

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA

COMPLEJOS METÁLICOS DE COBRE Y MANGANESO  
CON LIGANDOS BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS

ROCÍO CEJUDO MARÍN

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 de Setembre de 2002 davant un tribunal format per:

- Dra. Dña. Virtudes Moreno Martínez
- Dr. D. José Antonio Real Cabezas
- Dra. Dña. Carmen Navarro-Ranninger
- Dr. D. Juan Manuel Salas Peregrin
- Dr. D. Jose Sordo Rodríguez

Va ser dirigida per:

Prof. Dr Joaquín Borrás Tortonda y Dra. Gloria Alzuet Piña

©Copyright: Servei de Publicacions  
Rocío Cejudo Marín

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-5609-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

**[] Facultat de Química**

**Departamento de Química Inorgánica**

**COMPLEJOS METÁLICOS DE COBRE Y  
MANGANESO CON LIGANDOS BIOLÓGICAMENTE  
ACTIVOS**

TESIS DOCTORAL

presentada por:

**Rocío Cejudo Marín**

Valencia, Abril de 2002

*[Faint, illegible text, likely a signature or stamp]*

D. Joaquín Borrás Tortonda, Catedrático y D<sup>a</sup> Gloria Alzuet Piña, Doctora, del Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València,

CERTIFICAN

que el trabajo presentado por la licenciada Rocío Cejudo Marín, titulado "Complejos Metálicos de Cobre y Manganeso con Ligandos Biológicamente Activos", ha sido realizado en este departamento bajo nuestra dirección y asesoramiento.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizamos la presentación de esta Tesis Doctoral, para que se cumplan los trámites oportunos.

Valencia, Abril de 2002

Dr. Joaquín Borrás Tortonda

Dra. Gloria Alzuet Piña

*Esta Tesis Doctoral es la culminación de cinco años de esfuerzo y perseverancia, cinco años de trabajo donde ha habido muy buenos momentos pero también momentos de desaliento, aunque afortunadamente éstos han sido los menos y ya están olvidados. Durante este tiempo han sido muchas las personas que me han enseñado, con las que he compartido experiencias y que me han ayudado a llevar adelante este proyecto. Todas, a su manera, me han enseñado algo y de todas y cada una de ellas algo he aprendido. Ahora que ha llegado el momento quiero expresarles, desde estas líneas, mi más sincero agradecimiento.*

*En primer lugar quiero expresar mi agradecimiento a los dos directores de este trabajo, los doctores D. Joaquín Borrás Tortonda y D<sup>a</sup> Gloria Alzuet Piña. Gracias por aparecer en mi vida justo en el momento en el que estaba dispuesta a desistir. Quiero destacar su calidad humana, que ha hecho que me sintiera muy a gusto desde el momento en que llegué. Gracias a sus conocimientos, a su dedicación y a su inestimable ayuda este trabajo puede ser presentado.*

*Quiero también agradecer al profesor Francisco Vicente Pedrós y a Agustín Tato por apoyarme incondicionalmente en una difícil decisión.*

*Dar las gracias especialmente a los profesores Marcel·lí del Olmo y Lucas del Castillo por el trabajo, el tiempo, el espacio y los consejos que tan amablemente me han dedicado para la realización de las distintas pruebas de actividad biológica.*

*Mi reconocimiento a las profesoras Virtudes Moreno y María José Prieto, de la Universidad de Barcelona, por la realización de los ensayos de Microscopia de Fuerzas Atómicas (AFM).*

*Dar las gracias al profesor José Antonio Real de la Universidad de Valencia, por la realización de las pruebas de variación de la susceptibilidad magnética con la temperatura.*

*Mi gratitud a los profesores Alfonso Castiñeiras, de la Universidad de Santiago de Compostela y Santiago García Granda de la Universidad de Oviedo y a las doctoras Mafva Liu González y Carmen Ramírez de Arellano de la Universidad de Valencia por su desinteresada colaboración en la resolución de las estructuras cristalinas.*

*A las profesoras de la línea de investigación Sacra Ferrer, Rosa Ortiz y Lourdes Perelló gracias por sus inestimables consejos y por las anécdotas y buenos ratos compartidos.*

*A todos con los que, durante mi estancia, he compartido trabajo en el laboratorio de Química Inorgánica de la Facultad de Farmacia: a Marta, por todos los momentos que hemos pasado juntas: Gracias por guiarme y estar siempre ahí. A Ana, Yolanda, Laura, Vicente, Jose Luis, Fátima, Javi, Mónica, Mar....gracias.*

*A Raquel, Lorena y Xelo por estar siempre dispuestas a escuchar mis quejas y lamentos y por alegrarse conmigo en los buenos momentos.*

*A Inés, Brigi, Elisa, Ruth, Chelo, Amparo, Luisa, Patricia, Lucrecia, Bea, Verónica, Inma, Elena, Santi.....gracias por compartir conmigo consejos, charlas, comidas y muchos, muchos buenos ratos.*

*Quiero dar las gracias a mi familia, especialmente a mi prima Alicia por su "ayuda técnica", a mis amigos y a todos los que se alegrarán por mí.*

*Gracias a Juanjo por aguantarme, por haber estado siempre a mi lado, apoyándome desde el principio y compartiendo conmigo todos los momentos, los buenos y los malos. A él quiero agradecer haber sido mi más firme apoyo desde siempre, y desde estas líneas quiero que sepa que también yo espero siga siéndolo el resto de mi vida.*

*Por último, quiero agradecer y dedicar este trabajo a las dos personas más importantes de mi vida: mis padres. Ellos son las únicas personas que realmente han hecho posible esta Tesis Doctoral. Durante todo este tiempo han sido los únicos en financiar, sin límites, un trabajo que nadie más ha sido capaz de financiar. Gracias por confiar plenamente en mí, apoyarme en todas mis decisiones, las buenas y las malas, y por haber hecho realidad mi sueño.*

*Vila-real, 15 de Abril de 2002.*

*A JuanJo*

"No existe cantidad de experimentación  
que pueda demostrar que tengo razón,  
pero basta un solo experimento  
para demostrar que estoy equivocado"

Albert Einstein, 1879-1955

A mis Padres

" Si os apasiona la ciencia, haceos científicos.  
No penséis en lo que va a ser de vosotros.  
Si trabajáis firme y con entusiasmo,  
la ciencia llenará vuestra vida "

Severo Ochoa, 1905-1993



# ÍNDICE

## CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- IMPORTANCIA DE LA BIOINORGÁNICA	3
1.2.- QUÍMICA DEL MANGANESO	4
1.2.1.- INTRODUCCIÓN	4
1.2.2.- QUÍMICA DE COORDINACIÓN	5
1.2.3.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL MANGANESO	7
1.3.- QUÍMICA DEL COBRE	9
1.3.1.- INTRODUCCIÓN	9
1.3.2.- QUÍMICA DE COORDINACIÓN	9
1.3.3.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL COBRE	11
1.4.-SULFONAMIDAS	13
1.4.1.- INTRODUCCIÓN	13
1.4.2.- PROPIEDADES, ESTRUCTURA GENERAL Y MECANISMO DE ACCIÓN	15
1.4.3.- ESTUDIO DE LAS SULFONAMIDAS <i>N</i> -DERIVADAS	16

## CAPÍTULO 2.- EXPERIMENTAL

2.1.-REACTIVOS Y DISOLVENTES	21
2.2.-TÉCNICAS INSTRUMENTALES	21
2.2.1.- ANÁLISIS ELEMENTAL	21
2.2.2.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	21
2.2.2.1.- Fundamentos de la técnica	21
2.2.3.- ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE	22
2.2.3.1.- Fundamentos de la técnica	23
2.2.4.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (RPE)	23
2.2.4.1.- Fundamentos de la técnica	23
2.2.5.- DIFRACCIÓN DE RAYOS -X	24
2.2.6.- SUSCEPTIBILIDAD MAGNÉTICA	24
2.2.6.1.- Fundamentos de la técnica	24
2.2.7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	26
2.2.7.1.- Determinación <i>in vitro</i> de la actividad SOD	26
2.2.7.2.- Determinación <i>in vivo</i> de la actividad SOD	26
2.2.7.3.- Determinación de la Actividad Nucleasa	26

## CAPÍTULO 3.- LIGANDOS

<u>3.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LIGANDOS</u>	<u>29</u>
3.1.1.- DESCRIPCIÓN Y SÍNTESIS	29
3.1.2.- CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS	30
3.1.2.1.- Características Físicas y Solubilidad	30
3.1.2.2.- Análisis elemental y Espectros Infrarrojos	30
<i>N</i> -(tiazol-2-il)toluenosulfonamida (Htz-tol)	
<i>N</i> -(tiazol-2-il)bencenosulfonamida (Htz-ben)	
<i>N</i> -(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida (Htz-naf)	
4-amino- <i>N</i> -(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)bencenosulfonamida (Hsmtz)	
4-amino- <i>N</i> -(4,6-dimetil-2-pirimidinil)bencenosulfonamida (Hsmtzn)	
<u>3.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS</u>	<u>37</u>
3.2.1.- LIGANDO <i>N</i> -(TIAZOL-2-IL)TOLUENOSULFONAMIDA (HTZ-TOL)	37
3.2.1.1.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	37
3.2.2.- LIGANDO <i>N</i> -(TIAZOL-2-IL)NAFTALENOSULFONAMIDA (HTZ-NAF)	39
3.2.2.1.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	39

## CAPÍTULO 4.- COMPLEJOS DE Mn

<u>4.1.- SÍNTESIS Y ANÁLISIS ELEMENTAL</u>	<u>45</u>
<u>4.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS</u>	<u>47</u>
4.2.1.- COMPLEJO $[Mn(4-METILIMH)_2(OH_2)_4](SMTZ)_2$	47
4.2.1.1.- Síntesis de los monocristales	47
4.2.1.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	47
4.2.1.3.- Descripción de la estructura	48
4.2.2.- COMPLEJO $\{[Mn(SMTZN)_2(OH_2)] \cdot (IMH)\}_n$	50
4.2.2.1.- Síntesis de los monocristales	50
4.2.2.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	50
4.2.2.3.- Descripción de la estructura	51
<u>4.3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD</u>	<u>53</u>
<u>4.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA</u>	<u>53</u>

4.4.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
<b>4.5.- REFLECTANCIA DIFUSA</b>	<b>55</b>
4.5.1.-ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA Mn(II) Y Mn(III)	55
4.5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
<b>4.6.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA</b>	<b>56</b>
4.6.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA PARA Mn(II) Y Mn(III)	56
4.6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
<b>4.7.- MOMENTOS MAGNÉTICOS</b>	<b>59</b>
4.7.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
<b>4.8.- APÉNDICE</b>	<b>60</b>
4.8.1.- ESPECTROS IR	60
4.8.2.- ESPECTROS RPE	63

## **CAPÍTULO 5.- COMPLEJOS DE Cu**

<b>5.1.- SÍNTESIS Y ANÁLISIS ELEMENTAL</b>	<b>71</b>
<b>5.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS</b>	<b>74</b>
5.2.1.- COMPLEJO [Cu(SMTZ) <sub>2</sub> (IMH) <sub>2</sub> ]	74
5.2.1.1.- Síntesis de los monocristales	74
5.2.1.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	74
5.2.1.3.- Descripción de la estructura	75
5.2.2.- COMPLEJO [Cu(1,2-DIMETILIMH) <sub>3</sub> (SMTZ)(OH)]·½H <sub>2</sub> O	77
5.2.2.1.- Síntesis de los monocristales	77
5.2.2.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	77
5.2.2.3.- Descripción de la estructura	78
5.2.3.- COMPLEJO [Cu <sub>2</sub> (TZ-TOL) <sub>4</sub> ]	80
5.2.3.1.- Síntesis de los monocristales	80
5.2.3.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	80
5.2.3.3.- Descripción de la estructura	81

5.2.4.- COMPLEJO [Cu <sub>2</sub> (TZ-BEN) <sub>4</sub> ]	82
5.2.4.1.- Síntesis de los monocristales	82
5.2.4.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	83
5.2.5.- COMPLEJO [Cu <sub>2</sub> (TZ-NAF) <sub>4</sub> ]	83
5.2.5.1.- Síntesis de los monocristales	83
5.2.5.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura	83
5.2.5.3.- Descripción de la estructura	84
<b><u>5.3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD</u></b>	<b>85</b>
<b><u>5.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA</u></b>	<b>86</b>
5.4.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
<b><u>5.5.- REFLECTANCIA DIFUSA</u></b>	<b>88</b>
5.5.1.- ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA Cu(II)	88
5.5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
<b><u>5.6.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA</u></b>	<b>92</b>
5.6.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA PARA Cu(II)	92
5.6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	94
<b><u>5.7.- MOMENTOS MAGNÉTICOS</u></b>	<b>98</b>
5.7.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	98
<b><u>5.8.- APÉNDICE</u></b>	<b>102</b>
5.8.1.- ESPECTROS IR	102
5.8.2.- ESPECTROS RPE	110

## **CAPÍTULO 6.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

<b><u>6.1.- ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA</u></b>	<b>123</b>
6.1.1.- TOXICIDAD DEL OXÍGENO Y LAS ESPECIES "ROS"	123
6.1.2.- MECANISMOS DE DEFENSA: ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)	
6.1.2.1.- Enzima Cu/Zn-SOD	125
6.1.2.2.- Enzima Mn-SOD	126
6.1.2.3.- Enzima Fe-SOD	128
6.1.2.4.- Enzima Ni-SOD	129

6.1.2.5.- Mecanismos de actuación de los enzimas SOD	129
6.1.3.- COMPUESTOS MIMÉTICOS DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA	131
6.1.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SOD DE COMPLEJOS DE Cu(II) Y Mn(II)	133
6.1.4.1.- Determinación <i>in vitro</i> de la actividad SOD	134
Fundamentos del método	
Protocolo General	
Resultados y Discusión	
6.1.4.2.-Determinación <i>in vivo</i> de la actividad SOD	139
Condiciones del ensayo	
Fundamentos del método	
Protocolo General	
Resultados y Discusión	
<b>6.2.- ACTIVIDAD NUCLEASA</b>	<b>150</b>
6.2.1.- ÁCIDOS NUCLEICOS: IMPORTANCIA Y ESTRUCTURA	150
6.2.2.- NUCLEASAS :IMPORTANCIA DEL ENLACE FOSFODIESTER	151
6.2.3.- MODELOS DE NUCLEASAS QUÍMICAS	154
6.2.3.1.- Complejos Cu-fenantrolina	155
6.2.3.2.- Complejos Fe-bleomicina	156
6.2.3.3.- Complejos Mn-porfirina	158
6.2.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA	160
Fundamentos de la técnica	
Protocolo General	
Resultados y Discusión	
6.2.5.- PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD	173
Fundamentos de la técnica	
Protocolo General	
Resultados y Discusión	
6.2.6.- AFM (ATOMIC FORCE MICROSCOPY)	179
Fundamentos de la técnica	
Protocolo General	
Resultados y Discusión	

## **CAPÍTULO 7.- CONCLUSIONES**

## **CAPÍTULO 8.- BIBLIOGRAFÍA**

# ÍNDICE de TABLAS y FIGURAS

## CAPÍTULO 1.- INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1.- Estados de oxidación y estereoquímica del manganeso.....	6
Tabla 1.2.- Principales proteínas de Mn y su función.....	7
Tabla 1.3.- Estados de oxidación y estereoquímica del cobre.....	10
Tabla 1.4.- Principales proteínas de Cu y su función.....	11
Figura 1.1.- Funciones metabólicas esenciales de las proteínas de cobre.....	12
Figura 1.2.- Reducción del Prontosil Rubrum.....	14
Figura 1.3.- Estructura del ácido <i>p</i> -aminobenzoico (PABA).....	15
Figura 1.4.- Estructura general de las sulfonamidas.....	15
Figura 1.5.- Sulfatiazol.....	16

## CAPÍTULO 3.- LIGANDOS

Figura 3.1.- Síntesis de sulfonamidas según el método descrito por Vogel.....	29
Figura 3.2.- Bandas características de los espectros IR de sulfonamidas.....	31
Tabla 3.1.- Caracterización del ligando: <i>N</i> -(tiazol-2-il)toluenosulfonamida.....	32
Tabla 3.2.- Caracterización del ligando: <i>N</i> -(tiazol-2-il)bencenosulfonamida.....	33
Tabla 3.3.- Caracterización del ligando: <i>N</i> -(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida.....	34
Tabla 3.4.- Caracterización del ligando: 4-amino- <i>N</i> -(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il) bencenosulfonamida.....	35
Tabla 3.5.- Caracterización del ligando: 4-amino- <i>N</i> -(4,6-dimetil-2-pirimidinil) bencenosulfonamida.....	36
Figura 3.3.- Estructura cristalina de <i>N</i> -(tiazol-2-il)toluenosulfonamida.....	37
Tabla 3.6.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de <i>N</i> -(tiazol-2-yl)toluenosulfonamida (Htz-tol).....	38
Tabla 3.7.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	38
Figura 3.4.- Estructura cristalina de <i>N</i> -(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida.....	39
Tabla 3.8.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de <i>N</i> -(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida (Htz-naf).....	40
Tabla 3.9.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	40

## CAPÍTULO 4.- COMPLEJOS DE Mn

Tabla 4.1.- Análisis elemental de los complejos de Mn.....	46
Tabla 4.2.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Mn(4-metilimH) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ](smtz) <sub>2</sub> .....	48
Tabla 4.3.- Distancias principales (Å) entre átomos del Hsmtz.....	49
Figura 4.1.- Estructura cristalina del complejo [Mn(4-metilimH) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ](smtz) <sub>2</sub> .....	49
Tabla 4.4.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	49
Tabla 4.5.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Mn(smtzn) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> ](imH).....	51
Figura 4.2.- Estructura cristalina del complejo {[Mn(smtzn) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> ](imH)} <sub>n</sub> .....	52
Tabla 4.6.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	52
Tabla 4.7.- Bandas características de los espectros infrarrojos de los complejos.....	53
Figura 4.3.- Desdoblamiento de los niveles energéticos de un ión S=5/2 en un campo magnético.....	57
Figura 4.4.- Estructura hiperfina para un sistema I= 5/2.....	57
Tabla 4.8.- Valores de susceptibilidad molar y momentos magnéticos de los complejos a T <sup>a</sup> ambiente.....	59
Figura 4.5.- Espectro IR de Mn(smtz) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O.....	60
Figura 4.6.- Espectro IR de Mn(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O.....	60
Figura 4.7.- Espectro IR de Mn(smtz) <sub>2</sub> (N-metilimH) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O.....	61
Figura 4.8.- Espectro IR de [Mn(4-metilimH) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ](smtz) <sub>2</sub> .....	61
Figura 4.9.- Espectro IR de Mn(smtzn) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O.....	62
Figura 4.10.- Espectro IR de {[Mn(smtzn) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> ](imH)} <sub>n</sub> .....	62
Figura 4.11.- Espectro IR de Mn(smtzn) <sub>3</sub> · 3H <sub>2</sub> O.....	63
Figura 4.12.- Espectro RPE de Mn(smtz) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O.....	63
Figura 4.13.- Espectro RPE de Mn(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O.....	64
Figura 4.14.- Espectro RPE de Mn(smtz) <sub>2</sub> (N-metilimH) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O.....	64
Figura 4.15.- Espectro RPE de [Mn(4-metilimH) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ](smtz) <sub>2</sub> .....	65
Figura 4.16.- Espectro RPE de Mn(smtzn) <sub>2</sub> · 3H <sub>2</sub> O.....	65
Figura 4.17.- Espectro RPE de {[Mn(smtzn) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> ](imH)} <sub>n</sub> .....	66

## CAPÍTULO 5.- COMPLEJOS DE Cu

Tabla 5.1.- Análisis elemental de los complejos de cobre.....	73
Tabla 5.2.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ].....	74
Figura 5.1.- Estructura cristalina del complejo [Cu(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ].....	75
Figura 5.2.- Vista en perspectiva del empaquetamiento cristalino del complejo [Cu(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ].....	76
Tabla 5.3.- Distancia y ángulos de enlace seleccionados.....	76
Tabla 5.4.- Distancias y ángulos de enlace de los enlaces de hidrógeno.....	76
Tabla 5.5.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu(1,2-dimetilimH) <sub>3</sub> (smtz)(OH)]·½H <sub>2</sub> O.....	78
Figura 5.3.- Estructura cristalina del complejo [Cu(1,2- dimetilimH) <sub>3</sub> (smtz)(OH)]·½H <sub>2</sub> O.....	79
Tabla 5.6.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	79
Tabla 5.7.- Distancias y ángulos de enlace de los enlaces de hidrógeno.....	79
Tabla 5.8.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ].....	81
Figura 5.4.- Estructura cristalina del complejo [Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ].....	82
Tabla 5.9.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	82
Tabla 5.10.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ].....	84
Figura 5.5.- Estructura cristalina del complejo [Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ].....	85
Tabla 5.11.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados.....	85
Tabla 5.12.- Bandas características de los espectros infrarrojos de los complejos.....	86
Figura 5.6.- Correlación de los rangos de energía para las transiciones <i>d-d</i> para las diferentes estereoquímicas.....	89
Tabla 5.13.- Bandas de los espectros electrónicos, transiciones asignadas y geometrías de los complejos.....	91
Figura 5.7.- Posibles formas de los espectros RPE de los complejos de Cu(II)	
Tabla 5.14.- Parámetros de los espectros axiales.....	94
Tabla 5.15.- Parámetros de los espectros rómbicos.....	95
Tabla 5.16.- Parámetros de los espectros de los complejos dímeros.....	96



<b>Tabla 5.17.- Valores de <math>D_{dd}</math>, <math>D_{exc}</math> y <math>2J</math> para los complejos dimeros</b> .....	97
<b>Figura 5.8.-Estructura propuesta para el complejo <math>Cu_2(smtzn)_4 \cdot 6H_2O</math></b> .....	97
<b>Tabla 5.18.- Valores de <math>2J</math> para los complejos dimeros</b> .....	99
<b>Figura 5.9.- Dependencia de <math>\chi_M</math> y <math>\chi_M \cdot T</math> frente a la temperatura para el complejo <math>[Cu_2(tz-tol)_4]</math></b> .....	99
<b>Figura 5.10.- Dependencia de <math>\chi_M</math> y <math>\chi_M \cdot T</math> frente a la temperatura para el complejo <math>[Cu_2(tz-ben)_4]</math></b> .....	100
<b>Figura 5.11.- Dependencia de <math>\chi_M</math> y <math>\chi_M \cdot T</math> frente a la temperatura para el complejo <math>[Cu_2(tz-naf)_4]</math></b> .....	100
<b>Tabla 5.19.- Valores de susceptibilidad molar y momentos magnéticos de los Complejos a T<sup>a</sup> ambiente</b> .....	101
<b>Figura 5.12.- Espectro IR de <math>Cu(smtz)_2 \cdot H_2O</math></b> .....	102
<b>Figura 5.13.- Espectro IR de <math>[Cu(smtz)_2(imH)_2]</math></b> .....	102
<b>Figura 5.14.- Espectro IR de <math>Cu(smtz)_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot H_2O</math></b> .....	103
<b>Figura 5.15.- Espectro IR de <math>Cu(smtz)_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3H_2O</math></b> .....	103
<b>Figura 5.16.- Espectro IR de <math>Cu(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math></b> .....	104
<b>Figura 5.17.- Espectro IR de <math>[Cu(smtzn)(imH)](NO_3) \cdot H_2O</math></b> .....	104
<b>Figura 5.18.- Espectro IR de <math>Cu(smtzn)_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot 2H_2O</math></b> .....	105
<b>Figura 5.19.- Espectro IR de <math>[Cu(smtzn)(4\text{-metilimH})](NO_3) \cdot H_2O</math></b> .....	105
<b>Figura 5.20.- Espectro IR de <math>[Cu_2(tz-tol)_4]</math></b> .....	106
<b>Figura 5.21.- Espectro IR de <math>Cu(tz-tol)_2(N\text{-metilimH})_2</math></b> .....	106
<b>Figura 5.22.- Espectro IR de <math>Cu(tz-tol)_2(4\text{-metilimH})_2</math></b> .....	107
<b>Figura 5.23.- Espectro IR de <math>[Cu_2(tz-ben)_4]</math></b> .....	107
<b>Figura 5.24.- Espectro IR de <math>Cu(tz-ben)_2(imH)_2</math></b> .....	108
<b>Figura 5.25.- Espectro IR de <math>Cu(tz-ben)_2(N\text{-metilimH})_2</math></b> .....	108
<b>Figura 5.26.- Espectro IR de <math>[Cu_2(tz-naf)_4]</math></b> .....	109
<b>Figura 5.27.- Espectro IR de <math>Cu(tz-naf)_2(N\text{-metilimH})_2</math></b> .....	109
<b>Figura 5.28.- Espectro RPE de <math>Cu(smtz)_2 \cdot H_2O</math></b> .....	110
<b>Figura 5.29.- Espectro RPE de <math>[Cu(smtz)_2(imH)_2]</math></b> .....	110
<b>Figura 5.30.- Espectro RPE de <math>Cu(smtz)_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot H_2O</math></b> .....	111
<b>Figura 5.31.- Espectro RPE de <math>Cu(smtz)_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3H_2O</math></b> .....	111
<b>Figura 5.32.- Espectro RPE de <math>Cu(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math> (rango 0-2000)</b> .....	112
<b>Figura 5.33.- Espectro RPE de <math>Cu(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math> (rango 2200-4000)</b> .....	112

Figura 5.34.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (rango 3500-5500)	113
Figura 5.35.- Espectro RPE de $[\text{Cu}(\text{smtzn})(\text{imH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$	113
Figura 5.36.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{smtzn})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	114
Figura 5.37.- Espectro RPE de $[\text{Cu}(\text{smtzn})(4\text{-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$	114
Figura 5.38.- Espectro RPE de $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$	115
Figura 5.39.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(\text{N-metilimH})_2$	115
Figura 5.40.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2$	116
Figura 5.41.- Espectro RPE de $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$	116
Figura 5.42.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{imH})_2$	117
Figura 5.43.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{N-metilimH})_2$	117
Figura 5.44.- Espectro RPE de $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$	118
Figura 5.45.- Espectro RPE de $\text{Cu}(\text{tz-naf})_2(\text{N-metilimH})_2$	118

## CAPÍTULO 6.- ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Figura 6.1.- Homodímero de Cu/Zn-SOD	125
Figura 6.2.- Homotetrámero humano de Cu/Zn-SOD	125
Figura 6.3.- Sitio activo del enzima Cu/Zn-SOD	126
Figura 6.4.- Dímero de Mn-SOD	127
Figura 6.5.- Monómero de Mn-SOD	127
Figura 6.6.- Sitio activo del enzima Mn-SOD	127
Figura 6.7.- Homotetrámero de Mn-SOD	128
Figura 6.8.- Homodímero humano de Mn-SOD	128
Figura 6.9.- Homodímero de Fe-SOD bacteriano	128
Figura 6.10.- Sitio activo del enzima Fe-SOD	129
Figura 6.11.- Mecanismo de acción del enzima Cu/Zn-SOD	130
Figura 6.12.- Mecanismo de acción del enzima Mn-SOD	130
Tabla 6.1.- Valores de $\text{IC}_{50}$ de los complejos	136
Figura 6.13.- Actividad SOD del complejo $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	137
Figura 6.14.- Actividad SOD del complejo $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	137
Figura 6.15.- Actividad SOD del complejo $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-MetilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	138
Figura 6.16.- Actividad SOD del complejo $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	138
Figura 6.17.- Esquema de la ruta metabólica para la fermentación	141
Tabla 6.2.- Concentraciones y volúmenes de los complejos ensayados	142

<b>Figura 6.18 A) <math>MnCl_2 \cdot 2H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	144
<b>Figura 6.18 B) <math>MnCl_2 \cdot 2H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	144
<b>Figura 6.19 A) <math>Mn(smtz)_2(py)_2 \cdot 4H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	145
<b>Figura 6.19 B), <math>Mn(smtz)_2(py)_2 \cdot 4H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	145
<b>Figura 6.20 A) <math>Mn(smtz)_2(imH)_2 \cdot H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	145
<b>Figura 6.20 B), <math>Mn(smtz)_2(imH)_2 \cdot H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	145
<b>Figura 6.21 A) <math>Mn(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	146
<b>Figura 6.21 B) <math>Mn(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	146
<b>Figura 6.22 A) <math>CuCl_2 \cdot 2H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	147
<b>Figura 6.22 B) <math>CuCl_2 \cdot 2H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	147
<b>Figura 6.23 A) <math>[Cu(smtz)_2(imH)_2]</math>, cepa salvaje</b> .....	147
<b>Figura 6.23 B) <math>[Cu(smtz)_2(imH)_2]</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	147
<b>Figura 6.24 A) <math>Cu(smtz)_2 \cdot H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	148
<b>Figura 6.24 B) <math>Cu(smtz)_2 \cdot H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	148
<b>Figura 6.25 A) <math>Cu(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math>, cepa salvaje</b> .....	148
<b>Figura 6.25 B) <math>Cu(smtzn)_2 \cdot 3H_2O</math>, cepa carente de Cu/Zn-SOD</b> .....	148
<b>Figura 6.26.- Doble hélice de ADN</b> .....	150
<b>Figura 6.27.-Doble hélice de ADN</b> .....	150
<b>Figura 6.28.- Participación de los ácidos nucleicos en la transmisión de información genética</b> .....	151
<b>Figura 6.29.- Esqueleto de azúcar-fosfato del ADN</b> .....	152
<b>Figura 6.30.- Modos de interacción complejo metálico-ADN</b> .....	153
<b>Figura 6.31.- Mecanismo de degradación del ADN por <math>Cu(phen)_2</math></b> .....	155
<b>Figura 6.32.- Estructura de las bleomicinas <math>A_2</math> y <math>B_2</math></b> .....	156
<b>Figura 6.33.- Mecanismo de degradación del ADN por Fe-BLM activado</b> .....	157
<b>Figura 6.34.- Mecanismo de degradación del ADN por Mn-TMPyP</b> .....	159
<b>Figura 6.35.- Varias formas de ADN circular y su conversión a forma lineal</b> .....	161
<b>□ A-F Electroforesis de complejos de Mn(II)</b> .....	162-167
<b>□ G-I Electroforesis del complejo de Mn(III)</b> .....	168-170
<b>□ J-L Electroforesis de complejos de Cu(II)</b> .....	171-173
<b>Figura 6.36.- Mapa de restricción de los plásmidos pUC18 y pUC 19</b> .....	175

<b>Figura 6.37.- Prueba de especificidad de los complejos [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>] y Mn(smtzn)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O con el enzima de restricción EcoRI</b>	<b>177</b>
<b>Figura 6.38.- Prueba de especificidad de los complejos [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>] y Mn(smtzn)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O con los enzimas de restricción EcoRI y Sca</b>	
<b>Figura 6.39.- Imagen AFM tridimensional de cromosomas humanos</b>	<b>179</b>
<b>Figura 6.40.- AFM del complejo Mn(smtzn)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O, 40 μM, en tampón HEPES en ausencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato como forma activante de la reacción</b>	<b>181</b>
<b>Figura 6.41.- AFM del complejo Mn(smtzn)<sub>3</sub>·3H<sub>2</sub>O, 40 μM, en tampón HEPES en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato como forma activante de la reacción</b>	<b>181</b>

# Capítulo I: Introducción

---

---

## I.1.- IMPORTANCIA DE LA BIOINORGÁNICA

### I.2.- QUÍMICA DEL MANGANESO

I.2.1.- INTRODUCCIÓN

I.2.2. - QUÍMICA DE COORDINACIÓN

I.2.3.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL MANGANESO

### I.3.- QUÍMICA DEL COBRE

I.3.1.- INTRODUCCIÓN

I.3.2.- QUÍMICA DE COORDINACIÓN

I.3.3.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL COBRE

### I.4.-SULFONAMIDAS

I.4.1.- INTRODUCCIÓN

I.4.2.- PROPIEDADES, ESTRUCTURA GENERAL Y MECANISMO DE ACCIÓN

I.4.3.-ESTUDIO DE LAS SULFONAMIDAS *N*-DERIVADAS

## **1.1.- IMPORTANCIA DE LA BIOINORGÁNICA**

Aunque tradicionalmente la biología e incluso la vida han sido consideradas desde el punto de vista orgánico, la vida es también inorgánica. Hoy en día se sabe que muchos elementos inorgánicos y sus compuestos son esenciales para los organismos vivos. Son muchos los compuestos orgánicos incapaces de realizar correctamente ciertas funciones si no están presentes también determinados elementos inorgánicos.

La aparición de lo que llamamos Bioinorgánica no es un fenómeno aislado en el campo de la ciencia actual. Su origen se remonta hacia mediados de la década de los años 50, cuando *Schwarz* y colaboradores decidieron ampliar la lista de elementos inorgánicos esenciales conocidos hasta la fecha por su importancia biológica (zinc, cobre, cobalto, manganeso y molibdeno) con nuevos elementos inorgánicos (cromo, estaño, vanadio, níquel, cadmio y litio entre otros).<sup>1</sup> Esta lista se ha ampliado con los años, al tiempo que ha aumentado el atractivo de la Bioinorgánica para científicos e investigadores puesto que vertebra, en una única disciplina, diversas ramas de la ciencia y la tecnología (Química, Biología, Medicina, Farmacología, Ecología, Agricultura, Veterinaria) que, de esta manera, han alcanzado cierto grado de perfeccionamiento y desarrollo.<sup>2</sup>

En la actualidad, el interés de la Bioinorgánica se centra, más concretamente, en el estudio de los complejos metálicos presentes en los sistemas biológicos, el conocimiento de las funciones que los mismos desarrollan y la comprensión de las relaciones entre sus propiedades estructurales y su actividad biológica. A través de sistemas modelos se obtiene en muchos casos, información clave para dilucidar los mecanismos a través de los cuales ocurren los procesos biológicos, para conocer las estructuras de los sistemas químicos que forman parte de estos procesos biológicos, etc. De esta forma la Bioinorgánica ofrece auténticas posibilidades a la industria farmacéutica, sobre todo en el diseño de nuevos agentes terapéuticos y de diagnóstico para el tratamiento y comprensión de enfermedades que eran intratables hasta la fecha.<sup>3</sup>

Entre las principales funciones que los iones metálicos de transición desempeñan en los sistemas biológicos podemos destacar: <sup>4</sup>

- 1) Activación y transporte de oxígeno.
- 2) Transporte y/o almacenamiento de electrones.
- 3) Catálisis en procesos redox.
- 4) Catálisis en procesos ácido-base.

Es por todas estas razones por las que, en los últimos años, nuestro grupo de investigación se ha dedicado a este apasionante estudio, profundizando en el conocimiento sobre la química de coordinación de los metales con interés biológico: Cu, Mn, Fe, Ni, Co, Zn, etc.; con el fin de sintetizar modelos, capaces de mimetizar el comportamiento de determinadas metaloenzimas y con posibilidad de que presenten importantes propiedades terapéuticas.

En este contexto se encuadra la presente Tesis Doctoral. A pesar de toda la información de la que se dispone en este momento sobre los sistemas biológicos, todavía resta mucho por estudiar acerca de su estructura, del entorno del metal, de los mecanismos de acción, etc.

## **1.2.- QUÍMICA DEL MANGANESO**

### **1.2.1.- INTRODUCCIÓN**

Aunque el manganeso era ya conocido en el Imperio Romano (su nombre se piensa que deriva de la palabra latina *magnes*, magnético) no fue hasta 1774 cuando fue “descubierto” por Johann Gahn.<sup>5</sup> Presenta una abundancia relativamente alta en la corteza terrestre (0,085% o 1000 ppm), ocupando el segundo lugar entre los metales pesados (solo el hierro es más abundante) y el décimo lugar entre todos los elementos. Se encuentra principalmente en forma de óxidos (pirolusita, manganita, hausmanita), hidróxidos y carbonatos y el metal se puede obtener por reducción con aluminio. Existen depósitos marinos, nódulos, con aproximadamente un 30% de manganeso aunque en el agua marina el Mn es el decimonoveno metal más abundante en concentraciones de aproximadamente 1 ppb.<sup>6</sup>

El manganeso es el primer miembro del grupo 7, con número atómico 25, presenta una configuración electrónica  $[\text{Ar}] 3d^5 4s^2$  y un peso atómico de 54,938 u.m.a. Es un metal de color plateado o grisáceo, parecido al hierro aunque más duro que éste. Se le conocen varios isótopos:  $^{52}\text{Mn}$ ,  $^{52m}\text{Mn}$ ,  $^{53}\text{Mn}$ ,  $^{54}\text{Mn}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{56}\text{Mn}$  y  $^{57}\text{Mn}$ , aunque sólo el  $^{54}\text{Mn}$  es un isótopo natural.<sup>5,7</sup>

### 1.2.2. - QUÍMICA DE COORDINACIÓN

Una de las principales características químicas del manganeso es su variabilidad de estados de oxidación, conociéndose compuestos del mismo en estados de oxidación que van desde (-III) hasta (+VIII), aunque usualmente limita su aparición entre  $\text{Mn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{7+}$  (tabla 1.1). Entre éstos, los iones +2, +3 y +4 son los más empleados por los sistemas biológicos, puesto que los estados de oxidación más elevados son altamente oxidantes e inestabilizan a los ligandos orgánicos.

En el estado de oxidación +2 el nivel 3d se encuentra semilleno. La mayoría de los compuestos son de espín alto,  $(t_{2g})^3(e_g)^2$ , con los cinco electrones distribuidos simétricamente. La presencia de la configuración  $3d^5$  del Mn(II), se refleja en sus propiedades, especialmente el radio iónico o el calor de hidratación. La mayor parte de sus sales son solubles en agua, excepto el carbonato y el fosfato. Los compuestos octaédricos del Mn(II) con ligandos polidentados como la etilendiamina y el EDTA son casi incoloros (color rosado muy tenue) puesto que no existen bandas de transferencia electrónica en la región visible (absorción d-d) o, en caso de existir, son muy débiles ya que están prohibidas. Se conocen pocos complejos tetraédricos y éstos son de un color verde amarillento.

El  $\text{Mn}_2\text{O}_3$  hidratado es el ejemplo mejor conocido del estado de oxidación +3, y se forma cuando el aire atmosférico oxida al hidróxido de Mn(II) recién precipitado. El Mn(III) posee cuatro electrones d y las transiciones entre orbitales d no son de espín prohibido. El color rojo asociado a los compuestos octaédricos del Mn(III) de espín alto se atribuye a la transición  ${}^2t_{2g} \rightarrow {}^2e_g$ .



El estado de oxidación +4 tiene como compuesto más representativo al dióxido de manganeso,  $\text{MnO}_2$ . Éste es un sólido negro y un agente oxidante energético, lo que es habitual en los compuestos de Mn(IV). Otros compuestos de Mn(IV) son el sulfato,  $\text{Mn}(\text{SO}_4)_2$  y los manganitos, de fórmula general  $x\text{M}^{\text{II}}\text{O} \cdot y\text{Mn}^{\text{IV}}\text{O}_2$ .

Como ejemplos de los estados de oxidación (V) y (VI), encontramos los iones  $\text{MnO}_4^{3-}$  o el  $\text{MnO}_4^{2-}$ , de color verde oscuro.

**Tabla 1.1.- Estados de oxidación y estereoquímica del manganeso**

ESTADO DE OXIDACIÓN	NÚMERO DE COORDINACIÓN	ESTEREOQUÍMICA
<b>II</b> ( $3d^5$ )	2	Lineal
	4	Tetraédrica
	5	Plano cuadrada
	6	Bipirámide Trigonal
	7	Octaédrica
	8	Bipirámide Pentagonal
<b>III</b> ( $3d^4$ )	4	Dodecaédrica
	5	Plano Cuadrada
	6	Pirámide Cuadrada
	7	Bipirámide Trigonal
<b>IV</b> ( $3d^3$ )	6	Octaédrica
	7	Bipirámide Pentagonal
<b>V</b> ( $3d^2$ )	4	Tetraédrica
	6	Octaédrica
<b>VI</b> ( $3d^1$ )	4	Tetraédrica
	6	Octaédrica
<b>VII</b> ( $3d^0$ )	3	Plana
	4	Tetraédrica

La química del Mn(VII) está asociada principalmente al ión permanganato,  $\text{MnO}_4^-$ . Éste es tetraédrico y los enlaces de los ligandos óxido implican una donación  $\sigma\pi$  al átomo central de Mn(VII). Se obtiene por oxidación electrolítica a partir de una disolución básica de manganato(VI) de potasio. El nivel 3d se encuentra vacío y el color

púrpura intenso se debe a la absorción por transferencia electrónica. El  $\text{MnO}_4^-$  es el agente oxidante energético por excelencia y se utiliza mucho en análisis volumétrico.<sup>8</sup>

### 1.2.3 IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL MANGANESO

El Mn es uno de los muchos elementos empleados por los sistemas biológicos en diversas funciones tanto metabólicas como estructurales. Es utilizado para dar soporte estructural a las proteínas así como un importante cofactor en transformaciones que incluyen reacciones hidrolíticas y redox.<sup>9</sup> Algunas de las proteínas que contienen manganeso se detallan en la tabla 1.2:

**Tabla 1.2.- Principales proteínas de Mn y su función<sup>10</sup>**

Proteínas típicas de Mn	Función
Concavalina A	Unión de sacáridos
Galactosa transferasa	Transferencia del grupo galactosilo
Arginasa	Hidrólisis de la arginina a ornitina y urea
Glicosilaminasa	Hidrólisis de guanidinoacetato a glicina y urea
Piruvato carboxilasa	Carboxilación del grupo piruvato hasta oxalacetato
Mn-Ribonucleótido reductasa	Eliminación reductora de grupo 2-hidroxilo del ribonucleótido
Mn-Dioxigenasa	Cataliza la rotura del grupo extradiol de los catecoles
Mn-Catalasa	Enzima redox, actúa sobre el $\text{H}_2\text{O}_2$
Mn-Peroxidasa (Ligninasa)	Enzima redox, degrada la lignina
Mn-Superóxido dismutasa	Enzima redox, actúa sobre el radical superóxido
Fotosistema II	Liberación de dioxígeno en plantas
Glutamato sintetasa	Síntesis de glutamina
Fosfatasa Ácida	Hidroliza el enlace del ortofosfato

Muchos organismos superiores requieren la presencia de manganeso para funcionar correctamente. Si bien no existen dudas acerca de la importancia biológica de este elemento, ésta está poco explorada y comprendida. Su participación en la fotosíntesis así como su presencia en enzimas de diversos organismos inferiores está bien establecida.<sup>2</sup>

Los estados de oxidación del manganeso fisiológicamente más importantes son II, III y IV aunque el Mn(III) es la forma biológicamente más activa, dado que tiene mayor afección que el Mn(II) por la quelación en sistemas biológicos.<sup>6</sup>

El Mn coordina principalmente con proteínas que contienen átomos dadores de O y N, siendo el número de coordinación variable, de 4 a 6, en especial este último. Un aspecto muy peculiar asociado a su química bioinorgánica es su presencia tanto en forma de complejos sencillos, con un único centro metálico, como de especies multinucleares que presentan dos o más centros metálicos.<sup>2</sup>

En el ser humano, el manganeso es un elemento traza esencial. En un individuo adulto de 70 Kg podemos encontrar depósitos de cantidades muy pequeñas (10-20 mg) especialmente comparadas con otros metales como el hierro, que se encuentra en una cantidad entre 3-4 gramos.<sup>11</sup> Por lo que sabemos del metabolismo del Mn éste es esencial para la actividad de muchos enzimas degradativos, del metabolismo lipídico o del de carbohidratos.

La media diaria de ingesta alimentaria de manganeso para el hombre varía entre 2-9 mg. La absorción de manganeso en el tracto gastrointestinal es pobre en condiciones normales. El  $Mn^{2+}$  ingerido es transformado en  $Mn^{3+}$  en el medio alcalino duodenal y allí es transportado, a través del torrente sanguíneo por la **transmanganina** (proteína que forma un complejo específico con el Mn(III)) hasta el hígado donde es conjugado con la bilis y excretado al intestino donde, en parte es reabsorbido por la circulación. También parte del manganeso inhalado por los pulmones se transfiere al tracto gastrointestinal donde sufre el mismo proceso que el Mn ingerido.<sup>6</sup> Así pues, no es de extrañar que las concentraciones más elevadas de este metal, se encuentren en hígado, riñones y páncreas. En el interior celular encontramos de nuevo el manganeso en forma de ión  $Mn^{2+}$  en las mitocondrias, posiblemente como cofactor en enzimas del proceso respiratorio. La excreción del manganeso se realiza casi exclusivamente por vía fecal y en menor medida a través de la orina. Su toxicidad y deficiencias son conocidas desde hace tiempo. La deficiencia está relacionada con enfermedades tales como epilepsia, osteoporosis o diabetes. En cuanto a su toxicidad, el manganeso es el menos tóxico de los elementos esenciales. En el ser humano, esta toxicidad está relacionada con diversas patologías neurológicas (enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer o

enfermedad de Pick), disfunciones reproductivas o inmunológicas así como nefritis, anorexia, anemia, pancreatitis, etc. Pese a la severidad de los síntomas, la intoxicación crónica de manganeso no es una enfermedad fatal aunque puede provocar incapacidad permanente.<sup>12</sup>

### **1.3.- QUÍMICA DEL COBRE**

#### **1.3.1.- INTRODUCCIÓN**

Conocido desde la antigüedad y de “descubridor” desconocido, el cobre debe su nombre a la isla de Chipre (cobre proviene de la palabra latina *cuprium* o *cuprum*).<sup>13</sup> Es un metal bastante abundante (4,5 ppm) en la corteza terrestre y lo encontramos en la naturaleza, como metal, en forma de sulfuros: Calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ) y Calcosina ( $\text{Cu}_2\text{S}$ ), óxidos: Cuprita ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ) o carbonatos: Malaquita ( $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$ ).<sup>3</sup> En el agua de mar lo encontramos en concentraciones dentro del rango de 1-25 ppb.<sup>6</sup>

El cobre es el primer miembro del grupo 9, con número atómico 29, que presenta una configuración electrónica  $[\text{Ar}] 3d^{10}4s^1$  y un peso atómico de 63,546 u.m.a.. Es un metal rojizo, dúctil y maleable, excelente conductor de la electricidad y del calor (sólo el Fe tiene conductividades térmica y eléctrica superiores). Como isótopos conocidos tenemos:  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  y  $^{67}\text{Cu}$ .<sup>13</sup>

#### **1.3.2.- QUÍMICA DE COORDINACIÓN**

La química de coordinación del cobre es posiblemente una de las mejor estudiadas de todos los metales de transición. Al encontrarse el cobre al final de la serie de transición, donde se produce una mayor estabilidad de los orbitales d y con ello una reducción del número de estados de oxidación para cada elemento, sólo los estados +1 y +2 son estables para este elemento (tabla 1.3) aunque también se han encontrado complejos de Cu con estado de oxidación +3.<sup>3</sup>

Los complejos de Cu(I), con los cinco orbitales *d* llenos, suelen presentar coordinación tetraédrica. Son diamagnéticos y, a menos que existan bandas de transferencia de carga en la región visible del espectro, no poseen color.

En los compuestos de coordinación de Cu(II), la configuración  $d^9$  del  $Cu^{+2}$  implica una fuerte distorsión por el efecto Jahn-Teller si éste átomo se encuentra en un entorno de simetría cúbica (octaédrica y tetraédrica regular). Este intenso efecto provoca que este tipo de geometrías no se suelen dar. Cuando el Cu se encuentra hexacoordinado, el octaedro está severamente distorsionado. La distorsión típica presenta cuatro enlaces Cu-L cortos y dos enlaces *trans* más largos. El caso límite es la geometría plano-cuadrada. En general, todos los complejos son de color verde o azul. Estos colores son debidos a la presencia de una banda de absorción en la región entre 600-900 nm del espectro.<sup>14</sup>

**Tabla 1.3.- Estados de oxidación y estereoquímica del cobre**

ESTADO DE OXIDACIÓN	NÚMERO DE COORDINACIÓN	ESTEREOQUÍMICA
I ( $3d^{10}$ )	2	Lineal
	3	Plana Trigonal
	4	Tetraédrica
II ( $3d^9$ )	4	Pseudotetraédrica
		Plano cuadrada
	5	Bipirámide Trigonal
		Pirámide Cuadrada
III ( $3d^8$ )	6	Octaédrica
	4	Plano Cuadrada
	5	Bipirámide Trigonal
	6	Octaédrica Regular

Del estado +3, poco conocido y estudiado, simplemente reseñar que es isoelectrónico con el  $Ni^{+2}$  y aparece en algunos compuestos cristalinos, pero es inestable en disolución. Los compuestos son diamagnéticos, de spin bajo y, por lo general, con coordinación plano cuadrada.<sup>14</sup>

### 1.3.3.- IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL COBRE

El cobre es un nutriente esencial que está extensamente distribuido tanto en tejidos animales como vegetales. Es el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, después de Fe y Zn, y se han identificado un número relativamente alto de metaloproteínas que lo contienen. Está asociado a sistemas y procesos que implican la utilización del oxígeno por parte de sistemas biológicos, así como en sistemas transportadores de electrones.<sup>2</sup> En la tabla 1.4 se presentan algunas de las proteínas típicas de cobre:

**Tabla 1.4.- Principales proteínas de Cu y su función<sup>15</sup>**

Proteínas típicas de Cu	Función
Ascorbato Oxidasa	Oxidación de ascorbato a dihidroascorbato en plantas
Ceruloplasmina	Transporte y almacenamiento de Cu Movilización y oxidación de Fe
Galactosa oxidasa	Oxidación de alcoholes en hongos
Amino oxidasa	Degradación de aminas a compuestos carbonílicos
Citocromo c oxidasa	Punto final de la cadena respiratoria
Hemocianina	Transporte de O <sub>2</sub> en moluscos y artrópodos
Tirosinasa	<i>O</i> -hidroxilación de fenoles y subsiguiente oxidación a <i>o</i> -quinonas en piel, pulpa de las frutas
Plastocianina	Participación en la fotosíntesis de plantas
Azurina	Participación en la fotosíntesis de bacterias
Cu/Zn-SOD	Protección celular
NO <sub>2</sub> reductasa	Reducción del NO <sub>2</sub>
N <sub>2</sub> O reductasa	Reducción de N <sub>2</sub> O a N <sub>2</sub> en el ciclo del nitrógeno

Los estados de oxidación fisiológicamente más importantes para el cobre son (I) y (II), siendo este último el más frecuente. Los distintos tipos de Cu(II) que podemos encontrar en los sistemas biológicos son:

- **Cobre de tipo 1:** presenta una banda de absorción muy intensa, alrededor de los 600 nm, con un coeficiente de absorción molar unas 300 veces más elevado que el de los complejos usuales de Cu(II). La banda de absorción se debe al color azul que caracteriza a las proteínas que poseen este tipo de cobre. Estas proteínas se conocen con el nombre de proteínas azules de cobre.

