gradiente electrostático positivo hacia el interior del centro activo, con lo que se logra atraer a los radicales superóxido hacia el entorno del cobre.^{110,378,386} De este modo se consigue aumentar el número de ciclos catalíticos que puede realizar el enzima por unidad de tiempo.

El modo de demostrar que la carga de las nanopartículas tiene una influencia determinante sobre el aumento de la actividad antioxidante SOD de los complejos estudiados, por encima de otros posibles efectos, es variar el valor de la misma o incluso cambiar su signo. Es por ello que se decidió trabajar con las nanopartículas de sílice, de carga superficial negativa, pero misma naturaleza oxídica. Si la carga afecta significativamente a la velocidad de difusión de los radicales superóxido, el uso de estas nanopartículas de carga negativa debería reducir la capacidad antioxidante SOD de los miméticos soportados. Al repetir los ensayos con estos nuevos sistemas se pudo comprobar que, efectivamente, esto era así.

Los resultados de estos estudios, así como una breve recopilación de los valores determinados para los sistemas libres y los soportados sobre nanopartículas de boehmita, se pueden encontrar en la Tabla 7.8. Cabe mencionar que los estudios

Tabla 7.8 – Recopilación de los parámetros más importantes de la actividad SOD y potencial- ζ de los diferentes sistemas de nanopartículas sintetizados

Complejo	IC ₅₀ (μM)	k_{cat} ($\cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	Potencial- ζ (mV)
Cu- BNP-L3-H	0.071(6) ^a	51.1	16.1(6)
Cu- BNP-L3-Me₃	0.155(6)	22.6	13.6(4)
Cu ₂ - BNP-L5	0.10(3)	33.7	24.7(1)
Cu ₂ - BNP-L6	0.12(1)	28.7	32.0(7)
Cu ₂ - SNP-L5	3.5(3)	1.0	-12(2)
Cu ₂ - SNP-L6	0.43(5)	8.2	0(2)
Cu(ClO ₄) ₂ ^b	1.1(1)	2.7	-
CuZn-SOD ^b	0.010(2)	430	-

^a Los valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^b Datos tomados de la bibliografía.³⁶¹

con nanopartículas de sílice se han llevado a cabo tan solo con los ligandos piridólicos (**L5** y **L6**) a causa de la naturaleza del anclaje de los ligandos **L3-H** y **L3-Me₃** (con el uso del silano que se utiliza como intermediario entre la nanopartícula y el ligando se podría alterar significativamente el potencial- ζ del sistema, pudiendo llegar incluso a valores positivos). Asimismo, es importante destacar que en función de la concentración de ligando en las nanopartículas, se ha logrado obtener sistemas con carga superficial negativa o, incluso neutra (como es el caso de **SNP-L6**).

Como se puede observar en la Tabla 7.8, la reducción de la carga superficial positiva de las nanopartículas implica una importante reducción de la capacidad antioxidante SOD de sus complejos de Cu(II). Así, cuando el sistema presenta un potencial ζ próximo a cero, la constante determinada es muy cercana a la observada en los complejos no funcionalizados. Es el caso de Cu₂-**SNP-L6**, por ejemplo, que presenta un valor de potencial ζ de 0 mV y cuya constante catalítica es de $8.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, muy parecida a la del complejo libre ($9.3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Pero más llamativo es incluso el caso de los sistema con carga negativa. Para el ligando **L5**, por ejemplo, estar soportado sobre un sistema con un potencial ζ negativo supone

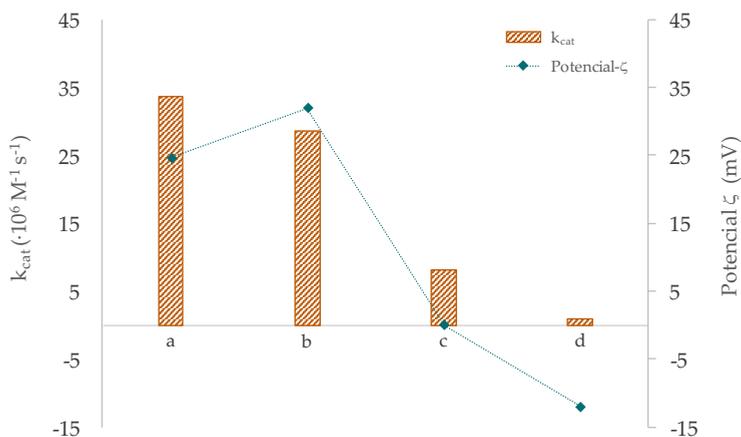


Figura 7.23 – Comparación entre el valor de la constante catalítica de los complejos L5 y L6 soportados sobre nanopartículas de sílice y de boehmita. Las barras con tramas naranja se corresponden con el valor de la constante catalítica de cada sistema, mientras que los puntos azules representan el valor de su potencial- ζ . Valores determinados para los sistemas a) $Cu_2BNP-L5$, b) $Cu_2BNP-L6$, c) $Cu_2SNP-L6$ y d) $Cu_2SNP-L5$.

una disminución del valor de su constante catalítica en un factor 4 con respecto al complejo libre y en un factor 34 respecto al complejo soportado sobre boehmita.

La influencia que tiene la carga superficial de las nanopartículas se puede ver claramente cuando se representa en función de la constante catalítica de sus sistemas soportados (ver Figura 7.23). Pese a no seguir una tendencia lineal, en esta figura se puede observar cómo valores de carga superficial inferiores a zero conllevan una reducción en el valor de la constante catalítica por debajo incluso de $10^6 M^{-1} s^{-1}$. Por ponerlos en contexto, estos valores son más bajos incluso que los mostrados por los complejos mononucleares piridólicos, cuya actividad estaba fuertemente desfavorecida por el equilibrio cetoenólico.

En consecuencia, parece plausible que el signo y, en menor medida, el valor de la carga superficial de las nanopartículas influye en gran medida sobre el valor final de la constante catalítica de los complejos en ellas soportados. De esta forma, los nanosistemas con un potencial ζ positivo provocan un importante incremento

en la actividad SOD de los miméticos, mientras que si este es negativo, la repulsión entre las cargas de mismo signo de la nanopartícula y la del propio sustrato repele este último del entorno del complejo, por lo que la actividad del mismo se ve significativamente reducida.

Al respecto de la carga de los nanosistemas, cabe añadir en último lugar que valores elevados de potencial ζ , ya sea en un sentido o en otro, no solamente influyen sobre la actividad antioxidante SOD del complejo final, sino que también contribuyen a aumentar la estabilidad de los nanosistemas en suspensión, retardando su deposición. Este factor es clave para que los miméticos puedan llevar a cabo el ciclo catalítico de forma óptima.

7.8 ACTIVIDAD SOD DE LOS COMPLEJOS DE Fe(II)

Tras el análisis exhaustivo de la capacidad SOD mostrada por los sistemas de Cu(II) sintetizados en esta tesis, se ha procedido a estudiar si los complejos de Fe(II) presentan esta misma actividad y en qué grado. De esta forma, siguiendo el procedimiento ya descrito de McCord-Fridovich, se ha cuantificado la actividad superóxido dismutasa de los distintos complejos, tanto libres en disolución como soportados sobre nanopartículas de boehmita.

En este caso, el análisis de los resultados es mucho más breve que para los sistemas estudiados anteriormente: ninguno de los complejos de Fe(II) presenta una actividad SOD reseñable. Al llevar a cabo los estudios cinéticos de eliminación de los radicales $O_2^{\bullet-}$ se observa que, incluso a concentraciones elevadas de complejo, la concentración de superóxido en el medio se reduce muy ligeramente. En la mayoría de los casos, de hecho, a concentraciones de 100 μM de complejo de Fe(II) tan solo se llega a observar una reducción de superóxido cercana al 30 %. Recordemos que las nanopartículas funcionalizadas, por ejemplo, eran ya capaces de eliminar el 50 % de esta especie en disolución a una concentración de complejo de Cu(II) de incluso 0.07 μM .

El análisis de los resultados del ensayo de McCord-Fridovich muestra que todos los sistemas de Fe(II) sintetizados presentan valores de IC_{50} superiores a 100 μM , lo que equivale a constantes catalíticas del orden de $10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Estas cons-

tantes son dos órdenes de magnitud inferiores que la de los complejos de Cu(II) libres, tres órdenes si se comparan con los sistemas nanoestructurados. En consecuencia, se puede considerar que ninguno de los complejos de Fe(II) estudiados presenta una actividad SOD significativa, especialmente cuando estos datos son comparados con los de sus análogos cúpricos.

7.9 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CATALASA

A lo largo de este capítulo de la tesis se ha discutido en profundidad la diferente capacidad mostrada por los sistemas sintetizados para eliminar los radicales superóxido del medio. Así, a través de los diferentes apartados se ha podido comprobar que la alquilación del ligando con grupos voluminosos mejora hasta en un orden de magnitud la actividad antioxidante de los complejos estudiados, al tiempo que se ha estudiado a qué es debido este efecto. Por otro lado, también se ha comprobado que disminuyendo la capacidad dadora de la piridina y ampliando el tamaño de la cadena azamacrocíclica se mejora la actividad SOD de sus complejos. Por último, se ha podido observar que mediante el anclaje de los complejos a sistemas nanoestructurados con carga superficial positiva se aumenta de forma sistemática su capacidad catalítica hasta llegar a ser tan solo diez veces inferior a la del propio enzima.

Ahora bien, la eliminación eficaz y cuantitativa de los radicales superóxido es tan solo la mitad del camino a recorrer a la hora evitar los efectos adversos derivados de su presencia. En otras palabras, la eliminación de las especies de superóxido no evita en su totalidad la existencia de estrés oxidativo, solo hace que este cambie de forma. Esto es debido a que su dismutación, ya sea catalizada o espontánea, genera como producto peróxido de hidrógeno (ec. 7.2 y 7.3).

El H_2O_2 es un agente oxidante comprendido dentro de la familia de las ROS.³⁸⁷ Así, pese a jugar un papel clave en diferentes procesos de detoxificación y señalización celular, la sobreexpresión de este compuesto se ha relacionado con la presencia de daño oxidativo en tejidos y órganos.^{388,389} Es por ello que nuestro propio organismo cuenta con familias de enzimas, como las catalasas, las glutatión peroxidadasas o las peroxiredoxinasas, encargadas de eliminar estas especies del medio

y evitar así las consecuencia del estrés oxidativo derivado de su presencia.³⁹⁰ Por lo tanto, para que cualquier sistema con capacidad SOD pueda ser considerado como antioxidante, este debe ir acoplado a un sistema de eliminación de H_2O_2 .

Llegado este punto, la primera pregunta que nos podemos plantear es, ¿los miméticos sintetizados durante esta tesis tienen actividad catalasa? En caso que no la tengan no podrían ser considerados como sistemas antioxidantes absolutos, ya que su propia actividad catalítica genera una nueva especie con carácter oxidante, como es el H_2O_2 . En ese caso tan solo podrían ser considerados como miméticos enzimáticos de la SOD. Ahora bien, si son capaces de catalizar la reacción de dismutación del peróxido de hidrógeno (bien los propios sistemas, bien los complejos metálicos de los mismos), ninguno de los cálculos realizados hasta el momento de actividad SOD sería correcto: la capacidad de los sistemas por reaccionar con el H_2O_2 implicaría la presencia de un proceso competitivo adicional entre estas especies y el superóxido, hecho que no se ha tenido en cuenta ni en el procedimiento experimental del ensayo de McCord-Fridovich en la deducción matemática del método. Así pues, ninguna de las dos opciones parece halagüeña.

El método más sencillo para resolver la pregunta planteada sobre si los compuestos sintetizados presentan actividad catalasa pasa por estudiar el efecto de ser adicionados sobre una disolución de peróxido de hidrógeno. El H_2O_2 es un compuesto que presenta una banda de absorción de cierta intensidad con un máximo localizado a 219 nm (ver Figura 7.24B), por lo que cualquier aceleración de su descomposición causada por los sistemas sintetizados debe de poder ser medida siguiendo la intensidad de este pico en función del tiempo. En consecuencia, con el fin de determinar la posible actividad catalasa de los compuestos sintetizados, se procedió a medir la intensidad de absorbancia de la banda situada a 219 nm durante 360 s para diferentes disoluciones de ligandos y nanopartículas en presencia y ausencia de Cu(II) y Fe(II).

Con el fin de validar las medidas, cada conjunto de cinéticas se referenció respecto al comportamiento de dos disoluciones de H_2O_2 , una en presencia de EUK-134 (Figura 7.24A) y otra en ausencia de él. Mediante la medida de estos dos controles, cuyo resultado típico se muestra en la Figura 7.24C, se obtiene una do-

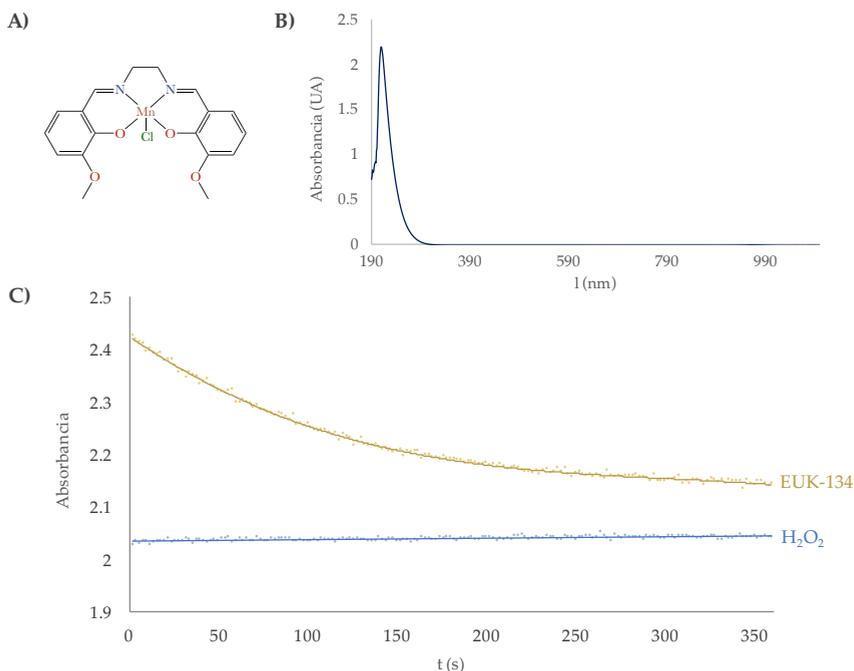


Figura 7.24 – A) Estructura del complejo de referencia EUK-134.¹⁴⁵ B) Espectro de absorbancia de una disolución de peróxido de hidrógeno 1 M a 298 K. C) Representación de la intensidad de absorción a 219 nm en función del tiempo para una disolución de H₂O₂ 1 M (trazo azul) y H₂O₂ 1 M en presencia de EUK-134 (50 mM, trazo amarillo).

ble confirmación de la validez del procedimiento empleado. En primer lugar, el estudio de la disolución que contiene únicamente H₂O₂ permite comprobar que la concentración de esta especie es estable en el tiempo, al menos bajo las condiciones de medida. Por lo tanto, tras la adición de los sistemas sintetizados, toda desviación de este comportamiento será causada por el efecto de la interacción del peróxido con los propios compuestos añadidos. En segundo lugar, el seguimiento del máximo de absorción del H₂O₂ en presencia de EUK-134 permite comprobar que, bajo las condiciones de medida, es viable la catálisis del peróxido por un mimético de la catalasa. Cabe decir que el EUK-134 es un complejo de Mn(II) cuya

capacidad catalasa es bien conocida, utilizándose habitualmente como control en este tipo de ensayos.^{145,268,269} En caso de que los compuestos sintetizados tengan actividad catalasa, al adicionarlos sobre una disolución de H_2O_2 , la intensidad de absorción a 219 nm debe disminuir, tal y como sucede durante este segundo control (ver Figura 7.24C). La pendiente de esta curva será mayor o menor en función de la capacidad catalítica que presente el complejo adicionado. Información adicional sobre el procedimiento empleado en el capítulo de *Materials and Methods*.

Una muestra de los resultados obtenidos para los ensayos con los sistemas sintetizados (tanto ligandos como sistemas nanoestructurados, solos y complejados a Cu(II) y Fe(II)) se pueden encontrar en la Figura 7.25. La conclusión evidente que se puede extraer de estos resultados es que ninguno de los sistemas sintetizados cataliza la eliminación del peróxido de hidrógeno. Ninguna representación muestra la más mínima tendencia a un decaimiento en la concentración de H_2O_2 para ninguno de los sistemas estudiados. Ni para los ligandos libres, ni para las nanopartículas funcionalizadas, ni para los diferentes complejos de Cu(II).

Para ninguno, a excepción de para cuatro sistemas en particular: los complejos *FeL1-Me₃*, *FeL2-Me₃*, *FeL3-Me₃* y *FeL4-Me₃*. Como se puede ver en la Figura 7.25C, solamente los complejos de Fe(II) de los ligandos pequeños trimetilados son capaces de catalizar la dismutación del peróxido de hidrógeno. Precisamente los sistemas que no presentan actividad SOD. Un análisis más detallado de los resultados muestra que, de hecho, no es que los complejos de Fe(II) de los sistemas trimetilados presenten actividad catalasa; es que su actividad es incluso comparable a la mostrada por la referencia EUK-134.

En cualquier caso, el motivo por el que ninguno de los sistemas sintetizados presenta actividad antioxidante cuando coordina Fe(II), a excepción de los ligandos trimetilados, es comprensible atendiendo a la reactividad de este tipo de complejos. Como es bien conocido, el Fe(II) es capaz de catalizar la reacción de deshidrogenación de las aminas primarias y secundarias en ambiente oxidante.³⁹¹⁻³⁹³ Así, es previsible que tras formarse el complejo con el Fe(II), las aminas secundarias de los ligandos pasen a su forma imina, modificando con ello la naturaleza de su interacción con el metal, tal y como se muestra en la Figura 7.26.

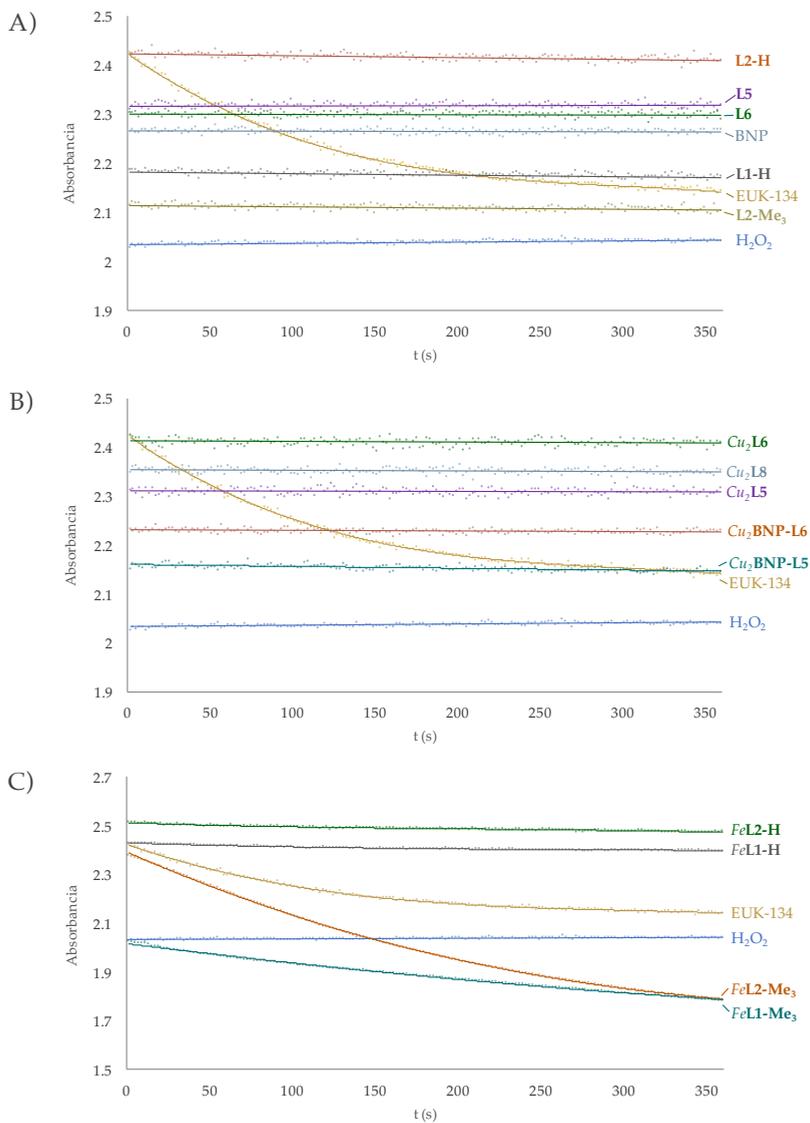


Figura 7.25 – Representación de la intensidad de absorbancia en función del tiempo medida a 219 nm para diversas muestras de A) ligandos de los grupos libres y soportados sobre nanopartículas, B) disoluciones de ligandos y sistemas de nanopartículas en presencia de Cu(II) y C) disoluciones de ligandos en presencia de Fe(II). En trazo amarillo se muestra el compuesto de referencia EUK-134.

