

Capítulo 5: Preparación de supramoléculas de Pt y Pd con ligando

etilendiamina

5-1- INTRODUCCION

Uno de los objetivos más destacados de este trabajo, además de la síntesis de metalosupramoléculas vía autoensamblaje, era su aplicación como receptores o anfitriones de otras moléculas específicas (huéspedes) en solución, mediante el proceso denominado reconocimiento molecular.

Este fenómeno es básico en química supramolecular y fue introducido por primera vez por J. M. Lehn para referirse a la tendencia de los éteres corona y ciertos criptatos a coordinar selectivamente iones alcalinos y alcalinotérreos (receptor y sustrato) (**figura 5-1**). Desde entonces, el principal desafío de la química supramolecular consiste en reproducir hechos biológicos que tienen lugar desde hace millones de años. En este contexto, las asociaciones entre anfitriones y huéspedes desempeñan un papel crucial en muchos sistemas biológicos, tales como interacciones enzima-sustrato, replicación de los ácidos nucleicos, transporte a través de la membrana celular, biosíntesis de proteínas, reconocimiento antígeno-anticuerpo, etc.

A partir de sus experimentos, J. M. Lehn definió el reconocimiento molecular como la *energía* y la *información* involucrada en el *enlace* y la *selección* del sustrato (s) por una molécula receptora concreta, que a su vez debe incorporar una *función* específica¹.

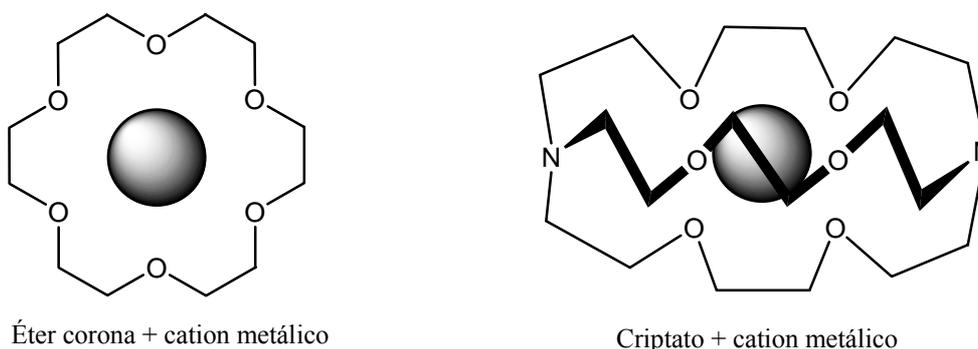


Figura 5-1: Éter corona y criptato como receptores de cationes metálicas

Desde los años 70, se han desarrollado una gran variedad de complejos supramoleculares sintéticos, no solamente como imitación de sistemas biológicos, sino también como sustancias interesantes en ciencia de materiales.

De manera análoga a las supramoléculas orgánicas, las supramoléculas basadas en enlaces de coordinación metal-ligando son capaces de participar en procesos de reconocimiento molecular mediante interacciones con especies introducidas en sus cavidades. La diversidad de cargas, las posibles interacciones débiles del metal con los huéspedes, la direccionalidad de los enlaces de los metales de transición y el comportamiento redox, entre otros, proporcionan a las metalosupramoléculas características especiales que no existen en los sistemas puramente orgánicos.

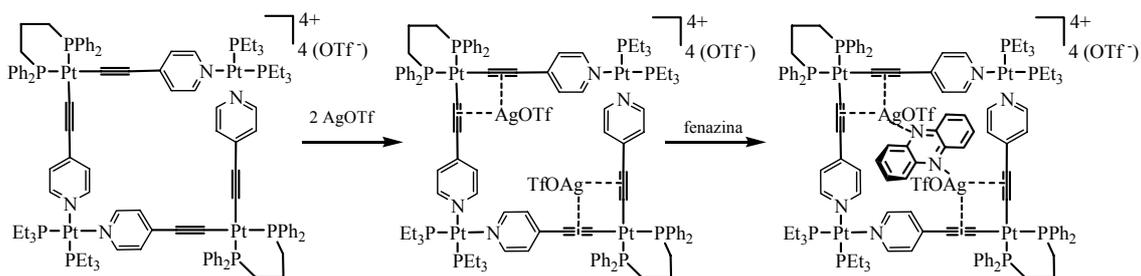
Las interacciones más comunes que se establecen entre las metalosupramoléculas y los huéspedes pueden ser: electrostáticas^{2,3,4,5,6}, hidrofóbicas^{2,4,5,6}, enlaces de hidrógeno^{7,8}, ácido-base de Lewis^{9,10,11}, metal-metal^{12,13}, π - π stacking^{12,13}, o una combinación entre algunas de ellas.

Así, la química de coordinación se ha utilizado con éxito para construir estructuras discretas tales como: macrociclos^{14,15,5,16}, hélices^{14,17,18}, “cajas”^{5,6,14,19-21} y “barras”^{14,22} de gran interés por su uso como receptores en procesos de reconocimiento molecular.

En particular y puesto que la construcción de cuadrados moleculares proporciona fácilmente cavidades de tamaños variables, se puede realizar una complejación selectiva de una amplia gama de moléculas orgánicas e iones por dichos cuadrados. En concreto, el cuadrado descrito por Fujita^{4,23}, formado mediante el ensamblaje espontáneo de la arista 4,4'-bipiridina y la esquina [Pd(NO₃)₂(en)], es capaz de encapsular dentro de su cavidad a huéspedes ricos en electrones, tales como, 1,3,5-trimetoxibenceno, *p*-dimetoxibenceno y *m*-dimetoxibenceno. Las constantes de asociación de estos procesos son de 750 M⁻¹, 330 M⁻¹ y 580 M⁻¹ respectivamente y su origen se atribuye a una combinación de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas. De manera similar, el cuadrado catiónico sintetizado por Stang^{21c}, con el ligando auxiliar dppp y la misma arista (4,4'-bipiridina), reconoce al 1,5-dihidroxinaftaleno en metanol deuterado. Aparentemente esta unión se debe a interacciones electrostáticas.

Por otro lado, la introducción de grupos acetileno en el esqueleto del macrociclo anfitrión permite el reconocimiento de iones Ag⁺ mediante el establecimiento de

interacciones del tipo ácido-base de Lewis^{9,21c} para dar lugar a un complejo anfitrión-huésped, cuya estabilidad en solución es considerable. El complejo de asociación obtenido, por su parte, actúa como receptor frente a huéspedes del tipo base de Lewis como la fenazina, la 4,4'-bipiridilcetona o la pirazina, especies con el tamaño adecuado para actuar de puente entre los dos cationes Ag^+ π -asociados al cuadrado (**esquema 5-1**).

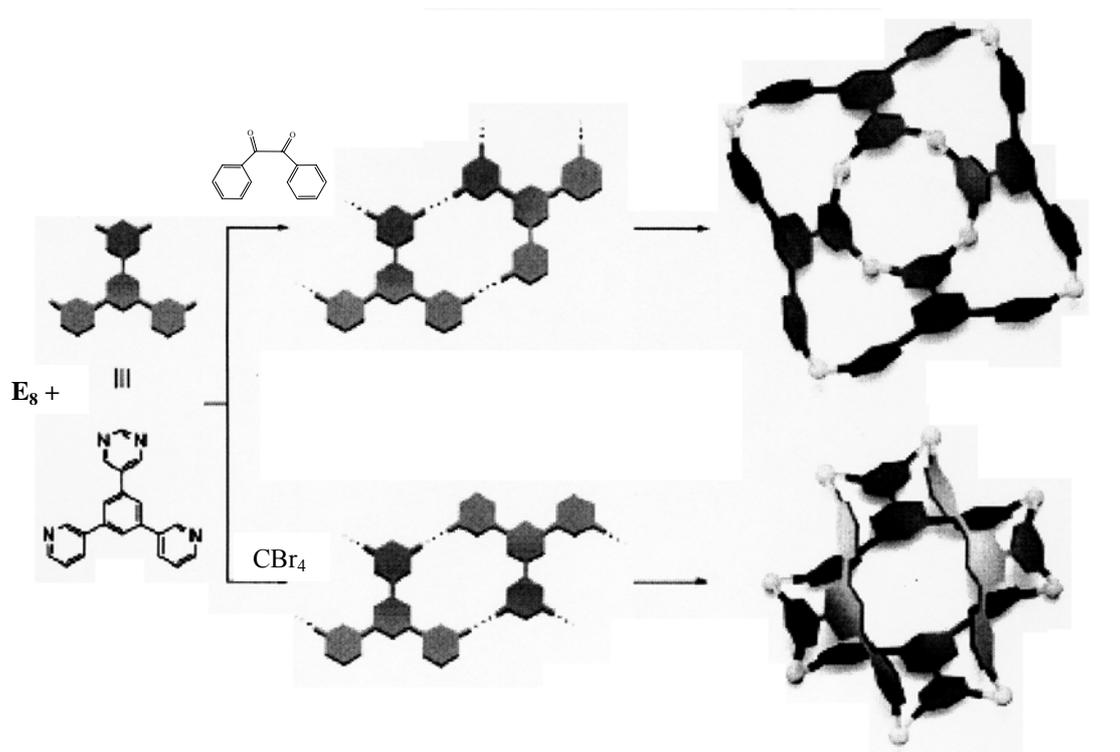


Esquema 5-1: Reconocimiento molecular mediante interacciones del tipo ácido-base de Lewis.

Como se puede observar en la **esquema 5-1**, es crucial que la forma y el tamaño del huésped sean adecuados a la cavidad del anfitrión. En este sentido se ha publicado un estudio muy interesante sobre la relación de la dimensión de la cavidad de un anfitrión tipo “caja” con la selección de los huéspedes apropiados en función de la forma y dimensión de los mismos². Así, para huéspedes de pequeño tamaño respecto a la cavidad, se forman complejos anfitrión-huésped con una relación de asociación 1:4, para huéspedes de dimensión media, se observa la formación de complejos 1:2, mientras que para huéspedes de dimensión mayor, se obtienen complejos 1:1².

A menudo, las interacciones anfitrión-huésped son de vital importancia para la síntesis de los macrociclos receptores. Por ejemplo, el autoensamblaje del compuesto 3,5-bis(3-piridil)-1-(3,5-pirimidil)-benceno con cuatro posiciones dadoras y la esquina $[\text{Pd}(\text{NO}_3)(\text{en})]$ (**E₈**) está condicionado por la naturaleza del huésped utilizado²⁴. Así, en presencia de huéspedes de tamaño grande como el 1,2-difenildiona, se favorece la formación de una estructura de pirámide truncada de base cuadrada, mientras que el

mismo ensamblaje en presencia de huéspedes tetraédricos de tamaño pequeño, como el CBr_4 , conduce a la formación de una estructura tetraédrica cerrada (**esquema 5-2**).



Esquema 5-2: Influencia del huésped sobre el resultado del autoensamblaje.

Por otro lado, la adición de huéspedes puede controlar la composición de un equilibrio en solución entre dos especies (cuadrado y triángulo moleculares)²⁵ de manera que, normalmente, el equilibrio se desplaza hacia la formación de la especie triangular en presencia de huéspedes de tamaño pequeño, mientras que huéspedes de gran tamaño inducen a la formación de la especie cuadrada.

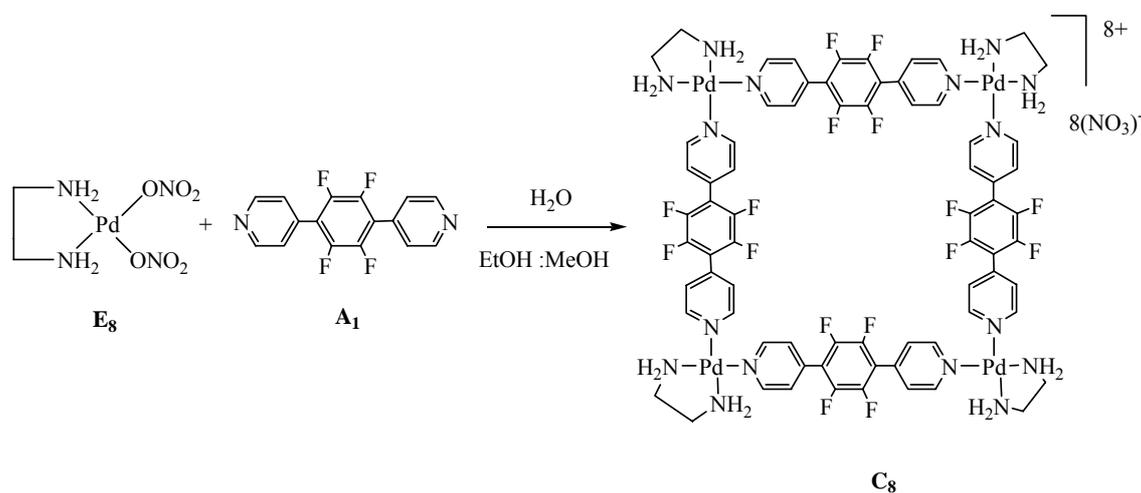
5-2- PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS SUPRAMOLÉCULAS DE Pt Y Pd CON LIGANDO ETILENDIAMINA: ANFITRIONES

Tal y como se ha descrito en el capítulo anterior, el uso de metalociclos con ligandos auxiliares del tipo difosfina no llevó a los resultados esperados en procesos de reconocimiento molecular de moléculas orgánicas ricas en electrones. Por ello, se pensó

en la síntesis de nuevas metalosupramoléculas solubles en agua, cuyas cavidades, además de deficientes en electrones, fueran hidrofóbicas de forma que se favoreciera la interacción con compuestos orgánicos neutros. Para ello, se combinaron las esquinas solubles en agua de tipo I [$M(\text{NO}_3)_2(\text{en})$] con la arista fluorada \mathbf{A}_1 .

5-2-1- Preparación del metalociclo $[\text{Pd}(\text{en})(\mathbf{A}_1)]_4(\text{NO}_3)_8$: \mathbf{C}_8

La combinación del complejo $[\text{Pd}(\text{NO}_3)_2(\text{en})]$ (\mathbf{E}_8) con la arista \mathbf{A}_1 en cantidades equimolares dio lugar a la formación del metalociclo \mathbf{C}_8 (esquema 5-3):



Esquema 5-3: Reacción de obtención del cuadrado molecular \mathbf{C}_8 .

Para realizar la síntesis, se siguió el método general descrito en la bibliografía por Fujita y col.^{15,4,23}. Se disolvió el compuesto esquina $[\text{Pd}(\text{NO}_3)_2(\text{en})]$ en H_2O y se le añadió una suspensión de la arista \mathbf{A}_1 en MeOH-EtOH (1:1) (la arista es poco soluble en disolventes orgánicos a temperatura ambiente). Se dejó la reacción en agitación hasta que se observó que no quedaba compuesto \mathbf{A}_1 en suspensión (4 horas aproximadamente). A continuación, se obtuvo el producto tras la evaporación de los disolventes y se caracterizó por espectroscopia de IR, RMN, espectrometría de masas (ESP(+)) y análisis elemental.

En el espectro de IR se observan las bandas del ligando \mathbf{A}_1 (1619, 1475, 981, 822 cm^{-1}), de la etilendiamina (3437 cm^{-1}) y del ión NO_3^- (1384, 815 cm^{-1}).

El espectro de RMN de ^1H en D_2O (**figura 5-2**) evidencia de forma clara que se forma una especie simétrica, ya que aparecen sólo dos tipos de señales de la piridina y una señal para la etilendiamina. Cabe resaltar que aunque la arista orgánica **A**₁ es insoluble en agua, el espectro de RMN de ^1H del macrociclo sintetizado muestra las señales de los protones α y β de la piridina, lo que indica que la arista ha pasado a formar parte de un nuevo compuesto soluble en agua.

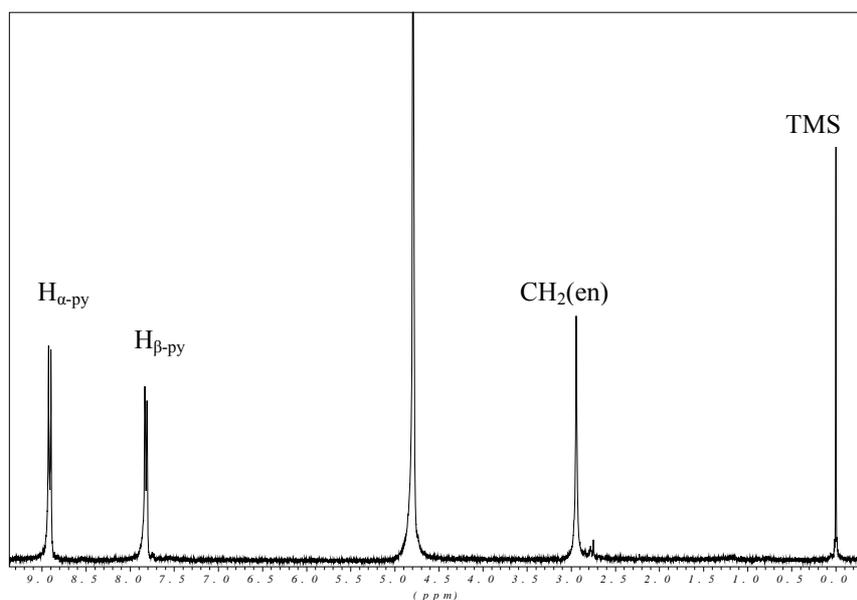


Figura 5-2: Espectro de RMN de ^1H del cuadrado molecular **C**₈.

En el espectro de RMN de ^{19}F , sólo hay una señal que corresponde a los anillos fluorados cuyos átomos de flúor son químicamente equivalentes (**figura 5-3**).

Se hicieron pruebas variando la concentración para detectar posibles equilibrios entre diferentes especies, de forma análoga a lo que ocurre en reacciones donde las esquinas poseen difosfinas (capítulo 4) o en nitrato-compuestos donde la arista es el derivado no fluorado $\text{py-C}_6\text{H}_4\text{-py}$ ¹⁵, pero no se produjo ningún cambio en el espectro, resultado que coincide con el obtenido por Fujita y col. al combinar la arista 4,4'-bipiridina con la misma esquina **E**₈^{15,4,23}.

Gracias a la espectrometría de masas (ESP(+)) se pudo confirmar la naturaleza del metalociclo simétrico formado, ya que se obtuvieron señales que corresponden a pérdidas de grupos NO_3^- : $[\text{C}_8-7(\text{NO}_3)\cdot\text{H}]^{8+}$, $[\text{C}_8-6\text{NO}_3]^{6+}$ y $[\text{C}_8-4\text{NO}_3]^{4+}$.