- **Cobre de tipo 2:** es paramagnético y posee el espectro electrónico típico de los complejos habituales de Cu(II).
- **Cobre de tipo 3:** está constituido por un par de iones Cu(II) sometidos a fuerte acoplamiento antiferromagnético, lo que convierte al sistema en diamagnético. Estos sistemas se caracterizan por presentar una banda de absorción muy intensa alrededor de los 330 nm.

Los números de coordinación 4, 5 y 6 son los más habituales en las metaloenzimas de cobre. En éstas, el átomo metálico se encuentra unido a átomos dadores de O, N y S.<sup>2,15</sup>

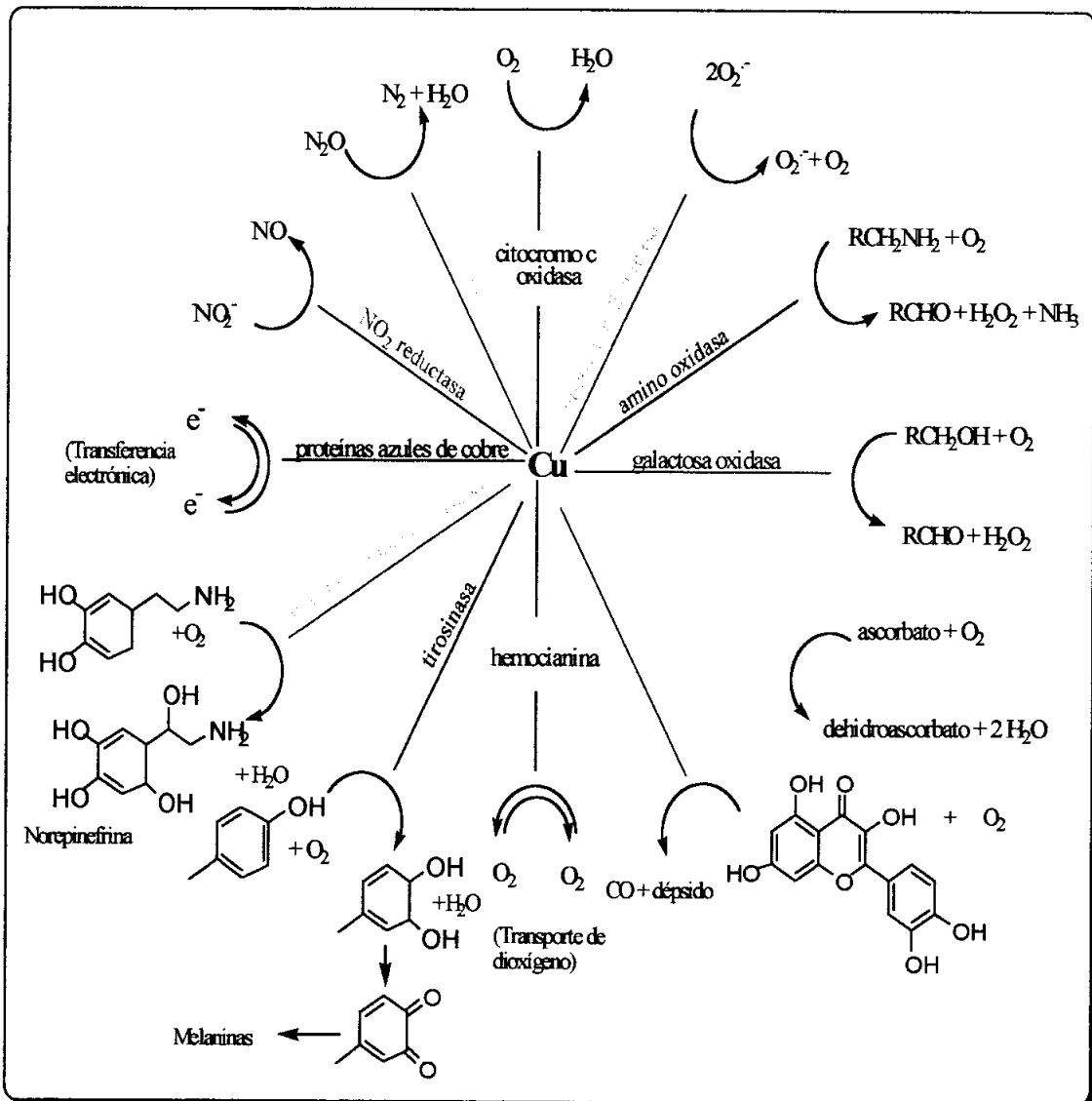


Figura 1.1.- Funciones metabólicas esenciales de las proteínas de cobre

En el ser humano el cobre es también un elemento esencial. En un individuo adulto de 70 Kg el contenido de Cu es de 80-150 mg y la media de ingesta diaria en la dieta para un adulto normal es de 4-5 mg. El Cu iónico es absorbido por el estómago, duodeno y yeyuno (absorción favorecida por la presencia de determinadas proteínas y aminoácidos). La **ceruloplasmina** es la principal proteína de transporte de Cu. El complejo Cu-Albúmina ayuda al transporte del Cu a través de las membranas y así es distribuido por los tejidos blandos. En general, la mayor concentración de cobre se encuentra en el hígado, cerebro, pulmón, riñón y ovario. Dentro de la célula hepática sobre un 65% del Cu está presente en la fracción soluble y un 8% en la mitocondria. El almacenamiento de Cu se produce a través de una **metalotioneína** específica para el cobre.

La mayor ruta de excreción del cobre en los animales es a través del sistema biliar, vía fecal y, en menor medida, a través del sudor o la orina.<sup>6</sup> La deficiencia de Cu puede provocar anomalías óseas, anemia, hipopigmentación del pelo, fallo cardiovascular e incluso muerte. Un importante desorden metabólico asociado a la deficiencia de cobre es la enfermedad de Menkes. Aunque no está bien establecido se cree que la deficiencia de cobre también está relacionada con anomalías en el metabolismo del colesterol y el de la glucosa así como también con alteraciones del sistema inmune. En cuanto a su toxicidad en seres humanos, el desorden metabólico del cobre más extensamente conocido es la enfermedad de Wilson. Ésta es una enfermedad hereditaria recesiva cuya consecuencia es un desorden del sistema nervioso asociado con la cirrosis hepática. Los pacientes con esta enfermedad presentan disfunciones neurológicas y/o hepáticas y en menor medida pueden presentar síntomas cardíacos, oftalmológicos, endocrinológicos o dermatológicos.<sup>16</sup>

## **1.4.-SULFONAMIDAS**

### **1.4.1.- INTRODUCCIÓN**

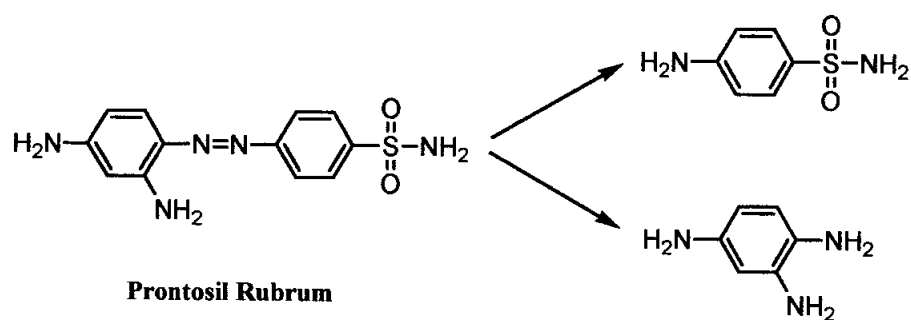
La lucha contra la infección bacteriana es uno de los grandes logros históricos de la química medicinal. En el siglo XIX *Pasteur* estableció la relación existente entre las bacterias y las enfermedades. Durante la última mitad del siglo XIX se identificaron los



distintos microorganismos relacionados con enfermedades como el cólera, el tifus o la tuberculosis.

Desde esta fecha se ha tratado de encontrar agentes químicos efectivos como agentes antibacterianos o antibióticos. Uno de estos grupos de agentes químicos, que revolucionaron la industria farmacéutica, fue el de las sulfonamidas, cuyo descubrimiento inició una de las eras más brillantes en la historia de la medicina y la salud pública.<sup>17</sup>

El descubrimiento de las sulfonamidas se produjo en 1908 cuando *Gelmo* preparó la sulfanilamida como parte de un programa de investigación de colorantes azoicos, aunque no fue hasta 1932 cuando *Domagk* estudió las propiedades antimicrobianas del Prontosil (figura 1.2) y observó que estas propiedades sólo se apreciaban *in vivo*. *Domagk* recibió por estas investigaciones el premio Nobel en 1938. En 1935 un grupo de investigadores del Instituto Pasteur de París (*Tréfouël, Nitti y Bovet*), bajo la dirección de *Fourneau* demostró que el grupo azo del Prontosil se reduce *in vivo* por acción enzimática (figura 1.2), formando sulfanilamida, demostrando que ésta es el auténtico metabolito activo.<sup>18</sup>



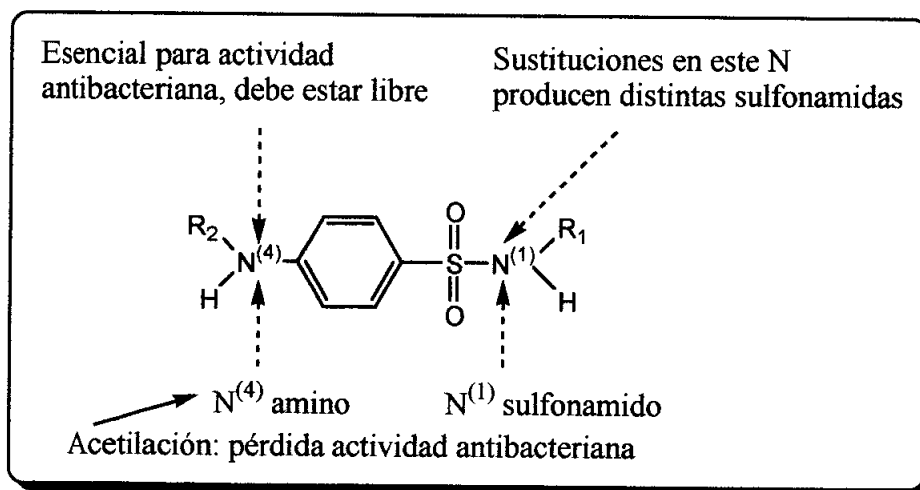
**Figura 1.2.- Reducción del Prontosil Rubrum**

Las sulfonamidas fueron ampliamente utilizadas y no fue hasta 1940 cuando, debido a la aparición de la penicilina y puesto que ésta era más efectiva y menos tóxica su uso fue dejado de lado.<sup>17</sup> Actualmente y a causa del efecto sinérgico que presentan combinadas con el *Trimetoprim*, las sulfonamidas han recuperado aplicaciones importantes en quimioterapia antibacteriana. Así encontramos sulfonamidas utilizadas en el tratamiento de infecciones urinarias, oftalmológicas, intestinales o dermatológicas entre otras.<sup>19</sup>

### 1.4.2.- PROPIEDADES, ESTRUCTURA GENERAL Y MECANISMO DE ACCIÓN

Las sulfonamidas son polvos blancos, cristalinos, de sabor amargo, más solubles en pH básico que en ácido. Se presentan en forma de sales sódicas que son solubles, altamente alcalinas e irritantes para los tejidos por lo que su administración parenteral es difícil, administrándose por tanto por vía oral. La estructura general de las sulfonamidas es la que se presenta en la figura 1.4.

Los requisitos mínimos para que una sulfonamida tenga actividad antimicrobiana están presentes en la sulfanilamida. Posee dos átomos de nitrógeno, el nitrógeno sulfonamido ( $N^1$ ) y el nitrógeno amino ( $N^4$ ), y las distintas sulfonamidas resultan de la sustitución de uno de los átomos de hidrógeno unido a dichos nitrógenos por diferentes grupos químicos. El grupo amino libre,  $N^4$ , es esencial para la actividad antibacteriana. La acetilación de este grupo produce la pérdida de la actividad antimicrobiana. Las sustituciones en el grupo sulfonamido,  $N^1$ , producen compuestos con variadas propiedades físicas, químicas, farmacológicas y antibacterianas.



Las sulfonamidas son análogos estructurales y antagonistas competitivos del ácido *p*-aminobenzoico (PABA) (figuras 1.3 y 1.4).

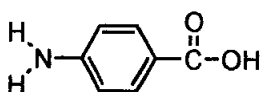


Figura 1.3.- Estructura del ácido *p*-aminobenzoico (PABA)

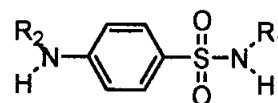


Figura 1.4.- Estructura general de las sulfonamidas

Ejercen su actividad tanto sobre microorganismos Gram+ como microorganismos Gram-. La acción de las sulfonamidas es bacteriostática, siendo los mecanismos de defensa (celular y humoral) del huésped indispensables para la erradicación final de la infección.

Impiden la incorporación de PABA a la molécula de ácido fólico, dificultando su biosíntesis, esencial para el crecimiento y multiplicación bacteriana. Los microorganismos **sensibles** son aquellos que deben sintetizar su propio ácido fólico, o son impermeables al ácido fólico de los líquidos circundantes. Los microorganismos **resistentes** son aquellos que son permeables al ácido fólico o, al igual que las células del hombre, requieren ácido fólico preformado para su normal desarrollo.<sup>19</sup>

### 1.4.3.- ESTUDIO DE LAS SULFONAMIDAS *N*-DERIVADAS

Desde hace mucho tiempo nuestro grupo de investigación ha estudiado el comportamiento como ligandos de sulfonamidas libres y sulfonamidas *N*-derivadas. La presencia de varios grupos dadores en las sulfonamidas *N*-derivadas hace factible la formación de enlaces entre los átomos de dichos grupos y distintos iones metálicos. Por un lado, el grupo *p*-amino puede formar complejos a través del par solitario del átomo de nitrógeno. Además el grupo sulfonamido puede también dar lugar a la formación de compuestos de coordinación siempre que se encuentre desprotonado. Finalmente el grupo sustituyente puede poseer características dadoras importantes, ya que al ser un grupo generalmente heterocíclico contiene átomos que pueden actuar como dadores.<sup>20</sup>

La 1ª sulfonamida *N*-derivada estudiada fue la 4-amino-*N*-(2-tiazol) bencenosulfonamida (sulfatiazol = Hstz).

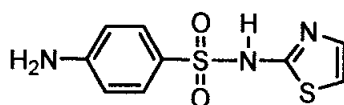


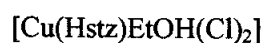
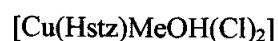
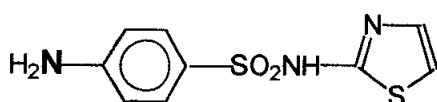
Figura 1.5.- Sulfatiazol (Hstz)

Con el sulfatiazol se han obtenido numerosos complejos cuya estructura cristalina determina las diferentes formas con que puede interaccionar este ligando con

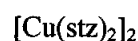
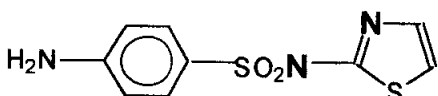
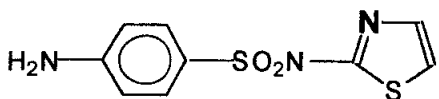
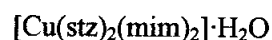
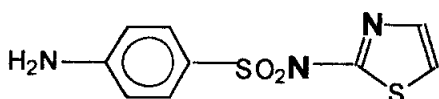
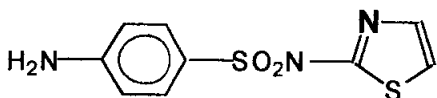
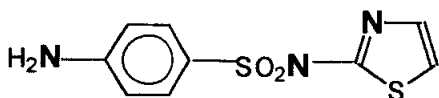
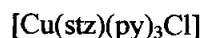
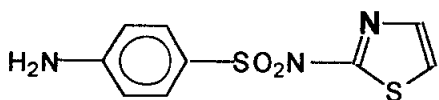
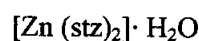
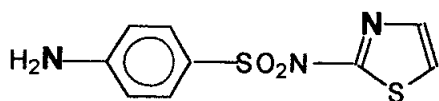
los iones metálicos.<sup>21-26</sup> Hay muchas áreas de interés potencial en la química de coordinación de las sulfonamidas.<sup>27</sup> Los complejos con sulfatiazol presentan actividad Superóxido Dismutasa (SOD) y se ha propuesto una relación entre las características estructurales de estos compuestos y su actividad SOD. Éste es un campo que continúa abierto a la investigación por la importancia que presentan los compuestos miméticos del enzima SOD en el mantenimiento de la salud.

### MODOS DE COORDINACION DEL SULFATIAZOL (Hstz)

#### FORMA NEUTRA

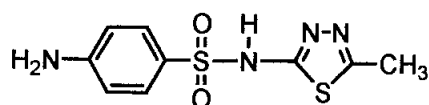


#### FORMA ANIONICA



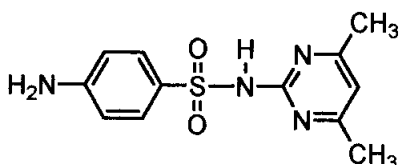
En la actualidad se están estudiando, por nuestro grupo de investigación, nuevas sulfonamidas, algunas de las cuales se presentan en este trabajo. Estos estudios se centran en la actividad biológica de los complejos.

Las sulfonamidas estudiadas en el presente trabajo y utilizadas como ligandos para la formación de los diferentes compuestos de coordinación han sido bien adquiridas comercialmente o sintetizadas por nuestro grupo siguiendo el procedimiento descrito por Vogel.<sup>28</sup> A continuación presentamos la estructura, nombre y aplicaciones de estas sulfonamidas.



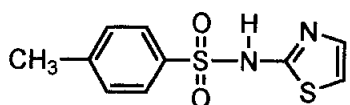
**4-amino-N-(5-metil-1,3,4 tiadiazol-2-il) bencenosulfonamida (Sulfametizol)**

**Aplicaciones:** Sulfonamida sistémica de acción rápida. Se emplea en el tratamiento de infecciones urinarias. Se puede encontrar bajo el nombre comercial de Thiosulfil Forte<sup>R, 29</sup>.

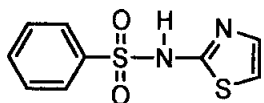


**4-amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidinil) bencenosulfonamida (Sulfametazina)**

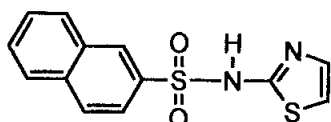
**Aplicaciones:** Sulfonamida sistémica de acción rápida. Forma parte de la mezcla denominada *trisulfapirimidina* (combinación a parte iguales de sulfadiazina, sulfamerazina y sulfametazina). Uso veterinario con acción antiparasitaria.<sup>30</sup> La encontramos bajo el nombre comercial de Calfspan<sup>R</sup> o Span bolet<sup>R</sup>, entre otros.<sup>31</sup>



**N-(thiazol-2-il)toluenosulfonamida**



**N-(thiazol-2-il)bencenosulfonamida**



**N-(thiazol-2-il)naftalenosulfonamida**

# Capítulo 2: Experimental

---

---

## **2.1.- REACTIVOS Y DISOLVENTES**

## **2.2.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES**

### **2.2.1.- ANÁLISIS ELEMENTAL**

### **2.2.2.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

#### **2.2.2.1.- FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

### **2.2.3.- ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE**

#### **2.2.3.1.- FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

### **2.2.4.- ESPECTROSCOPIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA**

#### **2.2.4.1.- FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

### **2.2.5.- DIFRACCIÓN DE RAYOS-X**

### **2.2.6.- SUSCEPTIBILIDAD MAGNÉTICA**

#### **2.2.6.1.- FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

### **2.2.7.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

#### **2.2.7.1.- DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD SOD**

#### **2.2.7.2.- DETERMINACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD SOD**

#### **2.2.7.3.- DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA**

## **2.1.- REACTIVOS Y DISOLVENTES**

Todos los reactivos utilizados para realizar las síntesis presentadas en este trabajo han sido productos puros suministrados por las casas comerciales Merck, Panreac, Sigma-Aldrich, Avocado y Fluka.

Los disolventes utilizados en estas síntesis han sido suministrados por las casas comerciales Panreac, Scharlau y Prolabo.

## **2.2.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES**

Las técnicas instrumentales utilizadas para la caracterización de los ligandos y los complejos obtenidos en el presente trabajo así como las utilizadas en la determinación de la actividad biológica son las siguientes:

### **2.2.1.- ANÁLISIS ELEMENTAL**

El porcentaje de C, H, N, y S ha sido determinado por el Laboratorio de Caracterización del departamento de Química del Instituto de Tecnología Química (C.S.I.C.-U.P.V.)

### **2.2.2.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

Los espectros infrarrojos se han realizado con un aparato Mattson modelo Satellite FTIR. Tanto los espectros de los ligandos como los de los complejos se han realizado en la región  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras fueron preparadas en forma de pastillas utilizando KBr (1%) como diluyente.

#### **2.2.2.1.- Fundamentos de la técnica**

La radiación infrarroja (IR) se refiere a la parte del espectro electromagnético que va desde la región visible a la región de microondas. La zona que proporciona mayor información a la hora del análisis molecular es la que comprende entre  $4000-400$

$\text{cm}^{-1}$ . Las bandas de absorción de IR se describen o bien por la longitud de onda ( $\lambda$ ), de la luz absorbida, en micrómetros o por su valor recíproco, llamado número de onda ( $\nu$ ), con unidades de  $\text{cm}^{-1}$ .

La radiación infrarroja en el rango de  $10000\text{-}100\text{ cm}^{-1}$  es absorbida y convertida por la molécula orgánica en energía vibracional molecular. Esta absorción es cuantizada y da lugar a un espectro vibracional. Este espectro aparece en forma de bandas y no de líneas debido a que el cambio energético vibracional va acompañado por cambios de la energía rotacional.

Una de las razones de la complejidad de los espectros infrarrojos es la diversidad de vibraciones posibles en una molécula y el hecho de que muchas de ellas están acopladas entre sí mecánicamente. Las moléculas que absorben luz infrarroja experimentan tanto movimientos de tensión como de deformación y combinaciones de ambos. Los distintos modos de vibración presentan movimientos de tensión simétrica y asimétrica y diversos tipos de deformación: balanceo (rocking), torsión (twisting) o aleteo (wagging).

La complejidad introducida por estas posibilidades hace muy difícil la interpretación de los espectros infrarrojos. A pesar de ello la espectroscopia IR es de gran utilidad por dos razones: 1) las bandas vibracionales de diversos grupos funcionales aparecen a números de onda característicos y 2) el espectro IR puede ser utilizado, en su conjunto, como una huella digital única de un determinado compuesto.<sup>32</sup>

### **2.2.3.- ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA-VISIBLE**

Los espectros de Reflectancia Difusa (RD) se han realizado con un aparato Shimadzu UV-2101 PC. Las muestras se suspendieron en nujol y como soporte se utilizó papel de filtro. Los espectros fueron registrados entre 200 y 800 nm.



### **2.2.3.1.- Fundamentos de la técnica**

El estudio de los espectros electrónicos de las moléculas, además de permitir explicar los colores de las sustancias, también proporciona información importante sobre los estados excitados de las moléculas.

Los tipos de transiciones que acompañan a las electrónicas en este tipo de espectroscopia son las de vibración y las de rotación por lo que los espectros obtenidos son de difícil discusión. La ecuación que gobierna la espectroscopia electrónica es la Ley de Lambert-Beer.<sup>33</sup>

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

A = Absorbancia (adimensional)

$\varepsilon$  = Coeficiente de absorción molar ( $M^{-1}cm^{-1}$ )

l = longitud de la celda (cm)

c = Concentración de la muestra (M)

### **2.2.4.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA (RPE)**

Los espectros de Resonancia Paramagnética Electrónica de las muestras se han realizado a T<sup>a</sup> ambiente con un espectrómetro Bruker ER200D operando en la frecuencia de la banda X.

#### **2.2.4.1.- Fundamentos de la técnica**

La resonancia paramagnética electrónica (también llamada resonancia de espín electrónico) es el estudio de especies que contienen electrones desapareados observando los campos magnéticos a los que entran en resonancia con radiación monocromática. Los niveles de energía de un espín electrónico en un campo magnético  $B$  están dados por la ecuación:

$$E_{m_s} = g_e \cdot \mu_B \cdot m_s \cdot B; \quad m_s = \pm 1/2$$

Expresión que pone de manifiesto que la energía de un electrón  $\alpha$  ( $m_s = + 1/2$ ) crece y que la de un electrón  $\beta$  ( $m_s = -1/2$ ), decrece, a medida que aumenta el campo, y que la separación de los niveles es:

$$\Delta E = E_\alpha - E_\beta = g_e \cdot \mu_B \cdot B$$

Así la condición de resonancia es, por tanto:  $h\nu = g_e \cdot \mu_B \cdot B$

Donde  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia,  $g$  es el factor de desplazamiento de Lande (igual a 2,003 para el electrón libre),  $\mu_B$  es el magnetón de Bohr electrónico y  $B$  es el campo magnético.<sup>33</sup>

### **2.2.5.- DIFRACCIÓN DE RAYOS -X**

Los cristales obtenidos han sido resueltos en la Universidad de Oviedo, en la Universidad de Santiago de Compostela y en el Servicio Central de Soporte a la Investigación (S.C.S.I.) de la Universidad de Valencia.

### **2.2.6.- SUSCEPTIBILIDAD MAGNÉTICA**

Las medidas realizadas de susceptibilidad magnética a T<sup>a</sup> ambiente fueron tomadas en una balanza de susceptibilidad magnética, modelo MSB-MKI, basada en el diseño de Evans. Se utilizó como patrón de referencia HgCo(NCS)<sub>4</sub>.

Para algunos complejos, se han realizado medidas de susceptibilidad magnética a T<sup>a</sup> próxima a la del helio líquido en un susceptómetro tipo péndulo AZTEC-DSM8 completamente automatizado, equipado con un criostato TBT de corriente continua y un electromagneto Bruker BE15, operando a 1,8 T.

#### **2.2.6.1.- Fundamentos de la técnica**

Las medidas magnéticas aportan información acerca de la estructura electrónica, del estado de oxidación y en algunos casos sobre las propiedades de simetría del átomo central en los complejos de metales de transición.

Cuando una sustancia es sometida a un campo magnético de fuerza  $H$ , la intensidad del campo magnético en la sustancia puede ser mayor o menor que  $H$ .

Si el campo en la sustancia es mayor que  $H$ , la sustancia es paramagnética. Es más fácil para las líneas magnéticas de fuerza viajar a través de un material paramagnético que a través de un vacío. Así, los materiales paramagnéticos atraen las líneas de fuerza, y si tiene libertad para moverse, un material paramagnético se moverá desde una parte más débil hasta otra más fuerte del campo. El paramagnetismo surge como resultado de los espines electrónicos desapareados en el átomo.

Si el campo en la sustancia es menor que  $H$ , la sustancia es diamagnética. Los materiales diamagnéticos tienden a repeler las líneas de fuerza. Es más difícil para las líneas magnéticas de fuerza viajar a través de los materiales magnéticos que a través de un vacío, y tales materiales tienden a moverse desde la parte más fuerte hacia la más débil de un campo magnético. En los compuestos diamagnéticos todos los espines electrónicos están apareados. El efecto paramagnético es mucho mayor que el efecto diamagnético.

En la práctica, el valor de susceptibilidad magnética ( $\chi_M$ ), calculado de los resultados de las medidas magnéticas, es la suma de las susceptibilidades diamagnética y paramagnética, con algunas correcciones. En aquellos complejos con grandes ligandos orgánicos que tienen una susceptibilidad paramagnética pequeña, la susceptibilidad diamagnética del ligando es determinada experimentalmente y este valor se introduce en la corrección. De la susceptibilidad paramagnética obtenida, se calcula el momento magnético efectivo mediante la fórmula :

$$\mu_{\text{efec}} = [(3kT/N\beta^2) \chi_M]^{1/2} = 2,84[\chi_M \cdot T]^{1/2}$$

donde  $k$  es la constante de Boltzmann,  $N$  es el número de Avogadro,  $T$  es la temperatura en grados Kelvin,  $\chi_M$  es la susceptibilidad molar y  $\beta$  es el magnetón de Bohr,  $eh/4\pi mc$ , siendo  $e$  la carga del electrón,  $h$  la constante de Planck,  $m$  la masa del electrón y  $c$  la velocidad de la luz.<sup>34</sup>

## **2.2.7.-ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

### **2.2.7.1.- Determinación *in vitro* de la actividad SOD**

Los ensayos cuantitativos para medir la actividad Superóxido Dismutasa (SOD) de los complejos metálicos aquí presentados se ha determinado según el método de *Oberley y Spitz*<sup>35</sup> con mínimas modificaciones. La cinética del proceso se sigue tomando valores de absorbancia a 560 nm. Estas medidas han sido realizadas con el espectrofotómetro Shimadzu modelo 2101 PC. Los reactivos utilizados para llevar a cabo los ensayos fueron suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich y Panreac.

### **2.2.7.2.- Determinación *in vivo* de la actividad SOD**

Para los ensayos cualitativos de actividad catalítica Superóxido Dismutasa las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* han sido proporcionadas por la ATCC (American Type Culture Collection). Los productos utilizados para la elaboración de los medios de cultivo han sido suministrados por Panreac, Pronadisa (Hispalab) y Cultimed.

### **2.2.7.3.- Determinación de la Actividad Nucleasa**

La actividad nucleasa de los complejos se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa. Los reactivos utilizados para la preparación de los geles y los utilizados en la realización de estos ensayos fueron suministrados por MBP Fermentas, Panreac, Merck, Sigma-Aldrich, MBA Seakem y Roche Diagnostics GMBH. Los geles corrieron en una cubeta Biorad Wide Mini-Sub Cell GT, cuya fuente de alimentación fue una Biorad PowerPac 300 Power Supply. El revelado de los geles se llevó a cabo en un aparato Gel Printer Plus con un transiluminador UV Spectroline Longlife™ filter. Para la manipulación de las imágenes obtenidas se utilizó el programa Scion Image.

# Capítulo 3: Ligandos

---

## 3.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LIGANDOS

### 3.1.1.- DESCRIPCIÓN Y SÍNTESIS

### 3.1.2.- CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS

#### 3.1.2.1.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD

#### 3.1.2.2.- ANÁLISIS ELEMENTAL Y ESPECTROS INFRARROJOS

*N*-(TIAZOL-2-IL)TOLUENOSULFONAMIDA (TZ-TOL)

*N*-(TIAZOL-2-IL)BENCENOSULFONAMIDA (TZ-BEN)

*N*-(TIAZOL-2-IL)NAFTALENOSULFONAMIDA (TZ-NAF)

4-AMINO-*N*-(5-METIL-1,3,4-TIADIAZOL-2-IL)BENCENOSULFONAMIDA

4-AMINO-*N*-(4,6-DIMETIL-2-PIRIMIDINIL)BENCENOSULFONAMIDA

## 3.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS

### 3.2.1.- LIGANDO *N*-(TIAZOL-2-IL)TOLUENOSULFONAMIDA (HTZ-TOL)

#### 3.2.1.1.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

### 3.2.2.- LIGANDO *N*-(TIAZOL-2-IL)NAFTALENOSULFONAMIDA (HTZ-NAF)

#### 3.2.2.1.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

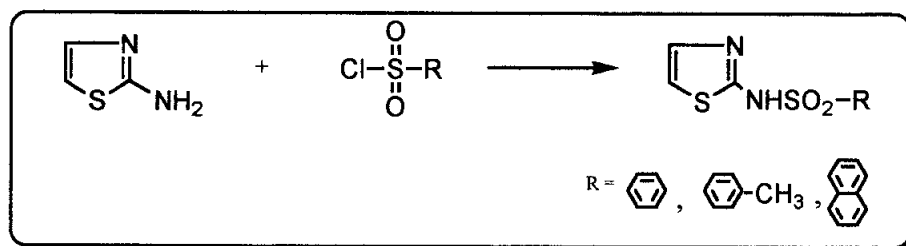
### 3.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS LIGANDOS

Como ya se comentó en el capítulo 1, dos de los ligandos han sido adquiridos comercialmente mientras que los otros tres han sido sintetizados por parte de nuestro grupo de investigación.

#### 3.1.1.- DESCRIPCIÓN Y SÍNTESIS

Los ligandos 4-amino-*N*-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)benzenosulfonamida (sulfametizol; **Hsmtz**) y 4-amino-*N*-(4,6-dimetil-2-pirimidinil)benzenosulfonamida (sulfametazina; **Hsmtzn**) han sido adquiridos comercialmente a la casa Sigma-Aldrich.

La síntesis de los ligandos: *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida (**Htz-tol**), *N*-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida (**Htz-ben**) y *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida (**Htz-naf**) se realizó según el procedimiento descrito por Vogel:<sup>28</sup>



**Figura 3.1.- Síntesis de sulfonamidas según el método descrito por Vogel**

Se someten a reflujo 2 g. de la amina (2-aminotiazol) y 4,55 g. del cloruro de sulfonilo correspondiente (cloruro de *p*-toluenosulfonilo, cloruro de benzenosulfonilo y cloruro de naftalenosulfonilo) en 12 ml de piridina durante un mínimo de 1 hora a 60 °C. Pasado este tiempo se vierte el producto obtenido sobre 20 ml de agua previamente enfriada y se deja agitar unos minutos hasta aparición de precipitado. Se filtra y el producto obtenido se recrystaliza en etanol para su purificación.

### **3.1.2.- CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS**

La caracterización de los ligandos obtenidos en el presente trabajo se ha realizado mediante el estudio de los espectros de infrarrojo. También se describen las características físicas y la solubilidad en diferentes disolventes.

#### **3.1.2.1.- Características Físicas y Solubilidad**

Los ligandos son sólidos de color blanco o de colores pálidos (rosados y ocre), estables a la luz y al aire. La solubilidad ha sido ensayada en los disolventes habituales (H<sub>2</sub>O, etanol, metanol, tetrahidrofurano (THF), acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), propilen carbonato (PC)). Los ensayos se han realizado a T<sup>a</sup> ambiente y a 60° C.

En general se observa que los ligandos estudiados son bastante solubles (ligera o totalmente solubles) en todos los disolventes ensayados a excepción del agua, donde estos ligandos son insolubles (parcial o totalmente).

#### **3.1.2.2.- Análisis elemental y espectros infrarrojos**

Para las nuevas sulfonamidas sintetizadas se propuso una fórmula que fuera consistente con el análisis elemental. Posteriormente se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja. Para los ligandos comerciales se presentan los espectros infrarrojos y la fórmula ya conocida.

La interpretación de los espectros infrarrojos de los ligandos se ha realizado en base a los datos obtenidos de la bibliografía y por comparación con los espectros infrarrojos de sulfonamidas *N*-sustituidas relacionadas.

En general, en el rango de frecuencias comprendidas entre 3200 y 2800 cm<sup>-1</sup> se observa una serie de bandas correspondientes a las vibraciones stretching C-H [ $\nu_{(C-H)}$ ] del anillo bencénico.<sup>36</sup>

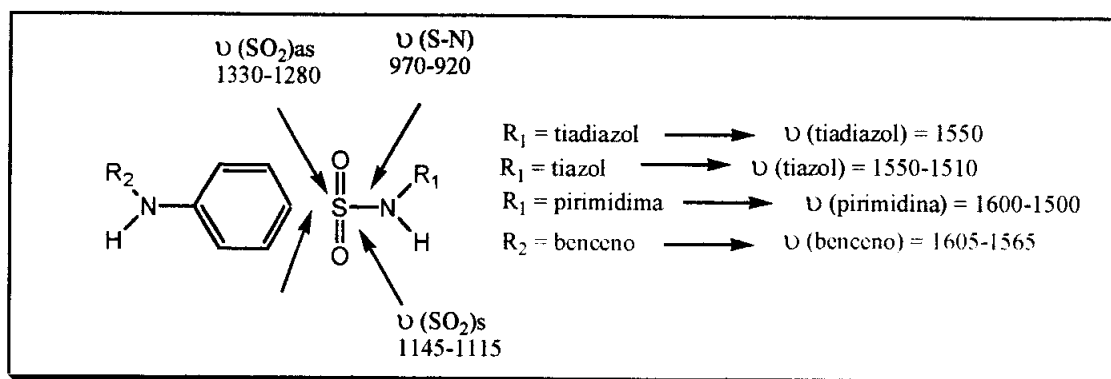
También en este rango de frecuencias, 3400-3100, encontramos las bandas características de los grupos NH<sub>2</sub> y N-H sulfonamido.<sup>37</sup>

Algunos de los ligandos presentan una banda intensa entre  $1510\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$  asignada a las vibraciones tipo stretching del anillo tiazol [ $\nu(\text{tiazol})$ ]<sup>38</sup>, mientras que el ligando 4-amino-*N*-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il)bencenosulfonamida presenta una banda intensa sobre  $1550\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del anillo tiadiazol [ $\nu(\text{tiadiazol})$ ] aunque en este caso, debido a la rigidez del anillo pentacoordinado 1,3,4-tiadiazol, esta vibración no puede ser atribuida a ningún modo de vibración concreto, estando los átomos del anillo implicados en varios modos de vibración.<sup>39</sup> En el espectro del ligando 4-amino-*N*-(4,6-dimetil-2-pirimidinil)bencenosulfonamida (sulfametazina; smtzn) aparece sobre  $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$  [ $\nu(\text{pirimidina})$ ] la banda correspondiente al grupo pirimidina.<sup>40</sup>

La vibración stretching asimétrica del grupo  $\text{SO}_2$  [ $\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$ ] se observa mediante una banda intensa alrededor de  $1330\text{-}1280\text{ cm}^{-1}$  que, en alguno de los ligandos sintetizados (tz-ben y tz-naf), se desdobra en dos bandas bien definidas. La banda correspondiente a la vibración stretching simétrica del grupo  $\text{SO}_2$  [ $\nu(\text{SO}_2)_{\text{s}}$ ] aparece aproximadamente entre  $1145\text{-}1115\text{ cm}^{-1}$  y también en alguno de los ligandos sintetizados (tz-naf) se ha desdoblado en dos bandas distintas.

La banda correspondiente a la vibración S-N [ $\nu(\text{S-N})$ ] la podemos encontrar, generalmente, en el intervalo de frecuencias comprendido entre  $920$  y  $980\text{ cm}^{-1}$ <sup>120,42,43</sup>. En el caso de los ligandos obtenidos, esta vibración también aparece en este rango de frecuencias ( $970\text{-}920\text{ cm}^{-1}$ ).

Entre  $695\text{-}645\text{ cm}^{-1}$  aparecen las bandas correspondientes a la combinación de las vibraciones stretching C-S [ $\nu(\text{C-S})$ ] del anillo tiazol y del grupo sulfonamido.<sup>37</sup>

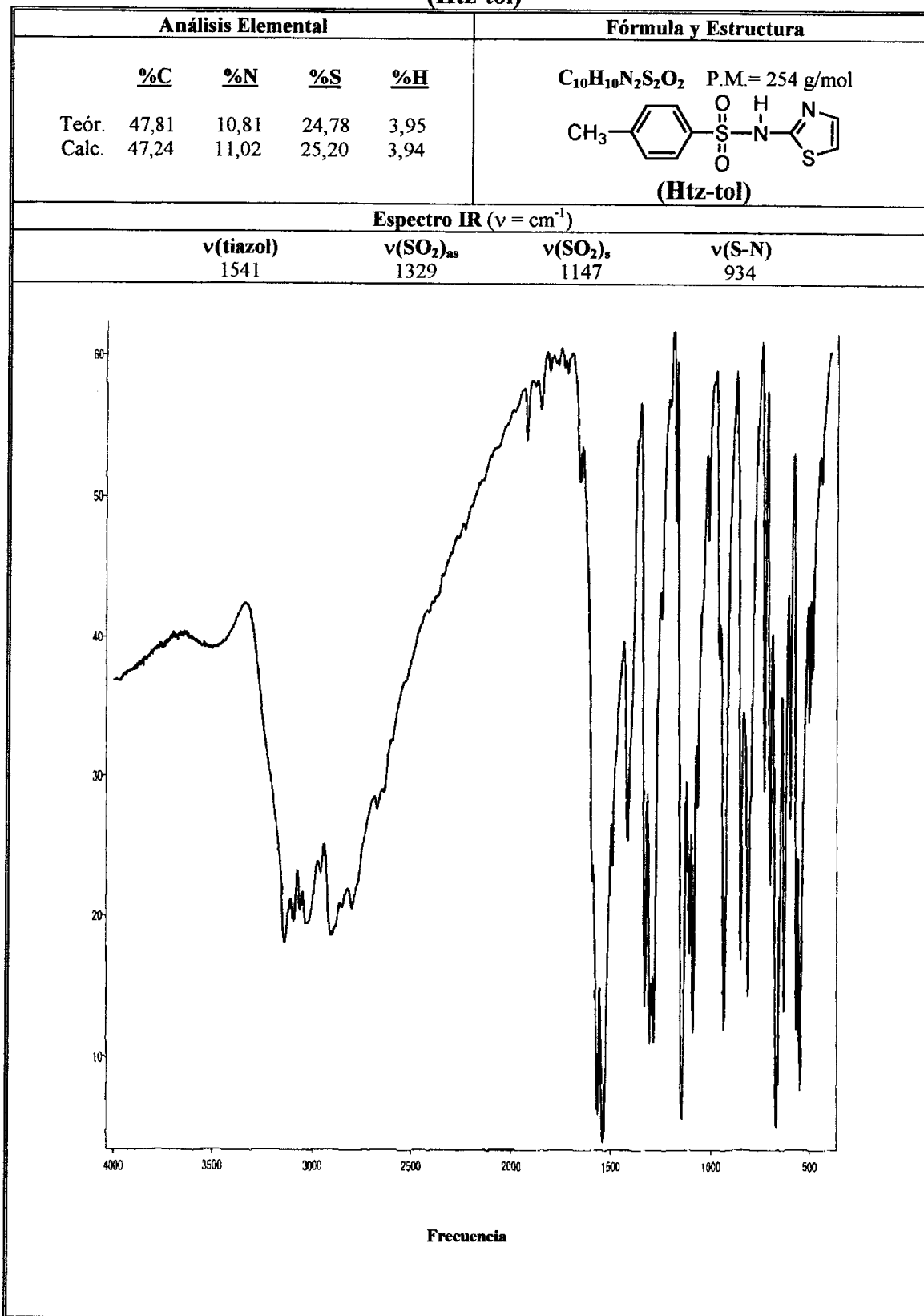


**Figura 3.2.- Bandas características de los espectros IR de sulfonamidas**

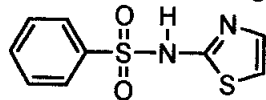
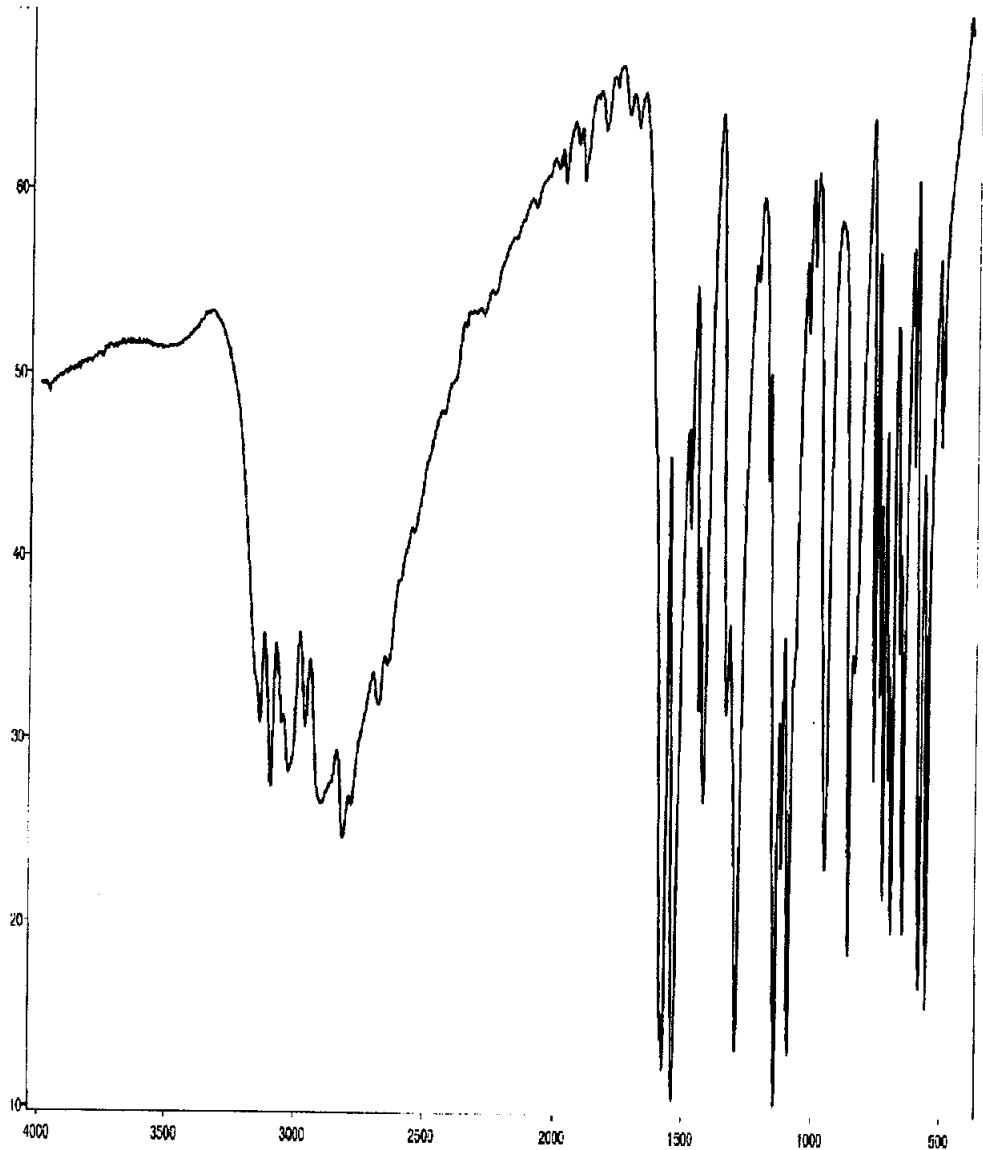


Los resultados se presentan en las tablas siguientes:

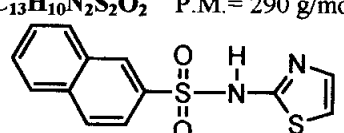
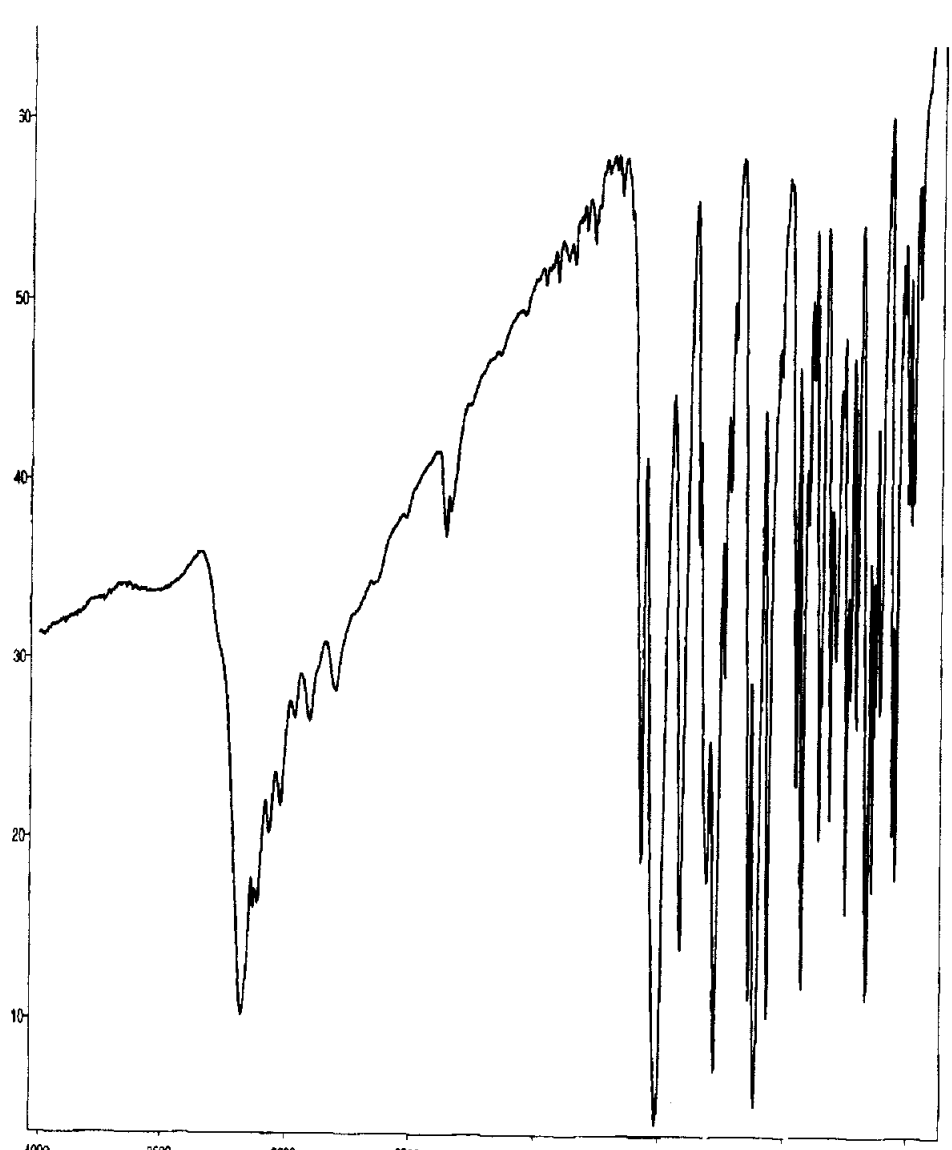
**Tabla 3.1.- Caracterización del ligando: *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida (Htz-tol)**