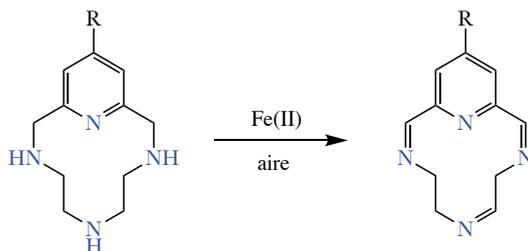


Figura 7.26 – Esquema de la reacción de deshidrogenación de los ligandos de pequeña capacidad mediada por la acción del Fe(II).

A la luz de estos resultados pueden plantearse dos conclusiones. En primer lugar, los sistemas desarrollados presentan una notable actividad antioxidante SOD, en algunos casos muy por encima de la bibliografía y a poca distancia del propio enzima de la SOD. Pero, al igual que sucede con este, ninguno de los complejos sintetizados puede etiquetarse como un sistema antioxidante absoluto ya que, pese a catalizar eficientemente la reacción de dismutación de los radicales superóxido, no son capaces de eliminar el peróxido de hidrógeno. En segundo lugar, se ha logrado sintetizar sistemas con actividad catalasa, tales como el *FeL1-Me₃*, pero sin la capacidad de eliminar el superóxido. Por lo tanto, estos complejos tampoco se pueden considerar sistemas antioxidantes completos, alejándose en su comportamiento del objetivo principal de este trabajo: crear nuevos miméticos de la SOD.

De esta forma, pese a haber desarrollado sistemas altamente eficientes con respecto a su función principal, el hecho de que no sean capaces de eliminar completamente el estrés oxidativo derivado de la presencia de los radicales superóxido puede dar la impresión de dejar el trabajo incompleto. Ahora bien, que un mismo complejo no sea capaz de eliminar simultáneamente superóxido y peróxido no significa que alguno de los sistemas estudiados sí lo pueda hacer.

Si reflexionamos sobre el conjunto de sistemas desarrollados, es posible encontrar uno en particular que presenta todas las características necesarias para convertirse en un agente antioxidante completo: mimético, al mismo tiempo, de la superóxidodismutasa y de la catalasa. De entre los sistemas estudiados, tan solo uno de ellos presenta una elevada actividad SOD cuando compleja Cu(II) y una

notable actividad catalasa cuando compleja Fe(II). Se trata del sistema nanoestructurado **BNP-L4-Me₃**.

En este mimético se combinan las cuatro características clave que permiten y/o potencian la actividad SOD y catalasa de un complejo de coordinación, determinadas a lo largo de esta tesis:

- i) Tiene capacidad de complejar cuantitativamente tanto Cu(II) como Fe(II) a pH fisiológico.
- ii) Presenta un grupo amida en *para* a su piridina, lo que debilita los complejos de Cu(II) y Fe(II) que pueda formar y, por tanto, facilita la realización del ciclo catalítico SOD.
- iii) Todas las aminas del ligando son terciarias, con lo que puede presentar actividad catalasa al no ser susceptible de sufrir oxidación a imina durante su interacción con Fe(II).
- iv) Es un sistema estructurado en base a nanopartículas de carga superficial positiva, como es la boehmita, con lo que es capaz de atraer los radicales superóxido a su entorno próximo, potenciando su actividad.

Este sistema por tanto reúne las características necesarias para ser un óptimo mimético tanto de la SOD como de la catalasa, tal y como muestran los resultados expuestos a lo largo del capítulo. Pero el elemento fundamental que lo convierte en el antioxidante completo es la multiplicidad de sus puntos de complejación. Así, tan solo es necesario añadir al sistema Fe(II) y Cu(II) en relación molar de 0.5 con respecto al ligando soportado para conseguir convertir a la nanopartícula funcionalizada en un mimético doble, capaz de eliminar simultáneamente superóxido y peróxido del medio; y lo más importante, sin que las distintas reacciones compitan entre sí por los centros catalíticos. De hecho, que en un mismo centro reactivo se combinen ambos tipos de actividad antioxidante, lejos de poder ser perjudicial, puede contribuir a aumentar la eficacia del sistema.

Analicemos un poco más en detalle el sistema con el fin de entender mejor su propio mecanismo de actuación (ver Figura 7.27). Tal y como hemos visto en el

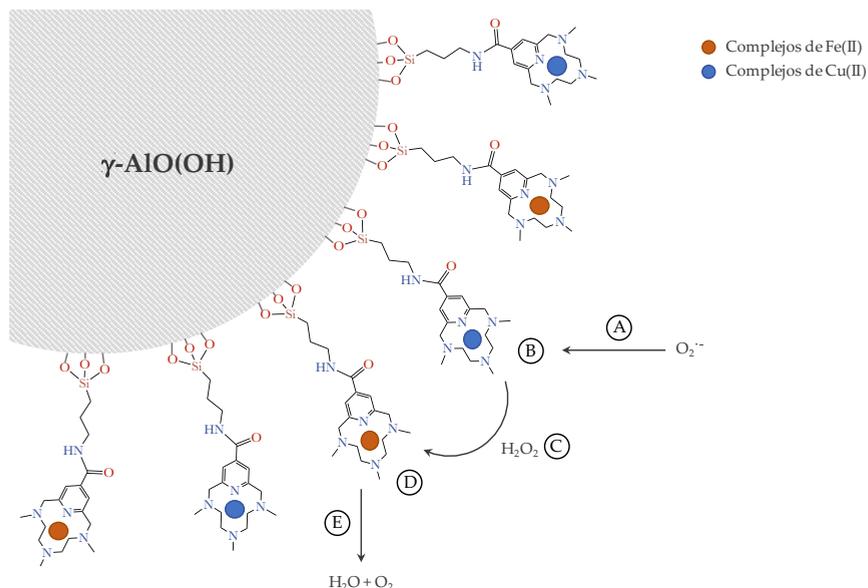


Figura 7.27 – Esquema del mecanismo de acción del sistema **BNP-L4-Me₃** durante su actuación como doble mimético. Este se puede dividir en cinco etapas fundamentales: A) aproximación del radical superóxido al nanosistema por atracción electrostática, B) dismutación de los radicales superóxido en los centros de Cu(II), C) liberación de H₂O₂ y transferencia de este a los centros de Fe(II), D) dismutación del peróxido de hidrógeno en los centros de Fe(II) y E) liberación de los subproductos del proceso (D).

capítulo de *Química de coordinación*, al adicionar Cu(II) y Fe(II) a una disolución de **BNP-L4-Me₃**, el ligando soportado en las nanopartículas coordina preferentemente el cobre hasta la saturación de los centro de complejación a causa de la mayor constante de estabilidad que presentan su complejos. En caso que haya un déficit de Cu(II), los centros que hayan quedado libres pueden coordinar el Fe(II). Por tanto, en disoluciones con Cu(II) y Fe(II) en relación molar 0.5 con respecto al ligando soportado en las nanopartículas, los sistemas nanoestructurados coordinan simultáneamente ambos metales.

Tras la generación de los radicales superóxido en el medio es cuando se pone en evidencia la actividad antioxidante de los nanosistemas. En primer lugar, la

carga superficial positiva de las nanopartículas aumenta la velocidad de difusión de los radicales hacia su superficie, incrementando con ello su concentración en el entorno de los complejos metálicos. Es en este punto cuando actúan los centros de cobre, catalizando la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ en O_2 y H_2O_2 con una k_{cat} de $22.6 \cdot 10^6 M^{-1}s^{-1}$, superior a la de la mayoría de miméticos de la bibliografía. Como se evidencia por su reducida actividad SOD ($IC_{50} > 100\mu M$), los complejos de Fe(II) no intervienen en esta primera reacción.

Este primer ciclo de catálisis libera peróxido de hidrógeno en el entorno inmediato de la propia nanopartícula, facilitando con ello el inicio del segundo ciclo de catálisis basado en la dismutación del peróxido generado. Esta segunda reacción la llevan a cabo los centros de Fe(II), siendo los complejos de Cu(II) agentes inertes en este proceso, tal y como se ha mostrado anteriormente en este mismo apartado (ver Figura 7.25). Como producto de la dismutación del H_2O_2 se obtiene O_2 y H_2O , compuestos inocuos para el organismo.

El sistema **BNP-L4-Me₃** es, por lo tanto, el mimético que hemos estado persiguiendo a lo largo de toda la tesis. Un sistema en que se combinan todas y cada una de las características necesarias para ser uno de los miméticos más eficaces de la bibliografía, con actividad tanto SOD como catalasa. Un sistema nanoestructurado con centros catalíticos independientes, específicos de una reacción concreta y cuyo funcionamiento presenta carácter cooperativo.

Chapter 8

Conclusions

Conclusion 1. *Synthesis and characterization of the ligands.*

The major achievement concerning the synthesis and characterization of the ligands is to have designed and synthesized seven new azamacrocyclic receptors. The new compounds, which can be divided in five families according to their structural features, differ in the pyridinic moiety, the amount of amines of the polyaminic chain and the alkylation degree that they present. New synthetic procedures for the collecting of the compounds have been designed, and those corresponding to the synthesis of the previously synthesized compounds have been optimized.

All the novel compounds have been fully characterized by NMR, mass spectroscopy and elemental analysis techniques.

Conclusion 2. *Synthesis and characterization of the oxidic nanoparticles.*

Boehmite nanoparticles were synthesized by means of the sol-gel method and characterized using x-ray diffraction techniques as well as dynamic light scattering and ζ -potential measurements. By monitoring the temperature of the reaction, the aluminium-water ratio and the acid chosen we were able to obtain γ -boehmite nanoparticles with an average size of 58 nm.

The silica nanoparticles, brought by Dr. Rafael Abargues, were also characterized using the same techniques employed with the boehmite nanosystems.

Conclusion 3. *Synthesis and characterization of the oxidic nanoparticles.*

The synthetic section finish with the functionalization of the oxidic nanoparticles. Ligands **L3-H**, **L3-Me₃**, **L5** and **L6** were grafted on the surface of the synthesized boehmite nanoparticles, while receptors **L5** and **L6** were also anchored onto the surface of the silica nanoparticles.

The amount of organic matter on the surface of the oxidic nanoparticles was determined by means of a NMR calibration and elemental analysis, while the amount of copper coordinated by the grafted ligands was quantified using inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP-MS).

All the nanosystems present an average concentration of azamacrocyclic li-

gands on their surface of 10^{-4} mol *per* gram of nanoparticles.

Conclusion 4. *Characterization of the acid-base behaviour of the ligands.*

The protonation constants of the new ligands were determined by potentiometric techniques. A further insight into their protonation behaviour was carried out by means of UV-Vis, NMR, calorimetric, x-ray diffraction and theoretical calculation studies.

Regarding the pyridinic tetraazamacrocyclic systems (ligands comprised in group L1), all of them present a similar behaviour characterised by: (i) early protonation of the central amine associated to the first protonation step, stabilized by the formation of a hydrogen bond with the pyridinic nitrogen; (ii) deprotonation of the central amine and protonation of the two lateral nitrogens with the second protonation step and (iii) protonation of the third amine group during the last protonation. Methylation of the ligands contributes to stabilize the monoprotinated structure due to the reduction of the inductive contributions.

Group L2 presents a very similar behaviour, differing from that shown by group L1 in the presence of an extra protonation step, corresponding to the pyridolic hydroxyl group, and a later rearrangement of the protonated amines. Keto-enolic equilibrium allowed by the hydroxyl group contribute to increase the protonation constants.

The protonation of group L3 is similar to that shown by the ligands of the group L1, except for the presence of an additional step, associated to the protonation of the carboxylic acid. Regarding the stabilization of the mononuclear species, group L3 presents an opposite behaviour with that shown by group L2: the withdrawal ability of the carboxyl group slightly destabilizes the first protonation.

Protonation of group L4 is closely related with that shown by the pyridinic group (L1).

Hexaazapyridinophanes present seven protonation constants, six of them corresponding to the secondary amines and one associated to the pyridolic hydroxyl group.

Conclusion 5. *Characterization of the coordination behaviour of the ligands.*

In order to understand the thermodynamic properties of the Cu(II), Fe(II) and Zn(II) complexes with the synthesized ligands, we have carried out potentiometric studies. These measurements were completed with the registration of the UV-Vis spectrum of the complexes in function of the pH, the determination of their formation and decomposition kinetics and the x-ray diffraction of some of the structures.

All the studied ligands present a remarkable tendency to coordinate copper, tendency that decreases with the alkylation of the amines and the introduction of a carboxylic group in the structure of the pyridine. In contrast, the presence of the hydroxyl group in *para* to the nitrogen in the pyridinic moiety increases the stability of the copper complexes. All the complexation constants present values ranking among 14 and 23 logarithmic units. The predominant complex present in solution at physiological pH is $[\text{CuL}]^{2+}$ for the ligands of groups L1 and L4 and $[\text{Cu}(\text{H}_{-1}\text{L})]^+$ for the ligands of groups L2 and L3.

On the other hand, the formation constants of the Fe(II) complexes show a lower stability for these species, comparing with the Cu(II) systems. All the studied ligands tend to coordinate Fe(II), but the constants rank now between 9 and 15 logarithmic units. The most stable complex at physiological pH is $[\text{FeL}]^{2+}$ for the ligands of group L1 and $[\text{Fe}(\text{H}_{-1}\text{L})]^+$ for the ligands of group L2.

Regarding to the binucleating compounds, **L5** and **L6** tend to coordinate simultaneously two atoms of copper for molar ratios 2:1 Cu(II):L. The predominant structure at physiological pH for both compounds is $[\text{Cu}_2(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]^{2+}$. These compounds can also form mixed Cu(II) Zn(II) complexes for 1:1:1 Cu(II):Zn(II):L molar ratios, giving rise to the formation of $[\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})]^{3+}$ and the hydroxylated $[\text{CuZn}(\text{H}_{-1}\text{L})(\text{OH})]^{2+}$ complexes at physiological pH.

Conclusion 6. *SOD activity of the studied systems.*

The superoxide dismutase activity of the synthesized systems was determined by means of the McCord-Fridovich assay and completed through the use of computational and electrochemical studies.

All the copper complexes, excluding those formed by the group L2 of ligands,

present a very remarkable SOD activity; with catalytic constants ranking from 10^6 to $50 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A further insight into their SOD behaviour show that methylation of the amines does not influence significantly their catalytic constant; instead, the increment of the bulkiness of the alkylic substituents leads to an enhancement of their SOD activity.

The introduction of the hydroxyl group in the structure of the pyridine leads to the reduction of the catalytic constant in the corresponding Cu(II) complexes. These SOD behaviour can be associated to the extra stabilization of the coordination species provided by the keto-enolic equilibrium of the pyridol. In contrast, the presence of the carbonyl group in the pyridine moiety leads to an increase of the SOD activity, due to the destabilization of the Cu(II) complexes.

In relation to the binuclear systems (ligands **L5** and **L6**), both the 2:1 Cu(II):L and the 1:1:1 Cu(II):Zn(II):L complexes present SOD activity, but with smaller catalytic constants than their pyridinic analogues. This difference can be explained in the same way than the activity of the group L2 copper complexes.

Regarding the activity of the nanosystems, grafting of the ligands onto the boehmite nanoparticles surface leads to a systematic enhancement of the SOD activity in their Cu(II) complexes. However, functionalization of the silica nanoparticles with the same ligands does not implies an equivalent increment of the SOD activity. Indeed, when the nanosystems presents ζ -potential negative values, their catalytic constant is significantly reduced to values even smaller than those shown by the non-grafted complexes. Thus, the positively charged surface of the boehmite nanoparticles might contribute to the increment of the nanosystems SOD activity by increasing the diffusion rates of the superoxide radicals towards the catalyst surroundings.

None Fe(II) complex shown a significant capacity to catalyze the disproportionation of the superoxide radicals.

Conclusion 7. *Catalase activity of the studied systems.*

Direct measurement of the hydrogen peroxide decomposition allowed us to determine the catalase activity of the synthesized systems.

Just the Fe(II) complexes of the trimethylated ligands (**L1-Me₃**, **L2-Me₃**, **L3-Me₃** and **L4-Me₃**), both free in solution and grafted on boehmite nanoparticles, shown catalase activity.

Anexo A

Espectros RMN

Caracterización por RMN de los ligandos y los sistemas nanoestructurados funcionalizados.

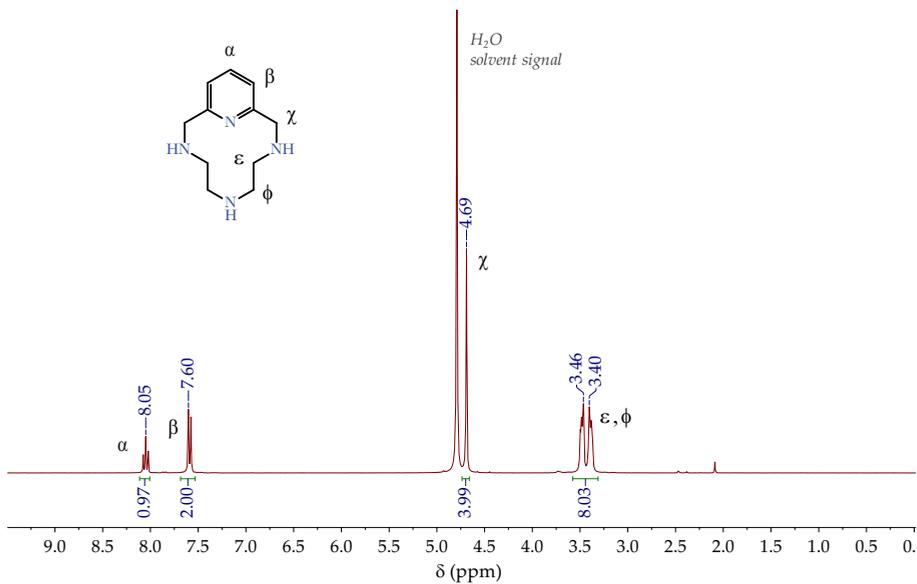


Figure A.1 – ^1H -NMR spectrum of L1-H in D_2O at 298 K.

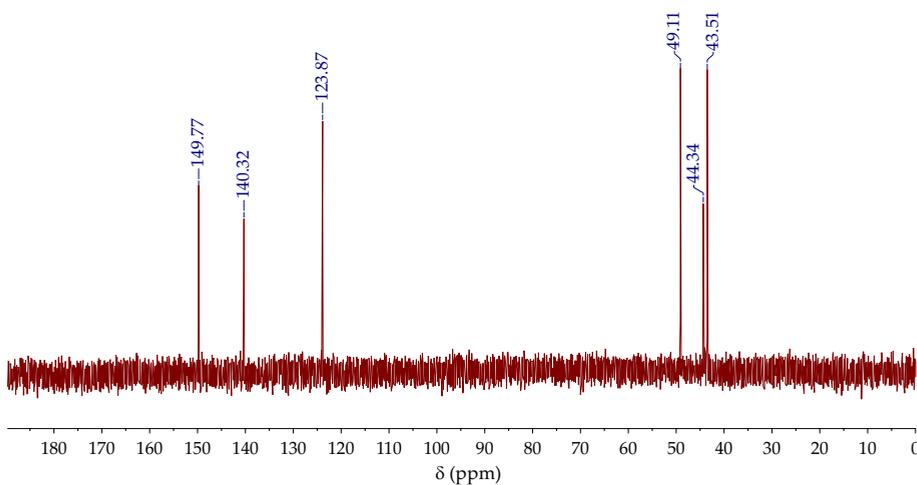


Figure A.2 – ^{13}C -NMR spectrum of L1-H in D_2O at 298 K.

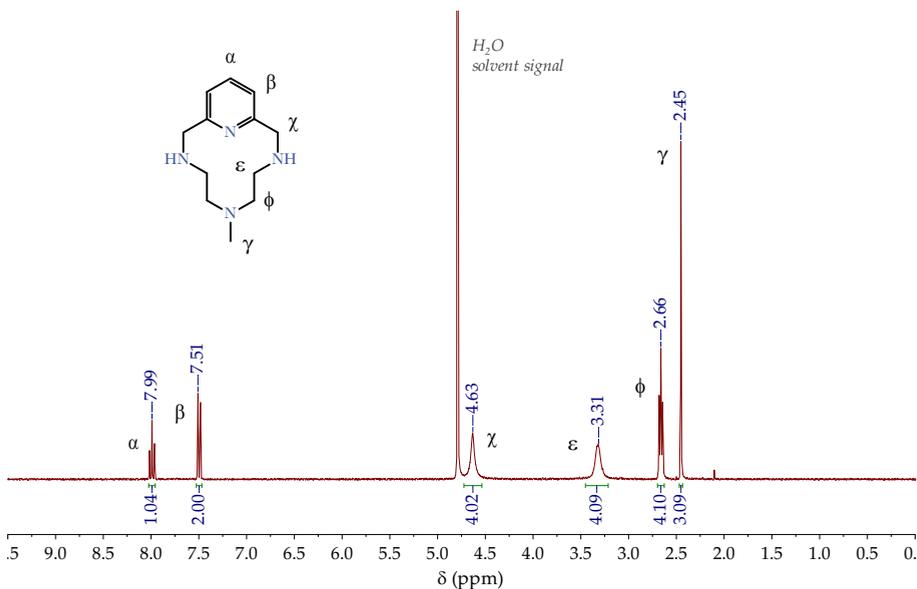


Figura A.3 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L1-Me in D_2O at 298 K.

