



UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA

Hilos moleculares basados en híbridos de oligonucleótidos y metales de transición



TESIS DOCTORAL

CON MENCIÓN EUROPEA

Noelia de la Luz Santamaría Díaz

Granada, abril de 2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Noelia de la Luz Santamaría Díaz

ISBN: 978-84-9125-957-2

URI: <http://hdl.handle.net/10481/44063>

Hilos moleculares basados en híbridos de oligonucleótidos y metales de transición

Memoria de Tesis Doctoral presentada por

D^a. Noelia de la Luz Santamaría Díaz para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

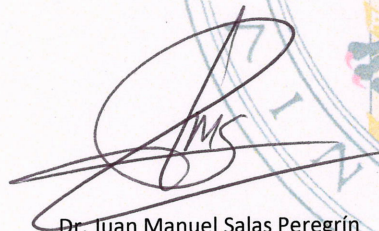
Granada, 29 de abril de 2016



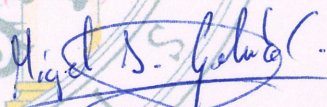
Noelia de la Luz Santamaría Díaz

Fdo. Noelia de la Luz Santamaría Díaz

LOS DIRECTORES DE LA TESIS



Dr. Juan Manuel Salas Peregrín
Catedrático de Química Inorgánica
de la Universidad de Granada



Dr. Miguel Ángel Galindo Cuesta
Investigador - Reincorporación de Doctores en
Química Inorgánica de la Universidad de Granada

La doctoranda **Noelia de la Luz Santamaría Díaz** y los directores de la tesis Dr. **Juan Manuel Salas Peregrín** y el Dr. **Miguel Ángel Galindo Cuesta**, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 29 de abril de 2016

La Doctoranda,



Fdo.: Noelia de la Luz Santamaría Díaz

Los Directores de la Tesis,



Dr. Juan Manuel Salas Peregrín
Catedrático de Química Inorgánica
de la Universidad de Granada



Dr. Miguel Ángel Galindo Cuesta
Investigador - Reincorporación de Doctores en
Química Inorgánica de la Universidad de Granada

A los que anheló.

A los que vivo.

A los que espero.

How these papers have been placed in sequence will be made manifest in the reading of them.

All needless matters have been eliminated, so that a history almost at variance with the possibilities of later-day belief may stand forth as simple fact. There is throughout no statement of past things wherein memory may err, for all the records chosen are exactly contemporary, given from the standpoints and within range of knowledge of those who made them.

Bram Stoker, *Dracula*.

AGRADECIMIENTOS

Y por fin llega el momento de escribir estas palabras. Las que más deseaba escribir, las que ninguna ciencia desarrollada o por desarrollar podrá despojar de la verdad que encierran. Porque son mis palabras, las mías de verdad. Las que encierran a duras penas todo el agradecimiento que me embarga, porque el camino ha sido largo, lleno de dudas y dificultades, pero, sobre todo, de personas únicas que me han acompañado y guiado entre las sombras para llegar a lo que soy hoy.

En primer lugar quiero agradecer a Juan Manuel y a Migue todo el apoyo y paciencia que han tenido conmigo en estos años en los que han guiado mis pasos por este mundo de investigación y universidad. Gracias por que bajo vuestra dirección he crecido, no sólo como química sino también como persona.

Tampoco me puedo olvidar de los que, sin ser mis directores oficiales, han sido mentores importantes en ciencia y espíritu. Gracias a todos y cada uno de los profesores del departamento, pero en especial a Juanma, Pepe, Enrique, Antoñillo y Belén, Miguel Quirós, Purí, Jose María, Jorge, Elisa, M^a Angustias, Javier y María por todos estos años compartiendo laboratorio, cruzadas de pasillo, alumnos y más de una cerveza. Sois una parte fundamental de mi paso por este departamento.

Todo aquel que lea estas palabras y haya pasado por el departamento creo que coincidirá en que Antonio de la Torre y M^a Carmen se merecen un párrafo para ellos solos. Y no sólo porque con su trabajo y buen hacer sean los mejores ejes del mecanismo que rige el departamento, sino porque para mí son como el padre al que siempre he podido recurrir cuando con mis embrolllos burocráticos, y la madre que te escucha, apoya y se siente orgullosa de los que crecemos junto a ella.

Pero no todo mi tiempo en este trabajo ha estado dedicado al cultivo de la mente, ¡ni mucho menos!: como principales responsables de mi mantenimiento físico durante estos años, agradezco enormemente a aquellos que se encuentran a un paseo de distancia, no muy agradable en los meses de invierno, pero junto a los cuales me he sentido a veces como en mi segundo laboratorio. Gracias todos los miembros del Centro

de Instrumentación que han contribuido de alguna manera con su trabajo a realizar todos los análisis que he necesitado, con más prisas o menos, con buenos resultados y no tan buenos. En especial a Laura, porque me hacía querer ir a RMN para poder charlar un ratito con ella y olvidar el estrés que me esperaba al cruzar la calle; a Miguel Ángel Salas, al que he tenido la suerte de hacer compañía durante muchas de mis horas dicroicas; y a Yolanda, porque da gloria tener vecinas laborales, y hueteñas, así de eficientes y encantadoras.

Una de las experiencias más maravillosas e inolvidables que me llevo de estos años de tesis y que ha supuesto un antes y un después en mi vida ha sido mi estancia en Liverpool. Thank you very much to Prof. Richard Nichols, Andrea, Wei, Nicolo and Bob to make me feel like one more of your group. I could never forget your help, my days besides you and my calzone challenger! Y por supuesto y de forma muy especial a David. Gracias por tu paciencia, por tus enseñanzas, por las horas de charlas made in Spain, por desentrañarme los misterios de los ingleses y por hacerme reír tantas y tantas veces. Muchísimas gracias de todo corazón a todos aquellos que me acogieron, arroparon y guiaron en mis días de sótano, oro y vibraciones indeseables.

Y los que hicieron esos días tan especiales, los culpables de que abra cierto “grifo” de vez en cuando al acordarme de lo lejos en la distancia que ahora están, son mi scouser family. Porque para mí fuisteis mi familia esos días y ahora, culpables de convertir un piso en apariencia frío y caótico en el lugar al que deseaba volver para encontraros y disfrutaros, increíblemente, desde el primer momento en el que Ángel bajó a abrirme cierta puerta de telefonillo perennemente escacharrado. Ángelillo, Martita, Iván, my dear Pau-Pau, Marta, Dylan, Arnon, Alba, ocupasteis y ocupáis e importante espacio en línea de vida.

Otra de las experiencias que guardo como oro en paño para saborear de vez en cuando son los congresos y cursos en los que, bailes e infusiones de seis bolsitas de tila aparte, se recogen momentos únicos e irrepetibles. Y son únicos e irrepetibles porque lo mejor de esos días son aquellos con los que los compartes, los cuales no pueden ser otros, y lo digo a “bocallena”, que mis becarios del departamento. Así que quiero dar las gracias, en primer lugar, a Sara, José Manuel, Elena, Víctor, Ismael, Kiko, Natalia, Marleny, Carmen, Rodrigo, Carlos, Migue,

Manu, Víctor, Ana, Rocío; gracias por soportarme y escucharme durante tanto tiempo y sobre todo durante estos días, ahora sí que sí tocan unas cervezas y a disfrutar celebrándolo con vosotros. Pero como soy de la vieja escuela, o mejor dicho, llevo en el departamento un poquito de tiempo nada más, no me puedo olvidar de los que estaban cuando llegué; aquellos que marcaron mis días pasados y que siguen siendo una parte importante en quien soy ahora: Ana, Fernando, Juanra, Chiquí, Elsa Valero, Carmen Montoro y Elsa Q, gracias por todo lo que hemos disfrutado juntos.

Y como soy una persona a la que le gusta comerse los bordes del bocadillo para disfrutar lentamente el centro, ya tocaba después de todo, y prometo no llorar mientras escribo, agradeceros a vosotros. Porque habéis hecho mis días entre las sombras más luminosos y porque lo mejor que llevo de todos estos años quiero agradeceros de todo corazón. Sílvia, Cala, Marta, Elo, que nuestros caminos se cruzaran en “ese” laboratorio ha sido solo el comienzo. Y como podéis imaginar no he podido mantener la promesa que os hecho al principio del párrafo. Os quiero, y mucho. Ya lo sabéis.

Pero mi vida estos años no ha sido sólo, aunque gracias a que me he andado con cuidado, horas de laboratorio. También mi mundo teatral, literario y por supuesto familiar se ha hecho más y más grande. Así que gracias de todo corazón a mi Club de Lectura que tanto me apoya y escucha. A mis teatreros remenderos a los que me entrego y que me entregan incondicionalmente lo más bello del ser humano entre esas paredes negras, en estados abraimóvicos, trágicos y llenos de la gran certeza que Nacho y Mayi nos hacen amar. A mis teatreros hueteños, porque disfruto tanto con vosotros en el escenario que no podéis imaginar el bálsamo que habéis supuesto para estos agotadores últimos meses. Gracias por ser el aliento que muchas veces he necesitado.

Y por fin he llegado he llegado a mi bocado preferido, el que llevo anticipando desde la primera de mis palabras, las mías, las que me salen del corazón. Vosotros sois lo más importante en mi vida, sois mi aliento, mis fuerzas, mis alegrías, mis esperanzas, sois mi religión, sois todo lo que sostiene esta marioneta de mujer. Este camino que he andado os lo entrego a vosotros porque de él sois dueños sin saberlo, y con él me alimentáis hacia el futuro. Mamá. Papá. Yeray. Emma.

Mimí. Abuela Isabel. Abuela Juana. Toñi. Pepe. Dorina. Nelly. William. Jose, mi Joseliyo. Os amo.

Y como soy una persona sensible, con los sentidos acabo. Porque esta tesis sabe a sal, suena a tres por cuatro, huele a hierbaluisa recién hecha, la puedes ver sonreír pese a todo, y cuando la tocas tiembla, expectante, por lo que está por llegar.

Abreviaturas y Acrónimos

Resumen (*Abstract*)

I. Introducción

II. Materiales y Métodos

2.1. Materiales

2.1.1. Nucleobases Modelo

2.1.1.a.1-metil-citosina (**mC**)

2.1.1.b. 1-etil-timina (**eT**)

2.1.1.c. N9-metil-7-deaza-adenina (**mdA**)

2.1.1.d. N9-propil-7-deaza-adenina (**pdA**)

2.1.1.e. N9-etil-adenina (**eA**)

2.1.1.f. N9-propil-guanina (**pG**)

2.1.1.f. N9-propil-7-deaza-guanina (**pdG**)

2.1.2. Ligandos

2.1.2.a. Ligandos hidroxio-hidroxio

2.1.2.a.1. Ácido 4-metoxipirimidina-2,6-dicarboxílico (**1**)

- 2.1.2.a.2. Ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridin-2,6-dicarboxílico (**2**)
- 2.1.2.a.3. (4-propoxipiridina-2,6-diil)dimetanol (**3**)
- 2.1.2.b. Ligandos hidroxio-amino
 - 2.1.2.b.1. Ácido 6-(aminometil)-4-propoxipicolínico (**4**)
 - 2.1.2.b.2. Ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico (**5**)
 - 2.1.2.b.3. Ácido 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxílico (**6**)
- 2.1.2.c. Ligandos amino-amino
 - 2.1.2.c.1. Piridin-2,6-diildimetanamina (**7**)
- 2.1.3. Complejos metálicos
 - 2.1.3.a. Complejos primarios de Pd(II), Pt(II) y Cu(II) con ligandos hidroxio-hidroxio
 - 2.1.3.a.1. [Pd(**cheld**)(CH₃CN)], **cheldPd**
 - 2.1.3.a.2. [Pd(**1**)Cl], **1Pd**
 - 2.1.3.a.3. [Pd(**2**)(H₂O)], **2Pd**
 - 2.1.3.a.4. [Pd(**3**)₂Cl₂], **3Pd**
 - 2.1.3.a.5. [Pt(**cheld**)(CH₃CN)], **cheldPt**
 - 2.1.3.a.6. K[Pt(**1**)Cl], **1Pt**
 - 2.1.3.a.7. [Cu(**1**)(H₂O)₂], **1Cu**
 - 2.1.3.b. Complejos primarios de Pd(II), Pt(II) y Cu(II) con ligandos hidroxio-amino
 - 2.1.3.b.1. [Pd(**5**)(NO₃)], **5Pd**
 - 2.1.3.b.2. [Pd(**6**)Cl], **6Pd**
 - 2.1.3.b.3. [Cu(**4**)(CH₃COO)(H₂O)], **4Cu**
 - 2.1.3.b.4. [Cu(**5**)₂](H₂O)₂, **5Cu**
 - 2.1.3.c. Complejos primarios de Pd(II), y Cu(II) con ligandos amino-amino
 - 2.1.3.c.1. [Pd(CH₃CN)(**pidiam**)], **pidiamPd**
 - 2.1.3.c.2. [Pd(**7**)Cl]₂·(PdCl₄)·(H₂O), **7Pd**
 - 2.1.3.c.3. [Cu(**7**)(NO₃)](NO₃), **7Cu**
 - 2.1.3.d. Complejos metal-nucleobase con ligandos de tipo hidroxio-hidroxio
 - 2.1.3.d.1. [Pd(**cheld**)(N3-mC)], **cheldPd_mC**

2.1.3.d.2. [Pd(**cheld**)(N1-mdA)], **cheldPd_mdA**

2.1.3.d.3. [Pd(**cheld**)(N1-pdA)], **cheldPd_pdA**

2.1.3.d.4. [Pt(**cheld**)(N3-mC)], **cheldPt_mC**

2.1.3.d.5. [Pt(**cheld**)(N1-mdA)], **cheldPt_mdA**

2.1.3.d.6. [Pt(**cheld**)(N1-pdA)], **cheldPt_pdA**

2.1.3.d.7. [Cu(**1**)(H₂O)(N3-mC)], **1Cu_mC**

2.1.3.d.8. [Cu(**1**)(H₂O)(N7-eA)], **1Cu_eA**

2.1.3.d.9. [Cu(**1**)(H₂O)(N1-pdA)], **1Cu_pdA**

2.1.3.d.10. [Cu(**1**)(H₂O)(N7-pG)], **1Cu_pG**

2.1.4. Síntesis de oligonucleótidos

2.1.4.a. Síntesis de **poly15**(^{7c}**A**)

2.1.4.b. Síntesis de **poly18**(^{7c}**A-T**)

2.1.4.c. Síntesis de **poly6**(NH₂-**A-T**)

2.1.4.d. Síntesis de **poly6**(NH₂-^{7c}**A-T**)

2.1.4.e. Síntesis de **poly10**(NH₂-**A-T**)

2.1.4.f. Síntesis de **poly10**(NH₂-^{7c}**A-T**)

2.1.5. Tampones

2.1.5.a. Tampón para las valoraciones con oligonucleótidos

2.1.5.b. Tampón para HPLC

2.2. Técnicas de caracterización

4. Tampones

2.2.2. Espectroscopia infrarroja (IR)

2.2.3. Resonancia magnética nuclear (RMN)

2.2.4. UV-visible y UV-visible de temperatura variable

2.2.5. Dicroísmo circular (CD)

2.2.6. Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

2.2.7. Difracción de Rayos X (DRX)

2.2.8. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

2.3. Métodos

IV. Síntesis y caracterización de los complejos primarios

4.1. Síntesis y caracterización de complejos primarios de Pd(II), Pt(II) y Cu(II) con ligandos hidroxido-hidroxido

4.1.1. $[\text{Pd}(\text{cheld})(\text{CH}_3\text{CN})]$, **cheldPd**

4.1.2. $[\text{Pd}(\mathbf{1})\text{Cl}]$, **1Pd**

4.1.3. $[\text{Pd}(\mathbf{2})(\text{H}_2\text{O})]$, **2Pd**

4.1.4. $[\text{Pd}(\mathbf{3})_2\text{Cl}_2]$, **3Pd**

4.1.5. $[\text{Pt}(\text{cheld})(\text{CH}_3\text{CN})]$, **cheldPt**

4.1.6. $\text{K}[\text{Pt}(\mathbf{1})\text{Cl}]$, **1Pt**

4.1.7. $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})_2]$, **1Cu**

4.2. Síntesis y caracterización de complejos primarios de Pd(II) y Cu(II) con ligandos hidroxido-amino

4.2.1. $[\text{Pd}(\mathbf{5})(\text{NO}_3)]$, **5Pd**

4.2.2. $[\text{Pd}(\mathbf{6})\text{Cl}]$, **6Pd**

4.2.3. $[\text{Cu}(\mathbf{4})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{H}_2\text{O})]$, **4Cu**

4.2.4. $[\text{Cu}(\mathbf{5})_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, **5Cu**

4.3. Síntesis y caracterización de complejos primarios de Pd(II) y Cu(II) con ligandos hidroxido-amino

4.3.1. $[\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})(\text{pidiam})]$, **pidiamPd**

4.3.2. $[\text{Pd}(\mathbf{7})\text{Cl}]_2 \cdot (\text{PdCl}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})$, **7Pd**

4.3.3. $[\text{Cu}(\mathbf{7})(\text{NO}_3)] \cdot (\text{NO}_3)$, **7Cu**

Bibliografía

V. Síntesis y caracterización de complejos metal-nucleobase

5.1. Síntesis de complejos de Pd(II), Pt(II) y ligandos hidroxido-hidroxido con nucleobases

- 5.1. [Pd(**cheld**)(N3-mC)], **cheldPd_mC**
 - 5.2. [Pd(**cheld**)(N1-mdA)], **cheldPd_mdA**
 - 5.3. [Pd(**cheld**)(N1-pdA)], **cheldPd_pdA**
 - 5.4. [Pd(**2**)(N1-pdA)], **2Pd_pdA**
 - 5.5. [Pt(**cheld**)(N3-mC)], **cheldPt_mC**
 - 5.6. [Pt(**cheld**)(N1-mdA)], **cheldPt_mdA**
 - 5.7. [Pt(**cheld**)(N1-pdA)], **cheldPt_pdA**
- 5.2. Síntesis de complejos de Cu(II) y ligandos hidroxido-hidroxido con nucleobases
- 5.2.1. [Cu(**1**)(H₂O)(N3-mC)], **1Cu_mC**
 - 5.2.2. [Cu(**1**)(H₂O)(N7-eA)], **1Cu_eA**
 - 5.2.3. [Cu(**1**)(H₂O)(N1-pdA)], **1Cu_pdA**
 - 5.2.4. [Cu(**1**)(H₂O)(N7-pG)], **1Cu_pG**

Bibliografía

VI. Interacción complejo-ADN

- 6.1. Estudio de la interacción de poly15(X) con complejos metálicos de Pd(II) (X: A, ⁷C¹⁴A)
- 6.2. Estudio de la interacción de poly15(X) con complejos metálicos de Cu(II) (X: A, ⁷C¹⁴A, T, C, G)

Bibliografía

VII. Interacción de iones de Ag(I) en moléculas de doble hebra de ADN

- 7.1. Estudio de la interacción Ag(I):poly18(X-T), X: A, ⁷C¹⁴A
 - 7.1.1. Estudio de estabilidad térmica del oligonucleótido poly18(⁷C¹⁴A-T) en presencia y ausencia de iones de Ag(I)
 - 7.1.2. Estudio por UV-visible de la interacción poly18(X-T), X: ⁷C¹⁴A, A

7.1.3. Estudio de la variación del pH del oligonucleótido poly18(⁷C-A-T) en presencia y ausencia de iones de Ag(I)

7.1.4. Estudio estructural del sistema por CD

Bibliografía

VIII. Conductance of hybrids Ag(I) - DNA

8.1. Conductance of system Ag(I) – DNA. Discussion

8.2. Conclusion

Bibliography

Conclusiones (*Conclusions*)

Anexos

ANEXO I: Tablas de valoración

ANEXO II: Datos cristalográficos

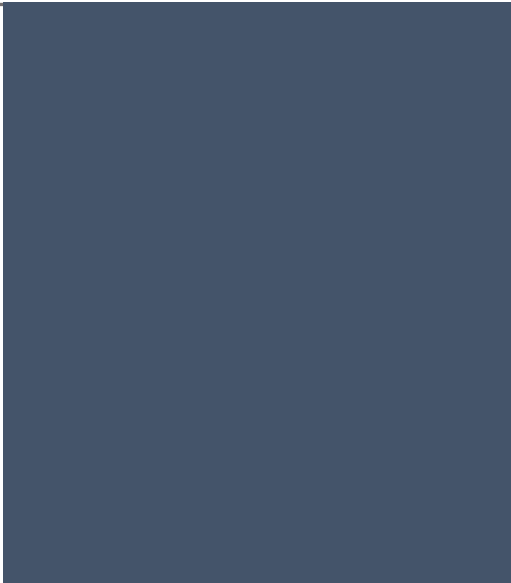
ANEXO III: Espectros de HRMS

ANEXO IV: Highly Stable Double-Stranded DNA Containing Sequential Silver(I)-Mediated 7-Deazaadenine/Thymine Watson–Crick Base Pairs (Artículo)

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

⁷ C A	7-deaza-adenina
A	Adenina
ACN	Acetonitrilo
AE	Análisis Elemental
AMA	30% amoniaco/40% metilamina
atm	Atmósfera (unidad de presión)
ATR	Reflectancia total atenuada
(Boc) ₂ O	dicarbonato Di-tert-butilo
cheld	ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico
CPG	Vidrio de poro controlado
Da	Dalton
DCM	diclorometano
DFT	Teoría del Funcional de la Densidad (<i>Density Functional Theory</i>)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMF anhy	<i>N,N</i> -dimetilformamida anhidra
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT	Dimetoxitritilo
DRX	Difracción de Rayos X
eA	N9-etil-adenina
eT	1-etil-timina
EM	Espectrometría de Masas
Equiv.	Equivalente
EtOH	Etanol
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución

HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
IR	Espectroscopia de Infrarrojo
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization-Time of Flight</i>
mC	1-metil-citosina
mdA	N9-metil-7-deaza-adenina
MeOH	Metanol
MOPS	3-(<i>N</i> -Morfolino) propano sulfonato
NMI	N-metilimidazol
pdA	N9-propil-7-deaza-adenina
P_m	Peso molecular
Pd/C	Paladio sobre carbón
pG	N9-propil-guanina
pidiam	2,6-piridín-dicarboxiamina
PS	Poliestireno
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
STM	<i>Scanning Tunneling Microscope</i>
STM-BJ	<i>Scanning Tunneling Microscope-based break-junctions</i>
T	Temperatura
TEEA	Tampón formado por ácido acético glacial, acetonitrilo y trimetilamina
TFA	Ácido trifluoroacético
T_m	Temperatura de desnaturalización
TBA hidróxido	Hidróxido de tetrabultiamonio
ua	Unidades de absorbancia
UV-visible	Espectroscopia Ultravioleta-Visible



Resumen
(Abstract)



El reto científico-tecnológico que plantea esta tesis doctoral consiste en desarrollar metodologías eficientes para conferir propiedades de interés tecnológico a los oligonucleótidos, con el fin de obtener nanomateriales con propiedades a la carta. En concreto, esta tesis persigue diseñar, sintetizar, caracterizar estructuralmente y estudiar las propiedades conductoras de nuevos hilos moleculares, basados en sistemas híbridos metal-ADN, obtenidos mediante procesos de auto-ensamblaje entre oligonucleótidos y compuestos de coordinación previamente diseñados o mediante la formación de oligonucleótidos que contengan iones de Ag(I) intercalados entre dobles la hebra de ADN, es decir, a través de la formación de pares de bases mediados por iones de Ag(I) .

Estos objetivos se pretenden conseguir mediante el desarrollo de dos metodologías;

- i) Mediante procesos de auto-asociación entre de los complejos metálicos, previamente programados, y moléculas de ADN de cadena simple.
- ii) Mediante el empleo de oligonucleótidos que contengan la nucleobase artificial 7-deaza-adenina en su secuencia de bases, con objeto de formar pares de bases mediadas por enlaces de coordinación.
- iii) Estudios de conductividad de los sistemas híbridos metal-ADN

A continuación se resumen los resultados obtenidos mediante el desarrollo y empleo de ambas estrategias. Finalmente, se resumirán los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades conductoras de los híbridos metal-ADN obtenidos a partir de la formación de pares de bases mediados por iones de Ag(I) .

1. Procesos de auto-asociación entre complejos metálicos y moléculas de ADN de cadena simple

Para este estudio se ha llevado a cabo, en primer lugar, el diseño y la síntesis de diferentes moléculas orgánicas que puedan actuar como ligandos y formar complejos metálicos, los cuales interactuarán posteriormente con las nucleobases o las hebras de oligonucleótidos.

Los ligandos orgánicos estudiados en este trabajo de tesis tienen las siguientes características en común:

- i) Son moléculas aromáticas-planos capaces de dar lugar a interacciones de apilamiento π - π
- ii) Son capaces de formar enlaces de hidrógeno cooperativos con los grupos amino y/o carbonilo complementarios presentes en las nucleobases
- iii) Son capaces de coordinarse a iones metálicos sin deterioro de las características anteriormente expuestas
- iv) Son portadores de grupos susceptibles de ser funcionalizados con objeto de introducir nuevas propiedades físico-químico en estos sistemas y sin poner en peligro las características anteriores.

Con estos objetivos se han sintetizado tres tipos de ligandos, clasificados de acuerdo a los grupos portadores capaces de formar enlaces de hidrógeno con las nucleobases:

- a) Ligandos hidroxó-hidroxó, que contienen grupos hidroxilo y/o carboxilo capaces de formar enlaces de hidrógeno con los grupos amino de las nucleobases (adenina y 7-deaza-adenina)
- b) Ligandos de tipo hidroxó-amino, portadores de grupos carboxilo y amino, capaces de formar enlaces de hidrógeno con los grupos carbonilo y amino de las nucleobases (guanina, 7-deaza-guanina y citosina)

propil-guanina (**pG**). Desafortunadamente no se han obtenido complejos entre la timina y **1Cu**, probablemente debido las repulsiones electrostáticas anteriormente descritas. Los estudios se han realizado tanto en estado sólido como en disolución.

La determinación estructural mediante DRX de los complejos **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** y **1Cu_pG** permitió determinar que la interacción entre el complejo y la nucleobase para el complejo **1Cu_eA** tiene lugar de forma casi coplanar (6.97°) favoreciendo la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo amino de la nucleobase y el grupo carboxilato del complejo. Sin embargo, para los complejos de **1Cu_mC**, **1Cu_pdA** y **1Cu_pG**, no se observa la interacción coplanar complejo-nucleobase (77.73° , 45.67° y 80.41° , respectivamente).

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente, los complejos **chlePd** y **1Cu**, serían buenos candidatos para estudiar su interacción y organización a lo largo de hebras de ADN de cadena simple. Por ello, estos complejos se utilizaron en los estudios de interacción frente a oligonucleótidos de cadena simple. Los oligonucleótidos frente a los que se ha estudiado esta interacción complejo-nucleobase consisten en secuencias homogéneas formadas por quince bases, canónicas como la adenina (A), la citosina (C), la guanina (G) y no canónicas como la 7-deaza-adenina ($^7\text{C}A$). El propósito de estos estudios ha sido que los complejos metálicos interaccionen con éstas monohebras homogéneas dando lugar al auto-ensamblaje de los mismos mediante la formación de un enlace de coordinación con uno de los átomos de nitrógeno disponibles en la nucleobase, así como por enlaces de hidrógeno que estabilicen y refuercen la interacción en este tipo de sistemas. Interacción que se ha comprobado que tiene lugar al realizar los estudios estructurales de los complejos metálicos y las mononucleobases (Figura 1).

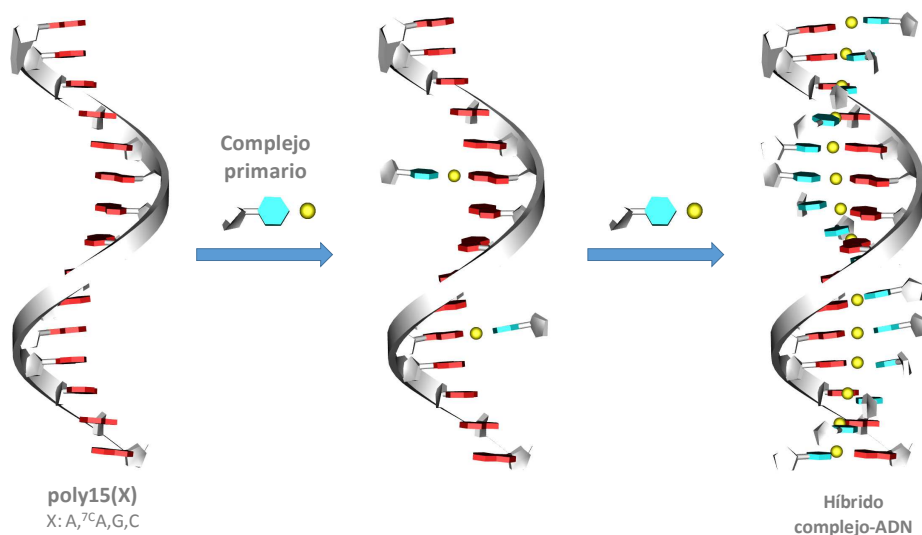


Figura 1. Representación de la interacción complejo primario-monohebra de ADN.

El complejo **cheldPd** se ha ensayado frente a las monohebras **poly15A** y **poly15(^{7C}A)** mientras que el complejo **1Cu** se ha ensayado frente a las monohebras **poly15A**, **poly15(^{7C}A)**, **poly15C** y **poly10G**.

2. Síntesis de oligonucleótidos que contengan pares de bases mediadas por enlaces de coordinación

Otra de las estrategias llevadas a cabo para la formación de híbridos metal-oligonucleótido ha consistido en el estudio de la formación de pares de bases mediadas por enlaces de coordinación. Se ha desarrollado una nueva estrategia que permite a un oligonucleótido auto-ensamblarse a través de sus enlaces de hidrógeno Watson-Crick, y que posteriormente se transforman en interacciones Watson-Crick pero mediadas por un enlace de coordinación en presencia de iones $Ag(I)$.

Concretamente, se ha sintetizado y caracterizado un oligonucleótido de 18 pares de bases de tipo ^{7C}A-T alternadas. Este oligonucleótido es capaz de alojar iones $Ag(I)$ en el interior de su doble hebra a través de la formación de pares de bases del

tipo ${}^7\text{C-A-Ag}^+\text{-T}$, donde un enlace de hidrógeno es reemplazado por un enlace de coordinación a un ion Ag(I) central (Figura 2).

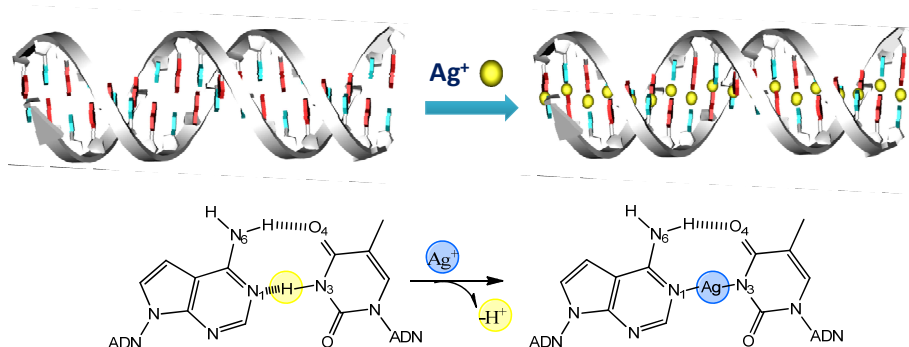


Figura 2. Formación de un sistema metal-ADN a través de la formación de pares de bases mediados por iones de Ag(I) .

La formación de este sistema metal-ADN constituido por pares de bases mediados por iones Ag(I) ha sido estudiado por diferentes técnicas como espectroscopia UV, dicroísmo circular, estabilidad térmica y HRMS.

Estos estudios han demostrado que es posible la formación de híbridos metal-oligonucleótido, altamente estables, a partir de un oligonucleótido previamente organizado a través de sus enlaces de hidrógeno Watson-Crick, mediante la sustitución de los enlaces de hidrógeno por enlaces de coordinación a unión Ag(I) .

3. Estudios de las propiedades conductoras de oligonucleótidos que contengan pares de bases mediadas por iones Ag(I) consecutivos

Por último, se ha llevado a cabo un estudio de las propiedades conductoras en los sistemas formados por dobles hebras de oligonucleótido capaces de alojar iones Ag(I) en su interior mediante la formación de pares de bases mediados por dicho ión. Estos estudios se han realizado mediante el empleo de la técnica *STM-break junction*

en colaboración con expertos en este campo como el Prof. Richard Nichols de la Universidad de Liverpool.

Se han realizado medidas de conductividad para estudiar el efecto de la formación de pares de bases $^{7C}A-Ag^+-T$ en el transporte de carga que tiene lugar en oligonucleótidos con pares de bases $^{7C}A-T$. Además, estos estudios han servido para estudiar cómo afecta la sustitución de nucleobase canónica adenina por 7-deaza-adenina al valor de la conductancia. Los oligonucleótidos empleados han sido el **poly6(NH₂-A-T)**, el **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** y el **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** capaces de dar lugar a pares de bases mediados por iones Ag(I) y adecuados para llevar a cabo las medidas de conductividad, ya que han sido modificados con un grupo amino terminal que permite la fijación del oligonucleótido a la superficie de deposición de la muestra y a la punta del STM (Figura 3).

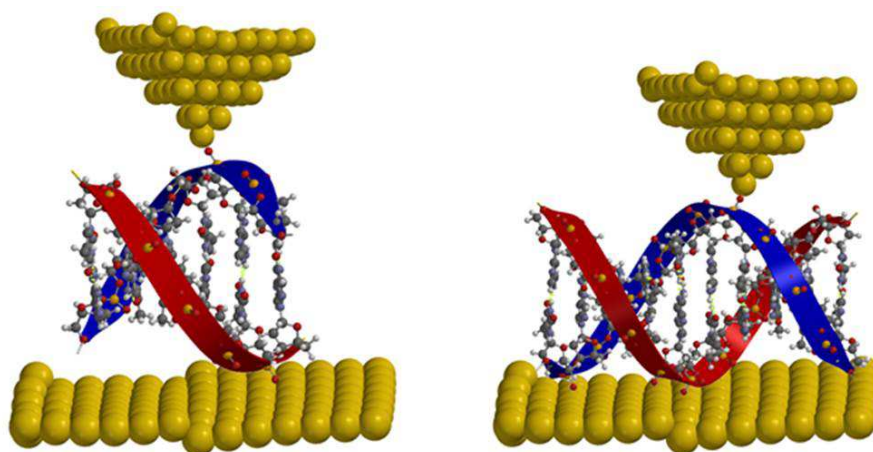


Figura 3. Representación del oligonucleótido **poly6(NH₂-A-T)** y **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** durante el registro de una medida de STM-break junction.

Una vez analizados los datos obtenidos por STM-BJ, se ha comprobado que el transporte de carga, que tiene lugar de forma natural entre pares de bases gracias al apilamiento $\pi-\pi^*$ de las nucleobases, no se ve afectado tras la interacción de iones

Ag(I) con los pares de bases originando híbridos $^{7C}A-Ag^+-T$; aunque la formación de estos sistemas implique un aumento en la estabilidad. Además de comprobar que la sustitución de la nucleobase canónica adenina por 7-deaza-adenina en el oligonucleótido no implica cambio alguno en el valor de la conductancia.

The scientific and technological challenge of this thesis is to develop efficient methodologies to introduce innovative properties to oligonucleotides in order to obtain nanomaterials with customized properties. Specifically, this thesis aims to design, synthesize, characterize and study the conducting properties of new molecular wires based on metallo-DNA hybrid systems, obtained by self-assembly processes between oligonucleotides and metal complexes or by the formation of silver-mediated base pairs inside double stranded DNA molecules.

In order to achieve the objectives of the thesis, two main methodologies were studied and investigated:

- i) Self-assembly processes between pre-programmed metal complexes and single-stranded DNA molecules
- ii) The use of oligonucleotides containing thymine/7-deaza-adenine base pairs within its base sequence, in order to form silver-mediated base pairs upon addition of silver(I) metal ions.

A summary of the outcomes obtained during the study and development of these methodologies is given subsequently, along with the results found for the conducting properties studies performed on these metallo-DNA hybrid systems.

1. Self-assembly process between metal complexes and ss-DNA molecules

Firstly, various organic molecules were designed, synthesized and characterized in an effort to obtain ligands capable of forming metal complexes for their subsequently interaction with nucleobases and oligonucleotides.

For the aim of this thesis, all organic ligands must fulfil the following characteristics:

- i) They consist of aromatic rings capable of participating in π - π stacking interactions
- ii) They are able to form cooperative hydrogen bonds with the amino and/or carbonyl groups of nucleobases
- iii) They can coordinate to metal ions without jeopardizing the preceding characteristics
- iv) They possess functional groups susceptible of chemical modification in order to introduce new physical-chemical properties into these systems without compromising the above characteristics.

Three types of ligands were prepared with these features, and classified according to their groups capable of forming hydrogen bonds with nucleobases:

- a) Hydroxo-hydroxo ligands, containing hydroxyl and/or carboxyl groups capable of forming hydrogen bonds with the nucleobases amino groups (adenine and 7-deaza-adenine)
- b) Hydroxo-amino ligands, containing carboxyl and amino groups capable of forming hydrogen bonds with the nucleobases carbonyl and amino groups (guanine, 7-deaza-guanine and cytosine)
- c) Amino-amino ligands, containing amino groups capable of forming hydrogen bonds with the nucleobase carbonyl groups of thymine

Subsequently, we performed a selection of the most suitable organic ligands to prepare metal complexes by reaction with Pd(II), Pt(II) and/or Cu(II) metal ions. Metal ions such as Pd(II) or Pt(II) were chosen due to the square plane geometry that provides their coordination environment, to the high affinity of these metal ions for nucleobases donor nitrogen atoms, their robustness coordination bonds and the easy to control their reactivity through the use of certain groups coordinated to the metal ion. In addition, Cu(II) metal ions were also employed to evaluate more labile coordination bonds, higher reaction kinetics and more varied coordination environments.

Afterwards, the interaction studies between Pd(II), Pt(II) and Cu(II) metal complexes and 1-methyl-cytosine (**mC**), 9-methyl-7-deaza-adenine (**mdA**), 9-propyl-

7-deaza-adenine (**pDA**), 9-propyl-guanine (**pG**), 9-propyl-7-deaza-guanine (**pdG**) and/or 1-ethyl-thymine (**eT**) were carried out both in solution and solid state.

The results obtained from the interaction studies showed the interaction of metal complexes **cheldPd**, **2Pd** and **cheldPt** (derived ligand hydroxo-hydroxo type) to the model nucleobases 1-methylcytosine (**mC**), 9-methyl-7-deaza-adenine (**mdA**) and 9-propyl-7-deaza-adenine (**pdA**). However, no interaction was found between the complexes and 9-propyl-guanine (**pG**) or 1-ethyl-thymine (**eT**). This could be due to the repulsion forces between nucleobases carbonyl groups and complexes hydroxo groups, along with the necessity to deprotonate for the **eT**. The interactions of **cheldPd** and **cheldPt** complexes with nucleobases have been studied in solid state (IR and XRD, in those cases where appropriate crystals of the complex were obtained) and solution ($^1\text{H-NMR}$, HRMS, UV-visible). In the case of **2Pd** complex these studies were carried out exclusively in solution ($^1\text{H NMR}$, HRMS) since it was not possible to isolate the **2Pd-nucleobases** complexes in solid state. The complexes **cheldPd_mC** and **cheldPd_pdA** were studied by XRD structural analysis indicating that only the complex **cheldPd_pdA** complex holds an almost coplanar (1.62°) configuration with the formation of an intramolecular hydrogen bond between the nucleobase exocyclic amino group and one of the complex carboxylate group. This is also seen for the isostructural **cheldPt_pdA** complex, which shows a dihedral angle of 1.49° and the formation of the equivalent hydrogen bonding complex-nucleobase. However, in the case of complex **cheldPd_mC**, the units hold an almost perpendicular (74.96°) configuration, with the absence of intramolecular hydrogen bonds.

Thus, the results obtained by DRX made possible to evaluate the formation of cooperative Watson-Crick hydrogen bonds between the complex carboxylate groups of **cheldPd**, **cheldPt** and the 7-deaza-adenine amino group, as well as the repulsion caused by the complexes carboxylate groups and the carbonyl group of the 1-methyl-cytosine.

The interaction between Cu(II) metal complexes, namely **1Cu** (derived from ligand hydroxo-hydroxo type), and model nucleobases was also studied in an effort to get some insight about the ability of this complex to interact with nucleobases

through the formation of both coordination and cooperative hydrogen bonds. The nucleobases containing exocyclic amino groups (adenine, cytosine and guanine) are the most suitable to interact with **1Cu** due to the presence of the carboxylate groups in the complex, since they can also form cooperative hydrogen bonds. However, those with carbonyl groups (cytosine, guanine and thymine) have a high probability to experience electrostatic repulsions with the carboxylate groups of the complex impeding the formation of **1Cu_nucleobase** complexes. To study these effects we have synthesized and characterized metal complexes with **1Cu** and the nucleobases N3-methyl-cytosine (**mC**), N9-ethyl-thymine (**eA**), N9-propyl-7-deaza-adenine (**pdA**) and N9-propyl-guanine (**pG**). Unfortunately, it was not possible to obtain complexes with thymine, probably due to electrostatic repulsions previously mentioned. The studies were performed in solid state and solution. XRD structural characterization of **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** and **1Cu_pG** complexes determined that the **1Cu_eA** complex holds an almost coplanar (6.97°) configuration facilitating the formation of an intramolecular hydrogen bond between the nucleobase amino group and the complex carboxylate group. However, this coplanar arrangement was not observed for **1Cu_mC**, **1Cu_pdA** and **1Cu_pG** complexes nucleobases (coplanar angles of 77.73° , 45.67° and 80.41° , respectively).

The information obtained from the synthesis and characterization of the complexes-nucleobases systems proved to be very important for the subsequent experiments completed to study the interaction of the complexes and oligonucleotides.

According to these results, **chlelPd** and **1Cu** complexes were the best candidates to study their interaction and organization along single-stranded DNA molecules (ss-DNA). Therefore, these complexes were used in the interaction studies against single-stranded oligonucleotides. These oligonucleotides consist of an homogeneous sequence formed by fifteen canonical bases, such as adenine (A), cytosine (C), guanine (G), or non-canonical nucleobases as 7-deaza-adenine (${}^7\text{C}$ A). These studies were performed to evaluate the interaction between metal complexes and homogeneous ss-DNA via self-assembly recognition, with the formation of supportive coordination bonds and hydrogen bonds (Figure 1).

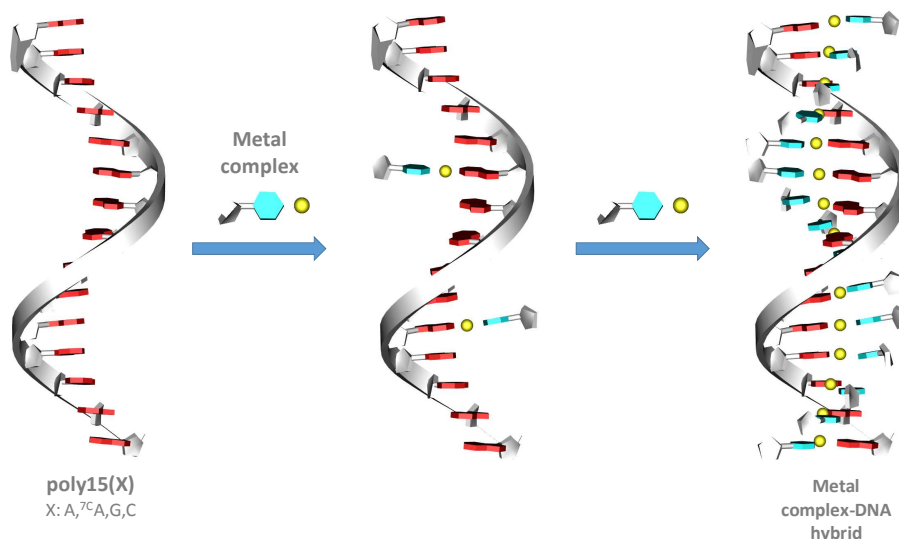


Figure. 1. Metal complex-ssDNA interaction.

The interaction of **cheldPd** complex and single-stranded oligonucleotides **poly15A** and **poly15(⁷C A)** have been also studied in solution by means of circular dichroism, since previous results have shown the formation of **cheldPd_mdA** and **cheldPd_pdA** complexes. On the other hand, the interaction of **1Cu** complex and single-stranded oligonucleotides **poly15A**, **poly15(⁷C A)**, **poly15C** and **poly10G** were evaluated, as a consequence of the results obtained for **1Cu**-nucleobases complexes previously.

2. Synthesis of oligonucleotide containing metal-mediated base pairs based on Ag(I)

The second strategy developed in this thesis to prepare metal-DNA hybrid systems consist in the formation of metal-mediated base pairs within double-stranded DNA molecules (ds-DNA). The aim has been to developed a new strategy that allows oligonucleotide to self-assembly through their nucleobases Watson-Crick hydrogen bond recognition, and subsequently become metal-mediated Watson-

Crick recognition by replacing a hydrogen bond of the base pairs by a coordination bond to a central Ag(I) ion.

Specifically, an oligonucleotide comprising eighteen 7C A-T alternated base pairs has been prepared and characterized. This oligonucleotide has shown to be capable of accommodating Ag(I) ions inside its double strand through the formation of silver-mediated base pairs 7C A-Ag $^{+}$ -T where an hydrogen bond is replaced by a coordinate bond to an ion Ag(I) (Figure 2).

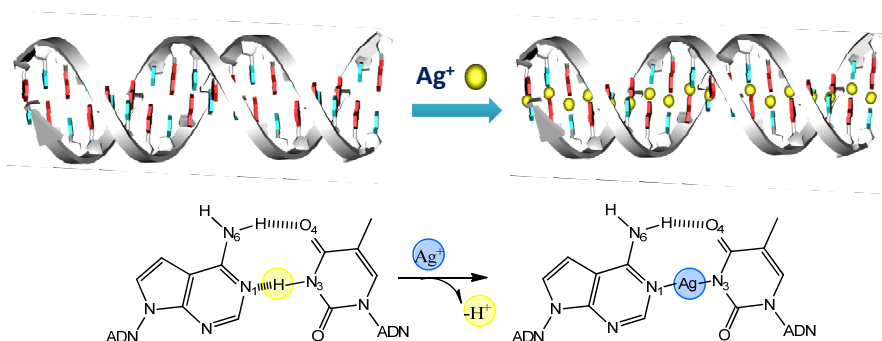


Figure 2. Proposed reaction pathway for the formation of a silver(I)-mediated base pairs that retains the canonical Watson-Crick base pairing.

The formation of this Ag(I)-mediated base pairs has been studied in solution by different techniques such as UV-visible spectroscopy , circular dichroism , thermal stability and HRMS .

These studies have shown that is possible to form a highly stable hybrid metal-oligonucleotide via replacing its native Watson-Crick hydrogen bonds by Ag(I) coordination bonds.

3. Conducting studies of oligonucleotides containing Ag(I)-mediated base pairs

Finally, the conducting properties of oligonucleotide containing sequential Ag(I) mediated 7-deaza-adenine/thymine Watson-Crick base pairs were measured. These studies were performed by using the STM-break junction technique in collaboration with Prof. Richard Nichols (University of Liverpool).

The electronic conductance was studied using the Scanning Tunneling Microscope Break Junction technique (STM-BJ) of a series of DNA and ds-DNA double helices and the effect of the addition of Ag(I) ion to modified DNA sequences resulting on stabilization on the conductance properties of short DNA duplexes. Oligonucleotides used were **poly6(NH₂-AT)**, **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** and **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** capable of giving rise to pairs of bases mid ions Ag(I) and suitable for performing conductance measurements thanks to have a terminal amino group which permits attachment of the oligonucleotide to the gold surface and the STM gold tip (Figure 3).

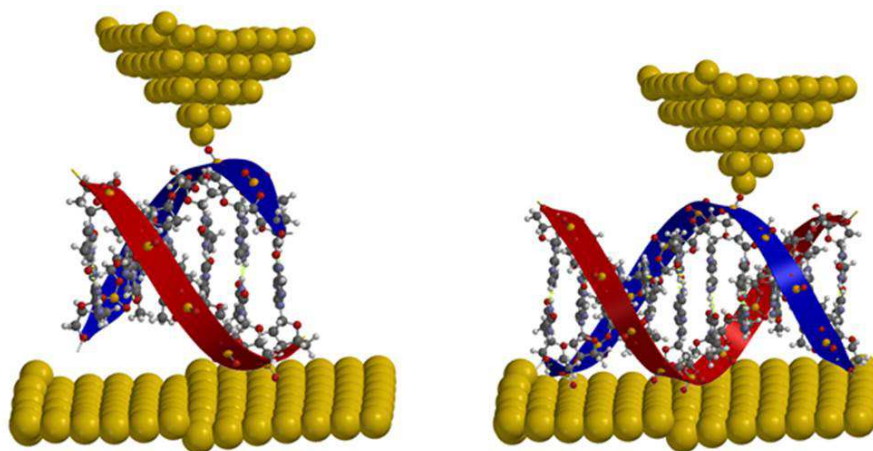
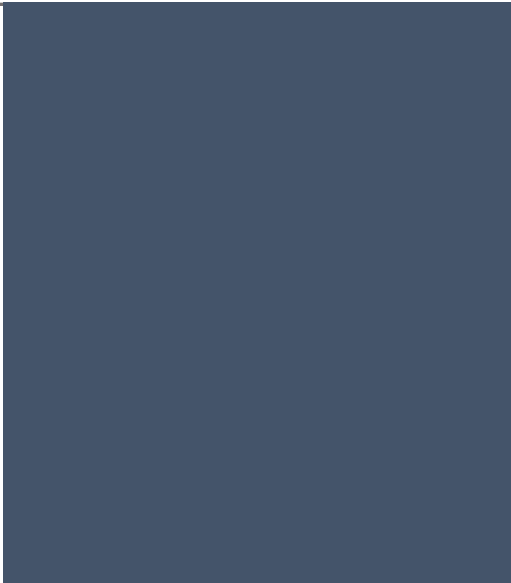


Fig. 3. Cartoon illustrating the STM -break junction electrode for oligonucleotide **poly6(NH₂-A-T)** and **poly10 (NH₂-^{7C}A-T)**.

After analyzing the data obtained by STM–BJ, it was found that the addition of Ag(I) does not change the conductance properties of the oligonucleotide sequences but improve the stability of the double helix by increasing the melting temperature. These studies also prove the non-effects in the substitution of the adenine bases to 7-deaza-adenine ones in the electronic properties of the system proving that the synthetic ds-DNA molecules have no impact on the charge transport properties compare with the biological DNA.



Capítulo I
Introducción



Es sabido desde hace tiempo que los metales son indispensables para la vida; desde luego, muchos de ellos como el sodio, el potasio y el calcio han sido ampliamente hallados en los seres vivos. Aunque el rol de los metales y su impacto en la vida no encontró explicación adecuada hasta que la química inorgánica, y en concreto la química de la coordinación, desarrolló herramientas experimentales y teóricas que, junto a sus aplicaciones a los problemas bioquímicos, permitieron el desarrollo de disciplinas íntimamente relacionadas como *Química Bioinorgánica*, *Bioquímica Inorgánica*, o *Química Inorgánica Biológica*.

El desarrollo en los últimos 40 años de la Química Inorgánica se ha visto influido por diversos factores; entre ellos podemos contemplar el estudio de la interacción entre iones metálicos y péptidos, nucleótidos, hormonas o vitaminas; los esfuerzos por comprender la acumulación, el transporte, el metabolismo y la toxicidad de los iones metálicos en sistemas biológicos; la síntesis biomimética de sistemas con el objeto de entender los procesos biológicos naturales y crear sistemas catalíticos más eficientes; la determinación estructural eficiente de proteínas, ácidos nucleicos y otras biomoléculas; el empleo de herramientas espectroscópicas que permitan mejorar los estudios estructurales dinámicos; o como más recientemente se viene desarrollando, el empleo de la ingeniería macromolecular para desarrollar nuevos sistemas biológicamente relevantes a voluntad.^[1]

Si nos centramos en los ácidos nucleicos, debido a su naturaleza polianiónica es impensable suponer su existencia sin que estos estén asociados a una serie de cationes metálicos; es más, la formación de estructuras secundarias depende de la presencia de iones metálicos ya que son responsables de un esqueleto cargado formado por entidades demasiado próximas entre sí.^[2,3] La mayor parte del tiempo, estos iones forman parte del medio en el que se encuentran los ácidos nucleicos dando lugar a una atmósfera iónica difusa que provee la carga de neutralización necesaria pero sin interaccionar directamente con estos;^[4] por otra parte, una pequeña fracción de estos iones metálicos está coordinada estrechamente en las pequeñas cavidades disponibles que forman la estructura de los ácidos nucleicos. A medio camino entre estas dos posibles formas de interacción de los iones metálicos con los ácidos nucleicos, se

encuentran los iones metálicos que interaccionan específicamente con los ácidos nucleicos posibilitando la formación de una red de enlaces de hidrógeno los cuales se encuentran localizados principalmente en el surco mayor de la hélice.^[5] La naturaleza del ADN se ve fuertemente condicionada por estas formas dinámicas de interacción por lo que también se verá reflejado en sus características.

Pero no sólo los iones metálicos se encargan de estabilizar la molécula de ADN sino que también son responsables de sus numerosos cambios estructurales induciendo el plegamiento o estiramiento de estas estructuras, como por ejemplo, la transición de la forma B a la Z de la doble hélice.^[6,7]

Además de su rol estructural, los iones metálicos coordinados a los ácidos nucleicos pueden desarrollar funciones catalizadoras de los ribosomas,^[8-11] redistribuir las densidades electrónicas provocando variaciones en el pK_a ,^[12-17] provocar la transición a geometrías más favorables o estabilizar tautómeros desfavorecidos energéticamente.^[16,18]

Esto convierte el estudio de la interacción metal-ADN en una fuente de conocimiento fundamental ya que su arquitectura o sus propiedades termodinámicas y cinéticas son una pieza clave en el entendimiento de la estructura y función de los ácidos nucleicos.

En el marco de este desarrollo científico se encuentra recogido este trabajo de investigación, donde el empleo de moléculas de ADN se contempla como un sistema ampliamente versátil para el desarrollo de aplicaciones independientes a su función natural como pueden ser las nanotecnológicas (máquinas nanométricas,^[19,20] nanocables,^[21] sensores^[22-24]), la síntesis de plantillas basadas en su doble hélice para depositar el material que deseemos en su superficie,^[25-27] su uso como andamio previa funcionalización química de sus componentes^[28,29] o la catálisis.^[30-32]

El ADN como material inteligente

Los ácidos nucleicos son cadenas de oligonucleótidos cuyos grupos fosfatos unen las posiciones 3' y 5' de unidades de ribosa vecinas (Figura 1.1). La unión entre nucleótidos individuales, o residuo nucleotídico, se conoce como enlace fosfodiéster. El residuo terminal cuyo átomo de carbono 5' no está unido a otro nucleótido se conoce como extremo 5', y lo mismo ocurre con el extremo 3'. De esta forma se originan unidades de monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y así sucesivamente hasta obtener oligómeros cuyas propiedades físicas variarán en función del tamaño que presente.

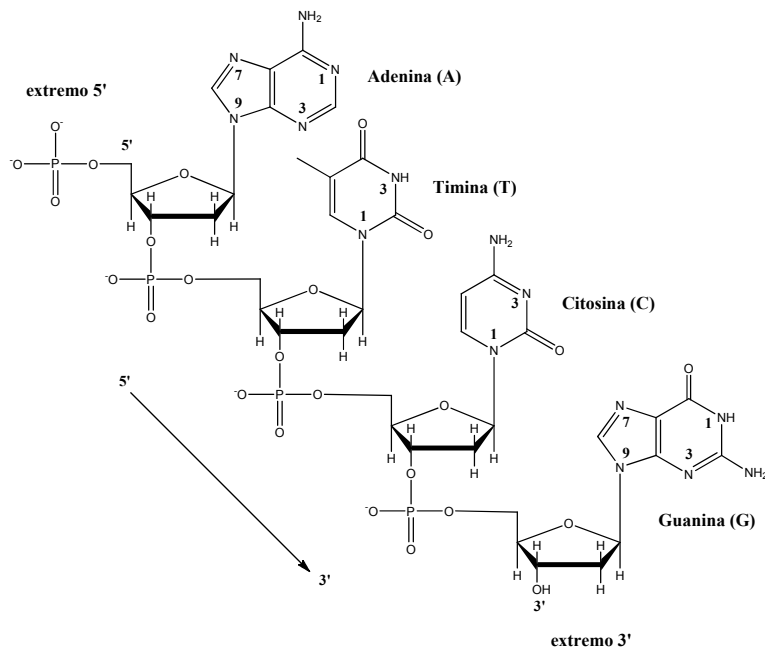


Figura 1.1. Estructura química del ácido nucleico d(pATCG). Por convención, la secuencia se escribe en dirección 5'→3'; la "p" indica un grupo 5' fosforilo y la "d" que se trata del desoxitetranucleótido (ausencia de los grupos 2'-OH).

De esta forma, el ADN está formado por una doble hebra de un polímero de desoxinucleótidos unidos por enlaces diéster, es decir, dos hélices donde cada base está unida por enlaces de hidrógeno a una base de la hebra opuesta para formar un par de bases plano. Estas interacciones por enlaces de hidrógeno, se conocen como apareamiento de bases complementarias y dan como resultado la asociación específica de las dos cadenas de la doble hélice originando los surcos mayor y menor de la doble hebra (Figura 1.2).

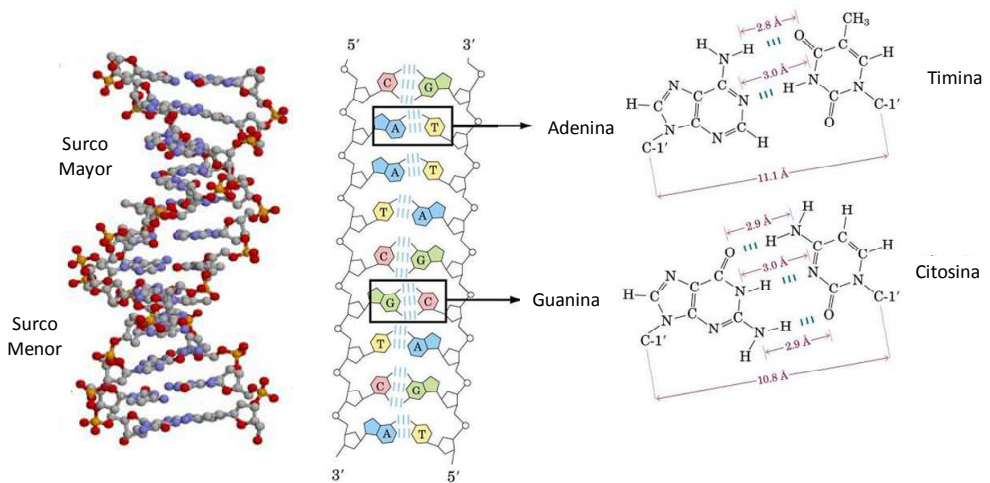


Figura 1.2. A la izquierda, estructura tridimensional del ADN. A la derecha, dos cadenas de polinucleótidos asociadas por el apareamiento de bases al formar enlaces de hidrógeno.

La forma más común de esta doble hebra se conoce como forma B donde las dos hebras de polinucleótidos antiparalelas se enrollan hacia la derecha originando un giro por cada 10 pares de bases y con un diámetro aproximado de 20 Å. Dado que cada base aromática tiene un ancho de 3.4 Å y estas se encuentran parcialmente apiladas unas sobre otras, cada vuelta de hélice tendría una longitud de 34 Å. Sin embargo, la doble hélice también puede presentar las estructuras conocidas como forma A y forma Z cuyas principales características se encuentran recogidas en la figura 1.3 y Tabla 1.1.^[33]

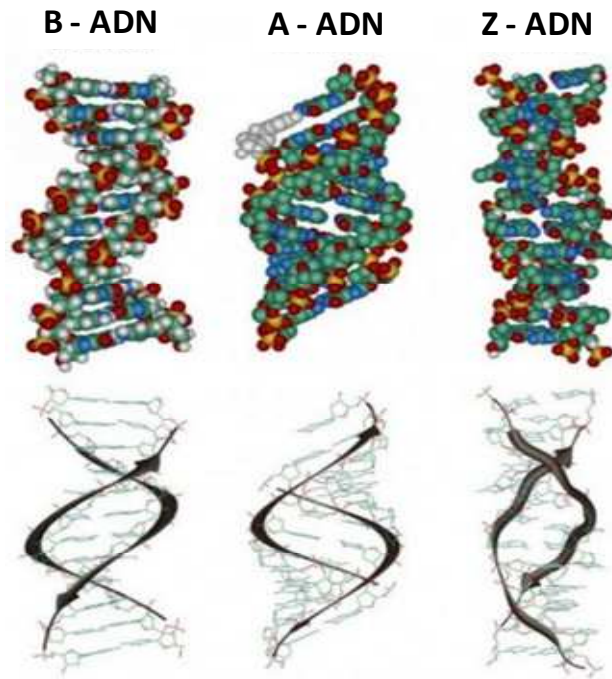


Figura 1.3. Representación de las distintas conformaciones que puede manifestar la doble hebra de ADN. (Fuente: www.biologyexamns4u.com)

Tabla 1.1. Características ideales de las formas A, B y Z de ADN.

	A	B	Z
<i>Sentido de la hélice</i>	Hacia la derecha	Hacia la derecha	Hacia la izquierda
<i>Diámetro</i>	~26 Å	~ 20 Å	~ 18 Å
<i>Pares de bases por vuelta de hélice</i>	11.6	10	12
<i>Longitud de la hélice por par de base</i>	2.9 Å	3.4 Å	7.4 Å
<i>Longitud de una vuelta de hélice</i>	34 Å	34 Å	44 Å
<i>Conformación del enlace glucósido</i>	Anti	Anti	Anti para las pirimidinas; syn para las purinas

Estas características estructurales junto con el desarrollo de la nanotecnología han convertido al ADN en una importante base para el desarrollo de nuevas estructuras que confieran a la molécula diferentes propiedades.^[34-39] Pero, ¿sería posible usar el ADN sin modificar como un nanocable molecular? Diversos estudios han demostrado que la molécula de ADN por sí misma no tiene la suficiente habilidad conductora como para ser empleada como tal en circuitos moleculares electrónicos.^[40] La literatura establece su valor de conductividad en el amplio rango de 1 a 1×10^7 M Ω , dependiendo de las diferentes técnicas experimentales en las que se han llevado a cabo las medidas (basadas en AFM, mediante contacto en nanotubos de carbono, etc.), a los diferentes medios empleados (humedad, contenido en sales, tampón) y los efectos de la superficie;^[41,42] sin olvidar que la diferencia entre las hebras estudiadas juega un papel determinante.

Por lo tanto, muchos equipos de investigación han empleado para sus estudios estructuras de ADN modificadas. En concreto, la ingeniería molecular electrónica establece estas estructuras como nuevas bases del desarrollo de circuitos miniaturizados.^[43]

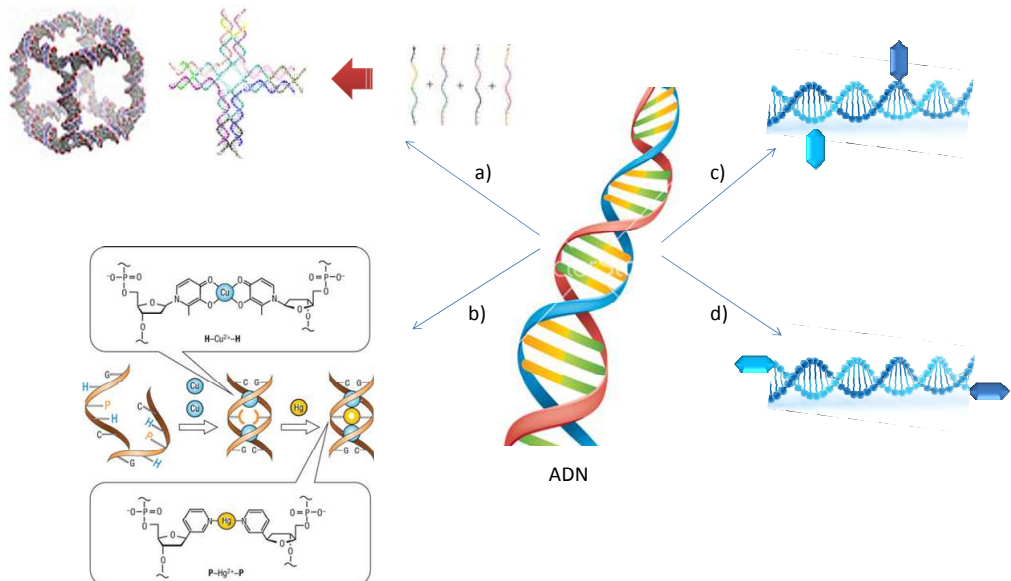


Figura 1.4. Algunos ejemplos desarrollados en nanotecnología basada en el ADN. a) Síntesis de "origamis de ADN"; b) incorporación de moléculas que actúen como ligandos de metales^[57]; ADN con moléculas enlazadas covalentemente a algunos de sus nucleobases centrales; d) ADN con moléculas enlazadas covalentemente a sus extremos 3' y 5'.

Aunque en los últimos años se han realizado una gran variedad de modificaciones sintéticas del ADN (Figura 1.4), no siempre estaban dirigidas al desarrollo de nanocables moleculares. Por ejemplo, ha sido posible enlazar covalentemente marcadores fluorescentes o anclajes superficiales en los extremos 3' o 5' de la doble hebra, lo que origina un cambio sustancial en su solubilidad;^[44–49] otras modificaciones se han realizado en la mitad de la hélice, reemplazando algunos de sus pares de bases naturales por otros artificiales con objeto de estudiar su influencia en la estabilidad estructural.^[50,51] Por otra parte, basados en la posibilidad de sintetizar de forma controlada el ADN incluyendo ciertas modificaciones, muchos investigadores han enfocado sus investigaciones hacia el desarrollo de "origamis de ADN".^[52–56] En estos sistemas se diseña la secuencia sobre la que la hebra simple va a hibridar hacia doble hebra de manera que confirme estructuras complejas basadas en un auto ensamblaje bidimensional y tridimensional.

Interacción entre iones metálicos y ácidos nucleicos

La coordinación de los iones metálicos a los ácidos nucleicos está influenciada en buena manera por el potencial de los metales o los ligandos, concepto que está íntimamente relacionado con la electronegatividad o polarizabilidad de los grupos.^[58] La mayoría de los iones metálicos pequeños con estados de oxidación elevados encuentran como sitios favorables de enlace los átomos de oxígeno de los grupos fosfatos o los oxígenos exocíclicos de las nucleobases,^[59] mientras que los iones metálicos de mayor tamaño y con un bajo estado de oxidación prefieren interactuar con los átomos de oxígeno endocíclicos.^[59-64] Con respecto a los grupos amino de las nucleobases, no se han encontrado casos en los que estos se coordinen a iones metálicos ya que el par electrónico del grupo amino se encuentra deslocalizado en el anillo aromático.

La interacción con los iones metálicos es un hecho a considerar a la hora de interpretar los resultados obtenidos en la caracterización cualitativa y cuantitativa de los sistemas en los que está presente la molécula de ADN, sobre todo cuando la concentración de las sales inorgánicas sea mayor a las encontradas fisiológicamente de forma natural. Por ejemplo, estudios simulados de dinámicas moleculares, junto con alguna información aportada por estructuras cristalinas, han identificado que iones como Cl^- , ClO_4^- , SO_4^- y PO_4^{3-} (los más empleados en la elaboración de los medios en los que se han llevado a cabo los estudios) pueden interactuar con el ADN reemplazando las moléculas de agua cercanas a los grupos amino de las nucleobases así como con los nitrógenos endocíclicos. Sin embargo, también se ha encontrado que en algunos casos la presencia de aniones origina un efecto sinérgico en la interacción de los iones metálicos con el ADN. En concreto, es posible sugerir que la presencia de estos aniones entre cationes favorecería la aproximación de dos cargas positivas en el sistema.^[65-67]

Tal y como se ha mencionado, la mayoría de los tampones en los que se realizan estudios de ADN interactúan de forma significativa con los iones metálicos.^[68-75] Por ejemplo, uno de los más empleados en el estudio de las propiedades espectroscópicas o bioquímicas de los ácidos nucleicos como es el tampón fosfato, interactúa de forma significativa con los iones metálicos lo que originaría errores en los datos obtenidos

como por ejemplo en experimentos donde se pretendan calcular constantes de afinidad^[62] o velocidades de reacción;^[76-78] un hecho que también se ha podido comprobar para algunos de los tampones más utilizados (Figura 1.5).^[76,79] Esto ha provocado que algunos investigadores se decanten por realizar los experimentos en medios libres de tampón.^[76,80,81]

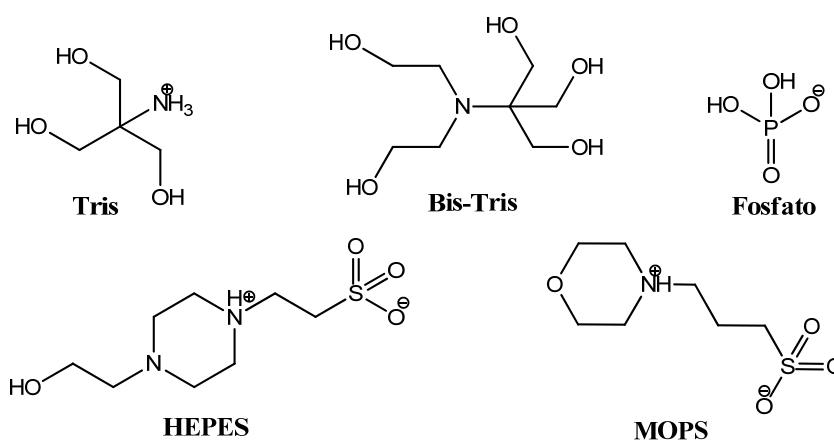


Figura 1.5. Tampones más utilizados en los estudios de ADN. Todos los tampones se representan en su forma protonada.

Sin embargo, no solo los iones metálicos pueden interactuar con el tampón, sino que los propios ácidos nucleicos han visto afectada su conformación o su capacidad para formar complejos de alguna manera.^[82,83]

Por lo tanto, la interacción de sales metálicas con el ADN ha sido ampliamente estudiada,^[84] focalizándose en los últimos años en el estudio con iones metálicos tales como el Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} o Ag^+ ^[85] llegando a la conclusión de que los iones metálicos interactúan con el ADN de forma muy diversa^[86,87], particularmente los iones Hg^{2+} y Ag^+ lo cuales son capaces de formar un fuerte enlace con la doble hebra sin modificar su estructura o interactuar con los grupos fosfato^[87].

Estos sistemas conocidos como metalo-ADN han ganado recientemente mucha atención por parte del mundo científico, en concreto por algunas de sus posibles

propiedades como la conductividad eléctrica.^[88] Basadas en estas propiedades eléctricas, se considera factible la creación de un sistema metalo-ADN enfocado a aplicaciones nanoelectrónicas donde su comportamiento como cable molecular esté favorecido frente a otro tipo de sistemas. Para apoyar esta hipótesis, se han realizado ensayos donde se ha observado que el auto ensamblaje de ADN en monocapas sobre electrodos de oro aumenta la transferencia electrónica con respecto a sistemas donde se deposite ADN en su forma B.^[89,90] Estos resultados han sido confirmados gracias a la incorporación de fluoróforos donores y aceptores en los extremos de una cadena de metalo-ADN, donde el atenuamiento de la fluorescencia se puede interpretar como un posible mecanismo electrónico de transferencia electrónica.^[91]

Interacción de Ag(I) con ácidos nucleicos

En los últimos años se han sintetizado un amplio número de nucleobases artificiales capaces de enlazarse a un átomo metálico central para formar los llamados pares de bases intercalados por metales (*metal-mediated base pairs*).^[92-96] Estos metales se introducen en las secuencias de oligonucleótidos originando sistemas metalo-ADN, donde los iones metálicos otorgan sus características químicas y físicas.

Si profundizamos en los estudios que versan sobre las interacciones con Ag^+ , se conoce desde hace más de cincuenta años el enlace reversible que esta forma con oligonucleótidos ricos en citosina,^[97] interacción que fue estudiada en primer lugar por métodos potenciométricos y fotométricos.^[86,98] Aunque al principio no estuvo clara la forma de unión del ión Ag^+ a las pares de bases, esta fue considerada como un enlace de “tipo II” donde uno de los protones presentes en las nucleobases es sustituido por un átomo de Ag^+ , lo que generaría la incorporación de un ión Ag^+ por cada par de base presente en la doble hélice, además del desplazamiento del protón para convertir el sistema $\text{N-H}\cdots\text{N}$ en N-Ag-N o $\text{N-Ag}\cdots\text{O}$ en N-Ag-O .^[98-100]

En bibliografía es posible encontrar sistemas donde los iones metálicos se encuentran unidos a dobles hebras con pares de bases naturales como las T-T y C-C.^[101-103] Estas estructuras están formadas por enlaces específicos de coordinación surgidos

como consecuencia de la desaparición de los enlaces de hidrógeno presentes entre las nucleobases de la doble hebra de forma natural.

Por ejemplo, en la interacción de citosina con plata se observa un sistema donde una doble hebra de oligonucleótidos y que comprende un único par de bases C:C se encuentra estructuralmente estabilizada gracias a la formación de un enlace con Ag^+ , hecho que conlleva la subida en 8°C de su temperatura de desnaturalización (T_m).^[103] Con respecto a la orientación de las citosinas al interaccionar con Ag^+ (Figura 1.6), aunque al enfrentar dos citosinas esto daría lugar a un estructura tipo cisoide, la estructura tipo transoide se vería reforzada por la formación de un enlace de hidrógeno adicional.^[104] Esta teoría se reafirma al comparar los espectros de dicroísmo circular (CD) registrados en condiciones normales con aquellos registrados en presencia de un medio acidificado; además de por otros estudios experimentales y teóricos.^[105–107] Incluso ya se han empezado a desarrollar algunas aplicaciones para este sistema, como por ejemplo sensores de plata basados en oligonucleótidos con citosina donde se produzca un cambio en la fluorescencia del sistema asociado al cambio conformacional que tiene lugar tras la interacción.^[103]

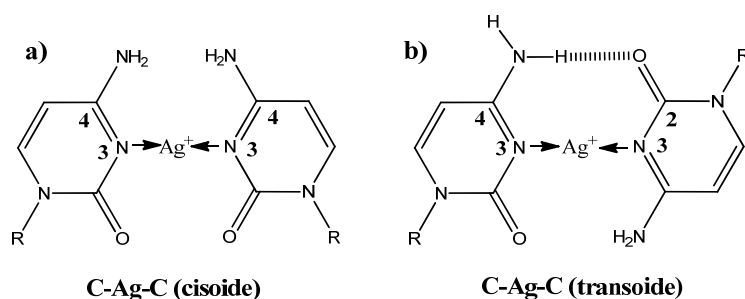


Figura 1.6. Estructuras propuestas para la interacción de Ag(I) con citosina. a) Estructura tipo cisoide; b) estructura tipo transoide.

Una de las ventajas de esta estrategia es la posibilidad de programar las secuencias de ADN para la formación de los sistemas de pares de bases intercalados por metales,

ya que es posible controlar de forma precisa la estructura de una doble hebra de ADN artificial.

Por otra parte, la falta de reconocimiento para originar un auto ensamblaje por parte de las nucleobases modificadas para actuar como ligandos (LNTs) puede afectar a la disponibilidad de estas para originar un efecto plantilla en las dobles hebras de ADN artificial. Por lo tanto, a menudo es necesaria la introducción de secuencias terminales de nucleobases naturales que favorezcan la hibridación del oligonucleótido.^[108,109] Estas regiones terminales hibridaban mediante la formación de enlaces de hidrógeno complementarios del tipo Watson-Crick (W-C) lo que permite mantener la estructura de doble hélice en las zonas terminales de las dobles hebras dejando las nucleobases que van a actuar como ligandos en las zonas centrales de la doble hebra. Este tipo de sistemas permite la formación de un complejo de coordinación metálico en el interior de la doble hebra entre las nucleobases metálicas que actuarán como ligandos (LNTs) y el ión metálico.

En esta línea, Müller y *col.* han desarrollado un elegante sistema donde prevén el uso de nucleobases canónicas terminales que permitan la hibridación de los oligonucleótidos por la cara Hoogsteen de la doble hebra mediante el uso de nucleobases modificadas como 1-deaza-adenina y 1,3-dideazaadenina que interaccionen con timina de forma que el protón imino sea reemplazado por el ión metálico (Figura 1.7).^[110,111] La gran ventaja del uso de estas nucleobases es el hecho de que las hebras que las incorporan poseen una estabilidad térmica muy similar a aquellas que contienen únicamente nucleobases naturales,^[108] esto genera la posibilidad de desarrollar sistemas con un elevado número de nucleobases mediadas por metales sin perder la posible reversibilidad del proceso de hibridación.

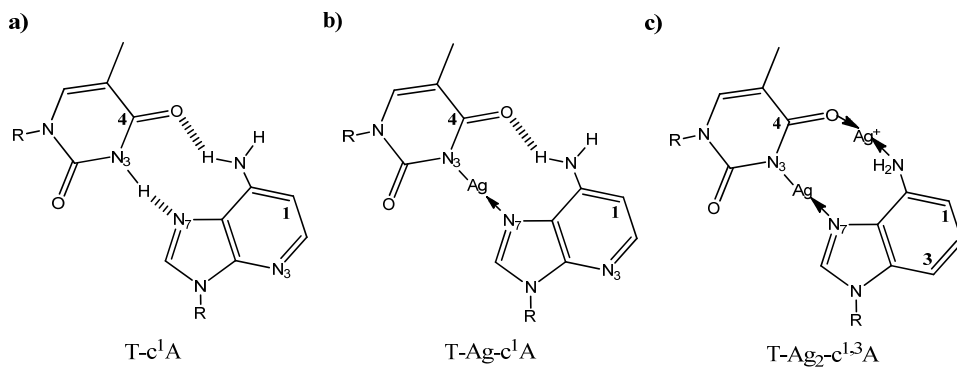


Figura 1.7. Interacción de nucleobases modificadas con plata. a) Timina (T) y 1-deazaadenina (c^1A); b) timinato, Ag^+ y 1-deazaadenina (c^1A); c) timinato, Ag^+ y 1,3-dideazaadenina ($c^{1,3}A$).

Justificación y objetivos

El empleo de oligonucleótidos para el diseño de nanomateriales es una estrategia de tipo “bottom-up” con un gran potencial para el desarrollo de sistemas muy bien organizados a escala nanométrica. La ventaja que presenta dicha estrategia es que la estructura de los oligonucleótidos puede ser diseñada de una forma sencilla mediante la programación de su secuencia de bases, existiendo actualmente una tecnología establecida para su síntesis, caracterización y manipulación.

El reto científico-tecnológico que plantea esta tesis doctoral consiste en desarrollar metodologías eficientes para conferir propiedades de interés tecnológico a los oligonucleótidos, con el fin de obtener nanomateriales con propiedades a la carta. En concreto, esta tesis persigue diseñar, sintetizar, caracterizar estructuralmente y estudiar las propiedades físico-químicas de nuevos hilos moleculares obtenidos mediante procesos de auto-ensamblaje entre oligonucleótidos y compuestos de coordinación previamente diseñados o metales intercalados entre dobles hebras de ADN. Este objetivo se pretende conseguir mediante el control de la secuencia de bases del oligonucleótido monohebra de tal manera que se defina su reactividad frente a los fragmentos de coordinación funcionales o los metales, que se deseen incorporar utilizando un proceso de autoasociación. Estos híbridos resultantes poseerán una estructura definida por la secuencia de bases del oligonucleótido monohebra plantilla y las propiedades funcionales de los compuestos de coordinación o iones metálicos ensamblados a posiciones específicas mediante la formación de enlaces de coordinación selectivos. Los compuestos de coordinación que se pretenden incorporar al oligonucleótido poseerán grupos funcionales de tipo porfirina, terpiridina o residuos π -conjugados con objeto de conferir a dichos nanosistemas propiedades de conductividad electrónica y/o fotoluminiscencia.

Teniendo en cuenta esto y los antecedentes bibliográficos descritos, los objetivos de este trabajo son:

1. Diseño, síntesis, caracterización y estudio de las propiedades físico-químicas de moléculas que contengan unidades de porfirina, terpiridina o monómeros

- precursores de polímeros π -conjugados, y que puedan actuar como ligandos en la síntesis de compuestos de coordinación que se utilizarán, posteriormente, en los procesos de auto-asociación con nucleótidos y oligonucleótidos mediante enlaces de coordinación en cooperación con interacciones supramoleculares (enlaces de hidrogeno e interacciones π - π).
2. Síntesis y caracterización de compuestos de coordinación funcionales, con posiciones de coordinación lábiles, haciendo reaccionar iones metálicos, tales como paladio(II), platino(II) y cobre (II), con las moléculas diseñadas en el punto anterior.
 3. Estudio de la asociación compuesto de coordinación-nucleótido en disolución y en estado sólido, mediante el uso de técnicas espectroscópicas (resonancia magnética nuclear, espectroscopia ultravioleta-visible, espectrometría de masas) y difracción de rayos X.
 4. Diseño y síntesis de oligonucleótidos con secuencias de bases programadas (homo-y/o heterogéneas) de cadena corta (decenas de bases) utilizando métodos de síntesis de ADN conocidos.
 5. Preparación y caracterización de los híbridos (discretos y extendidos) oligonucleótido-compuesto de coordinación en disolución utilizando técnicas espectroscópicas (dicroísmo circular, resonancia magnética nuclear, espectroscopia ultravioleta-visible, espectrometría de masas).
 6. Explorar las posibilidades de enlace de Ag(I) con las dobles hebras de oligonucleótidos cuya secuencia esté formada por nucleobases canónicas (timina) y no canónicas (7-deazaadenina).
 7. Estudio de las propiedades eléctricas de los sistemas mediante medidas de conductancia molecular basados en la metodología “*break-junction*” basada en un microscopio de efecto túnel (*STM-based break-junction*).

Bibliografía

- [1] A. Sigel, H. Sigel, R. K. O. Sigel, Eds. , *Interplay between Metal Ions and Nucleic Acids*, Springer Netherlands, Dordrecht, **2012**.
- [2] D. E. Draper, D. Grilley, A. M. Soto, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2005**, *34*, 221–243.
- [3] G. S. Manning, *Acc. Chem. Res.* **1979**, *12*, 443–449.
- [4] V. K. Misra, R. Shiman, D. E. Draper, *Biopolymers* **2003**, *69*, 118–136.
- [5] K. Chin, K. A. Sharp, B. Honig, A. M. Pyle, *Nat. Struct. Biol.* **1999**, *6*, 1055–1061.
- [6] N. V Hud, V. Sklenar, J. Feigon, *J. Mol. Biol.* **1999**, *286*, 651–660.
- [7] L. McFail-Isom, C. C. Sines, L. D. Williams, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1999**, *9*, 298–304.
- [8] J.-H. Chen, R. Yajima, D. M. Chadalavada, E. Chase, P. C. Bevilacqua, B. L. Golden, *Biochemistry* **2010**, *49*, 6508–6518.
- [9] N. Toor, K. S. Keating, S. D. Taylor, A. M. Pyle, *Sci. (Washington, DC, United States)* **2008**, *320*, 77–82.
- [10] N. J. Reiter, A. Osterman, A. Torres-Larios, K. K. Swinger, T. Pan, A. Mondragon, *Nat. (London, United Kingdom)* **2010**, *468*, 784–789.
- [11] M. R. Stahley, S. A. Strobel, *Sci. (Washington, DC, United States)* **2005**, *309*, 1587–1590.
- [12] R. K. O. Sigel, E. Freisinger, B. Lippert, *JBIC, J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, *5*, 287–299.
- [13] R. K. O. Sigel, M. Sabat, E. Freisinger, A. Mower, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **1999**, *38*, 1481–1490.
- [14] B. Knobloch, R. K. O. Sigel, B. Lippert, H. Sigel, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2004**, *43*, 3793–3795.

- [15] B. Lippert, *Prog. Inorg. Chem.* **2005**, *54*, 385–447.
- [16] B. Lippert, *Chem. Biodivers.* **2008**, *5*, 1455–1474.
- [17] R. Griesser, G. Kampf, L. E. Kapinos, S. Komeda, B. Lippert, J. Reedijk, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 32–41.
- [18] H. Sigel, *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 1869–1886.
- [19] J. Bath, A. J. Turberfield, *Nat Nano* **2007**, *2*, 275–284.
- [20] C. Song, Z.-G. Wang, B. Ding, *Small* **2013**, *9*, 2382–2392.
- [21] S. M. D. Watson, A. R. Pike, J. Pate, A. Houlton, B. R. Horrocks, *Nanoscale* **2014**, *6*, 4027–4037.
- [22] I. Grabowska, D. G. Singleton, A. Stachyra, A. Gora-Sochacka, A. Sirko, W. Zagorski-Ostojka, H. Radecka, E. Stulz, J. Radecki, *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 4196–4199.
- [23] E. Paleček, M. Bartošík, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3427–3481.
- [24] A. Abi, E. E. Ferapontova, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 14499–14507.
- [25] A. Houlton, A. R. Pike, M. Angel Galindo, B. R. Horrocks, *Chem. Commun. (Camb)*. **2009**, 1797–1806.
- [26] † Héctor A. Becerril, † Randall M. Stoltenberg, §. Dean R. Wheeler, ‡ Robert C. Davis, §. John N. Harb, † and Adam T. Woolley*, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 2828–2829.
- [27] S. A. F. Al-Said, R. Hassanien, J. Hannant, M. A. Galindo, S. Pruneanu, A. R. Pike, A. Houlton, B. R. Horrocks, *Electrochem. commun.* **2009**, *11*, 550–553.
- [28] B. Datta, and Gary B. Schuster*, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2965–2973.
- [29] E. Mayer-Enthart, H.-A. Wagenknecht, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2006**, *45*, 3372–3375.
- [30] J. Huang, L. Lin, D. Sun, H. Chen, D. Yang, Q. Li, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 6330–6374.


- [31] K. Li, K. Wang, W. Qin, S. Deng, D. Li, J. Shi, Q. Huang, C. Fan, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 4292–4295.
- [32] Y. Wang, G. Ouyang, J. Zhang, Z. Wang, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7912–7914.
- [33] D. Voet, J. G. Voet, C. W. Pratt, *Fundamentos de Bioquímica. La Vida a Nivel Molecular*, Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires, **2007**.
- [34] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Sci. (Washington, DC, United States)* **2008**, *321*, 1795–1799.
- [35] U. Feldkamp, C. M. Niemeyer, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2006**, *45*, 1856–1876.
- [36] M. Endo, H. Sugiyama, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2420–2443.
- [37] F. C. Simmel, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2008**, *47*, 5884–5887.
- [38] F. A. Aldaye, P. K. Lo, P. Karam, C. K. McLaughlin, G. Cosa, H. F. Sleiman, *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 349–352.
- [39] A. Heckel, M. Famulok, *Biochimie* **2008**, *90*, 1096–1107.
- [40] S. Liu, G. H. Clever, Y. Takezawa, M. Kaneko, K. Tanaka, X.-F. Guo, M. Shionoya, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2011**, *50*, 8886–8890, S8886/1–S8886/12.
- [41] X. Guo, A. A. Gorodetsky, J. Hone, J. K. Barton, C. Nuckolls, *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 163–167.
- [42] R. Mas-Balleste, O. Castillo, P. J. Sanz Miguel, D. Olea, J. Gomez-Herrero, F. Zamora, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2009**, 2885–2896.
- [43] G. E. Moore, *Proc. IEEE* **1998**, *86*, 82–85.
- [44] C. M. Niemeyer, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2001**, *40*, 4128–4158.
- [45] K. V. Gothelf, T. H. LaBean, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 4023–4037.
- [46] J. Wengel, *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 277–280.
- [47] J. J. Storhoff, C. A. Mirkin, *Chem. Rev. (Washington, D. C.)* **1999**, *99*, 1849–1862.
- [48] T. N. Nguyen, A. Brewer, E. Stulz, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2009**, *48*, 1974–1977.

- [49] M. D. Sorensen, M. Petersen, J. Wengel, *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)* **2003**, 2130–2131.
- [50] F. Seela, Y. He, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 367–377.
- [51] S. A. Benner, *Acc. Chem. Res.* **2004**, *37*, 784–797.
- [52] N. C. Seeman, *Nat. (London, United Kingdom)* **2003**, *421*, 427–431.
- [53] N. C. Seeman, *Int. J. Nanotechnol.* **2005**, *2*, 348–370.
- [54] H. T. Maune, S. Han, R. D. Barish, M. Bockrath, W. A. Goddard III, P. W. K. Rothmund, E. Winfree, *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 61–66.
- [55] P. W. K. Rothmund, *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [56] E. S. Andersen, M. Dong, M. M. Nielsen, K. Jahn, R. Subramani, W. Mamdouh, M. M. Golas, B. Sander, H. Stark, C. L. P. Oliveira, et al., *Nature* **2009**, *459*, 73–76.
- [57] K. Tanaka, G. H. Clever, Y. Takezawa, Y. Yamada, C. Kaul, M. Shionoya, T. Carell, *Nat Nano* **2006**, *1*, 190–194.
- [58] R. G. Pearson, *J. Chem. Educ.* **1968**, *45*, 643–648.
- [59] J. Schnabl, R. K. O. Sigel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 269–275.
- [60] R. K. O. Sigel, H. Sigel, *Acc. Chem. Res.* **2010**, *43*, 974–984.
- [61] R. B. Martin, *Met. Ions Biol. Syst.* **1996**, *32*, 61–89.
- [62] R. K. O. Sigel, H. Sigel, *Met. Ions Life Sci.* **2007**, *2*, 109–180.
- [63] E. Freisinger, R. K. O. Sigel, *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1834–1851.
- [64] C. P. Da Costa, H. Sigel, *Inorg. Chem.* **2000**, *39*, 5985–5993.
- [65] P. Auffinger, L. Bielecki, E. Westhof, *Struct. (Cambridge, MA, United States)* **2004**, *12*, 379–388.
- [66] M. Feig, B. M. Pettitt, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1769–1781.
- [67] J. S. Kieft, E. Chase, D. A. Costantino, B. L. Golden, *RNA* **2010**, *16*, 1118–1123.
- [68] D. P. Hanlon, D. S. Watt, E. W. Westhead, *Anal. Biochem.* **1966**, *16*, 225–233.


- [69] D. E. Allen, D. J. Baker, R. D. Gillard, *Nat. (London, United Kingdom)* **1967**, 214, 906–907.
- [70] R. Nakon, C. R. Krishnamoorthy, *Sci. (Washington, DC, United States)* **1983**, 221, 749–750.
- [71] P. D. Prenzler, W. D. Mcfadyen, *J. Inorg. Biochem.* **1997**, 68, 279–282.
- [72] Q. Yu, A. Kandegedara, Y. Xu, D. B. Rorabacher, *Anal. Biochem.* **1997**, 253, 50–56.
- [73] K. H. Scheller, T. H. J. Abel, P. E. Polanyi, P. K. Wenk, B. E. Fischer, H. Sigel, *Eur. J. Biochem.* **1980**, 107, 455–466.
- [74] B. E. Fischer, U. K. Haering, R. Tribolet, H. Sigel, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 94, 523–530.
- [75] H. Sigel, K. H. Scheller, B. Prijs, *Inorganica Chim. Acta* **1982**, 66, 147–155.
- [76] H. Sigel, *Coord. Chem. Rev.* **1990**, 100, 453–539.
- [77] H. Sigel, F. Hofstetter, R. B. Martin, R. M. Milburn, V. Scheller-Krattiger, K. H. Scheller, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, 106, 7935–7946.
- [78] H. Sigel, P. E. Amsler, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98, 7390–7400.
- [79] P. E. Amsler, H. Sigel, *Eur. J. Biochem.* **1976**, 63, 569–581.
- [80] H. Sigel, *Angew. Chemie, Int. Ed. English* **1969**, 8, 167–177.
- [81] H. Sigel, C. Flierl, R. Griesser, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 1061–1064.
- [82] K. L. Buchmueller, K. M. Weeks, *Nucleic Acids Res.* **2004**, 32, e184/1–e184/6.
- [83] N. C. Stellwagen, A. Bossi, C. Gelfi, P. G. Righetti, *Anal. Biochem.* **2000**, 287, 167–175.
- [84] J. Müller, *Metallomics* **2010**, 2, 318–327.
- [85] G. L. Eichhorn, Y. A. Shin, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 7323–7328.
- [86] G. L. Eichhorn, J. J. Butzow, P. Clark, E. Tarien, *Biopolymers* **1967**, 5, 283–296.

- [87] R. M. Izatt, J. J. Christensen, J. H. Rytting, *Chem. Rev. (Washington, DC, United States)* **1971**, *71*, 439–482.
- [88] A. Rakitin, P. Aich, C. Papadopoulos, Y. Kobzar, A. S. Vedeneev, J. S. Lee, J. M. Xu, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 3670–3673.
- [89] C.-Z. Li, Y.-T. Long, H.-B. Kraatz, J. S. Lee, *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 2291–2296.
- [90] M. J. Dinsmore, J. S. Lee, *J. Electroanal. Chem.* **2008**, *617*, 71–77.
- [91] S. D. Wettig, D. O. Wood, P. Aich, J. S. Lee, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 2093–2101.
- [92] Y. Takezawa, M. Shionoya, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 2066–2076.
- [93] G. H. Clever, M. Shionoya, *Coord. Chem. Rev.* **2010**, *254*, 2391–2402.
- [94] P. Scharf, J. Mueller, J. Müller, *Chempluschem* **2013**, *78*, 20–34.
- [95] Y. Takezawa, K. Nishiyama, T. Mashima, M. Katahira, M. Shionoya, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 14713–14716.
- [96] I. Sinha, C. Fonseca Guerra, J. Mueller, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2015**, *54*, 3603–3606.
- [97] T. Yamane, N. Davidson, *Biochim. Biophys. Acta, Spec. Sect. Nucleic Acids Relat. Subj.* **1962**, *55*, 609–621.
- [98] R. H. Jensen, N. Davidson, *Biopolymers* **1966**, *4*, 17–32.
- [99] L. G. Marzilli, T. J. Kistenmacher, M. Rossi, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2797–2798.
- [100] T. J. Kistenmacher, M. Rossi, L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.* **1979**, *18*, 240–244.
- [101] Z. Kuklenyik, L. G. Marzilli, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 5654–5662.
- [102] B. Datta, G. B. Schuster, A. McCook, S. C. Harvey, K. Zakrzewska, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 14428–14429.
- [103] A. Ono, S. Cao, H. Togashi, M. Tashiro, T. Fujimoto, T. Machinami, S. Oda, Y. Miyake, I. Okamoto, Y. Tanaka, *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)*

- 2008**, 4825–4827.
- [104] D. a Megger, J. Muller, *Nucleosides. Nucleotides Nucleic Acids* **2010**, *29*, 27–38.
- [105] H. Urata, E. Yamaguchi, Y. Nakamura, S. Wada, *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)* **2011**, *47*, 941–943.
- [106] T. Ono, K. Yoshida, Y. Saotome, R. Sakabe, I. Okamoto, A. Ono, *Chem. Commun. (Cambridge, United Kingdom)* **2011**, *47*, 1542–1544.
- [107] D. a. Megger, C. Fonseca Guerra, F. M. Bickelhaupt, J. Müller, *J. Inorg. Biochem.* **2011**, *105*, 1398–1404.
- [108] F. A. Polonius, J. Müller, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2007**, *46*, 5602–5604.
- [109] D. a. Megger, C. Fonseca Guerra, J. Hoffmann, B. Brutschy, F. M. Bickelhaupt, J. Müller, *Chem. - A Eur. J.* **2011**, *17*, 6533–6544.
- [110] C. Kaul, M. Mueller, M. Wagner, S. Schneider, T. Carell, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 794–800.
- [111] E.-K. Kim, C. Switzer, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 2403–2407.



Capítulo II
Materiales y
métodos



2.1 Materiales

En este apartado se describen de forma detallada las síntesis correspondientes a los materiales utilizados en este trabajo de investigación.

El ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**) fue suministrado por *TCI Europe* y se ha utilizado directamente, sin ningún proceso de purificación previo.

La molécula 2,6-piridín-dicarboxiamina (**pidiam**), el resto de reactivos y disolventes fueron suministrados por *Sigma Aldrich*[®], y se utilizaron directamente en las reacciones correspondientes sin necesidad de purificación previa.

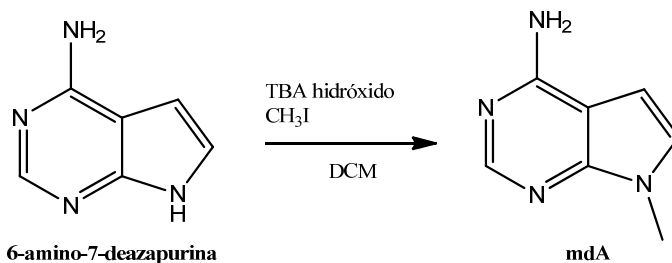
2.1.1 Nucleobases modelo

2.1.1.a 1-metil-citosina (**mC**)

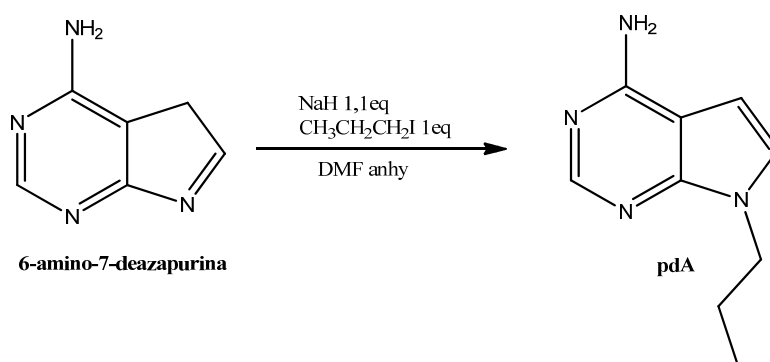
1-metil-citosina, (mC). La síntesis de esta nucleobase se realiza siguiendo un método descrito previamente en bibliografía.^[1]

2.1.1.b 1-etil-timina (**eT**)

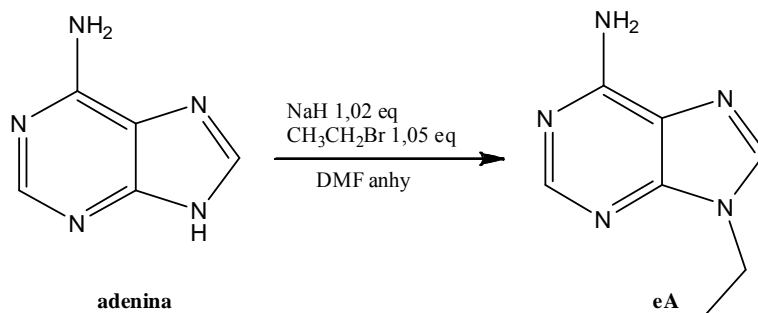
1-etil-timina, (eT). La síntesis de esta nucleobase se realiza siguiendo un método descrito previamente en bibliografía.^[2]

2.1.1.c N9-metil-7-deaza-adenina (**mdA**)

N9-metil-7-deaza-adenina, (mdA). A una disolución de 6-amino-7-deazapurina (0.69 g, 5 mmol) en diclorometano (15 mL) se le añade hidróxido de tetrabutilamonio (3.26 mL, 5 mmol) y yodometano (1.25 mL, 20 mmol). La mezcla de reacción se deja agitando a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras ese tiempo, se observa un precipitado blanco en el seno de la reacción que se disuelve en agua (250 mL). Por último, se lava con diclorometano (1x100 mL), la fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio y posteriormente se filtra y concentra en rotavapor para obtener **mdA** como precipitado blanco. Rendimiento: 520 mg (70.1%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.05 (s, 1H; CH), 7.10 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH), 6.90 (s, 2H; NH₂), 6.5 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH), 3.67 (s, 3H; CH₃). IR: 3394 (f), 3316 (f), 3104 (f), 2125 (d), 1650 (mf), 1592 (mf), 1555 (f), 1475 (f), 1389 (m), 1317 (m), 1268 (m), 1073 (d), 987 (d), 898 (d), 710 (f).