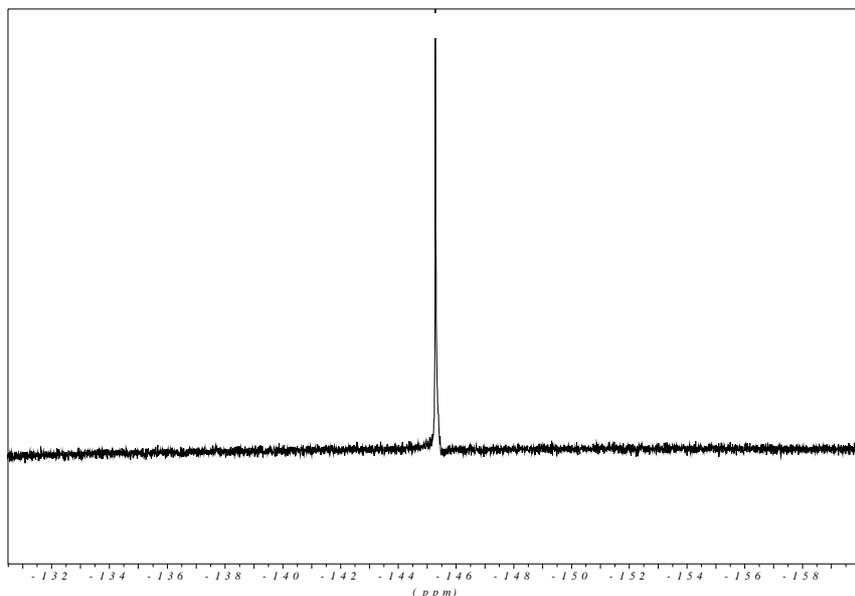
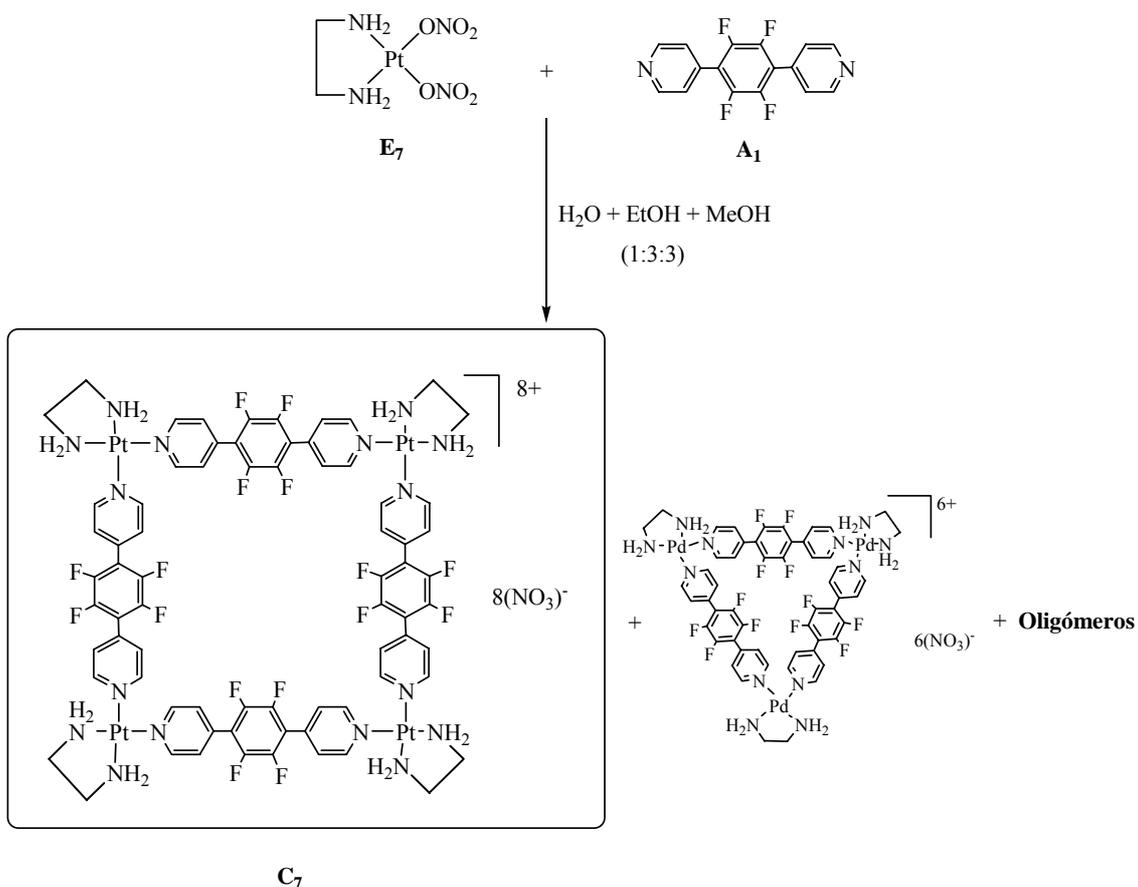


Figura 5-3: Espectro de RMN de ^{19}F del cuadrado molecular C_8 .

5-2-2 Preparación del metalociclo $[\text{Pt}(\text{en})(\text{A}_1)]_4(\text{NO}_3)_8$: C_7

El compuesto análogo de Pt se intentó preparar de forma similar al derivado de Pd que se acaba de describir. Así, se disolvió el $[\text{Pt}(\text{NO}_3)_2(\text{en})]$ (E_7) en H_2O y se añadió una cantidad equimolar de A_1 en suspensión en una mezcla de MeOH-EtOH (1:1). Después de dejar la mezcla de reacción 12h en agitación y a temperatura ambiente, y a pesar de que no se observó la disolución total de la arista en suspensión, se procedió a la filtración de la solución de reacción y el filtrado se concentró a sequedad. Un RMN de ^1H en D_2O del sólido oscuro obtenido (**figura 5-4 (a)**) mostró que no se obtenía una única especie simétrica, sino que además, probablemente, se formaban oligómeros y/o un macrociclo simétrico que podría corresponder al triángulo molecular (**esquema 5-4**). Este resultado está de acuerdo con la mayor dificultad observada de forma general en la obtención de macrociclos de Pt, hecho que se atribuye a la menor labilidad del enlace Pt-N¹⁵.



Esquema 5-4: Reacción de obtención del cuadrado molecular **C₇**.

Con el objetivo de mejorar el rendimiento de la especie macrocíclica y dada la conveniencia de obtener una única especie para realizar los ensayos de reconocimiento molecular, se repitió la reacción en condiciones más enérgicas (24h a reflujo o una semana de reacción a temperatura ambiente), pero no se consiguieron mejorar los resultados, obteniéndose siempre una mezcla de productos (**figura 5-4**). De hecho, tras el reflujo, se observó la precipitación de platino, lo que fue indicativo de que se producía descomposición.

Asimismo, se probó la reacción de autoensamblaje en CH_2Cl_2 , pero sólo se consiguió recuperar los productos de partida inalterados.

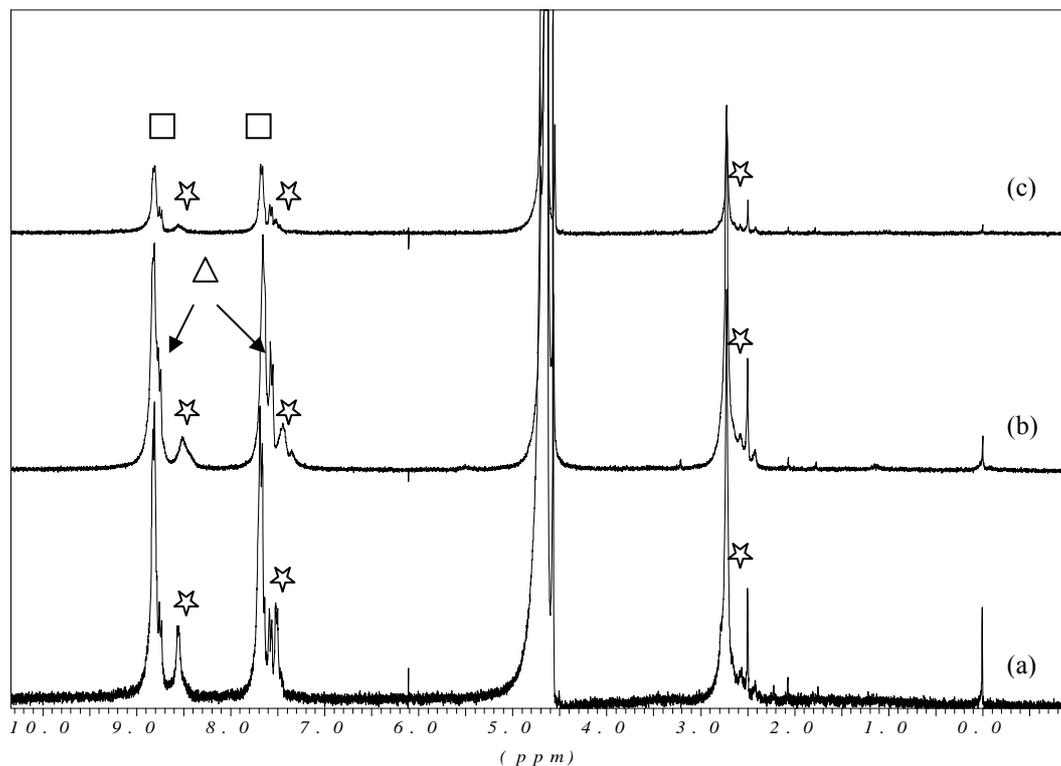


Figura 5-4: Seguimiento de la reacción en solución por RMN de ^1H . (a) Reacción 12h a temperatura ambiente. (b) Reacción 24h a reflujo. (c) Reacción una semana a temperatura ambiente. ☆ oligómeros.

Ya que según la bibliografía¹⁵, un aumento de la polaridad del medio puede favorecer la formación de los macrociclos frente a otras especies, se añadió un exceso de NaNO_3 (1M) a la solución de reacción. El espectro de RMN de ^1H de control en D_2O mostró la desaparición de las señales correspondientes a los oligómeros, quedando únicamente señales asignables a dos especies simétricas (**figura 5-5**).

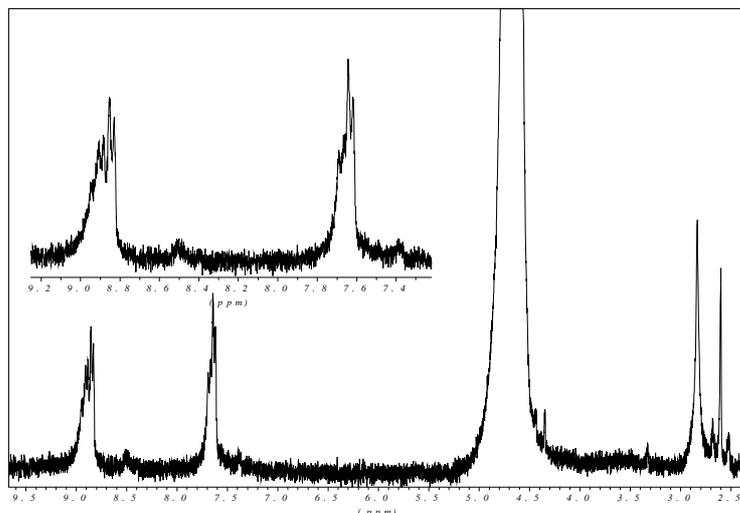


Figura 5-5: Espectro de RMN de ^1H de la solución de reacción en presencia de un exceso de la sal NaNO_3 (1M).

La adición de otras sales como NaClO_4 o KPF_6 , produjo un efecto similar al del NaNO_3 (espectros de RMN similares al de la **figura 5-5**). No obstante, no se pudieron identificar por espectrometría de masas los posibles productos formados en presencia de dichas sales ni tampoco se obtuvieron monocristales, a pesar de los múltiples ensayos.

Durante el transcurso de este trabajo Otera y col.²⁶ describieron la obtención de supramoléculas de Pt, gracias a una reacción realizada en ausencia del disolvente. Por ejemplo, en el caso de la reacción de autoensamblaje entre la esquina $[\text{Pt}(\text{NO}_3)_2(\text{en})]$ (**E7**) y la 4,4'-bipiridina, el tiempo de reacción al mezclar los reactivos a temperatura ambiente en estado sólido se reduce de 4 semanas a 100°C en solución¹⁵ a 10 min²⁶. Por ello en este trabajo, se pensó en intentar la síntesis del compuesto de Pt mezclando directamente el compuesto esquina **E7** y la arista orgánica en un mortero de ágata. El resultado fue sorprendente ya que se obtuvo el cuadrado deseado con alto rendimiento y en un corto espacio de tiempo.

Concretamente, se mezclaron cantidades equimolares de la esquina **E7** y la arista **A1**, en un mortero de ágata y se trituraron para poner en contacto íntimo ambos sólidos. Transcurridos 20 min, la mezcla resultante mostró un evidente cambio en su textura y color (de amarillento a marrón). Para mejorar la conversión de la reacción se aplicó durante 10 min una presión de 500 MPa al residuo obtenido.

La **figura 5-6** muestra los espectros de RMN de ^1H del producto obtenido en estado sólido en comparación con el registrado de la misma reacción en solución (12 horas a temperatura ambiente).

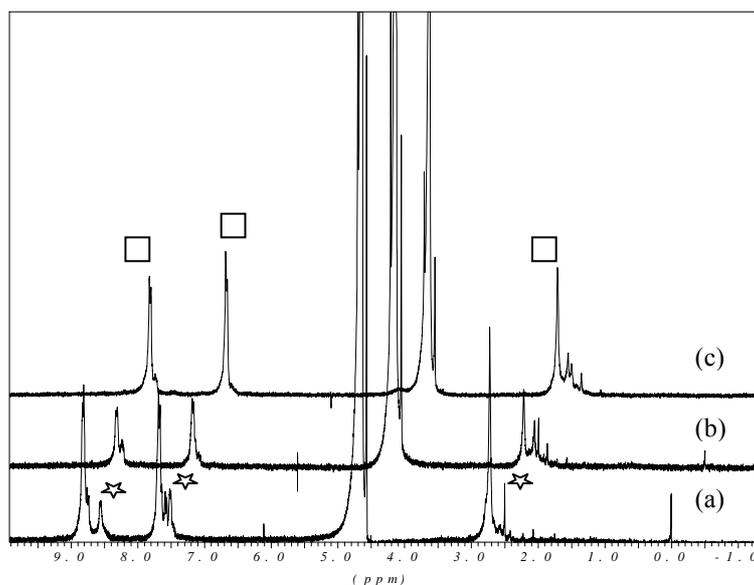


Figura 5-6: a) Reacción en solución, b) RMN de control de la reacción en estado sólido tras triturar la mezcla de reacción 20 min, c) RMN de control de la reacción en estado sólido tras triturar la mezcla de reacción 20 min en el mortero y aplicar presión 10 min. ☆ oligómeros.

El producto obtenido se caracterizó mediante análisis elemental, espectroscopia de IR, RMN multinuclear y espectrometría de masas.

El espectro de IR muestra las señales características de la arista fluorada (1623 , 1478 , 980 , 819 cm^{-1}) y del ión NO_3^- (1384 , 815 cm^{-1}).

El espectro de masas (ESP(+)) muestra picos correspondientes a la formación del cuadrado molecular con pérdidas de NO_3^- : $[\text{C}_7-7\text{NO}_3]^{7+}$, $[\text{C}_7-6\text{NO}_3\cdot\text{H}]^{7+}$, $[\text{C}_7-6\text{NO}_3]^{6+}$ y $[\text{C}_7-3\text{NO}_3\cdot\text{H}]^{4+}$.

Según se ve en la **figura 5-7**, el espectro de RMN de ^1H en D_2O del producto obtenido muestra unas señales muy minoritarias que no se pudieron eliminar por recristalización, y que probablemente corresponden a oligómeros (símbolo ☆ en **figura**

5-7). Por otro lado, la variación de la concentración no llevó a cambios significativos en la relación entre las señales del cuadrado C_7 y los oligómeros.

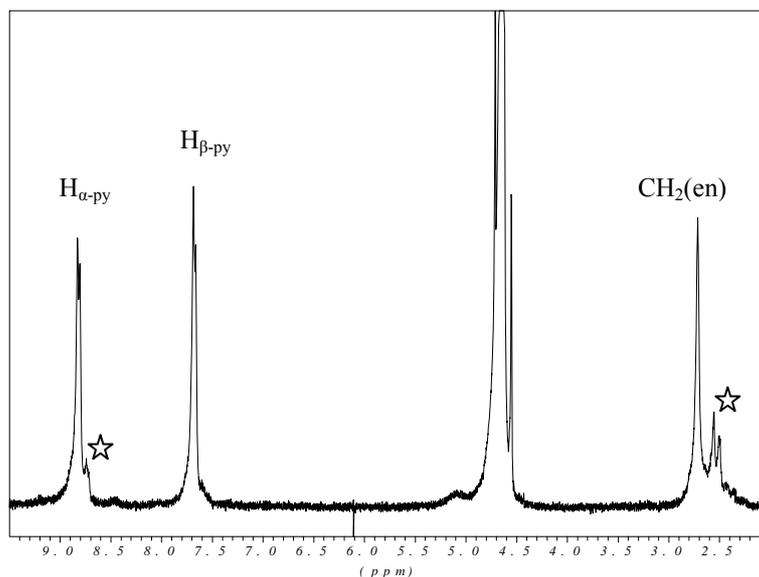


Figura 5-7: Espectro de RMN de ^1H en D_2O del cuadrado C_7 obtenido por reacción en estado sólido.

Tal y como se esperaba, el espectro de RMN de ^{19}F muestra una única señal que corresponde a los 12 átomos de flúor que son químicamente equivalentes.

Tanto para el macrociclo de Pd como el de Pt, no ha sido posible obtener monocristales adecuados para identificar sin ambigüedades la naturaleza de los productos simétricos obtenidos, a pesar de haber utilizado varios contraiones, tales como el ClO_4^- o el PF_6^- , que podían favorecer la cristalización.

