

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA



GRADO EN QUÍMICA

Síntesis de compuestos derivados de
macrociclos y estudio de sus propiedades como
agentes enzimáticos

Pablo Fernández Pombar
2014-2015

TRABAJO FIN DE GRADO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MACROCICLOS	4
1.1.1 Efecto macrocíclico.....	5
1.1.2 Clasificación según sus átomos dadores. Teoría de Pearson	6
1.1.3 Tamaño de los átomos dadores	6
1.1.4 Influencia de las insaturaciones.....	6
1.2 SÍNTESIS	6
1.2.1 Síntesis de los ligandos macrociclos	6
1.2.1.1 <i>Síntesis directa</i>	7
1.2.1.2 <i>Bases de Schiff</i>	7
1.2.1.3 <i>Síntesis template o “plantilla”</i>	8
1.2.2 Síntesis de los complejos	9
1.2.2.1 <i>Síntesis directa</i>	9
1.2.2.2 <i>Síntesis electroquímica</i>	9
1.2.2.2.1 Leyes de Faraday de la electrolisis	11
1.3 LIGANDOS CON <i>PENDANT-ARMS</i>	12
1.4 LOS METALES	13
1.4.1 Co	13
1.4.2 Ni.....	14
1.4.3 Cu	14
1.4.4 Zn y Cd.....	15
1.5 POTENCIAL ACTIVIDAD COMO CATALASA.....	16
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
2.1 OBJETIVOS	17
2.2 PLAN DE TRABAJO.....	19
3. PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS	20
3.1.1 Reactivos	20
3.1.2 Disolventes	21
3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.....	22
3.2.1 Análisis elemental	22

3.2.2 Espectroscopia IR.....	22
3.2.3 Espectrometría de masas	22
3.2.4 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear	22
3.2.5 Estudios Biológicos.....	22
3.3 SÍNTESIS DEL PRECURSOR	23
3.3.1 Síntesis del <i>O</i> ¹ , <i>O</i> ⁷ -bis(formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano	23
3.4 SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS Y DE LOS COMPLEJOS METÁLICOS	23
3.4.1 Síntesis del ligando H ₂ L.....	23
3.4.2 Síntesis electroquímica de los complejos metálicos de H ₂ L.....	24
3.4.3 Síntesis del ligando R ₂ L	28
3.4.4 Síntesis de los complejos de R ₂ L	28
3.5 ACTIVIDAD CATALASA	30
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
4.1 SÍNTESIS DEL LIGANDO H ₂ L.....	32
4.1.1 Análisis Elemental.....	32
4.1.2 Espectroscopia IR.....	32
4.1.3 Espectrometría de masas	33
4.1.4 Espectroscopia de RMN de ¹ H	34
4.2 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DE H ₂ L.....	35
4.2.1 Análisis elemental	36
4.2.2 Espectroscopia IR.....	36
4.2.3 Espectroscopia de masas	37
4.3 SÍNTESIS DEL LIGANDO R ₂ L.....	38
4.3.1 Análisis Elemental.....	38
4.3.2 Espectroscopia IR.....	38
4.3.3 Espectrometría de masas	39
4.3.4 Espectroscopia de RMN de ¹ H.....	40
4.4 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DE R ₂ L.....	41
4.4.1 Análisis elemental	41
4.4.2 Espectroscopia IR.....	42
4.4.3 Espectrometría de masas	43
4.5 ESTUDIOS BIOLÓGICOS	45
5. CONCLUSIONES	47

RESUMEN

En el presente Trabajo de Fin de Grado desarrollado en el Departamento de Química Inorgánica se estudian el diseño y la síntesis de dos ligandos macrocíclicos utilizando precursores dicarbonílicos y diamínicos, siguiendo un proceso de ciclocondensación, seguido de la posterior síntesis y caracterización de sus complejos metálicos. El correspondiente macrociclo se caracteriza mediante análisis elemental, espectroscopia RMN de ^1H , espectrometría de masas y espectroscopia de infrarrojo. La obtención de los complejos metálicos con los ligandos macrociclos, se lleva a cabo por dos rutas sintéticas diferentes consistentes en una síntesis electroquímica y síntesis directa. Finalmente, una vez sintetizados y caracterizados los diferentes compuestos, se estudian sus propiedades catalíticas como agente enzimático estableciendo una comparativa con la catalasa, enzima de la familia de las oxidoreductasas, midiendo la cantidad de oxígeno liberado en la correspondiente reacción *in vitro*.

This Final Grade Work developed in the Inorganic Chemistry Department studies the synthesis of two macrocyclic ligands obtained by a cyclocondensation process using dicarbonylic and diamine precursors, follow up with the synthesis and characterization of the corresponding metal complexes. Each macrocycle is characterized by means of elemental analysis, ^1H -RMN spectroscopy, mass spectrometry and infrared spectroscopy. Through two different pathways, electrochemical and direct synthesis, different metal complexes are obtained. After synthesizing and characterizing all the compounds, the catalytic properties are studied, establishing a correlation with the catalase, which is an enzyme from oxidoreductase family, measuring the oxygen released in the *in vitro* reaction.

ABREVIATURAS

a	Ancho
A	Amperios
AE	Análisis elemental
Ar	Aromático
C	Culombios
DCTB	Trans-2-[3-(4-tert-butilfenil)-2-metil-2-propenilideno]malononitrilo
ESI	Electrospray Ionization (Ionización por Electrospray)
FAB	Fast Atom Bombardment (Bombardeo por Átomos Rápidos)
h	Hora
imp	Impurezas
IR	Infrarrojo
L	Ligando
L-L	Líquido-Líquido
m	Multiplete
M	Metal
M:L	Relación estequiométrica entre el metal y el ligando
MALDI	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz)
NALDI	Nano-Assisted Laser Desorption/Ionization (Desorción/Ionización Láser Nano-Asistida)
ppm	Partes por millón
Rdto.	Rendimiento
RMN	Resonancia magnética nuclear

s	Singlete
TOF	Time of Flying (Tiempo de vuelo)
u.m.a.	Unidad de masa atómica

1. INTRODUCCIÓN

1.1 HISTORIA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS MACROCICLOS

La importancia de los ligandos macrocíclicos y sus compuestos es enorme, debido a la existencia de una gran cantidad de compuestos de este tipo que aparecen en la Naturaleza, como por ejemplo: hemoglobina y clorofila. Su descubrimiento y estudio es relativamente reciente.

En química de coordinación definimos macrociclo como “una molécula cíclica con tres o más átomos dadores en un anillo de, como mínimo, nueve átomos”. Esencialmente, esto implica que los ligandos puedan enlazar a un átomo metálico dentro de su cavidad central; por lo que moléculas pequeñas o carentes de átomos dadores no podrán considerarse macrociclos.¹

El tamaño de la cavidad interna viene determinado por el número de miembros que componen el macrociclo. Los cationes de pequeño tamaño son más afines con macrociclos cuya cavidad interna sea de un tamaño pequeño. De forma opuesta, los cationes de mayor tamaño coordinarán preferentemente con macrociclos cuya cavidad sea grande. En caso de que el radio del ión metálico sea mayor o menor que el hueco del macrociclo, es posible que se produzcan expansiones o contracciones del anillo.^{2,3}

Los macrociclos permiten que el metal presente un estado de oxidación elevado, que de otro modo sería inestable.

La presencia de insaturaciones provoca una disminución de la flexibilidad, restringiendo los modos de coordinación posibles. La consecuencia es un incremento de la selectividad.

La posibilidad de que el metal se sitúe en un ambiente hidrofílico, aislado del entorno por una envoltura orgánica hidrofóbica, los convierte en sustancias de gran interés en la síntesis de fármacos al poder ser aplicables como un medio de transporte en

¹ G. A. Melson, *Coordination Chemistry of Macrocyclic Compounds*, Plenum Press, New York, 1, (1979).

² M. G. B. Drew, J. Nelson, S. M. Nelson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1678 (1981).

³ M. G. B. Drew, J. Nelson, S. M. Nelson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1685 (1981).

el interior del organismo sin que el metal sufra transformaciones indeseadas como consecuencia de las condiciones fisiológicas.⁴

La alta estabilidad termodinámica y cinética de los complejos macrocíclicos de los metales de transición ha sido fundamental en su utilización como catalizadores. Estos ligandos ofrecen la oportunidad de regular las propiedades redox de los iones metálicos por sustitución de los átomos dadores del ligando. Además son especialmente importantes en las reacciones de oxidación en las que se ven implicadas moléculas de dióxígeno u otros agentes oxidantes.

Otras aplicaciones de estos compuestos son su uso como trazadores de contaminantes orgánicos, introducción de radioisótopos en la destrucción selectiva de tejidos cancerosos,⁵ metalurgia de los lantánidos, síntesis de materiales cromatográficos, etc.

1.1.1 Efecto macrocíclico

Una característica destacable de este tipo de compuestos es el “efecto macrociclo”, término que hace referencia a una estabilidad superior que presentan los complejos de ligandos cíclicos frente a los complejos análogos de cadena abierta.

La preorganización que presenta el macrociclo favorece la formación del complejo, en cambio el ligando de cadena abierta debe sufrir un reordenamiento estérico previo a la coordinación. Algunos autores apuntan a que la razón de este efecto está en un factor entrópico.⁶ Otros, en cambio, señalan a un origen entálpico.⁷

En lo referente al aspecto cinético, se ha comprobado que la velocidad de complejación y disociación es más lenta en ligandos cíclicos que en los análogos acíclicos. La causa que origina este suceso es que al no poseer extremos, la salida de un ligando macrocíclico de la esfera de coordinación del metal es más complicada.

⁴ J. D. Lamb, R. M. Izatt, J. J. Chrishtensen, *Stability Constants of Cation-Macrocyclic Complexes and their Effect on Facilitated-transport Rates*, Cap. 2 en *Progress in Macrocyclic Chemistry*, **2**, (1987).

⁵ D. E. Milenic, K. Garmestani, L. L. Chappell, E. Dadachova, A. Yordanov, D Ma, J. Schlom, M. W. Brechbiel, *Nucl. Med. Biol.*, **29**, 431, (2002).

⁶ D. Munro, *Chem. Br.*, **13**, 100, (1977).

⁷ L. F. Lindoy, D. H. Busch, *Preparative Inorganic Reactions*, **6**, (1971).

1.1.2 Clasificación según sus átomos dadores. Teoría de Pearson

Los ligandos macrocíclicos se unen a los iones metálicos a través de átomos dadores⁸ y, por lo tanto, será posible clasificarlos según la teoría ácido-base/duro-blando de Pearson.⁹

Los átomos dadores más habituales en los macrociclos son O, N, S, P y As. El cambio del heteroátomo dador permite una variación de la selectividad del ligando frente a un cierto sustrato metálico.

Así, los ligandos se clasifican en base a sus átomos dadores. N, S, P y As componen un grupo y el O forma el segundo. Los pertenecientes al primer tipo tienen más afinidad por metales de transición y otros cationes de metales pesados. Los del segundo grupo, poseen más afinidad por iones de metales alcalinos, alcalinotérreos y por iones trivalentes de los lantánidos.

1.1.3 Tamaño de los átomos dadores

Es de esperar que al sustituir un átomo dador pequeño por uno más voluminoso, tenga lugar una reducción del tamaño de la cavidad interna. Esta disminución no es tan pronunciada como sería esperable debido al alargamiento del enlace carbono-heteroátomo que ocasiona un efecto contrario, contrarrestándolo.

1.1.4 Influencia de las insaturaciones

Además de la ya mencionada selectividad, la rigidez de los sistemas insaturados puede beneficiar la aparición de geometrías de coordinación menos comunes, por ejemplo la bipiramidal pentagonal o la piramidal pentagonal.

1.2 SÍNTESIS

1.2.1 Síntesis de los ligandos macrociclos

La síntesis de macrociclos puede realizarse a partir de una cadena o grupo lineal de fragmentos, siendo la parte más importante la conexión de los extremos, bien dentro de la misma cadena, o bien como resultado del ensamblaje *in situ* de unidades

⁸ L. F. Lindoy, *The Chemistry of Macrocyclic Ligand Complexes*, Cambridge University Press, Cambridge (1989).

⁹ R. G. Pearson, *J. Am. Chem. Soc.*, **85(22)**, 3533, (1963).

bifuncionales. Existen varias formas de sintetizar macrociclos: ciclación simple, ciclación conjunta con otra molécula y/o condensación de dos o cuatro unidades.

Existen muchos procedimientos de síntesis de ligandos macrocíclicos, los más habituales serán descritos a continuación:

1.2.1.1 *Síntesis directa*

En este tipo de síntesis el proceso de ciclación sigue una reacción orgánica convencional sin la influencia directa de ningún ión metálico.

El principal inconveniente radica en la posibilidad de que surjan reacciones de policondensación. Para evitarlo suelen realizarse en condiciones de alta dilución.¹⁰ También es habitual la inclusión de grupos rígidos (anillos aromáticos u otras insaturaciones) que disminuyan la libertad rotacional de la cadena, lo que conlleva un descenso entrópico, favoreciendo el proceso de ciclación.¹¹

Las condiciones en las que se realiza la síntesis influyen no sólo en el rendimiento de la reacción, sino también en la naturaleza del producto obtenido, pudiendo llegar a obtener un macrociclo distinto al esperado. Véase la pureza del disolvente o el impedimento estérico.¹²

1.2.1.2 *Bases de Schiff*

Las bases de Schiff¹³ son compuestos que contienen un grupo imino procedente de la condensación de una amina primaria con el carbonilo activo de un aldehído o cetona. El mecanismo de reacción podría resumirse en cuatro pasos:

1. Adición nucleófila del grupo amino al carbonilo.
2. Transferencia del protón.
3. Formación del enlace imínico.
4. Pérdida de un protón que conduce a la formación de la base de Schiff y una molécula de agua.