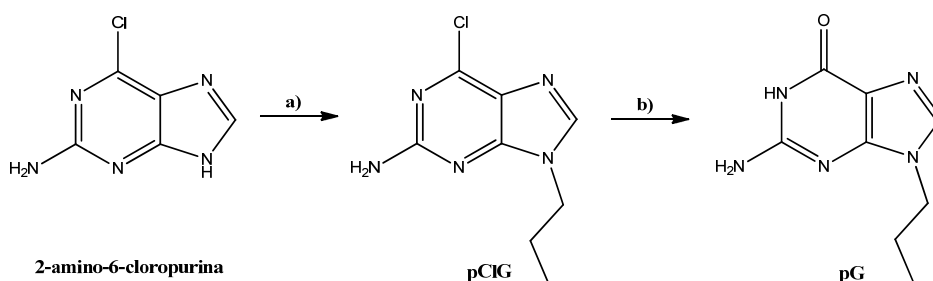
2.1.1.d N9-propil-7-deaza-adenina (**pdA**)

N9-propil-7-deaza-adenina, (**pdA**). A una disolución de 6-amino-7-deazapurina (1g, 7.23 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (200 mL) se le añade hidruro de sodio (0.0992 g, 2.48 mmol) bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se mantiene agitando durante 30 minutos hasta que la generación de H_2 deja de observarse. Posteriormente se añade 1-yodopropano (0.22 mL, 2.26 mmol) y se continúa agitando a temperatura ambiente durante 24 horas en una atmósfera de N_2 . Se elimina el disolvente en rotavapor, el residuo obtenido se disuelve en diclorometano (200 mL) y se lava con una disolución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% (1x150 mL) y cloruro de sodio (1x150 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio y posteriormente se filtra y concentra en rotavapor. El residuo resultante se recristaliza en diclorometano obteniéndose cristales de **pdA**. Rendimiento: 700 mg (55%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 8.04 (s, 1H; CH), 7.13 (d, $J=3.4$ Hz, 1H; CH), 6.87 (s, 2H; NH_2), 6.51 (d, $J=3.4$ Hz, 1H; CH), 4.05 (t, $J=7.1$ Hz, 2H; CH_2), 1.90 – 1.61 (m, 2H; CH_2), 0.81 (t, $J=7.4$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 177.1140; encontrado: 177.1113. IR: 3290 (m), 3078 (mf), 2926 (mf), 1670 (d), 1591 (mf), 1551 (d), 1320 (m), 1268 (m), 712 (mf), 611 (mf).

2.1.1.e N9-etil-adenina (**eA**)

N9-etil-adenina (eA). A una disolución de adenina (1.35 g, 10 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (200 mL) se le añade hidruro de sodio (0.410 g, 10.2 mmol) bajo una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se agita durante 30 minutos hasta que la generación de H₂ deja de observarse. A continuación se añade bromoetano (0.78 mL, 10.5 mmol) y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas en atmósfera inerte. Se elimina el disolvente en rotavapor y el residuo obtenido se recristaliza en etanol, obteniendo un precipitado cristalino de **eA**. Rendimiento: 815 mg (50 %). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.15 (s, 2H; CH), 8.13 (s, 1H; CH), 7.18 (s, 2H; NH₂), 4.16 (q, J=7.2 Hz, 2H; CH₂), 1.39 (t, J=7.2 Hz, 3H; CH₃).

2.1.1.f N9-propil-guanina (pG)



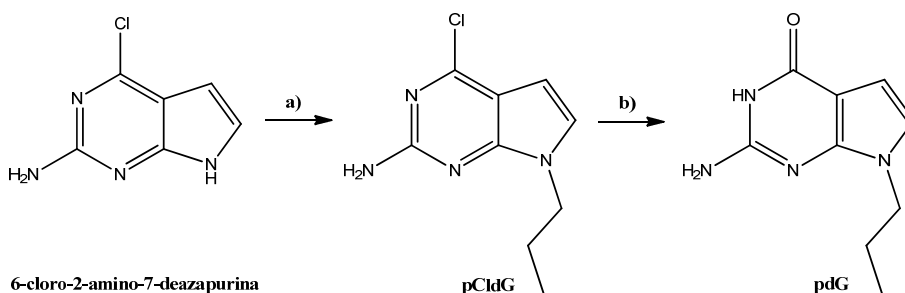
- a) *N9-propil-6-cloro-2-aminopurina (pClG)*. A una disolución de 2-amino-6-cloropurina (1 g, 5.9 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (50 mL) se le añade hidruro de sodio (0.4 g, 9.7 mmol) bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se mantiene agitando hasta que la generación de H_2 deja de observarse. A continuación, se añade 1-yodopropano (2 mL, exceso) y se mantiene agitando durante 5 días a temperatura ambiente y en atmósfera inerte. Posteriormente, se elimina el disolvente en rotavapor y el residuo obtenido se disuelve en diclorometano (50 mL) y agua (10 mL). La fase orgánica se lava con una disolución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% (1x50 mL) y cloruro de sodio (2x50 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio y posteriormente se filtra y concentra en rotavapor. El aceite obtenido se recristaliza en etanol para obtener un precipitado de **pClG**. Rendimiento: 1.1 g (76.4%). 1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.37 (s, 1H; CH), 6.61 (s, 2H; NH_2), 4.24 (t, $J=7.1$ Hz, 2H; CH_2), 1.79 (m, 2H; CH_2), 0.84 (t, $J=7.3$ Hz, 3H; CH_3).

El segundo paso de la síntesis de la N9-propil guanina está basado en un método descrito previamente en bibliografía:^[3]

- b) *N9-propil-guanina (pG)*. Una disolución de **pClG** (1,1 g, 5.2 mmol) en ácido clorhídrico (70 mL, 6 M) se mantiene a reflujo durante 2 horas. Tras ese tiempo, la disolución se deja enfriar a temperatura ambiente y se introduce en un baño de hielo, y el pH se neutraliza con una disolución concentrada de hidróxido de sodio. El precipitado blanco resultante se filtra y se disuelve en

una disolución acuosa de hidróxido de sodio al 4% (20 mL), a la que se le añaden dos cucharadas de carbón activo. La suspensión se mantiene en ebullición unos minutos y se filtra en caliente sobre *Cellite*[®]. Las aguas madres se neutralizan con ácido clorhídrico (6 mL aprox., 3 M), apareciendo un precipitado blanco que se filtra a vacío. Finalmente, este precipitado se recrystaliza en metanol (75 mL), obteniéndose unos cristales incoloros prismáticos de **pG**. Rendimiento: 450 mg (46.6%). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 10.68 (s, 1H; NH), 7.88 (s, 1H; CH), 6.04 (s, 2H; NH₂), 4.12 (t, J=6.8 Hz, 2H; CH₂), 1.77 (m, 2H; CH₂), 0.80 (t, J=7.3 Hz, 3H; CH₃). HRMS (ESI): *m/z*: calculado para C₈H₁₂N₅O [M+H]⁺: 194.1042; encontrado: 194.1035.

2.1.1.g N9-propil-7-deaza-guanina (pdG)



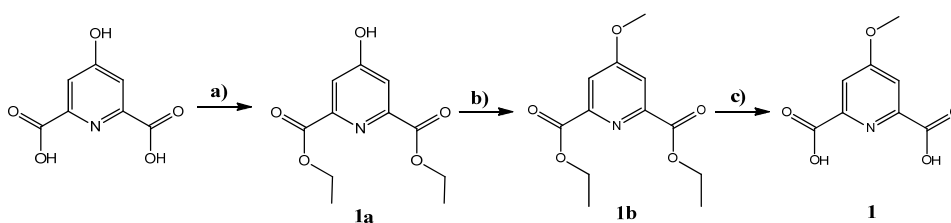
- a) *N*9-propil-6-cloro-2-amino-7-deazapurina (**pClIdG**). A una disolución de 6-cloro-2-amino-7-deazapurina (1 g, 5.9 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (100 mL) se le añade hidruro de sodio (0.24 g, 6 mmol) bajo una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se mantiene agitando hasta el cese del desprendimiento de H₂. A continuación, se añade 1-yodopropano (0.58 mL, 6 mmol) y se deja agitando durante 24 horas a temperatura ambiente y atmósfera inerte. Se elimina el disolvente en rotavapor, y el residuo obtenido se disuelve en diclorometano (200 mL). Se lava con una disolución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% (1x150 mL) y cloruro de sodio (1x150 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio, se filtra y se elimina el disolvente en rotavapor. El residuo obtenido se recrystaliza en diclorometano

obteniéndose **pCldG** en forma cristalina. Rendimiento: 850 mg (68%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.17 (d, $J=3.5$ Hz, 1H; *CH*), 6.61 (s, 2H; *NH*₂), 6.28 (d, $J=3.4$ Hz, 1H; *CH*), 3.97 (t, $J=7.1$ Hz, 2H; *CH*₂), 1.73 (m, 2H; *CH*₂), 0.82 (t, $J=7.3$ Hz, 3H; *CH*₃). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 211.0750; encontrado: 211.0732

- b) *N9-propil-7-deaza-guanina*, (**pdG**). Una disolución de **pCldG** (400 mg, 1.9 mmol) en una mezcla de ácido clorhídrico (25 mL, 1 M) y etanol (5 mL) se mantiene a reflujo durante 2 horas. La mezcla de reacción se lleva a sequedad en rotavapor y el residuo obtenido se disuelve en etanol (20 mL). Se elimina el disolvente en rotavapor y el residuo obtenido se disuelve en agua (20 mL). Se ajusta su pH a 7 usando una disolución de hidróxido de sodio concentrado, y el disolvente se elimina en rotavapor. Al residuo obtenido se le añade diclorometano (50 mL), y aparece un precipitado blanco de **pdG** que se filtra, lava y seca. Rendimiento: 55 mg (15%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 10.22 (s, 1H; *NH*), 6.71 (d, $J=3.2$ Hz, 1H; *CH*), 6.19 (d, $J=3.3$ Hz, 1H; *NH*₂), 6.17 (s, 1H; *CH*), 3.85 (t, $J=7.0$ Hz, 2H; *CH*₂), 1.68 (m, 2H; *CH*₂), 0.82 (t, $J=7.3$ Hz, 3H; *CH*₃). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_4\text{ONa}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 193.1089; encontrado: 193.1086.

2.1.2 Ligandos

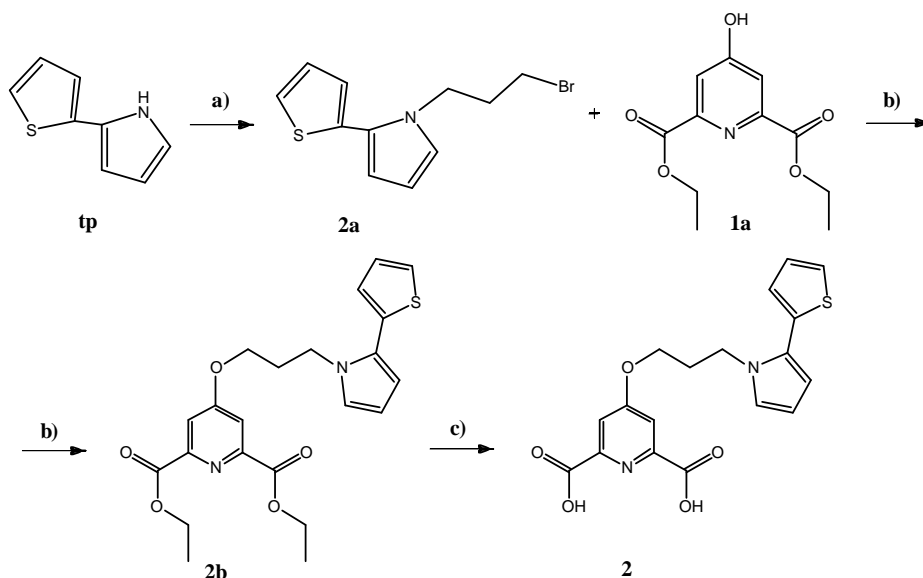
2.1.2.a Ligandos hidroxo-hidroxo

2.1.2.a.1 Ácido 4-metoxipiridín-2,6-dicarboxílico (**1**)

- a) *Dietil 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxilato, (1a)*. La obtención de esta molécula, utilizada como intermedio de reacción en algunas de las síntesis que a continuación se describen, se llevó a cabo según un proceso descrito previamente en bibliografía.^[4]
- b) *Dietil-4-metoxipiridín-2,6-dicarboxilato, (1b)*. A una disolución de **1a** (3 g, 12.5 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (150 mL) se le añade hidruro de sodio (0.5018 g, 12.5 mmol) bajo una atmósfera de N₂. Después de 30 minutos, se añade 1-yodometano (0.79 mL, 12.5 mmol), y la mezcla de reacción resultante se mantiene agitando durante 48 horas bajo una atmósfera de N₂. Se elimina el disolvente en rotavapor y el residuo resultante se disuelve en diclorometano (150 mL). Se lava con una disolución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% (1x150 mL) y cloruro de sodio (1x150 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de sodio, se filtra y se elimina el disolvente en rotavapor hasta obtener **1b** en forma de precipitado blanco. Rendimiento: 1.85 g (87.55%). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.72 (s, 2H; CH), 4.38 (t, J=10.6, 4H, CH₂), 3.98 (s, 3H; CH₃), 1.34 (t, J=7.1 Hz, 6H; CH₃). HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₂H₁₆NO₅ [M+H]⁺: 254.1028; encontrado: 254.1037.

c) *Ácido 4-metoxipiridín-2,6-dicarboxílico*, (**1**). El compuesto **1b** (2 g, 8.37 mmol) se disuelve en una disolución acuosa de hidróxido de sodio (25 mL, 0.5 M) y se mantiene a reflujo durante 12 horas. A continuación se acidifica con ácido clorhídrico concentrado hasta alcanzar un pH de 3.6, y la disolución se concentra en rotavapor hasta obtener **1b** en forma de precipitado blanco. Rendimiento: 1.21 g (57.6%). $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.36 (s, 2H; CH), 3.80 (s, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_8\text{H}_8\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 198.0402; encontrado: 198.0406. IR: 3566 (m), 2923 (f), 1722 (mf), 1631 (mf), 1602 (f), 1575 (mf), 1480 (f), 1466 (f), 1439 (m), 1410 (f), 1374 (m), 1312 (mf), 1234 (mf), 1214 (m), 1169 (d), 1113 (f), 1048 (mf), 999 (d), 893 (m), 867 (m), 815 (m), 783 (m), 697 (f), 631 (d), 579 (m), 556 (d).

2.1.2.a.2 *Ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridín-2,6-dicarboxílico* (**2**)

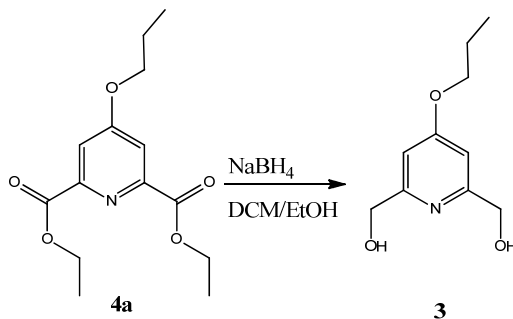


2-(tiofen-2-il)-1H-pirrolo, (**tp**). La síntesis de esta molécula ha sido descrita previamente en bibliografía.^[5]

- a) *1-(3-bromopropil)-2-(tiofen-2-il)-1H-pirrola*, (**2a**). A una disolución de **1p** (3 g, 20 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (300 mL) se le añade 1,3-dibromopropano (103 mL, 1 mol) bajo una atmósfera de N₂. Tras unos minutos de agitación, se añade hidruro de sodio (2 g, 0.05 mol) y la mezcla de reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente y en oscuridad durante 5 días. Posteriormente, el disolvente se elimina en rotavapor obteniéndose un aceite verde que se disuelve en acetato de etilo (200 mL aprox.), se lava con agua (2x100 mL) y el color de la disolución cambia a rojo burdeos. La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de sodio, se filtra y el disolvente se elimina en rotavapor hasta obtener un aceite dorado que es purificado por cromatografía (gel de sílice, hexano). Las fracciones que contienen el producto **2a** se unifican y se concentran en rotavapor. Rendimiento: 5 g (92.5%). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.51 (dd, J=0.7 y 4.6 Hz, 1H; CH), 7.11 (m, 2H; CH), 6.92 (s, 1H; CH), 6.21 (m, 1H; CH), 6.09 (m, 1H; CH), 4.15 (t, J=7.0 Hz, 2H; CH₂), 3.40 (t, J=6.4 Hz, 2H; CH₂), 2.12 (m, 2H; CH₂). HRMS (ESI): *m/z*: calculado para C₁₁H₁₂NSBr [M+H]⁺: 269.9952; encontrado: 269.9949.
- b) *Dietil 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridín-2,6-dicarboxilato*, (**2b**). A una disolución de **1a** (0.48 g, 2 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (15 mL) se le añade hidruro de sodio (0.1 g, 2.5 mmol) bajo una atmósfera de N₂ y en oscuridad, y se mantiene agitando a temperatura ambiente hasta el cese de desprendimiento de H₂. Tras la aparición de un precipitado blanco se le añade una disolución de **2a** (0.4 g, 1.48 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra, y la mezcla de reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente, en oscuridad y bajo una atmósfera de N₂ durante 5 días. A continuación, se elimina el disolvente en rotavapor y se disuelve el producto en diclorometano (100 mL). Se lava la disolución con agua (3x50 mL) y la fase acuosa final con diclorometano (1x50 mL). Las fases orgánicas se unifican y se secan con sulfato de sodio, se filtran y el disolvente se elimina en rotavapor obteniéndose **2b** de forma pura. Rendimiento: 670 mg (78.24%). ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.61 (s, 2H; CH), 7.42 (dd, J=0.9 y 5.0 Hz, 1H; CH), 7.08 (dd, J=0.9 y 3.3 Hz, 1H; CH), 7.03 (dd, J=3.6 y 5.0 Hz, 1H; CH), 6.94 (dd, J=1.9 y 2.5 Hz, 1H; CH), 6.19

(dd, J=1.7 y 3.4 Hz, 1H; CH), 6.07 (dd, J=2.9 y 3.4 Hz, 1H; CH), 4.38 (q, J=7.1, 4H; CH₂), 4.24 (t, J=6.8 Hz, 2H; CH₂), 4.07 (t, J=5.5 Hz, 2H; CH₂), 2.10 (dd, J=7.9 y 3.7 Hz, 2H; CH₂), 1.34 (t, J=7.1 Hz, 6H; CH₃). HRMS (ESI): m/z: calculado para C₂₂H₂₅N₂O₅S [M+H]⁺: 429.1484; encontrado: 429.1492.

- c) *Ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridín-2,6-dicarboxílico, (2)*. A una disolución de **2b** (0.67 g, 1.56 mmol) en metanol anhidro (30 mL) se le añade gota a gota una disolución anhidra de metóxido de sodio (3 mL, 1 M). Se mantiene agitando a temperatura ambiente 1 hora y 3 minutos a 60°C. Se observa un precipitado blanco que desaparece al bajar el pH a 7 adicionando *Amberlite*[®] (2 cucharadas aprox.) y manteniendo agitando la disolución durante 30 minutos. Posteriormente, la disolución se filtra a vacío y el disolvente se elimina en rotavapor, obteniéndose **2** en forma de precipitado amarillo. Rendimiento: 560 mg (62%). AE calculado para (C₁₈H₁₆N₂O₅S), (P_m=372.4): C, 58.05; H, 4.33; N, 7.52; S, 8.61. Encontrado: C, 58.61; H, 5.36; N, 6.20; S, 9.29. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.61 (s, 2H; CH), 7.42 (dd, J=1.1 y 5.1 Hz, 1H; CH), 7.09 (dd, J=1.1 y 3.5 Hz, 1H; CH), 7.03 (dd, J=3.6 y 5.0 Hz, 1H; CH), 6.94 (dd, J=1.7 y 2.5 Hz, 1H; CH), 6.19 (dd, J=1.8 y 3.5 Hz, 1H; CH), 6.07 (m, 1H; CH), 4.23 (t, J=6.9 Hz, 2H; CH₂), 4.09 (t, J=5.8 Hz, 2H; CH₂), 2.08 (dt, J=6.1 y 12.6 Hz, 2H; CH₂). HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₈H₁₇N₂O₅S [M+H]⁺: 373.0858; encontrado: 373.0844. IR: 3224 (m), 2921 (mf), 2857 (m), 1729 (mf), 1603 (m), 1447 (m), 1400 (mf), 1361 (mf), 1194 (f), 1105 (m), 1038 (m), 773 (m), 684 (m).

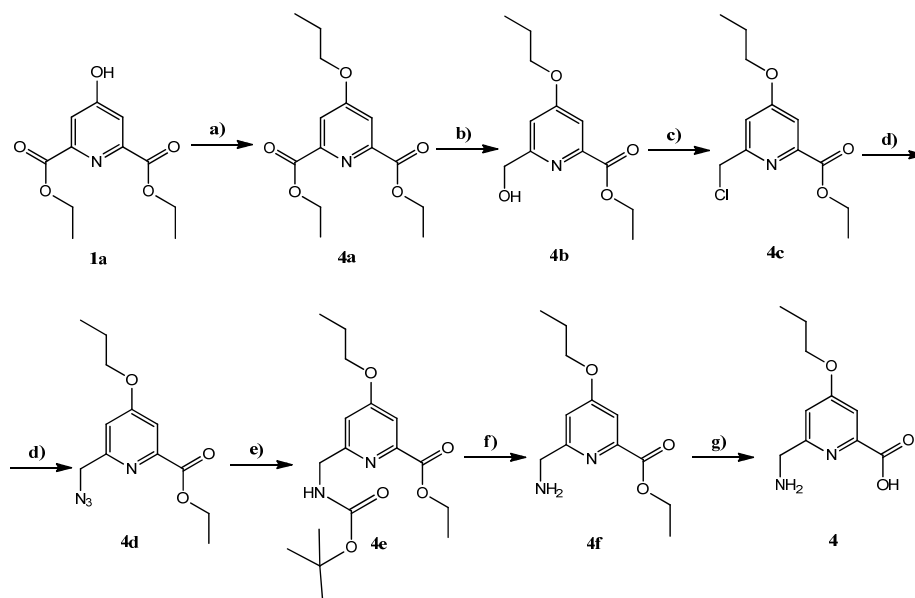
2.1.2.a.3 (4-propoxipiridín-2,6-diil)dimetanol (**3**)

(4-propoxipiridín-2,6-diil)dimetanol, (**3**). A una disolución de **4a** (3.17 g, 11.3 mmol) en diclorometano anhidro (20 mL) y etanol anhidro (50 mL) se le añade borohidruro de sodio (1 g, 37.6 mmol) bajo una atmósfera de N_2 y a 0°C . La mezcla de reacción se mantiene agitando a esa temperatura durante 30 minutos y posteriormente a temperatura ambiente durante 2 horas. La disolución se neutraliza adicionando ácido clorhídrico (1 M) gota a gota. El disolvente se elimina en rotavapor y se adiciona diclorometano. Aparece un precipitado granuloso blanco correspondiente a **3** que se filtra, lava y seca. Rendimiento: 254 mg (11.40%). AE calculado para ($\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_3$), ($P_m=197.1$): C, 60.88; H, 7.67; N, 7.11. Encontrado: C, 61.00; H, 7.96; N, 7.30. $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 6.84 (s, 2H; CH), 5.31 (t, $J=5.8$ Hz, 2H; OH), 4.45 (d, $J=5.8$ Hz, 4H; CH_2), 4.01 (t, $J=6.5$ Hz, 2H; CH_2), 1.75 (m, 2H; CH_2), 0.98 (t, $J=7.4$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{NO}_3$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$: 198.1122; encontrado: 198.1122. IR: 3314 (m), 2975 (d), 2926 (d), 2876 (d), 2780 (d), 1599 (mf), 1567 (m), 1432 (m), 1375 (m), 1358 (m), 1323 (f), 1227 (d), 1160 (f), 1126 (m), 1094 (f), 1060 (f), 1034 (mf), 984 (m), 960 (d), 941 (md), 858 (d), 781 (d), 691 (d), 630 (m), 583 (d), 518 (d).

2.1.2.b Ligandos hidroxo-amino

2.1.2.b.1 Ácido 6-(aminometil)-4-propoxipicolínico (**4**)

La síntesis del ligando se ha llevado a cabo utilizando una modificación de un método previamente descrito en bibliografía.^[6]



- a)** *Diethyl-4-propoxipirimidin-2,6-dicarboxilato, (4a)*. A una disolución de **1a** (3.03 g, 12.67 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (75 mL) se le añade hidruro de sodio (0.62 g, 15.4 mmol) bajo una atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se mantiene agitando durante 30 minutos. Después de ese tiempo, se añade 1-yodopropano (5 mL, 50 mmol), y la mezcla de reacción resultante se mantiene agitando bajo una atmósfera de N_2 durante 72 horas. Después de ese tiempo, el disolvente se elimina en rotavapor. El producto resultante se disuelve en diclorometano (50 mL) y se lava con una disolución acuosa saturada de hidrógeno carbonato de sodio (1x50 mL) y cloruro de sodio (1x50 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de sodio, se filtra y el disolvente se elimina en rotavapor hasta obtener **4a** en forma de precipitado

blanco. Rendimiento: 3.43 g (96.3%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.71 (s, 2H; CH), 4.37 (q, $J=7.1$ Hz, 4H; CH_2), 4.17 (t, $J=6.5$ Hz, 2H; CH_2), 1.76 (dt, $J=6.8$ y 13.5 Hz, 2H; CH_2), 1.34 (t, $J=7.1$ Hz, 6H; CH_3), 0.99 (t, $J=7.5$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 282.1341; encontrado: 282.1336.

- b) *Etil 6-(hidroximetil)-4-propoxipicolinato*, (**4b**). A una disolución de **4a** (2.25 g, 8 mmol) en diclorometano anhidro (20 mL) y etanol anhidro (70 mL) se le añade borohidruro de sodio (0.6 g, 16 mmol) bajo una atmósfera de N_2 y a 0°C . La mezcla de reacción se mantiene agitando a esa temperatura durante 30 minutos y, posteriormente, a temperatura ambiente durante 4 horas. Se neutraliza la disolución adicionando ácido clorhídrico (1 M) gota a gota. El disolvente se elimina en rotavapor y se purifica mediante una cromatografía en columna para obtener **4b** (gel de sílice, diclorometano/metanol 98:2 vol/vol). Rendimiento: 1.05 g (62.18%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.39 (d, $J=2.3$ Hz, 1H; CH), 7.21 (d, $J=2.2$ Hz, 1H; CH), 5.52 (t, $J=5.9$ Hz, 1H; OH), 4.55 (d, $J=5.8$ Hz, 2H; CH_2), 4.32 (q, $J=7.1$ Hz, 2H; CH_2), 4.09 (t, $J=6.5$ Hz, 2H; CH_2), 1.76 (m, 2H; CH_2), 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, 3H; CH_3), 0.98 (t, $J=7.4$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, fragmento de la molécula: 212.0923; encontrado: 212.0922.
- c) *Etil 6-(clorometil)-4-propoxipicolinato*, (**4c**). A una disolución de **4b** (1.05 g, 5 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (20 mL) se le adiciona dicloruro de tionilo (1.62 mL, 22.4 mmol) bajo atmósfera de N_2 , y la mezcla de reacción se mantiene agitando durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se elimina el disolvente y el exceso de dicloruro de tionilo en rotavapor para obtener **4c** en forma de sirupo. Rendimiento: 1.28 g (reacción cuantitativa). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.51 (s, 1H; CH), 7.44 (s, 1H; CH), 4.80 (s, 2H; CH_2), 4.34 (q, $J=7.0$ Hz, 2H; CH_2), 4.13 (t, $J=6.4$ Hz, 2H; CH_2), 1.74 (m, 2H; CH_2), 1.31 (t, $J=7.1$ Hz, 3H; CH_3), 0.96 (t, $J=7.4$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NO}_3\text{Cl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 258.0897; encontrado: 258.0887.
- d) *Etil 6-(azidometil)-4-propoxipicolinato* (**4d**). A una disolución de **4c** (1.28 g, 5 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (20 mL aprox.) se le añade azida de sodio (390.1 mg, 6 mmol) bajo una atmósfera de N_2 , y la mezcla de reacción se

mantiene agitando a temperatura ambiente durante 3 horas. El disolvente se elimina en rotavapor y se adiciona diclorometano (20 mL). El precipitado no disuelto se filtra, y el disolvente se elimina en rotavapor. Se realiza una cromatografía para obtener **4d** de forma pura (gel de sílice, cloroformo/metanol 9:1 vol/vol). Rendimiento: 710 mg (53.8%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.49 (d, $J=2.3$ Hz, 1H; CH), 7.36 (d, $J=2.3$ Hz, 1H; CH), 4.77 (s, 2H; CH_2), 4.34 (q, $J=7.1$ Hz, 2H; CH_2), 4.11 (t, $J=6.5$ Hz, 2H; CH_2), 1.76 (m, 2H; CH_2), 1.33 (t, $J=7.1$ Hz, 3H; CH_3), 0.98 (t, $J=7.4$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 265.1301; encontrado: 265.1302.

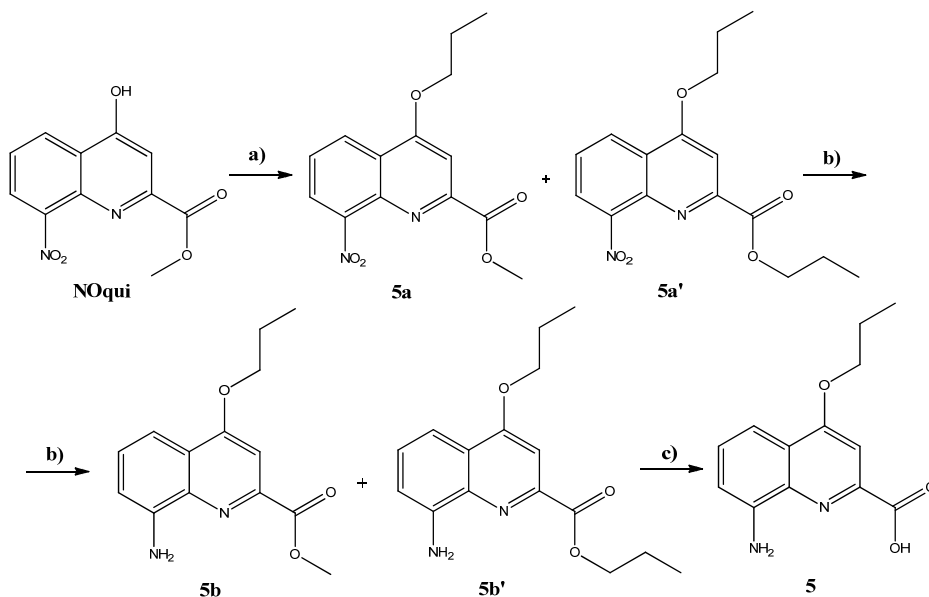
e) *6-((tert-butoxi-carbonilamino)metil)-4-propoxipicolinato de etilo, (4e)*. A una disolución de **4d** (750 mg, 2.84 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (15 mL) se le añade trifenilfosfina (745 mg, 2.84 mmol) bajo una atmósfera de N_2 , y la mezcla de reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 3 horas. A continuación se añade agua (2 mL) y se mantiene a reflujo durante 5 horas. el disolvente se elimina en rotavapor y se adiciona tolueno (20 mL), dicarbonato ditertbutilo (940 mg, 4.30 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (70.14 mg, 0.574 mol). La mezcla de reacción se mantiene agitando 16 horas, se elimina el disolvente en rotavapor, se añade diclorometano (20 mL aprox.) y se lava con agua (3x75 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de sodio, se filtra, y se elimina el disolvente en rotavapor. El residuo se purifica mediante una cromatografía en columna para obtener **4e** (gel de sílice, hexano/acetato de etilo/diclorometano 6:3:1 vol/vol/vol). Rendimiento: 500 mg (52.09%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.43 (d, $J=2.4$ Hz, 1H; CH), 7.20 (d, $J=2.3$ Hz, 1H; CH), 4.33 (q, $J=4.3$ Hz, 2H; CH_2), 4.16 (s, 2H; CH_2), 4.08 (t, $J=6.5$ Hz, 2H; CH_2), 1.75 (m, 2H; CH_2), 1.44 (s, 9H; CH_3), 1.32 (t, $J=7.1$ Hz, 3H; CH_3), 0.97 (t, $J=7.4$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z: calculado para $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 339.1936; encontrado: 339.1920.

f) *Etil 6-(aminometil)-4-propoxipicolinato, (4f)*. A una disolución de **4e** (500 mg, 1.48 mmol) en diclorometano (1 mL aprox.) se le añade ácido trifluoroacético (1.81 mL, 25.86 mmol) gota a gota y se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 6 horas. A continuación, se añade tolueno (5 mL) y se

elimina el disolvente en rotavapor. El residuo se purifica mediante una cromatografía en columna para obtener **4f** (gel de sílice, diclorometano/metanol 7:3 vol/vol). Rendimiento: 350 mg (99.35%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.45 (s, 1H; CH), 7.13 (s, 1H; CH), 4.33 (dd, J=7.2 y 14.0 Hz, 2H; CH_2), 4.06 (m, 4H; CH_2), 1.75 (m, 2H; CH_2), 1.30 (t, J=6.7 Hz, 3H; CH_3), 0.97 (t, J=7.3 Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z: calculado para $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, fragmento de la molécula: 210.1130; encontrado: 210.1139.

- g) *Ácido 6-(aminometil)-4-propoxipicolínico*, (**4**). A una disolución de **4f** (350 mg, 1.24 mmol) en metanol (50 mL) se le adiciona metóxido de sodio (1 mL, 1 M) y se deja agitando a temperatura ambiente durante 48 horas. Tras ese tiempo, aparece un precipitado. A la disolución se le añaden 2 cucharadas de *Amberlite*[®] y se deja agitando hasta que el pH de la disolución es neutro. Se filtra y la disolución se deja evaporar hasta que precipita **4** de forma pura. Rendimiento: 282 mg (90%). $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz, DMSO- d_6): 7.35 (s, 1H; CH), 7.08 (s, 1H; CH), 4.06 (t, J=6.5 Hz, 2H; CH_2), 3.85 (s, 2H; CH_2), 1.74 (m, 2H; CH_2), 0.97 (t, J=7.3 Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z: calculado para $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 239.1396; encontrado: 239.1391. IR: 3422 (m), 1684 (f), 1439 (d), 1381 (d), 1208 (f), 1142 (m), 848 (d), 803 (d), 725 (d), 668 (md), 604 (md), 521 (md).

2.1.2.b.2 Ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico (5)



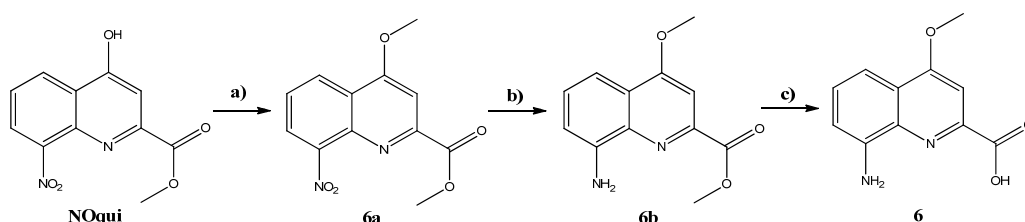
- a) *Metil 8-nitro-4-propoxiquinolona-2-carboxilato y propil 8-nitro-4-propoxiquinolona-2-carboxilato, (5a y 5a')*. A una disolución de metil-8-nitro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-2-carboxilato, **NOqui**, (1.5 g, 6.09 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (50 mL) se le añade hidruro de sodio (0.36 g, 9.14 mmol) bajo una atmósfera de N₂. La mezcla de reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos, se añade 1-yodopropano (5 mL, 51.26 mmol) y se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 6 días. Se elimina el disolvente en rotavapor y se añade tolueno (100 mL). Se lava con agua (2x75 mL) y la fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio, se filtra y se elimina el disolvente en rotavapor. El residuo se purifica mediante una cromatografía en columna para obtener una mezcla de **5a** y **5a'** (1:1), que no se pudo separar (gel de sílice, hexano/acetato de etilo 8:2 vol/vol). Rendimiento: 2 g. **5a** ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.46 (d, J=8.7 Hz, 1H; CH), 8.35 (d, J=7.4 Hz, 1H; CH), 7.83 (t, J=7.9 Hz, 1H; CH), 7.68 (s, 1H; CH), 4.38 (t, J=6.2 Hz, 2H; CH₂), 3.95 (s, 3H; CH₃), 1.94 (m, 2H; CH₂), 1.09 (t, J=7.3 Hz, 3H; CH₃). **5a'** ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.47 (d, J=8.5 Hz, 1H; CH), 8.37 (d,

J=7.5 Hz, 1H; CH), 7.85 (t, J=7.9 Hz, 1H; CH), 7.66 (s, 1H; CH), 4.37 (m, 4H; CH₂), 1.94 (m, 2H; CH₂), 1.78 (m, 2H; CH₂), 1.11 (t, J=7.3 Hz, 3H; CH₃), 1.01 (t, J=7.4 Hz, 3H; CH₃).

- b) *Metil 8-amino-4-propoxiquinolona-2-carboxilato y propil 8-amino-4-propoxiquinolona-2-carboxilato, (5b y 5b')*. A una disolución de **6a** y **6a'** (2g) en metanol previamente purificado con "carbón activo" (200 mL) se le añade una cantidad catalítica de Pd/C (200 mg, 10%). La mezcla de reacción se mantiene agitando bajo una atmósfera de H₂ (1 atm) durante 40 horas, se filtra sobre Cellite® y el disolvente se elimina en rotavapor para obtener la correspondiente mezcla de **5b** y **5b'** en forma de sirupo amarillo. Rendimiento: 1 g. **5b** y **5b'** ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.46 (d, J=4.6 Hz, 2H; CH), 7.38 (t, J=7.8 Hz, 2H; CH), 7.29 (d, J=8.1 Hz, 2H; CH), 6.9 (d, J=7.5 Hz, 2H; CH), 6.02 (s, 4H; NH₂), 4.26 (t, J=6.4 Hz, 4H; CH₂), 4.11 (q, J=5.2 Hz, 2H; CH₂), 3.95 (s, 3H; CH₃), 1.90 (dq, J=7.3 y 14.4 Hz, 4H; CH₂), 1.79 (m, 2H; CH₂), 1.08 (t, J=7.4 Hz, 6H; CH₃), 1.04 (t, J=7.4 Hz, 3H; CH₃). **5b** HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₄H₁₇N₂O₃ [M+H]⁺: 261.1239; encontrado: 261.1232. **5b'** HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₆H₂₁N₂O₃ [M+H]⁺: 289.1552; encontrado: 289.1543.
- c) *Ácido 8-amino-4-propoxiquinolona-2-carboxílico, (5)*. A una disolución de **5b** y **5b'** (1 g) en metanol anhidro (20 mL) se le añade gota a gota una disolución de metóxido de sodio (10 mL, 1 M) en metanol anhidro. La mezcla de reacción se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 12 horas y, posteriormente, se calienta a 60°C durante 2 horas. El pH se ajusta a 7 adicionando Amberlite® (0.5 g aprox.), se filtra y el disolvente se elimina en rotavapor para obtener **5** en forma de precipitado marrón. Rendimiento: 900 mg. AE calculado para (C₁₃H₁₄N₂O₃)(H₂O)_{0.65}, (P_m=257.9): C, 60.51; H, 5.98; N, 10.86. Encontrado: C, 60.50; H, 5.54; N, 10.59. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 12.74 (s, 1H; OH), 7.48 (s, 1H; CH), 7.38 (t, J=7.9 Hz, 1H; CH), 7.24 (d, J=8.42 Hz, 1H; CH), 6.89 (d, J=7.8 Hz, 1H; CH), 6.52 (s, 2H; NH₂), 4.27 (t, J=6.4 Hz, 2H; CH₂), 1.90 (m, 2H; CH₂), 1.08 (t, J=7.3 Hz, 3H; CH₃). HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₃H₁₅N₂O₃ [M+H]⁺: 247.1083; encontrado: 247.1073. IR: 3334 (m), 3140 (f), 2969 (m), 1682 (f), 1634 (f), 1608 (d), 1579 (f), 1536 (f), 1488 (mf), 1458 (m),

1430 (f), 1352 (mf), 1304 (m), 1281 (d), 1255 (d), 1217 (d), 1124 (d), 1075 (m), 1028 (m), 938 (md), 891 (m), 854 (d), 799 (m), 774 (m), 747 (m), 720 (m), 623 (d), 604 (d), 578 (d), 562 (d), 527 (d), 508 (md), 482 (md).

2.1.2.b.3 Ácido 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxílico (**6**)

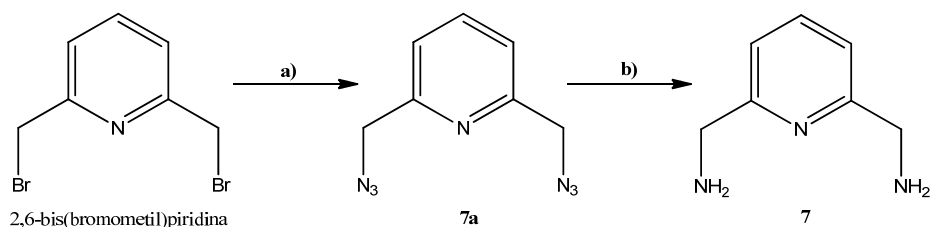


8-nitro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-2-carboxilato, (**NOqui**). La síntesis de este compuesto se llevó a cabo de acuerdo con un método descrito previamente en bibliografía.^[7]

- a) *Metil 4-metoxi-8-nitroquinolina-2-carboxilato*, (**6a**). A una disolución de **NOqui** (2g, 8.06 mmol) en *N,N*-dimetilformamida anhidra (200 mL) se le añade hidruro de sodio (0.3226 g, 8.06 mmol) bajo una atmósfera de N₂. Se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 30 minutos, se le añade yodometano (2.5 mL, 40.2 mmol) y se mantiene agitando a temperatura ambiente durante 12 horas. Se elimina el disolvente en rotavapor y se añade diclorometano (500 mL), tras lo que aparece un precipitado insoluble que se elimina por filtración. La disolución se lava con una disolución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% (4x100 mL) y cloruro de sodio (2x100 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio, se filtra y el disolvente se elimina en rotavapor. El precipitado se recrystaliza en etanol, se filtra y se seca a vacío obteniendo el producto **6a**. Rendimiento: 1.3 g (61.5%).
¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.42 (d, J=8.5 Hz, 1H; CH), 8.35 (d, J=7.5 Hz, 1H; CH), 7.83 (t, J=8.0 Hz, 1H; CH), 7.68 (s, 1H; CH), 4.19 (s, 3H; CH₃), 3.97 (s, 3H; CH₃).

- b) *Metil 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxilato*, (**6b**). A una disolución de **6a** (1.3 g, 4.96 mmol) en metanol (120 mL) se le añade una cantidad catalítica de Pd/C (130 mg, 10%). La mezcla se mantiene agitando a temperatura ambiente y bajo una atmósfera de H₂ (1 atm) durante 24 horas. A continuación, se filtra a través de Cellite® para eliminar el Pd/C y el filtrado se lleva a sequedad en rotavapor obteniéndose **6b** en forma de precipitado amarillo. Rendimiento: 1.17 g (99.7%). AE calculado para (C₁₂H₁₂N₂O₃)(H₂O)_{0.25}, (P_m=236.7): C, 60.89; H, 5.29; N, 11.84. Encontrado: C, 60.05; H, 6.13; N, 11.85. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.49 (s, 1H; CH), 7.37 (t, J=7.9 Hz, 1H; CH), 7.28 (d, J=8.2 Hz, 1H; CH), 6.96 (dd, J=2.2 y 7.6 Hz, 1H; CH), 4.08 (s, 3H; CH₃), 3.94 (s, 3H; CH₃). HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₂H₁₂N₂O₃ [M+H]⁺: 233.0926; encontrado: 233.0845.
- c) *Ácido 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxílico*, (**6**). Una disolución de **6b** (1.165 g, 5.02 mmol) en hidróxido de sodio (120 mL, 0.5 M) se mantiene a reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se enfría, se acidifica con una disolución de ácido clorhídrico al 20% hasta alcanzar un pH de 5.3 y se enfría a 4°C durante 2 horas. El precipitado se filtra, lava y seca obteniendo el producto **6**. Rendimiento: 1.06 g (96%). AE calculado para (C₁₁H₁₀N₂O₃)(H₂O)_{0.5}, (P_m=227.2): C, 58.15; H, 4.85; N, 12.33. Encontrado: C, 58.17; H, 5.22; N, 12.15. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 12.79 (d, J=11.5 Hz, 1H; OH), 7.49 (s, 1H; CH), 7.36 (t, J=7.9 Hz, 1H; CH), 7.20 (d, J=8.1 Hz, 1H; CH), 6.87 (d, J=7.6 Hz, 1H; CH), 6.53 (s, 2H, NH₂), 4.08 (s, 3H, CH₃). IR: 3440 (f), 3335 (d), 3113 (d), 1366 (md), 1340 (md), 1692 (d), 1638 (m), 1586 (d), 1541 (m), 1487 (m), 1416 (d), 1353 (m), 1080 (m), 1044 (8md), 893 (md), 793 (d), 774 (d), 736 (d), 716 (d), 617 (md), 465 (d).

2.1.2.c Ligandos amino-amino

2.1.2.c.1 Piridín-2,6-diildimetanamina (**7**)

a) *2,6-bis(azidometil)piridina* (**7a**). A una disolución de 2,6-bis(bromometil)piridina (0.25g, 1 mmol) en etanol:agua (10:1) se le añade azida de sodio (0.62 g, 10 mmol) y se mantiene a reflujo durante 48 horas. El disolvente se elimina en rotavapor y se le añade diclorometano (100 mL). Se lava con una disolución acuosa de hidrógeno carbonato de sodio al 10% (1x100 mL) y otra de cloruro de sodio (1x100 mL). La fase orgánica se recoge, se seca con sulfato de magnesio, se filtra y el disolvente se elimina en rotavapor para obtener **7a** en forma de sirupo amarillo. Rendimiento: 100 mg (77.3%). ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.86 (td, J=1.2 y 7.8 Hz, 1H; CH), 7.38 (d, J=7.7 Hz, 2H; CH), 4.51 (s, 4H; CH₂). ¹³C-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 54.66 (CH₂), 122.07 (CH), 138.75 (CH), 156.21 (C). IR: 2929 (d), 2109 (mf), 1718 (d), 1594 (m), 1576 (m), 1458 (m), 1435 (d), 1332 (m), 1280 (f), 1159 (d), 1095 (md), 996 (d), 902 (md), 797 (d), 761 (m), 655 (d), 556 (d).

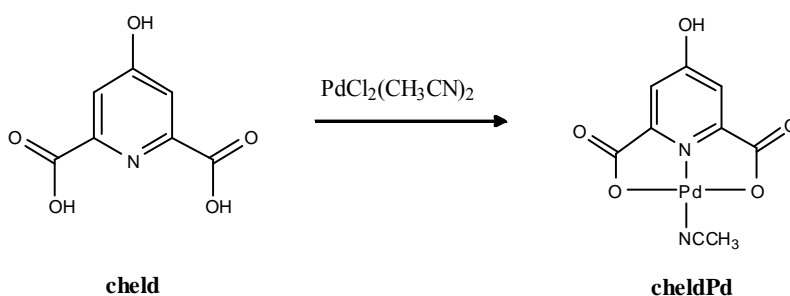
b) *Piridín-2,6-diildimetanamina* (**7**). A una disolución de **7a** (40 mg, 0.3 mmol) en metanol (3 mL) previamente purificado con "carbón activo" se le añade una cantidad catalítica de Pd/C (6 mg, 10% aprox.). La mezcla de reacción se mantiene agitando bajo una atmósfera de H₂ (3 atm) durante 16 horas, se filtra sobre Cellite® y el disolvente se elimina en rotavapor para obtener **7a** en forma de sirupo amarillo. Rendimiento: reacción cuantitativa. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.88 (t, J=7.7 Hz, 1H; CH), 7.40 (d, J=7.7 Hz, 2H; CH), 4.52 (s, 4H; CH₂). ¹³C-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 54.67 (CH₂), 122.07 (CH), 138.74

(CH), 156.19 (C). HRMS (ESI): m/z: calculado para $C_7H_{12}N_3$ $[M+H]^+$: 138.1031; encontrado: 138.1029.

2.1.3 Complejos metálicos

2.1.3.a Complejos primarios de Pd(II), Pt(II) y Cu(II) con ligandos hidroxo-hidroxo

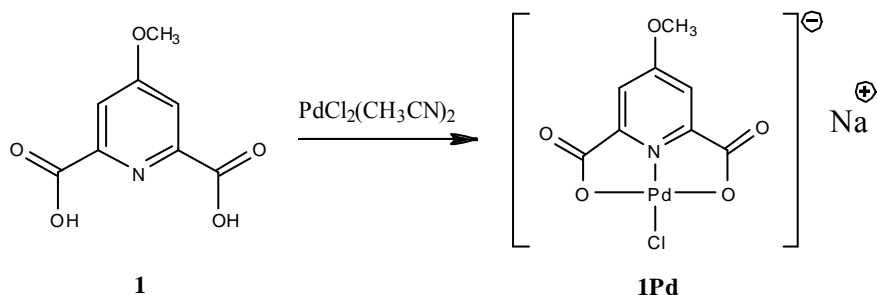
2.1.3.a.1 $[Pd(cheld)(NCCH_3)]$, **cheldPd**



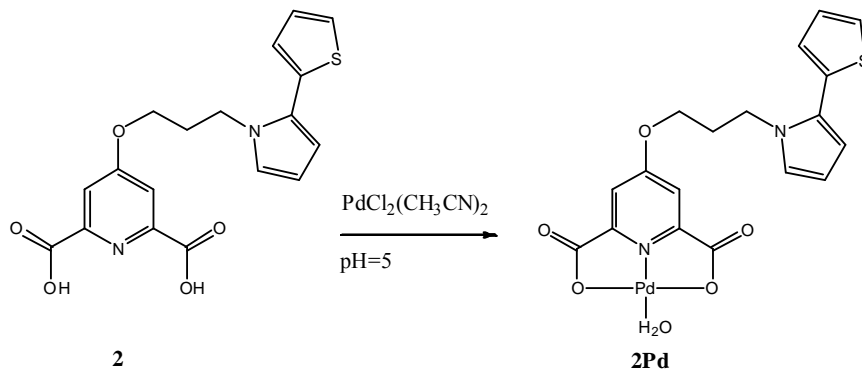
*Síntesis del complejo $[Pd(cheld)(CH_3CN)]$, **cheldPd**.* Una suspensión de $PdCl_2$ (354.66 mg, 2 mmol) en acetonitrilo (60 mL) se mantiene a reflujo durante 30 minutos hasta su completa disolución. Se filtra a temperatura ambiente para eliminar las impurezas insolubles y a continuación se le añade una disolución de **cheld** (366.24 mg, 2 mmol) en agua (50 mL). La mezcla de reacción se mantiene a reflujo durante 12 horas. Posteriormente, se deja enfriar a temperatura ambiente, apareciendo el producto **cheldPd** como un precipitado naranja que se recoge por filtración, se lava y se seca. La disolución se deja evaporar a temperatura ambiente obteniéndose más producto por evaporación. Rendimiento: 350 mg (68.47%). AE calculado para $Pd(C_7H_3NO_5)(CH_3CN)$, ($P_m=328.6$): C, 32.92; H, 1.83; N, 8.53. Encontrado: C, 32.65; H, 1.96; N, 8.51. 1H -RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$, $75^\circ C$): δ 7.05 (s, 2H, CH_{py}), 2.03 (s, 3H, $CH_{3,Acet.}$). IR: 3458 (m), 3022 (m), 2928 (m), 2716 (d), 2597 (d), 2334 (m), 2309 (md), 1684 (mf), 1628 (mf), 1582 (md),

1458 (f), 1359 (mf), 1269 (m), 1228 (m), 1176 (md), 1085 (mf), 924 (m), 911 (m), 799 (m), 757 (m), 701 (md), 638 (m), 571 (m), 460 (m).

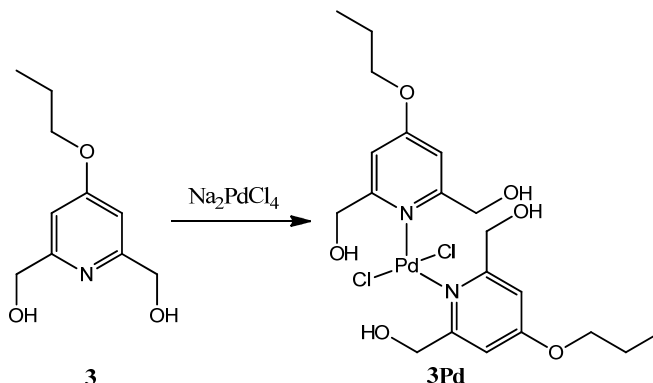
2.1.3.a.2 [Pd(1)Cl], **1Pd**



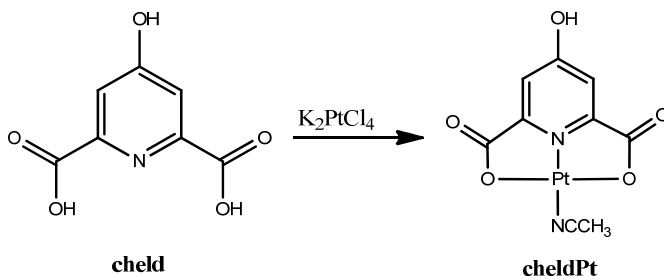
*Síntesis del complejo [Pd(1)Cl], **1Pd**.* Una suspensión de PdCl₂ (148 mg, 0.5 mmol) en acetonitrilo (10 mL) se mantiene a reflujo durante 30 minutos hasta su completa disolución. Se filtra a temperatura ambiente para eliminar impurezas insolubles y, a continuación, se añade sobre una disolución de **1** (136.6 mg, 0.5 mmol) en agua (5 mL) con unas gotas de una disolución de hidróxido de sodio saturada. La mezcla de reacción se calienta sin que llegue a ebullición y se mantiene agitando durante 5 minutos. A continuación, se concentra en rotavapor hasta que empieza a precipitar el complejo **1Pd**. Se guarda el matraz en el frigorífico durante unas horas, tras lo cual el precipitado de color naranja se filtra, lava y seca. Rendimiento: 130 mg (65.42%). AE calculado para [Pd(C₈H₅NO₅)Cl](Na)(H₂O)_{2.1}, (P_m=397.8): C, 24.15; H, 2.33; N, 3.52. Encontrado: C, 24.13; H, 3.13; N, 3.78. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.25 (s, 2H; CH), 3.99 (s, 3H; CH₃). IR: 3411 (d), 1615 (mf), 1473 (f), 1398 (f), 1329 (f), 1259 (d), 1128 (m), 1059 (f), 931 (d), 878 (d), 796 (m), 741 (m), 598 (md), 537 (md), 481 (d).

2.1.3.a.3 $[\text{Pd}(\mathbf{2})(\text{H}_2\text{O})]$, **2Pd**

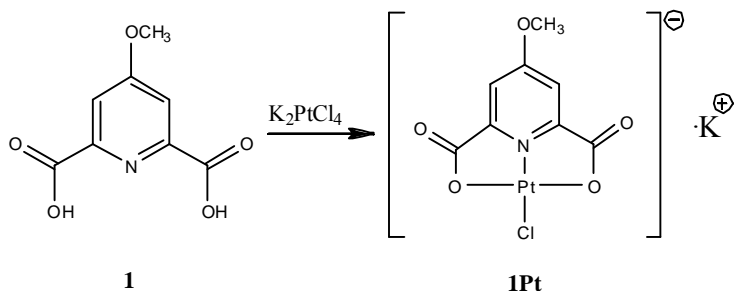
*Síntesis del complejo $[\text{Pd}(\mathbf{2})(\text{H}_2\text{O})]$, **2Pd**.* Una suspensión de PdCl_2 (209 mg, 0.8 mmol) en acetonitrilo (50 mL) se mantiene a reflujo durante 30 minutos hasta su completa disolución. Se filtra a temperatura ambiente para eliminar impurezas insolubles y, a continuación, se le añade gota a gota una disolución de **2** (300 mg, 0.8 mmol) en una mezcla de acetonitrilo:agua (20 mL, 3:4). A medida que se va completando la adición, la disolución inicial de color naranja intenso se va oscureciendo a la vez que empieza a aparecer un precipitado. En ese momento, el pH de la reacción está en torno a 5. La mezcla de reacción se mantiene agitando a 60°C durante 2 horas en oscuridad. La disolución se filtra en caliente y el precipitado oscuro se desecha. La disolución de color naranja se guarda en oscuridad para dejarla evaporar a temperatura ambiente. El complejo que precipita después de 4 días (165 mg) se filtra, lava, y seca, y se disuelve en diclorometano:metanol (40 mL, 6:4). La disolución se concentra en rotavapor hasta que precipita el complejo **2Pd** de color naranja que se filtra, lava y seca. Rendimiento: 40 mg (9.8%). AE calculado para $[\text{Pd}(\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5\text{S})(\text{H}_2\text{O})] \cdot (\text{H}_2\text{O})$, ($P_m=512.83$): C, 42.15; H, 3.53; N, 5.46; S, 6.25. Encontrado: C, 42.04; H, 3.39; N, 5.17; S, 5.24. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6): δ 7.43 (s, 1H, CH), 7.23 (s, 2H, CH), 7.15 (s, 1H; CH), 7.02 (s, 1H; CH), 6.87 (s, 1H; CH), 6.17 (s, 1H; CH), 6.05 (s, 1H; CH), 4.22 (m, 2H; CH_2), 4.09 (m, 2H; CH_2), 2.04 (m, 2H; CH_2). IR: 3419 (m), 3098 (d), 2925 (d), 1660 (mf), 1612 (mf), 1446 (m), 1347 (mf), 1127 (d), 1089 (m), 1057 (d), 794 (m), 755 (d), 627 (md), 575 (md), 453 (md).

2.1.3.a.4 $[\text{Pd}(\mathbf{3})_2\text{Cl}_2]$, **3Pd**

*Síntesis del $[\text{Pd}(\mathbf{3})_2\text{Cl}_2]$, **3Pd**.* A una disolución de **3** (98.62 mg, 0.5 mmol) en una mezcla de agua:acetonitrilo (20 mL, 9:1) se le añade gota a gota una disolución de Na_2PdCl_4 (147.1 mg, 0.5 mmol) en agua (10 mL), y se mantiene agitando a 75°C durante 12 horas. El precipitado oscuro que se observa se filtra y desecha. El filtrado de color amarillo se guarda en oscuridad, se deja evaporar a temperatura ambiente y, después de varios días, precipita una pequeña cantidad de un sólido de color oscuro que se desecha. A las tres semanas se obtienen cristales romboédricos de **3Pd** aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 30 mg (11.2%). AE calculado para $[\text{Pd}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_3)_2\text{Cl}_2](\text{H}_2\text{O})_{2.5}$, ($P_m=616.82$): C, 38.94; H, 5.71; N, 4.54. Encontrado: C, 38.84; H, 6.09; N, 5.39. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.05 (s, 4H; CH), 6.17 (t, $J=5.7$ Hz, 4H; OH), 5.13 (d, $J=5.8$ Hz, 8H; CH_2), 4.13 (t, $J=6.5$ Hz, 4H; CH_2), 1.77 (m, 4H; CH_2), 0.98 (t, $J=7.3$ Hz, 6H; CH_3). IR: 3446 (f), 3338 (m), 2968 (m), 2934 (d), 2882 (d), 1742 (f), 1618 (mf), 1515 (m), 1445 (f), 1384 (m), 1310 (m), 1226 (f), 1160 (m), 1073 (f), 919 (8d), 854 (d), 601 (md), 537 (md), 476 (md).

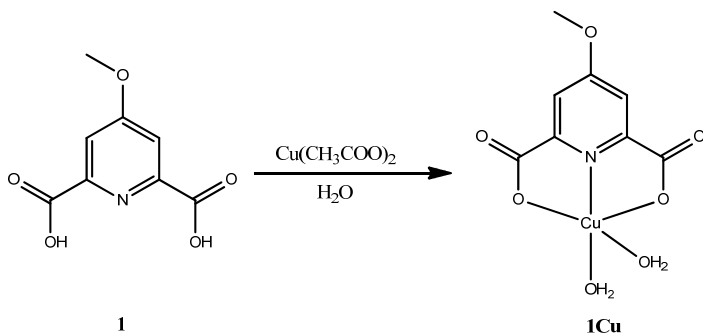
2.1.3.a.5 [Pt(cheld)(CH₃CN)], **cheldPt**

*Síntesis del complejo [Pt(cheld)CH₃CN], **cheldPt**.* A una disolución de K₂PtCl₄ (204.9 mg, 0.5 mmol) en agua (28 mL) y acetonitrilo (2 mL) se le añade una disolución de **cheld** (98.4 mg, 0.5 mmol) en agua (20 mL), que ha estado previamente a reflujo durante 30 minutos. La disolución final se mantiene a reflujo durante 2 horas, observándose como su color cambia de rojo a amarillo. Tras ese tiempo, aparece un precipitado amarillo correspondiente al complejo **cheldPt** que se filtra, lava y seca. Rendimiento: 133.6 mg (64.03%). AE calculado para [Pt(C₇H₃NO₅)(CH₃CN)], (P_m=417.2): C, 25.89; H, 1.43; N, 6.71. Encontrado: C, 25.97; H, 1.53; N, 6.29. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.26 (s, 2H, CH_{py}), 2.07 (s, 3H, CH_{3,Acet.}). IR: 3053 (d), 1703 (mf), 1647 (mf), 1617 (md), 1455 (m), 1353 (mf), 1275 (d), 1220 (md), 1092 (f), 925 (d), 906 (d), 819 (md), 795 (d), 769 (md), 642 (d), 565 (md), 469 (d).

2.1.3.a.6 $K[Pt(1)Cl]$, **1Pt**

*Síntesis del complejo $K[Pt(1)Cl]$, **1Pt**.* La síntesis de este complejo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en bibliografía.^[8] Fue posible la obtención de cristales en forma de agujas que permitieron estudiar la estructura del complejo **1Pt** mediante difracción de rayos X (véase *Anexo II*). AE calculado para $K[Pt(C_8H_6NO_5)_2Cl]$, ($P_m=660.95$): C, 29.05; H, 1.83; N, 4.23. Encontrado: C, 30.98; H, 2.99; N, 4.57. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 7.70 (s, 2H, CH), 3.98 (s, 3H; CH_3). IR: 3434 (m), 1653 (mf), 1614 (mf), 1482 (f), 1353 (f), 1256 (f), 1067 (f), 1015 (d), 909 (m), 794 (8m), 709 (m), 652 (md), 623 (md), 562 (d), 498 (md), 412 (md).

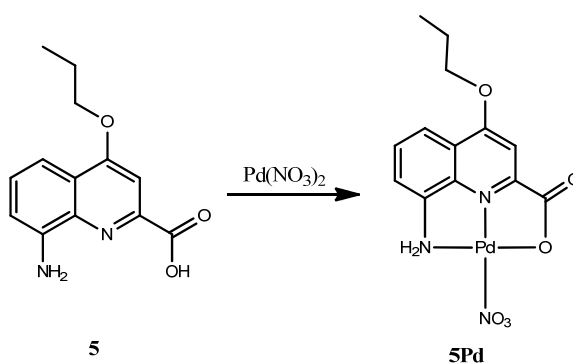
2.1.3.a.7 [Cu(**1**)(H₂O)₂], **1Cu**



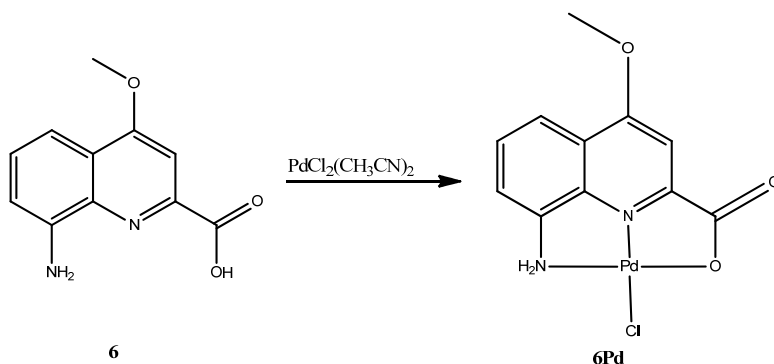
*Síntesis del complejo [Cu(**1**)(H₂O)₂], **1Cu**.* A una disolución de Cu(CH₃COO)₂·H₂O (98 mg, 0.49 mmol) en agua (15 mL) se le añade gota a gota una disolución de **1** (99 mg, 0.5 mmol) en agua (20 mL), y se mantiene agitando a 90°C durante 30 minutos. Tras ese tiempo, se observa la aparición de un precipitado de color azul que se filtra, lava y seca. El filtrado se deja evaporar a temperatura ambiente y aparecen unos cristales de **1Cu** que fueron aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 68 mg (50%). AE calculado para [Cu(C₈H₇NO₆)](H₂O)_{1.1}, (P_m=296.5): C, 32.40; H, 3.13; N, 4.72. Encontrado: C, 32.55; H, 3.75; N, 4.81. IR: 3445 (m), 1645 (mf), 1471 (m), 1375 (mf), 1121 (m), 1072 (f), 1007 (m), 889 (m), 795 (m), 743 8m), 697 8d), 649 (d), 607 (d), 576 (m), 530 (d), 453 (d), 421 (d).

2.1.3.b Complejos primarios Pd(II), Pt(II) y Cu(II) con ligandos hidroxilo-amino

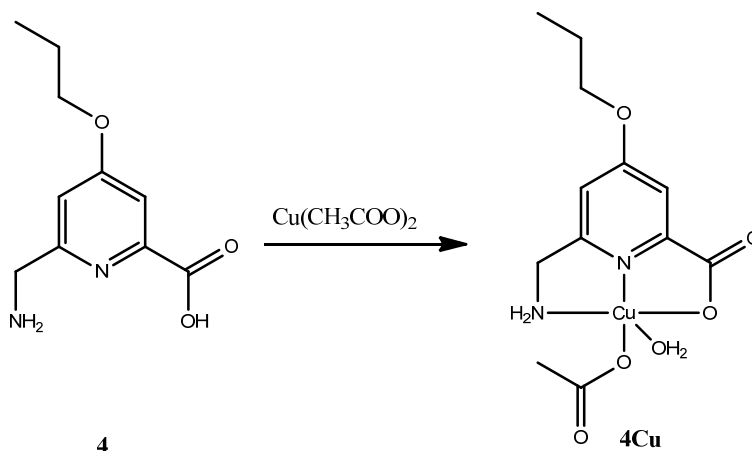
2.1.3.b.1 $[\text{Pd}(\mathbf{5})(\text{NO}_3)]$, **5Pd**



*Síntesis del complejo $[\text{Pd}(\mathbf{5})(\text{NO}_3)]$, **5Pd**.* A una disolución de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (333.1 mg, 0.5 mmol) en agua (10 mL) se le añade una disolución de **5** (123.1 mg, 0.5 mmol) en una mezcla de acetonitrilo:agua (30 mL, 4:3), y el pH se ajusta entre 4-5 con una disolución concentrada de hidróxido de sodio. La disolución se mantiene agitando durante 30 horas a temperatura ambiente y 2 horas a 50°C, en oscuridad. Tras ese tiempo, se filtra para eliminar impurezas, y el filtrado se guarda la disolución en oscuridad, dejándolo evaporar a temperatura ambiente. Después de una semana, precipita el complejo **5Pd** en forma de polvo de color marrón que se filtra, lava y seca. AE calculado para $[\text{Pd}(\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3)(\text{NO}_3)](\text{Pd}(\text{NO}_3)_2)_{0.8}(\text{H}_2\text{O})_{0.85}$, ($P_m=613.3$): C, 25.46; H, 2.42; N, 10.51. Encontrado: C, 25.53; H, 2.70; N, 10.42. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO- d_6): δ 8.81 (d, $J=7.1$ Hz, 1H; CH), 8.67 (d, $J=8.4$ Hz, 1H; CH), 7.98 (t, $J=8.0$ Hz, 1H; CH), 7.50 (s, 1H; CH), 4.50 (m, 2H; CH_2), 1.92 (dd, $J=7.1$ y 14.0 Hz, 2H; CH_2), 1.08 (t, $J=7.1$ Hz, 3H; CH_3). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{O}_6\text{Pd}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 413.9917; encontrado: 413.0502. IR: 3429 (m), 3078 (d), 2969 (d), 2934 (md), 2879 (md), 1673 (mf), 1625 (d), 1584 (mf), 1529 (mf), 1470 (md), 1423 (f), 1371 (md), 1336 (mf), 1284 (md), 1135 (m), 1016 (m), 891 (m), 789 (m), 758 (m), 739 (d), 639 (md), 588 (d), 501 (md).

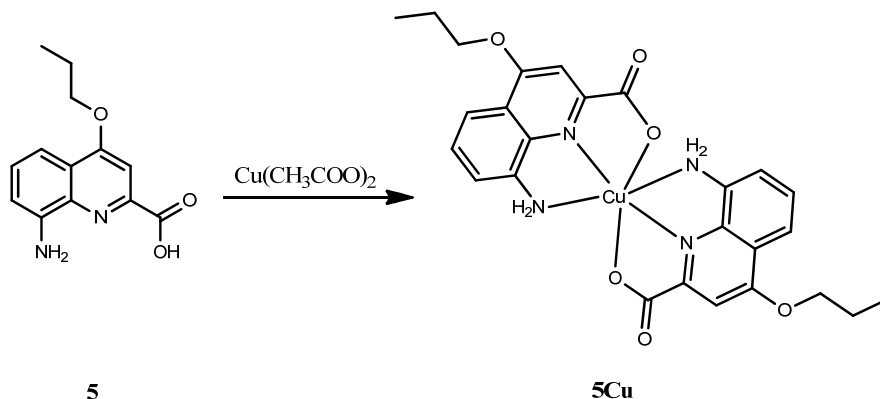
2.1.3.b.2 [Pd(**6**)Cl], **6Pd**

*Síntesis del complejo [Pd(**6**)Cl], **6Pd**.* Una disolución de PdCl₂ (54.18 mg, 0.18 mmol) en acetonitrilo (20 mL) se mantiene a reflujo durante 30 minutos. La disolución se filtra en caliente para eliminar las impurezas insolubles y, a continuación, se adiciona sobre una disolución en caliente de **6** (40 mg, 0.18 mmol) en una mezcla de acetonitrilo:agua (20 mL, 4:1). Aparece un precipitado amarillo, y la mezcla de reacción resultante se mantiene agitando a 60°C durante 2 horas, en oscuridad. A continuación, el precipitado correspondiente a **6Pd** se filtra, lava y seca. Rendimiento: 50 mg (75.3%). AE calculado para [Pd(C₁₁H₉N₂O₃)Cl](H₂O)_{0.65}, (P_m=368.8): C, 35.79; H, 2.76; N, 7.59. Encontrado: C, 35.78; H, 2.60; N, 7.63. ¹H-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.03 (s, 2H; NH₂), 8.03 (d, J=8.3 Hz, 1H; CH), 7.77 (t, J=7.8 Hz, 1H; CH), 7.71 (d, J=7.3 Hz, 1H; CH), 7.29 (s, 1H; CH), 4.23 (s, 3H; CH₃). ¹³C-RMN (500 MHz, DMSO-d₆): δ 58.41 (CH₃), 102.51 (CH), 121.37 (CH), 123.06 (C), 129.06 (CH), 130.91 (CH), 141.77 (C), 145.76 (C), 151.18 (C), 165.57 (C), 172.17 (C). IR: 3207 (m), 3135 (m), 3059 (d), 1659 (mf), 1589 (d), 1554 (d), 1511 (f), 1469 (m), 1389 (f), 1323 (f), 1284 (d), 1236 (d), 1188 (md), 1145 (m), 1055 (f), 890 (d), 790 (d), 762 (m), 729 (md), 687 (md), 646 (md), 601 (md), 543 (md), 472 (md).

2.1.3.b.3 [Cu(**4**)(CH₃COO)(H₂O)], **4Cu**

*Síntesis del complejo [Cu(**4**)(CH₃COO)(H₂O)], **4Cu**.* A una disolución de Cu(CH₃COO)₂·H₂O (100.4 mg, 0.5 mmol) en agua (20 mL) se le añade una disolución de **4** en una mezcla de acetonitrilo:agua (9.32 mL, 0.5 mmol, 95.19 mM), y se mantiene agitando a 50°C durante 1 hora. Tras ese tiempo, se filtra, y la disolución se guarda para que cristalice.

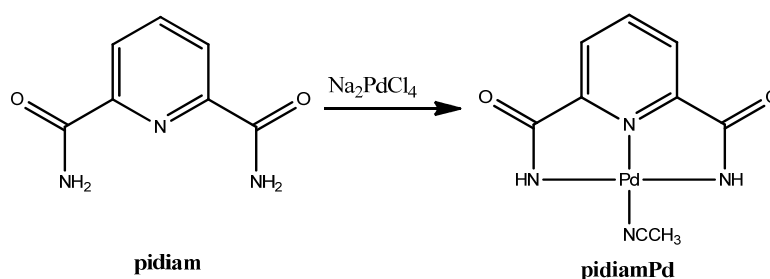
Ya que fue imposible la obtención de un precipitado para el análisis y estudio del complejo en estado sólido, se llevó a cabo su determinación en disolución mediante la técnica de ESI-MS. HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₂H₁₇N₂O₅Cu [M+H]⁺: 332.0433; encontrado: 332.0437. IR: 3479 (f), 3373 (f), 3267 (f), 2292 (d), 2240 (d), 1602 (mf), 1444 (mf), 1358 (d), 1053 (m), 1033 (d), 691 (f), 628 (f), 521 (m).

2.1.3.b.4 $[\text{Cu}(\mathbf{5})_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, **5Cu**

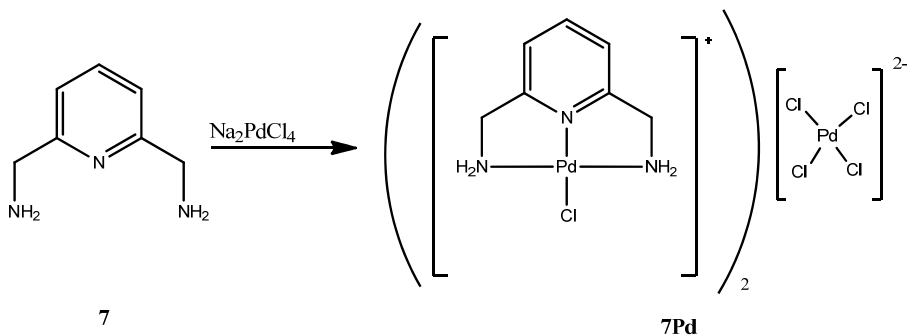
*Síntesis del complejo $[\text{Cu}(\mathbf{5})_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, **5Cu**.* A una disolución de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (49.9 mg, 0.25 mmol) en agua (20 mL) se le añade gota a gota una disolución en caliente de **5** (124 mg, 0.5 mmol) en una mezcla de acetonitrilo:agua (60 mL, 4:1), y se mantiene agitando a 50°C durante 1 hora y 30 minutos. La disolución inicial de color azul cambia a marrón en el transcurso de la adición. Después de ese tiempo, la disolución se guarda a la espera de que precipite el producto. Al cabo de unos días aparece un precipitado de color marrón correspondiente al complejo **5Cu** que se filtra, lava y seca. Posteriormente, de las aguas madres, se pudieron obtener cristales de **5Cu** aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 123 mg (82.3%). AE calculado para $[\text{Cu}(\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3)_2](\text{H}_2\text{O})_{2.5}$, ($P_m=598.1$): C, 52.16; H, 5.22; N, 9.36. Encontrado: C, 52.13; H, 5.31; N, 9.64. HRMS (ESI): m/z: calculado para $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{N}_4\text{O}_8\text{Cu}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 590.1438; encontrado: 590.1118. IR: 3435 (m), 3325 (d), 3200 (d), 2966 (d), 2927 (md), 2876 (d), 1644 (m), 1626 (f), 1595 (f), 1510 (f), 1470 (m), 1422 (m), 1373 (f), 1319 (f), 1252 (md), 1143 (d), 1064 (m), 1028 (m), 947 (d), 896 (d), 867 (d), 785 (m), 762 (m), 569 (d).

2.1.3.c Complejos primarios de Pd(II) y Cu(II) con ligando de tipo amino-amino

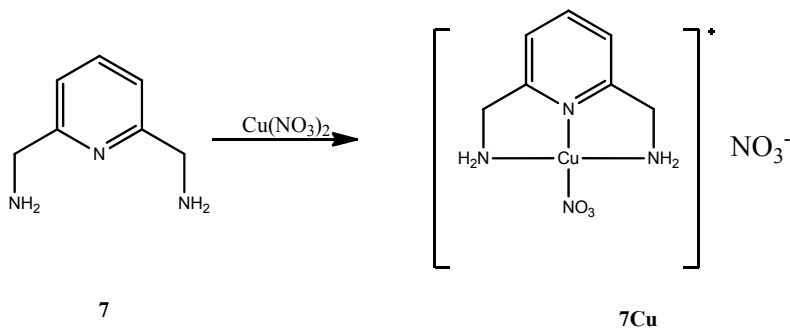
2.1.3.c.1 $[\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})(\text{pidiam})]$, **pidiamPd**



*Síntesis del complejo $[\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})(\text{pidiam})]$, **pidiamPd**.* A una suspensión de **pidiam** (85.1 mg, 0.5 mmol) en acetonitrilo:agua (25 mL, 4:3) se le añade gota a gota una disolución de Na_2PdCl_4 (147.1 mg, 0.5 mmol) en agua (5 mL), y se mantiene agitando 12 horas a temperatura ambiente. El color de la disolución cambia de naranja a amarillo, y aparece un precipitado que se desecha. La disolución se guarda en oscuridad y, tras 20 días, precipita el complejo **pidiamPd**, que se filtra, lava y seca. Rendimiento: 10 mg (5.6%). AE calculado para $[\text{Pd}(\text{NCCH}_3)(\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_3\text{O}_2)](\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})$, ($P_m=356.0$): C, 37.07; H, 3.96; N, 15.73. Encontrado: C, 37.01; H, 3.48; N, 15.39. ^1H -RMN (300 MHz, DMSO-d_6): δ 8.32 (t, $J=7.6$ Hz, 1H; CH), 7.77 (d, $J=7.1$ Hz, 2H; CH), 6.4 (s, 2H; NH). HRMS (ESI): m/z : calculado para $\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_2\text{Pd}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 310.9760; encontrado: 310.9724. IR: 3319 (d), 3303 (d), 1641 (d), 1585 (m), 1390 (d), 1259 (d), 1150 (d), 1092 (d), 835 (md), 765 (d), 692 (d), 588 (d), 476 (d).

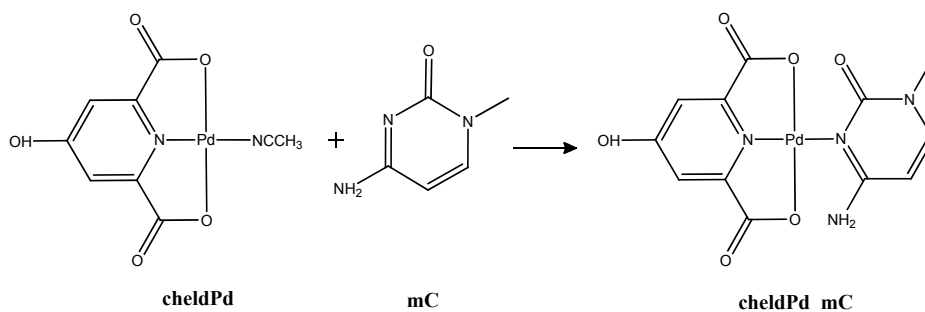
2.1.3.c.2 $[\text{Pd}(\mathbf{7})(\text{Cl})]_2 \cdot (\text{PdCl}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})$, **7Pd**


*Síntesis del complejo $[\text{Pd}(\mathbf{7})(\text{Cl})]_2(\text{PdCl}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})$, **7Pd**.* A una disolución en caliente de **7** (79.6 mg, 0.58 mmol) en metanol:agua (10 mL) se le añade gota a gota una disolución de Na_2PdCl_4 (170.74 mg, 0.58 mmol) en agua (5 mL), que da lugar a la aparición instantánea de un precipitado amarillo. La suspensión se mantiene agitando durante 1 hora a 40-45°C. El precipitado correspondiente al complejo **7Pd** se filtra, lava y seca. Después de unos días, de las aguas madres se obtienen cristales de **7Pd** aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 141.2 mg (28.27%). AE calculado para $[\text{Pd}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{Cl})]_2(\text{PdCl}_4)(\text{H}_2\text{O})_{1.75}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})_{0.5}$, ($P_m=860.9$): C, 20.93; H, 3.34; N, 9.76. Encontrado: C, 20.96; H, 3.38; N, 9.64. ^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 8.05 (t, $J=7.9$ Hz, 1H; CH), 7.46 (d, $J=8.0$ Hz, 2H; CH), 5.63 (s, 2H; NH), 4.39 (t, $J=5.9$ Hz, 4H; CH_2). ^{13}C -RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ 54.81 (C), 120.20 (CH_2), 140.43 (CH), 163.06 (CH). IR: 3499 (m), 3204 (m), 3110 (d), 2927 (d), 1603 (m), 1576 (m), 1476 (m), 1426 (d), 1255 (md), 1168 (m), 1095 (md), 986 (md), 799 (d), 556 (md), 498 (md).

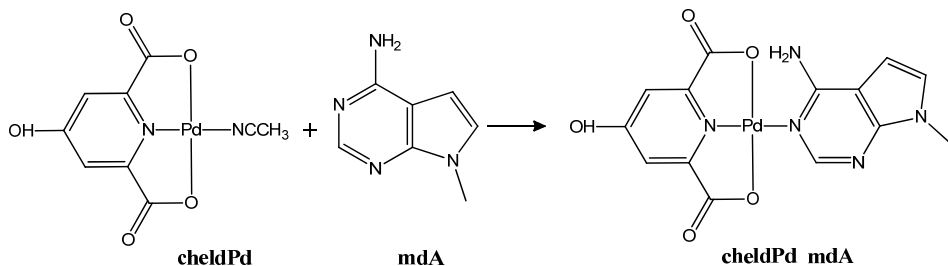
2.1.3.c.3 $[\text{Cu}(\mathbf{7})(\text{NO}_3)] \cdot (\text{NO}_3)$, $\mathbf{7Cu}$ 

Síntesis del complejo $[\text{Cu}(\mathbf{7})(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)$, $\mathbf{7Cu}$. A una disolución de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (241 mg, 1 mmol) en agua (5 mL) se le añade gota a gota una disolución en caliente de $\mathbf{7}$ (79.6 mg, 0.58 mmol) en metanol:agua (10 mL), y se mantiene agitando durante 45 minutos a 60°C . Después de unos días, en las aguas madres se observa un precipitado azul de $\mathbf{7Cu}$ que se filtra, lava y seca. Rendimiento: 25 mg (7.12%). AE calculado para $[\text{Cu}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3)(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})_{1.55}$, ($P_m=351$): C, 23.84; H, 4.03; N, 19.85. Encontrado: C, 23.99; H, 4.77; N, 19.72. IR: 3438 (d), 3207 (d), 1600 (d), 1383 (mf), 1160 (md), 1125 (md), 1000 (md), 932 (md), 826 (md), 801 (md).

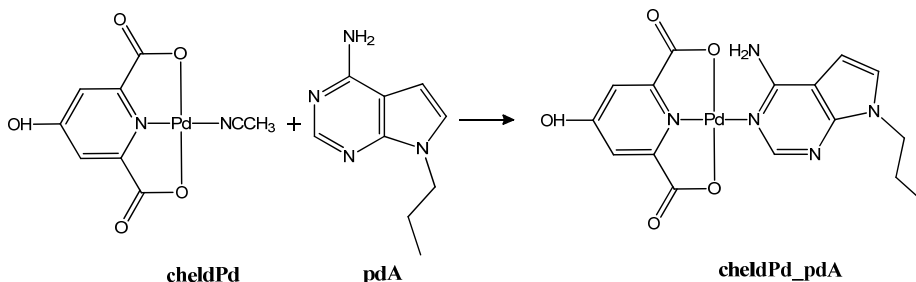
2.1.3.d Complejos metal-nucleobase con ligandos de tipo hidroxio-hidroxio

2.1.3.d.1 $[Pd(\text{cheld})(N3\text{-mC})]$, **cheldPd_mC**

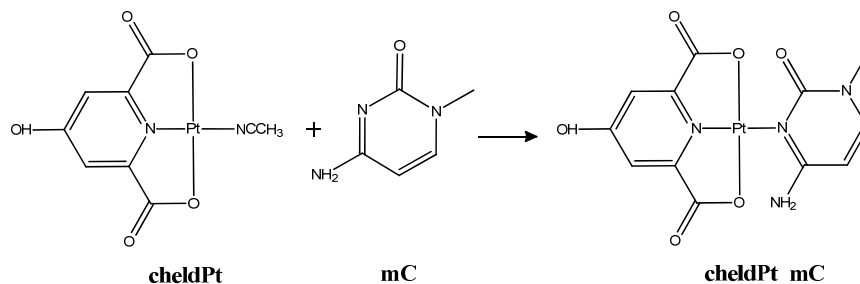
*Síntesis del complejo $[Pd(\text{cheld})(N3\text{-mC})]$, **cheldPd_mC**.* A una suspensión de **cheldPd** (50.0 mg, 0.15 mmol) en agua (20 mL) se añade una disolución de 1-metil-citosina, **mC**, (18.75 mg, 0.15 mmol) en agua (10 mL), y se mantiene agitando a 50°C en oscuridad durante 12 horas (pH=5.3). Después de este tiempo, aparece el compuesto **cheldPd_mC** en forma de precipitado amarillo que se filtra, lava y seca. Parte de este precipitado se recrystaliza en *N,N*-dimetilformamida, obteniéndose cristales anaranjados aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 45 mg (71.2%). AE calculado para $[Pd(C_{12}H_{10}N_4O_6)(H_2O)_{3.3}]$, ($P_m=472.1$): C, 30.54; H, 3.52; N, 11.87. Encontrado: C, 30.98; H, 3.59; N, 11.76. $^1\text{H-RMN}$ (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.08 (s, 3H, NCH_3), 5.78 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, CH_{py}), 7.07 (s, 2H, CH_{py}), 7.76 (d, $J=7.3$ Hz, 1H, CH_{py}), 8.50 (s, 1H, NH_a), 8.71 (s, 1H, NH_b). HRMS: (ESI) m/z calculado para $C_7H_4N_4O_6NaPd$, $[M+Na]^+$: 366.9069; encontrado: 366.9082. IR: 3437 (f), 1637 (mf), 1515 (d), 1461 (d), 1366 (m), 1261 (m), 1175 (d), 1090 (m), 931 (d), 880 (d), 793 (d), 771 (md), 755 (md), 639 (d), 575 (d), 444 (d), 408 (d).

2.1.3.d.2 [Pd(cheld)(N1-mdA)], **cheldPd_mdA**

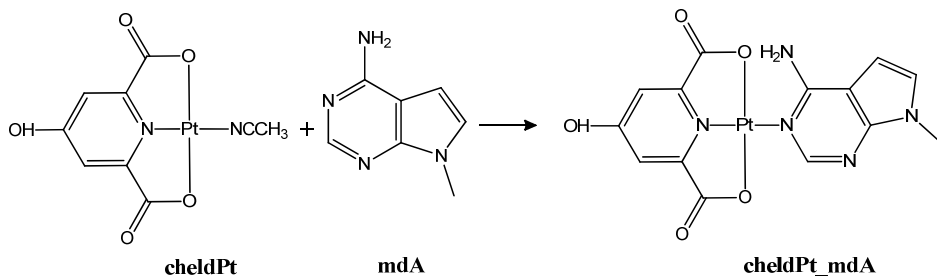
*Síntesis del complejo [Pd(cheld)(N1-mdA)], **cheldPd_mdA**.* A una suspensión de **cheldPd** (11.1 mg, 0.04 mmol) en agua (100 mL) y acetonitrilo (50 mL), que se ha mantenido a reflujo durante 1 hora hasta su completa disolución, se le añade una disolución de **mdA** (5 mg, 0.04 mmol) en agua (20 mL), y se mantiene agitando a 50°C durante 30 minutos. El precipitado amarillo correspondiente al complejo **cheldPd_mdA** se filtra, lava y seca. AE calculado para [Pd(C₁₄H₁₁N₅O₅)](H₂O)_{0.4}, (P_m=442.9): C, 37.96; H, 2.68; N, 15.81. Encontrado: C, 37.71; H, 3.15; N, 16.15. ¹H-RMN (400 MHz, DMF-d₇): δ 13.17 (s, 1H; OH), 7.34 (m, 1H; CH_b), 7.27 (s, 1H; CH_a), 7.14 (s, 1H; CH_a), 6.82 (s, 1H; CH_b), 3.76 (s, 1H; CH_b), 3.51 (s, 3H; CH_{3,b}). IR: 3338 (d), 3197 (d), 1673 (mf), 1610 (mf), 1557 (md), 1499 (d), 1461 (m), 1357 (mf), 1220 (md), 1162 (d), 1117 (d), 1085 (f), 1021 (md), 925 (d), 877 (d), 793 (d), 713 (d), 639 (d), 617 (d), 565 (d), 453 (d).

2.1.3.d.3 [Pd(cheld)(N1-pdA)], **cheldPd_pdA**

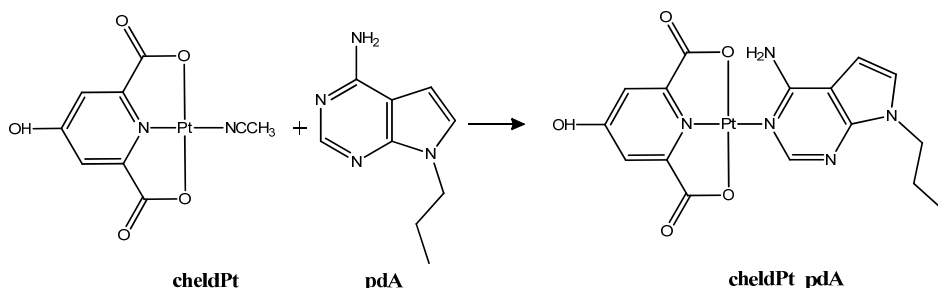
*Síntesis del complejo [Pd(cheld)(N1-pdA)], **cheldPd_pdA**.* A una suspensión de **cheldPd** (70 mg, 0.2 mmol) en acetonitrilo:agua (30 mL), que se ha mantenido a reflujo hasta su completa disolución y posteriormente se ha filtrado en caliente, se le añade una disolución de **pdA** (37.5mg, 0.2 mmol) en agua (20 mL), y se mantiene agitando a 60°C durante 1 hora y 30 minutos, en oscuridad. El complejo **cheldPd_pdA**, que aparece como precipitado en el transcurso de la reacción, se filtra, lava y seca. Parte de este se recristaliza en *N,N*-dimetilformamida, obteniéndose el complejo en forma de cristales aptos para su estudio por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 71.5 mg (72.1%). AE calculado para [Pd(C₁₆H₁₅N₅O₅)](H₂O)_{1.8}, (P_m=496.1): C, 38.73; H, 3.78; N, 14.11. Encontrado: C, 38.55; H, 4.28; N, 14.51. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.99 (s, 1H; CH_b), 7.34 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH_b), 7.10 (s, 2H; CH_a), 6.71 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH_b), 4.11 (t, J=7.0 Hz, 2H; CH_{2,b}), 1.76 (dq, J=7.2 y 14.4 Hz, 2H; CH_{2,b}), 0.81 (t, J=7.4 Hz, 3H; CH_{3,b}). IR: 3389 (mf), 3225 (d), 1664 (mf), 1603 (mf), 1502 (m), 1461 (m), 1370 (f), 1254 (m), 1084 (m), 797 (d), 733 (d).

2.1.3.d.4 [Pt(cheld)(N3-mC)], **cheldPt_mC**

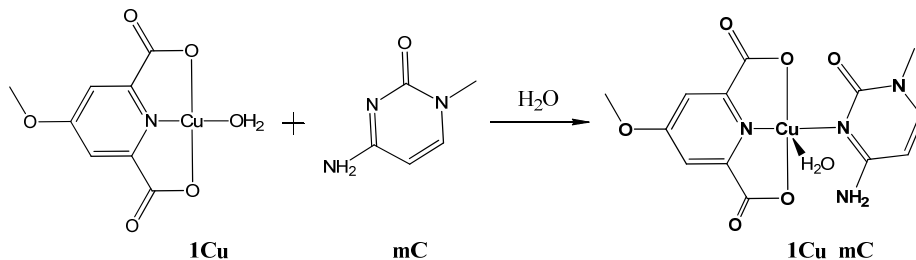
*Síntesis del complejo [Pt(cheld)(N3-mC)], **cheldPt_mC**.* A una suspensión de **cheldPt** (50.0 mg, 0.12 mmol) en agua (20 mL) se le añade una disolución de **mC** (14.7 mg, 0.12 mmol) en agua (10 mL), y se mantiene agitando durante 3 horas a 60°C, en oscuridad (pH=4.2). El complejo **cheldPt_mC** aparece como un precipitado verde que se filtra, lava y seca. AE calculado para [Pt(C₁₂H₁₀N₄O₆)](H₂O)_{2.5}, (P_m=546.34): C, 26.37; H, 2.74; N, 10.25. Encontrado: C, 26.31; H, 2.36; N, 9.45. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.55 (s, 1H; NH₂), 8.48 (s, 1H; NH₂), 7.68 (d, J=7.4 HZ, 1H; CH_b), 6.75 (s, 1H; CH_a), 6.51 (s, 1H; CH_a), 5.71 (d, J=7.3 Hz, 1H; CH_b), 3.22 (s, 3H; CH₃). HRMS (ESI): m/z: calculado para C₁₂H₁₀N₄O₆Pt: 502.0327; encontrado: 502.0522. IR: 3399 (m), 3078 (d), 2366 (d), 2343 (d), 1647 (mf), 1531 (d), 1509 (m), 1464 (md), 1427 (m), 1384 (md), 1360 (f), 1268 (d), 1172 (d), 1092 (m), 989 (md), 931 (d), 886 (d), 816 (md), 796 (md), 768 (d), 643 (d), 569 (d), 501 (md), 440 (d).

2.1.3.d.5 [Pt(cheld)(N1-mdA)], **cheldPt_mdA**

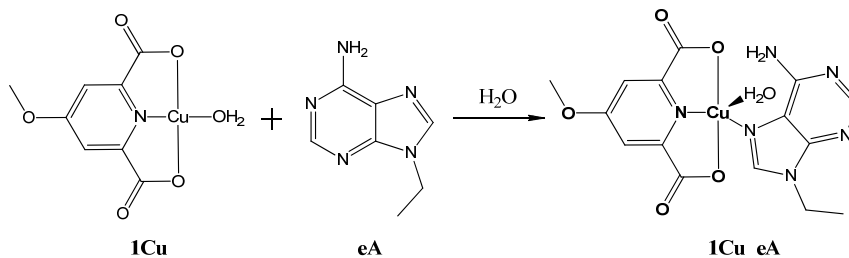
*Síntesis del complejo [Pt(cheld)(N1-mdA)], **cheldPt_mdA**.* A una suspensión de **cheldPt** (208.5 mg, 0.5 mmol) en agua (100 mL) y acetonitrilo (50 mL), que se ha mantenido a reflujo durante 1 hora hasta su completa disolución, se le añade una disolución de **mdA** (74.07 mg, 0.5 mmol) en agua (20 mL), y se mantiene agitando a 50°C durante 3 horas, en oscuridad. El complejo **cheldPt_mdA** aparece como un precipitado amarillo que se filtra, lava y seca. AE calculado para [Pt(C₁₄H₁₁N₅O₅)](H₂O)_{4.4}, (P_m=603.6): C, 29.80; H, 3.56; N, 13.03. Encontrado: C, 29.71; H, 3.65; N, 13.18. ¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 75°C): δ 8.17 (s, 1H; CH_b), 7.62 (s, 2H; NH₂), 7.28 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH_b), 7.15 (s, 2H; CH_a), 6.76 (d, 1H; CH_b), 3.77 (s, 3H; CH_{3,b}). HRMS: (ESI) m/z calculado para C₁₄H₁₁N₅O₅NaPt [M+Na]⁺, 525.04; encontrado: 525.08. IR: 3284 (mf), 3168 (mf), 1719 (f), 1664 (mf), 1608 (mf), 1510 (d), 1453 (f), 1349 (f), 1257 (f), 1160 (d), 1083 (m), 995 (f), 922 (d), 730 (d), 631 (d).

2.1.3.d.6 [Pt(cheld)(N1-pdA)], **cheldPt_pdA**

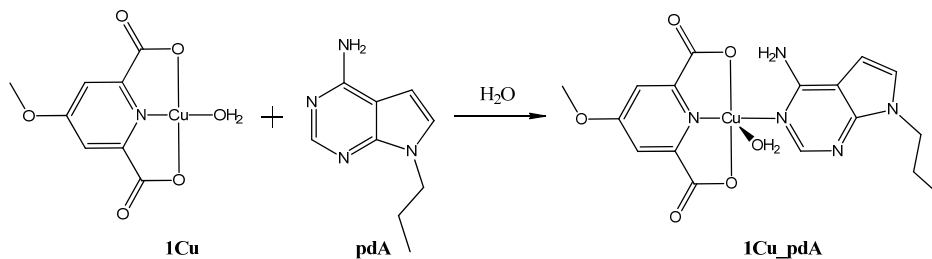
*Síntesis del complejo [Pt(cheld)(N1-pdA)], **cheldPt_pdA**.* A una suspensión de **cheldPt** (80 mg, 0.2 mmol) en agua:acetonitrilo:etanol (150 mL, 5:1:1), que se mantiene a refluxo hasta su completa disolución, se le añade una disolución de **pdA** (34 mg, 0.2 mmol) en agua (20 mL), y se mantiene agitando a 65°C durante 2 horas, en oscuridad. El precipitado amarillo que aparece, correspondiente al complejo **cheldPt_pdA**, se filtra, lava y seca. Parte del precipitado se recrystaliza en *N,N*-dimetilformamida para obtener cristales aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 58 mg (49.7%). AE calculado para [Pt(C₁₆H₁₅N₅O₅)](H₂O)_{1.7}, (P_m=583.0): C, 32.86; H, 3.18; N, 12.01. Encontrado: C, 32.90; H, 3.43; N, 12.12. ¹H-RMN (300 MHz, DMSO-d₆): δ 8.35 (s, 1H; NH₂), 8.29 (s, 1H; NH₂), 8.16 (s, 1H; CH_b), 7.38 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH_b), 7.17 (s, 2H; CH_a), 6.79 (d, J=3.4 Hz, 1H; CH_b), 4.14 (t, J=6.8 Hz, 2H; CH_{2,b}), 1.77 (m, 2H; CH_{2,b}), 0.82 (t, J=7.4 Hz, 3H; CH_{3,b}). IR: 3404 (f), 3229 (d), 3078 (d), 2969 (md), 2937 (md), 2876 (md), 2725 (d), 2610 (d), 2507 (md), 1678 (mf), 1610 (f), 1554 (d), 1502 (m), 1467 (m), 1422 (d), 1361 (f), 1277 (d), 1249 (md), 1162 (d), 1091 (m), 935 (d), 886 (d), 794 (d), 734 (d), 645 (d), 607 (md), 566 (d), 460 (d).