5-3- RECONOCIMIENTO MOLECULAR

Una vez sintetizados y caracterizados los cuadrados moleculares del tipo $[M(en)(A_1)]_4(NO_3)_8$ ($M = Pt (C_7)$ o $Pd (C_8)$), se pasó a abordar el estudio de su participación en procesos de reconocimiento molecular.

Los huéspedes elegidos fueron los compuestos orgánicos ricos en electrones que se muestran en la **figura 5-8**.

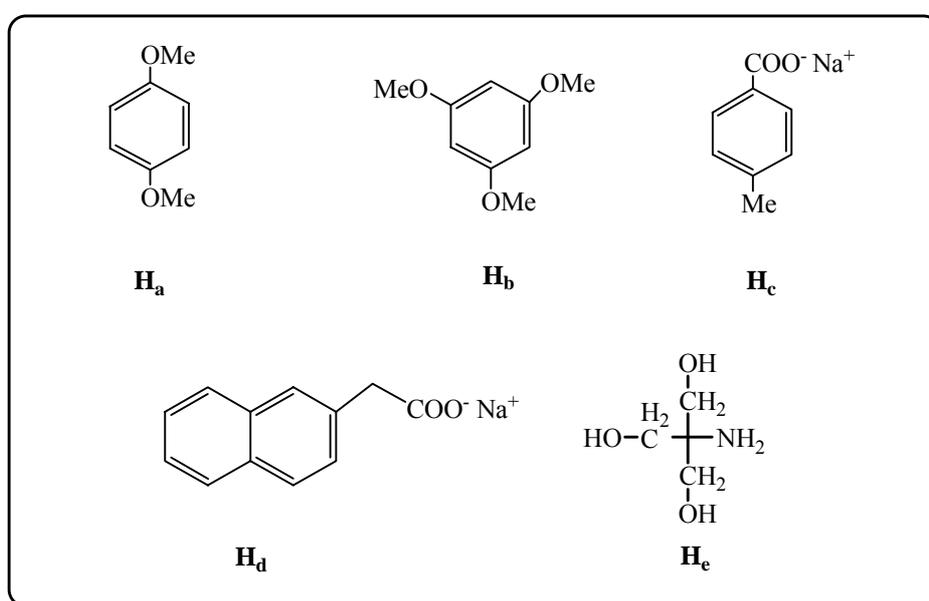


Figura 5-8: Compuestos orgánicos utilizados como huéspedes en estudios de reconocimiento molecular.

Las pruebas preliminares destinadas a detectar posibles interacciones se llevaron a cabo en un tubo de RMN utilizando soluciones en D_2O de anfitrión y de huésped con una concentración de 5mM para ambos ($[anfitrión] = [huésped] = 5 \text{ mM}$). Una hora después de la preparación de las mezclas, se registraron los espectros de RMN de 1H para detectar los posibles cambios en la forma de las señales y/o la variación en los desplazamientos químicos del huésped y/o del anfitrión.

En todos los sistemas huésped-anfitrión ensayados, sólo se observó variación de la forma de las señales de los protones que pertenecen a los huéspedes, así como una

variación de los desplazamientos químicos de dichos protones hacia campos altos (excepto para el huésped H_e). Un efecto similar se observa en sistemas análogos^{5,2,27,28} y se puede atribuir a la encapsulación de los huéspedes dentro de la cavidad del cuadrado molecular, ya que este último se puede considerar como un “canal” debido a la muy probable disposición casi perpendicular de los anillos piridina, tal y como se aprecia en la estructura optimizada del cuadrado molecular C_8 que se llevó a cabo mediante cálculos empleando el campo de fuerzas universal (UFF) con el programa Cerius2 (figura 5-9).

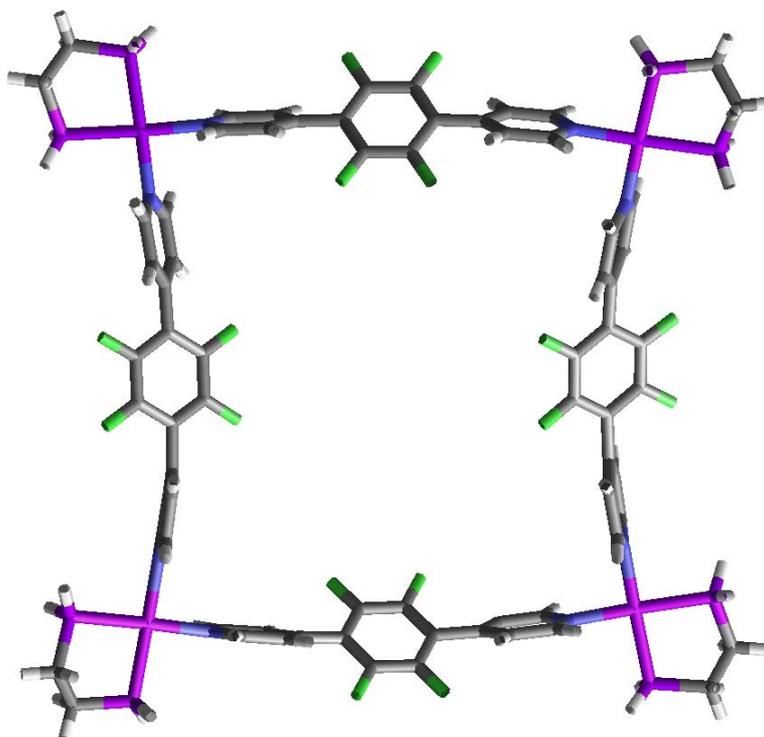


Figura 5-9: Estructura optimizada del cuadrado molecular C_8 (15,27 Å x 15,24 Å) mediante cálculos con el campo de fuerzas universal (UFF) con el programa Cerius2.

La variación de desplazamiento químico observada, se puede atribuir al hecho de que el huésped se encuentra apantallado del campo magnético por los anillos aromáticos del cuadrado y por tanto, sus protones resuenan a campos más altos que cuando se halla fuera de la cavidad²⁸.

5-3-1- Ensayos sobre el sistema C₈:huésped

En la **figura 5-10** se encuentra indicada la variación de los desplazamientos químicos ($\Delta\delta$ en ppm) de cada protón del huésped (el signo negativo indica una variación hacia campos altos).

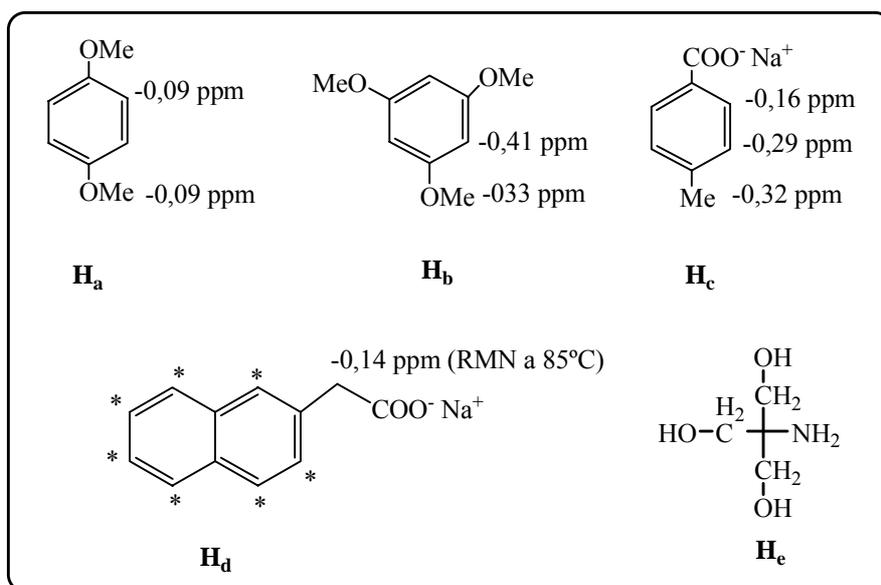


Figura 5-10: Variación del desplazamiento químico de los protones de los huéspedes estudiados en el sistema C₈: H (H = H_a, H_b, H_c, H_d), [C₈] = [H] = 5 mM. (* protones no identificados en el espectro)

Así, los cambios más significativos se registraron para el huésped **H_b** con una variación máxima de -0,41 ppm para los protones aromáticos. Sin embargo, el huésped similar *p*-dimetoxibenceno (**H_a**) sólo mostró una variación del -0,09 ppm para cada uno de sus dos tipos de protones.

En el caso del huésped iónico, 4-metilbenzoato de sodio (**H_c**), el valor de la variación de desplazamiento químico aumenta a medida que los protones se encuentran más alejados del grupo COO⁻ ($\Delta\delta$ = -0,16 ppm para los protones aromáticos α respecto al grupo carboxilato, -0,29 ppm para los protones β y -0,32 ppm para CH₃). Esta tendencia se puede explicar perfectamente por la disposición del huésped dentro de la

cavidad hidrofóbica del anfitrión. Dado que el grupo COO^- es un grupo hidrofílico, se encontraría dirigido hacia la exterior de la cavidad, mientras que el grupo metilo que es hidrofóbico, se dispondría hacia el interior de la cavidad, lo cual se traduce en una variación mayor del desplazamiento químico para el metilo (-0,32 ppm). Un efecto similar se ha observado en estructuras tipo caja descritas por Fujita y col.^{2,6}, susceptibles de interactuar con huéspedes que también poseen simultáneamente grupos hidrofílicos e hidrofóbicos.

En el estudio realizado con la sal sódica del ácido 2-naftilacético (\mathbf{H}_d), se observan señales de RMN de ^1H muy anchas y difíciles de asignar (las señales de los protones aromáticos salen solapadas). Por ello, se realizó un estudio de RMN de ^1H a temperatura variable (entre 5 y 85°C) en D_2O . Para las señales aromáticas no se apreció ninguna mejora, mientras que la señal correspondiente al CH_2 resultó más fina a temperatura alta, con una variación de desplazamiento químico de -0,14 ppm respecto al huésped libre (**figura 5-11**). Por analogía con el huésped aniónico \mathbf{H}_c , el grupo CH_2COO^- , se encontraría dirigido hacia el exterior de la cavidad y por tanto, los protones de CH_2 se ven poco afectados por la interacción con la misma.

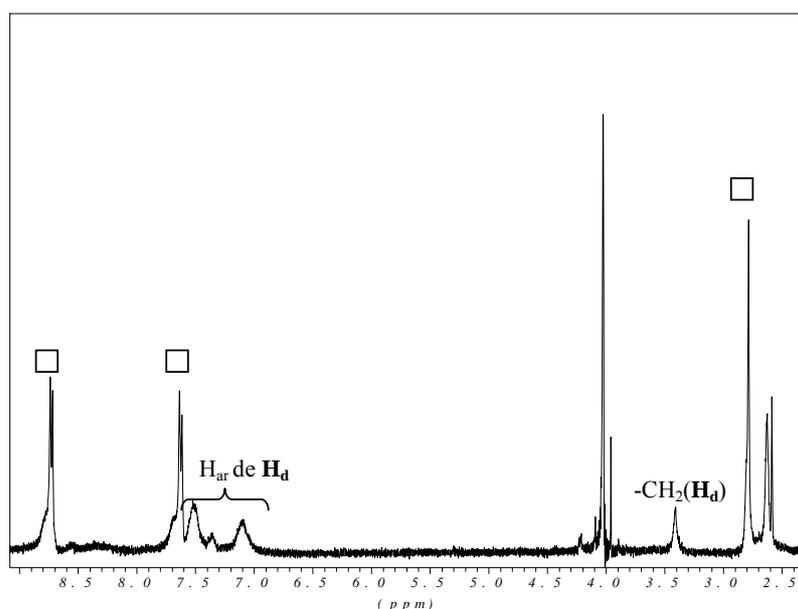


Figura 5-11: Espectro de RMN de ^1H a 358 K del sistema $\text{C}_8:\mathbf{H}_d$ en D_2O ($[\text{C}_8] = [\mathbf{H}_d] = 5 \text{ mM}$).

Una de las interacciones más habituales entre receptores y sustratos se produce gracias a la formación de enlaces de hidrógeno^{7,29}. Como el cuadrado **C**₈ posee enlaces C-F dirigidos hacia el interior de la cavidad (**figura 5-9** de la página 130), se pensó en elegir un huésped capaz de formar enlaces de hidrógeno con los átomos de flúor. Así, se utilizó el compuesto **H**_e ((HOCH₂)₃CNH₂), que posee 4 grupos susceptibles de formar enlaces de hidrógeno. Se preparó una solución del sistema anfitrión-huésped ([anfitrión] = [huésped] = 5 mM) en D₂O a temperatura ambiente y después de 15 min en agitación, la solución de reacción mostró un sólido en suspensión. El espectro de RMN de ¹H (**figura 5-12**) de la solución filtrada mostró las señales del cuadrado, señales debidas a la etilendiamina libre y otra señal a 3,7 ppm que corresponde a un grupo CH₂ (símbolo x de la **figura 5-12**) según se dedujo del espectro de RMN 2D de correlación protón-carbono (gHSQC editado) que se realizó, y que muy probablemente se debe a un compuesto de Pd donde la nueva base **H**_e (pH de su disolución es 9,12) sustituye a la etilendiamina. Así, la adición de tris(hidroximetil)aminometano (**H**_e) provocó la descomposición parcial del cuadrado molecular, liberando la arista insoluble, y muy probablemente la formación de un compuesto de Pd con la nueva base **H**_e.

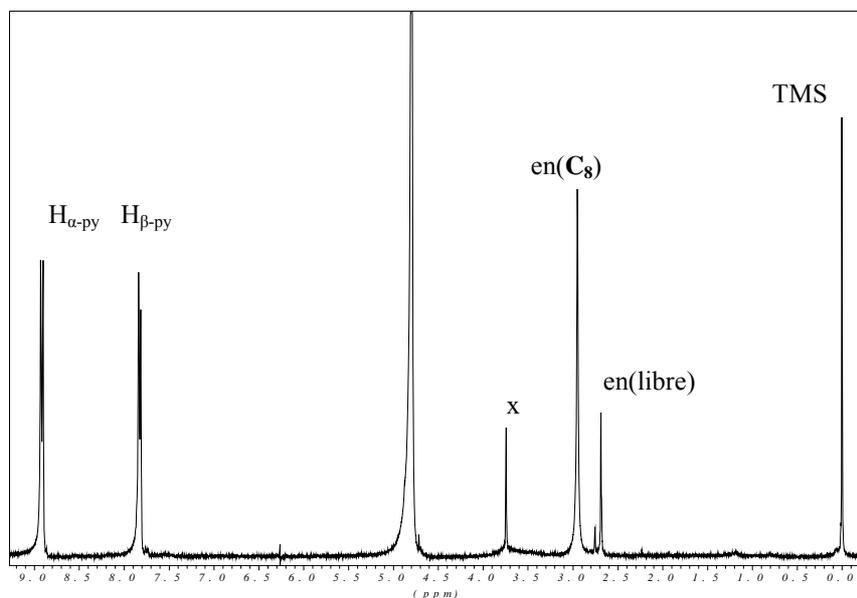


Figura 5-12: Espectro de RMN de ¹H del sistema **C**₈:**H**_e ([**C**₈] = [**H**_e] = 5mM) en D₂O.

5-3-2- Ensayos sobre el sistema C₇:huésped

En el estudio realizado con el cuadrado de Pt (C₇) como anfitrión, se observó una variación en las señales de los protones de los huéspedes utilizados similar a la descrita para el cuadrado de Pd (C₈). Sin embargo, según se observa en la **figura 5-13**, las variaciones de los desplazamientos químicos son menores.

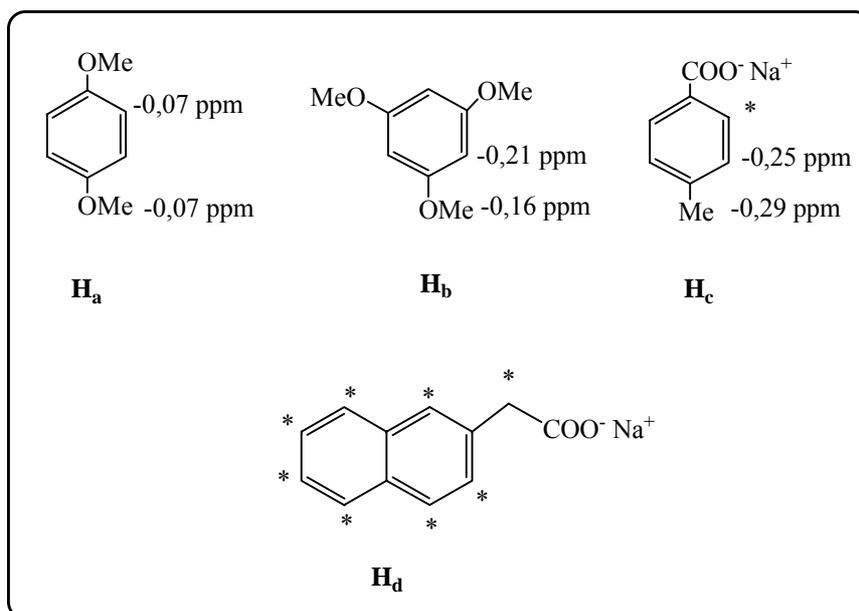


Figura 5-13: Variación del desplazamiento químico de los protones de los huéspedes estudiados en el sistema C₇:H (H = H_a, H_b, H_c y H_d), [C₇] = [H] = 5 mM.

Además, en los experimentos realizados con C₇, los espectros de RMN de ¹H mostraron señales muy anchas para los protones del huésped, en comparación con el sistema C₈:H a la misma concentración (**figura 5-14**). Después de dejar las soluciones durante 24h, no se obtuvo mejora en la resolución de las señales y se observó la formación de un precipitado, que probablemente corresponde al complejo de asociación anfitrión-huésped, que resulta ser insoluble en agua. Este hecho se observó en todos los sistemas anfitrión-huésped estudiados, e incluso en algunos casos se apreció la formación lenta de geles, lo que apoyaría la posibilidad de que exista una asociación importante. Efectos similares se han descrito en la bibliografía para sistemas análogos¹².