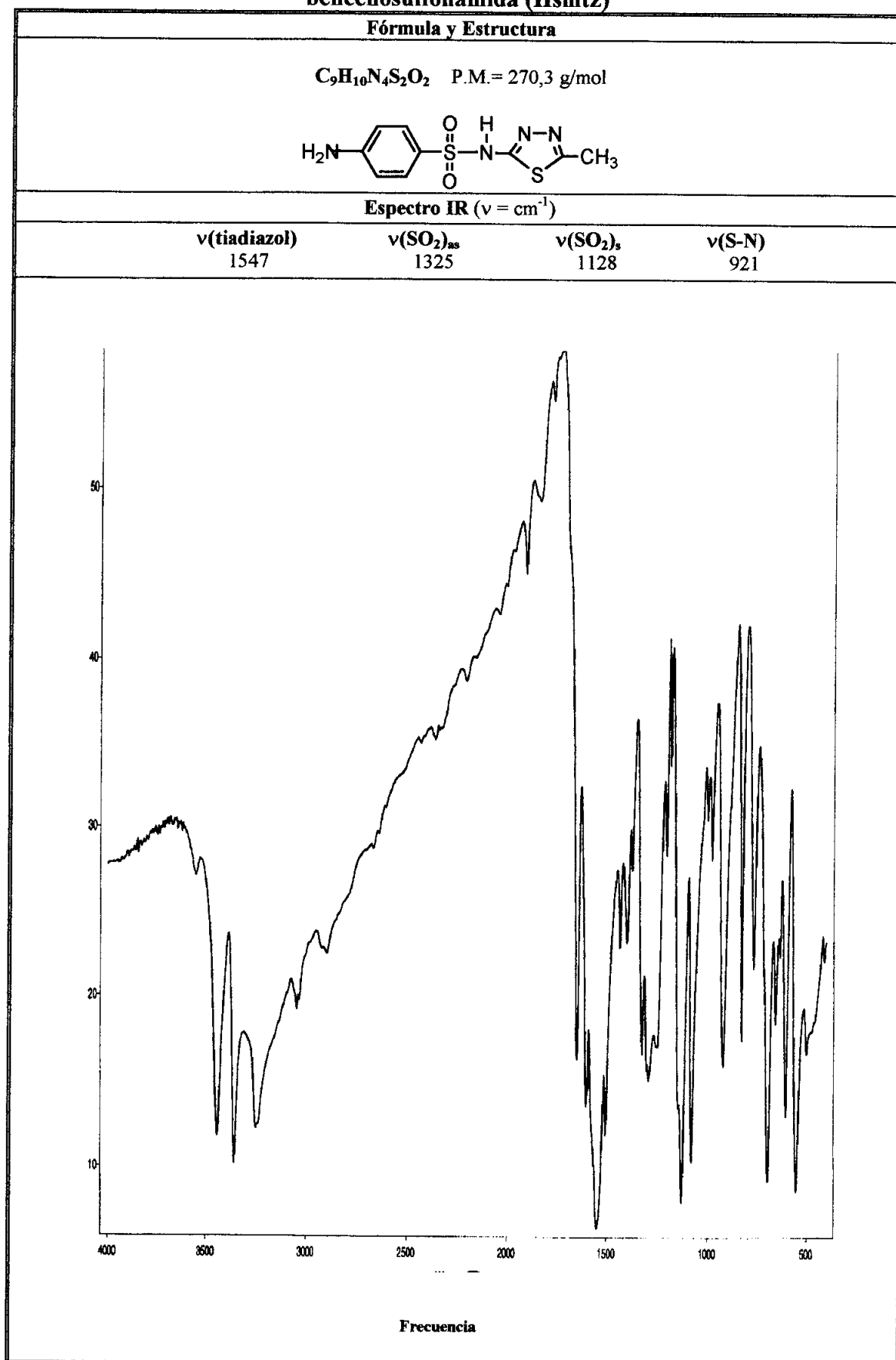
**Tabla 3.2.- Caracterización del ligando: *N*-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida (Htz-ben)**

Análisis Elemental					Fórmula y Estructura	
	<b>%C</b>	<b>%N</b>	<b>%S</b>	<b>%H</b>	$C_9H_8N_2S_2O_2$	P.M. = 240 g/mol
Teór.	44,06	11,39	26,72	3,15		
Calc.	45,00	11,67	26,67	3,33		
<b>(Htz-ben)</b>						
Espectro IR ( $\nu = \text{cm}^{-1}$ )						
	$\nu(\text{tiazol})$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{s}}$	$\nu(\text{S-N})$		
	1536	1334, 1293	1143	949		
						
Frecuencia						

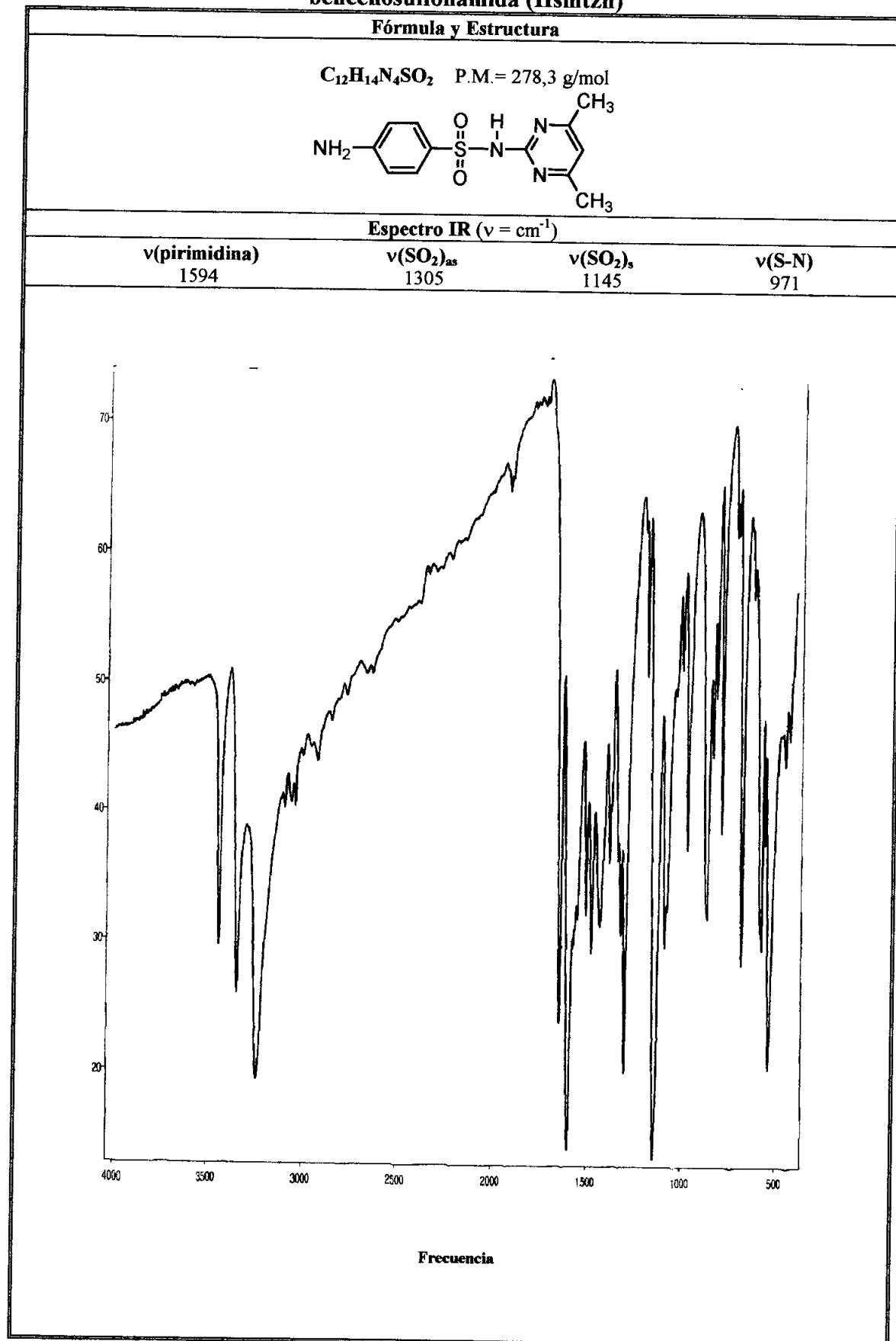
**Tabla 3.3.- Caracterización del ligando: *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida (Htz-naf)**

Análisis Elemental				Fórmula y Estructura	
	<b>%C</b>	<b>%N</b>	<b>%S</b>	<b>%H</b>	
Teór.	53,84	9,41	21,81	3,38	$C_{13}H_{10}N_2S_2O_2$ P.M. = 290 g/mol 
Calc.	53,42	9,60	21,92	3,42	
<b>(Htz-naf)</b>					
Espectro IR ( $\nu = \text{cm}^{-1}$ )					
	<b><math>\nu(\text{tiazol})</math></b>	<b><math>\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}</math></b>	<b><math>\nu(\text{SO}_2)_s</math></b>	<b><math>\nu(\text{S-N})</math></b>	
	1510	1306,1279	1141,1118	928	
					
Frecuencia					

**Tabla 3.4.- Caracterización del ligando: 4-amino-N-(5-metil-1,3,4-tiadiazol-2-il) bencenosulfonamida (Hsmtz)**



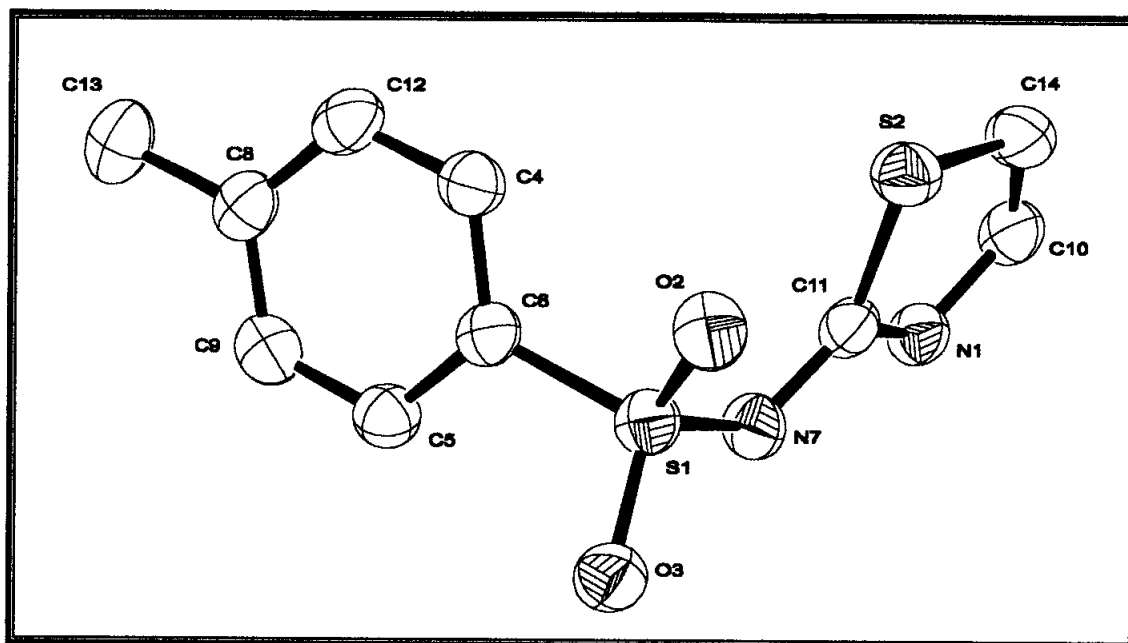
**Tabla 3.5.- Caracterización del ligando: 4-amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidinil) bencenosulfonamida (Hsmtzn)**



## **3.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS**

Los ligandos Htz-tol y Htz-naf fueron cristalizados. La resolución de los monocristales produjo las siguientes estructuras cristalinas.

### **3.2.1.- LIGANDO *N*-(TIAZOL-2-IL)TOLUENOSULFONAMIDA (HTZ-TOL)**



**Figura 3.3.- Estructura cristalina de *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida (Htz-tol)**

#### **3.2.1.1.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura**

El cristal seleccionado para la toma de datos es de dimensiones 0,35 x 0,32 x 0,30 mm. Se montó sobre un difractor Bruker SMART CCD 1000<sup>44</sup>. El grupo espacial es el P2(1)/n. Se midieron 3307 reflexiones de las que 2058 fueron independientes. El rango hkl fue de (-16,-7,-16) a (15,6,16). La estructura fue resuelta por métodos directos<sup>45</sup>, los cuales revelaron la posición de todos los átomos no hidrógeno. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados y factores de desplazamiento anisotrópicos usando el programa SHELXL-97<sup>46</sup>. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante el programa PLATON99<sup>48</sup>. En la tabla 3.6 se resumen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 3.6.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de N-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida (Htz-tol)**

Datos cristalográficos			
<b>Fórmula</b>	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	<b>V</b>	1109,83(5) Å <sup>3</sup>
<b>M (g/mol)</b>	254,31	<b>ρ</b>	1,510 mg/m <sup>3</sup>
<b>Sistema Cristalino</b>	Monoclínico	<b>λ</b>	-
<b>Grupo Espacial</b>	P2(1)/n	<b>Morfología del cristal</b>	-
<b>Z</b>	4	<b>Dimensiones (mm)</b>	0,35 x 0,32 x 0,30
<b>Parámetros de celda</b>	a = 13.21320(7) Å b = 6.5384(3) Å c = 13.68250(5) Å	<b>T</b>	293(2) K
		<b>Monocromador</b>	-
		<b>μ</b>	4,187 mm <sup>-1</sup>
		<b>θ rango</b>	6,77 –69,69

**Tabla 3.7.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados**

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE(°)			
S(1)-O(3)	1,435(2)	O(3)-S(1)-O(2)	118,52(13)	C(4)-C(6)-S(1)	119,8(2)
S(1)-O(2)	1,436(2)	O(3)-S(1)-N(7)	104,85(12)	C(11)-N(7)-S(1)	122,2(2)
S(1)-N(7)	1,610(2)	O(2)-S(1)-N(7)	112,02(12)	C(9)-C(8)-C(12)	118,5(3)
S(1)-C(6)	1,767(3)	O(3)-S(1)-C(6)	107,65(12)	C(9)-C(8)-C(13)	120,2(3)
S(2)-C(14)	1,732(3)	O(2)-S(1)-C(6)	107,75(12)	C(12)-C(8)-C(13)	121,3(3)
S(2)-C(11)	1,746(3)	N(7)-S(1)-C(6)	105,22(12)	C(5)-C(9)-C(8)	121,6(3)
N(1)-C(11)	1,342(4)	C(14)-S(2)-C(11)	90,72(15)	C(14)-C(10)-N(1)	112,9(3)
N(1)-C(10)	1,381(4)	C(11)-N(1)-C(10)	115,5(3)	N(7)-C(11)-N(1)	120,0(3)
C(4)-C(12)	1,386(4)	C(12)-C(4)-C(6)	119,3(3)	N(7)-C(11)-S(2)	130,7(2)
C(4)-C(6)	1,390(4)	C(6)-C(5)-C(9)	118,9(3)	N(1)-C(11)-S(2)	109,3(2)
C(5)-C(6)	1,384(4)	C(5)-C(6)-C(4)	120,9(3)	C(4)-C(12)-C(8)	120,8(3)
C(5)-C(9)	1,385(5)	C(5)-C(6)-S(1)	119,3(2)	C(10)-C(14)-S(2)	111,7(2)
N(7)-C(11)	1,320(4)				
C(8)-C(9)	1,389(4)				
C(8)-C(12)	1,395(4)				
C(8)-C(13)	1,511(4)				
C(10)-C(14)	1,330(5)				

### 3.2.2.- LIGANDO *N*-(TIAZOL-2-IL)NAFTALENOSULFONAMIDA (HTZ-NAF)

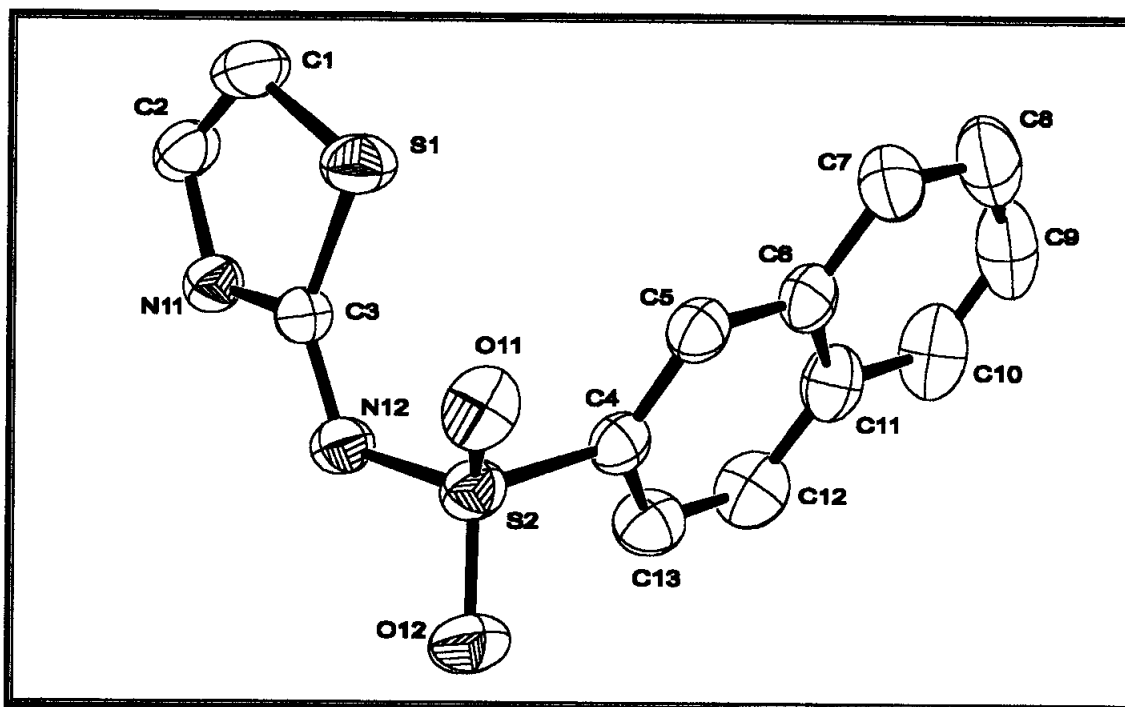


Figura 3.4.- Estructura cristalina de *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida (Htz-naf)

#### 3.2.2.1.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura

El cristal seleccionado para la toma de datos es naranja, prismático y de dimensiones 0,32 x 0,20 x 0,20 mm. Se montó sobre un difractómetro Enraf Nonius MACH3<sup>49</sup>. Los parámetros de la celda unidad se determinaron a partir de 25 reflexiones centradas en el rango de  $\theta$  de 12,66° a 37,42°. Las intensidades se recogieron en un monocromador de grafito utilizando la radiación CuK( $\alpha$ ),  $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ . El grupo espacial es el P2(1)/n. Se midieron 5452 reflexiones en el rango 3,45° a 72,89°, de las que 2582 fueron independientes. El rango hkl fue de (-15,0,0) a (15,11,13), usando la técnica de barrido de  $\omega$ -2 $\theta$  siendo corregidos los efectos de Lorentz y de polarización<sup>50</sup>. Se realizó una corrección de absorción (Psi-scan) semi-empírica<sup>51</sup>. La estructura fue resuelta por métodos directos<sup>45</sup>, los cuales revelaron la posición de todos los átomos no hidrógeno. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados y factores de desplazamiento anisotrópicos usando el programa SHELXL-97<sup>46</sup>. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante los programas PLATON<sup>48</sup> y SCHAKAL<sup>52</sup>. En la tabla 3.8 se resumen los detalles cristalográficos del monocristal.



**Tabla 3.8.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de N-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida (Htz-naf)**

Datos cristalográficos			
Fórmula	C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	v	1290,2(2) Å <sup>3</sup>
M (g/mol)	290,35	ρ	1.495 mg/m <sup>3</sup>
Sistema Cristalino	Monoclínico	λ	1,54184 Å
Grupo Espacial	P2(1)/n	Morfología del cristal	prismática
Z	4	Dimensiones (mm)	0,32 x 0,20 x 0,20
Parámetros de celda	a = 12,8179(15) Å b = 9,1246(11) Å c = 11,0332(8) Å	T	293(2) K
		Monocromador	-
		μ	3,742 mm <sup>-1</sup>
		θ rango	3,45-72,89

**Tabla 3.9.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados**

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE (°)			
S(1)-C(3)	1,7288(19)	C(3)-S(1)-C(1)	90,81(10)	C(5)-C(4)-S(2)	119,95(15)
S(1)-C(1)	1,733(2)	O(12)-S(2)-O(11)	118,54(10)	C(13)-C(4)-S(2)	119,00(16)
S(2)-O(12)	1,4338(15)	O(12)-S(2)-N(12)	105,64(9)	C(4)-C(5)-C(6)	120,72(19)
S(2)-O(11)	1,4403(15)	O(11)-S(2)-N(12)	112,00(9)	C(7)-C(6)-C(11)	119,5(2)
S(2)-N(12)	1,6071(16)	O(12)-S(2)-C(4)	107,06(9)	C(7)-C(6)-C(5)	122,1(2)
S(2)-C(4)	1,766(2)	O(11)-S(2)-C(4)	107,04(9)	C(11)-C(6)-C(5)	118,4(2)
N(11)-C(3)	1,338(2)	N(12)-S(2)-C(4)	105,79(9)	C(8)-C(7)-C(6)	120,4(3)
N(11)-C(2)	1,378(3)	C(3)-N(11)-C(2)	115,20(17)	C(7)-C(8)-C(9)	120,5(3)
N(12)-C(3)	1,330(2)	C(3)-N(12)-S(2)	120,75(14)	C(10)-C(9)-C(8)	121,0(3)
C(1)-C(2)	1,325(3)	C(2)-C(1)-S(1)	111,35(17)	C(9)-C(10)-C(11)	120,4(3)
C(4)-C(5)	1,363(3)	C(1)-C(2)-N(11)	112,96(19)	C(12)-C(11)-C(6)	119,2(2)
C(4)-C(13)	1,416(3)	N(12)-C(3)-N(11)	120,14(17)	C(12)-C(11)-C(10)	122,6(2)
C(5)-C(6)	1,418(3)	N(12)-C(3)-S(1)	130,17(15)	C(6)-C(11)-C(10)	118,3(2)
C(6)-C(7)	1,410(3)	N(11)-C(3)-S(1)	109,68(13)	C(13)-C(12)-C(11)	121,8(2)
C(6)-C(11)	1,413(3)	C(5)-C(4)-C(13)	121,05(19)	C(12)-C(13)-C(4)	118,8(2)
C(7)-C(8)	1,363(4)				
C(8)-C(9)	1,390(5)				
C(9)-C(10)	1,357(5)				
C(10)-C(11)	1,426(3)				
C(11)-C(12)	1,409(4)				
C(12)-C(13)	1,361(4)				

# Capítulo 4: Complejos de Mn

---

## 4.1.- SÍNTESIS Y ANÁLISIS ELEMENTAL

## 4.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS

### 4.2.1.- COMPLEJO $[Mn(4\text{-METILIMH})_2(OH_2)_4](SMTZ)_2$

#### 4.2.1.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

#### 4.2.1.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

#### 4.2.1.3.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA

### 4.2.2.- COMPLEJO $\{[Mn(SMTZN)_2(OH_2)] \cdot (IMH)\}_n$

#### 4.2.2.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

#### 4.2.2.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

#### 4.2.2.3.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA

## 4.3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD

## 4.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

### 4.4.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# Capítulo 4: Complejos de Mn

---

## 4.5.- REFLECTANCIA DIFUSA

4.5.1.- ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA Mn(II) Y Mn(III)

4.5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.6.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

4.6.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA PARA Mn(II) Y Mn(III)

4.6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4.7.- MOMENTOS MAGNÉTICOS

4.7.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

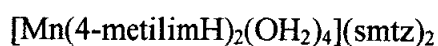
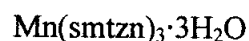
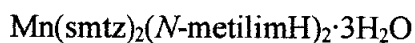
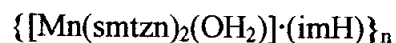
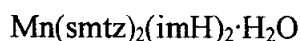
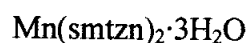
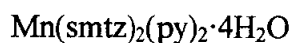
## 4.8.- APÉNDICE

4.8.1.- ESPECTROS IR

4.8.2.- ESPECTROS RPE

#### 4.1.- SÍNTESIS Y ANÁLISIS ELEMENTAL

Los complejos obtenidos son:



A continuación se describen los procedimientos seguidos para sintetizar los complejos así como las técnicas utilizadas para su caracterización.

El complejo **Mn(smtz)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O** se obtuvo disolviendo en una disolución de piridina y H<sub>2</sub>O (50 ml, 25:25) 5 mmoles de Hsmtz (1,36 g.). A ésta se le añadió otra de py/H<sub>2</sub>O (50 ml, 12,5:37,5) donde se habían disuelto 10 mmoles de Mn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (2,51 g.). Se dejó la disolución final en reposo y en unos pocos días apareció un precipitado de color blanquecino que se filtró, se lavó y se secó a vacío hasta peso constante.

Los complejos **Mn(smtz)<sub>2</sub>(imH)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O** y **Mn(smtz)<sub>2</sub>(N-metilimH)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O** fueron sintetizados disolviendo 4 mmoles del imidazol correspondiente en 20 ml de metanol. Se añadió 1 mmol de Mn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,245 g.). Una vez disuelto, esta disolución se mezcló con otra donde habíamos disuelto 1 mmol de Hsmtz (0,27 g.) en 50 ml de metanol. Se mantuvo la agitación y después se dejó en reposo apareciendo en unos días un precipitado de color blanco en el caso del complejo Mn(smtz)<sub>2</sub>(imH)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O y de color marrón claro para el complejo Mn(smtz)<sub>2</sub>(N-metilimH)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O. Estos precipitados se filtraron, se lavaron y se secaron a vacío hasta obtener un peso constante.

Para la síntesis del complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se disolvió 1 mmol de  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,162 g.) en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se tomó 1 mmol de  $\text{Nasmtzn}$  (0,30 g.) y también se disolvió en 10 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . Apareció a los pocos días un precipitado de color blanco que se filtró, se lavó y se secó a vacío hasta peso constante.

El único complejo de Mn(III) obtenido y caracterizado fue el compuesto  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Se sintetizó en atmósfera de argón, disolviendo 1 mmol de  $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,268 g.) en 20 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  formándose una suspensión. Por otra parte se disolvió 1 mmol de  $\text{Hsmtzn}$  (0,278 g.) en 10 ml de DMF. Esta disolución se añadió a la suspensión anterior y se dejó en agitación constante, siempre en atmósfera de argón para evitar posibles oxidaciones del  $\text{Mn}^{+3}$ . Se obtuvo un precipitado de color marrón muy oscuro que se filtró, se lavó y se secó a vacío hasta peso constante.

En la tabla 4.1 se presentan los datos de análisis elemental de todos los complejos anteriores.

**Tabla 4.1.- Análisis elemental de los complejos de Mn**

ANÁLISIS ELEMENTAL					
% EXP.(TEOR.)					
Complejo	%C	%N	%S	%H	Color
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	40,50 (40,79)	16,85 (16,99)	15,53 (15,54)	4,38 (4,37)	Blanco
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	39,12 (38,52)	22,34 (22,47)	17,88 (17,12)	3,55 (3,74)	Blanco
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	37,55 (38,28)	20,29 (20,60)	15,72 (15,88)	4,71 (4,94)	Marrón claro
$\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	43,52 (43,43)	16,86 (16,89)	10,16 (9,66)	4,85 (4,86)	Blanco
$\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	46,10 (45,95)	18,10 (17,87)	10,13 (10,20)	4,78 (4,44)	Marrón oscuro

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina

## **4.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS**

### **4.2.1.- COMPLEJO [Mn(4-METILIMH)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>](SMTZ)<sub>2</sub>**

#### **4.2.1.1.- Síntesis de los monocristales**

El complejo [Mn(4-metilimH)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>](smtz)<sub>2</sub> fue sintetizado disolviendo 4 mmoles del imidazol correspondiente en 20 ml de metanol. Se añadió 1 mmol de Mn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,245 g.). Una vez disuelto, esta disolución se mezcló con otra que contenía 1 mmol de Hsmtz (0,27 g.) en 50 ml de metanol. Se mantuvo la agitación constante y la disolución se llevó hasta sequedad formándose una capa aceitosa que se redisolvió en metanol (aproximadamente 20 ml). Se filtró el sólido y el filtrado se dejó durante 2-3 días hasta que aparecieron unos cristales prismáticos de color marrón de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Estos cristales se filtraron se lavaron en la mínima cantidad posible de disolvente y se secaron a vacío.

#### **4.2.1.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura**

El cristal seleccionado para la toma de datos es marrón, prismático y de dimensiones 0,20 x 0,15 x 0,05 mm. Se monta sobre un difractómetro Enraf Nonius CAD4<sup>49</sup>. Los parámetros de la celda unidad se determinaron a partir de 25 reflexiones centradas en el rango de  $\theta$  de 13,48° a 28,07°. Las intensidades se recogieron en un monocromador de grafito utilizando la radiación CuK( $\alpha$ ),  $\lambda = 1,54184$  Å. Se realizó una corrección de absorción (Psi-scan) semi-empírica<sup>51</sup>. El grupo espacial es el P2(1)/n. Se midieron 3943 reflexiones en el rango 5,35° a 64,93°, de las que 3081 fueron independientes. El rango hkl fue de (-1,-1,-10) a (10,30,10), usando la técnica de barrido de  $\omega$ -2 $\theta$  siendo corregidos los efectos de Lorentz y de polarización mediante el programa GENHKL<sup>50</sup>. La estructura fue resuelta por métodos directos<sup>45</sup>, los cuales revelaron la posición de todos los átomos no hidrógeno. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados y factores de desplazamiento anisotrópicos<sup>46</sup>. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante los programas PLATON<sup>48</sup> y SCHAKAL97<sup>52</sup>. En la tabla 4.2. se recogen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 4.2.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Mn(4-metilimH)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>](smtz)<sub>2</sub>**

Datos cristalográficos			
Fórmula	MnS <sub>4</sub> O <sub>8</sub> N <sub>12</sub> C <sub>26</sub> H <sub>38</sub>	V	1877,7(3) Å <sup>3</sup>
M (g/mol)	829,86	ρ	1,468 mg/m <sup>3</sup>
Sistema Cristalino	Monoclínico	λ	1,54184 Å
Grupo Espacial	P2(1)/n	Morfología del cristal	prismática
Z	2	Dimensiones (mm)	0,20 x 0,15 x 0,05
Parámetros de celda	a = 8,6137(6) Å b = 26,135(3) Å c = 8,7141(7) Å	T	213(2) K
		Monocromador	grafito
		μ	5,470 mm <sup>-1</sup>
		θ rango	5,37-64,93

#### 4.2.1.3.- Descripción de la estructura

En la figura 4.1 se muestra un ORTEP de la molécula con la numeración detallada de los átomos. La tabla 4.4 presenta las longitudes y ángulos de enlace seleccionados.

#### Poliedro de coordinación

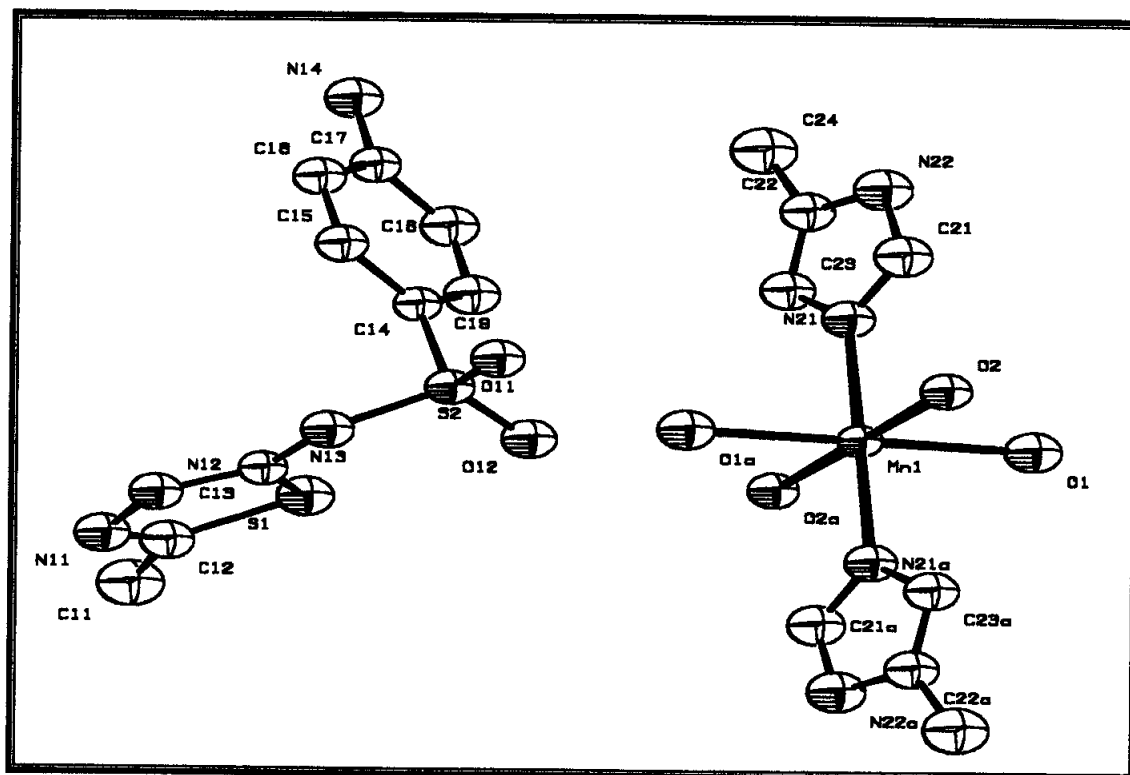
El ión de Mn(II) está hexacoordinado. En las posiciones axiales se encuentran, dos átomos de nitrógeno pertenecientes a dos imidazoles y las posiciones ecuatoriales están ocupadas por cuatro átomos de oxígeno que pertenecen a 4 moléculas de agua. La distancia Mn-N<sub>imidazol</sub> es de 2,224 Å. La distancia de enlace Mn-O<sub>w</sub>1(O<sub>w</sub>1a) es 2,140 Å mientras que la Mn-O<sub>w</sub>2(O<sub>w</sub>2a) es 2,220 Å. El entorno geométrico es un octaedro prácticamente regular, puesto que los ángulos del poliedro de coordinación (87,4°-92,6°) están próximos a los ángulos de un octaedro regular.

En la estructura descrita el ligando (Hsmtz) se encuentra actuando como contraión. Este comportamiento no había sido observado en la bibliografía de estructuras cristalinas de sulfonamidas *N*-derivadas. Con este mismo ligando, han sido obtenidas, por nuestro grupo de investigación, estructuras cristalinas ([Co(smtz)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>]<sup>39</sup> donde el sulfametizolato sí se encuentra coordinado. Comparando algunas de las distancias que se dan en ambos complejos (tabla 4.3) se observa que las diferencias entre ellas no son mayores de 0,1 Å por lo que podemos afirmar que el diferente comportamiento de la sulfonamida no influye en las distancias

entre sus átomos. Este hecho puede ser atribuido a la deslocalización electrónica del anillo tiadiazol.

**Tabla 4.3.- Distancias principales (Å) entre átomos del Hsmtz**

Distancias	[Co(smtz) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ]	[Mn(4-metilimH) <sub>2</sub> (OH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ](smtz) <sub>2</sub>
S <sub>2</sub> -N <sub>11</sub>	1,442(2)	1,462(2)
S <sub>2</sub> -N <sub>12</sub>	1,444(19)	1,453(3)
S <sub>2</sub> -N <sub>13</sub>	1,589(19)	1,571(4)
N <sub>12</sub> -C <sub>13</sub>	1,325(3)	1,308(6)
N <sub>12</sub> -N <sub>11</sub>	1,387(3)	1,390(5)
N <sub>13</sub> -C <sub>13</sub>	1,349(3)	1,359(6)



**Figura 4.1.- Estructura cristalina del complejo [Mn(4-metilimH)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>](smtz)<sub>2</sub>**

**Tabla 4.4.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados**

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE(°)	
Mn(1)-O(1)	2,140(3)	O(1)-Mn(1)-O(1)#1	180,00
Mn(1)-O(1)#1	2,140(3)	O(1)-Mn(1)-O(2)#1	91,61(13)
Mn(1)-O(2)#1	2,220(3)	O(1)#1-Mn(1)-O(2)#1	88,39(13)
Mn(1)-O(2)	2,220(3)	O(1)-Mn(1)-O(2)	88,39(13)
Mn(1)-N(21)#1	2,224(4)	O(1)#1-Mn(1)-O(2)	91,61(13)
Mn(1)-N(21)	2,224(4)	O(2)#1-Mn(1)-O(2)	180,00
		O(1)-Mn(1)-N(21)#1	92,60(15)
		O(1)#1-Mn(1)-N(21)#1	87,40(15)
		O(2)#1-Mn(1)-N(21)#1	90,91(14)
		O(2)-Mn(1)-N(21)#1	89,09(14)
		O(1)-Mn(1)-N(21)	87,40(15)
		O(1)#1-Mn(1)-N(21)	92,60(15)
		O(2)#1-Mn(1)-N(21)	89,09(14)
		O(2)-Mn(1)-N(21)	90,91(14)
		N(21)#1-Mn(1)-N(21)	180,00



## 4.2.2.- COMPLEJO $\{[\text{Mn}(\text{SMTZN})_2(\text{OH}_2)]\cdot(\text{IMH})\}_n$

### 4.2.2.1.- Síntesis de los monocristales

El complejo  $([\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)]\cdot(\text{imH}))_n$  se sintetizó disolviendo 4 mmoles de imidazol (imH) (0,272 g.) en 25 ml de metanol. Se añadió 1 mmol de  $\text{Mn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0,245 g.) y una vez disuelto se mezcló esta disolución con otra que contenía 2 mmoles de Hsmtzn en 50 ml de metanol. Se dejó la disolución final en reposo y cuando se enfrió a T<sup>a</sup> ambiente se observó la precipitación del ligando que se eliminó por filtración. Del filtrado se obtuvieron cristales de tamaño medio de color rosa muy pálido, de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Éstos se filtraron, se lavaron con la mínima cantidad de disolvente y se secaron a vacío hasta peso constante.

### 4.2.2.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura

El cristal seleccionado para la toma de datos es rosa pálido, prismático y de dimensiones 0,15 x 0,10 x 0,10 mm. Se monta sobre un difractómetro Enraf Nonius CAD4<sup>49</sup>. Los parámetros de la celda unidad se determinaron a partir de 25 reflexiones centradas en el rango de  $\theta$  de 16,30° a 23,60°. Las intensidades se recogieron en un monocromador de grafito utilizando la radiación  $\text{CuK}(\alpha)$ ,  $\lambda = 1,54184 \text{ \AA}$ . Se realizó una corrección de absorción (Psi-scan) semi-empírica<sup>51</sup>. El grupo espacial es el P2(1)/n. Se midieron 5926 reflexiones en el rango 5,13° a 65,00°, de las que 4713 fueron independientes. El rango hkl fue de (-18,-17,-15) a (18,1,1), usando la técnica de barrido de  $\omega$ -2 $\theta$  siendo corregidos los efectos de Lorentz y de polarización mediante el programa GENHKL<sup>50</sup>. La estructura fue resuelta por métodos directos, los cuales revelaron la posición de todos los átomos no hidrógeno. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados<sup>45</sup> y factores de desplazamiento anisotrópicos<sup>46</sup>. Todos los átomos de hidrógeno fueron situados mediante mapas de diferencia de Fourier excepto aquellos de los grupos metilo. Una molécula desordenada de imH fue situada y dado que presentaba unas distancias C-C y C-N inciertas se refinó el anillo como un grupo de métrica variable mediante el programa SHELXL-97<sup>46</sup>. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante los programas PLATON<sup>48</sup> y ZORTEP<sup>53</sup>. En la tabla 4.5 se resumen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 4.5.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de  $\{[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)]\cdot(\text{imH})\}_n$**

Datos cristalográficos			
Fórmula	$\text{MnS}_2\text{O}_5\text{N}_{10}\text{C}_{27}\text{H}_{32}$	V	$3019,3(2) \text{ \AA}^3$
M (g/mol)	695,69	$\rho$	$1,530 \text{ mg/m}^3$
Sistema Cristalino	Monoclínico	$\lambda$	$1,54184 \text{ \AA}$
Grupo Espacial	P2(1)/n	Morfología del cristal	prismática
Z	4	Dimensiones (mm)	$0,15 \times 0,10 \times 0,10$
Parámetros de celda	$a = 15,5201(7) \text{ \AA}$ $b = 14,8101(7) \text{ \AA}$ $c = 13,2194(6) \text{ \AA}$	T	$213(2) \text{ K}$
		Monocromador	grafito
		$\mu$	$5,331 \text{ mm}^{-1}$
		$\theta$ rango	$5,13\text{-}65,00$

#### 4.2.2.3.- Descripción de la estructura

En la figura 4.2 se muestra un ORTEP de la molécula con la numeración detallada de los átomos. La tabla 4.6 presenta las longitudes y ángulos de enlace seleccionados.

#### Poliedro de coordinación:

La estructura cristalina consiste en un ordenamiento tridimensional de agua y moléculas de  $[\text{Mn}(\text{smtzn})_2]$ . El ión de Mn se presenta hexacoordinado. Está enlazado a un átomo de O perteneciente a una molécula de agua y a 5 átomos de nitrógeno de tres ligandos sulfonamida, uno de los cuales pertenece a una unidad asimétrica adyacente. El ión metálico adopta una estereoquímica octaédrica distorsionada con el plano ecuatorial definido por dos átomos de  $N_{\text{pirimidina}}$  ( $N_{11}$  y  $N_{21}$ ), un átomo  $N_{\text{amino}}$  ( $N_{24}$ ) y un átomo de O ( $O_1$ ). Las posiciones axiales están ocupadas por dos átomos  $N_{\text{sulfonamidato}}$  ( $N_{23}$  y  $N_{13}$ ). Los ángulos de enlace de este entorno de coordinación están en el rango  $58,7(2)\text{-}170,4(2)^\circ$ . El hecho de que dos de las sulfonamidas actúen como ligandos bidentados, implica que los ángulos de enlace  $N(13)\text{-Mn}(1)\text{-N}(11)$  y  $N(23)\text{-Mn}(1)\text{-N}(21)$  sean de  $59,50(2)^\circ$  y  $58,70(2)^\circ$  respectivamente, alejándose del ángulo recto que sería el esperado para una geometría octaédrica regular. Estos ángulos son similares al encontrado en el complejo  $[\text{Cu}(\text{stz})_2(\text{imH})_2]^{20}$  que es de  $55,8(3)^\circ$ .

Observamos también la presencia , de un anillo imidazol no enlazado .

Debido a la presencia de un ligando sulfonamida que actúa como puente entre dos cationes metálicos adyacentes, la estructura cristalina está estabilizada por una red tridimensional. En la estabilización de esta red también pueden tomar parte algunos enlaces de hidrógeno ( $O\cdots N = 2,732(9)-3,182(8)\text{\AA}$ ).

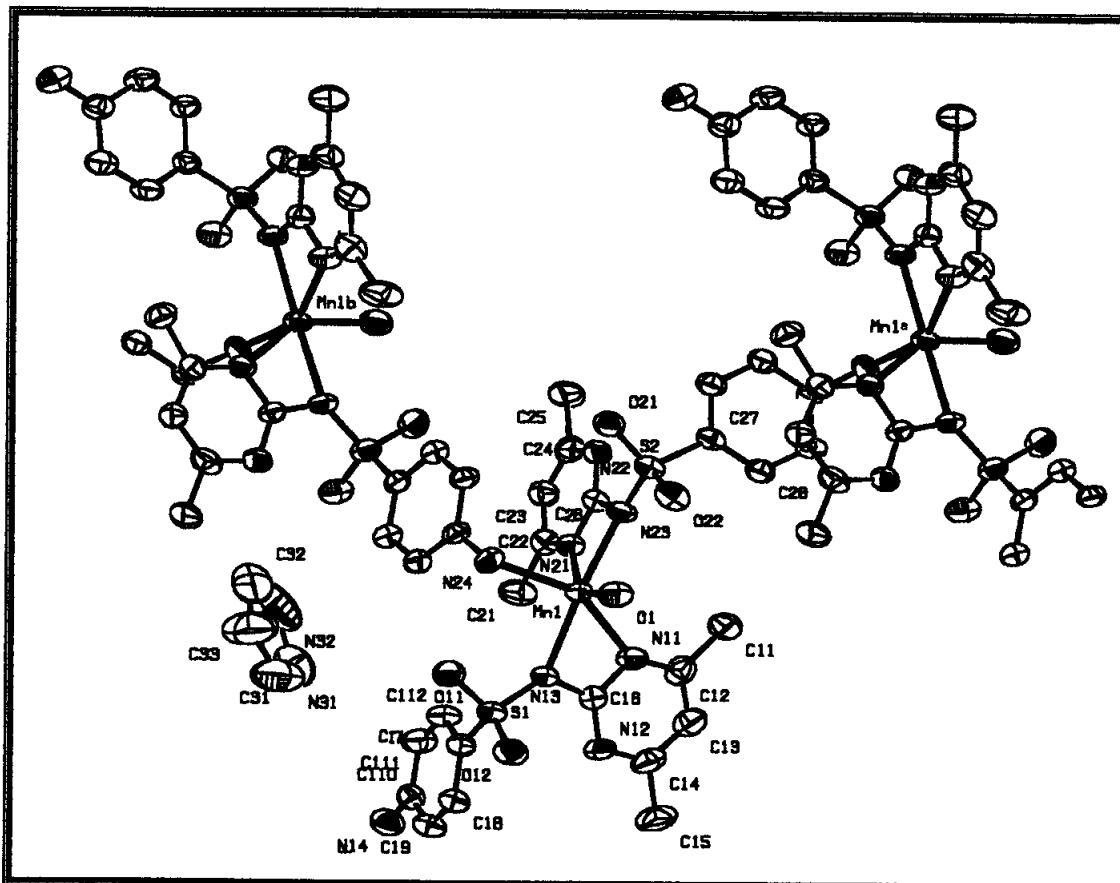


Figura 4.2.- Estructura cristalina del complejo  $\{[Mn(smtzn)_2(OH_2)] \cdot (imH)\}_n$

Tabla 4.6.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE (°)			
Mn(1)-O(1)	2,173(6)	O(1)-Mn(1)-N(23)	88,40(2)	N(13)-Mn(1)-N(21)	115,10(2)
Mn(1)-N(23)	2,235(5)	O(1)-Mn(1)-N(13)	97,40(2)	N(11)-Mn(1)-N(21)	93,20(2)
Mn(1)-N(13)	2,243(5)	N(23)-Mn(1)-N(13)	170,40(2)	O(1)-Mn(1)-N(24)	91,90(2)
Mn(1)-N(11)	2,260(6)	O(1)-Mn(1)-N(11)	99,5(2)	N(23)-Mn(1)-N(24)	96,50(2)
Mn(1)-N(21)	2,300(6)	N(23)-Mn(1)-N(11)	112,10(2)	N(13)-Mn(1)-N(24)	91,00(2)
Mn(1)-N(24)	2,319(6)	N(13)-Mn(1)-N(11)	59,50(2)	N(11)-Mn(1)-N(24)	149,40(2)
		O(1)-Mn(1)-N(21)	147,10(2)	N(21)-Mn(1)-N(24)	92,30(2)
		N(23)-Mn(1)-N(21)	58,70(2)		

### **4.3.-CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD**

Los complejos obtenidos son coloreados (los de Mn(II) son de colores claros, el de Mn(III) es marrón oscuro) y de aspecto cristalino. No son sensibles a la luz ni al aire. La solubilidad de los compuestos ha sido ensayada de forma cualitativa a T<sup>a</sup> ambiente y a 60 °C. Los disolventes utilizados han sido los mismos que los usados en los ensayos de solubilidad de los ligandos en el capítulo 3.

Podemos ver, en general, que los complejos de manganeso estudiados son insolubles en agua y en los alcoholes y ligeramente solubles en acetona, THF, DMSO, DMF y propilen carbonato. También se observa que la solubilidad aumenta cuando aumentamos la temperatura del ensayo a 60°C.

### **4.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

#### **4.4.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La interpretación de los espectros se ha realizado por comparación con los espectros de los ligandos y el estudio de las bandas citadas en la bibliografía.

En la tabla 4.7 se presentan las bandas de frecuencia características de los complejos.