¹⁰ P. Ruggli, *Liebigs Ann.*, **92**, 392, (1912); **174**, 399, (1913); **1**, 412, (1917).

¹¹ B. L. Shaw, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 3856, (1975).

¹² J. de O. Cabral, M. F. Cabral, M. G. B. Drew, F. S. Esho, O. Haas, S. M. Nelson. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1066, (1982).

¹³ H. Schiff, *Ann.*, **131**, 118, (1864).

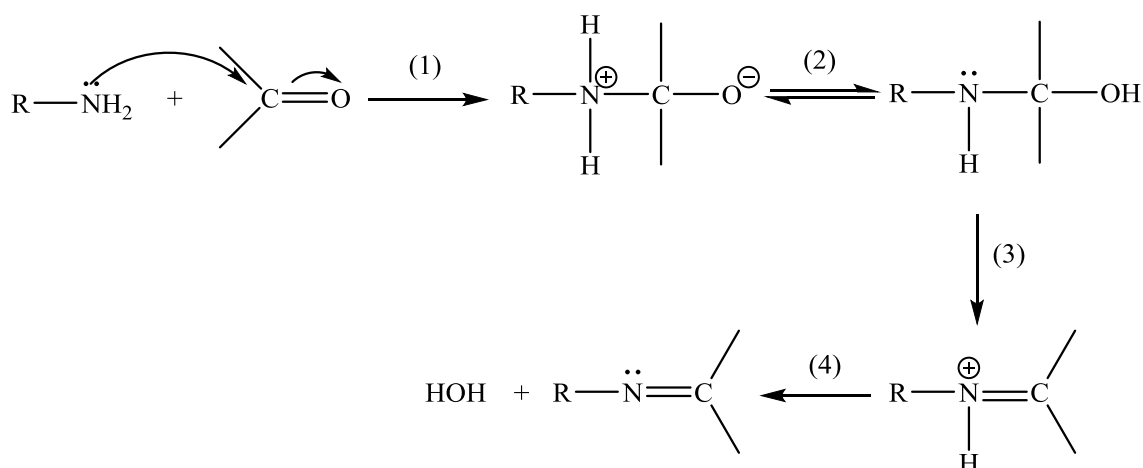


Figura 1 Formación de una base de Schiff

Según el número de subunidades que pasen a componer el ligando pueden obtenerse productos muy diversos, aunque los más habituales son [1+1] y [2+2]. Este tipo de compuestos son fácilmente reducibles a las correspondientes aminas.

1.2.1.3 *Síntesis template o “plantilla”*

Este proceso efectúa la ciclación en presencia de un ión metálico. Dicho catión se coordina a las cadenas reactivas, preorganizando los intermedios de reacción y permitiendo establecer un control conformacional a la hora de unir los extremos de las cadenas. Esto es, una *síntesis template* implica un acercamiento *in situ* de los fragmentos que compondrán el macrociclo. El agente *template*, el sustrato metálico, actúa como una plantilla y ejerce una influencia, *efecto metálico template*,¹⁴ que favorece la reacción por dos razones:¹⁵

- ❖ Efecto termodinámico: desplaza el equilibrio hacia la formación del complejo metálico al coordinarse al macrociclo.
- ❖ Efecto cinético: controla la estereoquímica de los intermedios, por lo que la ciclación es la ruta más favorable.

Que la presencia del ión metálico sea favorable depende de una serie de factores como: su configuración electrónica, tamaño de la cavidad macrocíclica, tamaño del ión metálico, número y naturaleza de átomos dadores y posibles conformaciones en el macrociclo a coordinar.

¹⁴ L. F. Lindoy, D. W. Margeum, *Inorg. Chem.*, **13**, 2941, (1974).

¹⁵ M. C. Thompson, D. H. Busch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3651, (1964).

El uso de metales de transición como agentes *template* en la síntesis de macrociclos de gran tamaño no suele ser efectivo.

Es posible eliminar el metal una vez finalizada la síntesis mediante una reacción de desmetalación. Si el ión no está fuertemente unido, puede disolverse el complejo en un disolvente coordinante en el que el macrociclo tenga baja solubilidad. En el caso de complejos macrocíclicos base de Schiff, el metal se reduce y precipita al mismo tiempo que reduce el grupo imino a amina.

1.2.2 Síntesis de los complejos

1.2.2.1 Síntesis directa

Requiere que el ligando macrocíclico sea obtenido previamente en su forma libre. Una vez purificado éste, se hace reaccionar con diferentes sales metálicas en disolución. La relación molar metal:ligando se elige en función del tipo de complejo que se quiera obtener: mono, di, trinuclear, etc., teniendo siempre en cuenta el tamaño del catión y de la cavidad macrocíclica, factores comentados anteriormente.

Pese a que no se aplicó en este trabajo, también podría realizarse una síntesis *template*, descrita en el anterior apartado, empleando los metales de interés durante el proceso de síntesis.

1.2.2.2 Síntesis electroquímica

Este novedoso tipo de síntesis, que se ensaya por primera vez en este tipo de compuestos, es uno de los más simples y directos para llevar a cabo reacciones de oxidación y reducción. Con el uso de esta técnica es posible evitar los inconvenientes que puedan surgir al emplear reactivos redox.

Hoy en día existe un interés creciente en la utilización de esta técnica en la química preparativa, motivado principalmente por los buenos resultados obtenidos y la simplicidad que presenta.

Una de las ventajas del uso de esta técnica de síntesis es que como producto de partida se emplean láminas de los correspondientes metales, que son estables, con una elevada pureza y fácilmente almacenables, pudiendo reutilizarse en ocasiones futuras. En las reacciones electroquímicas se trabaja a temperatura ambiente sin necesidad de

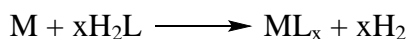
emplear sofisticados aparatos. Además, manipulando cantidades de reactivo habituales en el laboratorio, se obtienen rendimientos altísimos en términos de consumo de metal.

La técnica de síntesis electroquímica puede ser de dos tipos. En uno de ellos se utilizan electrodos inertes cuya misión es servir como fuente o sumidero de electrones para la oxidación o reducción de las especies presentes en disolución. En el otro, uno de los electrodos no sólo cumple con la misión anterior, sino que también participa en la reacción junto con las especies en disolución. En este caso, se dice que actúa como electrodo de sacrificio.

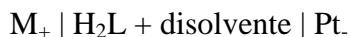
Los procesos de síntesis de compuestos de coordinación con ligandos orgánicos en los que se parte del elemento metálico en estado de oxidación cero, constituyen un nuevo campo dentro de la química preparativa, que en los últimos años ha alcanzado un importante auge.

Dentro de este conjunto de procesos se encuentran aquellos en los que tiene lugar la oxidación electrolítica del metal, que constituye el ánodo de una celda electroquímica que contiene al ligando en un disolvente adecuado. Surge de este modo lo que podría denominarse “síntesis electroquímica de compuestos de coordinación”. El método ha sido desarrollado principalmente por D. G. Tuck.¹⁶

Un caso particular de síntesis de compuestos de coordinación siguiendo un procedimiento electroquímico, lo constituye aquel en el que el ligando presenta un comportamiento como ácido débil siendo susceptible de ser desprotonado, y por lo tanto, transformado en su correspondiente anión conjugado en un proceso catódico. La reacción directa entre el metal y un ligando con estas características conduce a la formación del complejo con el ligando en su forma aniónica y la liberación de hidrógeno molecular en el cátodo.



En estas condiciones, la celda puede representarse como:



siendo acetonitrilo el disolvente más común para estos procesos.

¹⁶ D. G. Tuck; *Pure Appl. Chem.*, **51**, 2005, (1979).

El grupo desprotonable del ligando puede proceder de diferentes grupos funcionales, pudiendo hacer una clasificación atendiendo a la naturaleza de este grupo:

- Grupos –OH procedentes de alcoholes, fenoles o ácidos orgánicos.
- Grupos –SH procedentes de tioles.
- Grupos –NH procedentes de aminas, pirroles, pirazoles, etc.
- Grupos –PH procedentes de fosfinas.

En este proyecto se realizará un estudio detallado de compuestos de coordinación obtenidos mediante dicha síntesis electroquímica a partir de un ligando diamínico cuyos grupos desprotonables corresponden a dos grupos funcionales –NH de las aminas.

1.2.2.2.1 Leyes de Faraday de la electrolisis

Primera ley: las masas de las sustancias depositadas o liberadas en cada electrodo durante una electrólisis son proporcionales a la cantidad de electricidad que ha pasado a través de la celda electrolítica.

Segunda ley: Para una misma cantidad de corriente eléctrica, la masa de las sustancias depositadas o liberadas en los electrodos es proporcional a su masa atómica y al número de electrones intercambiados por cada una de ellas.

La expresión matemática sería:

$$\frac{I \cdot t}{m} = \frac{n \cdot F}{Mm}$$

Donde: I es la intensidad de corriente aplicada (amperios), t es el tiempo transcurrido (segundos), m es la masa de la sustancia depositada o liberada en los electrodos (gramos), n es el número de electrones intercambiados (electrones / mol), F es la constante de Faraday (F = 96485 C·mol) y Mm es la masa molecular de la sustancia (g / mol).

1.3 LIGANDOS CON PENDANT-ARMS

El término macrociclo con “pendant-arms” aparece en 1980 para denominar a los ligandos macrocíclicos que presentan grupos dadores adicionales unidos al propio átomo dador del macrociclo.

Este tipo de macrociclo presenta similitudes con los macrociclos libres y con los ligandos de cadena abierta. Poseen la inercia cinética propia de los sistemas cíclicos y al mismo tiempo mantienen cierta flexibilidad de coordinación, habitualmente asociada a los ligandos de cadena abierta.

La estrategia sintética más habitual, consiste en añadir los brazos directamente sobre el ligando previamente sintetizado.

El grupo más estudiado son los poliazamacrociclos saturados, los cuales incorporan los *pendant-arms* a los átomos de nitrógeno del esqueleto macrocíclico.

Las cadenas que constituyen los *pendant-arms* son muy diversas, pudiendo tener un único átomo dador o varios, ser rígidas o flexibles, largas, cortas, etc. La presencia de estas cadenas con átomos dadores da lugar a una estabilización adicional de los ligandos, al situarse los átomos dadores próximos al ión metálico, facilitando su coordinación.

En macrociclos con brazos colgantes, su solubilidad resulta ser una propiedad clave, puesto que para su síntesis a escala industrial deben ser solubles en disolventes no polares. En cambio, para aplicaciones biológicas es imprescindible que puedan disolverse en agua y ser estables.

Actualmente se diseñan macrociclos con pendant-arms de segunda generación en busca de aplicaciones en diferentes áreas de investigación. En el campo de la Bioinorgánica como imitadores de sistemas enzimáticos, o también son utilizables como sensores químicos de fluorescencia, etc.

1.4 LOS METALES

Los iones metálicos que hemos empleado son clasificables en dos grupos:

-Metales de transición: Co, Ni, y Cu.

-Metales post-transicionales: Zn y Cd.

Metales de transición

Son aquellos elementos cuyo átomo tiene parcialmente completos los orbitales d , o aquellos que pueden dar lugar a cationes con una configuración incompleta en sus orbitales d . Su coordinación a ligandos macrocíclicos puede ser complicada. Existen una serie de factores que afectan a la coordinación geométrica, al número de coordinación y, por lo tanto, a la estabilidad termodinámica.

Hemos visto la influencia del tamaño del catión así como de la cavidad interna del macrociclo y de la teoría de Pearson como principales factores. No obstante, también hay que tener en cuenta ciertas consideraciones geométricas. Debido a requisitos electrónicos, los iones de metales de transición de configuración d^8 tienden a adoptar una geometría octaédrica (spin alto) o plano-cuadrada (spin bajo). Sin embargo, el ligando puede imponer cierta geometría debido a su rigidez estructural. Ambas circunstancias tienen como consecuencia que el mismo metal pueda adoptar diferentes geometrías en función del ligando al que se coordine. No obstante, pese a dichas restricciones, el ión tratará de imponer su preferencia geométrica, pudiendo ocasionar que no se coordine al macrociclo.

A continuación se recoge una breve introducción sobre los metales de transición y post-transicionales utilizados (Co, Ni, Cu, Zn y Cd).

1.4.1 Co

Al contrario que los metales previos, nos referimos a uno de los metales menos abundantes de la corteza terrestre. No obstante, posee una función en el organismo como componente fundamental de la vitamina B₁₂.¹⁷ Habitualmente se muestra en estados de oxidación bajos (II y III), y poco común en estado IV. Los índices de coordinación más frecuentes son cuatro y seis, y sus respectivas geometrías serán

¹⁷ Z. Schneider, A. Stroinski, *Comprehensive B₁₂*, de Gruyter, Berlín, 1978.

tetraédrica y octaédrica en estado de alto spin. Destaca por ser el metal que forma más complejos tetraédricos, lo que se debe a su elevada energía de estabilización en dicho entorno al poseer una configuración d^7 . En sistemas d^3 , d^4 , d^8 , y d^9 , la diferencia de energía de estabilización de campo cristalino, EECC, es bastante menor.