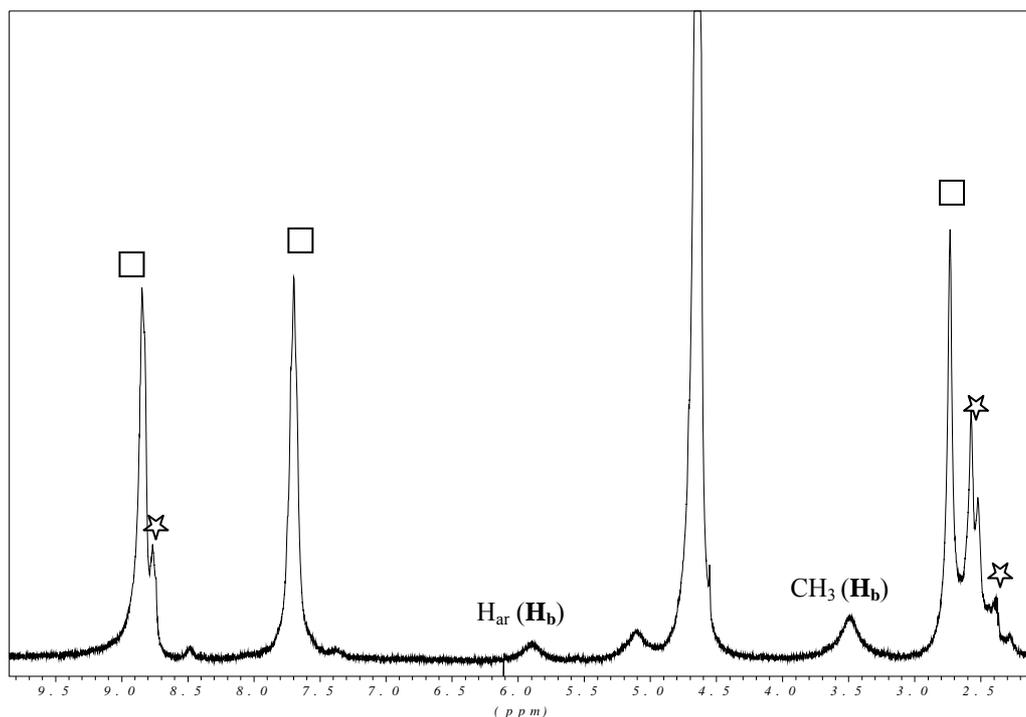


Figura 5-14: Espectro de RMN de ^1H del sistema $\text{C}_7:\text{H}_b$ ($[\text{C}_7] = [\text{H}_b] = 5\text{mM}$) en D_2O

5-3-3- Determinación de la estequiometría de la asociación

El fenómeno de la complejación en química supramolecular puede ser estudiado por varios métodos físicos. Estos métodos ofrecen nuevos conocimientos sobre las funciones supramoleculares y resultan eficaces para diseñar nuevas supramoléculas. Así, la resonancia magnética nuclear, la espectroscopia ultravioleta-visible, medidas de fluorescencia, el dicroísmo circular y la espectroscopia de infrarrojo son métodos espectroscópicos ampliamente utilizados.

Dada la variación observada en los desplazamientos químicos de las moléculas empleadas como huéspedes al interactuar con los macrociclos, pareció apropiado utilizar la resonancia magnética nuclear para el estudio cuantitativo del fenómeno observado. Este se llevó a cabo en los casos en los que se habían obtenido señales finas y una variación suficiente de desplazamiento químico debida a la asociación, es decir para $\text{C}_8:\text{H}$ ($\text{H} = \text{H}_b, \text{H}_c$).

Antes de abordar el estudio de la determinación de la constante de asociación, es primordial la determinación de la estequiometría de la asociación entre el anfitrión y el huésped (1:1, 1:2, 2:1, 1:3,...). Para ello, se utilizó el método de Job (o de la variación continua)³⁰ y el de la relación molar³¹. Estos dos métodos se explican a continuación.

5-3-3-1- Método de Job (o de la variación continua)³⁰

Para un equilibrio (intercambio rápido)³² donde se forma un complejo A_mH_n entre un anfitrión A y un huésped H :



la representación gráfica de la concentración del complejo $[A_mH_n]$ (o cualquier función lineal que dependa de $[A_mH_n]$) en función de x (fracción molar del huésped) da lugar a una curva con un máximo situado a: $\frac{1}{m/n + 1}$, siendo $x = \frac{[H]_t}{[H]_t + [A]_t}$.

Por consiguiente, cuando se trata de una complejación 1:1 el máximo aparece a $x = 0,5$ ($m = n = 1$), en el caso de 1:2 ($m = 1, n = 2$) el máximo está a $x = 0,67$, etc.

Este método, sin embargo, resulta inadecuado para relaciones huésped-anfitrión elevadas ($n \gg m$), debido a que las diferentes estequiometrías poseen valores muy próximos de fracción molar $\{1:4 (x=0,800), 1:5 (x=0,833), 1:6 (x=0,857), \dots\}$, por lo que para estos casos se utiliza preferentemente el método de la relación molar³¹.

Desde un punto de vista experimental se monitoriza la propiedad física de elección (en nuestro caso el desplazamiento químico de los protones del huésped) de una serie de soluciones en las que la concentración molar total es constante ($[A]_t + [H]_t = \text{cte} = M$), mientras la relación $[H]_t/[A]_t$ varía ligeramente. Con este fin, se mezclan diferentes volúmenes de disoluciones de la misma concentración de los dos componentes de manera que el volumen total se mantenga constante.

5-3-3-1-1- Aplicación al sistema $C_8:H$ ($H = H_b, H_c$)

Se prepararon una serie de disoluciones con una concentración total constante de 4 mM ($[C_8] + [H_b] = \text{cte} = 4 \text{ mM}$) pero con diferentes proporciones de anfitrión (C_8) y huésped (H_b), y se registraron los correspondientes espectros de RMN de 1H en D_2O .

La **figura 5-15** muestra la representación del producto de la variación del desplazamiento químico de los protones del huésped $\Delta\delta$ por la fracción molar del mismo ($x(H_b)$) en función de dicha fracción molar. El máximo de la curva se encuentra situado a $x = 0,5$, lo que indica que la estequiometría de asociación para este sistema es 1:1.

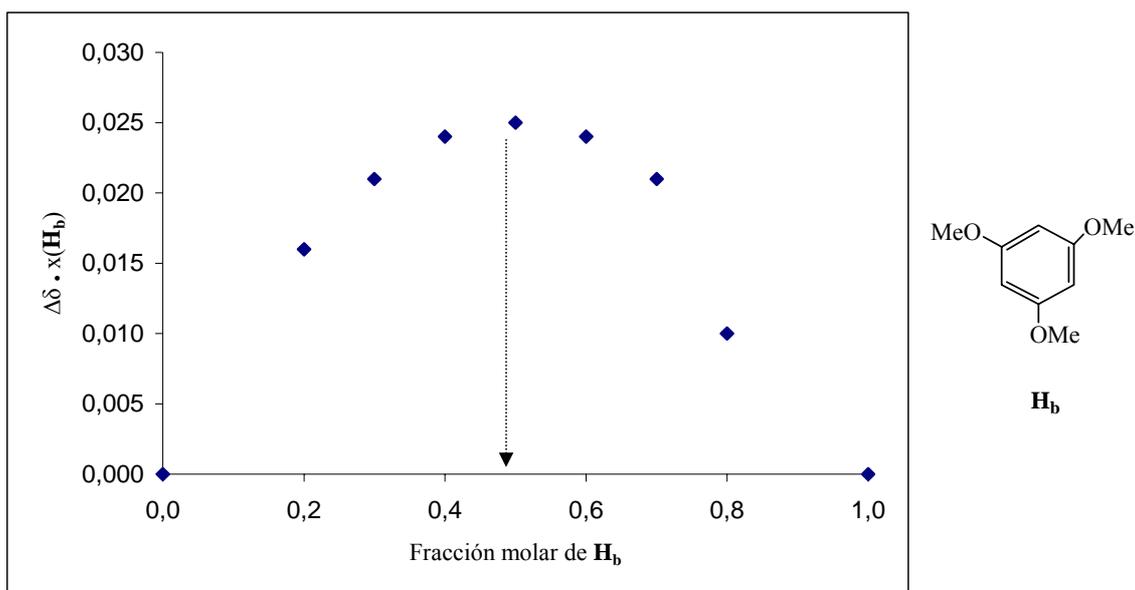


Figura 5-15: Gráfica de Job para el sistema $C_8:H_b$. El máximo de la curva está a $x = 0,5$.

Cuando el mismo estudio se realizó para el huésped H_c , se determinó una estequiometría de asociación 1:2 tal y como se deduce de la gráfica de Job representada en la **figura 5-16** donde el máximo se sitúa a una fracción molar del huésped de 0,67.

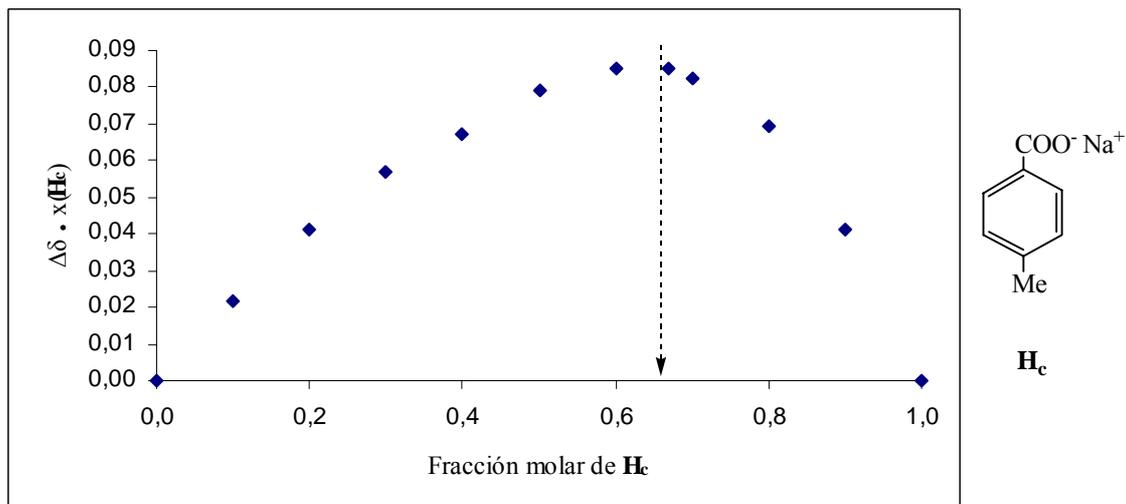


Figura 5-16: Gráfica de Job para el sistema $C_8:H_c$. El máximo de la curva está a $x=0,67$.

5-3-3-2- Método de la relación molar³¹

Para la determinación de la estequiometría de asociación por este método en primer lugar se representa gráficamente la variación de la propiedad física considerada, (la variación del desplazamiento químico), en función de la relación molar $[H]_t/[A]_t$. El valor de esta relación para el que se produce una discontinuidad o cambio notable de la pendiente de la gráfica corresponde a la relación estequiométrica.

Desde un punto de vista experimental, las soluciones que se preparan deben tener una concentración total del anfitrión $[A]_t$ constante, mientras que la concentración total del huésped varía.

5-3-3-2-1- Aplicación al sistema $C_8:H$ ($H = H_b, H_c$)

El método de la relación molar aplicado a los resultados de RMN para especies en régimen de intercambio rápido confirmó los resultados obtenidos por el método de Job para los huéspedes estudiados H_b y H_c .

En la **figura 5-17** se representan los valores del desplazamiento químico del grupo metilo de **H_b** (δ_{Me}) en función de la relación molar $[H_b]/[C_8]$.

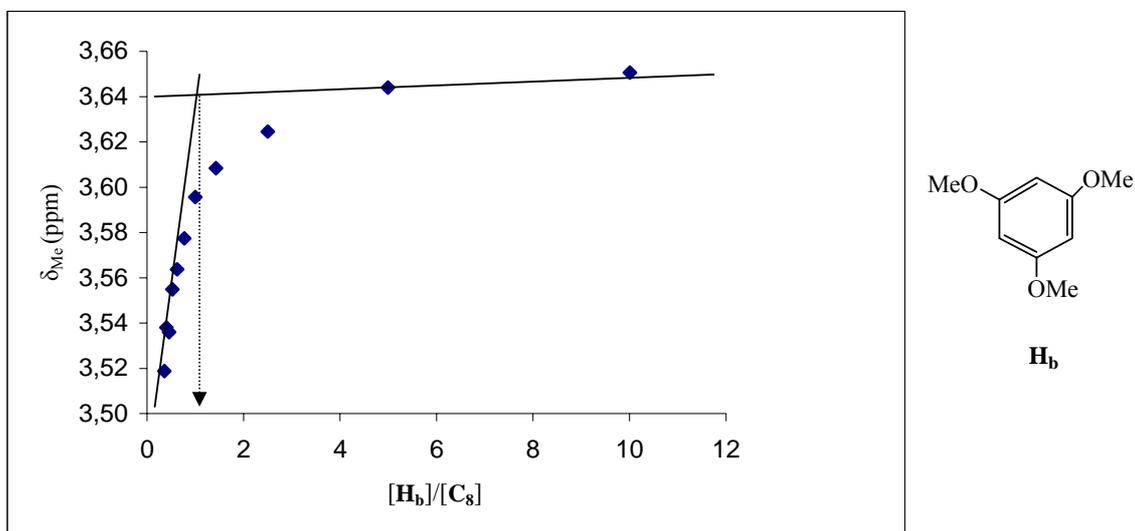


Figura 5-17: Representación gráfica del desplazamiento químico δ_{Me} en función de $[H_b]/[C_8]$ (método de la relación molar).

Tal y como se muestra a partir de la extrapolación de las partes lineales, se pudo determinar la relación de complejación (punto de intersección), que corresponde a la formación de la especie $C_8:H_b$ y por tanto la estequiometría de asociación resulta ser 1:1.

El mismo método se utilizó para confirmar la formación de la especie $C_8:(H_c)_2$. Así, el resultado obtenido se muestra en la **figura 5-18**, donde se aprecia que la intersección de las extrapolaciones de las partes lineales de la curva indica que se trata de una estequiometría 1:2 ($[H_c]/[C_8] = 2$).

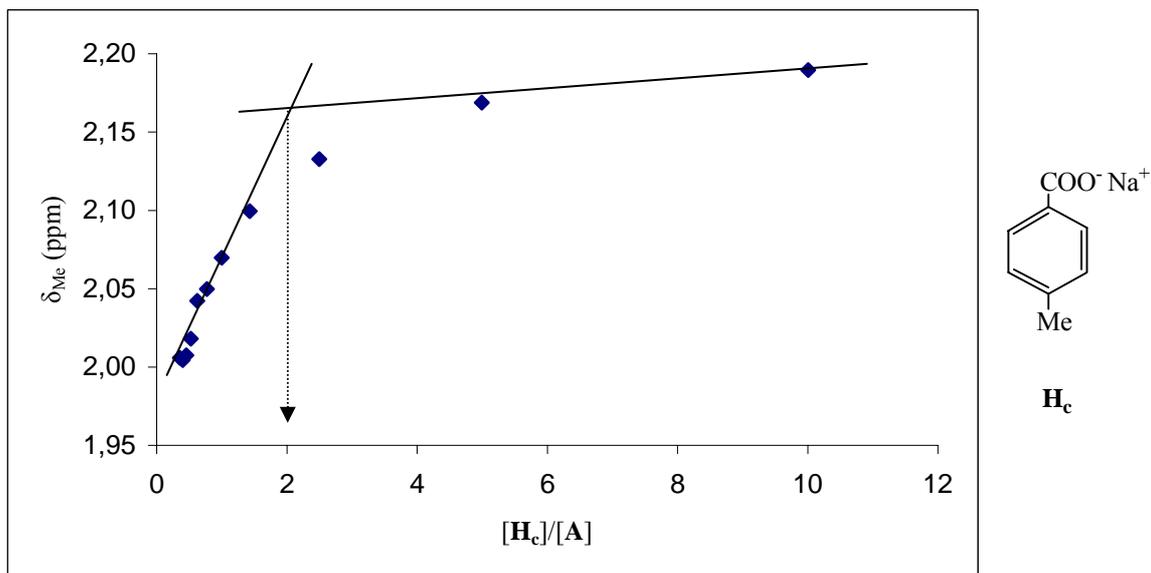


Figura 5-18: Representación gráfica del desplazamiento químico $\delta_{\text{H}}(\text{Me})$ en función de $[\text{H}_c]/[\text{C}_8]$ (método de la relación molar)

5-3-4- Determinación de la constante de asociación K

Si se considera el equilibrio de asociación siguiente:



El valor de la constante de asociación se expresa como sigue:

$$K = \frac{[\text{AH}]}{[\text{A}] \times [\text{H}]} \quad (2)$$

Donde $[\text{A}]$, $[\text{H}]$ y $[\text{AH}]$ son las concentraciones en el equilibrio para **A**, **H** y el complejo **AH** respectivamente.