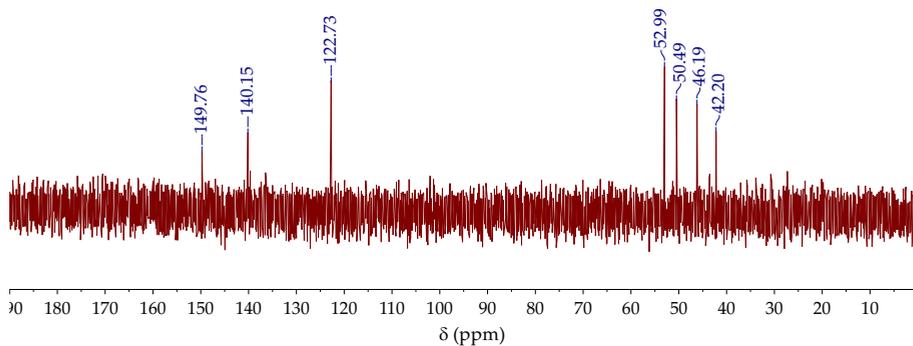


Figura A.4 – $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of L1-Me in D_2O at 298 K.

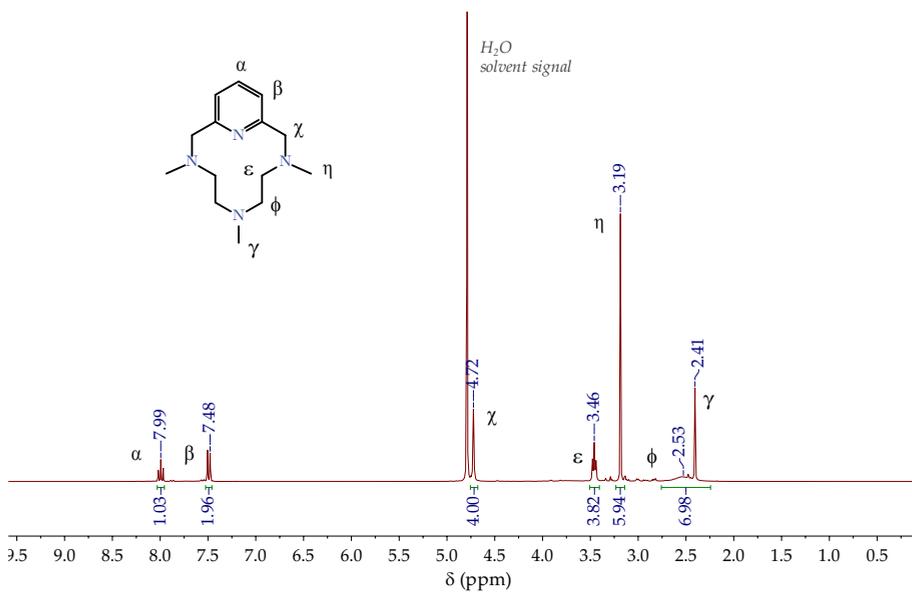


Figure A.5 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L1-Me_3 in D_2O at 298 K.

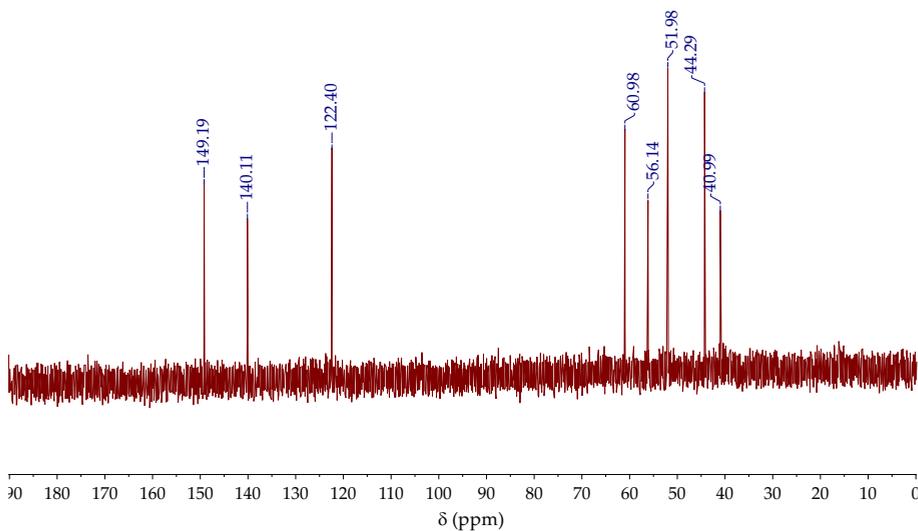


Figure A.6 – $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of L1-Me_3 in D_2O at 298 K.

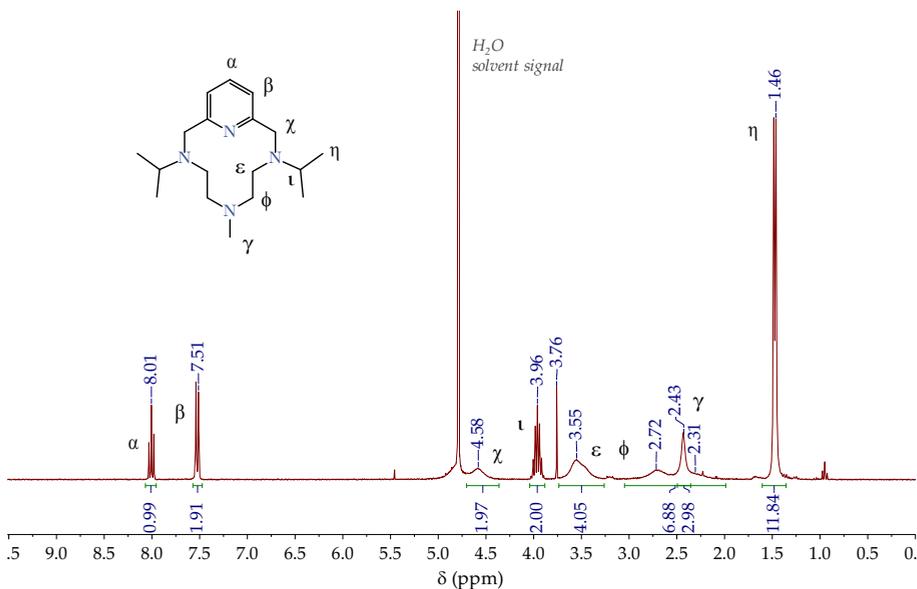


Figura A.7 – ¹H-NMR spectrum of L1-MeiPr₂ in D₂O at 298 K.

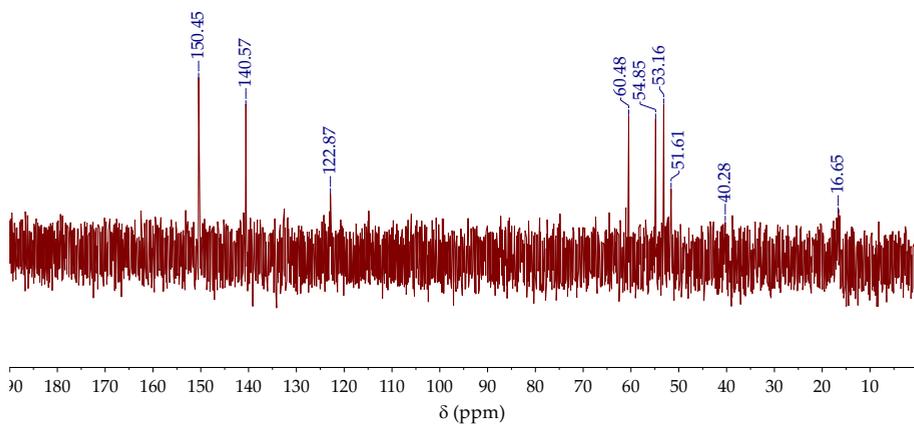


Figura A.8 – ¹³C-NMR spectrum of L1-MeiPr₂ in D₂O at 298 K.

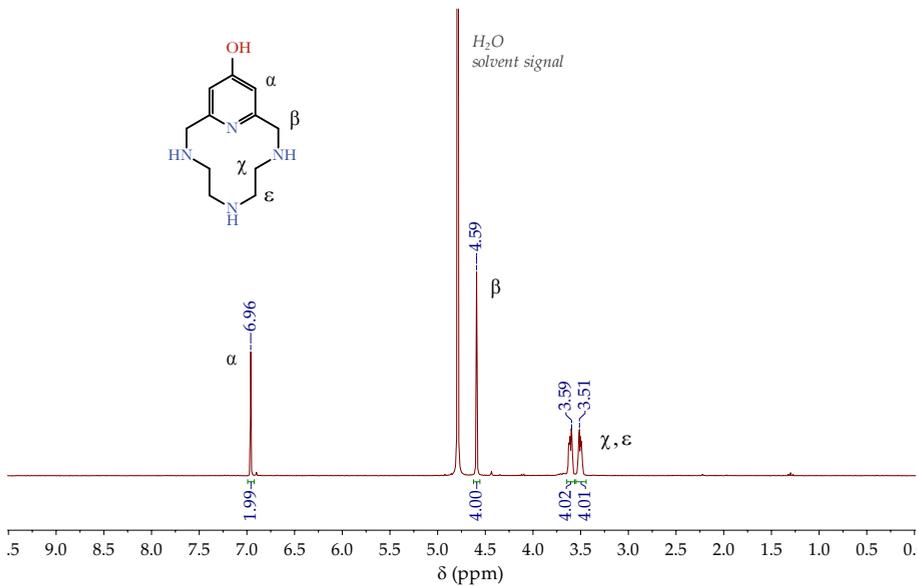


Figure A.9 – 1H -NMR spectrum of L2-H in D_2O at 298 K.

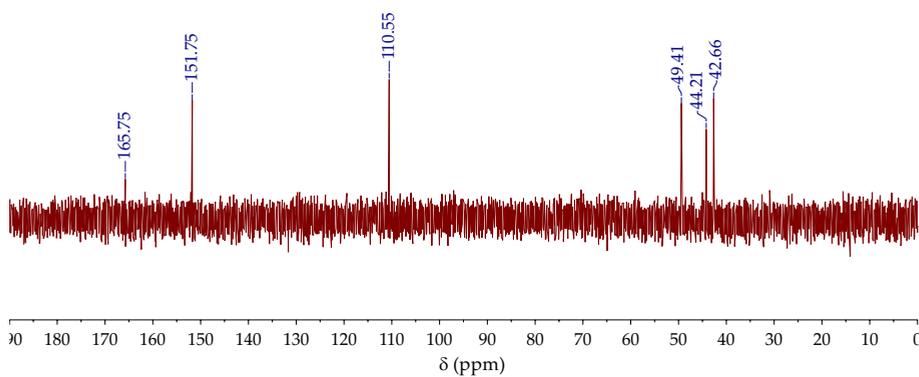


Figure A.10 – ^{13}C -NMR spectrum of L2-H in D_2O at 298 K.

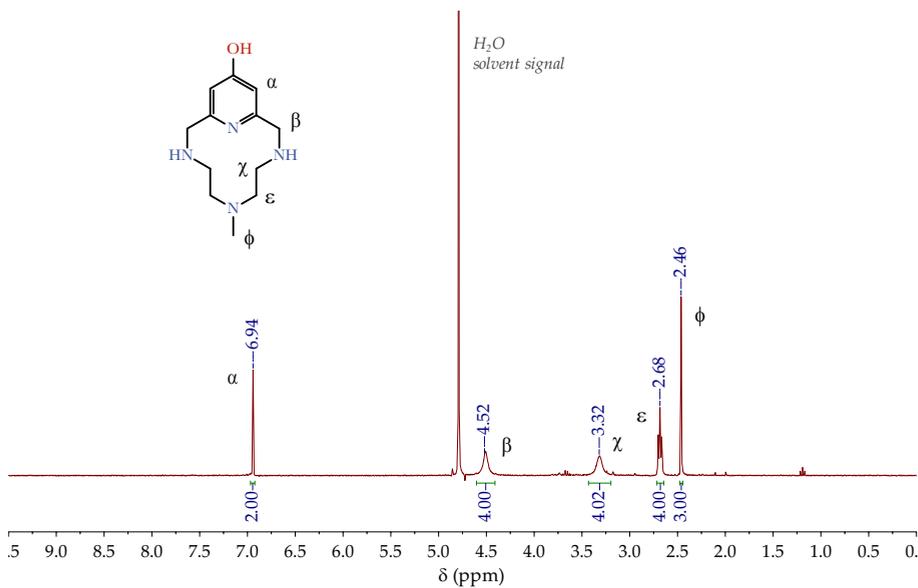


Figure A.11 – 1H -NMR spectrum of L2-Me in D_2O at 298 K.

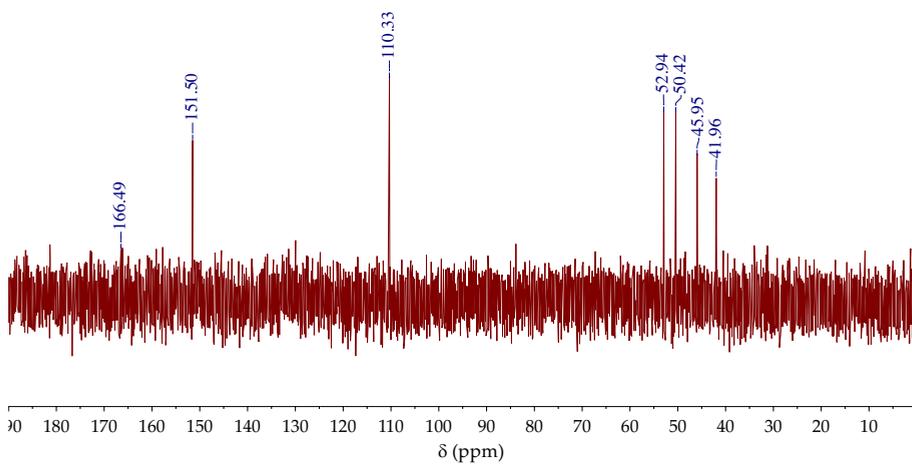


Figure A.12 – ^{13}C -NMR spectrum of L2-Me in D_2O at 298 K.

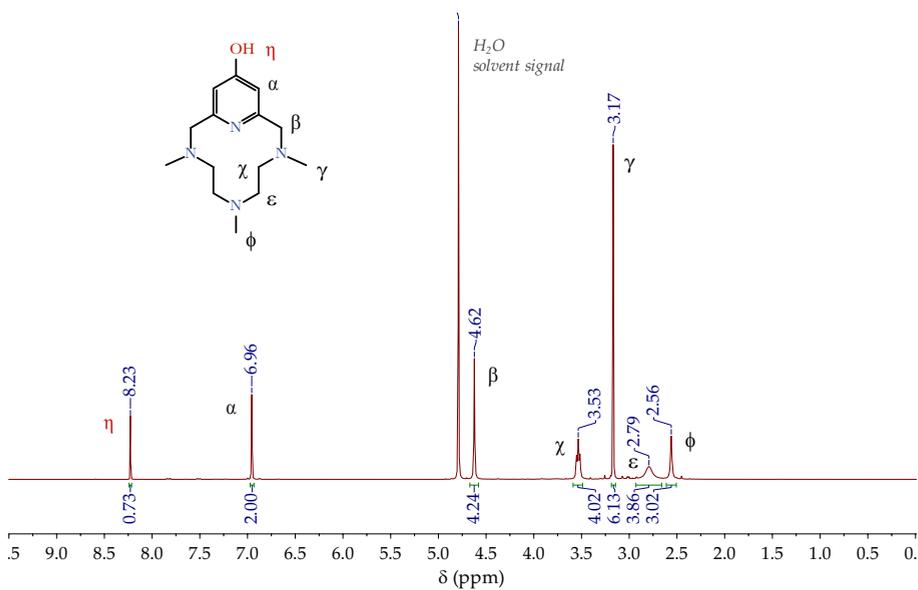


Figure A.13 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L2-Me₃ in D₂O at 298 K.

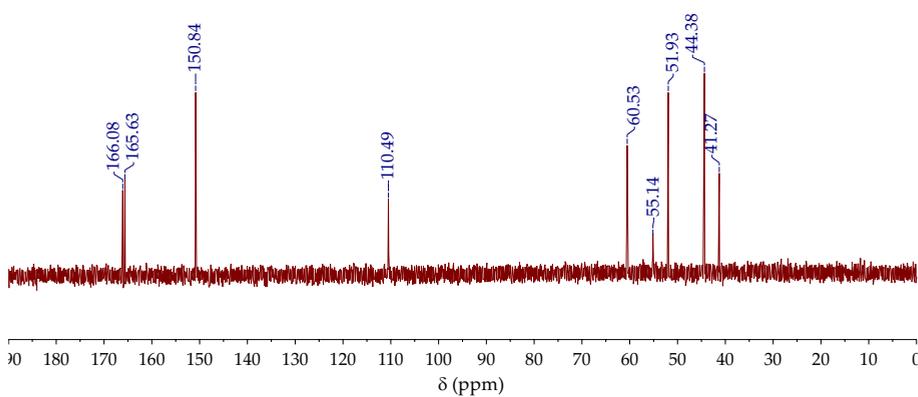


Figure A.14 – $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of L2-Me₃ in D₂O at 298 K.

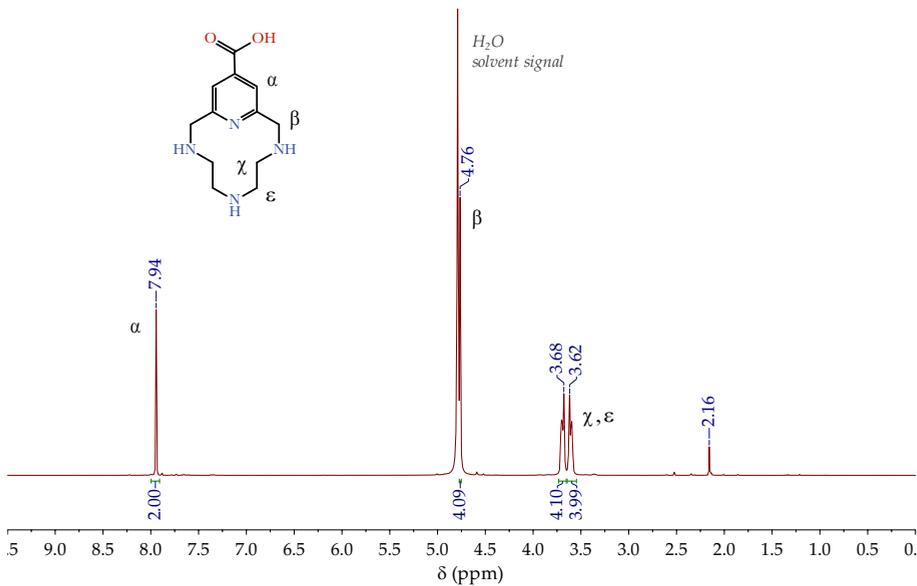


Figura A.15 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L3-H in D_2O at 298 K.

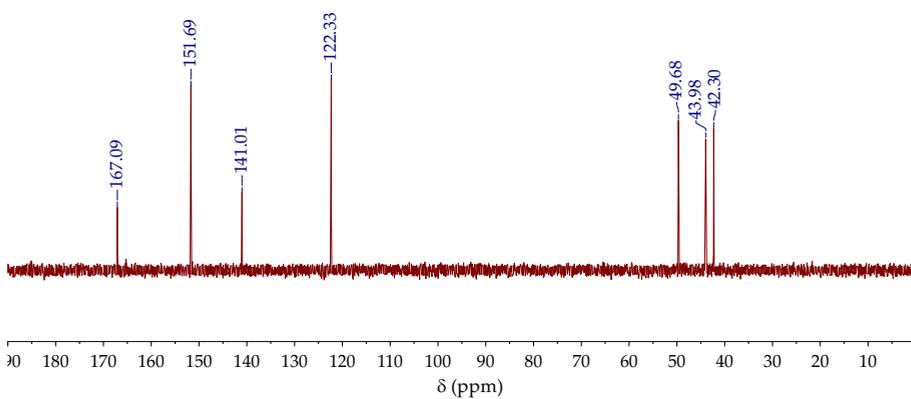


Figura A.16 – $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of L3-H in D_2O at 298 K.