1.4.2 Ni

Ligeramente más abundante que el cobre y, al igual que éste, su estado de oxidación más frecuente es el II, encontrándose los estados I y 0 exclusivamente en química organometálica. Su química de coordinación destaca porque puede formar complejos con todas las geometrías importantes. Se considera necesario para el crecimiento de ciertas bacterias anaeróbicas y está presente en varios tipos de enzimas con estados de oxidación y entornos diferentes, como por ejemplo: la *ureasa*,¹⁸ *hidrogenasas*¹⁹ y la *metil CoM reductasa*.²⁰

1.4.3 Cu

Se trata de un metal bastante abundante en la naturaleza. Es esencial para la vida en cantidades traza, pero tóxico en cantidades grandes. El estado de oxidación II es el más importante, puesto que el I se oxida fácilmente y la obtención del III es complicada. Sus índices de coordinación más frecuentes son cuatro, cinco y seis. Al tratarse de un catión con configuración d^9 , los complejos octaédricos y tetraédricos tenderán a sufrir distorsión por efecto Jahn-Teller, lo que conlleva que sus geometrías no sean regulares.

Algunas de las proteínas de cobre más conocidas son las *oxidasas*,²¹ *plastocianinas*²² y las *superoxo-dismutasas*.²³ Se asocia a procesos que utilizan oxígeno en sistemas biológicos y a sistemas transportadores de electrones.

¹⁸ A. B. Costa, *Chem. Br.*, **25(8)**, 788, (1989).

¹⁹ C. Zirngibl, W. Van Dongen, B. Shwörer, R. von Büнау, M. Ritcher, A. Klein, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.*, **208(2)**, 511, (1992).

²⁰ R. K. Thauer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1018(2-3)**, 256, (1990).

²¹ A. G. Sykes, *Adv. Inorg. Chem.*, **36**, 377, (1991).

²² A. G. Sykes, *Struct. Bonding*, **75**, 175, (1991).

²³ J. S. Valentine, D. Mota de Freitas, *J. Chem. Educ.*, **62(11)**, 9901, (1985).

Metales post-transicionales

Aquellos que presentan totalmente ocupados sus orbitales *d* en su estado de oxidación normal o en su forma catiónica.

1.4.4 Zn y Cd

El primero posee una abundancia superior a la del cobre, en cambio el cadmio es escaso. El estado de oxidación más importante es el II, siendo el I muy inestable en ambos casos y tendiendo a oxidarse rápidamente. Poseen los orbitales *d* completos, lo que conlleva desde el punto de vista del campo ligando que no posean una preferencia por una determinada geometría. Así pues, las geometrías vendrán impuestas por factores como el tamaño del ión metálico. Los índices de coordinación más frecuentes son cuatro, seis y cinco para el zinc. Posiblemente sea la tetraédrica la más importante en ambos casos.

Tras el hierro, el zinc es el elemento más importante desde el punto de vista metabólico. Su papel más importante radica en las proteínas capaces de reconocer bases del ADN, las cuales presentan dominios de aminoácidos coordinados a iones Zn^{2+} , y se conocen como *Dedos de Zinc*.²⁴ En ellas, el entorno es tetraédrico distorsionado.

El Zn^{2+} se trata de un ácido de Lewis razonablemente efectivo, sin tendencia a hidrolizarse a pH inferior a 8 y no lleva asociada una química redox bajo condiciones biológicas.

Para el cadmio sólo se han hallado consecuencias negativas a efectos biológicos, pudiendo desplazar al cinc coordinado a grupos cisteína en ciertos enzimas, provocando su inhibición.²⁵

²⁴ B. A. Krizekm J. M. Berg, *Inorg. Chem.*, **31**, 2984, (1992).

²⁵ N. M. Price, F. M. M. Morel, *Nature*, **344**, 658, (1990).

1.5 POTENCIAL ACTIVIDAD COMO CATALASA

El peróxido de hidrógeno es un residuo del metabolismo celular de muchos organismos vivos que desempeña una función de protección contra microorganismos patógenos. No obstante, al tratarse de una especie muy oxidante, debe ser transformado rápidamente en compuestos menos peligrosos. Para realizar esta función existen distintas enzimas en la naturaleza, entre las cuales se encuentra la catalasa, perteneciente a la familia de las oxidoreductasas y que cataliza la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua. Esta enzima es un tetrámero.²⁶

²⁶ H. B. Gray, E. I. Stiefel, J. Selverstone-Valentine, I. Bertini, “*Biological Inorganic Chemistry, Structure & Reactivity*”, University Science Books, 344, California, 2007.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

2.1 OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo es el diseño y la síntesis de dos receptores oxazamacrocíclicos, la síntesis y estudio de sus correspondientes complejos metálicos con metales de transición y post-transicionales, y el análisis de su potencial actividad como catalasa.

La síntesis del ligando H_2L se lleva a cabo por medio de una reacción de ciclocondensación [1+1] entre el O^1, O^7 -bis(2-formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano y la etilendiamina para obtener un compuesto tipo base de Schiff, posteriormente reducido a la correspondiente diamina con $NaBH_4$.

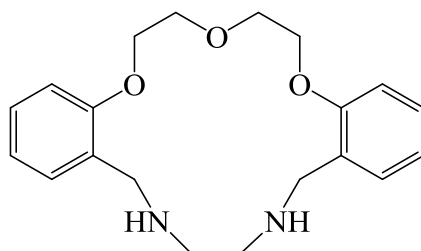


Figura 2.1.1 Ligando H_2L

Se realizará, por primera vez con este tipo de ligandos, una síntesis electroquímica, de manera que el ligando dianiónico forme un complejo neutro con el metal, en lugar del complejo catiónico con contraiones que se obtendría con la síntesis tradicional.

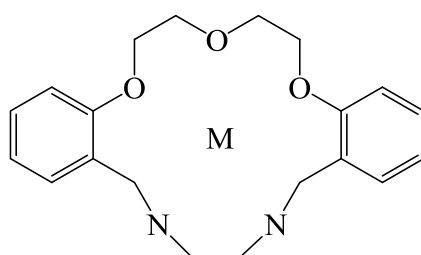


Figura 2.1.2 Complejo ML

Se llevará a cabo la funcionalización exocíclica de H_2L con *pendant-arms*, de manera que se puedan obtener receptores con una mayor capacidad encapsulante, y con distintas propiedades coordinativas. La síntesis de R_2L se llevará a cabo mediante la N-alquilación del ligando H_2L , por reacción con el 3-(2-bromoetil)-indol en medio básico.

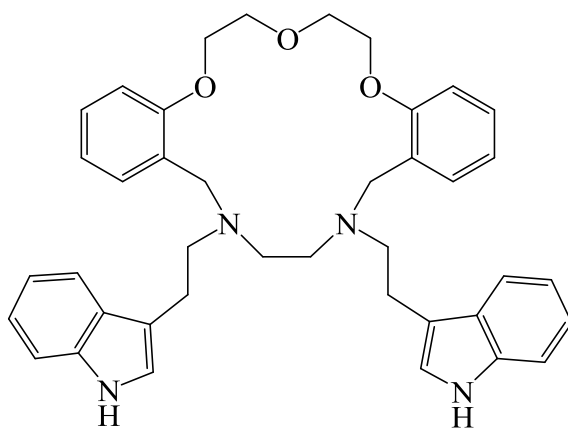


Figura 2.1.3 Ligando R₂L

Se analizará la capacidad coordinativa de R₂L mediante reacciones de complejación con diferentes iones de metales de transición y post-transicionales. Las sales metálicas utilizadas fueron los correspondientes nitratos de Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ y Cd²⁺.

Finalmente, se analizará la posible capacidad como catalasa, por el método Amplex[®] Red-Hydrogen Peroxide, de los ligandos y algunos de los complejos metálicos.

Con ello, se espera aportar nuevos conocimientos a la Química de Coordinación Macro-cíclica y a la Química Bioinorgánica.

Para llevar a cabo los objetivos descritos se propone el siguiente plan de trabajo:

2.2 PLAN DE TRABAJO

2.2.1 Síntesis directa y caracterización del ligando macrocíclico H₂L.

2.2.2 Síntesis electroquímica y caracterización de los complejos metálicos derivados de H₂L.

2.2.3 Síntesis y caracterización del ligando macrocíclico R₂L.

2.2.4 Síntesis directa y caracterización de los complejos metálicos derivados de R₂L.

2.2.5 Análisis de las propiedades de los ligandos y complejos como agentes enzimáticos.

Las caracterizaciones se llevaron a cabo por diversas técnicas:

- Análisis elemental.
- Espectroscopia de IR.
- Espectrometría de masas.
- Espectroscopia RMN de ¹H.
- Estudio de la actividad catalasa.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS

3.1.1 Reactivos

Todos ellos son productos comerciales utilizados sin purificar, excepto el *O'*,*O*⁷-bis(2-formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano que se sintetizó a partir de salicilaldehído y 1,5-dicloro-3-oxapentano.

Tabla 3.1.1.1 Reactivos empleados

Reactivo	Calidad	Casa comercial	Empleo
Salicilaldehído	Purísimo	ALDRICH	Síntesis
1,5-Dicloro-3-oxapentano	Purísimo	FLUKA	Síntesis
Hidróxido de sodio (NaOH)	98%	PANREAC	Síntesis
Etilendiamina	99,5%	ALDRICH	Síntesis
Borohidruro sódico (NaBH ₄)	>95%	TCI	Síntesis
3-(2-Bromoetil)-indol	97%	ALDRICH	Síntesis
Carbonato sódico (Na ₂ CO ₃)	Purísimo	PANREAC	Síntesis
Sulfato sódico anhidro (Na ₂ SO ₄)	Purísimo	ALDRICH	Secado disolventes

Para la obtención de los complejos se utilizaron las sales metálicas y los metales de la tabla 3.1.1.2:

Tabla 3.1.1.2 Sales metálicas y metales empleados

Sales metálicas	Calidad	Casa comercial	Empleo
Cu(NO ₃) ₂ ·3H ₂ O	Purísimo	PANREAC	Síntesis
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	98%	ALDRICH	Síntesis
Ni(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	Purísimo	PANREAC	Síntesis
Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	Purísimo	ALDRICH	Síntesis
Cd(NO ₃) ₂ ·5H ₂ O	Purísimo	PANREAC	Síntesis
Cobre metal	99,98%	ALDRICH	Síntesis
Níquel metal	99,98%	ALDRICH	Síntesis
Cobalto metal	99,95%	ABCR	Síntesis
Zinc metal	99,9%	ABCR	Síntesis

3.1.2 Disolventes

Tabla 3.1.2.1 Disolventes empleados

Disolvente	Calidad	Casa comercial	Empleo
DMSO	Puro	PANREAC	Síntesis
Metanol	99,99%	Fisher Chemical	Síntesis
Acetonitrilo	99,99%	Scharlau	Síntesis
Éter etílico	99,5%	PANREAC	Precipitación
Diclorometano	99,99%	Fisher Chemical	Síntesis y extracción L-L
Cloroformo-d ₁	99,8%	ALDRICH	RMN

3.2 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

3.2.1 Análisis elemental

Los porcentajes de C, H y N fueron determinados en un analizador elemental FISIONS modelo EA 1108.

3.2.2 Espectroscopia IR

Los espectros se realizaron en un espectrofotómetro VARIAN FT-IR 670 con MICROSCOPIO VARIAN 610 IR MAPPING ACOPLADO. Todas las muestras se registraron en pastillas de KBr.

3.2.3 Espectrometría de masas

Los espectros ESI-TOF de ión positivo se realizaron en un espectrómetro de masas BRUKER MICROTOF. Se empleó un espectrómetro BRUKER AUTOFLEX para los espectros MALDI de ión positivo, empleando DCTB como matriz, y NALDI de ión positivo.

3.2.4 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear

Para la realización de los espectros de RMN de ^1H se emplearon los espectrofotómetros: BRUKER DPX 250 y VARIAN INOVA 400.

3.2.5 Estudios Biológicos

Los estudios de actividad biológica se realizaron en un multilector FLUOSTAR OPTIMA.

3.3 SÍNTESIS DEL PRECURSOR

3.3.1 Síntesis del O^1, O^7 -bis(formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano²⁷

Se disuelve salicilaldehído (20,15 g, 165 mmol) en 20 mL de DMSO, a los que se añaden 70 mL de una disolución de NaOH 2,5 M y 1,5-dicloro-3-oxapentano (11,80 g, 82,5 mmol) en 20 mL de DMSO. La disolución se agita a ebullición durante 72 horas, en atmósfera de N₂. A continuación se añade hielo picado hasta que precipita un sólido marrón que se filtra y se recrystaliza en metanol 80% (V/V), obteniéndose finalmente un sólido de color marrón.

El rdto. de la reacción fue de un 55%.



Esquema 1

AE: C₁₈H₁₈O₅, % experimental (teórico): C: 67,3 (67,5); H: 6,0 (5,9). IR (KBr, cm⁻¹): 1684 ν(CO). FAB⁺ (m/z): 315 [L₁+H]⁺. RMN de ¹H (250 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 3,98 (t, 4H); 4,25 (t, 4H); 6,96-7,83 (m, 8H); 10,48 (s, 2H).