El desplazamiento químico de **H** varía al formar el complejo **AH** y cuando existe un intercambio rápido entre **H** y **AH**, el desplazamiento químico observado se puede expresar de acuerdo con la ecuación (3):

$$\delta_{\text{obs}} = x_{\text{H}} \delta_{\text{H}} + x_{\text{AH}} \delta_{\text{AH}} \quad (3)$$

Donde:

$\delta_{\mathbf{H}}$ = desplazamiento químico de \mathbf{H} libre

$\delta_{\mathbf{AH}}$ = desplazamiento químico de \mathbf{H} en el complejo

x = fracción molar, de forma que $x_{\mathbf{H}} + x_{\mathbf{AH}} = 1$

Así, δ_{obs} se puede escribir como:

$$\delta_{\text{obs}} = \delta_{\mathbf{H}} + \frac{[\mathbf{AH}]}{[\mathbf{A}] + [\mathbf{AH}]} (\delta_{\mathbf{AH}} - \delta_{\mathbf{H}}) \quad (4)$$

Si las concentraciones totales de \mathbf{A} y \mathbf{H} son $[\mathbf{A}]_t$ y $[\mathbf{H}]_t$:

$$[\mathbf{A}]_t = [\mathbf{A}] + [\mathbf{AH}] \quad (5)$$

$$[\mathbf{H}]_t = [\mathbf{H}] + [\mathbf{AH}] \quad (6)$$

A partir de la ecuación (4) y la ecuación (5), se obtiene:

$$[\mathbf{AH}] = \frac{[\mathbf{H}]_t (\delta_{\text{obs}} - \delta_{\mathbf{H}})}{(\delta_{\mathbf{AH}} - \delta_{\mathbf{H}})} = [\mathbf{H}]_t \left(\frac{\Delta\delta_{\text{obs}}}{\Delta\delta_{\text{max}}} \right) \quad (7)$$

Por otro lado, la ecuación (2) se puede escribir utilizando $[\mathbf{A}]_t$ y $[\mathbf{H}]_t$ de forma que:

$$K = \frac{[\mathbf{AH}]}{([\mathbf{A}]_t - [\mathbf{AH}])([\mathbf{H}]_t - [\mathbf{AH}])} \quad (8)$$

Y finalmente se obtiene:

$$K = \frac{[\mathbf{AH}]}{[\mathbf{A}]_t [\mathbf{H}]_t - [\mathbf{AH}]([\mathbf{A}]_t + [\mathbf{H}]_t) + [\mathbf{AH}]^2} \quad (9)$$

La ecuación 9 se puede reorganizar para dar:

$$[\mathbf{AH}]^2 - \left([\mathbf{A}]_t + [\mathbf{H}]_t + \frac{1}{K} \right) [\mathbf{AH}] + [\mathbf{A}]_t [\mathbf{H}]_t = 0 \quad (10)$$

De modo que $[\mathbf{AH}]$ se obtiene de solucionar la ecuación 10.

$$[\mathbf{AH}] = \frac{[\mathbf{A}]_t + [\mathbf{H}]_t + \frac{1}{K} + \sqrt{\left([\mathbf{A}]_t + [\mathbf{H}]_t + \frac{1}{K} \right)^2 - 4[\mathbf{A}]_t [\mathbf{H}]_t}}{2} \quad (11)$$

Sustituyendo el valor de $[\mathbf{AH}]$ hallado en la ecuación (11) dentro de la ecuación (7) se obtiene una expresión para la diferencia de desplazamiento observado $\Delta\delta_{\text{obs}}$ en función de $[\mathbf{A}]_t$, $[\mathbf{H}]_t$, K y $\Delta\delta_{\text{max}}$ ($\Delta\delta_{\text{max}}$ corresponde a la variación de desplazamiento químico máximo del huésped cuando la complejación es completa).

$$\Delta\delta_{\text{obs}} = \frac{\Delta\delta_{\text{max}}}{2[\mathbf{H}]_t} \left\{ [\mathbf{A}]_t + [\mathbf{H}]_t + \frac{1}{K} - \sqrt{\left([\mathbf{A}]_t + [\mathbf{H}]_t + \frac{1}{K}\right)^2 - 4[\mathbf{A}]_t[\mathbf{H}]_t} \right\} \quad (12)$$

Las valoraciones experimentales facilitan una serie de datos ($[\mathbf{H}]_t$, $[\mathbf{A}]_t$ y $\Delta\delta_{\text{obs}}$) mientras que los parámetros incógnita de la ecuación (12) son K y $\Delta\delta_{\text{max}}$. Estos se determinan mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados.

En el caso de que la asociación sea del tipo 1:2, se han de tener en cuenta dos ecuaciones de equilibrio (13 y 14).



Entonces las constantes de asociación se expresan como:

$$K_1 = \frac{[\mathbf{AH}]}{[\mathbf{A}] \times [\mathbf{H}]} \quad (15)$$

$$K_2 = \frac{[\mathbf{AH}_2]}{[\mathbf{AH}] \times [\mathbf{H}]} \quad (16)$$

\mathbf{AH} = anfitrión con un huésped asociado

\mathbf{AH}_2 = anfitrión con dos huéspedes asociados

Entonces, el desplazamiento químico observado para el huésped resulta ser:

$$\delta_{\text{obs}} = x_{\mathbf{H}} \delta_{\mathbf{H}} + x_{\mathbf{AH}} \delta_{\mathbf{AH}} + x_{\mathbf{AH}_2} \delta_{\mathbf{AH}_2} \quad (17)$$

Y las concentraciones totales de \mathbf{A} y \mathbf{H} :

$$[\mathbf{A}]_t = [\mathbf{A}] + [\mathbf{AH}] + [\mathbf{AH}_2] \quad (18)$$

$$[\mathbf{H}]_t = [\mathbf{H}] + [\mathbf{AH}] + [\mathbf{AH}_2] \quad (19)$$

Estimaciones iniciales de K_1 , K_2 , y el uso de programas de cálculo por ordenador permiten la determinación de las constantes de asociación K_1 y K_2 y los desplazamientos correspondientes a los complejos $[AH]$ y $[AH_2]$.

Para el cálculo de las incógnitas, se han utilizado dos programas: ChemEqui³³ (Estimation of stability constants and related quantities from different techniques) y WinEQNMR³⁴ (A program for the calculation of equilibrium constants from NMR chemical shift data).

5-3-4-1-Aplicación al sistema $C_8:H$ ($H = H_b, H_c$)

Se prepara una solución de huésped en un tubo de RMN (500 μ l, 2 mM), y se registra su espectro de RMN de 1H para determinar el desplazamiento químico del huésped libre (δ_{libre}). A continuación se añaden alícuotas (10 μ l inicialmente, luego 20 – 30 μ l) de una solución más concentrada del anfitrión (10 mM). Después de cada nueva adición se registra el espectro de RMN de 1H y se obtienen aproximadamente 11 datos experimentales. La formación del complejo implica una variación en el desplazamiento químico de los protones del huésped. Una vez se detecta que los valores de desplazamientos químicos resultan prácticamente constantes (normalmente después de la adición de 5 a 10 equivalentes del valorante C_8), se para la adición.

Así, para hallar el valor de la constante de asociación correspondiente a $C_8:H_b$, se realizaron valoraciones mediante RMN en agua deuterada a 298K. La adición progresiva del anfitrión C_8 sobre una solución del huésped H_b (2 mM, D_2O), da lugar a variaciones de los desplazamientos químicos de los protones del huésped H_b hacia campos altos (variación hasta 0,13 ppm (Me) y 0,16 ppm (H_{ar})) y además se observa un ensanchamiento de las bandas (**figura 5-19**). Este último efecto, que se produce como consecuencia de la complejación, está también relacionado con la influencia del metal sobre el tiempo de relajación de los protones del huésped.

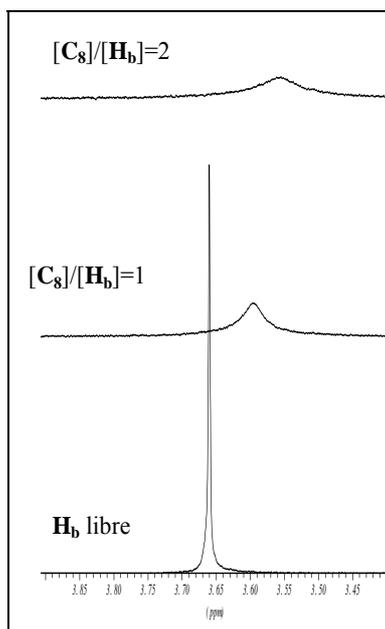


Figura 5-19: Evolución de la señal del Me (H_b) durante la valoración con C_8 .

En la **tabla 5-1**, se encuentran los datos experimentales de la valoración del huésped H_b con el anfitrión C_8 .

Volumen de C_8 (μ l)	$[C_8]_0$ (mM)	$[H_b]_0$ (mM)	δ_{Me} (ppm)	$\Delta\delta_{Me}$ (Hz)
0	-	2,000	3,660	-
10	0,196	1,961	3,646	3,50
20	0,385	1,923	3,637	5,75
40	0,741	1,852	3,624	9,00
70	1,228	1,754	3,607	13,26
100	1,667	1,667	3,591	17,26
130	2,063	1,587	3,576	21,01
160	2,424	1,515	3,563	24,26
190	2,754	1,449	3,551	27,26
220	3,055	1,389	3,534	31,52

Tabla 5-1: Concentraciones iniciales del huésped H_b y del anfitrión C_8 y la variación de desplazamiento químico ($\Delta\delta_{Me} = \Delta\delta_{obs}$) correspondiente a cada volumen añadido de la disolución de C_8 .

La aplicación de los programas de ajuste a estos datos tiene como resultado una serie de valores cuya concordancia con los datos experimentales se muestra en la curva de la **figura 5-20**. Como se puede observar, ésta muestra una buena correspondencia entre los datos observados y los valores calculados.

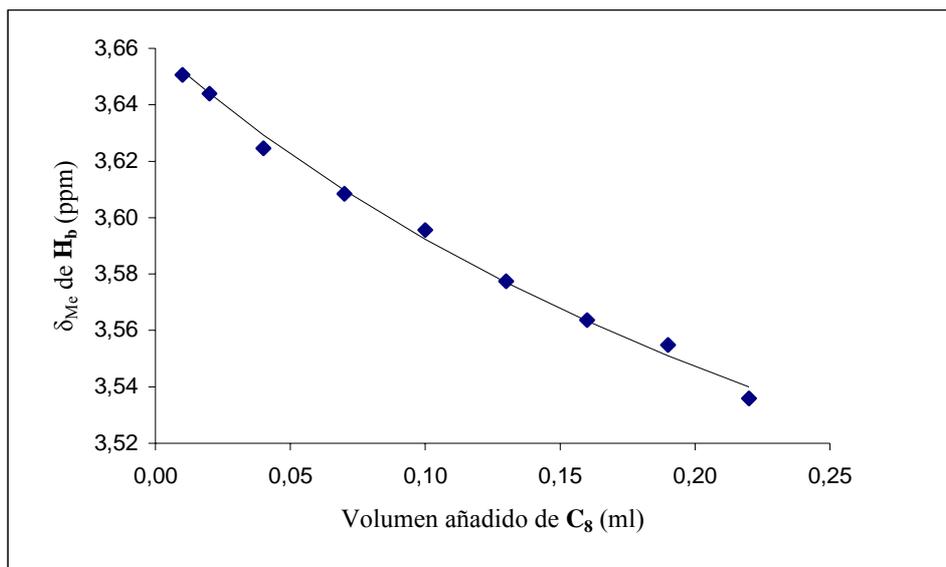


Figura 5-20: Valoración por RMN de ^1H . Valores de desplazamiento químico del protón del metilo de H_b ($[\text{H}_b]_0 = 2 \text{ mM}$) en función del volumen de la disolución de C_8 añadido. La línea continua corresponde a la curva del ajuste calculada mediante mínimos cuadrados con el programa ChemEqui.

El valor que resulta para la constante de asociación mediante los dos programas de cálculo utilizados es de $K = 38 \text{ M}^{-1}$ (error $<10\%$), considerablemente inferior al calculado por Fujita para el cuadrado resultante del autoensamblaje entre la arista 4,4'-bipiridina y la esquina E_8 y el huésped H_b ($K = 750 \text{ M}^{-1}$)¹⁵. Este resultado podría atribuirse al gran tamaño relativo de la cavidad ($15,27\text{Å} \times 15,24\text{Å}$, **figura 5-9** de la página 130) respecto al huésped, en comparación con el cuadrado de Fujita^{35,36} cuyas aristas poseen un anillo aromático menos.

Del mismo modo, para obtener información sobre las constantes de asociación que caracterizan al autoensamblaje $\text{C}_8:(\text{H}_c)_2$, se llevaron a cabo valoraciones mediante RMN de ^1H en D_2O y a 298K. Se obtuvieron variaciones de los desplazamientos químicos de

los protones del huésped H_c (variación hasta 0,22 ppm para el protón del Me) hacia campos altos (**figura 5-21**).

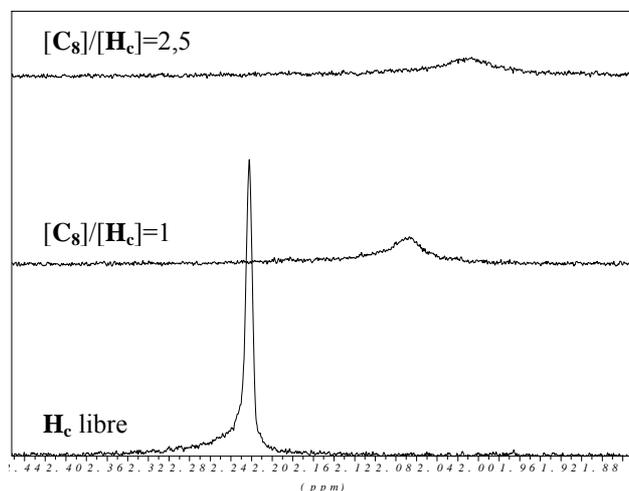


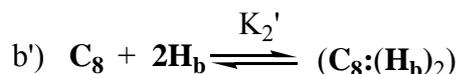
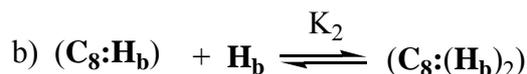
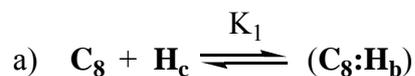
Figura 5-21: Evolución de la señal del Me (H_c) durante la valoración con C_8 .

En la **tabla 5-2**, se encuentran los datos experimentales de la valoración del huésped H_c con el anfitrión C_8 .

Volumen de C_8 (μ l)	$[C_8]_0$ (mM)	$[H_c]_0$ (mM)	δ_{Me} (ppm)	$\Delta\delta_{Me}$ (Hz)
0	-	2	2,222	-
10	0,196	1,961	2,189	8,25
20	0,385	1,923	2,166	14,01
40	0,741	1,852	2,131	22,76
70	1,228	1,754	2,099	30,76
100	1,667	1,667	2,068	38,52
130	2,063	1,587	2,049	43,27
160	2,424	1,515	2,041	45,27
190	2,754	1,449	2,018	51,03
220	3,055	1,389	2,007	52,78
250	3,333	1,333	1,999	55,78

Tabla 5-2: Concentraciones iniciales del huésped H_c y del anfitrión C_8 y la variación de desplazamiento químico ($\Delta\delta_{Me} = \Delta\delta_{obs}$) correspondiente a cada volumen añadido de la disolución de C_8 .

En este caso, los cálculos realizados se basan sobre la hipótesis del establecimiento de dos equilibrios consecutivos en solución (a y b):



La gráfica de la **figura 5-22** muestra la buena correspondencia entre los datos observados y los valores calculados.

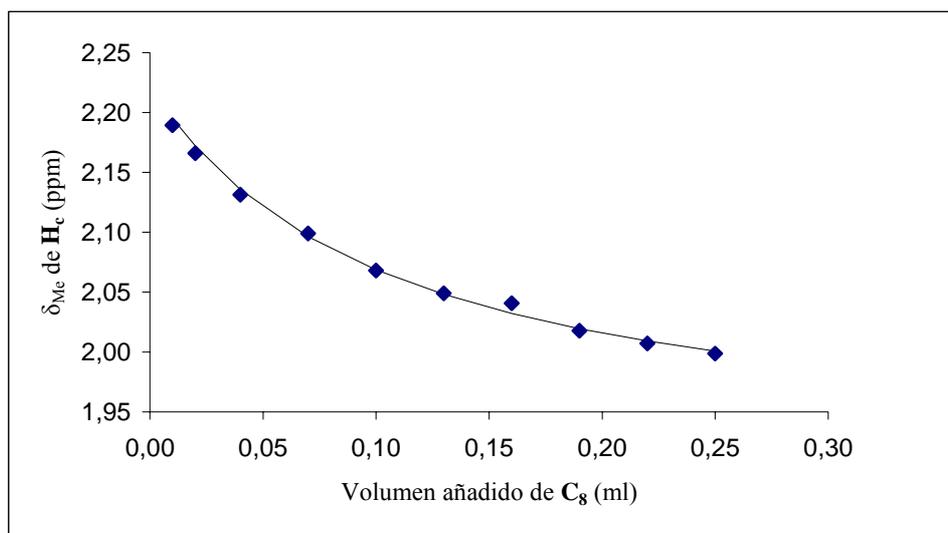


Figura 5-22: Valoración por RMN de ¹H. Valores de desplazamiento químico del protón del metilo de **H_c** (**[H_c]₀** = 2 mM) en función del volumen de la disolución de **C₈** añadido. La línea continua corresponde a la curva del ajuste calculado mediante mínimos cuadrados mediante el programa ChemEqui.

Los valores calculados mediante el programa ChemEqui resultan ser $K_1 = 42 \text{ M}^{-1}$ (error < 30%) y $K_2' = 73282 \text{ M}^{-2}$ (error < 1%). El valor de K_2 se deduce a partir de K_1 y K_2' y resulta ser de 1746 M^{-1} . El valor de K_2 es superior que el valor de K_1 , lo que

indica muy probablemente que el complejo $C_8:H_c$ aún posee espacio en su cavidad, y su estabilidad aumenta al incorporar una molécula adicional de huésped. Un efecto similar se ha descrito en la bibliografía para otros sistemas^{37,38}.

Lamentablemente, no se pudieron realizar los mismos estudios para los otros huéspedes con el anfitrión C_8 , ya que o bien presentaron una variación insuficiente de los desplazamientos químicos (H_a) o bien se obtuvieron espectros de gran complejidad (H_d).

5-4-ESTUDIO BIOLÓGICO

5-4-1- Introducción

Debido al conocido papel determinante del DNA en la replicación celular y la transmisión genética, los ácidos nucleicos son generalmente el primer objetivo en el estudio de la acción de los fármacos. Se conocen muchos compuestos capaces de interactuar con el DNA: los que modifican covalentemente las bases, los que son capaces de introducirse entre las cadenas del DNA o producen uniones anormales, los antimetabolitos, los inhibidores de precursores de nucleótidos, o los inhibidores de enzimas como las topoisomerasas, necesarias para los cambios conformacionales que requiere el DNA en su replicación³⁹.

Los compuestos metálicos pueden unirse al DNA de diversas formas. El *cis*-diamminodicloroplatino (II) (conocido como cisplatino o CDP, *cis*-DDP, etc) es el ejemplo mejor estudiado. Dicha asociación se produce mediante la coordinación del átomo de Pt a las posiciones N₇ de las bases guanina y adenina. Este compuesto es uno de los fármacos más utilizados actualmente en quimioterapia, y fue descubierto casualmente por Rosemberg y col.⁴⁰ en la década de los 60. En 1972 se iniciaron los primeros ensayos clínicos en humanos, y en 1978 se probó el empleo clínico del fármaco en EE.UU., y más tarde en Europa y Japón. El cisplatino es muy efectivo en el tratamiento de cáncer testicular y de ovarios, así como en el tratamiento de carcinomas cervicales, broncogénicos y orofaríngeos, linfoma, osteoblastoma y neuroblastoma, entre otros. Sin embargo, su uso está limitado por algunos factores: espectro relativamente estrecho de tumores contra los que presenta actividad, solubilidad limitada en medio acuoso, efectos secundarios⁴¹, desarrollo de mecanismos de resistencia que presentan algunos tumores después del tratamiento inicial⁴², etc.