**Tabla 4.7.- Bandas características de los espectros infrarrojos de los complejos**

Complejo	$\nu$ (tiadiazol)	$\nu$ (pirimidina)	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{SO}_2)_s$	$\nu(\text{S-N})$
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1445	-	1276-1241 <sup>d</sup>	1117	956
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1440	-	1288	1141	937
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1454	-	1269	1127	920
$[\text{Mn}(4\text{-metilimH})_2(\text{OH}_2)_4](\text{smtz})_2$	1445	-	1275	1118	958
$\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	1599	1244	1139-1124 <sup>d</sup>	978
$\{[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)] \cdot (\text{imH})\}_n$	-	1599	1250	1138-1123 <sup>d</sup>	976
$\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	-	1594	1303	1146	971

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; <sup>d</sup> = doblete

En general observamos que la banda de absorción del grupo tiadiazol  $\nu(\text{tiadiazol})$  se encuentra significativamente desplazada hacia frecuencias menores (desde  $1547 \text{ cm}^{-1}$  en el ligando hasta aproximadamente  $1450 \text{ cm}^{-1}$ ) en los complejos cuyo ligando es el sulfametizol (Hsmtz). El desplazamiento observado se debe, principalmente, a que en el ligando se produce la desprotonación del grupo sulfonamido lo que provoca una deslocalización de la carga a través del anillo de tiadiazol<sup>39</sup> responsable de las modificaciones observadas en el espectro IR.

La banda correspondiente al grupo pirimidínico  $\nu(\text{pirimidina})$ , que encontramos sobre  $1590 \text{ cm}^{-1}$ , no sufre desplazamientos. La posición de esta banda está en concordancia con los datos encontrados en la bibliografía.<sup>40</sup>

Observamos que la banda correspondiente a la vibración  $\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$  sufre un desplazamiento significativo hacia frecuencias menores en los complejos de sulfametizol (desde  $1325 \text{ cm}^{-1}$  para el ligando hasta  $1288\text{-}1241 \text{ cm}^{-1}$  para los complejos). En el caso de los complejos de sulfametazina en dos de los complejos se observa un desplazamiento hacia frecuencias menores mientras que para el otro complejo el desplazamiento prácticamente no se modifica.

La vibración  $\nu(\text{SO}_2)_{\text{s}}$  no sufre fuertes modificaciones en los complejos estudiados aunque sí se observan ligeros desplazamientos en algunos complejos.<sup>41</sup>

En relación con la banda de vibración  $\nu(\text{S-N})$  del grupo sulfonamido cabe decir que los desplazamientos observados en las dos series de complejos se producen hacia mayores frecuencias de vibración, para los complejos de Hsmtz, o prácticamente no se modifican en los complejos de Hsmtzn. El desplazamiento observado puede atribuirse a la reducción en la distancia del enlace S-N del grupo sulfonamido en los complejos respecto a sus respectivos ligandos provocada por la desprotonación de este grupo.<sup>20, 42, 43</sup>

También encontramos para el complejo  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  las bandas características de la piridina coordinada sobre  $3066, 1445, 1083$  y  $657 \text{ cm}^{-1}$ . Este dato está en total acuerdo con aquellos encontrados en la bibliografía.<sup>41, 54, 55, 56, 57</sup>

Debemos también señalar la existencia en el rango de frecuencias entre 3400-3100  $\text{cm}^{-1}$ , de las bandas características de los grupos  $-\text{NH}_2$  de la sulfonamida y N-H imidazol, (sobre 3200-3100  $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>37,21</sup>

La presencia de nuevas bandas (que no aparecen en los ligandos pero sí en los complejos) a frecuencias superiores a 3400  $\text{cm}^{-1}$  (3550-3450  $\text{cm}^{-1}$ ) la podemos atribuir a la existencia de moléculas de agua presentes en los complejos.

## **4.5.- REFLECTANCIA DIFUSA**

### **4.5.1.- ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA Mn(II) Y Mn(III)**

Los complejos octaédricos de  $\text{Mn}^{2+}$  presentan espectros electrónicos con bandas muy débiles. Estos complejos suelen ser de color rosa muy pálido e incluso podemos encontrar algunos sólidos de color blanco. La debilidad de las bandas se debe a que los complejos presentan configuración  $d^5$ , con un estado fundamental  ${}^6\text{S}$  que es el único estado sextuplete posible; para cualquier alteración concebible, la distribución electrónica  $t^3_{2g}e^2_g$  resulta del apareamiento de dos electrones, produciendo estados doblete y cuadruplete. Por lo tanto, todos los estados excitados del sistema  $d^5$  tienen diferentes multiplicidades de espín respecto del estado fundamental, y las transiciones hasta ellos están prohibidas por las reglas de Laporte.

Los complejos tetraédricos de  $\text{Mn}^{2+}$  presentan bandas más intensas que los octaédricos. Los coeficientes de absorción molar se encuentran en el rango de 1,0-4,0, mientras que para los complejos de Mn(II) octaédricos estos valores se hallan en el intervalo de 0,01-0,04. La razón de incremento no se conoce con total certeza pero se piensa que puede ser debido en parte a la interacción de los orbitales  $p$  y  $d$  del metal en un entorno tetraédrico, lo cual está facilitado por el solapamiento de los orbitales  $d$  del metal con los orbitales del ligando en los complejos tetraédricos.<sup>8</sup>

Un sistema  $d^4$ , como el  $Mn^{3+}$ , puede tener como estado fundamental un término quintuplete ( $^5e_g$ ) o uno triplete ( $^3t_{1g}$ ). Para un sistema  $d^4$  de espín alto, los posibles estados fundamentales son dos quintupletes. El espectro observado en ambos casos será una única banda. Si el sistema  $d^4$  es de espín bajo los estados fundamentales posibles son tripletes, lo cual nos permitirá observar un espectro con varias bandas  $d-d$  permitidas. En este último caso, es posible la aparición de intensas bandas de transferencia de carga las cuales pueden enmascarar el típico espectro  $d-d$ .<sup>58</sup>

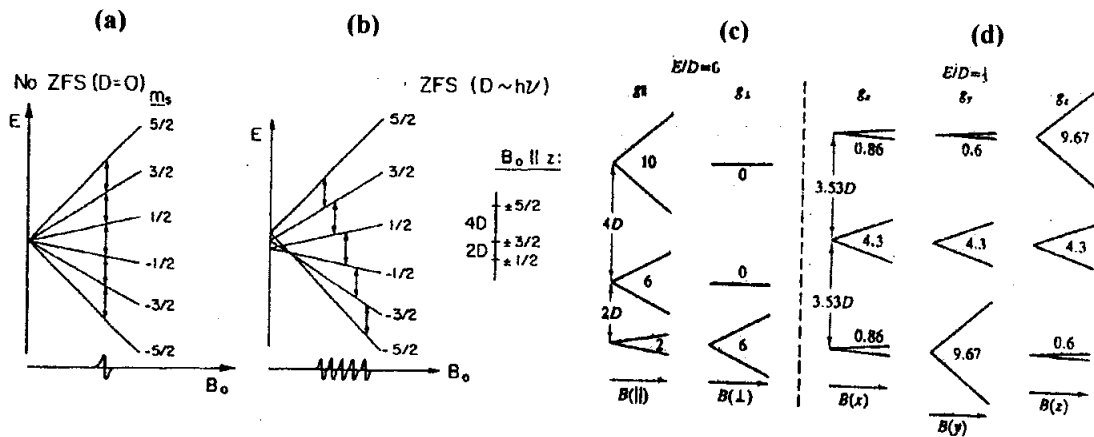
#### **4.5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El espectro de los complejos de Mn(II) no presenta bandas en la zona visible. Para el complejo de Mn(III) se observa una banda de transferencia de carga a una  $\lambda$  de aproximadamente  $25.000\text{ cm}^{-1}$  (400 nm).<sup>58</sup> Es por estas razones que los espectros de RD de los complejos de Mn no han sido incluidos en el trabajo, aunque sí queremos destacar su realización.

### **4.6.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA**

#### **4.6.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA PARA Mn(II) Y Mn(III)**

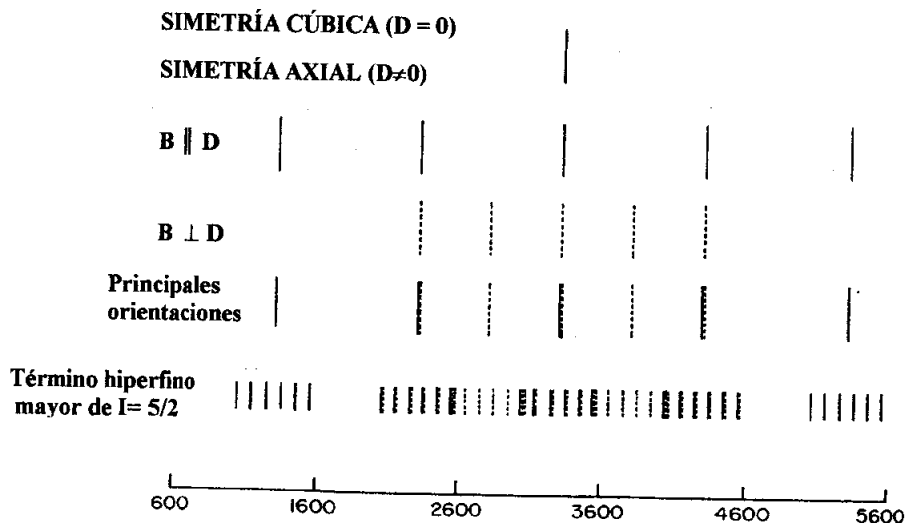
Un ión  $d^5$  presenta un estado fundamental singlete  $S = 5/2$ . Para campos de ligandos moderados, el estado fundamental es todavía esencialmente un orbital singlete lo que conlleva que el valor de  $g$  para estos iones sea muy próximo al valor de  $g$  del espín libre. Sin embargo, la presencia de 5 electrones desapareados requiere un término adicional en el hamiltoniano de espín. Este término deriva del fenómeno de desdoblamiento a campo cero (zfs). Esto es la separación en energía de varios estados  $m_s$  en ausencia de un campo magnético aplicado y es el resultado de las interacciones interelectrónicas y el campo de ligandos de baja simetría. Se compone del parámetro axial  $D$  y la relación  $E/D$  indica la distorsión rómbica en el entorno electrónico.<sup>59,60,61</sup> Pueden observarse varios casos para  $S = 5/2$  según la distorsión del entorno.



**Figura 4.3.- Desdoblamiento de los niveles energéticos de un ión  $S=5/2$  en un campo magnético**

Cuando  $D = 0$  (figura 4.3.a)<sup>62</sup>, no hay desdoblamiento del campo cero y las seis configuraciones de spin divergen linealmente con el campo magnético con una pendiente directamente proporcional a  $m_s$ . La separación entre los niveles de pares adyacentes es siempre la misma y se obtiene una línea RPE simple. Como el sistema  $d^5$  no tiene momento orbital angular, el valor de  $g$  para esta línea es 2.

Cuando  $0 < D < hv$ , los tres pares de niveles se desdoblan en el campo cero, pero la separación es más pequeña que la onda de frecuencias cuántica (figura 4.3.b)<sup>62</sup>. En el espectro aparecen las cinco señales.



**Figura 4.4.- Estructura hiperfina para un sistema  $I= 5/2$**

Cuando  $D \gg hv$  pueden darse dos casos:

- 1) Distorsión Tetragonal
- 2) Distorsión Rómbica



En la distorsión tetragonal,  $E = 0$  se produce el caso de la figura 4.3.c)<sup>63</sup>, donde se obtienen dos valores de  $g$ ,  $g_{\parallel} = 2$  y  $g_{\perp} = 6$ . Para la distorsión rómbica,  $E/D = 1/3$ , la separación de niveles se puede apreciar en la figura 4.3.d)<sup>63</sup>, se obtienen valores de  $g$  próximos a 9, 4,3, 0,86 etc.

Esta complejidad se incrementa todavía más para el Mn(II) puesto que, si tenemos en cuenta que para éste el momento nuclear es  $I = 5/2$ , cada señal puede desdoblarse en  $2I+1 = 6$  señales, tal como se puede apreciar en la figura 4.4.<sup>64</sup>

Hay pocos espectros RPE estudiados para sistemas  $d^4$ , entre los que se encuentra el  $Mn^{3+}$ . El estado fundamental en este sistema, en un campo cristalino  $O_h$  débil, el cual es  ${}^5E$ , no tiene momento orbital angular. El desdoblamiento del campo cero en los niveles  $\pm 2$ ,  $\pm 1$  y 0 conlleva las cuatro transiciones cuando el desplazamiento es pequeño y ninguna cuando el desplazamiento es grande. Las distorsiones Jahn-Teller y los grandes desplazamientos de campo cero que son esperadas, frecuentemente hacen imposible ver un espectro.<sup>65</sup>

#### 4.6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el complejo  $Mn(smtz)_2(py)_2 \cdot 4H_2O$  se observan 5 valores de  $g$ : 5,24, 2,82, 1,96, 1,46, 1,24 y un espectro que no puede ser atribuido a ninguno de los desdoblamientos de niveles energéticos aparecidos en la figura 4.3 si bien se podría clasificar entre axial y rómbico. Para dilucidarlo se debería realizar el espectro a  $T^a$  de 4K con el fin de conseguir una mejor definición.

Para el complejo  $Mn(smtz)_2(imH)_2 \cdot H_2O$  observamos un espectro axial que presenta 4 valores para  $g$ : 6,5, 2,80, 1,98 y 1,38. Este espectro puede atribuirse a un compuesto octaédrico.

El complejo  $Mn(smtz)_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot 3H_2O$  nos presenta un espectro pobremente resuelto, con señales muy débiles por lo que la ganancia necesaria para su observación es muy alta. Una comparación con el espectro del complejo  $Mn(smtz)_2(py)_2 \cdot 4H_2O$  parece indicar un espectro similar.

El complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  presenta un espectro RPE típico isotrópico, que no presenta desdoblamiento a campo cero y cuyo valor de  $g$  (2,01) se aproxima al del electrón libre (2,003).

Para el complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  también se realizó el espectro RPE pero no presentaba bandas.

El complejo  $[\text{Mn}(\text{4-metilimH})_2(\text{OH}_2)_4](\text{smtz})_2$  presenta un espectro RPE axial, también con cuatro valores de  $g$ , como en el caso del complejo  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Los valores observados son: 4,51, 2,31, 1,88 y 1,42. Estos valores son asignables a una geometría octaédrica lo cual viene demostrado por la estructura cristalina del complejo. El complejo  $\{[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)] \cdot (\text{imH})\}_n$  presenta un espectro isotrópico, sin desdoblamiento a campo cero y con un valor de  $g_i$  de 2,05.

## 4.7.- MOMENTOS MAGNÉTICOS

### 4.7.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las medidas magnéticas de los complejos de Mn(II) y Mn(III), se presentan en la siguiente tabla. Estos resultados vienen a apoyar aquellos obtenidos a partir del análisis de los espectros de resonancia paramagnética electrónica.

**Tabla 4.8.- Valores de susceptibilidad molar y momentos magnéticos de los complejos a T° ambiente**

Complejo	Susceptibilidad molar ( $\chi_M$ )	Momento magnético ( $\mu$ )(MB)
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$1,64 \cdot 10^{-5}$	5,71
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	$1,95 \cdot 10^{-5}$	5,82
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$1,89 \cdot 10^{-5}$	6,09
$\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$2,01 \cdot 10^{-5}$	5,67
$\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	$4,41 \cdot 10^{-6}$	3,16

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina

Estos valores se ajustan a aquellos encontrados en la bibliografía para complejos de manganeso. De acuerdo con los valores tabulados en la bibliografía, podemos proponer que todos nuestros complejos de Mn(II) son de spin alto (5,65-6,10 MB) mientras que el complejo de Mn(III) adquiere la configuración de spin bajo (3,18 MB).<sup>34</sup>

## 4.8.- APÉNDICE

### 4.8.1.- ESPECTROS IR

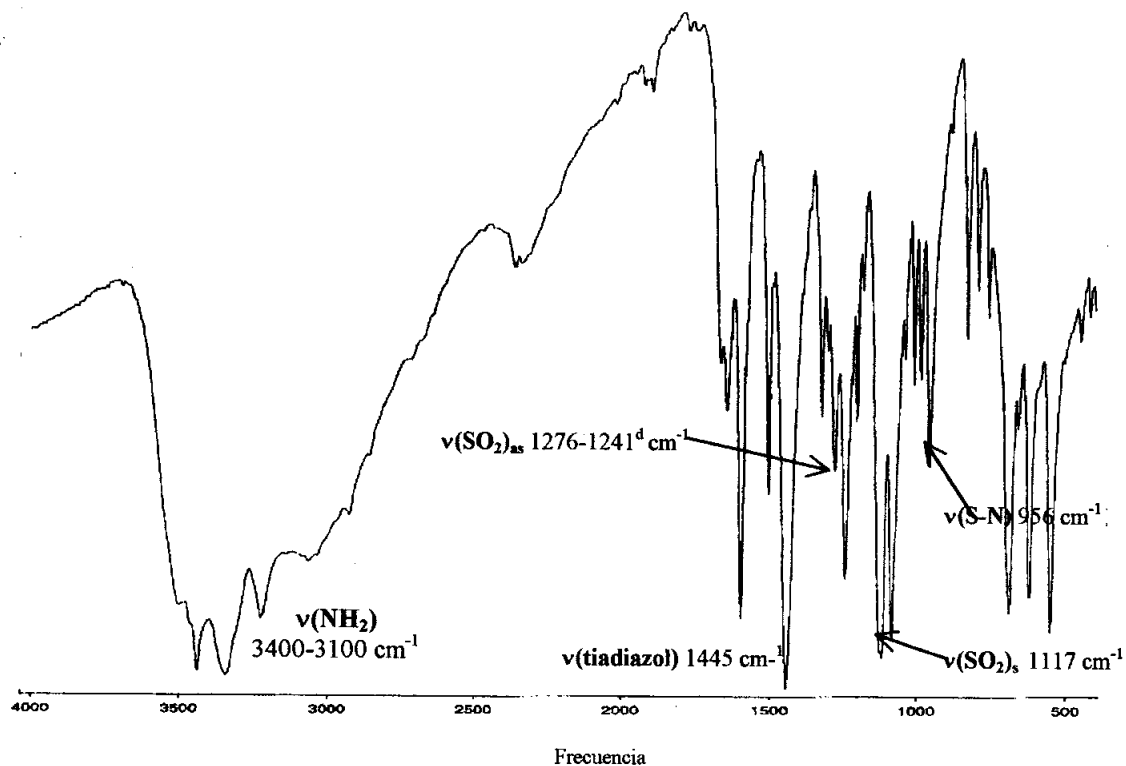


Figura 4.5.- Espectro IR de  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

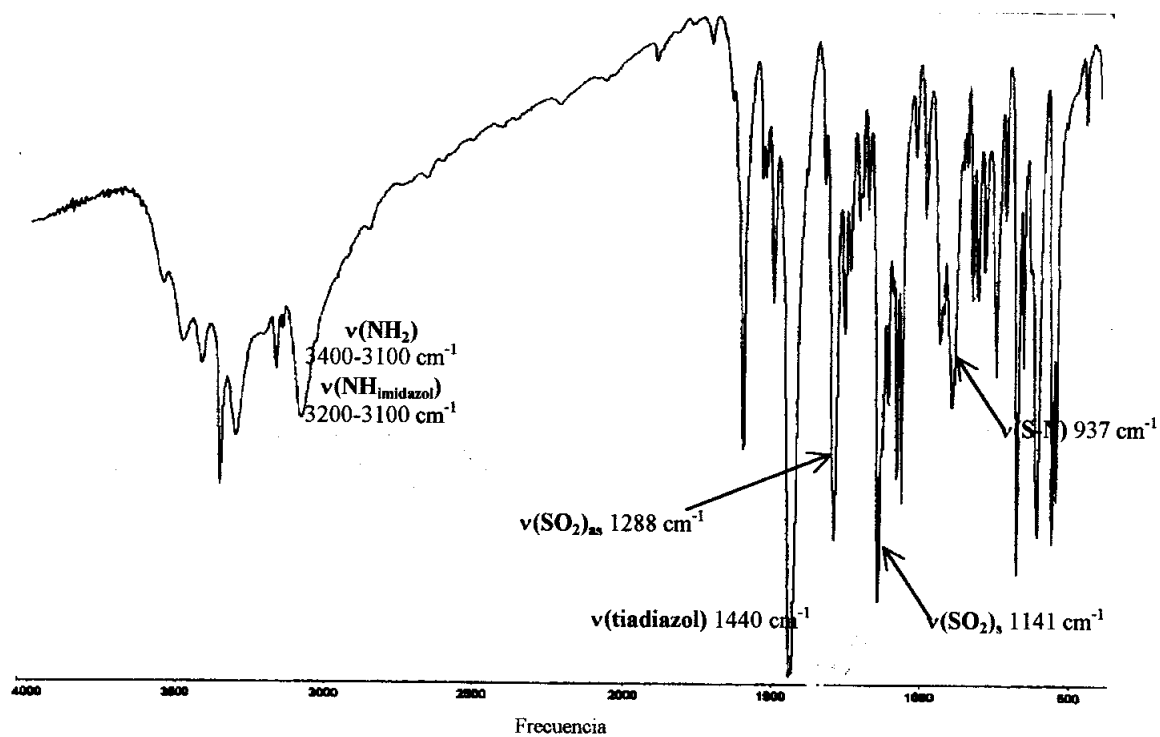


Figura 4.6.- Espectro IR de  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

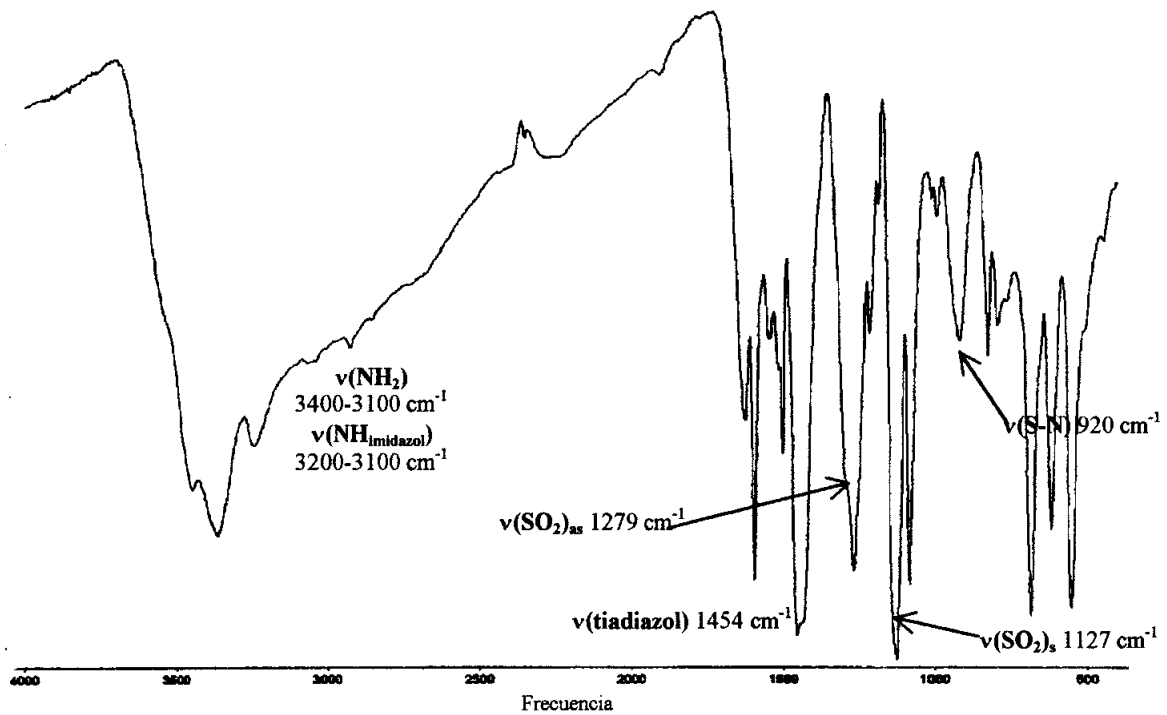


Figura 4.7.- Espectro IR de  $\text{Mn(smtz)}_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

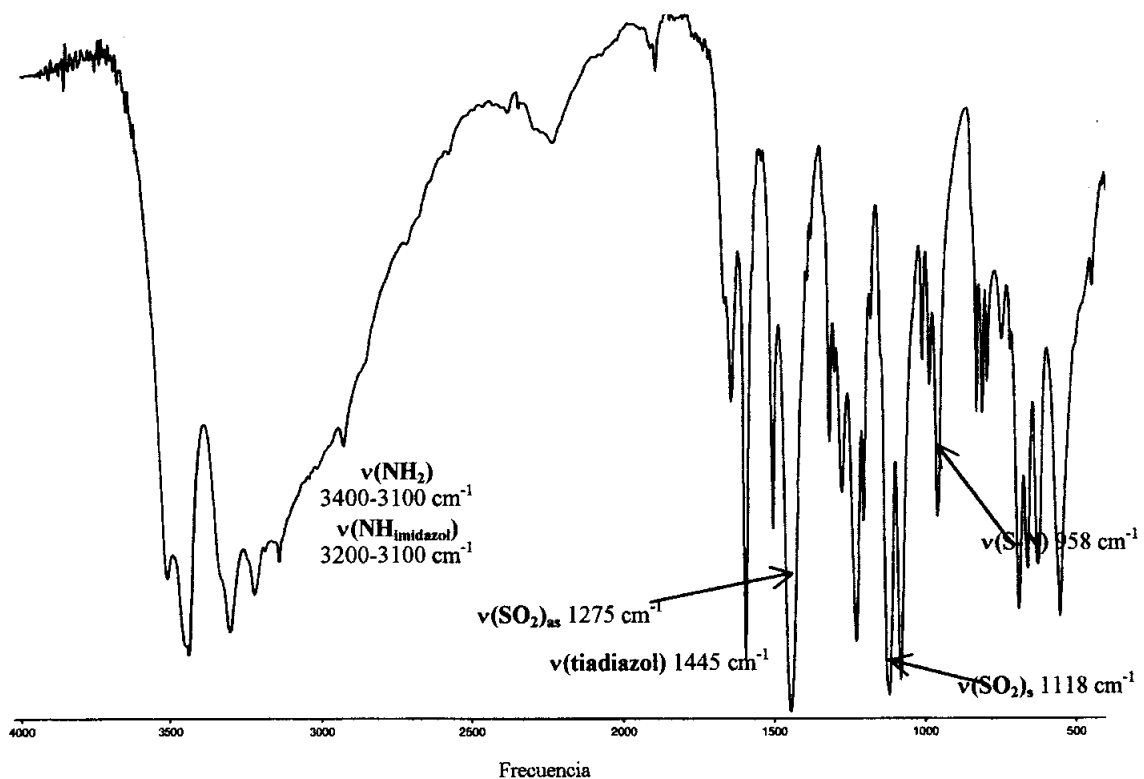


Figura 4.8.- Espectro IR de  $[\text{Mn}(4\text{-metilimH})_2(\text{OH}_2)_4](\text{smtz})_2$

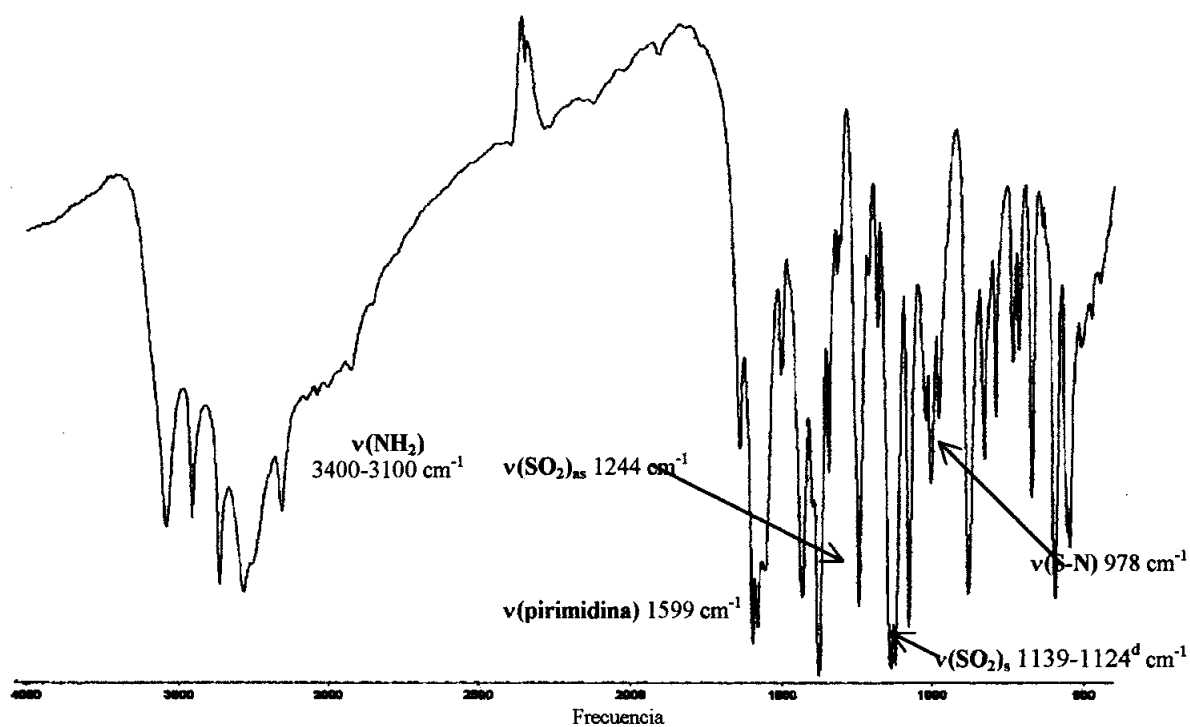


Figura 4.9.- Espectro IR de  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

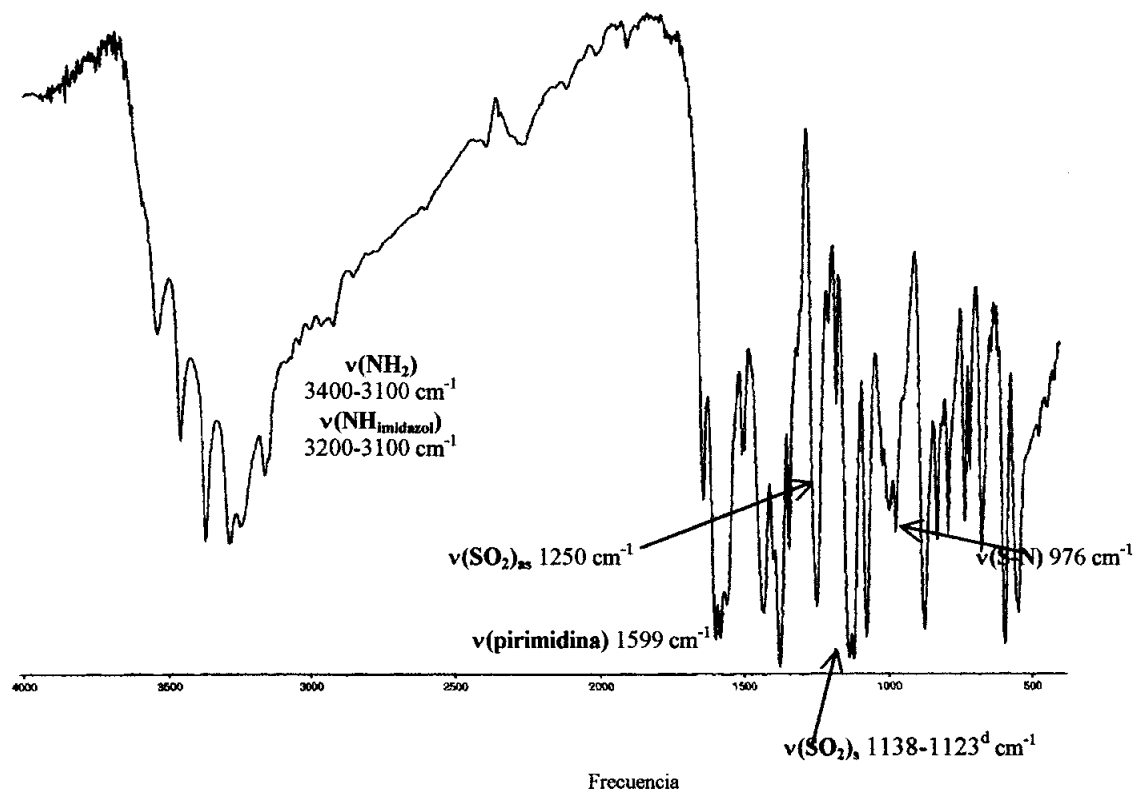


Figura 4.10.- Espectro IR de  $\{[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)] \cdot (\text{imH})\}_n$

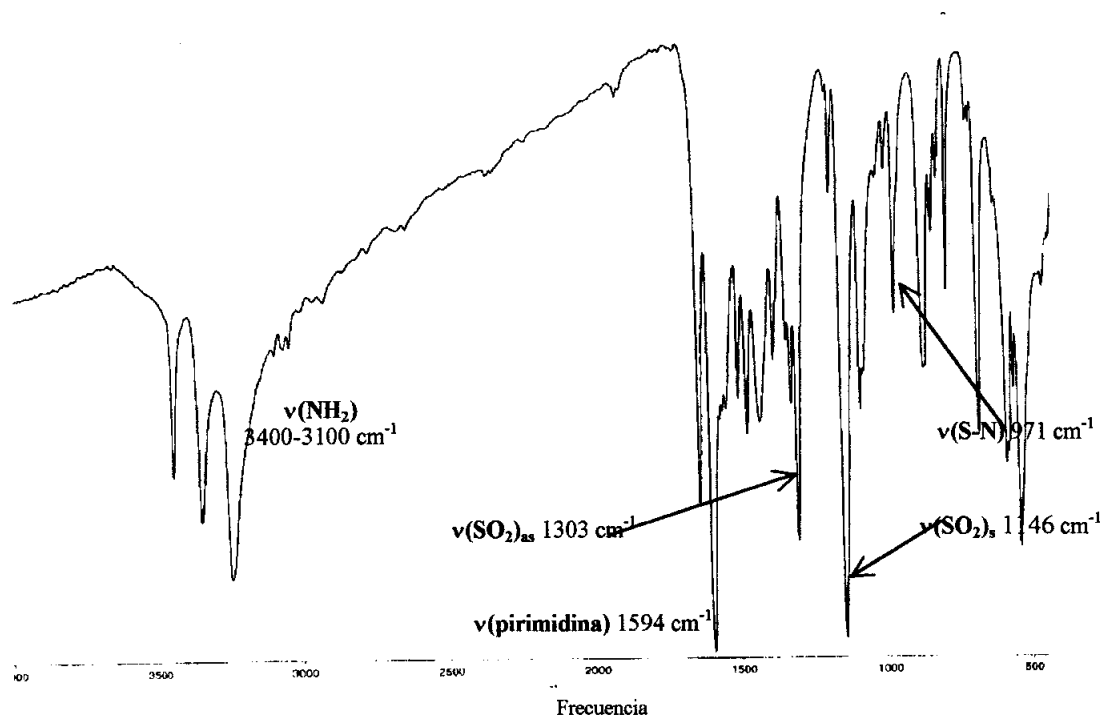


Figura 4.11.- Espectro IR de  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

#### 4.8.2.- ESPECTROS RPE

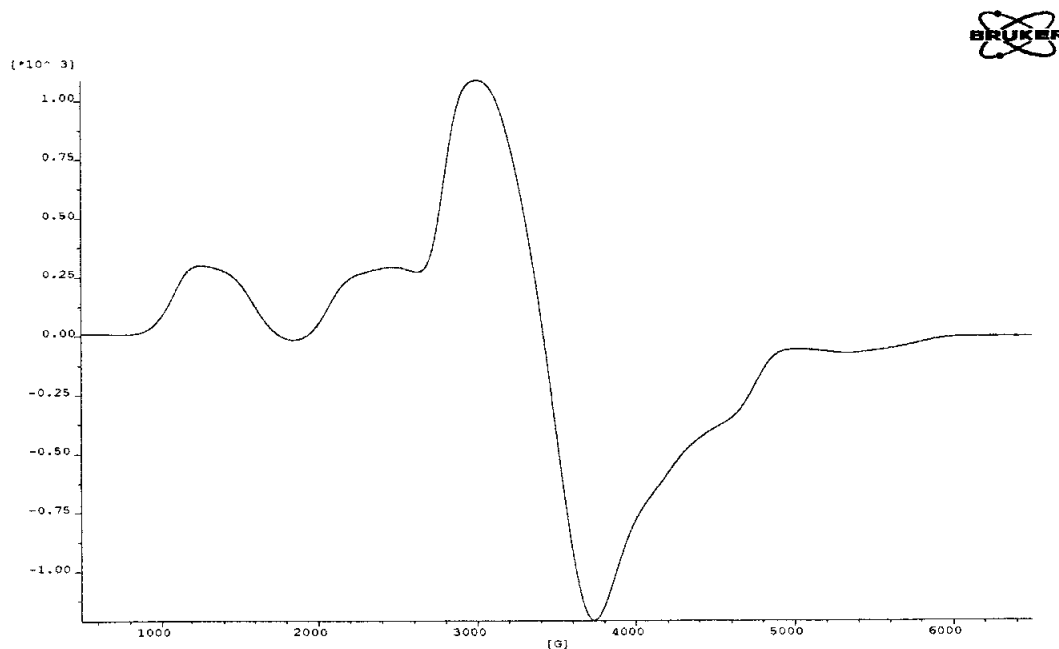
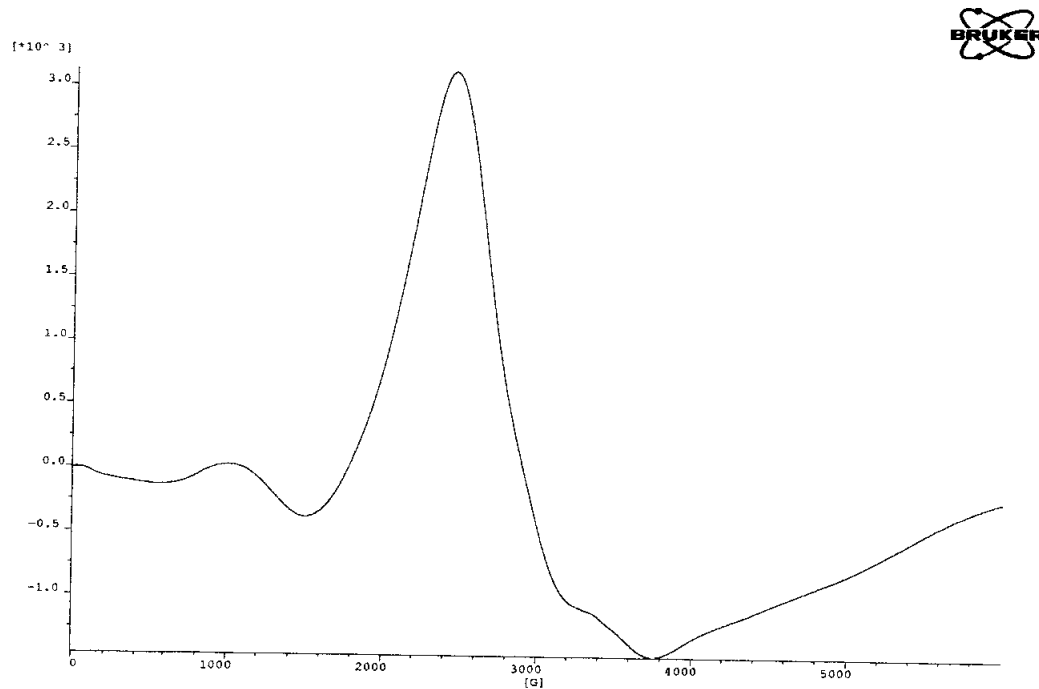
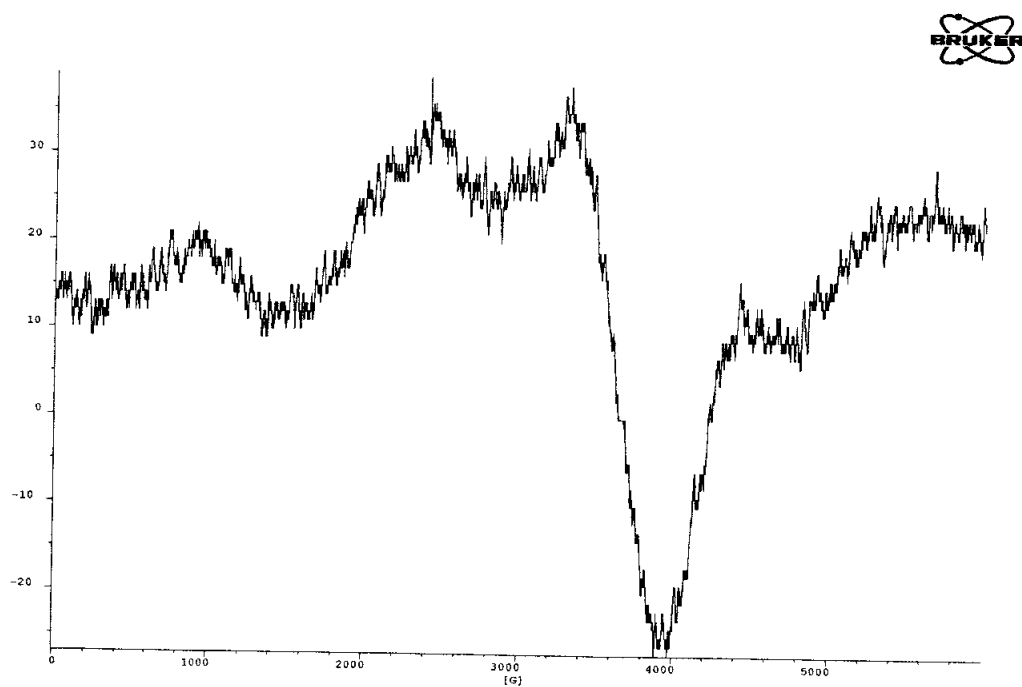


Figura 4.12.- Espectro RPE de  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$



**Figura 4.13.- Espectro RPE de  $\text{Mn(smtz)}_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$**



**Figura 4.14.- Espectro RPE de  $\text{Mn(smtz)}_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$**

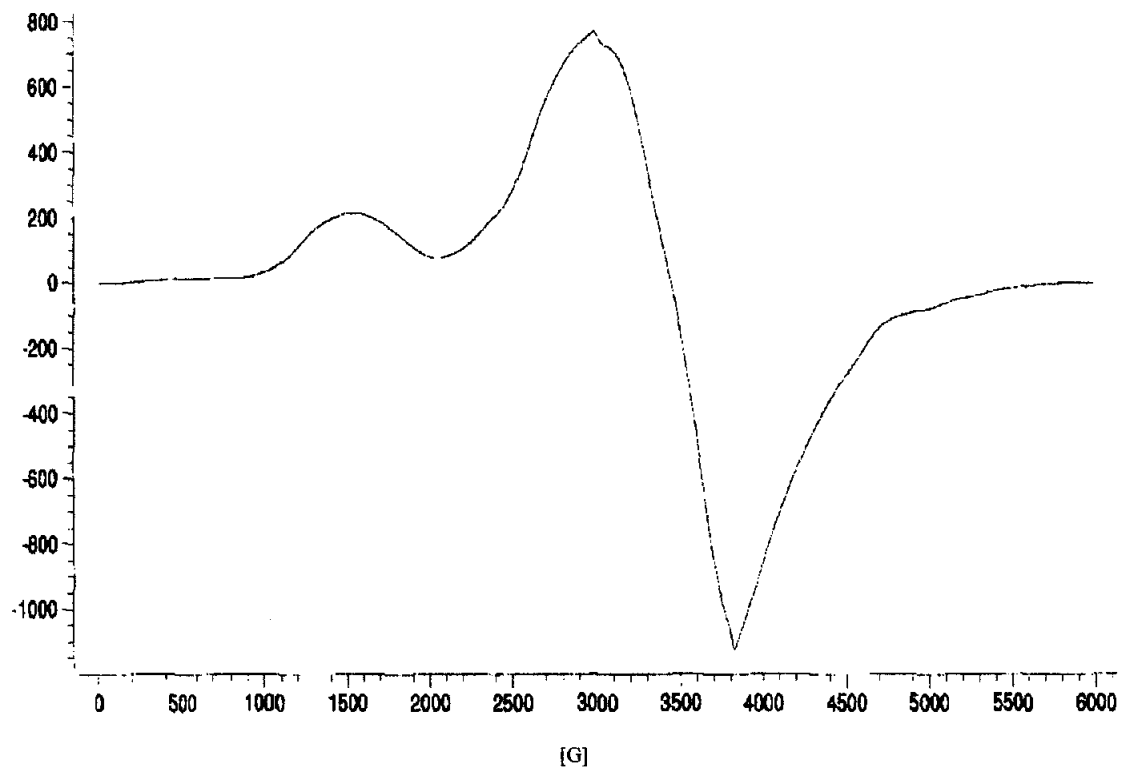


Figura 4.15.-Espectro RPE de  $[\text{Mn}(\text{4-metilimH})_2(\text{OH}_2)_4](\text{smtz})_2$

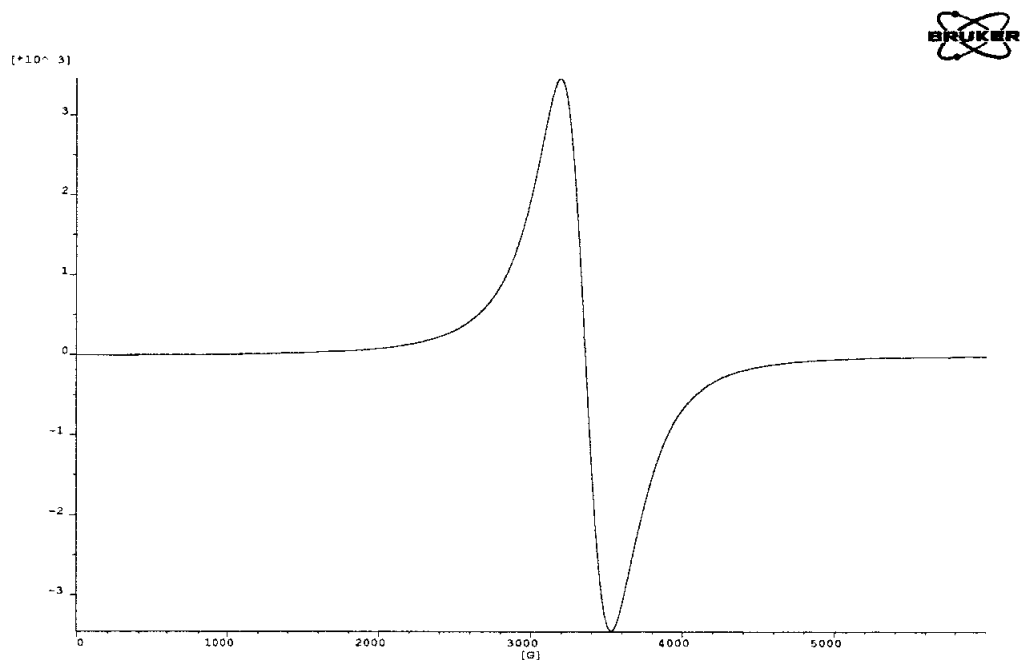


Figura 4.16.- Espectro RPE de  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$



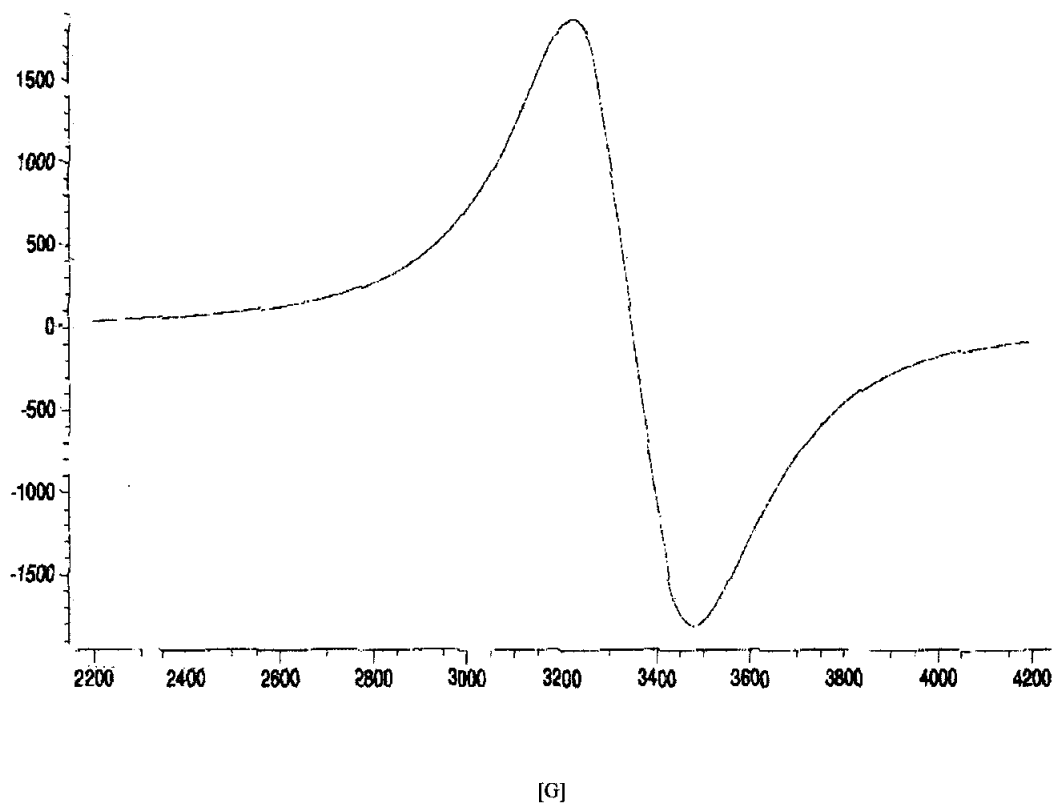


Figura 4.17.- Espectro RPE de  $\{[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)] \cdot (\text{imH})\}_n$

# Capítulo 5: Complejos de Cu

---

---

## 5.1.- SÍNTESIS Y ANÁLISIS ELEMENTAL

## 5.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS

### 5.2.1.- COMPLEJO $[Cu(SMTZ)_2(IMH)_2]$

#### 5.2.1.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

#### 5.2.1.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

#### 5.2.1.3.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA

### 5.2.2.- COMPLEJO $[Cu_{1,2} \text{ DIMETILIMH}_3(SMTZ)(OH)] \cdot \frac{1}{2} H_2O$

#### 5.2.2.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

#### 5.2.2.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

#### 5.2.2.3.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA

### 5.2.3.- COMPLEJO $[Cu_2(TZ-TOL)_4]$

#### 5.2.3.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

#### 5.2.3.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

#### 5.2.3.3.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA

### 5.2.4.- COMPLEJO $[Cu_2(TZ-BEN)_4]$

#### 5.2.4.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

#### 5.2.4.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

# Capítulo 5: Complejos de Cu

---

---

## 5.2.5.- COMPLEJO $[Cu_2(TZ-NAF)_4]$

### 5.2.5.1.- SÍNTESIS DE LOS MONOCRISTALES

### 5.2.5.2.- TOMA DE DATOS. RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LA ESTRUCTURA

### 5.2.5.3.- DESCRIPCIÓN DE LA ESTRUCTURA

## 5.3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD

## 5.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

### 5.4.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.5.- REFLECTANCIA DIFUSA

### 5.5.1.- ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA $Cu(II)$

### 5.5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.6.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA

### 5.6.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA PARA $Cu(II)$

### 5.6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.7.- MOMENTOS MAGNÉTICOS

### 5.7.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

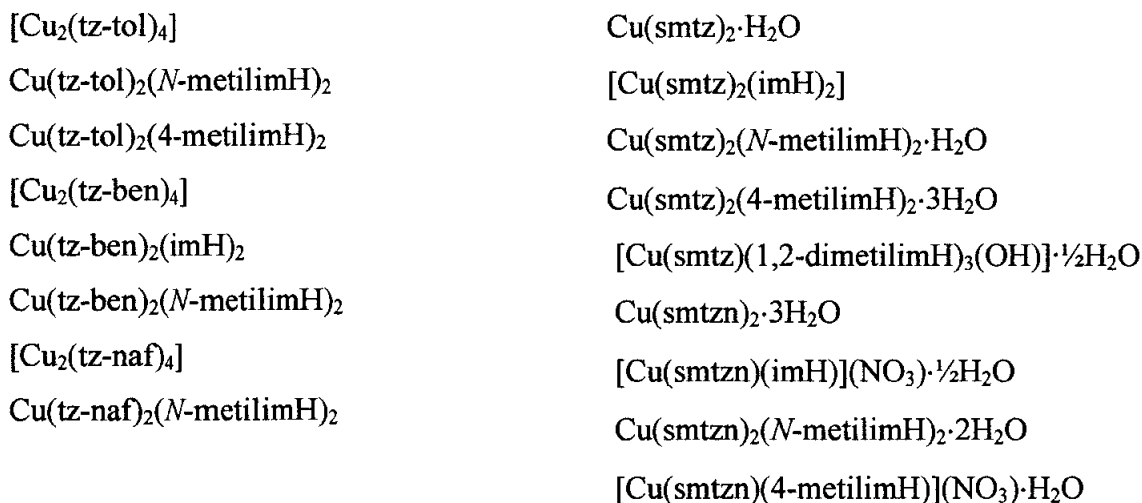
## 5.8.- APÉNDICE

### 5.8.1.- ESPECTROS IR

### 5.8.2.- ESPECTROS RPE

## 5.1.- SÍNTESIS Y ANÁLISIS ELEMENTAL

Los complejos obtenidos fueron:



A continuación se describen los procedimientos seguidos para sintetizar los complejos así como las técnicas utilizadas para su caracterización.