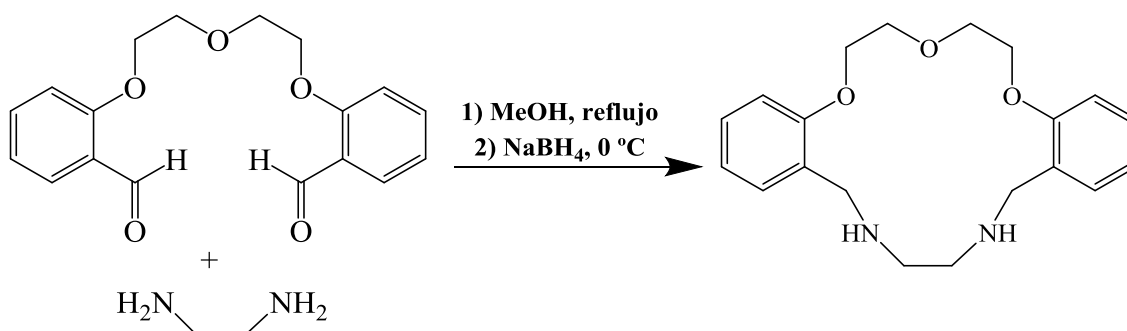
3.4 SÍNTESIS DE LOS LIGANDOS Y DE LOS COMPLEJOS METÁLICOS

3.4.1 Síntesis del ligando H₂L

Sobre una disolución en ebullición de O^1, O^7 -bis(formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano (0,640 g, 2,04 mmol) en 100 mL de metanol se añade etilendiamina (0,140 mL, 2,09 mmol) en 20 mL del mismo disolvente. La disolución resultante se mantiene en ebullición durante 30 minutos. A continuación, se deja enfriar hasta una temperatura próxima a 0 °C, y se adiciona cuidadosamente NaBH₄ (0,385 g, 10,2 mmol) en pequeñas porciones mientras se mantiene la agitación. Después de 2 horas, la disolución resultante se concentra en el rotavapor hasta un volumen aproximado de 60 mL y se adiciona hielo picado hasta triplicar ese volumen. La mezcla resultante se mantiene con

²⁷ K. R. Adam, A. J. Leong, L. F. Lindoy, H. C. Lip, B. W. Skelton, A. H. White, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4645, (1983).

agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Se ajusta el pH a 12 y se extrae con diclorometano (5x30 mL). La fase orgánica extraída se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y se concentra en el rotavapor, obteniéndose un gel marrón que se somete a vacío, dando lugar a un sólido marrón. Se disuelve en éter dietílico, se filtra y se deja evaporar el disolvente, obteniendo finalmente un sólido blanco. El rdto. de la síntesis fue del 60%.



Esquema 2

3.4.2 Síntesis electroquímica de los complejos metálicos de H₂L

Los complejos se obtienen por un procedimiento electroquímico partiendo del propio metal que constituye el ánodo de una celda electroquímica, la cual se conecta a una fuente de alimentación de voltaje variable y a un miliamperímetro.

La celda electroquímica está constituida por un vaso de precipitados de 100 mL que contiene una disolución del ligando H₂L y electrolito en 60 mL de acetonitrilo. El vaso de precipitados está cerrado por un tapón aislante de goma con dos agujeros que sirven de soporte para los electrodos: un hilo inerte de platino que constituye el cátodo y una lámina del correspondiente elemento metálico, con alto grado de pureza, como ánodo.

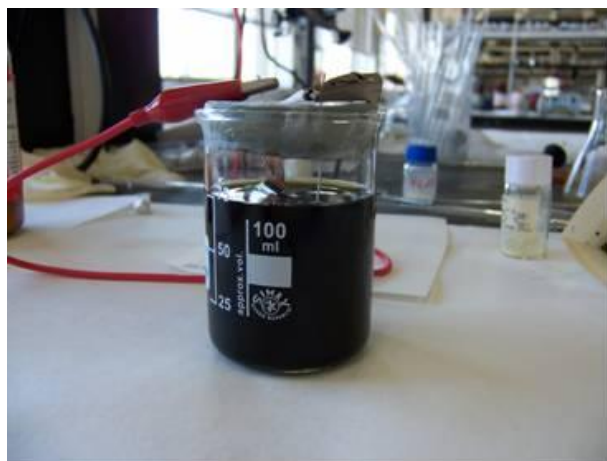


Figura 3.4.2.1 Celda electrolítica

Los electrodos se conectan a una fuente de alimentación de corriente continua que proporciona la energía necesaria para que tenga lugar la reacción. Esta fuente a su vez contiene un amperímetro que nos indica la intensidad de corriente a la que se está llevando a cabo la síntesis del complejo.



Figura 3.4.2.2 Fuente de alimentación

Durante la síntesis, el proceso de formación del compuesto es paulatino y se lleva a cabo lentamente regulando la intensidad de la corriente eléctrica que circula a través de la celda. Se aplica una intensidad de corriente de 5 mA.

Para la síntesis de todos los complejos metálicos se siguen los pasos que se detallan a continuación:

1. Se limpia la placa del metal a utilizar (en este caso cobalto, níquel, cobre y zinc) y el hilo de platino, lijándose suavemente y lavándose con acetona.
2. Se pesa la placa del metal antes de comenzar la reacción.
3. Se pesa la cantidad necesaria de ligando en función de la intensidad a la que se vaya a realizar la síntesis (0,032 g, 0,0933 mmol).
4. Se añade el electrolito, en este caso perclorato de tetraetilamonio.
5. Se añaden unos 60 mL de acetonitrilo, la cantidad necesaria para la disolución del ligando y el electrolito.
6. Una vez hecho esto se realiza el montaje de la celda y se deja que la reacción transcurra durante una hora manteniendo la intensidad constante.
7. Se deja evaporar lentamente el disolvente de la disolución resultante.
8. Se pesa de nuevo la placa metálica para determinar por diferencia la cantidad de metal que se ha consumido en la síntesis.

En todos los experimentos se puede observar un cambio de color en las disoluciones debido a la formación del complejo metálico, así como la liberación de hidrógeno en el cátodo como consecuencia de la desprotonación del ligando (reducción catódica).

Con el fin de determinar el mecanismo de reacción, se calcula la eficiencia electroquímica del proceso, E_f , para todas las experiencias. La eficiencia electroquímica se define como la relación que existe entre el número de moles de metal consumidos y el número de moles de electrones que circulan a través de la celda, es decir, el número de moles de metal que se consumirían teóricamente.

$$\text{N}^\circ \text{ de moles de metal consumidos} = \frac{\text{metal consumido (g)}}{M_{\text{at metal}} \text{ (g/mol)}}$$

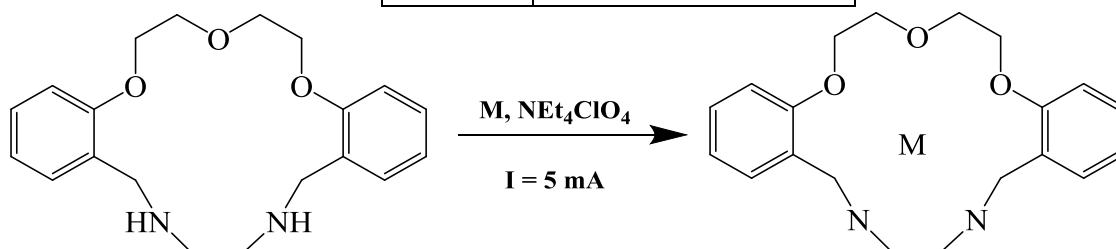
Por otra parte el N° de moles de metal que reaccionarían al aplicar una intensidad de corriente I (A) durante un cierto tiempo t (s), se puede expresar como la cantidad de corriente usada, entre la cantidad de corriente necesaria para que se oxide un mol de átomos de metal, ($F = 96485 \text{ C/mol}$). Así, matemáticamente la eficiencia se puede calcular mediante la expresión:

$$E_f = \frac{\text{metal consumido (g)} \cdot F \text{ (C / mol)}}{M_{\text{at metal (g / mol)}} \cdot t \text{ (s)} \cdot I \text{ (A)}}$$

Una vez calculada la eficiencia podemos saber el número de moles de electrones que intervienen en la reacción y, por lo tanto, el estado de oxidación alcanzado por los átomos metálicos, teniendo así información sobre cuál será el mecanismo de reacción. Se ha podido comprobar que prácticamente en todos aquellos casos en los que el metal presenta diferentes estados de oxidación bien definidos, la oxidación anódica lleva inicialmente al metal a su estado de oxidación más bajo. Esto es muy interesante si lo que se pretende es la obtención de compuestos en estos estados de oxidación bajos, en cuyo caso, la estrategia se centra en diseñar de forma adecuada los ligandos, de tal forma que una vez se origine esta especie, pueda ser estabilizada y no sufra una oxidación adicional en la disolución.

Tabla 3.4.2.1 Complejos metálicos

Metal	Color disolución
Cobre	Verde oscuro
Níquel	Verde claro
Cobalto	Marrón
Zinc	Blanco



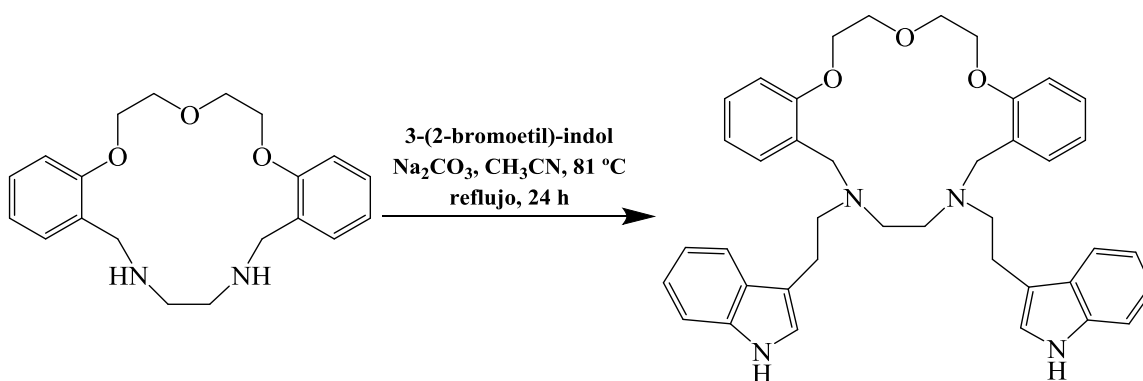
Esquema 3

Tabla 3.4.2.1 Datos de los complejos metálicos de H₂L

Complejo	Metal (g)	Ligando (g)	E _f
CuL	0,0052	0,032	0,94
NiL	0,0048	0,032	0,44
CoL	0,0051	0,032	0,46
ZnL	0,0050	0,032	0,49

3.4.3 Síntesis del ligando R₂L

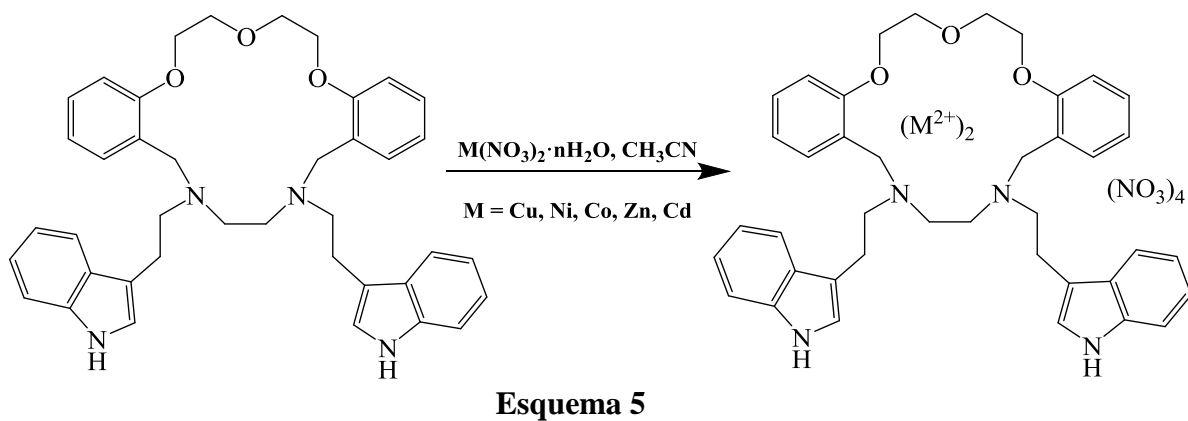
Sobre una disolución del ligando H₂L (0,160 g, 0,46 mmol) en 20 mL de acetonitrilo se adiciona Na₂CO₃ (0,240 g, 2,26 mmol). La mezcla se lleva a ebullición y se añade 3-(2-bromoetil)-indol (0,206 g, 0,92 mmol) disuelto en 5 mL del mismo disolvente. La disolución se mantiene en ebullición durante 24 horas. Se filtra para eliminar un precipitado inicial y el filtrado se concentra a sequedad en el rotavapor. Se añade agua hasta la disolución del producto y se realizó una extracción con diclorometano (5x50 mL). La fase orgánica se seca con Na₂SO₄ anhidro, se filtra y posteriormente se concentra en el rotavapor, obteniéndose un aceite marrón que se somete a vacío, aplicando aire caliente hasta que se forma un sólido pulverulento de color amarillo claro que se caracteriza adecuadamente. El rdto. de la síntesis fue del 63%.