2.1.3.d.7 [Cu(1)(H₂O)(N3-mC)], **1Cu_mC**

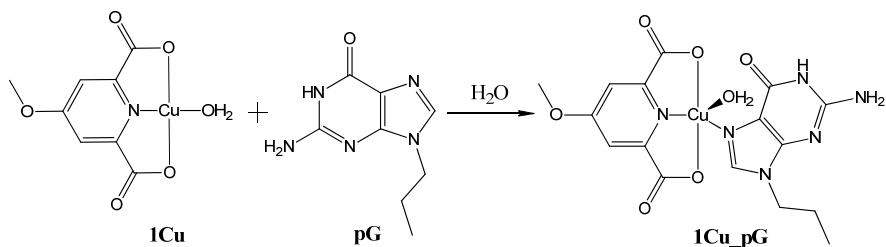
*Síntesis del complejo [Cu(1)(H₂O)(N3-mC)], **1Cu_mC**.* A una disolución en caliente de **mC** (9.3 mg, 0.075 mmol) en agua (15 mL) se le añade gota a gota una disolución de **1Cu** (22 mg, 0.075 mmol) en agua (10 mL), y se mantiene agitando a 65°C durante 30 minutos. La disolución se guarda para que se evapore lentamente a temperatura ambiente, y después de unos días se obtienen cristales azules correspondientes al complejo **1Cu_mC** aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 2 mg (6%). AE calculado para [Cu(C₁₃H₁₂N₄O₆)](H₂O)_{3.7}, (P_m=450.5): C, 34.66; H, 4.34; N, 12.43. Encontrado: C, 34.55; H, 4.50; N, 12.54. IR: 3419 (m), 3101 (md), 1657 (mf), 1609 (mf), 1544 (d), 1512 (md), 1474 (m), 1429 (d), 1377 (f), 1265 (md), 1185 (md), 1124 (d), 1078 (m), 1012 (md), 912 (md), 877 (md), 799 (m), 774 (d), 748 (d), 582 (md), 530 (md), 437 (md).

2.1.3.d.8 [Cu(1)(H₂O)(N7-eA)], **1Cu_eA**

Síntesis del complejo [Cu(1)(H₂O)(N7-eA)], 1Cu_eA. A una disolución en caliente de N9-etiladenina, **eA**, (16.4 mg, 0.1 mmol) en agua (15 ml) se le añade gota a gota una disolución de **1Cu** (29.3 mg, 0.1 mmol) en agua (15 mL), y se mantiene agitando a 65°C durante 30 minutos. El complejo **1Cu_eA** aparece como precipitado azul que se filtra, lava y seca. Parte de este precipitado se recristaliza en *N,N*-dimetilformamida para obtener cristales aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 38 mg (87%). AE calculado para [Cu(C₁₅H₁₄N₆O₅)](H₂O)_{7.6}, (P_m=558.5): C, 32.03; H, 5.30 N, 14.94. Encontrado: C, 31.84; H, 4.93; N, 15.45. IR: 3332 (f), 3153 (mf), 1997 (d), 1672 (f), 1594 (mf), 1472 (m), 1389 (f), 1340 (f), 1295 (f), 1186 (m), 1063 (m), 796 (m).

2.1.3.d.9 [Cu(1)(H₂O)(N1-pdA)], **1Cu_pdA**

Obtención del complejo [Cu(1)(H₂O)(N1-pdA)], 1Cu_pdA. A una disolución de **1Cu** (20.7 mg, 0.075 mmol) en agua (15 mL) se le añade gota a gota una disolución de **pdA** (13.2 mg, 0.075 mmol) en agua (10 mL), y se mantiene agitando a 60°C durante 30 minutos. El precipitado azul, correspondiente al complejo **1Cu_pdA**, se filtra, lava y seca. Parte del precipitado se recristaliza en *N,N*-dimetilformamida para obtener cristales azules aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). Rendimiento: 16 mg (45.3%). AE calculado para [Cu(C₁₇H₁₇N₅O₅)](H₂O)₂, (P_m=470.9): C, 43.35; H, 4.49; N, 14.87. Encontrado: C, 43.18; H, 4.92; N, 14.70. IR: 3592 (m), 3351 (f), 3190 (f), 1656 (mf), 1603 (mf), 1488 (m), 1380 (f), 1269 (d), 1072 (m), 799 (d).

2.1.3.d.10 [Cu(1)(H₂O)(N7-pG)], **1Cu_pG**

*Síntesis del complejo [Cu(1)(H₂O)(N7-pG)], **1Cu_pG**.* A una disolución de **pG** (19 mg, 0.1 mmol) en agua (15 mL) se le añade gota a gota una disolución de **1Cu** (29.4 mg, 0.1 mmol) en agua (10 mL), y se mantiene agitando a 65°C durante 30 minutos. El precipitado fino y escaso que aparece se filtra y se desecha. Después de unos días, se obtienen cristales azules correspondientes al complejo **1Cu_pG** aptos para su análisis por difracción de rayos X (véase *Anexo II*). AE calculado para [Cu(C₁₆H₁₈N₆O₇)](H₂O)_{0.7}, (P_m=482.5): C, 39.82; H, 4.05; N, 17.41. Encontrado: C, 39.71; H, 4.22; N, 17.12. IR: 3459 (m), 3220 (f), 1667 (m), 1638 (f), 1597 (mf), 1474 (d), 1361 (f), 1182 (d), 1131 (d), 1073 (m), 1002 (d), 894 (m), 797 (d).

2.1.4 Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos más sencillos para los estudios desarrollados en el transcurso de este trabajo de investigación han sido adquiridos en *Sigma-Aldrich*[®]. Sin embargo, los más complejos, que incluyen nucleobases modificadas, fueron solicitados al servicio de Genómica y Síntesis de ADN del Instituto López Neyra, ubicado en el Parque Tecnológico de la Salud de Granada, usando para ello los protocolos estándar y las fosforamiditas correspondientes suministradas por *Thermo Fisher Scientific Inc.* y *Glen Research, VA, USA*.

La síntesis de las cadenas de oligonucleótidos se llevó a cabo en fase sólida,^[9] utilizando para ello un sintetizador *ABI 3400 DNA Synthesizer*. Las ventajas de esta técnica, desarrollada por Bruce Merrifield en la década de 1960 (Premio Nobel en Química en el año 1984), frente a otros métodos en disolución son, entre otras, la automatización del método o la no necesidad de una purificación en cada paso dado que las impurezas o exceso de reactivo se elimina en las etapas de lavado.

Para esta síntesis en fase sólida se utiliza como soporte sólido unas resinas (partículas insolubles de un diámetro variable entre 50-200 μm) a las que están enlazados covalentemente los oligonucleótidos durante el proceso, siendo las de uso más común el poliestireno (PS) o el vidrio de poro controlado (CPG). El método utilizado fue el de la fosforamidita (Marvin Caruthers, década de 1980) en la dirección 3' a 5', en el cual se añade un oligonucleótido a la cadena por cada ciclo de síntesis (véase Figura 2.1).

La primera etapa consiste en la **activación y acoplamiento** (*Step 1: Activation and coupling*) donde, una vez liberado el grupo hidroxilo del nucleósido unido a la resina, este está disponible para reaccionar con el siguiente nucleósido incorporado al ciclo de síntesis en forma de monómero de la fosforamidita. De esta forma el grupo diisopropilamino del nucleósido incorporado es protonado por un activador (tetrazolo o derivado) y convertido en un buen grupo saliente, que es inmediatamente desplazado por el ataque del grupo 5'-hidroxilo del nucleósido unido a la resina, creando un enlace fosfito triéster.

En la segunda etapa se procede con el **bloqueo** (*Step 2: Capping*) de los grupos 5'-hidroxilo que no reaccionaron en el paso anterior, cuyo rendimiento aproximado es del 99.5%. Este proceso se lleva a cabo mediante una reacción de acetilación que tiene lugar al incorporar ácido acético anhidro y N-metilimidazol (NMI) al sintetizador.

Finalmente tiene lugar la **oxidación** (*Step 3: Oxidation*), donde el grupo fosfito-triéster formado en el acoplamiento se oxida con yodo en presencia de agua y piridina para formar el grupo fosfato estable que, a su vez, se encuentra protegido por un grupo 2-cianoetil que evita reacciones indeseables durante las siguientes repeticiones del ciclo de síntesis.

Este ciclo se repite tantas veces como nucleótidos se deseen incorporar a la cadena y, una vez terminado este proceso, se procede a liberar la cadena de la resina, mediante un tratamiento ligeramente básico, y a la desprotección de los grupos fosfatos. Tras estas etapas finales se procede a la purificación de los oligonucleótidos por HPLC, procedimiento descrito en el apartado 2.3 *Métodos*.

2.1.4.a Síntesis de poly15(⁷C A)

La síntesis del oligonucleótido **poly15(⁷C A)**, [5'-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-⁷C A-3'], se realiza mediante un sintetizador *Biosystems 3400 DNA* siguiendo el protocolo estándar de síntesis y usando las correspondientes fosforamidas proporcionadas por *Thermo Fisher Scientific Inc.* y *Glen Research, VA, USA*.

La etapa de desprotección del oligonucleótido implica su tratamiento con hidróxido de amonio al 30% durante 16 horas a 55°C.

La purificación se realiza mediante HPLC en el equipo descrito en el apartado 2.2.8, bajo un gradiente que estaba formado por una fase móvil A (5% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5) y una fase móvil B (65% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5). El gradiente se programa para que tenga lugar un incremento de 0% de B a 70% de B durante 25 minutos para que el gradiente regrese al 100% de A en el minuto 30.

Tras la purificación, el oligonucleótido se desala mediante filtración en gel usando una columna *Shepadex G-25*. El oligonucleótido desalado se caracteriza mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el equipo descrito en el apartado 2.2.6 usando una matriz de ácido 3-hidropicolínico/citrato de amonio. HRMS (MALDI-TOF): m/z: calculado para [M+H]⁺: 4618 Da; encontrado: 4620 Da.

2.1.4.b Síntesis de poly18(⁷C-A-T)

La síntesis del oligonucleótido **poly18(⁷C-A-T)**, [5'-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-3'], se realiza mediante un sintetizador *Biosystems 3400 DNA* siguiendo el protocolo estándar de síntesis y usando las correspondientes fosforamidas proporcionadas por *Thermo Fisher Scientific Inc.* y *Glen Research, VA, USA*.

La etapa de desprotección del oligonucleótido implica su tratamiento con hidróxido de amonio al 30% durante 16 horas a 55°C.

La purificación se realiza mediante HPLC en el equipo descrito en el apartado 2.2.8, bajo un gradiente que estaba formado por una fase móvil A (10% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5) y una fase móvil B (65% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5). El gradiente se programa para que tenga lugar un incremento de 0% de B a 35% de B durante 25 minutos para que el gradiente regrese al 100% de A en el minuto 30.

Tras la purificación, el oligonucleótido se desala mediante filtración en gel usando una columna *Shepadex G-25*. El oligonucleótido desalado se caracteriza mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el equipo descrito en el apartado 2.2.6 usando una matriz de ácido 3-hidropicolínico/citrato de amonio. HRMS (MALDI-TOF): m/z: calculado para [M+H]⁺: 5487 Da; encontrado: 5489 Da.

2.1.4.c Síntesis de poly6(NH₂-A-T)

La síntesis del oligonucleótido **poly6(NH₂-A-T)**, [5'-A-T-A-T-A-T-NH₂-3'], se realiza mediante un sintetizador *Biosystems 3400 DNA* siguiendo el protocolo estándar de síntesis y usando las correspondientes fosoramiditas proporcionadas por *Thermo Fisher Scientific Inc.* y *Glen Research, VA, USA*.

La etapa de desprotección del oligonucleótido implica su tratamiento con AMA (30% amoniaco/40% metilamina 1:1) a 65°C durante 15 minutos.

La purificación se realiza mediante HPLC en el equipo descrito en el apartado 2.2.8, bajo un gradiente que estaba formado por una fase móvil A (5% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5) y una fase móvil B (65% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5). El gradiente se programa para que tenga lugar un incremento de 0% de B a 15% de B durante 25 minutos para que el gradiente regrese al 100% de A en el minuto 30.

Tras la purificación, el oligonucleótido se desala mediante filtración en gel usando una columna *Shepadex G-25*. El oligonucleótido desalado se caracteriza mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el equipo descrito en el apartado 2.2.6 usando una matriz de ácido 3-hidropicolínico/citrato de amonio. HRMS (MALDI-TOF): m/z: calculado para [M+H]⁺: 1881 Da; encontrado: 1883 Da.

2.1.4.d Síntesis de poly6(NH₂-⁷C-A-T)

La síntesis del oligonucleótido **poly6(NH₂-⁷C-A-T)**, [5'-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-NH₂-3'], se realiza mediante un sintetizador *Biosystems 3400 DNA* siguiendo el protocolo estándar de síntesis y usando las correspondientes fosforamiditas proporcionadas por *Thermo Fisher Scientific Inc.* y *Glen Research, VA, USA*.

La etapa de desprotección del oligonucleótido implica su tratamiento con AMA (30% amoniaco/40% metilamina 1:1) a 65°C durante 15 minutos.

La purificación se realiza mediante HPLC en el equipo descrito en el apartado 2.2.8, bajo un gradiente que estaba formado por una fase móvil A (5% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5) y una fase móvil B (65% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5). El gradiente se programa para que tenga lugar un incremento de 0% de B a 15% de B durante 25 minutos para que el gradiente regrese al 100% de A en el minuto 30.

Tras la purificación, el oligonucleótido se desala mediante filtración en gel usando una columna *Shepadex G-25*. El oligonucleótido desalado se caracteriza mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el equipo descrito en el apartado 2.2.6 usando una matriz de ácido 3-hidropicolínico/citrato de amonio. HRMS (MALDI-TOF): m/z: calculado para [M+H]⁺: 1884 Da; encontrado: 1886 Da.

2.1.4.e Síntesis de poly10(NH₂-⁷C-A-T)

La síntesis del oligonucleótido **poly10(NH₂-⁷C-A-T)**, [5'-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-⁷C-A-T-NH₂-3'], se realiza mediante un sintetizador *Biosystems 3400 DNA* siguiendo el protocolo estándar de síntesis y usando las correspondientes fosforamiditas proporcionadas por *Thermo Fisher Scientific Inc.* y *Glen Research, VA, USA*.

La etapa de desprotección del oligonucleótido implica su tratamiento con AMA (30% amoníaco/40% metilamina 1:1) a 65°C durante 15 minutos.

La purificación se realiza mediante HPLC en el equipo descrito en el apartado 2.2.8, bajo un gradiente que estaba formado por una fase móvil A (5% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5) y una fase móvil B (65% de acetonitrilo en agua con tampón TEAA a pH=6.5). El gradiente se programa para que tenga lugar un incremento de 0% de B a 15% de B durante 25 minutos para que el gradiente regrese al 100% de A en el minuto 30.

Tras la purificación, el oligonucleótido se desala mediante filtración en gel usando una columna *Shepadex G-25*. El oligonucleótido desalado se caracteriza mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF) en el equipo descrito en el apartado 2.2.6 usando una matriz de ácido 3-hidropicolínico/citrato de amonio. HRMS (MALDI-TOF): m/z: calculado para [M+H]⁺: 3116 Da; encontrado: 3117 Da.

2.1.5 Tampones

2.1.5.a Tampón para las valoraciones con oligonucleótidos

El tampón que se ha utilizado de forma general para las experiencias con oligonucleótidos está formado por una disolución de MOPS 5 mM a pH=6.8 y NaClO_4 100 mM en agua ultrapura (Tipo I) *Milli-Q*[®], ambos productos comerciales.

La disolución madre de MOPS 100 mM se preparó disolviendo 0.21g de MOPS en agua ultrapura *Milli-Q*[®] (10 mL) y ajustando su pH a 6.8 con una disolución 1 M de hidróxido de sodio en agua ultrapura *Milli-Q*[®]. Con respecto a la disolución madre 1000 mM de NaClO_4 , esta se preparó disolviendo 1.41 g de NaClO_4 en agua ultrapura *Milli-Q*[®] (10 mL).

2.1.5.b Tampón para HPLC

El tampón utilizado en las purificaciones de oligonucleótidos llevadas a cabo en el HPLC es el tampón conocido generalmente como “Tampón TEEA” y está formado por ácido acético glacial, acetonitrilo y trimetilamina, todos ellos con un grado de pureza de calidad HPLC

Para preparar unos 2 L de 0.1 M TEEA a pH=6.5, se adiciona a 1900 mL de agua *Milli-Q*[®] ácido acético glacial (12 mL) y acetonitrilo (100 mL), y se ajusta el pH a 6.5 usando una disolución de trimetilamina pura (37 mL aprox.).

2.2 Técnicas de caracterización

2.2.1 Análisis elemental (AE)

La determinación del contenido en carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre en los diferentes compuestos se ha realizado en un analizador elemental *THERMO SCIENTIFIC* modelo *FLASH 2000*, compuesto por una microbalanza de precisión *METTLER M-3*, disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada; y en un analizador elemental modelo *FLASH EA1112 CHNS-O* de *THERMO FINNIGAN*, complementado con una microbalanza electrónica *METTLER TOLEDO MX5*, disponible en el Centro de Instrumentación Científico-Técnica de la Universidad de Jaén.

2.2.2 Espectroscopia infrarroja (IR)

Los espectros IR se han obtenido en un espectrofotómetro con transformada de Fourier *THERMO NICOLET IR200*, disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada, empleando bromuro de potasio como medio dispersante.

También se ha utilizado un espectrómetro de infrarrojo por Transformada de Fourier (FT) *BRUKER TENSOR 27* que lleva acoplado un sistema para la medida de la reflectancia total atenuada (ATR), disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

2.2.3 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros RMN se han registrado en los equipos disponibles en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada utilizando cada equipo según las necesidades específicas de cada una de las medidas. Los equipos utilizados para ello fueron un espectrómetro de RMN de 300 MHz (2 canales) *VARIAN INOVA UNITY*, un

espectrómetro de RMN de 400 MHz (2 canales) *VARIAN DIRECT DRIVE* provisto de regulador de temperatura sin nitrógeno líquido, y un espectrómetro de RMN de 500 MHz (3 canales) *VARIAN DIRECT DRIVE* provisto de regulador de temperatura sin nitrógeno líquido.

2.2.4 UV-visible y UV-visible de temperatura variable

Varios de los experimentos seguidos por esta técnica, como el estudio en disolución de la interacción entre los complejos metálicos o los metales y las nucleobases, o el estudio en disolución de la estabilidad térmica de los oligonucleótidos (T_m), se han llevado a cabo en dos equipos distintos según las características del experimento.

El primero de ellos se trata de un equipo SHIMADZU UV-1800 UV-vis, y el segundo de un espectrofotómetro *AGILENT TECHNOLOGIES* modelo *CARY 100*, equipado con un controlador de temperatura *CARY TEMPERATURE CONTROLLER*, ambos disponibles en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

2.2.5 Dicroísmo circular (CD)

Los estudios de dicroísmo circular (CD) se llevaron a cabo en un espectropolarímetro de dicroísmo circular *JASCO* modelo *J-815*, dotado con sistema de termostatación por *Peltier*, para estudios de desnaturalización térmica, disponible en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

2.2.6 Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS)

En la mayoría de los casos, los espectros de masas de alta resolución se registraron haciendo uso de espectrofotómetros de masas *WATERS LCT PREMIER* y *WATERS SYNAP*

G2. Sin embargo, para la caracterización de los oligonucleótidos se empleó el espectrofotómetro *BRUKERAUTOFLEX*. Ambos equipos se encuentran disponibles en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada.

Los espectros obtenidos fueron deconvolucionados usando el software *MAXENT3* con *MassLyns[™]*.

2.2.7 Difracción de Rayos X (DRX)

Cuando fue posible la obtención de los compuestos en forma de monocristal, se determinaron sus estructuras cristalinas mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX). Algunos de ellos fueron medidos en un difractorómetro *BRUKER SMART APEX* ($\text{Mo K}\alpha$, $\lambda=0.71073 \text{ \AA}$), con monocromador de grafito, y detector de área CCD, en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Pero la mayoría fueron medidos en *Factoría de cristalización*, empresa ubicada en el Parque Tecnológico de la Salud de Granada, que dispone de un difractorómetro *BRUKER X8 PROTEUM* con ánodo rotatorio de cobre, óptica *Montel* y un detector *CCD 6000* inteligente, equipado con un dispositivo de baja temperatura de *OXFORD CRYOSTREAM* que permite trabajar entre 80 y 400 K.

2.2.8 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Para llevar a cabo una de las purificaciones intermedias en la síntesis de las cadenas de oligonucleótidos, así como también para comprobar la pureza de las muestras antes de comenzar los estudios correspondientes, se hizo uso de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) utilizando un cromatógrafo de líquidos analítico *THERMO SCIENTIFIC* modelo *SPECTRA SYSTEM P4000* dotado de un detector UV-visible acoplado *THERMO SCIENTIFIC* modelo *UV8000* y una columna cromatográfica *PHENOMENEX CLARITY 3 μ* , disponible en el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Granada.

2.3 Métodos

2.3.1 Estudio en disolución de la interacción complejo primario-nucleobase mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los estudios en disolución por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de la interacción complejo primario-nucleobase están basados en la observación de los desplazamientos en las señales correspondientes a los espectros de ^1H -RMN de las moléculas una vez que éstas interactúan entre sí, dando lugar a la formación de complejos. Los estudios se llevaron a cabo siguiendo dos vías distintas:

La primera consiste en disolver en el disolvente deuterado los moles necesarios del complejo primario correspondiente, cuyo volumen se mantiene constante durante la experiencia, e inmediatamente después registrar el espectro ^1H -RMN. Tras esto se le adiciona la cantidad calculada de nucleobase para que la relación nucleobase:complejo sea 1:1 o 1:2 según el caso y, una vez disuelta esta, se vuelve a registrar el espectro de ^1H -RMN analizando los cambios en las señales correspondientes tras la interacción. A veces, debido a las cinéticas lentas de algunas reacciones, es necesario calentar ligeramente o esperar un tiempo determinado antes de volver a registrar el espectro para observar los cambios que pudieran producirse.

La segunda vía está basada en la formación *in situ* del complejo primario. Para ello, se disuelve en primer lugar en el disolvente deuterado adecuado la molécula que actúa como ligando y tras registrar su ^1H -RMN, se le adiciona la cantidad correspondiente de sal metálica para que la relación metal:ligando sea 1:1. Tras registrar su espectro ^1H -RMN y observar los cambios de las señales que confirman la formación del complejo, se procede a adicionar la nucleobase, en proporción 1:1 ó 1:2 según el caso, y se registra el espectro. Igual que en el procedimiento anterior, el volumen inicial de disolvente deuterado se mantiene constante durante todo el experimento, y si el espectro no mostrara cambio alguno en las señales se procede a calentar y esperar un tiempo antes de volver a registrarlo.

2.3.2 Cálculo de la concentración de las cadenas de oligonucleótidos

Antes de empezar a trabajar con las disoluciones de partida de las cadenas de oligonucleótidos que fueron sintetizados o adquiridos de manera comercial, se llevaron a cabo medidas de las concentraciones de estas.

El protocolo a seguir para ello consistió en preparar tres réplicas de distinta concentración pipeteando tres volúmenes conocidos de la disolución madre de oligonucleótido, generalmente 5 μL , 7 μL y 9 μL , y llevándolos a un volumen total de 200 μL o 500 μL según el caso, con agua *Milli-Q*[®]. A continuación, se registraron los espectros de UV-visible haciendo uso de uno de los equipos de UV-visible disponible (véase sección 2.2), y se anotó el valor de la absorbancia registrado a una $\lambda=260$ nm. Haciendo uso de la Ley de Lambert-Beer,

$$A_{260} = \xi_{260} \cdot c \cdot l$$

donde A_{260} es la absorbancia registrada a 260 nm en unidades de absorbancia (ua), c es la concentración de la disolución de oligonucleótido (mM). Conociendo previamente el valor de los coeficientes de extinción molar a 260 nm, ξ_{260} ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$), característicos de cada nucleobase, y la longitud de la cubeta, l (cm), se pudo determinar la concentración.

Los coeficientes de extinción molar, ξ_{260} , de las nucleobases tipo así como de aquellas modificadas^[10] se encuentran recogidos en la literatura y son los siguientes:

Nucleobase	ξ_{260} ($\text{cm}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$)
<i>Adenina</i>	14.
<i>7-deaza-Adenina</i>	9.4
<i>Timina</i>	8.7
<i>Citosina</i>	6.1
<i>Guanina</i>	11.8
<i>7-deaza-Guanina</i>	12.6

2.3.3 Estudio de la temperatura de desnaturalización de las hebras de ADN

Los estudios de la temperatura de desnaturalización de las hebras de oligonucleótidos aportan una información muy importante que siempre se debe tener en cuenta para los experimentos donde se vaya a emplear este tipo de moléculas.

La desnaturalización de la doble hebra de ADN consiste en exponer una doble hebra a alta temperatura dando lugar a la ruptura de los enlaces de hidrógeno que existen entre las nucleobases y, por consiguiente, a la ruptura de la doble hélice, originando en su lugar monohebras de ADN. Este tipo de calentamiento puede ser monitorizado experimentalmente haciendo uso de un espectrómetro de UV-visible ya que es posible observar un cambio en la absorción a 260 nm debido al cambio estructural que sufre la doble hebra^[11].

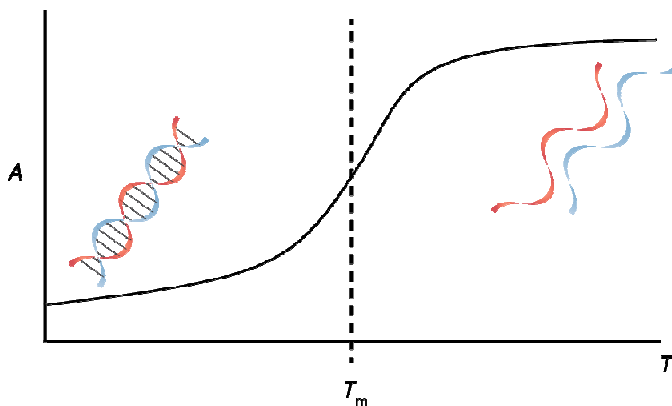


Figura 2.2. Curva genérica de desnaturalización de una doble hebra (Figura propiedad de www.atdbio.com)

Tal y como se muestra en la figura 2.2 el punto medio de la curva de desnaturalización corresponde a la T_m , temperatura donde tendríamos un 50% de doble hebra y un 50% de monohebra. Esta temperatura se usa para caracterizar principalmente la estabilidad térmica de una doble hebra en unas circunstancias

determinadas; además de variar en función de las nucleobases que conformen la cadena, ya que aquellas nucleobases que posibiliten la formación de más enlaces de hidrógeno serán las que le confieran un valor más elevado de T_m a una doble hebra determinada.

En esta tesis, para determinar la T_m de las cadenas de oligonucleótidos con los que se ha trabajado se prepara una disolución del oligonucleótido correspondiente en el tampón MOPS 5mM-NaClO₄ 1000 mM, y se registra el espectro de UV-visible en el rango 200-400 nm. Una vez determinada la longitud de onda a la que tiene lugar el máximo de absorción (siempre en valores próximos a 260 nm), se programa el equipo para que, a esa longitud de onda, se registre la absorbancia realizando una rampa de temperatura entre 5-90°C (los valores de las rampas de temperatura varían según el caso) a una velocidad de 1°C/min., dejando siempre un tiempo de espera de un minuto antes de registrar el valor para que el sistema se estabilice.

De esta forma, se registra la curva característica de desnaturalización de los oligonucleótidos con los que se ha trabajado durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

2.3.4 Estudio de la variación de la temperatura de desnaturalización en la interacción metal-ADN

El estudio de la variación de la temperatura de desnaturalización en la interacción metal-ADN permite conocer la estabilidad de los sistemas formados, y para ello se hace uso de la técnica de UV-visible.

En primer lugar, se prepara una disolución de hebra de oligonucleótido de concentración 1 μ M ó 2 μ M (según el caso) en tampón 5 mM MOPS (pH=6.8) y NaClO₄ 1000 mM. A esta disolución se le añade progresivamente la disolución del metal correspondiente en agua *Milli-Q*[®] (la concentración de esta depende del experimento), abarcando el ratio de adición que permita el estudio de interacción entre el metal y los lugares de interacción disponibles en la hebra de oligonucleótido (Tablas de adición disponibles en el *Anexo I*).

Se registra el espectro UV-visible correspondiente para determinar la longitud de onda máxima de absorción sobre la que se va a registrar el valor de absorbancia a las distintas temperaturas.

El equipo (véase sección 2.2.4) se programa para que registre la absorbancia en dos ciclos (desde valores mayores a menores de temperatura, y viceversa) al valor de longitud de onda donde tiene lugar el máximo característico del oligonucleótido, a una velocidad de 1°C/min., dejando que el sistema se estabilice durante un minuto. El rango de temperatura varía en función de la estabilidad del oligonucleótido pero tiene que ser el suficiente para observar la estabilización de la curva sigmoideal en sus extremos. Tras cada una de las adiciones de metal se lleva a cabo este proceso para registrar las curvas correspondientes.

Una vez obtenidas todas las curvas, se les realiza el tratamiento matemático correspondiente que permite conocer el valor de temperatura al que tiene lugar la desnaturalización de la doble hebra (T_m) según se incrementa la concentración de metal en la disolución.

2.3.5 Estudio de la interacción metal-ADN en disolución mediante espectrometría UV-visible

El estudio de interacción metal-ADN se lleva a cabo usando un equipo de UV-visible (véase sección 2.2.4) y registrando el espectro correspondiente a cada uno de los ratios de concentración oligonucleótido:metal/complejo primario.

La disolución de oligonucleótido de concentración 2 μ M se prepara en tampón MOPS 5 mM (pH=6.8), NaClO₄ 100 mM y agua *Milli-Q*[®]. La disolución de metal/complejo primario, cuya concentración varía según la experiencia, también se prepara en agua *Milli-Q*.

Se registra el espectro UV-visible entre 200 y 400 nm, a una velocidad de 300 nm/min. La temperatura a la que se realiza la valoración depende del oligonucleótido empleado (Tablas de adición disponibles en el *Anexo I*).

2.3.6 Estudio del cambio estructural en la interacción metal-ADN mediante dicroísmo circular (CD)

Las valoraciones necesarias para el estudio del cambio estructural en la interacción metal-ADN se llevan a cabo mediante la técnica de dicroísmo circular (CD). A una disolución de oligonucleótido se le realizan adiciones de una disolución de metal/complejo primario de forma que la disolución de oligonucleótido se mantenga constante a 2 μM y sólo aumente la concentración en el medio del metal/complejo metálico (Tablas correspondientes en *Anexo I*).

Para realizar estas experiencias se prepara una disolución del oligonucleótido correspondiente a una concentración de 4 μM en tampón 10 mM MOPS (pH=6.8), 200 mM NaClO_4 y agua *Milli-Q*[®]. De esta disolución se tomarán las correspondientes alícuotas que mantendrán constante la concentración del oligonucleótido.

La disolución de metal/complejo primario de 400 μM se prepara en agua *Milli-Q*[®] exceptuando las experiencias donde fue necesario el uso de la *N,N*-dimetilformamida como disolvente.

Los parámetros del equipo para llevar a cabo las medidas, usando una cubeta de 5 mm, fueron los siguientes:

- *Sensitivity: Standart*
- *D.I.T.: 0.5 sec*
- *Band Width: 2.00 nm*
- *Data Pitch: 0.5 nm*
- *Scanning Speed: 100 nm/min.*
- *Acumulation: 5*

El valor de la temperatura a la que se llevan a cabo las medidas se elige por debajo de la temperatura de desnaturalización (T_m) característica de cada oligonucleótido, teniendo en cuenta que la primera curva de dicroísmo circular, antes de adicionar por primera vez metal/complejo metálico, se registra después de calentar el sistema por encima de la T_m del oligonucleótido.

Para que el procedimiento sea homogéneo y el sistema se estabilice antes de cada medida, se espera 15 minutos tras cada adición de metal/complejo primario antes de registrar la medida correspondiente.

Al espectro de CD registrado tras cada adición se le sustrae el espectro correspondiente al tampón en agua *Milli-Q*[®], se le realiza una operación de suavizado y se le ajusta el *zero* de forma aritmética usando el programa *SPECTRA ANALYSIS 2.6.0.1* (*SPECTRA MANAGER* Versión 2) de *JASCO CORPORATION*.

2.3.7 Estudio de la variación de pH en la interacción metal-ADN

Las valoraciones de pH se realizaron preparando una disolución de doble hebra de oligonucleótido 3 μM en NaClO_4 100 mM y agua *Milli-Q*[®] a pH=7 ajustado con disoluciones concentradas de ácido polifosfórico o hidróxido de sodio. Esta disolución de oligonucleótido se calienta a 85°C durante unos 10 minutos antes de comenzar las adiciones de AgNO_3 5.2 mM en agua *Milli-Q*[®]. Tras cada adición, a temperatura ambiente, se espera 5 minutos para que se estabilice el valor de pH, el cual se registra en un pHmetro *JENWAY 3510*.

Posteriormente, se realiza la experiencia en las mismas condiciones pero en ausencia de oligonucleótido, y se sustraen estos valores a los registrados previamente (Tablas correspondientes en *Anexo I*).

2.3.8 Medidas de la conductancia de ADN mediante *STM-break junction*

Las medidas de conductancia de los sistemas Ag(I)–ADN se llevaron a cabo en el Departamento de Química de la Universidad de Liverpool (Reino Unido), bajo la supervisión del Prof. Richard Nichols, mediante la técnica *STM-break junction*.

Esta técnica consiste en acercar una punta de STM sobre una superficie formada por una monocapa de oro (*Gold Self Assembled Monolayer*) para hacer contacto mediante una punta de oro con el extremo de una molécula que previamente ha sido depositada sobre dicha superficie. La molécula se funcionaliza previamente con grupos orgánicos, típicamente tiol o amina, para facilitar la unión de la punta de oro del sistema STM. Tras el contacto entre la punta y la molécula, la punta de la sonda se retira rápidamente originando un puente de átomos que se alarga hasta la ruptura del mismo. A medida que esa apertura se ensancha, las moléculas de la monocapa de oro (Au-SAM) llenan ese espacio vacío, originando flujos de corriente, hasta que ese espacio se vuelve demasiado amplio para las moléculas que originan el “puente”, y la corriente cesa (Figura 2.3).

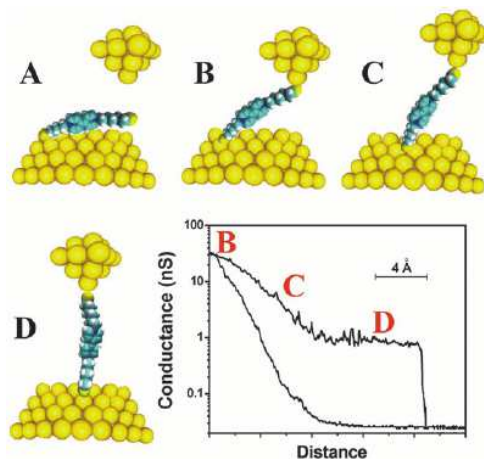


Figura 2.3. Distintas etapas en el procedimiento de medida de la conductancia mediante *STM-based break junction* (STM-BJ). (Fuente de la imagen: www.researchgate.com)

En este trabajo de tesis doctoral se ha hecho uso de esta técnica para medir la conductividad de las moléculas de oligonucleótidos cuando tienen coordinados iones Ag^+ en el interior de la doble hebra.

Para realizar estas medidas se prepararon disoluciones de cadenas de oligonucleótidos en una disolución de NaClO_4 100 mM y de tampón MOPS 5 mM a $\text{pH}=6.8$. Antes de realizar cada medida y, para asegurar el desenrollamiento de las hebras, estas fueron calentadas a 65°C en un baño de agua y posteriormente sacadas del mismo para que regresaran a temperatura ambiente de forma lenta y progresiva. La concentración final de oligonucleótido en las muestras depositadas sobre las que se realizaron las medidas fue $10\ \mu\text{M}$.

Como se ha mencionado previamente, para medir la conductancia de las muestras se empleó la técnica de *STM-BJ*. Las medidas se realizaron tras depositar unas gotas de la muestra de oligonucleótido $10\ \mu\text{M}$ sobre una superficie de oro previamente depositada en un sustrato de vidrio (*Arrandee, Schöer*, Alemania). Previo depósito de la muestra, la superficie de oro se limpia con acetona y se funde mediante un soplete de butano hasta llevarla al rojo. La superficie se mantiene en este estado durante 20 segundos durante los cuales el soplete se mantiene en movimiento alrededor de la muestra para evitar el sobrecalentamiento. Este procedimiento se realiza tres veces para generar terrazas de $\text{Au}(111)$.^[12] Sobre esta superficie de oro, fijada al portamuestras, se depositan unos mililitros de muestra de oligonucleótido y a la que se añade una disolución de $\text{Ag}(\text{I})$, según el caso, y se espera unos 30 minutos antes realizar la medida.

Las puntas utilizadas para realizar las medidas se afilan electroquímicamente y se recubren con cera *Apiezon* para hacerlas aptas en medidas de muestras líquidas.

La punta del sistema STM (Microscopio *AGILENT 5500 SPM*) se deposita sobre la muestra de forma repetitiva aplicando un *set point* de $10\ \mu\text{A}$ y un *withdraw* de 10 nm. La tensión de polarización aplicada es de unos 100 mV.

Durante el proceso de medida, si no se enlazan moléculas entre la punta y la superficie mientras se realiza la retirada de la punta, se observa un ligero decaimiento

del potencial en la curva de la corriente; sin embargo, si se enlazan moléculas entre la punta y la superficie, se observa el correspondiente “plato” en la curva de corriente.

Este proceso se repite aproximadamente unas 7.000 veces por cada muestra, para representar posteriormente la correspondiente gráfica de corriente *versus* distancia. Los picos obtenidos en el histograma determinan la conductancia más probable para la unión de una única molécula. El tratamiento de los datos se realiza mediante un software programado específicamente para que rechace aquellas medidas en las que se observe un ruido excesivo o tiempos de decaimiento de la corriente extremadamente largos.

2.4 Bibliografía

- [1] E. Greco, A. E. Aliev, V. G. H. Lafitte, K. Bala, D. Duncan, L. Pilon, P. Golding, H. C. Hailes, *New J. Chem.* **2010**, *34*, 2634–2642.
- [2] O. F. Schall, G. W. Gokel, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 6089–6100.
- [3] T. Murata, G. Saito, K. Nakamura, M. Maesato, T. Hiramatsu, Y. Yoshida, *Cryst. Growth Des.* **2013**, *13*, 2778–2792.
- [4] G. Chessa, A. Scrivanti, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1996**, *1*, 307.
- [5] R. E. Niziurski-Mann, M. P. Cava, *Adv. Mater.* **1993**, *5*, 547–551.
- [6] N. Delsuc, F. Godde, B. Kauffmann, J.-M. Leger, I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11348–11349.
- [7] N. P. Peet, L. E. Baugh, S. Sunder, J. E. Lewis, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 298–302.
- [8] B. Pitteri, L. Cattalini, G. Chessa, G. Marangoni, N. Stevanato, M. L. Tobe, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1991**, 3049–3054.
- [9] Tom Brown and Dr Tom Brown (Jr), “Solid-Phase Oligonucleotide Synthesis,” **2015**.
- [10] Glen Research, “Molar Extinction Coefficients Nucleobases,” puede encontrarse en <http://www.glenresearch.com/Technical/Extinctions.html>, **n.d.**
- [11] A. Rodger, H. C. Latham, P. Wormell, A. Parkinson, M. Ismail, K. J. Sanders, *Enantiomer* **1998**, *3*, 395–408.
- [12] W. Haiss, D. Lackey, J. K. Sass, K. H. Besocke, *J. Chem. Phys.* **1991**, *95*.



Capítulo III

Síntesis y
caracterización de
ligandos



En este capítulo se llevará a cabo una descripción de los procesos de síntesis que se han empleado para la obtención de las moléculas orgánicas que actuarán como ligandos en la formación de los complejos metálicos y que, posteriormente, interactuarán con las nucleobases o las hebras de oligonucleótidos.

3.1 Síntesis y caracterización de ligandos hidroxio-hidroxio

3.1.1. Ácido 4-metoxipiridín-2,6-dicarboxílico (1)

La síntesis de este ácido se ha realizado en tres pasos, empleando como compuesto de partida el ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**) (Figura 3.1). El objetivo principal consiste en funcionalizar el ligando **cheld** a través del grupo hidroxilo en posición 4 para demostrar así la versatilidad de esta molécula para aportar funcionalidad específica sin alterar su capacidad para formar complejos de coordinación. El ligando **cheld** puede actuar como ligando tridentado a través de los átomos N1, O1 y O5, y además aporta dos grupos carboxilo capaces de actuar en la formación de enlaces de hidrógeno.^[1-5]

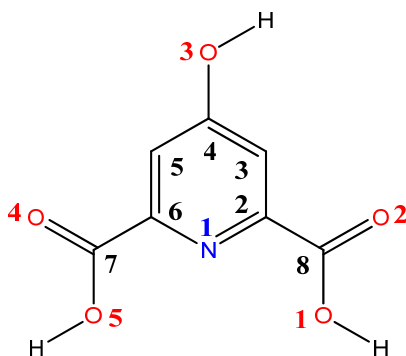


Figura 3.1. Molécula numerada de ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**).

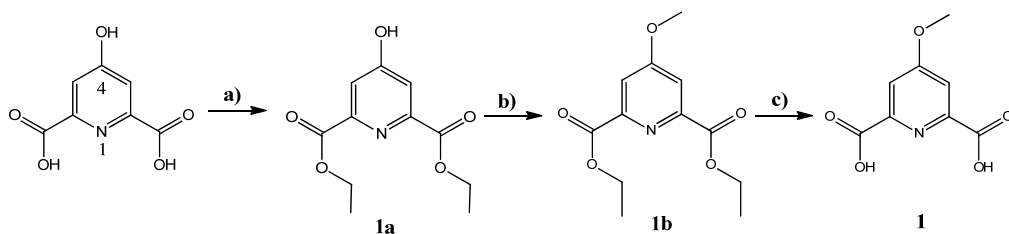


Figura 3.2. Esquema de síntesis del ácido 4-metoxipiridín-2,6-dicarboxílico, **1**. a) $\text{SOCl}_2/\text{EtOH}$ absoluto, T ambiente 24h, 2h reflujo; b) CH_3I , NaH , Schlenk 48h; c) NaOH 0.5 M $\text{pH}=7$, HCl $\text{pH}=3.6$.

La síntesis del ligando ácido 4-metoxipiridín-2,6-dicarboxílico (**1**) (Figura 3.2) se inició llevando a cabo la protección de los grupos carboxílicos del ligando de partida **cheld**, sustituyendo los dos hidrógenos por grupos etilo mediante una reacción de esterificación, obteniendo el compuesto intermedio **1a** (Figura 3.3).

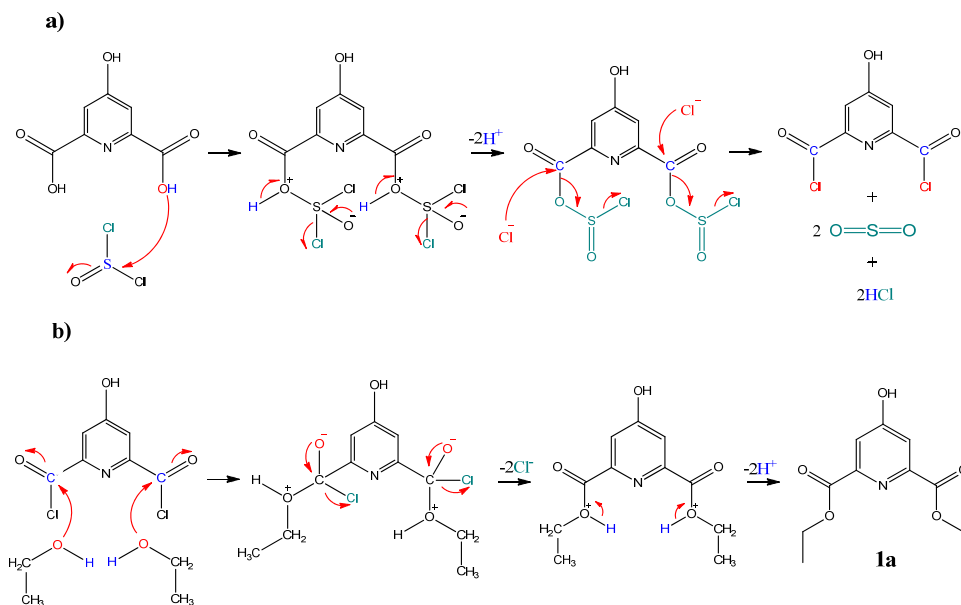


Figura 3.3. Mecanismo de obtención del intermedio **1a**. a) Obtención del cloruro de ácido. b) Reacción de adición nucleofílica-eliminación del cloruro de ácido para obtener **1a**.

Posteriormente, se lleva a cabo la alquilación del grupo hidroxilo en posición 4 mediante una síntesis de *Williamson*,^[6] empleando yodometano e hidruro de sodio en una atmósfera inerte, obteniéndose el producto **1b** (Figura 3.4).

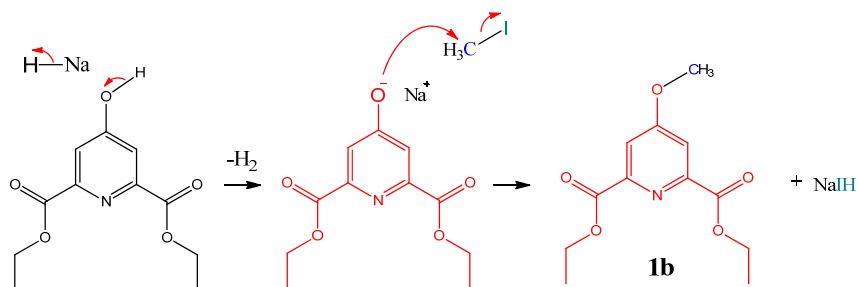


Figura 3.4. Mecanismo de obtención del intermedio **1b** mediante la síntesis de *Williamson*.

Finalmente, se realiza la desprotección de los grupos hidroxilo mediante una hidrólisis básica de ésteres para obtener el ácido 4-metoxipirimidín-2,6-dicarboxílico (**1**) (Figura 3.5).

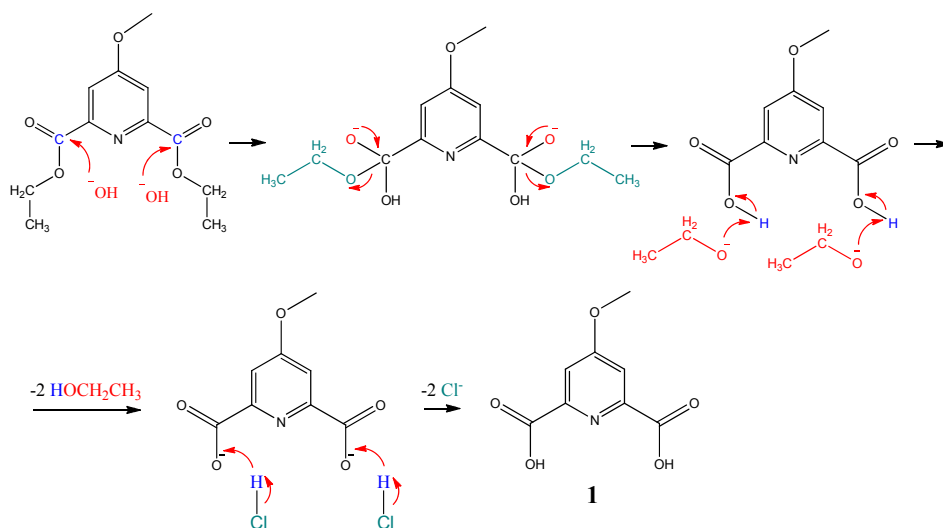


Figura 3.5. Mecanismo de obtención de **1** mediante una hidrólisis básica de ésteres.

La caracterización de las diferentes especies químicas formadas en cada una de las etapas, tanto de los intermedios como del producto final, se llevó a cabo en disolución mediante técnicas de ^1H -RMN y HRMS (véase sección 2.1.2.a.1).

El espectro de ^1H -RMN del producto **1a** (Figura 3.6, a) muestra la aparición de dos nuevas señales a 4.38 ppm (4H) y 1.34 ppm (6H) respecto del ligando **cheld**, correspondientes a los grupos etilo introducidos mediante la reacción de esterificación. En el caso del intermedio **1b**, el espectro de ^1H -RMN muestra la desaparición del protón del grupo hidroxilo en posición 4 y la aparición de un singlete a 3.98 ppm (3H), correspondiente al grupo metilo introducido en esa posición, al igual que un desplazamiento a campo alto de los protones aromáticos H3 y H5 ($\Delta\delta=0.15$ ppm). La masa obtenida por HRMS corrobora la formación de este producto **1** ($[\text{M}+\text{H}^+]$ encontrado: 254.1037).

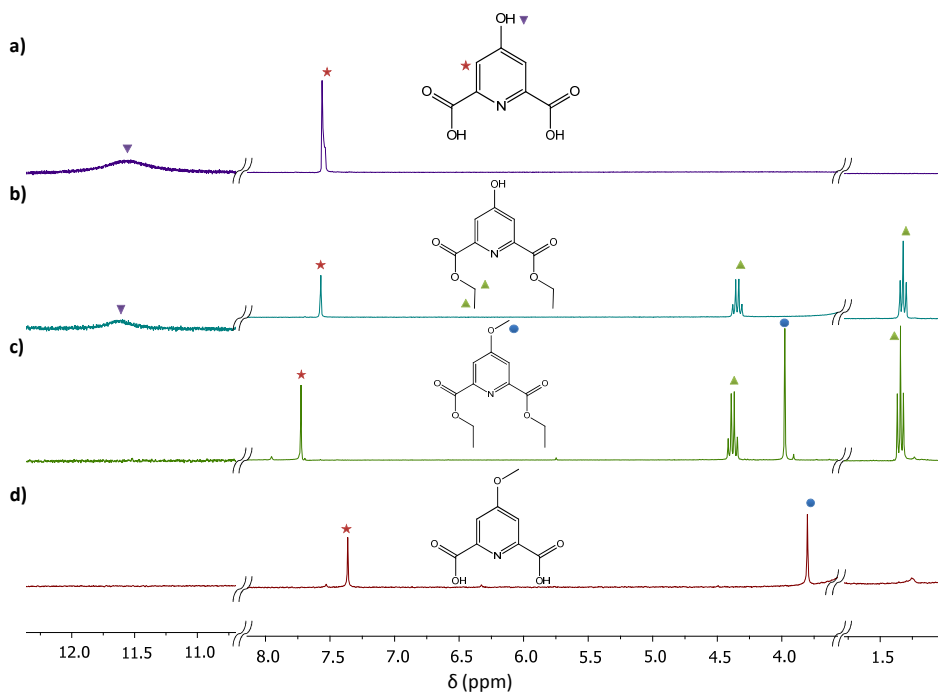


Figura 3.6. Espectros de ^1H -RMN (DMSO-d_6) para los productos a) **cheld**, b) **1a**, c) **1b** y d) **1**.

3.1.2. Ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridín-2,6-dicarboxílico (**2**)

En este trabajo de tesis se pretende incorporar el monómero 2-(2-tiofenil)pirrolo (**tp**) en posiciones específicas de moléculas monohebra de ADN y de manera controlada. Para ello, el monómero **tp** se introduce en un nuevo ligando para permitir desarrollar nuevas rutas sintéticas y estratégicas para la formación de híbridos ADN-polímeros conductores, concretamente mediante la formación de complejos metálicos capaces de interaccionar a posiciones específicas de las nucleobases constituyentes del ADN.

El ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridín-2,6-dicarboxílico (**2**) se obtiene por funcionalización del ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**) con un monómero precursor de un polímero conductor orgánico. En concreto, se introdujo el monómero **tp** precursor del polímero conductor poli(2-(2-tienil)pirrolo).^[7] Este polímero había sido previamente depositado con éxito sobre la superficie de moléculas de ADN, las cuales actuaban como plantilla^[8]. Sin embargo, esta estrategia carece de control sobre la estequiometría y sobre el lugar de deposición del polímero.

La síntesis del ligando **2** se llevó a cabo en cuatro etapas (Figura 3.7).

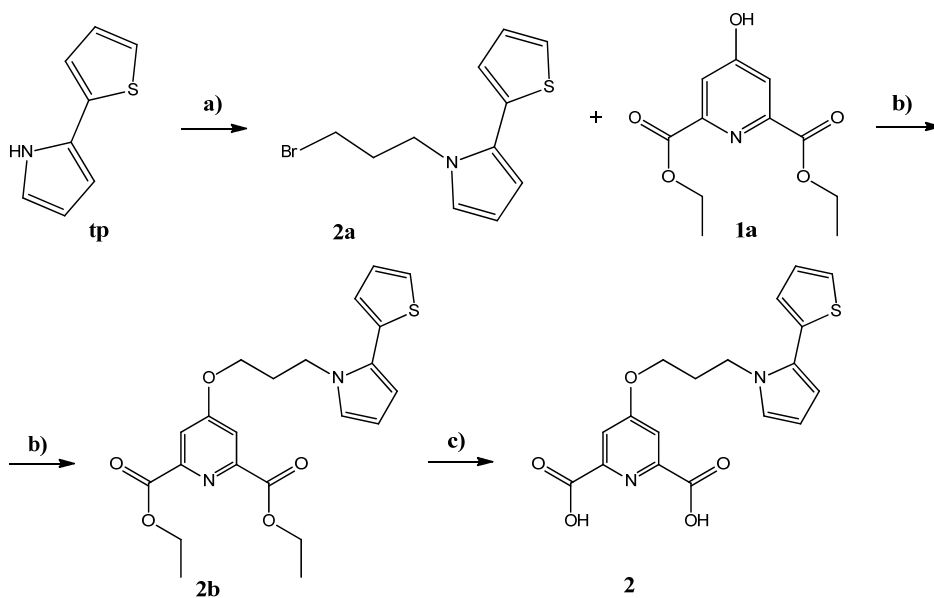


Figura 3.7. Esquema de síntesis del ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridín-2,6-dicarboxílico, **2**. a) $\text{BrCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$, NaH , Schlenk 5 días; b) **1a**, NaH , Schlenk 5 días; c) $\text{CH}_3\text{ONa}/\text{CH}_3\text{OH}$, T ambiente 48h, 60°C 2h.

Inicialmente se introduce una cadena alquílica en el monómero **tp**, portadora de un grupo halógeno terminal y que, por tanto, permite su participación en reacciones de sustitución nucleofílica para su posterior incorporación al ligando **1**.

Para ello, se realiza una reacción de alquilación entre el monómero **tp** y la cadena alquílica 1,3-dibromopropano en presencia de una base y en atmósfera inerte, obteniéndose el producto **2a**. El espectro de ^1H -RMN de este compuesto (Figura 3.8) muestra la desaparición del protón del grupo pirrolo (respecto del monómero libre) y la aparición de tres nuevas señales a 4.15, 3.40 y 2.12 ppm, correspondientes a los protones del grupo propilo con un bromo terminal. También se observa un desplazamiento a campo alto de los protones aromáticos del doble anillo pirrolo (**tp**).

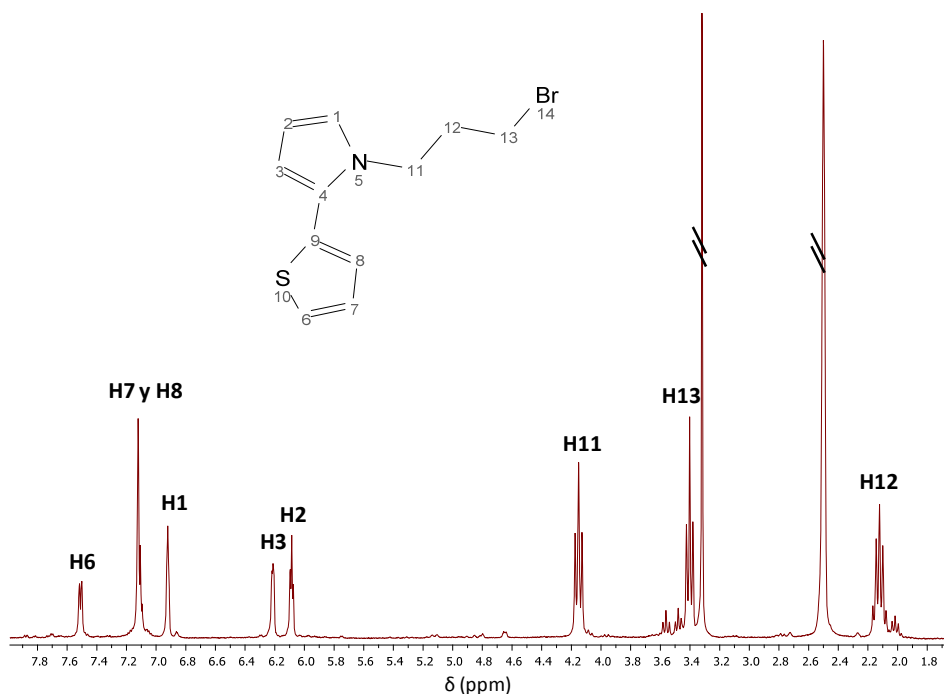


Figura 3.8. Espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del producto **2a**.

A continuación, se llevó a cabo la introducción del intermedio **2a** en el ligando **1a** (derivado del ligando **cheld**) en presencia de hidruro de sodio, obteniéndose el derivado **2b**. El espectro de ^1H -RMN de **2b** pone de manifiesto la incorporación del grupo **tp** al ligando aromático mediante una cadena de propilo unida al oxígeno en posición 4 del anillo aromático. En concreto, se observan los protones aromáticos correspondientes al monómero **tp** (7.42-6.07 ppm) y a la cadena de propilo a 4.24 ppm, 4.07 ppm y 2.10 ppm. Igualmente, debería observarse la desaparición del hidrógeno del grupo hidroxilo presente inicialmente en el ligando pero la presencia de agua en la muestra no lo permite. Asimismo, se aprecia un débil desplazamiento a campo bajo de los protones aromáticos H3 y H5 ($\Delta\delta=0.03$ ppm). El espectro de masas HRMS (véase *Anexo III*) muestra la masa esperada para este intermedio ($[\text{M}+\text{H}^+]$ encontrado: 429.1492).

Finalmente, se desprotegeron los grupos carboxílicos utilizando como catalizador metóxido de sodio en un medio anhidro y calentando ligeramente para favorecer su actividad catalítica. A continuación, se neutraliza el medio de reacción haciendo uso de una resina neutra como la *Amberlite*[®], obteniéndose el ligando final **2**.

El espectro de ¹H-RMN del ligando **2** (Figura 3.9) muestra claramente la desprotección de los grupos carboxílicos, con la desaparición de las señales correspondientes a los protones del grupo etilo. Con respecto a los protones de los grupos carboxílicos, no se observa la señal correspondiente debido al intercambio de sus protones con deuterio. El espectro de masas HRMS (véase *Anexo III*) muestra la masa teórica esperada para el ligando **2** ($[M+H]^+$ encontrado: 373.0844).

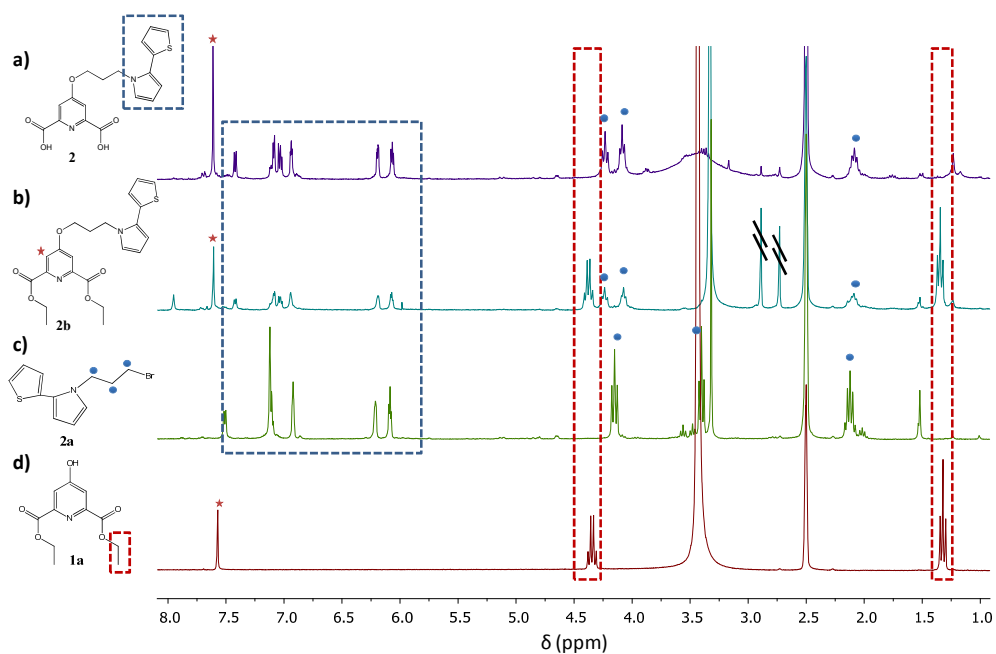


Figura 3.9. Espectros de ¹H-RMN (*DMSO-d*₆) para los productos a) ligando **2**, b) intermedio **2a**, c) monómero funcionalizado **2a** y d) precursor **1a**.

3.1.3. (4-propoxipiridín-2,6-diil)dimetanol (**3**)

Esta molécula se obtuvo como subproducto de reacción al llevar a cabo la reducción completa de los grupos ésteres presentes en el intermedio dietil-4-propoxipiridón-2,6-dicarboxilato (**4a**) (Figura 3.10 y 3.11).

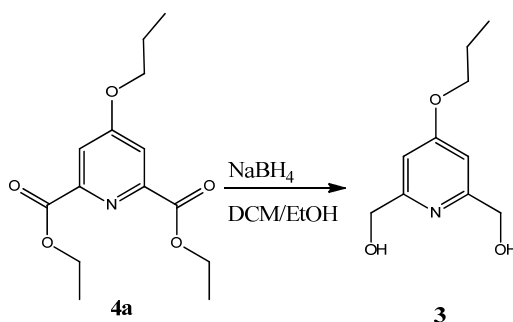


Figura 3.10. Esquema de síntesis de (4-propoxipiridín-2,6-diil)dimetanol, **3**.

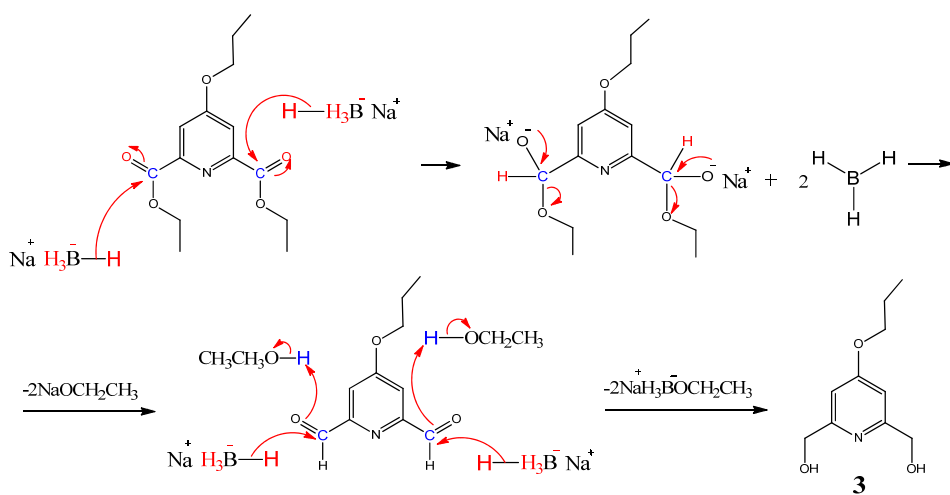


Figura 3.11. Mecanismo de reducción de éster vía NaBH_4 para obtener **3**.

La caracterización de esta molécula se llevó a cabo en disolución tanto por ^1H -RMN como por HRMS, y en estado sólido mediante técnicas de AE (véase sección 2.1.2.a.3).

El espectro de ^1H -RMN (Figura 3.12) muestra la aparición de nuevas señales que ponen de manifiesto la reducción de los dos grupos carboxílicos a grupos hidroxilos terminales. Específicamente, se observa la aparición de un triplete a 5.31 ppm (2H) correspondiente a los dos grupos OH, al igual que un doblete a 4.45 ppm (4H) de los protones de los grupos $-\text{CH}_2$ en posición 2 y 4.

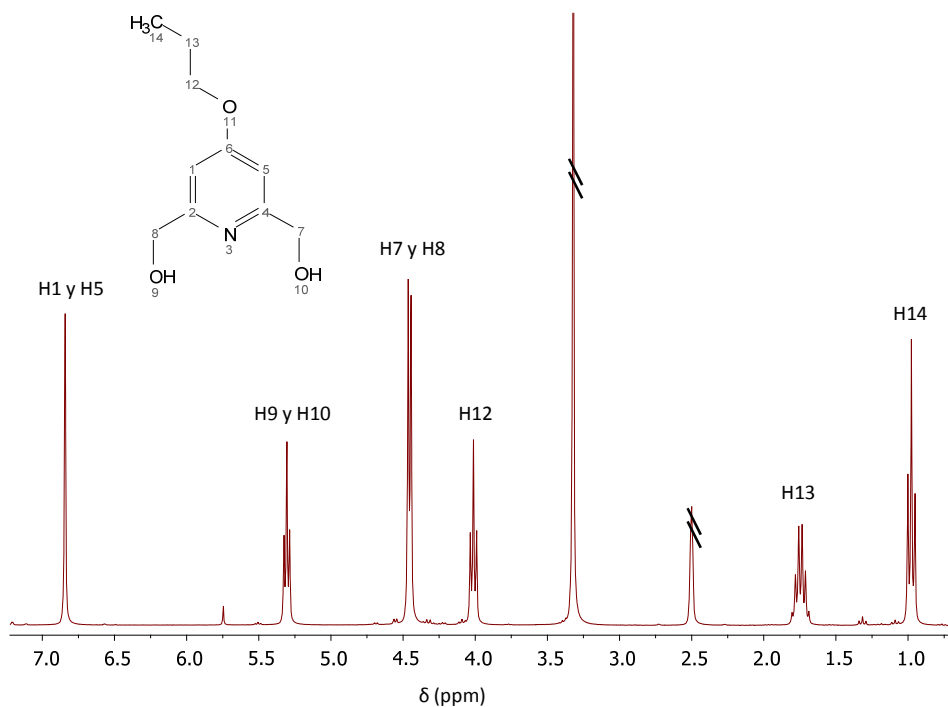


Figura 3.12. Espectro de ^1H -RMN (DMSO-d_6) para el producto 3.

3.2 Síntesis y caracterización de ligandos hidroxo-amino

3.2.1. Ácido 6-(aminometil)-4-propoxipicolínico (**4**)

La síntesis del ácido 6-(aminometil)-4-propoxipicolínico (**4**) se ha llevado a cabo utilizando la modificación de un método descrito previamente en bibliografía^[9].

A diferencia del ligando **1**, este nuevo ligando **4** posee un grupo carboxílico y un grupo amino, capaces de coordinarse a iones metálicos y de actuar en la formación de enlaces de hidrógeno como grupos aceptores y dadores respectivamente. El objetivo es la obtención de un ligando capaz de aportar funcionalidad específica sin afectar su capacidad para formar complejos de coordinación actuando como ligando tridentado.

El proceso global de síntesis de **4** tiene lugar en siete pasos, partiendo del derivado **1a**, previamente sintetizado (Figura 3.13).

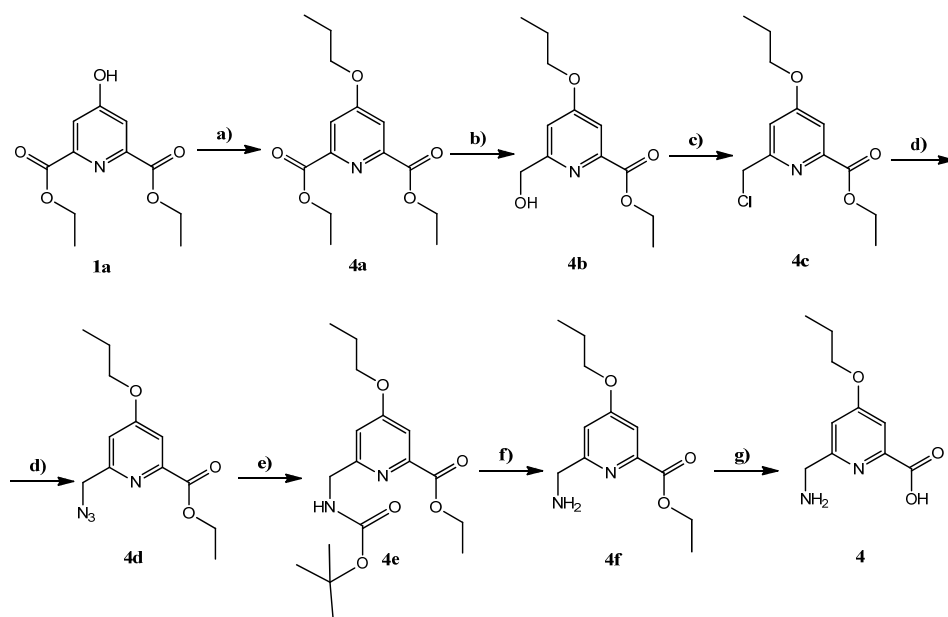


Figura 3.13. Esquema de síntesis del ligando ácido-6-(aminometil)-4-propoxipicolínico, **4**.
 a) NaH, CH₃CH₂CH₂I, Schlenk 48h; b) NaBH₄, T ambiente 3h; c) SOCl₂, Schlenk 3h; d) NaN₃/DMF, T ambiente 3h; e) PPh₃, T ambiente 3h, H₂O, 5h reflujo, (Boc)₂O, 4-DMAP, T ambiente 16h; f) TFA, T ambiente 6h; g) CH₃ONa/CH₃OH, T ambiente 48h, 60°C 2h.

A partir del ligando **1a**, se llevó a cabo la funcionalización del grupo hidroxilo en posición 4 mediante una reacción de alquilación empleando 1-yodopropano en presencia de hidruro de sodio, obteniéndose el derivado **4a**. El espectro de $^1\text{H-RMN}$ confirmó la formación de **4a**, observándose la desaparición del protón del grupo hidroxilo y la aparición de las señales correspondientes a los hidrógenos de la cadena de propilo (4.17 ppm, 1.76 ppm, 0.99 ppm).

El siguiente paso consistió en la reducción de uno de los grupos carboxilo a hidroxilo utilizando borohidruro de sodio, obteniéndose así el derivado **4b**. Es importante mencionar que para evitar la reducción de los dos grupos hidroxilo, la reacción se llevó a cabo en condiciones reductoras menos enérgicas y con un control exhaustivo del progreso de la reacción mediante cromatografía en capa fina (TLC).

Cuando la reacción se lleva a cabo con un exceso mayor a dos equivalentes de borohidruro de sodio se produce la reducción de los dos grupos carboxilo a hidroxilo, dando lugar al derivado **3** (véase sección 3.1.3).

El derivado **4b** se caracterizó en disolución por espectroscopia de $^1\text{H-RMN}$ (Figura 3.14), cuyo espectro muestra la reducción del grupo carboxílico a alcohol con la aparición de las señales correspondientes al grupo CH_2 en forma de doblete (4.55 ppm), así como el triplete correspondiente al protón del grupo hidroxilo (5.52 ppm). También se observa un desdoblamiento del singlete original correspondiente a los dos protones aromáticos del anillo debido a la pérdida de la simetría de **4a** con respecto a **4b** al reducir únicamente uno de los grupos carboxílicos.

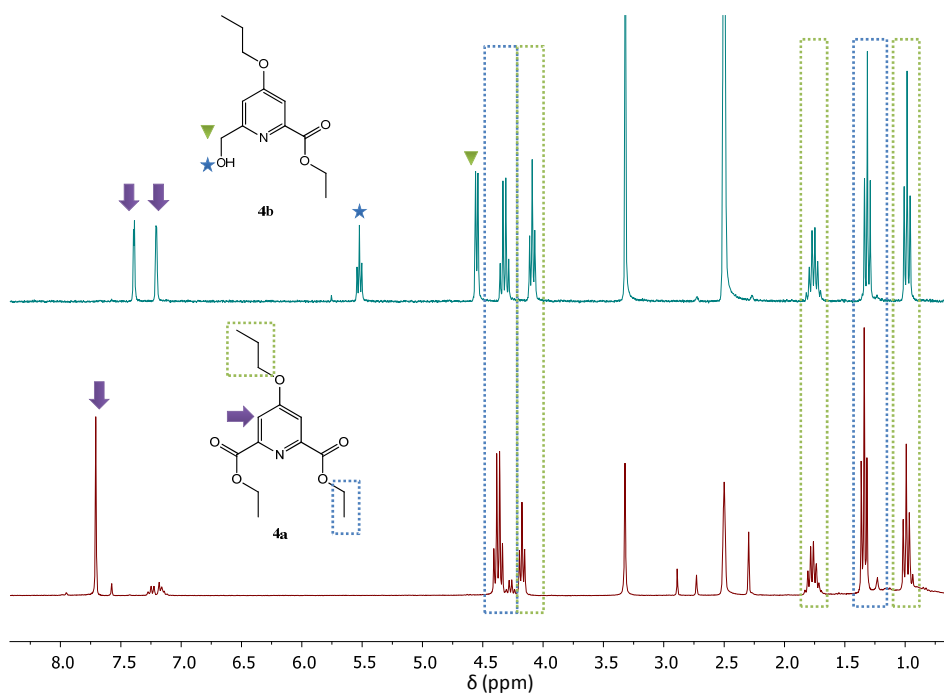


Figura 3.14. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) para los productos **4b** (arriba) y **4a** (abajo)

A continuación, se llevó a cabo la sustitución del grupo hidroxilo por cloro, por acción del cloruro de tionilo, para obtener un cloruro de alquilo, dando lugar al derivado **4c**, cuyo espectro de ¹H-RMN mostró la desaparición del protón del grupo hidroxilo y el desplazamiento del grupo -CH₂- como consecuencia de su unión a un cloruro ($\Delta\delta=0.25$ pm).

El siguiente paso de reacción está basado en la primera parte de la *Síntesis de Gabriel* (Figura 3.15), y consiste en la transformación del cloruro de alquilo a un grupo azida, empleando azida de sodio, obteniéndose el derivado **4d** de forma sencilla y con muy buen rendimiento. La caracterización de **4d** se llevó a cabo en disolución por ¹H-RMN sin que el espectro muestre diferencias notables con respecto al obtenido al caracterizar la molécula **4c**. Esto es debido a que el intercambio del cloro por un grupo azida parece afectar de manera similar al desplazamiento de los protones -CH₂- adyacente a estos grupos. Sin embargo, el espectro de masas HRMS de **4d** confirma la

masa esperada y el intercambio de los cloruros por los grupos azida ($[M+H]^+$ encontrado: 265.1301) (véase *Anexo III*).

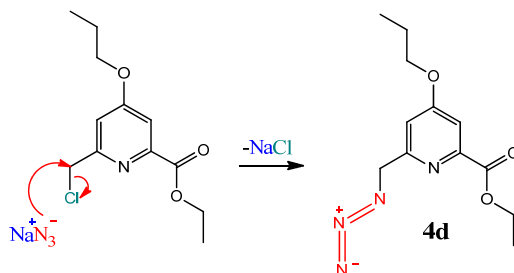


Figura 3.15. Mecanismo de reacción para la obtención del intermedio **4d**.

Posteriormente, se realizó la transformación del grupo azida a amina cuyo mecanismo está basado en la reacción de *Staudinger*,^[10] por acción de trifenilfosfina y agua (Figura 3.16, a y b) y el posterior intercambio del grupo trifenilfosfonio por el grupo protector tert-butoxicarbonilo (Boc), todo ello en una misma reacción, obteniéndose el derivado **4e** (Figura 3.16, c). El espectro de $^1\text{H-RMN}$ de **4e** pone de manifiesto la presencia del grupo Boc con la aparición de un singlete a 1.44 ppm (9H). El espectro de masas HRMS confirma la masa del ligando **4e** ($[M+H]^+$ encontrado: 258.0887) (véase *Anexo III*).

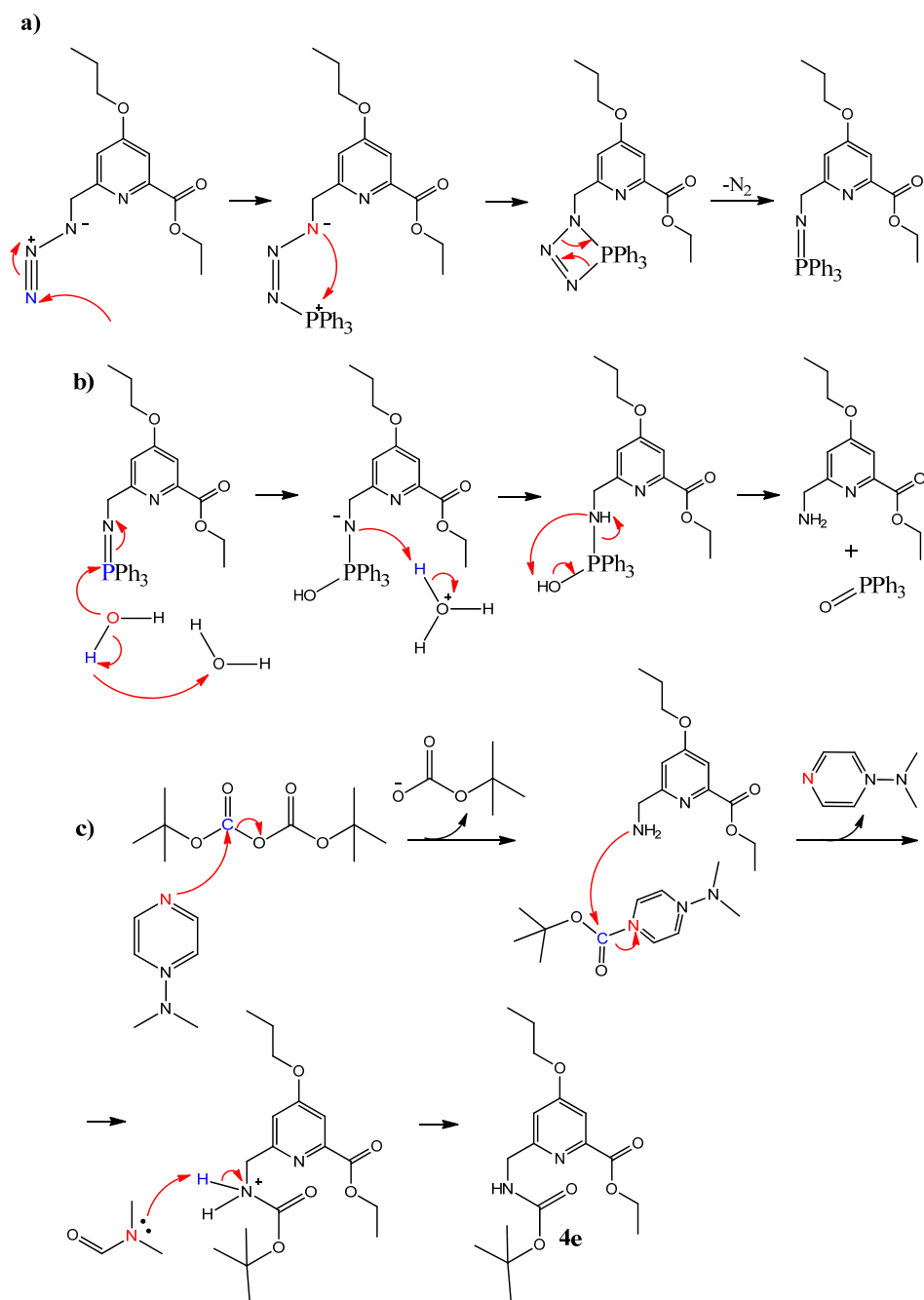


Figura 3.16. Mecanismo de reacción para la obtención de **4e**. a) Reacción del grupo azida con PPh_3 . b) Eliminación del grupo PPh_3 . c) Protección del grupo amino con $(\text{Boc})_2\text{O}$, reacción catalizada por 4-DMAP.

La eliminación del grupo Boc, en presencia del ácido trifluoroacético (TFA) da lugar a la amina primaria con buen rendimiento, es decir, al compuesto **4f** (Figura 3.17). Su espectro de $^1\text{H-RMN}$ pone de manifiesto la desaparición de las señales del grupo Boc pero no se observa la señal correspondiente al grupo amino debido a la presencia de agua en la muestra.

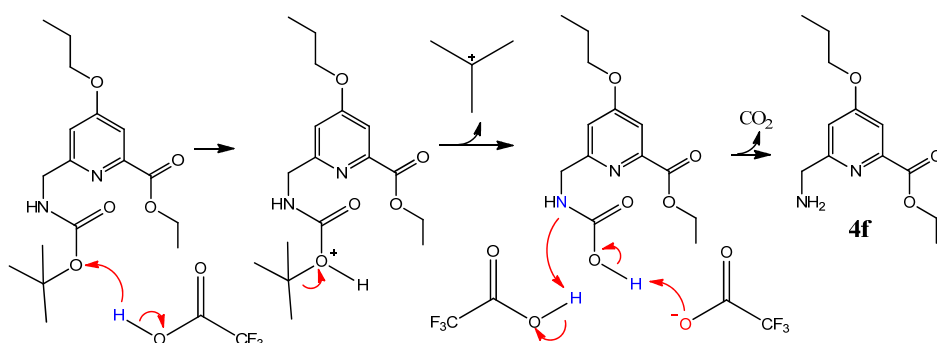


Figura 3.17. Mecanismo de desprotección de aminas vía TFA.

Finalmente, se llevó a cabo la desprotección del grupo éster para obtener el ácido carboxílico correspondiente, vía catalítica usando metóxido de sodio, tal y como se ha descrito previamente, obteniéndose el ligando deseado **4**. En el espectro de $^1\text{H-RMN}$ de esta molécula (Figura 3.18, a), es interesante señalar la desaparición de las señales del grupo éster etílico (4.33 y 1.30 ppm) una vez se lleva a cabo su desprotección en este último paso de la reacción.

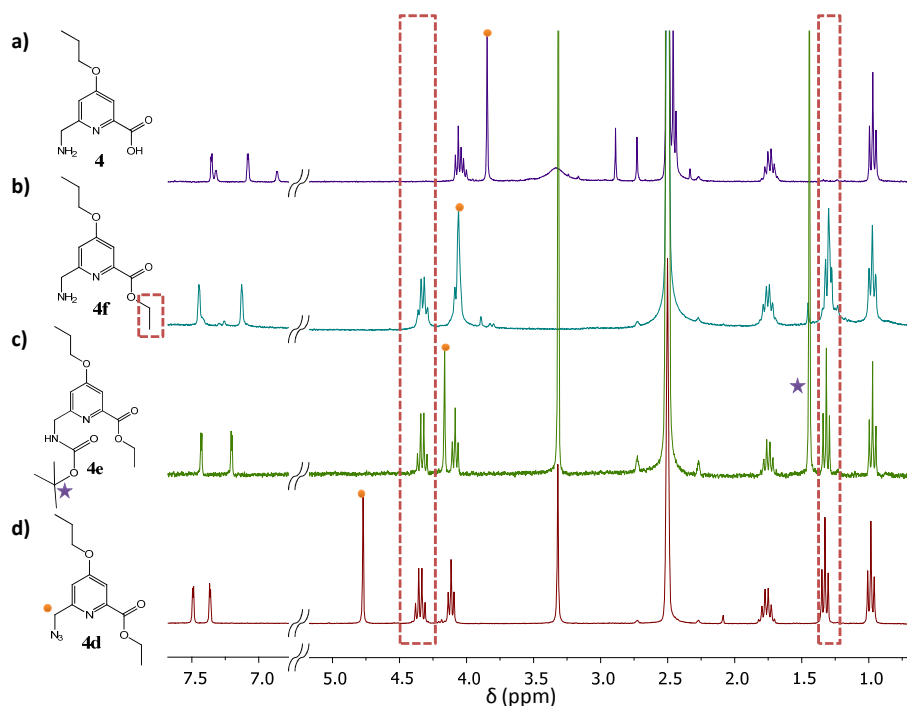


Figura 3.18. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) para los productos a) **4**; b) **4f**, c) **4e** y d) **4d**.

Es importante indicar que también se intentó sintetizar el ácido-6-(aminometil)-4-propoxipicolínico (**4**), obteniéndose en primer lugar la azida **4d**, tal cual se ha descrito previamente, pero realizando a continuación una hidrogenación catalítica usando como catalizador paladio sobre carbón, y una corriente de H_2 (4 atm) durante 7 días. Sin embargo, se obtuvo el ácido 6-metil-4-propoxipicolínico (Figura 3.19), hecho del que no se han encontrado razones que permitan su justificación.

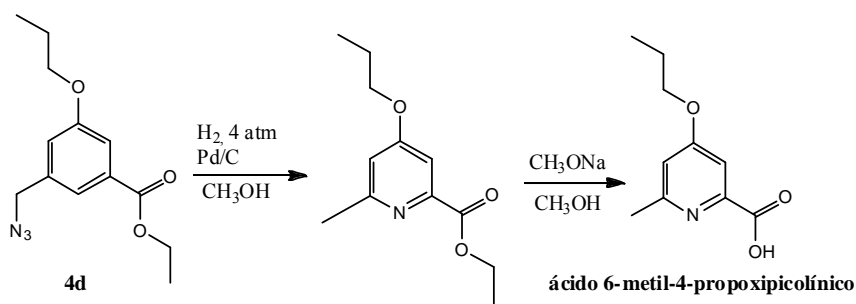


Figura 3.19. Esquema alternativo de síntesis de **4** que dio como resultado la obtención del **ácido 6-metil-4-propoxipicolínico**.

3.2.3. Ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico (**5**)

Para la síntesis del ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico (**5**) se usó como molécula de partida metil-8-nitro-4-oxo-1,4-dihidroquinolina-2-carboxilato (**NOqui**), cuyo procedimiento de síntesis se realizó siguiendo un método descrito en literatura.^[11]

Es importante destacar que en el transcurso de la primera etapa, es decir, durante la alquilación del grupo 4-hidroxilo con una cadena propílica, tuvo lugar una reacción de transesterificación entre un grupo metil y otro propil (Figura 3.20), dando lugar a los derivados **5a** y **5a'**. Esta transesterificación posiblemente estuvo favorecida por las condiciones ácido-base del medio en el que transcurre.

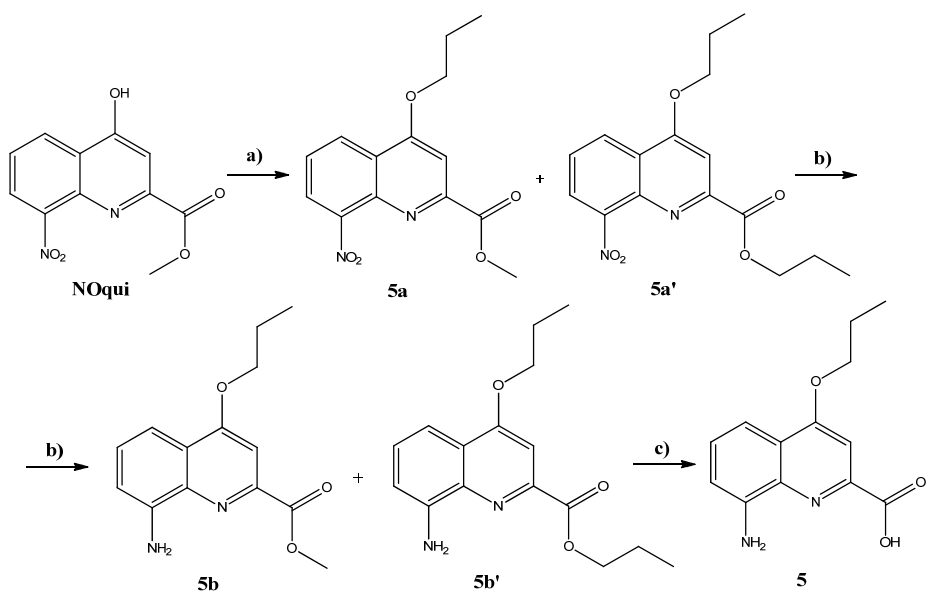


Figura 3.20. Esquema de síntesis del ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico, **5**. a) NaH, CH₃CH₂CH₂I, Schlenk 6 días; b) H₂ 1 atm, 10% Pd/C, 40h; c) CH₃ONa/CH₃OH, T ambiente 12h, 60°C 2h.

La purificación adecuada de estas especies, por cromatografía en gel de sílice, no fue posible debido a que ambas poseen coeficientes de retención muy próximos. No obstante, durante la separación en columna fue posible obtener una pequeña fracción de **5a** y **5a'** de elevada pureza, cuyos espectros de ¹H-RMN (Figura 3.21) permitieron comprender el espectro de ¹H-RMN de la mezcla de ambas especies, que fue la fracción mayoritaria obtenida durante los procesos de purificación.

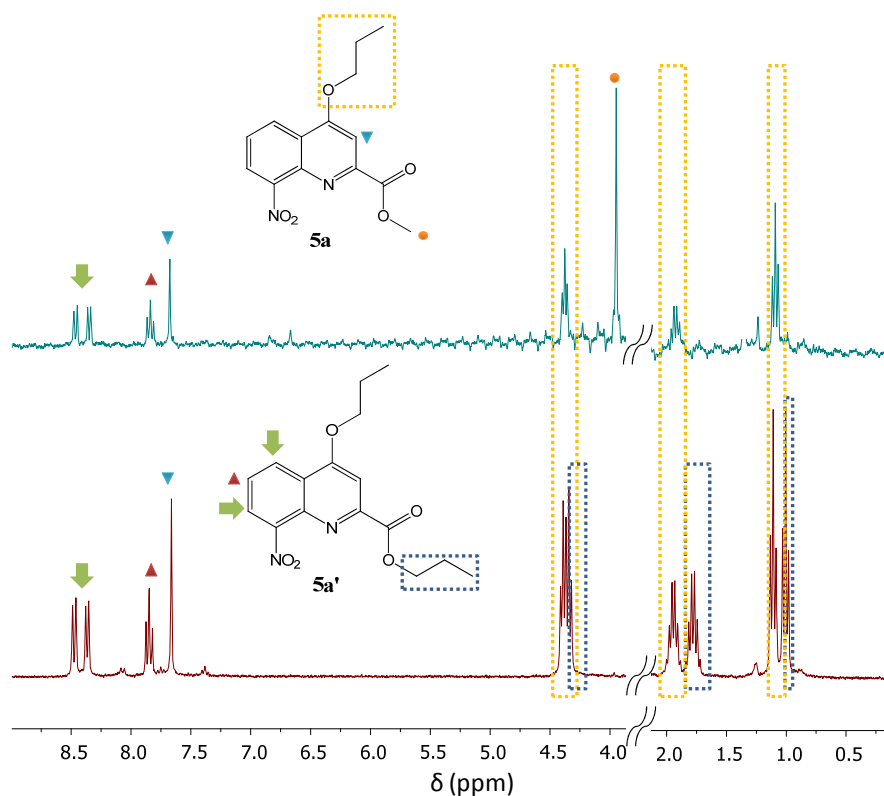


Figura 3.21. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) para los productos **5a** (arriba) y **5a'** (abajo).

Concretamente, en el espectro de ¹H-RMN de **5a** pueden observarse las señales del éster metilo como un singlete a 3.95 ppm, y del grupo propil (posición 4) como triplete, multiplete y triplete a 4.38 ppm, 1.94 ppm y 1.09 ppm respectivamente. En el caso de **5a'**, las señales correspondientes al éster propilo pueden observarse a desplazamientos de 4.37 ppm, 1.78 ppm y 1.01 ppm, y los del grupo propil (posición 4) se observan a 4.37 ppm, 1.94 ppm y 1.11 ppm. Con respecto a los cuatro protones del doble anillo que se observan en la zona aromática del espectro (8.5-7 ppm), el desplazamiento es prácticamente el mismo para **5a** y para **5a'**.

Por lo tanto, la alquilación en posición 4 se llevó a cabo correctamente con un grupo propilo, de manera que la transesterificación no afectó para obtener el producto deseado y, por lo tanto, no se llevó a cabo la separación total de ambas especies.

Posteriormente, se realizó la hidrogenación catalítica del grupo nitro, empleando paladio soportado sobre carbón como catalizador y en atmósfera de H₂ (1 atm), obteniendo así los derivados correspondientes **5b** y **5b'**. El éxito de la hidrogenación y la consecuente conversión del grupo nitro a amino se observa en el espectro de ¹H-RMN con la aparición de una señal a 6.02 ppm que integra por cuatro protones (correspondiente a dos grupos amino de los dos derivados) (Figura 3.22).

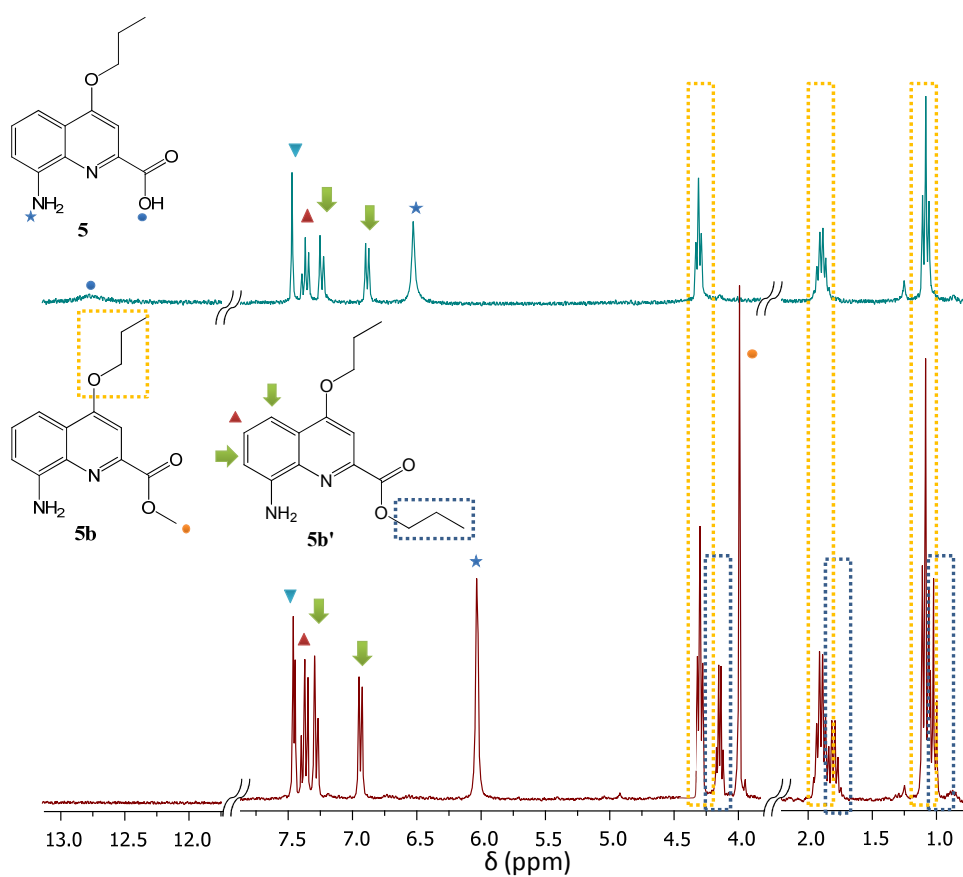


Figura 3.22. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) para los productos **5b'**+**5b** (abajo) y **5** (arriba).

Finalmente, la última etapa del proceso consistió en la saponificación de los grupos ésteres, dando lugar al ligando final ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico (**5**) como único producto de reacción. En el espectro de ^1H -RMN de la especie **5** (Figura 3.22, arriba) no se observan las señales correspondientes a los protones de los grupos éster carboxílicos pero, sí es posible observar el protón del grupo OH (12.74 ppm) que se obtiene como resultado de la desprotección de las moléculas **5b** y **5b'**. El desplazamiento y la multiplicidad del resto de señales no se ven afectados por este cambio en la molécula, siendo el esperado el número de protones por el que integra cada una de ellas.

Debido a la presencia de las dos especies éster (metilo y propilo) durante todo el proceso fue difícil calcular el rendimiento de cada etapa de síntesis, que sí se calculó con respecto al proceso global de síntesis, siendo este del 57.3%.

La caracterización mediante HRMS confirma la existencia en disolución de las moléculas **5b**, **5b'** y **5** (véase *Anexo III*).

3.2.3. Ácido 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxílico (**6**)

Con objeto de obtener un derivado similar al ligando **5**, descrito en el apartado anterior, pero con diferentes propiedades de solubilidad, se decidió preparar el ligando **6**, que incorpora un grupo metilo en posición 4 en lugar de un grupo propilo como en el caso del ligando **5**.

El procedimiento de síntesis para el ácido 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxílico (**6**) se llevó a cabo de una forma similar al descrito previamente para el ácido 8-amino-4-propoxiquinolina-2-carboxílico (**5**) (Figura 3.23).

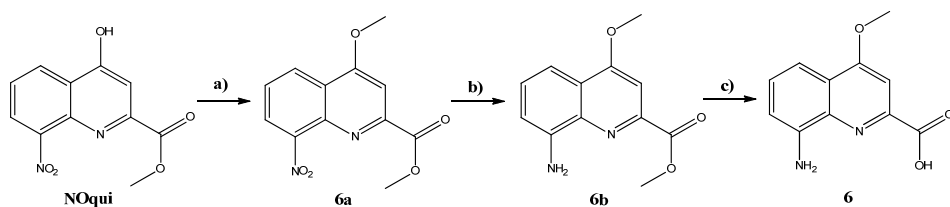


Figura 3.23. Esquema de síntesis del ácido 8-amino-4-metoxiquinolina-2-carboxílico, **6**. a) NaH, CH₃I, Schlenk 12h; b) H₂ (1 atm), 10% Pd/C, 24h; c) NaOH 0.5 M, reflujo 24h, HCl al 20% (pH=7).

A continuación, se llevó a cabo la metilación del grupo hidroxilo en posición 4 en condiciones básicas mediante una sustitución nucleofílica para obtener **6a**. El espectro de ¹H-RMN confirma la formación del intermedio **5a** con la aparición de un singlete a 4.19 ppm, correspondiente al grupo metilo (Figura 3.24, a).

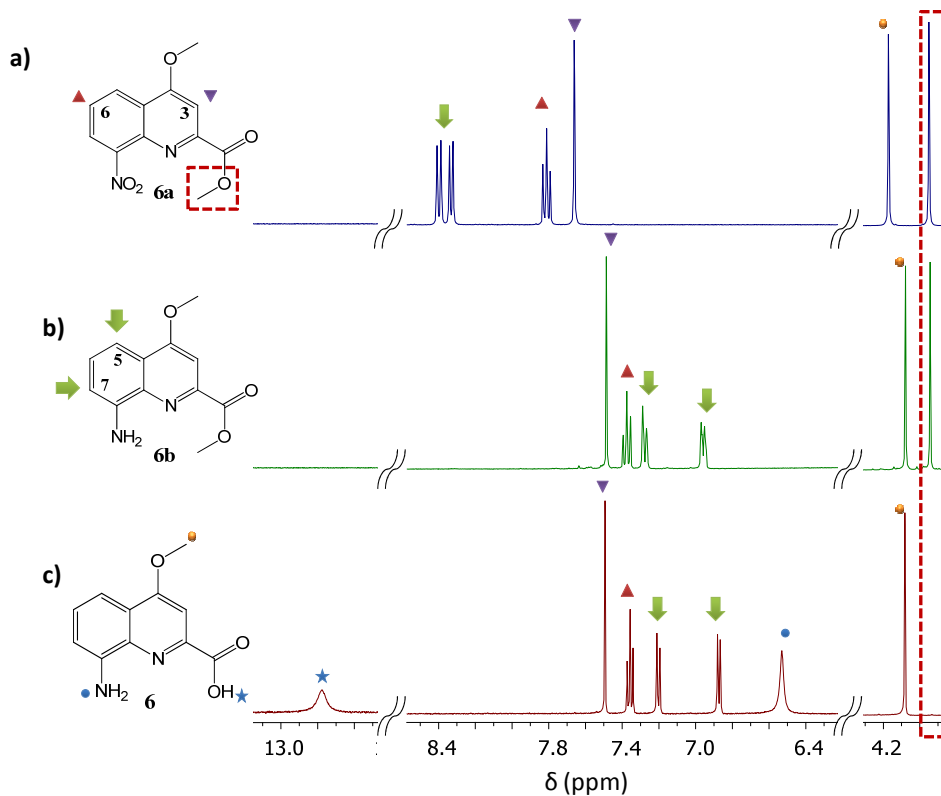


Figura 3.24. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) para los productos a) **6a**, b) **6b**, y c) **6**.