Los complejos  $\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se obtuvieron disolviendo 2 mmoles de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,4g.) en 5 ml de ácido acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ). Por otra parte se disolvió 1mmol de ligando (Hsmtzn o Hsmtz) (0,28 g.) en 30 ml de metanol. Se mezclaron ambas disoluciones y la disolución se dejó en reposo. En ambos casos, transcurridos unos días apareció un precipitado de color marrón verdoso. Estos precipitados se filtraron, se lavaron y se secaron a vacío hasta peso constante.

Los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$  se sintetizaron mediante el siguiente procedimiento: 0,5 mmoles de  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{COO})_2$  (0,15 g.) se disolvieron en 50 ml de etanol. 1 mmol de los ligandos (Htz-tol (0,254g.) y Htz-ben (0,24 g.)) se disolvieron en otros 100 ml de etanol, mientras que el ligando Htz-naf (0,290 g.) se disolvió en acetona. Se mezclaron ambas disoluciones y la disolución final, de color amarillo claro se dejó en reposo, a Tª ambiente. Al cabo de 7-8 días aparecieron, en los tres casos, cristales de color granate, de calidad y tamaño suficientes para su estudio mediante difracción de Rayos X. Estos cristales se filtraron, se lavaron con la mínima cantidad de disolvente y se secaron a vacío.

Cuando se utilizó  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COOH})$ , en lugar de  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{COO})_2$ , se obtuvieron unos precipitados cristalinos de color morado de igual composición que los cristales.

Los complejos  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2$ ,  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se sintetizaron del modo siguiente: se disolvieron 4 mmoles del imidazol correspondiente en 20 ml de metanol y se añadió 1 mmol (0,2 g.) de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Esta disolución se mezcló con otra donde se había disuelto 1 mmol de Hsmtz (0,27 g.) en 50 ml de metanol, manteniendo en agitación. Transcurridos unos días se obtuvieron precipitados de color verde en los tres casos que se filtraron, se lavaron y se secaron a vacío hasta peso constante.

Para la síntesis de los complejos  $[\text{Cu}(\text{smtzn})(\text{imH})](\text{NO}_3) \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ , y  $[\text{Cu}(\text{smtzn})(4\text{-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$  se siguió el procedimiento siguiente: 1 mmol de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (0,24 g.) se disolvió en 30 ml de etanol. A esta disolución se le añadió 1 mmol de Hsmtzn (0,28 g.) y 2 mmoles del imidazol correspondiente. El complejo  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  se sintetizó disolviendo 1 mmol de  $\text{CuSO}_4$ , 2 mmoles de Nasmtzn (el ligando en forma de sal sódica) y 2 mmoles (15 gotas) de *N*-metilimH, en 30 ml de  $\text{H}_2\text{O}$ . En todas estas síntesis la disolución final se dejó en reposo y al cabo de 15-20 días se obtuvieron precipitados de color verde brillante en los dos primeros casos y lila para el tercer complejo, que fueron recogidos mediante filtración de las disoluciones, lavados y secados a vacío hasta peso constante.

Los complejos  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(N\text{-metilimH})_2$ ,  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2$ ,  $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{imH})_2$  y  $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(N\text{-metilimH})_2$  se sintetizaron disolviendo 4 mmoles del imidazol correspondiente en 20 ml de metanol. A esta disolución se le añadió 1 mmol de  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,2 g.). Se introdujo esta disolución en un baño de hielo y se le adicionó otra disolución de 1 mmol del respectivo ligando (Htz-tol, Htz-ben, Htz-naf) en 50 ml de metanol. Se mantuvo la agitación en baño de hielo durante 4 horas. Pasado este tiempo se dejó la disolución en reposo, a  $T^\circ$  ambiente y al cabo de unos días se obtuvieron diferentes precipitados de color verde en todos los casos excepto para el  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2$  que fue gris. Estos precipitados fueron filtrados, lavados y secados a vacío hasta peso constante.

El complejo  $\text{Cu}(\text{tz-naf})_2(\text{N-metilimH})_2$ , se obtuvo siguiendo este último procedimiento pero sin introducir la disolución en el baño de hielo.

En la tabla 5.1 se presentan los datos de análisis elemental de todos los complejos anteriores.

**Tabla 5.1.- Análisis elemental de los complejos de cobre**

ANÁLISIS ELEMENTAL					
% EXP. (TEOR.)					
Complejo	%C	%N	%S	%H	Color
$\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	34,42 (34,83)	17,58 (18,06)	20,18 (20,64)	3,20 (3,22)	Marrón oscuro
$\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2$	38,65 (38,91)	22,14 (22,69)	17,60 (17,29)	3,49 (3,51)	Verde
$\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{N-MetilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40,20 (39,84)	21,46 (21,51)	16,23 (16,33)	4,02 (4,12)	Verde
$\text{Cu}(\text{smtz})_2(4\text{-MetilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	38,09 (38,09)	20,61 (20,51)	14,74 (15,61)	4,37 (4,43)	Verde
$\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	42,91 (42,72)	16,19 (16,61)	9,28 (9,49)	4,59 (4,75)	Marrón
$[\text{Cu}(\text{smtzn})(\text{imH})](\text{NO}_3) \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	36,68 (36,88)	19,59 (20,08)	6,60 (6,55)	3,90 (3,92)	Verde brillante
$\text{Cu}(\text{smtzn})_2(\text{N-MetilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	46,11 (46,87)	20,38 (20,51)	7,55 (7,81)	5,28 (5,41)	Lila
$[\text{Cu}(\text{smtzn})(4\text{-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$	38,57 (38,24)	19,24 (19,52)	6,50 (6,37)	4,22 (4,10)	Verde brillante
$\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4$	41,89 (42,17)	9,73 (9,84)	22,82 (22,49)	2,93 (3,16)	Morado
$\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	45,02 (44,58)	14,47 (14,86)	16,56 (16,98)	4,35 (4,51)	Verde azulado
$\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	44,66 (44,59)	13,98 (14,86)	17,93 (16,98)	4,17 (4,51)	Gris
$\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4$	39,05 (39,90)	9,94 (10,30)	23,64 (23,38)	2,58 (2,49)	Morado
$\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{imH})_2$	42,24 (42,54)	16,25 (16,54)	18,74 (18,90)	3,24 (3,24)	Verde azulado
$\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{N-imH})_2$	44,13 (44,25)	15,86 (15,88)	18,15 (18,75)	3,58 (3,68)	Verde oscuro
$\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4$	48,93 (48,33)	8,63 (8,67)	19,82 (19,83)	2,73 (2,78)	Morado
$\text{Cu}(\text{tz-naf})_2(\text{N-imH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	48,59 (48,26)	13,30 (13,24)	14,99 (15,13)	3,71 (4,25)	Verde azulado

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida;  
Htz-ben = *N*-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida; Htz-naf = *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida

## 5.2.- ESTRUCTURAS CRISTALINAS

### 5.2.1.- COMPLEJO [Cu(SMTZ)<sub>2</sub>(IMH)<sub>2</sub>]

#### 5.2.1.1.- Síntesis de los monocristales

El complejo [Cu(smtz)<sub>2</sub>(imH)<sub>2</sub>] fue sintetizado disolviendo 4 mmoles de imidazol (imH) en 20 ml de metanol. Se añadió 1 mmol de Cu(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (0,20 g.). Una vez disuelto, esta disolución se mezcló con otra donde habíamos disuelto 1 mmol de Hsmtz (0,27 g.) en 50 ml de metanol. Apareció un precipitado que fue filtrado, lavado y secado a vacío hasta peso constante. El filtrado se dejó durante 2-3 días hasta que aparecieron cristales de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Estos cristales se filtraron, se lavaron con la mínima cantidad posible de disolvente y se secaron a vacío.

#### 5.2.1.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura

El cristal seleccionado para la toma de datos es prismático y tiene unas dimensiones de 0,46 x 0,42 x 0,15 mm. El grupo espacial es el P-1. Se midieron 2590 reflexiones en el rango de  $\theta$  de 1-25° y en el rango de hkl de (0,-10,-11) a (10,11,11). Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas Internacionales de Cristalografía<sup>47</sup>. En la tabla 5.2 se resumen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 5.2.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu(smtz)<sub>2</sub>(imH)<sub>2</sub>]**

Datos cristalográficos			
Fórmula	CuS <sub>4</sub> O <sub>4</sub> N <sub>12</sub> C <sub>24</sub> H <sub>26</sub>	V	735,34(14) Å <sup>3</sup>
M (g/mol)	738,35	$\rho$	1,667 mg/m <sup>3</sup>
Sistema Cristalino	Triclínico	$\lambda$	0,71073 Å
Grupo Espacial	P-1	Morfología del cristal	prismática
Z	1	Dimensiones (mm)	0,46 x 0,42 x 0,15
Parámetros de celda	a = 8,8525(13) Å b = 9,4743(9) Å c = 9,5845(8) Å	T	293(2) K
		Monocromador	grafito
		$\mu$	1,083 mm <sup>-1</sup>
		$\theta$ rango	2,17-25,04

### 5.2.1.3.- Descripción de la estructura

En la figura 5.1 se muestra un ORTEP de la molécula con la numeración detallada de los átomos. La tabla 5.3 presenta las longitudes y ángulos de enlace seleccionados.

#### Poliedro de coordinación

El cobre(II) está coordinado a dos N imidazol y a dos N tiadiazol de dos sulfametazolatos en un entorno plano-cuadrado regular. Los ángulos de enlace del poliedro de coordinación están próximos al ángulo recto ( $89,72^\circ$ - $90,28^\circ$ ). Las distancias Cu-N<sub>imidazol</sub> (1,994(2) Å) son prácticamente iguales a las distancias Cu-N<sub>tiadiazol</sub> (2,059(2) Å). El sulfametizol actúa como ligando monodentado, coordinando a través del N tiadiazólico contiguo al grupo sulfonamida desprotonado.

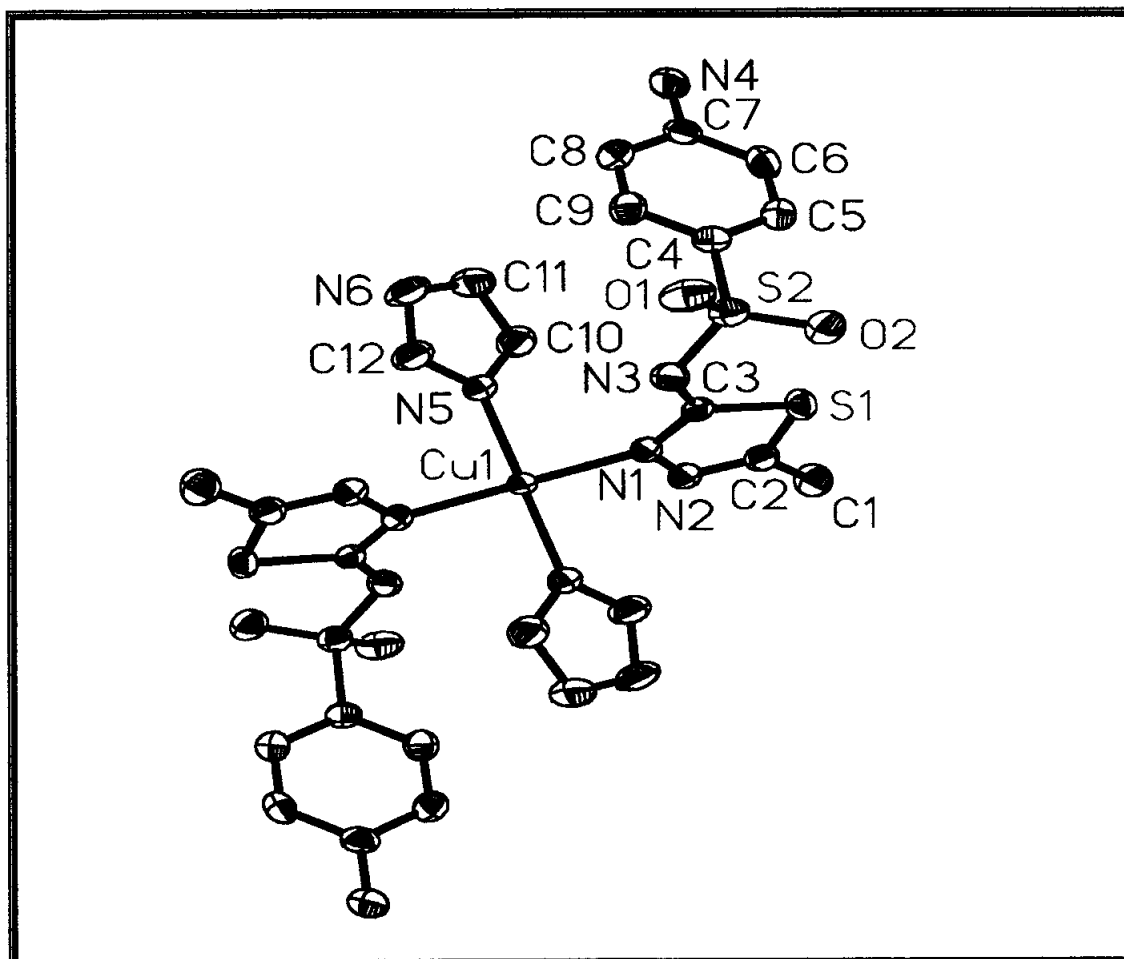


Figura 5.1.- Estructura cristalina del complejo  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$



El comportamiento que presenta la sulfonamida es diferente del observado para esta misma sulfonamida en el complejo  $[Mn(4\text{-metilimH})_2(OH_2)_4](smtz)_2$  donde actúa como contraión y que ha sido descrito en el apartado 4.2.1.3. Para este complejo de Cu(II), las distancias N3-S2 (1,602(2) Å) y N3-C3 (1,340(3) Å) son similares a las de los complejos  $[Mn(4\text{-metilimH})_2(OH_2)_4](smtz)_2$  y  $[Co(smtz)_2(py)_2(H_2O)_2]^{39}$ . Estos datos están en concordancia con el hecho de que el comportamiento de la sulfonamida en cuanto a su coordinación no influye en las distancias interatómicas. La estructura está estabilizada mediante enlaces de hidrógeno (figura 5.2) en los que intervienen el  $N_{amino}$ ,  $N_{sulfonamido}$ ,  $N_{tiadiazólico}$  y  $O_{sulfonamido}$ .

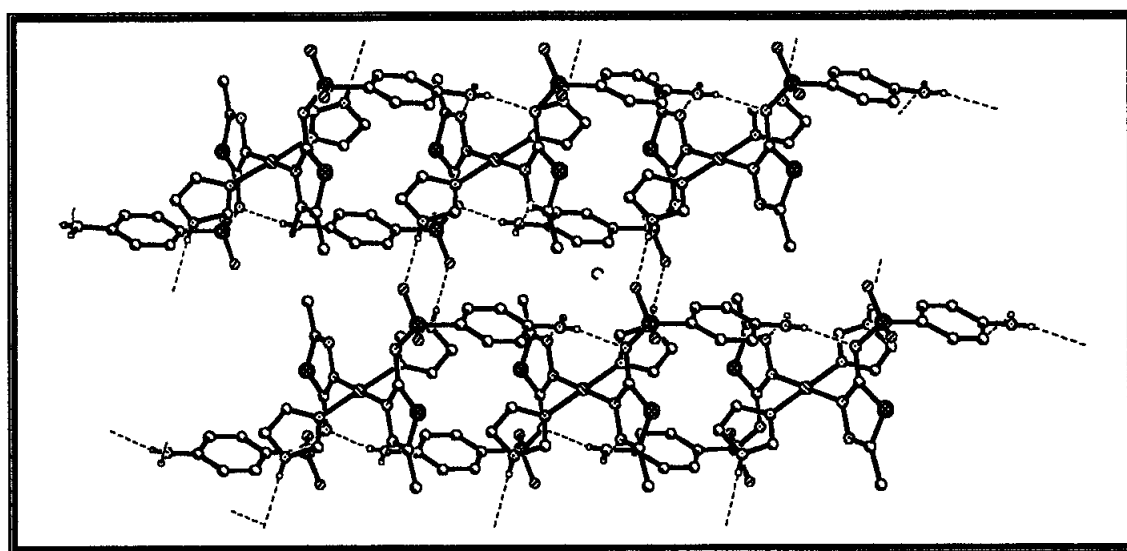


Figura 5.2.- Vista en perspectiva del empaquetamiento cristalino del complejo  $[Cu(smtz)_2(imH)_2]$

Tabla 5.3.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE (°)			
Cu-N(5)	1,994(2)	N(5)-Cu-N(5)#1	180,00	N(5) -Cu-N(1)	88,39(13)
Cu-N(5)#1	1,994(2)	N(5)-Cu-N(1)#1	91,61(13)	N(5)#1-Cu-N(1)	91,61(13)
Cu-N(1)#1	2,059(2)	N(5)#1-Cu-N(1)#1	88,39(13)	N(1)#1- Cu-N(1)	180,00
Cu-N(1)	2,059(2)				

Tabla 5.4.- Distancias y ángulos de enlace de los enlaces de hidrógeno

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
N(4)-H(1)...N(3)#2	0,81(2)	2,19(2)	2,977(4)	165(4)
N(4)-H(2)...N(2)#3	0,80(2)	2,48(3)	3,021(4)	125(3)
N(6)-H(3)...O(1)#4	0,80(2)	2,04(3)	2,820(3)	163(4)

## 5.2.2.- COMPLEJO [Cu(1,2-DIMETILIMH)<sub>3</sub>(SMTZ)(OH)]·½H<sub>2</sub>O

### 5.2.2.1.- Síntesis de los monocristales

El complejo [Cu(1,2-dimetilimH)<sub>3</sub>(smtz)(OH)]·½H<sub>2</sub>O fue sintetizado disolviendo 3 mmoles de 1,2-dimetilimH (0,29 g.) en 10 ml de metanol. Se añadió 1 mmol de CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O (0,17 g.). Una vez disuelto, esta disolución se mezcló con otra donde se había disuelto 1 mmol de Hsmtz (0,27g.) en 30 ml de metanol. La disolución resultante se dejó durante 2-3 días hasta que aparecieron unos cristales prismáticos de color azulado de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Estos cristales se filtraron, se lavaron con la mínima cantidad posible de disolvente y se secaron a vacío hasta peso constante.

### 5.2.2.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura

El cristal seleccionado para la toma de datos es azulado, prismático y de dimensiones 0,33 x 0,21 x 0,06 mm. Se monta sobre un difractómetro Bruker SMART CCD 1000<sup>44</sup>. Las intensidades se recogieron en un monocromador de grafito utilizando la radiación MoK(α), λ= 0,71073 Å. Los datos se procesaron mediante el programa SAINT y las correcciones de absorción se realizaron con el programa SADABS<sup>66</sup> (factores de transmisión: 1,000-0,840). El grupo espacial es el P-1. Se midieron 10978 reflexiones en el rango 1,14° a 28,03°, de la que 7590 fueron independientes. El rango hkl fue de (-10,-14,-22) a (11,13,23). La estructura fue resuelta por métodos directos y se utilizó el programa SHELXL-97<sup>45</sup>. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados empleando el programa SHELXL-97<sup>46</sup>. Los átomos de hidrógeno fueron situados geoméricamente y los parámetros de posición fueron refinados. Los átomos de hidrógeno de los grupos OH y H<sub>2</sub>O fueron localizados de forma inequívoca mediante mapas de diferencia de Fourier. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante el programa PLATON99<sup>48</sup>. En la tabla 5.5 se recogen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 5.5.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu(1,2-dimetilimH)<sub>3</sub>(smtz)(OH)]·½H<sub>2</sub>O**

Datos cristalográficos			
Fórmula	CuS <sub>2</sub> O <sub>3,5</sub> N <sub>10</sub> C <sub>24</sub> H <sub>35</sub>	V	1637,7(2) Å <sup>3</sup>
M (g/mol)	647,28	ρ	1,313 mg/m <sup>3</sup>
Sistema Cristalino	Triclínico	λ	0,71073 Å
Grupo Espacial	P-1	Morfología del cristal	prismática
Z	2	Dimensiones (mm)	0,33 x 0,21 x 0,06
Parámetros de celda	a = 8,3515(7) Å b = 10,9876(9) Å c = 18,0244(14) Å	T	293(2) K
		Monocromador	grafito
		μ	0,837 mm <sup>-1</sup>
		θ rango	1,14-28,03

### 5.2.2.3.- Descripción de la estructura

En la figura 5.3 se muestra un ORTEP de la molécula con la numeración detallada de los átomos. La tabla 5.7 presenta las longitudes y ángulos de enlace seleccionados.

#### Poliedro de coordinación

El ión de Cu(II) se encuentra en un entorno pentacoordinado. Está unido a tres N imidazólicos y a un N tiadiazólico del ligando sulfametizol. También encontramos unido al cobre un átomo de O perteneciente a un grupo (OH). Las distancias de enlace entre el átomo de cobre y los átomos de su poliedro de coordinación se encuentran en el rango 1,988(3)-2,323(2) Å. Los ángulos de enlace de este poliedro se encuentran cercanos al ángulo recto (88,07°-98,55°). Se observa también, fuera del entorno geométrico del cobre, una molécula de agua que está compartida entre dos celdas unidad. Ante los datos expuestos podemos decir que el complejo descrito presenta una geometría pirámide cuadrada, aunque ligeramente distorsionada.

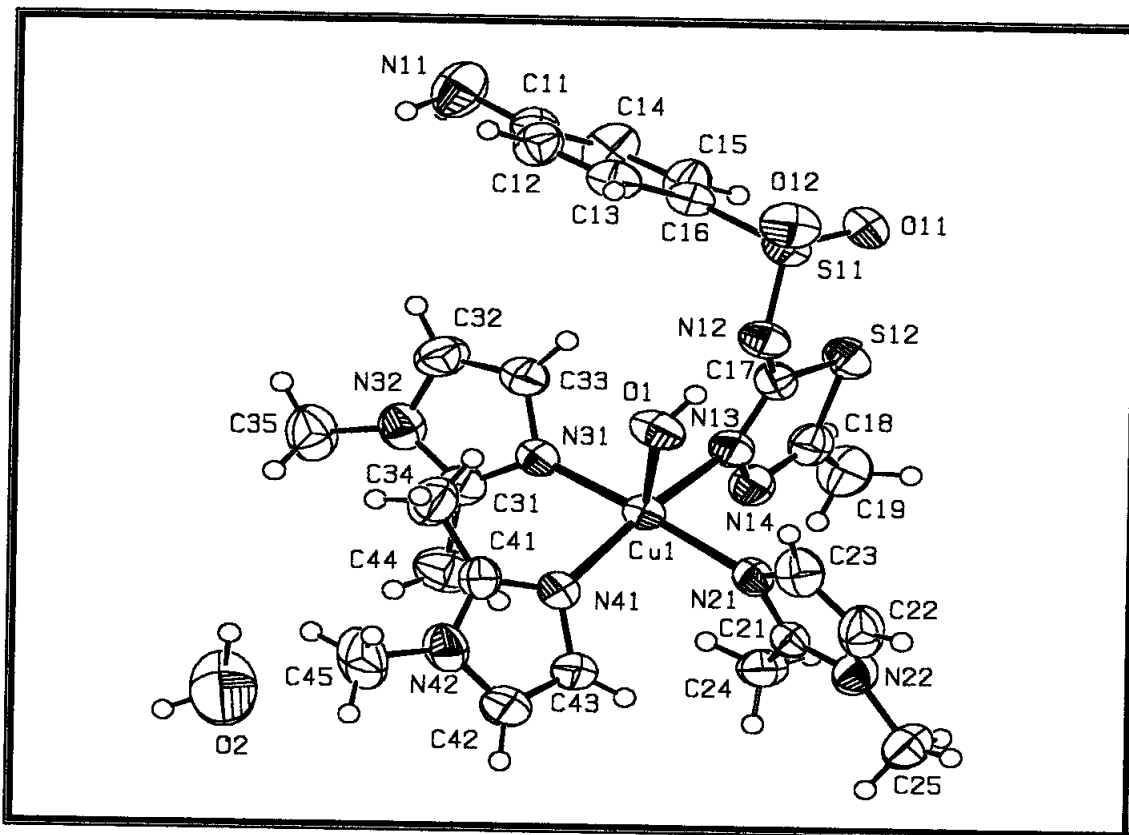


Figura 5.3.- Estructura cristalina del complejo  $[\text{Cu}(\text{1,2-dimetilimidazole})_3(\text{smtz})(\text{OH})] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$

Tabla 5.6.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE(°)			
Cu(1)-N(21)	1,988(3)	N(21)-Cu(1)-N(31)	169,38(12)	N(41)-Cu(1)-N(13)	170,05(11)
Cu(1)-N(31)	1,991(3)	N(21)-Cu(1)-N(41)	89,63(11)	N(21)-Cu(1)-O(1)	91,77(11)
Cu(1)-N(41)	2,038(3)	N(31)-Cu(1)-N(41)	92,34(11)	N(31)-Cu(1)-O(1)	98,55(11)
Cu(1)-N(13)	2,046(3)	N(21)-Cu(1)-N(13)	88,07(11)	N(31)-Cu(1)-O(1)	93,76(10)
Cu(1)-O(1)	2,323(2)	N(31)-Cu(1)-N(13)	88,20(11)	N(13)-Cu(1)-O(1)	95,98(10)

Tabla 5.7.- Distancias y ángulos de enlace de los enlaces de hidrógeno

D-H...A	d(D-H)	d(H...A)	d(D...A)	<(DHA)
O(1)-H(1)...N(12)	0,82	2,07	2,760(4)	142,0
N(11)-H(11a)...O(12)#2	0,75	2,50	3,014(4)	126,9
N(11)-H(11b)...O(2)#3	1,07	2,22	3,047(4)	132,5

### 5.2.3.- COMPLEJO [Cu<sub>2</sub>(TZ-TOL)<sub>4</sub>]

#### 5.2.3.1.- Síntesis de los monocristales

El complejo [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>] se sintetizó tomando 0,5 mmoles de Cu(CF<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (0,15 g.) y disolviéndolos en 50 ml de etanol. 1 mmol del ligando (Htz-tol (0,254g.)) se disolvió en otros 100 ml de etanol. La disolución final de color amarillo claro se dejó en reposo y al cabo de 7-8 días aparecieron unos cristales prismáticos de color granate de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Estos cristales se filtraron se lavaron con la mínima cantidad posible de disolvente y se secaron a vacío.

#### 5.2.3.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura

El cristal seleccionado para la toma de datos es granate, prismático y de dimensiones 0,18 x 0,16 x 0,06 mm. Se monta sobre un difractómetro Bruker SMART CCD 1000<sup>44</sup>. Las intensidades se recogieron en un monocromador de grafito utilizando la radiación MoK(α), λ= 0,3108 Å. Los datos se procesaron mediante el programa SAINT y las correcciones de absorción se realizaron con el programa SADABS<sup>66</sup> (factores de transmisión: 0,925-0,797). El grupo espacial es el P2(1)/n. Se midieron 15546 reflexiones en el rango 1,77° a 28,06°, de la que 5654 fueron independientes. El rango hkl fue de (-35,-13,-13) a (35,12,26). La estructura fue resuelta por métodos directos y se utilizó el programa SHELXL-97<sup>45</sup>. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados empleando el programa SHELXL-97<sup>46</sup>. Los átomos de hidrógeno fueron situados geoméricamente y los parámetros de posición fueron refinados. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante el programa PLATON99<sup>48</sup>. En la tabla 5.8 se resumen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 5.8.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>]**

Datos cristalográficos			
Fórmula	Cu <sub>2</sub> S <sub>8</sub> O <sub>8</sub> N <sub>8</sub> C <sub>40</sub> H <sub>36</sub>	V	4702,6(8) Å <sup>3</sup>
M (g/mol)	1140,33	ρ	1611 mg/m <sup>3</sup>
Sistema Cristalino	Monoclínico	λ	0,3108 Å
Grupo Espacial	P2(1)/n	Morfología del cristal	prismática
Z	4	Dimensiones (mm)	0,18 x 0,16 x 0,06
Parámetros de celda	a = 27,174 (3) Å b = 10,1931(10) Å c = 20,025(2) Å	T	291(2) K
		Monocromador	grafito
		μ	1,320 mm <sup>-1</sup>
		θ rango	1,77-28,06

### 5.2.3.3.- Descripción de la estructura

En la figura 5.4 se muestra un ORTEP de la molécula con la numeración detallada de los átomos. La tabla 5.9 presenta las longitudes y ángulos de enlace seleccionados.

#### Poliedro de coordinación

Cada ión Cu(II) está tetracoordinado, con un entorno plano cuadrado ligeramente distorsionado: los centros metálicos están unidos a dos nitrógenos tiazoles de dos ligandos sulfonamida desprotonados y a dos átomos de nitrógeno sulfonamido de otras dos moléculas de ligando. Las distancias metal-ligando Cu-N<sub>tiazol</sub> y Cu-N<sub>sulfonamido</sub> son similares a las observadas en otros complejos con sulfonamidas estudiados. Los ángulos de enlace en el cromóforo CuN<sub>4</sub> son casi regulares. Los átomos N tiazol están en posición *trans*. La desviación del Cu respecto del plano formado por los átomos N12a, N21a, N22 y N11 es 0,2182 Å. La distancia Cu1-Cu1a es de 2,7224 (13)Å. El ligando actúa como puente a través de N<sub>tiazol</sub> y el N<sub>sulfonamido</sub>. Este modo de coordinación es el que presenta el ligando relacionado sulfatiazol en el complejo Cu<sub>2</sub>(sulfatiazolato)<sub>4</sub>.<sup>21</sup>

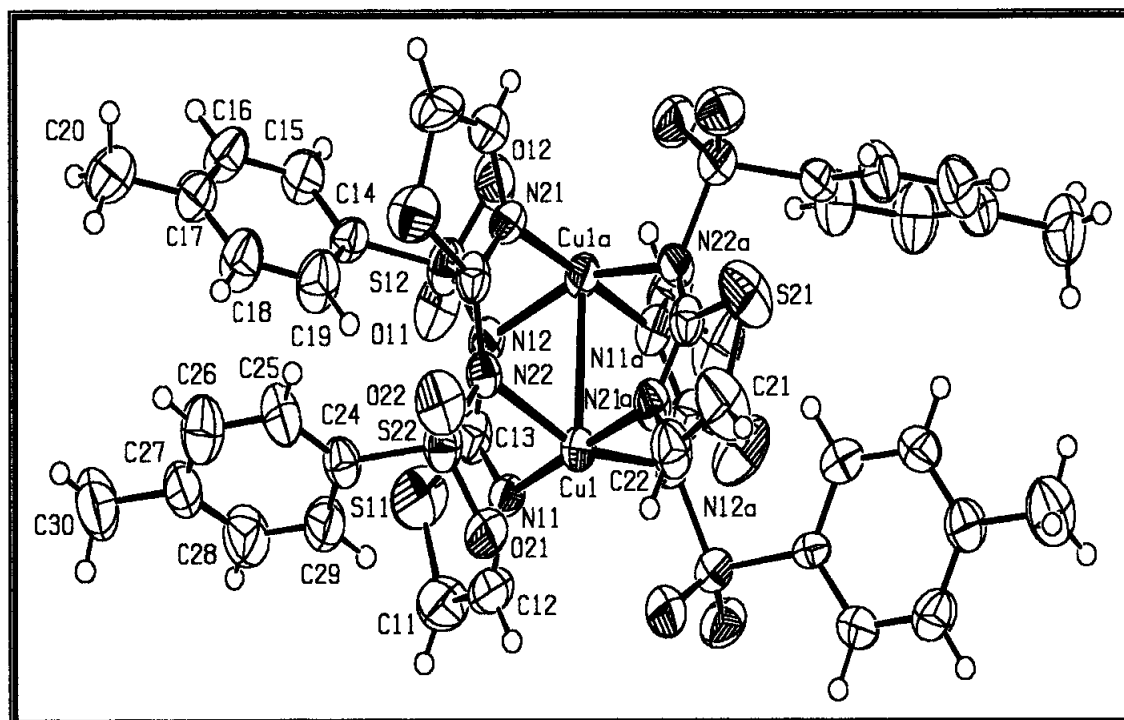


Figura 5.4.- Estructura cristalina del complejo  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$

Tabla 5.9.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE (°)	
Cu(1)-N(21)#1	1,942(4)	N(21)#1-Cu(1)-N(11)	178,04(17)
Cu(1)-N(11)	1,947(4)	N(21)#1-Cu(1)-N(12)#1	90,11 (16)
Cu(1)-N(12)#1	2,067(4)	N(11)-Cu(1)-N(12)#1	87,98(15)
Cu(1)-N(22)	2,088(4)	N(21)#1-Cu(1)-N(22)	89,63(15)
Cu(1)-Cu(1)#1	2,7224(13)	N(11)-Cu(1)-N(22)	92,30(15)
		N(12)#1-Cu(1)-N(22)	155,71(15)
		N(21)#1-Cu(1)-Cu(1)#1	91,80(14)
		N(11)-Cu(1)-Cu(1)#1	88,99(13)
		N(12)#1-Cu(1)-Cu(1)#	178,50(11)
		N(22)-Cu(1)-Cu(1)#1	77,22(11)

## 5.2.4.- COMPLEJO $[\text{Cu}_2(\text{TZ-BEN})_4]$

### 5.2.4.1.- Síntesis de los monocristales

El complejo  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  se sintetizó tomando 0,5 mmoles de  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{COO})_2$  (0,15 g.) y disolviéndolos en 50 ml de etanol. 1 mmol del ligando (Htz-ben (0,240g.)) se disolvió en otros 100 ml de etanol. La disolución final de color amarillo claro se dejó en reposo y al cabo de 7-8 días aparecieron unos cristales prismáticos de color granate de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Éstos se filtraron, se lavaron con la mínima cantidad posible de disolvente y se secaron a vacío.

#### **5.2.4.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura**

El cristal seleccionado para la toma de datos resultó ser pequeño para su resolución y refinamiento, por lo que no podemos presentar su estructura cristalina. En vista de la similitud entre los resultados de la caracterización de este complejo y los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$  pensamos que éste también es un complejo dímero.

#### **5.2.5.- COMPLEJO $\text{Cu}_2(\text{TZ-NAF})_4$**

##### **5.2.5.1.- Síntesis de los monocristales**

El complejo  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$  se sintetizó tomando 0,5 mmoles de  $\text{Cu}(\text{CF}_3\text{COO})_2$  (0,15 g.) y disolviéndolos en 50 ml de etanol. 1 mmol del ligando (Htz-naf (0,290g.)) se disolvió en otros 100 ml de acetona. La disolución final de color amarillo claro se dejó en reposo y al cabo de 7-8 días aparecieron unos cristales prismáticos de color granate de tamaño y calidad suficientes para su resolución por difracción de Rayos X. Estos cristales se filtraron se lavaron con la mínima cantidad posible de disolvente y se secaron a vacío.

##### **5.2.5.2.- Toma de datos. Resolución y refinamiento de la estructura**

El cristal seleccionado para la toma de datos es granate, de dimensiones 0,06 x 0,2 x 0,16 mm. Se monta sobre un difractómetro Nonius Kappa-CCD<sup>67</sup>. Las intensidades se recogieron en un monocromador de grafito utilizando la radiación  $\text{MoK}(\alpha)$ ,  $\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$ . Se recogieron un total de 98 imágenes utilizando el método de oscilación con una oscilación de  $1,9^\circ$  y un tiempo de exposición de 200 s por imagen. Los datos se recogieron mediante el programa Collect<sup>67</sup>. La reducción de estos datos y el refinamiento de la celda se llevó a cabo con los programas HKL Denzo y Scalepack<sup>68</sup>. El grupo espacial es el  $\text{Aba}2$ . Se midieron 5516 reflexiones en el rango  $2,91^\circ$  y  $26,02^\circ$  de las que 3957 fueron independientes. El rango hkl fue de (-23,-25,-17) a (23,25,17). La estructura fue resuelta por métodos directos y se utilizó el programa SIR-97<sup>69</sup>. El refinamiento de la estructura se realizó mediante mínimos cuadrados empleando el programa SHELXL-97<sup>45,46</sup>. Los átomos de hidrógeno fueron situados geoméricamente y



los parámetros de posición fueron refinados. Los factores de difusión atómica se tomaron de las Tablas de Cristalografía de Rayos-X<sup>47</sup>. Los cálculos geométricos fueron realizados con el programa PARST<sup>70</sup>. Las gráficas moleculares se obtuvieron mediante el programa ORTEP3<sup>71</sup>. En la tabla 5.10 se resumen los detalles cristalográficos del monocristal.

**Tabla 5.10.- Detalles experimentales cristalográficos del monocristal de [Cu<sub>2</sub>(tz-naf)<sub>4</sub>]**

Datos cristalográficos			
Fórmula	Cu <sub>2</sub> S <sub>8</sub> O <sub>8</sub> N <sub>8</sub> C <sub>52</sub> H <sub>40</sub>	V	5811(3) Å <sup>3</sup>
M (g/mol)	1288,48	ρ	1,473 mg/m <sup>3</sup>
Sistema Cristalino	Ortorómbico	λ	0,71069 Å
Grupo Espacial	Aba2	Morfología del cristal	-
Z	4	Dimensiones (mm)	0,06 x 0,2 x 0,16
Parámetros de celda	a = 19,581(5) Å b = 20,493(5) Å c = 14,481(5) Å	T	293 °K
		Monocromador	-
		μ	1,078 mm <sup>-1</sup>
		θ rango	3,45-26,02

### 5.2.5.3.- Descripción de la estructura

En la figura 5.5 se muestra un ORTEP de la molécula con la numeración detallada de los átomos. La tabla 5.11 presenta las longitudes y ángulos de enlace seleccionados.

#### Poliedro de coordinación

Cada ión Cu(II) está tetracoordinado. Los centros metálicos están unidos a dos nitrógenos tiazoles de dos ligandos sulfonamida y a dos átomos de nitrógeno sulfonamido de otras dos moléculas de ligando desprotonados. Las distancias metal-ligando Cu-N<sub>tiazol</sub> son: 1,958(6) para el Cu1 y 1,950(5) para el Cu2. Las distancias Cu-N<sub>sulfonamido</sub> son 2,084(5) y 2,063(5) para Cu1 y Cu2 respectivamente. Estas distancias son similares a las observadas en otros complejos con sulfonamidas estudiados. La distancia Cu1-Cu2 es de 2,7043(17) Å. Los datos obtenidos para los ángulos de enlace en el entorno de cada átomo de cobre llevan a pensar en una geometría plano cuadrada ligeramente distorsionada (tabla 5.11).

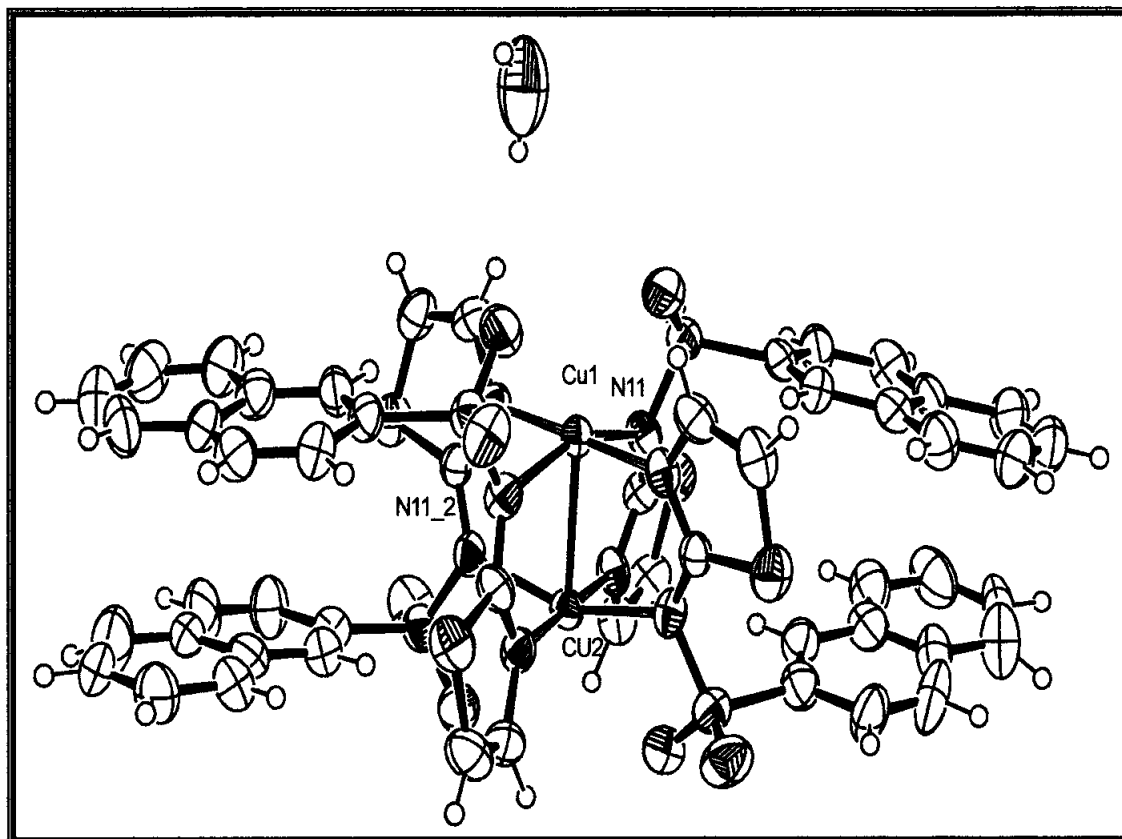


Figura 5.5.- Estructura cristalina del complejo  $[Cu_2(tz-naf)_4]$

Tabla 5.11.- Distancias y ángulos de enlace seleccionados

DISTANCIAS DE ENLACE (Å)		ÁNGULOS DE ENLACE (°)			
Cu(1)-N(22)#1	1,958(6)	N(22)#1-Cu(1)-N(22)	179,1(4)	N(12)-Cu(2)-N(12)#1	179,0(4)
Cu(1)-N(22)	1,958(6)	N(22)#1-Cu(1)-N(11)	87,1(2)	N(12)-Cu(2)-N(21)#1	88,5(2)
Cu(1)-N(11)	2,084(5)	N(22)-Cu(1)-N(11)	92,7(2)	N(12)#1-Cu(2)-N(21)#1	91,7(2)
Cu(1)-N(11)#1	2,084(5)	N(22)#1-Cu(1)-N(11)#1	92,7(2)	N(12)-Cu(2)-N(21)	91,7(2)
Cu(1)-Cu(2)	2,7043(17)	N(22)-Cu(1)-N(11)#1	87,1(2)	N(12)#1-Cu(2)-N(21)	88,5(2)
Cu(2)-N(12)	1,950(5)	N(11)-Cu(1)-N(11)#1	156,1(3)	N(21)#1-Cu(2)-N(21)	157,0(3)
Cu(2)-N(12)#1	1,950(5)	N(22)#1-Cu(1)-Cu(2)	89,53(19)	N(12)-Cu(2)-Cu(1)	90,48(18)
Cu(2)-N(21)#1	2,063(5)	N(22)-Cu(1)-Cu(2)	89,53(19)	N(12)#1-Cu(2)-Cu(1)	90,48(18)
Cu(2)-N(21)	2,063(5)	N(11)-Cu(1)-Cu(2)	78,07(16)	N(21)#1-Cu(2)-Cu(1)	78,50(16)
		N(11)#1-Cu(1)-Cu(2)	78,07(16)		

### 5.3.- CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y SOLUBILIDAD

Los complejos obtenidos son coloreados (amplia gama de verdes y marrones oscuros y de color morado) y de aspecto cristalino. No son sensibles a la luz ni al aire. La solubilidad de los compuestos ha sido ensayada de forma cualitativa a T<sup>a</sup> ambiente y a 60 °C. Los disolventes utilizados han sido los mismos que los usados en los ensayos de solubilidad de los ligandos en el capítulo 3.

Se observa, en general, que estos complejos de cobre son bastante insolubles en todos los disolventes ensayados H<sub>2</sub>O, acetona, etanol, metanol, THF, DMSO, DMF y propilen carbonato, destacando, especialmente, el carácter hidrofóbico de los complejos. También observamos, al igual que para los complejos de manganeso que la solubilidad aumenta cuando aumentamos la temperatura del ensayo hasta 60°C.

## **5.4.- ESPECTROSCOPIA INFRARROJA**

### **5.4.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tomando en consideración las frecuencias encontradas en la bibliografía y por comparación con los espectros IR de los ligandos, se ha llevado a cabo la interpretación de los espectros.

**Tabla 5.12.- Bandas características de los espectros infrarrojos de los complejos**

Complejo	$\nu(\text{heterocicl})^*$	$\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$	$\nu(\text{SO}_2)_s$	$\nu(\text{S-N})$
Cu(smtz) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1434	1289-1275 <sup>d</sup>	1143	934
[Cu(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ]	1446	1282	1139	919
Cu(smtz) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1451	1278	1144	922
Cu(smtz) <sub>2</sub> (4-metilimH) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1434	1288-1274 <sup>d</sup>	1143	932
Cu(smtzn) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1594	1270-1255	1127	983
[Cu(smtzn)(imH)](NO <sub>3</sub> )·½H <sub>2</sub> O	1591	1283	1156-1136 <sup>d</sup>	978
Cu(smtzn) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1579-1562 <sup>d</sup>	1263	1144-1124 <sup>d</sup>	975
[Cu(smtzn)(4-metilimH)](NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	1592	1283	1150-1133 <sup>d</sup>	978
[Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ]	1471	1322	1140	948
Cu(tz-tol) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1452	1280-1251 <sup>d</sup>	1139	951
Cu(tz-tol) <sub>2</sub> (4-metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1455	1258	1131	956
[Cu <sub>2</sub> (tz-ben) <sub>4</sub> ]	1468	1302-1290 <sup>d</sup>	1143	950
Cu(tz-ben) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub>	1450-1438 <sup>d</sup>	1227	1123	954
Cu(tz-ben) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub>	1449	1265	1138	949
[Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ]	1467	1322,1298	1144,1123	957,936
Cu(tz-naf) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1459	1257-1249 <sup>d</sup>	1143,1113	963,938

$\nu(\text{heterocicl})^* = \nu(\text{pirimidina})$  para los complejos de sulfametazina;  $\nu(\text{tiadiazol})$  para los complejos de sulfametizol;  $\nu(\text{tiazol})$  para los complejos de Htz-tol, Htz-ben y Htz-naf;

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida; Htz-ben = *N*-(tiazol-2-il)benzenosulfonamida; Htz-naf = *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida; <sup>d</sup> = doblete

Centraremos el estudio de los espectros de los complejos en el análisis de las bandas correspondientes a los grupos característicos de los ligandos que quedan recogidos en el capítulo 3.