Esquema 4

3.4.4 Síntesis de los complejos de R₂L

Sobre una disolución del macrociclo R₂L (aprox. 0,04 mmol) en 20 mL de CH₃CN, se adiciona lentamente una disolución de la correspondiente sal metálica M(NO₃)₂·nH₂O (aprox. 0,04 mmol) en un 5 mL del mismo disolvente. La disolución se mantiene con agitación magnética, a temperatura ambiente, durante 4 horas. La disolución resultante se concentra en el rotavapor hasta un volumen aproximado de 10 mL y se agita con éter etílico hasta su transformación en un sólido pulverulento que se separa por centrifugación y se seca a vacío. Los complejos se caracterizan adecuadamente.



En la tabla 3.4.4.1 se recogen los datos correspondientes a la síntesis de los complejos metálicos de R₂L:

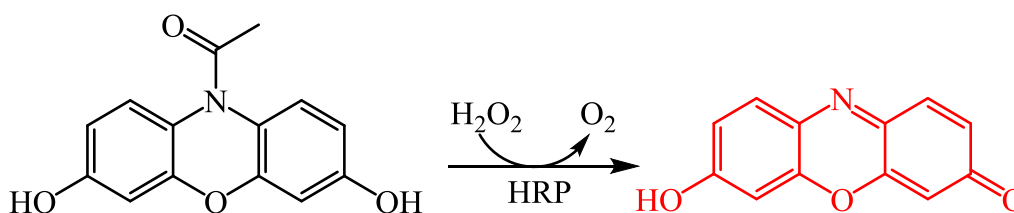
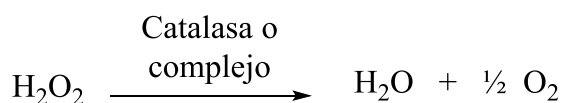
Tabla 3.4.4.1 Complejos metálicos del ligando R₂L

Complejos metálicos	Sal metálica (g)	R ₂ L (g)	Rdto (%)	Color
[R ₂ LCu ₂](NO ₃) ₄ ·7H ₂ O	0,012	0,025	48	Violeta oscuro
[R ₂ LNi ₂](NO ₃) ₄ ·H ₂ O	0,014	0,025	40	Verde claro
[R ₂ LCu ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O·Et ₂ O	0,012	0,025	25	Marrón
[R ₂ LZn ₂](NO ₃) ₄ ·2H ₂ O·Et ₂ O	0,012	0,025	23	Blanco
[R ₂ LCd ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O	0,015	0,025	36	Blanco

3.5 ACTIVIDAD CATALASA

La actividad enzimática como mimético de la catalasa de los compuestos sintetizados se evaluó bajo condiciones fisiológicas, esto es, en una disolución acuosa a un pH entre 7,2-7,4 y a concentraciones micromolares tanto de catalizador como de H₂O₂. El ensayo se realizó a una temperatura constante de 37 °C en un volumen total de 1 mL conteniendo: 50 mM de disolución tampón fosfato, 100 μM H₂O₂ y la cantidad apropiada del compuesto a analizar. Para este ensayo se pesó aproximadamente 1 mg de cada compuesto y se disolvieron en DMSO. El control que se utilizó fue catalasa de ligando bovino a una concentración de 0,5 U/L.

A diferentes intervalos de tiempo, se diluyen alícuotas de la mezcla de reacción (1/100) en la disolución tampón de fosfato de sodio y se cuantifica, mediante el método *Amplex[®] Red-Hydrogen Peroxide*, la cantidad de peróxido de hidrógeno que queda sin descomponerse en la alícuota. El reactivo principal de este método es 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina que reacciona estequiométricamente con H₂O₂ en presencia de HRP (Horseradish Peroxidase) para producir resorrufina, que es un producto fluorescente. La cantidad de H₂O₂ no degradada, o lo que es lo mismo, la cantidad de resorrufina generada es cuantificada mediante la medición de la intensidad de fluorescencia producida. La intensidad de fluorescencia producida es, por lo tanto, inversamente proporcional a la actividad como catalasa del compuesto. Cuanto mayor sea la actividad del complejo, menor cantidad de peróxido de hidrógeno quedará sin degradar y por lo tanto se formará también una menor cantidad de resorrufina, siendo menor la señal de fluorescencia.



Esquema 6

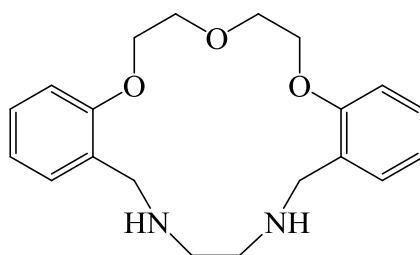
Para medir H_2O_2 se mezclaron volúmenes iguales de muestra y de *Amplex[®] Red-HRP*. La mezcla de reacción final contenía 50 μM de *Amplex[®]* y 0,1 U/mL de HRP. Tras 10 minutos, la cantidad de resorrufina generada se cuantificó en un lector de placa fluorescente usando una longitud de onda de excitación de 545 nm y emisión de 590 nm.

Simultáneamente, para asegurarse de que los complejos a estudiar no modifican la intensidad de fluorescencia debido, por ejemplo, a que reaccionasen con el *Amplex[®] Red*, se llevaron a cabo experimentos de control, añadiendo únicamente las disoluciones de los complejos con el reactivo *Amplex[®] Red* en una disolución tampón de fosfato.

La actividad catalasa es expresada como velocidad de reacción en nanomoles de H_2O_2 descompuestos por minuto en la mezcla de reacción.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 SÍNTESIS DEL LIGANDO H₂L



El ligando H₂L fue sintetizado mediante una reacción directa en metanol entre la etilendiamina y el precursor dicarbonílico *O*¹,*O*⁷-bis(2-formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano en relación molar 1:1. Una vez obtenido el compuesto diimínico, se llevó a cabo una reducción utilizando NaBH₄. El compuesto obtenido se trató con éter dietílico obteniéndose un sólido de color blanco. Fue caracterizado adecuadamente por varias técnicas.

4.1.1 Análisis Elemental

Los datos de análisis elemental para el macrociclo H₂L se ajustan a la fórmula C₂₀H₂₆O₃N₂·2CH₃OH.

Tabla 4.1.1.1 Datos analíticos del ligando H₂L

AE %Experimental (teórico)			
Compuesto	%C	%N	%H
C ₂₀ H ₂₆ O ₃ N ₂ ·2CH ₃ OH	63,6 (64,3)	7,63 (7,14)	8,63 (8,22)

4.1.2 Espectroscopia IR

En el espectro IR del ligando H₂L no se observan bandas pertenecientes a los grupos carbonilo o azometino que pudieran indicarnos la presencia de los reactivos precursores sin reaccionar. Esto muestra la efectividad de la reacción de ciclocondensación y posterior reducción.

Las bandas más significativas son: $\nu(\text{NH})^{28}$ 3272; $\delta(\text{NH})$ 1654 débil; y $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1601 cm^{-1} .

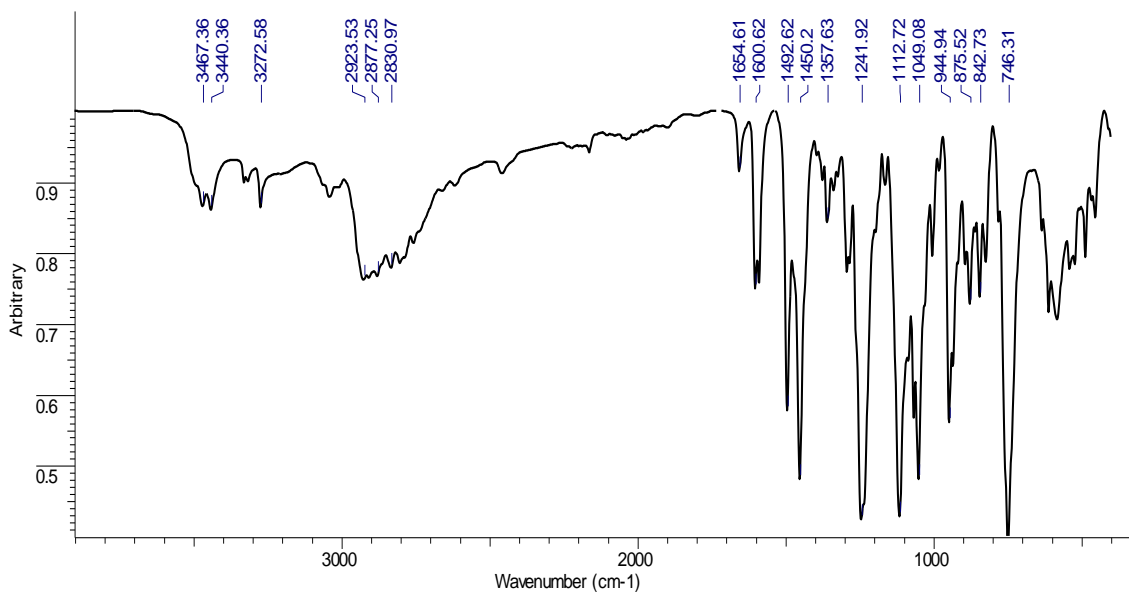


Figura 4.1.2.1 Espectro de IR (Pastilla de KBr) del ligando H₂L

4.1.3 Espectrometría de masas

El espectro de masas del ligando H₂L, realizado con la técnica ESI-TOF-FIA, confirma la presencia del macrociclo, ya que puede observarse un pico de elevada intensidad con valor de m/z de 343 u.m.a. correspondiente al ligando protonado $[\text{H}_2\text{L}+\text{H}]^+$.

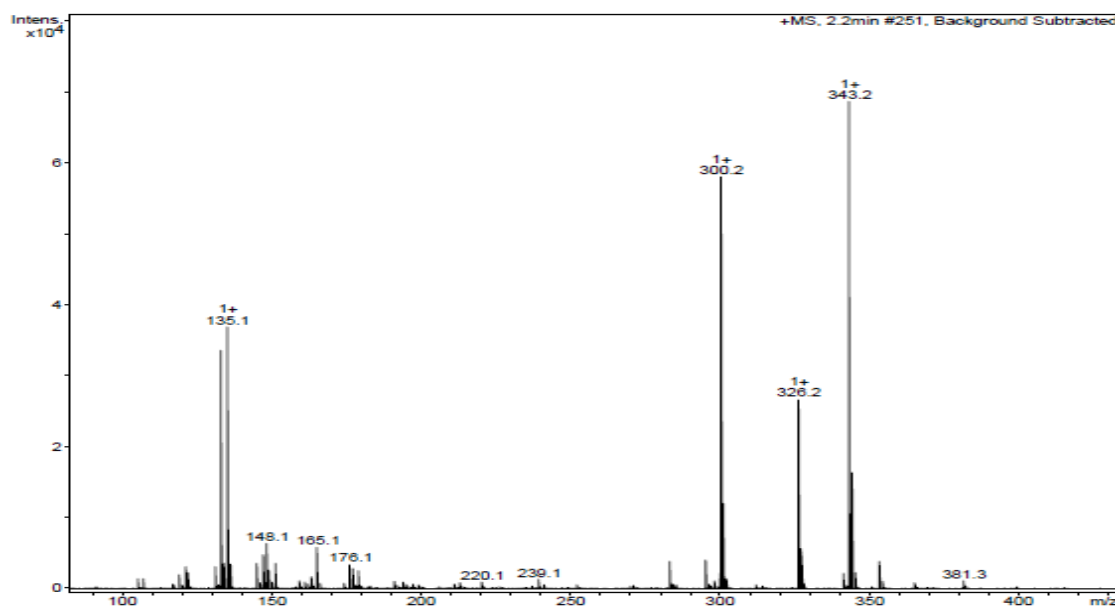


Figura 4.1.3.1 Espectro de masas ESI-TOF del ligando H₂L

²⁸ E. Pretsch, P. Bühlmann, C. Affolter, A. Herrera, R. Martínez, *Determinación estructural de compuestos orgánicos*, 270, (2002).

4.1.4 Espectroscopia de RMN de ^1H

El espectro de RMN de ^1H del ligando H_2L fue realizado en CDCl_3 . El desplazamiento químico al que se observan las señales, las integrales y su intensidad confirman la estructura del macrociclo. El espectro confirma que en disolución existe un plano de simetría que contiene el oxígeno central de la cadena de poliéter y que atraviesa el enlace C-C de la cadena amínica.