Este paso de reacción fue seguido de la síntesis de **6b** llevada a cabo mediante una hidrogenación catalítica, utilizando como catalizador de paladio sobre carbón en atmósfera de H₂ (1 atm) durante 24 horas. Como consecuencia de la conversión del grupo nitro en grupo amino, se puede observar en el espectro de ¹H-RMN de la molécula (Figura 3.24, b) que los protones del doble anillo de quinoleína se desplazan a campo alto. Los desplazamientos más significativos tienen lugar en los protones que se encontraban más cercanos al grupo nitro, concretamente el protón H7 ($\Delta\delta=1.46$ ppm). También se observa un ligero desplazamiento a campo bajo de la señal correspondiente al singlete del grupo metilo ($\Delta\delta=0.11$ ppm).

Por último, se procedió a la saponificación del éster para obtener el grupo carboxílico mediante una reacción en medio básico fuerte que favorece el ataque nucleofílico al grupo metóxido y la salida del mismo. En el espectro de ¹H-RMN del ligando **6**, es posible observar las señales correspondientes a los protones de los grupos NH₂ (6.53 ppm) y OH (12.79 ppm), así como la desaparición del singlete correspondiente al grupo metílico protector del grupo carboxílico, lo que confirma el éxito del proceso de saponificación (Figura 3.24, c).

3.3 Síntesis y caracterización de ligandos amino-amino

3.3.1. Piridín-2,6-diildimetanamina (7)

La síntesis de este ligando se llevó a cabo por primera vez en el año 1957, cuando los investigadores Francis Lions y Kenneth V. Martin lo obtuvieron partiendo de 2,6-dimetilpiridina.^[12] Posteriormente, han aparecido otros métodos de obtención en la literatura,^[13,14] siendo la más próxima al método que se propone en este trabajo de investigación la descrita en la patente de Shibatomi.^[15] Sin embargo, el método aquí descrito emplea disolventes más respetuosos con el medio ambiente, obteniéndose rendimientos bastante altos (73% en el primer paso de reacción y 100% en el segundo).

Para la síntesis de la piridín-2,6-diildimetanamina (**7**) se utilizó como compuesto de partida el producto comercial bis(bromometil)piridina. Este precursor posee dos bromuros de alquilo primarios que son susceptibles de participar en reacciones de sustitución nucleofílica (Figura 3.25).

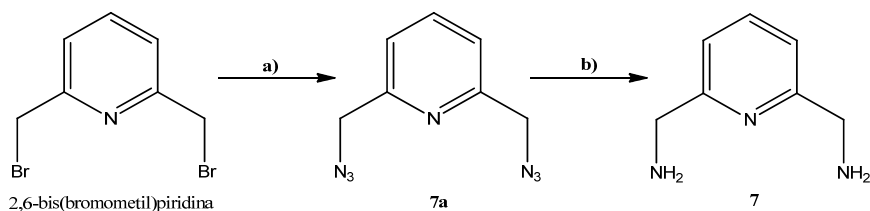


Figura 3.25. Esquema de síntesis de piridín-2,6-diildimetanamina, **7**. a) $\text{NaN}_3/\text{EtOH}:\text{H}_2\text{O}$, reflujo 48h; b) H_2 (3 atm), 10% Pd/C, 16h.

El tratamiento de la piridina 2,6-bis(bromometil)piridina con azida sódica dio lugar al intermedio **7a** mediante una sustitución nucleofílica bimolecular ($\text{S}_{\text{N}}2$). Esta reacción está favorecida por el buen carácter de grupo saliente de los bromuros, confirmando el óptimo rendimiento de la primera etapa de reacción (77.3%). La sustitución del grupo

bromuro por azida se confirmó por IR al observarse la presencia de la banda correspondiente a los grupos azida (2100 cm^{-1}) (Figura 3.26).

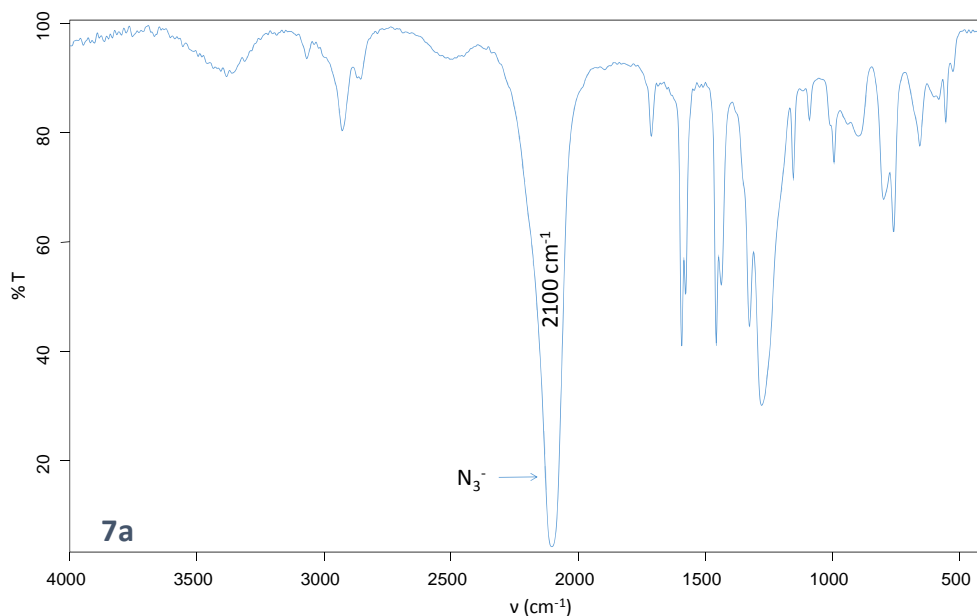


Figura 3.26. Espectro infrarrojo del intermedio de reacción **7a** donde se refleja la presencia del grupo azida en la molécula.

A continuación, y como etapa final, se llevó a cabo una hidrogenación catalítica, empleando paladio soportado sobre carbón como catalizador y atmósfera de H₂ (3 atm) para obtener el ligando final **7**, en este caso bajo condiciones más energéticas que las descritas anteriormente.

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN de ambos compuestos (Figura 3.27) son muy similares ya que los grupos azida y amino provocan desplazamientos químicos idénticos tanto en los hidrógenos de los carbonos enlazados a ellos (**7a**: 4.51ppm y **7**: 4.52 ppm) como en dichos átomos de carbono (**7a**: 156.21 ppm y **7**: 156.19 ppm). Las señales de los grupos amino no se observaron debido al intercambio con deuterio. El espectro de

masas pone de manifiesto claramente que la reacción de obtención de **7** ha tenido lugar de manera satisfactoria (véase *Anexo III*).

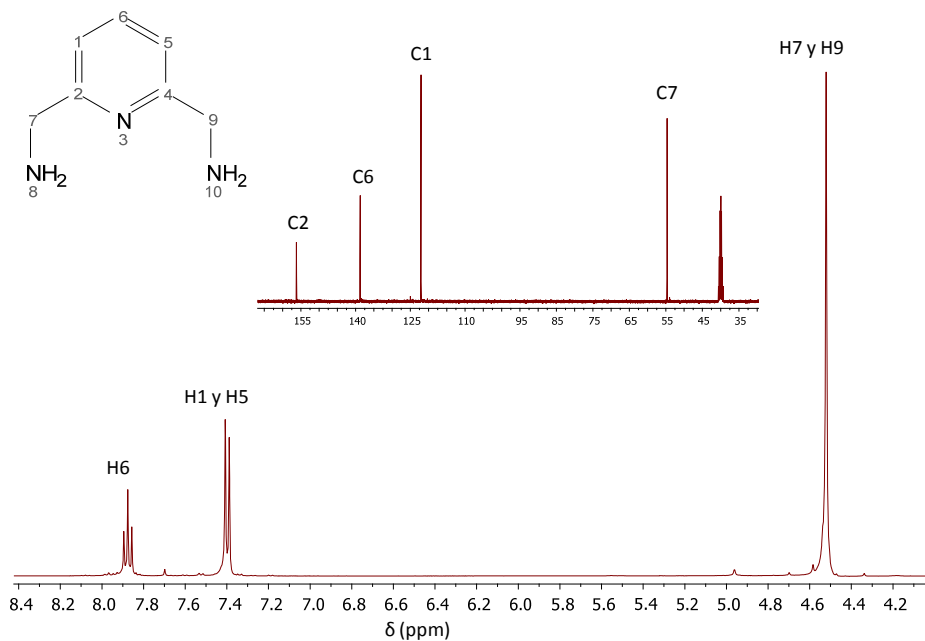


Figura 3.27. Espectros de ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) y ^{13}C -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) para el producto piridín-2,6-diildimetamina, **7**.

Bibliografía

- [1] M. Herring, L. Henling, J. a Labinger, J. E. Bercaw, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 851–853.
- [2] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [3] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364–12367.
- [4] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 13–25.
- [5] D. Griffith, A. Chopra, H. Müller-Bunz, C. J. Marmion, *Dalton Trans.* **2008**, *2*, 6933–6939.
- [6] N. E. Vollhardt, K.P.C., Schore, *Química Orgánica. Estructura Y Función*, Ediciones Omega, S.A., **2000**.
- [7] H. Nalwa, *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices - Volume 8 -*, Academic Press, Burlington, **2001**.
- [8] S. A. F. Al-Said, R. Hassanien, J. Hannant, M. A. Galindo, S. Pruneanu, A. R. Pike, A. Houlton, B. R. Horrocks, *Electrochem. commun.* **2009**, *11*, 550–553.
- [9] N. Delsuc, F. Godde, B. Kauffmann, J.-M. Leger, I. Huc, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11348–11349.
- [10] H. Staudinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta* **1919**, *2*, 635–646.
- [11] N. P. Peet, L. E. Baugh, S. Sunder, J. E. Lewis, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 298–302.
- [12] F. Lions, K. V Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 2733–2738.
- [13] N. Delsuc, J.-M. Leger, S. Massip, I. Huc, *Angew. Chemie, Int. Ed.* **2007**, *46*, 214–217.
- [14] P. Roquette, C. Koenig, O. Huebner, A. Wagner, E. Kaifer, M. Enders, H.-J. Himmel, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, 4770–4782.

- [15] K. Shibatomi, *Preparation of Optically Active 2,6-Bis(aminomethyl)pyridines and Asymmetric Reactions with Their Metal Complex Catalysts.*, **2008**.



Capítulo IV

Síntesis y
caracterización de los
complejos primarios



En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de los complejos primarios constituidos por los ligandos orgánicos sintetizados en el Capítulo III y de los iones metálicos de paladio (II), platino (II) y/o cobre (II).

El objetivo de dicha síntesis consiste en obtener complejos metálicos con capacidad para formar, simultáneamente, enlaces de coordinación y enlaces de hidrógeno complementarios a las nucleobases constituyentes del ADN. Este tipo de complejos se describirán en el Capítulo VI.

4.1 Síntesis y caracterización de complejos primarios de Pd(II), Pt(II) y Cu(II) con ligandos hidroxo-hidroxo

Los complejos primarios obtenidos a partir de ligandos hidroxo-hidroxo se sintetizaron con el objetivo de estudiar su interacción frente a nucleobases modelo complementarias, derivadas de la adenina (A).

Para ello, en primer lugar se obtuvieron complejos con ligandos procedentes del ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**), capaz de actuar como ligando tridentado a través de los átomos N1, O1 y O5,^[1-5] y cuyos grupos carboxilato poseen átomos de oxígeno capaces de participar como grupos aceptores en la formación de enlaces de hidrógeno con el grupo amino de la nucleobase adenina (Figura 4.1).

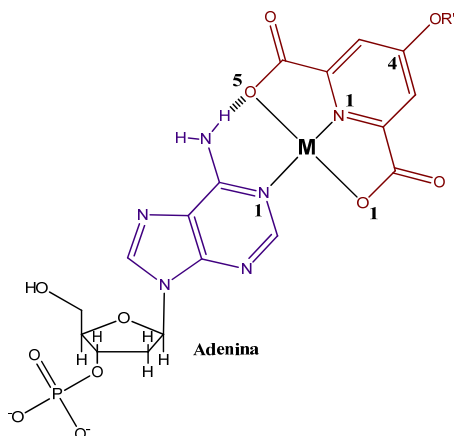


Figura 4.1. Esquema de interacción de un complejo metálico basado en un *ligando hidroxilo-hidroxilo* y la *adenina*.

Asimismo, como ya se describió en el Capítulo III, el grupo hidroxilo en posición 4 permite su modificación química y, por lo tanto, el ligando **cheld** puede ser programado para portar funcionalización específica.

La elección de iones metálicos, tales como Pd(II) o Pt(II), responde a la geometría plano-cuadrada que ofrece su entorno de coordinación, a la alta afinidad de estos metales por átomo de nitrógeno donadores localizados en posiciones específicas de las bases nitrogenadas, a la robustez de los enlaces de coordinación formados y al control de su reactividad, a través del uso de ciertos grupos de coordinación, con el ión metálico.^[6]

Sin embargo, el Pd(II) y el Pt(II) tienen un radio iónico que puede dificultar la obtención de estos sistemas,^[7] además de unas cinéticas de reacción más moderadas (especialmente en el caso del Pt(II)) por lo que se han sintetizado también complejos con Cu(II), cuyos enlaces de coordinación son más lábiles, su cinética de reacción es más elevada y además permite entornos de coordinación más variados.

4.1.1. [Pd(cheld)(CH₃CN)], **cheldPd**

El complejo **cheldPd** se obtiene mediante una reacción sencilla entre el complejo PdCl₂(CH₃CN)₂ y el ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**) (Figura 4.2).

El complejo de partida PdCl₂(CH₃CN) se obtuvo *in situ* a partir de una reacción a reflujo de PdCl₂ en acetonitrilo durante 30 minutos. A continuación, la disolución se filtró para eliminar posibles impurezas insolubles, y el ligando **cheld** se adicionó sobre el complejo metálico. Posteriormente, la mezcla se mantuvo agitando a 60°C para favorecer la coordinación del ión metálico Pd(II) al ligando **cheld**, dando lugar al complejo plano-cuadrado **cheldPd**.

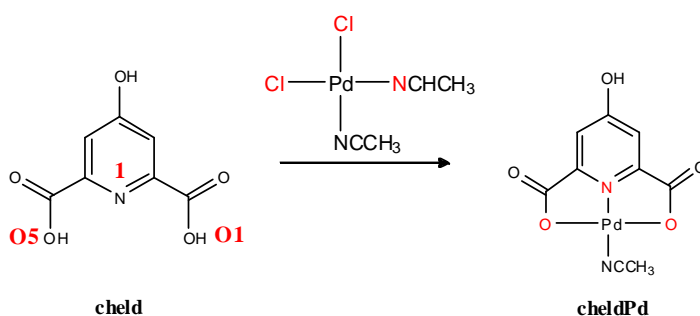


Figura 4.2. Esquema de síntesis del complejo **cheldPd**.

El complejo **cheldPd** se caracterizó en estado sólido por espectroscopia IR y AE. En el espectro IR (Figura 4.3) se observa la desaparición de las bandas correspondientes a los grupos OH del ligando **cheld** (3606 cm⁻¹ y 3445 cm⁻¹) como resultado de su coordinación al ión metálico Pd(II). Con respecto a las bandas de la vibración de tensión de los grupos carbonilo del ligando, afectados por esta coordinación debido a su proximidad a los átomos O1 y O5 del ligando, se observan ligeros desplazamientos de tipo batocrómico en la banda centrada a 1702 cm⁻¹ ($\Delta\nu=18$ cm⁻¹) y de tipo hipsocrómico en la banda centrada a 1617 cm⁻¹ ($\Delta\nu=11$ cm⁻¹). Aunque más alejada de los átomos que intervienen en la coordinación al átomo metálico, la banda correspondiente a la

vibración de tensión del átomo de carbono unido al grupo –OH en posición 4 sofre, a su vez, un desplazamiento batocrómico influenciado por la resonancia del anillo piridínico (1130 cm^{-1} , $\Delta\nu= 45\text{ cm}^{-1}$).

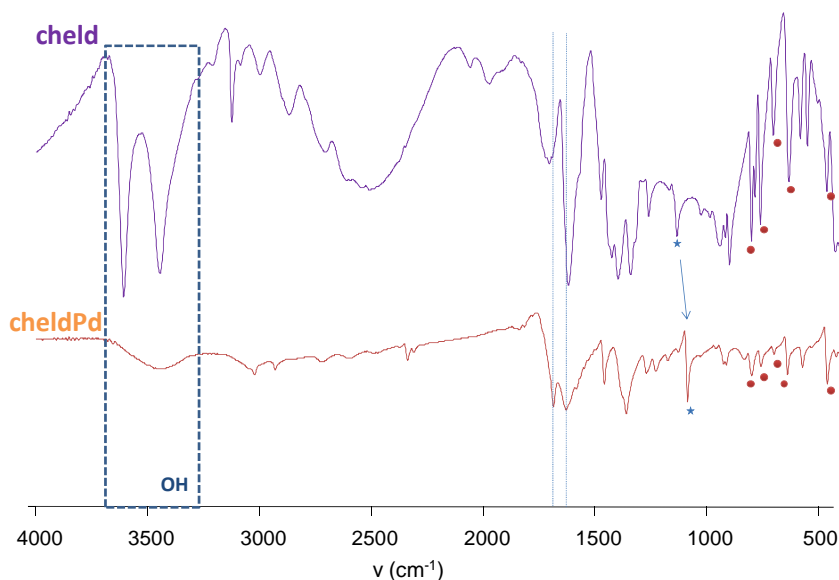


Figura 4.3. Espectros IR en transmitancia del ligando **cheld** (morado) y del complejo **cheldPd** (naranja), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

Los datos obtenidos por AE están en muy buena concordancia con los calculados teóricamente para este complejo (Tabla 4.I).

Tabla 4.I. AE del complejo **cheldPd**.

Pd(C₇H₃NO₅)(CH₃CN)		
	AE _{obtenido}	AE _{calculado}
% N	8.51	8.53
% C	32.65	32.92
% H	1.96	1.83

La caracterización en disolución del complejo **cheldPd** se llevó a cabo mediante espectroscopia de ^1H -RMN. En primer lugar, si comparamos el espectro del ligando **cheld** con el espectro de ^1H -RMN (Figura 4.4) del complejo **cheldPd**, se observa que al coordinarse el ligando al ión Pd(II) tiene lugar un desplazamiento bastante drástico de la señal correspondiente a los protones H3 y H5 ($\Delta\delta=0.51$ ppm), provocado por la coordinación del ligando al átomo metálico. Además, el espectro ^1H -RMN registrado a temperatura ambiente, muestra tres señales para los protones aromáticos H3 y H5, cuando sólo se esperarían observar un único singlete debido a la simetría de la molécula. Cuando el espectro se registra a una temperatura de 75°C , se observa una única señal (7.05 ppm) que integra por dos protones. Finalmente, cuando se vuelve a temperatura ambiente, aparecen de nuevo las tres señales observadas en el primer espectro. En todos los casos se observa una señal a 2.03 ppm correspondiente a una molécula de acetonitrilo coordinada al ion metálico.

Este fenómeno puede justificarse por la formación de una especie dimérica del complejo de Pd(II) en disolución, en la que una de las posiciones de coordinación del Pd se encuentra ocupada por el átomo de oxígeno carboxílico de otra unidad de complejo (Figura 4.4). La formación de este tipo de complejos a temperatura ambiente en disolución es común en metales como el Pd, siendo posible encontrar otros casos similares en bibliografía^[1].

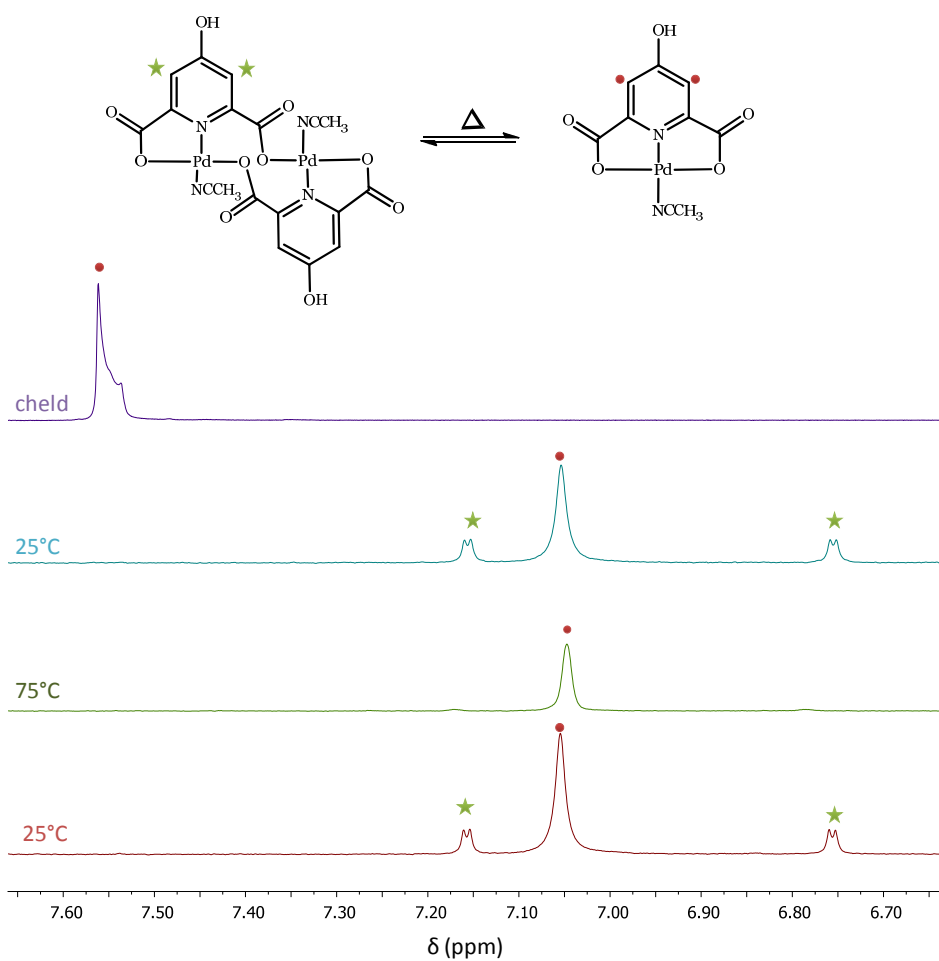


Figura 4.4. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO- d_6) del ligando **cheld** (arriba) y complejo **cheldPd** a distinta temperatura.

4.1.2. [Pd(1)Cl], **1Pd**

El objetivo de la síntesis de **1Pd** fue la obtención de un complejo que demostrara la posibilidad de obtener este tipo de compuestos con el ácido 4-hidroxipiridín-2,6-dicarboxílico (**cheld**) previamente funcionalizado, en posición 4, sin que esto afectara a la funcionalidad de este sistema para actuar como ligando tridentado.

La síntesis se realizó siguiendo un procedimiento similar al descrito para el complejo **cheldPd** (Figura 4.6).

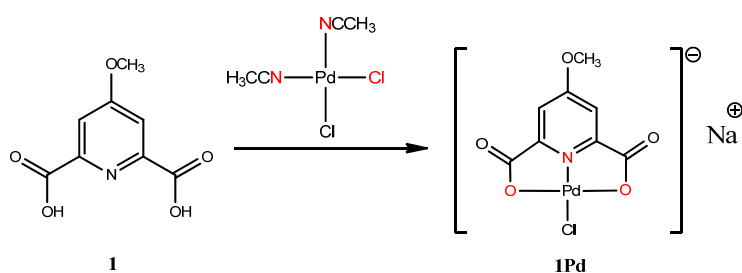


Figura 4.6. Esquema de síntesis del complejo **1Pd**.

Los estudios de caracterización en estado sólido del complejo **1Pd**, llevados a cabo por espectroscopia de IR (Figura 4.7), muestran la desaparición de las bandas correspondientes a los grupos hidroxilo carboxílico de la molécula de partida (3560 cm^{-1}), así como el desplazamiento a menor frecuencia de la banda correspondiente al grupo -CO- (1722 cm^{-1} , $\Delta\nu=107\text{ cm}^{-1}$) y el desplazamiento a mayor frecuencia de algunas de las bandas correspondientes a la huella dactilar del ligando (1312 cm^{-1} y 1234 cm^{-1} , $\Delta\nu=86$ y 95 cm^{-1}); por otra parte, muchas de las bandas correspondientes a la huella dactilar del ligando, indicadas con círculos en la figura, apenas sufren variación.

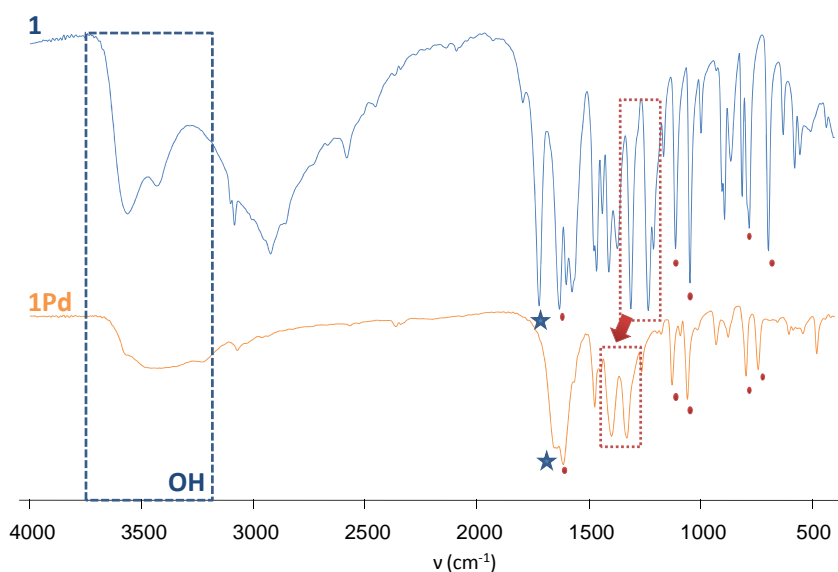


Figura 4.7. Espectros IR en transmitancia del ligando **1** (azul) y del complejo **1Pd** (naranja), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como señales que permanecen invariables (★).

A diferencia de los encontrado para el complejo análogo **cheldPd**, en el caso del complejo **1Pd** los datos obtenidos por AE confirman la presencia de un átomo de cloro y sodio, y la ausencia de una molécula de acetonitrilo (véase Tabla 4.II).

Tabla 4.II. AE del complejo **1Pd**.

[Pd(C₈H₅NO₅)Cl](Na)(H₂O)_{2.1}		
	AE _{obtenido}	AE _{calculado}
% N	3.78	3.52
% C	24.13	24.15
% H	3.13	2.33

Los estudios en disolución del complejo **1Pd**, realizados mediante espectroscopia de ¹H-RMN y ¹³C-RMN, muestran la ausencia de una molécula de acetonitrilo en el

entorno de coordinación del ión metálico. También se observan dos únicas señales a 7.25 y 3.99 ppm, correspondientes a los protones aromáticos (H3, H5) y al grupo metilo en posición 4, respectivamente. Este resultado pone de manifiesto la existencia del complejo **1Pd** como una especie monomérica a temperatura ambiente, y no como una especie dimérica, tal y como se ha observado en el caso del complejo **cheldPd** (Figura 4.8).

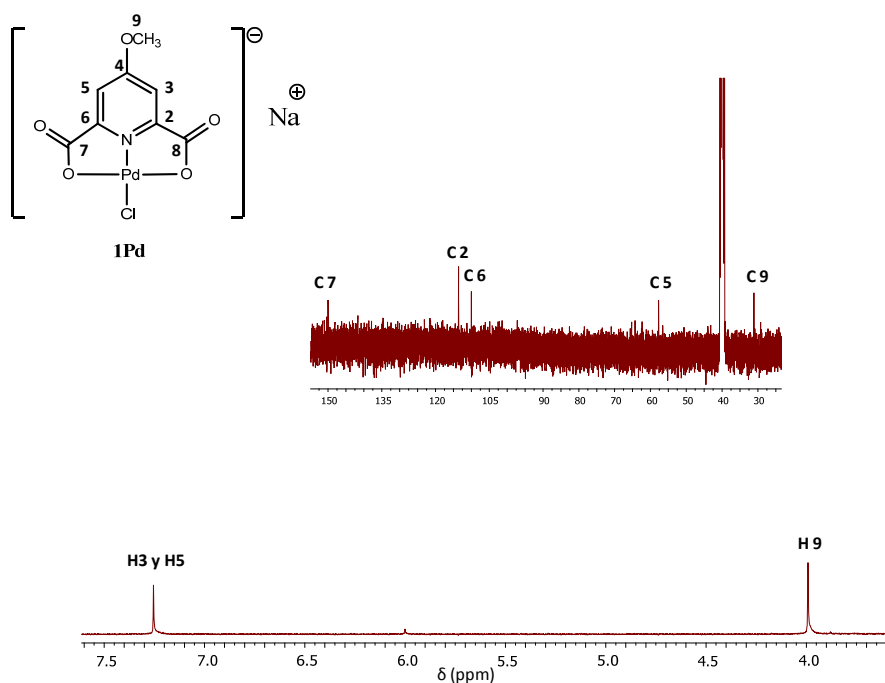


Figura 4.8. Espectros de ^1H -RMN (DMSO-d_6) y ^{13}C -RMN (DMSO-d_6) del complejo **1Pd**.

Para intentar favorecer la coordinación del paladio a un mejor grupo saliente, como el acetonitrilo, la reacción se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento pero en condiciones más enérgicas (calentando a 60°C y manteniendo la agitación durante 4 horas); sin embargo, los análisis realizados al producto final confirmaron la obtención del mismo complejo.

4.1.3. $[\text{Pd}(\text{2})(\text{H}_2\text{O})]$, **2Pd**

El éxito de la obtención del complejo **1Pd** incentivó la preparación de complejos metálicos derivados del ligando **cheld** con funcionalización más compleja. Para ello, se utilizó el ligando **2**, derivado de **cheld** y funcionalizado en posición 4, con el monómero, 2-(tiofen-2-il)-1H-pirrolo (**tp**), precursor de un polímero conductor orgánico.^[8]

La síntesis del complejo **2Pd** se llevó a cabo mediante una reacción sencilla entre el $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$ y el ligando **2** (Figura 4.9).

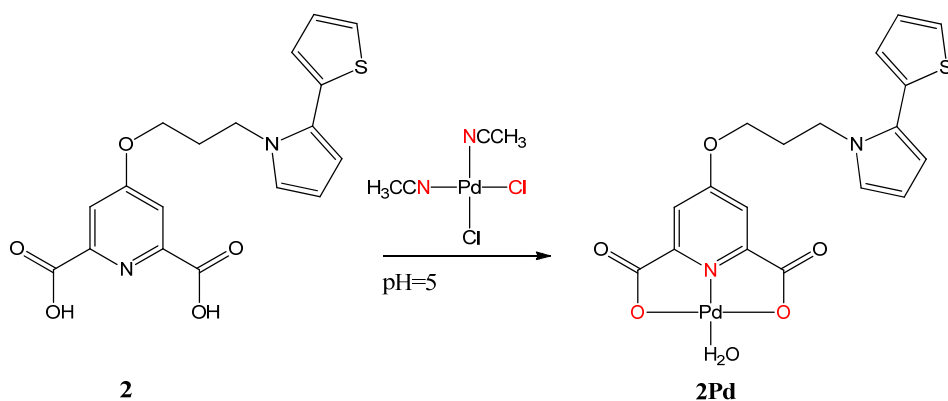


Figura 4.9. Esquema de síntesis del complejo **2Pd**.

El complejo de partida $\text{PdCl}_2(\text{CH}_3\text{CN})_2$, al igual que en los casos anteriores, se obtiene *in situ* al mantener a reflujo PdCl_2 en acetonitrilo durante 30 minutos. Tras filtrar la disolución para eliminar las impurezas insolubles, se adiciona gota a gota el ligando **2** sobre el complejo, y la reacción se mantiene agitando a 60°C , para dar lugar al complejo plano-cuadrado **2Pd**.

La caracterización en estado sólido del complejo se realizó, en primer lugar, registrando los correspondientes AE e IR.

En el espectro IR (Figura 4.10) se observa la desaparición de la banda correspondiente a la vibración de tensión del $-\text{OH}$ de los grupos carboxilato del ligando

(3221 cm^{-1}) y la disminución en la intensidad de la banda correspondiente a las vibraciones de tensión de los grupos -C-N-C- (2921 cm^{-1}), lo que sugiere la coordinación del ligando al ión Pd(II) a través de estos grupos. El enlace de coordinación al grupo carboxílico es, a su vez, responsable del efecto hipsocrómico que sufre la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo que se desplaza de 1730 cm^{-1} a 1660 cm^{-1} (★). Finalmente, otro de los hechos que se observan en la figura es una severa modificación de las señales comprendidas entre 1500 y 1000 cm^{-1} con respecto al IR del ligando, lo que sugiere la coordinación del ligando al átomo metálico de forma tridentada afectando mediante resonancia a las principales vibraciones de tensión presentes en el anillo pirimidínico. Por último, la banda correspondiente a las vibraciones de tensión de los grupos -OH que se observa a 3419 cm^{-1} puede estar originada tanto por la coordinación de una molécula de agua al ión Pd(II) como por la presencia de una pequeña cantidad de agua en la muestra.

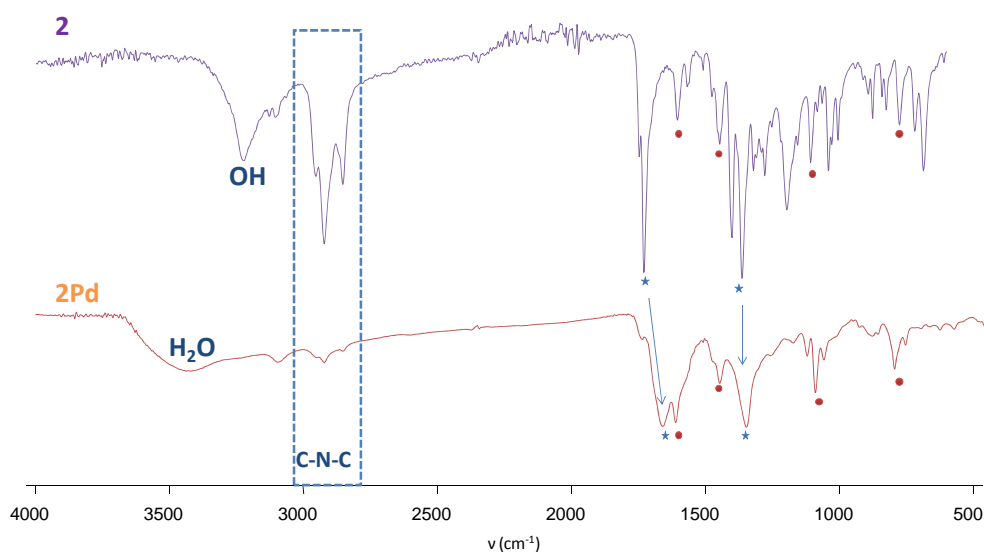


Figura 4.10. Espectros IR en transmitancia del ligando **2** (azul) y del complejo **2Pd** (naranja), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como señales que permanecen invariables (●).

En la tabla 4.III se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 4.III. AE del complejo **2Pd**.

[Pd(C₁₈H₁₄N₂O₅S)(H₂O)]·(H₂O)		
	A_Eobtenido	A_Ecalculado
% N	5.17	5.46
% C	42.04	42.15
% H	3.39	3.53
% S	5.24	6.25

La caracterización en disolución se llevó a cabo por ¹H-RMN (Figura 4.11). Si nos fijamos en el espectro del complejo **2Pd**, se pueden observar otras señales debido a impurezas presentes en la muestra, entre las que se incluye un exceso de ligando que no ha reaccionado con el ión Pd(II) para dar lugar al complejo. Sin embargo, al comparar los espectros del ligando **2** y el del complejo **2Pd** se puede observar que los protones H3 y H5 del anillo piridínico sufren un desplazamiento a campo alto ($\Delta\delta_{H3,H5}=0.38$ ppm) como consecuencia de la coordinación del ión de Pd(II) al ligando y de los efectos de resonancia presentes en el anillo.

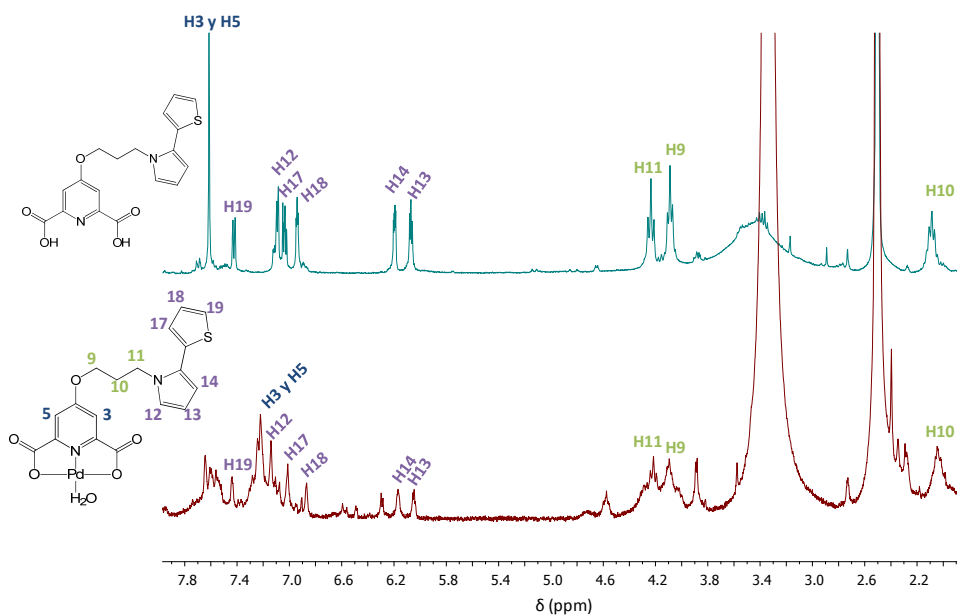


Figura 4.11. Espectro asignado de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del ligando **2** (arriba) y del complejo **2Pd** (abajo).

El resto de protones correspondientes al ligando **2**, aparecen en el espectro del complejo **2Pd** sufriendo leves desplazamientos, principalmente a campo alto en los protones del anillo pirrolo (véase Tabla 4.IV), como consecuencia de posibles interacciones supramoleculares en disolución y de los efectos de resonancia que se propagan a través de la estructura de la molécula de ligando.

Tabla 4.IV. Desplazamiento de los protones del ligando **2** y del complejo **2Pd**.

δ (ppm)	2	2Pd
H3 y H5 (s)	7.61	7.23
H19 (dd)	7.42	7.43
H12 (dd)	7.09	7.15
H17 (dd)	7.03	7.02
H18 (dd)	6.94	6.87
H14 (dd)	6.19	6.17
H13 (m)	6.07	6.05
H11 (t)	4.23	4.22
H9 (t)	4.09	4.09
H10 (dt)	2.08	2.04

4.1.4. $[\text{Pd}(\mathbf{3})_2\text{Cl}_2]$, **3Pd**

El ligando (4-propoxipiridina-2,6-dil)dimetanol (**3**), obtenido como subproducto de reacción durante la reducción de los dos grupos carboxílicos a hidroxilos del intermedio de reacción dietil-4-propoxipirimidin-2,6-dicarboxilato (**4a**), se utilizó para la obtención del complejo de paladio **3Pd**.

La síntesis de **3Pd** se llevó a cabo en una disolución de acetonitrilo y agua usando Na_2PdCl_4 y manteniendo la mezcla de reacción en agitación a 75°C durante 12 horas (Figura 4.12).

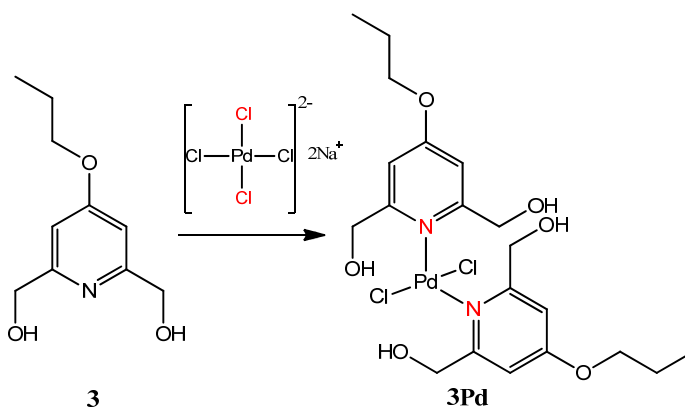


Figura 4.12. Esquema de síntesis del complejo **3Pd**.

Durante la reacción, en los posteriores procesos de cristalización por evaporación lenta del disolvente aparecieron precipitados muy escasos que se puede atribuir a la reducción del Pd(II), y que fueron imposibles de recuperar para su correcto análisis. Sin embargo, después de tres semanas aparecieron cristales romboédricos que permitieron la determinación estructural del complejo por DRX.

La caracterización en estado sólido del complejo se realizó, en primer lugar, registrando los correspondientes AE e IR del complejo.

En la figura 4.13 se ha realizado una comparación entre los espectros IR del ligando **3** y el complejo **3Pd**, observándose que las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los grupos hidroxilo (zona de 3000-3500 cm^{-1}) no sufren ninguna variación significativa a excepción de la aparición de un leve hombro correspondiente al agua presente en la muestra. Se observa, sin embargo, un aumento de la intensidad de la banda que aparece a 1744 cm^{-1} y la aparición de una nueva banda a 1226 cm^{-1} , sin que las señales correspondientes a la huella dactilar del ligando y al complejo varíen sustancialmente.

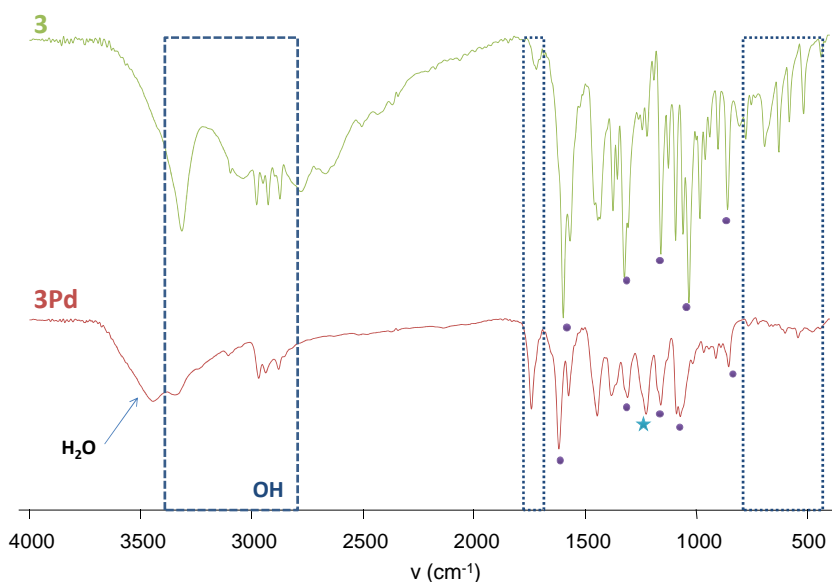


Figura 4.13. Espectros IR en transmitancia del ligando **3** (verde) y del complejo **3Pd** (rojo) donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

En la tabla 4.V se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta del complejo **3Pd** tras realizar su AE.

Tabla 4.V. AE del complejo 3Pd.

$[\text{Pd}(\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}_3)_2\text{Cl}_2](\text{H}_2\text{O})_{2.5}$		
	$\text{AE}_{\text{obtenido}}$	$\text{AE}_{\text{calculado}}$
% N	5.39	4.54
% C	38.84	38.94
% H	6.09	5.71

La caracterización en disolución del complejo se realizó mediante ^1H -RMN. En el espectro recogido en la figura 4.14 se puede observar una comparación entre los espectros correspondientes al ligando **3** y al complejo **3Pd**.

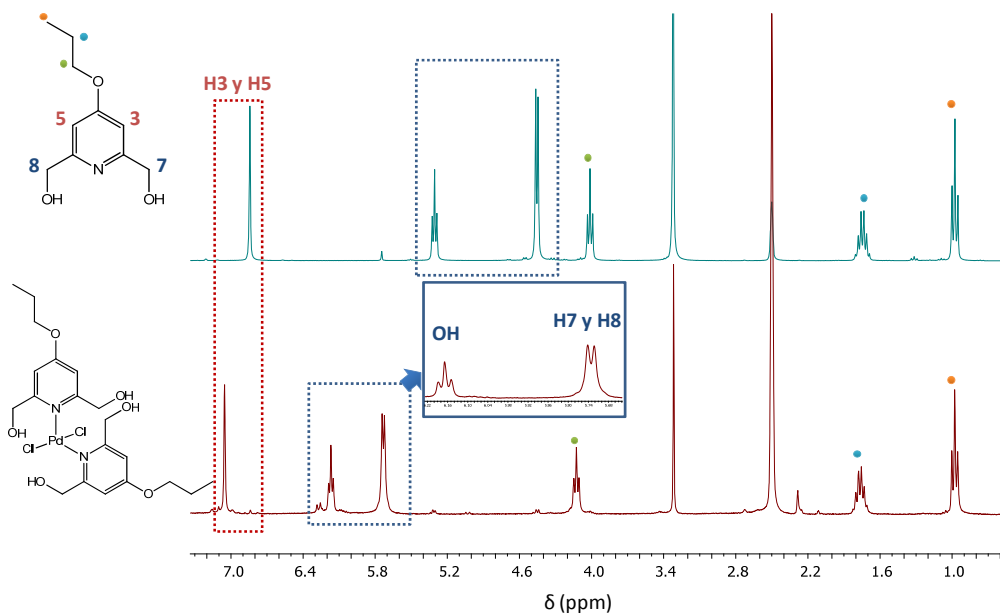


Figura 4.14. Espectro asignado de ^1H -RMN (DMSO-d_6) del ligando **3** (arriba) y del complejo **3Pd** (abajo).

En el espectro se puede observar un desplazamiento significativo a campo bajo de las señales correspondientes a los grupos -OH (6.17 ppm, $\Delta\delta=0.86$ ppm) y $\text{-CH}_2\text{-}$ (5.13 ppm, $\Delta\delta=0.68$ ppm) del ligando. Además, la señal correspondiente a los grupos hidroxilo aparece como un triplete que integra por cuatro protones; este hecho, junto al doblete correspondiente a los $\text{-CH}_2\text{-}$, confirma que esos grupos hidroxilo no se encuentran coordinados al átomo de paladio. La señal correspondiente a los cuatro protones del anillo aromático aparece como un único singlete, que sufre un ligero desplazamiento a campo bajo (7.05 ppm, $\Delta\delta=0.21$ ppm), mientras que las correspondientes al grupo propoxi enlazado al átomo de carbono en posición 4 no se ven afectadas por la coordinación del ligando al átomo metálico, apareciendo como triplete (4.13 ppm), multiplete (1.77 ppm) y triplete (0.98 ppm) según se aleja la cadena del átomo de oxígeno.

La determinación estructural de **3Pd** permitió confirmar las conclusiones obtenidas tras los estudios previos. Tal y como se puede observar en la figura 4.15, el complejo **3Pd** es una especie monomérica $[\text{Pd}(\mathbf{3})_2\text{Cl}_2]$ con un entorno de coordinación PdN_2Cl_2 y geometría plano-cuadrada que cristaliza en el sistema monoclinico con un grupo espacial $\text{P2}_1/\text{c}$. Sus datos cristalográficos se recogen en el Anexo II. La unión de los ligandos al ión Pd(II) tiene lugar en forma monodentada a través de N1, siendo las distancias medias de enlace Pd-N1 de 2.035 Å y Pd-Cl1 de 2.303 Å. Estos ligandos se encuentran relacionados entre sí por un centro de inversión que explica la coplanaridad de los mismos al coordinarse al ión Pd(II) .

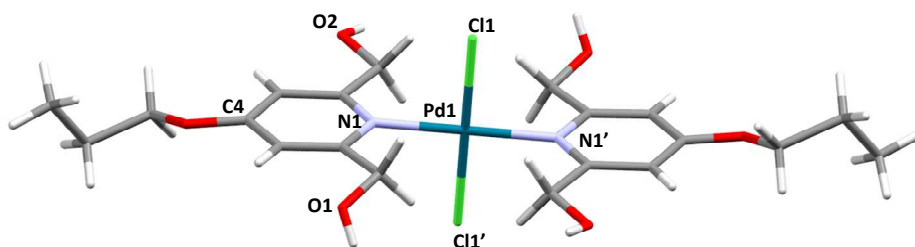


Figura 4.15. Entorno de coordinación del paladio en el complejo **3Pd**.

La estructura supramolecular del complejo queda estabilizada mediante la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares, donde el átomo O2 actúa como dador y aceptor según se enfrente a los átomos O1 y Cl (O1-H...O2 2.745 Å, O2-H...Cl 3.089 Å) (Figura 4.16, a). Como resultado, se originan cadenas simples que se propagan a lo largo del eje cristalino b donde no se observan interacciones π - π^* (Figura 4.16, b).

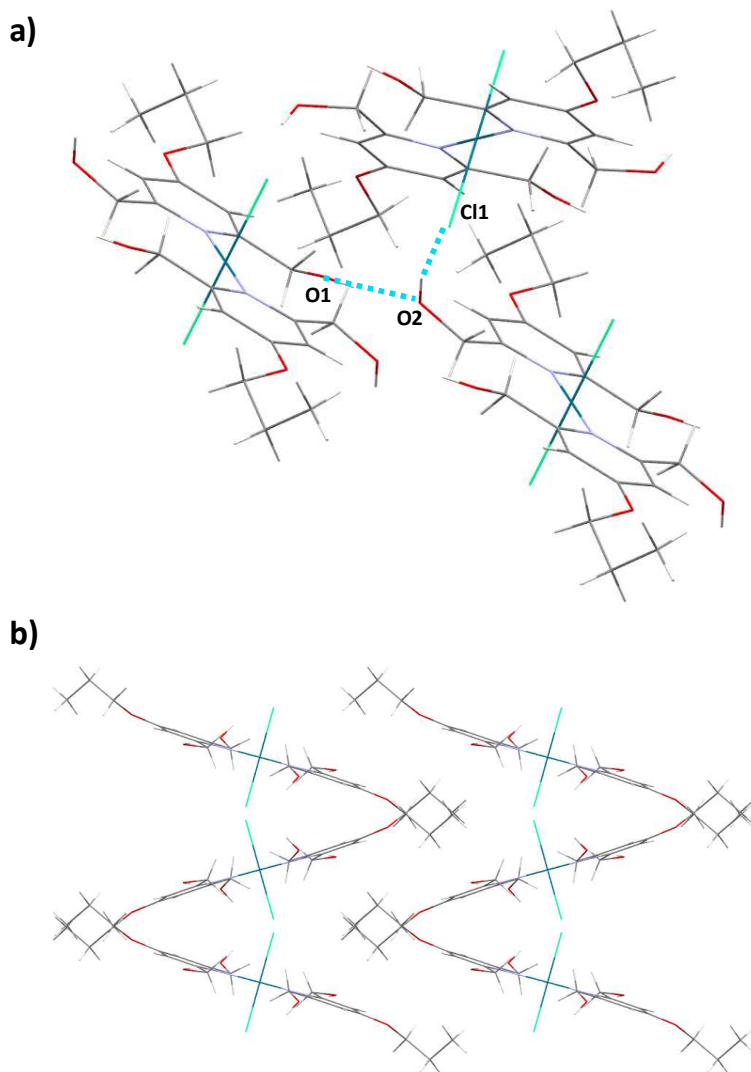


Figura 4.16. a) Enlaces de hidrógeno intermoleculares presentes en el complejo **3Pd** (línea punteada). b) Perspectiva del empaquetamiento cristalino del complejo **3Pd** visto a lo largo del eje c.

4.1.5. [Pt(**cheld**)(CH₃CN)], **cheldPt**

La síntesis del complejo **cheldPt** se llevó a cabo mediante la reacción entre el ligando **cheld** con K₂PtCl₄ en un medio de acetonitrilo:agua, manteniendo la reacción a reflujo durante 2 horas (Figura 4.17). Bajo estas condiciones, se observa un cambio de color en la disolución que pasa de rojo a amarillo, y la aparición de un precipitado, cuya caracterización puso de manifiesto la formación del complejo **cheldPt**.

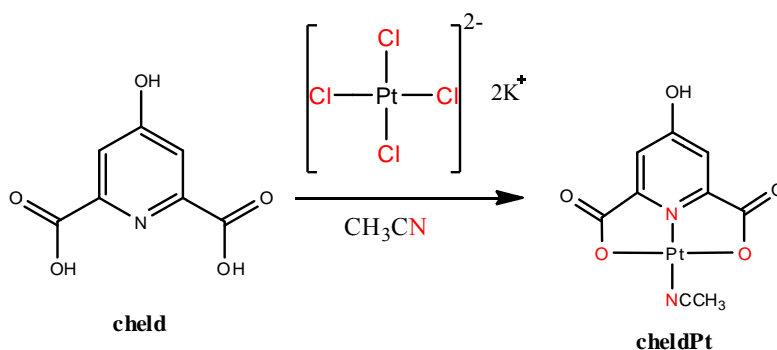


Figura 4.17. Esquema de síntesis del complejo **cheldPt**.

El complejo **cheldPt** se caracterizó en estado sólido mediante espectroscopia IR y AE.

El espectro IR (Figura 4.18) del complejo aislado muestra la desaparición de las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los grupos –OH (3606 y 3445 cm⁻¹) lo que sugiere la coordinación del átomo metálico al ligando a través de los átomos O1 y O5. Esta coordinación se ve reflejada a su vez en las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los grupos carbonilo que aparecen a 1397 y 1257 cm⁻¹ en el espectro IR del ligando **cheld**, observándose como convergen en una única banda fuerte a 1353 cm⁻¹ (★). De forma análoga al complejo **cheldPd**, la coordinación al átomo metálico a través del átomo de nitrógeno N1 del anillo implica un cambio en la resonancia del mismo, que se observa en el desplazamiento a menor frecuencia de la

banda correspondiente a la vibración de tensión del átomo de carbono unido al grupo hidroxilo en posición 4 del anillo (1130 cm^{-1} , $\Delta\nu=38\text{ cm}^{-1}$, ★).

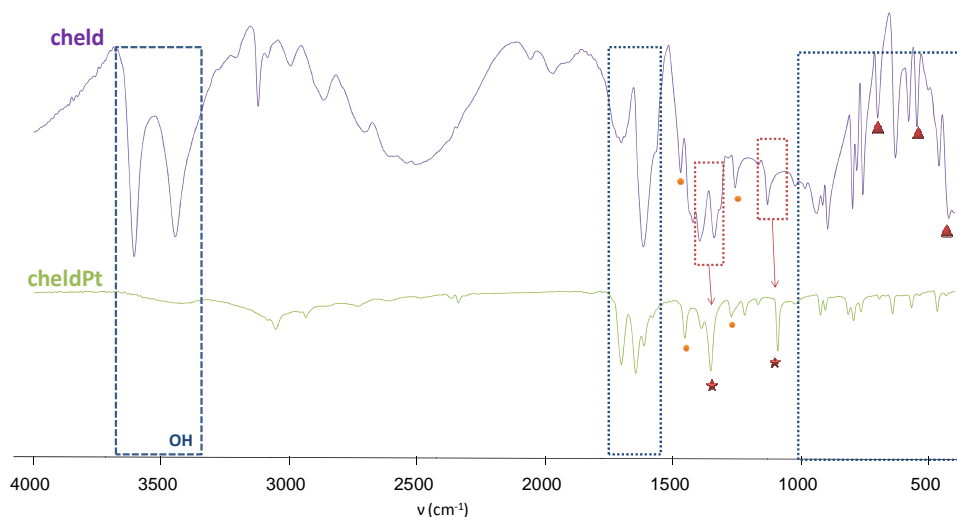


Figura 4.18. Espectros IR en transmitancia del ligando **cheld** (morado) y del complejo **cheldPt** (verde), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

Los datos de AE del complejo aislado están en perfecto acuerdo con los valores teóricos calculados para una composición del tipo $\text{Pt}(\text{C}_7\text{H}_3\text{NO}_5)(\text{CH}_3\text{CN})$ (véase Tabla 4.VI).

Tabla VI. AE del complejo **cheldPt**.

Pt(C ₇ H ₃ NO ₅)(CH ₃ CN)		
	AE _{obtenido}	AE _{calculado}
% N	6.29	6.71
% C	25.97	25.89
% H	1.53	1.43

La caracterización en disolución del complejo **cheldPt** se llevó a cabo mediante ^1H -RMN. El espectro ^1H -RMN del complejo (Figura 4.19) confirma la coordinación de una molécula de acetonitrilo al átomo de platino, ya que aparece un singlete a 2.07 ppm que integra por tres protones correspondientes al grupo $-\text{CH}_3$ del acetonitrilo. A su vez, se puede observar que la señal correspondiente a los dos protones del anillo piridínico sufre un desplazamiento a campo alto debido a la coordinación del ligando al ión Pt(II) (7.56 ppm, $\Delta\delta=0.3$ ppm). La presencia de agua en la muestra, tal y como recoge el espectro, no permite observar la señal correspondiente al grupo $-\text{OH}$ en posición 4 del ligando.

Al contrario de lo que se observa para el complejo **cheldPd**, en el complejo **cheldPt** no se observa el desdoblamiento de la señal correspondiente a los protones H3 y H5, siendo ambos protones magnéticamente equivalentes; este hecho sugiere que la coordinación del ligando al ión metálico no origina la formación de especies diméricas en el medio.

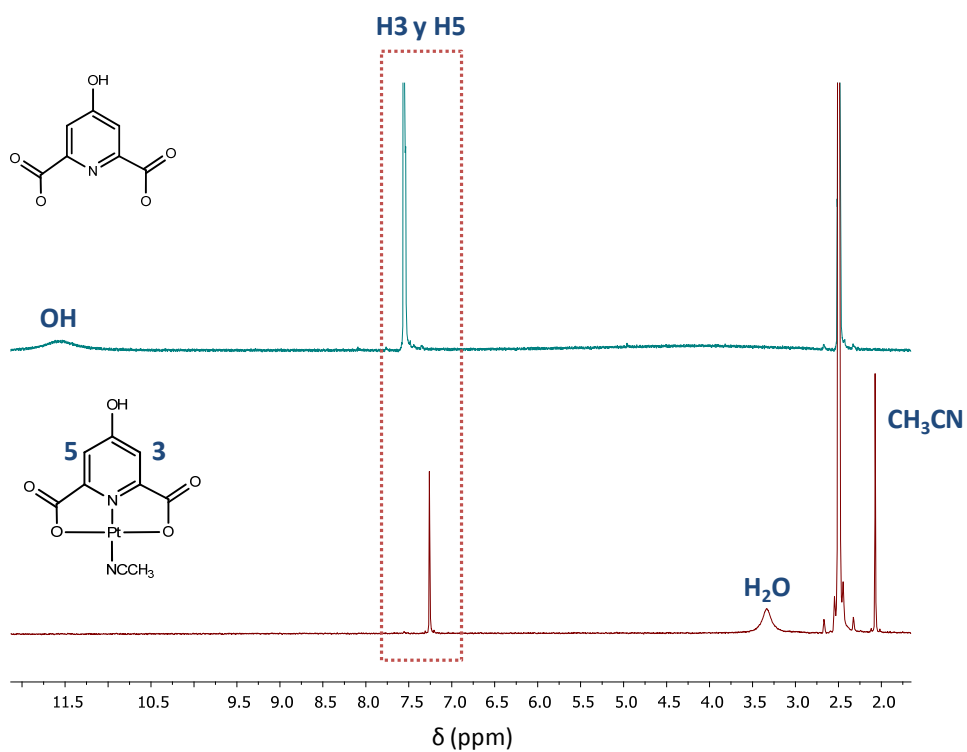


Figura 4.19. Espectro asignado de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) del ligando **cheld** (arriba) y del complejo **cheldPt** (abajo).

4.1.6. $K[Pt(1)Cl]$, **1Pt**

La síntesis de este complejo se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en literatura (Figura 4.20).^[9] La obtención de cristales permitió el estudio estructural del complejo mediante DRX.

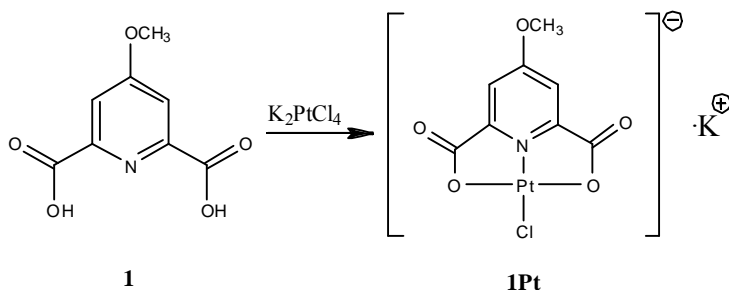


Figura 4.20. Esquema de síntesis del complejo **1Pt**.

El complejo **1Pt** se caracterizó en estado sólido mediante espectroscopia IR y AE.

Los estudios de caracterización en estado sólido del complejo **1Pt**, llevados a cabo por espectroscopia de IR (Figura 4.21), muestran la desaparición de las bandas correspondientes a los grupos hidroxilo carboxílico del ligando de partida (3560 cm^{-1}), así como el desplazamiento a menor frecuencia de la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo $-\text{CO}-$ (1722 cm^{-1} , $\Delta\nu=69 \text{ cm}^{-1}$), como consecuencia de la coordinación del ión Pt(II) al ligando mediante estos grupos. La zona comprendida entre 1250 y 1500 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión de los enlaces simples del anillo aromático, sufre modificaciones significativas que incluyen el desplazamiento y la desaparición de algunas bandas del ligando de partida debido a la coordinación del átomo metálico al átomo de nitrógeno presente en el mismo, así como efectos de resonancia. Por otra parte, muchas de las bandas correspondientes a la huella dactilar del ligando, e indicadas con círculos en la figura, apenas sufren variación.

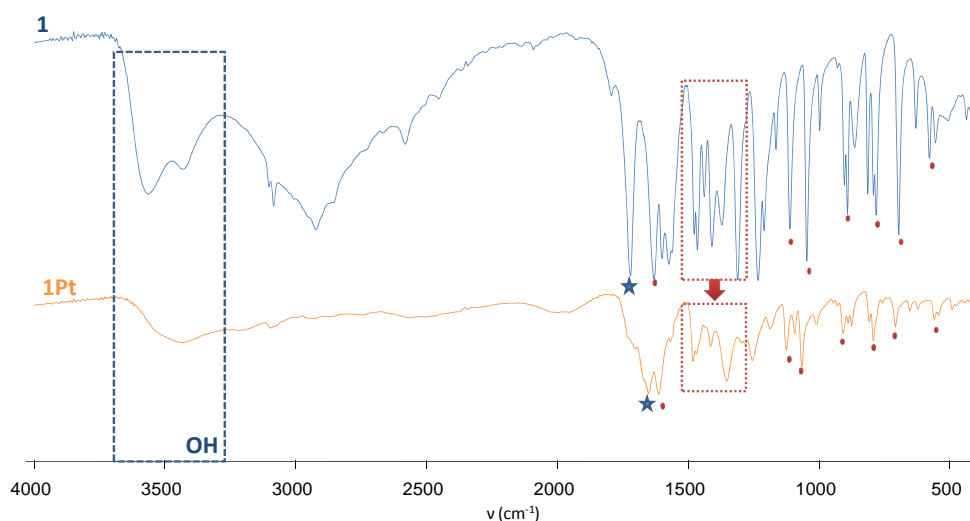


Figura X. Espectros IR en transmitancia del ligando **1** (azul) y del complejo **1Pt** (naranja), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como señales que permanecen invariables (●).

Los datos de AE del complejo aislado están en perfecto acuerdo con los valores teóricos calculados para una composición del tipo $K[Pt(C_8H_6NO_5)_2Cl]$ donde se obtendría el dímero del complejo (véase Tabla 4.VII).

Tabla 4.VII. AE del complejo **1Pt**.

$K[Pt(C_8H_6NO_5)_2Cl]$		
	$AE_{obtenido}$	$AE_{calculado}$
% N	4.57	4.23
% C	30.98	29.05
% H	2.99	1.83

Sin embargo, en la caracterización en disolución del complejo, realizada mediante 1H -RMN, no se observa la especie dimérica al aparecer en el espectro una única señal correspondiente a los protones H3 y H5 (Figura 4.22). Al realizar una comparación entre

el espectro correspondiente al ligando **1** y al complejo **1Pt**, donde la coordinación del ligando al ión Pt(II), se pone de manifiesto mediante el desplazamiento a campo bajo del singlete correspondiente a los protones H3 y H5 del anillo piridínico del ligando (7.36 ppm, $\Delta\delta=0.34$ ppm). Además, debido a los efectos estructurales de resonancia ya mencionados, la señal correspondiente al grupo $-\text{CH}_3$ en posición 4 también sufre un desplazamiento a campo bajo, aunque menos significativo (3.80 ppm, $\Delta\delta=0.18$ ppm).

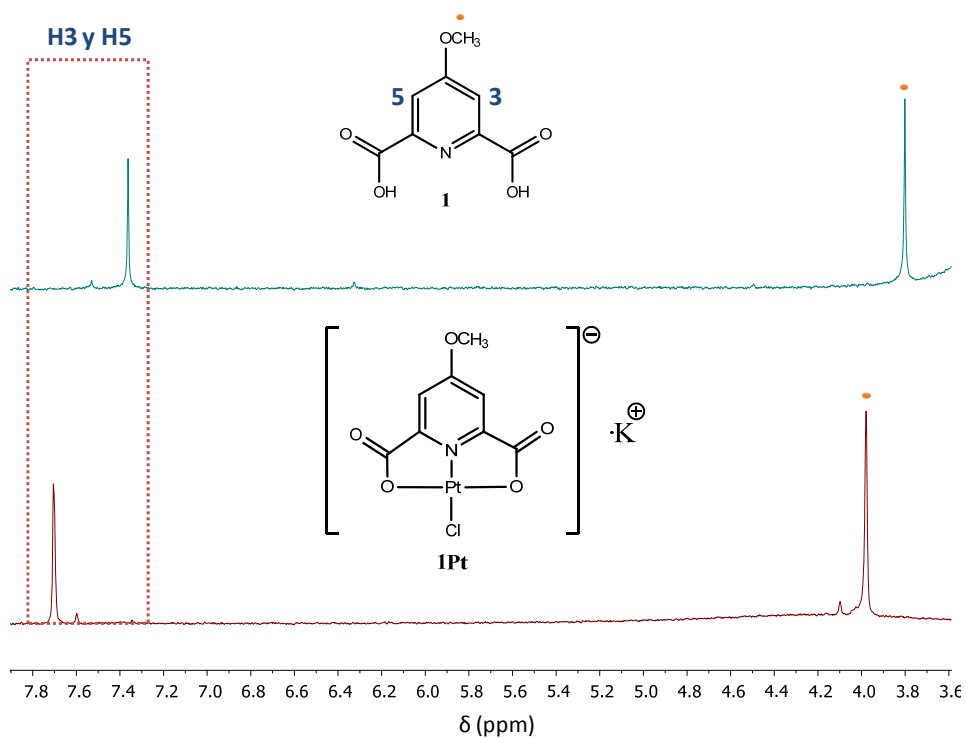


Figura 4.22. Espectro asignado de ^1H -RMN (DMSO- d_6) del ligando **1** (arriba) y del complejo **1Pt** (abajo).

El análisis mediante DRX del complejo permitió determinar su estructura. El complejo **1Pt** cristaliza en el sistema triclinico con un grupo espacial P-1. La unidad asimétrica está constituida por cuatro unidades de [Pt(**1**)Cl] cristalográficamente independientes, cuatro iones K^+ y dos moléculas de H_2O (Figura 4.23, a). El átomo de platino presenta una geometría plano-cuadrada donde el ligando **1** se encuentra coordinado de forma tridentada a través de los átomos N1 (1.903 Å), O1 (2.024 Å) y O5 (2.023 Å) cuyas distancias de enlace, citadas entre paréntesis, corresponden a una de las unidades cristalográficamente independientes siendo casi idénticas para las otras. En esta unidad, la distancia de enlace al átomo de cloro que ocupa la cuarta posición de coordinación es de 2.296 Å.

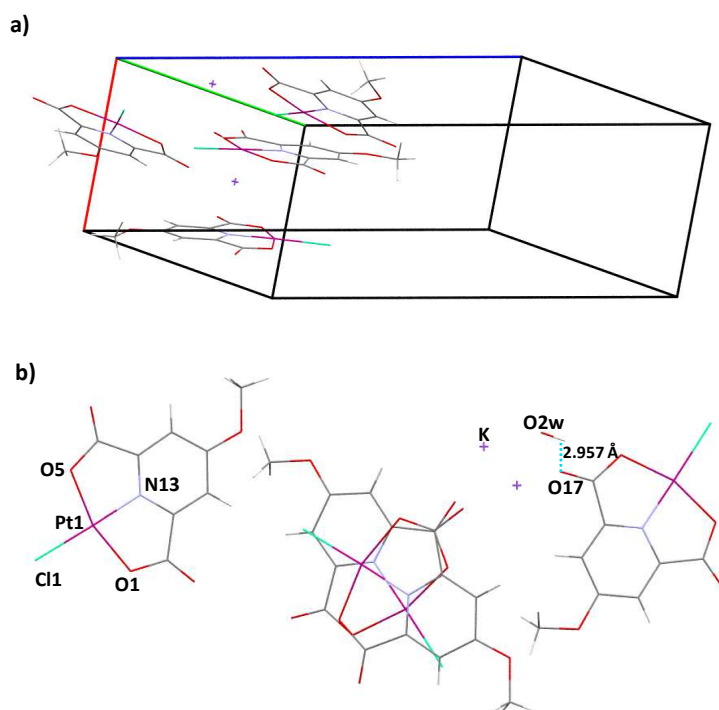


Figura 4.23. a) Celdilla unidad del complejo **1Pt**. b) Unidad asimétrica del complejo vista a lo largo del eje b. Entorno de coordinación y enlace de hidrógeno intermolecular.

La estructura supramolecular del complejo está estabilizada por la formación de un enlace de hidrógeno entre una de las unidades cristalográficamente independientes del complejo y una de las moléculas de agua que rodean el complejo (2.957 Å) (Figura 4.23, b). No se llega a observar interacciones de π - π^* entre los anillos de las unidades de complejo.

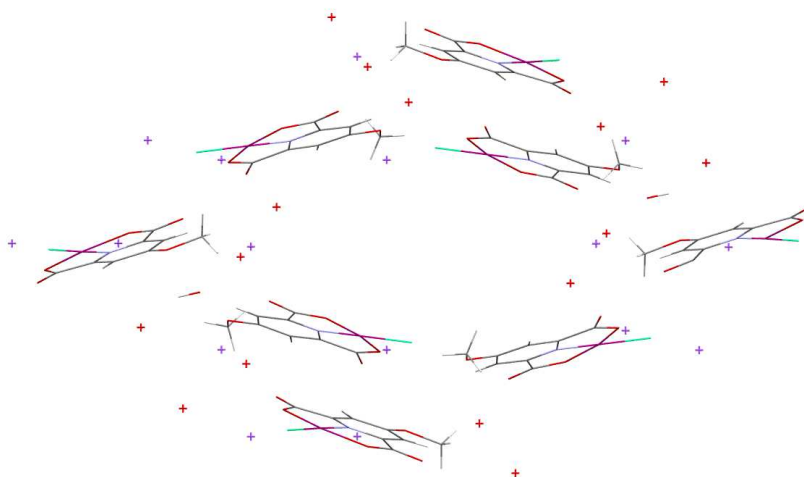


Figura 4.24. Estructura supramolecular del complejo **1Pt**.

4.1.7. $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})_2]$, **1Cu**

La obtención del complejo **1Cu** se lleva a cabo haciendo reaccionar $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ y el ligando **1** en medio acuoso a 90°C (Figura 4.25). En estas condiciones se obtiene un precipitado cristalino azul que, tras filtrarlo a vacío, fue caracterizado mediante análisis elemental y DRX, que confirmaron la obtención de $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})_2]$, **1Cu**.

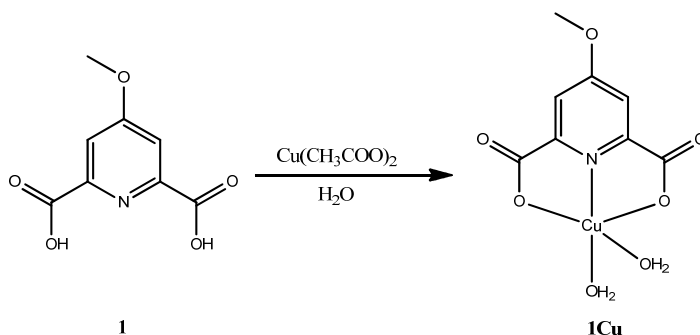


Figura. 4.25. Esquema de síntesis del complejo **1Cu**.

El complejo **1Cu** se ha caracterizado en estado sólido por espectroscopia IR y AE. En el espectro IR (Figura 4.26) se observa la desaparición de la banda correspondiente a los grupos OH del ligando **1** (3566 cm^{-1}) como resultado de su coordinación al ión metálico Pd(II). Con respecto a las bandas de la vibración de tensión de los grupos carbonilo del ligando, afectados por esta coordinación debido a su proximidad a los átomos O1 y O5 del ligando, se observa un severo desplazamiento batocrómico de la banda centrada a 1722 cm^{-1} ($\Delta\nu=77\text{ cm}^{-1}$). Al igual que ocurría para el complejo análogo de Pt(II), la zona comprendida entre 1200 y 1500 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión de los enlaces simples del anillo aromático, sufre modificaciones significativas como la desaparición (1312 y 1234 cm^{-1}) o, por el contrario, la intensificación de algunas bandas del ligando de partida (1374 cm^{-1}) debido a la coordinación del átomo metálico al átomo de nitrógeno del anillo piridínico.

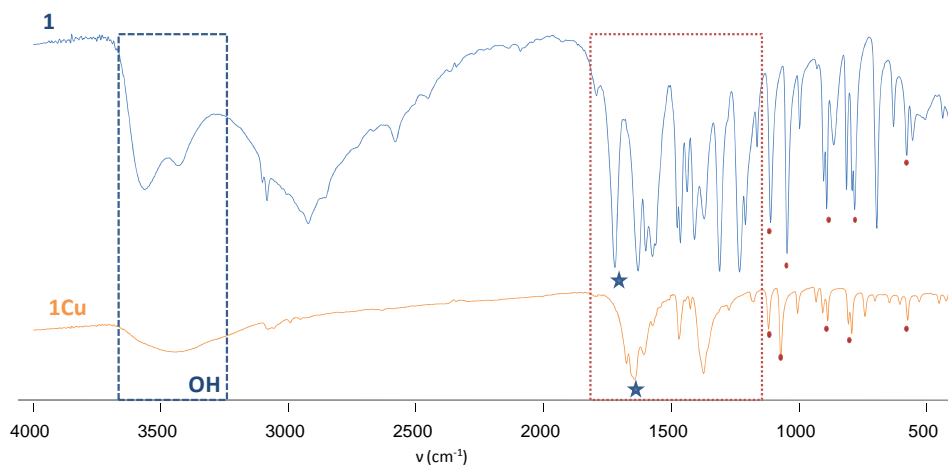


Figura 4.26. Espectros IR en transmitancia del ligando **1** (azul) y del complejo **1Cu** (naranja), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

En la tabla 4.VIII se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta del complejo **1Cu** tras realizar su AE.

Tabla 4.VIII. AE del complejo **1Cu**.

[Cu(C₈H₇NO₆)](H₂O)_{1.1}		
	A_Eobtenido	A_Ecalculado
% N	4.81	4.72
% C	32.55	32.40
% H	3.75	3.13

El complejo **1Cu** cristaliza en el sistema cristalino P₂₁/n, presentando una geometría de pirámide de base cuadrada. El ligando **1** se coordina al cobre de manera tridentada a través de los átomos N1 (Cu-N 1.900Å) del anillo piridínico y los átomos de oxígeno O1 y O5 (Cu-O1 2.056Å; Cu-O5 2.043Å) de los grupos carboxilatos; las dos restantes posiciones de coordinación del cobre se encuentran ocupadas por moléculas de agua, una en posición basal y otra en posición apical, de forma que el átomo de

cobre también se encuentra enlazado a los átomos O1w y O2w (Cu-O1w 2.174 Å; Cu-O2w 1.939 Å) (Figura 4.27, a). La molécula de agua en posición apical origina una estructura supramolecular gobernada por enlaces de hidrógeno con el átomo O1w como dador y los átomos O1 y O4 como aceptores (Figura 4.27, b).

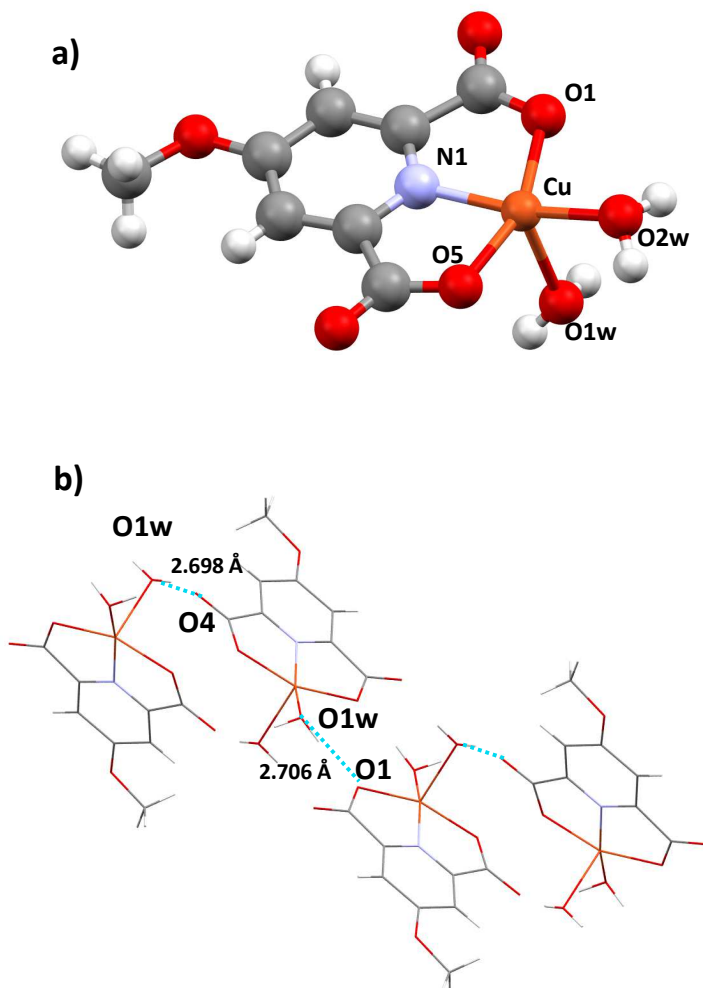


Figura 4.27. a) Entorno de coordinación del complejo **1Cu**; b) Enlaces de hidrógeno intramoleculares presentes en el complejo (línea punteada).

4.2 Síntesis y caracterización de complejos primarios de Pd(II) y Cu(II) con ligandos hidroxio-amino

El estudio, preparación y caracterización de complejos de coordinación de Pd(II), Pt(II) y Cu(II) obtenidos a partir de ligandos de tipo hidroxio-amino, capaces de actuar como ligandos tridentados a través de sus átomos donadores N1, O1 y N2, es fundamental para el posterior estudio de la interacción de dichos complejos frente a las nucleobases complementarias adenina, citosina y guanina; interacción que tendría lugar a través de la formación cooperativa de un enlace de coordinación entre el átomo metálico y la formación de enlaces de hidrógeno donde los grupos amino y carboxílico actuarían como dadores y aceptores respectivamente (Figura 4.28).

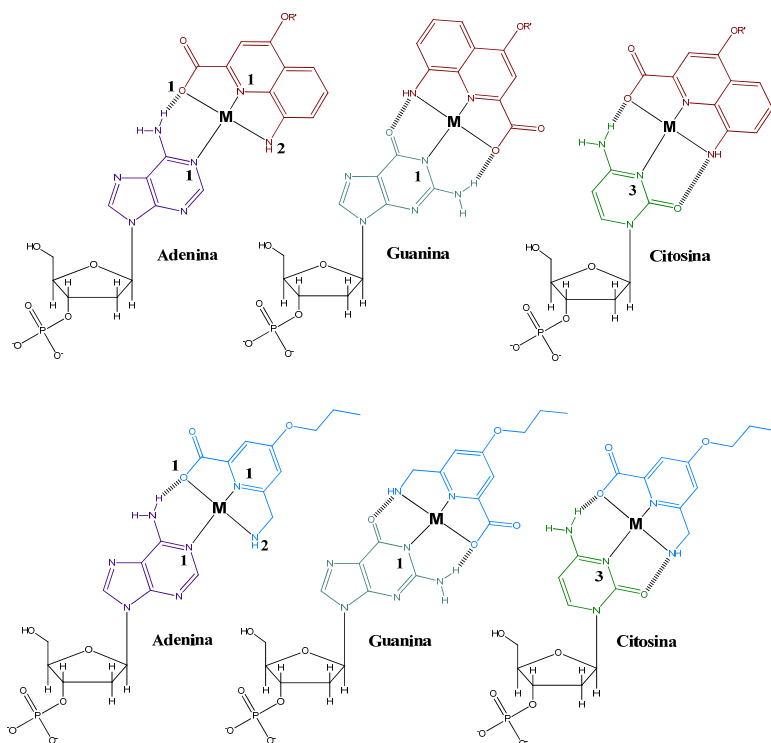


Figura 4.28. Esquema de interacción de complejos metálicos basado en ligandos hidroxio-amino con adenina, guanina y citosina.

4.2.1. $[\text{Pd}(\mathbf{5})(\text{NO}_3)]$, **5Pd**

Debido a las dificultades para disolver el ligando en un medio acuoso, el medio mayoritario en este caso fue acetonitrilo, por lo que el ligando **5** fue disuelto en una mezcla de acetonitrilo:agua (4:3) que se adicionó sobre una disolución acuosa de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. Para favorecer la coordinación del ligando al átomo metálico se ajustó el pH de la disolución a 4-5 y se mantuvo agitando a 50°C durante 2 horas. El precipitado de color marrón obtenido se filtró a vacío y se procedió a su caracterización tanto en estado sólido como en disolución (Figura 4.29).

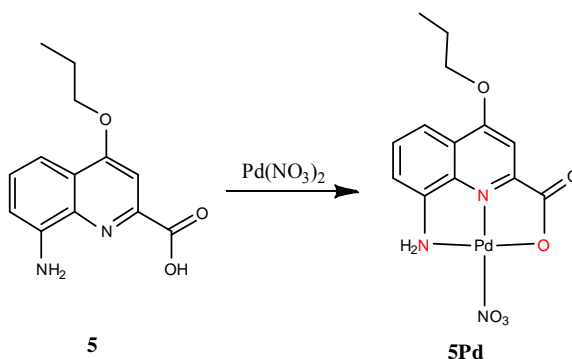


Figura 4.29. Esquema de síntesis del complejo **5Pd**.

El complejo **5Pd** se caracterizó en estado sólido mediante espectroscopia IR y en disolución mediante espectrometría de masas y espectroscopia RMN.

En el espectro de IR del complejo **5Pd** (Figura 4.30), podemos observar, al igual que en los complejos anteriores, la desaparición de la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo $-\text{OH}$ (3334 cm^{-1}) así como la de la correspondiente vibración de tensión del grupo $-\text{NH}_2$ (3140 cm^{-1}). Debido a la coordinación de ión $\text{Pd}(\text{II})$ al grupo $-\text{OH}$ del grupo carboxílico del ligando **5**, se observa un desplazamiento batocrómico de la banda correspondiente al grupo carbonilo ($\nu_{\text{C=O}}=1638 \rightarrow 1625\text{ cm}^{-1}$). Además, y como

hecho muy clarificador, aparecen en el espectro del complejo las bandas que originan las vibraciones de tensión del grupo NO_3^- coordinado al metal a 1423 y 1371 cm^{-1} .

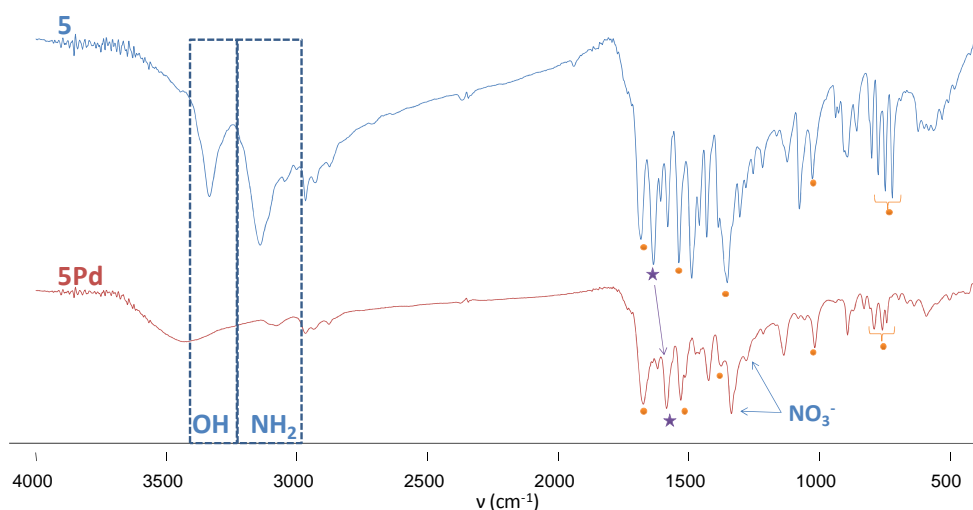


Figura 4.30. Espectros IR en transmitancia del ligando **5** (azul) y del complejo **5Pd** (rojo), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

La caracterización en disolución del complejo mediante espectrometría de masas (HRMS) confirma la coordinación del grupo nitrato al metal siendo el valor de la masa obtenida de 413.0502 para $[\text{Pd}(\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3)(\text{NO}_3)]$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$ calculada: 413.9917 , Anexo III).

También se llevó a cabo la caracterización del complejo mediante resonancia magnética nuclear (^1H -RMN, Figura 4.31). La comparación de este espectro con el registrado para el ligando **5** muestra un gran desplazamiento a campo bajo de los protones H5, H6 y H7 del anillo quinoleínico (véase Tabla 4.IX). El protón del grupo $-\text{OH}$ no se debería observar debido a la formación del enlace de coordinación con el átomo de paladio, sin embargo, la presencia de agua en la muestra evita que podamos

comprobarlo. Este hecho evita también que observemos la señal correspondiente a los protones del grupo amino.

Tabla 4.IX. Desplazamiento de los protones del anillo quinoleínico de **5** y **5Pd**.

δ (ppm)	5	5Pd
H3 (s)	7.48	7.50
H5 (d)	6.89	8.67
H6 (t)	7.38	7.98
H7 (d)	7.24	8.81

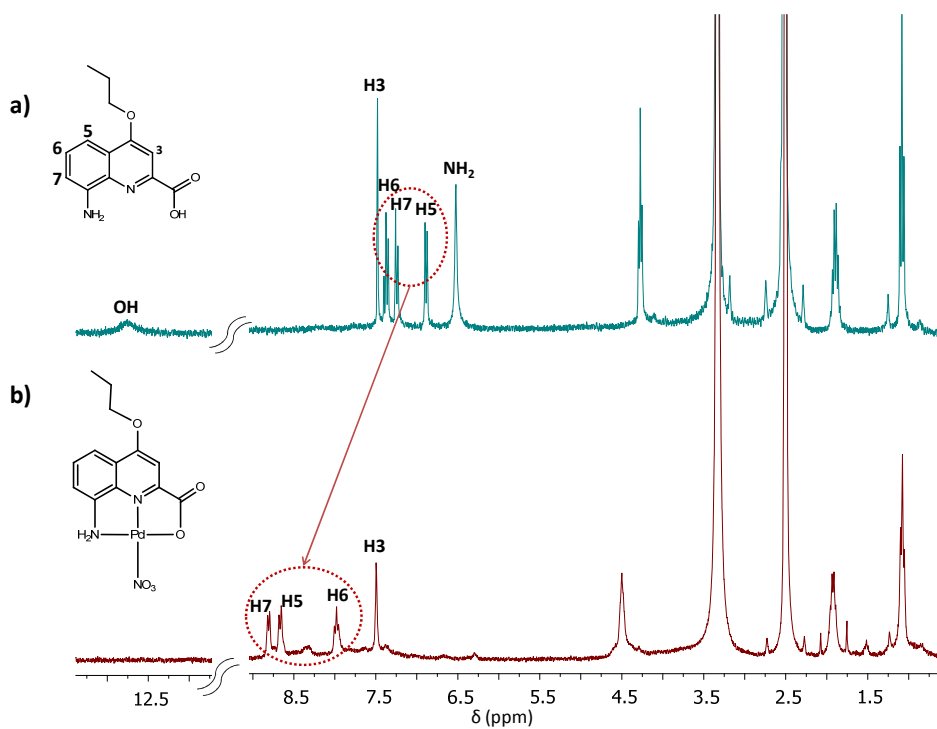


Figura 4.31. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ (DMSO-d_6) de a) ligando **5** y b) complejo **5Pd**.

4.2.2. [Pd(6)Cl], **6Pd**

La preparación y caracterización del complejo **6Pd** se llevó a cabo con objeto de modificar las propiedades de solubilidad del complejo análogo **5Pd**. Para ello se utilizó el ligando **6**, el cual posee un grupo metilo en posición 4 que mejora la solubilidad del ligando en un medio acuoso.

La síntesis del complejo [Pd(**6**)Cl], **6Pd**, se llevó a cabo en disolución acuosa adicionando sobre el ligando una disolución de PdCl₂(CH₃CN)₂, formado in situ tras mantener a reflujo durante 30 minutos PdCl₂ en acetonitrilo. La mezcla de reacción se mantiene agitando a 60°C durante 2 horas, obteniéndose un complejo de color amarillo y cuya caracterización puso de manifiesto la formación del complejo **6Pd** (Figura 4.32).

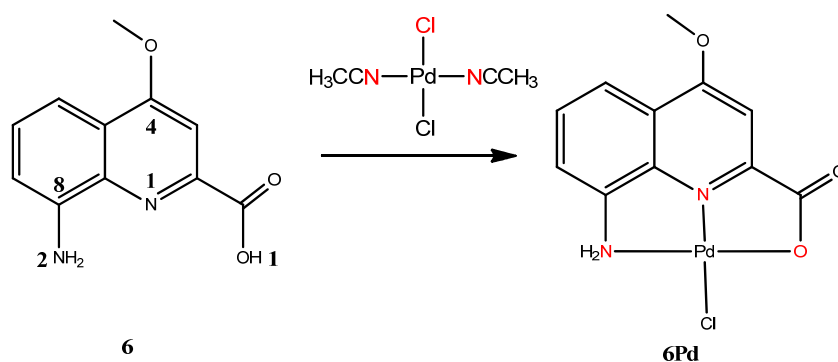


Figura 4.32. Esquema de síntesis del complejo **6Pd**.

El complejo **6Pd** se caracterizó en estado sólido mediante espectroscopia IR y mediante AE.

En el espectro IR (Figura 4.33) se observa la desaparición de la banda correspondiente a la vibración de tensión del –OH del grupo carboxilato del ligando (3440 cm⁻¹), lo que sugiere la participación del oxígeno O1 en el enlace al átomo metálico. Este enlace es responsable del efecto hipsocrómico que sufre la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo que se desplaza de 1638

cm^{-1} a 1659 cm^{-1} (★). Finalmente, otro de los hechos que se observan en la figura es una severa modificación con respecto al IR del ligando de las señales comprendidas entre 1500 y 1000 cm^{-1} ; lo que pone de manifiesto que la coordinación del ligando al átomo metálico de forma tridentada afecta mediante resonancia a las principales vibraciones de tensión presentes en la molécula.

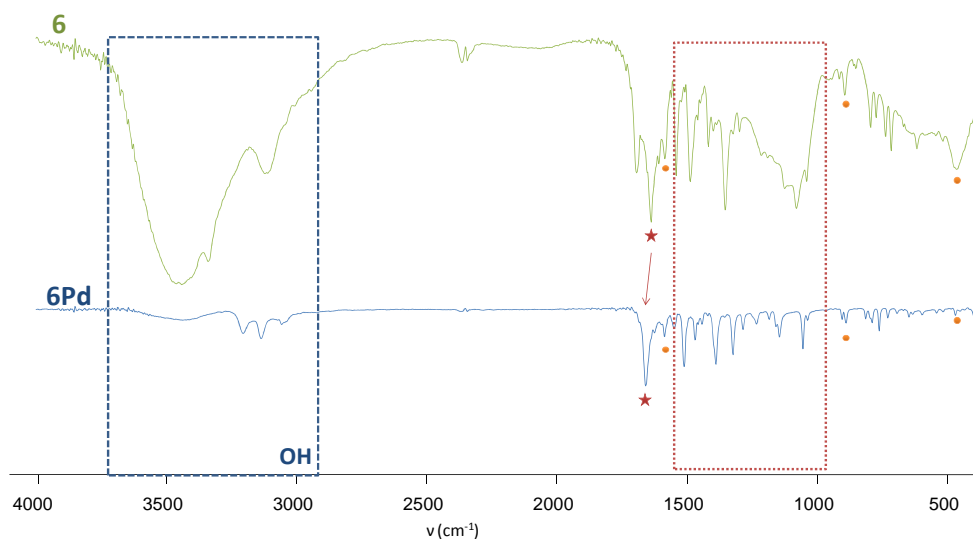


Figura 4.33. Espectros IR en transmitancia del ligando **6** (verde) y del complejo **6Pd** (azul), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

El análisis elemental del precipitado (véase Tabla 4.X) concuerda con la opción de que sea un átomo de cloro el que se coordina al átomo de paladio, ya que la fórmula propuesta que se ajusta más a los valores experimentales obtenidos es $[\text{Pd}(\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3)\text{Cl}](\text{H}_2\text{O})_{0.65}$. El agua presente en el complejo se debe a humedad.

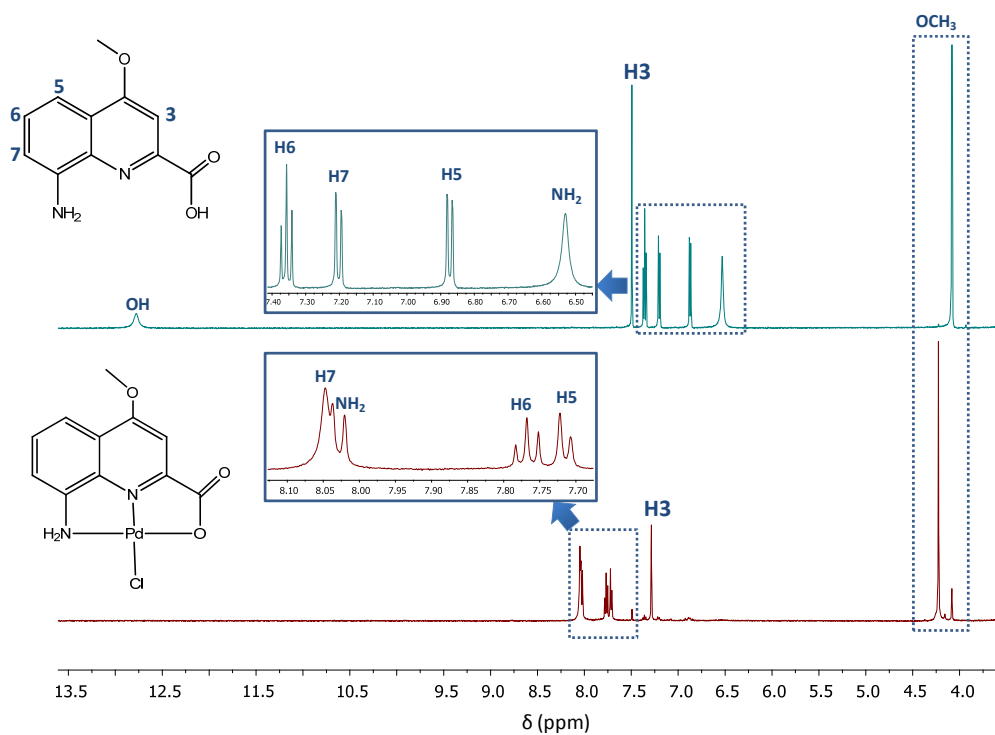
Tabla 4.X. AE del complejo **6Pd**.

[Pd(C₁₁H₉N₂O₃)Cl](H₂O)_{0.65}		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	7.63	7.59
% C	35.78	35.79
% H	2.60	2.76

El complejo **6Pd** se caracterizó en disolución mediante ¹H-RMN (Figura 4.34). La comparación de este espectro con el registrado para el ligando **6** muestra la desaparición de la señal correspondiente al grupo –OH del ligando (12.79 ppm) y el desplazamiento a campo bajo que sufre la señal del grupo amino, lo que confirma la coordinación del ión Pd(II) al ligando a través de estos grupos (8.03 ppm, Δδ=1.5 ppm). También se ven afectados por esta coordinación los protones H5, H6 y H7 del anillo quinoleínico por efecto de la resonancia, por lo que las señales correspondientes a estos protones sufren un desplazamiento significativo a campo bajo (véase Tabla 4.XI). El grupo metoxi en posición 4, al encontrarse en una posición estructural más alejada de aquellos átomos que intervienen en la coordinación del ligando al ión metálico, sufre un desplazamiento a campo bajo menos significativo que el observado en las señales descritas anteriormente (4.23 ppm, Δδ=0.15 ppm).

Tabla 4.XI. Desplazamiento de los protones del anillo quinoleínico de **6** y **6Pd**.

δ (ppm)	6	6Pd
H3 (s)	7.49	7.29
H5 (d)	7.36	7.77
H6 (t)	7.20	8.03
H7 (d)	6.87	7.71

**Figura 4.34.** Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) del ligando **6** (arriba) y del complejo **6Pd** (abajo).

4.2.3. $[\text{Cu}(\mathbf{4})(\text{CH}_3\text{COO})(\text{H}_2\text{O})]$, **4Cu**

La síntesis de este complejo de cobre permitiría extrapolar los resultados al estudio de las interacciones entre la adenina, citosina y guanina y un complejo metálico de dimensiones más reducidas a los complejos obtenidos con los ligandos **5** y **6** que hemos estudiado anteriormente.

La síntesis de este complejo se llevó a cabo adicionando sobre una disolución acuosa de la sal de cobre, una disolución del ligando en acetonitrilo:agua. Para favorecer la coordinación del ligando al átomo metálico al ligando, se mantuvo la agitación a 50°C durante 1 hora (Figura 4.35). Sin embargo, no fue posible obtener ningún precipitado del complejo, por lo que su determinación se llevó a cabo en disolución mediante HRMS, que permitió establecer la masa exacta del complejo menos una molécula de agua ($\text{C}_{12}\text{H}_7\text{N}_2\text{O}_5\text{Cu} [\text{M}+\text{H}]^+$: 332.0437).