La banda correspondiente al grupo tiazol ( $\nu(\text{tiazol})$ ), sufre un desplazamiento significativo en los complejos hacia frecuencias más bajas ( $1547\text{-}1510\text{ cm}^{-1}$  para los distintos ligandos hasta  $1471\text{-}1438\text{ cm}^{-1}$  para los complejos). Para algunos de los complejos esta banda se desdobra apareciendo un doblete. En cuanto a los complejos de sulfametizol, la banda correspondiente al grupo tiadiazol ( $\nu(\text{tiadiazol})$ ), también se desplaza hacia menores frecuencias de vibración (desde  $1547\text{ cm}^{-1}$  para el sulfametizol hasta  $1451\text{-}1434\text{ cm}^{-1}$  para los complejos). El desplazamiento observado se debe, principalmente, a que en el ligando se produce la desprotonación del grupo sulfonamido lo que provoca una deslocalización de la carga a través del anillo de tiazol o el anillo tiadiazol responsable de las modificaciones observadas en el espectro IR.<sup>39,42</sup>

Para los complejos de sulfametazina, en general se observa que la banda característica del grupo pirimidínico ( $\nu(\text{pirimidina})$ ), alrededor de  $1590\text{ cm}^{-1}$ ,<sup>40</sup> no sufre modificaciones significativas con respecto al ligando.

Respecto a la vibración asimétrica  $\nu(\text{SO}_2)_{\text{as}}$  se observa que:

- en los complejos de Hsmtz y Hsmtzn, esta banda se desplaza, significativamente, hacia frecuencias menores.
- los complejos de Htz-tol, Htz-ben y de Htz-naf, presentan esta banda ligeramente modificada hacia menores frecuencias excepto los dímeros que no presentan desplazamiento.

En cuanto a la vibración simétrica  $\nu(\text{SO}_2)_{\text{s}}$  se observa que :

- para los complejos de Hsmtzn, esta banda se desplaza hacia frecuencias menores o se desdobra.
- en los complejos de Hsmtz en general no se observan modificaciones de esta banda y en el caso de darse son ligeras lo cual está de acuerdo con los datos encontrados en complejos de este mismo ligando sintetizados con anterioridad por nuestro grupo de investigación.<sup>39</sup>

- para los complejos de Htz-tol, Htz-ben y Htz-naf no se observan prácticamente modificaciones para esta banda.

En relación con la banda de vibración  $\nu(\text{S-N})$  del grupo sulfonamido podemos decir al igual que ocurría con los complejos de manganeso, que existen, en algunos casos, significativos desplazamientos hacia frecuencias mayores, mientras que otros complejos no presentan prácticamente desplazamiento. El desplazamiento hacia mayores frecuencias podría atribuirse a una reducción en la distancia del enlace S-N del grupo sulfonamido en los distintos complejos respecto a sus respectivos ligandos provocada por la desprotonación de dicho grupo.<sup>20, 42, 43</sup>

Además de estas bandas, debemos señalar que existen otras bandas, entre 3400-3100  $\text{cm}^{-1}$ , que pertenecen a los grupos  $\text{NH}_2$  de la sulfonamida y N-H imidazol (sobre 3200-3100  $\text{cm}^{-1}$ ).<sup>37,21</sup>

También señalar la existencia, en los complejos  $[\text{Cu}(\text{smtzn})(\text{imH})](\text{NO}_3) \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Cu}(\text{smtzn})(4\text{-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$ , de las bandas correspondientes al grupo nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Esta banda hacia 1380  $\text{cm}^{-1}$  viene a indicarnos que este grupo se encuentra como grupo iónico y actúa como contraión.<sup>72</sup>

En resumen, los espectros IR de los complejos muestran variaciones importantes en las vibraciones del anillo tiazol, en las vibraciones asimétricas y simétricas del grupo  $\text{SO}_2$  y en las vibraciones del grupo S-N. Estas variaciones están de acuerdo con la desprotonación del grupo sulfonamido y la coordinación de dicho grupo y/o del grupo tiazol o tiadiazol.

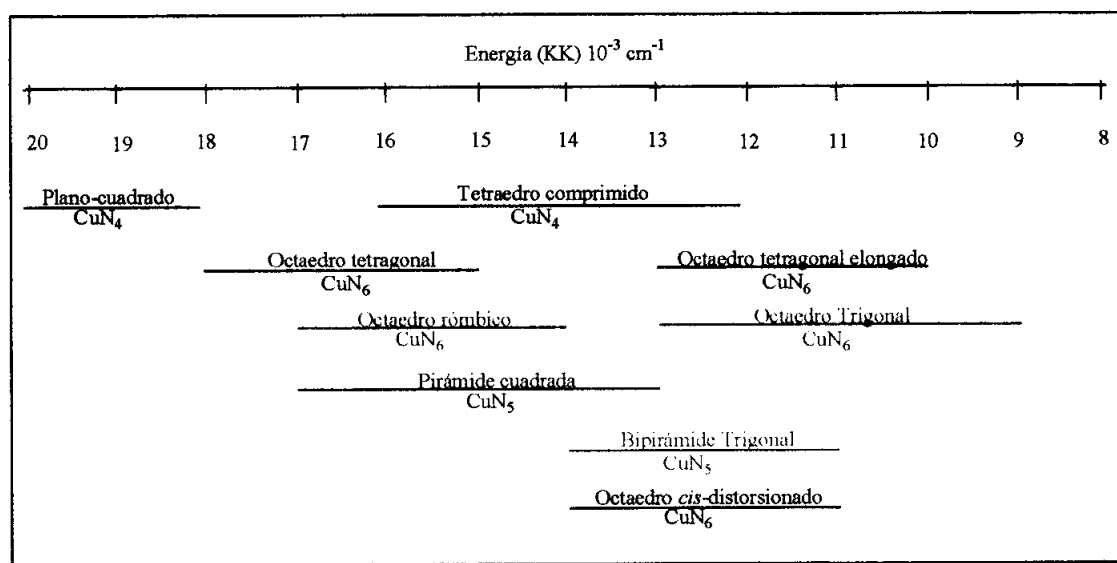
## **5.5.- REFLECTANCIA DIFUSA**

### **5.5.1.- ESPECTROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA Cu(II)**

Para los complejos de Cu(II), a los cuales nos dedicamos en este capítulo, éstos presentan diferentes tipos de transiciones electrónicas en el rango entre 30.000 y 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (333-2500 nm).<sup>73</sup>

- 1) *d-d*
- 2) de transferencia de carga
- 3) internas de ligando
- 4) combinaciones y vibraciones armónicas de los ligandos en el IR cercano
- 5) transiciones de transferencia de carga intervalencia

Es sabido que el espectro electrónico de los complejos varía con su estereoquímica aunque no solo depende de ella. Existe una correlación aproximada entre el rango de frecuencias en el que aparecen las bandas y las distintas estereoquímicas. Esta correlación se muestra en la figura 5.6:



**Figura 5.6.- Correlación de los rangos de energía para las transiciones *d-d* para las diferentes estereoquímicas**

Los sistemas de Cu(II) con estereoquímica plano cuadrada o próxima a ella no tiene absorción electrónica por debajo de  $10000\text{ cm}^{-1}$  (1000 nm).

Los complejos tetraédricos o próximos a esta estequiometría absorben principalmente en la región del rojo e infrarrojo cercano y no deben presentar máximos de absorción en la zona de  $10000\text{ a }20000\text{ cm}^{-1}$  (1000-1500 nm) aunque la distorsión puede provocar la presencia de bandas en esta zona.

Los complejos pentacoordinados pueden aparecer fundamentalmente con dos tipos de geometría: pirámide de base cuadrada y bipirámide trigonal. En el caso de la bipirámide trigonal, para un cromóforo  $\text{CuN}_5$  se ha propuesto<sup>74</sup> un espectro electrónico

que presenta varios picos desde  $10500\text{ cm}^{-1}$  (952 nm) hasta  $14600\text{ cm}^{-1}$  (685 nm) apareciendo las mayores intensidades de absorción en los picos cuyos máximos se extienden desde  $11400$  y  $15000\text{ cm}^{-1}$  (877 a 666 nm), pero con las mayores intensidades de absorción a las más altas energías.

En el caso de la pirámide cuadrada el espectro electrónico presenta los picos en el rango de frecuencias entre  $13000$ - $17000\text{ cm}^{-1}$  (769-588 nm).

Con índice de coordinación seis la geometría más frecuentemente obtenida es el octaedro. Dado que el estado fundamental en un campo octaédrico es el término inestable  $2e_g$ , por el efecto Jahn-Teller existen muy pocos complejos octaédricos regulares. La separación entre los orbitales  $e_g$  y  $t_{2g}$  en un octaedro regular varía en el Cu(II) desde  $13000\text{ cm}^{-1}$  (769 nm) para un cromóforo  $\text{CuO}_6$  hasta  $18000\text{ cm}^{-1}$  (555 nm) para un cromóforo  $\text{CuN}_6$ . En las estructuras distorsionadas, sin embargo, se pueden esperar varias bandas de absorción en esas regiones, correspondiendo a transiciones desde los componentes de  $t_{2g}$  hasta  $e_g$  de forma que  $d_{z^2}$  se encuentra desde  $6000$  hasta  $15000\text{ cm}^{-1}$  (1666 hasta 666 nm) por debajo de  $d_{x^2-y^2}$  dando lugar a una absorción de ese orden de energías. A mayor tetragonalidad aparecen dos bandas, una que engloba las transiciones  $d_{xy}-d_{x^2-y^2}$  y  $d_{yz}, d_{xz}-d_{x^2-y^2}$  y otra correspondiente a la transición  $d_{z^2}-d_{x^2-y^2}$ .

Considerando lo anteriormente expuesto hay que tener en cuenta que las asignaciones estereoquímicas basadas en espectros de reflectancia difusa se pueden considerar provisionales, hasta que se confirmen con alguna otra técnica como R-X, o en su defecto, espectroscopia de espín electrónico.

Los complejos de Cu(II) presentan un amplio rango de estereoquímicas haciendo difícil la identificación de la estructura usando la espectroscopia electrónica como único instrumento.

### 5.5.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los espectros de los complejos presentan los siguientes máximos de absorción. El estudio de los datos obtenidos nos ha permitido discutirlos para intentar establecer las diferentes estequiometrías que presentan los complejos obtenidos.

En la tabla 5.13 se indican los máximos de absorción y las diferentes geometrías propuestas para los complejos:

**Tabla 5.13.- Bandas de los espectros electrónicos, transiciones asignadas y geometrías propuestas para los complejos**

Complejo	Bandas cm <sup>-1</sup> (nm)	Transición	Geometrías propuestas
Cu(smtz) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	22935 (436) 17240 (580)	TC <i>d-d</i>	Octaédrica
[Cu(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ]	24390 (410) 18181 (550)	TC <i>d-d</i>	Plano-cuadrada
Cu(smtz) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	23696 (422) 15576 (642)	TC <i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. distors.
Cu(smtz) <sub>2</sub> (4-metilimH) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	24937 (401) 15625 (640)	TC <i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. distors.
Cu(smtzn) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	18416 (543)	<i>d-d</i>	Plano-cuadrada
[Cu(smtzn)(imH)](NO <sub>3</sub> )·½H <sub>2</sub> O	13477 (742)	<i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. distors.
Cu(smtzn) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	25974 (385) 18868 (530)	TC <i>d-d</i>	Plano-cuadrada /Pirám. Cuadr.
[Cu(smtzn)(4-metilimH)](NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	24691 (405) 14005 (714)	TC <i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. distors.
[Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ]	19609 (510)	<i>d-d</i>	Plano Cuadrada
Cu(tz-tol) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	24691 (405) 16181 (618)	TC <i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. Distors.
Cu(tz-tol) <sub>2</sub> (4-metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	25000 (400) 17921 (558)	TC <i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. Distors.
[Cu <sub>2</sub> (tz-ben) <sub>4</sub> ]	19762 (506)	<i>d-d</i>	Plano Cuadrada
Cu(tz-ben) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub>	25062 (399) 16590 (602)	TC <i>d-d</i>	Octaédrica distorsionada
Cu(tz-ben) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub>	15625 (640)	<i>d-d</i>	Pirám. Cuadr./ Octaédr. distors.
[Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ]	19960 (501)	<i>d-d</i>	Plano Cuadrada
Cu(tz-naf) <sub>2</sub> ( <i>N</i> -metilimH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	24937 (401) 17301 (578)	TC <i>d-d</i>	Octaedrica distorsionada

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = *N*-(tiazol-2-il) toluenosulfonamida;  
Htz-ben = *N*-(tiazol-2-il) bencenosulfonamida; Htz-naf = *N*-(tiazol-2-il) naftalenosulfonamida

El estudio de los espectros de Reflectancia Difusa nos han llevado a proponer una serie de geometrías de acuerdo con estos espectros.

Los complejos de Cu(II) obtenidos presentan diversa estereoquímica, obteniéndose, sobretodo, complejos con geometría plano-cuadrada, octaédrica y de pirámide cuadrada, que, por otro lado, son las geometrías habitualmente adoptadas por un ión d<sup>9</sup> como es el Cu(II).



Los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$  se caracterizan por presentar una única banda intensa sobre  $19000 \text{ cm}^{-1}$ . Esta banda corresponde a una transición  $d-d$  y su posición es característica de una geometría plano-cuadrada, lo cual está de acuerdo con los datos obtenidos de su estructura cristalina.

## **5.6.- RESONANCIA PARAMAGNÉTICA ELECTRÓNICA**

### **5.6.1.- ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA PARAMAGNÉTICA PARA Cu(II)**

El ión Cu(II), con una configuración  $d^9$ , tiene un espín efectivo de  $s = 1/2$  y asociado a un momento angular  $m_s = + 1/2$ , provocando un estado de espín doblemente degenerado en ausencia de un campo magnético. En un campo magnético, esta degeneración se pierde y la diferencia de energía entre dos estados viene dada por:

$$E = h\nu = g\beta H$$

donde  $h$  es la constante de Planck,  $\nu$  es la frecuencia,  $g$  es el factor de desplazamiento de Lande (igual a 2,003 para el electrón libre),  $\beta$  es el magnetón de Bohr electrónico y  $H$  es el campo magnético. Para campos magnéticos normales (de aproximadamente 3500 G) la frecuencia de resonancia está en la región de las microondas de la banda X ( $10^4$  MHz), desde aquí la absorción se realiza usando la región de microondas.

Para el cobre (II) libre hay también una interacción con el campo magnético debido al momento angular orbital  $L$  del electrón, y la interacción total es:

$$E = (2,003 S + L) H$$

La degeneración orbital se pierde por el campo cristalino y el momento orbital angular se dice que se anula para el estado fundamental de los complejos de cobre (II). El acoplamiento espín-órbita mezcla con el estado fundamental algunos momentos angulares de ciertos estados excitados, la extensión de las cuales se refleja en la modificación del factor  $g$  de desdoblamiento de Lande.

En el caso del octaedro regular el valor del factor  $g$  es isotrópico y mayor que el valor de 2,003 que corresponde al ión libre. Se halla incrementado en  $6r^2\lambda/\Delta$  donde  $\Delta$  es

la energía de desdoblamiento de campo cristalino, el valor de  $\lambda$  del ión libre es  $-0,829$  kK ( $1 \text{ kK} = 10000 \text{ cm}^{-1}$ ) y  $r$  mide la combinación de la reducción del momento angular orbital y la constante de acoplamiento en el complejo respecto a los valores correspondientes en el ión libre. Está influenciado por factores como enlace covalente y deslocalización electrónica de los átomos de ligando al ión cobre (II). Los valores típicos para el factor  $g$  isotrópico oscilan entre 2,10 y 2,13.

En los sistemas axiales los factores  $g$  son diferentes dependiendo de que el término fundamental sea  $d_{x^2-y^2}$  o  $d_{z^2}$ . En el primer caso,  $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,00$  y en el segundo caso,  $g_{\parallel} > g_{\perp} = 2,00$ .

En la práctica, el espectro RPE de los complejos de cobre (II) se representa como la primera derivada de curvas de absorción y en líneas generales las representaciones observadas se ilustran en la figura 5.7.

Los dos espectros axiales elongado y comprimido son claramente reconocibles y pueden ser usados como criterio para distinguir un estado fundamental  $d_{x^2-y^2}$  y  $d_{z^2}$  respectivamente, como señalan los valores numéricos de  $g$ .

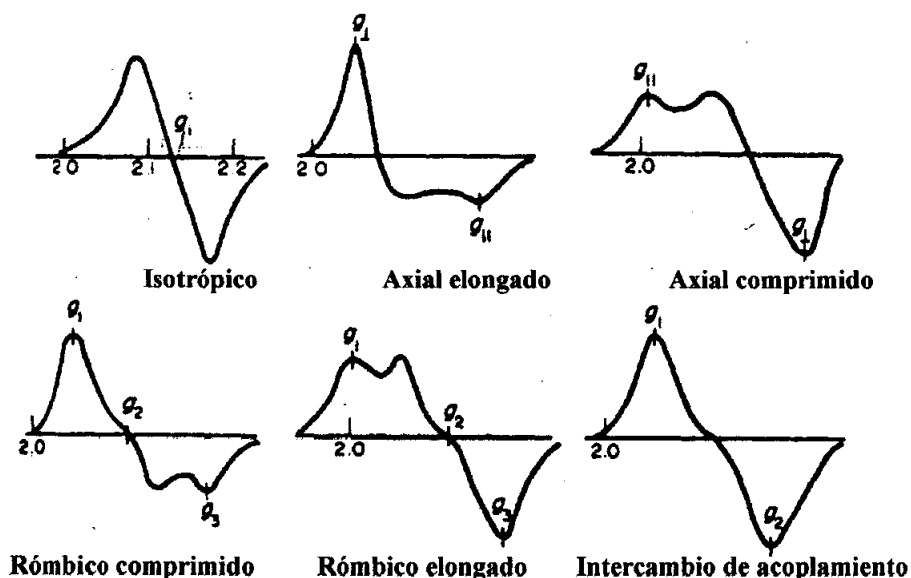


Figura 5.7.- Posibles formas de los espectros RPE de los complejos de Cu(II)

Se debe enfatizar que una interpretación simple de los espectros RPE sólo se aplica si todos los ejes del entorno local del ión cobre (II) están alineados paralelamente en la celda unidad. Para un entorno local rómbico las expresiones del factor  $g$  son más complicadas y se observan 3 factores  $g$  si todos los ejes moleculares están alineados paralelamente. En los sistemas rómbicos un estado  $d_{z^2}$  también desemboca en un valor de  $g$  bajo (menor de 2,003), pero nunca tan bajo como en los sistemas axiales. Consecuentemente un estado  $d_{z^2}$  no es tan claramente reconocible en un sistema rómbico como un sistema axial.<sup>74</sup>

### 5.6.2.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las tablas 5.14, 5.15 y 5.16 se recogen los parámetros de los espectros de resonancia paramagnética de los distintos complejos. Para el estudio de estos espectros, los complejos han sido agrupados de acuerdo con la forma de los mismos.

**Tabla 5.14.- Parámetros de los espectros axiales**

Complejo	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$A_{\parallel}$ ( $\text{cm}^{-1} \times 10^{-4}$ )	$G$
$[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$	2,20	2,06	--	3,3
$\text{Cu}(\text{smtz})_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,24	2,03	170	8
$\text{Cu}(\text{smtz})_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2,20	2,02	195	10
$\text{Cu}(\text{smtzn})_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,28	2,05	150	5,6
$\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(N\text{-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,25	2,05	200	5
$\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,25	2,06	--	4,2
$\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(N\text{-metilimH})_2$	2,28(aprox)	2,06	--	4,7

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida;  
Htz-ben = *N*-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida

Los valores de  $G$  han sido calculados mediante la fórmula  $G = g_{\parallel} - 2/g_{\perp} - 2$ .<sup>75,76</sup> Para estos complejos, puesto que  $g_{\parallel} > g_{\perp} > 2,00$  el electrón desapareado del ión Cu(II) ocupará preferentemente el orbital  $d_{x^2-y^2}$ . El valor de  $g_{\parallel} < 2,30$ , indica un cierto carácter covalente en la interacción metal-ligando.<sup>77,78</sup> Así, los complejos  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$  y  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , son los que presentan mayor participación covalente.

La existencia de acoplamiento hiperfino ha permitido obtener el valor de  $A_{\parallel}$ . Bertini<sup>79</sup> sugiere que valores de  $A_{\parallel} > 160$  G indican una geometría octaédrica, tetragonal distorsionada o plano cuadrada distorsionada. Valores comprendidos entre 130-160 G corresponden a geometría pirámide cuadrada o bipirámide trigonal distorsionada. Los valores  $<$  de 130 G indican una geometría pseudo-tetraédrica. En este sentido se observa que los complejos  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(4\text{metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  presentan unos valores de  $A_{\parallel}$  de 170, 195 y 200 respectivamente por lo que podemos asignarles geometrías octaédricas distorsionadas. Para el complejo  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , un valor de  $A_{\parallel}$  de 150, sugiere una geometría pirámide cuadrada distorsionada.

**Tabla 5.15.- Parámetros de los espectros rómbicos**

Complejo	$g_1$	$g_2$	$g_3$	R
$[\text{Cu}(\text{smtzn})(\text{imH})](\text{NO}_3) \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$	2,06	2,14	2,20	0,75
$[\text{Cu}(\text{smtzn})(4\text{-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,06	2,13	2,21	0,88
$\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2,04	2,08	2,20	0,33
$\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{imH})_2$	2,03	2,08	2,28	0,25
$\text{Cu}(\text{tz-naf})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,04	2,08	2,32	0,17

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; Htz-ben= *N*-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida;  
Htz-naf= *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida

Para los espectros rómbicos, **R** ha sido calculado según la fórmula  $\mathbf{R} = (\mathbf{g}_2 - \mathbf{g}_1) / (\mathbf{g}_3 - \mathbf{g}_2)$ . Para sistemas con  $g_3 > g_2 > g_1$  el radio R indica el estado base del complejo. Si  $R > 1$  el estado base es predominantemente  $d_{z^2}$  mientras que el estado base es preferentemente  $d_{x^2-y^2}$  cuando el valor de R es  $< 1$ .<sup>23,80</sup>

En los complejos sintetizados, el estado fundamental presenta el electrón desapareado en el orbital del Cu(II)  $d_{x^2-y^2}$ , este hecho sugiere que las geometrías de los poliedros de coordinación deben ser pirámide cuadrada u octaedro rómbicamente distorsionadas.

**Tabla 5.16.- Parámetros de los espectros de los complejos dimeros**

Complejo	$g_{\parallel}$	$g_{\perp}$	$D(\text{cm}^{-1})$	$H_{z_1}(\text{calc})$	$H_{xy_1}(\text{calc})$	$H_{xy_2}(\text{calc})$	$H_{z_2}(\text{calc})$
$\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	2,31	2,05	2520	750(732)	1620(1638)	4482(4325)	5110(5101)
$[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$	2,28	2,02	2310	926(897)	1867(1819)	4331(4277)	4983(4961)
$[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$	2,19	2,00	2400	897(882)	1830(1804)	4455(4469)	5275(5270)
$[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$	2,30	2,03	2270	967(953)	1952(1893)	4290(4295)	4909(4905)

Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = *N*-(tiazol-2-il) toluenosulfonamida; Htz-ben = *N*-(tiazol-2-il) bencenosulfonamida; Htz-naf = *N*-(tiazol-2-il) naftalenosulfonamida

Como es bien sabido, las especies polinucleares de los complejos de metales de transición presentan unos espectros de RPE distintos a los de las especies mononucleares. En los espectros de especies dimeras de Cu(II) cabe esperar la presencia de numerosas señales. La interpretación de este tipo de espectros se describe utilizando el hamiltoniano de spín para el estado triplete de complejos de cobre dimetálicos:

$$H = g\beta BS + DS_z^2 + E(S_x^2 - S_y^2) - 2D/3$$

donde D y E son parámetros de desdoblamiento a campo cero y  $\beta$  es el magnetón de Bohr. Como mostró *Wasson et al.*,<sup>81</sup> dos transiciones permitidas por la regla de selección ( $\Delta m_s = \pm 1$ ) resultarán para cada dirección principal y por tanto se podrán determinar seis campos de resonancia. Los seis campos de resonancia son  $H_{x^1}$ ,  $H_{y^1}$ ,  $H_{z^1}$ ,  $H_{x^2}$ ,  $H_{y^2}$  y  $H_{z^2}$  cuyas ecuaciones fueron propuestas por *Wasserman et al.*<sup>82</sup> Cuando D es menor que  $h\nu$ , como sucede normalmente en los compuestos dimeros y  $E = 0$ , la solución al hamiltoniano de spín son cuatro transiciones permitidas ( $\Delta m_s = \pm 1$ ) para los campos de resonancia  $H_{z^1}$ ,  $H_{z^2}$ ,  $H_{xy^1}$  y  $H_{xy^2}$  dadas por las ecuaciones:<sup>83</sup>

$$h\nu = D - g_{\parallel}\beta H_{z^1} \qquad h\nu = -D + g_{\parallel}\beta H_{z^2}$$

$$h\nu = D/2 + [D^2/4 - (g_{\perp}\beta H_{xy^1})^2]^{1/2}$$

$$h\nu = -D/2 + [D^2/4 + (g_{\perp}\beta H_{xy^2})^2]^{1/2}$$

Además, las transiciones prohibidas ( $\Delta m_s = \pm 2$ ) vienen dadas por la ecuación:

$$H = (1/2)g\beta[(h\nu) - 4(D^2/3 + E^2)]^{1/2}$$

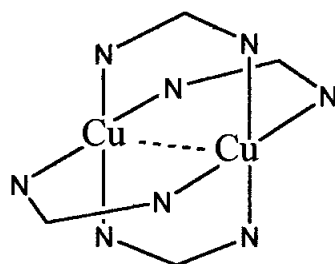
D se define como la suma de las contribuciones dipolo-dipolo y de intercambio según la expresión  $D_{\text{obs}} = D_{\text{dd}} + D_{\text{exc}}$ , donde  $D_{\text{dd}}$  cuantifica la interacción dipolo-dipolo y la  $D_{\text{exc}}$  indica la interacción de intercambio. El valor de  $D_{\text{dd}}$  tiene signo negativo y se determina a través de la expresión basada en un modelo dipolo puntual,  $R^3 = 0,65 g_{\parallel}^2 / D_{\text{dd}}$ , donde R es la distancia cobre-cobre.<sup>84</sup> Aplicando las ecuaciones anteriores se obtienen los valores de  $D_{\text{dd}}$  y  $D_{\text{exc}}$ . Puesto que  $D_{\text{exc}} = -2J[(g_{\parallel}-2)^2/4 - (g_{\perp}-2)^2]/8$ , se obtiene la energía de separación entre el estado fundamental singlete y el primer estado excitado.<sup>20</sup>

**Tabla 5.17.- Valores de  $D_{\text{dd}}$ ,  $D_{\text{exc}}$  y  $2J$  para los complejos dímeros**

Complejo	R (dist. Cu-Cu)(Å)	$D_{\text{dd}}(\text{cm}^{-1})$	$D_{\text{exc}}(\text{cm}^{-1})$	$2J(\text{cm}^{-1})$
Cu(smtzn) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	--	--	--	--
[Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ]	2,7224	0,167	0,398	(-162)
[Cu <sub>2</sub> (tz-ben) <sub>4</sub> ]	--	--	--	--
[Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ]	2,7043	0,174	0,401	(-148,5)

Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = *N*-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida; Htz-ben = *N*-(tiazol-2-il) bencenosulfonamida; Htz-naf = *N*-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida

Las estructuras cristalinas de los complejos [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>], [Cu<sub>2</sub>(tz-ben)<sub>4</sub>] y [Cu<sub>2</sub>(tz-naf)<sub>4</sub>] nos muestran que estos complejos presentan geometría plano-cuadrada. Con respecto al complejo Cu(smtzn)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, el espectro RPE pone claramente de manifiesto que se trata de un complejo dímero, por lo tanto debe formularse como Cu<sub>2</sub>(smtzn)<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O. Dado que el valor de D es similar al de los dímeros [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>], [Cu<sub>2</sub>(tz-ben)<sub>4</sub>] y [Cu<sub>2</sub>(tz-naf)<sub>4</sub>] y al complejo [Cu<sub>2</sub>(sulfatiazolato)<sub>4</sub>]<sup>21</sup> publicado anteriormente por nuestro grupo de investigación, consideramos que la estructura del complejo es similar a la de los complejos anteriores, proponiendo para este complejo la siguiente estructura:



**Figura 5.8.- Estructura propuesta para el complejo Cu<sub>2</sub>(smtzn)<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O**

## **5.7.- MOMENTOS MAGNÉTICOS**

### **5.7.1.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo con la bibliografía, los complejos de Cu(II) presentan valores de  $\mu_{\text{eff}}$  comprendidos entre 1,70-2,20 M.B.<sup>34</sup> Dado que el momento magnético cuando solo interviene la interacción de spin para un ión  $d^9$  es de 1,73 M.B., la aparición de valores más altos es debida a una pequeña contribución orbital consecuencia de que, bien el término fundamental (cuando la geometría es tetraédrica) o bien el término excitado (cuando la geometría es octaédrica) es un término T.

Los valores del momento magnético obtenidos para todos los complejos de Cu(II) a temperatura ambiente se muestran en la tabla 5.19. El momento magnético inferior a 1,70 M.B. en algunos complejos sugiere un cierto acoplamiento antiferromagnético entre los iones Cu(II).<sup>20</sup>

Dada la naturaleza dímica de los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$ , demostrada mediante la estructura cristalina o el estudio de los espectros RPE, se ha realizado un estudio de la variación de la susceptibilidad magnética de los mismos con la temperatura. Este estudio nos permitirá obtener el parámetro de interacción  $J$  entre los dos iones cobre y el valor de  $g$ . La interacción antiferromagnética conlleva un estado de spin-singlete y a un estado excitado de spin-triplete. Las susceptibilidades experimentales fueron ajustadas utilizando la expresión de Bleaney-Bowers:

$$\chi_M = Ng^2\beta^2 [kT[3 + \exp(-2J/kT)]]^{-1}(1-\rho) + \rho Ng^2\beta^2/4kT + \chi_{\text{TIP}}$$

donde se hicieron también correcciones para la impureza paramagnética ( $\rho$ ) en la muestra. Para los distintos complejos se consideraron diferentes valores de  $\chi_{\text{TIP}}$ . El ajuste por mínimos cuadrados de los puntos experimentales se realizó en rangos de temperaturas diferentes para cada complejo. Este ajuste permitió obtener los valores de  $2J$  para cada complejo, así como el valor de  $g$ .<sup>20</sup> La representación de los datos muestra en todos los casos un buen ajuste entre los datos experimentales y los calculados como

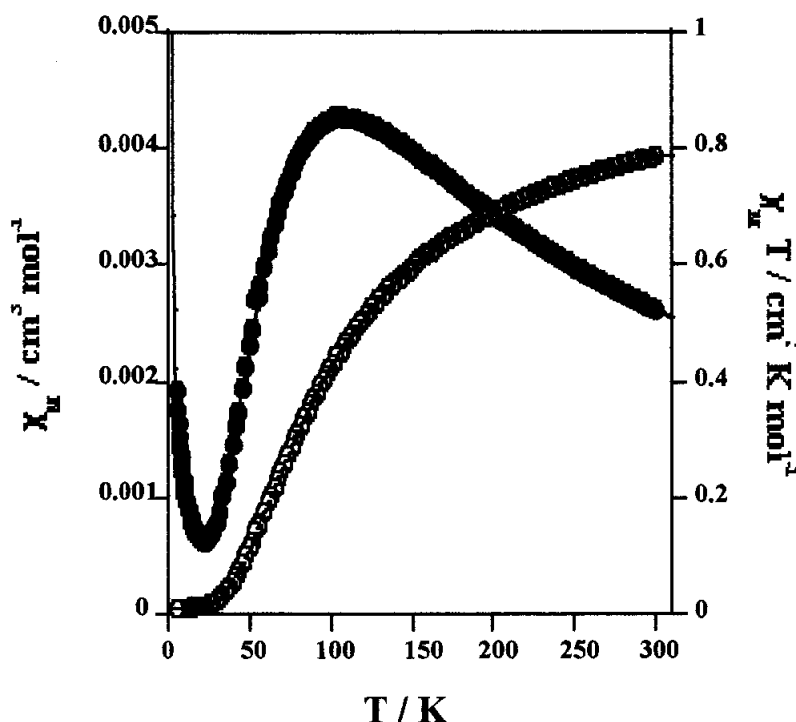
se observa en las figuras 5.9, 5.10 y 5.11 y por los valores de R. Todos estos parámetros han sido recogidos en la tabla 5.18.

**Tabla 5.18.- Valores de 2J para los complejos dimeros**

Complejo	Rango T°(K)	$\chi_{TIP}$	$\rho$	$g$	$2J$ (cm <sup>-1</sup> )	R
[Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ]	5,50-350,00	120·10 <sup>-6</sup>	0,022	2,19	-121,3	3,5·10 <sup>-5</sup>
[Cu <sub>2</sub> (tz-ben) <sub>4</sub> ]	2,00-300,00	120·10 <sup>-6</sup>	0,050	2,18	-114,1	1,2·10 <sup>-4</sup>
[Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ]	5,65-300,00	124·10 <sup>-6</sup>	0,006	2,13	-104,3	1,2·10 <sup>-4</sup>

Htz-tol = N-(tiazol-2-il) toluenosulfonamida; Htz-ben = N-(tiazol-2-il) benzenosulfonamida; Htz-naf = N-(tiazol-2-il) naftalenosulfonamida

Los valores de 2J obtenidos no coinciden con aquellos obtenidos a través del RPE. La diferencia entre los valores calculados y los experimentales puede deberse a las aproximaciones realizadas en las ecuaciones de RPE y al hecho de que el desplazamiento singlete-triplete no esté relacionado sólo con la interacción del canje. Los valores de g no difieren en exceso de los obtenidos a través del RPE mediante la expresión  $g_{av} = (g_{||} + 2g_{\perp})/3$  que son 2,13, 2,06 y 2,11 respectivamente.



**Figura 5.9.- Dependencia de  $\chi_M$  y  $\chi_M \cdot T$  frente a la temperatura para el complejo [Cu<sub>2</sub>(tz-tol)<sub>4</sub>]**



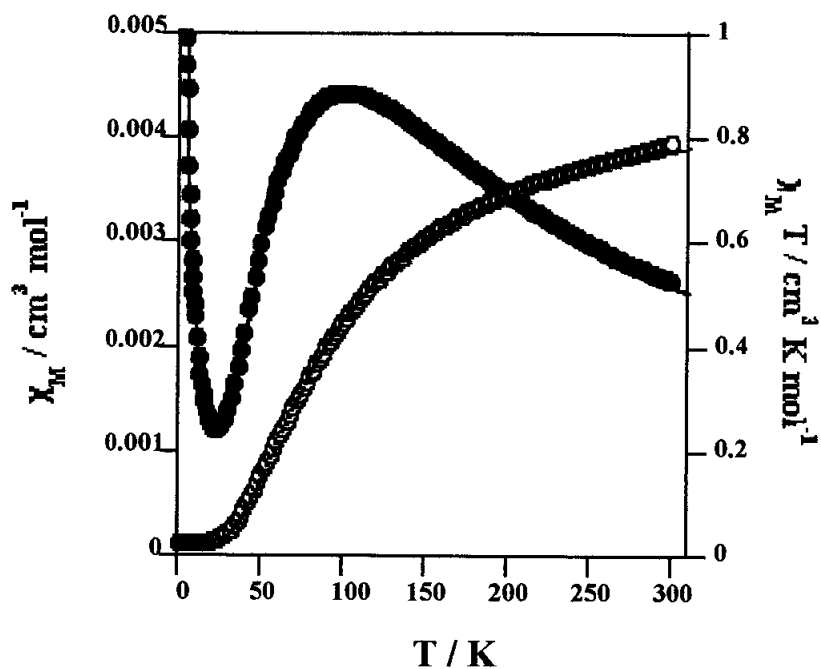


Figura 5.10.- Dependencia de  $\chi_M$  y  $\chi_M \cdot T$  frente a la temperatura para el complejo  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$

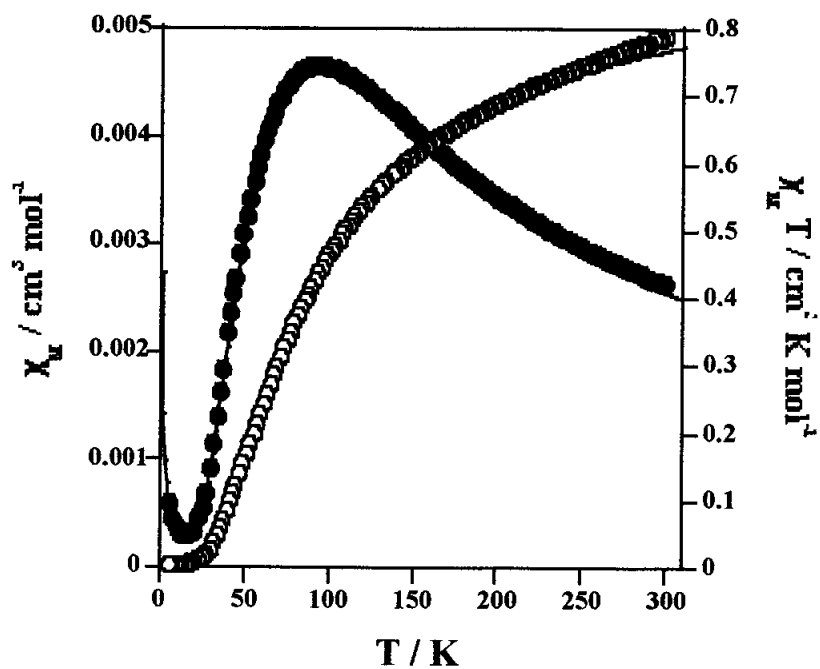


Figura 5.11.- Dependencia de  $\chi_M$  y  $\chi_M \cdot T$  frente a la temperatura para el complejo  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$

**Tabla 5.19.- Valores de susceptibilidad molar y momentos magnéticos de los complejos a T° ambiente**

Complejo	Susceptibilidad molar ( $\chi_M$ )	Momento magnético ( $\mu$ )(MB)
Cu(smtz) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,90·10 <sup>-6</sup>	1,68
[Cu(smtz) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub> ]	1,63·10 <sup>-6</sup>	1,70
Cu(smtz) <sub>2</sub> (N-metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,60·10 <sup>-6</sup>	1,74
Cu(smtz) <sub>2</sub> (4-metilimH) <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	1,58·10 <sup>-6</sup>	1,77
Cu <sub>2</sub> (smtzn) <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,60·10 <sup>-6</sup>	1,13
[Cu(smtzn)(imH)](NO <sub>3</sub> )·½H <sub>2</sub> O	2,50·10 <sup>-6</sup>	1,69
Cu(smtzn) <sub>2</sub> (N-metilimH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,53·10 <sup>-6</sup>	1,73
[Cu(smtzn)(4-metilimH)](NO <sub>3</sub> )·H <sub>2</sub> O	2,60·10 <sup>-6</sup>	1,77
[Cu <sub>2</sub> (tz-tol) <sub>4</sub> ]	1,85·10 <sup>-6</sup>	1,12
Cu(tz-tol) <sub>2</sub> (N-metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,81·10 <sup>-6</sup>	1,81
Cu(tz-tol) <sub>2</sub> (4-metilimH) <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,85·10 <sup>-6</sup>	1,83
[Cu <sub>2</sub> (tz-ben) <sub>4</sub> ]	2,50·10 <sup>-6</sup>	1,27
Cu(tz-ben) <sub>2</sub> (imH) <sub>2</sub>	1,81·10 <sup>-6</sup>	1,81
Cu(tz-ben) <sub>2</sub> (N-metilimH)	1,83·10 <sup>-6</sup>	1,82
[Cu <sub>2</sub> (tz-naf) <sub>4</sub> ]	2,14·10 <sup>-6</sup>	1,29
Cu(tz-naf) <sub>2</sub> (N-metilimH) <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1,55·10 <sup>-6</sup>	1,76

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina; Htz-tol = N-(tiazol-2-il)toluenosulfonamida; Htz-ben = N-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida; Htz-naf = N-(tiazol-2-il)naftalenosulfonamida

## 5.8.- APÉNDICE

### 5.8.1.- ESPECTROS IR

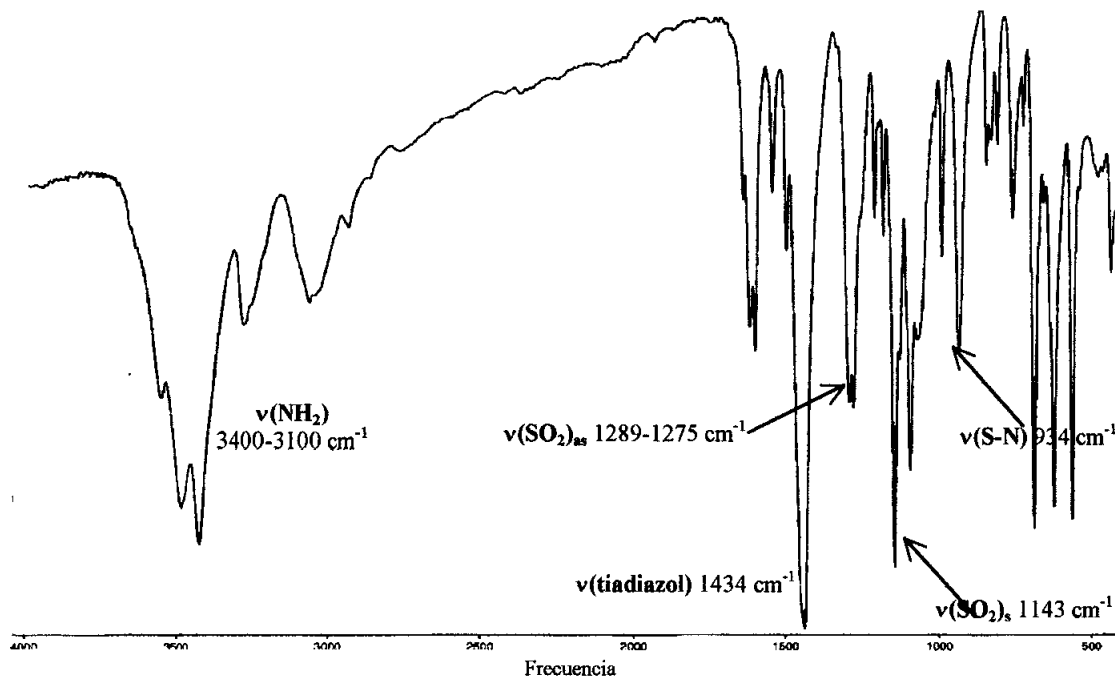


Figura 5.12.- Espectro IR de  $\text{Cu(smtz)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

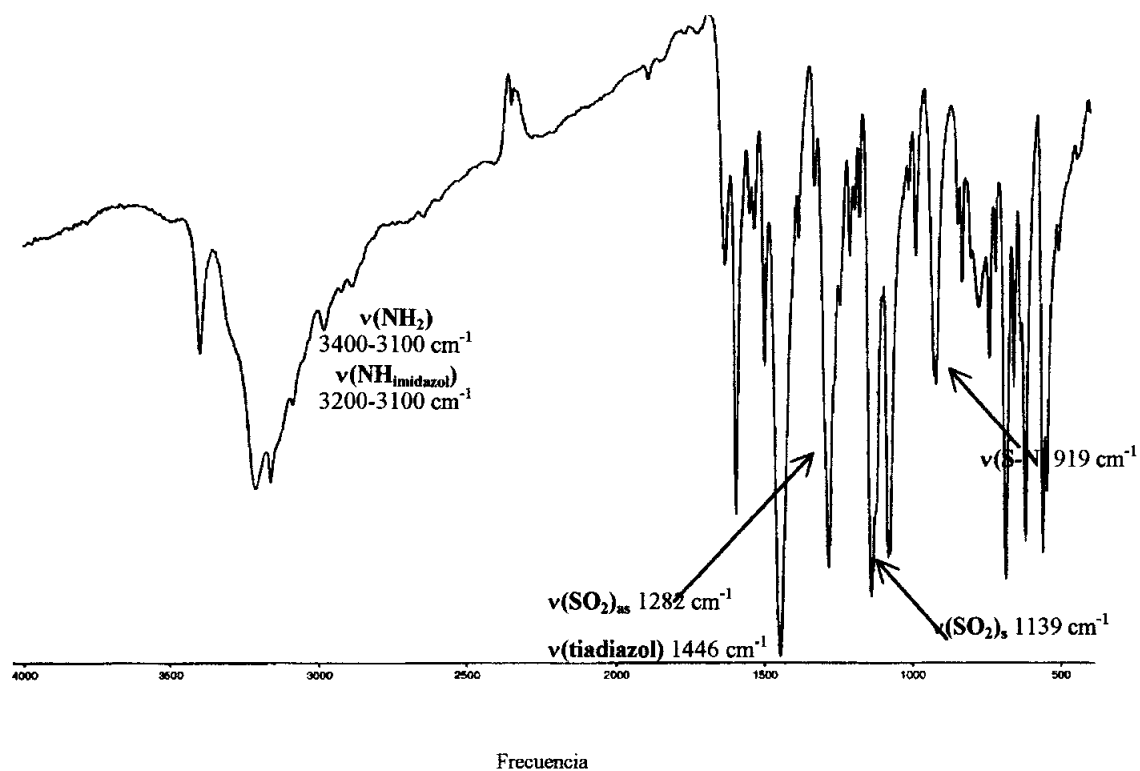


Figura 5.13.- Espectro IR de  $[\text{Cu(smtz)}_2(\text{imH})_2]$

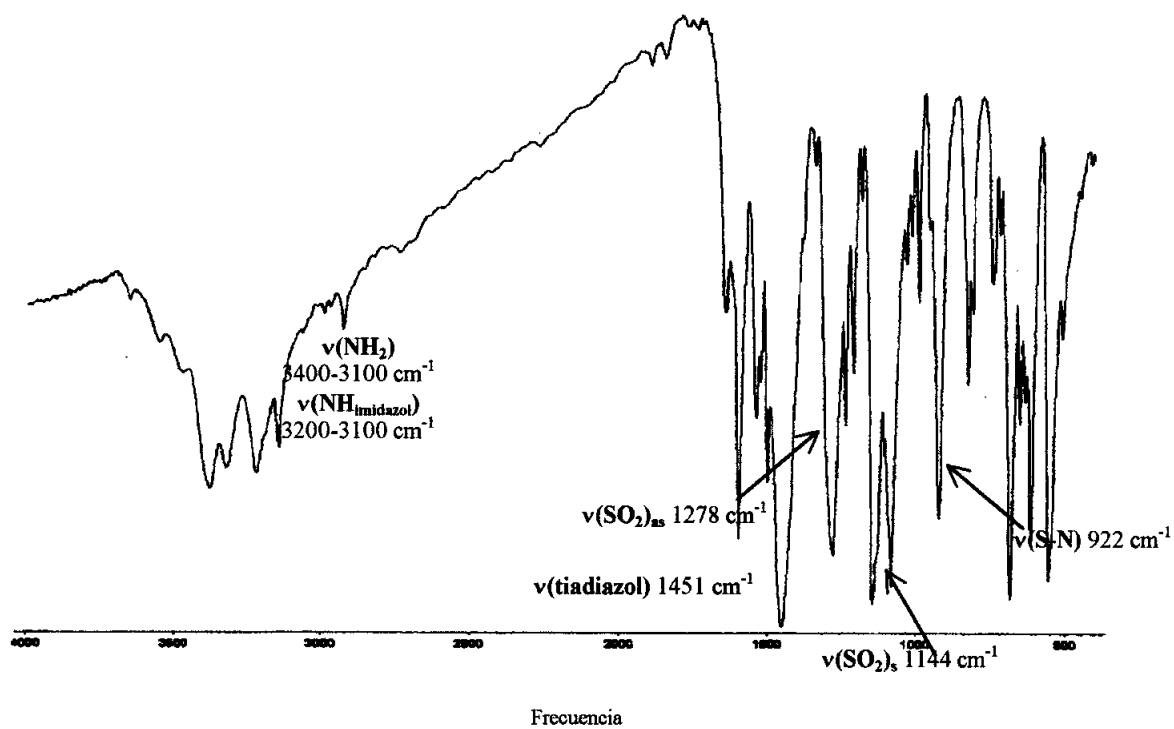


Figura 5.14.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

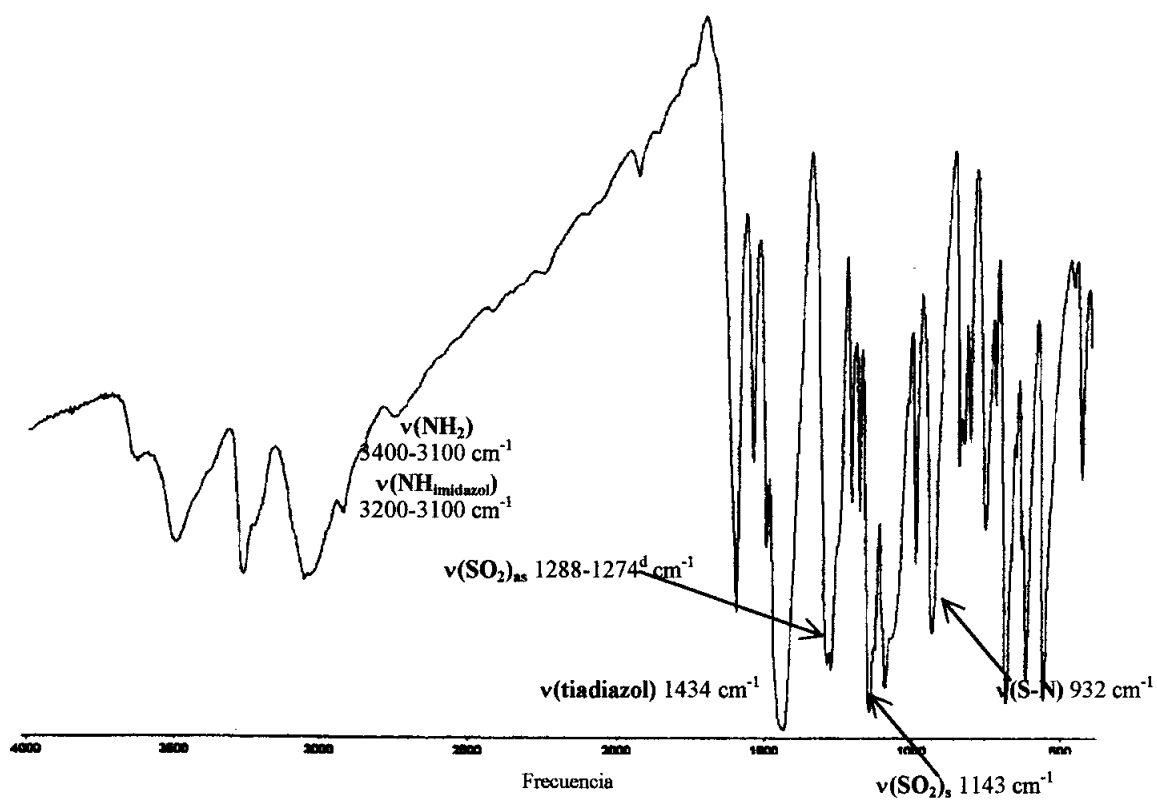


Figura 5.15.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{smtz})_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