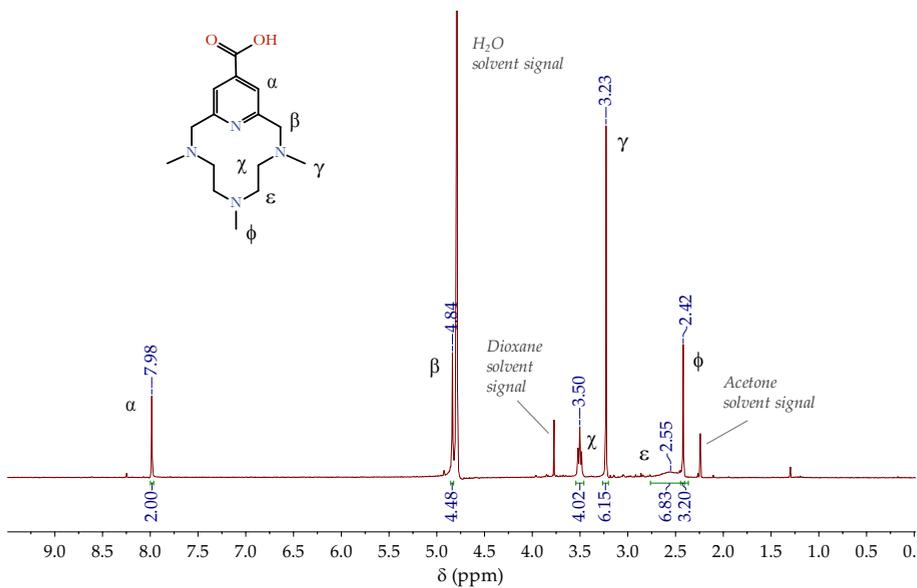


Figure A.17 – ¹H-NMR spectrum of L3-Me₃ in D₂O at 298 K.

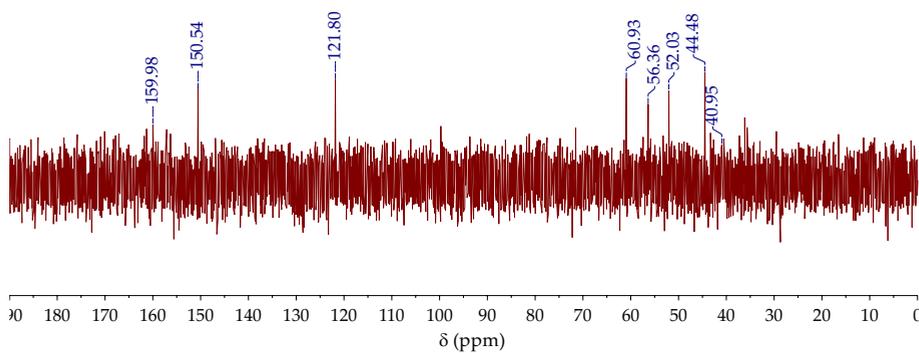


Figure A.18 – ¹³C-NMR spectrum of L3-Me₃ in D₂O at 298 K.

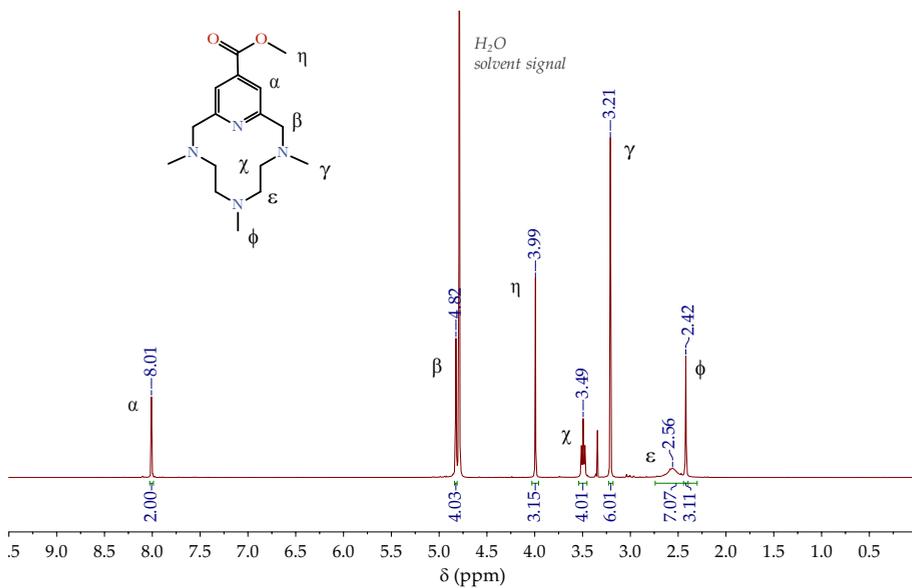


Figura A.19 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L4-Me_3 in D_2O at 298 K.

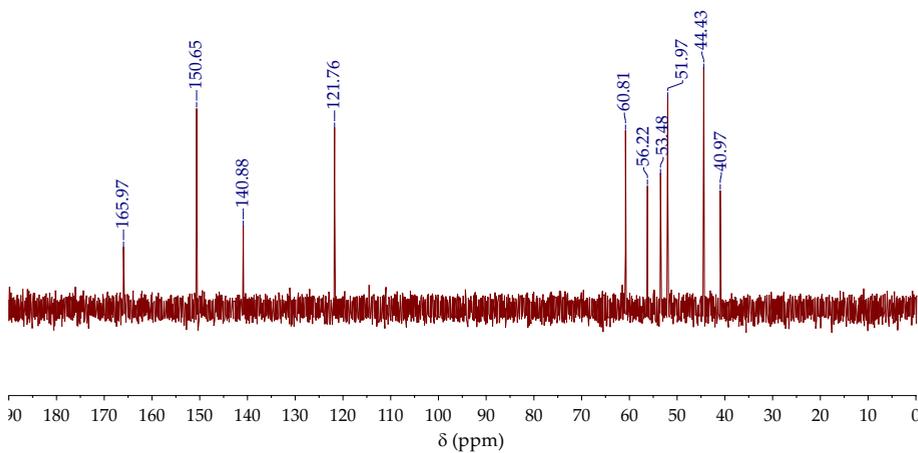


Figura A.20 – $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of L4-Me_3 in D_2O at 298 K.

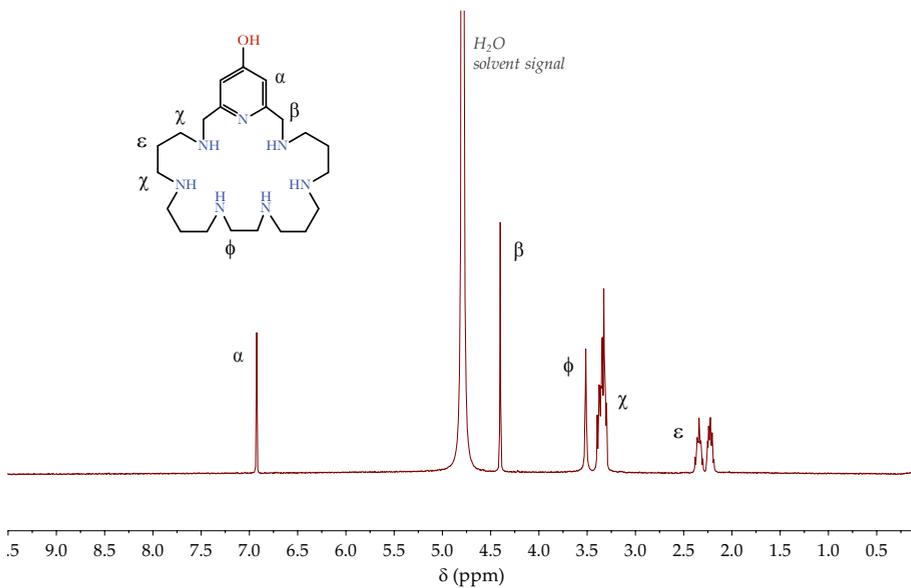


Figure A.21 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of L5 in D_2O at 298 K.

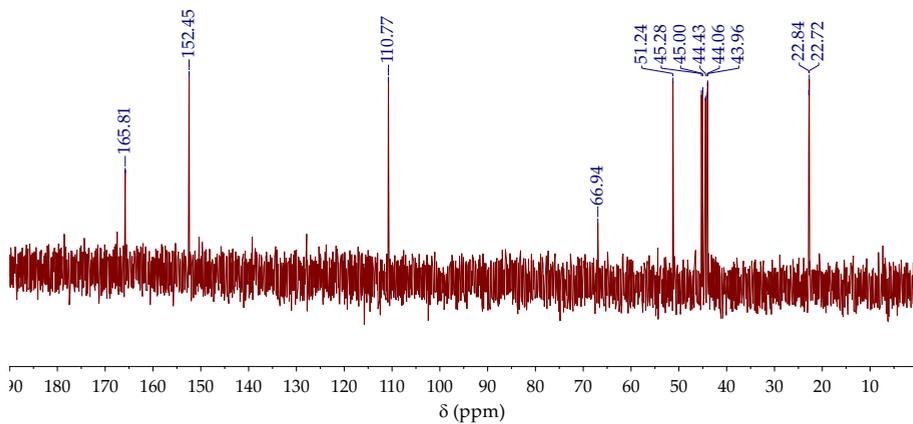
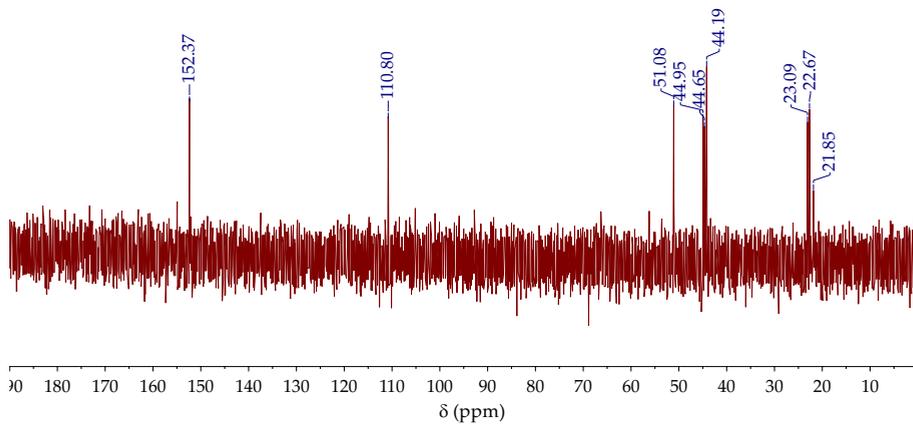
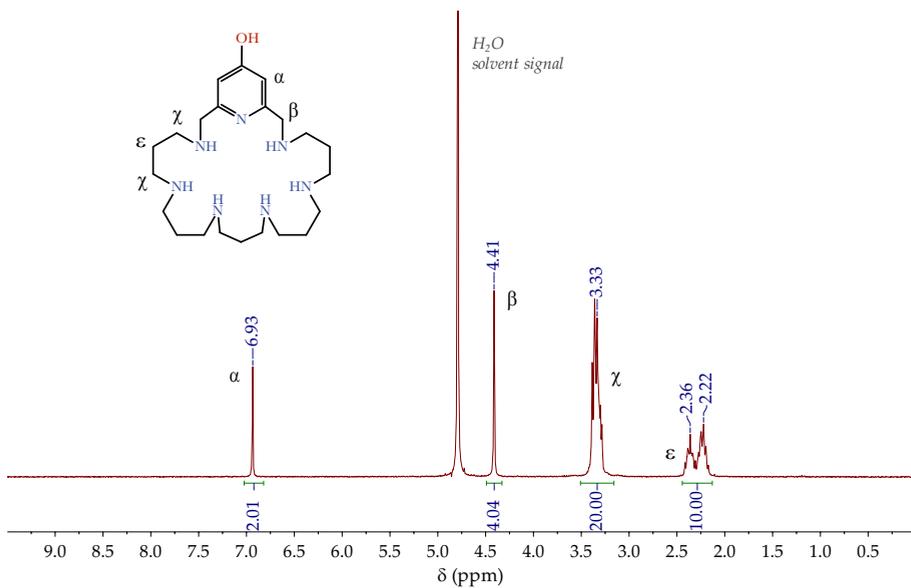


Figure A.22 – $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of L5 in D_2O at 298 K.



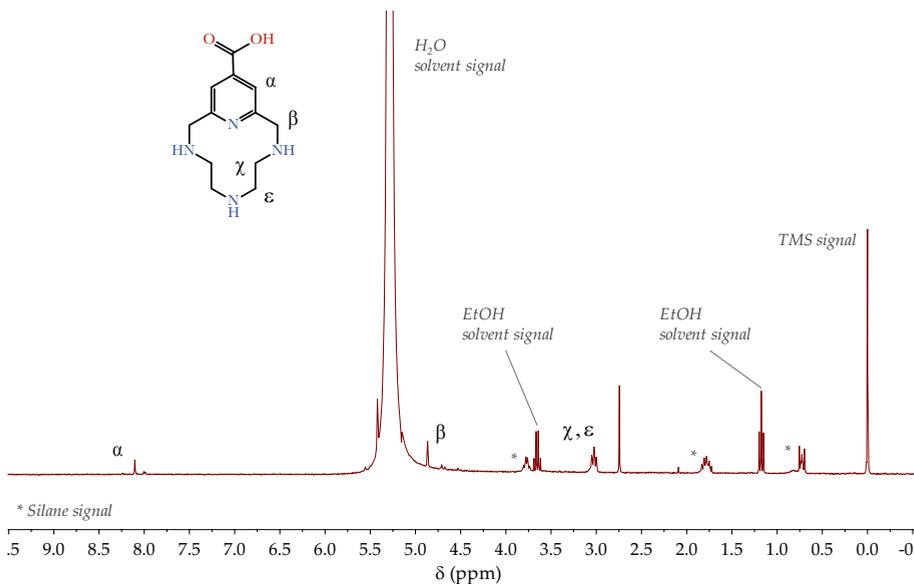


Figure A.25 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a BNP-L3-H sample in D_2O at 298 K.

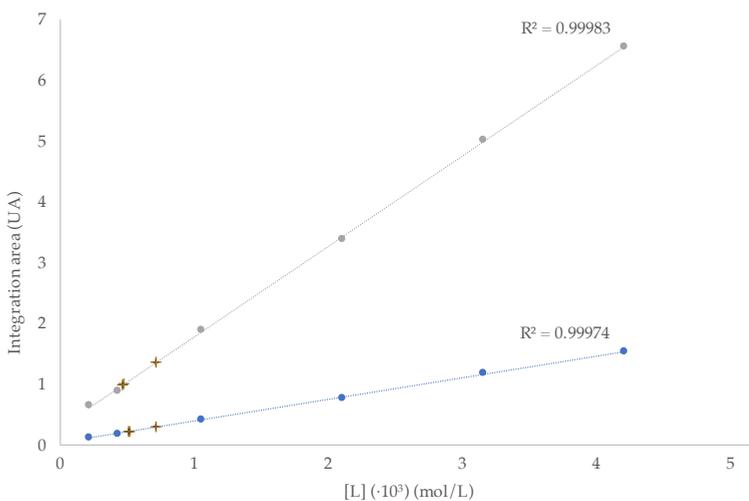


Figure A.26 – Calibration and interpolation of BNP-L3-H anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Blue dots (\bullet) correspond to the integration of χ and ϵ signals, while grey dots (\bullet) correspond to the integration of the α signal. Yellow crosses ($+$) correspond to the integration of the corresponding signals of the BNP samples.

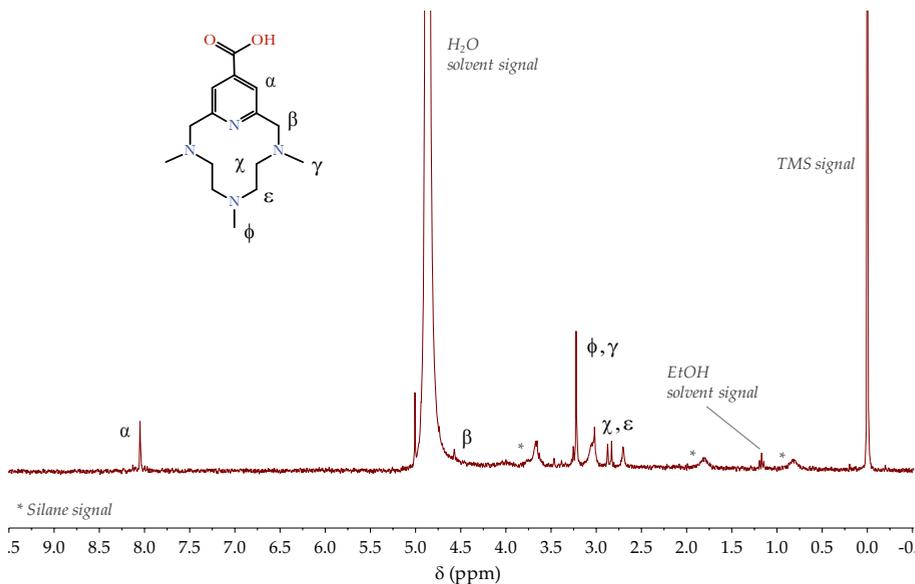


Figura A.27 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a **BNP-L3-Me₃** sample in D_2O at 298 K.

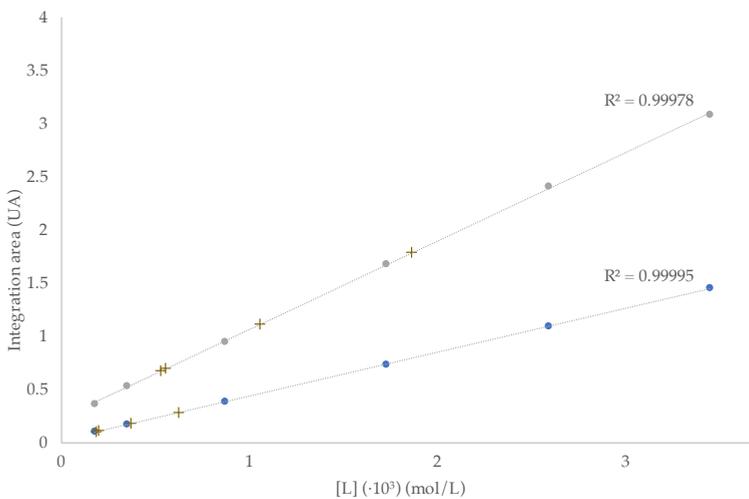


Figura A.28 – Calibration and interpolation of **BNP-L3-Me₃** anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Blue dots (●) correspond to the integration of χ and ϵ signals, while grey dots (●) correspond to the integration of the α signal. Yellow crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals of the BNP samples.

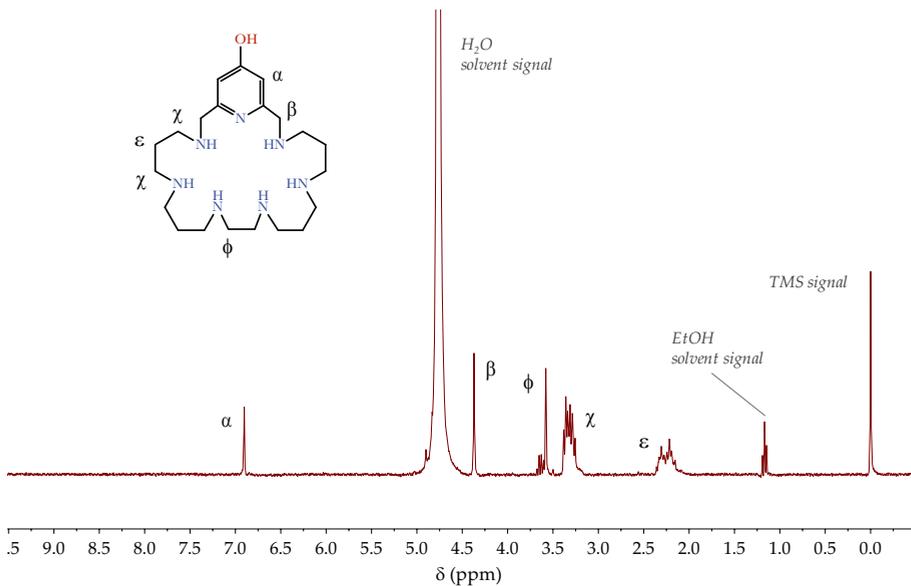


Figure A.29 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a **BNP-L5** sample in D_2O at 298 K.

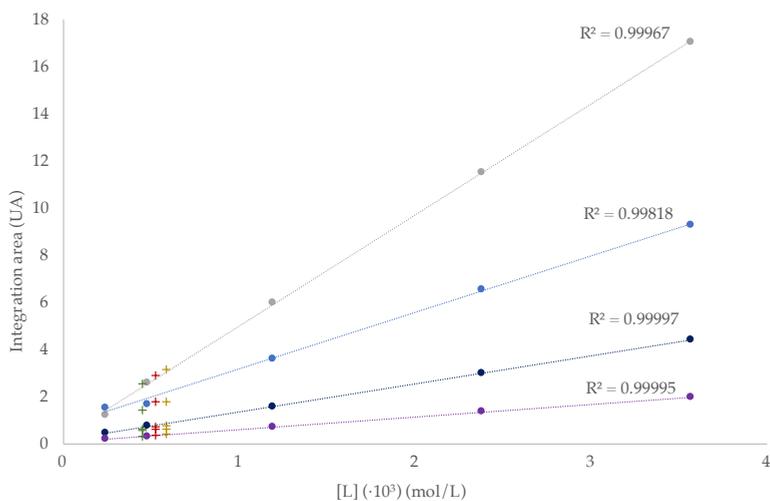


Figure A.30 – Calibration and interpolation of **BNP-L5** anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (\bullet) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (\bullet) to the ϵ signal, dark blue dots (\bullet) to the β signal and violet dots (\bullet) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the BNP samples.