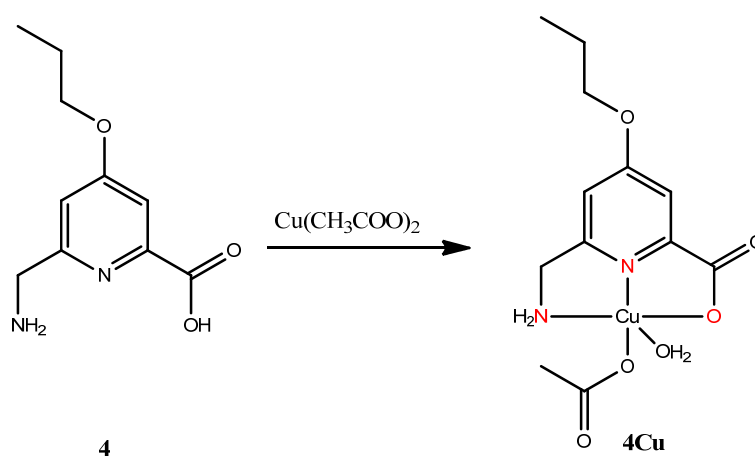


Figura 4.35. Esquema de síntesis del complejo **4Cu**.

Aunque no se pudo obtener el complejo en forma sólida, se pudo realizar la caracterización del mismo mediante espectroscopia de infrarrojos (IR) al depositar una gota de la disolución del complejo en el medio dispersante (KBr) para luego llevarlo a

sequedad en estufa y proceder a su molturación y prensado en pastilla. Así, recogimos los espectros tanto de ligando **4** como del complejo final (Figura 4.36). Al comparar ambos no se puede obtener información de la banda correspondiente al grupo hidroxilo, ya que la banda correspondiente a la molécula de agua unida al átomo de cobre la enmascara. Por otra parte, la banda correspondiente al grupo acetato presente en el ligando sufre un desplazamiento batocrómico ($\nu_{\text{COO}^-}=1684 \text{ cm}^{-1} \rightarrow 1602 \text{ cm}^{-1}$) a la vez que aumenta su intensidad como consecuencia de la coordinación del grupo acetato al metal. Este mismo efecto se observa en la banda correspondiente al grupo $-\text{NH}_2$ (1053 y 1033 cm^{-1}) que al contrario que lo que sucede con la banda correspondiente a los grupos acetatos presentes en la muestra, ve disminuida su intensidad al coordinarse al átomo metálico.

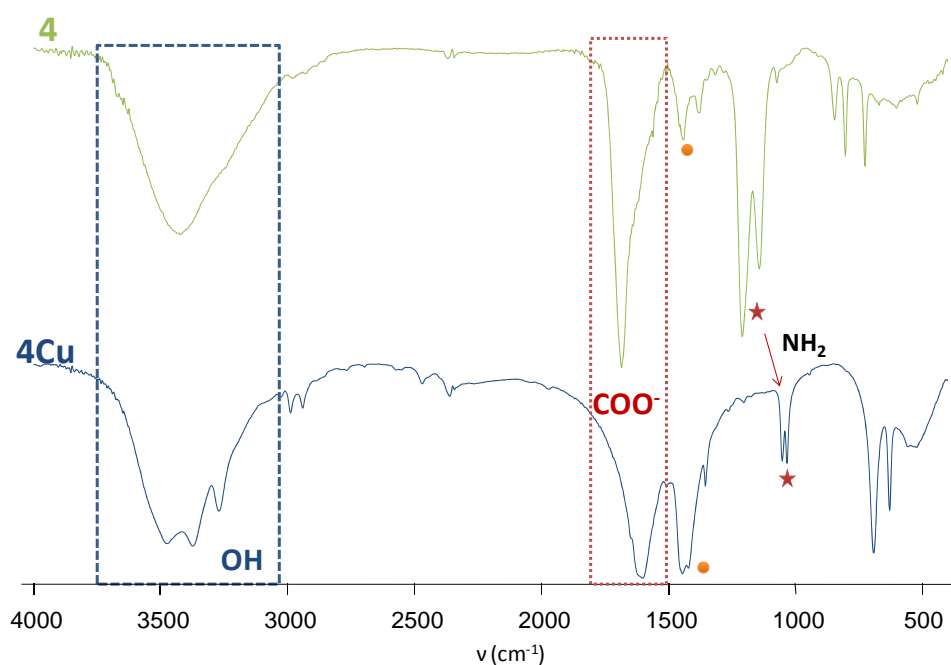


Figura 4.36. Espectros IR en transmitancia del ligando **4** (verde) y del complejo **4Cu** (azul), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

4.2.4. $[\text{Cu}(\mathbf{5})_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, **5Cu**

La síntesis del complejo $[\text{Cu}(\mathbf{5})_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, **5Cu**, se realizó adicionando gota a gota una disolución en acetonitrilo:agua del ligando **5** sobre una disolución acuosa de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, manteniendo la disolución en agitación a 50°C durante 1 hora y 30 minutos. Para comprobar si el orden de adición afectaba de alguna manera a la obtención del bis-complejo final, se repitió la síntesis adicionando $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ sobre el ligando, obteniéndose el mismo resultado (Figura 4.37).

Tras varios días de evaporación lenta del disolvente se obtuvieron unos cristales de color azul que fueron analizados mediante AE y DRX y en disolución por HRMS (Anexo III).

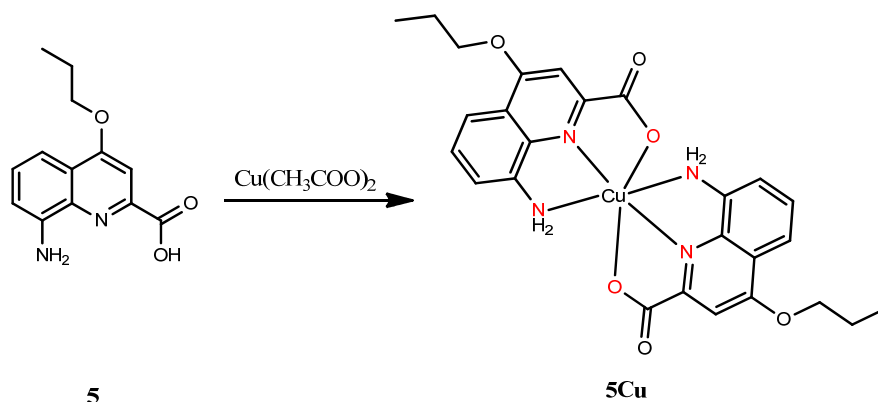


Figura 4.37. Esquema de síntesis del complejo **5Cu**.

El complejo **5Cu** se caracterizó en estado sólido mediante espectroscopia IR y mediante AE.

En el espectro IR (Figura 4.38) se observa la desaparición de la banda correspondiente a la vibración de tensión del $-\text{OH}$ del grupo carboxilato del ligando (3440 cm^{-1}) y de los grupos NH_2 (3325 y 3200 cm^{-1}), lo que sugiere la participación del ligando al ión $\text{Cu}(\text{II})$ a través de estos grupos. El enlace de coordinación al grupo

carboxílico, es a su vez, responsable del efecto hipsocrómico que sufre la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo que se desplaza de 1638 cm^{-1} a 1644 cm^{-1} (★). Finalmente, otro de los hechos que se observan en la figura es una severa modificación de las señales comprendidas entre 1600 y 1200 cm^{-1} con respecto al IR del ligando, hecho que sugiere la coordinación del ligando al átomo metálico de forma tridentada afectando mediante resonancia a las principales vibraciones de tensión presentes en el anillo quinoleínico.

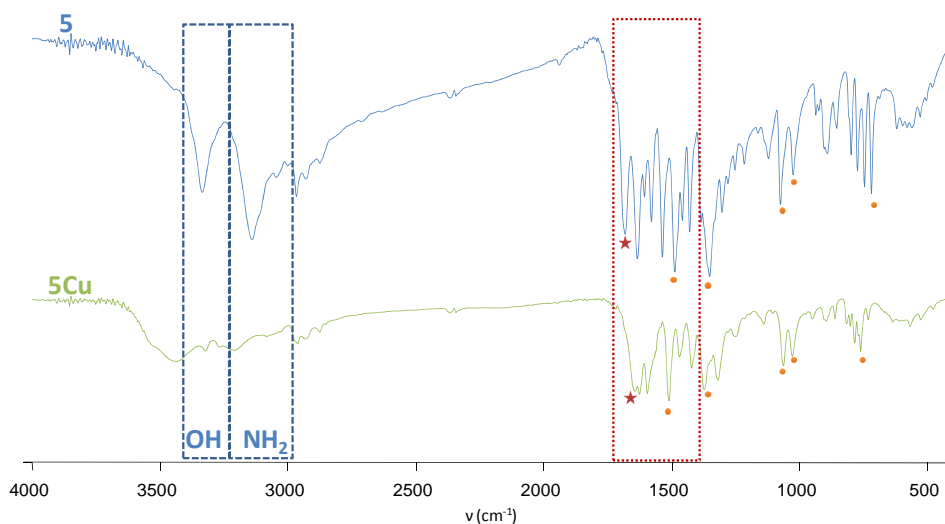


Figura 4.38. Espectros IR en transmitancia del ligando **5** (azul) y del complejo **5Cu** (verde), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

El análisis elemental del precipitado (véase Tabla 4.XII) establece que la fórmula propuesta que se ajusta más a los valores experimentales obtenidos es aquella en la que el ión Cu(II) se encuentra coordinado a dos moléculas de ligando, $[\text{Cu}(\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3)_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_{2.5}$.

Tabla 4.XII. AE del complejo **5Cu**.

$[\text{Cu}(\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3)_2] \cdot (\text{H}_2\text{O})_{2.5}$		
	$\text{AE}_{\text{obtenido}}$	$\text{AE}_{\text{calculado}}$
% N	9.64	9.36
% C	52.13	52.16
% H	5.31	5.22

La determinación estructural del complejo mediante DRX (Figura 4.39) indica que este cristaliza en el sistema monoclinico, grupo espacial $\text{P2}_1/\text{c}$, existiendo dos moléculas de agua de cristalización que interaccionan a través de enlaces de hidrógeno con los átomos O2 y O1' de la molécula. El complejo presenta una geometría octaédrica distorsionada donde el cobre se encuentra coordinado a dos moléculas de ligando que actúan de forma tridentada (N1, O1, N2). En los vértices del octaedro se encuentran los átomos O1 y N2, y en el plano ecuatorial los átomos N1, N1', O1 y O2'. Las distancias y los ángulos de enlace más significativos se recogen en la Tabla 4.XIII.

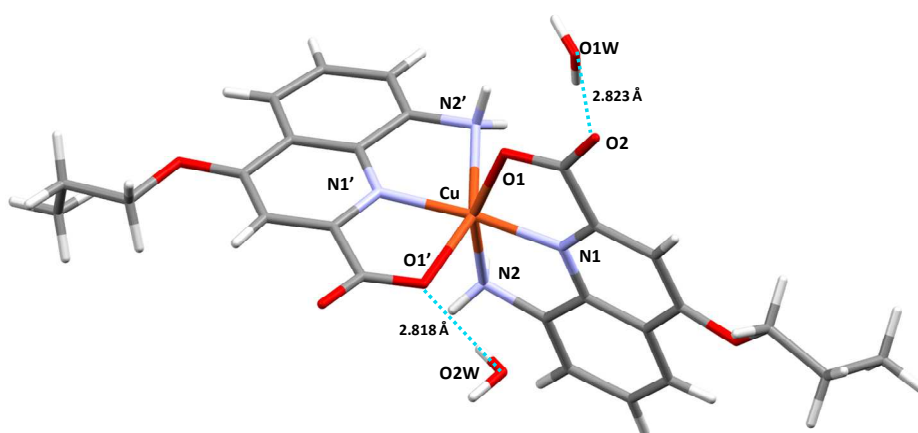


Figura 4.39. Entorno de coordinación del cobre en el complejo **5Cu** y enlaces de hidrógeno presentes en la molécula (*línea punteada*).

Tabla 4.XIII. Distancias y ángulos de enlace del complejo **5Cu**.

5Cu			
Distancias (Å)		Ángulos de enlace (°)	
Cu-O1	2.1951 (18)	O1-Cu-N2'	91.92 (8)
Cu-O1'	2.2419 (19)	N1-Cu-O1	77.38 (8)
Cu-N1	1.930 (2)	N1-Cu-N2	80.44 (9)
Cu-N1'	1.963 (2)	N1-Cu-O1	102.90 (8)
Cu-N2	2.161 (2)	N1'-Cu-N2'	77.74 (9)
Cu-N2'	2.309 (3)	N2-Cu-O1'	97.78 (9)
Enlaces de hidrógeno (Å)			
O1W...H-O2		2.823	
O2W...H-O1'		2.818	

4.3 Síntesis y caracterización de complejos primarios de Pd(II) y Cu(II) con ligandos amino-amino

Son muchos los ejemplos que nos encontramos en la literatura sobre complejos metálicos formados con ligandos del tipo **pidiam** como unidad base (Figura 4.40).

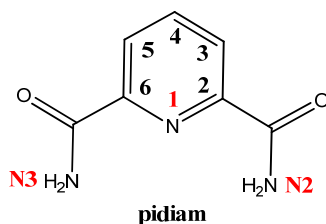


Figura 4.40. Estructura numerada del ligando 2,6-piridín-dicarboxiamida (**pidiam**).

Aunque la coordinación esperada para este tipo de ligandos sería a través de los átomos N1, N2 y N3,^[4,10] también es posible encontrar ejemplos en los que el átomo metálico se encuentre coordinado a los átomos de oxígeno O1 y O2,^[5] por lo que para evitar esta posibilidad se han sintetizado complejos no sólo con este ligando, sino con el ligando **7**, cuya ausencia de oxígenos fuerza al metal a coordinarse a los átomos de nitrógeno^[11-13] que luego van a favorecer la formación de enlaces de hidrógeno con la nucleobase complementaria timina (Figura 4.41).

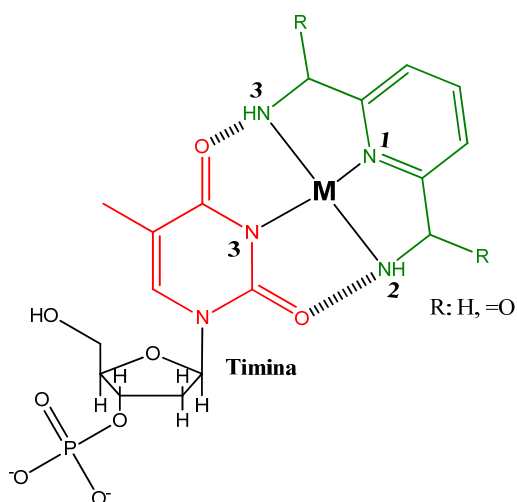


Figura 4.41. Esquema de interacción de un complejo metálico basado en un ligando amino-amino y la *timina*.

4.3.1. $[\text{Pd}(\text{CH}_3\text{CN})(\text{pidiam})]$, *pidiamPd*

El complejo **pidiamPd** se obtiene al hacer reaccionar una suspensión de ligando *pidiam* en acetonitrilo:agua (4:3) con una disolución acuosa de Na_2PdCl_4 . La reacción se mantiene en agitación a temperatura ambiente, se filtra la disolución para eliminar un leve precipitado que fue imposible recuperar para su posterior análisis y se deja en reposo a la espera de que precipite el complejo, lo que sucede pasados 20 días (Figura 4.42).

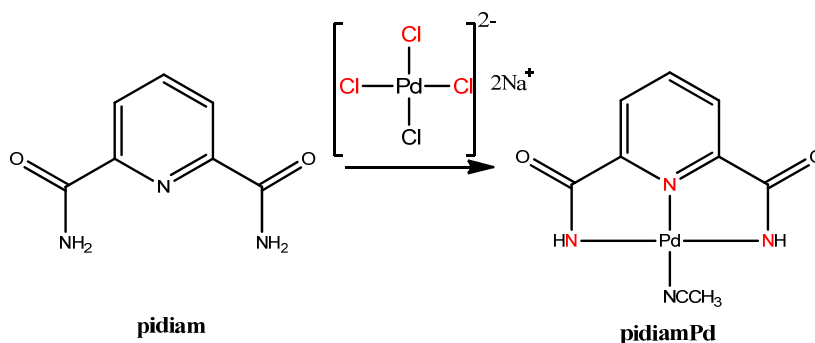


Figura 4.42. Síntesis del complejo **pidiamPd**.

El precipitado fue analizado tanto en estado sólido por AE e IR, como en disolución por ^1H -RMN y HRMS confirmando la formación del complejo **pidiamPd**.

El espectro IR (Figura 4.43) del sólido aislado muestra la desaparición de las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los grupos $-\text{NH}_2$ de la molécula de ligando libre ($3000\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$) hecho que confirma la coordinación del ión Pd(II) al ligando a través de los átomos N_2 y N_3 . Esta coordinación afecta a la banda que se observa a 1585 cm^{-1} en el espectro del complejo, correspondiente a la vibración de tensión de los grupos carbonilo, observándose un desplazamiento batocrómico de la misma ($\Delta\nu=84\text{ cm}^{-1}$). Asimismo, se observa que por debajo de 1500 cm^{-1} , en la zona correspondiente a la huella dactilar, aparecen algunas de las señales correspondientes al ligando sin sufrir apenas desplazamiento (●).

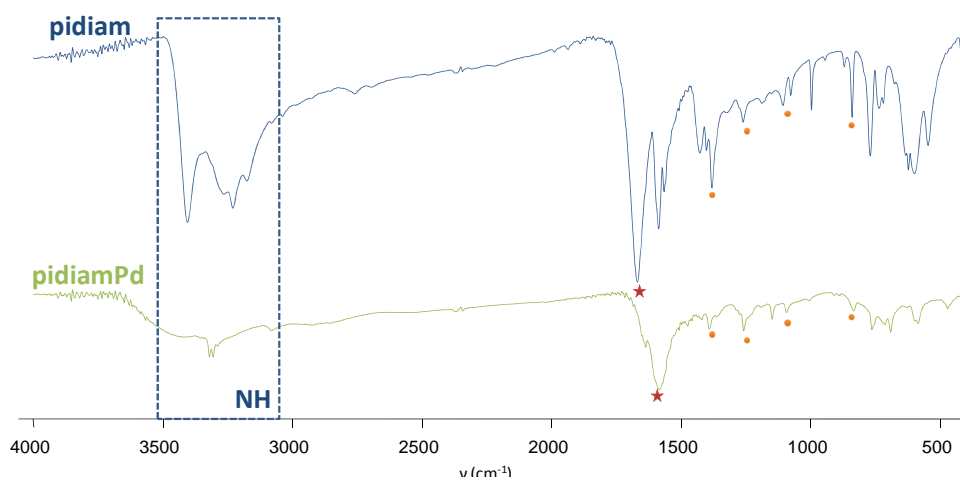


Figura 4.43. Espectros IR en transmitancia del ligando **pidiam** (azul) y del complejo **pidiamPd** (verde), donde se indican algunos de los cambios más significativos así como otras señales que permanecen invariables (●).

En la tabla 4.XIV se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 4.XIV. AE del complejo **pidiamPd**.

[Pd(C₇H₅N₃O₂)(CH₃CN)](CH₃CH₂OH)		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	15.39	15.73
% C	37.01	37.07
% H	3.48	3.96

La caracterización en disolución del complejo **pidiamPd** se llevó a cabo mediante ¹H-RMN (Figura 4.44). En el espectro ¹H-RMN del complejo **pidiamPd** se observa tanto la presencia de ligando coordinado como ligando sin coordinar lo que dificulta la interpretación y asignación de las señales. Aún así, la coordinación del ligando **pidiam** al

ión Pd(II) a través de los grupos amino del complejo se confirma al aparecer en el espectro del complejo una señal correspondiente a los grupos –NH– del ligando (2H, 6.4 ppm); señal que no se observa en el espectro correspondiente al ligando libre por la presencia de agua en la muestra. A su vez, la coordinación del átomo metálico al ligando a través de N1 se ve reflejada, debido a la resonancia del anillo piridínico, en el desplazamiento del triplete correspondiente al protón H4 (8.18 ppm, $\Delta\delta=0.14$ ppm).

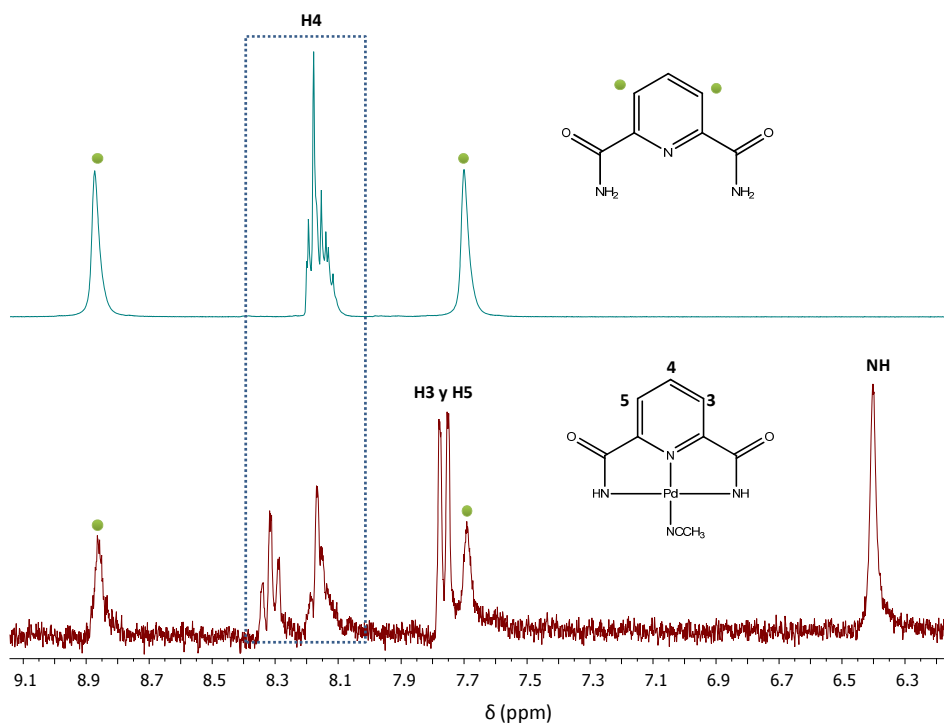


Figura 4.44. Espectro ¹H-RMN (DMSO-d₆) del ligando *pidiam* (arriba) y del complejo *pidiamPd* (abajo).

La presencia de acetonitrilo en el complejo se ve confirmada al registrar el espectro de masas del complejo en disolución. En él se obtiene la masa exacta para la fórmula [Pd(NCCH₃)(C₇H₆N₃O₂)] siendo esta de 310.9724 ([M+H]⁺ calculado: 310.9760; Anexo III).

4.3.2. $[\text{Pd}(\mathbf{7})\text{Cl}]_2 \cdot (\text{PdCl}_4) \cdot (\text{H}_2\text{O})$, **7Pd**

La síntesis del complejo **7Pd** se llevó a cabo en disolución metanólica adicionando gota a gota la sal Na_2PdCl_4 disuelta en agua sobre la disolución de ligando. El complejo precipita de manera inmediata y la reacción se mantuvo en agitación a 40-45°C durante 1 hora. Este precipitado inicial se recogió para su análisis y la disolución se dejó evaporar a temperatura ambiente, obteniendo cristales aptos para su estudio por DRX después de varios días (Figura 4.45).

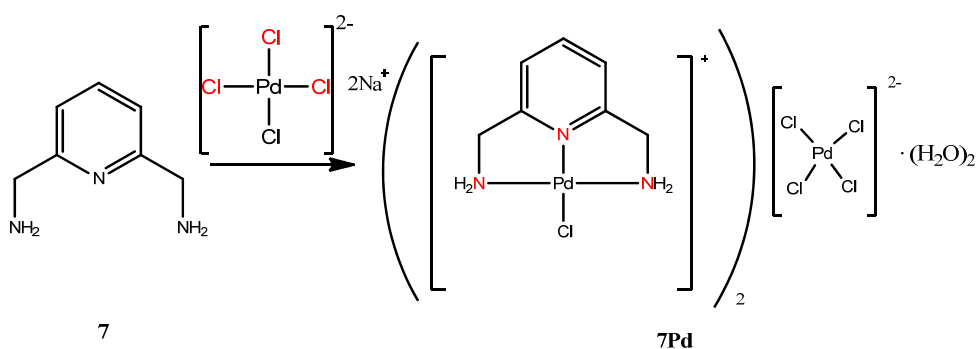


Figura 4.45. Esquema de síntesis del complejo **7Pd**.

En la tabla 4.XV se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 4.XV. AE del complejo **7Pd**.

$[\text{Pd}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{Cl})_2](\text{PdCl}_4)(\text{H}_2\text{O})_{1.75}(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH})$		
	$\text{AE}_{\text{obtenido}}$	$\text{AE}_{\text{calculado}}$
% N	9.64	9.76
% C	20.96	20.93
% H	3.38	3.34

La caracterización en disolución se llevó a cabo por ^1H -RMN (Figura 4.46). Los espectros del ligando **7** y el del complejo **7Pd** muestran que los protones H3, H4 y H5 del anillo piridínico sufren un desplazamiento a campo bajo ($\Delta\delta_{\text{H3,H5}}=0.06$ ppm, $\Delta\delta_{\text{H4}}=0.17$ ppm) como consecuencia de la coordinación del ión de Pd(II) al ligando.

En el espectro del complejo (Figura 4.46, abajo) se observa un triplete que integra por cuatro protones correspondiente a los grupos $-\text{NH}_2$ de la molécula (5.63 ppm) que no se observan en el ligando libre debido a la presencia de agua en la muestra. Por último, se observa que la señal correspondiente a los protones H7 y H8 sufre un desplazamiento a campo alto ($\Delta\delta_{\text{H7,H8}}=0.13$ ppm) a la vez que la multiplicidad pasa de singlete en el ligando libre a triplete debido a la imposibilidad de rotación libre de los protones del grupo $-\text{NH}_2$, de esta forma, los protones pierden su equivalencia magnética al coordinarse el ligando al átomo metálico.

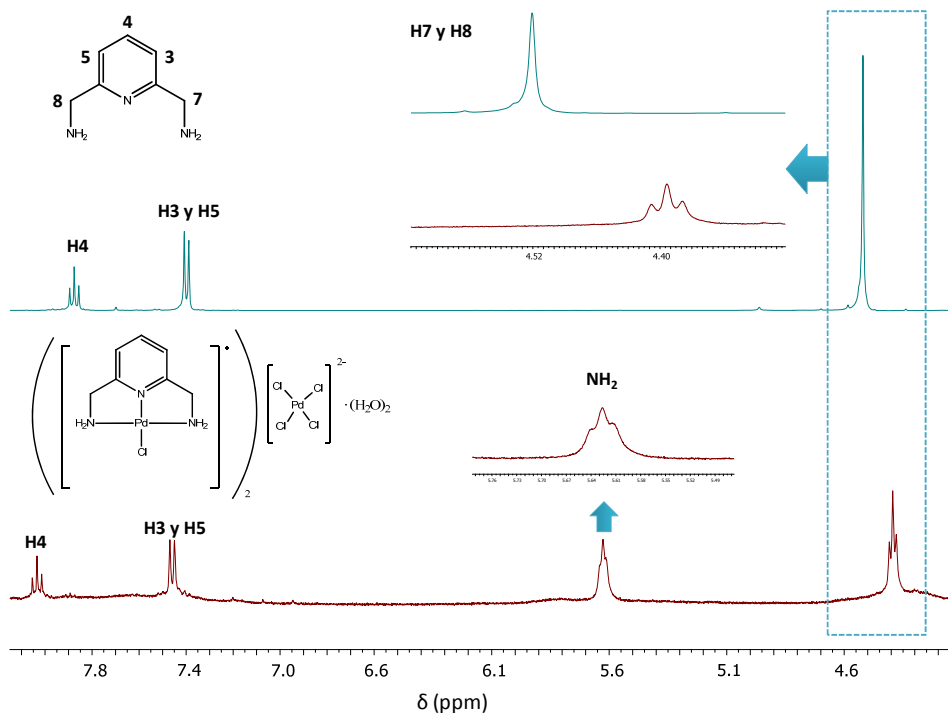


Figura 4.46. Espectro ^1H -RMN ($\text{DMSO}-d_6$) del ligando **7** (arriba) y del complejo **7Pd** (abajo).

Los estudios de difracción de rayos X determinaron que el complejo cristaliza en el sistema ortorrómbico, grupo espacial $Pbca$, originando una red catiónica de unidades $[Pd(7)Cl]^+$ en la que por cada dos cationes hay un anión de $PdCl_4^{2-}$ que compensa la carga del sistema. En la unidad catiónica, el ión $Pd(II)$ presenta un entorno de coordinación plano-cuadrado, en el que el ligando actúa de manera tridentada coordinándose al átomo de paladio por los átomos N1, N2 y N3 estando la cuarta posición de coordinación se encuentra ocupada por un átomo de cloro (Figura 4.47).

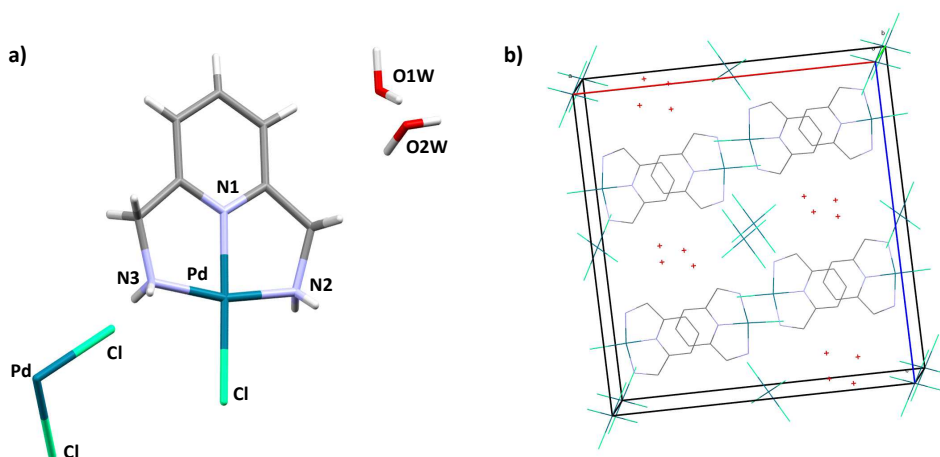


Figura 4.47. a) Entorno de coordinación del átomo de paladio en el complejo **7Pd** y átomos más relevantes. Se muestra la unidad asimétrica. b) Celdilla unidad del complejo **7Pd** representada sin átomos de hidrógeno.

La estructura supramolecular del complejo está estabilizada por una serie de enlaces de hidrógeno en los que participan las moléculas de agua de cristalización del complejo (Figura 4.48, a); así como por las interacciones π - π^* entre los anillos piridínicos del complejo cuya distancia entre centroides es de 3.5224 Å (Figura 4.48, b).

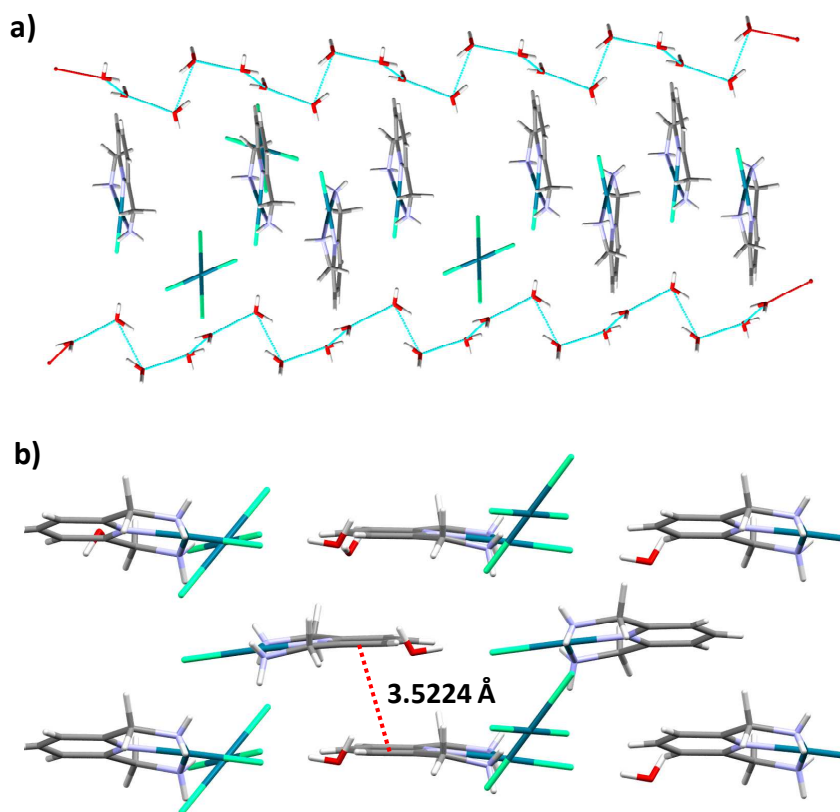


Figura 4.48. a) Red de enlaces de hidrógeno que estabilizan la estructura supramolecular del complejo **7Pd** (línea punteada). b) Interacciones π - π^* entre los anillos piridínicos de las moléculas de complejo. Representación a lo largo del eje c.

4.3.3. $[\text{Pd}(\mathbf{7})(\text{NO}_3)] \cdot (\text{NO}_3)$, 7Cu

La obtención del complejo 7Cu se llevó a cabo siguiendo un orden de adición contrario a la obtención del complejo 7Pd . En este caso se adicionó gota a gota una disolución en caliente del ligando 7 en metanol:agua sobre una disolución acuosa de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$. La mezcla de reacción se mantuvo agitando a 60°C durante 45 minutos (Figura 4.49). Tras unos días de evaporación lenta del disolvente, el complejo precipitó en forma de polvo de color azul lo que permitió su caracterización por análisis elemental (AE).

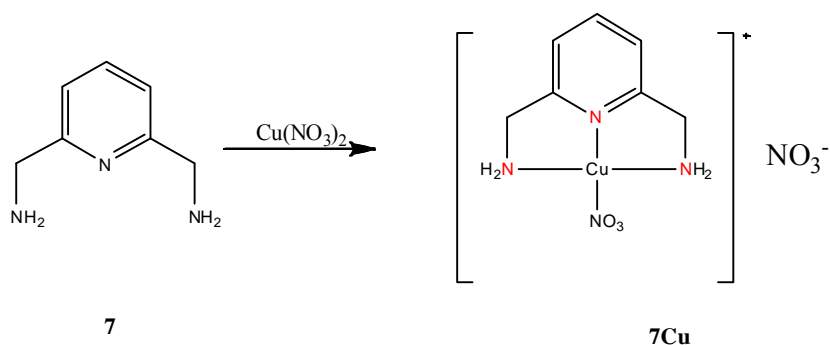


Figura 4.49. Síntesis del complejo 7Cu .

En la tabla 4.XVI se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 4.XVI. AE del complejo 7Cu .

$[\text{Cu}(\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3)(\text{NO}_3)](\text{NO}_3)(\text{H}_2\text{O})_{1.55}$		
	$\text{AE}_{\text{obtenido}}$	$\text{AE}_{\text{calculado}}$
% N	19.72	19.85
% C	23.99	23.84
% H	4.77	4.03


Bibliografía

- [1] a M. Herring, L. Henling, J. a Labinger, J. E. Bercaw, *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 851–853.
- [2] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [3] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364–12367.
- [4] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 13–25.
- [5] D. Griffith, A. Chopra, H. Müller-Bunz, C. J. Marmion, *Dalton Trans.* **2008**, *2*, 6933–6939.
- [6] B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 487–516.
- [7] P. Espinet, J. A. Miguel, S. García-Granda, D. Miguel, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2287–2291.
- [8] H. Nalwa, *Handbook of Advanced Electronic and Photonic Materials and Devices - Volume 8 -*, Academic Press, Burlington, **2001**.
- [9] B. Pitteri, L. Cattalini, G. Chessa, G. Marangoni, N. Stevanato, M. L. Tobe, *J. Chem. Soc. Dalton Trans. Inorg. Chem.* **1991**, 3049–3054.
- [10] D. Huang, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4693–4701.
- [11] A. Hofmann, D. Jaganyi, O. Q. Munro, G. Liehr, R. van Eldik, *Inorg. Chem.* **2003**, *42*, 1688–1700.
- [12] S. W. Annie Bligh, A. Bashall, C. Garrud, M. McPartlin, N. Wardle, K. White, S. Padhye, V. Barve, G. Kundu, *Dalton Trans.* **2002**, *3200*, 184–188.
- [13] A. Arnáiz, J. V. Cuevas, G. García-Herbosa, A. Carbayo, J. a. Casares, E. Gutierrez-Puebla, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2002**, *2*, 2581.



Capítulo V

Síntesis y
caracterización de
complejos metal-
nucleobase



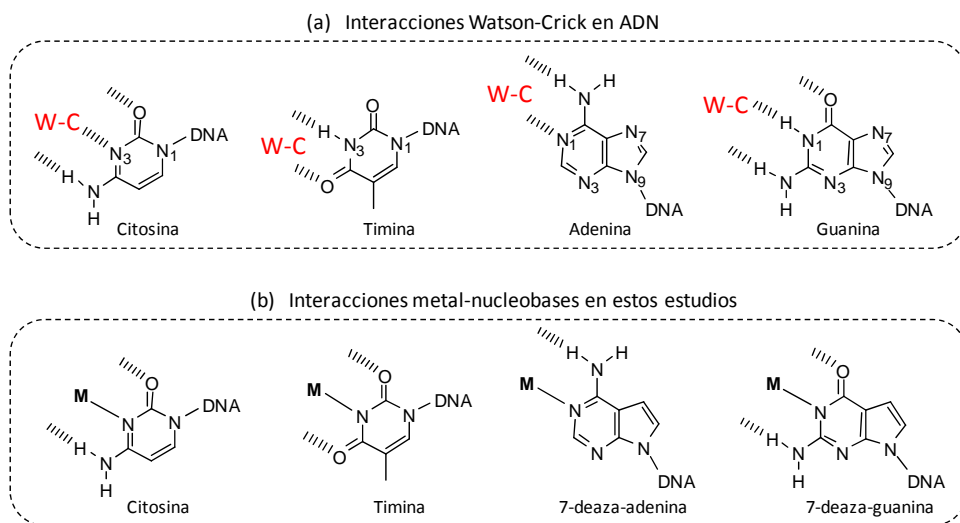


Figura 5.1. a) Representación de las interacciones por enlaces de hidrógeno Watson-Crick (W-C) encontradas en el ADN. b) Formación de enlaces de coordinación de un metal (M) con las nucleobases citosina, timina y los análogos de nucleobase 7-deaza-adenina y 7-deaza-guanina.

La nucleobase 7-deaza-adenina posee un grupo amino en la posición 6 capaz de formar enlaces de hidrógeno entre con los grupos carboxilato de los complejos **cheldM** y **2Pd**, por lo que una conformación coplanar estará más favorecida, deseable para una mejor organización a lo largo de las hebras de ADN.

Por este motivo, a priori, la nucleobase 7-deaza-adenina constituye la mejor alternativa para interactuar con los complejos **cheldM** y **2Pd**, y dar lugar a la formación de pares de bases mediadas por enlaces de coordinación y enlaces de hidrógeno cooperativos de tipo Watson-Crick (Figura 5.2).

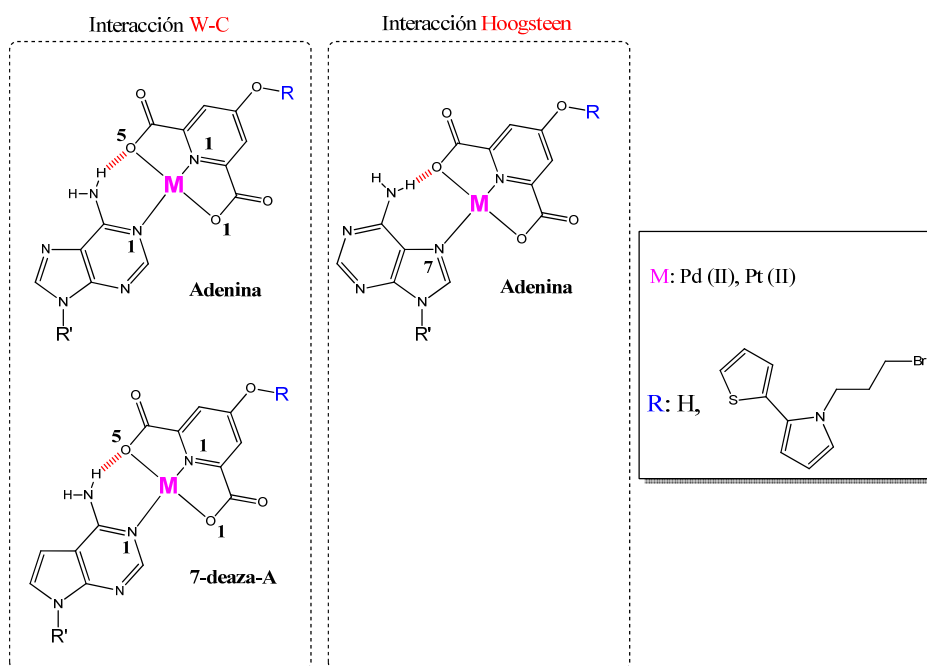


Figura 5.2. Interacción de complejos metálicos con adenina y 7-deaza-adenina y enlaces de hidrógeno que pueden formarse.

Las nucleobases timina, guanina y citosina, poseen grupos carbonilo próximos a las posiciones preferentes de coordinación (timina-N3H, citosina-N3 y guanina-N1H) (Figura 5.3).^[6] Estos grupos carbonilo de las nucleobases pueden dar lugar a fuerzas de repulsión electrostáticas con los grupos carboxilato del complejo y por lo tanto no favorecerán la formación de estructuras coplanares. El efecto contrario se observa en estudios recientes donde tiene lugar la interacción entre complejos de estos iones metálicos y ligandos amino-amino y nucleobases como la timina.^[7]

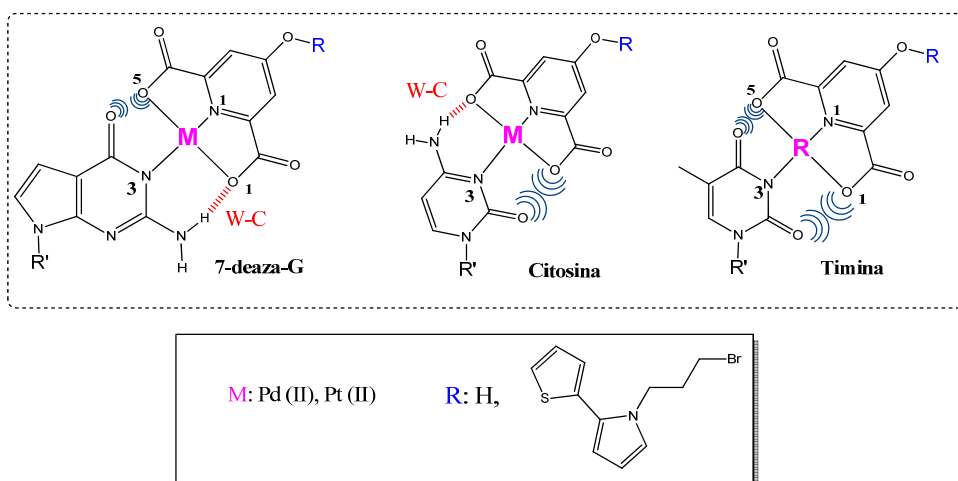


Figura 5.3. Interacción de los complejos metálicos con las nucleobases 7-deaza-guanina, citosina y timina: enlaces de hidrógeno que pueden formarse y repulsiones electrostáticas.

Para llevar a cabo el estudio de la influencia de estas repulsiones entre los grupos carbonilo de las nucleobases y los grupos carboxilo de la unidad **cheld**, se ha sintetizado complejos de tipo **cheldM_citosina** debido a la mayor facilidad de la citosina para coordinarse a iones de Pd(II) y Pt(II) sin necesidad de desprotonar el átomo N3, respecto a los derivados protonados de timina y guanina.

A continuación, se pasa a describir los métodos de síntesis utilizados para la obtención de los diferentes complejos de **cheldM** con nucleobases derivadas de la 7-deaza-adenina y citosina, y la caracterización de los mismos.

Las interacciones del complejo **cheldM** con las diferentes nucleobases han sido estudiadas tanto en fase sólida (IR y DRX, en aquellos casos en los que se obtuvieron cristales adecuados del complejo) como en disolución ($^1\text{H-RMN}$, HRMS, UV-visible). En el caso del complejo **2Pd** estos estudios sólo pudieron ser llevados a cabo en disolución ($^1\text{H-RMN}$, HRMS) debido a la dificultad para aislar dicho complejo en fase sólida.

5.1.1. [Pd(cheld)(N3-mC)], **cheldPd_mC**

La síntesis del complejo **cheldPd_mC** se llevó a cabo en medio acuoso manteniendo en la oscuridad la mezcla de reacción con agitación a 50°C durante una noche (Figura 5.4). El precipitado amarillo que se aisló por filtración, se caracterizó en disolución (HRMS, RMN) y en estado sólido (DRX, IR, AE).

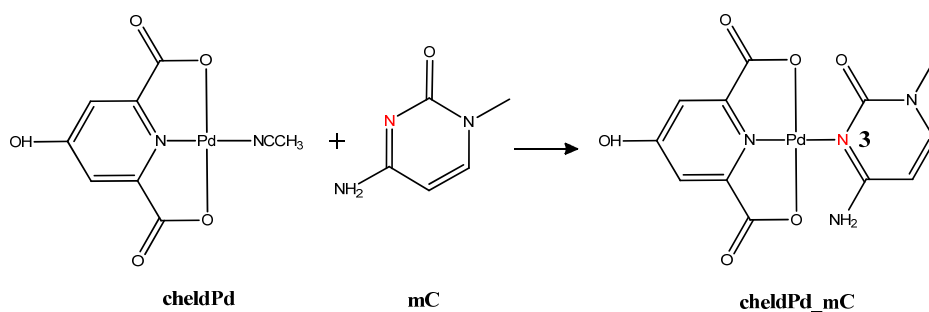


Figura 5.4. Esquema de síntesis del complejo **cheldPd_mC**.

La caracterización en estado sólido del complejo **cheldPd_mC** se llevó a cabo mediante IR y AE.

En la figura 5.5 se recogen los espectros IR del complejo **cheldPd** y **cheldPd_mC**. El cambio más significativo que se puede observar es que al coordinarse la nucleobase **mC** al complejo **cheldPd** tiene un lugar un desplazamiento batocrómico de la banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos carbonilo, -CO, ($\nu_{\text{CO}}=1684 \rightarrow 1637 \text{ cm}^{-1}$), así como una intensificación energética de la misma. En la zona correspondiente a las vibraciones de tensión de los anillos aromáticos ($1200\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$) así como en la huella dactilar del complejo ($500\text{-}700 \text{ cm}^{-1}$), es posible observar nuevas bandas correspondientes a la nucleobase coordinada así como algunas de las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión del complejo que permanecen invariables. El aumento en la intensidad que se observa en la banda a 3500 cm^{-1} , correspondiente a la vibración de tensión de los grupos -OH, puede estar ocasionado por un efecto

sinérgico de la vibración de tensión del grupo -NH_2 presente en la nucleobase así como por la posible presencia de agua en la muestra.

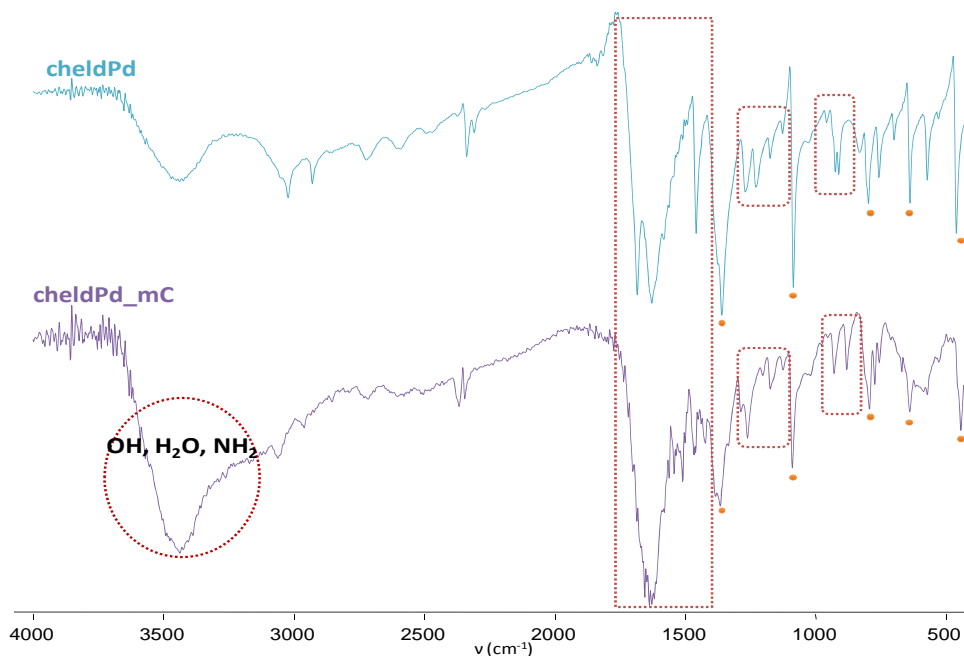


Figura 5.5. Espectros IR de los complejos *cheldPd* (azul) y *cheldPd_mC* (morado) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.I se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.I. AE del complejo *cheldPd_mC*.

$[\text{Pd}(\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_6)(\text{H}_2\text{O})_{3.3}]$		
	$\text{AE}_{\text{obtenido}}$	$\text{AE}_{\text{calculado}}$
% N	11.76	11.87
% C	30.98	30.54
% H	3.59	3.52

El estudio en disolución de la interacción entre el complejo **cheldPd** y la 1-metilcitosina (**mC**) se realizó mediante HRMS y ^1H -RMN.

Los resultados obtenidos por HRMS confirman la formación del complejo **cheldPd_mC**, obteniendo un valor m/z de 366.9082 para la fórmula [**cheldPd_mC**+Na] $^+$ (véase *Anexo III*).

El espectro ^1H -RMN del complejo **cheldPd_mC** (Figura 5.6) confirma la interacción en disolución del complejo **cheldPd** y la nucleobase **mC**, interacción que se ve reflejada principalmente en el desplazamiento a campo bajo que experimentan las señales de los protones del anillo pirimidínico de la nucleobase **mC** ($\Delta\delta_{\text{H4}_m\text{C}}=0.17$ ppm; $\Delta\delta_{\text{H5}_m\text{C}}=0.21$ ppm). Por otra parte, la señal correspondiente a los protones piridínicos del complejo **cheldPd** apenas sufren variación ($\Delta\delta_{\text{H3 y H5}_{\text{cheldPd}}}=0.02$ ppm). Sin embargo, el grupo amino de la nucleobase sufre un cambio muy significativo ya que sus protones aparecen como una única señal ancha a 6.94 ppm cuando la nucleobase se encuentra libre, pero al coordinarse al complejo **cheldPd**, estos protones dan lugar a dos singletes a 8.50 y 8.71 ppm. Este cambio en la forma y posición del grupo NH_2 se debe a la restricción de la libre rotación del grupo C-NH_2 , como consecuencia de un mayor carácter de doble enlace C=NH_2 debido a la coordinación del ión de Pd(II) al átomo de nitrógeno N3 adyacente. Esta restricción en la rotación del grupo NH_2 da lugar a la pérdida de equivalencia entre los dos protones y por lo tanto a la aparición de dos señales. Esta restricción o fijación de los protones del grupo NH_2 puede favorecer la formación de enlaces de hidrógeno con los grupos carboxilato del la unidad de **cheld**.

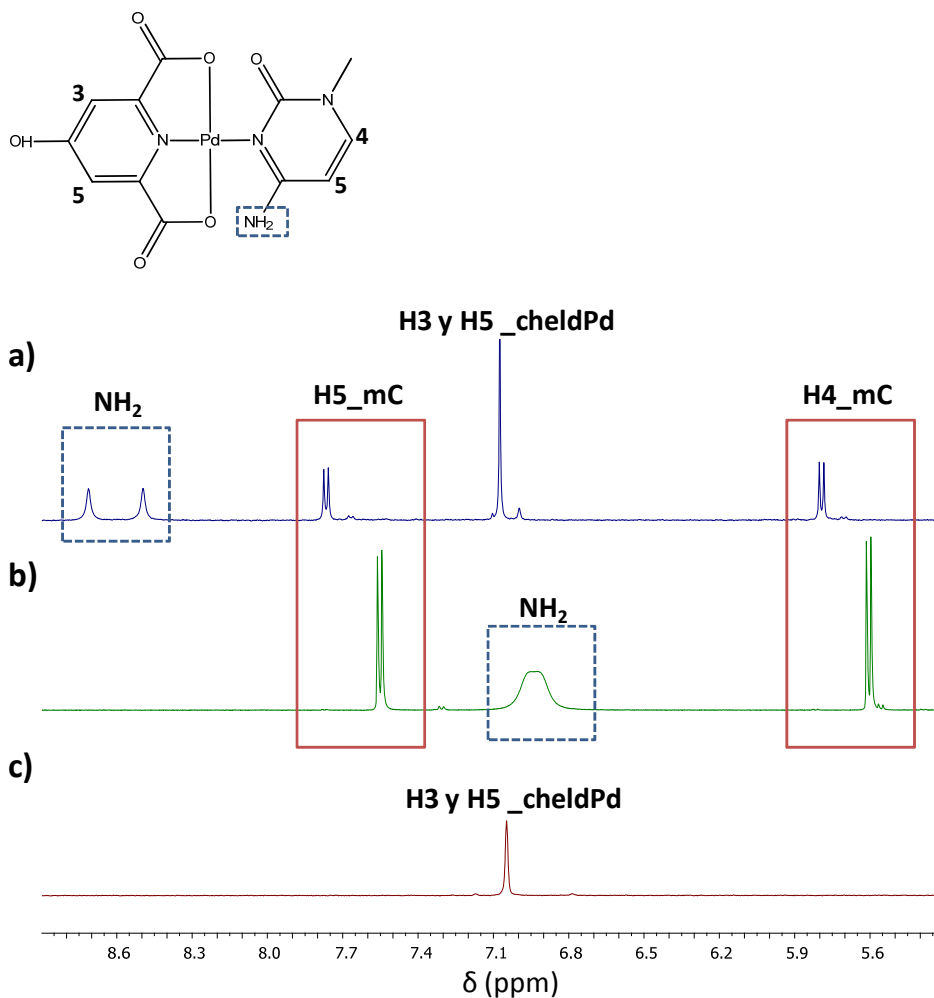


Figura 5.6. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ ($\text{DMSO-}d_6$) y cambios más significativos en la zona aromática de a) chelPd_mC , b) mC y c) chelPd .

Para confirmar la formación del enlace de hidrógeno entre el grupo amino de la nucleobase y el oxígeno del grupo carboxilato del complejo chelPd , se registró el espectro de $^1\text{H-RMN}$ a distintas temperaturas (25°C , 40°C y 60°C) (Figura 5.7). Al representar conjuntamente estos espectros, se observa claramente como las señales correspondientes a los protones, H_a y H_b , se van aproximando entre sí a medida que

aumentamos la temperatura hasta originar una única señal a 8.44 ppm correspondiente ahora a los dos protones magnéticamente equivalentes entre sí.

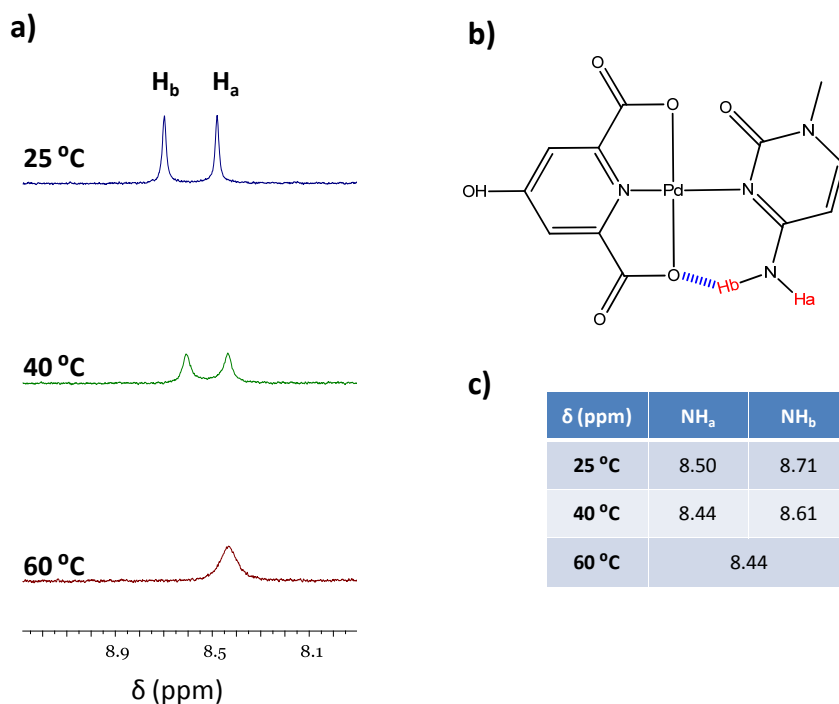


Figura 5.7. a) Variación en la señal en ^1H -RMN del grupo NH_2 de la nucleobase a distinta temperatura. b) Representación del enlace de hidrógeno que se forma en disolución. c) Tabla que recoge la variación en el desplazamiento químico de los protones a distintas temperaturas.

La recristalización del complejo en *N,N*-dimetilformamida permitió obtener cristales aptos para su estudio estructural por DRX. La estructura molecular de **cheldPd_mC** está constituida por una molécula de $[\text{Pd}(\text{cheld})(\text{N3-mC})]$, donde el ión Pd(II) se encuentra en un entorno de coordinación plano-cuadrado coordinado al ligando **cheld**, que actúa de forma tridentada, a través de los átomos N1A (Pd-N1A 1.914 Å), O1A (Pd-O1A 2.036 Å) y O5A (Pd-O5A 2.044 Å), y de la nucleobase 1-

metilcitosina, que lo hace de forma monodentada, a través del átomo N3B de su anillo pirimidínico (Cu-N3B 2.052 Å) (Figura 5.8).

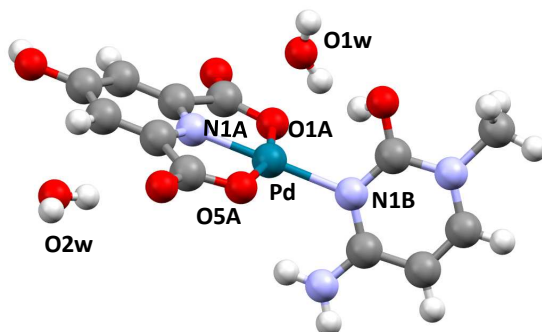


Figura 5.8. Estructura molecular determinada por DRX para el complejo *cheldPd_mC*.

Las interacciones de enlaces de hidrógeno dan lugar a una estructura supramolecular donde la molécula de agua O1w actúa como dadora y aceptora en función del átomo del ligando al que se enfrente (O3A-H...O1w 2.575 Å, O1w-H...O2A 2.673 Å) (Figura 5.9, a).

La interacción entre el complejo *cheldPd* y la nucleobase *mC* tiene lugar de forma no coplanar, como cabría esperar, formando un ángulo de 74.96° entre el plano definido por la citosina y por el anillo piridínico del complejo (Figura 5.9, b); además, esta interacción origina una distorsión en el plano que contiene la molécula del complejo *cheldPd* generando un ángulo de 4.96° entre el plano que contiene el anillo piridínico y el que contiene la esfera de coordinación del átomo metálico.

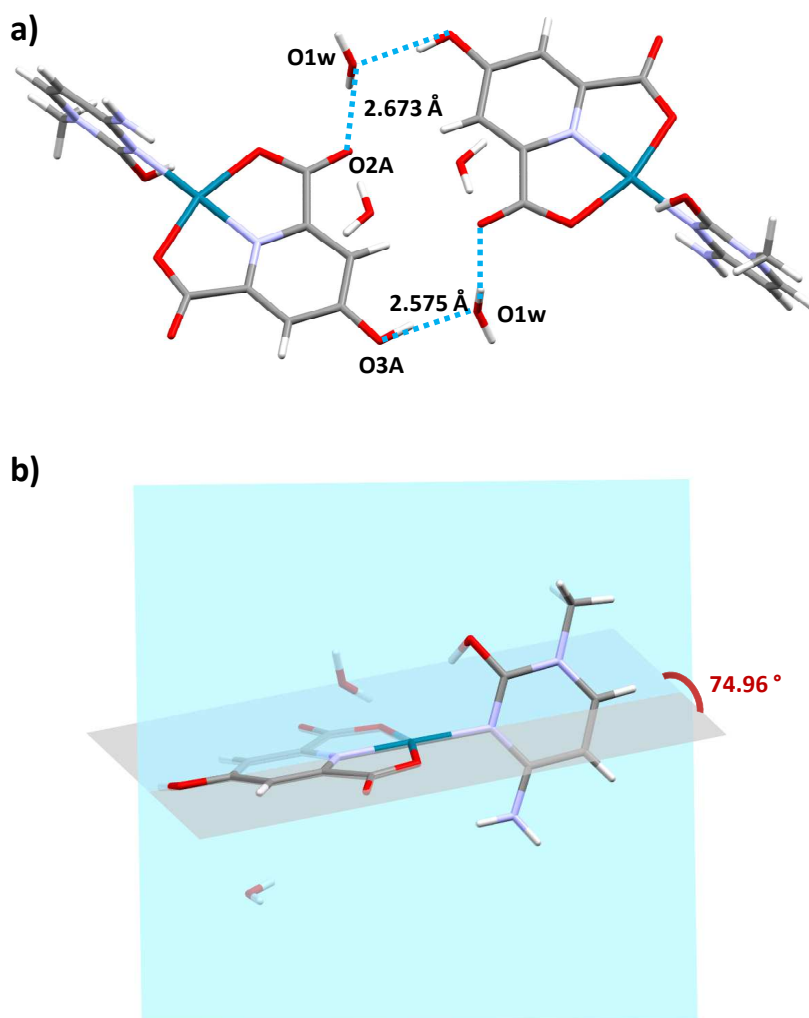


Figura 5.9. a) Enlaces de hidrógeno intermoleculares del complejo *chelPd_mc*. b) Ángulo que forman los planos que contienen el entorno de coordinación del átomo de paladio en el complejo *chelPd* y *mc*.

5.1.2. [Pd(cheld)(N1-mdA)], **cheldPd_mdA**

Para llevar a cabo el estudio de la interacción entre el complejo **cheldPd** y la nucleobase modificada 7-metildeazaadenina (**mdA**), se hizo reaccionar en un medio de agua:acetonitrilo a ambos compuestos manteniéndolos a 50°C (Figura 5.10). En estas condiciones, al cabo de 30 minutos, se obtuvo un precipitado de color amarillo que se aisló por filtración y se estudió por AE e IR (véase 2.1.3.d.2) y en disolución (RMN).

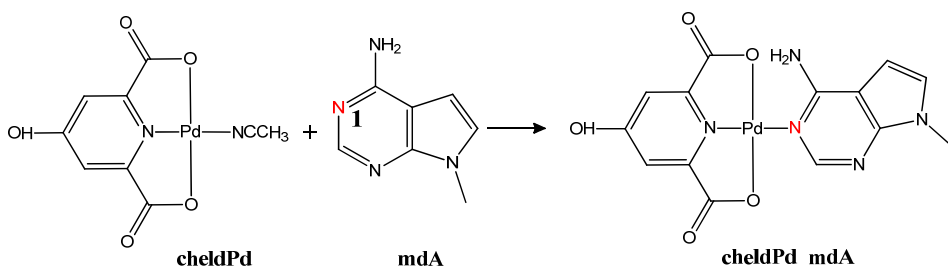


Figura 5.10. Esquema de síntesis del complejo **cheldPd_mdA**.

La caracterización en estado sólido del complejo **cheldPd_mdA** se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro de IR del complejo **cheldPd_mdA** se observan las bandas más significativas del complejo **cheldPd** y las de la nucleobase **mdA** (Figura 5.11), desplazadas como resultado de su interacción al complejo. En el espectro IR del complejo **cheldPd_mdA** se observan en la zona de 3000-3500 cm^{-1} las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos $-\text{NH}_2$ ($\nu=3338$ y 3197 cm^{-1}); hecho que sugiere la formación de un enlace de hidrógeno entre dicho grupo amino y el grupo carboxilato del complejo al observarse dos vibraciones de tensión a frecuencias diferentes. La banda correspondiente al grupo $-\text{OH}$ del complejo **cheldPd** ($\nu=3438$ cm^{-1}) queda enmascarada por la banda a mayor frecuencia del grupo observándose en el espectro como un pequeño hombro. A su vez, se produce un leve desplazamiento batocrómico en las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos

carbonilo del complejo **cheldPd** ($\nu=1684 \rightarrow 1673 \text{ cm}^{-1}$; $\nu=1628 \rightarrow 1610 \text{ cm}^{-1}$), hecho que podría confirmar la formación del enlace de hidrógeno mencionado anteriormente.

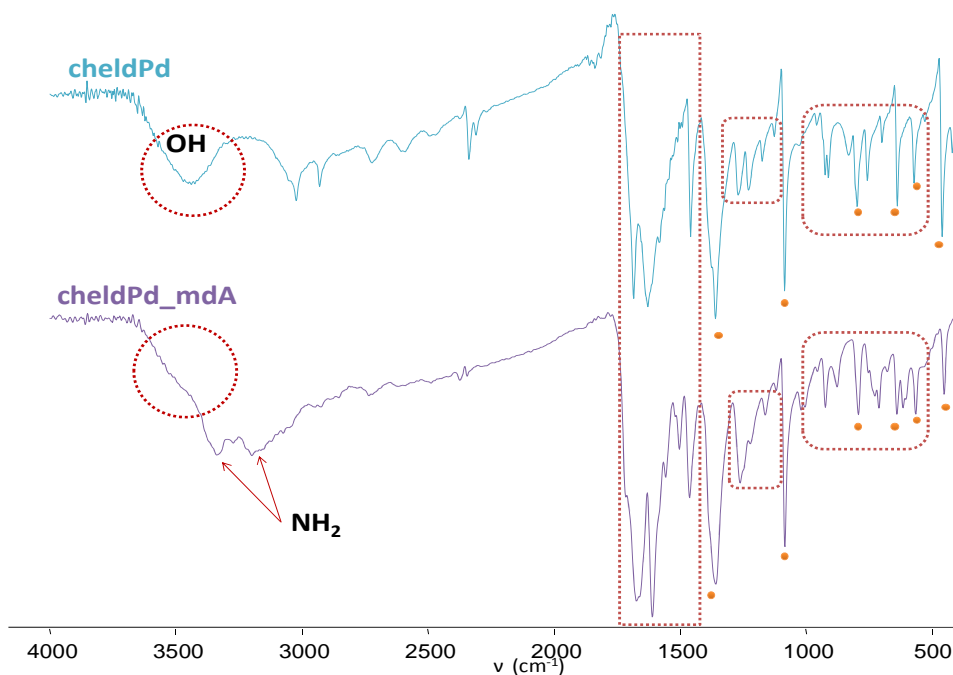


Figura 5.11. Espectros IR de los complejos **cheldPd** (azul) y **cheldPd_mdA** (morado) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.II se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.II. AE del complejo **cheldPd_mdA**.

[Pd(C₁₄H₁₁N₅O₅)](H₂O)_{0.4}		
	AE _{obtenido}	AE _{calculado}
% N	16.15	15.81
% C	37.71	37.96
% H	3.15	2.68

La caracterización en disolución del complejo **cheldPd_mdA** se llevó a cabo mediante ^1H -RMN usando como disolvente DMF-d_7 debido a la dificultad para disolver este complejo en otros disolventes deuterados más comunes. En la figura 5.12 se recoge su espectro donde se puede observar que aparecen todas las señales correspondientes a los protones presentes en la molécula menos la correspondiente al grupo amino de la nucleobase. Asimismo, se observa la pérdida de la simetría original del complejo **cheldPd**, ya que los protones del anillo piridínico aparecen como dos singletes a 7.27 y 7.14 ppm.

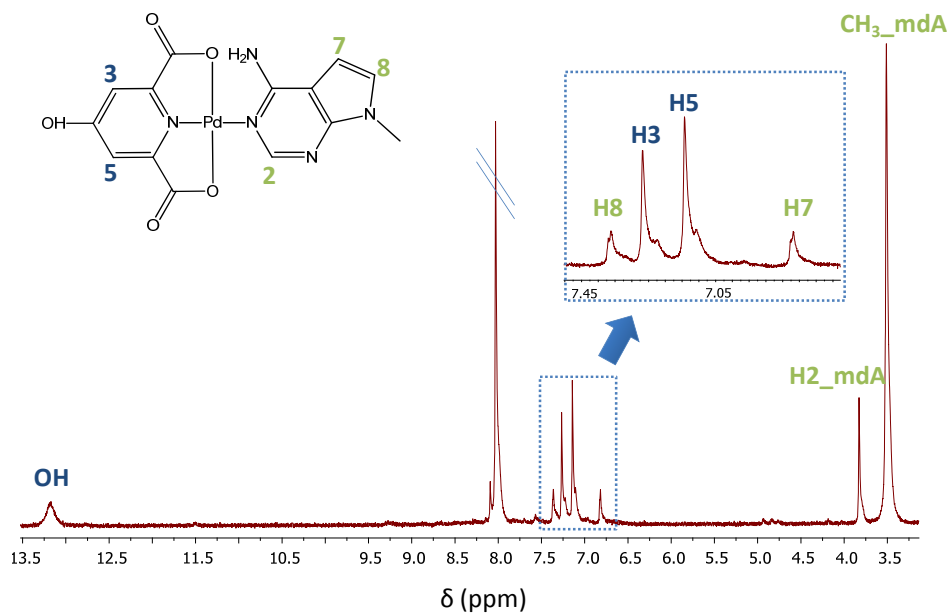


Figura 5.12. Espectro ^1H -RMN (DMF-d_7) asignado del complejo **cheldPd_mdA**.

5.1.3. [Pd(cheld)(N1-pdA)], cheldPd_pdA

La síntesis del complejo **cheldPd_pdA** aportó información crucial para entender la interacción entre los complejos de paladio (II) con ligandos del tipo hidroxilo-hidroxilo y la 7-deazaadenina.

Por otra parte, la incorporación de un grupo propilo a la posición N9 (N9-propil-7-deazaadenina, **pdA**) en lugar de un grupo metilo como en el caso del complejo anterior mejoró la solubilidad de la nucleobase y del complejo final, y permitió completar los estudios previos realizados con la nucleobase N9-metil-7-deazaadenina (**mdA**).

La síntesis de **cheldPd_pdA** se realizó en un medio acetonitrilo:agua manteniendo la mezcla de reacción con agitación a 60°C durante 1 hora y 30 minutos (Figura 5.13). El precipitado que aparece en el transcurso de la reacción se aisló por filtración y se caracterizó en disolución (HRMS, RMN, UV) y en estado sólido (DRX, IR).

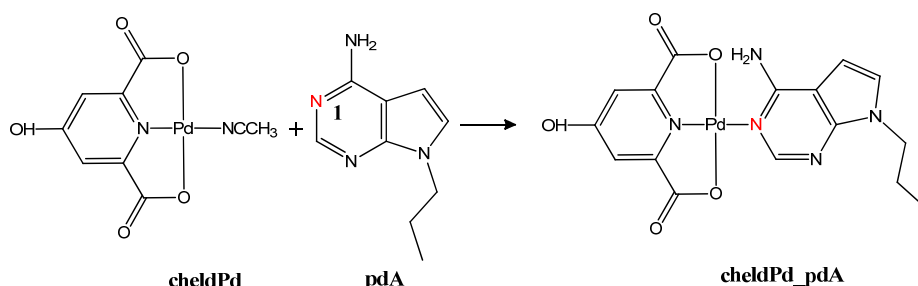


Figura 5.13. Esquema de síntesis del complejo **cheldPd_pdA**.

La caracterización en estado sólido del complejo **cheldPd_pdA** se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro de IR del complejo **cheldPd_pdA** se observan las bandas más significativas del complejo **cheldPd** y las de la nucleobase **pdA** (Figura 5.14), desplazadas como resultado de su interacción al complejo. En la zona de 3000-3500 cm⁻¹ del espectro IR del complejo **cheldPd_pdA** se observa, en primer lugar, dos bandas muy

acusadas correspondientes a las vibraciones de tensión de los grupos -NH_2 ($\nu=3389$ y 3225 cm^{-1}); hecho que sugiere la formación del enlace de hidrógeno entre dicho grupo amino y el grupo carboxilato del complejo, tal y como ocurría en el caso del caso del complejo **cheldPd_mdA**. La banda correspondiente al grupo -OH del complejo **cheldPd** ($\nu=3438\text{ cm}^{-1}$) vuelve a quedar enmascarada observándose en el espectro como un pequeño hombro. A su vez, se produce desplazamiento batocrómico más acusado en las bandas correspondientes a la vibraciones de tensión de los grupos carbonilo del complejo **cheldPd** ($\nu=1684 \rightarrow 1664\text{ cm}^{-1}$; $\nu=1628 \rightarrow 1603\text{ cm}^{-1}$), hecho que podría confirmar la formación del enlace de hidrógeno mencionado anteriormente. Otro aspecto a destacar es la aparición de nuevas bandas, correspondientes a la nucleobase coordinada, tanto en la zona de las vibraciones de tensión de los anillos aromáticos ($1200\text{ -}1500\text{ cm}^{-1}$) como en la huella dactilar del complejo ($500\text{-}700\text{ cm}^{-1}$), siendo más significativas las de esta última.

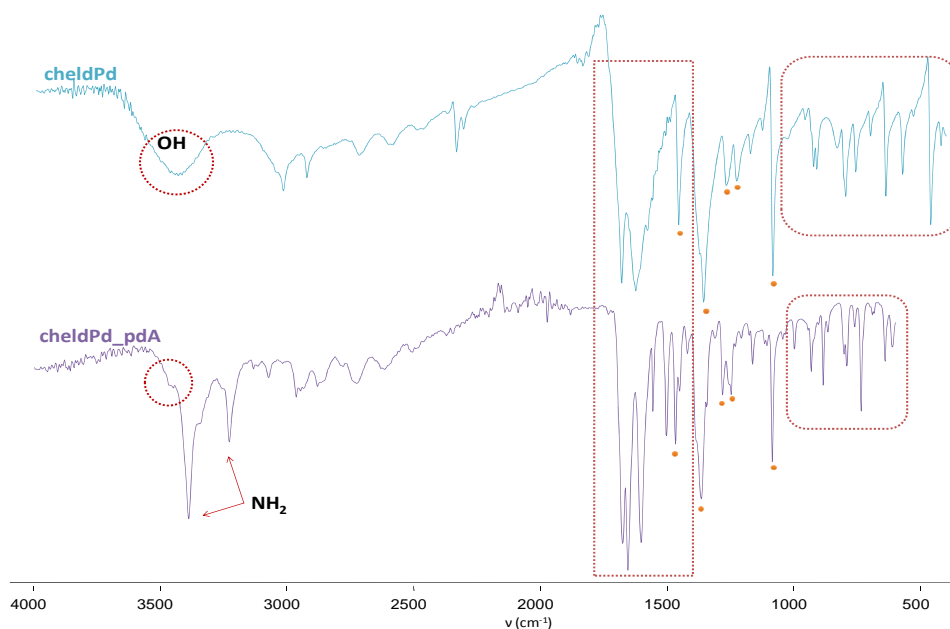


Figura 5.14. Espectros IR de los complejos **cheldPd** (azul) y **cheldPd_pdA** (morado) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.III se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.III. AE del complejo *cheldPd_pdA*.

[Pd(C₁₆H₁₅N₅O₅)](H₂O)_{1.8}		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	14.51	14.11
% C	38.55	38.73
% H	4.28	3.78

El espectro ¹H-RMN del complejo **cheldPd_pdA** (Figura 5.15) confirma la interacción en disolución del complejo **cheldPd** y la nucleobase **pdA**, interacción que se ve reflejada principalmente en el desplazamiento a campo bajo que experimentan las señales de los protones del doble anillo de la nucleobase **pdA** ($\Delta\delta_{H7_pdA}=0.20$ ppm; $\Delta\delta_{H8_pdA}=0.21$ ppm); al igual que la señal correspondiente a los protones piridínicos del complejo **cheldPd** ($\Delta\delta_{H3 \text{ y } H5_cheldPd}=0.05$ ppm). Por otra parte, la señal correspondiente al protón H2 de la nucleobase sufre un desplazamiento muy leve a campo alto ($\Delta\delta_{H2_pdA}=0.09$ ppm). El grupo amino de la nucleobase no se observa, en este caso, debido de a la presencia de agua en la muestra.

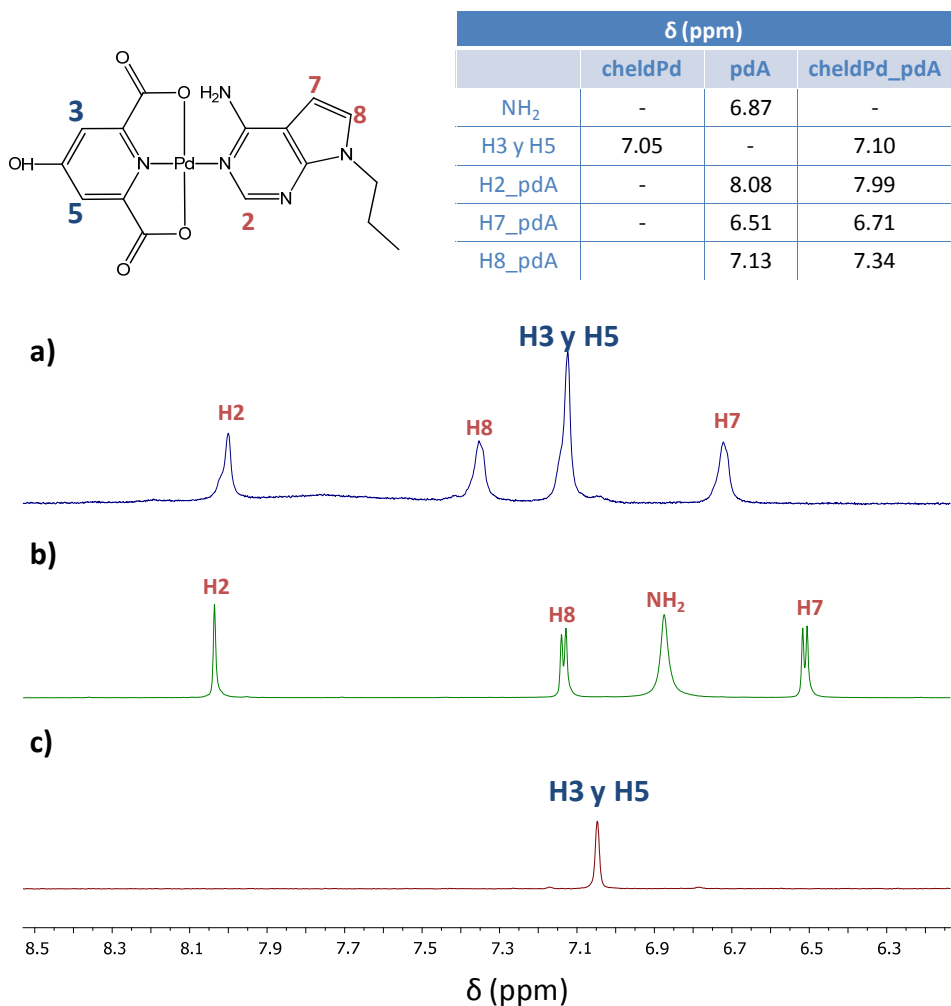


Figura 5.15. Espectros de ^1H -RMN ($\text{DMSO-}d_6$) y cambios más significativos en la zona aromática de a) **chelPd_pdA**, b) **pdA** y c) **chelPd**.

El registro del espectro de UV-visible completó la información obtenida para este complejo en disolución. Como podemos observar en el gráfico que recoge los espectros para cada una de las especies (Figura 5.16), al formarse el complejo se produce un aumento en la intensidad y un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción a 274 nm correspondiente a la nucleobasa una vez se ha coordinado al complejo **chelPd** ($\Delta\lambda=3.5$ nm, $\Delta\epsilon=0.08$ u.a.). Con respecto a la banda localizada en esa zona del complejo

cheldPd, al contrario que para la nucleobase, una vez se produce la interacción complejo-nucleobase, sufre un desplazamiento hipsocrómico muy significativo ($\Delta\lambda=20.5$ nm, $\Delta I=0.08$ u.a). Así como un aumento en la intensidad equivalente al que previamente se ha mencionado para la nucleobase.

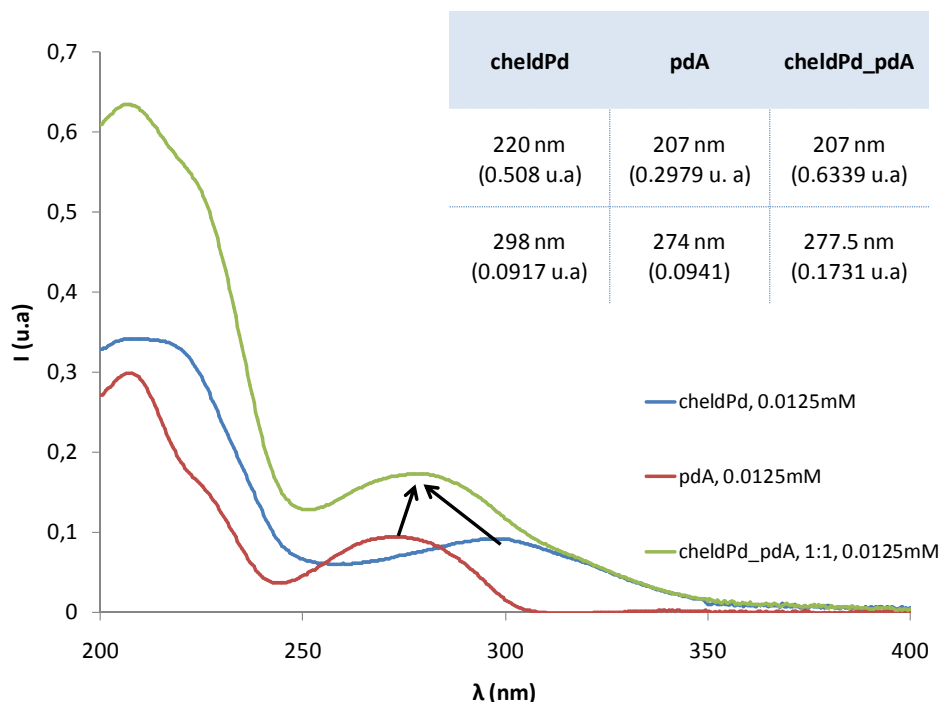


Figura 5.17. Espectros UV-visible de **cheldPd** (azul), **pdA** (rojo) y **cheldPd_pdA** (verde).

La recristalización en *N,N*-dimetilformamida del precipitado que aparece en el transcurso de la reacción permitió el estudio estructural del complejo por DRX.

El complejo **cheldPd_pdA** cristaliza en el sistema monoclinico con un grupo espacial $P2_1/c$. La unidad asimétrica está constituida por dos unidades de $[Pd(cheld)(N1-pdA)]$ cristalográficamente independientes, una molécula de agua y una de *N,N*-dimetilformamida (Figura 5.17, a). El átomo de paladio presenta una geometría plano-cuadrada donde el ligando **cheld** se encuentra coordinado de forma tridentada a través

de los átomos N1 (Pd1-N1A 1.938 Å, Pd2-N1A' 1.914 Å), O1 (Pd1-O1A 2.051 Å, Pd2-O1A' 2.030 Å) y O5 (Pd1-O5A 2.053 Å, Pd2-O5A' 2.050 Å); y la nucleobase **pdA** a través del átomo N1 (Pd1-N1B 2.079 Å, Pd2-N1B' 2.074 Å).

En este caso, la interacción entre el complejo **cheldPd** y la nucleobase **pdA** tiene lugar una distribución coplanar de los anillos aromáticos (1.62°), tal y como demuestra la estructura, y está favorecida por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo amino exocíclico de la nucleobase y uno de los átomos de oxígeno coordinados al átomo de paladio del ligando **cheld** (N61B-H...O5A 2.775 Å, N61B'-H...O5A' 2.778 Å) (Figura 5.17, b).

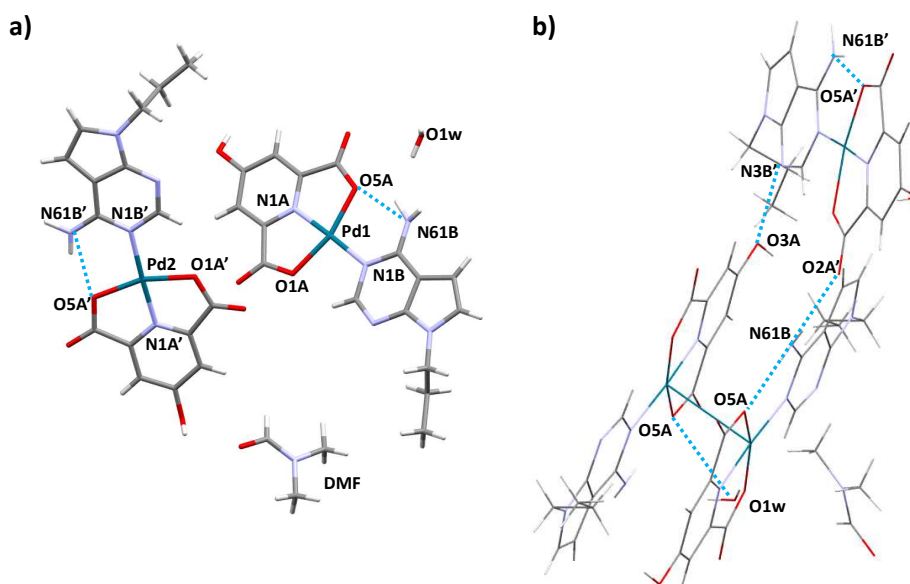


Figura 5.17. a) Entorno de coordinación del átomo del paladio en la unidad asimétrica del complejo **cheldPd_pdA** y enlaces de hidrógeno intramoleculares. b) Enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares vistos a lo largo del eje b.

Tabla 5.IV. Distancias de enlaces de hidrógeno más relevantes en el complejo *cheldPd_pdA*.

Distancias (Å)	
N61B-H...O5A	2.775
N61B-H...O2A'	2.935
N61B'-H...O5A'	2.778
O3A-H...N3B'	2.696
O1w-H...O5A	3.007

La estructura supramolecular del complejo está estabilizada por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares (véase Tabla 5.IV, Figura 5.17, b), e interacciones π - π^* ($d_{\pi-\pi^*}=3.424$ Å) entre los anillos piridínico y pirimidínicos de ligando y la nucleobase de dos moléculas de complejo relacionadas entre sí por un centro de inversión (Figura 5.18).

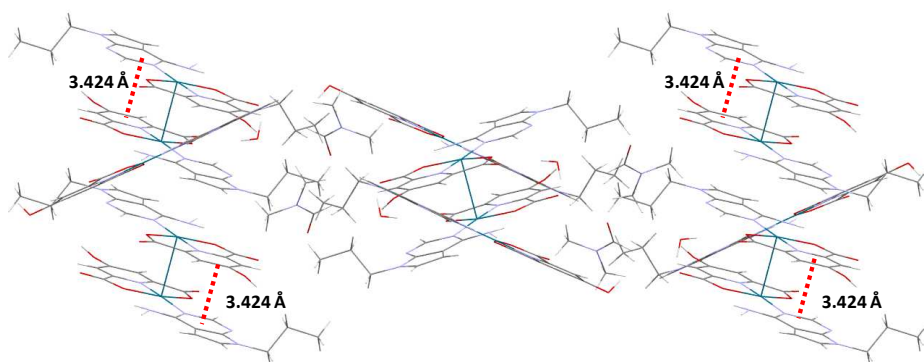


Figura 5.18. Empaquetamiento e interacciones π - π^* en el complejo *cheldPd_pdA* vistos a lo largo del eje *a*.

5.1.4. [Pd(2)(N1-pdA)], 2Pd_pdA

Todos los ensayos llevados a cabo para obtener un complejo de tipo **2Pd_pdA** en estado sólido resultaron infructuosos (Figura 5.19).

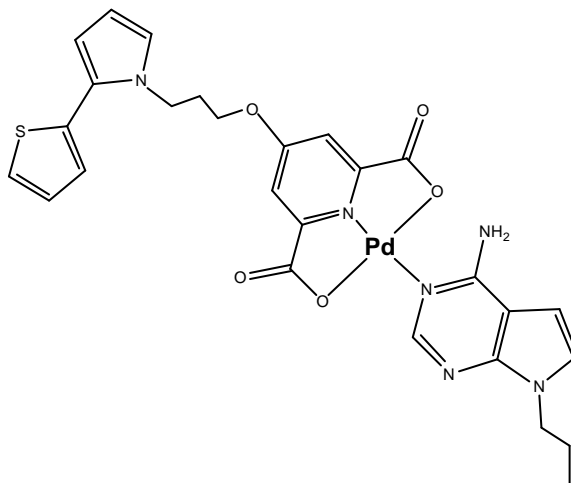


Figura 5.19. Estructura del complejo **2Pd_pdA**.

Sin embargo, ante esta dificultad, se realizaron estudios en disolución utilizando la técnica de ^1H -RMN y HRMS. En estos estudios se ha podido demostrar la formación del complejo **2Pd_pdA** en disolución.

Para llevar a cabo este estudio se realizó un seguimiento por ^1H -RMN en DMSO-d_6 registrando, en primer lugar, el ^1H -RMN correspondiente al ligando **2** para confirmar la pureza del mismo (Figura 5.20, a). A continuación, y sin variar el volumen total del medio, se adicionó 1 equivalente de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y tras esperar unos minutos para que se produjese la disolución total de la sal, se procedió a registrar el ^1H -RMN correspondiente (Figura 5.20, b) que confirma la formación del complejo **2Pd**, ya que podemos observar como tiene lugar un desplazamiento a campo alto del singlete correspondiente a los protones H3 y H5 del anillo piridínico ($\Delta\delta=0.39$ ppm). El resto de

señales no sufren desplazamientos significativos; sin embargo, es posible observar una nueva señal intensa y ancha a 5.04 ppm que no se ha podido identificar tras consultar distintas fuentes bibliográficas.

Por último, y para asegurar que en el medio de reacción haya la cantidad de nucleobase suficiente para formar el complejo, se adicionaron 2 equivalentes de **pdA** y se calienta ligeramente el tubo de RMN para evitar la posible formación de dímeros de paladio. Transcurridos unos minutos, se registró el espectro correspondiente (Figura 5.20, d). Al comparar este espectro con los que aparecen en la figura, podemos observar cómo las señales correspondientes a la nucleobase libre sufren un desplazamiento muy significativo a campo bajo una vez se encuentra coordinada al ión Pd(II); sobre todo aquellas correspondientes a los protones del grupo amino ($\Delta\delta=2.14$ ppm) y los protones H2, H7 y H8 del anillo pirimidínico ($\Delta\delta_{H2}=0.28$ ppm, $\Delta\delta_{H7}=0.43$ ppm, $\Delta\delta_{H8}=0.41$ ppm). El resto de protones correspondientes al complejo 2Pd no sufren desplazamientos significativos. Estas evidencias sugieren la interacción entre el complejo **2Pd** y la nucleobase **pdA** para dar lugar al complejo **chelPd_pdA** en disolución.

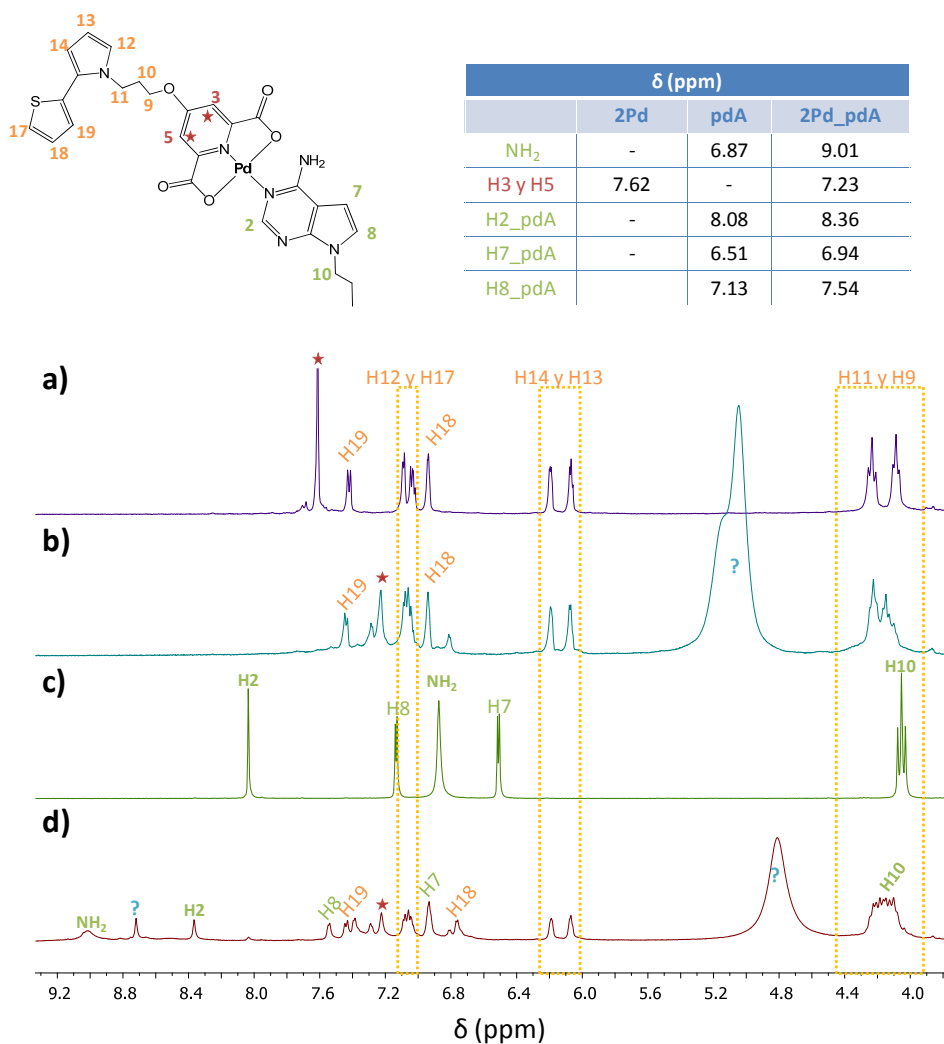


Figura 5.20. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) y cambios más significativos en la zona comprendida entre 4 y 9.2 ppm de a) **2**, b) **2Pd**, c) **pdA** y d) **2Pd_pdA**.

Los resultados obtenidos por HRMS confirman la formación del complejo **2Pd_pdA** en disolución obteniéndose un valor m/z de 736.8795 para la fórmula [**2Pd_pdA**+H]⁺ (véase Anexo III).

5.1.5. [Pt(cheld)(N3-mC)], **cheldPt_mC**

La síntesis del complejo **cheldPt_mC** se realizó adicionando una disolución acuosa de 1-metilcitosina (**mC**) sobre una suspensión del complejo **cheldPt** en acetonitrilo:agua (Figura 5.21). La mezcla de reacción se mantuvo agitando a 60°C y en oscuridad durante 3 horas. En estas condiciones se aísla un precipitado de color verde que fue caracterizado en estado sólido (IR, AE) y en disolución (¹H-RMN).

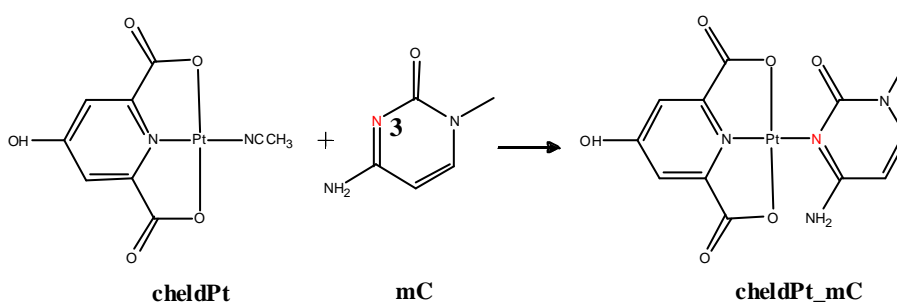


Figura 5.21. Esquema de síntesis del complejo **cheldPt_mC**.

La caracterización en estado sólido del complejo **cheldPt_mC** se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro IR del complejo **cheldPt_mC** (Figura 5.22) se observa una banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo -NH₂ de la nucleobase ($\nu=3399\text{ cm}^{-1}$). Al observarse un única banda poco intensa no podemos asegurar la formación en estado sólido del enlace de hidrógeno esperado entre uno de los protones del grupo amino de la nucleobase y un grupo carboxilato del complejo, hecho que sugiere en primera instancia, la no coplanaridad del complejo debido, posiblemente, a las repulsiones electrostáticas entre los grupos carbonilo y carboxilato de la nucleobase **mC** y del complejo **cheldPt**, respectivamente. Esta repulsión puede ser la responsable del desplazamiento batocrómico de una de las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los grupos carboxilatos y carbonilo mencionados previamente

($\nu_{\text{cheldPt}}=1703\text{cm}^{-1}$, $\Delta\nu=56\text{ cm}^{-1}$). También es posible observar la aparición de nuevas bandas correspondientes a las vibraciones de tensión del anillo aromático de la nucleobase por debajo de 1500 cm^{-1} ; así como la invariabilidad de algunas de las bandas propias del complejo **cheldPt**.

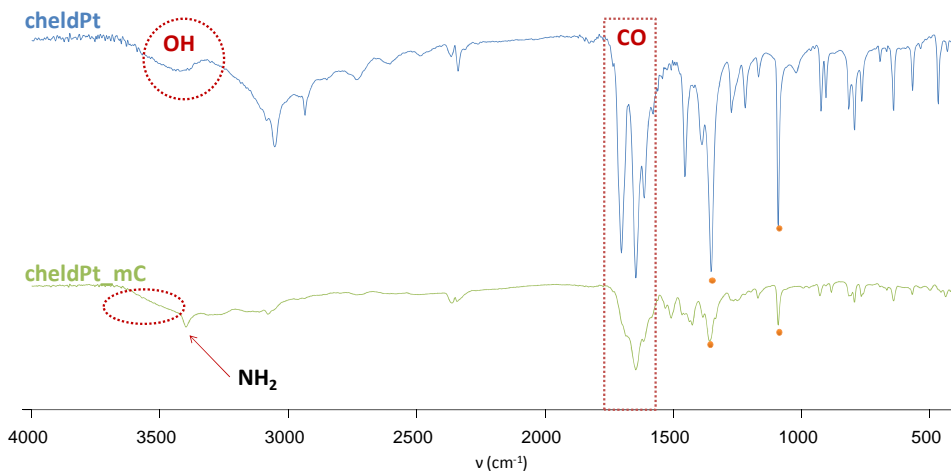


Figura 5.22. Espectros IR de los complejos **cheldPt** (azul) y **cheldPt_mC** (verde) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.V se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.V. AE del complejo **cheldPt_mC**.