Tabla 4.1.4.1 Asignación del espectro de RMN de ^1H del ligando H_2L

RMN de ^1H (CDCl_3)				
δ (ppm)	Multiplicidad	n° H	Asignación	
2,20	s. a.	6	h, impurezas	
2,63	s	4	i	
3,79	s	4	a	
3,91	m	4	g	
4,18	m	4	b	
6,83-7,20	m	8	c, d, e, f	

Las cadenas de $-\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ dan lugar a dos multipletes, lo que indica la inequivalencia magnética de las parejas de protones geminales debido a la rotación impedida de los enlaces C-C del macrociclo.²⁹

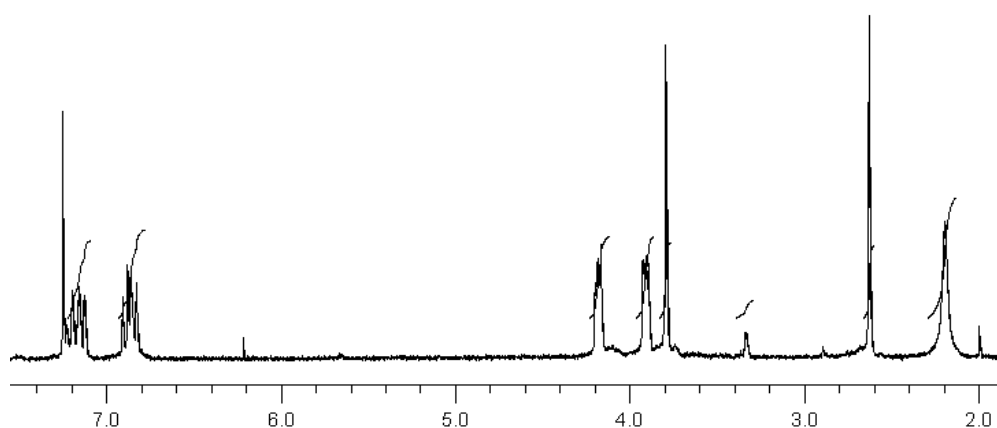


Figura 4.1.4.1 Espectro de ^1H -RMN de H_2L en CDCl_3

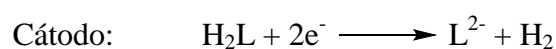
²⁹ N. A. Bailey, C. O. Rodríguez de Barbarín, D. E. Fenton, P. C. Hellier, P. D. Hempstead, M. Kanesato, P. B. Leeson, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 765, (1995).

4.2 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DE H₂L

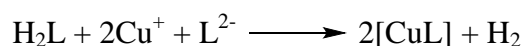
Se emplea el novedoso método de síntesis electroquímica para obtener complejos metálicos neutros [ML] del receptor H₂L. Para realizar dicho estudio, se emplean diferentes metales de transición y post-transicionales.

La síntesis electroquímica de los complejos metálicos se efectúa en acetonitrilo, siguiendo una relación molar metal-ligando 1:1.

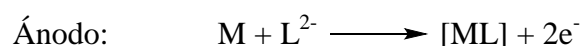
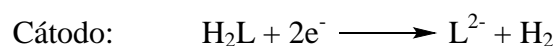
En la síntesis del complejo de cobre [CuL] el valor de la eficiencia es próximo a 1 mol/F, por tanto el proceso redox llevaría asociadas las siguientes reacciones:



Este proceso se acompañaría por la oxidación en disolución de Cu⁺ a Cu²⁺ según la reacción:



En la síntesis de los complejos de los demás metales [ML] los valores de las eficiencias son próximos a 0,5 mol/F. Estos valores sugieren un mecanismo de reacción como el siguiente:



Los productos obtenidos fueron sólidos de diferentes colores que se intentaron purificar con MeOH para eliminar el perclorato de tetraetilamonio y se caracterizaron por diversas técnicas.

Tabla 4.2.1 Complejos metálicos de H₂L

Complejos	Color
CuL	Verde oscuro
NiL	Verde claro
CoL	Marrón
ZnL	Blanco

4.2.1 Análisis elemental

Los datos obtenidos en el AE para los complejos de H₂L no fueron satisfactorios debido, probablemente, a la presencia de impurezas y de perclorato de tetraetilamonio utilizado en el proceso de síntesis.

4.2.2 Espectroscopia IR

Todos los complejos metálicos obtenidos presentaron un espectro de infrarrojo similar. Se realizaron en pastillas de KBr.

La presencia de una banda ancha en torno a 3438 cm⁻¹, debida probablemente a la vibración de tensión $\nu(\text{OH})$ de agua procedente del KBr empleado, dificulta el análisis de la banda $\nu(\text{NH})$ en esa zona del espectro, lo que permitiría evidenciar la desprotonación del ligando.

Asimismo, debido a la presencia de impurezas de perclorato de tetraetilamonio, se observa una banda muy intensa con máximos a 1122 y 1066 cm⁻¹ correspondiente a la $\nu(\text{ClO}_4^-)$, y otra con máximo a 634 cm⁻¹ correspondiente a la $\delta(\text{ClO}_4^-)$.³⁰

³⁰ L. de Cola, D. L. Smailes, L. M. Vallarino, *Inorg. Chem.*, **25**, 1729-1732, (1986).

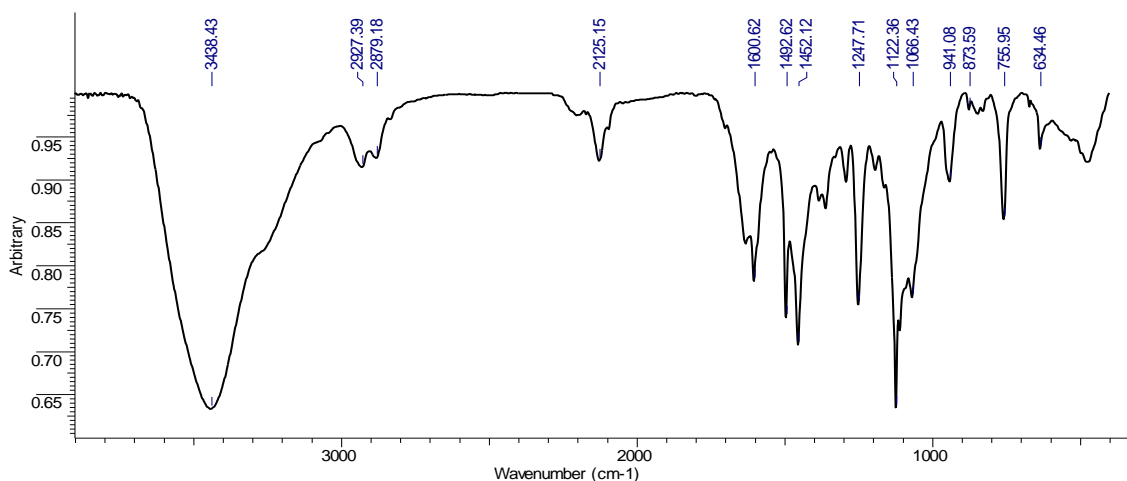


Figura 4.2.2.1 Espectro de IR (Pastilla de KBr) del complejo CuL

4.2.3 Espectroscopia de masas

Los espectros de masas de todos los complejos derivados de H₂L se realizaron mediante la técnica de MALDI, a excepción del Níquel que fue realizado por NALDI.

En el espectro del complejo de cobre se observa un pico a m/z de 405 u.m.a. correspondiente a $[\text{CuL}+\text{H}]^+$. El espectro del complejo de níquel presenta un pico a m/z de 399 u.m.a. que se corresponde con $[\text{NiL}]^+$. En el espectro del complejo de zinc se puede observar un pico a m/z de 343 u.m.a. correspondiente a $[\text{H}_2\text{L}+\text{H}]^+$. Desafortunadamente, no es posible asignar ningún pico a un fragmento reconocible en el espectro del Co.

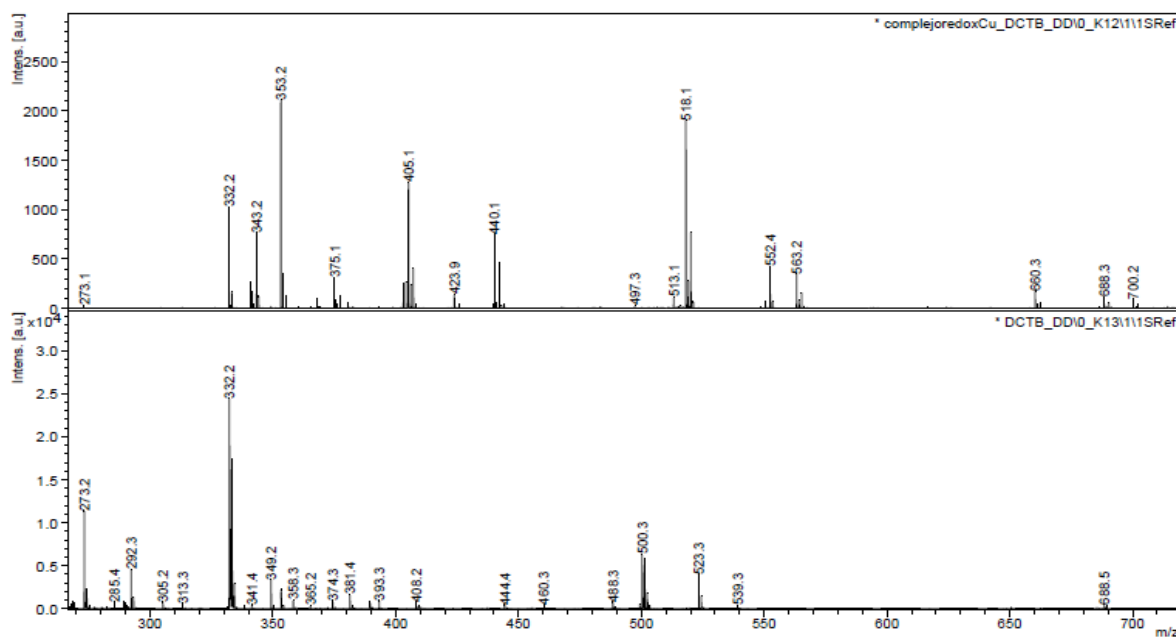
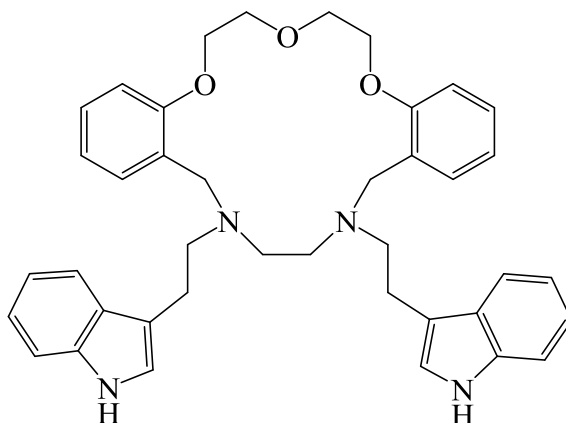


Figura 4.2.3.1 Espectro de masas MALDI de CuL

4.3 SÍNTESIS DEL LIGANDO R₂L



El macrociclo R₂L fue sintetizado a partir de una disolución del ligando H₂L en acetonitrilo mediante una reacción de N-alquilación, con 3-(2-bromoetil)-indol como agente alquilante, en relación molar 1:2. El ligando resultó ser un sólido amarillo muy claro. Fue caracterizado por varias técnicas.

4.3.1 Análisis Elemental

Los datos de análisis elemental para el macrociclo R₂L se ajustan a la fórmula C₄₀H₄₄O₃N₄·CH₂Cl₂.

Tabla 4.3.1.1 Datos analíticos del ligando R₂L

AE %Experimental (teórico)			
Compuesto	%C	%N	%H
C ₄₀ H ₄₄ O ₃ N ₄ ·CH ₂ Cl ₂	68,7 (69,0)	7,91 (7,85)	5,89 (6,45)

4.3.2 Espectroscopia IR

En el espectro IR del ligando R₂L la presencia de una banda ancha a 3421 cm⁻¹, correspondientes la vibración de la tensión $\nu(\text{OH})$ de las moléculas de agua procedentes del KBr, dificulta el análisis del espectro en la zona de las bandas $\nu(\text{NH})$ características de los grupos indol introducidos. No obstante, la presencia de bandas débiles a 1629 y 875 cm⁻¹ se pueden asignar a las vibraciones de flexión $\delta(\text{NH})$, confirmando la presencia del grupo indol.

Otras bandas significativas son $\nu(\text{C-N})$ 1095 y $\nu(\text{C=C})$ a 1456 cm⁻¹.