Dadas las limitaciones del cisplatino, el reto desde los años 80 ha consistido en encontrar nuevos fármacos con actividad antitumoral parecida o superior y que, a su vez, presenten menor toxicidad y un espectro más amplio de aplicaciones. De esta forma, han surgido los llamados derivados de segunda y tercera generación.

Antes de abordar los diferentes modos de unión que pueden tener los complejos metálicos y el DNA, es importante acercarse a la estructura del mismo.

5-4-2- Aspectos estructurales del DNA

El DNA (ácido desoxirribonucleico) es un polímero de nucleótidos que consta de dos cadenas unidas entre sí a través de las bases nitrogenadas orientadas antiparalelamente formando una doble hélice. Los nucleótidos se unen entre sí mediante un enlace éster entre el ión fosfato y la desoxirribosa. Las bases nitrogenadas son derivadas de anillos púricos o pirimidínicos y se unen a través de puentes de hidrógeno de forma complementaria, de tal manera que la adenina siempre se une a la timina y la guanina a la citosina.

Podemos hablar de tres niveles estructurales en el DNA: la estructura primaria, la secundaria y la terciaria. La secuencia de nucleótidos posee individualidad y constituye lo que se conoce como estructura primaria. La estructura secundaria se refiere al plegamiento regular del DNA y la estructura terciaria, o superenrollamiento, se refiere al plegamiento de orden superior de los elementos de la estructura secundaria⁴³.

El DNA puede existir en diferentes conformaciones (A, B, C, Z,...) según sea la estructura secundaria (**figura 5-23**), las cuales están determinadas por tres factores principales: el apilamiento de las bases, los enlaces de hidrógeno y la repulsión entre los grupos fosfato. Estas conformaciones son interconvertibles y su estabilidad depende de factores como la secuencia primaria, la humedad, la fuerza iónica, el pH, etc, generando una estructura secundaria dinámica^{44,45}.

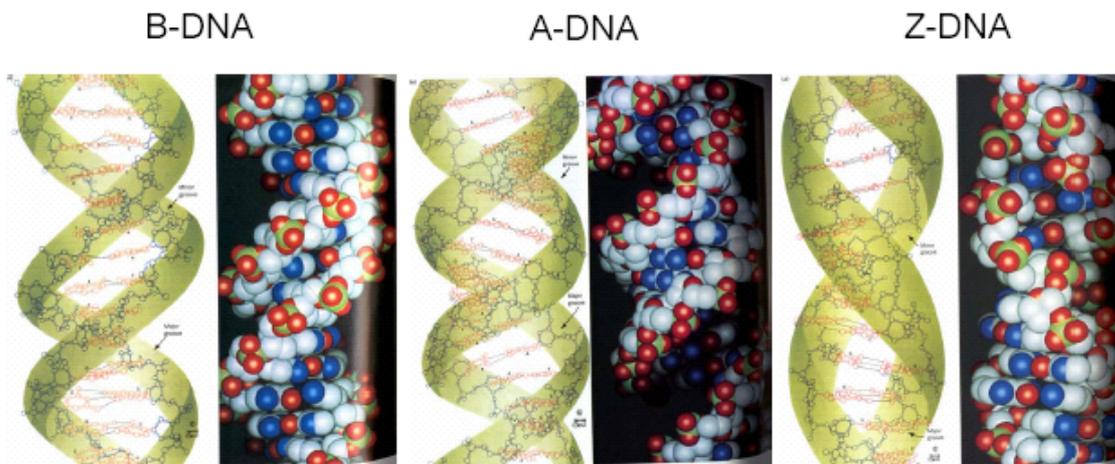


Figura 5-23: Conformaciones A, B y Z del DNA

La forma más común en el medio biológico es la B y consiste en una doble hélice dextrógira con los fosfatos orientados hacia el exterior y las bases nitrogenadas hacia el interior apiladas y aparejadas por enlaces de hidrógeno. El eje de la hélice está casi en el centro de gravedad ya que la unión de la desoxirribosa con el fosfato se hace a través de la posición C2' del azúcar.

La forma C es muy similar a la forma B, de tal manera que se puede decir que pertenece a la familia de la forma B pero presenta un menor empaquetamiento.

La forma A es también una hélice dextrógira y se encuentra en medios biológicos donde la humedad se ha reducido por debajo del 75%. En este caso, el eje de la hélice está inclinado 20° respecto al centro de gravedad puesto que la unión al fosfato se produce a través del C3' del azúcar.

La forma Z es una hélice levógira en forma de zig-zag, más estrecha que las otras formas y presenta las bases púricas y pirimidínicas alternadas. La unión entre fosfato y el azúcar se produce a través del C3'.

5-4-3- Modos de interacción complejo/DNA

Los posibles modos de unión de los complejos metálicos con el DNA, se indican a continuación (**figura 5-24**):

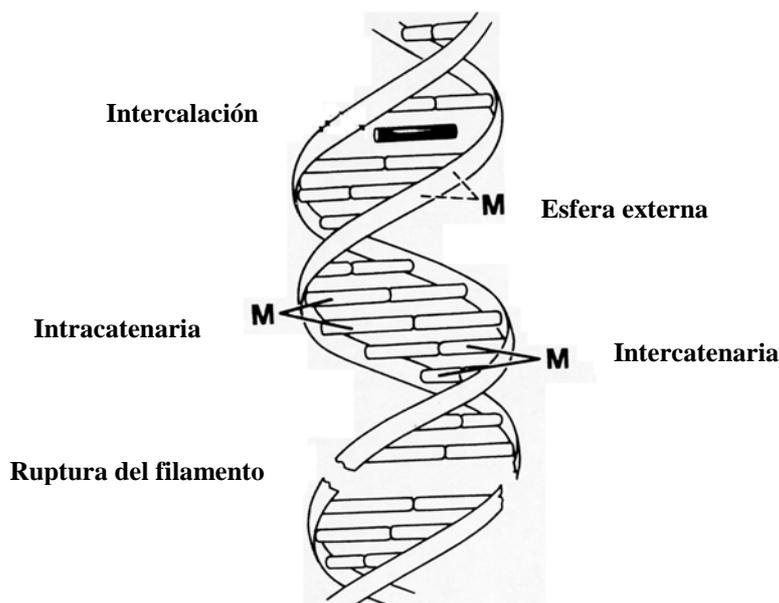


Figura 5-24: Representación esquemática de los modos de interacción de los complejos metálicos con el DNA.

- **Interacción mediante enlace covalente** con las bases nitrogenadas, principalmente con la guanina y en menor proporción con la adenina. En el caso de ser bifuncional, esta unión se puede establecer entre bases de una misma cadena (intracatenaria) o de cadenas diferentes (intercadenaria). Esta unión es típica de los complejos de platino y en particular del cisplatino.

- **Interacción de esfera externa:** son uniones de tipo electrostático entre los grupos fosfato del DNA y el complejo.

- **Ruptura de la cadena:** el complejo produce la ruptura de un enlace covalente, normalmente la unión entre el azúcar y el fosfato o las uniones C-C dentro del azúcar.

- **Intercalación:** se produce una inserción del compuesto entre dos pares de bases vecinas, estableciéndose una interacción de tipo no-covalente. Dicha interacción fue sugerida por primera vez por Lerman⁴⁶ en la descripción de la unión del DNA a varias moléculas aromáticas planas y grandes constituidas por anillos aromáticos condensados^{47,48,49}. Sin embargo, es también bien conocida la capacidad intercaladora de algunos complejos metálicos⁵⁰. La **figura 5-25** muestra diversos complejos de Pt y Pd que se han descrito en la bibliografía como intercaladores.

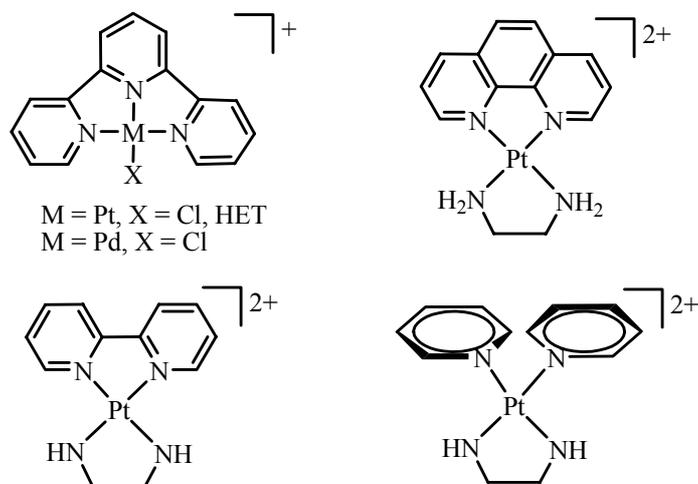


Figura 5-25: Ejemplos de complejos de platino o paladio con ligandos aromáticos estudiados como intercaladores.

La estructura cristalina que se muestra en la **figura 5-26**, ilustra de forma clara como el complejo de Pt $[Pt(terpy)(HET)]^+$ {terpy = 2,2',2''-terpiridina y HET = 2-hidroxietanotiolato} se intercala entre las bases del dinucleótido dCpG⁵¹.

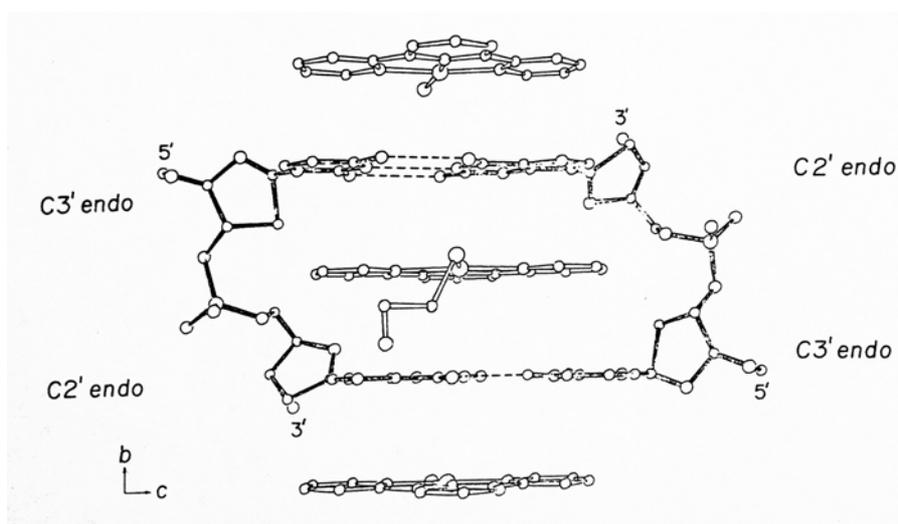


Figura 5-26: Vista parcial del diagrama ORTEP del aducto formado entre dos unidades dCpG y el complejo $[Pt(terpy)(HET)]^+$

Los complejos metálicos que se asocian al DNA por intercalación se denominan, metalintercaladores, y lo hacen a través de diversas interacciones tales como π - π stacking o electrostáticas. Como resultado, las propiedades físicas del DNA se ven modificadas de forma que la inserción del cromóforo plano estabiliza, alarga, fija y desenrolla la doble hélice^{46,52,53,54}.

Dadas las características estructurales de los macrociclos sintetizados en este trabajo (Pd o Pt, ligandos lábiles nitrógeno dadores, anillos aromáticos, estructura plana), pareció interesante investigar su capacidad de interactuar con el DNA. Debido a que en el medio biológico el agua es el disolvente por excelencia, sólo se llevó a cabo el estudio con los metalociclos derivados de la etilendiamina (**C₇** y **C₈** de la **figura 5-27**) por ser los únicos solubles en este disolvente.

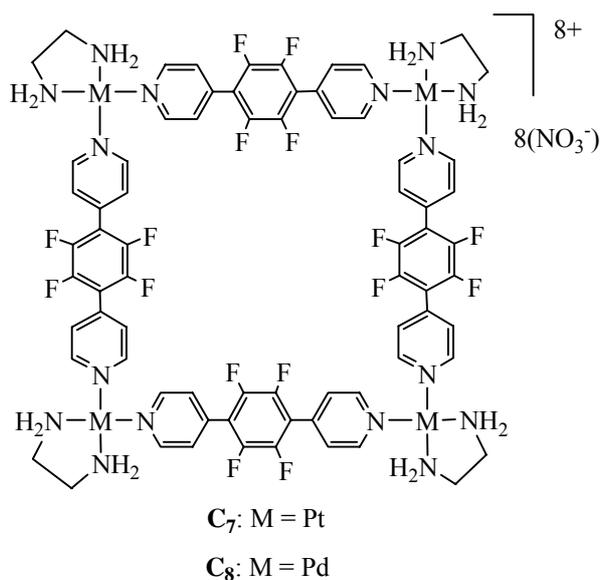


Figura 5-27: Macrociclos utilizados en el estudio biológico

Para ello, se llevaron a cabo estudios de dicroísmo circular, electroforesis y microscopía de fuerzas atómicas. Después de comprobar que existía interacción se estudio la actividad antiproliferativa del derivado de Pt (**C₇**). Este estudio fue llevado a cabo por la Dra. Julia Lorenzo Rivera del Institut de Biotecnologia i Biomedicina (IBB) de la Universitat Autònoma de Barcelona.

5-4-4 Estudios de la interacción de los macrociclos con el DNA

5-4-4-1- Estudio por dicroísmo circular

La técnica de dicroísmo circular se basa en la interacción de la luz polarizada con moléculas ópticamente activas y mide la relación, respecto a la longitud de onda, de la diferencia de absorción de la luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda⁵⁵.

En los espectros, se representa la elipticidad molar (θ), frente a la longitud de onda, de forma que θ se relaciona con los coeficientes de extinción molar para las ondas polarizadas hacia la derecha (ϵ_r) y hacia la izquierda (ϵ_l) según:

$$\theta = \frac{\Delta\epsilon}{10 \times c \times l}$$

Donde:

θ = elipticidad molar (grados \times cm² \times dmol⁻¹)

$\Delta\epsilon = \epsilon_r - \epsilon_l$ (mgrados)

c = molaridad de la solución

l = camino óptico (cm)

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en los intervalos comprendidos entre 250-350 nm (ultravioleta próximo) y 180-250 nm (ultravioleta lejano) de la radiación electromagnética, porque estas son las regiones que corresponden a las transiciones electrónicas del esqueleto de los péptidos, cadenas laterales de las proteínas y las bases nitrogenadas del DNA.

La aplicación de esta técnica a los ácidos nucleicos permite establecer una correlación entre el espectro que observamos y la conformación de la biomolécula (cambio en la estructura secundaria del DNA)⁵⁶, debido a que es muy sensible a los pequeños cambios de orientación de las bases que pueden provocar tanto la apertura como el enrollamiento de la doble hélice⁵⁷. No obstante, no proporciona información sobre la estructura absoluta del polinucleótido.

Así, cada una de las conformaciones del DNA presenta un espectro de dicroísmo circular característico⁴⁴, tal y como se muestra en la **figura 5-28**.

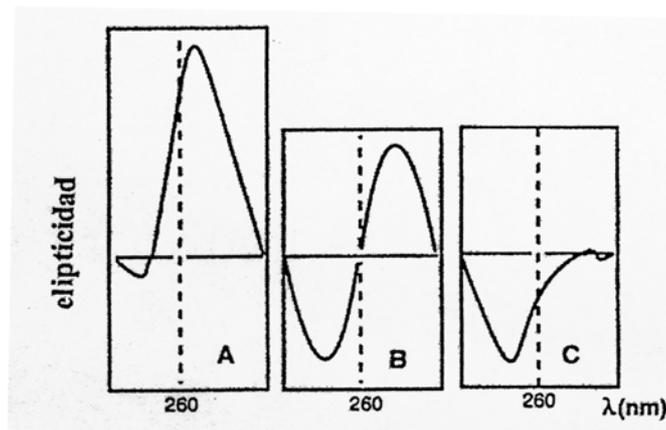


Figura 5-28: Espectros de DC de las formas A, B y C del DNA.

5-4-4-1-1- Resultados y discusión

El DNA utilizado en los experimentos realizados ha sido el de *Calf Thymus* cuya conformación en solución es la B.

La preparación de las muestras se describe en el capítulo 7. Se utilizaron tres razones molares del metalomacrocielo $r_i = 0,1, 0,3$ y $0,5$, para poder observar la modificación que tiene lugar en función de la concentración. Los tiempos de incubación fueron todos de 24h a una temperatura de 37°C.

a- Metalocielo **C₈**:

En la **figura 5-29** se muestran los espectros de DC del metalocielo de Pd **C₈**.

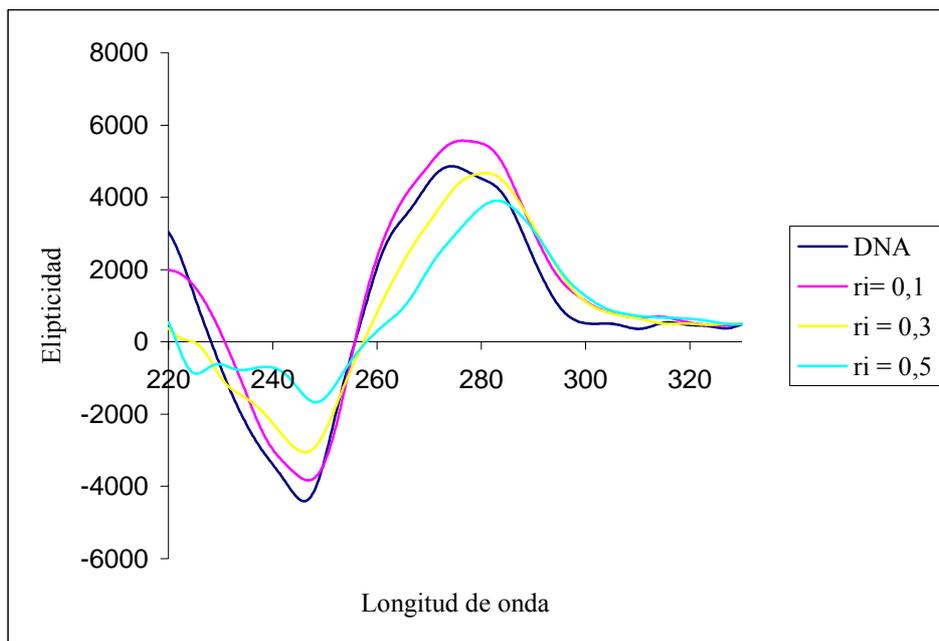


Figura 5-29: Espectros de DC del DNA de *calf Thymus* incubado con el metalociclo de Pd (C_8).