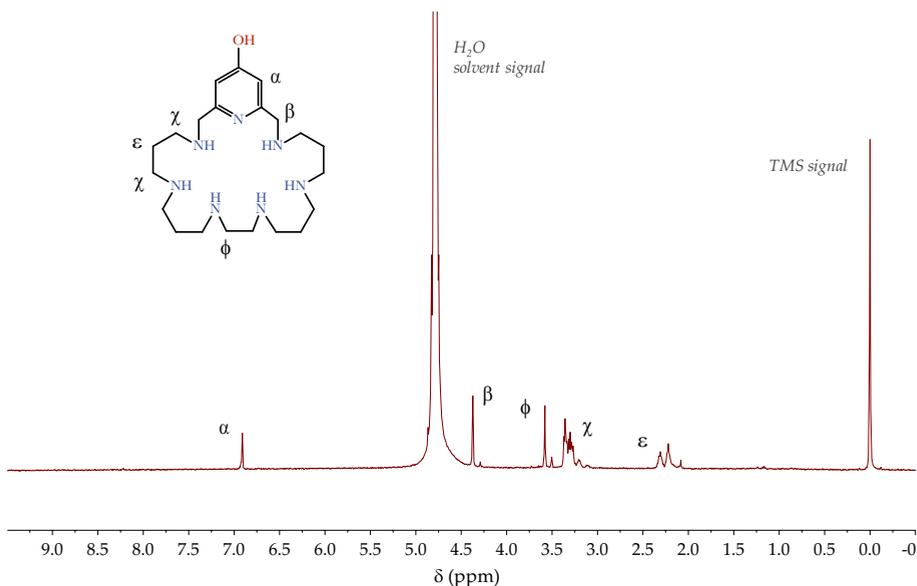


Figura A.31 – ¹H-NMR spectrum of a SNP-L5 sample in D₂O at 298 K.

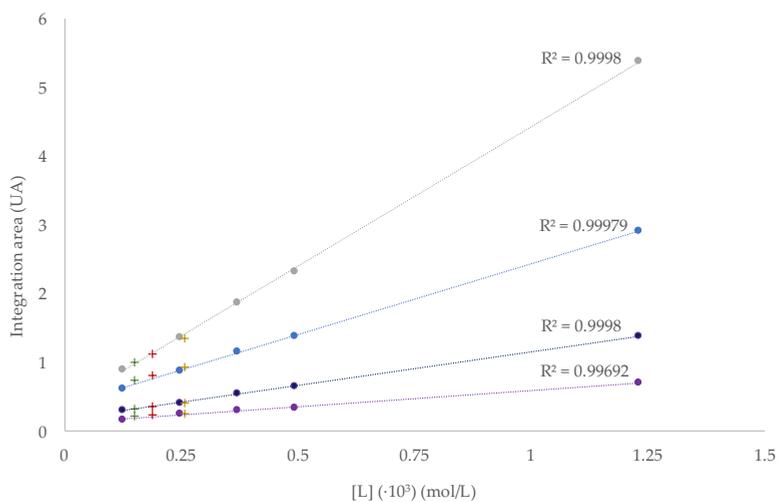


Figura A.32 – Calibration and interpolation of SNP-L5 anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (●) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (●) to the ε signal, dark blue dots (●) to the β signal and violet dots (●) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the SNP samples.

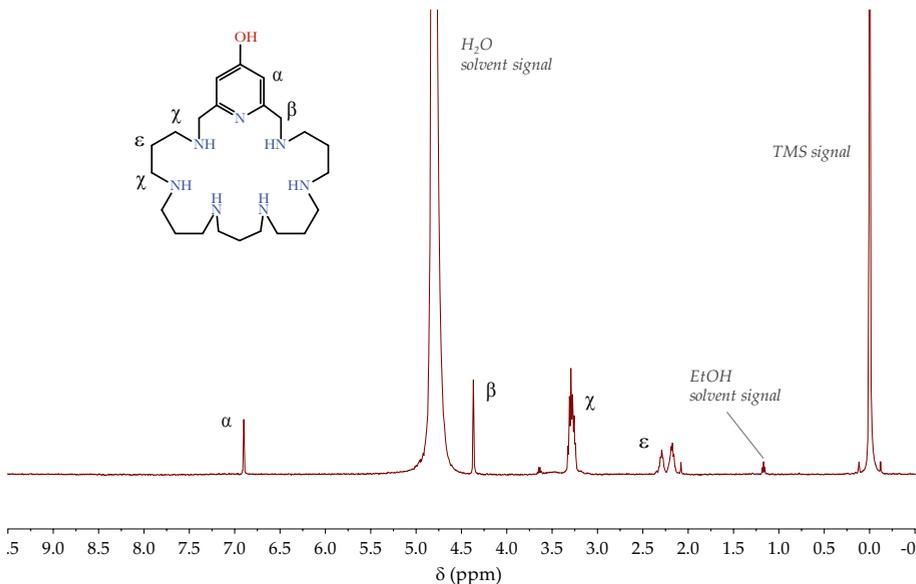


Figure A.33 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a BNP-L6 sample in D_2O at 298 K.

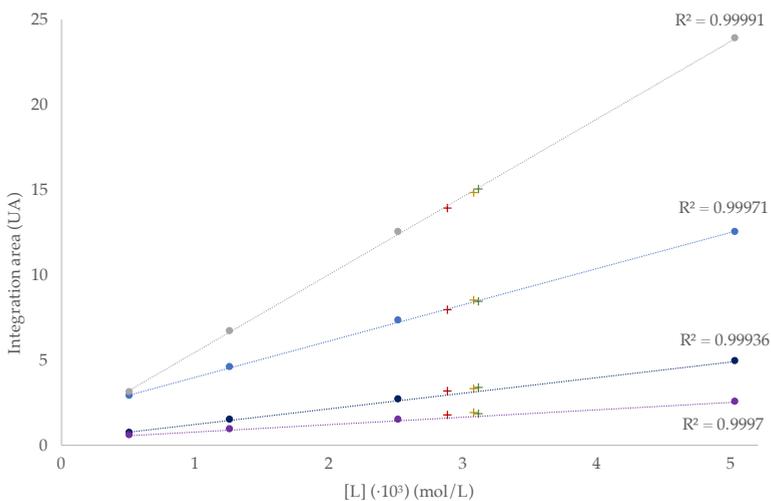


Figure A.34 – Calibration and interpolation of BNP-L6 anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (\bullet) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (\bullet) to the ϵ signal, dark blue dots (\bullet) to the β signal and violet dots (\bullet) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the BNP samples.

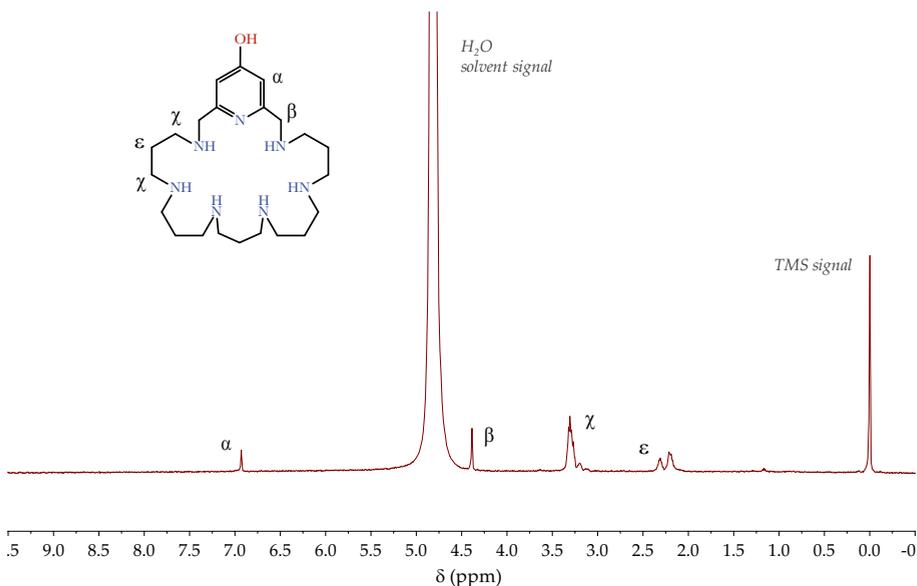


Figura A.35 – $^1\text{H-NMR}$ spectrum of a **BNP-L6** sample in D_2O at 298 K.

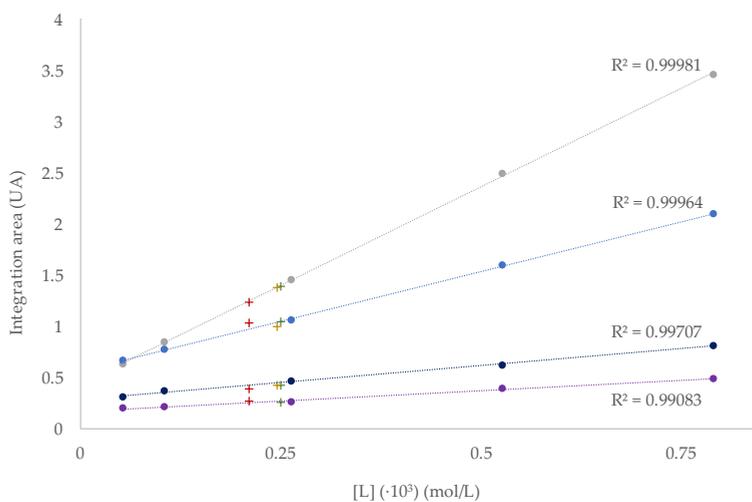


Figura A.36 – Calibration and interpolation of **SNP-L6** anchoring to boehmite nanoparticles by NMR determination. Gray dots (\bullet) correspond to the integration of the χ signal, light blue dots (\bullet) to the ϵ signal, dark blue dots (\bullet) to the β signal and violet dots (\bullet) to the α signal. The crosses (+) correspond to the integration of the corresponding signals in the SNP samples.

Anexo B

Dedución cinética

Dedución de la ecuación de velocidad de formación de los complejos del grupo L1

Atendiendo al mecanismo de reacción propuesto para la formación de los complejos de $[\text{CuL}]^{2+}$ mostrado en la Figura B.1, se puede deducir la ecuación de su constante de velocidad; partiendo de la ecuación de la velocidad de $[\text{CuL}]^{2+}$.

$$\frac{\delta[\text{CuL}]}{\delta t} = k_4[\text{CuHL}_A] + k_5[\text{CuHL}_B] \quad (\text{B.1})$$

donde $[\text{CuL}]$ es la concentración del complejo $[\text{CuL}]^{2+}$, $[\text{CuHL}_A]$ la concentración de $[\text{CuHL}]_A^{3+}$ y $[\text{CuHL}_B]$ la de $[\text{CuHL}]_B^{3+}$. Por otra parte, la constante de velocidad determinada experimentalmente es de primer orden tanto con respecto al metal, representado como M, como con el ligando total:

$$k_{\text{obs}}[\text{M}][\text{L}] = k_{\text{obs}}[\text{M}]([\text{HL}] + [\text{H}_2\text{L}]) \quad (\text{B.2})$$

La constante de equilibrio para la desprotonación de H_2L^{2+} en HL^+ permite expresar en la ecuación B.2 la concentración de HL^+ en términos de H_2L^{2+} :

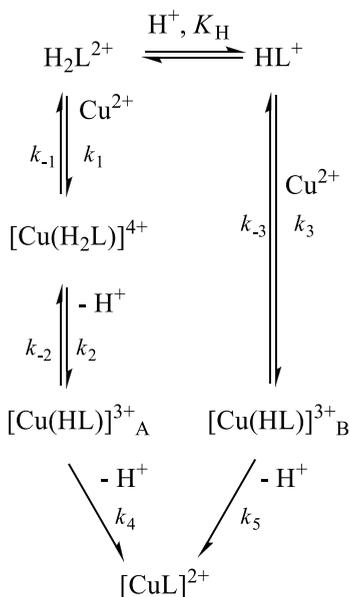


Figura B.1 – Mecanismo de reacción propuesto para la formación de $[\text{CuL}]^{2+}$.

$$k_{\text{obs}}[M] \left(\frac{[\text{H}_2\text{L}]\text{K}_\text{H}}{[\text{H}]} + [\text{H}_2\text{L}] \right) = k_{\text{obs}}[M][\text{H}_2\text{L}] \left(\frac{[\text{H}] + \text{K}_\text{H}}{[\text{H}]} \right) \quad (\text{B.3})$$

Al aplicar la aproximación de estado estacionario a $[\text{CuH}_2\text{L}]^{4+}$ y $[\text{CuHL}]_{\text{A}}^{3+}$ obtenemos:

$$k_1[M][\text{H}_2\text{L}] + k_{-2}[\text{CuHL}_{\text{A}}][\text{H}] = [\text{CuH}_2\text{L}](k_{-1} + k_2) \quad (\text{B.4})$$

$$k_2[\text{CuH}_2\text{L}] = [\text{CuHL}_{\text{A}}](k_{-2}[\text{H}] + k_4) \quad (\text{B.5})$$

$$[\text{CuH}_2\text{L}] = \frac{[\text{CuHL}_{\text{A}}](k_{-2}[\text{H}] + k_4)}{k_2} \quad (\text{B.6})$$

y, combinando las ecuaciones B.4 y B.6 obtenemos:

$$k_1[M][\text{H}_2\text{L}] + k_{-2}[\text{CuHL}_{\text{A}}][\text{H}] = \frac{[\text{CuHL}_{\text{A}}](k_{-2}[\text{H}] + k_4)(k_{-1} + k_2)}{k_2} \quad (\text{B.7})$$

$$k_1k_2[M][\text{H}_2\text{L}] + k_2k_{-2}[\text{CuHL}_{\text{A}}][\text{H}] = [\text{CuHL}_{\text{A}}](k_{-2}[\text{H}] + k_4)(k_{-1} + k_2) \quad (\text{B.8})$$

$$k_1k_2[M][\text{H}_2\text{L}] + k_2k_{-2}[\text{CuHL}_{\text{A}}][\text{H}] = [\text{CuHL}_{\text{A}}](k_{-1}k_{-2}[\text{H}] + k_{-1}k_4 + k_2k_{-2}[\text{H}] + k_2k_4) \quad (\text{B.9})$$

$$k_1k_2[M][\text{H}_2\text{L}] = [\text{CuHL}_{\text{A}}](k_{-1}k_{-2}[\text{H}] + k_{-1}k_4 + k_2k_4) \quad (\text{B.10})$$

$$[\text{CuHL}_{\text{A}}] = \frac{k_1k_2[M][\text{H}_2\text{L}]}{k_{-1}k_{-2}[\text{H}] + k_{-1}k_4 + k_2k_4} \quad (\text{B.11})$$

Por otro lado, al aplicar la aproximación de estado estacionario a $[\text{CuHL}]_{\text{B}}^{3+}$ obtenemos:

$$k_3[M][\text{HL}] = [\text{CuHL}_{\text{B}}](k_{-3} + k_5) \quad (\text{B.12})$$

$$[\text{CuHL}_B] = \frac{k_3[\text{M}][\text{HL}]}{k_{-3} + k_5} \quad (\text{B.13})$$

que, expresada en términos de H_2L^{2+} :

$$[\text{CuHL}_B] = \frac{k_3 K_H [\text{M}][\text{H}_2\text{L}]}{(k_{-3} + k_5)[\text{H}]} \quad (\text{B.14})$$

así, combinando las ecuaciones B.1, B.3, B.11 y B.14 obtenemos:

$$k_{\text{obs}}[\text{M}][\text{H}_2\text{L}] \left(\frac{[\text{H}] + K_H}{[\text{H}]} \right) = \frac{k_1 k_2 k_4 [\text{M}][\text{H}_2\text{L}]}{k_{-1} k_{-2} [\text{H}] + k_{-1} k_4 + k_2 k_4} + \frac{k_3 k_5 K_H [\text{M}][\text{H}_2\text{L}]}{(k_{-3} + k_5)[\text{H}]} \quad (\text{B.15})$$

y simplificando:

$$k_{\text{obs}}([\text{H}] + K_H) = \frac{k_1 k_2 k_4 [\text{H}]}{k_{-1} k_{-2} [\text{H}] + k_{-1} k_4 + k_2 k_4} + \frac{k_3 k_5 K_H}{k_{-3} + k_5} \quad (\text{B.16})$$

Si consideramos

$$\alpha = \frac{k_3 k_5 K_H}{k_{-3} + k_5} \quad (\text{B.17})$$

entonces:

$$k_{\text{obs}}([\text{H}] + K_H) = \frac{k_1 k_2 k_4 [\text{H}]}{k_{-1} k_{-2} [\text{H}] + k_{-1} k_4 + k_2 k_4} + \alpha \quad (\text{B.18})$$

$$k_{\text{obs}}([\text{H}] + K_H) = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)\alpha + k_1 k_2 k_4 [\text{H}] + k_{-1} k_{-2} \alpha [\text{H}] + k_1 k_2 k_4 [\text{H}]}{k_4(k_{-1} + k_2) + k_{-1} k_{-2} [\text{H}]} \quad (\text{B.19})$$

y si consideramos

$$b = K_1 K_2 k_4; K_1 = \frac{k_1}{k_{-1}}; K_2 = \frac{k_2}{k_{-2}} \quad (\text{B.20})$$

$$c = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_{-1} k_{-2}} \quad (\text{B.21})$$

entonces:

$$k_{\text{obs}}([\text{H}] + K_{\text{H}}) = \frac{\alpha c + \alpha[\text{H}] + b[\text{H}]}{[\text{H}] + c} \quad (\text{B.22})$$

$$k_{\text{obs}} = \frac{\alpha c + (\alpha + b)[\text{H}]}{([\text{H}] + K_{\text{H}})([\text{H}] + c)} \quad (\text{B.23})$$

donde $\alpha = \frac{k_3 k_5 K_{\text{H}}}{k_{-3} + k_5}$, $b = K_1 K_2 k_4$ y $c = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_{-1} k_{-2}}$. y $k_1 = \frac{b}{c}$. A pesar que estos tres parámetros incluyen componentes de diferentes constantes de equilibrio y velocidad, su valor se puede asociar a una de las dos rutas de formación de los complejos de Cu(II) (a través de la especie HL^+ o a través de la H_2L^{2+}). Así, mientras que "a" puede servir como indicador de la contribución de la ruta de HL^+ , ya que tan sólo presenta constantes cinéticas de esta; los parámetros "b" y "c" se pueden corresponder con la contribución de la ruta de H_2L^{2+} por idéntico motivo. Asimismo, la constante de velocidad mecanísticamente relevante es k_1 , que toma el valor $k_1 = \frac{b}{c}$. Los valores de los parámetros "a", "b", "c" y k_1 obtenidos a través del ajuste de los datos representados en las Figuras 6.8 y 6.9 mediante el uso de la ecuación 6.7 han sido recopilados en la Tabla 6.2.