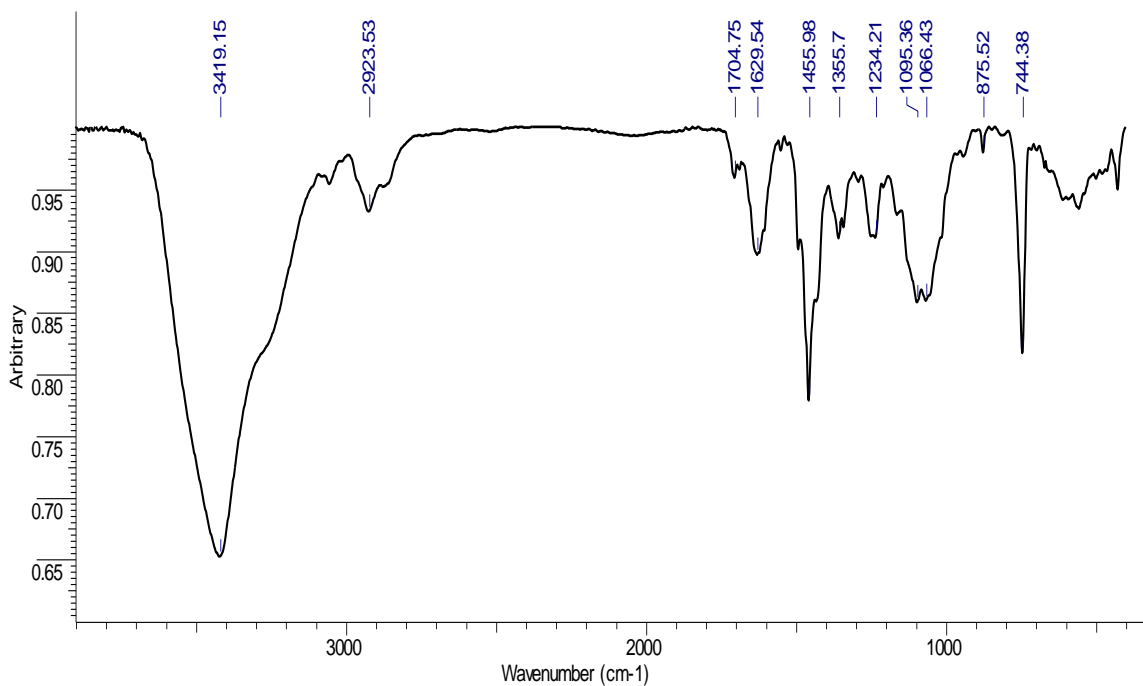


Figura 4.3.2.1 Espectro de IR (Pastilla de KBr) del ligando R_2L

4.3.3 Espectrometría de masas

El espectro de masas del ligando R_2L , realizado con la técnica ESI-TOF, confirma la presencia del nuevo macrociclo, ya que puede observarse un pico con valor de m/z de 629 u.m.a. correspondiente al ligando protonado $[R_2L+H]^+$. También se observa un pico con valor de m/z de 772 u.m.a. correspondiente al fragmento $[R_3L]^+$.

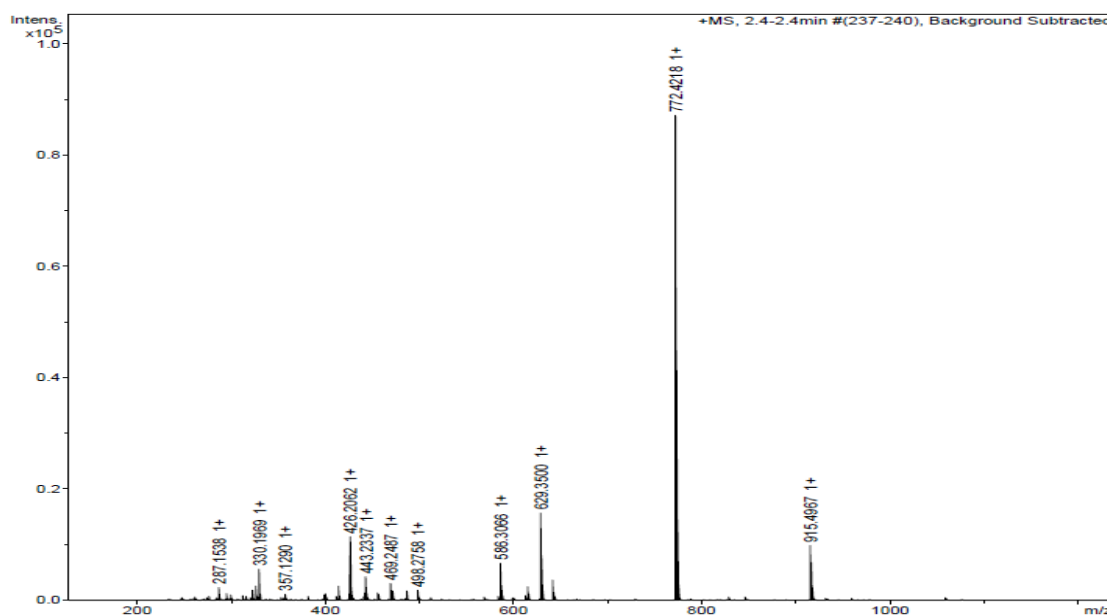


Figura 4.3.3.1 Espectro de masas ESI-TOF del ligando R_2L

4.3.4 Espectroscopia de RMN de ^1H

El espectro de RMN de ^1H del ligando R_2L fue realizado en CDCl_3 . El desplazamiento químico al que se observan las señales, las integrales y su intensidad confirman la estructura del macrociclo.

Tabla 4.3.4.1 Asignación del espectro de RMN de ^1H del ligando R_2L

^1H -RMN (CDCl_3)				
δ (ppm)	Multiplicidad	n° H	Asignación	
2,89	s. a.	12	h, i, j	
3,87	s. a.	8	a, g	
4,09	s. a.	4	b	
6,79-7,49	m	18	c, d, e, f, k, l, m, n, o	

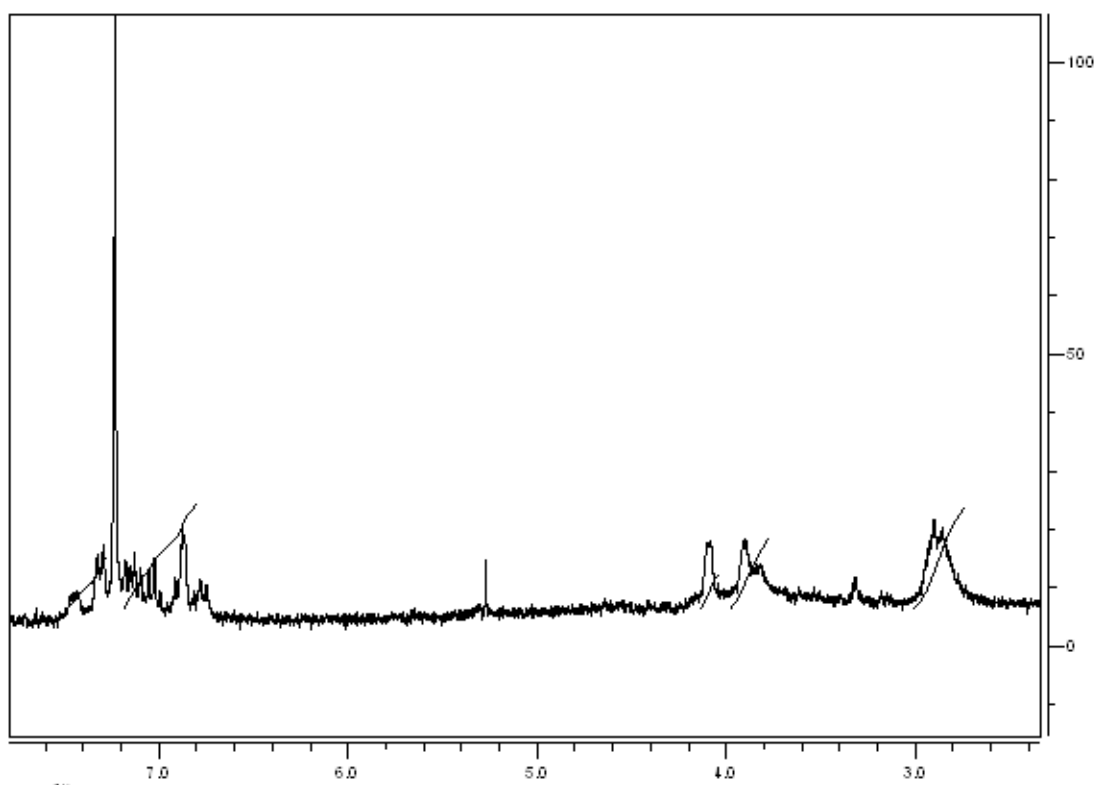


Figura 4.3.4.1 Espectro de ^1H -RMN de R_2L en CDCl_3

4.4 SÍNTESIS DE LOS COMPLEJOS DE R₂L

Se llevó a cabo un estudio de la capacidad de R₂L para coordinar distintos iones metálicos. Para realizar dicho estudio, se emplearon diferentes metales de transición y post-transición.

La síntesis directa de los complejos metálicos se efectuó en acetonitrilo, siguiendo una relación molar metal-ligando 1:1.

Los productos obtenidos fueron sólidos de diferentes colores que fueron caracterizados adecuadamente.

Tabla 4.4.1 Complejos metálicos de R₂L

Complejos	Color
[R ₂ LCO ₂](NO ₃) ₄ ·7H ₂ O	Violeta oscuro
[R ₂ LNi ₂](NO ₃) ₄ ·H ₂ O	Verde claro
[R ₂ LCu ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O·Et ₂ O	Marrón
[R ₂ LZn ₂](NO ₃) ₄ ·2H ₂ O·Et ₂ O	Blanco
[R ₂ LCd ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O	Blanco

4.4.1 Análisis elemental

A pesar de haber utilizado en la síntesis de los complejos una relación molar 1:1 (M:L), los datos obtenidos en el AE para los complejos son acordes con una formulación [R₂LM₂](NO₃)₄·xH₂O·yEt₂O.

Tabla 4.4.1.1 Datos analíticos de los complejos de R₂L

AE %Experimental (teórico)			
Complejos	%C	%N	%H
[R ₂ LCO ₂](NO ₃) ₄ ·7H ₂ O	47,2 (48,2)	9,08 (8,43)	5,27 (5,87)
[R ₂ LNi ₂](NO ₃) ₄ ·H ₂ O	47,1 (47,5)	10,8 (11,1)	4,31 (4,58)
[R ₂ LCu ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O·Et ₂ O	52,9 (53,4)	8,14 (8,49)	5,54 (5,91)
[R ₂ LZn ₂](NO ₃) ₄ ·2H ₂ O·Et ₂ O	47,3 (47,3)	9,72 (10,0)	4,99 (5,23)
[R ₂ LCd ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O	41,3 (41,6)	9,86 (9,70)	4,74 (4,36)

4.4.2 Espectroscopia IR

Todos los complejos metálicos obtenidos presentaron un espectro de infrarrojo similar (Tabla 4.4.2.1).

En primer lugar mencionaremos la presencia de una banda ancha en torno a 3415 cm^{-1} , que se corresponde con las vibraciones de tensión $\nu(\text{OH})$ del agua, lo que nuevamente dificulta ver la banda $\nu(\text{NH})$ del ligando. Se observan las bandas a 1625 y 875 cm^{-1} asignables al grupo indol, que apenas modifican su posición con respecto al ligando libre, lo que sugiere que estos grupos no están implicados en la coordinación.

Para este tipo de complejos resulta importante el estudio de las bandas correspondientes a los grupos NO_3^- , ya que sufren alteraciones en función de si el anión está o no coordinado y, en caso de estarlo, si actúa como monodentado o bidentado.

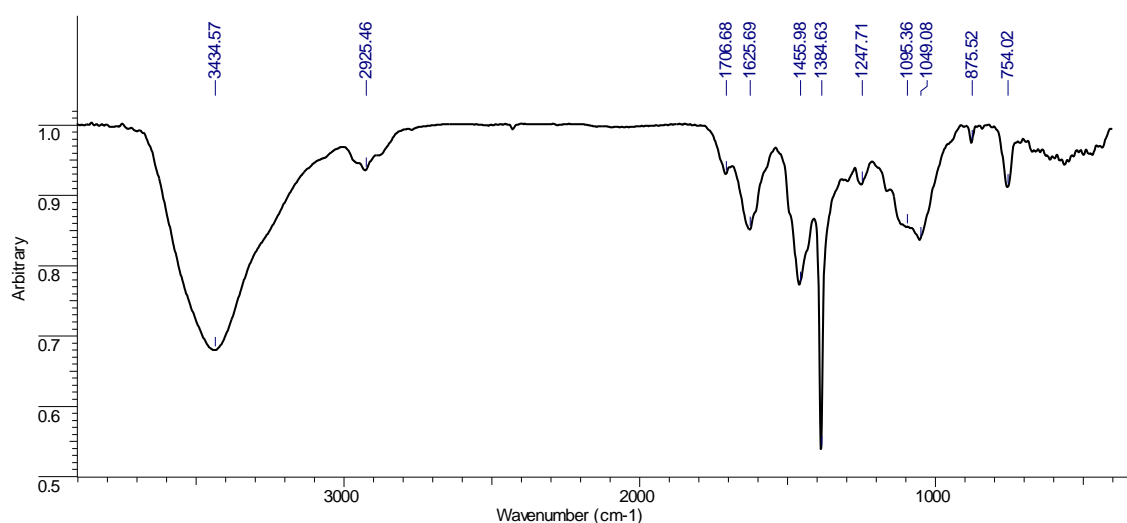
Pese a su interés, es complicado asignar si el enlace formado con el metal es monodentado o bidentado. Un nitrato iónico, con simetría D_{3h} , posee tres modos de vibración activos en IR (720 , 830 y 1390 cm^{-1}). Al coordinarse, tiene lugar una disminución de su simetría que conlleva un desdoblamiento, de las vibraciones de mayor y menor energía, en dos componentes cuyos modos de vibración son activos en IR. Por lo tanto serán observables seis vibraciones (ν_5 y ν_3 710 y 740 cm^{-1} ; ν_6 820 cm^{-1} ; ν_2 1030 cm^{-1} ν_4 y ν_1 1300 y 1500 cm^{-1}).³¹

Los espectros IR de los complejos sintetizados presentan una banda muy intensa en torno a 1385 cm^{-1} . Dicha banda es indicativa de la presencia del nitrato iónico. La asignación de grupos nitrato coordinados es más dificultosa, debido a que el resto de bandas son muy débiles en comparación con la de nitrato iónico. No obstante, en torno a 1050 cm^{-1} se observa una banda que podría ser indicativa de la presencia de grupos nitrato coordinados.