En presencia del metalociclo de Pd (C_8), se aprecia una clara modificación en los espectros a medida que aumenta r_i , lo cual demuestra que la perturbación en la molécula de DNA se debe al metalociclo. Se observa como la elipticidad disminuye tanto en la banda positiva como en la negativa a medida que la concentración del metalociclo aumenta (**tabla 5-3**). Se ha descrito que la disminución de la elipticidad de la banda positiva es indicativa de una transformación de la forma B a la C del DNA. Este cambio está producido por un desenrollamiento de la hélice debido a una rotación de las bases cuando el compuesto se une al DNA ^{44,58-60}.

Compuestos	r_i	θ_{\max}^a	$\lambda_{\max}(\text{nm})$	θ_{\min}^a	$\lambda_{\min}(\text{nm})$
DNA	--	4850	274	-4480	245
$C_8(\text{Pd})\text{-DNA}$	0,1	5570	276	-3830	246
	0,3	4670	280	-3050	246
	0,5	3900	283	-1670	248

Tabla 5-3: Valores de elipticidad y longitud de onda para el máximo y mínimo de los espectros de DC de DNA incubado con $C_8(\text{Pd})$

b- Metalociclo C_7 :

En la **figura 5-30** se muestran los espectros de DC del metalociclo de Pt (C_7).

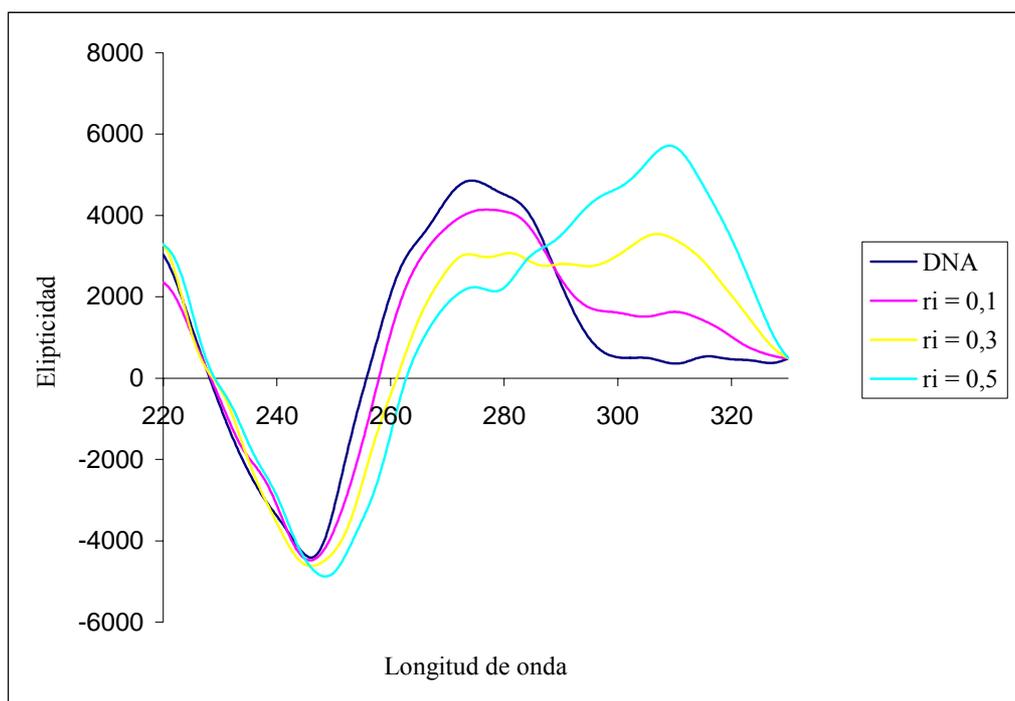


Figura 5-30: Espectros de DC del DNA de *Calf Thymus* incubado con el metalociclo de Pt (C_7).

Compuestos	r_i	$\theta_{\max 1}$	$\lambda_{\max 1}(\text{nm})$	θ_{\min}	$\lambda_{\min}(\text{nm})$	$\theta_{\max 2}$	$\lambda_{\max 2}(\text{nm})$
DNA	--	4850	274	-4500	245	-	-
$C_7(\text{Pt})\text{-DNA}$	0,1	4140	276	-4480	245	1630	310
	0,3	3030	273	-4620	246	3540	307
	0,5	2230	275	-4880	248	5720	309

Tabla 5-4: Valores de elipticidad y longitud de onda para el máximo y mínimo de los espectros de DC de DNA incubado con $C_7(\text{Pt})$

Tal y como se observa en la **figura 5-30** y en la **tabla 5-4**, en presencia del metalociclo C_7 los espectros muestran un aspecto diferente al descrito para el derivado de paladio, ya que se ven dos bandas positivas, una a 270 nm y otra a 310 nm aproximadamente y otra negativa alrededor de 250 nm. A medida que la concentración del compuesto aumenta, la elipticidad de la primera banda positiva disminuye, mientras que la elipticidad de la segunda banda positiva aumenta. La elipticidad de la banda negativa aumenta ligeramente a medida que se incrementa la concentración. Un efecto similar se ha observado en el sistema DNA/[Pt(terpy)(CH₃)]Cl⁶¹, donde las bandas inducidas en el espectro de CD se producen tras el acoplamiento entre el momento de dipolar de la transición de las nucleobases y del fragmento aromático del ligando, lo que es indicativo de la existencia de una interacción intercaladora entre el complejo de Pt(II) y la doble hélice del ácido nucleico⁶².

5-4-4-2- Estudio por electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel es uno de los métodos más usuales para estudiar el DNA. Como el DNA es una macromolécula cargada negativamente, esta se somete a un campo eléctrico de dirección y fuerza constantes de forma que se produce una migración diferencial de las moléculas o fragmentos de DNA en función de dos factores fundamentales: el tamaño y el grado de superenrollamiento.

Para nuestros estudios de electroforesis se ha utilizado gel de agarosa y DNA plásmido pBR322. Los plásmidos se definen como material genético extracromosómico

que aparece en bacterias⁶³. Este tipo de DNA presenta una medida fija (4,36 Kbp) y las moléculas se pueden encontrar mayoritariamente en dos formas: la forma circular covalentemente cerrada (CCC o forma I), que presenta un cierto número de vueltas superhelicoidales, y la forma circular abierta (OC o forma II) que es la forma relajada⁶⁴. Junto a estas dos formas, de las cuales el mayor porcentaje es de CCC, suele aparecer una tercera forma muy minoritaria que es la forma lineal o forma III (**figura 5-31**).

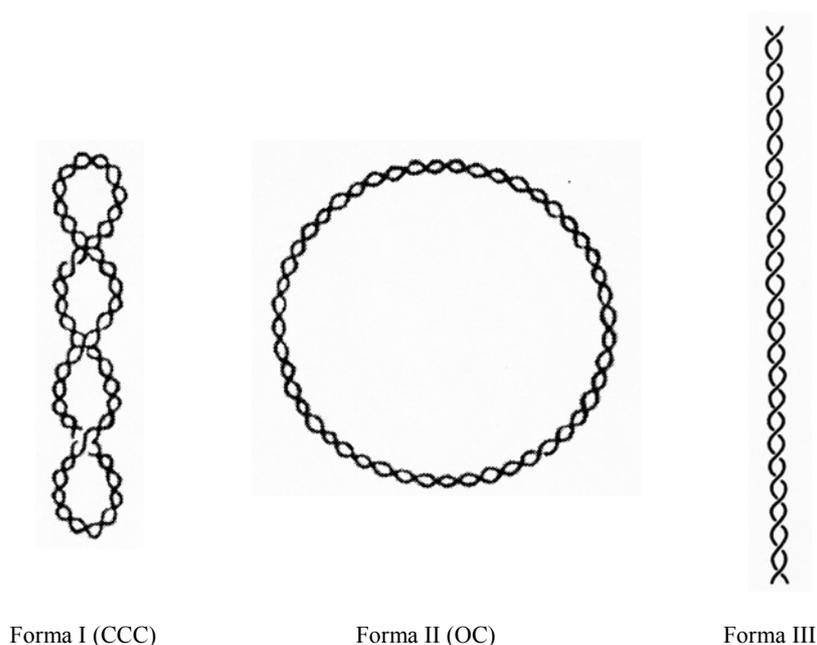


Figura 5-31: Representación esquemática de las formas del DNA estudiado.

La velocidad de migración depende de muchos factores como la diferencia de potencial aplicada, el tampón usado, la proporción de agarosa en el gel, el tamaño del DNA, el número de vueltas superhelicoidales, etc. Sin embargo, para unas condiciones fijadas, la velocidad de migración pasa a depender únicamente del número de vueltas superhelicoidales, de modo que cuantas más vueltas, más compacta es la estructura, lo cual aumenta su movilidad. Así pues, la forma CCC (forma I) migra más rápido que la OC (forma II)^{55,66}. Esto quiere decir que, en principio, se pueden observar dos marcas, una correspondiente a cada una de las dos formas mayoritarias del DNA. La forma III (lineal) no se suele observar por ser muy minoritaria o porque frecuentemente corre junto a la CCC⁶⁷.

Los complejos metálicos pueden provocar tanto una disminución del superenrollamiento como una compactación del DNA. Por tanto, se espera una variación en la movilidad electroforética de las diferentes formas, y como consecuencia, esta técnica permite evaluar las modificaciones en la estructura terciaria del DNA provocadas por dichos complejos⁶⁸.

5-4-4-2-1- Resultados y discusión

Se han estudiado los cambios producidos en la movilidad electroforética del DNA plásmido por los metalociclos de Pt (**C₇**) y de Pd (**C₈**) incubados durante 24h a 37°C y a una $r_i = 0,1$ y $0,3$ para todos ellos. Para poder evaluar la modificación causada por los metalociclos sobre la movilidad electroforética del plásmido incubado en las mismas condiciones se ha realizado un control negativo (plásmido solo).

En la **figura 5-32** se muestran los resultados obtenidos. Las fotografías se presentan de manera que la migración de las diferentes formas que puede adoptar el DNA se produce desde la parte superior a la parte inferior de la imagen. La última calle (6) corresponde a un marcador que contiene diferentes fragmentos de DNA lineal de tamaños diversos. Siempre la primera señal corresponde a la forma OC, y la segunda a la CCC.

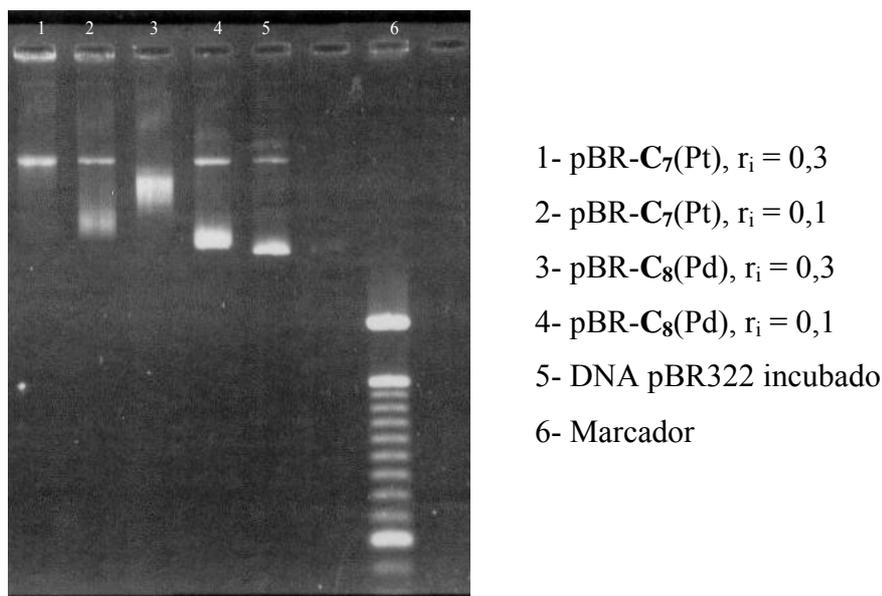


Figura 5-32: Patrón de movilidad electroforética del DNA incubado con los metalociclos

Tal y como se ve en la **figura 5-32**, los dos metalociclos provocan cambios apreciables en la estructura terciaria del plásmido y, por tanto, son capaces de modificar la movilidad electroforética del pBR322. El metalociclo de Pd a razón molar 0,1 (calle 4) provoca un ligero retraso en la movilidad electroforética de la forma CCC. En cambio a $r_i = 0,3$ (calle 3) la forma CCC migra a la misma velocidad que la OC, de modo que se ve una sola banda ancha intermedia entre las dos formas, lo que indica que la forma CCC ha sufrido un desenrollamiento y sufre un retraso a la hora de migrar mientras que la forma OC parece que al interactuar con el metalociclo de Pd, aumenta su movilidad. Este efecto es similar al encontrado para el cisplatino, el cual interacciona de forma *cis*-bifuncional provocando la torsión en la doble hélice, originando micropliegues locales y por consiguiente, compactación. Este hecho sugiere que en este caso la interacción no es puramente intercalativa, tal y como parecen indicar también los estudios de dicroísmo circular.

En el caso del metalociclo de Pt (C_7), a concentración baja, se observa un efecto similar al encontrado para el metalociclo de Pd, es decir un retraso en la migración de la forma CCC. Por el contrario a concentración alta, sólo aparece una banda que

corresponde a la forma OC, lo que indica que toda la forma CCC ha sufrido un desenrollamiento completo. Dado que la unión intercalativa provoca un grado de desenrollamiento de la superhélice mayor que el que se produce en una unión covalente *cis*-bifuncional⁶⁶, este resultado coincide con el obtenido en dicroísmo circular, que apunta hacia una interacción de tipo intercalativo para C₇.

5-4-4-3- Estudio por microscopía de fuerzas atómicas (AFM)

La microscopía de fuerzas atómicas (AFM) es una de las técnicas de la familia de microscopía de sonda próxima (que incluye la microscopía del efecto túnel) que actúa como un perfilómetro nanométrico y determina la topografía de una superficie con una resolución atómica.

En esta técnica, una punta recorre la superficie de la muestra (como si se tratara de la aguja de un tocadiscos) y mide los desplazamientos que se ve obligada a realizar manteniendo una fuerza constante; de esta manera, construye una imagen a partir de las diferentes alturas que presentan los componentes de la muestra observada.

Usando un microscopio de fuerzas atómicas comercial, en 1992 Bustamante y col. pudieron publicar la primera imagen creíble de DNA plásmido con una resolución similar a la de un microscopio electrónico convencional⁶⁹. Posteriormente se publicaron imágenes similares a las obtenidas por Bustamante (Hansman y col., Henderson, Lyubchenko y col., etc)^{70,71}. Esto es posible gracias a la utilización de un sustrato como la mica y la presencia en los tampones utilizados de cationes divalentes como el Mg²⁺, que incrementan la adhesión de DNA al sustrato de mica⁷².

Dentro de toda la familia de técnicas que recoge el AFM, las mejores imágenes de DNA plásmido se han obtenido gracias al modo TMAFM (tapping mode atomic force microscopy), en el cual, el contacto entre la punta y la muestra es intermitente y débil, minimizando las fuerzas laterales de manera que las muestras apenas se ven dañadas ni arrastradas⁷³. Se trata de una técnica potente para la investigación de estructuras biológicas que puede actuar en interfase aire-sólido y líquido-sólido, revelando el relieve topográfico real⁷⁴.

Se han realizado numerosos estudios de AFM sobre las modificaciones que el cisplatino provoca sobre el DNA^{68(a,d,e),75,76} y siempre se observa que las moléculas de DNA se acortan y se compactan al platinarse gracias a la capacidad del platino para entrecruzarse con las cadenas de DNA formando micropliegues.

5-4-4-3-1- Resultados y discusión

Se han estudiado mediante TMAFM las modificaciones que sufre el DNA plásmido pBR322 al interactuar con los metalociclos de Pt (C₇) y de Pd (C₈) incubados durante 24h a 37°C y a una $r_i = 0,3$.

En la **figura 5-33**, se muestra la imagen del DNA libre. En las **figuras 5-34 y 5-35** se muestran los resultados obtenidos cuando se incubaba el DNA con los metalociclos de Pd (C₈) y de Pt (C₇) respectivamente.

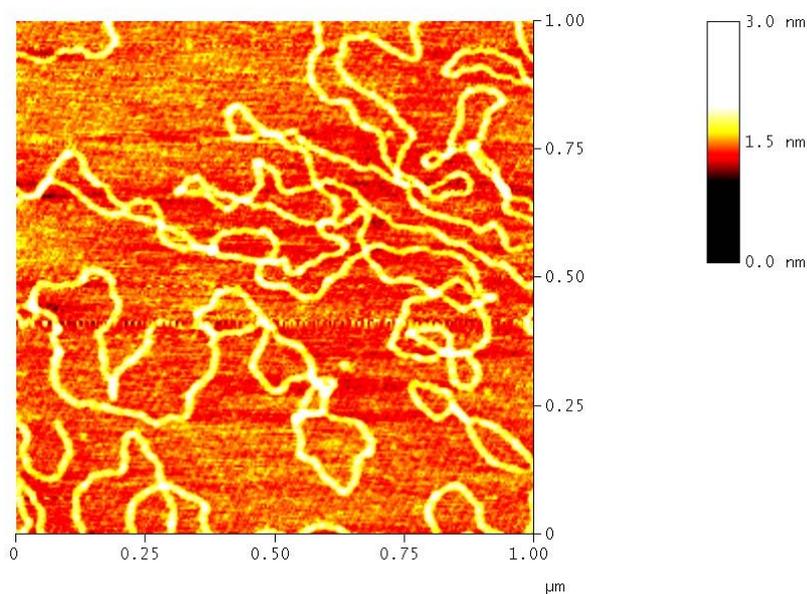


Figura 5-33: Imágenes de TMAFM del DNA pBR322 libre

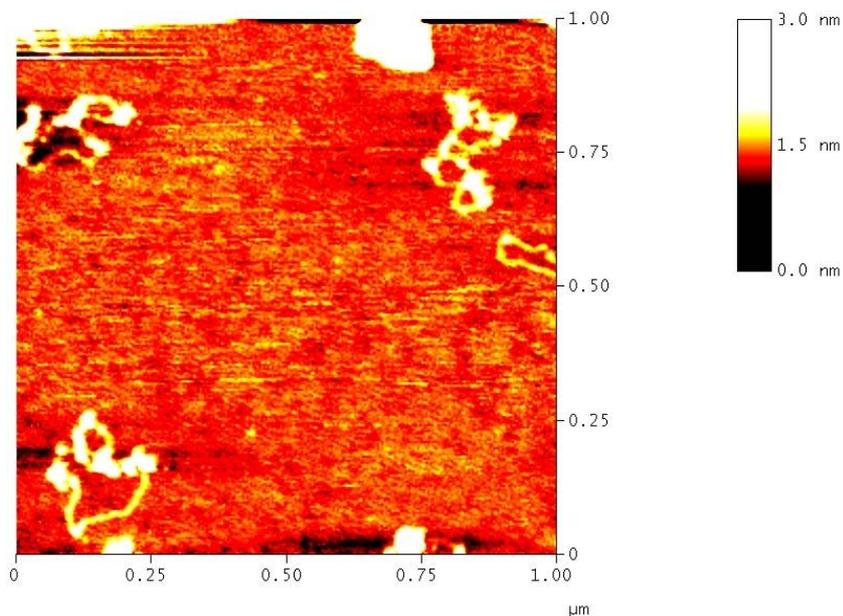


Figura 5-34: Imágenes de TMAFM del DNA incubado con el metalociclo de Pd (C_8).