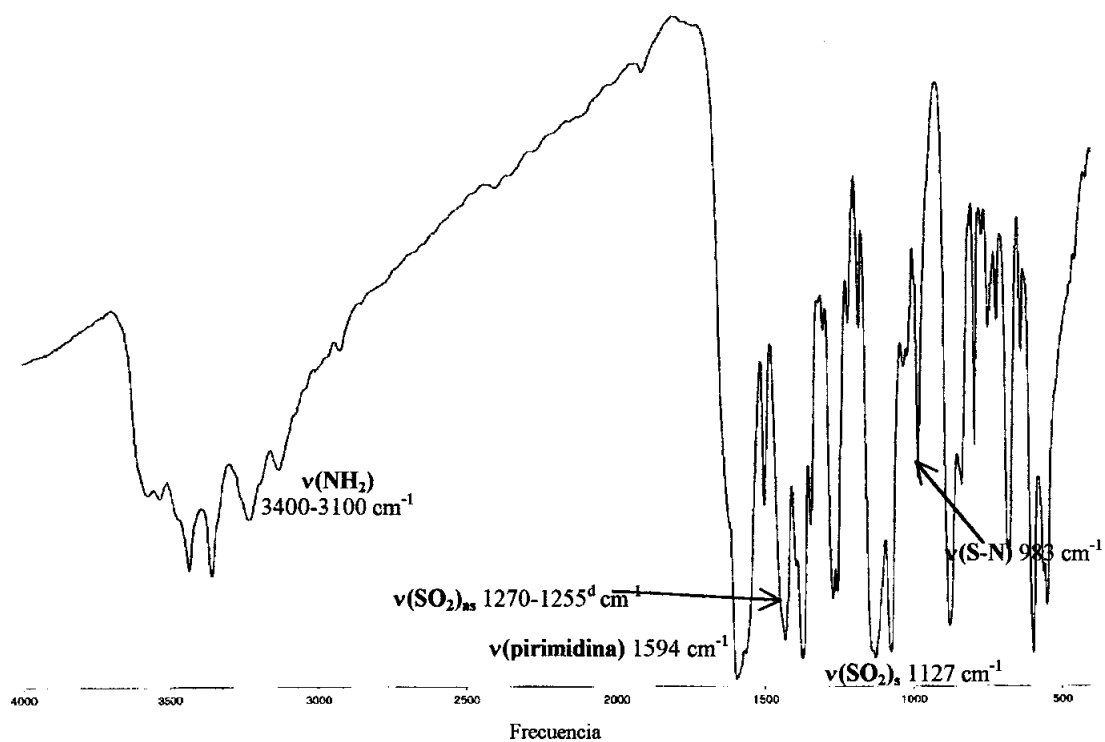


Figura 5.16.- Espectro IR de  $\text{Cu(smtzn)}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$

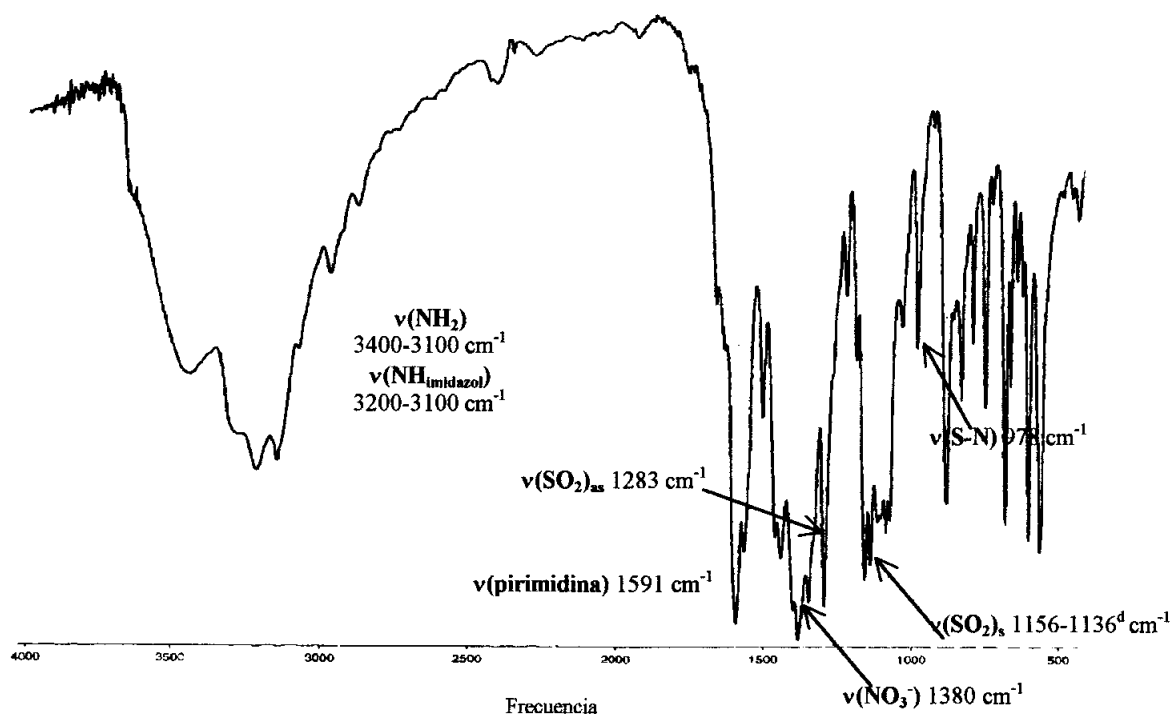


Figura 5.17.- Espectro IR de  $[\text{Cu(smtzn)(imH)}](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$

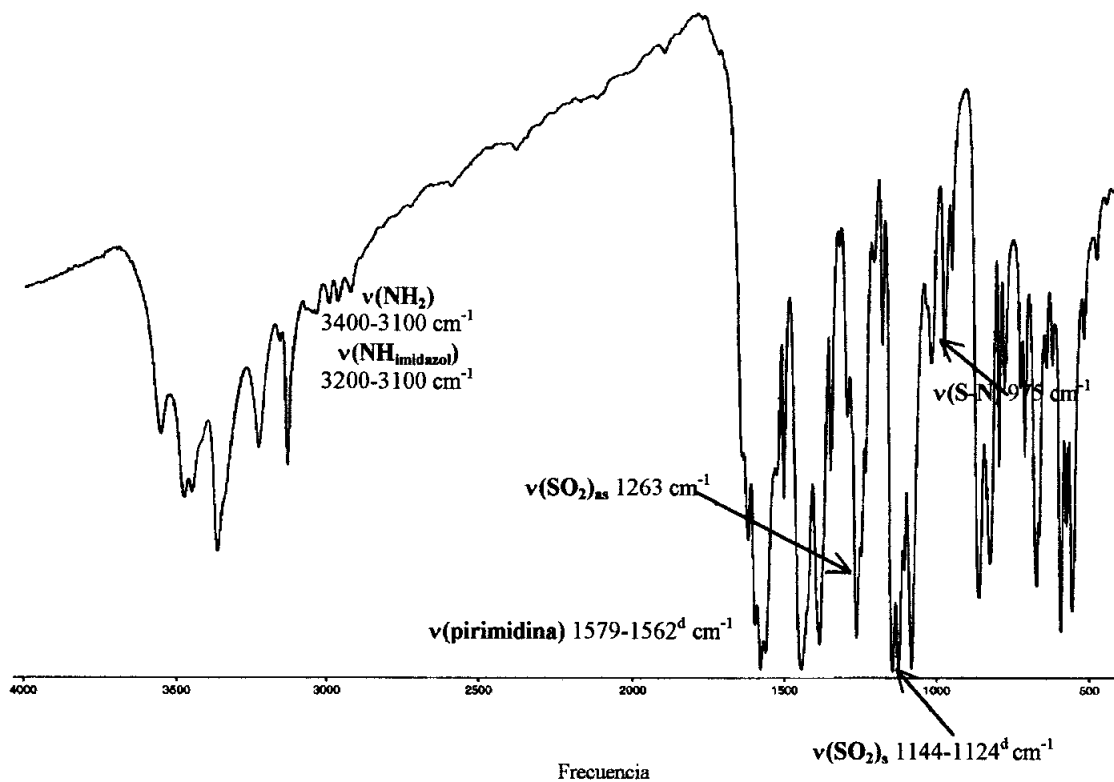


Figura 5.18.- Espectro IR de  $\text{Cu(smtzn)}_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

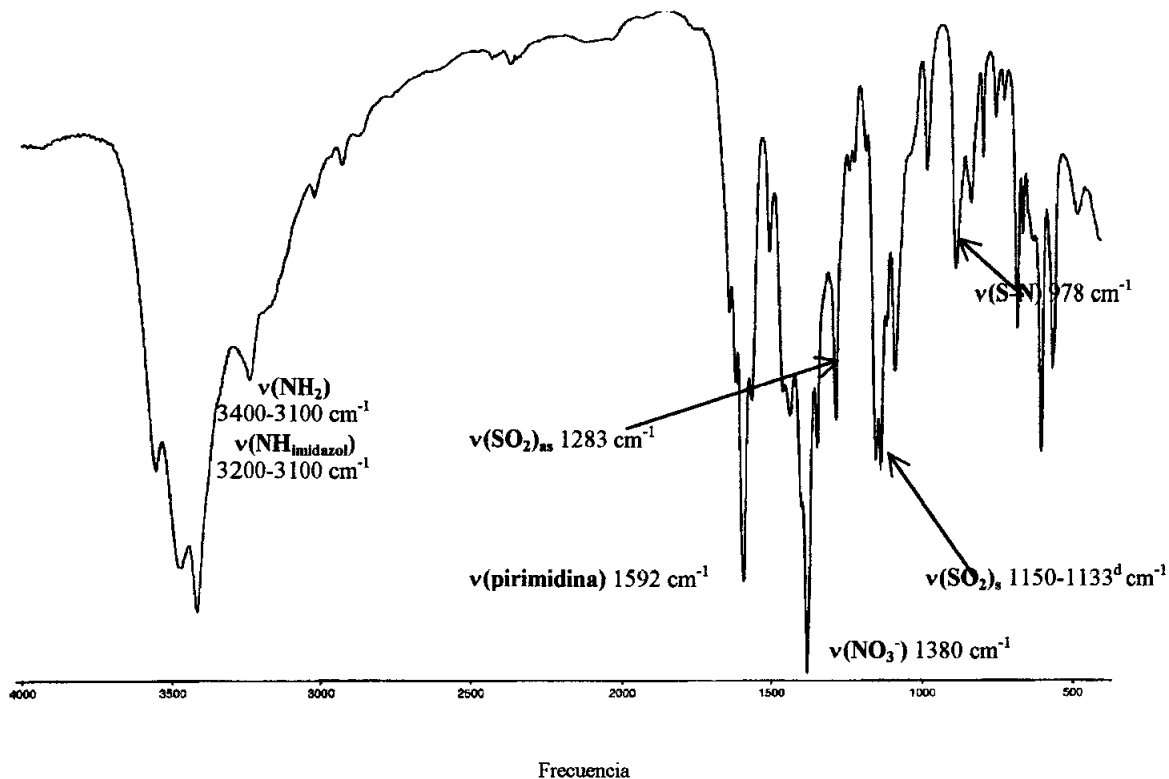


Figura 5.19.- Espectro IR de  $[\text{Cu(smtzn)}(\text{4-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$

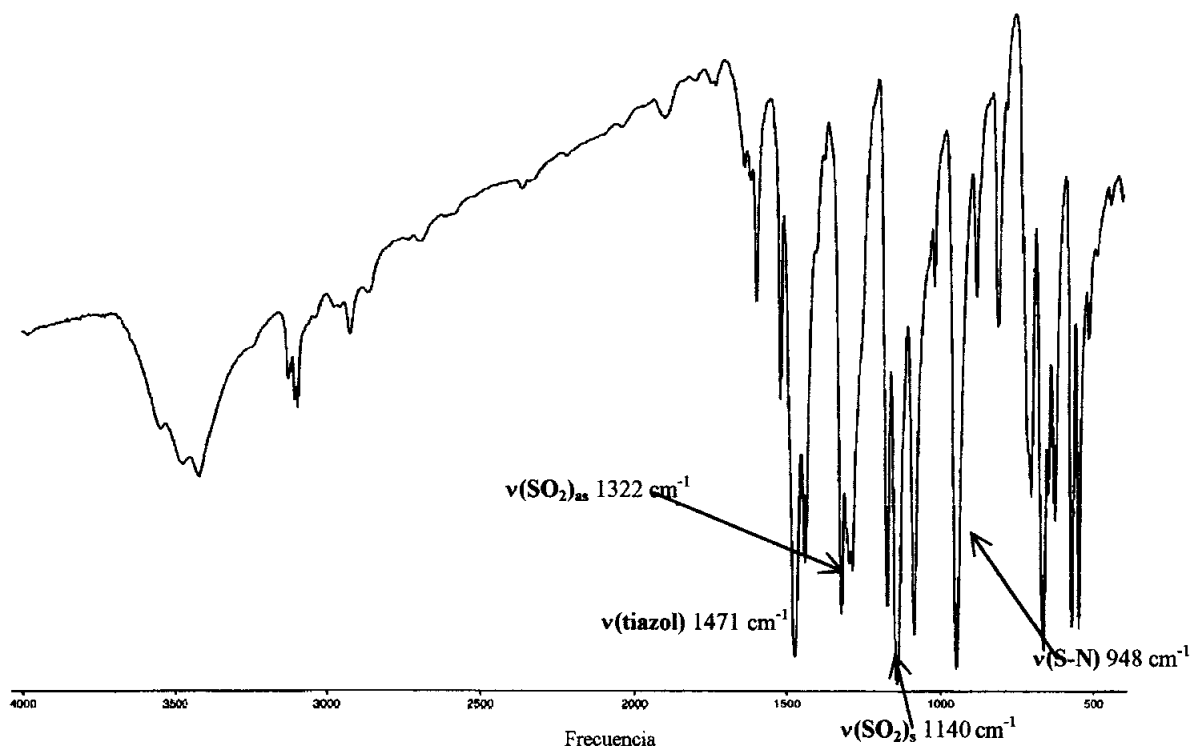


Figura 5.20.- Espectro IR de  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$

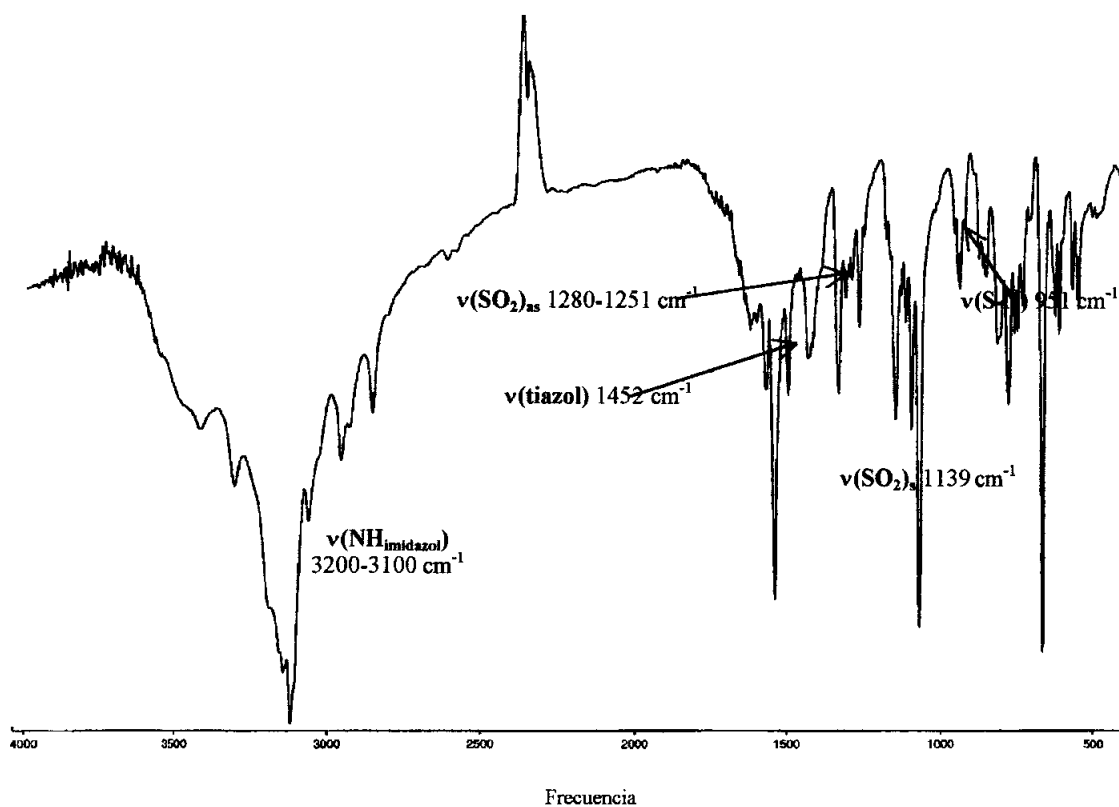


Figura 5.21.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(\text{N-metilimH})_2$

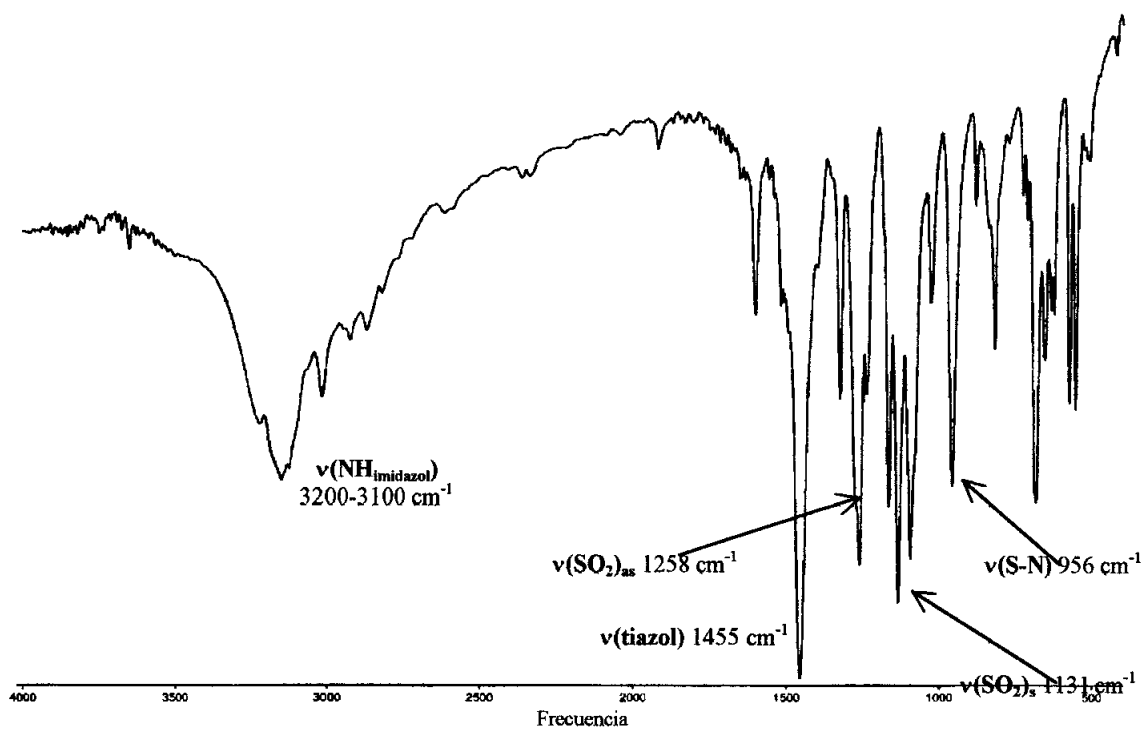


Figura 5.22.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2$

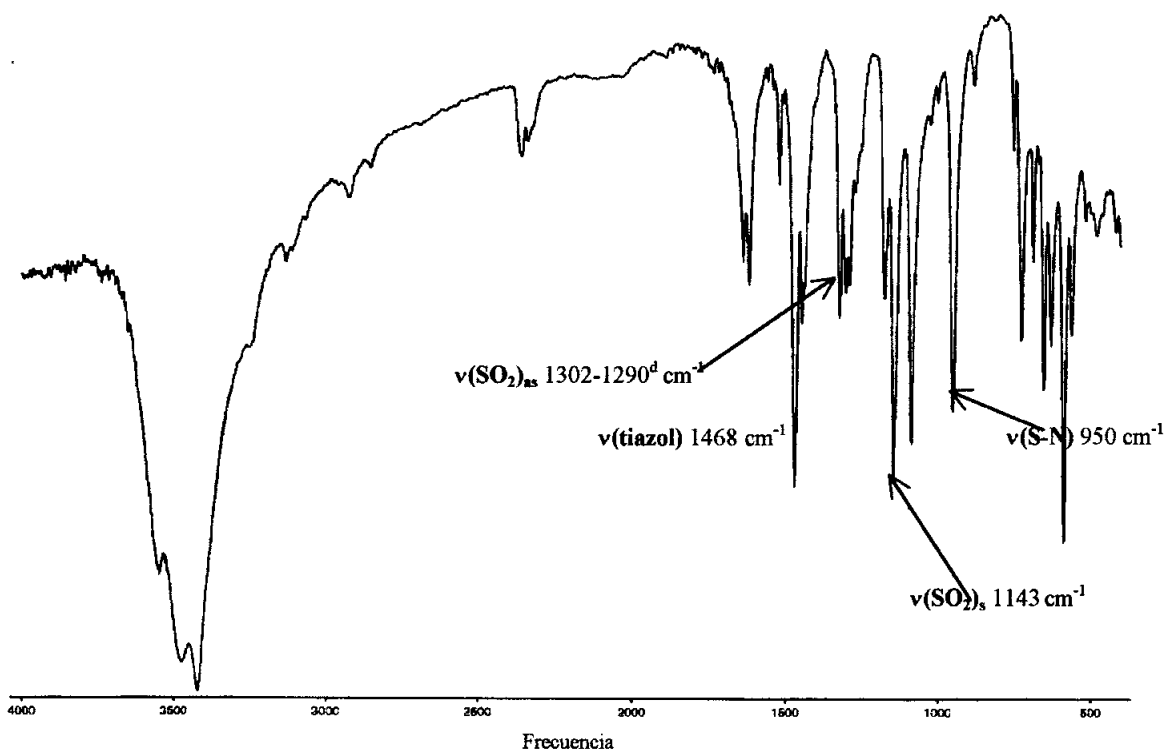


Figura 5.23.- Espectro IR de  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$



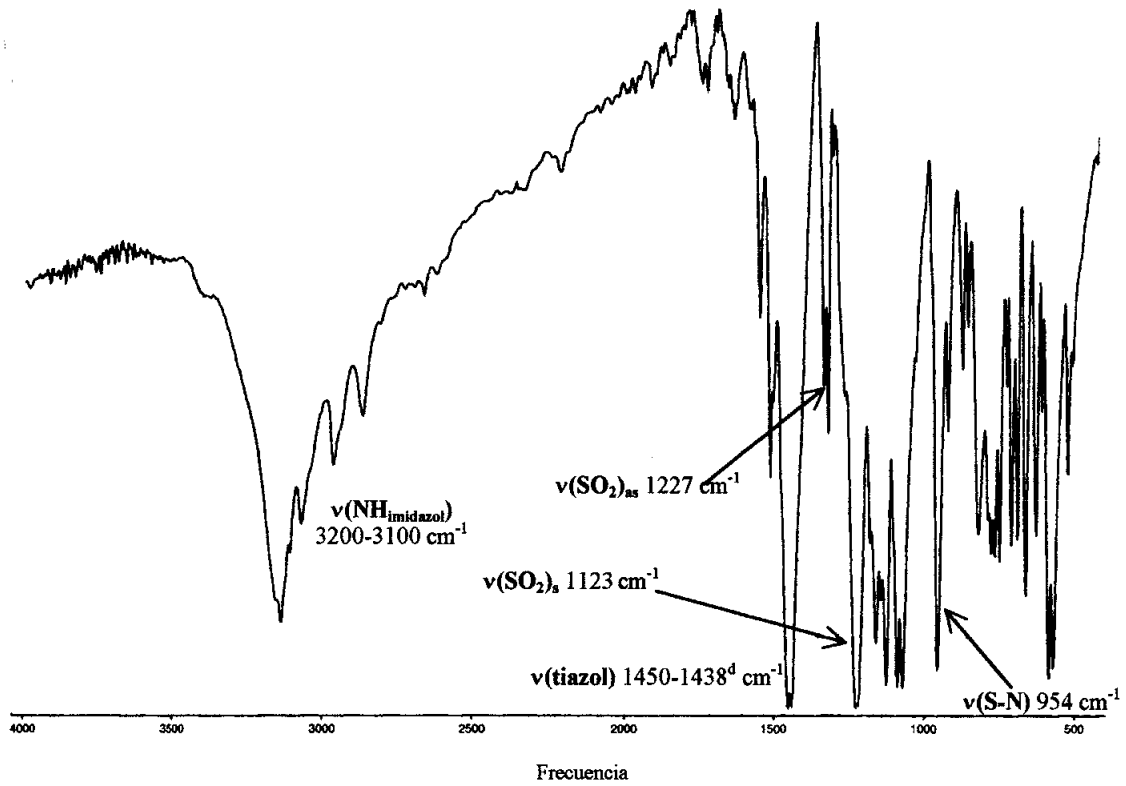


Figura 5.24.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{imH})_2$

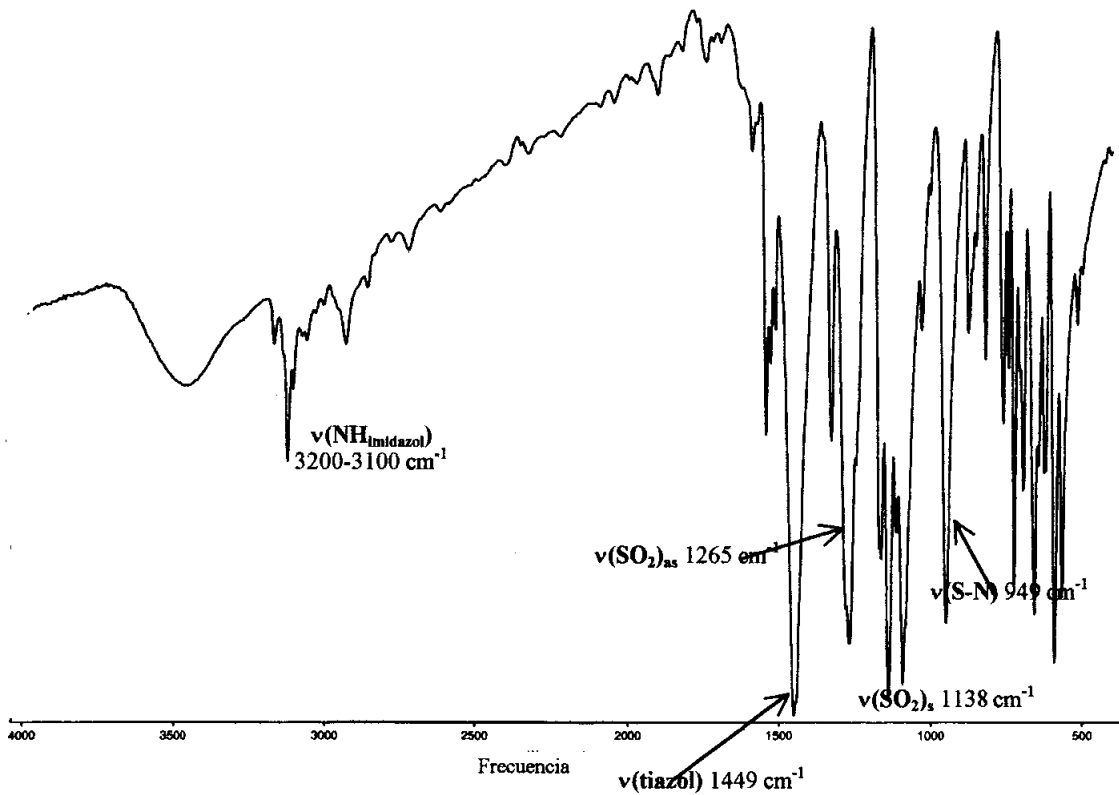


Figura 5.25.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{N-metilimH})_2$

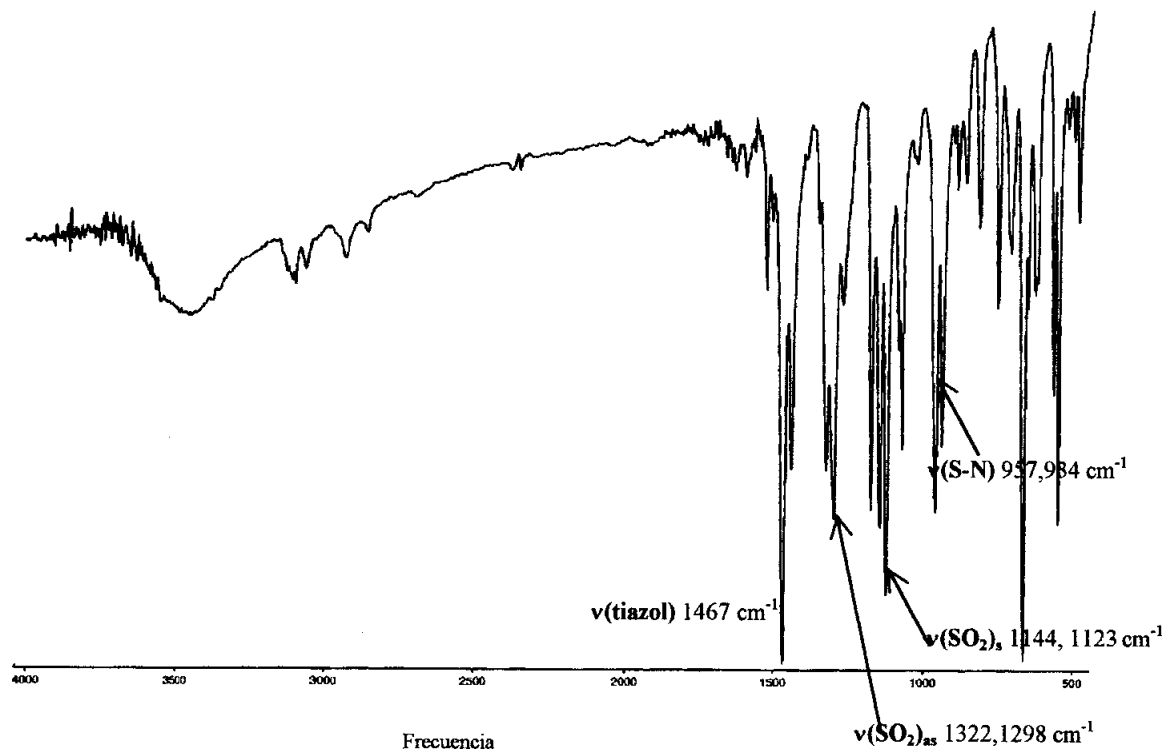


Figura 5.26.- Espectro IR de  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$

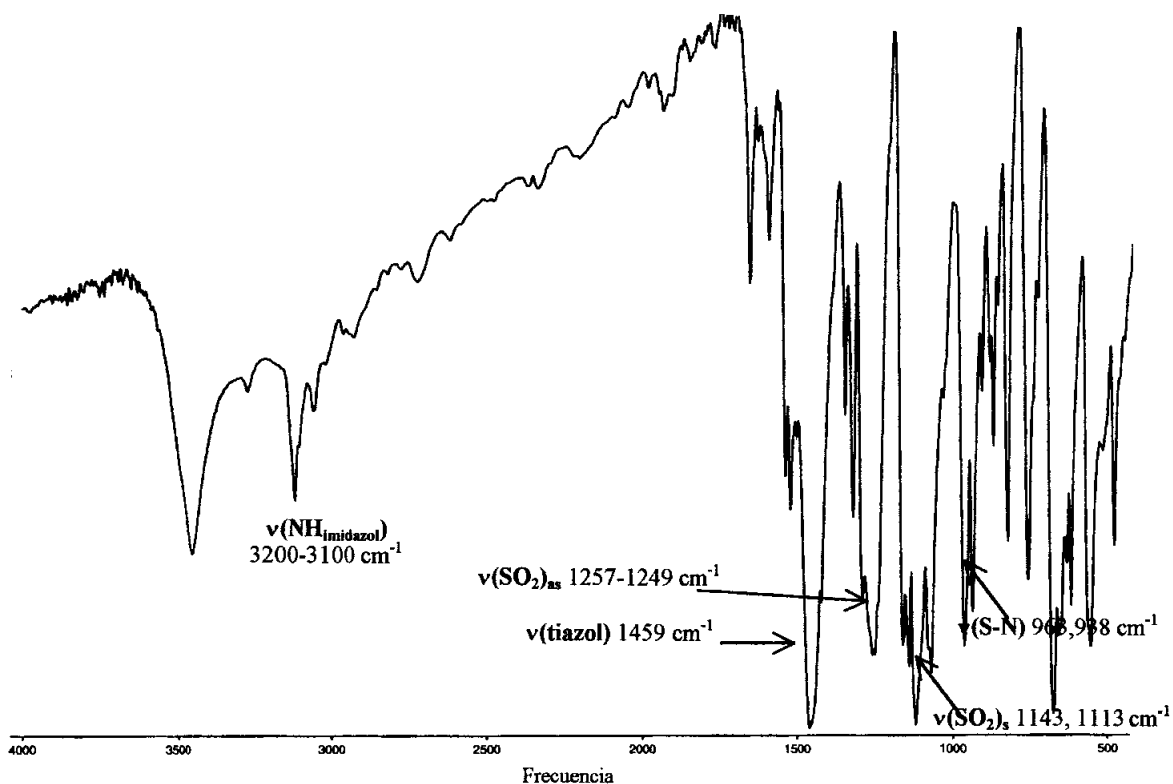
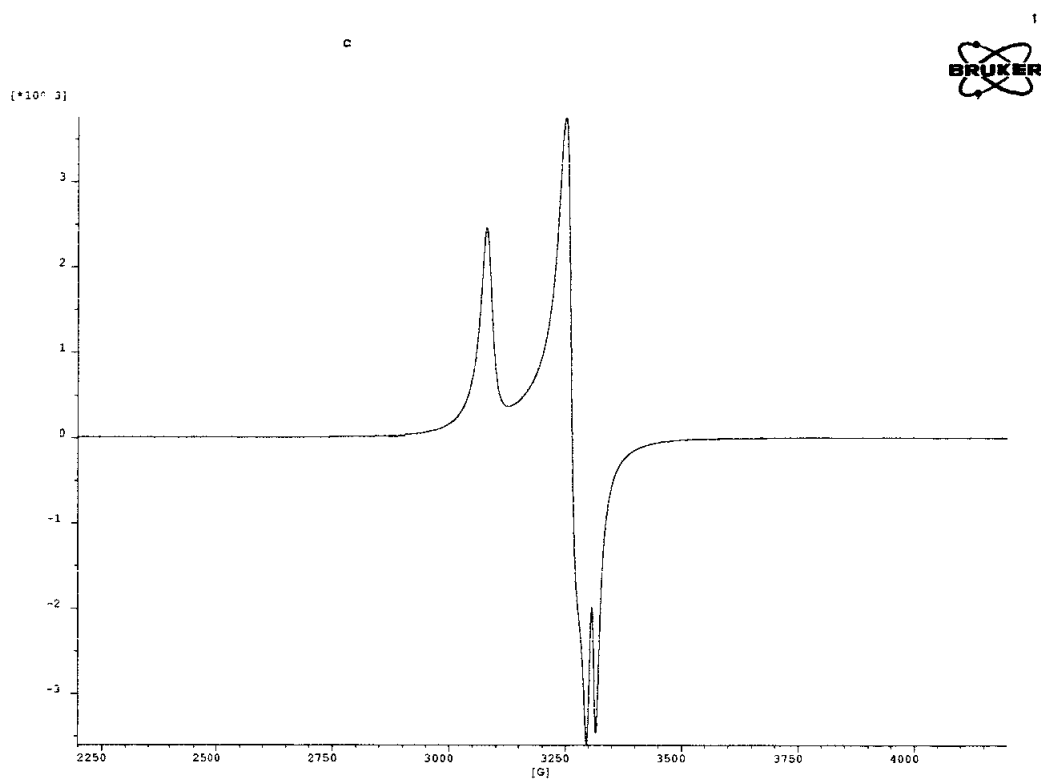
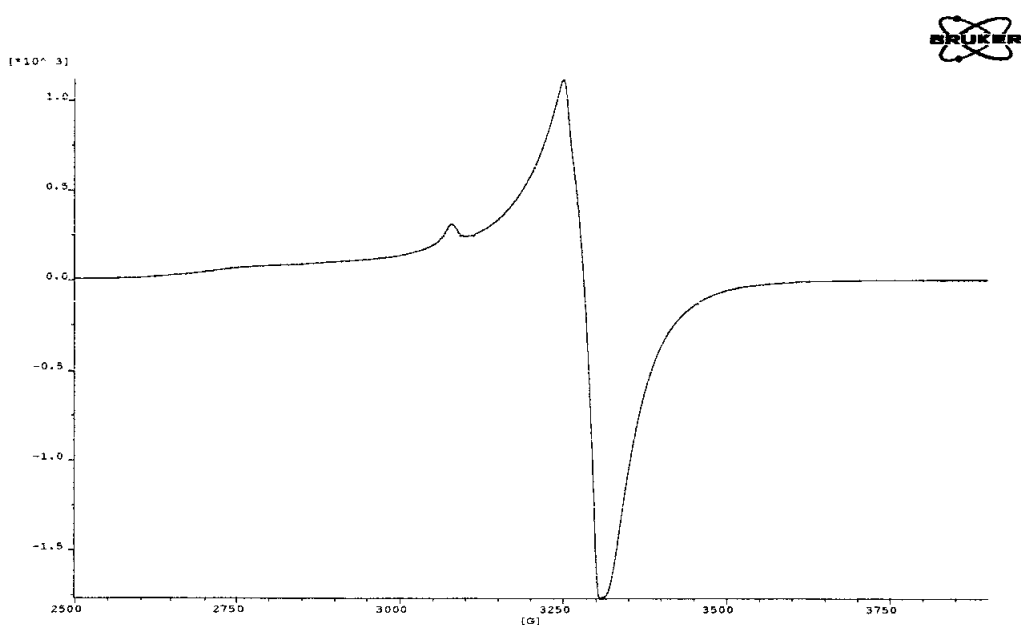
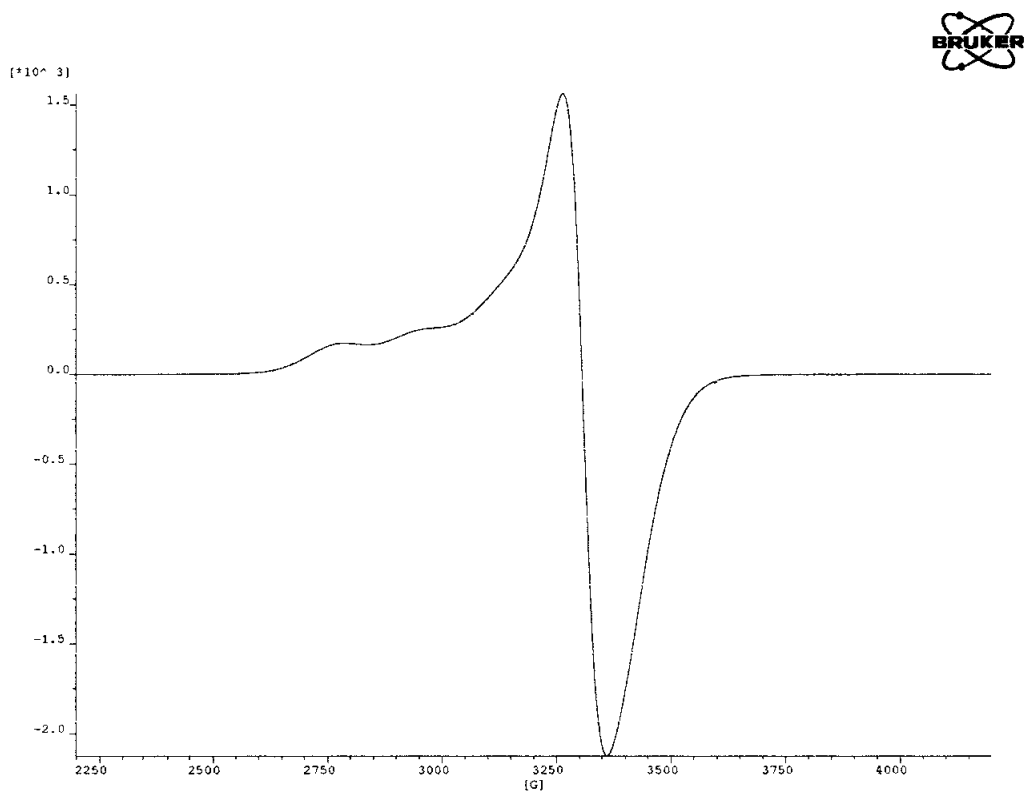


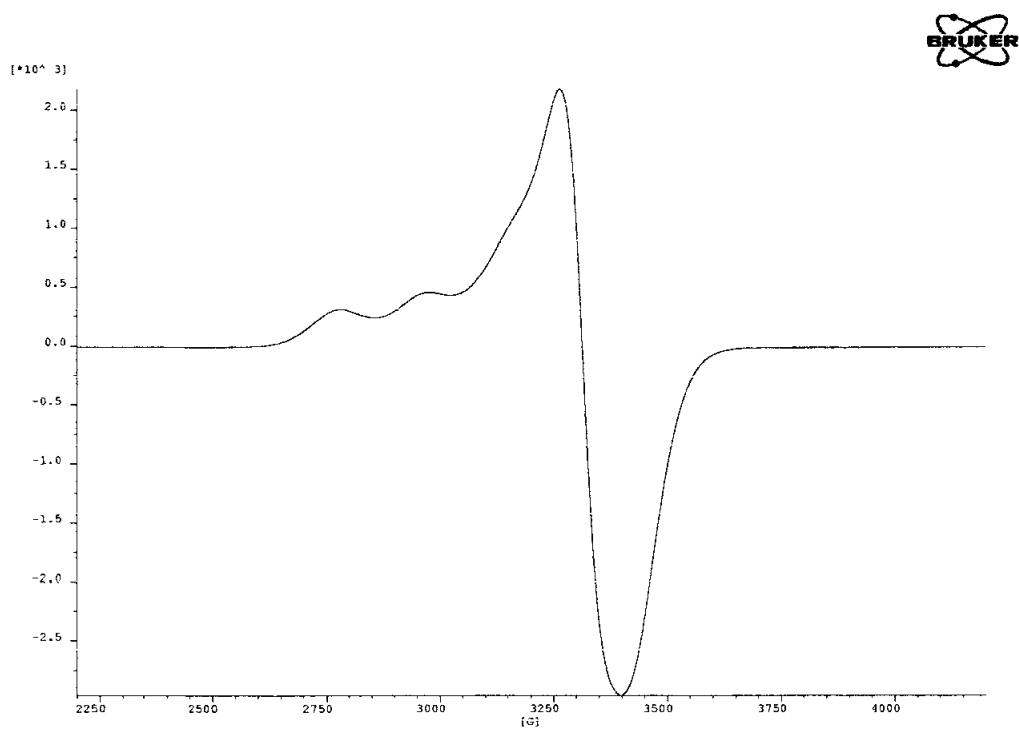
Figura 5.27.- Espectro IR de  $\text{Cu}(\text{tz-naf})_2(\text{N-metilimH})_2$

## 5.8.2.- ESPECTROS RPE

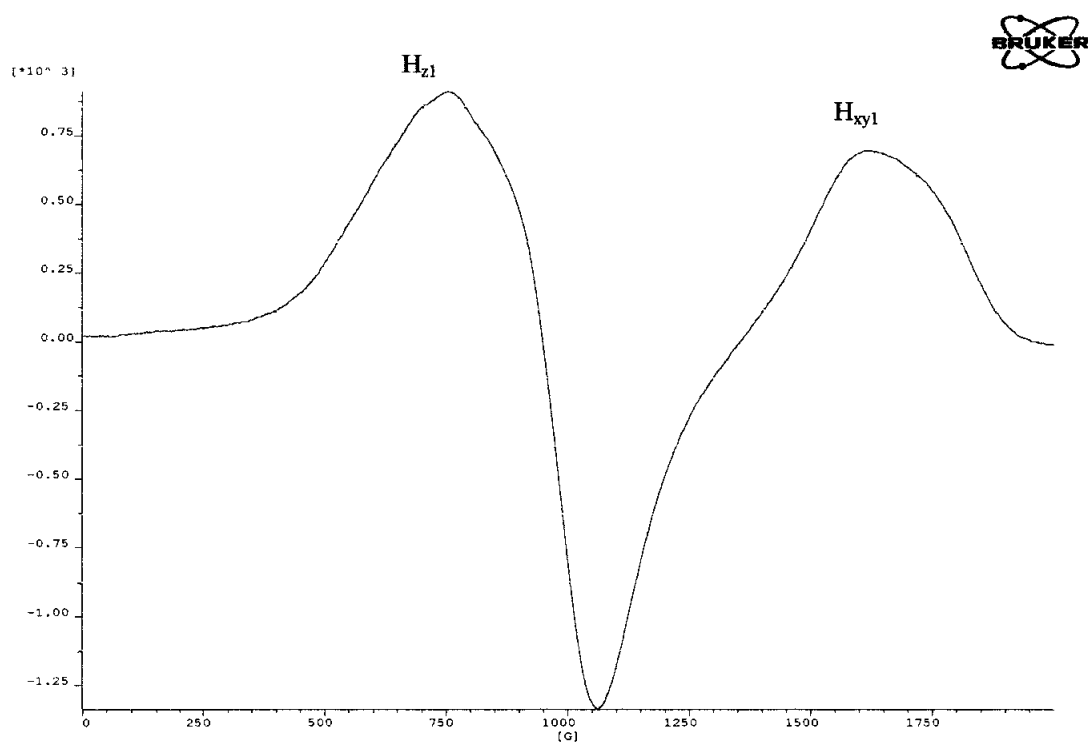
Figura 5.28.- Espectro RPE de  $\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Figura 5.29.- Espectro RPE de  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$



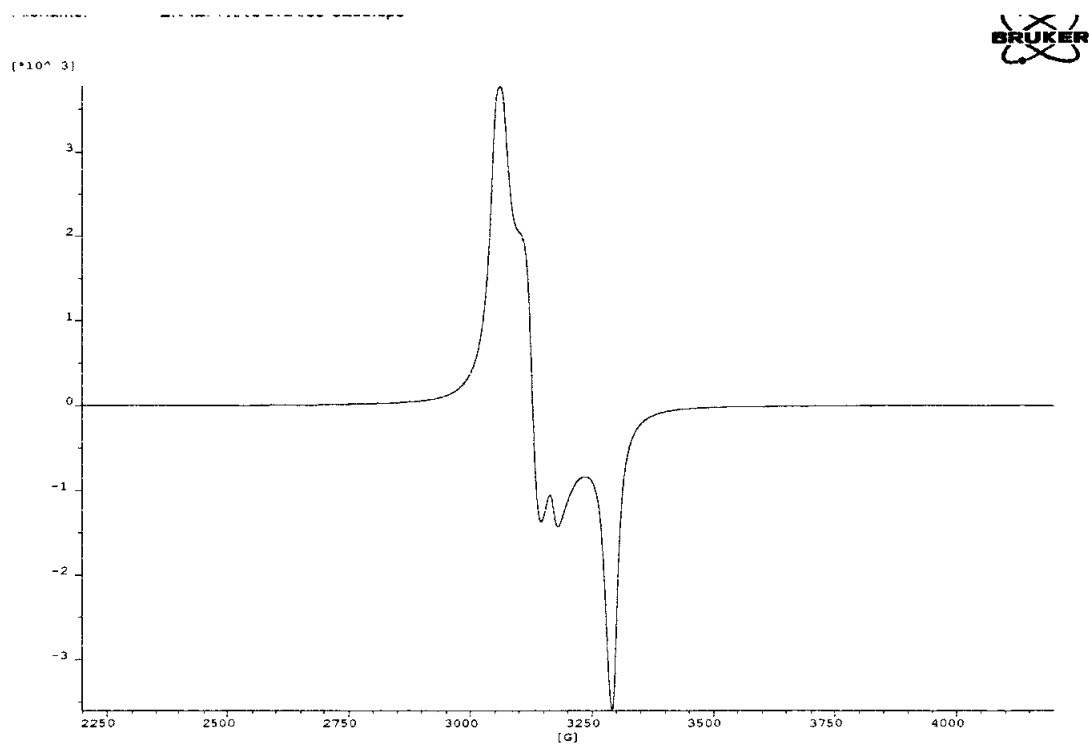
**Figura 5.30.- Espectro RPE de  $\text{Cu(smtz)}_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$**