[Pt(C₁₂H₁₀N₄O₆)](H₂O)_{2.5}		
	AE _{obtenido}	AE _{calculado}
% N	9.45	10.25
% C	26.31	26.37
% H	2.36	2.74

La caracterización del complejo **cheldPt_mC** en disolución se llevó a cabo mediante ^1H -RMN. El espectro ^1H -RMN en DMSO-d_6 del complejo **cheldPt_mC** (Figura 5.23) confirma la interacción en disolución del complejo **cheldPt** y la nucleobase 1-metilcitosina (**mC**), interacción que se ve reflejada en primer lugar en el desplazamiento a campo bajo de los protones aromáticos H5 y H6 del anillo pirimidínico de la nucleobase **mC** ($\Delta\delta_{\text{H6_mC}} = 0.11$ ppm; $\Delta\delta_{\text{H5_mC}} = 0.13$ ppm). Por otra parte, la señal correspondiente a los protones piridínicos H3 y H5 del complejo **cheldPt**, debido a la pérdida de simetría de la molécula, aparecen desdoblados en dos singletes a 6.51 y 6.75 ppm. A su vez, el grupo amino de la nucleobase también sufre un cambio muy significativo en su señal; los dos protones que presentan una única señal ancha a 6.94 ppm cuando la nucleobase se encuentra libre pierden su equivalencia magnética al coordinarse la 1-metilcitosina al complejo **cheldPt** dando lugar a dos singletes a 8.48 y 8.55 ppm. Esto es debido al carácter de doble enlace que adquiere el enlace C-NH_2 , como ya se discutió para el complejo análogo de paladio **cheldPd_mC** (véase sección 5.1.1).

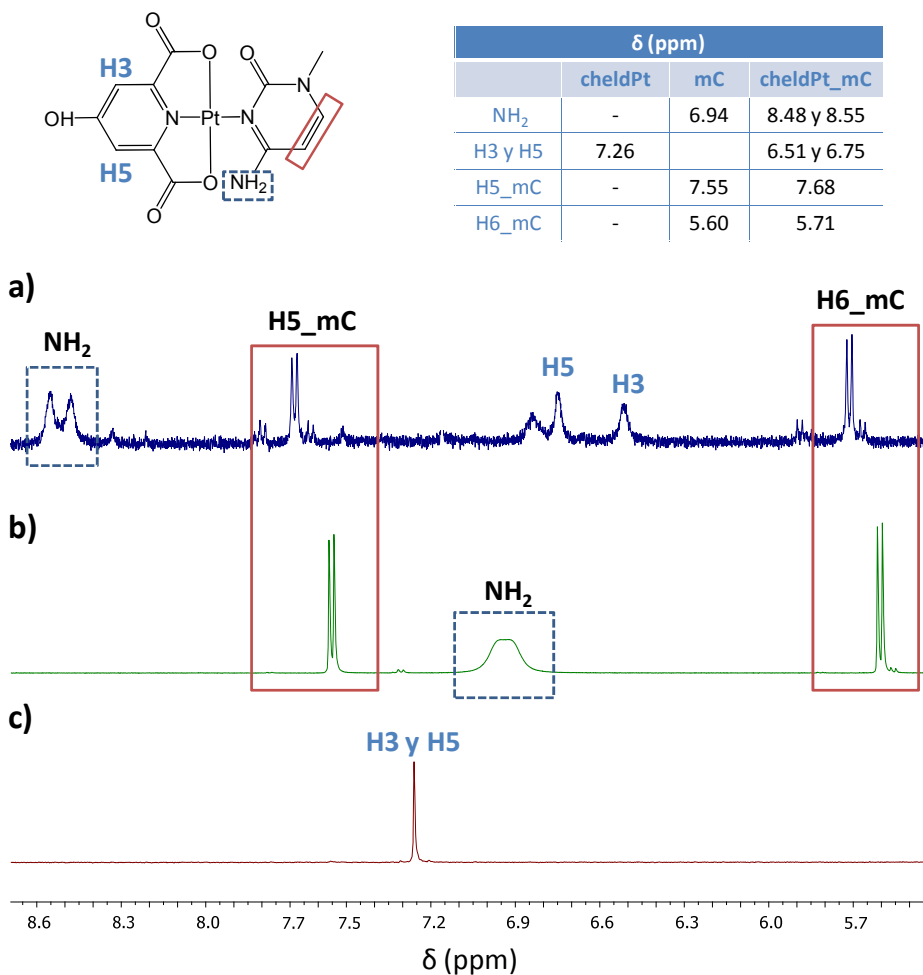


Figura 5.23. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) y cambios más significativos en la zona aromática de a) cheldPt_mC, b) mC y c) cheldPt.

El espectro de HRMS donde la masa obtenida coincide con la masa teórica esperada ([cheldPt_mC+H]⁺ encontrado: 502.0522) (véase Anexo III), confirma la anterior afirmación.

5.1.6. [Pt(cheld)(N1-mdA)], cheldPt_mdA

La síntesis del complejo **cheldPt_mdA** se realizó manteniendo a reflujo una suspensión del complejo **cheldPt** en acetonitrilo:agua durante 1 hora a la que posteriormente se adicionó una disolución acuosa de **mdA** manteniendo la mezcla resultante en agitación durante 3 horas a 50⁰C y en oscuridad (Figura 5.24). El complejo **cheldPt_mdA** precipita en forma de un sólido pulverulento de color amarillo, que se analizó en estado sólido (IR y AE) y en disolución (¹H-RMN, HRMS).

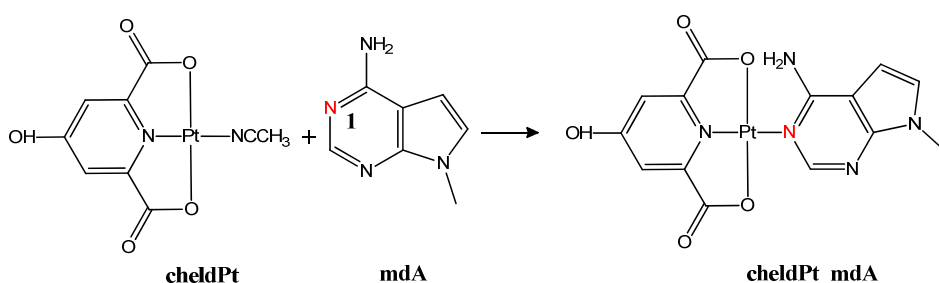


Figura 5.24. Esquema de síntesis del complejo **cheldPt_mdA**.

La caracterización en estado sólido del complejo **cheldPt_mdA** se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro de IR del complejo **cheldPt_mdA** se observan las bandas más significativas del complejo **cheldPt** y las de la nucleobase **mdA** (Figura 5.25), desplazadas como resultado de su interacción al complejo. En la zona del espectro por encima de 3000 cm⁻¹ correspondiente al complejo **cheldPt_mdA** se observa una única banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo -NH₂ de la nucleobase ($\nu=3284$ cm⁻¹), lo cual justifica que no podamos asegurar la formación en estado sólido del enlace de hidrógeno esperado entre la nucleobase y el complejo y la posible coplanaridad. Al igual que para el complejo **cheldPt_mC**, se observa un desplazamiento batocrómico de una de las bandas correspondientes a la vibración de tensión de los grupos carbonilo presentes en el complejo ($\nu_{\text{cheldPt}}=1703$ cm⁻¹, $\Delta\nu=39$ cm⁻¹). También es posible observar

la aparición de nuevas bandas correspondientes a las vibraciones de tensión del anillo aromático de la nucleobase por debajo de 1600 cm^{-1} ; así como la invariabilidad de algunas de las bandas propias del complejo **cheldPt**.

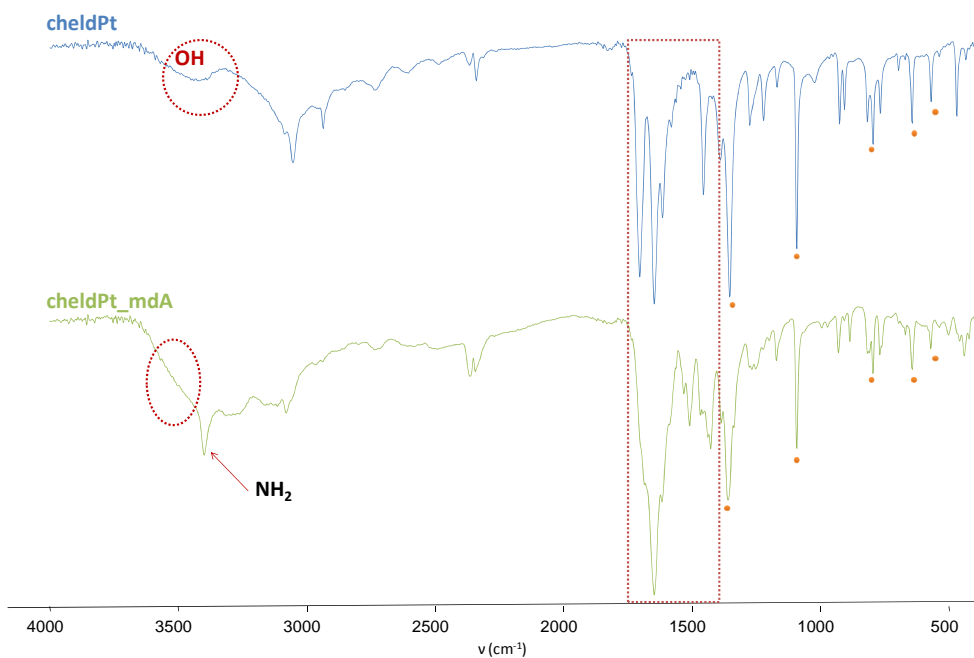


Figura 5.25. Espectros IR de los complejos **cheldPt** (azul) y **cheldPt_mdA** (verde) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.VI se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.VI. AE del complejo *cheldPt_mdA*.

[Pt(C₁₄H₁₁N₅O₅)](H₂O)_{4.4}		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	13.18	13.03
% C	29.71	29.80
% H	3.65	3.56

Como puede observarse en el espectro de ¹H-RMN correspondiente al complejo **cheldPt_mdA** (Figura 5.26), la formación del complejo en disolución origina subproductos de reacción, debido a la cinética del ión Pt(II), que pueden observarse en las señales que acompañan a las propias del complejo **cheldPt_mdA**. Aún así, el espectro ¹H-RMN confirma la interacción en disolución del complejo **cheldPt** y la nucleobase **mdA**; interacción que se ve reflejada principalmente en el desplazamiento a campo bajo que experimentan las señales de los protones H2, H7 y H8 del doble anillo de la nucleobase **mdA** ($\Delta\delta_{H2_mdA}=0.09$ ppm, $\Delta\delta_{H7_mdA}=0.26$ ppm; $\Delta\delta_{H8_mdA}=0.18$ ppm). Por otra parte, esta coordinación del complejo **cheldPt** a la nucleobase **mdA** origina un desplazamiento a campo alto del singlete correspondiente a los protones piridínicos del complejo **cheldPt** ($\Delta\delta_{H3 \text{ y } H5_cheldPt}=0.11$ ppm). Los protones correspondientes al grupo amino aparecen con una señal ancha tras sufrir un desplazamiento a campo bajo ($\Delta\delta_{NH2}=0.72$ ppm), hecho que no sugiere la formación de enlaces de hidrógeno en disolución con el grupo carboxilato del complejo debido a la libre rotación de sus protones que se manifiesta mediante una única señal ancha.

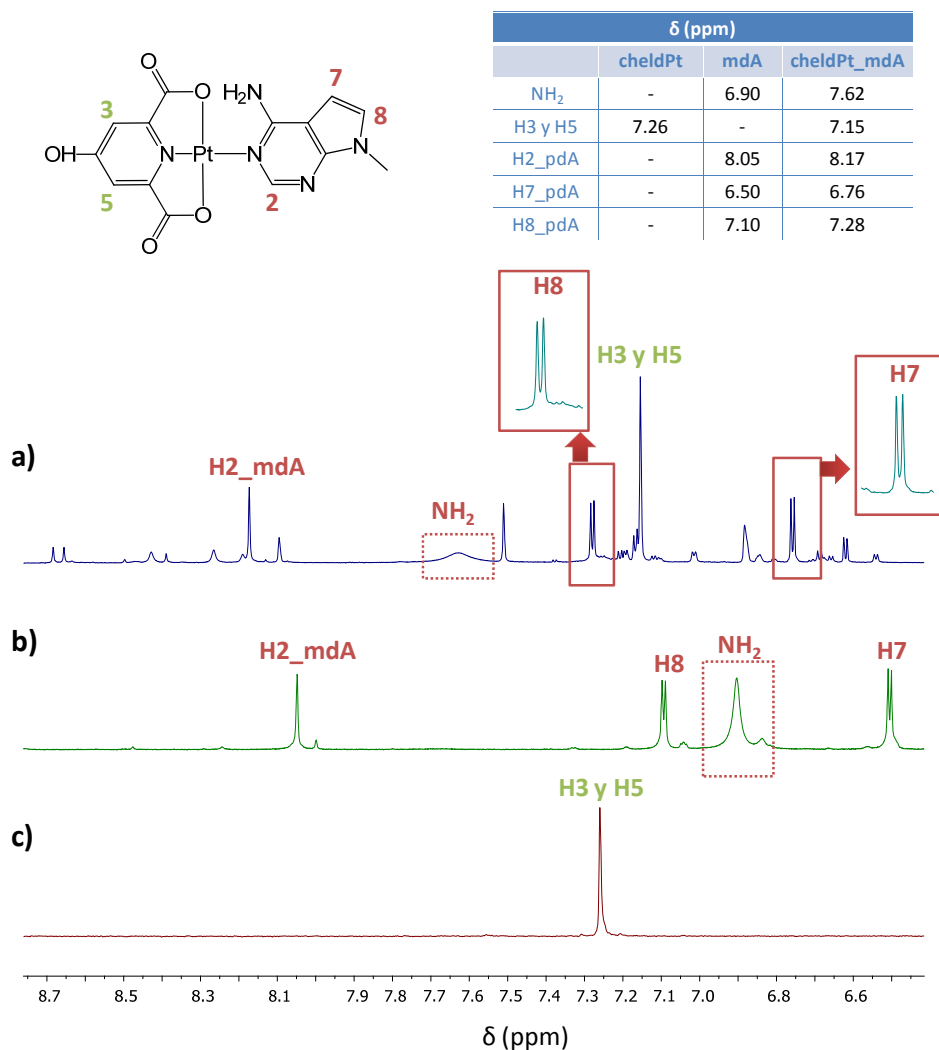


Figura 5.26. Espectros de ¹H-RMN (DMSO-d₆) y cambios más significativos en la zona aromática de a) *cheldPt_mdA*, b) *mdA* y c) *cheldPt*.

El estudio en disolución de esta interacción se completó mediante HRMS. La masa obtenida por esta técnica confirma la interacción entre complejo y nucleobase siendo el valor del peso molecular obtenido el correspondiente a la unidad $[\text{cheldPt_mdA}+\text{Na}]^+$ (525.08) (véase Anexo III).

5.1.7. [Pt(cheld)(N1-pdA)], *cheldPt_pdA*

En este caso, la síntesis del complejo se llevó a cabo adicionando sobre una disolución en agua:acetonitrilo:etanol de **cheldPt**, que previamente estuvo a reflujo 1 hora, una disolución acuosa de **pdA** (Figura 5.28). La mezcla de reacción se mantuvo agitando a 65°C en oscuridad durante 2 horas, tiempo tras el cual se obtuvo un precipitado amarillo que se aisló y caracterizó en estado sólido (IR y AE) y en disolución (¹H-RMN y HRMS).

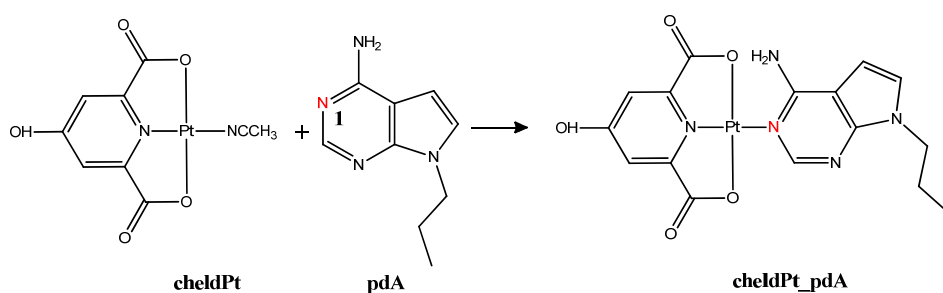


Figura 5.27. Esquema de síntesis del complejo *cheldPt_pdA*.

La caracterización en estado sólido del complejo **cheldPt_pdA** se llevó a cabo mediante IR y AE.

Al comparar el espectro de IR del complejo **cheldPt** y del complejo **cheldPt_pdA** (Figura 5.28) se observa en primer lugar que a 3404 cm^{-1} aparece una banda que corresponde al grupo amino de la nucleobase y que enmascara la banda correspondiente a la vibración de tensión del grupo -OH del complejo (3500 cm^{-1}). El hecho de que se observe una única banda para indicar que en estado sólido no se observa la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo amino y uno de los grupos carboxilato del complejo **cheldPt**. Las bandas correspondientes a los grupos carbonilo del complejo **cheldPt** sufren un pequeño desplazamiento batocrómico debido a la proximidad de la nucleobase una vez que esta se coordina al ión Pt(II) ($\nu_{\text{cheldPt}}=1703$

cm^{-1} , $\Delta\nu=25 \text{ cm}^{-1}$). En la zona correspondiente a la huella dactilar del complejo se observan algunas bandas del complejo, que no se ven afectadas por la coordinación a la nucleobase **pdA**, así como la aparición de nuevas bandas propias de esta misma.

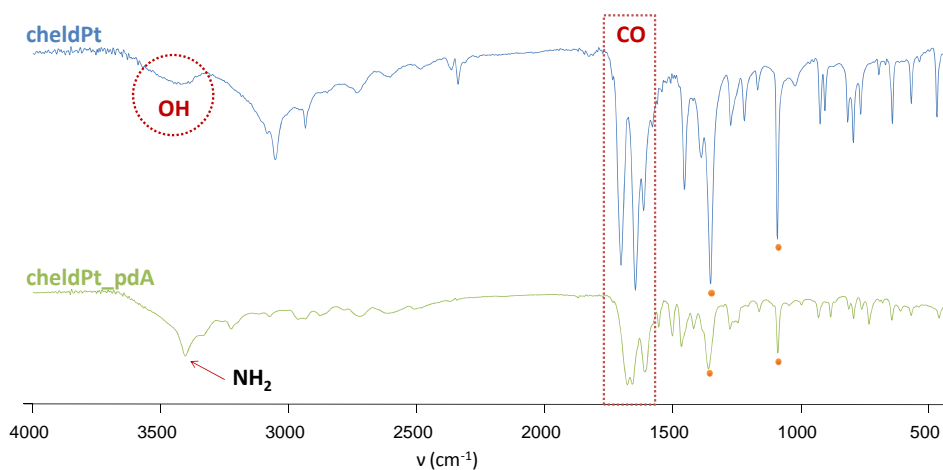


Figura 5.28. Espectros IR de los complejos **cheldPt** (azul) y **cheldPt_pdA** (verde) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.VII se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.VII. AE del complejo **cheldPt_pdA**.

[Pt(C₁₆H₁₅N₅O₅)](H₂O)_{1.7}		
	AE _{obtenido}	AE _{calculado}
% N	12.12	12.01
% C	32.90	32.86
% H	3.43	3.18

El espectro ^1H -RMN del complejo **cheldPt_pdA** (Figura 5.29) confirma la interacción en disolución del complejo **cheldPt** y la nucleobase **pdA**, y al igual que en el espectro del complejo **chelPt_mdA** se observa la presencia de ciertas impurezas en disolución. La interacción entre el complejo y la nucleobase se ve reflejada principalmente en el desplazamiento a campo bajo que experimentan las señales de los protones H2, H7 y H8 del doble anillo de la nucleobase **pdA** ($\Delta\delta_{\text{H2_pdA}}=0.08$ ppm, $\Delta\delta_{\text{H7_pdA}}=0.28$ ppm; $\Delta\delta_{\text{H8_pdA}}=0.25$ ppm). Por otra parte, la señal correspondiente a los protones piridínicos del complejo **cheldPt** sufre un desplazamiento a campo alto poco significativo ($\Delta\delta_{\text{H3 y H5_cheldPt}}=0.09$ ppm). Es muy significativo, al igual que ocurría en los complejos **cheldPd_mC** y **cheldPt_mC**, el desplazamiento a campo bajo que sufre el grupo amino de la nucleobase así como el cambio en su multiplicidad, observándose dos señales a 8.29 y 8.35 ppm ($\Delta\delta_{\text{H1_NH2}}=1.42$ ppm, $\Delta\delta_{\text{H2_NH2}}=1.48$ ppm). Esto es debido al carácter de doble enlace que adquiere el enlace C-NH₂, como ya se discutió en los casos anteriores.

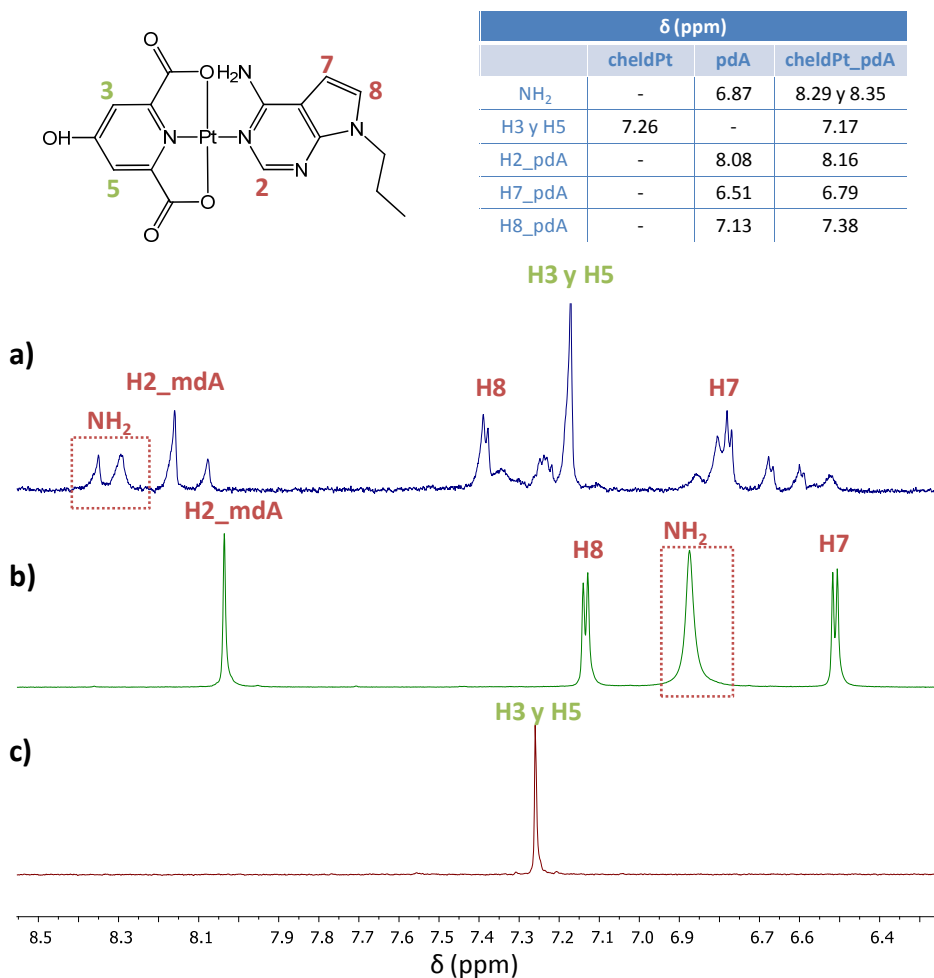


Figura 5.29. Espectros de ^1H -RMN (DMSO-d_6) y cambios más significativos en la zona aromática de a) **cheldPt_pdA**, b) **pdA** y c) **cheldPt**.

El complejo fue recrystalizado en *N,N*-dimetilformamida, dando lugar a cristales aptos para su estudio por DRX.

El complejo **cheldPt_pdA** cristaliza en el sistema monoclinico con un grupo espacial $\text{P2}_1/\text{c}$. La unidad asimétrica está constituida por dos unidades de $[\text{Pt}(\text{cheld})(\text{N1-pdA})]$, una molécula de agua y una de *N,N*-dimetilformamida (Figura 5.30). El átomo de platino presenta una geometría plano-cuadrada donde el ligando **cheld** se encuentra

coordinado de forma tridentada a través de los átomos N1 (Pt1-N1A 1.928 Å, Pt2-N1A' 1.924 Å), O1 (Pt1-O1A 2.036 Å, Pt2-O1A' 2.026 Å) y O5 (Pt1-O5A 2.054 Å, Pt2-O5A' 2.051 Å) y la nucleobase **pdA** a través del átomo N1 (Pt1-N1B 2.062 Å, Pt2-N1B' 2.053 Å).

La interacción entre el complejo **cheldPt** y la nucleobase **pdA** da lugar a una distribución coplanar (1.49°) de los anillos aromáticos de la unidad **cheld** y **pdA**, tal y como puede verse en la figura 5.30, y está favorecida por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo amino exocíclico de la nucleobase y uno de los átomos de oxígeno coordinados al átomo de platino del ligando **cheld** (N61B-H...O5A 2.764 Å, N61B'-H...O5A' 2.769 Å).

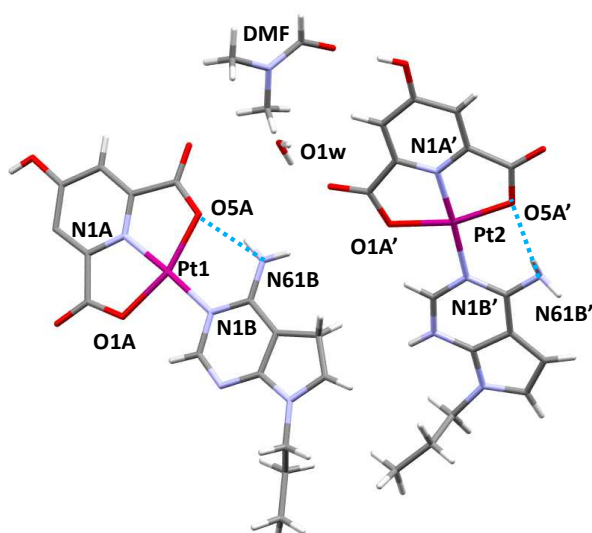


Figura 5.30. Entorno de coordinación del átomo del platino en la unidad asimétrica del complejo **cheldPt₂pdA** y enlaces de hidrógeno intramoleculares.

La estructura supramolecular del complejo está estabilizada por la formación de una serie de enlaces de hidrógeno intermoleculares (véase Tabla 5.VIII, Figura 5.31, a), y por interacciones π - π^* ($d_{\pi-\pi^*} = 3.410 \text{ \AA}$) que se forman gracias al apilamiento de los anillos piridínico del ligando y pirimidínico de la nucleobase de dos moléculas de complejo relacionadas entre sí por un centro de inversión (Figura 5.31, b).

Tabla 5.VIII. Distancias de enlaces de hidrógeno más relevantes en el complejo *cheldPt_pda*.

Distancias (Å)	
N61B-H...O5A	2.764
N61B'-H...O2A	2.809
N61B'-H...O5A'	2.769
O3A-H...O1s	1.716
O1w-H...O4A	3.029

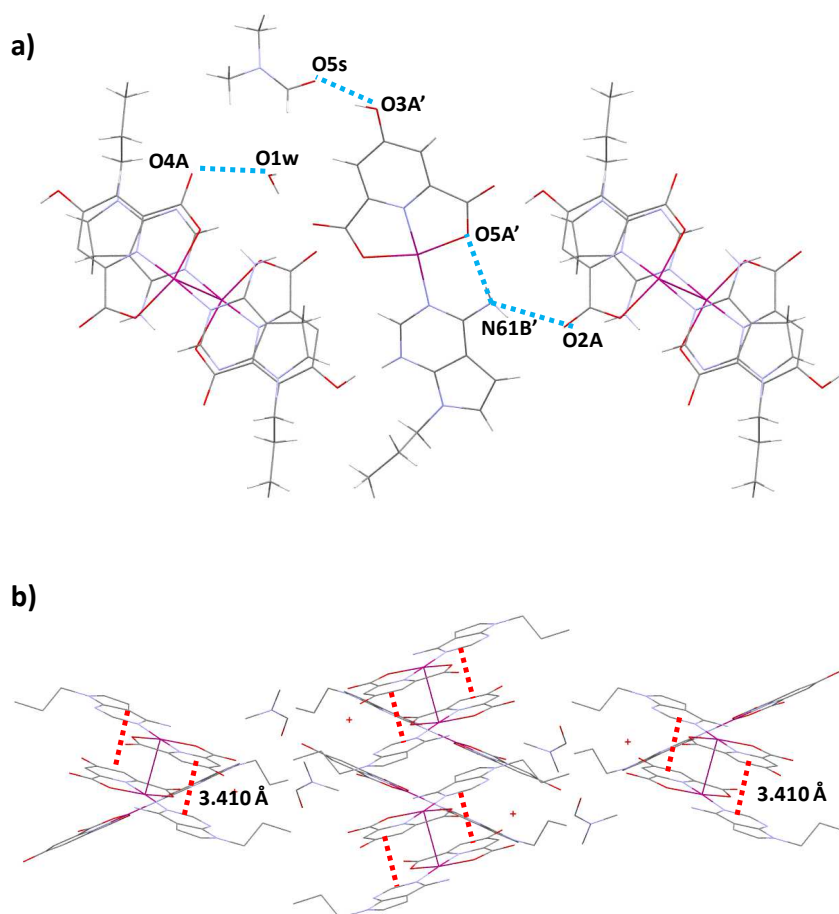


Figura 5.31.a) Enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares vistos a lo largo del eje b. b) Empaquetamiento e interacciones π - π^* en el complejo **cheldPt_pdA** vistos a lo largo del eje a. Se han omitido los átomos de hidrógeno para clarificar la imagen.

5.2 Síntesis de complejos de Cu(II) y ligandos hidroxohidroxo con nucleobases

Los estudios de interacción complejos de Cu(II) formados con ligandos hidroxohidroxo y las distintas nucleobases se han realizado exclusivamente para el complejo primario **1Cu**. Estos estudios se han realizado tanto en estado sólido como en disolución.

El ligando **cheld**, y sus derivados, han sido introducidos en secuencias de ADN para formar estructuras de doble hélice que contengan pares de bases artificiales de tipo **cheld_Cu_piridina**.^[8-10] Estas pares de bases, mediadas por un enlace de coordinación, han demostrado ser capaces de aumentar la estabilidad de las hebras, respecto de la misma hebra con una secuencia que posea un apareamiento de bases A-T en la misma posición.

De la misma manera, se ha estudiado la estabilidad de pares de base tipo **cheld_Cu_nucleobase** (adenina, citosina, guanina y timina) en disolución, observándose una estabilidad que sigue la tendencia adenina>citosina>guanina, y sin una estabilización para el caso de la timina.^[9]

Siguiendo la línea de este trabajo de tesis, en esta sección se describe la preparación y caracterización de complejos de tipo **cheld_Cu_nucleobases** capaces de formar pares de bases mediante la formación de enlaces de coordinación y de hidrógeno cooperativos. Los resultados obtenidos permiten un mayor entendimiento y comprensión de los resultados publicados previamente cuando este tipo de pares de bases artificiales fueron introducidos en estructuras de doble hebras de ADN.

Como ya se explicó al principio de este capítulo, hay que tener en cuenta la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilato presentes en el complejo **1Cu** y los grupos amino de las nucleobases modificadas (adenina, citosina y guanina), así como la posible repulsión electrostática entre estos mismos grupos carboxilato y los grupos carbonilo de algunas de las nucleobases (citosina, guanina y timina).

Como se ha ido viendo a lo largo de este capítulo, las nucleobases derivadas de la adenina son las más favorables para formar complejos que posean enlaces de coordinación y de hidrógeno cooperativos de tipo Watson-Crick (W-C), que favorecen la distribución coplanar de las unidades. De la misma manera, se ha observado la formación de complejos con la nucleobase citosina (**cheldPd_mC** y **cheldPt_mC**) con una distribución no-coplanar de las unidades favorecida por las repulsiones entre los grupos presentes (Figura 5.32).

Con el objetivo de demostrar todas estas consideraciones se han sintetizado y caracterizado complejos de **1Cu** y las nucleobases modificadas N3-metil-citosina (**mC**), N9-etil-timina (**eA**), N9-propil-7-deaza-adenina (**pdA**) y N9-propil-guanina (**pG**). Desafortunadamente no se han obtenido complejos entre la timina y **1Cu**, probablemente debido las repulsiones electrostáticas anteriormente descritas.

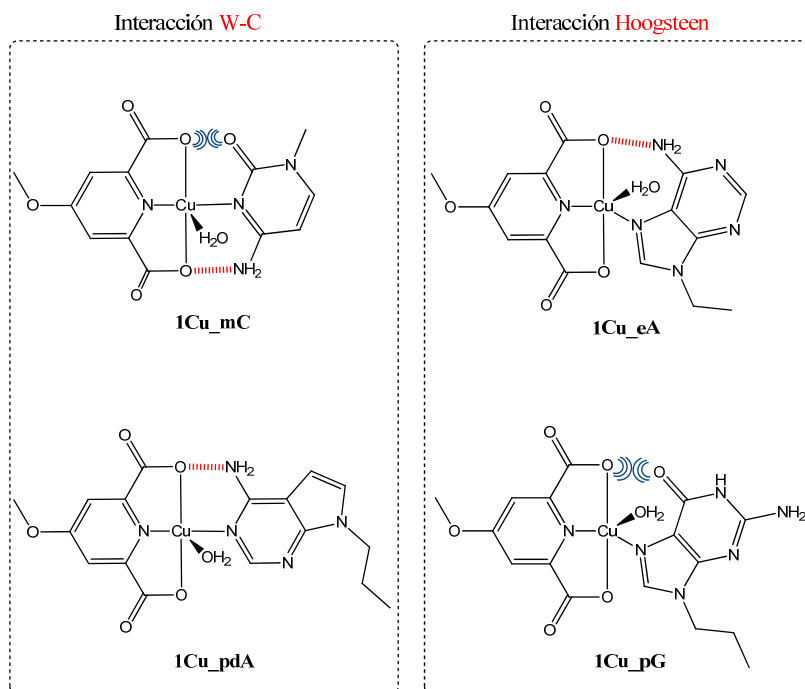


Figura 5.32. Complejos sintetizados con **1Cu** y las nucleobases modificadas. Enlaces de hidrógeno susceptibles de formarse y posibles repulsiones electrostáticas.

5.2.1. $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})(\text{N3-mC})]$, $\mathbf{1Cu_mC}$

El complejo $\mathbf{1Cu_mC}$ se obtuvo tras hacer reaccionar en caliente una disolución acuosa de N1-metilcitosina (\mathbf{mC}) con $\mathbf{1Cu}$ (Figura 5.33). Después de unos días de evaporación lenta del disolvente se obtuvo un polvo cristalino que se caracterizó en estado sólido (IR, AE y DRX) y en disolución (UV-visible).

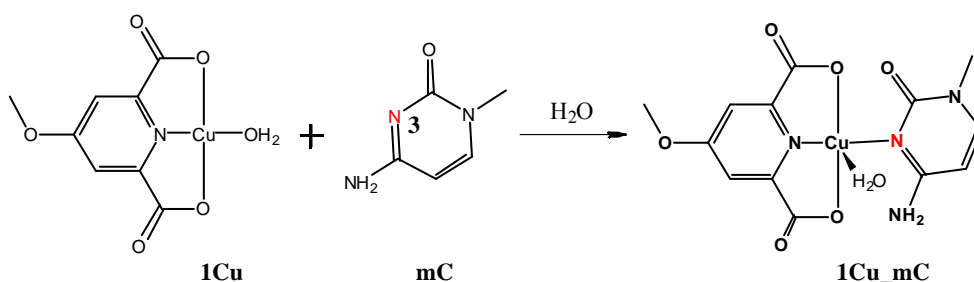


Figura 5.33. Esquema de síntesis del complejo $\mathbf{1Cu_mC}$.

La caracterización en estado sólido del complejo $\mathbf{1Cu_mC}$ se llevó a cabo mediante IR y AE.

En la figura 5.34 se recogen los espectros IR del complejo $\mathbf{1Cu}$ y $\mathbf{1Cu_mC}$. El cambio más significativo que se puede observar es el aumento en intensidad que se observa en las bandas registradas en la zona entre $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a la vibración de tensión de los grupos -OH presentes en la molécula de agua coordinada al ión Cu(II) , así como a la vibración de tensión del grupo -NH_2 presente en la nucleobase \mathbf{mC} . La amplitud y superposición que presentan las bandas en esta zona no permite discernir claramente la banda correspondiente al grupo amino, por lo que es difícil determinar la posible formación de enlaces de hidrógeno en los que intervenga este grupo. A su vez, tiene lugar un desplazamiento batocrómico de la banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos carbonilo, -CO , tanto del complejo $\mathbf{1Cu}$ como de la nucleobase \mathbf{mC} ($\nu_{\text{CO}}=1645 \rightarrow 1609\text{ cm}^{-1}$), así como un ensanchamiento de la señal. Es posible

observar nuevas bandas correspondientes a la nucleobase en la zona correspondiente a las vibraciones de tensión de los anillos aromáticos ($1200-1500\text{ cm}^{-1}$) así como en la huella dactilar del complejo ($500-700\text{ cm}^{-1}$). Algunas de las bandas correspondientes a las vibraciones de tensión del complejo permanecen invariables.^[11]

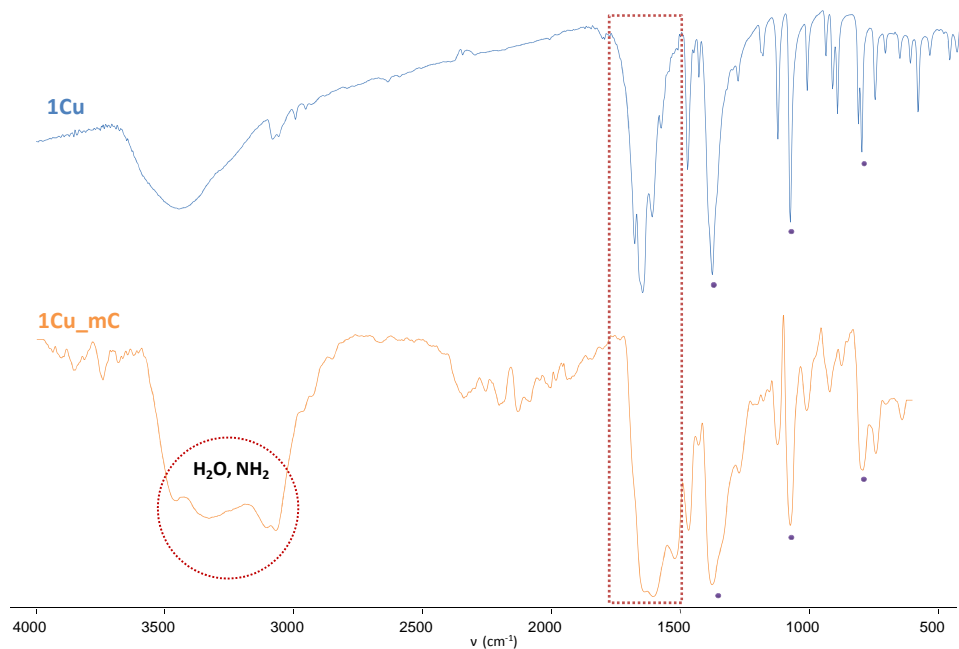


Figura 5.34. Espectros IR de los complejos **1Cu** (azul) y **1Cu_mC** (naranja) con algunos de los cambios más significativos así como algunas señales invariables (●).

En la tabla 5.IX se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.IX. AE del complejo **1Cu_mC**.

[Cu(C₁₃H₁₂N₄O₆)](H₂O)_{3.7}		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	12.54	12.43
% C	34.55	34.66
% H	4.50	4.34

El estudio en disolución de la interacción entre el complejo **1Cu** y la nucleobase **mC** se llevó a cabo mediante espectroscopia UV-vis. En la figura 5.35 se recoge la evolución de los espectros cuando ambas especies se encuentran aisladas en disolución y cuando éstas interaccionan. Como podemos observar, la interacción del complejo **1Cu** con la nucleobase **mC** produce un efecto batocrómico, es decir un desplazamiento del máximo de absorción a longitudes de onda mayores y una disminución de la intensidad de la banda situada a 250 nm ($\Delta\lambda=18$ nm, $\Delta I=0.107$ u.a).

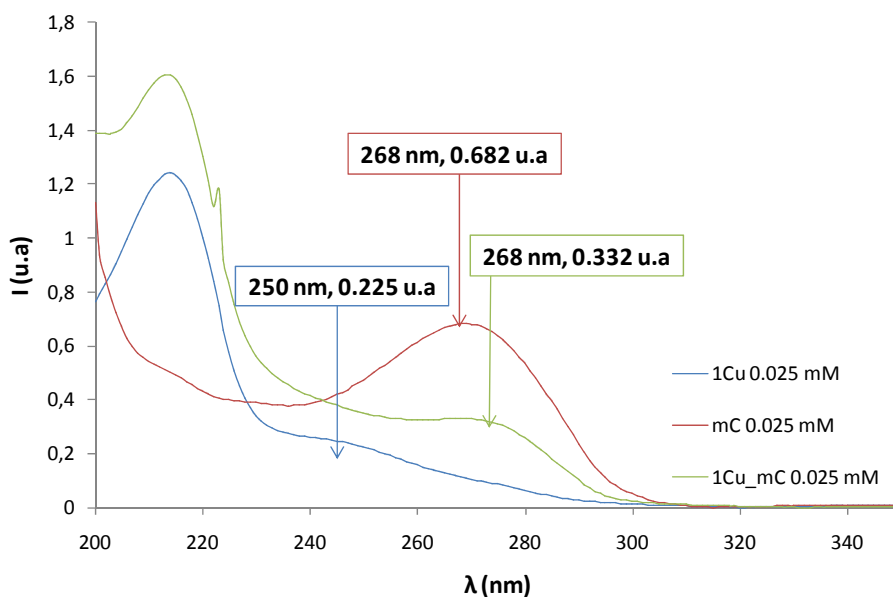


Figura 5.35. Espectros UV-visible de **1Cu** (azul), **mC** (rojo) y **1Cu_mC** (verde).

La estructura molecular de **1Cu_mC** consiste en una especie mononuclear de $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})(\text{N3-mC})]$ que se encuentra rodeada por tres moléculas de agua. El átomo de cobre presenta una coordinación octaédrica distorsionada donde el ligando **1** actúa en forma tridentada coordinándose al cobre por los átomos N1A (Cu-N1A 1.893 Å), O1A (Cu-O1A 1.977 Å) y O5A (Cu-O5A 2.027 Å) situados en el plano ecuatorial del octaedro. La nucleobase 1-metilcitosina actúa como ligando neutro en forma bidentada a través de los átomos N3B del anillo pirimidínico en posición basal (Cu-N3B 1.956 Å) y el átomo O1B del grupo carbonilo en posición apical (Cu-O1B 2.712 Å); modo de coordinación que origina distancias de enlace más pequeñas a las descritas previamente en bibliografía.^[12] Una molécula de agua en posición apical opuesta al átomo de oxígeno de **mC**, completa la esfera de coordinación del átomo de cobre (Cu-O1W 2.407 Å) (Figura 5.36).

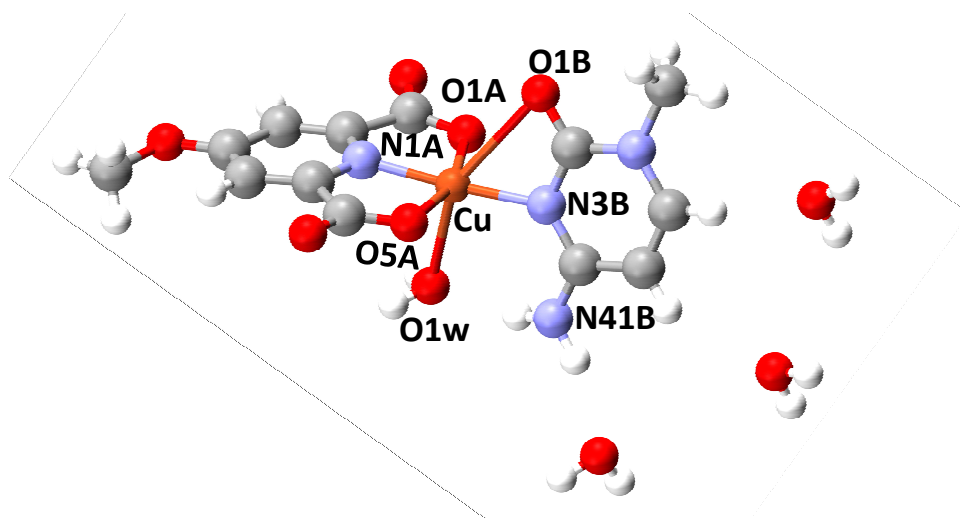


Figura 5.36. Entorno de coordinación del átomo de cobre en el complejo **1Cu_mC**.

La estructura del complejo se estabiliza por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular en el que participan el átomo de hidrógeno enlazado a N41B de **mC** como dador y el átomo O1w de la molécula de agua en posición apical como aceptor (N41B-H...O1w 1.953 Å). La estructura supramolecular del complejo se ve estabilizada por las interacciones de tipo π - π^* que se establecen entre los anillos piridínicos del ligando **1** (distancia entre centroides de 3.596 Å) (Figura 5.37, a). El ángulo formado entre los planos que contienen el ligando **1** y la nucleobase **mC** tiene un valor de 77.73 ° confirmando la disposición no coplanar del complejo (Figura 5.37, b).

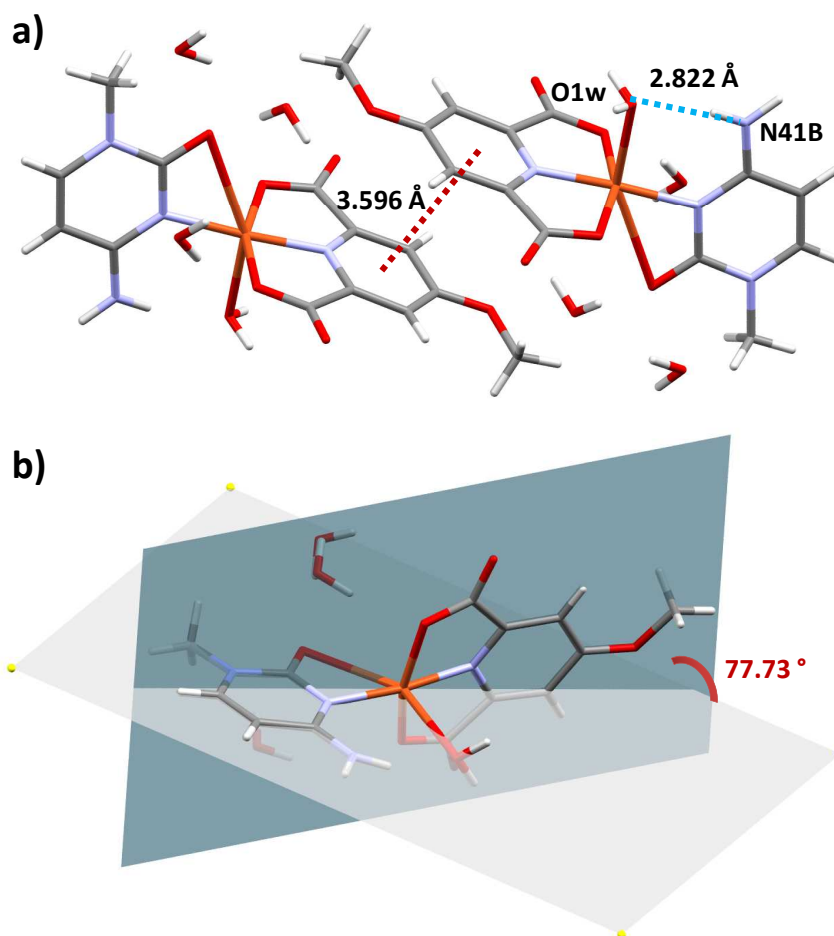


Figura 5.37. a) Enlace de hidrógeno intramolecular e interacciones π - π^* intermoleculares del complejo **1Cu_mC**. b) Ángulo que forman los planos del complejo **1Cu** y **mC**.

5.2.2. $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})(N7\text{-eA})]$, $\mathbf{1Cu_eA}$

La síntesis de $\mathbf{1Cu_eA}$ se llevó a cabo en disolución acuosa al adicionar gota a gota sobre un disolución en caliente de 9-etiladenina (\mathbf{eA}) otra de $\mathbf{1Cu}$ (Figura 5.38). El precipitado que se obtiene en forma de polvo se recrystalizó en *N,N*-dimetilformamida permitiendo obtener cristales adecuados para la determinación estructural del complejo por DRX.

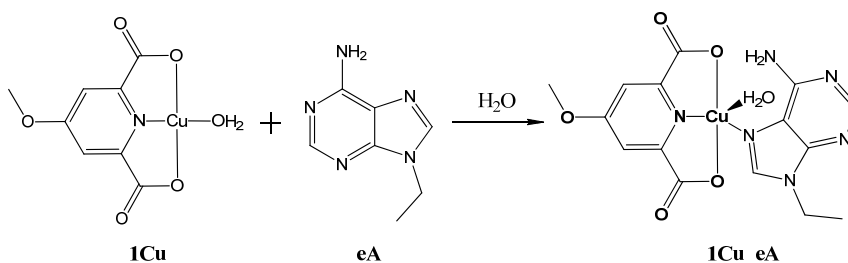


Figura 5.38. Esquema de síntesis del complejo $\mathbf{1Cu_eA}$.

La caracterización en estado sólido del complejo $\mathbf{1Cu_eA}$ se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro IR del complejo $\mathbf{1Cu_eA}$ (Figura 5.39) se observa una banda ancha entre $3500\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ correspondiente a las vibraciones de tensión del grupo -NH_2 de la nucleobase y del agua coordinada al ión Cu(II) . La banda ancha que se observa a 3153 cm^{-1} , correspondiente al grupo -NH_2 de la nucleobase \mathbf{eA} aparece como una única señal que descartaría la posible formación de enlaces de hidrógeno en este complejo $\mathbf{1Cu_eA}$ cuando se encuentra en estado sólido. A su vez, tiene lugar un desplazamiento batocrómico, así como un ensañamiento, de la doble banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos carbonilo, -CO , tanto del complejo $\mathbf{1Cu}$ como de la nucleobase \mathbf{eA} ($\nu_{\text{CO}}=1645 \rightarrow 1594\text{ cm}^{-1}$). También es posible observar la aparición de nuevas bandas correspondientes a las vibraciones de tensión de los anillos aromáticos de la nucleobase ($1389, 1340, 1295\text{ cm}^{-1}$), así como algunas de las bandas

correspondientes a las vibraciones de tensión del complejo que permanecen invariables (500-700 cm^{-1}).

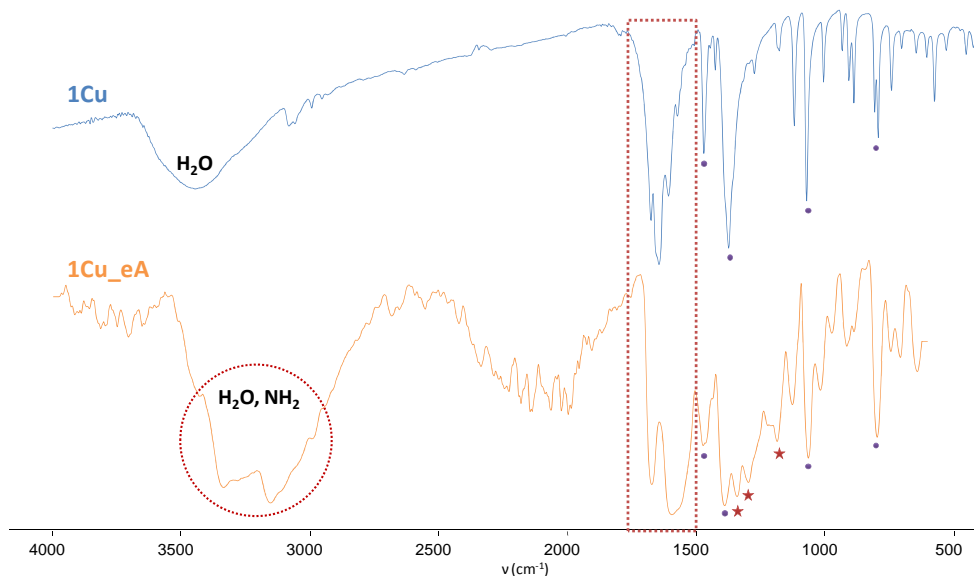


Figura 5.39. Espectros IR de los complejos **1Cu** (azul) y **1Cu_eA** (naranja) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

El estudio en disolución de la interacción entre el complejo **1Cu** y la nucleobase **eA** se llevó a cabo mediante espectroscopia UV-vis. En la figura 5.40 se recoge la evolución de los espectros cuando ambas especies se encuentran aisladas en disolución y cuando éstas interaccionan. Como podemos observar, la interacción del complejo **1Cu** con la nucleobase **eA** produce un efecto batocrómico, es decir un desplazamiento del máximo de absorción a longitudes de onda mayores y un aumento de la intensidad de la banda correspondiente al complejo situada a 250 nm ($\Delta\lambda=8$ nm, $\Delta I=0.1589$ u.a). Así como un leve desplazamiento hipsocrómico, junto con el equivalente aumento de intensidad, de la banda de la nucleobase centrada a 261 nm ($\Delta\lambda=3$ nm, $\Delta I=0.1081$ u.a).

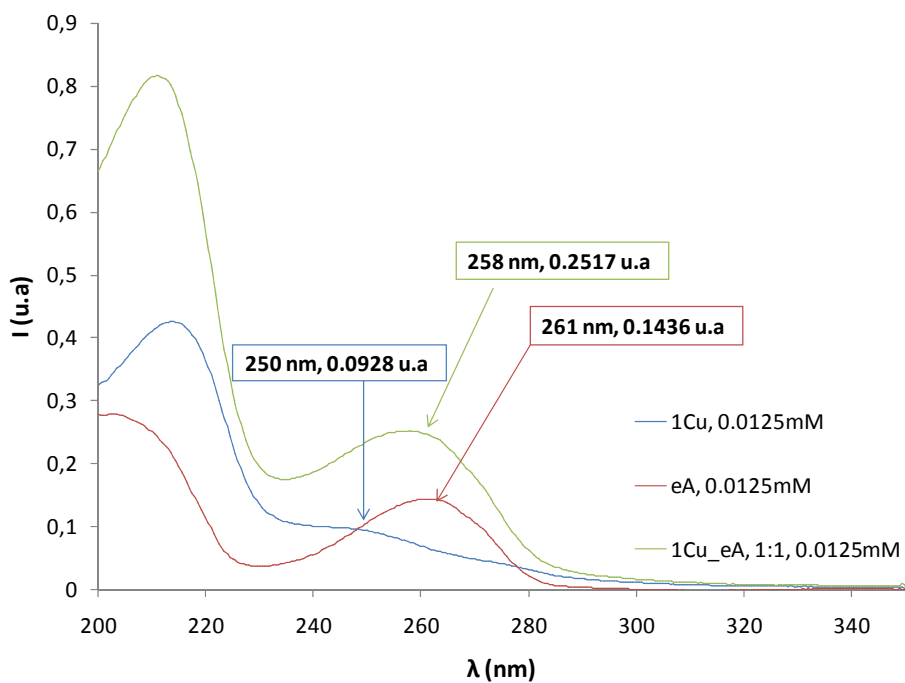


Figura 5.40. Espectros UV-visible de **1Cu** (azul), **eA** (rojo) y **1Cu_eA** (verde).

En la tabla 5.X se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.X. AE del complejo **1Cu_eA**.

[Cu(C₁₅H₁₄N₆O₅)](H₂O)_{7.6}		
	A_Eobtenido	A_Ecalculado
% N	15.45	14.94
% C	31.84	32.03
% H	4.93	5.30

El complejo $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})(\text{N7-eA})]\cdot 6(\text{H}_2\text{O})$ cristaliza en el sistema monoclinico, grupo espacial $P2_1/n$. El átomo de cobre presenta un entorno de coordinación de geometría de pirámide de base cuadrada donde el ligando **1** actúa de forma tridentada a través de los átomos N1 (Cu1-N1' 1.93 Å, Cu2-N1 1.924 Å), O1 (Cu1-O1A' 2.038 Å, Cu2-O1A 1.996 Å) y O5 (Cu1-O5A' 2.007 Å, Cu2-O5A 2.026 Å) ocupando tres de las posiciones basales de la pirámide; y la N9-etiladenina (**eA**) se coordina al átomo de cobre a través de N7 (Cu1-N7B' 1.963 Å, Cu2-N7B 2.000 Å) ocupando la cuarta posición basal. Una molécula de agua en posición apical completa la esfera de coordinación del átomo metálico (Cu1-O1w' 2.245 Å, Cu2-O1w 2.288 Å) (Figura 5.41, a).

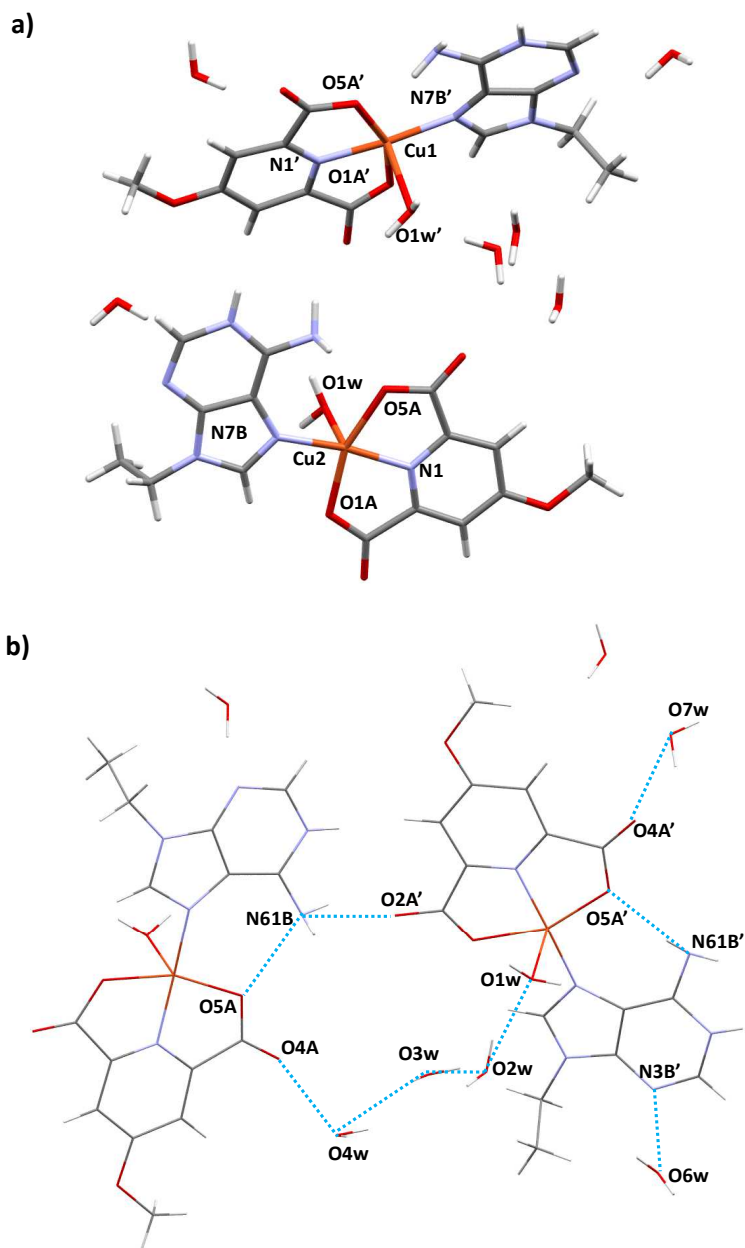


Figura 5.41. a) Entorno de coordinación del cobre en el complejo **1Cu_eA**. b) Átomos implicados en la red de enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares de **1Cu_eA**.

La interacción entre complejo y nucleobase tiene lugar de forma casi coplanar, siendo el ángulo que forman el plano que contiene **1Cu** y el plano que contiene **eA** de 6.97° en la unidad de Cu1 y de 2.18° en la unidad de Cu2. Esta interacción coplanar está reforzada en cada una de las unidades por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre los átomos N61B y O5 (N61B'-H...O5A' 2.808 Å, N61B-H...O5A 2.730 Å). Además de este enlace de hidrógeno, la estructura se estabiliza mediante la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre las dos unidades (N61B-H...O2A' 2.791 Å) y entre estas unidades y las moléculas de agua que las rodean (Figura 5.41, b; Tabla 5.XI).

Este modo de coordinación del ión Cu(II) a la nucleobase, así como la participación del grupo amino exocíclico en la formación de enlaces de hidrógeno que estabilicen la estructura de la molécula ha sido descrito previamente en bibliografía.^[13]

Tabla 5.XI. Distancias de enlaces de hidrógeno en el complejo **1Cu-eA**.

Distancias (Å)	
N61B-H...O5A	2.730
N61B-H...O2A'	2.791
N61B'-H...O5A'	2.808
O6w-H...N3B'	2.807
O4w-H...O4A	2.919
O7w-H...O4A'	2.863
O2w-H...O1w	2.846
O3w-H...O2w	2.876
O3w-H...O4w	2.882

5.2.3. $[\text{Cu}(\text{1})(\text{H}_2\text{O})(\text{N1-pdA})]$, 1Cu_pdA

El complejo 1Cu_pdA se obtuvo tras adicionar gota a gota sobre una disolución acuosa de pdA otra de 1Cu y mantener la mezcla de reacción en agitación a 60°C durante 30 minutos (Figura 5.42). El complejo precipitó en forma de polvo azul que por recristalización en *N,N*-dimetilformamida permitió obtener cristales aptos para su estudio estructural por DRX.

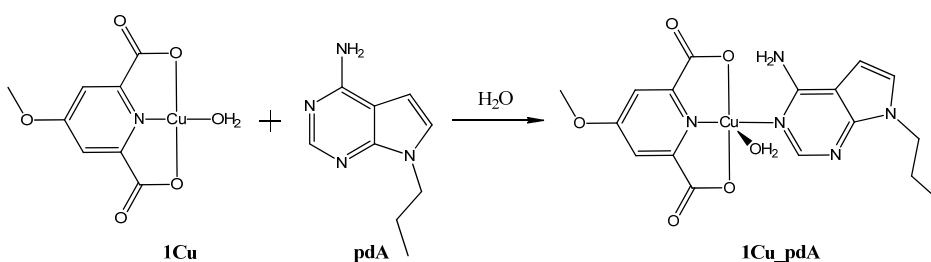


Figura 5.42. Esquema de síntesis del complejo 1Cu_pdA .

La caracterización en estado sólido del complejo 1Cu_pdA se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro de IR del complejo 1Cu_pdA se observan las bandas más significativas del complejo 1Cu y las de la nucleobase pdA (Figura 5.43), desplazadas como resultado de la coordinación de la nucleobase al ión $\text{Cu}(\text{II})$. En el espectro IR del complejo 1Cu_pdA se la banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos $-\text{OH}$ de la molécula de agua que se encuentra en la esfera de coordinación del complejo (3592 cm^{-1}); la definición de esta banda comparada con su análogo en el complejo 1Cu sugiere la participación de esta molécula de agua en la formación de enlaces de hidrógeno que eviten la libre rotación de los grupos $-\text{OH}$ de la misma. Asimismo, se observan dos bandas correspondientes con las vibraciones de tensión del grupo $-\text{NH}_2$ de la nucleobase ($\nu=3351$ y 3190 cm^{-1}); hecho que sugiere la formación de un enlace de hidrógeno entre dicho grupo amino y el grupo carboxilato del complejo al aparecer las

bandas a frecuencias diferentes. Esta formación de un enlace de hidrógeno entre la nucleobase **pdA** y el complejo se ve apoyada por el desplazamiento batocrómico que se observa en el sobretono de los grupos carbonilo ($\nu=3085 \rightarrow 2954 \text{ cm}^{-1}$) se produce un leve desplazamiento batocrómico en las bandas correspondientes a la vibraciones de tensión de los grupos carbonilo del complejo **1Cu**, así como el desdoblamiento de la señal ($\nu=1684 \rightarrow 1673 \text{ cm}^{-1}$), ya que al formarse el enlace de hidrógeno con uno de los grupos $-\text{CO}$ de los grupos carboxilato del complejo implicaría un ligero cambio en la vibración de tensión de su enlace diferenciándolo consecuentemente del otro. Tanto en la zona de las vibraciones de tensión de los anillos aromáticos ($1200 -1500 \text{ cm}^{-1}$) como en la huella dactilar del complejo ($500-700 \text{ cm}^{-1}$) se observa la aparición de nuevas bandas, correspondientes a la nucleobase coordinada, siendo muy significativa la banda que se observa a 1361 cm^{-1} . Otras bandas, correspondientes al complejo **1Cu** permanecen invariables.

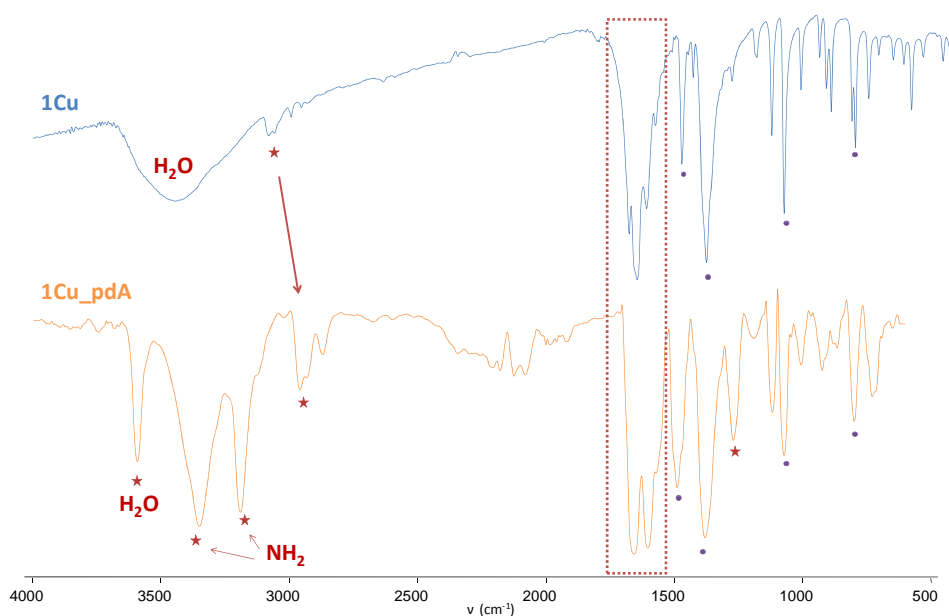


Figura 5.43. Espectros IR de los complejos **1Cu** (azul) y **1Cu_pdA** (naranja) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.XII se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.XII. AE del complejo **1Cu_pdA**.

[Cu(C₁₇H₁₇N₅O₅)](H₂O)₂		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	14.70	14.87
% C	43.18	43.35
% H	4.92	4.49

El estudio en disolución de la interacción entre el complejo **1Cu** y la nucleobase **pdA** se llevó a cabo mediante espectroscopia UV-vis. En la figura 5.44 se recoge la evolución de los espectros cuando ambas especies se encuentran aisladas en disolución y cuando éstas interaccionan. Como podemos observar, la interacción del complejo **1Cu** con la nucleobase **pdA** produce un significativo efecto batocrómico del máximo de absorción correspondiente al complejo situado a 250 nm, así como un aumento en la intensidad de la banda ($\Delta\lambda=15.5$ nm, $\Delta I=0.0729$ u.a). El máximo centrado a 274 nm de la nucleobase, al igual que en los casos anteriores sufre un desplazamiento hipsocrómico, así como el equivalente aumento de intensidad una vez la nucleobase interacciona con el complejo metálico ($\Delta\lambda=8.5$ nm, $\Delta I=0.0716$ u.a).

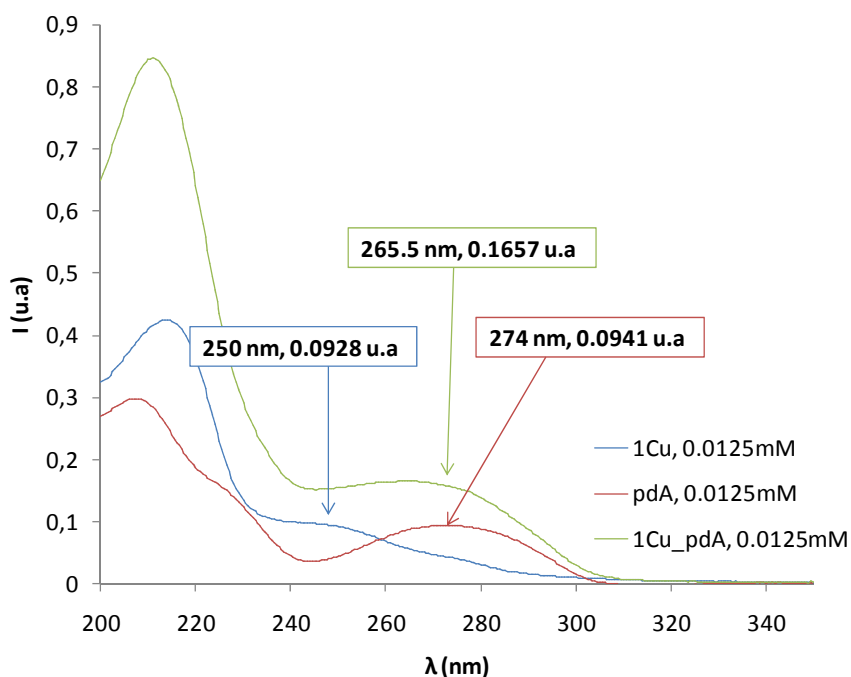


Figura 5.44. Espectros UV-visible de **1Cu** (azul), **pdA** (rojo) y **1Cu_{pdA}** (verde).

El complejo $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})(\text{N1-pdA})] \cdot (\text{H}_2\text{O})$ cristaliza en el sistema triclinico, grupo espacial P-1 (Figura 5.45, b). El átomo de cobre se encuentra situado en un entorno de pirámide de base cuadrada distorsionada donde el ligando **1** actúa de forma tridentada coordinándose al cobre por los átomos N1A (Cu-N1A 1.920 Å), O1A (Cu-O1A 2.127 Å) y O5A (Cu-O5A 2.0364 Å) ocupando tres de las posiciones basales. La nucleobase 9-propil-7-deazaadenina se coordina al átomo de cobre a través de N1B ocupando la cuarta posición basal de la pirámide (Cu-N1B 1.9972 Å). La posición apical está ocupada por una molécula de agua completando la esfera de coordinación del átomo de cobre (Cu-O1W 2.211 Å) (Figura 5.45, a).

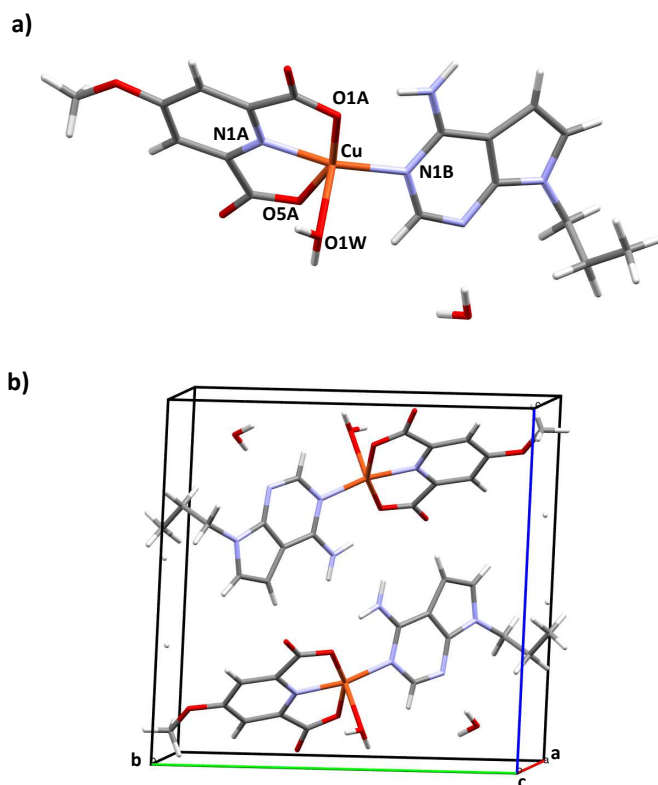


Figura 5.45. a) Entorno de coordinación de los átomos de cobre en el complejo **1Cu_pdA**. b) Celdilla unidad de **1Cu_pdA** en el sistema triclinico que contiene dos moléculas de complejo y dos de agua.

La estructura del complejo está estabilizada por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre los átomos O5A del ligando **1** y el átomo de hidrógeno enlazado a N61B de la nucleobase (N61B-H \cdots O5A 2.769 Å) y otro intermolecular entre el átomo N3B de la nucleobase y la molécula de agua de cristalización más cercana a éste (O2W-H \cdots N3B 2.956 Å) (Figura 5.46, a). Aunque lo más lógico sería pensar que la formación del enlace de hidrógeno intramolecular estaría asociado a una interacción coplanar entre el complejo **1Cu** y la nucleobase **pdA**, esta tiene lugar de forma no coplanar siendo el ángulo que forman los planos que los contiene de 45.67° (Figura 5.46, b).

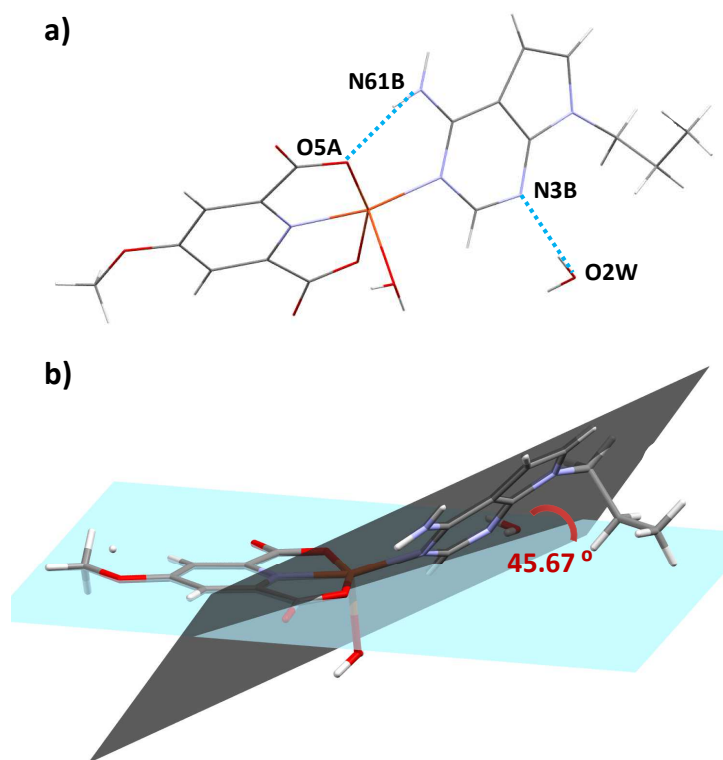


Figura 5.46. a) Átomos que intervienen en la formación de enlaces de hidrógeno del complejo **1Cu-pdA**. b) Ángulo que forman los planos que contienen el complejo **1Cu** y la nucleobase **pdA**.

5.2.4. [Cu(1)(H₂O)(N7-pG)], 1Cu_pG

La obtención de **1Cu_pG** se llevó a cabo al hacer reaccionar una disolución acuosa de 9-propilguanina (**pG**) con **1Cu** manteniendo la mezcla de reacción a 65°C y con agitación durante 30 minutos (Figura 5.47). Tras unos días de evaporación lenta del disolvente fue posible obtener cristales del complejo que permitieron su estudio estructural por DRX.

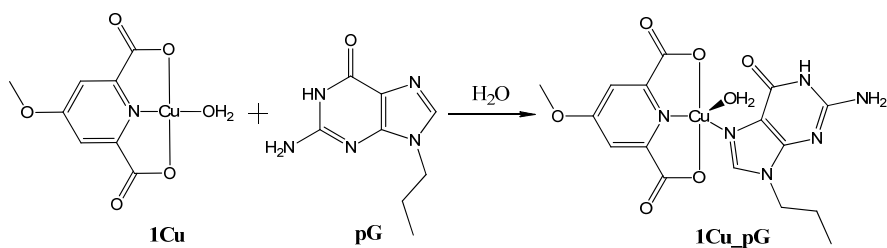


Figura 5.47. Esquema de síntesis del complejo **1Cu_pG**.

La caracterización en estado sólido del complejo **1Cu_pdA** se llevó a cabo mediante IR y AE.

En el espectro de IR del complejo **1Cu_pG** (Figura 5.48) se observa en la zona comprendida entre 3000-3500 cm⁻¹ del espectro, la banda correspondiente a la vibración de tensión de los grupos -OH de la molécula de agua que se encuentra coordinada al ión Cu(II) (3459 cm⁻¹) que al igual que en el complejo **1Cu_pdA** sugiere la participación de esta molécula de agua en la formación de enlaces de hidrógeno. Se observa un desplazamiento batocrómico de la banda correspondiente a la vibraciones de tensión de los grupos carbonilo del complejo **1Cu**, así como el ensanchamiento de la señal debido a la presencia del grupo -CO de la nucleobase coordinada ($\nu=1684 \rightarrow 1638$ cm⁻¹). Tanto en la zona de las vibraciones de tensión de los anillos aromáticos (1200 - 1500 cm⁻¹) como en la huella dactilar del complejo (500-700 cm⁻¹) se observa la aparición de nuevas bandas, correspondientes a la nucleobase coordinada (1361 y 894 cm⁻¹), así como la invariabilidad de algunas de las bandas correspondientes al complejo **1Cu**.

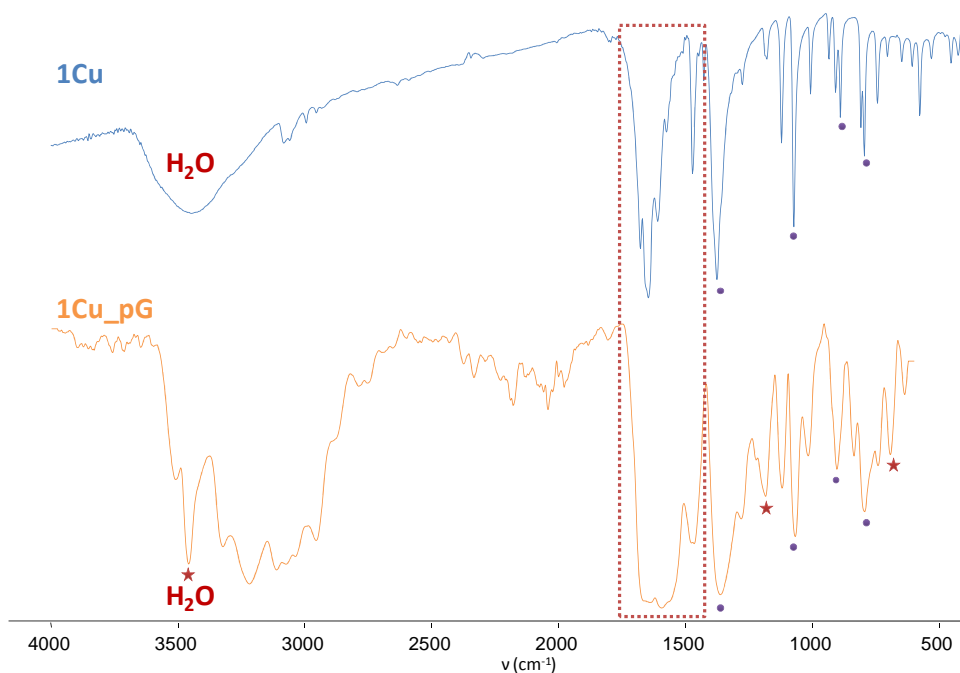


Figura 5.48. Espectros IR de los complejos **1Cu** (azul) y **1Cu_pG** (naranja) con algunos de los cambios más significativos así como otras señales invariables (●).

En la tabla 5.XIII se recogen los valores teóricos y calculados para la formulación propuesta tras realizar el AE del complejo.

Tabla 5.XIII. AE del complejo **1Cu_pG**.

Cu(C₁₆H₁₈N₆O₇)](H₂O)_{0.7}		
	AE_{obtenido}	AE_{calculado}
% N	17.12	17.41
% C	39.71	39.82
% H	4.22	4.05

El complejo $[\text{Cu}(\mathbf{1})(\text{H}_2\text{O})(\text{N7-pG})]$ cristaliza en el sistema monoclinico, grupo espacial Cc. El átomo de cobre adopta una geometría de pirámide de base cuadrada, en la que el ligando **1** actúa en forma tridentada a través de los átomos N1 (Cu-N1 1.909 Å), O1 (Cu-O1A 2.053 Å) y O5 (Cu-O5A 2.046 Å) ocupando tres de las posiciones basales de la pirámide; y a su vez, la nucleobase **pG** se coordina al átomo de cobre a través de N7 (Cu-N7B 1.981 Å) ocupando la cuarta posición de la base de la pirámide. La quinta posición de coordinación situada en el vértice de la pirámide está ocupada por una molécula de agua (Cu-O1w 2.160 Å) (Figura 5.49).

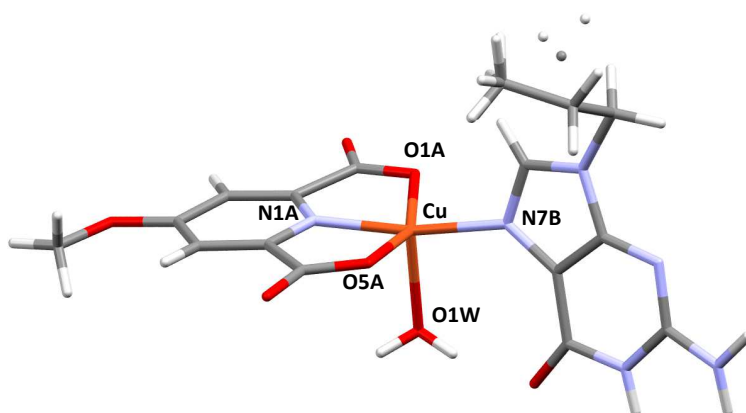


Figura 5.49. Entorno de coordinación del átomo de cobre en el complejo **1Cu_pG**.

La estructura del complejo está estabilizada por la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre la molécula de agua coordinada al átomo de cobre, O1W, y el átomo de oxígeno de la nucleobase, O61B (O1W-H...O61B 2.688 Å); y otro intermolecular entre los átomos N21B de la nucleobase y el átomo de oxígeno del grupo carboxilato de una molécula de ligando **1** próxima en el espacio, O4A' (N31B-B...O4A' 2.987 Å) (Figura 5.50, a). El complejo **1Cu** y la nucleobase **pdA** presentan una interacción no coplanar, casi perpendicular (80.41°) (Figura 5.50, b).

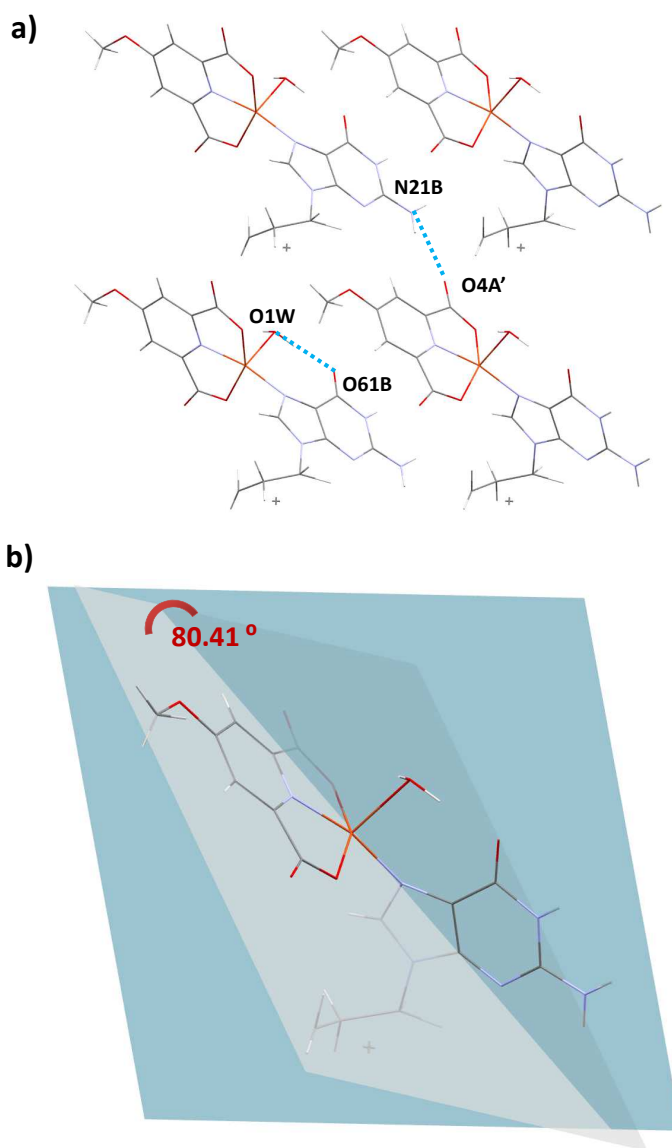


Figura 5.50. a) Átomos que intervienen en la formación de enlaces de hidrógeno del complejo **1Cu-pG**. b) Ángulo que forman los planos que contienen el complejo **1Cu** y la nucleobase **pG**.

Bibliografía

- [1] R. K. O. Sigel, E. Freisinger, S. Metzger, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12000–12007.
- [2] A. Galstyan, P. J. Sanz Miguel, J. Wolf, E. Freisinger, B. Lippert, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2011**, *2011*, 1649–1656.
- [3] S. Siebel, C. Dammann, P. J. Sanz Miguel, T. Drewello, G. Kampf, N. Teubner, P. J. Bednarski, E. Freisinger, B. Lippert, *Chemistry* **2015**, *21*, 17827–43.
- [4] A. Schreiber, M. S. Lüth, A. Erxleben, E. C. Fusch, B. Lippert, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 4124–4132.
- [5] P. Nh, L. L-n, **1999**, *2*, 2306–2311.
- [6] B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 487–516.
- [7] O. Golubev, G. Turc, T. Lönnberg, *J. Inorg. Biochem.* **2016**, *155*, 36–43.
- [8] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [9] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364–12367.
- [10] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 13–25.
- [11] S. Kalyanaraman, V. Krishnakumar, K. Ganesan, *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2007**, *66*, 1340–1346.
- [12] A. Višnjevac, N. Biliškov, B. Žinić, *Polyhedron* **2009**, *28*, 3101–3109.
- [13] J. M. González-Pérez, D. Choquesillo-Lazarte, A. Domínguez-Martín, H. El Bakkali, M. E. García-Rubiño, I. Pérez-Toro, E. Vílchez-Rodríguez, A. Castiñeiras, V. M. Nurchi, J. Niclós-Gutiérrez, *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *151*, 75–86.



Capítulo VI
Interacción
complejo-ADN



En este capítulo se discute una de las estrategias para la formación de híbridos metal-oligonucleótido, concretamente, la interacción entre oligonucleótidos y algunos de los complejos metálicos primarios de Pd(II) y Cu(II) sintetizados previamente.

Los oligonucleótidos frente a los que se estudiará esta interacción complejo-ADN consisten en secuencias homogéneas formadas por quince bases, canónicas como la adenina (A), la citosina (C) o la guanina (G), y no canónicas como la 7-deaza-adenina (${}^7\text{C}_A$). La formación de los híbridos complejo-ADN se llevará a cabo mediante un proceso de auto-asociación donde los complejos interaccionarán con posiciones específicas de las nucleobases mediante la formación de un enlace de coordinación, y, en algunos, enlaces de hidrógeno cooperativos, y como ya se estudió en el Capítulo V (Figura 6.1).

Estos estudios se han realizado exclusivamente para los complejos primarios **cheldPd** y **1Cu**, ya que se obtuvo más información y detalles sobre su interacción con las nucleobases modelo (Capítulo V). No se han llevado a cabo frente a complejos primarios de Pt(II) debido a la falta de tiempo para realizar esos estudios, pero ha quedado de manifiesto que junto al Pd(II) estos complejos metálicos son capaces de interaccionar mediante la formación de enlaces de coordinación entre un complejo de estos iones metálicos y nucleobases como la citosina (C) y la adenina (A), al contrario de lo que proponen algunos estudios en bibliografía.^[1,2]

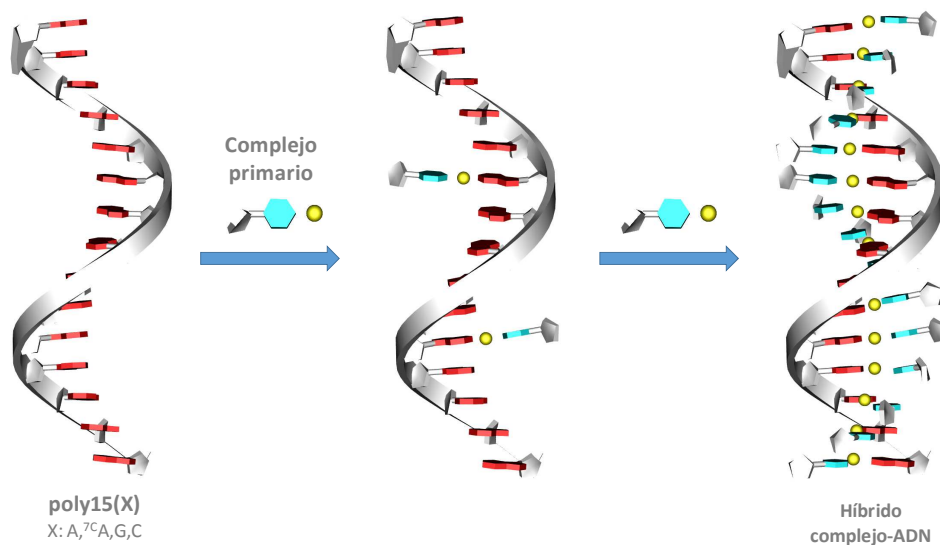


Figura 6.1. Representación de la formación de un híbrido complejo-ADN como consecuencia de un proceso de auto-asociación entre los complejos primario y una monohebra de ADN.

Como se ha mencionado previamente a lo largo de esta tesis, en la 7-deazaadenina (⁷C_A) se ha reemplazado el átomo N7 por un grupo CH con respecto a la adenina. De esta forma se evita la formación de un enlace metal-N7 (favorable en el caso de la adenina)^[3] y se favorece la coordinación del complejo metálico al N1, localizado en la cara Watson-Crick de las nucleobases de la monohebra.

El complejo **cheldPd** se ha ensayado frente a las monohebras **poly15A** y **poly15(⁷C_A)** al tratarse de las nucleobases frente a las cuales ha sido posible ver una interacción clara tras obtener los complejos **cheldPd_mdA** y **cheldPd_pdA**. Los estudios de interacción entre este complejo y monohebras de **poly15C**, tras los buenos resultados de interacción que quedaron de manifiesto al obtener el complejo **cheldPd_mC**, se encuentran en proceso de investigación debido al tiempo limitado para el desarrollo de este trabajo.

Con respecto al complejo **1Cu**, los estudios de interacción se han realizado frente a las monohebras **poly15A**, **poly15(⁷C_A)**, **poly15C** y **poly10G**. No se han utilizado

monohebras de timina (T) y 7-deazaguanina (^7G) debido a que no fue posible obtener el complejo **1Cu_nucleobase** que demostrase que tiene lugar la formación del enlace de coordinación por la cara Watson-Crick de estas nucleobases. Para el caso de la timina, esta falta de interacción se encuentra completamente justificada debido a las repulsiones electrostáticas entre los grupos carboxilato y carbonilo del complejo y nucleobase, respectivamente, como ya se comentó en capítulos anteriores. Sin embargo, no ha sido posible encontrar una razón que explique el motivo por el que no se ha podido obtener el complejo con la mononucleobase ^7G incluso aumentando el pH del medio a 10 para que al desprotonar la nucleobase se favorezca la coordinación al átomo N1 de la misma.

6.1 Estudios de interacción entre complejos primarios de Pd(II) y oligonucleótidos poly15(X) con (X: A, ^7C A)

La interacción entre el complejo **cheldPd** y las monohebras **poly15A** y **poly15(^7C A)** se estudiaron mediante la técnica de Dicroísmo Circular (CD). Para ello se realizó, de forma equivalente para ambas hebras, una valoración manteniendo la concentración de oligonucleótido constante a 2 μM , en NaClO_4 100 mM y tampón MOPS 5 mM (pH=8.6), y adicionando alícuotas de una disolución acuosa de **cheldPd** de concentración conocida. Las experiencias se realizaron a una temperatura de 20°C y manteniendo una agitación constante. Para minimizar al máximo los posibles cambios que se pudieran manifestar en el sistema debido al paso de tiempo, las adiciones se realizaron dejando un intervalo de 15 minutos entre estas. Antes de proceder a la adición de la primera alícuota de complejo, las monohebras fueron calentadas a 60°C durante un periodo aproximado de 30 minutos para asegurar que estas no se encontrasen enrolladas y facilitar el acceso a los sitios de interacción del complejo con las nucleobases.

Tal y como podemos observar en la figura 6.2, el espectro de dicroísmo circular del oligonucleótido **poly15(A)**, correspondiente a la curva registrada a 0 equivalentes de

cheldPd, está caracterizado por dos bandas significativas cuyos mínimos aparecen a 205nm y 250nm, y máximos a 218nm, y 276nm.

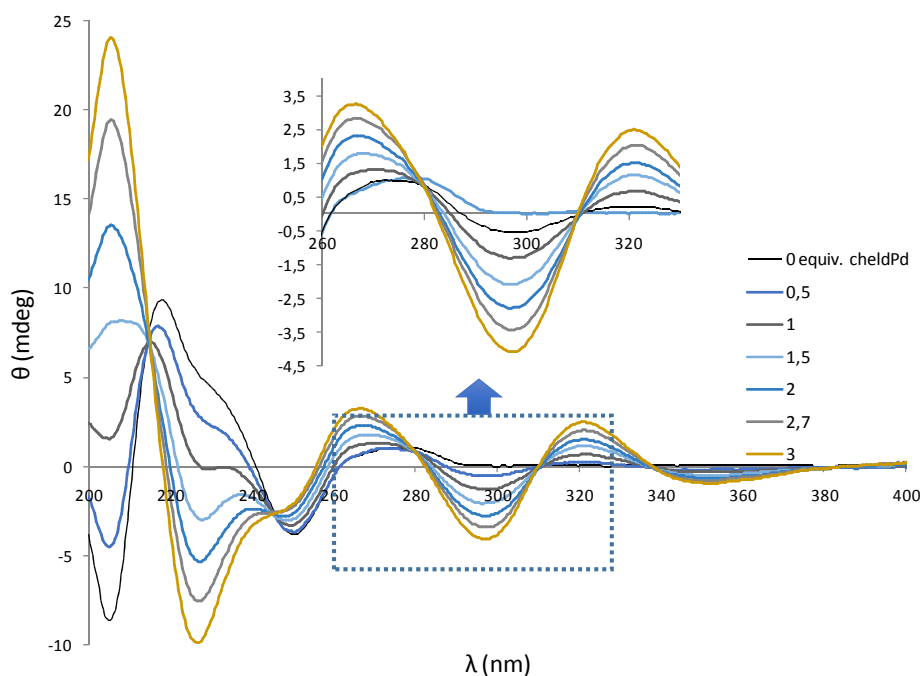


Figura 6.2. Espectros de CD registrados durante la valoración de **poly15A** con el complejo **cheldPd**.

La adición de **cheldPd** al oligonucleótido **poly15(A)** da lugar a cambios significativos en su espectro de CD. Puede observarse como aparecen nuevas bandas cuyos mínimos se dan a 226.5 nm, 297 nm y 351.5 nm, y máximos a 205.5 nm, 266.5 nm y 321 nm. Por lo tanto, en el transcurso de la valoración observamos, en primer lugar, como el mínimo registrado a 205 nm, aumenta de forma progresiva su intensidad hasta originar un máximo centrado a esa longitud de onda. El máximo centrado a 218 nm disminuye su intensidad y sufre un desplazamiento batocrómico hasta originar el mínimo centrado a 226.5 nm.

Con respecto al máximo centrado a 276 nm (zona de absorbancia para el oligonucleótido en el UV-visible), éste disminuye su intensidad y sufre un ligero desplazamiento hipsocrómico para centrarse a 266.5 nm en la curva correspondiente a 3 equivalentes de **cheldPd** por nucleobase en el medio. Estos cambios en las bandas del espectro de CD se pueden explicar como resultado de la interacción entre el complejo **cheldPd** y la monohebra **poly15A**. Sin embargo, el efecto más interesante que justifica esta afirmación es la aparición de una señal inducida (ICD) con un máximo centrado a 321 nm, zona en la que absorbe de forma aislada el complejo **cheldPd** en disolución. Si tenemos en cuenta que el complejo por sí solo no presenta quiralidad, al interactuar con las nucleobases presentes en la monohebra quiral, el sistema completo presenta quiralidad, originando un máximo en esa zona que correspondería con la absorción del complejo, y que como podemos observar aumenta su intensidad a medida que aumenta la concentración de **cheldPd** en el medio.

Si nos fijamos en la representación de la elipticidad (θ) para los máximos en los que absorben la monohebra **poly15A** (265 nm) y el complejo **cheldPd** (320 nm) en UV (Figura 6.3), se observa que a medida que incrementa la concentración de complejo en el medio, aumenta de forma *quasi* lineal la intensidad de los máximos. Teniendo en cuenta que la adenina presenta dos posibles sitios de coordinación con el complejo, N1 y N7, el hecho de que no ocurra una estabilización de la señal cuando se sobrepasan los 2 equivalentes de complejo en el medio y ambas posiciones de coordinación se encuentren ocupadas, como cabría esperar, puede deberse a que, como resultado de la estructura plano-cuadrada del complejo, tenga lugar la intercalación del mismo entre los complejos que se encuentren coordinados a la hebra.

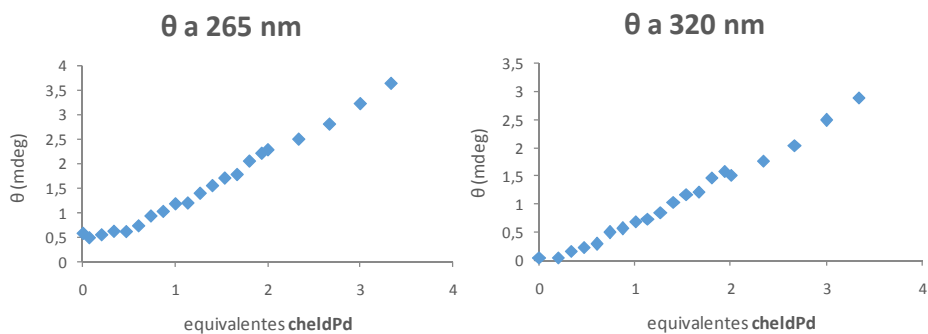


Figura 6.3. Variación de la elipticidad (θ) a 265 nm y 320 nm en el transcurso de la valoración.

Los resultados obtenidos para los estudios de interacción entre el complejo **cheldPd** y la hebra **poly15(⁷C_A)**, donde la posibilidad de interacción más favorable es que el complejo se coordine al átomo N1 de la nucleobase ⁷C_A dando lugar al sistema **cheld-Pd²⁺-⁷C_A**, muestran que el espectro de dicroísmo del oligonucleótido (0 equivalentes **cheldPd**) presenta una única banda con dos mínimo de intensidad a 253 nm y 286 nm, y un máximo a 266 nm (Figura 6.4).