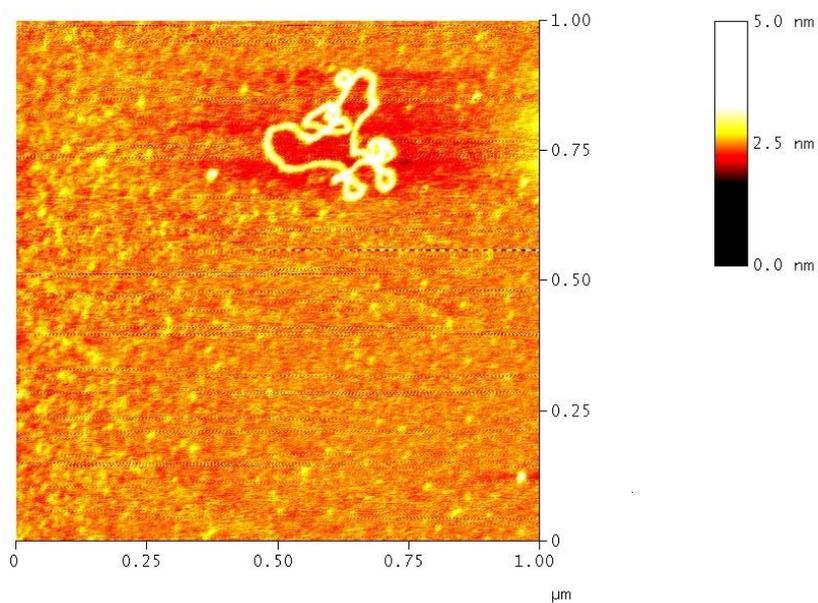


Figura 5-35: Imágenes de TMAFM del DNA incubado con el metalociclo de Pt (C_7).

Mientras que el DNA libre presenta una moderada relajación (50%) (se puede apreciar la forma cíclica OC y la superenrollada CCC cuando se incuba a 37°C durante 24 horas), cuando se incuba con el metalociclo de Pt (C_7) se observan cambios drásticos que provocan modificaciones en la estructura terciaria. Se torsiona la doble hélice, se

forman nudos y puntos de unión entre diferentes filamentos, dando lugar a una estructura compacta. Este efecto es más pronunciado en el caso de C_8 , ya que se observan nudos más grandes y por tanto una estructura mucho más compacta.

5-4-5- Ensayos de la actividad antiproliferativa

Ya que los estudios que se acaban de exponer habían puesto de manifiesto que los macrociclos eran capaces de interactuar con el DNA, se pensó en ensayar su actividad antiproliferativa. Este estudio se realizó únicamente con el cuadrado de Pt (C_7) ya que los compuestos de este metal son los más utilizados desde un punto de vista farmacológico.

Con los estudios que se presentan en este apartado, se pretende analizar la capacidad de sobrevivir y reproducirse que tienen las células tumorales de un cultivo que se han puesto en contacto con un determinado compuesto, comparada con la de un cultivo de control (en ausencia del compuesto). El parámetro que se evalúa se denomina porcentaje de supervivencia celular y se obtiene por comparación de la capacidad de proliferación de las células en los cultivos tratados, con los compuestos y los cultivos de control. En todos los casos, la proliferación celular en los cultivos tratados con el metalociclo de Pt (C_7) se ha determinado mediante el método basado en el compuesto MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) como indicador de la viabilidad celular (cromóforo), el cual se reduce por las reductasas mitocondriales en el interior de las células vivas. El producto de reducción del MTT (formazán) es un sólido cristalino de color naranja-rojizo que se puede disolver y analizar por colorimetría^{77,78} (los detalles del procedimiento se explican en la parte experimental). Este proceso de reducción requiere mitocondrias que quedarían inactivas al poco tiempo de iniciar la muerte celular. Es por eso que este método constituye una herramienta útil para discriminar entre células vivas y muertas.

Los porcentajes de supervivencia celular obtenidos se representan gráficamente en función de la concentración del compuesto administrado. De esta representación gráfica se obtiene por interpolación el parámetro IC_{50} , que se define como la concentración del compuesto que se tiene que administrar para inhibir en un 50% el

crecimiento de las células tumorales (o la concentración que se necesita para obtener una supervivencia del 50%)^{79,80}.

Los estudios de la actividad antiproliferativa que se presentan en este trabajo se han llevado a cabo con la línea de células tumorales Leucemia humana HL-60.

Las células han sido expuestas continuamente al cisplatino y a **C₇** durante un periodo de 24h o de 72h y después se ha examinado el crecimiento utilizando el método del MTT.

En la **tabla 5-5** se muestran los porcentajes de supervivencia celular para cada uno de los casos estudiados.

Compuesto	IC ₅₀ (μM) 24h	IC ₅₀ (μM) 72h
C₇ (Pt)	4,85 ± 1,01	5,26 ± 1,77
cisplatino	15,61 ± 1,15	2,153 ± 1,01

Tabla 5-5: Valores de IC₅₀ para el metalociclo de Pt (**C₇**) y el cisplatino para la línea celular HL-60.

Tal y como se observa en la **tabla 5-5**, los bajos valores de IC₅₀ para el metalociclo de Pt preparado en esta memoria (**C₇**) indican que este presenta, a corto plazo, un efecto mejor que el cisplatino (mata a las células a dosis bajas), mientras que a largo plazo el cisplatino es más efectivo.

Todos estos resultados sugieren la conveniencia de desarrollar en un futuro un estudio complementario, mediante la técnica de citometría de flujo, para analizar la capacidad del macrociclo **C₇** para inducir apoptosis en las células de Leucemia HL-60.

5-5- BIBLIOGRAFÍA

- 1- J.-M. Lehn, *Struct. Bonding*, **1973**, 16, 1.
- 2- T. Kusukawa, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 13576.
- 3- J.-P. Bourgeois, M. Fujita, M. Kawano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 9260.
- 4- M. Fujita, J. Yazaki, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5645.
- 5- M. Fujita, S. Nagao, M. Iida, K. Ogata, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1993**, 115, 1574.
- 6- M. Fujita, S. Nagao, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 1649.
- 7- K.-S. Jeong, Y. L. Cho, J. U. Song, H.-Y. Chang, M.-G. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 10982.
- 8- K.-S. Jeong, Y. L. Cho, S.-Y. Chang, T.-Y. Park, J. U. Song, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 9459.
- 9- J. A. Whiteford, P. J. Stang, S. D. Huang, *Inorg. Chem.*, **1998**, 37, 5595.
- 10- J. A. Whiteford, C. V. Lu, P. J. Stang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 2524.
- 11- C. Müller, J. A. Whiteford, P. J. Stang, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 9827
- 12- A. J. Goshe, I. M. Steele, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125, 444.
- 13- R. D. Sommer, A. L. Rheingold, A. J. Goshe, B. Bosnich, *J. Am. Chem. Soc.*, **2001**, 123, 3940.
- 14- J.-P. Sauvage, M. W. Hosseini, *Templating, Self-assembly, and self-organization, Comprehensive Supramolecular Chemistry*, **1996**, 9, ch 5-7.
- 15- M. Fujita, K. Ogura, *Coord. Chem. Rev.*, **1996**, 148, 249.
- 16- P. J. Stang, D. H. Cao, S. Saito, A. M. Arif, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 6283.
- 17- a) J.-M. Lehn, A. Rigault, J. Siegel, J. Harrowfield, B. Chevrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 2565. b) J.-M. Lehn, A. Rigault, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1988**, 27, 1095.
- 18- (a) E. C. Constable, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 10013. (b) E. C. Constable, M. D. Ward, D. A. Tocher, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 1256. (c) E. C. Constable, R. Chotalia, D. A. Tocher, *Chem. Commun.*, **1992**, 771. (d) A. F. Williams, C. Piguet,

- G. Bernardinelli, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 703. (f) T. W. Bell, H. Jousselin, *Nature*, **1994**, 367, 441.
- 19- (a) P. Baxter, J.-M. Lehn, A. DeCian, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1993**, 32, 69. (b) E. Leize, A. V. Dorsselaer, R. Kramer, J.-M. Lehn, *Chem. Commun.*, **1993**, 990.
- 20- (a) M. Fujita, D. Ogura, M. Miyazawa, H. Oka, K. Yamaguchi, K. Ogura, *Nature*, **1995**, 378, 469. (b) M. Fujita, J. Yazaki, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5645.
- 21- (a) J. Manna, C. J. Kuehl, J. A. Whiteford, P. J. Stang, D. C. Muddiman, S. A. Hofstadler, R. D. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 11611. (b) J. P. Stang, N. E. Persky, J. Manna, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, 119, 4777. (c) P. J. Stang, B. Olenyuk, *Acc. Chem. Res.*, **1997**, 30, 502.
- 22- X. Delaigue, M. W. Hosseini, E. Leize, S. Kieffer, A. V. Doreeslaer, *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 7561.
- 23- (a) M. Fujita, J. Yazaki, K. Ogura, *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 5645. (b) M. Fujita, J. Yazaki, K. Ogura, *Chem. Lett.*, **1991**, 1031.
- 24- K. Umemoto, K. Yamaguchi, M. Fujita, *J. Am. Chem. Soc.*, **2000**, 122, 7150.
- 25- S. B. Lee, S. Hwang, D. S. Chung, H. Yun, J.-I. Hong, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 873.
- 26- A. Orita, L. Jiang, T. Nakano, N. Ma, J. Otera, *Chem. Commun.*, **2002**, 1362.
- 27- S. Shinkai, K. Araki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 110, 7214.
- 28- S. Aoki, M. Shiro, E. Kimura, *Chem. Eur. J.*, **2002**, 8, 929.
- 29- C. A. Schalley, A. Lützen, M. Albrecht, *Chem. Eur. J.*, **2004**, 10, 1072.
- 30- A. Job, *Liebigs. Ann. Chem.*, **1928**, 9, 113.
- 31- A. S. Meyer, Jr. Ayres, G. H. Ayres, *J. Am. Chem. Soc.*, **1957**, 79, 49.
- 32- (a) M. T. Blanda, J. H. Horner, M. Newcomb, *J. Org. Chem.*, **1989**, 54, 4626. (b) K. A. Connors, *Binding constants, The Measurement of Molecular Complex Stability*, Wiley-Interscience, New York, **1987**.
- 33- (a) V. P. Solov'ev, E. A. Vnuk, N. N. Strakhova, O. A. Raevsky, *Thermodynamic of complexation of the macrocyclic polyethers with salts of alkali and alkaline-earth metals*, VINITI, Moscow, **1991**. (b) V. P. Solov'ev, V. E. Baulin, N. N. strakhova,

- V. P. Kazachenko, V. K. Belsky, A. A. Varnek, T. A. Volkova, G. Wipff, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **1998**, 2, 1489.
- 34- M. J. Hynes, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1993**, 311.
- 35- M. Fujita, O. Sasaki, T. Mitsuhashi, T. Fujita, J. Yazaki, K. Yamaguchi, K. Ogura, *Chem. Commun.*, **1996**, 1535.
- 36- M. Fujita, K. Ogura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1996**, 69, 1471.
- 37- K. Kano, I. Takenoshita, T. Ogawa, *Chemistry Letters*, **1982**, 321.
- 38- S. Shinkai, K. Araki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, 110, 7214.
- 39- A. Muñoz, *Cáncer. Genes y nuevas terapias*, Hélice, Madrid, **1997**.
- 40- (a) B. Rosenberg, L. Van Camp, T. Trigás, *Nature*, **1965**, 205, 698. (b) B. Rosenberg, L. Van Camp, J. E. Trosko, V. H. Mansour, *Nature*, **1969**, 222, 385.
- 41- J. Reedijk, *Chem. Commun.*, **1996**, 801.
- 42- E. Wong, C. M. Giandomenico, *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2451.
- 43- C. K. Mathews, K. E. Van Holde, *Bioquímica*, McGraw-Hill Interamericana (2^a ed.), Madrid, **1998**.
- 44- R. L. P. Adams, J. T. Knowler, D. P. Leadre, *The Biochemistry of the Nucleic Acids*, 11th ed., Chapman & Hall, London, **1992**.
- 45- N. Farrell, *Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, **1989**.
- 46- L. S. Lerman, *J. Mol. Biol.*, **1961**, 3, 18.
- 47- L. S. Lerman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **1963**, 49, 94.
- 48- (a) M. J. Waring, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1964**, 87, 358. (b) W. Bauer, J. Vinograd, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 47, 419.
- 49- V. Hollstein, *Chem. Rev.*, **1974**, 74, 625.
- 50- K. W. Jennette, S. J. Lippard, G. A. Vassiliades, W. R. Bauer: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1974**, 71, 3839.
- 51- A. H.-J. Wang, J. Nathans, G. van der Marel, J. H. van Boom, A. Rich: *Nature*, **1978**, 276, 471.
- 52- W. Muller, D. M. Crothers, *Eur. J. Biochem.*, **1975**, 54, 267.
- 53- W. Bauer, J. Vinograd, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 54, 281.
- 54- M. J. Waring, *J. Mol. Biol.*, **1970**, 54, 247.

- 55- D. Freifelder, *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Serie de Biología Molecular*, Reverté S.A., Barcelona, **1991**.
- 56- K. Nakanishi, R. W. Berova, R. W. Woody, *Circular Dicroism. Principles and applications*, VCH, New York, **1994**.
- 57- V. I. Ivanov, L. E. Minchenkova, A. K. Schvolkina, A. I. Poletavev, *Biopolymers*, **1973**, 12, 89.
- 58- V. Bravec, V. Klenwächter, J. J. Butour, M. P. Johnson, *Biophys. Chem.*, **1990**, 35, 129.
- 59- A. Johnson, Y. Qu, B. Van Hounten, N. Farrell, *Nucleic Acids Res.*, **1992**, 20, 1697.
- 60- W. C. Johnson, M. S. Itzwoztz, Y. Tinoco, *Biopolymers*, **1972**, 11, 225.
- 61- G. Arena, L. Monsú Scolaro, R. F. Pasternack, R. Romeo, *Inorg. Chem.*, **1995**, 34, 2994.
- 62- E. C. Long, J. K. Barton, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, 23, 271.
- 63- J. Grinsted, P. Bennett, *Methods in Biology*, vol. 21: *Plasmid Technology*, Academic Press, London, **1998**.
- 64- S. J. Lippard, *Acc. Chem. Res.*, **1978**, 11, 211.
- 65- P. Nielsen, W. Zhen, U. Henriksen, O. Buchardt, *Biochemistry*, **1988**, 27, 67.
- 66- M. V. Keck, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3386.
- 67- A. Pumarola, A. Rodríguez-Torres, J. A. García-Rodríguez, G. Piedrola-Angulo, *Tratado de Microbiología y Parasitología Médica*, Salvat, Barcelona, **1991**.
- 68- (a) J. P. Macquet, J. L. Butour, *Biochimie*, **1978**, 60, 901. (b) B. E. Bowler, L. S. Holis, S. J. Lippard, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 6102. (c) R. T. Espejo, J. Lebowitz, *Anal. Biochem.*, **1976**, 72, 95. (d) G. L. Cohen, W. R. Bauer, J. K. Barton, S. J. Lippard, *Science*, **1979**, 203, 1014. (e) S. Mong, Y. Daskal, A. W. Prestayko, S. T. Crooke, *Cancer Res.*, **1981**, 41, 4020.
- 69- Z. Shao, J. Mou, D. M. Czajkowsky, J. Yang, J. Y. Yang, *Advances in Physics*, **1996**, 45, 1.
- 70- Y. L. Lyubchenko, B. L. Jacobs, S. M. Lindsay, A. Stasiak, *Scanning Microscopy*, **1995**, 9, 705.
- 71- H. G. Hansma, D. E. Laney, *Biophysical Journal*, **1996**, 70, 1993.
- 72- C. Bustamante, C. Rivetti, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **1996**, 25, 395.

- 73- H. G. Hansma, D. E. Laney, *Biophysical Journal*, **1993**, 70, 1933.
- 74- W. Fritze, A. Schaper, T. M. Jovin, *European Microscopy and Analysis*, **1996**, 5.
- 75- B. Revet, J. M. Malinge, E. Delain, M. L. Bret, M. Leeng, *Nucl. Acids Res.*, **1984**, 12, 8349.
- 76- G. B. Onoa, G. Cervantes, V. Moreno, M. J. Prieto, *Nucl. Acids Res.*, **1998**, 26, 1473.
- 77- M. C. Alley, D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Huresey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, M. R. Shoemaker, M. R. Boyd. *Cancer Res.*, **1988**, 48, 589.
- 78- M. B. Hansen, S. E. Nielsen, K. Berg, *J. Immunol. Methods*, **1989**, 119, 203.
- 79- V. M. González, P. Amo-Ochoa, J. M. Pérez, M. A. Fuertes, J. R. Masaguer, C. Navarro-Ranninger, C. Alonso, *J. Inorg. Biochem.*, **1996**, 63, 57.
- 80- G. B. Onoa, Tesis Doctoral, Universitat de Barcelona, **1998**.