Anexo C

Tablas cristalográficas

	[HL1-MeiPr ₂] ₂ (ClO ₄) ₂ ·H ₂ O	[H ₃ L3-H]Cl ₃ ·(H ₂ O) ₃
Fórmula empírica	C ₃₆ H ₆₈ Cl ₂ N ₈ O ₉	C ₁₃ H ₂₇ Cl ₃ N ₃ O ₅
Mw	827.88	476.87
Temperatura (K)	120.00(10)	300(2)
Sistema cristalino	monoclínico	triclínico
Grupo espacial	P21/n	P -1
a(Å)	11.2180(3)	7.4644(16)
b(Å)	26.6036(7)	10.347(4)
c(Å)	14.8328(4)	13.207(4)
α(°)	90	98.531(7)
β(°)	99.409(3)	103.273(9)
γ(°)	90	99.909(7)
Volumen(Å ³)	4367.1(2)	959.0(5)
Z	4	2
ρ _{calc} (g/cm ³)	1.259	1.651
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073
F(000)	1784	479
μ (mm ⁻¹)	0.207	1.512
Corrección de absorción	multi-scan	multi-scan
Rango 2θ	6.73 a 50	6.73 a 50
Reflecciones recolectadas	14125	6020
Reflecciones únicas	7577	3404
R (int)	0.0311	0.1030
restr/param	2/508	0/227
[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0505	R ₁ = 0.0887
	wR ₂ = 0.1114	wR ₂ = 0.1850
Índices R todos los datos	R ₁ = 0.0715	R ₁ = 0.1791
	wR ₂ = 0.1229	wR ₂ = 0.2357
GoF (F ²)	1.013	1.027

	[H ₃ L3-H](ClO ₄) · Cl ₂ · H ₂ O	[CuL1-MeiPr ₂ Cl](ClO ₄)
Fórmula empírica	C ₁₂ H ₂₄ Cl ₂ N ₄ O ₇ S	C ₁₈ H ₃₂ Cl ₂ CuN ₄ O ₄
Mw	439.31	502.91
Temperatura (K)	120.00(10)	121(3)
Sistema cristalino	monoclínico	monoclínico
Grupo espacial	P21/c	P21/c
a(Å)	9.670(3)	13.9757(6)
b(Å)	7.190(3)	10.6834(4)
c(Å)	27.106(9)	15.0734(6)
α(°)	90	90
β(°)	96.988(8)	102.513(4)
γ(°)	90	90
Volumen(Å ³)	1870.7(12)	2197.13(15)
Z	4	4
ρ _{calc} (g/cm ³)	1.560	1.52
Longitud de onda (Å)	0.71073	0.71073
F(000)	920	1052
μ (mm ⁻¹)	0.502	1.269
Corrección de absorción	multi-scan	multi-scan
Rango 2θ	6.73 a 50	6.72 a 52
Reflecciones recolectadas	32386	8287
Reflecciones únicas	3814	4309
R (int)	0.2301	0.0265
restr/param	0/304	0/267
[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0806 wR ₂ = 0.1729	R ₁ = 0.0343 wR ₂ = 0.0768
Índices R todos los datos	R ₁ = 0.1432 wR ₂ = 0.2045	R ₁ = 0.0441 wR ₂ = 0.0835
GoF (F ²)	1.064	1.037

[CuL1-MePr₂(H₂O)](ClO₄)₂·H₂O	
Fórmula empírica	C ₁₈ H ₃₆ Cl ₂ CuN ₄ O ₁₀
Mw	602.95
Temperatura (K)	120.00(10)
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo espacial	P21/c
a(Å)	9.96517(14)
b(Å)	18.2266(2)
c(Å)	14.4512(2)
α(°)	90
β(°)	102.7343(15)
γ(°)	90
Volumen(Å ³)	2560.22(7)
Z	4
ρ _{calc} (g/cm ³)	1.564
Longitud de onda (Å)	0.71073
F(000)	1260
μ (mm ⁻¹)	1.12
Corrección de absorción	multi-scan
Rango 2Θ	6.73 a 50
Reflecciones recolectadas	25401
Reflecciones únicas	4487
R (int)	0.0357
restr/param	0/325
[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0302
	wR ₂ = 0.0758
Índices R todos los datos	R ₁ = 0.0337
	wR ₂ = 0.0783
GoF (F ²)	1.050

[[Cu(H ₋₁ L3-H)] ₂ (μ-OH)](ClO ₄)	
Fórmula empírica	C ₁₂ H _{18.5} Cl _{2.5} CuN ₄ Na ₂ O ₁₃ S
Mw	624.95
Temperatura (K)	300(1)
Sistema cristalino	ortorrómbico
Grupo espacial	Pnma
a(Å)	28.323(3)
b(Å)	10.3897(10)
c(Å)	15.7844(18)
α(°)	90
β(°)	90
γ(°)	90
Volumen(Å ³)	4644.8(9)
Z	8
ρ _{calc} (g/cm ³)	1.787
Longitud de onda (Å)	0.71073
F(000)	2528
μ (mm ⁻¹)	1.336
Corrección de absorción	multi-scan
Rango 2Θ	6.73 a 50
Reflecciones recolectadas	75446
Reflecciones únicas	11600
R (int)	0.0980
restr/param	50/387
[I > 2σ(I)]	R ₁ = 0.0729
	wR ₂ = 0.2085
Índices R todos los datos	R ₁ = 0.1621
	wR ₂ = 0.2673
GoF (F ²)	1.034

Anexo D

Publicaciones

TRABAJOS PUBLICADOS DE ESTA TESIS

Parte de los resultados presentados en esta tesis han sido publicados en los siguientes artículos:

1. **A. Martínez-Camarena**, E. Delgado-Pinar, C. Soriano, J. Alarcón, J. M. Llinares, R. Tejero & E. García-España. **Enhancement of SOD activity in boehmite supported nano-receptors**. *Chemical Communications* **2018**, *54*, 3871-3874. doi: 10.1039/C8CC01599F

2. **A. Martínez-Camarena**, A. Liberato, E. Delgado-Pinar, A. G. Algarra, J. Pitarch-Jarque, J. M. Llinares, M. A. Mañez, A. Domenech-Carbo, M. G. Basallote & E. García-España. **Coordination chemistry of Cu²⁺ complexes of small N-alkylated tetra-azacyclophanes with SOD activity**. *Inorganic Chemistry* **2018**, *57*, 10961-10973. doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01492

OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS

Otras publicaciones en las que se ha participado durante la realización de la tesis:

1. L. M. López-Martínez, J. Pitarch-Jarque, **A. Martínez-Camarena**, E. García-España, R. Tejero, H. Santacruz-Ortega, R. Navarro, R. R. Sotelo-Mundo, M. A. Leyva-Peralta, A. Doménech-Carbo & B. Verdejo. **Synthesis, characterization and Cu²⁺ coordination studies of a 3-hydroxy-4-pyridinone aza scorpiand derivat**. *Inorganic Chemistry* **2016**, *55*, 7564-7575. doi: 10.1021/acs.inorgchem.6b01006

2. J. González-García, **A. Martínez-Camarena**, B. Verdejo, M. Paz Clares, C. Soriano, E. García-España, H. R. Jiménez, A. Doménech-Carbó, R. Tejero, E. Calvo, L. Briansó-Llort, C. Serena, S. Trefler & A. García-España. **Oxidative stress protection by manganese complexes of tail-tied aza-scorpiand ligands**. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2016**, *163*, 230-239. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.04.020

3. A. Nebot-Guinota, A. Liberato, M. A. Mañez, M. Paz Clares, A. Doménech, J. Pitarch-Jarque, **A. Martínez-Camarena**, M. G. Basallote & E. García-España. **Methylation as an effective way to generate SOD-activity in copper complexes of scorpiand-like azamacrocyclic receptors**. *Inorganica Chimica Acta* **2018**, *472*, 139-148. doi: 10.1016/j.ica.2017.08.044

4. E. Carbonell, **A. Martínez-Camarena**, C. Galiana-Rosello, M. Inclán, R. Tejero, M. J. R. Yunta, P. Navarro, F. Gomez-Contreras, A. M. Sanz, L. Campayo, M. C. Cano, E. García-España & J. González-García. **Acid–base behaviour and binding to double stranded DNA/RNA of benzo[*g*]phthalazine-based ligands** 2019, 43, 700-708. doi: 10.1039/c8nj0-5039b

5. M. Savastano, **A. Martínez-Camarena**, C. Bazzicalupi, E. Delgado-Pinar, J. M. Lli-
nares, P. Mariani, B. Verdejo, E. García-España & A. Bianchi. **Stabilization of supramole-
cular networks of polyiodides with protonated small tetra-azacyclophanes** 2019, 7, 48.
doi: 10.3390/inorganics7040048

Bibliografía

- [1] J. Parkinson; *An Essay on the Shaking Palsy*; Whittingham and Rowland for Sherwood, Neely, and Jones, 1817.
- [2] J. Parkinson; *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **2002**, *14*, 223–236.
- [3] I. M. L. Donaldson; *J. R. Coll. Physicians Edinb.* **2015**, *45*, 84–86.
- [4] M. Goedert; A. Compston; *Nat. Rev. Neurol.* **2018**, *14*, 57–62.
- [5] C. Henchcliffe; M. F. Beal; *Nat. Clin. Pract. Neuro.* **2008**, *4*, 600–609.
- [6] V. Dias; E. Junn; M. M. Mouradian; *J. Parkinsons Dis.* **2013**, *3*, 461–491.
- [7] Z. Wei; X. Li; X. Li; Q. Liu; Y. Cheng; *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 236.
- [8] B. Drukarch; F. L. van Muiswinkel; *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *59*, 1023–1031.
- [9] A. Elkouzi; V. Vedam-Mai; R. S. Eisinger; M. S. Okun; *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 204–223.
- [10] P. Tans; K. Thoning; NOAA ESRL Global Monitoring Division. "How we measure background CO₂ levels on Mauna Loa, Report"; 2018.
- [11] P. R. Rich; *Biochem. Soc. T.* **2003**, *31*, 1095–1105.
- [12] W. T. Borden; R. Hoffmann; T. Stuyver; B. Chen; *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 9010–9018.
- [13] K. Schmidt-Rohr; *J. Chem. Educ.* **2015**, *92*, 2094–2099.

- [14] G. P. Sutton; O. Biblarz; *Rocket Propulsion Elements*; John Wiley & Sons, 2016.
- [15] T. Engel; P. Reid; *Physical Chemistry*; Pearson Int. Ed., Benjamin Cummings, 2006.
- [16] R. Mittler; *Trends Plant Sci.* **2017**, *22*, 11–19.
- [17] B. Halliwell; J. M. C. Gutteridge; *Free Radicals in Biology and Medicine (5th edn)*; Oxford university Press, 2007.
- [18] L. Vaahtera; M. Brosché; M. Wrzaczek; J. Kangasjärvi; *Antioxid. Redox. Sign.* **2014**, *21*, 1422–1441.
- [19] C. Nathan; A. Ding; *Cell* **2010**, *140*, 952.e2.
- [20] C. Nathan; A. Cunningham-Bussel; *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 349–361.
- [21] B. Halliwell; *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 312–322.
- [22] F. C. Fang; *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 820–832.
- [23] Á. Donkó; Z. Péterfi; A. Sum; T. Leto; M. Geiszt; *Phil. Trans. R. Soc. B* **2005**, *360*, 2301–2308.
- [24] J. M. Schlauch; *Mol. Microbiol.* **2011**, *80*, 580–583.
- [25] V. Rani; U. C. S. Yadav; *Free Radicals in Human Health and Disease*; Springer, 2015.
- [26] C. Kohchi; H. Inagawa; T. Nishizawa; G.-I. Soma; *Anticancer Res.* **2009**, *29*, 817–822.
- [27] R. Patel; L. Rinker; J. Peng; W. M. Chilian; *Reactive Oxygen Species: The Good and the Bad*; IntechOpen, 2017.
- [28] G.-Y. Liou; P. Storz; *Free Radical Res.* **2010**, *44*, 479–496.
- [29] P. D. Ray; B.-W. Huang; Y. Tsuji; *Cel. Signal.* **2012**, *24*, 981–990.
- [30] M. Schieber; N. S. Chandel; *Curr. Biol.* **2014**, *24*, R453–R462.

- [31] A. Gorman; J. Killoran; C. O'Shea; T. Kenna; W. M. Gallagher; D. F. O'Shea; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10619–10631.
- [32] G. Garcia; F. Hammerer; F. Poyer; S. Achelle; M.-P. Teulade-Fichou; P. Maillard; *Bioorgna. Med. Chem.* **2013**, *21*, 153–165.
- [33] F. Hammerer; G. Garcia; S. Chen; F. Poyer; S. Achelle; C. Fiorini-Debuisschert; Marie-Paule Teulade-Fichou; P. Maillard; *J. Org. Chem.* **2014**, *79*, 140–1417.
- [34] C. J. Weydert; T. A. Waugh; J. M. Ritchie; K. S. Iyer; J. L. Smith; L. Li; D. R. Spitz; L. W. Oberley; *Free Radical Bio. Med.* **2006**, *41*, 226–237.
- [35] S. Kumari; A. K. Badana; M. M. G; S. G; R. Malla; *Biomark. Insights* **2018**, *13*, 1–9.
- [36] U. Singh; I. Jialal; *Pathophysiology* **2006**, *13*, 129–142.
- [37] G. Togliatto; G. Lombardo; M. F. Brizzi; *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1988.
- [38] T. Zhou; E. R. Prather; D. E. Garrison; L. Zuo; *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 417.
- [39] A. C. Maritim; Sanders; J. B. Watkins; *J. Biochem. Mol. Toxic.* **2003**, *17*, 24–38.
- [40] J. N. Wilson; J. D. Pierce; R. L. Clancy; *Heart Lung* **2001**, *30*, 370–375.
- [41] P. Cheres; S.-J. Kim; S. Tulasiram; D. W. Kamp; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1832*, 1028–1040.
- [42] K. Richter; T. Kietzmann; *Cell Tissue Res.* **2016**, *365*, 591–605.
- [43] S. Boukhenouna; M. A. Wilson; K. Bahmed; B. Kosmider; *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *18*, 1–9.
- [44] A. A. Andreadis; S. L. Hazen; S. A. A. Comhair; S. C. Erzurum; *Free Radical Bio. Med.* **2003**, *35*, 213–225.
- [45] U. M. Sahiner; E. Birben; S. Erzurum; C. Sackesen; O. Kalayci; *World Allergy Organ. J.* **2011**, *4*, 151–158.

- [46] V. Chauhan; A. Chauhan; *Pathophysiology* **2006**, *13*, 195–208.
- [47] A. Kumar; R. R. Ratana; *J. Huntington Dis.* **2016**, *5*, 217–237.
- [48] E. Radi; P. Formichi; C. Battisti; A. Federico; *J. Alzheimers Dis.* **2014**, *42*, S125–S152.
- [49] Z. Liu; T. Zhou; A. C. Ziegler; P. Dimitrion; L. Zuo; *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, *17*, 1–11.
- [50] G. M. Cooper; *The Cell, 2nd edn. A Molecular Approach.*; Oxford University Press, 2000.
- [51] D. Fennell; Y. Summers; J. Cadranell; T. Benepal; D. Christoph; R. Lal; M. Das; F. Maxwell; C. Visseren-Grul; D. Ferry; *Cancer Treat. Rev.* **2016**, *44*, 42–50.
- [52] L. Li; G. Ishdorj; S. B. Gibson; *Free Radical Bio. Med.* **2012**, *53*, 1399–1410.
- [53] J. Ribas; P. Mattiolo; J. Boix; *Curr. Drug Targets* **2015**, *16*, 31–37.
- [54] Y. Hu; D. G. Rosen; Y. Zhou; L. Feng; G. Yang; J. Liu; P. Huang; *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 39485–39492.
- [55] E. Panieri; V. Gogvadze; E. Norberg; R. Venkatesh; S. Orrenius; B. Zhivotovsky; *Free Radical Bio. Med.* **2013**, *57*, 176–187.
- [56] M. H. Raza; S. Siraj; A. Arshad; U. Waheed; F. Aldakheel; S. Alduraywish; M. Arshad; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2017**, *143*, 1789–1809.
- [57] J. G. Wilkes; M. S. Alexander; J. J. Cullen; *Antioxidants* **2017**, *6*, 66.
- [58] H. Tang; Y. Qin; J. Li; X. Gong; *BMC Biol.* **2011**, *9*, 1–16.
- [59] J. Gaugler; B. James; T. Johnson; A. Marin; J. Weuve; *Alzheimers Dement* **2018**, *14*, 367–429.
- [60] E. Pollari; G. Goldsteins; G. Bart; J. Koistinaho; R. Giniatullin; *Front. Cell. Neurosci.* **2014**, *8*, 131.

- [61] A. Matilla-Dueñas et al. *Cerebellum* **2014**, *13*, 269–302.
- [62] J. Olesen; A. Gustavsson; M. Svensson; H.-U. Wittchene; B. Jönsson; *Eur. J. Neurol.* **2012**, *19*, 155–162.
- [63] C. Patterson; C. Lynch; A. Bliss; M. Lefevre; W. Weidner; *World Alzheimer Report 2018. The state of the art of dementia research: New frontiers.*; 2018.
- [64] M. J. Farrer; *Nat. Rev. Genet.* **2006**, *7*, 306–318.
- [65] L. M. Bekris; I. F. Mata; C. P. Zabetian; *J. Geriatr. Psych. Neur.* **2010**, *23*, 228–242.
- [66] J. K. Andersen; *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *10*, S18–S25.
- [67] S. Gandhi; A. Y. Abramov; *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, *12*, 1–11.
- [68] K. M. Lincoln; P. Gonzalez; T. E. Richardson; D. A. Julovich; R. Saunders; J. W. Simpkins; K. N. Green; *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2712–2714.
- [69] C. Cheignona; M. Tomasa; D. Bonnefont-Rousselot; P. Fallerf; C. Hureau; F. Collin; *Redox Biol.* **2018**, *14*, 450–464.
- [70] R. Jakob-Roetne; H. Jacobsen; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3030–3059.
- [71] C. Haass; M. G. Schlossmacher; A. Y. Hung; C. Vigo-Pelfrey; A. Mellon; B. L. Ostaszewski; I. Lieberburg; E. H. Koo; D. Schenk; D. B. Teplow; D. J. Selkoe; *Nature* **1992**, *359*, 322–325.
- [72] V. W. Chow; M. P. Mattson; P. C. Wong; M. Gleichmann; *Neuromol. Med.* **2010**, *12*, 1–12.
- [73] D. Puzzo; O. Arancio; *J. Alzheimers Dis.* **2013**, *33*, S111–S120.
- [74] Y. Xiao; B. Ma; D. McElheny; S. Parthasarathy; F. Long; M. Hoshi; R. Nussinov; Y. Ishii; *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2015**, *22*, 499–505.
- [75] R. C. Barber; *Scientifica* **2012**, *2012*, 1–14.
- [76] J. Nasica-Labouze et al. *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 3518–3563.

- [77] J. Kang; H.-G. Lemaire; A. Unterbeck; J. M. Salbaum; C. L. Masters; K.-H. Grzeschik; G. Multhaup; K. Beyreuther; B. Müller-Hill; *Nature* **1987**, 325, 733–736.
- [78] A. Tiiman; P. Palumaa; VelloTõugu; *Neurochem. Int.* **2013**, 62, 367–378.
- [79] H. Bayir; *Crit. Care Med.* **2005**, 33, S498–S501.
- [80] E. P. Meyer; A. Ulmann-Schuler; M. Staufenbiel; T. Krucker; *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 3587–3592.
- [81] B. Uttara; A. V. Singh; P. Zamboni; R. Mahajan; *Curr. Neuropharmacol.* **2009**, 7, 65–74.
- [82] C. Opazo; X. Huang; R. A. Cherny; R. D. Moir; A. E. Roher; A. R. White; R. Cappai; C. L. Masters; R. E. Tanzi; N. C. Inestrosa; A. I. Bush; *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 40302–40308.
- [83] M. R. Cookson; *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, 74, 29–52.
- [84] J. Labbadia; R. I. Morimoto; *Trends Biochem. Sci.* **2013**, 38, 378–385.
- [85] L. Pench; J. Granlund; W. Merz; G. Carone; P. Arevalo; S. C. Ramos; P. Eckefeldt; L. Giamboni; B. Goranova; B. Martinelli; A. Patarau; A. Reut; C. Uregian; *The 2018 Ageing Report*; 2018.
- [86] P. Davalli; T. Mitic; A. Caporali; A. Lauriola; D. D’Arca; *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 16, 1–18.
- [87] D. B. Lynch; I. B. Jeffery; P. W. O’Toole; *WIREs Syst. Biol. Med.* **2015**, 7, 131–138.
- [88] A. H. Shadyab; A. Z. LaCroix; *Ageing Res. Rev.* **2015**, 19, 1–7.
- [89] P. V. Sergiev; O. A. Dontsova; G. V. Berezkin; *Acta Naturae* **2015**, 7, 9–18.
- [90] M. Ristow; S. Schmeisser; *Free Radical Bio. Med.* **2011**, 51, 327–336.
- [91] T. Kuilman; C. Michaloglou; W. J. Mooi; D. S. Peeper; *Genes Dev.* **2010**, 24, 2463–2479.

- [92] J. Su; J. T. Groves; *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 6317–6329.
- [93] J. Nordberg; E. S. Arnér; *Free Radical Bio. Med.* **2001**, *31*, 1287–1312.
- [94] M. Mohammad; A. Y. Khan; M. S. Subhani; N. Bibi; S. Ahmad; S. Saleemi; *Res. Chem. Intermed.* **2001**, *27*, 259–267.
- [95] M. Hayyan; M. A. Hashim; I. M. AlNashef; *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3029–3085.
- [96] J. Prousek; *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 2325–2338.
- [97] A. Phaniendra; D. B. Jestadi; L. Periyasamy; *Ind. J. Clin. Biochem.* **2015**, *30*, 11–26.
- [98] M. E. Aliaga; C. Carrasco-Pozo; C. López-Alarcón; C. Olea-Azar; H. Speisky; *Bioorga. Med. Chem.* **2011**, *19*, 534–541.
- [99] W. Koppenol; *Redox Rep.* **2001**, *6*, 229–234.
- [100] A. Holmgren; J. Lu; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *396*, 120–124.
- [101] e. a. H. Weissbach *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *397*, 172–178.
- [102] R. Bryk; P. Griffin; C. Nathan; *Nature* **2000**, *407*, 211–215.
- [103] Y. S. Bae; H. Oh; S. G. Rhee; Y. D. Yoo; *Mol. Cells* **2011**, *32*, 491–509.
- [104] I. A. Abreu; D. E. Cabelli; *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1804*, 263–274.
- [105] A.-F. Miller; *FEBS Letters* **2012**, *586*, 585–595.
- [106] D. Salvemini; D. P. Riley; S. Cuzzocrea; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 367–374.
- [107] H. Younus; *Int. J. Health Sci.* **2018**, *12*, 88–93.
- [108] J. M. McCord; I. Fridovich; *J. Biol. Chem.* **1969**, *244*, 6049–6055.
- [109] H. R. Lucas; K. D. Karlin; *Met. Ions Life Sci.* **2009**, *6*, 295–361.
- [110] I. Bertini; S. Mangani; M. S. Viezzoli; *Adv. Inorg. Chem.* **1998**, *45*, 127–250.