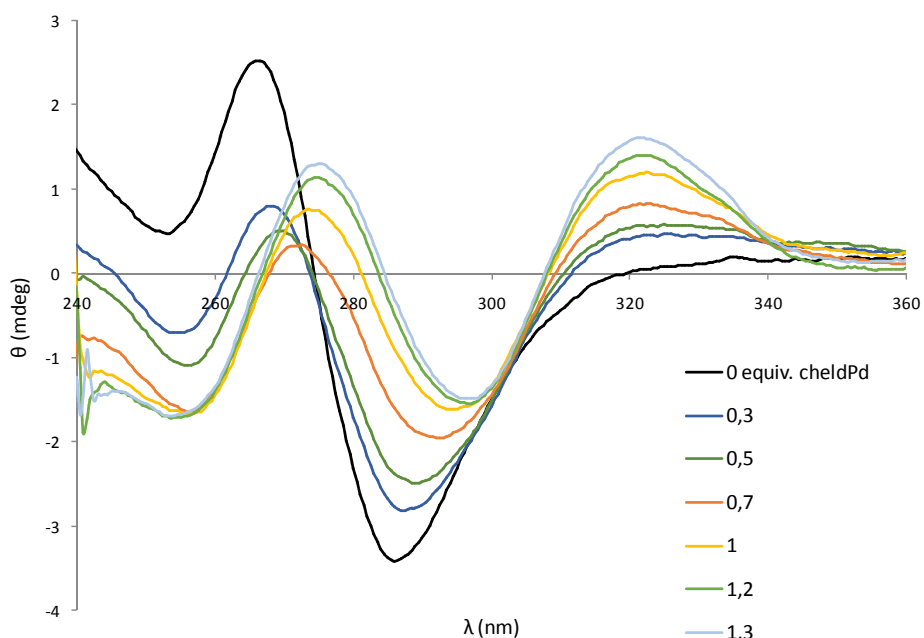


Figura 6.4. Espectros de CD registrados durante la valoración de **poly15(^{7C}A)** con el complejo **cheldPd**.

La adición de **cheldPd** al oligonucleótido **poly15(^{7C}A)** da lugar a cambios de intensidad en las bandas del espectro de CD. Sin embargo, a diferencia de los observados para **poly15(A)**, no se observan cambios significativos en la forma que presenta la curva de la **poly15(^{7C}A)**. También se observa la aparición de una nueva banda inducida, centrada a 320 nm y correspondiente con la absorción del complejo **cheldPd** en UV, que aumenta de forma progresiva su intensidad y que confirma la interacción de **cheldPd** con la hebra **poly15(^{7C}A)**.

El máximo centrado a 266 nm sufre un desplazamiento batocrómico para centrarse a 275 nm tras adicionar 1,3 equivalentes de **cheldPd**. También se observa en esa zona que cada curva registrada sufre, tras cada adición, una disminución de la intensidad y un posterior aumento de la misma una vez que se sobrepasa el equivalente de **cheldPd** en el medio.

La representación de la elipticidad (θ) a 266 nm (longitud de onda a la que absorbe el oligonucleótido **poly15(⁷C₇A)** en UV) frente a los equivalentes de complejo añadido, muestra una estabilización de la intensidad cuando se alcanza 1 o más equivalentes de complejo (Figura 6.5). Este hecho sugiere la interacción de una única molécula de complejo por cada nucleobase presente en la cadena, originando un sistema híbrido donde las 15 nucleobases que forman la hebra se encuentran coordinadas a 15 moléculas de complejo a través del átomo N1 de la 7-deaza-adenina, como quedó demostrado tras resolver, mediante DRX, la estructura del complejo **cheldPd₂pdA** (Capítulo V)

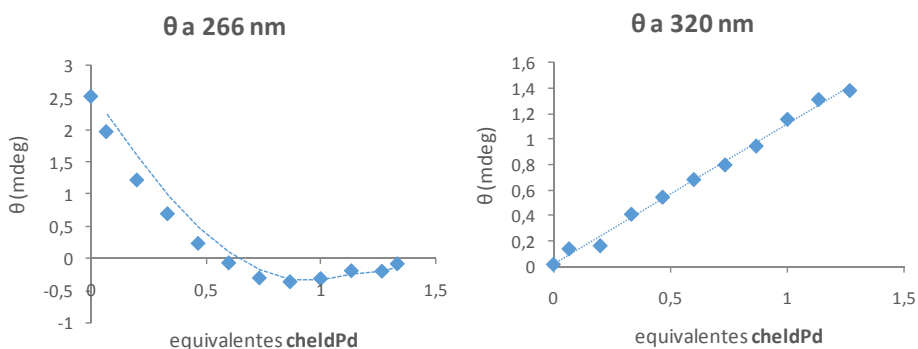


Figura. 6.5. Variación de la elipticidad (θ) a 266nm y 320 nm en el transcurso de la valoración.

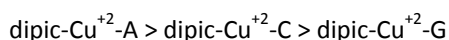
Para completar estos estudios estructurales se realizaron las valoraciones en un espectrofotómetro de UV-visible aunque debido a la complejidad que presenta los espectros obtenidos no se procederá a su discusión en esta memoria de tesis doctoral.

Para confirmar de forma definitiva la interacción, se ha intentado registrar los correspondientes espectros de masas de alta resolución del sistema final pero los métodos de ionización de los que hemos podido disponer conllevan a la fragmentación excesiva de la muestra sin que haya sido posible observar el valor de masas esperado.

6.2 Estudio de la interacción entre complejos primarios de Cu(II) y oligonucleótidos poly15(X) con (X: A, ⁷C, A, T, C, G)

La interacción de complejos de Cu(II) basados en ligandos derivados de **cheld** y nucleobases ha sido previamente estudiada en disolución mediante el empleo de moléculas de ADN de cadena doble por Schultz et *al.*^[1,4,5] En estos estudios se prepararon secuencias de ADN naturales y secuencias complementarias donde se sustituyó una nucleobase natural por el ácido dipicolínico (dipic) como nucleobase artificial, o alguno de sus derivados. Cuando se produce la hibridación entre hebras complementarias el ligando dipic queda enfrentado a una nucleobase específica (dependiendo de la secuencia de la cadena complementaria).

El dipic no puede interaccionar por enlaces de hidrógeno con la nucleobase opuesta, por lo tanto la estabilidad térmica de la doble hebra de ADN es inferior a la de su homóloga sin dipic. Sin embargo, en presencia de ión de Cu(II) se observa un aumento de la estabilidad de la doble hebra, como resultado de la formación de un complejo de tipo dipic-Cu²⁺-nucleobase en el interior de la doble hebra. Los estudios de estabilidad térmica realizados posteriormente establecen que la estabilidad del sistema varía en función de la nucleobase con la que interaccionan de la siguiente forma:



sin que llegue a observarse interacción cuando el complejo queda enfrentado a la nucleobase timina.

En nuestro caso, hemos enfrentado monohebras compuestas por una única nucleobase al complejo primario previamente sintetizado y caracterizado **1Cu**, cuya interacción con mononucleobases se ha sido estudiada y confirmada mediante la obtención de los complejos **1Cu**-nucleobase discutidos en el *Capítulo V* de esta tesis doctoral.

Estos estudios de interacción **1Cu**-monohebra confirman que al igual que tiene lugar la interacción entre complejo y nucleobase aislada, esta se produce con cadenas de 15 nucleobases para la adenina (A), 7-deaza-adenina (⁷C) y la citosina (C). Sin

embargo, cuando el estudio se realiza con una hebra de diez unidades de guanina (G), no se observa interacción, tal y como se discutirá posteriormente. Como se ha comentado previamente, no se ha realizado el estudio con la hebra de timina (T) al no observarse interacción con la mononucleobase de forma aislada.

El procedimiento para realizar los estudios de interacción **1Cu**-oligonucleótido se realizaron en disolución mediante la técnica de dicroísmo circular (CD), al igual que los estudios de interacción **cheldPd**-oligonucleótido descritos en el apartado anterior. Merece la pena mencionar que para poder conseguir la disolución completa del complejo **1Cu** fue necesario el uso de *N,N*-dimetilformamida como disolvente originando que los espectros recogidos presentaran algo de ruido y no se observen tan claros como los correspondientes a los ensayos para el complejo **cheldPd**.

Es importante destacar que a la hora de interpretar los espectros de CD obtenidos se ha tenido en cuenta que la absorción en UV-visible del complejo **1Cu** en disolución tiene lugar a una longitud de onda de 250 nm, por lo que cualquier señal inducida correspondiente a la interacción del complejo **1Cu** con la monohebra estaría enmascarada por la absorción intrínseca de la hebra.

En primer lugar se llevó a cabo el estudio para la interacción **1Cu:poly15A**. El espectro de CD del oligonucleótido **poly15(A)**, correspondiente a la curva registrada a 0 equivalentes de **1Cu**, está caracterizado por una banda cuyos mínimos se observa a 250 nm y máximo a 275 nm (Figura 6.6). La adición controlada de alícuotas de **1Cu** sobre el oligonucleótido **poly15(A)** no conlleva a ningún cambio significativo en la forma original de las curvas obtenidas, aunque sí en las intensidades de las mismas.

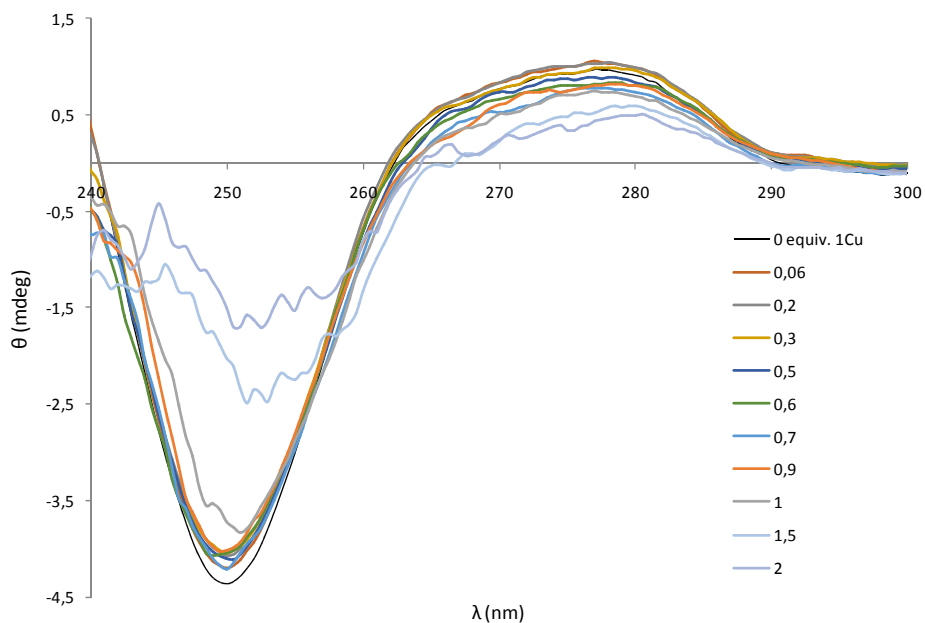


Figura 6.6. Espectros de CD registrados durante la valoración de **poly15A** con el complejo **1Cu**.

La representación de la elipticidad (θ) frente a la concentración de complejo, a la longitud de onda a la que tienen lugar dicho máximo y mínimo (Figura 6.7), muestra que existe un ligero aumento de la intensidad en ambos casos, sin que ésta se estabilice completamente una vez superados los dos equivalentes de complejo.

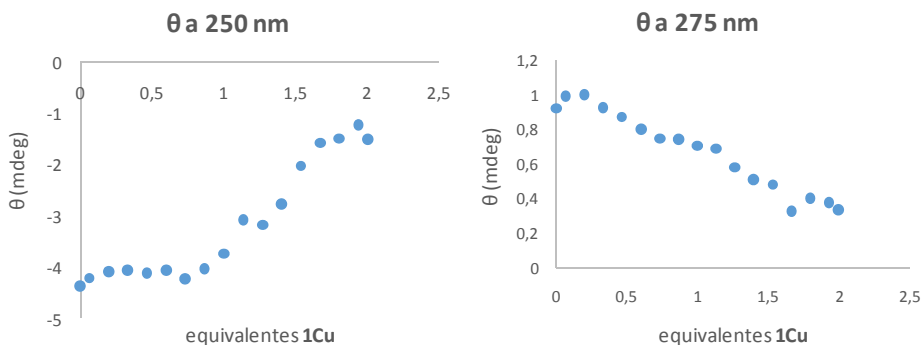


Figura 6.7. Variación de la elipticidad (ϑ) a 250nm y 275 nm en el transcurso de la valoración de **poly15A** con el complejo **1Cu**.

Al igual que para interacción **cheldPd:poly15A**, esto indica que tiene lugar una interacción puesto que observamos cambios en los espectros registrados, pero que tras dicha interacción (probablemente en las posiciones N1 y N7 de las nucleobases) podría existir una interacción por intercalación del complejo entre las unidades de complejo que ya han interaccionado. Además, se presenta el inconveniente en la coincidencia de las longitudes de onda de absorción para complejo y la señal de CD del oligonucleótido, lo que dificulta el que pueda observarse esta interacción de forma clara debido a que la señal ICD correspondiente al complejo **1Cu** unido a **poly15A** queda enmascarada.

A continuación se llevó a cabo el estudio de interacción entre **1Cu** y la monohebra **poly15(⁷C^A)**. En este caso, al igual que para la interacción con la **poly15A**, no se observa un cambio significativo en la forma del espectro del oligonucleótido conforme tiene lugar la adición progresiva de alícuotas de complejo (Figura 6.8). Sin embargo, sí es posible observar de forma más acusada los cambios en la intensidad de la señal.

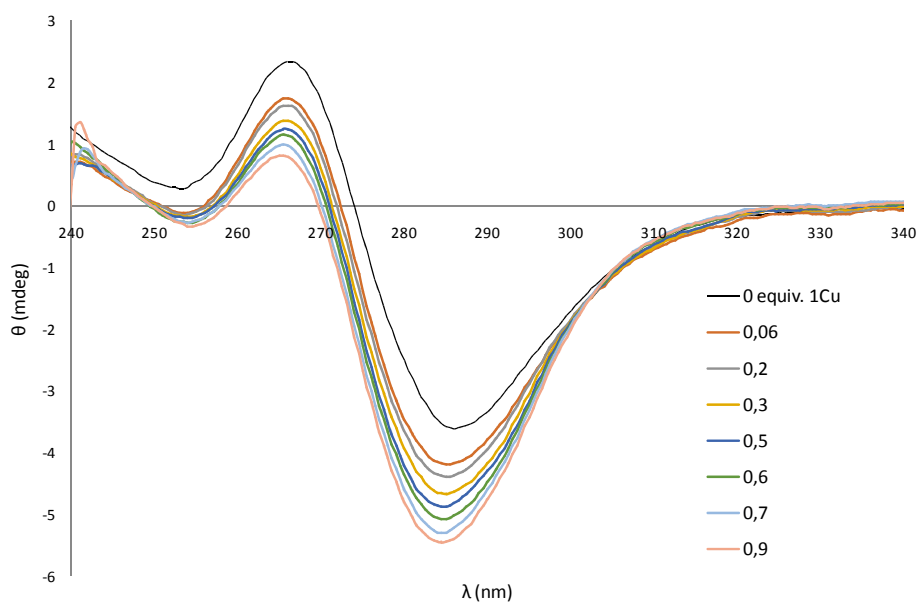


Figura 6.8. Espectros de CD registrados durante la valoración de **poly15(7cA)** con el complejo **1Cu**.

Sin embargo, al representar la elipticidad (θ) a 265 nm y la λ máxima de cada una de las curvas de CD en esta región, frente a los equivalentes de **1Cu**, se observa una disminución de la intensidad progresiva acompañada de un desplazamiento hipsocrómico de los máximos. Estos cambios se ven ligeramente estabilizados cuando se alcanza 1 equivalente de complejo en el medio(Figura 6.9).

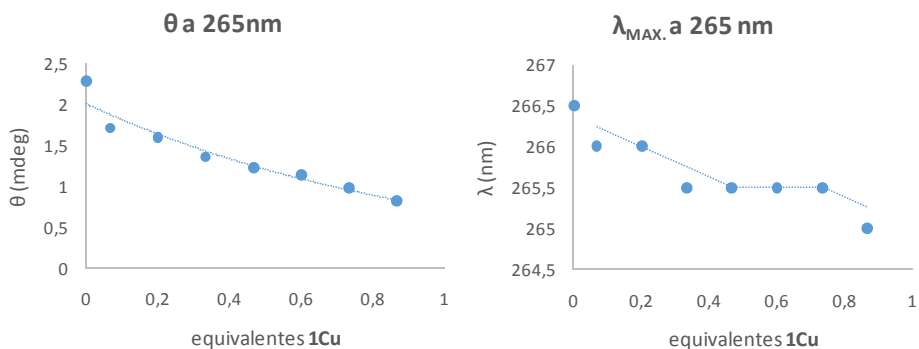


Figura 6.9. Variación de la elipticidad (ϑ) a 250nm y 275 nm en el transcurso de la valoración de **poly15**(^{7c}**A**) con el complejo **1Cu**.

Es posible observar este mismo efecto cuando se representan las mismas variables, elipticidad (θ) y la λ máxima, para las curvas con un máximo aproximado de 286 nm frente a los equivalentes de complejo (Figura 6.10).

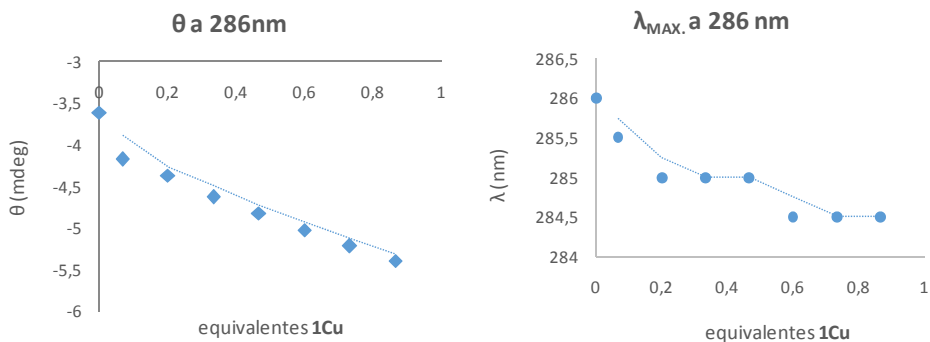


Figura 6.10. Variación de ϑ a 286nm y longitudes de onda en el transcurso de la valoración de **poly15**(^{7c}**A**) con el complejo **1Cu**.

La suma de estos hechos confirma la interacción entre el complejo **1Cu** y la monohebra de oligonucleótido, así como sugiere que dicha interacción tiene lugar a través del átomo N1 de la 7-deaza-adenina, como también se observó en el complejo **1Cu_pdA** estudiado y caracterizado en el Capítulo V.

La coplanaridad de esta interacción, confirmada previamente mediante el estudio estructural por DRX del complejo **1Cu_pdA**, puede ser la causa que favorezca la intercalación de otras moléculas de complejo entre los espacios que quedan al interaccionar 15 moléculas de **1Cu** con las 15 nucleobases que conforman la hebra, hecho que justifica el que sólo se observe una ligera estabilización de la intensidad de las bandas cuando se ha adicionado 1 equivalente de complejo.

Los estudios de interacción entre el complejo **1Cu** y la monohebra **poly15C** no mostraron variaciones significativas en las medidas de CD registradas tras la adición de cantidades crecientes de complejo **1Cu** (Figura 6.11).

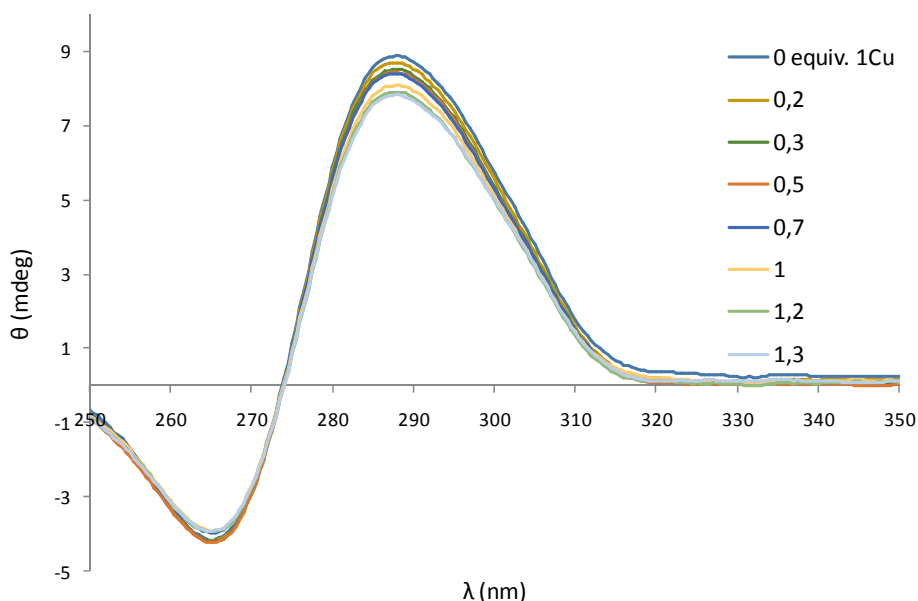


Figura 6.11. Espectros de CD registrados durante la valoración de **poly15C** con el complejo **1Cu**.

Si representamos la variación de la elipticidad para el mínimo registrado a 265 nm y para el máximo a 288 nm (Figura 6.12), en ambos casos se observa una leve variación en la intensidad de ambos, hecho que sugiere la interacción del complejo **1Cu** y la monohebra. Sin embargo, esta interacción debe ser limitada ya que como se observó tras el estudio estructural por DRX del complejo **1Cu_mC** la interacción entre el complejo y la nucleobase no tiene lugar de forma coplanar, lo que puede conllevar a impedimentos estéricos para la interacción de **1Cu** en nucleobases adyacentes. Además, como se observó para el complejo **1Cu_mC**, no existe la formación de enlaces de hidrógeno entre complejo y nucleobase que favorezcan la estabilidad del sistema.

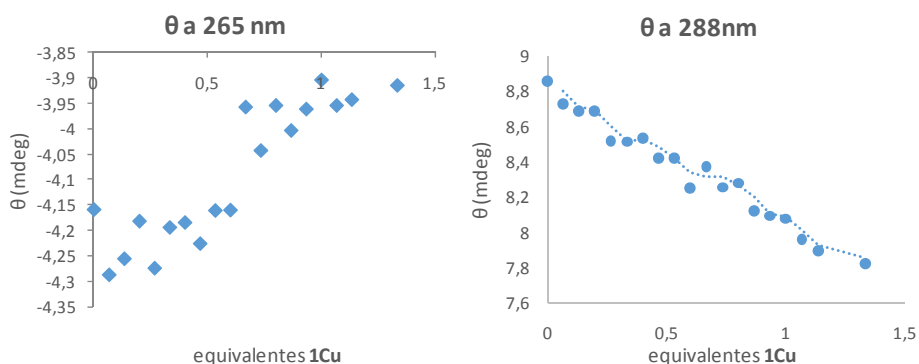


Figura 6.12. Variación de θ a 265 y 268nm y longitudes de onda en el transcurso de la valoración de **poly15C** con el complejo **1Cu**.

Estos datos están en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de Schultz et al. donde la interacción entre el complejo de **dipic_Cu(II)** y la citosina originaba un sistema de estabilidad térmica menor si se compara su valor al obtenido al enfrentarlo a la adenina; hecho que queda justificado tras el análisis de estos resultados ya que un carácter coplanar de la interacción y la posible formación de enlaces de hidrógeno cooperativos favorecerían la estabilidad de la hebra.

Por último, se realizó el estudio de la interacción entre el complejo **1Cu** una monohebra formada por 10 unidades de guanina, **poly10G**. El utilizar este oligonucleótido formado por 10 bases en lugar de 15 como en los casos anteriores se debe a que la dificultad para sintetizar hebras de guanina de una longitud mayor. Los oligonucleótidos de guanina pueden formar cuartetos (ADN cuadruplexo) dificultando su purificación por HPLC y limitando los procesos de síntesis de los mismos.

Los espectros de dicromismo registrados durante esta valoración apenas manifiestan variación en las curvas registradas tras adicionar cada alícuota de **1Cu** salvo una ligera disminución en la intensidad del máximo observado a 260 nm (Figura 6.13, a y b) y una variación aún menos significativa para el hombro centrado a 300 nm (Figura 6.13, c).

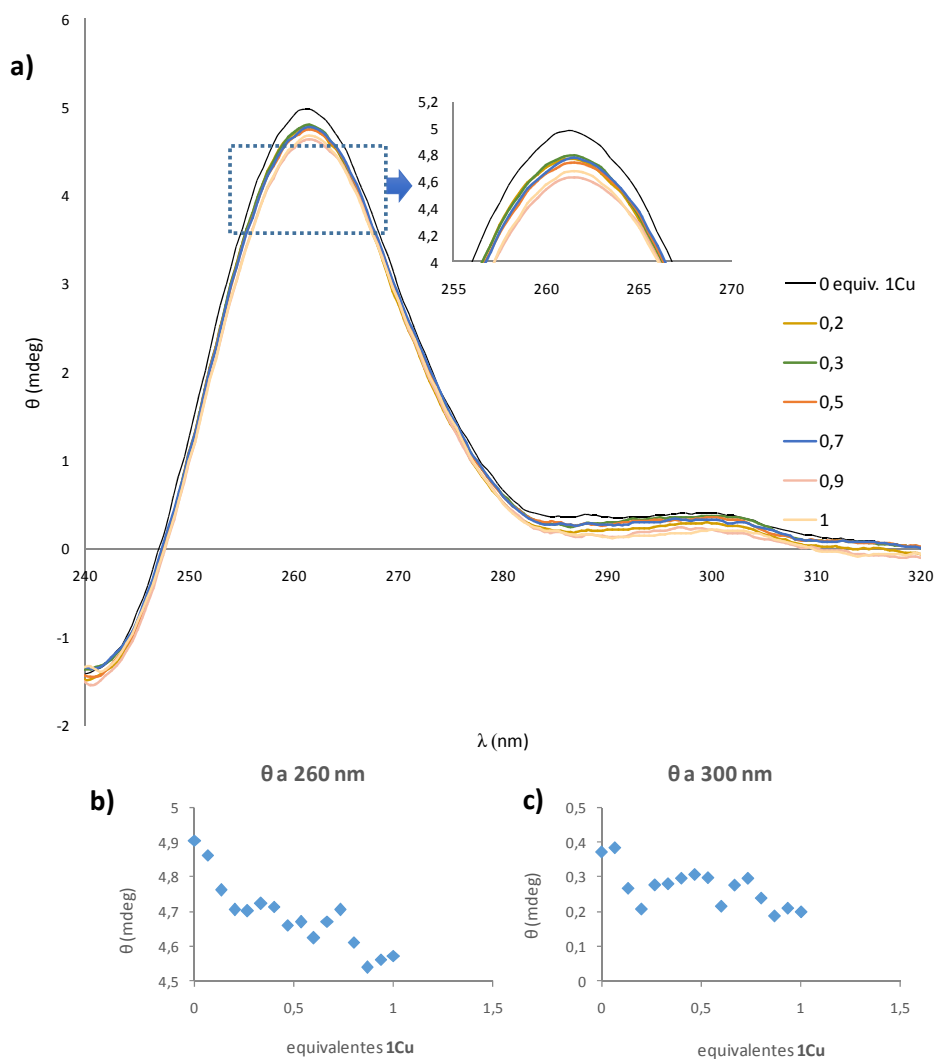


Figura 6.13. Variación de ϑ a 260 y 300 nm y longitudes de onda en el transcurso de la valoración de **poly10G** con el complejo **1Cu**.

Estos datos sugieren que el complejo **1Cu** apenas interacciona con la monohebra de **poly10G**. La interacción a través del N1 debe estar excluida ya que conllevaría una desprotonación del mismo, hecho que no se observó cuando se hizo interaccionar de forma aislada el complejo **1Cu** con la nucleobase **pG**. Sin embargo, al llevar a cabo el análisis estructural por DRX del complejo **1Cu_pG** se observó que la interacción tiene

lugar a través de átomo N7 de la nucleobase. Por lo tanto, la interacción de **1Cu** ocurriría preferentemente por esta posición. Sin embargo, al no observar cambios significativos en las medidas de CD registrada, es posible que la formación de cuartetos de guanina altamente estables impida la coordinación del complejo **1Cu** a la nucleobase. Serán necesarios más estudios de dicroísmo a diferentes temperaturas para poder obtener más información al respecto.

Bibliografía

- [1] E. Meggers, P. L. Holland, W. B. Tolman, F. E. Romesberg, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10714–10715.
- [2] P. Espinet, J. A. Miguel, S. García-Granda, D. Miguel, *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 2287–2291.
- [3] B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 487–516.
- [4] S. Atwell, E. Meggers, G. Spraggon, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12364–12367.
- [5] N. Zimmermann, E. Meggers, P. G. Schultz, *Bioorg. Chem.* **2004**, *32*, 13–25.



Capítulo VII

Interacción de iones
de Ag(I) en moléculas
de doble hebra de ADN



En este capítulo se discute una de las estrategias para la obtención de híbridos metal-oligonucleótido, concretamente, la interacción entre oligonucleótidos modificados de cadena doble e iones de Ag(I). Los oligonucleótidos que se van a emplear consisten en secuencias palindrómicas formadas por dieciocho nucleobases; se emplearán tanto nucleobases canónicas como la adenina (A) y la timina (T), y no canónicas como la 7-deaza-adenina (${}^7\text{C}$ A).

Se ha empleado la base artificial ${}^7\text{C}$ A con el propósito de favorecer la formación de un enlace de coordinación en el interior de la hebra que sustituya a uno de los enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick. En la 7-deaza-adenina se ha reemplazado el átomo N7 por un grupo CH con respecto a la adenina, de esta forma se evita la interacción de iones metálicos a la posición más favorecida N7,^[1] y por lo tanto se facilita la coordinación del átomo metálico a la posición N1, permitiendo así la formación de enlaces en el interior de la doble hebra.

La elección de iones de Ag(I), con respecto a otros iones metálicos, se debe principalmente a la ventaja que esta ofrece en la formación de geometrías de coordinación lineales (similares a la geometría de enlaces de hidrógeno) así como a su naturaleza intermedia como ácido de Brönsted y su predisposición en la formación de enlaces de coordinación con ligandos que presentan átomos de nitrógeno dadores.

Por lo tanto, esta estrategia va a permitir la incorporación controlada de iones de Ag(I) a través de la formación de pares de bases mediadas por enlaces de coordinación, donde participan los átomos de nitrógeno donadores endocíclicos de la 7-deaza-adenina (N1) y timina (N3) (Figura 7.1).

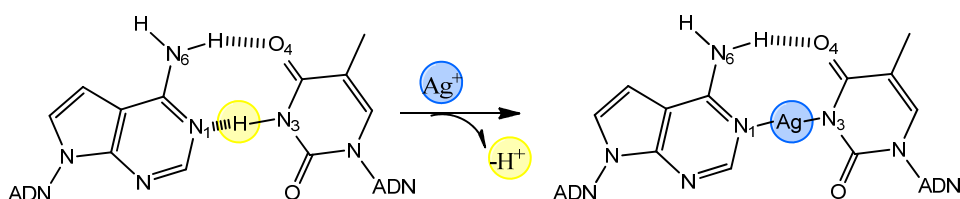


Figura 7.1. Propuesta de formación de enlaces de coordinación endocíclico con Ag(I) en sustitución de un enlace de hidrógeno.

7.1 Estudio de la interacción Ag:poly18(X-T), X: A, ^{7C}A

El oligonucleótido **poly18(^{7C}A-T)** consiste en una secuencia palindrómica formada por dieciocho nucleobases en las que se alternan la nucleobase canónica timina (T) y la nucleobase sintética 7-deaza-adenina (^{7C}A).

En ausencia de iones de Ag(I), el oligonucleótido **poly18(^{7C}A-T)** da lugar a la formación de una doble hebra como consecuencia del reconocimiento de las bases de una hebra y su complementaria, a través de la formación de 18 pares de bases unidos por enlaces de hidrógeno de tipo Watson-Crick (WC). Sin embargo, en presencia de iones de Ag(I) uno de los enlaces de hidrógeno de cada par de bases es reemplazado por un enlace de coordinación, dando lugar a una doble hebra con 18 pares de bases mediados por un enlace de coordinación a un ión de Ag(I) (Figura 7.2).

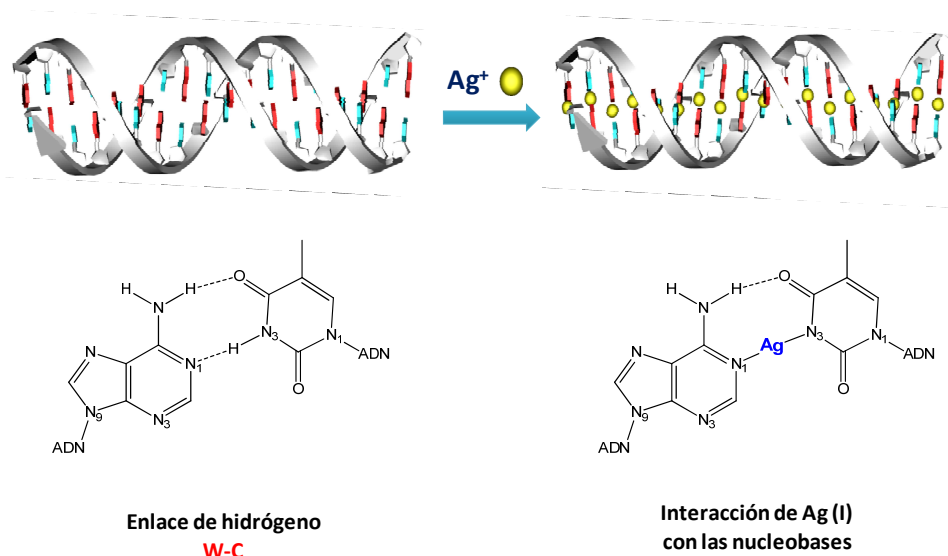


Figura 7.2. Representación de la interacción de iones Ag(I) con la doble hebra **poly18(^{7C}A-T)**.

7.1.1. Estudio de estabilidad térmica del oligonucleótido poly18(⁷C A-T) en presencia y ausencia de iones de Ag(I)

Los estudios de estabilidad térmica de la doble hebra se llevaron a cabo mediante medidas de UV-visible a temperatura variable siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3 *Métodos*. Las medidas se registraron para 2 μM de oligonucleótido **poly18(⁷C A-T)** en 100 mM NaClO_4 y 5 mM MOPS (pH=6.8), a la que se le fueron añadiendo alícuotas crecientes de una disolución de AgNO_3 16.5 mM (véase *Anexo I*), manteniendo la concentración de oligonucleótido constante (Figura 7.3).

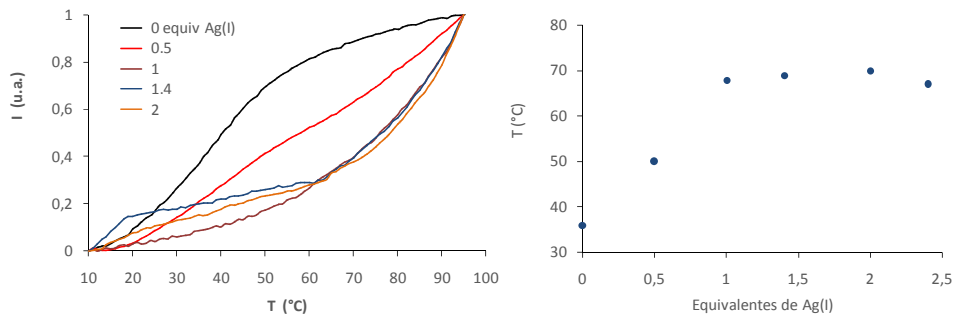


Figura 7.3. Izquierda: Representación gráfica de las curvas obtenidas para la T_m de la doble hebra en presencia y ausencia de AgNO_3 . Derecha: Representación de los cambios observados en la T_m tras las adiciones de AgNO_3 .

La curva sigmoidal correspondiente al oligonucleótido **poly18(⁷C A-T)** en ausencia de Ag(I) presenta un comportamiento cooperativo, lo que sugiere la formación de una estructura de doble hebra mantenida por enlaces de hidrógeno entre las bases complementarias de cada hebra, y cuya temperatura de desnaturalización (T_m) es de 35°C.

La adición de 1 o más equivalentes de iones Ag(I) origina un incremento en la temperatura de desnaturalización de la doble hebra de 33°C (ΔT_m), lo cual puede explicarse por la interacción de los iones Ag(I) con la doble. Además, observamos que la

T_m se mantiene estable para cantidades mayores de 1 equivalente de iones Ag(I) (un equivalente se expresa como un equivalente por par de base). Estos resultados ponen de manifiesto la coordinación de un ión Ag(I) por cada par de base ${}^{7\text{C}}\text{A-T}$, dando lugar a un par de base de tipo ${}^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$. La sustitución de un enlace de hidrógeno por un enlace de coordinación da lugar a una mayor estabilización de los pares de base, y por lo tanto a un incremento en la temperatura de desnaturalización, como se ha observado en los datos experimentales.

7.1.2. Estudio por UV-visible de la interacción $\text{Ag(I)}:\text{poly18}(\text{X-T})$, X: ${}^{7\text{C}}\text{A, A}$

Se ha llevado a cabo un estudio en disolución acuosa mediante UV-visible de la interacción entre la doble hebra **poly18(${}^{7\text{C}}\text{A-T}$)** y Ag(I) .

El estudio se realizó según el procedimiento descrito en el apartado 2.3. *Métodos* utilizando una disolución de doble hebra **poly18(${}^{7\text{C}}\text{A-T}$)** 2 μM en agua *Milli-Q*[®] y tampón NaClO_4 100 mM y MOPS 5 mM (pH=6.8). Los correspondientes espectros UV-visible fueron registrados a 20°C tras llevar a cabo las adiciones correspondientes de una disolución de AgNO_3 1 mM (véase *Anexo I*), manteniendo constante la concentración de oligonucleótido.

El espectro UV-visible muestra una variación de la señal en presencia de iones Ag(I) (Figura 7.4). Concretamente se observan cambios significativos en la región comprendida entre 230 nm y 300 nm, correspondiente a la región de absorción de las nucleobases. También observamos un efecto hipsocrómico que confirma la interacción entre los iones de Ag^+ y la doble hebra de oligonucleótido.

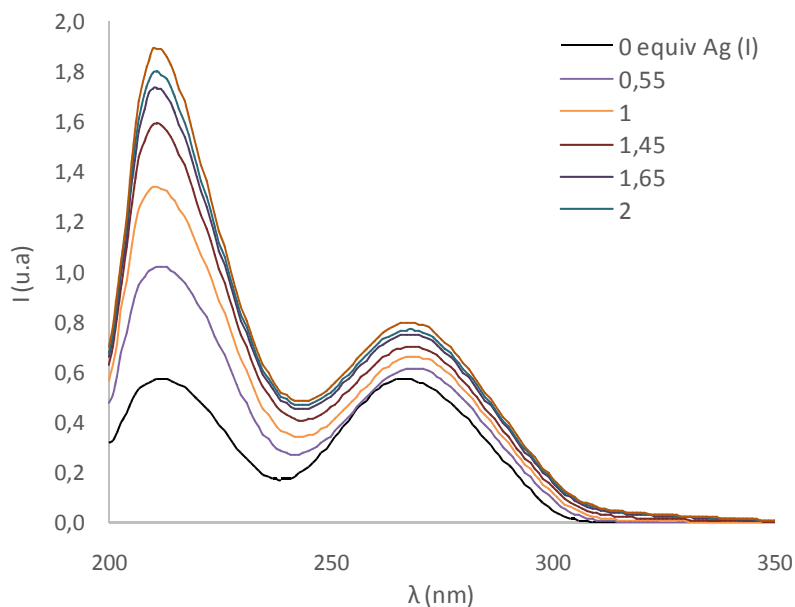
UV-visible valoración Ag(I):poly18(⁷C_A-T)

Figura 7.4. Representación de los UV-visible registrados en presencia de Ag(I).

Un detalle a destacar es que mientras la absorbancia a 270 nm incrementa progresivamente a la vez que se incrementa la concentración de ion Ag(I) en el medio, la absorbancia a 240 nm y a 212 nm incrementa hasta llegar a la adición de 1 equivalente de Ag(I); tras superar esta concentración de Ag(I) en el medio, se observa un incremento menos pronunciado en el valor de la absorbancia a estas longitudes de onda (Figura 7.5). También podemos observar un efecto batocrómico de 4 nm en el máximo a 240 nm durante la adición del primer equivalente de Ag(I) que deja de observarse al sobrepasar esa concentración de plata en el medio (Figura 7.5).

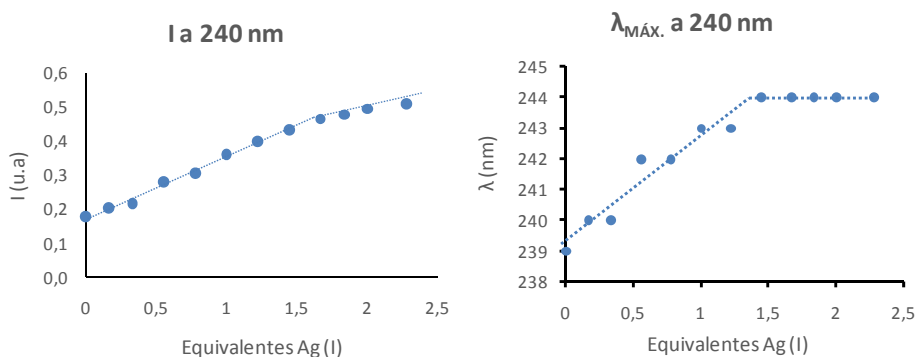


Figura 7.5. Representación del valor máximo de absorbancia a 240 nm y de los máximos de absorción de cada espectro registrada en esa zona.

Estos resultados son concordantes con las formación del sistema $^{7C}A-Ag^+-T$, como se ha puesto de manifiesto en los estudios de estabilidad térmica del apartado anterior y que se proponía en la introducción de este estudio.

Al llevar a cabo esta misma experiencia para el oligonucleótido análogo **poly18(A-T)**, constituido por las nucleobases canónicas adenina (A) y timina (T) de manera alternada, observamos los efectos hipsocrómico y batocrómico en los máximos de absorción de las curvas de UV-visible registradas, de la misma manera que se observó para el oligonucleótido **poly18($^{7C}A-T$)**. Sin embargo, en este caso no se observa la estabilización de los valores de absorbancia cuando la concentración de Ag(I) en el medio es superior a 1 equivalente (Figura 7.6).

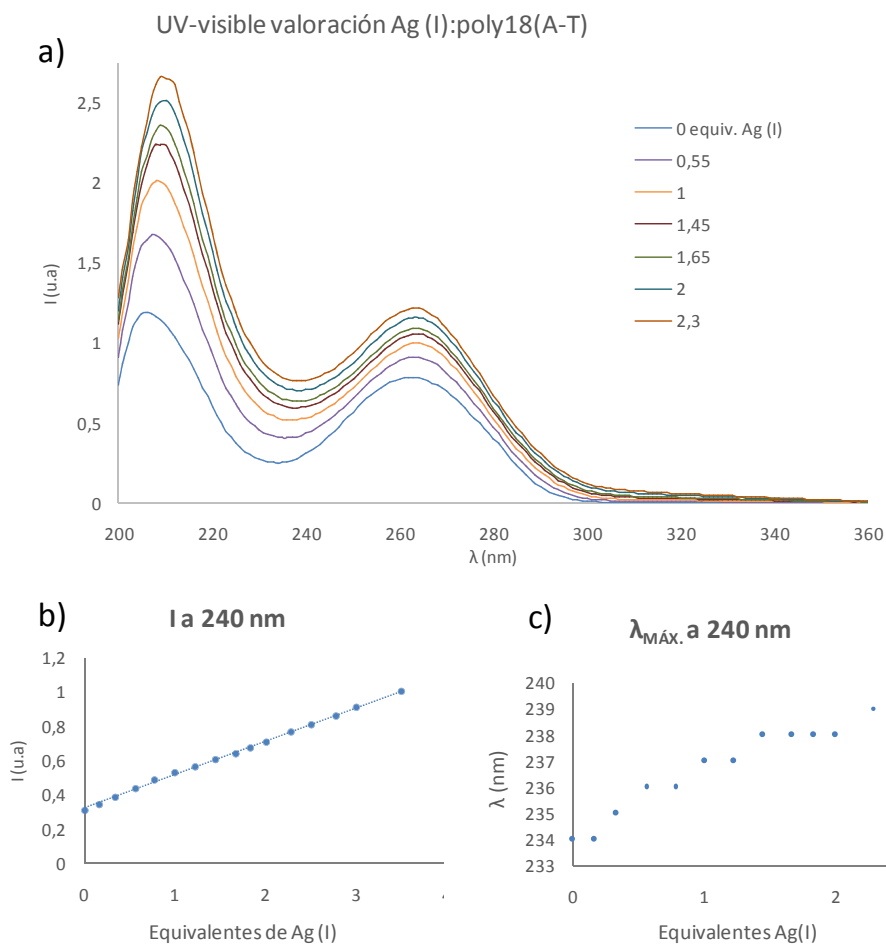


Figura 7.6.a) Espectros UV-visible de la valoración de **poly18(A-T)** con $Ag(I)$. b) Absorbancia máxima registrada a 240 nm. c) Representación de la longitud de onda a que tienen lugar los máximos de absorción según la concentración de $Ag(I)$ en el medio.

Estos resultados se pueden explicar por la formación de diferentes enlaces dependiendo si el oligonucleótido contiene la 7-deaza-adenina o la adenina. En cualquier caso, los iones de $Ag(I)$ se van a coordinar preferentemente a los átomos de nitrógeno endocíclicos de las nucleobases. Para el caso de **poly18(^{7C}A-T)**, los iones de $Ag(I)$ se unirán preferentemente a los átomos N1 de la 7-deaza-adenina y N3 de la timina; dando lugar a la formación del sistema ^{7C}A- Ag^+ -T. La formación de este tipo de

enlace implica la desprotonación de la timina (T) y por lo tanto esto puede originar unos cambios en las bandas de absorción de la **poly18(⁷C-A-T)** diferentes a los observados en la **poly18(A-T)**, donde los iones Ag(I) se coordinarían favorablemente a las posición N7 de la adenina, y por lo tanto la formación del sistema A-Ag⁺-T no está favorecida.

7.1.3. Estudio de la variación del pH del oligonucleótido poly18(⁷C-A-T) en presencia y ausencia de iones de Ag(I)

La formación de los pares de bases mediados por iones Ag(I), del tipo ⁷C-A-Ag⁺-T, a lo largo de la estructura del oligonucleótido **poly18(⁷C-A-T)** da lugar a la desprotonación del grupo NH del la timina. Esta desprotonación debe originar cambios de pH que pueden ser registrados y medidos, y constituyen una evidencia añadida a la formación de estos sistemas.

Con este objetivo se realizó el estudio de la variación del pH mediante la adición controlada de alícuotas de AgNO₃ (5.2 mM) sobre una disolución de oligonucleótido (3 μM) en NaClO₄ 100 mM pero en ausencia de tampón MOPS 5 mM (véase *Anexo I*). La ausencia de tampón es necesaria para poder registrar los cambios de pH. Como control, también se llevó a cabo el estudio de variación del pH en una disolución en las mismas condiciones pero en ausencia de oligonucleótido (Figura 7.7).

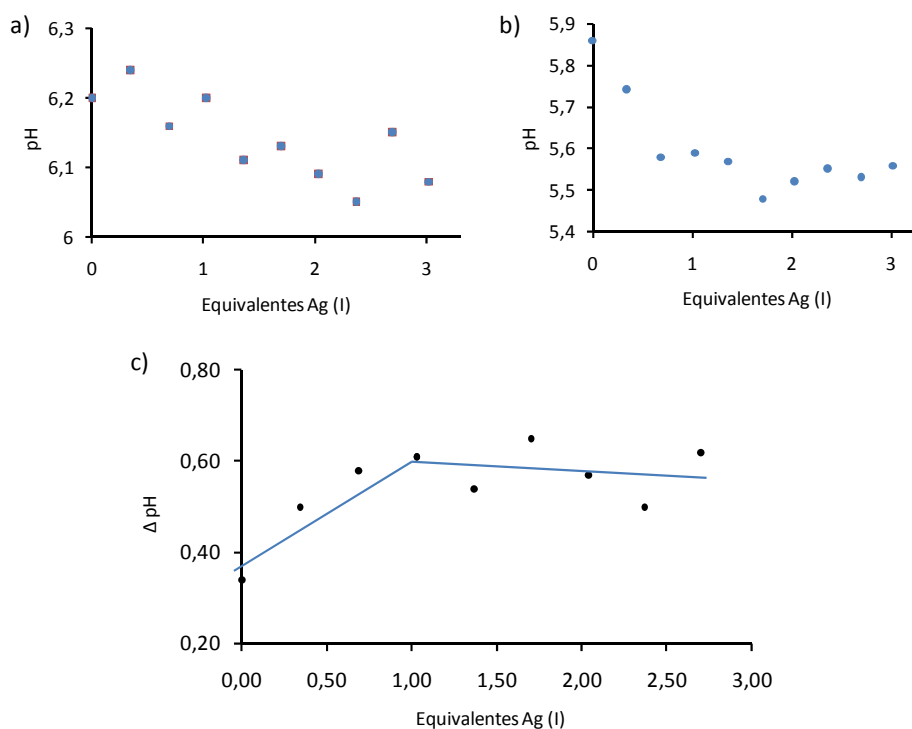


Figura 7.7. Variación de pH durante una valoración con AgNO_3 de una disolución que contiene a) $3 \mu\text{M}$ **poly18**(^{13}C -**A-T**) en NaClO_4 100 mM y agua Milli-Q®, b) NaClO_4 100 mM y agua Milli-Q® (muestra control). c) representación de los valores de la muestra a los que se les ha sustraído la muestra control.

La variación de pH observada es muy tenue aunque es posible observar una tendencia a la estabilización de los datos registrados una vez que se ha añadido el primer equivalente de Ag(I) (Figura 7.7, $\Delta \text{pH}=0.27$). Podemos asumir que esta tendencia se debe a la desprotonación del grupo imino de la timina en presencia de Ag(I), hecho que se puede corroborar al analizar la muestra por espectrometría de masas (ESI) (véase Anexo III).

El efecto atenuado del cambio del pH puede explicarse debido al efecto tampón que los grupos fosfato de las cadenas de ADN pueden tener.

7.1.4. Estudio estructural del sistema por CD

Los estudios de dicroísmo circular (CD) se llevaron a cabo con el propósito de profundizar en la investigación de la formación del sistema $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$ y su influencia en la conformación de la doble hebra **poly18($^{7\text{C}}\text{A-T}$)**.

Los espectros se registraron al realizar una valoración de **poly18($^{7\text{C}}\text{A-T}$)** 2 μM en agua *Milli-Q*[®], NaClO_4 100 mM y tampón MOPS 5 mM (pH=8.6), a la que se le fueron añadiendo cantidades crecientes de una disolución de AgNO_3 1 mM (véase *Anexo I*).

Tal y como podemos observar en la figura 7.8, el espectro de dicroísmo circular del oligonucleótido **poly18($^{7\text{C}}\text{A-T}$)**, en ausencia de iones Ag(I) , está caracterizado por dos bandas significativas cuyos mínimos de intensidad aparecen a 295 nm y 253 nm, y máximos a 275 nm y 222 nm. La curva de CD del oligonucleótido **poly18($^{7\text{C}}\text{A-T}$)** presenta una forma característica para una conformación de doble hebra de tipo B, similar a la conformación observada para los oligonucleótidos $\text{poly}[(^{7\text{C}}\text{A-T})]$ y $\text{poly}[(\text{IC})]$.^[2]

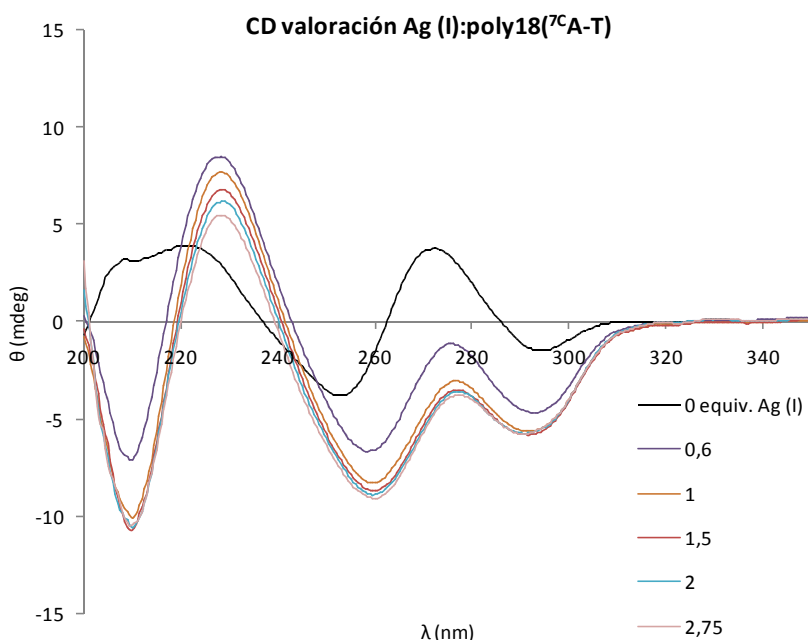


Figura 7.8. Representación gráfica de algunos de los espectros de CD más significativos de la valoración.

Sin embargo, en presencia de iones Ag(I) en el medio, así como en el aumento progresivo de su concentración, la curva de CD no varía sustancialmente su forma, pero sí se pueden observar cambios significativos en la intensidad y el desplazamiento de las intensidades máximas y mínimas observadas. La intensidad del máximo positivo observado a 222 nm incrementa significativamente; sin embargo, tiene lugar un descenso de la intensidad en el máximo de la banda a 275 nm, al igual que en los mínimos de las bandas a 295 nm y 253 nm (Figura 7.9). Este descenso de la intensidad es similar al encontrado en el caso del oligonucleótido poly[(IC)] a baja concentración de sal en el medio,^[3] y recientemente para las hebras homobases G6 tras la adición de iones Ag(I) .^[4]

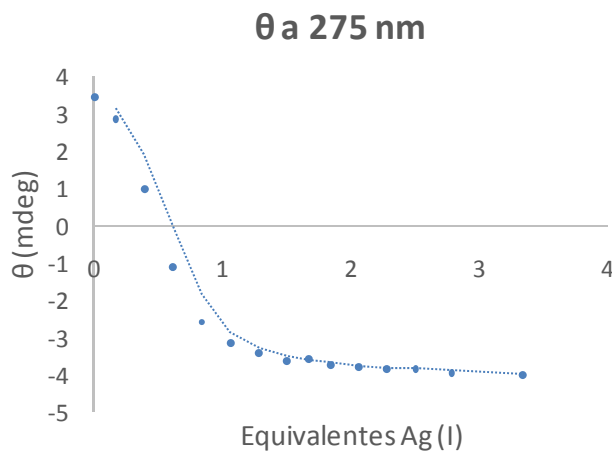


Figura 7.9. Variación de θ a 275 nm en el transcurso de la valoración.

En todos los casos se ha observado un efecto batocrómico de las bandas de dicroísmo, exceptuando la banda a 295 nm para la que se observa un desplazamiento a longitudes de onda menores.

Cabe destacar que todos estos cambios se han observado para una concentración de Ag(I) en el medio de hasta 1 equivalente por par de base, sin que ocurran cambios significativos a concentraciones más elevadas de Ag(I) . Estos resultados concuerdan con

los estudios preliminares, de estabilidad térmica y espectroscopia de UV, que indicaban la formación de 18 pares de base $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$ a lo largo de la doble hebra de **poly18($^{7\text{C}}\text{A-T}$)**.

Además, los resultados obtenidos en las medidas de dicroísmo circular están de acuerdo con la sustitución del enlace de hidrógeno $\text{N1}\cdots\text{H-N3}$ como resultado de la formación de los pares de bases $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$ mediados por iones de Ag(I) , lo que implicaría cambios en la conformación de la doble hebra debido a un mayor distanciamiento entre las nucleobases con respecto a los pares de base $^{7\text{C}}\text{A-T}$, mediados por enlaces de hidrógeno. Con objeto de estudiar la diferencia entre los pares de bases mediados por enlaces de hidrógeno y los mediados por iones de Ag(I) , se llevaron a cabo cálculos de DFT para ambos sistema $^{7\text{C}}\text{A-T}$ y $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$ (Figura 7.10). Los resultados revelan una mayor distancia entre los átomos dN3-N1 igual a 4.195 Å para el par de base $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$, que para su homólogo $^{7\text{C}}\text{A-T}$ cuya dN3-N1 es 2.337 Å. Merece la pena destacar que en el sistema el par de base $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$ también se observa cómo se mantiene el enlace de hidrógeno de tipo Watson-Crick entre el grupo amino de la 7-deaza-adenina y el grupo carbonilo de la timina.

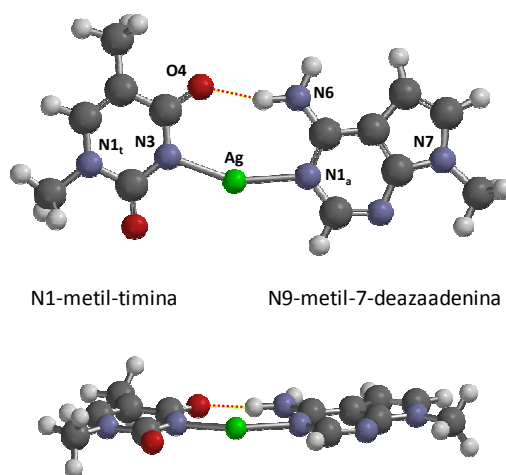


Figura 7.10. Estructura geométrica optimizada para el sistema $^{7\text{C}}\text{A-Ag}^+\text{-T}$ calculada al usar como modelo las nucleobases N1-metil-timina y N9-metil-adenina. La línea de puntos roja representa un enlace de hidrógeno. Distancias calculadas: $d_{\text{O4-N6}}=2,910$ Å; $d_{\text{N3-N1a}}=4,195$ Å; $d_{\text{N11-N7}}=10,502$ Å; $d_{\text{Ag-N3}}=2,109$ Å; $d_{\text{Ag-N1a}}=2,177$ Å; $\angle\text{N3-Ag-N1a}=156,23^\circ$.

Otro aspecto interesante a destacar es la aparición de una nueva banda negativa a 210 nm en presencia de iones Ag(I) y que se estabiliza cuando la concentración de Ag(I) en el medio es superior a 1 equivalente, al igual que los otros casos. Esta banda es característica de una conformación tipo A de la doble hélice, ^[1,5] característica por poseer un mayor diámetro de la doble hélice. Esto puede explicarse debido a la formación de los pares de base ^{7C}A-Ag⁺-T a lo largo de la estructura del oligonucleótido, dando lugar a un mayor distanciamiento entre las bases enfrentadas, y por lo tanto a una estructura con un diámetro mayor que la de partida.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos para la **poly18(A-T)**, es difícil observar la estabilización de los máximos y mínimos presentes en el espectro de dicroísmo ya que la interacción entre los iones Ag⁺ y nucleobases pueden tener lugar tanto por el átomo de nitrógeno N1 como por el N7 de la adenina. Sin embargo, si se observa en el que cambio de forma de las curvas, así como en el desplazamiento batocrómico que tiene lugar en el máximo centrado a 270 nm que la interacción tiene lugar dando lugar a un sistema similar al que se observa para la doble hebra **poly18(^{7C}A-T)** pero algo más complejo (Figura 7.11).

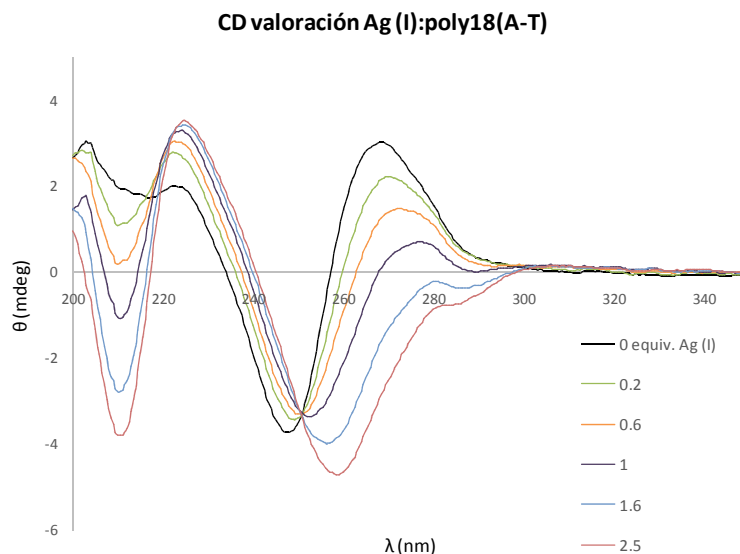


Figura 7.11. Representación gráfica de algunos de los espectros de CD más significativos de la valoración.

Tampoco es posible observar cómo se estabiliza la elipticidad a 269 nm (Figura 7.12), lo que significa que la interacción entre los iones Ag(I) y la doble hebra puede tener lugar reemplazando no sólo los enlaces de hidrógeno internos, si no también mediante interacciones electrostáticas al interaccionar el metal con la hebra de forma externa.

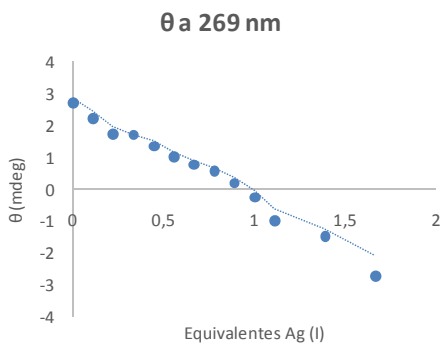


Figura 7.12. Variación de θ a 269 nm en el transcurso de la valoración

Bibliografía

- [1] B. Lippert, *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 200-202, 487–516.
- [2] J. Kypr, I. Kejnovská, D. Renčiuk, M. Vorlíčková, *Nucleic Acids Res.* **2009**, 37, 1713–1725.
- [3] M. Vorlíčková, J. Sági, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 2343–2347.
- [4] S. M. Swasey, L. E. Leal, O. Lopez-Acevedo, J. Pavlovich, E. G. Gwinn, *Sci. Rep.* **2015**, 5, 10163.
- [5] M. Vorlíčková, I. Kejnovská, K. Bednářová, D. Renčiuk, J. Kypr, *Chirality* **2012**, 24, 691–698.



Capítulo VIII

Conductance of
hybrids Ag(I)-DNA



DNA chains and bioorganic molecules have received lately a great interest due to their charge transfer electronic properties.^[1-3] The observation of long-range charge transport in DNA and advances in synthesizing DNA with defined nanostructures have further stimulated research interest in exploring DNA as a building block for nanoelectronics application.

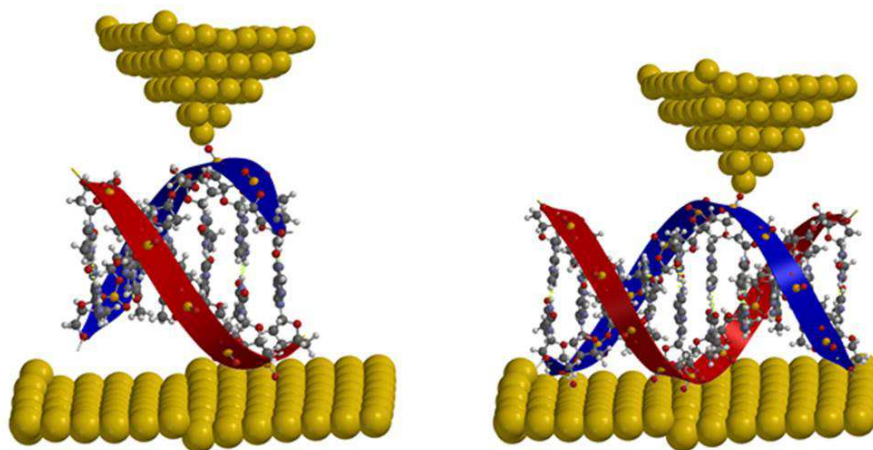
Many different studies have been published in the recent years with experimental results for similar DNA sequences showing non-agreement in their results.^[4-6] These shown discrepancies could maybe due to the different experimental conditions, especially different ionic environments in buffer solutions. The local molecular environment is a critical factor which should be taken in account when measuring the electronic properties of DNA.^[7,8] Supramolecular interactions could vary due to the ions surrounding the molecules^[9,10] altering the degree of charge delocalization and also perturb the structure of DNA molecules.

The electronic conductance through a DNA strand (IE end –to-end) is dominated by the thermal activated Hopping mechanism^[11-13] where the electrons migrate from the tip electrode to the surface electrode hopping through the DNA bases. These results indicate that the molecular conductance is measured through the DNA sequence. The study here shown measures the molecular conductance of the DNA and ds-DNA sequences across the double helix and due to the short length of the sequences, the molecular conductance is dominated by coherent tunneling mechanism.

It is well known that charge transport in DNA molecules is mediated by the π - π stacking interactions between neighboring base pairs.^[14-16] These π - π stacking interactions are sensitive to structural changes in DNA molecules which can be induced by adding Ag(I) ions to its sequence or changing the adenine base by the alternates' non-canonical 7-deaza-adenine synthesizing ds-DNA.

Here we study the electronic conductance using the Scanning Tunneling Microscope Break Junction technique (STM-BJ)^[17-19] of a series of DNA and ds-DNA double helices (Figure 8.1) and the effect of the addition of Ag(I) ion to modified DNA sequences resulting on stabilization on the conductance properties of short DNA duplexes. To explore whether the Ag(I) can significantly affect the transport properties

of DNA we chose three different sequences denoted 5'-A-T-A-T-A-T-3' [**poly6(NH₂-A-T)**], 5'-^{7C}A-T-^{7C}A-T-^{7C}A-T-3' [**poly6(NH₂-^{7C}A-T)**] and 5'-^{7C}A-T-^{7C}A-T-^{7C}A-T-^{7C}A-T-^{7C}A-T-3' [**poly10(NH₂-^{7C}A-T)**].



*Figure 8.1. Cartoon illustrating the electrode for **poly6(NH₂-A-T)** and **poly10(NH₂-^{7C}A-T)**.*

The addition of Ag(I) ions to the DNA and ds-DNA^[20] sequences stabilizes the double helix due to the replacement of the hydrogen bonds between the bases to Base-Ag-Base bonds which are stronger than the Base-hydrogen-base bond; this stabilization effect is reflected in the increase of the DNA's melting temperature.

8.1. Conductance of system Ag(I)–DNA. Discussion

Single molecule break junction measurements of the ds-DNA molecules offer a starting point to explore the molecular conductance improvement after adding Ag(I) ions within the chain bases and study its effects in the π - π^* stacking interactions in the DNA structure. The Ag(I) ions have been recently use as a stabilizer in the synthetic double helix DNA molecules due to its ability of increase the thermal stability of the strands bridged with these ions. This new discovered effect allows us to measure the molecular conductance of short ds-DNA sequences at room temperature.

The STM-BJ technique was used to measure the single molecule conductance of the series of compounds. The conductance is measured by repeatedly forming and breaking gold-DNA point contacts with a home-made Agilent based STM-BJ in a solution of molecules at room temperatures. The current is recorded at a fixed bias while the junction is elongated to generate conductance traces, using the procedures and conditions described in the experimental section. The conductance histograms are constructed from thousands of traces showing peaks corresponding to the most frequent value.

In figure 8.2 we show the STM-BJ histogram for the **poly6(NH₂-A-T)** in buffer solution with 1 equivalent of Ag(I), generated from 6026 traces which show the most frequent value for the conductance peak.

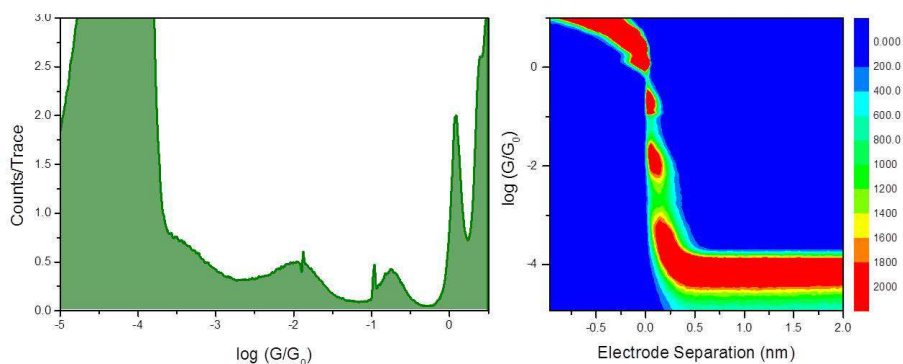


Figure 8.2. STM-BJ conductance histogram of **poly6(NH₂-A-T)** compound with 1 eq. of Ag(I) constructed from 6026 measured traces.

The histogram shows the sharp peaks at integer multiples of the conductance quantum G_0 which corresponds to the gold monoatomic contact and also exhibits one peak at lower conductance centered at $10^{-2} G_0$. The peak observed between $10^{-1} G_0$ and $10^{-0.5} G_0$ corresponds to the common gas peak and not to any molecular junction and it will be observed in all the histograms in this study.

The same **poly6(NH₂-A-T)** molecule has been measured after adding 2 Ag(I) equivalents to the buffer solution. The results obtained shown in figure 8.3 showing the same conductance value of $10^{-2} G_0$.

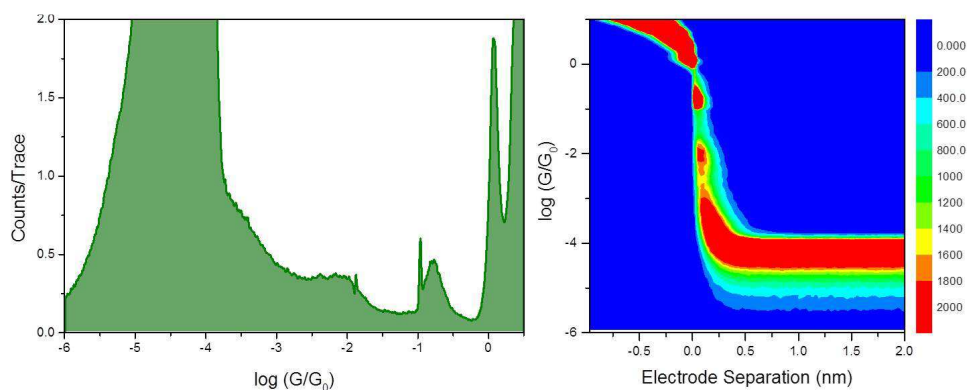


Figure 8.3. STM-BJ conductance histogram of **poly6(NH₂-A-T)** compound with 2 eq. of Ag(I) constructed from 5697 measured traces.

The results obtained suggest that the addition of one equivalent of Ag(I) ions increases the π - π stacking interaction in the Olygo compounds and the stability of the observing the shift of the melting temperatures to high temperatures upon addition.^[20] This stabilization effect is reflected in the conductance of the DNA molecules but the supplementary addition of one more Ag(I) equivalent does not lead to further significant stabilization.

The ds-DNA molecule **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** consisting in the same sequence of bases of the molecule **poly6(NH₂-A-T)** but changing the Adenine base for deaza-adenine base has been measured obtaining the results shown in figure 8.4.

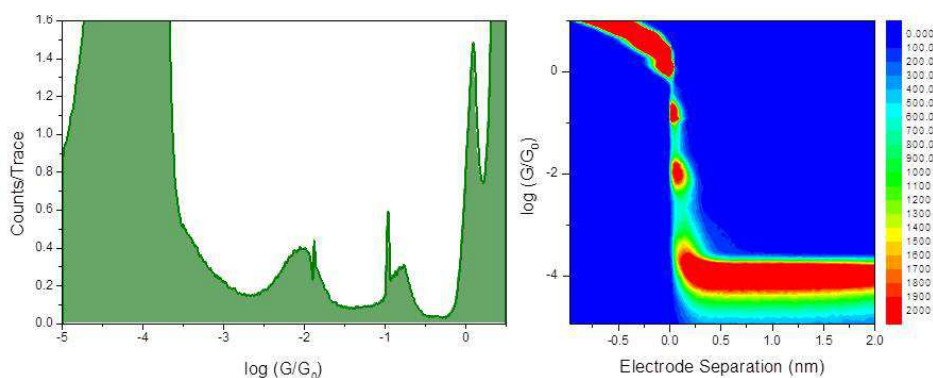


Figure 8.4. STM-BJ conductance histogram of **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** compound with 1 eq. of Ag(I) constructed from 5354 measured traces.

The conductance value obtained for the **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** compound with one equivalent of Ag(I) is 10⁻²G₀ as the histogram shows above. The conductance value does not change significantly with the substitution of the Adenine base for deaza-adenine base. The addition of two Ag(I) equivalent to the **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** shown in figure 8.5 reveals the same effect as obtained with the **poly6(NH₂-A-T)** molecule, giving a conductance value of 10⁻²G₀.

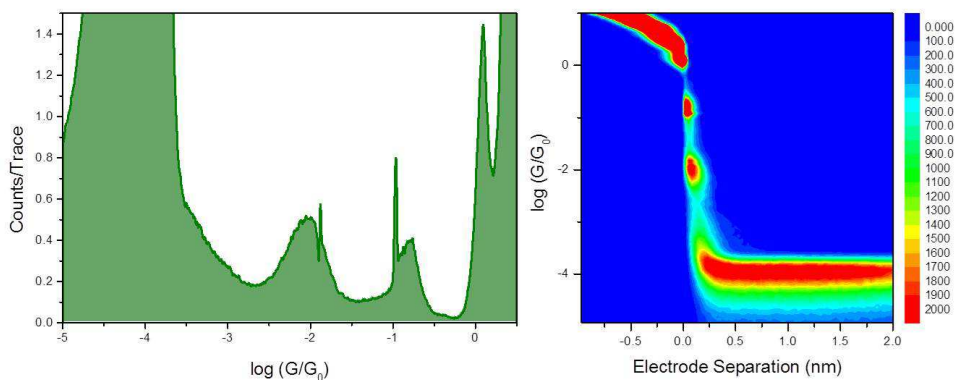


Figure 8.5. STM-BJ conductance histogram of **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** compound with 2 eq. of Ag(I) constructed from 6396 measured traces.

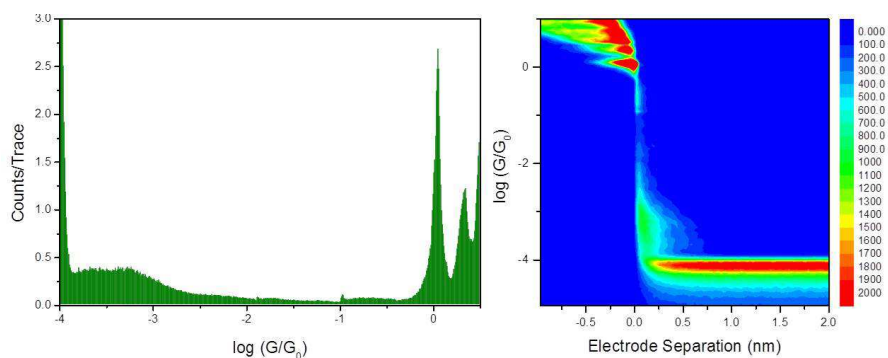
The results obtained comparing the DNA molecule **poly6(NH₂-A-T)** with the ds-DNA molecule **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** prove the effect of the silver ions in the stabilization of the double helix sequences due to the stronger silver bridge interaction instead the common DNA hydrogen bridge between bases. This effect reflected in the thermal stability of the molecules does not change with the increasing of silver equivalents to the DNA helix.

We have also measured **poly10(NH₂-^{7C}A-T)**, a ds-DNA sequence larger than **poly6(NH₂-A-T)** and **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** containing 10 pairs of bases. In figure 6 we show the STM-BJ histogram for the **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** in buffer solution, generated from 2781 traces which shows the most frequent value for the conductance peak for this ds-DNA helix.

The relatively high melting temperature of the **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** ($T_m=15^\circ\text{C}$) allowed us to measure the conductance of this ds-DNA sequence without adding any Ag(I) ions to the sample. That measurement was not possible due to the low melting temperature for the compounds **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** and **poly6(NH₂-A-T)** ($T_m=8^\circ\text{C}$).

The histogram in figure 8.6 shows a broad peak for the conductance of the **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** centered at $10^{-3.3} G_0$. The broad peak obtained could be explained

due to the length of the ten pair basis ds-DNA chain and the possibility of attach the molecule in different points of the bases sequence changing thereby the conductance value according with the distance between electrodes. This effect can be proved with the break-off distances distribution shown in the 2D-Histogram in figure 8.6. The 2d-Histogram shows a distribution on break-off distances up to six angstroms with the consequent conductance decay broadening the molecular conductance peak. This effect is not reflected in the measurements for **poly6(NH₂-⁷C-A-T)** and **poly6(NH₂-A-T)** due to the short length of the six pair of bases.



*Figure 8.6. STM-BJ conductance histogram of **poly10(NH₂-⁷C-A-T)** compound in buffer solution constructed from 3781 measured traces.*

In figure 8.7 we show the histogram of **poly10(NH₂-⁷C-A-T)** after adding one equivalent of Ag(I) to the buffer solution.

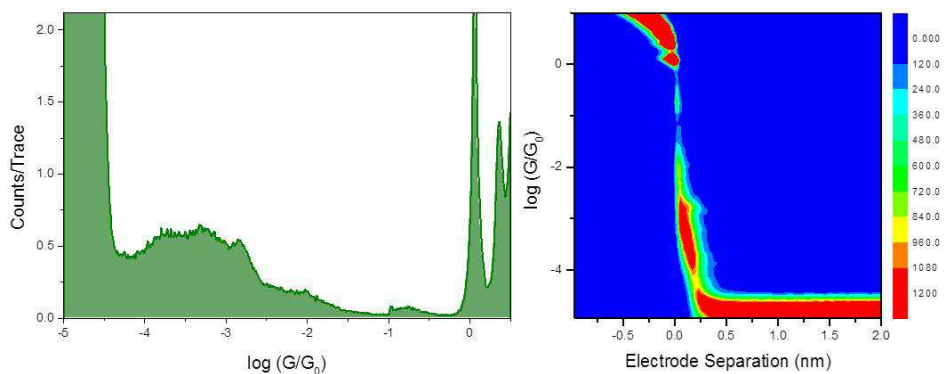


Figure 8.7. STM-BJ conductance histogram of **poly10(NH₂-⁷C-A-T)** compound with 1 eq. of Ag(I) constructed from 2359 measured traces.

Although the conductance value does not change after adding the silver cation, the histograms shows how the broad peak splits into three different peaks proving the explained effect before about the different connection positions of the electrodes while measuring the current across the ds-DNA molecule.

The addition of two equivalents of Ag(I) does not show any better result that the ones obtained for the **poly10(NH₂-⁷C-A-T)** in buffer solution and with one Ag(I) equivalent (Figure 8.8). The addition of the two equivalents increases the noise level in the system screening the conductance peak but keeping it still measurable centered in $10^{-3.5}G_0$.

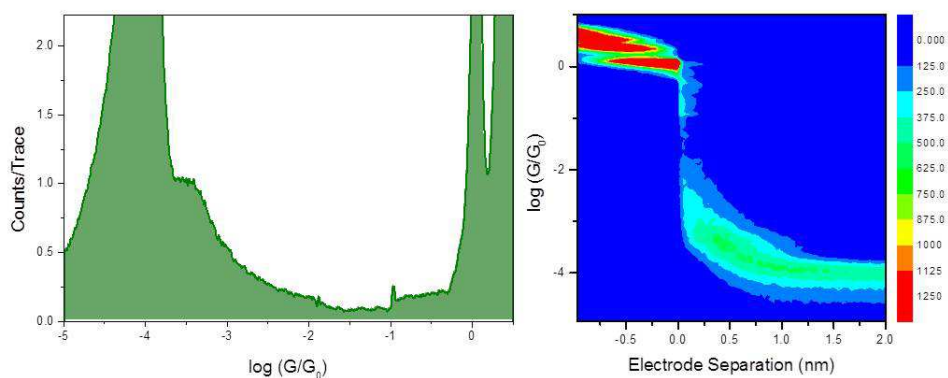


Figure 8.8. STM-BJ conductance histogram of **poly10(NH₂-⁷C-A-T)** compound with 2 eq. of Ag(I) constructed from 2246 measured traces.

Table 8.I. Summary of results obtained after each measure.

Sample	Size	Ag(I) equivalents	T _m	Conductance
poly6(NH ₂ -A-T)	~2 nm	1	~30°C	$G=10^{(-2.03\pm 0.83)}G_0$
		2	~55°C	$G=10^{(-2.31\pm 0.89)}G_0$
poly6(NH ₂ - ⁷ C-A-T)	~2 nm	1	30°C	$G=10^{(-2.06\pm 0.43)}G_0$
		2	55°C	$G=10^{(-1.87\pm 0.49)}G_0$
poly10(NH ₂ - ⁷ C-A-T)	~3.4 nm	0	~15°C	$G=10^{(-3.33\pm 0.66)}G_0$
		1	40°C	$G=10^{-3.30\pm 0.32}G_0$
		2	~55°C	$G=10^{-3.51}G_0$

Control experiments conducted in buffer with two equivalent of Ag(I) solution with no DNA didn't show any peak (Figure 8.9) therefore these imply that the peaks observed in the histograms are due to DNA molecules, rather than other factors such as the buffer solution or the Ag(I) ions.

The single strand DNA and ds-DNA could not form the molecular junction since only one end of the single strand was modified with an amine group, so it is impossible to attach the single DNA or ds-DNA strands to both gold electrodes.

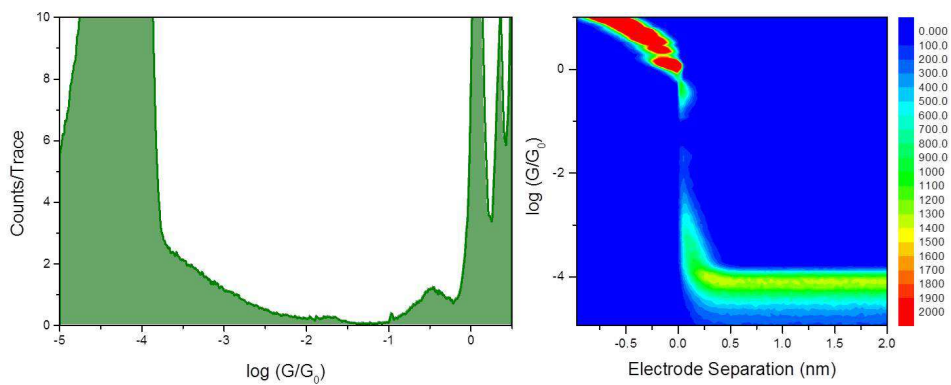


Figure 8.9. STM-BJ conductance histogram of the buffer solution with 2 eq. of Ag(I) constructed from 1854 measured traces.

8.2. Conclusion

We have measured the charge transport properties across DNA and ds-DNA molecules with and without the addition of silver ions. It was found that the addition of Ag(I) does not change the conductance properties of the Olygo sequences but improve the stability of the double helix by increasing the melting temperature. This study also prove the non-effects in the substitution of the adenine bases to deaza-adenine ones in the electronic properties of the system proving that the synthetic ds-AND molecules have no impact on the charge transport properties compare with the biological DNA.

However, the sharp conductance peaks shown for **poly6(NH₂-^{7C}A-T)** and **poly6(NH₂-A-T)** compare with the broad features in the **poly10(NH₂-^{7C}A-T)** conductance histograms and the break off distances distribution also indicates the capability to measure the conductance across a double helix between a pair of basis joined with silver bridges and also measure the conductance across the ds-DNA with a few pair of basis in-between the electrodes connections.

Bibliography

- [1] C. D. and M. Ratner, *Phys. World* **2001**, *14*, 29.
- [2] Y. Ye, L. Chen, X. Liu, U. J. Krull, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *568*, 138–145.
- [3] J. C. Genereux, J. K. Barton, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1642–1662.
- [4] E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan, G. Ben-Yoseph, *Nature* **1998**, *391*, 775–778.
- [5] H.-W. Fink, C. Schonenberger, *Nature* **1999**, *398*, 407–410.
- [6] P. Tran, B. Alavi, G. Gruner, *Phys. Rev. Lett.* **2000**, *85*, 1564–1567.
- [7] R. N. Barnett, C. L. Cleveland, A. Joy, U. Landman, G. B. Schuster, *Science (80-.)*. **2001**, *294*, 567–571.
- [8] Y. A. Mantz, F. L. Gervasio, T. Laino, M. Parrinello, *Phys. Rev. Lett.* **2007**, *99*, 58104.
- [9] W. Zhang, S. Gan, A. Vezzoli, R. J. Davidson, D. C. Milan, K. V. Luzyanin, S. J. Higgins, R. J. Nichols, A. Beeby, P. J. Low, et al., *ACS Nano* **2016**, DOI 10.1021/acsnano.6b00786.
- [10] D. C. Milan, O. A. Al-Owaedi, M.-C. Oerthel, S. Marqués-González, R. J. Brooke, M. R. Bryce, P. Cea, J. Ferrer, S. J. Higgins, C. J. Lambert, et al., *J. Phys. Chem. C* **2015**, DOI 10.1021/acs.jpcc.5b08877.
- [11] S. M. Risser, D. N. Beratan, T. J. Meade, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2508–2510.
- [12] J. Jortner, M. Bixon, T. Langenbacher, M. E. Michel-Beyerle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 12759–12765.
- [13] L. Xiang, J. L. Palma, C. Bruot, V. Mujica, M. A. Ratner, N. Tao, *Nat Chem* **2015**, *7*, 221–226.
- [14] C. J. Murphy, M. R. Arkin, N. D. Ghatlia, S. Bossmann, N. J. Turro, J. K. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 5315–9.
- [15] F. D. Lewis, X. Liu, J. Liu, S. E. Miller, R. T. Hayes, M. R. Wasielewski, *Nature* **2000**,

- 406, 51–3.
- [16] B. Giese, J. Amaudrut, A. K. Köhler, M. Spormann, S. Wessely, *Nature* **2001**, *412*, 318–20.
- [17] C. Kergueris, J.-P. Bourgoin, S. Palacin, D. Esteve, C. Urbina, M. Magoga, C. Joachim, *Phys. Rev. B* **1999**, *59*, 12505–12513.
- [18] H. . Weber, J. Reichert, F. Weigend, R. Ochs, D. Beckmann, M. Mayor, R. Ahlrichs, H. . Löhneysen, *Chem. Phys.* **2002**, *281*, 113–125.
- [19] M. A. Reed, *Science (80-.)*. **1997**, *278*, 252–254.
- [20] N. Santamaría-Díaz, J. M. Méndez-Arriaga, J. M. Salas, M. A. Galindo, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, DOI 10.1002/anie.201600924.



Conclusiones
(Conclusions)



El trabajo de tesis realizado ha tenido como objetivo el estudio, desarrollo y estudio de las propiedades conductoras de nuevos hilos moleculares basados en sistemas de tipo metal-ADN. Para la formación de estas moléculas híbridas metal-ADN se han estudiado dos estrategias bien definidas; i) desarrollo de complejos metálicos capaces de participar en procesos de auto-ensamblaje para interaccionar con posiciones específicas de oligonucleótidos de cadena simple, y ii) formación de moléculas de ADN de cadena doble modificadas capaces de dar lugar a pares de bases mediadas por enlaces de coordinación en presencia iones de Ag(I). El estudio de las propiedades conductoras de estos sistemas se ha realizado mediante técnicas de *STM-break junction*, en colaboración con la Universidad de Liverpool.

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de tesis han sido las siguientes:

1. Se han sintetizado y caracterizado estructuralmente un total de siete ligandos orgánicos (ácido 4-metoxipiridín-2,6-dicarboxílico (**1**), ácido 4-(3-(2-(tiofen-2-il)-1H-pirrol-1-il)propoxi)piridin-2,6-dicarboxílico (**2**), (4-propoxipiridina-2,6-diil)dimetanol (**3**), ácido 6-(aminometil)-4-propoxipicolínico (**4**), ácido 8-amino-4-propoxiquinolona-2-carboxílico (**5**), ácido 8-amino-4-metoxiquinolona-2-carboxílico (**6**) y piridin-2,6-diildimetanamina (**7**) para su posterior uso en la obtención de complejos metálicos. Estos ligandos se han clasificados, por sus características para la formación de enlaces de hidrógeno complementarios a las nucleobases, en ligandos hidroxio-hidroxio, hidroxio-amino y amino-amino.
2. Ha sido posible la obtención y caracterización de siete complejos con ligandos hidroxio-hidroxio (**cheldPd**, **1Pd**, **2Pd**, **3Pd**, **cheldPt**, **1Pt** y **1Cu**), cuatro complejos con ligandos hidroxio-amino (**5Pd**, **6Pd**, **4Cu** y **5Cu**) y tres complejos con ligandos amino-amino (**pidiamPd**, **7Pd** y **7Cu**) que se han denominado como *complejos primarios*. La caracterización se ha llevado a cabo tanto en estado sólido (IR, AE) como en disolución (¹H-RMN, HRMS). Cuando fue posible la obtención de monocristales también se realizó la determinación estructural del complejo mediante DRX (**3Pd**, **1Pt**, **1Cu**, **5Cu** y **7Pd**).

3. Se han estudiado las interacciones entre los complejos primarios, derivados de ligandos hidrox-hidrox, y nucleobases modelo aisladas, como paso previo a la formación de los híbridos metal-ADN. Concretamente, se han sintetizado y caracterizado por AE, IR, ^1H -RMN, HRMS y DRX (de aquellos en los que fue posible obtener el monocristal) los siguientes complejos metal-nucleobase: **cheldPd_mC**, **cheldPd_mdA**, **cheldPd_pdA**, **cheldPt_mC**, **cheldPt_mdA**, **cheldPt_pdA**, **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** y **1Cu_pG**. Para poder realizar estos estudios con mononucleobases, se han sintetizado y caracterizado siete nucleobases modelo entre las cuales se encuentra la 7-deaza-adenina (^7C A) que se caracteriza por la ausencia del átomo de nitrógeno en la posición 7, evitando así la coordinación del complejo metálico a la nucleobase por esta posición, como ocurre en el caso de la adenina.
4. Se han sintetizado y caracterizado tres complejos de Pd(II) al reaccionar el complejo primario **cheldPd** con las nucleobases 1-metil-citosina (**mC**), N9-metil-7-deaza-adenina (**mdA**) y N9-propil-7-deaza-adenina (**pdA**). El estudio estructural de los complejos **cheldPd_mC**, **cheldPd_mdA** y **cheldPd_pdA** confirma la interacción entre el complejo metálico y las nucleobases a través de la formación de un enlace de coordinación entre el ión Pd(II) y el átomo N3 para la nucleobase **mC** y N1 para las nucleobases **mdA** y **pdA**. Debido a la dificultad para obtener el complejo primario **2Pd** en estado sólido, el estudio que confirma la interacción entre este y la nucleobase **pdA** se ha realizado exclusivamente en disolución mediante ^1H -RMN y HRMS. El análisis estructural mediante DRX de los complejos **cheldPd_mC** y **cheldPd_pdA** permitió determinar que sólo en el caso del complejo **cheldPd_pdA**, la interacción tiene lugar de forma coplanar (1.62°), y se encuentra estabilizada por la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo amino exocíclico de la nucleobase **pdA** y uno de los grupo carboxilato del complejo **cheldPd**. En el caso del complejo **cheldPd_mC**, esta interacción ocurre de forma casi perpendicular (74.96°) sin que lleguen a formarse enlaces de hidrógeno complejo-nucleobase.

5. Se han sintetizado y caracterizado tres complejos de Pt(II) por interacción del complejo primario **cheldPt** con las nucleobases 1-metil-citosina (**mC**), N9-metil-7-deaza-adenina (**mdA**) y N9-propil-7-deaza-adenina (**pdA**). El estudio estructural de los complejos **cheldPt_mC**, **cheldPt_mdA** y **cheldPt_pdA** confirma que la interacción entre el complejo metálico y las nucleobases tiene lugar a través de la formación de un enlace de coordinación entre el ión Pt(II) y el átomo N3 en el caso de la nucleobase **mC** y N1 para las nucleobases **mdA** y **pdA**. La determinación estructural mediante DRX del complejo **cheldPt_pdA** confirmó que se trata de un complejo isoestructural a su análogo de Pd(II), en el que el ángulo diedro entre el complejo y la nucleobase es de 1.49° y tiene lugar la formación de un enlace de hidrógeno complejo-nucleobase equivalente.

6. Se han sintetizado y caracterizado cuatro complejos de Cu(II) haciendo reaccionar el complejo primario **1Cu** con las nucleobases 1-metil-citosina (**mC**), N9-etil-timina (**eA**), N9-propil-7-deaza-adenina (**pdA**) y N9-propil-guanina (**pG**). El estudio estructural de los complejos **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** y **1Cu_pG** confirma que la interacción entre el complejo metálico y las nucleobases se establece a través de la formación de un enlace de coordinación entre el ión Pt(II) y el átomo N3 en el caso de la nucleobase **mC**, N1 para la nucleobase **pdA**, y N7 para las nucleobases **eA** y **pG**. No ha sido posible obtener los complejos que confirmen que es posible la interacción entre **1Cu** y las nucleobases N9-propil-7-deaza-guanina (**pdG**) y 1-etil-timina (**eT**). La determinación estructural mediante DRX de los complejos **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** y **1Cu_pG** determinó que sólo para el complejo **1Cu_eA** la interacción entre el complejo y la nucleobase tiene lugar de forma casi coplanar (6.97°) favoreciendo la formación de un enlace de hidrógeno intramolecular entre el grupo amino de la nucleobase y el grupo carboxilato del complejo. Los valores de ángulos diedros para los complejos de **1Cu_mC**, **1Cu_pdA** y **1Cu_pG** fueron de 77.73°, 45.67° y 80.41°, respectivamente.

7. Se han realizado estudios de interacción complejo metálico-ADN para los complejos **cheldPd** y oligonucleótidos monohebras de 15 nucleobases **poly15A** y

- poly15(⁷C A)**. La realización de estos estudios, mediante una valoración en la se fue adicionando complejo metálico sobre oligonucleótido y que fue seguida por la técnica espectroscópica de dicroísmo circular (CD), confirma la interacción del complejo con las monohebras y la formación de híbridos complejo-ADN.
8. El estudio de interacción entre el complejo **1Cu** y las monohebras **poly15A**, **poly15(⁷C A)**, **poly15C** y **poly10G** confirma que este interacciona las tres primeras cadenas de oligonucleótidos.
 9. En el desarrollo de moléculas de ADN de cadena doble que contengan pares de bases mediadas por enlaces de coordinación a iones de Ag(I), se utilizó las dobles hebras **poly18(⁷C A-T)** y **poly18(A-T)**. Se ha demostrado que tiene lugar la formación de híbridos metal-oligonucleótido altamente estables debido a la sustitución de los enlaces de hidrógeno presentes de forma natural entre los pares de bases de la doble hebra por enlaces de coordinación con el ión Ag(I).
 10. Se ha llevado a cabo la síntesis y caracterización de oligonucleótidos **poly6(NH₂-A-T)**, **poly6(NH₂-⁷C A-T)**, **poly10(NH₂-A-T)** y **poly10(NH₂-⁷C A-T)**, con un grupo amino terminal, capaces de dar lugar a pares de bases mediados por iones Ag(I) y adecuados para llevar a cabo las medidas de conductividad.
 11. Se ha realizado el estudio de las propiedades conductoras de los oligonucleótidos en presencia y ausencia de iones Ag(I), mediante la técnica *STM-break junction*, comprobándose que el transporte de carga, que tiene lugar de forma natural entre pares de bases gracias al apilamiento π - π^* de las nucleobases, no se ve afectado tras la interacción de los iones Ag(I) con los pares de bases originando híbridos ⁷C A-Ag⁺-T aunque la formación de estos sistemas implique un aumento en la estabilidad. Además, se ha comprobado mediante estos estudios que la sustitución de la nucleobase canónica adenina por 7-deaza-adenina en el oligonucleótido no implica cambio alguno en el valor de la conductancia.

This thesis has developed and studied the conducting properties of new molecular wires based on metallo-DNA. Two different methodologies were investigated to prepare the metallo-DNA systems; i) the self-assembly processes between pre-programmed metal complexes and ss-DNA molecules, and ii) the use of oligonucleotides containing artificial thymine/7-deaza-adenine base pairs within its sequence, capable of forming silver-mediated base pairs in presence of silver(I) metal ions. Then, the conducting properties of the silver-DNA systems were measured using the *STM-break junction* technique.

All the results described in this thesis lead to the following conclusions:

1. Seven organic ligands (4-methoxypyridine-2,6-dicarboxylic acid (**1**), 4-(3-(2-(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)propoxy)pyridine-2,6-dicarboxylic acid (**2**), (4-propoxypyridine-2,6-diyl)dimethanol (**3**), 6-(aminomethyl)-4-propoxypicolinic acid (**4**), 8-amino-4-propoxyquinoline-2-carboxylic acid (**5**), 8-amino-4-methoxyquinoline-2-carboxylic acid (**6**) and pyridin-2,6-diyl dimethanamine (**7**) were designed, synthesized and characterized to form metal complexes, participate in hydrogen bond formation with nucleobases and be modified to carry desired functionality. These ligands were classified in hydroxo-hydroxo, hydroxo-amino and amino-amino ligands, by the ability of their functional groups to hydrogen bonding with nucleobases-
2. It was possible to obtain and characterize seven primary Pd(II), Pt(II) and Cu(II) metal complexes with hydroxo-hydroxo ligands (**cheldPd**, **1Pd**, **2Pd**, **3Pd**, **cheldPt**, **1Pt** and **1Cu**), four metal complexes with hydroxo-amino ligands (**5Pd**, **6Pd**, **4Cu** and **5Cu**) and three metal complexes with amino-amino ligands (**pidiamPd**, **7Pd** and **7Cu**). The characterization was carried out in the solid state (IR, AE) and solution ($^1\text{H-NMR}$, HRMS) and by XRD (**3Pd**, **1Pt**, **1Cu**, **5Cu** and **7Pd**) when it was possible.