³¹ J. C. G. Bünzli, D. Wessner, *Coord. Chem. Rev.*, **60**, 191, (1984).

Tabla 4.4.2.1 Datos de espectroscopia IR de los complejos metálicos de R₂L

Complejos	ν (N--O) _{libre} /cm ⁻¹	ν (NO ₃) _{coord} /cm ⁻¹
[R ₂ LCu ₂](NO ₃) ₄ ·7H ₂ O	1385	1053
[R ₂ LNi ₂](NO ₃) ₄ ·H ₂ O	1385	1051
[R ₂ LCu ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O·Et ₂ O	1385	1049
[R ₂ LZn ₂](NO ₃) ₄ ·2H ₂ O·Et ₂ O	1385	-
[R ₂ LCd ₂](NO ₃) ₄ ·3H ₂ O	1385	1051

**Figura 4.4.2.1** Espectro de IR (Pastilla de KBr) de [R₂LCu₂](NO₃)₄·3H₂O·Et₂O

4.4.3 Espectrometría de masas

Los espectros de masas de todos los complejos derivados de R₂L se realizaron mediante la técnica de MALDI.

A excepción del complejo de cobre, todos poseen un pico a m/z de 629 u.m.a. que corresponde al fragmento [R₂L+H]⁺, y un pico a m/z de 772 que se asigna al fragmento [R₃L]⁺. No obstante, no es posible asignar ningún pico correspondiente a los complejos metálicos.

En el espectro del complejo de cobre, se distingue un pico a m/z de 818 u.m.a. que se corresponde al fragmento [R₂LCu(NO₃)₂+2H]⁺. También es observable un pico a m/z de 834 u.m.a. que podría asignarse al fragmento [R₃L+Cu+H]⁺.

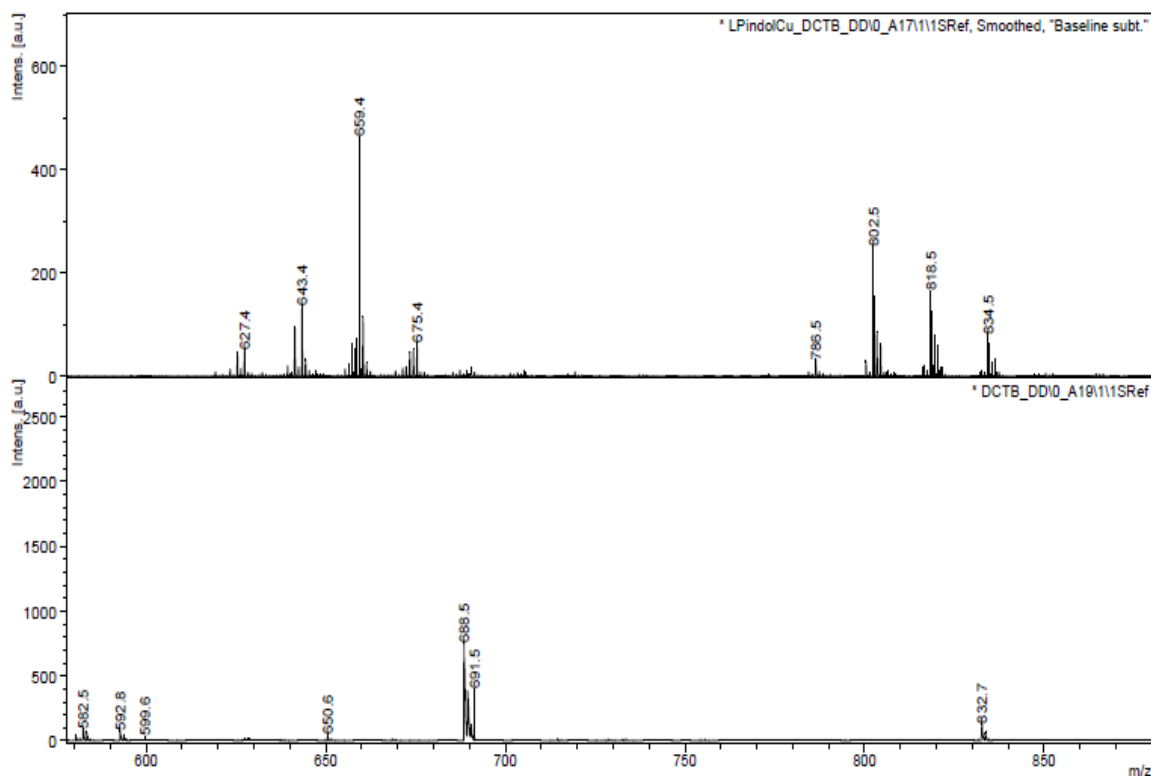


Figura 4.4.3.1 Espectro de masas MALDI de $[R_2LCu_2](NO_3)_4 \cdot 3H_2O \cdot Et_2O$

En ausencia de una estructura cristalina que nos permita confirmar la estructura de los complejos obtenidos, se propone la formación de un catión y un anión complejo $[R_2LM(NO_3)_x]^{n+}(M(NO_3)_y)^{n-}$, como se evidenció en estudios con ligandos similares realizados previamente en el grupo de investigación en el que se llevó a cabo el presente trabajo.³²

³² Cristina Núñez González, “Diseño, síntesis y propiedades de nuevos receptores aza-, oxaaza- y tiazamacrocíclicos y de sus complejos metálicos”. Tesis Doctoral, 285-288, (2009).

4.5 ESTUDIOS BIOLÓGICOS

El poder catalítico de los ligandos H₂L, R₂L y sus correspondientes complejos metálicos se evaluó cuantificando la fluorescencia de emitida por la resorrufina, un producto generado tras la reacción de oxidación del reactivo comercial *Amplex-Red*[®] mediada por el H₂O₂ presente en la reacción.³³ El ensayo se realizó simulando las condiciones fisiológicas, en una solución acuosa con pH 7,2-7,4 y a 37 °C. La cantidad de H₂O₂ no degradada por los compuestos es inversamente proporcional a la cantidad de resorrufina formada, y por lo tanto a la intensidad de fluorescencia. Como ya se indicó, con fines comparativos se expresarán los resultados como porcentajes relativos al poder catalítico de 0,5 U/mL de catalasa comercial obtenida de hígado bovino.³⁴

A una concentración 25 µM, todos los compuestos probados mostraron una cierta actividad catalítica, a excepción de ZnL. Esta actividad no llega a ser estadísticamente significativa para los ligandos solos, pero sí logra serlo para los complejos sintetizados. A la concentración utilizada, los compuestos que más despuntan son el de cobalto en la serie de H₂L (L1) y el de cobre en la serie de R₂L (L2).

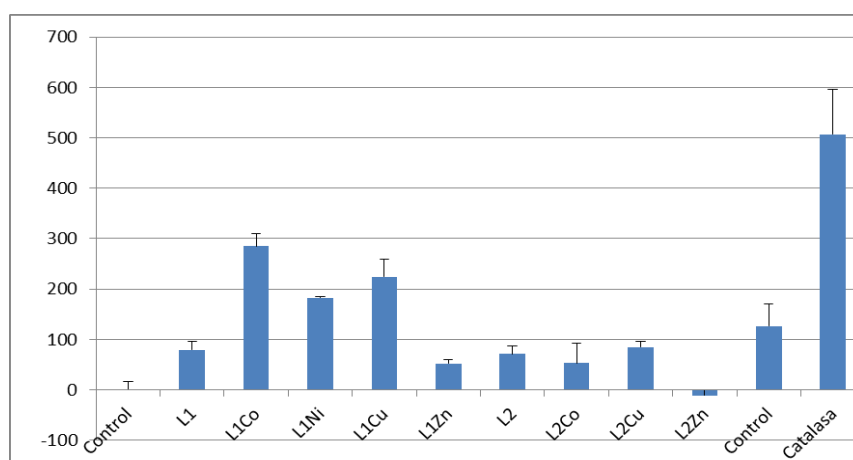


Figura 4.5.1 Efecto de los compuestos sintetizados (25 µM) sobre la degradación de H₂O₂. Cada barra representa la media ± E.S.M. para cinco experimentos

Demostrado el efecto antioxidante de los ligandos H₂L y R₂L y sus nitrato complejos, en un futuro se realizarían ensayos de supervivencia celular, probando la eficacia de estos compuestos en cultivos neuronales de embriones de rata,

³³ M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.*, **253(2)**, 162, (1997).

³⁴ E. Labisbal, L. Rodríguez, O. Souto, A. Sousa-Pedrares, J. A. García- Vázquez, J. Romero, A. Sousa, M. Yáñez, F. Orallo, J. A. Real, *Dalton Trans.*, **28(40)**, 8644, (2009).

en los que se evaluará su eficacia como neutralizadores de estímulos nerviosos tóxicos que contribuyen al envejecimiento celular. Para ello, las neuronas se sembrarán en una densidad de 100.000 células/mL y se mantendrán durante 8-10 días en un incubador a 37 °C y humedad constante. Posteriormente, serán expuestas durante 24 horas a distintas concentraciones de los compuestos y se cuantificará su viabilidad mitocondrial con una técnica colorimétrica.³⁵ Para comprobar “*in vivo*” el efecto neutralizador de radicales libres, en algunos de los cultivos neuronales se utilizará H₂O₂ como estímulo tóxico y se evaluará nuevamente la viabilidad en presencia y ausencia de compuesto.³⁶

³⁵ T. Mosmann, *J. Immunol Methods*, **65(1-2)**, 55, (1983).

³⁶ F. Luan, M. N. Cordeiro, N. Alonso, X. García-Mera, O. Caamaño, F. J. Romero-Duran, M. Yañez, H. Gonzalez-Díaz, *Bioorg. Med. Chem.*, **21(7)**, 1870, (2013).

5. CONCLUSIONES

1. Mediante la reacción entre el precursor O^1, O^7 , -bis(formilfenil)-1,4,7-trioxaheptano y etilendiamina en metanol y la posterior reducción realizada *in situ*, fue posible obtener el ligando precursor H_2L . La caracterización realizada por diversas técnicas confirmó su integridad.

2. Se llevó a cabo un estudio de la capacidad de coordinación de H_2L con diferentes iones metálicos (de transición y post-transicionales) mediante síntesis electroquímica con el fin de obtener complejos neutros $[ML]$. Se trabajó con una intensidad de corriente de 5 mA y un potencial de 20 V durante 1 h. Lamentablemente, los datos analíticos no fueron satisfactorios para confirmar la formulación $[ML]$ de los complejos.

3. El ligando H_2L y sus complejos metálicos presentan actividad como catalasa, obteniéndose la mayor actividad catalítica para el complejo de cobalto. A la vista de estos resultados se podrán realizar ensayos de supervivencia celular, probando la eficacia de estos compuestos como neutralizadores de estímulos tóxicos que contribuyen al envejecimiento celular.

4. La reacción de H_2L con 3-(2-bromoetil)-indol en acetonitrilo, en relación molar 1:2, dio lugar al ligando con *pendant-arms* R_2L mediante la alquilación de los grupos amina. Este ligando fue caracterizado por diversas técnicas.

5. Se llevó a cabo un estudio de la capacidad de coordinación de R_2L con diferentes iones metálicos, para ello fueron empleadas sales de diversos metales de transición y post-transicionales. Por síntesis directa de R_2L con las sales $M(NO_3)_2 \cdot n(H_2O)$ (con $M = Co, Ni, Cu, Zn$ y Cd) en relación molar 1:1 se obtuvieron los complejos de fórmula $[R_2LM_2](NO_3)_4 \cdot xH_2O \cdot yEt_2O$, sugiriendo la formación de un catión y anión complejo.

6. El ligando R_2L y sus nitrato-complejos resultaron ser positivos en actividad como catalasa, obteniéndose la mayor actividad catalítica para el nitrato-complejo de cobre. A la vista de estos resultados se podrán realizar ensayos de supervivencia celular, probando la eficacia de estos compuestos como neutralizadores de estímulos tóxicos que contribuyen al envejecimiento celular.

1. Through the reaction of O^1, O^7 -bis(formylphenyl)-1,4,7-trioxaheptane and ethylenediamine in methanol and the posterior *in situ* reduction, it was possible to obtain the ligand precursor, H₂L. The characterization made by different techniques confirmed its integrity.

2. It was developed a study of H₂L ability to coordinate different metallic ions (transition and post-transitional) through electrochemical synthesis. We worked with an amperage of 5 mA and a potential of 20 V potential for 1 h. Unfortunately, the analytic results weren't satisfactory to confirm the [ML] formulation of the complexes.

3. H₂L ligand and its metal complexes were found to show activity as catalase, obtaining the highest activity for cobalt complex. In view of the results cell survival assays can be made.

4. The reaction of H₂L with 3-(2-bromoethyl)-indol in acetonitrile as solvent, in 1:2 molar ratio, rose to the *pendant-arms* ligand R₂L substituting the amine groups. This ligand was characterized by different techniques.

5. A study of the R₂L ability to coordinate different metallic ions was developed. To this purpose, different transition and post-transitional metal salts were used in 1:1 molar ratio with R₂L. The complexes were obtained of formula $[R_2LM_2](NO_3)_4 \cdot xH_2O \cdot yEt_2O$.

6. R₂L ligand and its nitrate complexes were found to be positive in the enzymatic assay, obtaining the highest activity for copper nitrate complex. In view of the results cell survival assays can be made.