- [111] S. V. Antonyuk; R. W. Strange; S. L. Marklund; S. S. Hasnain; *J. Mol. Biol.* **2009**, *388*, 310–326.
- [112] R. H. Holm; P. Kennepohl; E. I. Solomon; *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2239–2314.
- [113] M. J. Hitchler; F. E. Domann; *Antioxid. Redox Sign.* **2014**, *20*, 1590–1598.
- [114] M. A. Hough; S. S. Hasnain; *Structure* **2003**, *11*, 937–946.
- [115] W. R. Rypniewskia; S. Mangani; B. Bruni; P. L. Orioli; M. Casati; K. S. Wilson; *J. Mol. Biol.* **1995**, *251*, 282–296.
- [116] K. D. Carugo; A. Battistoni; M. T. Carri; F. Polticelli; A. Desideri; G. Rotilio; A. Coda; K. S. Willson; M. Bolognesi; *Acta Cryst.* **1996**, *D52*, 176–188.
- [117] B. B. Keele; J. M. McCord; I. Fridovich; *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 6176–6181.
- [118] A. K. Holley; V. Bakthavatchalu; J. M. Velez-Roman; D. K. S. Clair; *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 7114–7162.
- [119] L. Miao; D. K. S. Clair; *Free Radical Bio. Med.* **2009**, *47*, 344–356.
- [120] R. A. Edwards; H. M. Baker; M. M. Whittaker; J. W. Whittaker; G. B. Jameson; E. N. Baker; *J. Biol. Inorg. Chem.* **1998**, *3*, 161–171.
- [121] J. Azadmanesh; G. E. O. Borgstahl; *Antioxidants* **2018**, *7*, 1–16.
- [122] G. J. Hunter; C. H. Trinh; R. Bonetta; E. E. Stewart; D. E. Cabelli; T. Hunter; *Protein Sci.* **2015**, *24*, 1777–1788.
- [123] J. Azadmanesh; S. R. Trickel; G. E. O. Borgstahl; *J. Struct. Biol.* **2017**, *199*, 68–75.
- [124] T. C. Eisenschmid; R. U. Kirss; P. P. Deutsch; S. I. Hommeltoft; R. Eisenberg; J. Bargon; R. G. Lawler; A. L. Balch; *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *109*, 8089–8091.

- [125] D. E. Cabelli; D. P. Riley; J. A. Rodriguez; J. S. Valentine; H. Zhu; *Models of superoxide dismutases in biomimetic oxidations catalysed by transition metal complexes*; Imperial College Press, 2000.
- [126] M. S. Lah; M. M. Dixon; K. A. Patridge; W. C. Stallings; J. A. Fee; M. L. Ludwig; *Biochemistry* **1995**, *34*, 1646–1660.
- [127] E. Yikilmaz; D. W. Rodgers; A.-F. Miller; *Biochemistry* **2006**, *45*, 1151–1161.
- [128] R. Gupta; A. S. Borovik; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13234–13242.
- [129] C. K. Vance; A.-F. Miller; *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 461–467.
- [130] C. K. Vance; A.-F. Miller; *Biochemistry* **2001**, *40*, 13079–13087.
- [131] A. L. Schwartz; E. Yikilmaz; C. K. Vance; S. Vathyam; R. L. Koder; A.-F. Miller; *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 247–256.
- [132] A.-F. Miller; *Acc. Chem. Res.* **2008**, *80*, 501–510.
- [133] D. P. Barondeau; C. J. Kassmann; C. K. Bruns; J. A. Tainer; E. D. Getzoff; *Biochemistry* **2004**, *43*, 8038–8047.
- [134] J. Wuerges; J. Lee; Y. Yim; H. Yim; S. Kang; K. D. Carugo; *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8569–8574.
- [135] J. Shearer; L. Long; *Inorg. Chem.* **2006**, *45*, 2358–2360.
- [136] C. Muscoli; S. Cuzzocrea; D. P. Riley; J. L. Zweier; C. Thiemermann; Z.-Q. Wang; D. Salvemini; *Brit. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 445–460.
- [137] V. B. Djordjević; *Int. Rev. Cytol.* **2004**, *237*, 57–89.
- [138] C. D. Putnam; A. S. Arvai; Y. Bourne; J. A. Tainer; *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 295–309.
- [139] C. Glorieuxa; P. B. Calderon; *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 1095–1108.
- [140] P. Jones; H. B. Dunford; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2292–2298.

- [141] J. Vlasitsa; C. Jakopitscha; M. Schwanninger; P. Holubarb; C. Obinger; *FEBS Letters* **2007**, *581*, 320–324.
- [142] T. Matsui; S. ichi Ozaki; E. Liong; G. N. Phillips; Y. Watanabe; *J. Inorg. Biochem.* **1999**, *274*, 2838–2844.
- [143] Y. Christen; *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 621S–629S.
- [144] S. Boillée; C. V. Velde; D. W. Cleveland; *Neuron* **2006**, *52*, 39–59.
- [145] I. Ivanović-Burmazović; M. R. Filipović; *Adv. Inorg. Chem.* **2012**, *64*, 53–95.
- [146] L. E. Scott; C. Orvig; *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 4885–4910.
- [147] M. T. Fodero-Tavoletti; V. L. Villemagne; C. C. Rowe; C. L. Masters; K. J. Barnham; R. Cappai; *Int. J. Biochem. Cell Bio.* **2011**, *43*, 1247–1251.
- [148] J. M. McCord; M. A. Edeas; *Biomed. Pharmacother.* **2005**, *59*, 2239–2314.
- [149] P. A. Adlard et al. *Neuron* **2008**, *59*, 43–55.
- [150] E. Crabb; E. A. Moore; *Metals and Life*; Royal Society of Chemistry Publishing, 2010.
- [151] M. B. Ward; A. Scheitler; M. Yu; L. Senft; A. S. Zillmann; J. D. Gordon; D. D. Schwartz; I. Ivanović-Burmazović; C. R. Goldsmith; *Nat. Chem.* **2018**, *10*, 1207–1212.
- [152] F. Schwizer; Y. Okamoto; T. Heinisch; Y. Gu; M. M. Pellizzoni; V. Lebrun; R. Reuter; V. Köhler; J. C. Lewis; T. R. Ward; *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 142–231.
- [153] R. H. Weiss; Riley; *Drugs Future* **1996**, *21*, 383–389.
- [154] D. P. Riley; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2573–2587.
- [155] D. Salvemini; Analgesic methods using synthetic coordination compound catalysts for the dismutation of superoxide radicals and the prevention of opioid tolerance. Patent WO 9858636, 1998.

- [156] D. Salvemini; Z.-Q. Wang; J. L. Zweier; A. Samouilov; H. Macarthur; T. P. Misko; M. G. Currie; S. Cuzzocrea; J. A. Sikorski; D. P. Riley; *Science* **1999**, *286*, 304–306.
- [157] Q.-X. Li; Q.-H. Luo; Y.-Z. Li; Z.-Q. Pan; M.-C. Shen; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2004**, *2004*, 4447–4456.
- [158] P. Failli; D. Bani; A. Bencini; M. Cantore; L. D. C. Mannelli; C. Ghelardini; C. Giorgi; M. Innocenti; F. Rugi; A. Spepi; R. Udisti; B. Valtancoli; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 7273–7283.
- [159] S. Durot; C. Policar; F. Cisnetti; F. Lambert; J.-P. Renault; G. Pelosi; G. Blain; H. Korri-Youssofi; J.-P. Mahy; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 3513–3523.
- [160] O. Singh; N. Tyagi; M. M. Olmstead; K. Ghosh; *Dalton Trans.* **2017**, *46*, 14186–14191.
- [161] G. Kolks; C. R. Frihart; H. N. Rabinowitz; S. J. Lippard; *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 5720–5721.
- [162] P. K. Coughlin; J. C. Dewan; S. J. Lippard; E. ichi Watanabe; J.-M. Lehn; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 265–266.
- [163] P. K. Coughlin; S. J. Lippard; *Inorg. Chem.* **1984**, *23*, 1446–1451.
- [164] H. Fu; Y.-H. Zhou; W.-L. Chen; Z.-G. Deqing; M.-L. Tong; L.-N. Ji; Z.-W. Mao; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 4924–4925.
- [165] Y.-H. Zhou; H. Fu; W.-X. Zhao; W.-L. Chen; C.-Y. Su; H. Sun; L.-N. Ji; Z.-W. Mao; *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 734–739.
- [166] J.-L. Pierre; P. Chautemps; S. Refaif; C. Beguin; A. El-Marzouki; G. Serratrice; E. Saint-Aman; P. Rey; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 1965–1973.
- [167] I. Szilágyi; I. Labádi; K. Hernadi; I. Pálkó; N. Nagy; L. Korecz; A. Rockenbauer; Z. Kele; T. Kiss; *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 1619–1629.

- [168] J. Casanova; G. Alzuet; J. Borrás; O. Carugo; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1996**, 0, 2239–2244.
- [169] Q.-X. Li; Q.-H. Luo; Y.-Z. Lia; M.-C. Shen; *Dalton Trans.* **2004**, 0, 2329–2335.
- [170] X. Le; S. Liao; X. Liu; X. Feng; *J. Coord. Chem.* **2006**, 59, 985–995.
- [171] M. González-Álvarez; G. Alzuet; J. Borrás; L. del Castillo Agudo; S. García-Granda; J. M. Montejo-Bernardo; *Inorg. Chem.* **2005**, 44, 9424–9433.
- [172] Z. P. Cai; A. K. Hagan; M. M. Wang; S. L. Flitsch; L. Liu; J. Voglmeir; *J. Anal. Chem.* **2014**, 86, 5179–5186.
- [173] H. Stetter; W. Frank; R. Mertens; *Tetrahedron* **1981**, 37, 767–772.
- [174] C. T. Wu; Y. B. He; *Youji Huaxue* **1983**, 6, 437.
- [175] J. Costa; R. Delgado; *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 5257–5265.
- [176] B. Verdejo; A. Ferrer; S. Blasco; C. E. Castillo; J. González; J. Latorre; M. A. Máñez; M. G. Basallote; C. Soriano; E. García-España; *Inorg. Chem.* **2007**, 46, 5707–5719.
- [177] K. M. Lincoln; T. E. Richardson; L. Rutter; P. Gonzalez; J. W. Simpkins; K. N. Green; *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, 3, 919–927.
- [178] J. J. Braymer; A. S. DeToma; J.-S. Choi; K. S. Ko; ; M. H. Lim; *Int. J. Alzheimers Dis.* **2011**, 2011, 1–9.
- [179] J. Aguilar; M. G. Basallote; L. Gil; J. C. Hernández; M. A. Máñez; E. García-España; C. Soriano; B. Verdejo *Dalton Trans.* **2004**, 1, 94–103.
- [180] R. Belda; S. Blasco; B. Verdejo; H. R. Jiménez; A. Doménech-Carbó; C. Soriano; J. Latorre; C. Terencio; E. García-España; *Dalton Trans.* **2013**, 42, 11194–11204.
- [181] C. Serena; E. Calvo; M. P. Clares; M. L. Diaz; J. U. Chicote; R. Beltrán-Debon; R. Fontova; A. Rodriguez; E. García-España; A. García-España; *Plos ONE* **2015**, 10, e0119102.

- [182] M. P. Clares; C. Serena; S. Blasco; A. Nebot; L. Castillo; C. Soriano; A. Doménech; A. V. Sánchez-Sánchez; L. Soler-Calero; J. L. Mullor; A. García-España; E. García-España; *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *143*, 1–8.
- [183] L. Guijarro; M. Inclán; J. Pitarch-Jarque; A. Doménech-Carbó; J. U. Chicote; S. Trefler; E. García-España; A. García-España; B. Verdejo; *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 13748–13758.
- [184] A. Nebot-Guinot; A. Liberato; M. A. Máñez; M. P. Clares; A. Doménech; J. Pitarch-Jarque; A. Martínez-Camarena; M. G. Basallote; E. García-España; *Inorg. Chim. Acta* **2018**, *472*, 139–148.
- [185] G. Golub; H. Cohen; P. Paoletti; A. Bencini; L. Messori; I. Bertini; D. Meyerstein; *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 8353–8361.
- [186] G. Golub; A. Lashaz; H. Cohen; P. Paoletti; A. Bencini; B. Valtancoli; D. Meyerstein; *Inorg. Chim. Acta* **1997**, *255*, 111 – 115.
- [187] K. M. Lincoln; M. E. Offutt; T. D. Hayden; R. E. Saunders; K. N. Green; *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 1406–1416.
- [188] M. Vallet; J. Faus; E. García-España; J. Moratal; *Introducción a la Química Bioinorgánica*; Síntesis, 2003.
- [189] A. Rathi; Interview to Jean-Marie Lehn. Lindau Nobel Laureate Meetings, 2010.
- [190] M. C. Baruzzi; *Química Supramolecular con Jean-Marie Lehn*. Universidad Autónoma de Barcelona, 2012.
- [191] J. Rose; Transcript from an interview with Professor Jean-Marie Lehn, Nobel Laureate in Chemistry 1987. The Nobel Prize organisation, 2001.
- [192] C. J. Pedersen; *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, *89*, 7017–7036.
- [193] B. Dietrich; J. Lehn; J. Sauvage; *Tetrahedron Lett.* **1969**, *34*, 2885–2888.
- [194] J. M. Lehn; *Pure Appl. Chem.* **1978**, *50*, 871–892.

- [195] D. J. Cram; T. Kaneda; R. C. Helgeson; G. M. Lein; *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6752–6754.
- [196] C. Dietrich-Buchecker; M. C. Jimenez-Molero; V. Sartor; J.-P. Sauvage; *Pure Appl. Chem.* **2003**, *75*, 1383–1393.
- [197] F. Durola; V. Heitz; F. R. C. Roche; J.-P. Sauvage; A. Sour; Y. Trolez; *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 633–645.
- [198] C. J. Bruns; J. F. Stoddart; *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 2186–2199.
- [199] J. Jarnestad; *Elastic Molecular Structure*. The Royal Swedish Academy of Sciences, 2016.
- [200] P. R. Ashton; C. L. Brown; E. J. T. Chrystal; T. T. Goodnow; A. E. Kaifer; K. P. Parry; D. Philp; A. M. Z. Slawin; N. Spencer; J. F. Stoddart; D. J. Williams; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1991**, 634–639.
- [201] P. R. Ashton; A. S. Reder; N. Spencer; J. F. Stoddart; *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 5286–5287.
- [202] J. A. Bravo; F. M. Raymo; J. F. Stoddart; A. J. P. White; D. J. Williams; *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 2565–2571.
- [203] N. Koumura; R. W. J. Zijlstra; R. A. van Delden; N. Harada; B. L. Feringa; *Nature* **1999**, *401*, 152–155.
- [204] J. Frey; T. Kraus; V. Heitz; J.-P. Sauvage; *Chem. Commun.* **2005**, 5310–5312.
- [205] Y. Liu; A. H. Flood; P. A. Bonvallet; S. A. Vignon; B. H. Northrop; H.-R. Tseng; J. O. Jeppesen; T. J. Huang; B. Brough; M. Baller; S. Magonov; S. D. Solares; W. A. Goddard; C.-M. Ho; J. F. Stoddart; *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 9745–9759.
- [206] K. Ariga; T. Kunitake; *Supramolecular Chemistry - Fundamentals and Applications*; Springer, 2006.
- [207] R. Feynman; *There's Plenty of Room at the Bottom*. Talk to the American Physical Society, 1959.

- [208] C. Toumey; *Techné* **2012**, *12*, 133–166.
- [209] J. L. Gilmore; X. Yi; L. Quan; A. V. Kabanov; *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2008**, *3*, 83–94.
- [210] F. Palazon; D. P. del Rey; S. Marras; M. Prato; M. Sessolo; H. J. Bolink; L. Manna; *ACS Energy Lett.* **2018**, *3*, 835–839.
- [211] J. Lehmann; A. Gaita-Ariño; E. Coronado; D. Loss *Nat. Nanotech.* **2007**, *2*, 312–317.
- [212] M. Shiddiq; D. Komijani; Y. Duan; A. Gaita-Ariño; E. Coronado; S. Hill; *Nature* **2016**, *531*, 348–351.
- [213] D. F. Emerich; C. G. Thanos; *Expert Opin. Biol. Ther.* **2003**, *3*, 655–663.
- [214] P. Boisseau; B. Loubaton; *C. R. Physique* **2011**, *6*, 620–636.
- [215] I. Pont; J. González-García; M. Inclán; M. Reynolds; E. Delgado-Pinar; M. T. Albelda; R. Vilar; E. García-España; *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 10850–10858.
- [216] G. Binnig; H. Rohrer; *IBM J. Res. Dev.* **1986**, *30*, 355–369.
- [217] R. Sandhir; A. Yadav; A. Sunkaria; N. Singhal; *Neurochem. Int.* **2015**, *89*, 209–226.
- [218] R. A. Petros; J. M. DeSimone; *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*, 615–627.
- [219] R. Martín; Cristina Menchón; N. Apostolova; V. M. Victor; M. Álvaro; J. R. Herance; H. García; *ACS Nano* **2010**, *4*, 6957–6965.
- [220] L. Du; J. Li; C. Chen; Y. Liu; *Free Radical Res.* **2014**, *48*, 1061–1069.
- [221] S. V. Vinogradov; E. V. Batrakova; A. V. Kabanov; *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 50–60.
- [222] G. Warren; E. Makarov; Y. Lu; T. Senanayake; K. Rivera; S. Gorantla; L. Y. Poluektova; S. V. Vinogradov; *J. Neuroimmune Pharmacol.* **2015**, *10*, 88–101.

- [223] M. Patriarca; V. Daiera; G. Camía; N. Pellegrini; E. Rivière; C. Hureau; S. Signorella; *Micropor. Mesopor. Mat.* **2019**, *279*, 133–141.
- [224] B. Klajnert; T. Wasiak; M. Ionov; M. Fernandez-Villamarin; A. Sousa-Herves; J. Correa; R. Riguera; E. Fernandez-Megia; *Nanomed.-Nanotechnol.* **2012**, *8*, 1372–1378.
- [225] J. Wenga; J. Ren; *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 897–909.
- [226] L. Li; C. Wang; K. Liu; Y. Wang; K. Liu; Y. Lin; *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 3404–3411.
- [227] C. Fasting; C. A. Schalley; M. Weber; O. Seitz; S. Hecht; B. Kokschi; J. Dervede; C. Graf; E.-W. Knapp; R. Haag; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472 – 10498.
- [228] J. Serrano-Plana; W. N. Oloo; L. Acosta-Rueda; K. K. Meier; V. Begoña; E. García-España; M. G. Basallote; E. Münck; J. Lawrence Que; A. Company; M. Costas; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 15833–15842.
- [229] A. Rutenberg; V. V. Vinogradov; D. Avnir; *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 5636–5638.
- [230] B. Sun; T. Xia; *J. Mater. Chem. B* **2016**, *4*, 5496–5509.
- [231] S. Blasco; B. Verdejo; C. Bazzicalupi; A. Bianchi; C. Giorgi; C. Soriano; E. García-España; *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 843–850.
- [232] P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca; *J. Solut. Chem.* **2008**, *37*, 467–476.
- [233] J. P. Perdew; *Phys. Rev. B* **1986**, *33*, 8822–8824.
- [234] A. D. Becke; *Phys. Rev. A* **1988**, *38*, 3098–3100.
- [235] C. Lee; W. Yang; R. G. Parr; *Phys. Rev. B* **1988**, *37*, 785–789.
- [236] R. Ditchfield; W. J. Hehre; J. A. Pople; *J. Chem. Phys.* **1971**, *54*, 724–728.
- [237] P. Schwerdtfeger; M. Dolg; W. H. E. Schwarz; G. A. Bowmaker; P. D. W. Boyd; *J. Chem. Phys.* **1989**, *91*, 1762–1774.