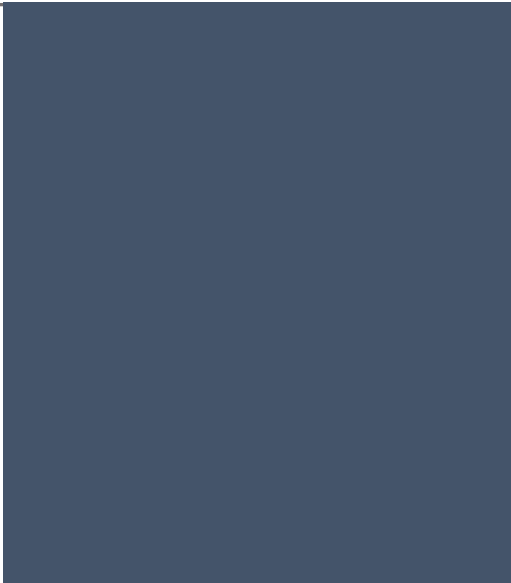
3. The interaction studies between primary complexes (hydroxo-hydroxo ligands derivatives) and model mononucleobases were performed to get some insight about the formation of primary complexes_nucleobases systems prior the formation of metallo-DNA hybrids. Thus, model nucleobases **mC**, **eA**, **mdA**, **pdA**, **pG**, **pdG** were synthesized and characterized. Afterwards, the synthesis of metal-nucleobase complex **cheldPd_mC**, **cheldPd_mdA**, **cheldPd_pdA**, **cheldPt_mC**, **cheldPt_mdA**, **cheldPt_pdA**, **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** and **1Cu_pG** was achieved and characterized by EA, IR, ¹H-NMR, HRMS and finally by XRD when possible.
4. Three Pd(II) complexes were obtained as a result of the interaction between **cheldPd** and 1-methyl-cytosine (**mC**), N9-methyl-7-deaza-adenine (**mdA**) and N9-propyl-7-deaza-adenine (**pdA**) nucleobases. The structural study of **cheldPd_mC**, **cheldPd_mdA** and **cheldPd_pdA** complexes confirms the interaction of the **CheldPd** with the nucleobases through formation of a coordination bond at **mC-N3**, **mdA-N1** and **pdA-N1** position. Complex **2Pd** could not be isolated in solid state and therefore the interaction studies were carried out in solution (¹H-NMR and HRMS) confirming its interaction towards nucleobase **pdA**. The X-Ray diffraction analysis for **cheldPd_mC** and **cheldPd_pdA** determined that only the aromatic units of **cheldPd_pdA** hold a coplanar (1.62°) conformation that is further stabilized by a hydrogen bond between the nucleobase exocyclic amino group and complex carboxylate group. However, in the case of **cheldPd_mC**, the aromatic unit preserve an almost perpendicular (74.96°) conformation with no hydrogen bonding observed.
5. Three Pt(II) complexes were obtained as a result of the interaction between **cheldPt** and 1-methyl-cytosine (**mC**), N9-methyl-7-deaza-adenine (**mdA**) and N9-propyl-7-deaza-adenine (**pdA**) nucleobases. The structural study of **cheldPt_mC**, **cheldPt_mdA** and **cheldPt_pdA** confirms the interaction of **cheldPt** with nucleobases through formation of a coordination bond at **mC-N3**, **mdA-N1** and **pdA-N1** position. The X-Ray diffraction analysis determined that aromatic units of

- cheldPt_pdA** maintain an almost coplanar configuration (1.49°) that is further stabilized by a hydrogen bond nucleobase exocyclic amino group and complex carboxylate group.
- Four Cu(II) complexes were obtained as a result of the interaction between **1Cu** and 1-methyl-cytosine (**mC**), N9-ethyl-thymine (**eA**), N9-propyl-7-deaza-adenine (**pdA**) and N9-propyl-guanine (**pG**) nucleobases. The structural study of **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** and **1Cu_pG** confirms the interaction of **1Cu** towards nucleobases through formation of a coordination bond at **mC-N3** atom, **pdA-N1** atom, **eA-N7** and **pG-N7** position. It has not been possible to obtain the complex resulting from the interaction between **1Cu** and N9-propyl-7-deaza-guanine (**pdG**) or 1-ethyl-thymine (**eT**). The X-Ray diffraction analysis of **1Cu_mC**, **1Cu_eA**, **1Cu_pdA** and **1Cu_pG** determined that only the aromatic units of **1Cu_eA** hold a coplanar (6.97°) configuration that is further stabilized by an intramolecular hydrogen bond between the nucleobase amino group and the complex carboxylate group. On the other hand, the aromatic units of **1Cu_mC**, **1Cu_pdA** and **1Cu_pG** display an angle of 77.73° , 45.67° and 80.41° , respectively.
 - Afterward, the interaction between primary metal complex **cheldPd** and single-stranded DNA were carried out by means of circular dichroism. **cheldPd** was proven to bind to oligonucleotides **poly15A** and **poly15(7C A)** leading to a hybrid complex-DNA system with controlled stoichiometry.
 - The interaction between **1Cu** and single-stranded oligonucleotides **poly15A**, **poly15(7C A)**, **poly15C** and **poly10G** was also performed by means of circular dichroism. The results showed that **1Cu** only binds to the first three oligonucleotides and no interaction was observed towards **poly10G**, which is subject of further study.
 - The ds-oligonucleotide **poly18(7C A-T)** has been proven to lead to highly stable ds-oligonucleotide containing silver-mediated-base pairs 7C A-Ag-T upon addition of

controlled amount of Ag(I) ions. This has been studied in solution by UV spectroscopy at variable temperature, CD, pH and ESI-MS. The results showed that the formation of the silver-mediated base pairs occurs due to the replacement of Watson-Crick hydrogen by coordination bonds to central Ag(I) metal ions.

10. The oligonucleotides **poly6(NH₂-A-T)**, **poly6(NH₂-⁷C-A-T)** and **poly10(NH₂-⁷C-A-T)**, holding a terminal amino group, has been proven to form silver-mediated base pairs suitable to carry out the conductance measurements.

11. The conductance studies of the oligonucleotides **poly6 (NH₂-A-T)**, **poly6(NH₂-⁷C-A-T)** and **poly10(NH₂-⁷C-A-T)** in presence and absence of Ag(I) ions has been measured by STM break-junction technique. It has been found that the transport charge, occurring along the base pairs, is not affected upon formation of ⁷C-A-Ag⁺-T base pairs, although the formation of these systems involves an increase in stability. Furthermore, it has been found that the substitution of canonical nucleobase adenine by 7-deaza-adenine in the oligonucleotide does not imply any change in the conductance value.



Anexo I

Valoraciones: Tablas



Tabla de adición para una valoración de Tm

Valoración T_m poly18(dA-T): AgNO₃

Stock Solution [AgNO ₃] uM	X	
Stock Solution ds-poly18(T_A)	X uM (ds)	X uM (ss)

NaClO₄ 100 mM
 MOPS 5 mM
 pH 6,8

ds[OLIGO]	Ag/bp	[Ag]	Volumen (uL)	Volumen (uL) adiciones Ag	Volumen (uL) Total Ag
2	=D9/(B9*18)	=(G9*\$B\$4/E9)	2000	0	=0
2	=D10/(B10*18)	=(G10*\$B\$4/E10)	=E9+F10	1,5	=G9+F10
2	=D11/(B11*18)	=(G11*\$B\$4/E11)	=E10+F11	1,5	=G10+F11
2	=D12/(B12*18)	=(G12*\$B\$4/E12)	=E11+F12	1,5	=G11+F12
2	=D13/(B13*18)	=(G13*\$B\$4/E13)	=E12+F13	1,5	=G12+F13
2	=D14/(B14*18)	=(G14*\$B\$4/E14)	=E13+F14	1,5	=G13+F14
2	=D15/(B15*18)	=(G15*\$B\$4/E15)	=E14+F15	1,5	=G14+F15
2	=D16/(B16*18)	=(G16*\$B\$4/E16)	=E15+F16	1,5	=G15+F16
2	=D17/(B17*18)	=(G17*\$B\$4/E17)	=E16+F17	1,5	=G16+F17
2	=D18/(B18*18)	=(G18*\$B\$4/E18)	=E17+F18	1,5	=G17+F18
[Oligo] final experimento	=E9*B9/(E9+G18)				

Valoración Tm poly18(dA-T):Ag⁺

Stock Solution [AgNO ₃] uM	16500	
Stock Solution ds-poly18(T_A)	2 uM (ds)	4 uM (ss)

NaClO₄ 100 mM
 MOPS 5 mM
 pH 6,8

ds[OLIGO]	Ag/bp	[Ag]	Volumen (uL)	Volumen (uL) adiciones Ag	Volumen (uL) Total Ag
2,00	0,00	0,00	2000,00	0,00	0,00
2,00	0,34	12,37	2001,50	1,50	1,50
2,00	0,69	24,71	2003,00	1,50	3,00
2,00	1,03	37,04	2004,50	1,50	4,50
2,00	1,37	49,35	2006,00	1,50	6,00
2,00	1,71	61,64	2007,50	1,50	7,50
2,00	2,05	73,92	2009,00	1,50	9,00
2,00	2,39	86,17	2010,50	1,50	10,50
2,00	2,73	98,41	2012,00	1,50	12,00
2,00	3,07	110,63	2013,50	1,50	13,50
[Oligo] final experimento	1,99				

Tabla de los cálculos para una valoración UV-vis

Valoración UV-visible poly18(dA-T):Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	1000
Stock Solution ds[poly18dA-T] uM	4

4uM + 4uM de cada hebra ssDNA

Ratio [AgNO ₃]:[polydA-T]	Initial Volume uL	[AgNO ₃] uM required	[polydA-T] uM	V(AgNO ₃) total uL from stock solution	Total volume uL	V(AgNO ₃) uL added	V(poly18dA-T) uL added
	500	0	2	$=(\$B\$7*C7)/(\$B\$3-(2*C7))$	$=\$B\$7+(2*E7)$	0	=B7/2
=C8/D8		6	2	$=(\$B\$7*C8)/(\$B\$3-(2*C8))$	$=\$B\$7+(2*E8)$	=E8	=G8
=C9/D9		12	2	$=(\$B\$7*C9)/(\$B\$3-(2*C9))$	$=\$B\$7+(2*E9)$	=E9-E8	=G9
=C10/D10		20	2	$=(\$B\$7*C10)/(\$B\$3-(2*C10))$	$=\$B\$7+(2*E10)$	=E10-E9	=G10
=C11/D11		28	2	$=(\$B\$7*C11)/(\$B\$3-(2*C11))$	$=\$B\$7+(2*E11)$	=E11-E10	=G11
=C12/D12		36	2	$=(\$B\$7*C12)/(\$B\$3-(2*C12))$	$=\$B\$7+(2*E12)$	=E12-E11	=G12
=C13/D13		44	2	$=(\$B\$7*C13)/(\$B\$3-(2*C13))$	$=\$B\$7+(2*E13)$	=E13-E12	=G13
=C14/D14		52	2	$=(\$B\$7*C14)/(\$B\$3-(2*C14))$	$=\$B\$7+(2*E14)$	=E14-E13	=G14
=C15/D15		60	2	$=(\$B\$7*C15)/(\$B\$3-(2*C15))$	$=\$B\$7+(2*E15)$	=E15-E14	=G15
=C16/D16		66	2	$=(\$B\$7*C16)/(\$B\$3-(2*C16))$	$=\$B\$7+(2*E16)$	=E16-E15	=G16
=C17/D17		72	2	$=(\$B\$7*C17)/(\$B\$3-(2*C17))$	$=\$B\$7+(2*E17)$	=E17-E16	=G17
=C18/D18		82	2	$=(\$B\$7*C18)/(\$B\$3-(2*C18))$	$=\$B\$7+(2*E18)$	=E18-E17	=G18
=C19/D19		90	2	$=(\$B\$7*C19)/(\$B\$3-(2*C19))$	$=\$B\$7+(2*E19)$	=E19-E18	=G19
=C20/D20		100	2	$=(\$B\$7*C20)/(\$B\$3-(2*C20))$	$=\$B\$7+(2*E20)$	=E20-E19	=G20
=C21/D21		120	2	$=(\$B\$7*C21)/(\$B\$3-(2*C21))$	$=\$B\$7+(2*E21)$	=E21-E20	=G21

Valoración UV-visible poly18(dA-T):Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	1000
Stock Solution ds[poly18dA-T] uM	4

4uM + 4uM de cada hebra ssDNA

Ratio [AgNO ₃]:[polydA-T]	Initial Volume uL	[AgNO ₃] uM required	[polydA-T] uM	V(AgNO ₃) total uL from stock solution	Total volume uL	V(AgNO ₃) uL added	V(poly18dA-T) uL added
	500	0	2	0,00	500,00	0,00	250,00
3		6	2	3,04	506,07	3,04	3,04
6		12	2	6,15	512,30	3,11	3,11
10		20	2	10,42	520,83	4,27	4,27
14		28	2	14,83	529,66	4,41	4,41
18		36	2	19,40	538,79	4,57	4,57
22		44	2	24,12	548,25	4,73	4,73
26		52	2	29,02	558,04	4,90	4,90
30		60	2	34,09	568,18	5,07	5,07
33		66	2	38,02	576,04	3,93	3,93
36		72	2	42,06	584,11	4,04	4,04
41		82	2	49,04	598,09	6,99	6,99
45		90	2	54,88	609,76	5,83	5,83
50		100	2	62,50	625,00	7,62	7,62
60		120	2	78,95	657,89	16,45	16,45

Valoración UV-visible poly18(A-T):Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	2000	4uM + 4uM de cada hebra ssDNA
Stock Solution ds[poly18dA-T] uM	4	

Ratio [AgNO ₃]:[poly dA-T]	Initial Volume uL	[AgNO ₃] uM required	[polydA-T] uM	V(AgNO ₃) total uL from stock solution	Total volume uL	V(AgNO ₃) uL added	V(poly18dA-T) uL added	Ag ⁺ /base pair
	500	0	2	0,00	500,00	0,00	250,00	0
3		6	2	1,51	503,02	1,51	1,51	0,166667
6		12	2	3,04	506,07	1,53	1,53	0,333333
10		20	2	5,10	510,20	2,07	2,07	0,555556
14		28	2	7,20	514,40	2,10	2,10	0,777778
18		36	2	9,34	518,67	2,13	2,13	1
22		44	2	11,51	523,01	2,17	2,17	1,222222
26		52	2	13,71	527,43	2,21	2,21	1,444444
30		60	2	15,96	531,91	2,24	2,24	1,666667
33		66	2	17,67	535,33	1,71	1,71	1,833333
36		72	2	19,40	538,79	1,73	1,73	2
41		82	2	22,33	544,66	2,93	2,93	2,277778
45		90	2	24,73	549,45	2,39	2,39	2,5
50		100	2	27,78	555,56	3,05	3,05	2,777778
54		108	2	30,27	560,54	2,49	2,49	3
63		126	2	36,04	572,08	5,77	5,77	3,5

Valoración pH poly18(dA-T) : Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	X	
Stock Solution ds-poly18(T_dA)	3 uM (ds)	6 uM (ss)

NaClO₄ 100 mM

MOPS 0 mM

pH inicial
(ajustado con
NaOH o
fosfórico) 7

ds[OLIGO]	Ag/bp	[Ag]	Volumen (uL)	Volumen (uL) adiciones Ag	Volumen (uL) Total Ag
3	=D9/(B9*18)	=(G9*3400/E9)	500	0	=0
3	=D10/(B10*18)	=(G10*\$B\$4/E10)	=E9+F10	1,8	=G9+F10
3	=D11/(B11*18)	=(G11*\$B\$4/E11)	=E10+F11	1,8	=G10+F11
3	=D12/(B12*18)	=(G12*\$B\$4/E12)	=E11+F12	1,8	=G11+F12
3	=D13/(B13*18)	=(G13*\$B\$4/E13)	=E12+F13	1,8	=G12+F13
3	=D14/(B14*18)	=(G14*\$B\$4/E14)	=E13+F14	1,8	=G13+F14
3	=D15/(B15*18)	=(G15*\$B\$4/E15)	=E14+F15	1,8	=G14+F15
3	=D16/(B16*18)	=(G16*\$B\$4/E16)	=E15+F16	1,8	=G15+F16
3	=D17/(B17*18)	=(G17*\$B\$4/E17)	=E16+F17	1,8	=G16+F17
3	=D18/(B18*18)	=(G18*\$B\$4/E18)	=E17+F18	1,8	=G17+F18
[Oligo] final experimento	=E9*B9/(E9+G18)				

Valoración pH poly18(dA-T):Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	5200	
Stock Solution ds- poly18(T_dA)	3 uM (ds)	6 uM (ss)

NaClO₄ 100 mM

MOPS 0 mM

pH inicial
(ajustado con
NaOH o
fosfórico) 7

	ds[OLIGO]	Ag/bp	[Ag]	Volumen (uL)	Volumen (uL) adiciones Ag	Volumen (uL) Total Ag
	3,00	0,00	0,00	500,00	0,00	0,00
	3,00	0,35	18,65	501,80	1,80	1,80
	3,00	0,69	37,17	503,60	1,80	3,60
	3,00	1,03	55,56	505,40	1,80	5,40
	3,00	1,37	73,82	507,20	1,80	7,20
	3,00	1,70	91,94	509,00	1,80	9,00
	3,00	2,04	109,95	510,80	1,80	10,80
	3,00	2,37	127,82	512,60	1,80	12,60
	3,00	2,70	145,57	514,40	1,80	14,40
	3,00	3,02	163,19	516,20	1,80	16,20
[Oligo] final experimento	2,91					

Valoración pH poly18(A-T):Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	5200	
Stock Solution ds- poly18(T_A)	3 uM (ds)	6 uM (ss)

NaClO₄ 100 mM

MOPS 0 mM

pH inicial
(ajustado con
NaOH o
fosfórico) 7

	ds[OLIGO]	Ag/bp	[Ag]	Volumen (uL)	Volumen (uL) adiciones Ag	Volumen (uL) Total Ag
	3,00	0,00	0,00	500,00	0,00	0,00
	3,00	0,35	18,65	501,80	1,80	1,80
	3,00	0,69	37,17	503,60	1,80	3,60
	3,00	1,03	55,56	505,40	1,80	5,40
	3,00	1,37	73,82	507,20	1,80	7,20
	3,00	1,70	91,94	509,00	1,80	9,00
	3,00	2,04	109,95	510,80	1,80	10,80
	3,00	2,37	127,82	512,60	1,80	12,60
	3,00	2,70	145,57	514,40	1,80	14,40
	3,00	3,02	163,19	516,20	1,80	16,20
[Oligo] final experimento	2,91					

Valoración CD poly18(dA-T) : Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	1000
Stock Solution ds[poly18dA-T] uM	4

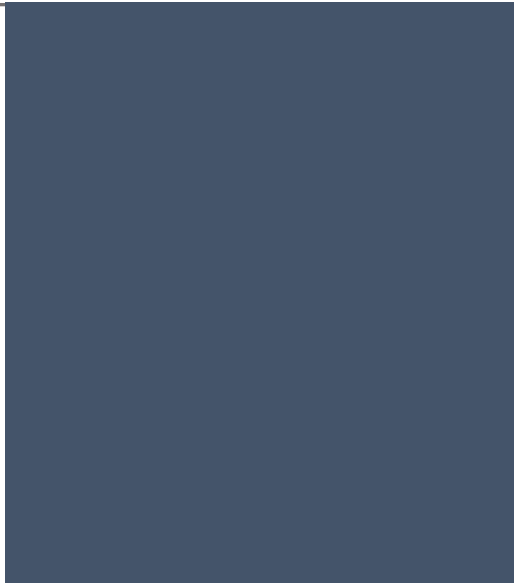
4uM + 4uM de cada hebra ssDNA

Ratio [AgNO ₃]:[polydA-T]	Initial Volume uL	[AgNO ₃] uM required	[polydA-T] uM	V(AgNO ₃) total uL from stock solution	Total volume uL	V(AgNO ₃) uL added	V(poly18dA-T) uL added
	1000	0	=B\$4/2	=(B\$7*C7)/(B\$3-(2*C7))	=B\$7+(2*E7)	0	500
=C8/D8		6	=B\$4/2	=(B\$7*C8)/(B\$3-(2*C8))	=B\$7+(2*E8)	=E8	=G8
=C9/D9		14	=B\$4/2	=(B\$7*C9)/(B\$3-(2*C9))	=B\$7+(2*E9)	=E9-E8	=G9
=C10/D10		22	=B\$4/2	=(B\$7*C10)/(B\$3-(2*C10))	=B\$7+(2*E10)	=E10-E9	=G10
=C11/D11		30	=B\$4/2	=(B\$7*C11)/(B\$3-(2*C11))	=B\$7+(2*E11)	=E11-E10	=G11
=C12/D12		38	=B\$4/2	=(B\$7*C12)/(B\$3-(2*C12))	=B\$7+(2*E12)	=E12-E11	=G12
=C13/D13		46	=B\$4/2	=(B\$7*C13)/(B\$3-(2*C13))	=B\$7+(2*E13)	=E13-E12	=G13
=C14/D14		54	=B\$4/2	=(B\$7*C14)/(B\$3-(2*C14))	=B\$7+(2*E14)	=E14-E13	=G14
=C15/D15		60	=B\$4/2	=(B\$7*C15)/(B\$3-(2*C15))	=B\$7+(2*E15)	=E15-E14	=G15
=C16/D16		66	=B\$4/2	=(B\$7*C16)/(B\$3-(2*C16))	=B\$7+(2*E16)	=E16-E15	=G16
=C17/D17		74	=B\$4/2	=(B\$7*C17)/(B\$3-(2*C17))	=B\$7+(2*E17)	=E17-E16	=G17
=C18/D18		82	=B\$4/2	=(B\$7*C18)/(B\$3-(2*C18))	=B\$7+(2*E18)	=E18-E17	=G18
=C19/D19		90	=B\$4/2	=(B\$7*C19)/(B\$3-(2*C19))	=B\$7+(2*E19)	=E19-E18	=G19
=C20/D20		100	=B\$4/2	=(B\$7*C20)/(B\$3-(2*C20))	=B\$7+(2*E20)	=E20-E19	=G20
=C21/D21		120	=B\$4/2	=(B\$7*C21)/(B\$3-(2*C21))	=B\$7+(2*E21)	=E21-E20	=G21

Valoración en CD de poly18(dA-T):Ag

Stock Solution [AgNO ₃] uM	1000	
Stock Solution ds[poly18dA-T] uM	4	4uM+ 4uM de cada hebra ssDNA

Ratio [AgNO ₃]:[polydA-T]	Initial Volume uL	[AgNO ₃] uM required	[polydA-T] uM	V(AgNO ₃) total uL from stock solution	Total volume uL	V(AgNO ₃) uL added	V(poly18dA-T) uL added
	1000	0	2	0,00	1000,00	0,00	500,00
3		6	2	6,07	1012,15	6,07	6,07
7		14	2	14,40	1028,81	8,33	8,33
11		22	2	23,01	1046,03	8,61	8,61
15		30	2	31,91	1063,83	8,90	8,90
19		38	2	41,13	1082,25	9,21	9,21
23		46	2	50,66	1101,32	9,54	9,54
27		54	2	60,54	1121,08	9,88	9,88
30		60	2	68,18	1136,36	7,64	7,64
33		66	2	76,04	1152,07	7,86	7,86
37		74	2	86,85	1173,71	10,82	10,82
41		82	2	98,09	1196,17	11,23	11,23
45		90	2	109,76	1219,51	11,67	11,67
50		100	2	125,00	1250,00	15,24	15,24
60		120	2	157,89	1315,79	32,89	32,89



Anexo II

Datos cristalográficos



Complejos primarios

	3Pd	1Pt	1Cu	5Cu	7Pd
Fórmula	C _{2.5} H _{0.25} ClN ₅ O ₂ Pd _{0.5}	C ₅ H ₂₀ N ₃ O ₈ Cl ₂ Pt ₂ K _{0.25}	C ₈ H ₉ CuNO ₇	C ₂₆ H ₃₀ CuN ₄ O ₈	C ₁₈ NCl ₉ Pd ₅ O _{1.5} HN _a 0.125
M _r (g·mol ⁻¹)	220.98	721.09	294.70	590.08	1109.12
Sistema cristalino	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico	Ortorrómico
Grupo espacial	P2 ₁ /c	P-1	P2 ₁ /n	P2 ₁ /c	Pbca
a (Å)	12.8313 (4)	7.166 (6)	9.6792 (16)	15.3760 (7)	19.280 (5)
b (Å)	10.0132 (3)	17.888 (15)	5.7689 (7)	10.2687 (5)	6.796 (5)
c (Å)	9.1172 (3)	18.296 (16)	18.198 (4)	16.8513 (7)	20.615 (5)
α (Å)	90.00	89.954 (11)	90.00	90	90.000 (5)
β (Å)	92.0950 (10)	97.888 (11)	91.279 (11)	105.779 (2)	90.000 (5)
γ (Å)	90.00	90.053 (11)	90.00	90	90.000 (5)
V (Å ³)	1170.62 (6)	2323 (3)	1012.9 (3)	2560.4 (2)	2701 (2)
Z	4	4	4	4	8
ρ _{cal} (g·cm ⁻³)	1.254	2.062	1.927	1.531	5.455
Color	naranja	amarillo	azul	azul	naranja
T (K)	100.0	273.15	99.65	100.0	99.65
μ (mm ⁻¹)	1.042	12.330	2.175	0.912	8.350
Rango θ (°)	5.16 – 56.58	2.248 -56.78	4.72 – 55	4.696 – 50.072	3.96 -47.66
Reflex. medidas	9794	26556	7538	22745	20530
R (int)	0.0242	0.0746	0.0739	0.0495	0.0452
GOF en F ²	1.058	1.021	1.068	1.088	1.091
R (F) [I>2σ(I)]	0.0351	0.0597	0.0395	0.0352	0.0290
wR (F ²)	0.0832	0.1182	0.0983	0.0739	0.0698

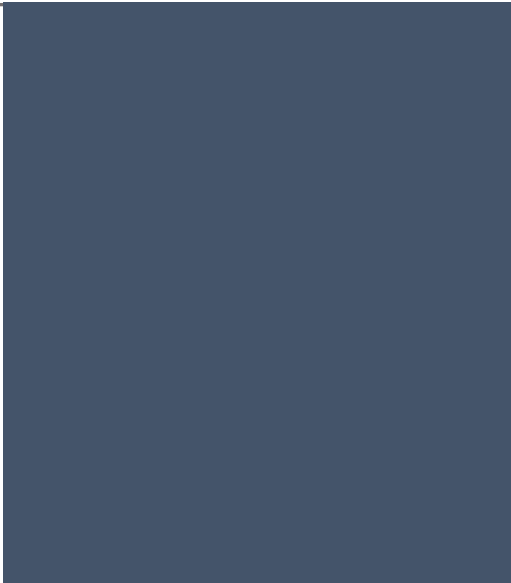
[I>2σ(I)]				
-----------	--	--	--	--

Complejos de Pd(II) y Pt(II) con nucleobases

	cheldPd_mC	cheldPd_pdA	cheldPt_pdA
Fórmula	C ₁₂ H ₁₈ N ₄ O ₉ Pd	C ₃₅ H ₃₉ N ₁₁ O ₁₂ Pd ₂	C ₃₅ H ₃₉ N ₁₁ O ₁₂ Pt ₂
M _r (g·mol ⁻¹)	468.70	1018.57	1195.95
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	P2 ₁ /c	P2 ₁ /c
a (Å)	6.731 (6)	18.1949 (4)	18.1390 (5)
b (Å)	9.834 (9)	28.525 (2)	28.4919
c (Å)	13.145 (11)	7.4952 (6)	7.4843 (2)
α (Å)	95.020 (14)	90	90
β (Å)	93.422 (14)	101.268 (2)	100.7760 (11)
γ (Å)	107.047 (14)	90	90
V (Å ³)	825.3 (13)	3815.1 (5)	3799.79 (18)
Z	2	4	4
ρ _{cal} (g·cm ⁻³)	1.886	1.773	2.091
Color	naranja	naranja	14.266
T (K)	446 (2)	293 (2)	293 (2)
μ (mm ⁻¹)	1.183	8.296	14.266
Rango θ (°)	3.12 – 56.21	4.952 – 132.798	4.958 – 133.162
Reflex. medidas	9289	49544	28070
R (int)	0.0757	0.2256	0.0360
GOF en F ²	1.036	1.012	1.032
R (F) [I>2σ(I)]	0.0713	0.0745	0.0258
wR (F ²) [I>2σ(I)]	0.1599	0.1773	0.0586

Complejos de Cu(II) con nucleobases

	1Cu_mC	1Cu_eA	1Cu_pdA	1Cu_pG
Fórmula	C ₁₃ H ₂₀ N ₄ O ₁₀ Cu	C ₃₀ N ₁₆ O ₁₀ Cu ₂ H _{0.25}	C ₁₇ H ₂₁ CuN ₅ O ₇	C ₁₆ H ₁₈ N ₆ O ₇ Cu
M _r (g·mol ⁻¹)	455.87	871.79	470.93	469.90
Sistema cristalino	Triclínico	Monoclínico	Triclínico	Monoclínico
Grupo espacial	P-1	P2 ₁ /n	P-1	Cc
a (Å)	6.6005 (17)	7.200 (3)	4.9903 (3)	19.2898 (15)
b (Å)	9.456 (2)	27.904 (10)	13.8745 (10)	5.2866 (4)
c (Å)	15.100 (4)	19.858 (7)	13.9977 (10)	17.8217 (12)
α (Å)	87.447 (4)	90.00	91.593 (3)	90.00
β (Å)	83.828 (5)	93.215 (12)	92.468 (3)	92.508 (3)
γ (Å)	69.860 (4)	90.00	99.590 (3)	90.00
V (Å ³)	877.7 (4)	3983 (3)	954.14 (11)	1815.7 (2)
Z	2	4	2	4
ρ _{cal} (g·cm ⁻³)	1.7249	1.454	1.639	1.719
Color	azul	azul	azul	azul
T (K)	99.65	100.0	373 (2)	300.0
μ (mm ⁻¹)	1.309	1.139	2.097	1.260
Rango θ (°)	2.72 – 56.36	4.84 – 47.24	6.32 – 133.34	6.1 – 50.18
Reflex. medidas	10167	4772	12114	9279
R (int)	0.0561	0.0564	0.0524	0.0344
GOF en F ²	1.030	1.102	1.087	1.027
R (F) [I>2σ(I)]	0.0509	0.0789	0.0451	0.0266
wR (F ²) [I>2σ(I)]	0.1023	0.1899	0.1227	0.0524



Anexo III
Espectros de HRMS



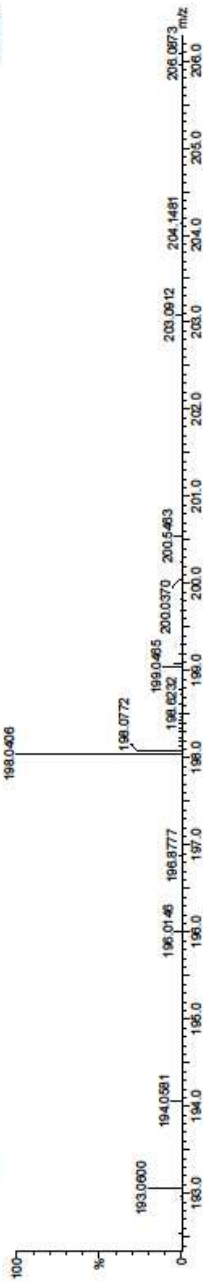
Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for iFIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 281 formula(s) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-20 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-20 Na: 0-1
 14_D4_C6_NS145b358 (2.290)

1: TOF MSES+
 1.46e-003



Minimum: 2.0 5.0 -1.5
 Maximum: 198.0406 198.0416 -5.0 50.0

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
198.0406	198.0402	0.4	2.0	5.5	113.6	0.6	C8 H8 N O5
198.0416	198.0416	-1.0	-5.0	10.5	113.8	0.8	C9 H4 N5 O

1b

Page 1

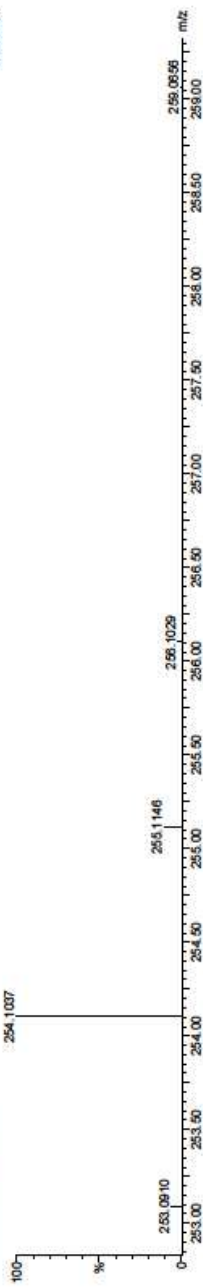
Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 520 formula(s) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-50 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-20 Na: 0-1
 14_04_10_NS 146 a 387 (1.508)

t: TOF MS ES+
 4.08e+003



Minimum: -1.5
 Maximum: 50.0

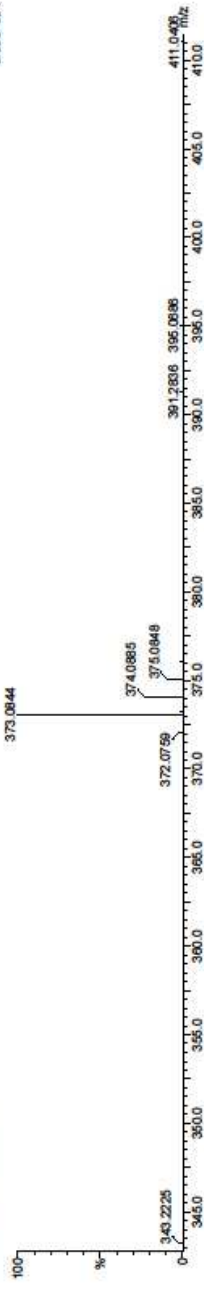
Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
254.1037	254.1028	0.9	3.5	5.5	18.6	0.1	C12 H16 N O5
	254.1042	-0.5	-2.0	10.5	20.6	2.1	C13 H12 N5 O

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 856 formula(s) evaluated with 2 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 15-41 H: 0-200 N: 0-20 O: 0-10 S: 0-1
 13_03_05_NS206b 511 (1.996)



Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
373.0844	373.0858	-1.4	-3.8	11.5	26.4	0.0	C18 H17 N2 O5 8
373.0844	373.0838	0.6	1.6	21.5	41.1	14.8	C22 H9 N6 O

Minimum: 2.0 5.0 -1.5
 Maximum: 100.0 100.0

2b

Page 1

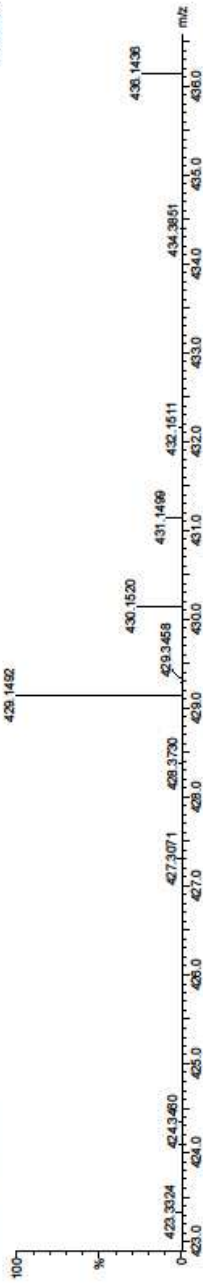
Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 803 formula(s) evaluated with 3 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 20-41 H: 0-200 N: 0-20 O: 0-10 S: 0-1
 13_03_05_NS206a 975 (3359)

1: TOF MSES-
3.10e004



Minimum: 2.0 5.0 -1.5
 Maximum: 100.0 100.0

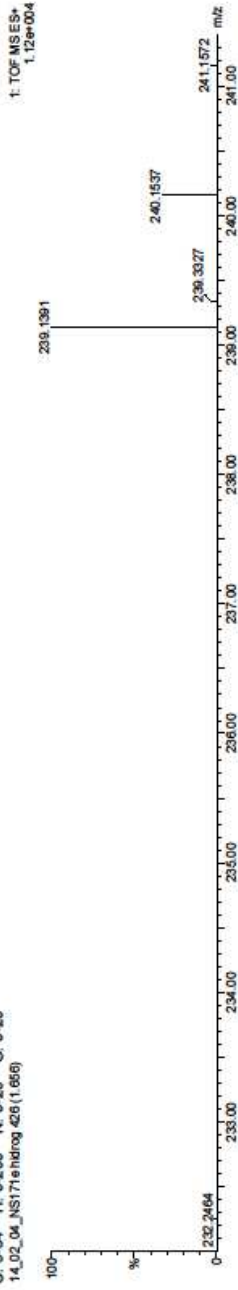
Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
429.1492	429.1484	0.8	1.9	11.5	28.6	0.0	C22 H25 N2 O5 S
429.1498	-0.6	-1.4	16.5	33.9	5.3	0.8	C23 H21 N5 O S
429.1491	0.1	0.2	20.5	46.4	17.8	0.3	C30 H21 O3

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 278 formula(s) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-64 H: 0-200 N: 0-20 O: 0-20
 14_02_04_NSI71enhmg 426(1.666)



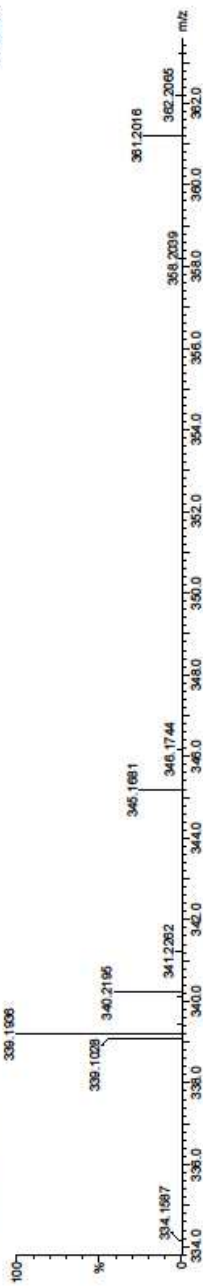
Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
239.1391	239.1396	-0.5	-2.1	4.5	39.9	0.0	C12 H19 N2 O3
Minimum: -1.5							
Maximum: 50.0							

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 495 formula(s) evaluated with 2 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
 Elements Used:
 C: 1-64 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-12
 NS_171L_050-83bis 798 (3.119)



Minimum: 5.0
 Maximum: -1.5

Mass	Cal.c. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
339.1936	339.1920	1.6	4.7	5.5	55.4	1.0	C17 H27 N2 O6
	339.1933	0.3	0.9	10.5	54.9	0.5	C18 H23 N5 O

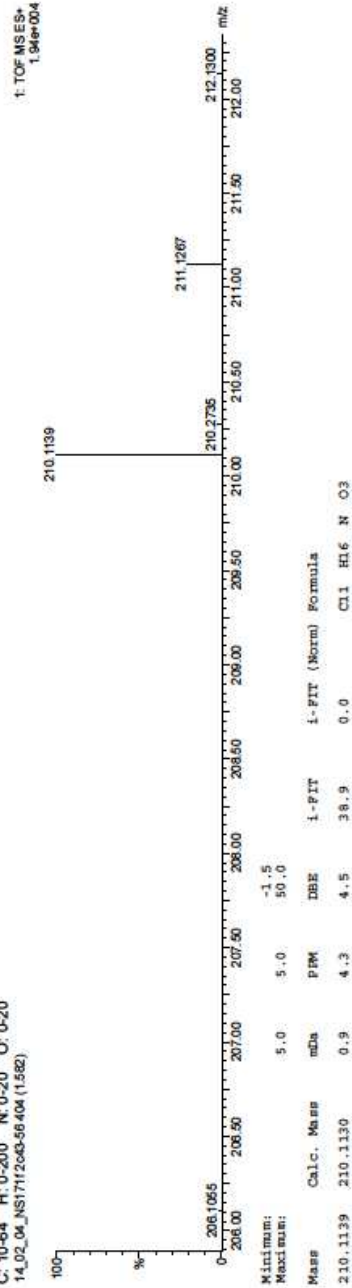
T: TOF MSES+
 1.37e+004

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 150 formula(s) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
 Elements Used:
 C: 10-64 H: 0-200 N: 0-20 O: 0-20
 14_02_04_NST171266-66404 (1.982)

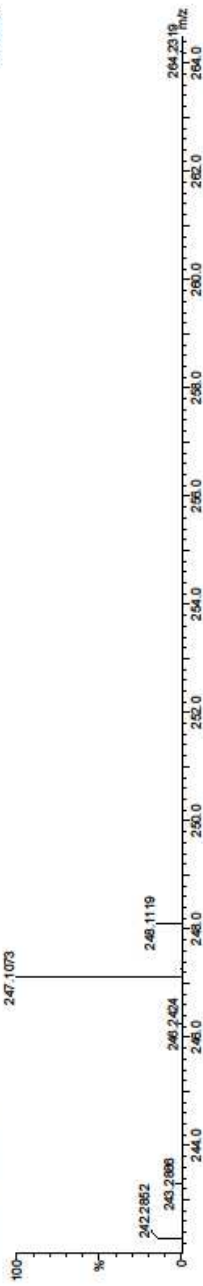


Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 598 formula(s) evaluated with 2 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-25 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-10 S: 0-2
 14_07_05_NSI029598 (2.224)



Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
247.1073	247.1083	-1.0	-4.0	7.5	31.5	0.0	C13 H15 N2 O3
	247.1076	-0.3	-1.2	-1.5	34.9	3.5	C5 H19 N4 O5 S

5b

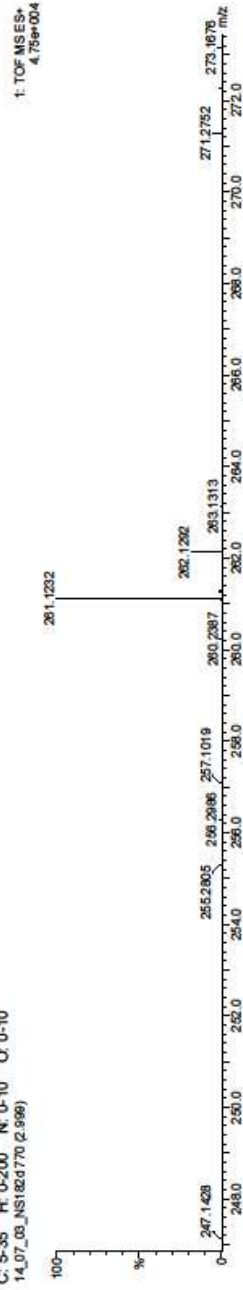
Page 1

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3.

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 269 formula(s) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-35 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-10
 14_07_05_NS1620770 (2.998)



Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
261.1232	261.1239	-0.7	-2.7	7.5	48.6	0.0	C14 H17 N2 O3
Minimum:	2.0	5.0	-1.5				
Maximum:			50.0				

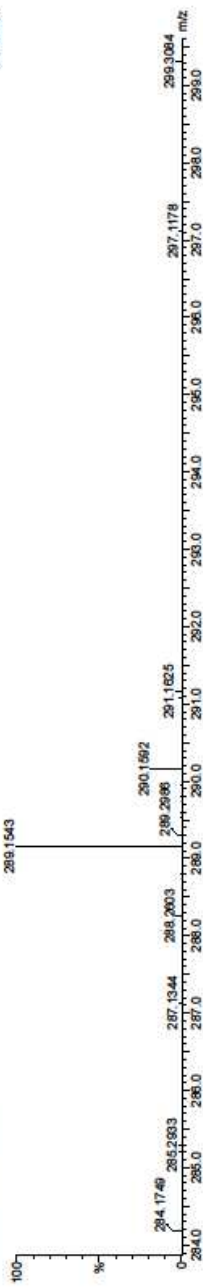
5b'

Page 1

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis
 Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3.

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions
 343 formula(s) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-35 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-10
 14_07_05_NS1020929 (8.014)



Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
289.1543	289.1552	-0.9	-3.1	7.5	41.8	0.0	C16 H21 N2 O3
Minimum:		2.0	5.0	-1.5			
Maximum:				50.0			

t: TOF MSES+
 2.31e+003

2Pd

Page 1

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 20.3 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

16446 formula(e) evaluated with 426 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

C: 10-60 H: 0-210 N: 0-20 O: 0-20 Na: 0-1 S: 0-2 10MPd: 1-1

15_04_28_MS207Pd_p02_purifiedOCM conc (398 (5.428))

1: TOF MS ES+
1.84e10DA



Mass	Calc. Mass	mba	FPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
831.4036	831.4037	-0.1	-0.1	11.3	74.1	6.3	C39 H65 N7 O6 104Pd
	831.4037	-0.1	-0.1	16.5	73.7	5.9	C38 H59 N14 O 104Pd
	831.4035	0.1	0.1	6.5	71.3	3.4	C40 H72 N6 O2 Na E2 104Pd
	831.4037	-0.1	-0.1	5.5	74.5	6.7	C40 H71 O11 104Pd
	831.4038	-0.2	-0.2	14.3	72.0	4.2	C37 H69 N UJ S 104Pd
	831.4033	0.3	0.4	3.5	70.9	3.1	C32 H68 N10 O5 Na S 104Pd
	831.4039	-0.3	-0.4	12.5	74.1	6.3	C40 H66 N6 O3 Na 104Pd
	831.4039	-0.3	-0.4	74.2	74.2	5.7	C41 H72 O8 Na S 104Pd
	831.4039	-0.3	-0.4	74.2	74.2	5.7	C41 H72 O8 Na S 104Pd
	831.4032	0.1	0.5	5.0	71.3	3.5	C39 H73 N10 E2 104Pd
	831.4032	0.1	0.5	10.2	71.3	3.3	C39 H67 N10 E3 104Pd
	831.4040	-0.4	-0.5	-0.5	72.6	4.7	C35 H68 N15 O3 Na E2 104Pd
	831.4032	0.4	0.5	23.5	74.4	6.6	C53 H63 N2 Na S 104Pd
	831.4041	-0.5	-0.6	15.5	72.1	4.3	C48 H68 N2 Na S 104Pd
	831.4031	0.5	0.6	0.5	73.0	5.3	C24 H64 N15 O8 Na 104Pd
	831.4042	-0.6	-0.7	4.0	72.7	4.9	C24 H61 N19 O7 104Pd
	831.4030	0.5	0.7	2.0	70.9	3.1	C31 H69 N9 O8 S 104Pd
	831.4030	0.5	0.7	71.5	70.6	2.1	C30 H63 N15 O3 S 104Pd
	831.4042	-0.6	-0.7	-1.5	73.4	5.6	C25 H67 N12 O12 104Pd
	831.4038	0.3	0.8	1.9	73.4	5.3	C25 H65 N12 O11 S 104Pd
	831.4028	0.3	1.0	1.3	73.0	5.3	C24 H65 N12 O11 104Pd
	831.4044	-0.8	-1.0	1.5	73.2	3.3	C33 H71 N6 O9 S 104Pd
	831.4044	-0.8	-1.0	0.0	73.4	5.6	C36 H66 N13 O9 Na 104Pd

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
 713 formula(s) evaluated with 7 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
 Elements Used:
 C: 5-50 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-10 63Cu: 1-1
 14_07_16_NS186 Cu0.8 722(2.829)



Minimum: 2.0 5.0 50.0
 Maximum: -1.5 50.0

Mass	Calcd. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
590.1118	590.1114	0.4	0.7	24.0	204.9	1.7	C29 H21 N9 O2 63Cu
	590.1114	0.4	0.7	18.5	205.1	1.8	C30 H27 N3 O7 63Cu
	590.1128	-1.0	-1.7	23.5	205.3	2.1	C31 H23 N6 O3 63Cu
	590.1101	1.7	2.9	19.0	204.8	1.6	C28 H25 N5 O6 63Cu
	590.1096	2.2	3.7	31.5	205.1	1.9	C42 H23 63Cu
	590.1141	-2.3	-3.9	23.0	205.7	2.5	C33 H23 N3 O4 63Cu
	590.1146	-2.8	-4.7	10.5	205.6	2.4	C19 H27 N8 O10 63Cu

2Pd_pdA

Elemental Composition Report

Single Mass Analysis

Tolerance = 20.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
 Element prediction: Off
 Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

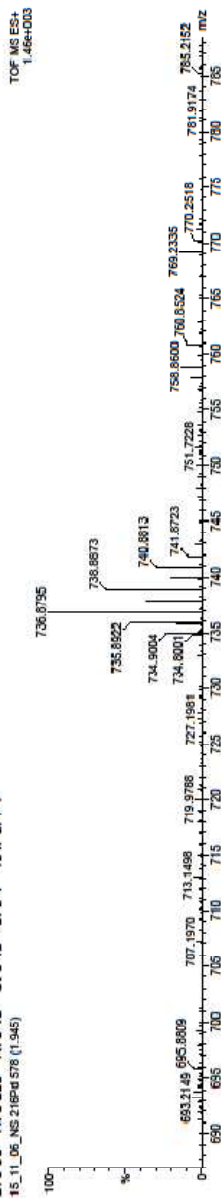
Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions

460 formula(e) evaluated with 7 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)

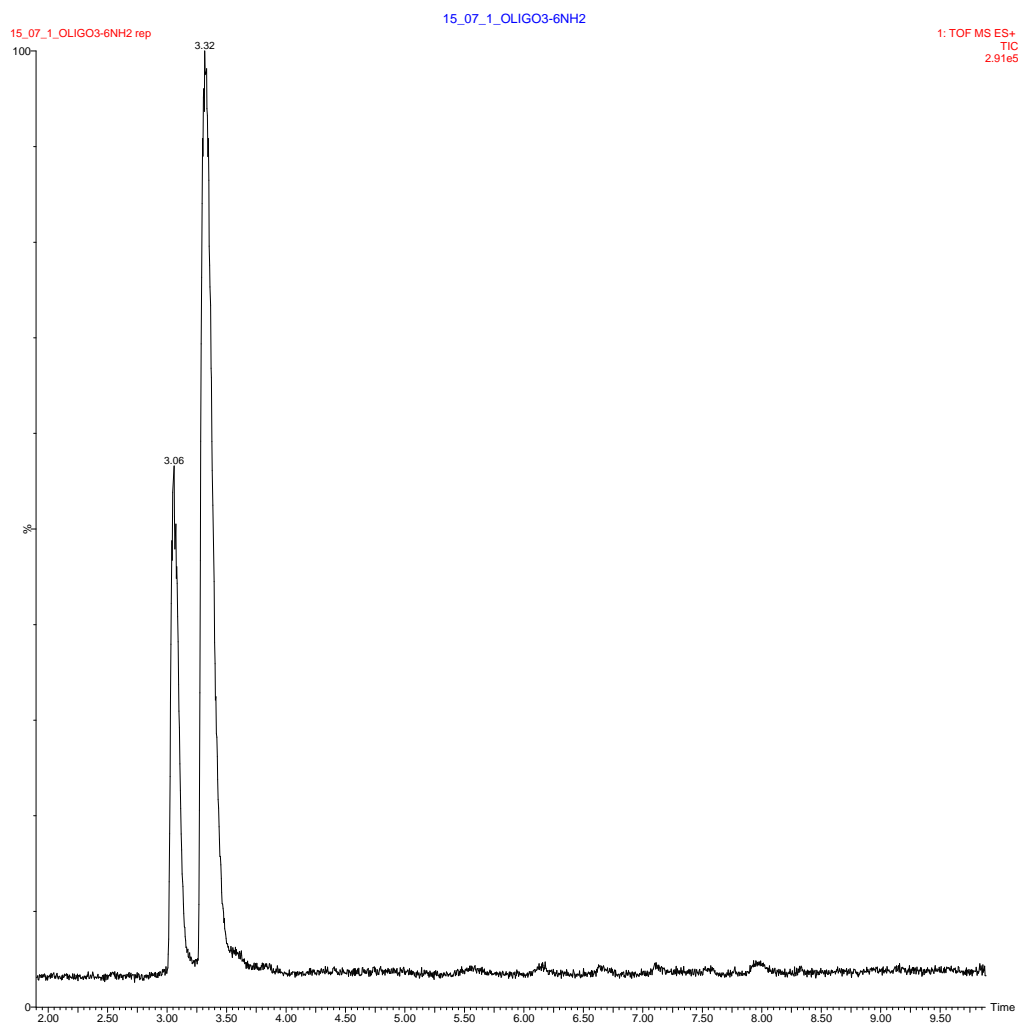
Elements Used:

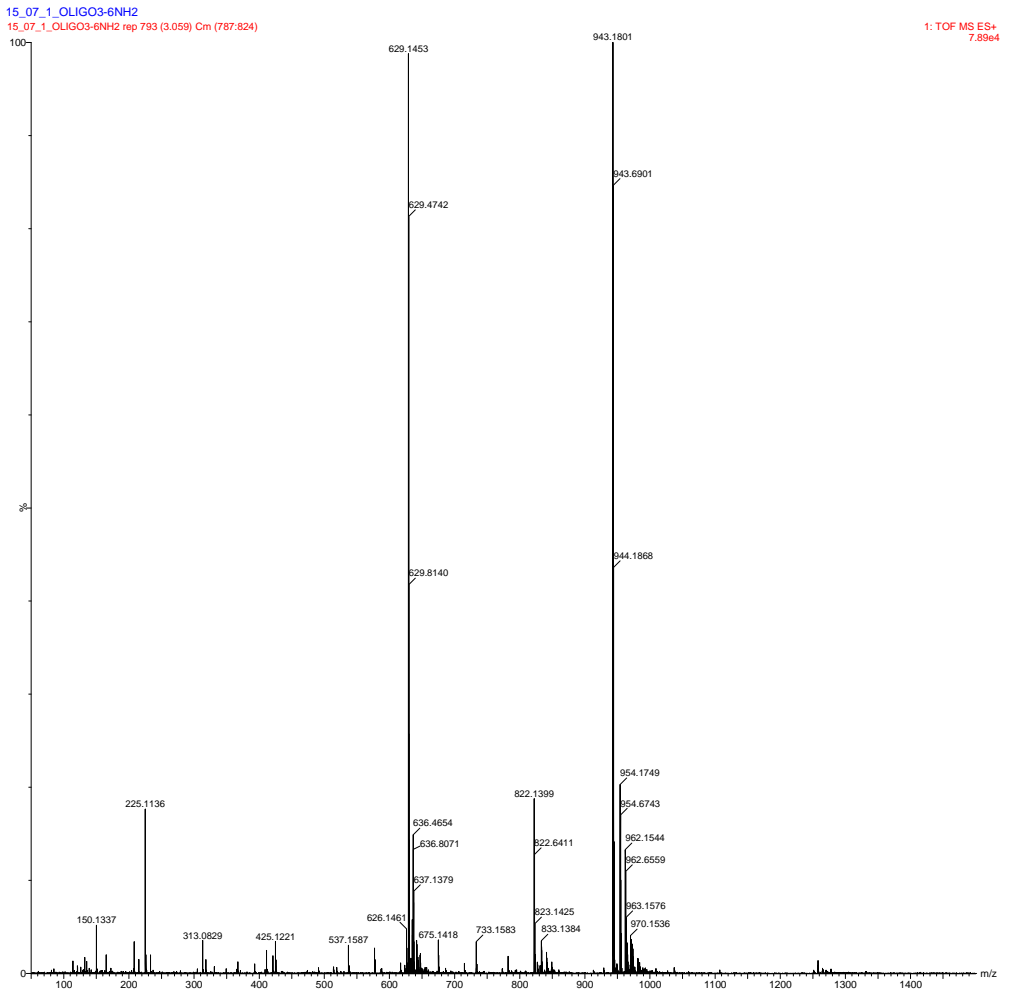
C: 0-30 H: 0-200 N: 0-10 O: 0-10 S: 0-1 104Pd: 1-1

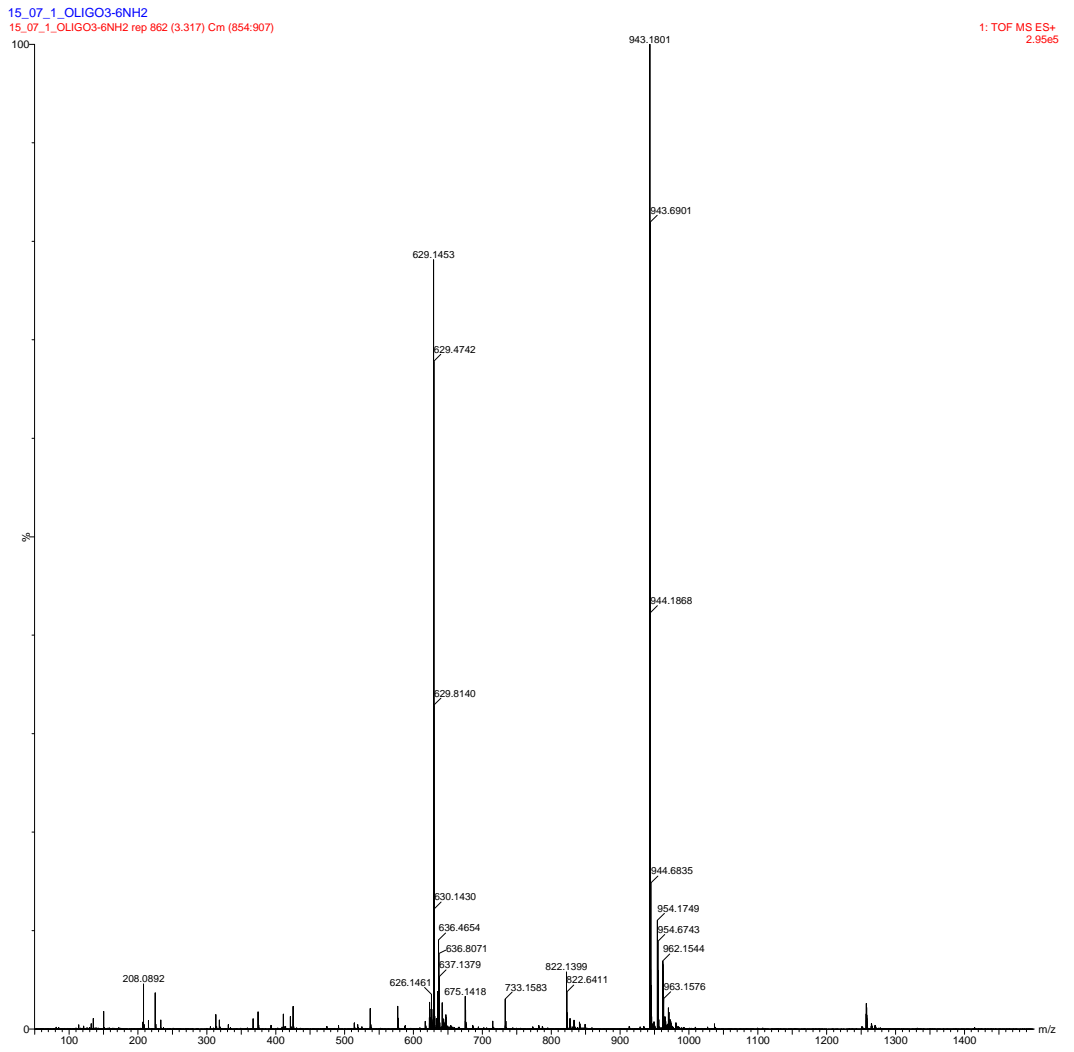
15_11_05_NS_216Pd_578 (1.945)

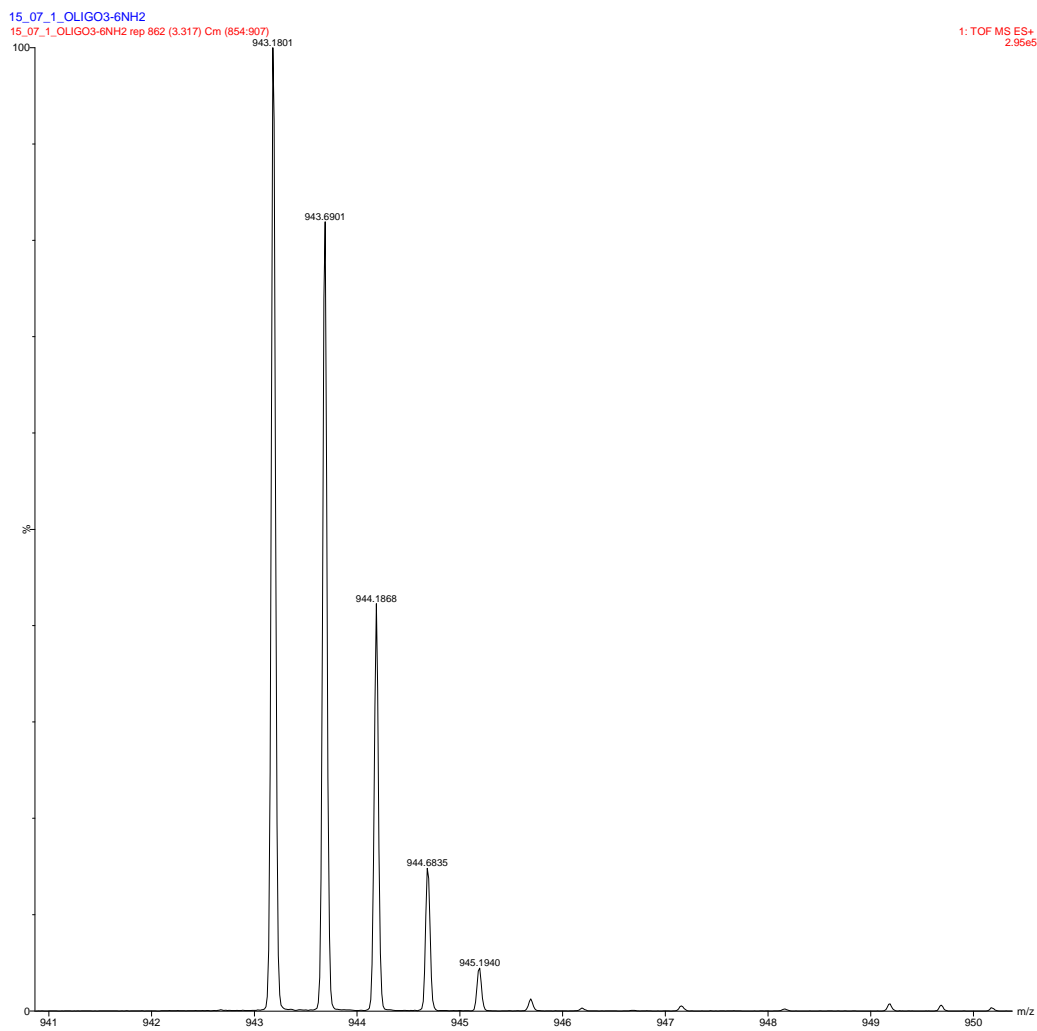


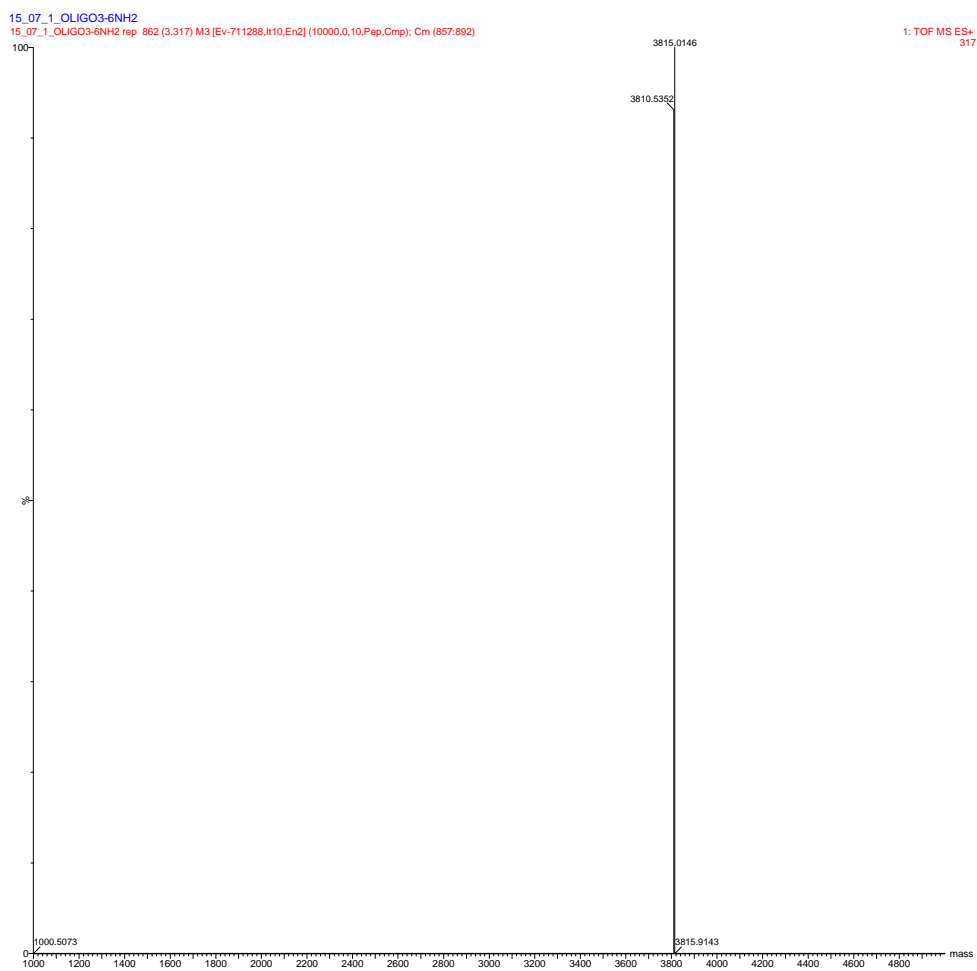
Mass	Calc. Mass	mda	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
734.9004	734.8859	14.5	19.7	30.0	81.7	1.7	C28 H5 N7 O10 S 104Pd
	734.8971	3.3	4.5	30.0	81.7	1.8	C27 H5 N9 O9 S 104Pd
	734.8998	0.6	0.8	34.5	81.8	1.8	C30 H3 N10 O6 S 104Pd
	734.8985	1.9	2.6	29.5	81.8	1.8	C29 H7 N6 O10 S 104Pd
	734.9097	-9.3	-12.7	29.5	82.0	2.1	C28 H7 N8 O9 S 104Pd
	734.9110	-10.6	-14.4	29.0	82.1	2.1	C30 H5 N5 O10 S 104Pd
	734.8937	6.7	9.1	35.0	82.4	2.5	C30 H 8 N9 O9 104Pd

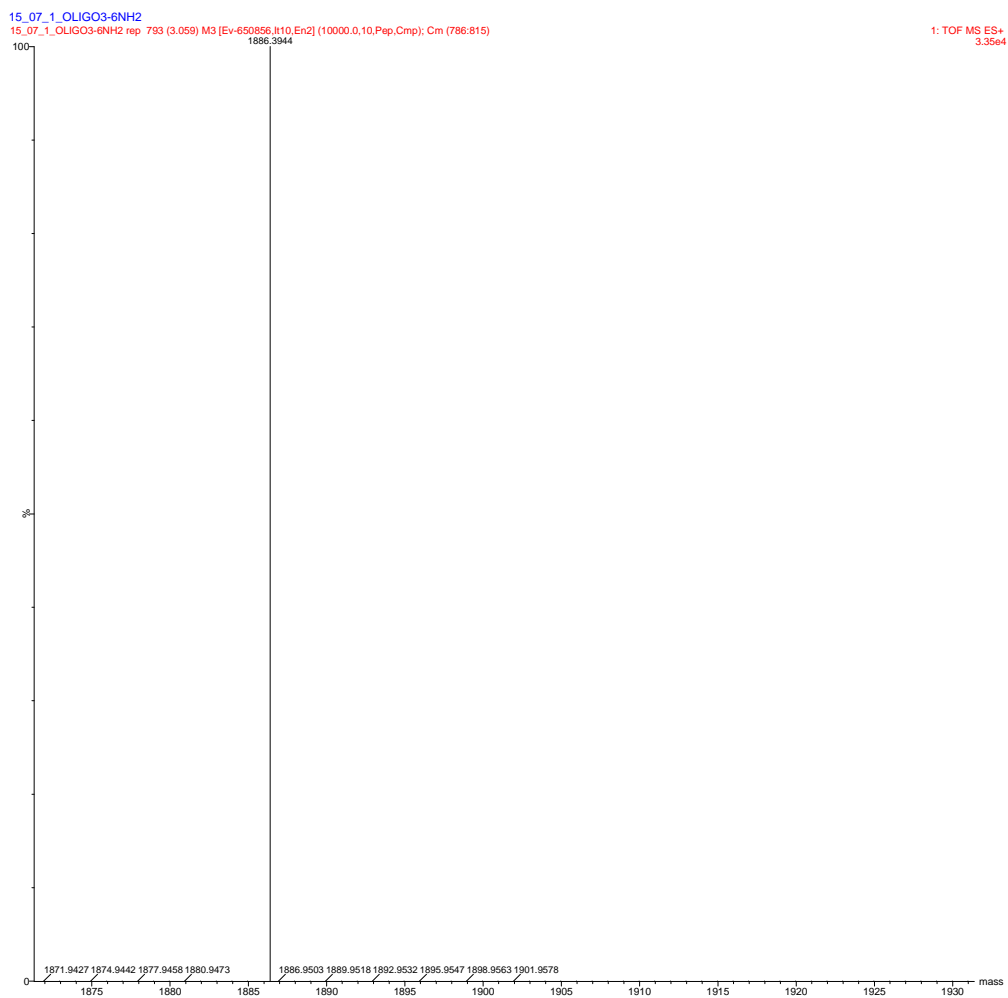
poly6(NH₂-⁷C A-T)



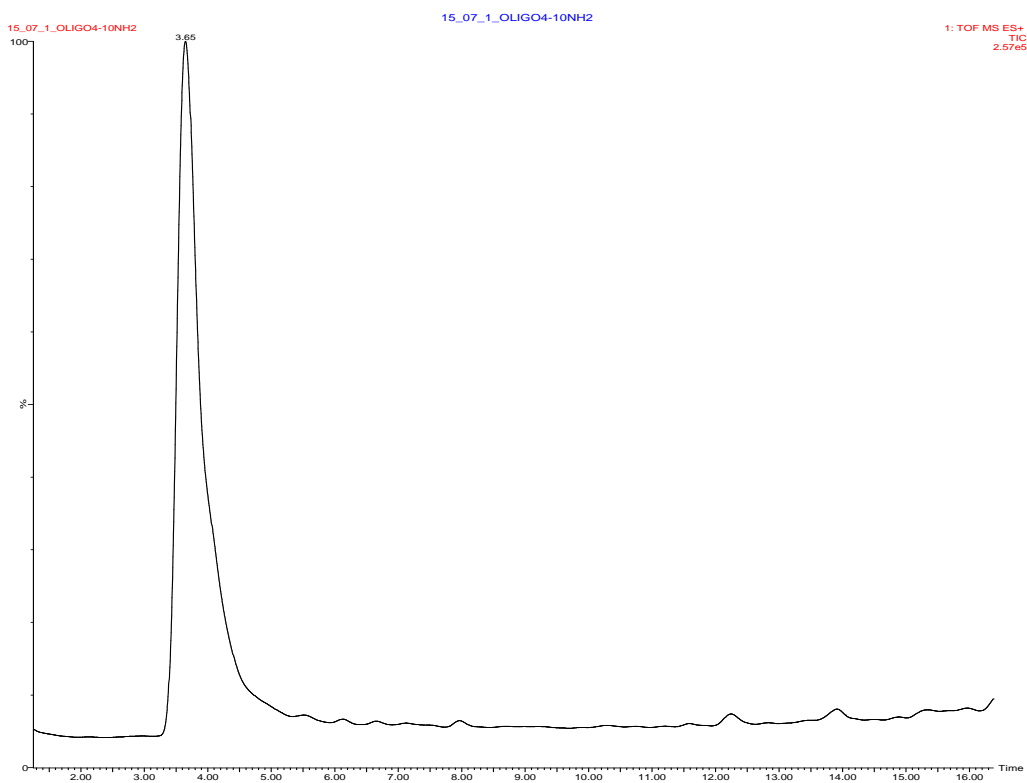


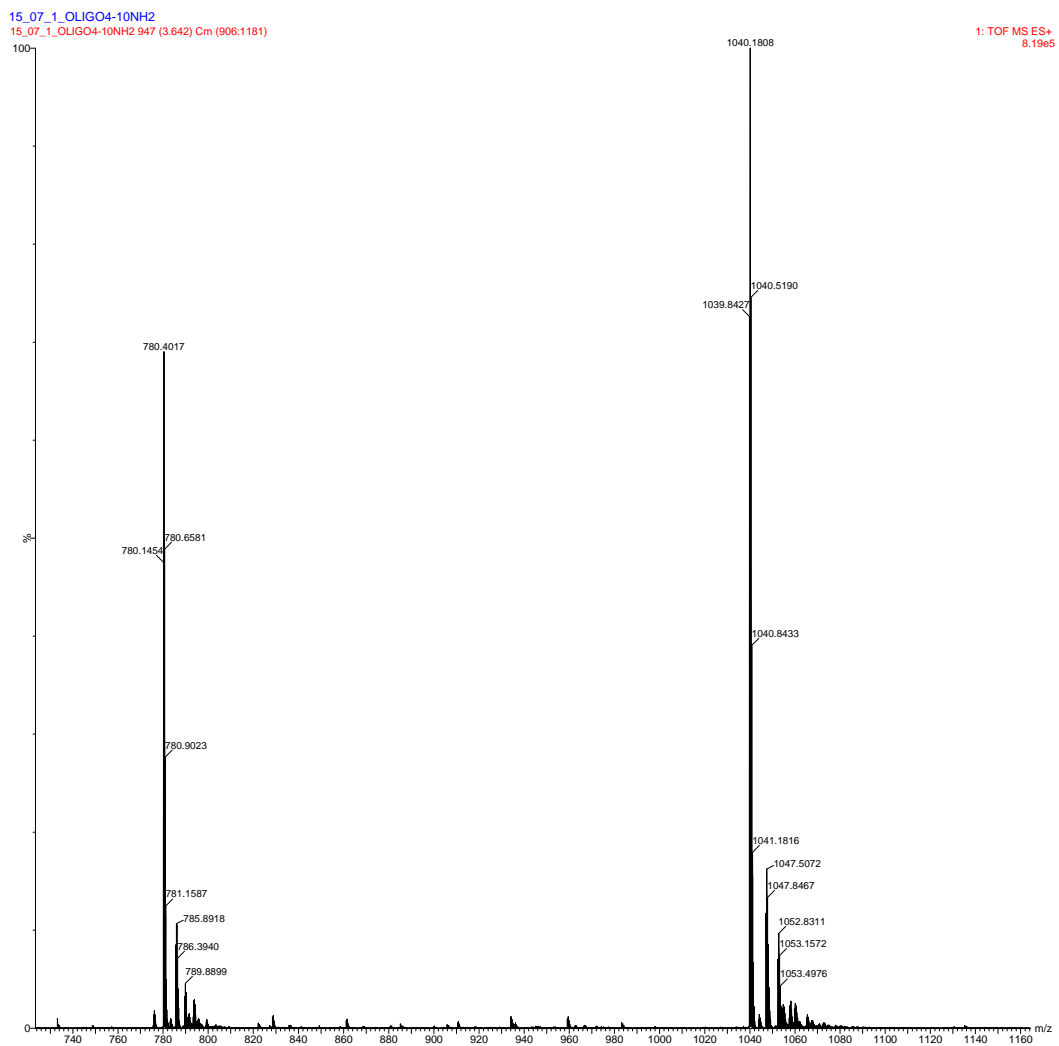


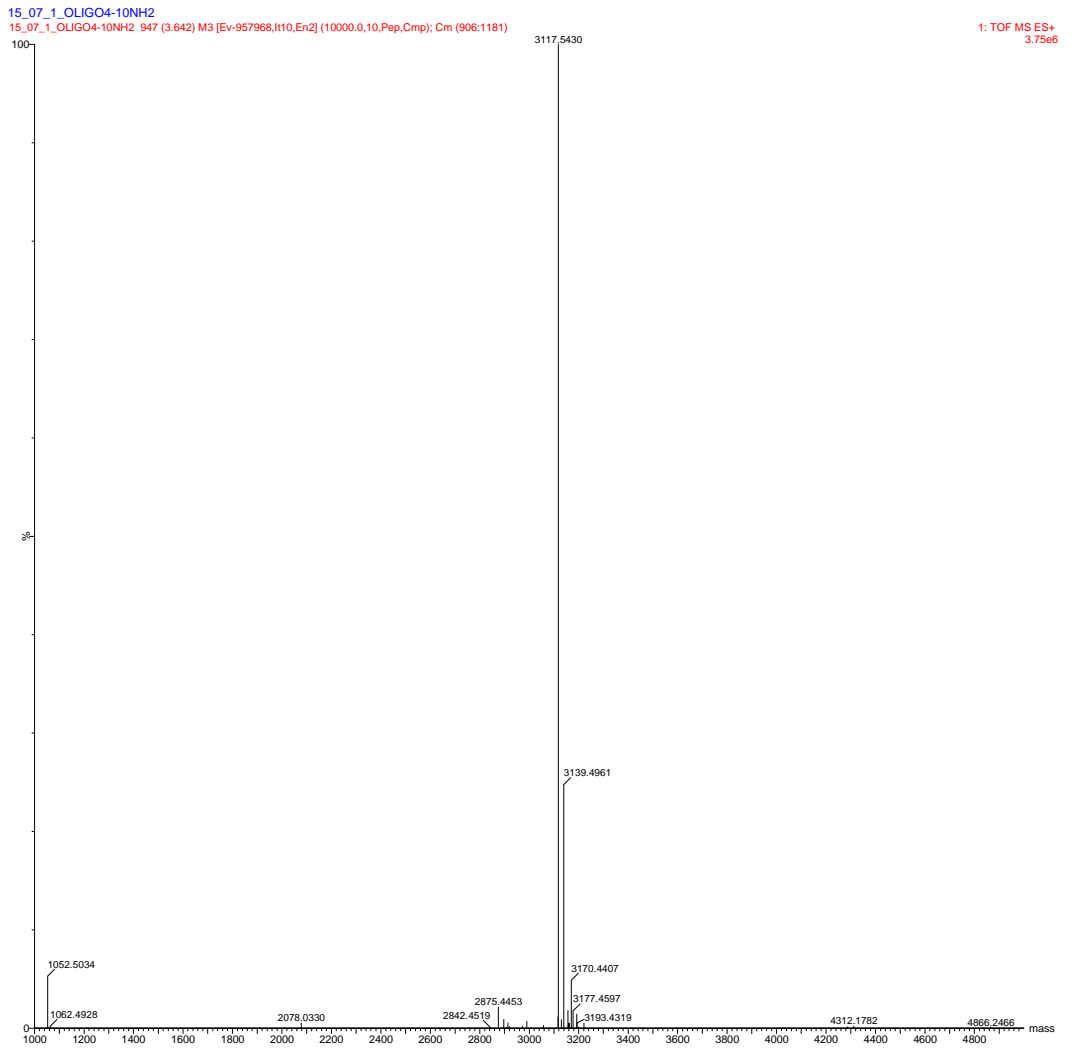


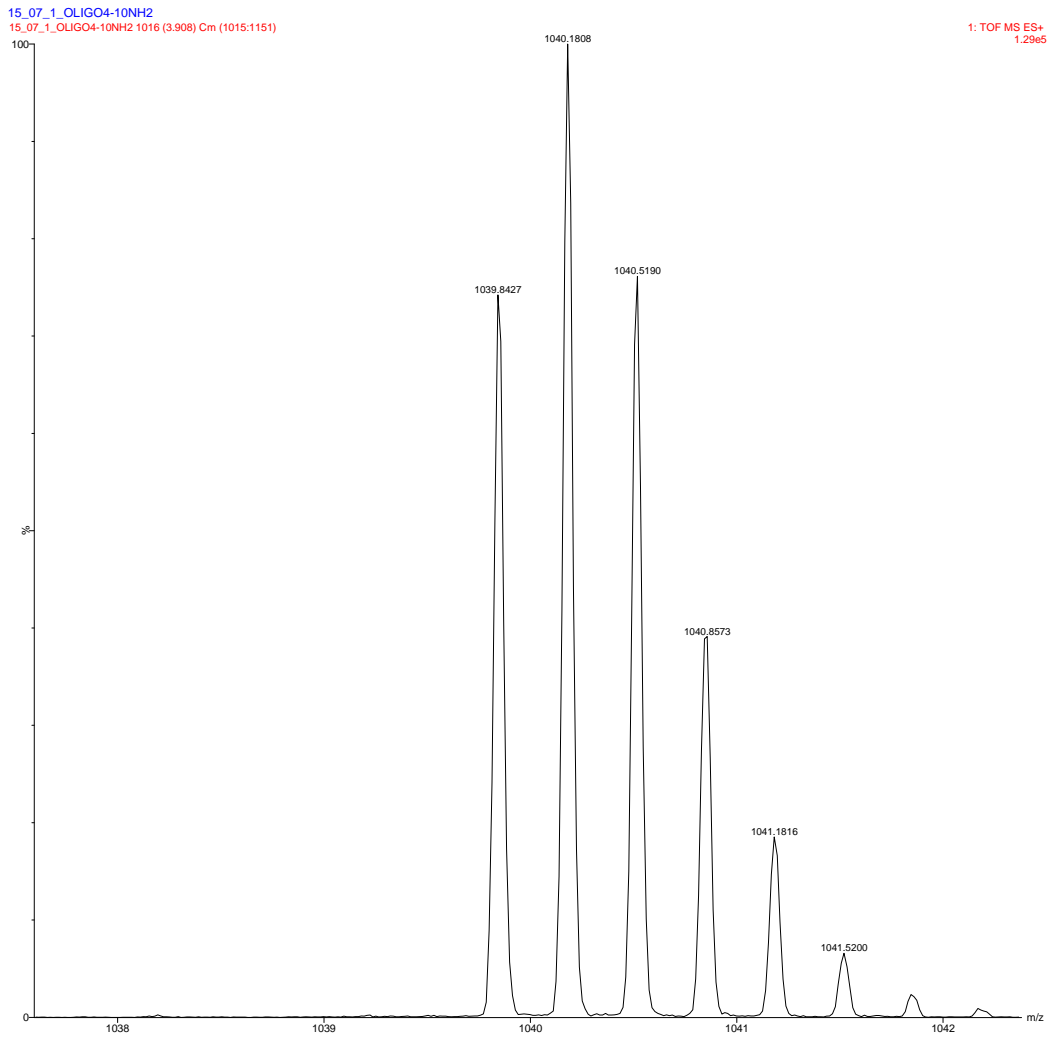


poly10(NH₂-⁷C-A-T)









Highly Stable Double-Stranded DNA Containing Sequential Silver(I)-Mediated 7-Deazaadenine/Thymine Watson–Crick Base Pairs

Noelia Santamaría-Díaz, José M. Méndez-Arriaga, Juan M. Salas, and Miguel A. Galindo*

Abstract: The oligonucleotide $d(TX)_9$, which consists of an octadecamer sequence with alternating non-canonical 7-deazaadenine (X) and canonical thymine (T) as the nucleobases, was synthesized and shown to hybridize into double-stranded DNA through the formation of hydrogen-bonded Watson–Crick base pairs. dsDNA with metal-mediated base pairs was then obtained by selectively replacing W-C hydrogen bonds by coordination bonds to central silver(I) ions. The oligonucleotide **I** adopts a duplex structure in the absence of Ag^+ ions, and its stability is significantly enhanced in the presence of Ag^+ ions while its double-helix structure is retained. Temperature-dependent UV spectroscopy, circular dichroism spectroscopy, and ESI mass spectrometry were used to confirm the selective formation of the silver(I)-mediated base pairs. This strategy could become useful for preparing stable metallo-DNA-based nanostructures.

DNA molecules have been widely employed to develop new systems with tailored properties at the nanoscale, enabling new applications in catalysis^[1] and as nanomachines,^[2] nanowires,^[3] and sensors.^[4] The incorporation of non-inherent properties into nucleic acids can be achieved by using DNA as a template^[5] to deposit a certain material on its surface or as a scaffold^[6] for precise functionalization by chemical modification of its constituents (the nucleobases). In the past years, several artificial nucleobases that are capable of binding to a central metal ion to form so-called metal-mediated base pairs^[7] have been synthesized and introduced into oligonucleotide sequences to obtain metallo-DNA systems, where the metal ions lead to unique chemical and physical properties. The conversion of natural, mismatched T-T and C-C base pairs into metal-coordinated matching pairs has also been demonstrated.^[8] The structure of a metallo-DNA system is determined both by the selective formation of hydrogen-bonded base pairs as well as by the specificity of the coordination bonds. Hence, this strategy takes advantage of the sequence programmability of DNA and the formation of metal-mediated base pairs to control the precise structure of an artificial metallo-DNA double-helix structure. However, the template effect of artificial DNA with ligand-type nucleobases (LTNs) can be limited as a consequence of

their inability to undergo self-assembly. Consequently, the introduction of complementary end sequences consisting of canonical nucleobases is necessary to enable the hybridization of the oligonucleotide.^[7] These end regions hybridize through complementary Watson–Crick (W-C) hydrogen bonding and consequently form double-helix structures at each end, so that the central LTNs face each other. The subsequent introduction of appropriate metal ions leads to the formation of metal-mediated base pairs and ultimately generates the metallo-DNA system. Müller and Polonius have elegantly avoided the use of canonical end sequences by using oligonucleotides that hybridize by Hoogsteen-type base pairing, which were obtained from 1-deazaadenine or 1,3-dideazaadenine and thymine, where the thymine imino proton can be substituted by a metal ion.^[9] In the same context, Shionoya et al. have recently reported the use of 5-hydroxyuracil in DNA sequences that are capable of forming base pairs by hydrogen bonding or metal coordination.^[10] However, the number of LTNs used in a sequence is restricted because the stability of a DNA duplex with complementary end regions decreases with the number of these ligands. Nevertheless, it has been demonstrated that some LTNs participate in the enzymatic synthesis of nucleic acids,^[11] but they are still unable to self-assemble in the absence of metal ions unless canonical sequences are introduced. Consequently, the design of LTNs that function as substrates for enzymes involved in the synthesis of nucleic acids, can undergo W-C self-assembly, and possess the interstrand π -stacking properties of canonical nucleobases constitutes an interesting challenge. Such LTNs would provide a means for developing DNA systems with predictable structures (e.g., DNA origami)^[12] that could be converted into metallo-DNA structures upon addition of appropriate metal ions through the formation of metal-mediated base pairs within the structure (DNA origami could be extended to metal-mediated DNA origami).

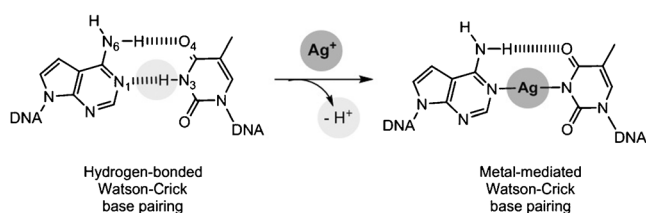
Herein, we have explored a simple strategy to overcome this challenge by means of using canonical thymine (T) and non-canonical 7-deazaadenine (⁷C_A) as nucleobases to generate silver(I)-mediated W-C base pairs. We took advantage of the linear coordination geometry and borderline Lewis acidity of silver(I) ions to yield stable coordination bonds with nitrogen donors. This approach permits the incorporation of controlled amounts of silver(I) ions at specific locations inside a double-helix DNA motif. The nucleobases T and ⁷C_A can assemble by W-C hydrogen bonding to form ⁷C_A-T base pairs that mimic naturally occurring A-T base pairs.^[13] Remarkably, the non-canonical nucleobase ⁷C_A can be enzymatically incorporated into nucleic acid polymers.^[14] Therefore, the use of ⁷C_A to form metal-mediated base pairs should not be restricted to short oligonucleotides obtained from DNA

[*] N. Santamaría-Díaz, J. M. Méndez-Arriaga, Prof. Dr. J. M. Salas, Dr. M. A. Galindo
Facultad de Ciencias, Departamento Química Inorgánica
Universidad de Granada
Avd. Fuentenueva s/n, 18071 Granada (Spain)
E-mail: magalindo@ugr.es

Supporting information for this article can be found under:
<http://dx.doi.org/10.1002/anie.201600924>.

synthesizers but can be extended to longer programmed DNA sequences by using enzymatic processing.

In the non-canonical nucleobase ${}^7\text{C}A$, the N7 atom of canonical adenine (A) has been replaced by a CH group; therefore, the nucleobases ${}^7\text{C}A$ and T can still assemble by W-C base pairing,^[15] and the preferential binding of metal ions to the N7 position is prevented.^[16] We took advantage of this feature to guide the coordination of the silver ions towards the donor atoms located inside the duplex DNA structure, namely the adenine N1 and thymine N3 nitrogen atoms (Scheme 1), to form metal-mediated base pairs without altering the canonical W-C duplex hybridization. The resulting metal-mediated base pairs then contain Ag^+ ions that are coordinated to the endocyclic nitrogen donors ${}^7\text{C}A\text{-N1}$ and T-N3 (Scheme 1).



Scheme 1. Proposed reaction pathway for the formation of a silver(I)-mediated base pair that retains the canonical Watson-Crick base pairing.

To investigate the formation of these silver(I)-mediated base pairs, we prepared the octadecamer oligonucleotide 5'-d(TX)₉-3' (**I**), which consists of alternating purine (${}^7\text{C}A$, X) and pyrimidine (T) nucleobases. Primarily, we studied the thermal stability of oligonucleotide **I** by variable-temperature UV measurements, both in the absence and presence of Ag^+ ions at an ionic strength of $I = 0.1\text{M}$.^[17] In the absence of Ag^+ ions, oligonucleotide **I** shows cooperative melting curves, indicating the formation of a duplex structure with a melting temperature (T_m) of 35°C . Upon addition of increasing amounts of Ag^+ ions, the melting curves were shifted to higher temperatures, which is indicative of double-stranded oligonucleotide **I** being significantly thermally stabilized. This trend is observed until one equivalent of Ag^+ is present in the solution (Figure 1), and the addition of more Ag^+ ions (> 1 equiv) did not lead to further significant stabilization.^[18] The increase in T_m that was observed upon addition of one or more equivalents of Ag^+ ions corresponded to $\Delta T_m = 33^\circ\text{C}$. These results suggest that ${}^7\text{C}A\text{-T}$ base pairs can coordinate to one Ag^+ ion, leading to the formation of metal-mediated base pairs of the type ${}^7\text{C}A\text{-Ag}^+\text{-T}$.

To gain further insight into the formation of the metal-mediated base pairs, the addition of increasing amounts of Ag^+ ions was monitored by UV spectroscopy (Figure 2). The UV spectra display significant changes in the region from 230 to 300 nm, which is where the nucleobases absorb.

A hyperchromic effect was observed during the titration experiment, confirming the binding of Ag^+ to the nucleobases (Figure 2a). It is noteworthy that while the absorbance of the maximum at 270 nm increased progressively during the whole titration experiment, the intensities of the absorption mini-

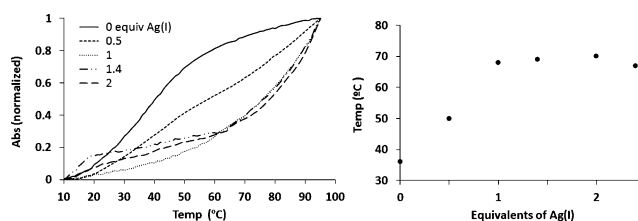


Figure 1. Left: Comparison of the melting curves recorded for duplex **I** in the absence and presence of various amounts of AgNO_3 . Right: Changes in the T_m of oligonucleotide **I** observed upon addition of different amounts of Ag^+ ions. The sample contained $2\ \mu\text{M}$ of double-stranded oligonucleotide **I**, $100\ \text{mM NaClO}_4$, and $5\ \text{mM MOPS}$ buffer at $\text{pH } 6.8$.

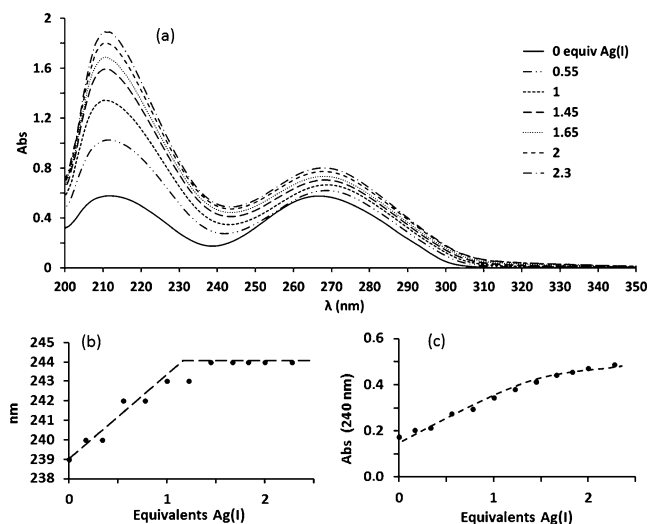


Figure 2. a) UV spectra of **I** in the presence of various amounts of Ag^+ ions. b) Bathochromic shift of the minimum at approximately $240\ \text{nm}$. c) Absorption changes in the $240\ \text{nm}$ region upon addition of Ag^+ ions. The sample contained $2\ \mu\text{M}$ of double-stranded oligonucleotide **I**, $100\ \text{mM NaClO}_4$, and $5\ \text{mM MOPS}$ buffer at $\text{pH } 6.8$.

um at $240\ \text{nm}$ and the maximum at $212\ \text{nm}$ increased significantly up to the presence of approximately one equivalent of Ag^+ , and the addition of more Ag^+ ions led to a slightly less steep increase in the absorbance (Figure 2c). Moreover, a bathochromic shift of the absorption at $240\ \text{nm}$ ($4\ \text{nm}$) was observed during the addition of the first equivalent, whereas no significant changes were observed afterwards (Figure 2b). These results are in agreement with the formation of the expected silver-mediated base pairs. When the same experiment was performed with the analogous oligonucleotide d(AT)_9 (**II**), containing canonical adenine and thymidine nucleobases, the hyperchromic effect as well as the bathochromic shift were also observed upon the addition of Ag^+ ions, but these variations followed a progressive trend with no stabilization during the experiment (Supporting Information, Figure S1). These observations can be explained by the binding of Ag^+ ions by oligonucleotide **I** via the endocyclic nitrogen atoms ${}^7\text{C}A\text{-N1}$ and T-N3 , leading to the formation of metal-mediated ${}^7\text{C}A\text{-Ag}^+\text{-T}$ base pairs. This binding will necessarily deprotonate the thymidine imine and therefore induce changes in the absorption bands of the nucleobases that are different to those observed for oligonu-

cleotide **I**, where Ag^+ will favorably coordinate to the A-N7 atoms.

To assess the deprotonation of the imino group, we monitored the changes in pH upon addition of Ag^+ ions to non-buffered solutions of oligonucleotide **I** (Supporting Information, Figure S2). Although the changes in the pH value were not particularly large, the pH varied steadily upon addition of the first equivalent of Ag^+ ($\Delta\text{pH} = 0.27$), with some fluctuations afterwards. We can assume that this change is due to the deprotonation of the thymidine imino group in the presence of the Ag^+ ions—a hypothesis that was also supported by ESI mass spectrometry (see below)—leading to the formation of the metal-mediated base pairs ${}^7\text{C A-Ag}^+-\text{T}$.

The formation of the silver(I)-mediated base pairs and their significance for the conformation of oligonucleotide **I** was investigated by CD spectroscopy titration experiments. In the absence of Ag^+ ions, the CD spectrum of oligonucleotide **I** is characterized by two negative bands at 295 and 250 nm, together with two positive bands at 270 and 220 nm (Figure 3).

The shape of the curve indicates that oligonucleotide **I** has a B-form conformation that is closely related to the conformation of poly[d(AT)] and poly[d(IC)].^[19] Upon addition of Ag^+ ions, the CD spectra retain their overall profile, but substantial changes in the intensity of the various bands are observed. The intensity of the positive band at 222 nm increases significantly while a decrease in intensity was observed for the positive band at 275 nm and the negative bands at 295 and 253 nm. This decrease in intensity has also been reported for the B-form of poly[d(IC)] at low salt concentrations^[20] and, recently, for G_6 homobase strands upon addition of Ag^+ ions.^[21] In all cases, a bathochromic shift is observed, except for the negative band at 295 nm, which moves to shorter wavelengths. Interestingly, the larger changes for all bands are completed upon addition of 1 equivalent of Ag^+ ions, and no significant changes are observed later. These results concur with the binding of Ag^+

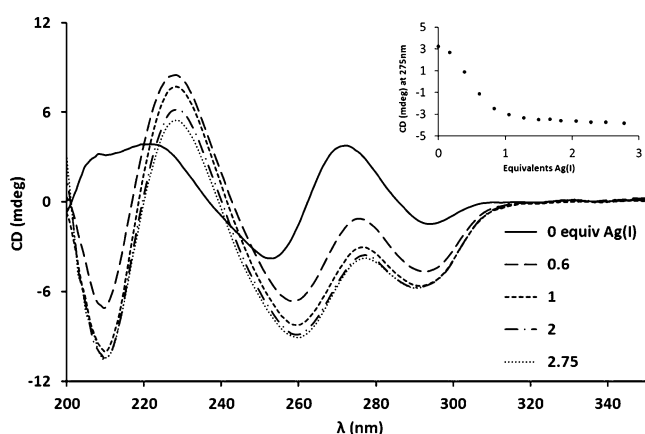


Figure 3. CD spectra of oligonucleotide **I** upon addition of different amounts of Ag^+ ions. Inset: Plot of the positive CD maximum at 275 nm against the number of equivalents of Ag^+ ions. The sample contained $2 \mu\text{M}$ of double-stranded oligonucleotide **I**, 100 mM NaClO_4 , and 5 mM MOPS buffer at pH 6.8.

ions to the DNA and with the concomitant formation of silver(I)-mediated base pairs, replacing one of the original W-C hydrogen bonds at the ${}^7\text{C A-T}$ base pair by a silver-nitrogen coordination bond. The observation that the intensities of the bands change during the addition of the first equivalent, and that no significant changes were observed afterwards, is in good agreement with the fact that the substitution of a hydrogen bond ($\text{N1}\cdots\text{H-N3}$) by a coordination bond ($\text{N1-Ag}^+-\text{N3}$) will have a certain influence on the conformation of the oligonucleotide. This seems sensible as the formation of ${}^7\text{C A-Ag}^+-\text{T}$ base pairs will disturb the overall arrangement of the system owing to the larger separation of the nucleobases relative to the hydrogen-bonded ${}^7\text{C A-T}$ base pair, which was confirmed by the DFT-optimized geometry of the ${}^7\text{C A-Ag}^+-\text{T}$ base pair (Figure S5, S6).

Interestingly, a new intense negative band appeared at 210 nm upon addition of Ag^+ ions, which is characteristic for an A-form DNA conformation.^[15,22] We attribute this result to the formation of a structure with a more open cylindrical core, owing to the substitution of hydrogen bonds by longer coordination bonds to central Ag^+ metal ions, which increases the distance between the ${}^7\text{C A}$ and T nucleobases within the helix (see above).

To corroborate the formation of silver-mediated base pairs in duplex **I**, the system was analyzed by ESI mass spectrometry. This technique has previously been utilized to detect heteroduplex $\text{A}_{11}-(\text{Ag}^+)_n-\text{T}_{11}$ products in solution.^[20] The mass spectrum of free oligonucleotide **I** is shown in Figure 4a.

The deconvoluted spectrum contained a signal that was assigned to single-stranded oligonucleotide **I** ($[\text{I}]^-$: 5482 Da), as well as a range of signals corresponding to higher masses, with a major signal probably due to the WC-paired double-stranded **I** dimer ($[\text{2I}]^-$: 10965 Da; see also the Supporting Information). The presence of both single- and double-stranded strands can be explained by the detachment of the double-stranded oligonucleotide during the electrospray ionization. Notably, in the presence of Ag^+ ions, signals corresponding to the free oligonucleotide **I** were not observed, and different signals appeared (Figure 4b). The deconvolution of this spectrum gave a signal assigned to metalated single-stranded oligonucleotide **I** $[\text{M}+9\text{Ag}-9\text{H}]^-$ (6435 Da) with nine Ag^+ ions coordinated to the nine

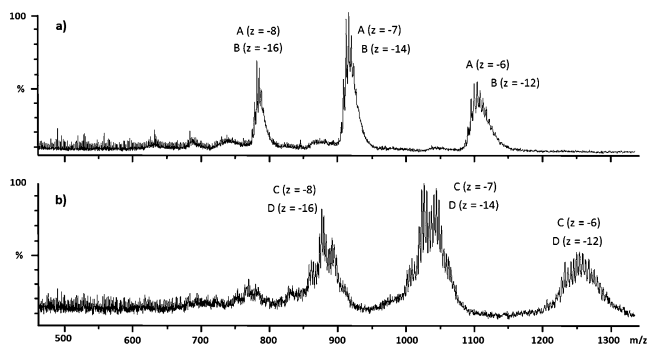


Figure 4. ESI mass spectra of a) free oligonucleotide **I** and b) oligonucleotide **I** in the presence of Ag^+ ions. A = $[\text{ss-I}]^-$, B = $[\text{ds-I}]^-$, C = $[\text{ss-I}+9\text{Ag}-9\text{H}]^-$, D = $[\text{ds-I}+18\text{Ag}-18\text{H}]^-$.

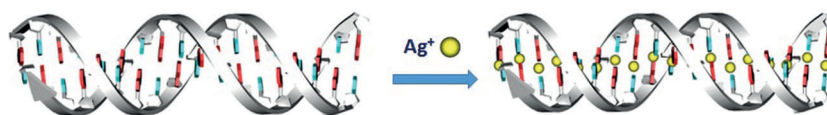
Communications



DNA Structures

N. Santamaría-Díaz,
J. M. Méndez-Arriaga, J. M. Salas,
M. A. Galindo* ————— ■■■■—■■■■

Highly Stable Double-Stranded DNA
Containing Sequential Silver(I)-Mediated
7-Deazaadenine/Thymine Watson–Crick
Base Pairs



Substitution of the original hydrogen bonds by silver(I) coordination bonds in a double-stranded oligonucleotide comprising Watson–Crick-paired 7-deazaadenine and thymine nucleobases leads to a sequential array of metal-mediated base

pairs. The stability of the silver-containing structure was significantly higher than that of the parent compound while the double-helix structure was retained.