- [238] W. R. Wadt; P. J. Hay; *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 284–298.
- [239] P. J. Hay; W. R. Wadt; *J. Chem. Phys.* **1985**, *82*, 299–310.
- [240] J. Tomasi; B. Mennucci; R. Cammi; *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 2999–3093.
- [241] M. Cossi; G. Scalmani; N. Rega; V. Barone; *J. Chem. Phys.* **2002**, *117*, 43–54.
- [242] S. Grimme; J. Antony; S. Ehrlich; H. Krieg; *J. Chem. Phys.* **2010**, *132*, 154104.
- [243] C. R. Groom; I. J. Bruno; M. P. Lightfoot; S. C. Ward; *Acta Cryst.* **2016**, *B72*, 171–179.
- [244] Á. Martínez-Camarena; A. Liberato; E. Delgado-Pinar; A. G. Algarra; J. Pitarch-Jarque; J. M. Llinares; M. A. Mañez; A. Domenech-Carbó; M. G. Basallote; E. García-España; *Inorg. Chem.* **2018**, *57*, 10961–10973.
- [245] A. D. Becke; *J. Chem. Phys.* **1993**, *98*, 5648–5652.
- [246] Y. Zhao; D. G. Truhlar; *Theor. Chem. Account* **2008**, *120*, 215–241.
- [247] F. Weigend; R. Ahlrichs; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2005**, *7*, 3297–3305.
- [248] D. Andrae; U. Häußermann; M. Dolg; H. Stoll; H. Preuß; *Theor. Chim. Acta* **1990**, *77*, 123–141.
- [249] M. J. Frisch et al. *Gaussian09* **2009**, Version C.01.
- [250] G. Schaftenaar; J. Noordik; *J. Comput. Mol. Design* **2000**, *14*, 123–134.
- [251] Schrödinger-LLC *The PyMOL Molecular Graphics System Version 1.8*.
- [252] W. L. Jorgensen; J. Chandrasekhar; J. D. Madura; R. W. Impey; M. L. Klein; *J. Chem. Phys.* **1983**, *79*, 926–935.
- [253] U. Essmann; L. Perera; M. L. Berkowitz; T. Darden; H. Lee; L. G. Pedersen; *J. Chem. Phys.* **1995**, *103*, 8577–8593.
- [254] V. Kräutler; W. F. van Gunsteren; P. H. Hünenberger; *J. Comp. Chem.* **2001**, *22*, 501–508.

- [255] D. A. Case et al. *AMBER17, University of California, San Francisco* **2017**,
- [256] P. Li; K. M. Merz; *J. Chem. Inf. Model* **2016**, *56*, 599–604.
- [257] W. J. Hehre; L. Radom; P. v. R. Schleyer; J. A. Pople; *Ab initio molecular orbital theory*; Wiley, 1986.
- [258] U. C. Singh; P. A. Kollman; *J. Comp. Chem.* **1984**, *5*, 129–145.
- [259] B. H. Besler; J. Kenneth M. Merz; P. A. Kollman; *J. Comp. Chem.* **1990**, *11*, 431–439.
- [260] D. E. Reichert; P.-O. Norrby; M. J. Welch; *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 5223–5230.
- [261] Y. Zhu; Y. Su; X. Li; Y. Wang; G. Chen; *Chemical Physics Letters* **2008**, *455*, 354–360.
- [262] T. Xue; S. Cui; Y. Wang; B. Yang; G. Chen; *Theor. Chem. Acc.* **2015**, *134*, 1603–1605.
- [263] F. Neese; *WIREs Comput. Mol. Sci.* **2012**, *2*, 73–78.
- [264] D. R. Roe; T. E. Cheatham; *J. Chem. Theory Comput.* **2013**, *9*, 3084–3095.
- [265] R. A. Binstead; B. J. and A. D. Zuerbühler; *SPECFIT-32, Spectrum Software Associated: Chappel Hill* **2000**,
- [266] A. K. Covington; M. Paabo; R. A. Robinson; R. G. Bates; *Anal. Chem.* **1968**, *40*, 700–706.
- [267] M. R. Willcott; *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 13180.
- [268] Y. Rong; S. R. Doctrow; G. Tocco; M. Baudry; *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 9897–9902.
- [269] S. R. Doctrow; K. Huffman; C. B. Marcus; G. Tocco; E. Malfroy; C. A. Adinolfi; H. Kruk; K. Baker; N. Lazarowych; J. Mascarenhas; B. Malfroy; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4549–4558.

- [270] M. Fontanelli; M. Micheloni; *Proceedings of the I Spanish-Italian Congress on Thermodynamics of Metal Complexes* **1990**, Peñíscola, España.
- [271] G. Gran; *Acta Chem. Scand.* **1950**, *4*, 559–577.
- [272] G. Gran; *Analyst* **1952**, *77*, 661–671.
- [273] P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1985**, 1195–1200.
- [274] P. Gans; A. Sabatini; A. Vacca; *Talanta* **1996**, *43*, 1739–1753.
- [275] L. Alderighi; P. Gans; A. Ienco; D. Peters; A. Sabatini; A. Vacca; *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *184*, 311–318.
- [276] H. Hope; *Acta Cryst.* **1988**, *B44*, 22–26.
- [277] Agilent-Technologies-Ltd *Agilent. CrysAlis PRO* **2014**,
- [278] G. M. Sheldrick; *Acta Cryst.* **2015**, *A71*, 3–8.
- [279] O. V. Dolomanov; L. J. Bourhis; R. J. Gildea; J. A. K. Howard; H. Puschmann; *J. Appl. Cryst.* **2009**, *42*, 339–341.
- [280] A. M. Pisoschi; G. P. Negulescu; *Biochem. & Anal. Biochem.* **2011**, *1*, 106.
- [281] L. K. MacDonald-Wicks; L. G. Wood; M. L. Garg; *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 2046–2056.
- [282] C. Beauchamp; I. Fridovich; *Anal. Biochem.* **1971**, *44*, 276–287.
- [283] J. M. McCord; M. Crapo; I. Fridovich; *Superoxide and Superoxide Dismutases*; Academic Press, New York, 1977.
- [284] L. W. Oberley; D. R. Spitz; *Method. Enzymol.* **1984**, *105*, 457–464.
- [285] C. Enroth; B. T. Eger; K. Okamoto; T. Nishino; T. Nishino; E. F. Pai; *P. Natl. Acad. Sci. USA* **200**, *97*, 10723–10728.
- [286] N. Cantu-Medellin; E. E. Kelley; *Redox Biology* **2013**, *1*, 353–358.
- [287] T. Nishino; K. Okamoto; *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *82*, 43–49.

- [288] T. Iwasaki; K. Okamoto; T. Nishino; J. Mizushima; H. Hori; *J. Biochem.* **2000**, *127*, 771–778.
- [289] R. Cejudo-Marín; G. Alzuet; S. Ferrer; J. Borrás; A. Castiñeiras; E. Monzani; L. Casella; *Inorg. Chem.* **2004**, *43*, 6805–6814.
- [290] S. B. Llopis; Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes. Ph.D. thesis, Universitat de Valencia, 2011.
- [291] J. E. Richman; T. J. Atkins; *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 2268–2270.
- [292] N. Leygue; A. P. e Iñiguez De Heredia; C. Galaup; E. Benoist; L. Lamarque; C. Picard; *Tetrahedron* **2018**, *74*, 4272–4287.
- [293] S. Pulacchinia; K. F. Sibbons; K. Shastri; M. Motevalli; M. Watkinson; H. Wan; A. Whiting; A. P. Lightfoot; *Dalton Trans.* **2003**, *10*, 2043–2052.
- [294] R. C. Hoye; J. E. Richman; G. A. Dantas; M. F. Lightbourne; L. S. Shineman; *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 2722–2725.
- [295] A. Bencini; M. I. Burguete; E. García-España; S. V. Luis; J. F. Miravet; C. Soriano; *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4749–4753.
- [296] P. Froidevaux; J. M. Harrowfield; A. N. Sobolev; *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 4678–4687.
- [297] A.-L. Gassner; C. Duhot; J.-C. G. Bünzli; A.-S. Chauvin; *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 7802–7812.
- [298] E. Busto; A. González-Álvarez; V. Gotor-Fernández; I. Alfonso; V. Gotor; *Tetrahedron* **2010**, *66*, 6070–6077.
- [299] L. Iturrino; P. Navarro; M. I. Rodríguez-Franco; M. Contreras; J. A. Escario; A. Martínez; M. D. R. Pardo; *Eur. J. Med. Chem.* **1987**, *22*, 445–451.
- [300] R. Belda; J. Pitarch-Jarque; C. Soriano; J. M. Llinares; S. Blasco; J. Ferrando-Soria; E. García-España; *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 10795–10803.

- [301] F. Minisci; R. Galli; V. Malatesta; T. Caronna; *Tetrahedron* **1970**, 26, 4083–4091.
- [302] H. Itokawa; S. Kameyama; T. Inaba; T. Tazaki; S. Mihashi; Y. Kawazoe; *Chem. Pharm. Bull.* **1975**, 23, 487–493.
- [303] K. Weidmann; M. Bickel; K. Kessler; B. Scharbert; 2-Hydroxymethylpyridines, the corresponding pyridine N-oxides and their derivatives, processes for their preparation and their use. Patent EP 0533131, 1992.
- [304] C. Féau; E. Klein; P. Kerth; L. Lebeau; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 1499–1503.
- [305] S. G. Gouin; M. Roger; N. Leygue; D. Deniaud; K. Julienne; E. Benoist; C. Picard; J. Kovensky; C. Galaup; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, 22, 2684–2688.
- [306] F. Minisci; R. Galli; M. Cecere; V. Malatesta; T. Caronna; *Tetrahedron Lett.* **1968**, 54, 5609–5612.
- [307] H. Itokawa; T. Inaba; R. Haruta; S. Kameyama; *Chem. Pharm. Bull.* **1978**, 26, 1295–1297.
- [308] E. Fischer; *Berichte* **1915**, 48, 93.
- [309] V. V. Sureshbabu; N. Narendra; *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry: Volume 4: Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*; Ed. Andrew B. Hughes, Wiley-VCH, 2011.
- [310] P. G. M. Wuts; T. W. Greene; *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, 2006.
- [311] S. Gabriel; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1887**, 20, 2224–2236.
- [312] H. R. Ing; R. H. F. Manske; *J. Chem. Soc.* **1926**, 129, 2348–2351.
- [313] P. G. M. Wuts; T. W. Greene; *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, Inc., 2007.

- [314] C. H. Heathcock; K. M. Smith; T. A. Blumenkopf; *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 5022–5024.
- [315] M. Ayadim; J. L. H. Jiwan; J. P. Soumillion; *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10436–10437.
- [316] D. P. Kudav; S. P. Samant; B. D. Hosangadi; *Synth. Commun.* **1987**, *17*, 1185–1187.
- [317] H. R. Snyder; R. E. Heckert; *J. Am. Chem. Soc.* **1952**, *74*, 2006–2009.
- [318] B. E. Haskell; S. B. Bowlus; *J. Org. Chem.* **1976**, *41*, 159–160.
- [319] I. Lázár; *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 3181–3185.
- [320] P. K. Mandal; J. S. McMurray; *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6599–6601.
- [321] P. Angibeaud; J. Defaye; A. Gabelle; J.-P. Utille; *Synthesis* **1985**, *12*, 1123–1125.
- [322] S. K. Boovanahalli; D. W. Kim; D. Y. Chi; *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3340–3344.
- [323] A. Meijer; Manganese chelates and their use as contrast agents in magnetic resonance imaging (MRI). Patent WO 2011/073371 A1, 2011.
- [324] W. Eschweiler; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1905**, *38*, 880–882.
- [325] H. T. Clarke; H. B. Gillespie; S. Z. Weisshaus; *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 4571–4587.
- [326] E. Fischer; A. Speier; *Chemische Berichte.* **1895**, *28*, 3252–3258.
- [327] Z. Chen; Y. Wen; Y. Fu; H. Chen; M. Ye; G. Luo; *Synlett* **2017**, *28*, 981–985.
- [328] R. Aucejo; P. Díaz; E. García-España; J. Alarcón; E. Delgado-Pinar; F. Torres; C. Soriano; M. C. Guillem; *New J. Chem.* **2007**, *31*, 44–51.
- [329] J. D. Wright; N. A. J. M. Sommerdijk; *Sol-Gel Materials: Chemistry and Applications*; Gordon and Breach Science Publishers, 2000.

- [330] A. Williamson; *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1850**, 37, 350–356.
- [331] R. N. Boyd; R. T. Morrison; *Organic Chemistry*; Englewood Cliffs, N.J.: Prentice Hall, 1992.
- [332] J. E. Sarneski; H. L. Surprenant; F. K. Molen; C. N. Reilley; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 2116–2124.
- [333] S. P. Dagnall; D. N. Hague; M. E. McAdam; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 435–440.
- [334] S. P. Dagnall; D. N. Hague; M. E. McAdam; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1984**, 1111–1114.
- [335] D. N. Hague; A. D. Moreton; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1994**, 265–270.
- [336] C. Frassinetti; S. Ghelli; P. Gans; A. Sabatini; M. S. Moruzzi; A. Vacca; *Anal. Biochem.* **1995**, 231, 374 – 382.
- [337] A. Bencini; A. Bianchi; E. García-España; M. Micheloni; J. A. Ramirez; *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 188, 97 – 156.
- [338] G. Loudon; *Organic Chemistry*; Roberts and Company, 2009.
- [339] M. M. Piero; Paoletti; A. Vacca; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1978**, 945–947.
- [340] P. Beak; J. B. Covington; S. G. Smith; J. M. White; J. M. Zeigler; *J. Org. Chem.* **1980**, 45, 1354–1362.
- [341] J. Aguilar; M. G. Basallote; L. Gil; J. C. Hernández; M. A. Máñez; E. García-España; C. Soriano; B. Verdejo; *Dalton Trans.* **2004**, 94–103.
- [342] A. W. Addison; T. N. Rao; J. Reedijk; J. van Rijn; G. C. Verschoor; *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1984**, 1349–1356.
- [343] R. A. Read; D. W. Margerum; *Inorg. Chem.* **1981**, 20, 3143–3149.
- [344] W.-J. Lan; C.-S. Chung; *J. Chin. Chem. Soc.* **1992**, 39, 577–582.

- [345] W.-J. Lan; C.-S. Chung; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1994**, 0, 191–194.
- [346] C. E. Castillo; M. A. Mañez; M. G. Basallote; M. P. Clares; S. Blasco; E. García-España; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2012**, 41, 5617.
- [347] B. C. Westerby; K. L. Juntunen; G. H. Leggett; V. B. Pett; M. J. Koenigbauer; M. D. Purgett; M. J. Taschner; L. A. Ochrymowycz; D. B. Rorabacher; *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 2109–2120.
- [348] T. Biver; F. Secco; M. R. Tine; M. Venturini; *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 33–40.
- [349] M. Soibinet; D. Gusmeroli; L. Siegfried; T. A. Kadena; C. Palivan; A. Schweiger; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2005**, 12, 2138–2146.
- [350] L. Siegfried; T. A. Kader; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2005**, 6, 1136–1140.
- [351] T. Biver; D. Lombardi; F. Secco; M. R. Tine; M. Venturini; A. Bencini; A. Bianchi; B. Valtancoli; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2006**, 12, 1524–1533.
- [352] M. Eigen; R. G. Wilkins; *Mechanisms of Inorganic Reactions*; American Chemical Society, 1965; pp 55–80.
- [353] R. G. Wilkins; *Kinetics and Mechanism of Reactions of Transition Metal Complexes*, 2nd ed.; VCH: Weinheim, Germany, 1991; pp 201–212.
- [354] D. H. Powell; L. Helm; A. E. Merbach; *J. Chem. Phys.* **1991**, 95, 9258–9265.
- [355] C. Bazzicalupi; A. Bencini; A. Bianchi; S. Ciattini; C. Giorgi; P. Paoletti; B. Valtancoli; F. Secco; M. R. Tinè; M. Venturini; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2000**, 2, 4864–4869.
- [356] T. S. Turan; D. B. Rorabacher; *Inorg. Chem.* **1972**, 11, 288–295.
- [357] F. Olmo; M. P. Clares; C. Marín; J. González; M. Inclán; C. Soriano; K. U. R. Tejero; M. J. Rosales; R. L. Krauth-Siegel; M. Sánchez-Moreno; E. García-España; *RSC Adv.* **2014**, 4, 65108–65120.
- [358] H. Irving; R. J. P. Williams; *J. Chem. Soc.* **1953**, 3192–3210.

- [359] A. S. Ten; N. Humbert; B. Verdejo; J. M. Llinares; M. Elhabiri; J. Jezierska; C. Soriano; H. Kozlowski; A.-M. Albrecht-Gary; E. García-España; *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 8985–8997.
- [360] B. P. Hay; R. D. Hancock; *Coord. Chem. Rev.* **2001**, *212*, 61–72.
- [361] H. Ohtsu; Y. Shimazaki; A. Odani; O. Yamauchi; W. Mori; S. Itoh; S. Fukuzumi; *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5733–5741.
- [362] O. Iranzo; *Bioorg. Chem.* **2011**, *39*, 73–87.
- [363] L. Guijarro; M. Inclán; J. Pitarch-Jarque; A. Doménech-Carbó; J. U. Chicote; S. Trefler; E. García-España; A. García-España; ; B. Verdejo; *Inorg. Chem.* **2017**, *56*, 13748–13758.
- [364] L. G. Ferrer; Azaciclofanos modificados para el estudio de moléculas de interés biológico. Ph.D. thesis, Universitat de Valencia, 2018.
- [365] J. Rabani; D. Klug; I. Fridovich; *Isr. J. Chem.* **1972**, *10*, 1095–1106.
- [366] D. Klug-Roth; I. Fridovich; J. Rabani; *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 2786–2790.
- [367] E. M. Fielden; P. B. Roberts; R. C. Bray; D. J. Lowe; G. N. Mautner; G. Rotilio; L. Calabrese; *Biochem. J.* **1974**, *139*, 49–60.
- [368] P. M. Wood; *Biochem. J.* **1988**, *253*, 287–289.
- [369] J. Xu; W. Huang; R. L. McCreery; *J. Electroanal. Chem.* **1996**, *410*, 235–242.
- [370] M. Srncic; F. Aquilante; U. Ryde; L. Rulíšek; *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 6074–6086.
- [371] S. Grimme; *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **2011**, *1*, 211–228.
- [372] A. Schäfer; H. Horn; R. Ahlrichs; *J. Chem. Phys.* **1992**, *97*, 2571–2577.
- [373] A. Schäfer; C. Huber; R. Ahlrichs; *J. Chem. Phys.* **1994**, *100*, 5829–5835.
- [374] F. Weigend; *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 1057–1065.

- [375] B. F. Anderson; R. A. Edwards; M. M. Whittaker; J. W. Whittaker; E. N. Baker; G. B. Jameson;
- [376] L. Rulišek; K. P. Jensen; K. Lundgren; U. Ryde; *J. Comp. Chem.* **2006**, *27*, 1398–1414.
- [377] D. Chen; Q. Wang; H. Zhang; S. Mi; J. Wang; Q. Zeng; G. Zhang; *Int. J. Quantum Chem.* **2010**, *110*, 1394–1401.
- [378] M. Lintuluoto; C. Yamada; J. M. Lintuluoto; *J. Phys. Chem. B* **2017**, *121*, 7235–7246.
- [379] L. Yang; D. R. Powell; R. P. Houser; *Dalton Trans.* **2007**, *0*, 955–964.
- [380] F. M. Hawkridge; H. H. Bauer; *Anal. Chem.* **1972**, *44*, 364–369.
- [381] J. L. Anderson; I. Shain; *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1274–1281.
- [382] J. L. Anderson; I. Shain; *Anal. Chem.* **1978**, *50*, 163–171.
- [383] A. Doménech; E. García-España; S. V. Luis; V. Marcelino; J. F. Miravet; *Inorg. Chim. Acta* **2000**, *299*, 238–246.
- [384] G. Gunawardena; G. Hills; I. Montenegro; *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *184*, 357–369.
- [385] J. Crousier; I. Bimaghra; *Electrochim. Acta* **1989**, *34*, 1205–1211.
- [386] J. A. Tainer; E. D. Getzoff; J. S. Richardson; D. C. Richardson; *Nature* **1983**, *306*, 284–287.
- [387] C. A. Cohn; A. Pak; D. Strongin; M. A. Schoonen; *Geochem. Trans.* **2005**, *6*, 47–51.
- [388] B. J. Day; *Biochem. Pharmacol.* **2009**, *77*, 285–296.
- [389] I. Lee; O. Hwang; D. Yoo; G. Khang; D. Lee; *Bull. Korean Chem. Soc.* **2011**, *32*, 2187–2192.

-
- [390] I. Batinic-Haberle; A. Tovmasyan; I. Spasojevic; *Redox Biology* **2015**, *5*, 43–65.
- [391] E. Zhang; H. Tian; S. Xu; X. Yu; Q. Xu; *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2704–2707.
- [392] C. Giri; F. Topić; P. Mal; K. Rissanen; *Dalton Trans.* **2014**, *43*, 15697–15699.
- [393] G. Jaiswal; V. G. Landge; D. Jagadeesan; E. Balaraman; *Nature* **2017**, *8*, 2147.