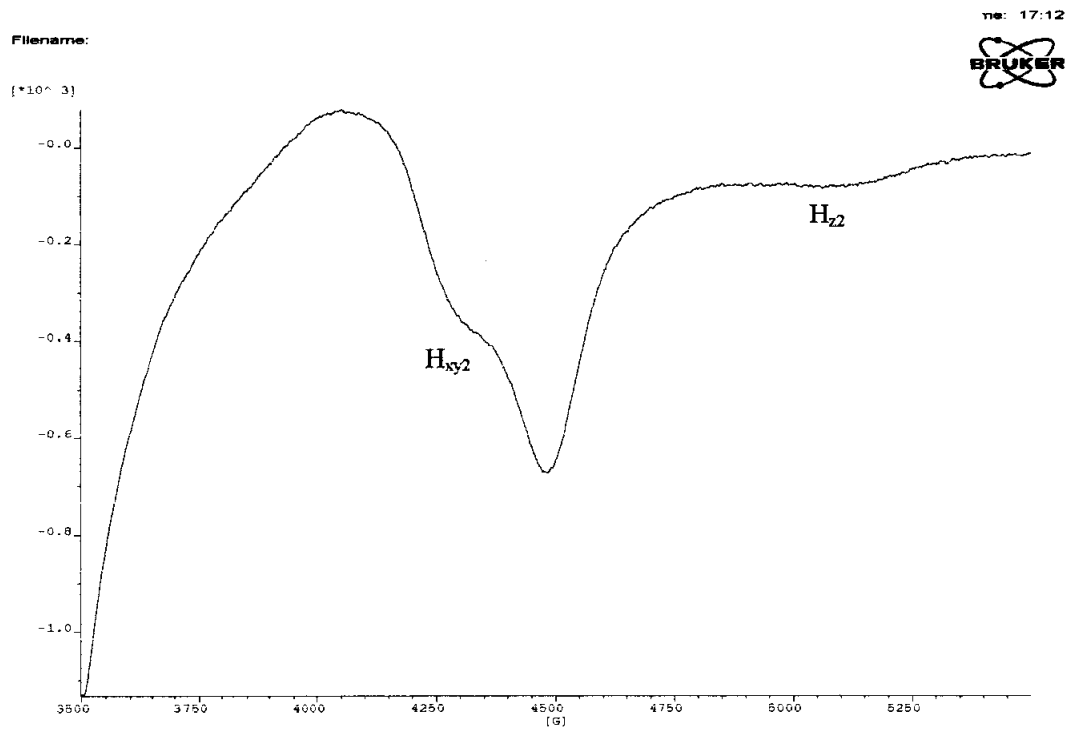
**Figura 5.31.- Espectro RPE de  $\text{Cu(smtz)}_2(4\text{-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$**



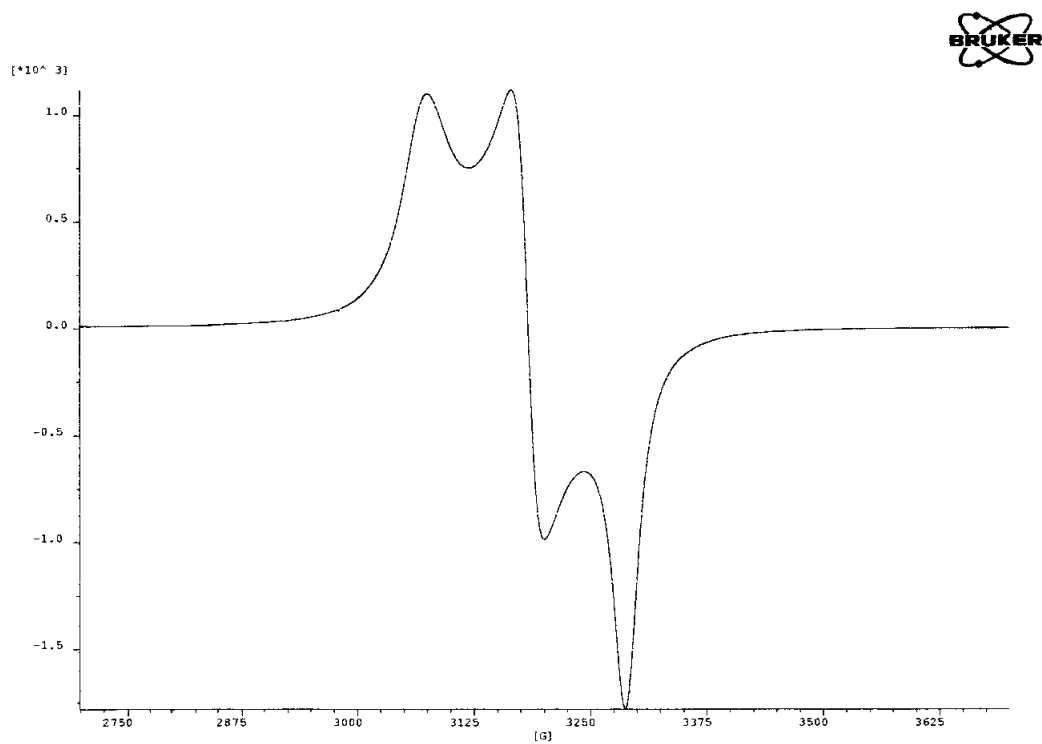
**Figura 5.32.- Espectro RPE de  $\text{Cu(smtzn)}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (rango 0-2000)**



**Figura 5.33.- Espectro RPE de  $\text{Cu(smtzn)}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (rango 2200-4000)**



**Figura 5.34.- Espectro RPE de  $Cu(smtzn)_2 \cdot 3H_2O$  (rango 3500-5500)**



**Figura 5.35.- Espectro RPE de  $[Cu(smtzn)(imH)](NO_3) \cdot \frac{1}{2}H_2O$**

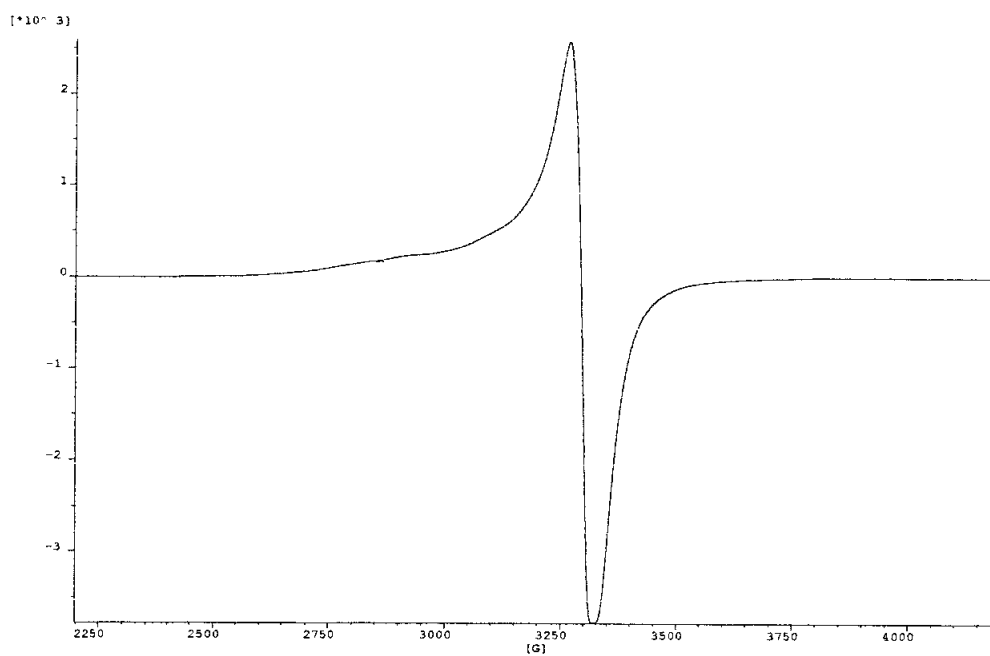


Figura 5.36.- Espectro RPE de  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

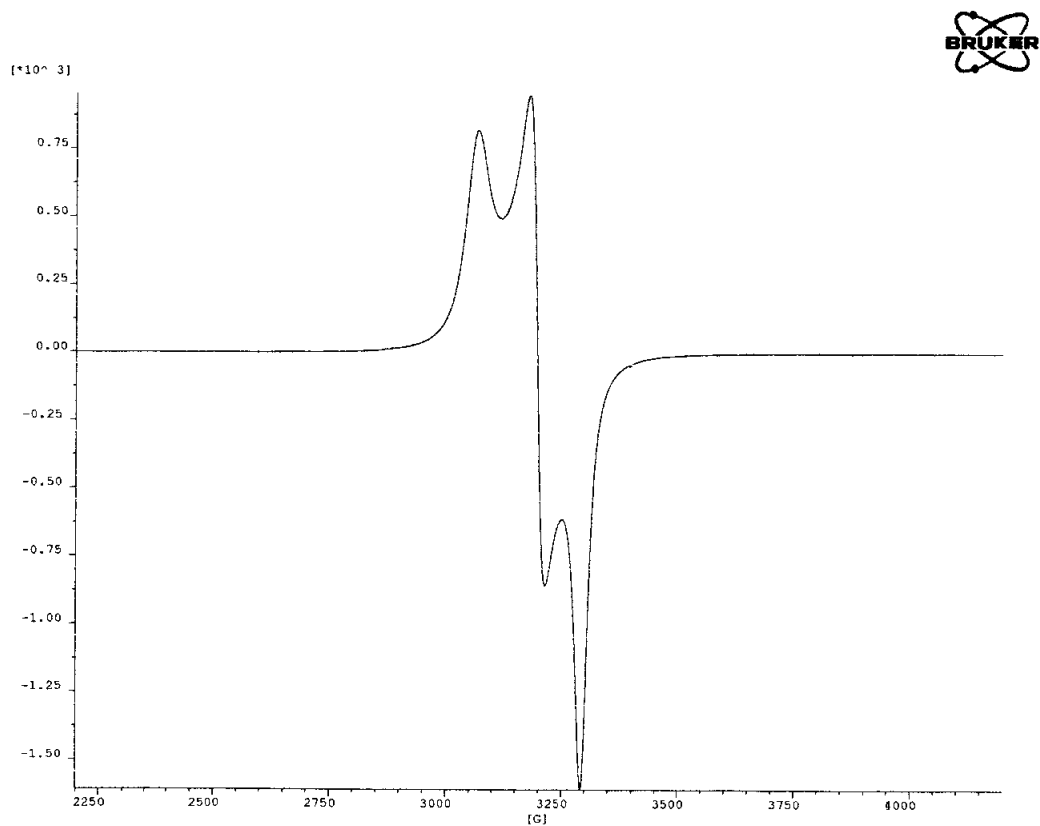


Figura 5.37.- Espectro RPE de  $[\text{Cu}(\text{smtzn})(4\text{-metilimH})](\text{NO}_3) \cdot \text{H}_2\text{O}$

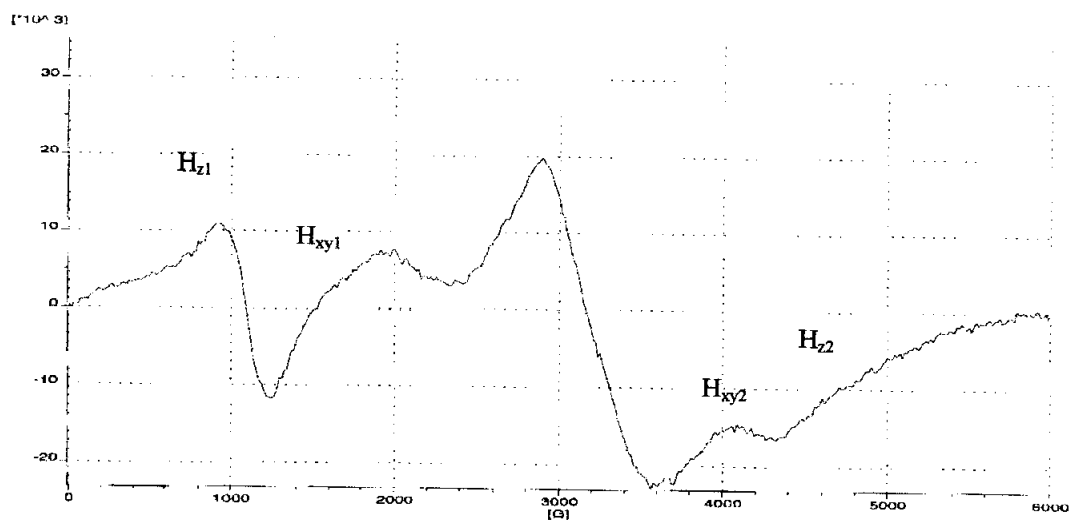


Figura 5.38.- Espectro RPE de  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$

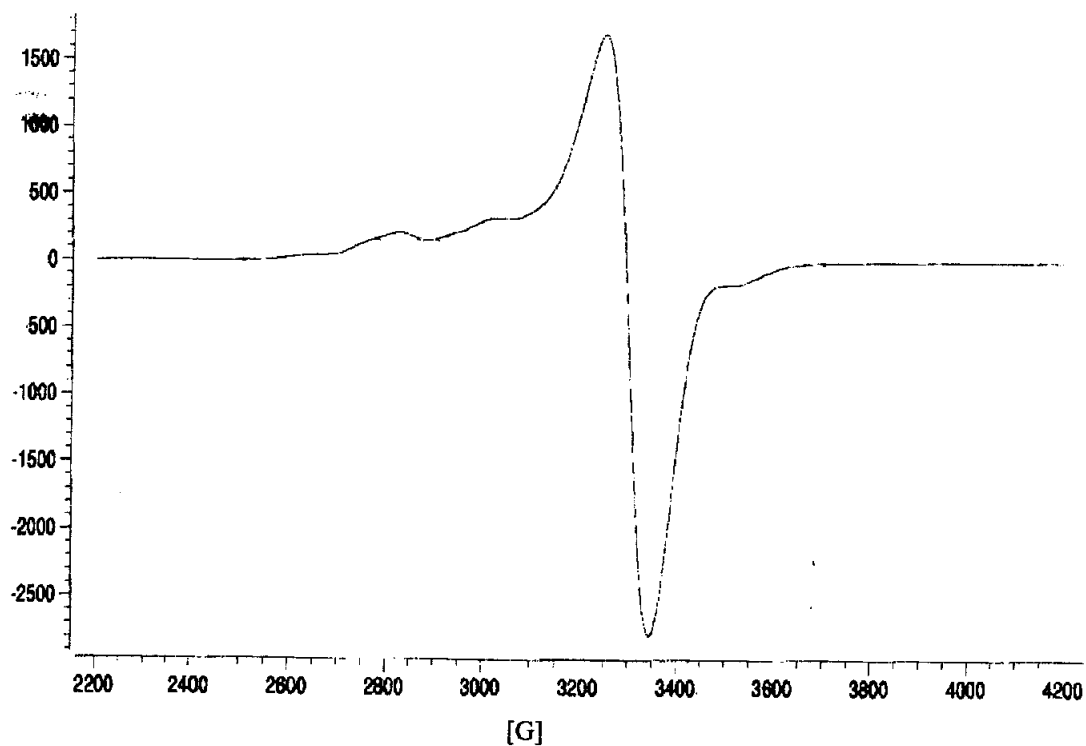


Figura 5.39.- Espectro RPE de  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(\text{N-metilimH})$



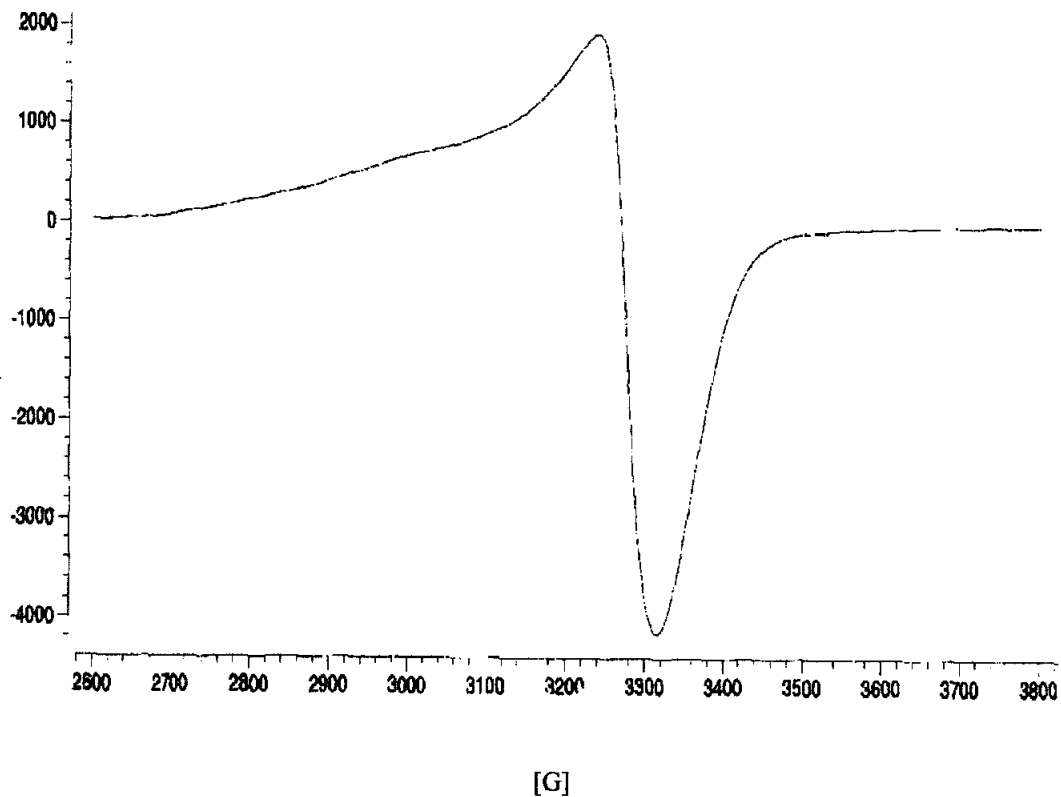


Figura 5.40.- Espectro RPE de  $\text{Cu}(\text{tz-tol})_2(4\text{-metilimH})_2$

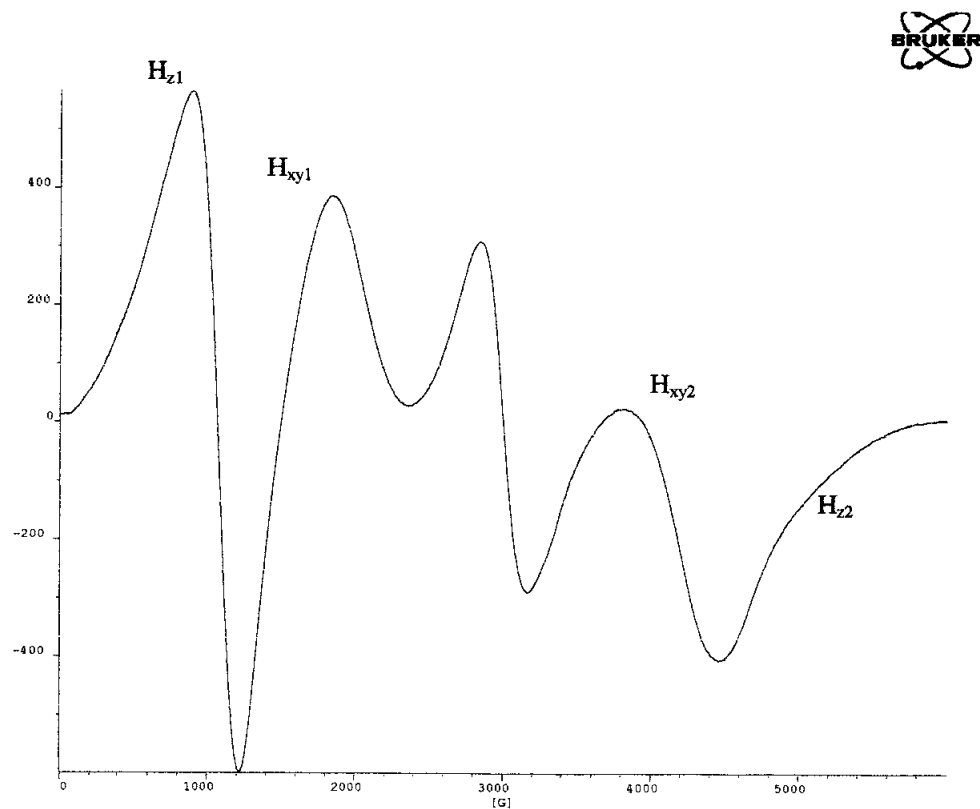
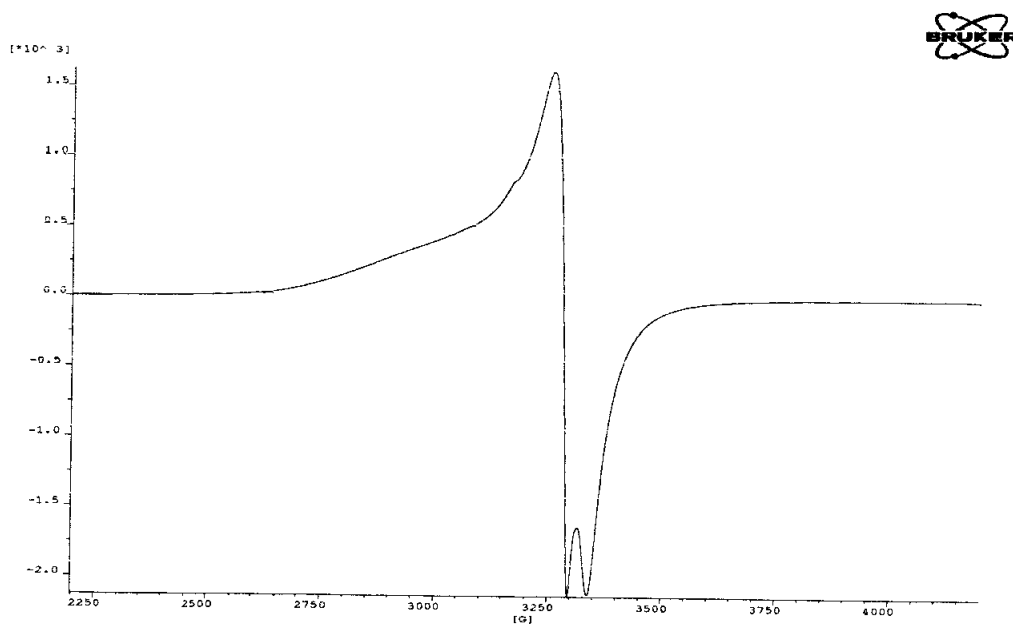
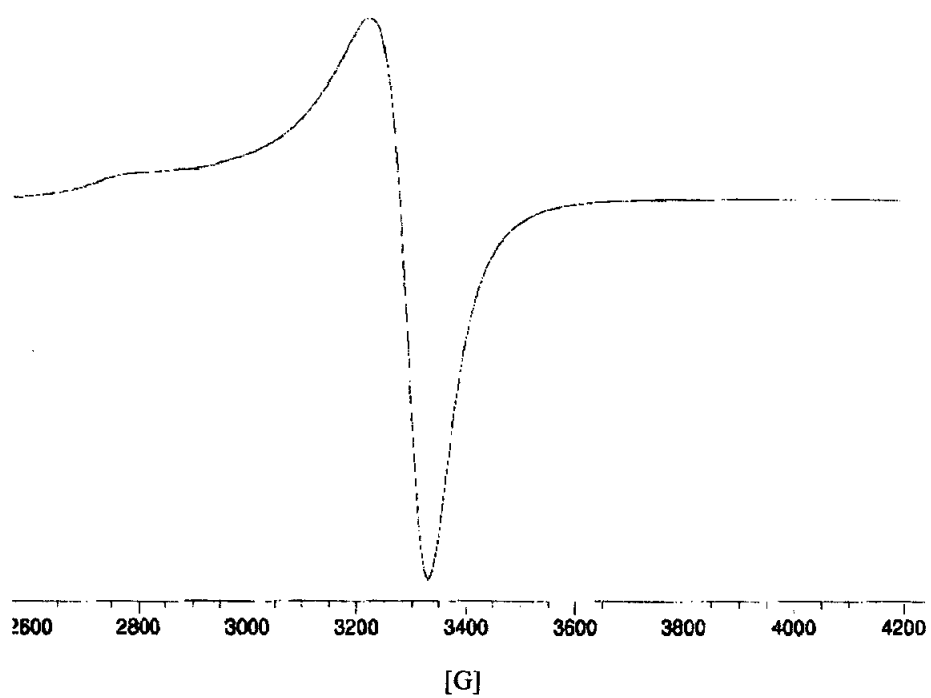


Figura 5.41.- Espectro RPE de  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$



**Figura 5.42.- Espectro RPE de  $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{imH})_2$**



**Figura 5.43.- Espectro RPE de  $\text{Cu}(\text{tz-ben})_2(\text{N-imH})_2$**

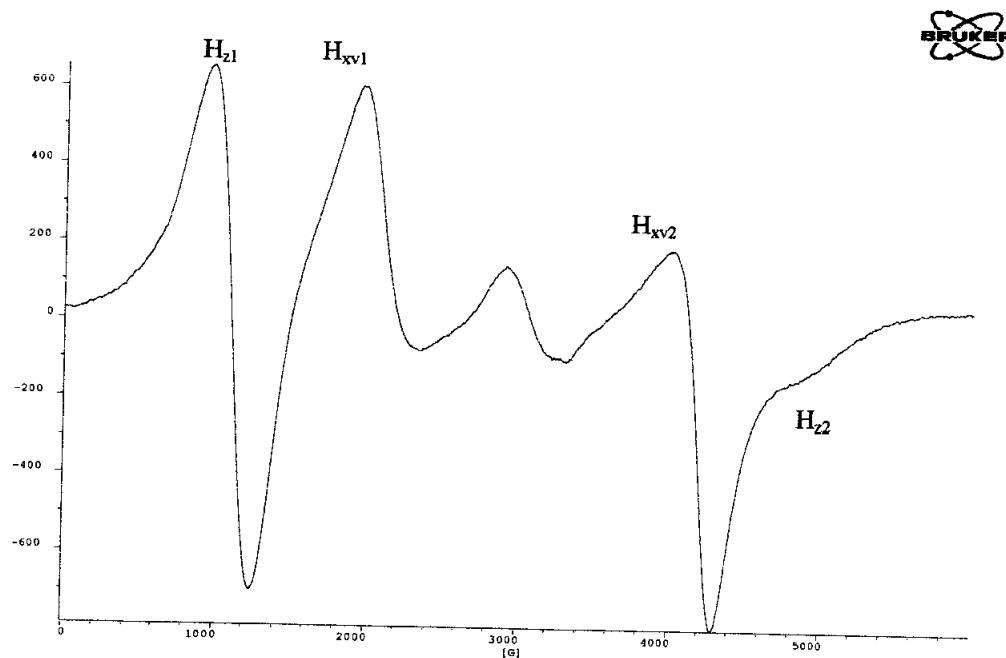


Figura 5.44.- Espectro RPE de  $[Cu_2(tz-naf)_4]$

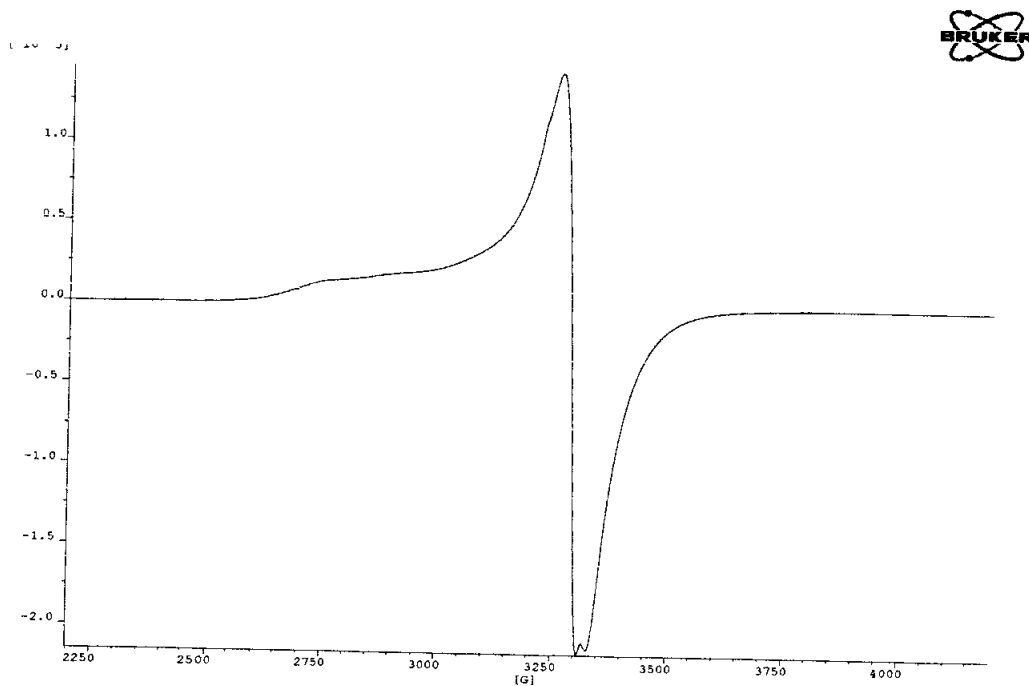


Figura 5.45.- Espectro RPE de  $Cu(tz-naf)_2(N\text{-metilimH})_2$

# Capítulo 6: Actividad Biológica

---

---

## 6.1.- ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

### 6.1.1.- TOXICIDAD DEL OXÍGENO Y LAS ESPECIES "ROS"

### 6.1.2.- MECANISMOS DE DEFENSA: ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

#### 6.1.2.1.- ENZIMA Cu/Zn-SOD

#### 6.1.2.2.- ENZIMA Mn-SOD

#### 6.1.2.3.- ENZIMA Fe-SOD

#### 6.1.2.4.- ENZIMA Ni-SOD

#### 6.1.2.5.- MECANISMOS DE ACTUACIÓN DE LAS SODS

### 6.1.3.- COMPUESTOS MIMÉTICOS DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

### 6.1.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SOD DE COMPLEJOS DE Cu(II) Y Mn(II)

#### 6.1.4.1.- DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD SOD

FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

PROTOCOLO GENERAL

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1.4.2.- DETERMINACIÓN *IN VIVO* DE LA ACTIVIDAD SOD

CONDICIONES DEL ENSAYO

FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

PROTOCOLO GENERAL

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

# Capítulo 6: Actividad Biológica

---

---

## 6.2.- ACTIVIDAD NUCLEASA

### 6.2.1.- ÁCIDOS NUCLEICOS: IMPORTANCIA Y ESTRUCTURA

### 6.2.2.- NUCLEASAS :IMPORTANCIA DEL ENLACE FOSFODIESTER

### 6.2.3.- MODELOS DE NUCLEASAS QUÍMICAS

#### 6.2.3.1.- COMPLEJOS Cu-FENANTROLINA

#### 6.2.3.2.- COMPLEJOS Fe-BLEOMICINA

#### 6.2.3.3.- COMPLEJOS Mn-PORFIRINA

### 6.2.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA

#### FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

#### PROTOCOLO GENERAL

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.2.5- PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD

#### FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

#### PROTOCOLO GENERAL

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.2.6- AFM (ATOMIC FORCE MICROSCOPY)

#### FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA AFM

#### PROTOCOLO GENERAL

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 6.1.- ACTIVIDAD SUPERÓXIDO DISMUTASA

### 6.1.1.- TOXICIDAD DEL OXÍGENO Y LAS ESPECIES “ROS”

Las propiedades tóxicas del oxígeno se conocen desde el siglo XVIII (Teoría de los radicales libres de *Gershman*). Esta toxicidad se debe a la reactividad de las especies de oxígeno con los componentes celulares. El oxígeno en su estado molecular no es muy reactivo, pero las formas parcialmente reducidas del oxígeno, conocidas como ROS (Reactive Oxygen Species) son más reactivas. La toxicidad del oxígeno está mediada por estas especies las cuales comprenden:  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^{\cdot}$ , que son generadas como subproductos del metabolismo celular. La reducción del oxígeno molecular a las formas ROS se produce por electrones que salen de la cadena de transporte electrónico en las células aeróbicas, por la acción de enzimas, por la autooxidación de macromoléculas biológicas o por las propiedades cíclicas redox de determinados compuestos.

El radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es una de estas especies implicadas en la toxicidad del oxígeno. La generación de  $O_2^{\cdot-}$  *in vitro* ha sido observada en un número importante de diferentes sistemas experimentales (sistema xantina-xantina oxidasa, sistema FMN-ferredoxina-TPN<sup>+</sup> oxidoreductasa, etc.) así como en componentes celulares (núcleo, mitocondrias, cloroplastos, monocitos y neutrófilos humanos, macrocitos y microsomas). Otras circunstancias en las que se produce la generación de  $O_2^{\cdot-}$  son la fotólisis del agua o el ciclo redox de compuestos *in vivo*.<sup>85</sup>

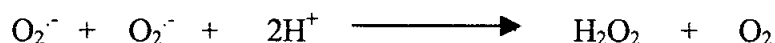
Se ha demostrado que estos radicales libres nocivos derivados del oxígeno son mediadores de enfermedades como infarto agudo de miocardio, apoplejía, isquemia cerebral, apoptosis celular y cáncer. También están asociados con el desarrollo y continuación de procesos inflamatorios que se producen en enfermedades como artritis y juegan un importantísimo papel en el inicio de enfermedades que se relacionan con desórdenes neurológicos como las enfermedades de Parkinson o Alzheimer.<sup>86</sup>

### 6.1.2.- MECANISMOS DE DEFENSA: ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD)

A la vista de estos datos cabe suponer la existencia en la célula de ciertos mecanismos de defensa contra el daño provocado por la toxicidad del oxígeno o sus especies reactivas. Entre estos mecanismos se encuentra el enzima Superóxido Dismutasa (SOD), aunque cabe señalar que son muchos los sistemas que la célula mantiene frente a la toxicidad de los radicales libres.

Desde que en 1969 *Fridovich* y *McCord* descubrieron el sistema primario de defensa contra los radicales superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ),<sup>87</sup> el enzima Superóxido Dismutasa, se abrió un importante campo de investigación, convirtiéndose esta área en una cuestión médica de gran prioridad por su enorme repercusión clínica. Parte del  $O_2$  que los mamíferos consumen en el proceso de respiración se convierte en radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). En condiciones normales, en individuos sanos, los enzimas SOD del organismo se encargan de eliminar estos radicales perjudiciales, pero cuando la producción de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es excesiva se puede superar la capacidad del organismo para catalizar la eliminación del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), ocasionándose algunos de los importantes daños anteriormente citados.

El enzima Superóxido Dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) es del tipo oxidoreductasa y cataliza la reacción entre dos moléculas de superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para formar peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Es un enzima ampliamente distribuido en los sistemas vivos, jugando un papel fundamental en la regulación del tiempo de vida del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y protegiendo de la citotoxicidad mediada por este radical.<sup>88</sup>



Hasta la fecha se conocen diferentes clases de enzimas SOD clasificados en base al metal que se encuentra en el centro activo del enzima y que participa en la catálisis: Cu/Zn-SOD, Fe-SOD, Mn-SOD y más recientemente Ni-SOD.

Los eucariotas contienen, normalmente, tanto el enzima Cu/Zn-SOD, localizado en el citoplasma celular, como el Mn-SOD que se encuentra en el interior de la mitocondria.

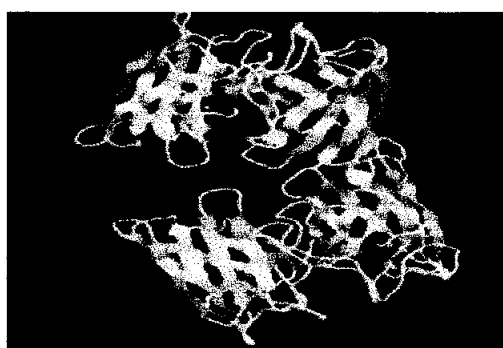
Los procariontes como *E. coli* contienen tanto el Mn-SOD como el enzima Fe-SOD.

### **6.1.2.1.- Enzima Cu/Zn-SOD**

El enzima Cu/Zn-SOD bovino es un dímero, compuesto por dos subunidades idénticas de peso molecular 32.500, unidas al menos por un puente disulfuro (figura 6.1.). Contiene dos iones cobre y dos iones zinc por molécula. Lo encontramos en el citoplasma celular. Cada una de sus subunidades contiene un ión de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  unidos por un ligando común: His (puente imidazolato). Cada subunidad está formada por un barril- $\beta$  hecho de ocho cadenas  $\beta$  antiparalelas conectadas por siete giros y lazos. Los iones de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  de cada subunidad están localizados entre los lazos fuera del barril- $\beta$ . La función del  $\text{Cu}^{2+}$  es catalítica mientras que el  $\text{Zn}^{2+}$  ejerce una función estructural, ayudando a generar condiciones geométricas óptimas que facilitan la reacción catalítica. El enzima Cu/Zn-SOD humano (figura 6.2) es similar al Cu/Zn-SOD bovino.



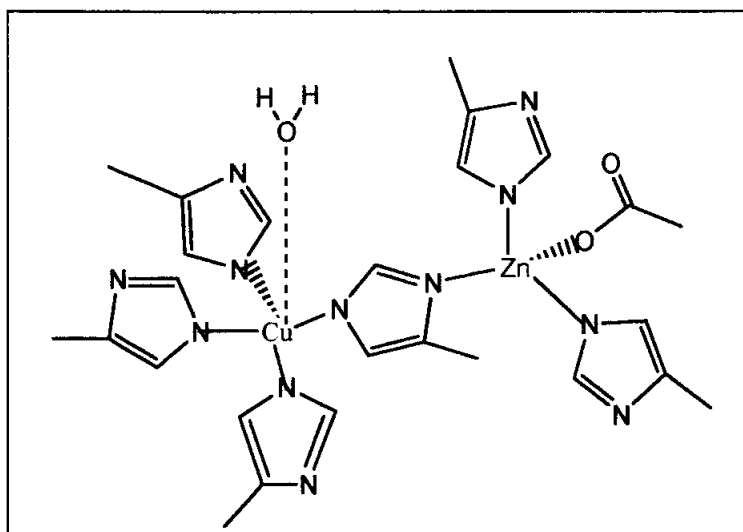
**Figura 6.1.- Homodímero de Cu/Zn-SOD**



**Figura 6.2.- Homotetrámero humano de Cu/Zn-SOD**

En su sitio activo, el  $\text{Cu}^{2+}$  está coordinado con cuatro His, una de las cuales hace de puente entre el cobre y el zinc además, existe un sitio de coordinación adicional para el  $\text{O}_2^-$  el cual está habitualmente ocupado por una molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  lábil por lo que el  $\text{Cu}^{2+}$  presenta una geometría de pirámide de base cuadrada distorsionada. El ión zinc está unido a tres His y a un residuo de Asp y presenta una esfera de coordinación con geometría tetraédrica bastante regular (figura 6.3).<sup>89</sup>





**Figura 6.3.- Sitio activo del enzima Cu/Zn-SOD**

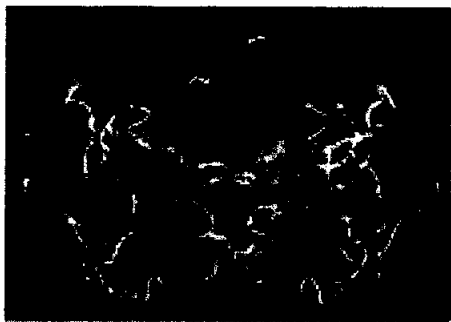
Existe también un enzima Cu/Zn-SOD extracelular (EC-SOD) secretado, tetramérico y glicosilado, con alta afinidad por ciertos glicosaminoglicanos como la heparina y el heparan-sulfato. Este enzima es una proteína de mamíferos aunque también ha sido hallado en no mamíferos. De él se conoce su secuencia aminoacídica y se sabe que posee un péptido de 18 residuos característico de las proteínas secretadas. Los residuos 96-193 muestran secuencias altamente homólogas con el enzima Cu/Zn-SOD citósolico aunque no ocurre lo mismo en los residuos 1-95. Generalmente lo encontramos en los espacios intersticiales de los tejidos y en los fluidos extracelulares, llevando a cabo la mayor parte de la actividad SOD del plasma, la linfa y el fluido sinovial.<sup>90</sup>

#### **6.1.2.2.- Enzima Mn-SOD**

El enzima Mn-SOD es uno de los enzimas SOD mejor caracterizados. Se han estudiado algunas de sus estructuras cristalinas por R-X, incluyendo la estructura del enzima Mn-SOD mitocondrial humano así como otros Mn-SODs bacterianos (*E. coli*). Algunos de estos datos cristalográficos revelan características estructurales similares aunque también ponen de manifiesto las diferencias existentes entre ambas enzimas.<sup>91</sup> Mientras que el Mn-SOD de eucariotas contiene cuatro subunidades, cada una con un peso molecular de 20.000 y se encuentra localizada en la matriz mitocondrial, el enzima

Mn-SOD de procariontes consta sólo de dos subunidades, por lo que su peso molecular es la mitad, es decir 40.000 (figura 6.4).

Los monómeros se pliegan en dos dominios (figura 6.5). El dominio Nt (amino terminal) consiste en dos largas  $\alpha$ -hélices antiparalelas. El dominio Ct (carboxilo terminal) contiene una lámina- $\beta$  central formada por 3 cadenas  $\beta$  antiparalelas con 4-6  $\alpha$ -hélices circundantes. El átomo de manganeso está ligado a dos residuos de cada una de las hélices Nt y dos residuos de los lazos en el dominio Ct.

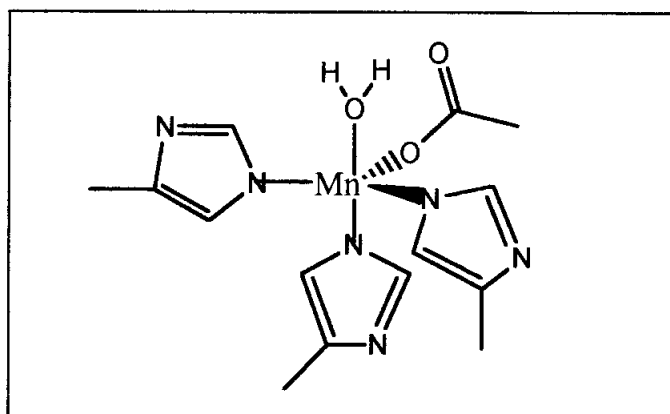


**Figura 6.4.- Dímero de Mn-SOD**

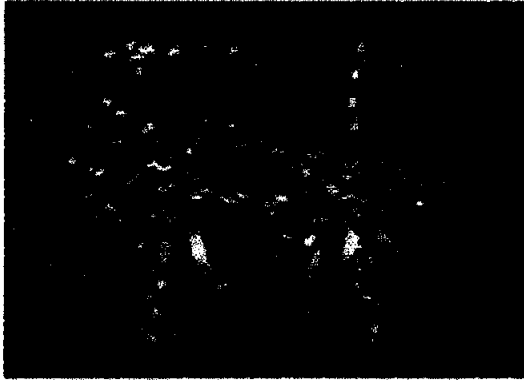


**Figura 6.5.- Monómero de Mn-SOD**

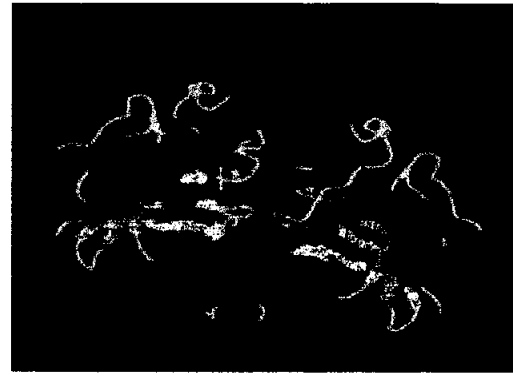
La resolución de la estructura cristalina de los enzimas Mn-SOD ha sido realizada a T<sup>a</sup> ambiente y muestra que el enzima posee un sitio activo pentacoordinado (figura 6.6). El manganeso presenta un estado de oxidación (+3) y está coordinado a tres N de residuos His, un O de un residuo de Asp y un O de una molécula de agua dispuestos en una geometría bipirámide trigonal distorsionada.



**Figura 6.6.- Sitio activo del enzima Mn-SOD**



**Figura 6.7.- Homotetrámero de Mn-SOD**

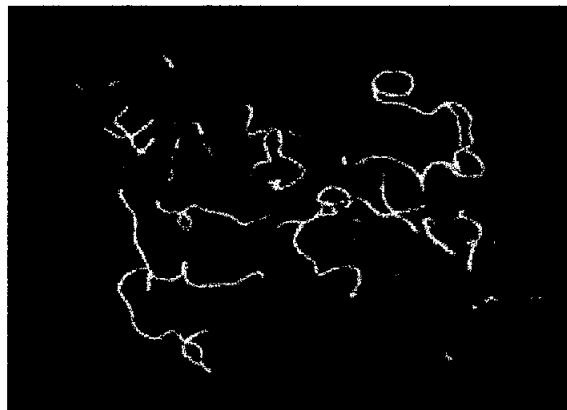


**Figura 6.8.- Homodímero humano de Mn-SOD**

El enzima Mn-SOD encontrado en lo seres humanos es un homotetrámero (figura 6.7) de peso molecular 44.000; con un átomo de manganeso unido entre el dominio  $\alpha$ -hélice y el dominio  $\alpha/\beta$  de cada monómero (figura 6.8).<sup>92</sup>

#### **6.1.2.3.- Enzima Fe-SOD**

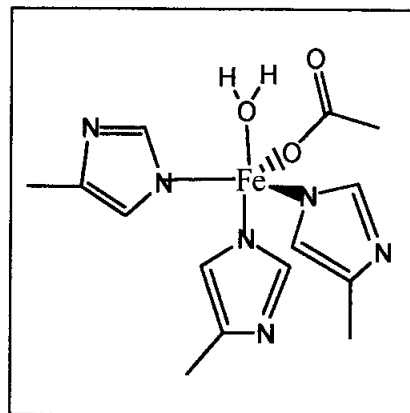
El enzima Fe-SOD muestra homología parcial con el enzima Mn-SOD. Ambos poseen los mismos grupos enlazados al metal en el centro activo, compartiendo considerables secuencias y homología en la estructura tridimensional.<sup>93</sup> Se ha encontrado en organismos anaerobios forzados, aerobios facultativos (exclusivamente o junto con el Mn-SOD), en el citosol de cianobacterias o en el estroma de cloroplastos de plantas superiores y en protozoos.



**Figura 6.9.- Homodímero de Fe-SOD bacteriano**

Está compuesto por dos subunidades, de peso molecular 39.000 cada una, con un ión  $\text{Fe}^{3+}$  por molécula de enzima (figura 6.9). Los monómeros se pliegan en dos dominios. El dominio Nt consiste en dos largas  $\alpha$ -hélice antiparalelas. El dominio Ct contiene una lámina- $\beta$  central formada por 3 cadenas  $\beta$  antiparalelas con 4-6  $\alpha$ -hélices circundantes. El ión de  $\text{Fe}^{+3}$  está ligado a dos residuos de cada una de las hélices Nt y dos residuos de los lazos en el dominio Ct.<sup>94</sup>

Estudios cristalográficos ponen de manifiesto que el hierro presenta una geometría bipirámide trigonal distorsionada. En las posiciones ecuatoriales se encuentran dos N histidina y un átomo O de un residuo de aspartato, mientras que las posiciones axiales están ocupadas por otro N histidina y un átomo de O de una molécula de agua (figura 6.10).



**Figura 6.10.- Sitio activo del enzima Fe-SOD**

#### **6.1.2.4.- Enzima Ni-SOD**

De entre los enzimas SOD, el Ni-SOD es el más recientemente descubierto y estudiado. Ha sido purificado de la fracción citósolica de varias especies de *Streptomyces*. La composición aminoacídica, la secuencia de aminoácidos Nt (amino terminal) y las propiedades inmunológicas muestran que estos enzimas Ni-SODs son distintos de aquellos que poseen Mn, Fe, y Cu/Zn en su centro catalítico. Está compuesto por cuatro subunidades idénticas de peso molecular 13.400 y es estable a pH 4,0-8,0. El apoenzima, sin el níquel, no tiene la capacidad de mediar en la conversión del radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) a peróxido de hidrógeno, lo cual indica el importante papel del ión  $\text{Ni}^{2+}$  en la actividad del enzima.<sup>86</sup>

#### **6.1.2.5.- Mecanismos de actuación de los enzimas SOD**

Como ya hemos visto, los enzimas SOD son una clase de oxido-reductasas que contienen Cu/Zn, Mn, Fe e incluso Ni en su centro activo y que catalizan la dismutación del radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ). Estos enzimas realizan este ciclo catalítico con una

eficiencia, prácticamente sometida a control difusional. Así observamos cómo los enzimas SODs incrementan la razón de desaparición del superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ) desde  $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$  a pH fisiológico hasta aproximadamente  $1,8 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$  para Mn-SOD a pH 7,8 y hasta  $1,6 \times 10^9 M^{-1} s^{-1}$  para la Cu/Zn-SOD entre pH 5,3 y 9,5.<sup>95</sup>

El enzima Superóxido Dismutasa actúa mediante un mecanismo de *ping-pong*, donde la dismutación ocurre en dos pasos. En el primer paso el metal se reduce al aceptar un electrón del radical superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ ), en el segundo el metal reducido cede el electrón a otra molécula de radical restableciendo el enzima. Este mecanismo lo esquematizamos para la Cu/Zn-SOD (figura 6.11) y para la Mn-SOD (figura 6.12):

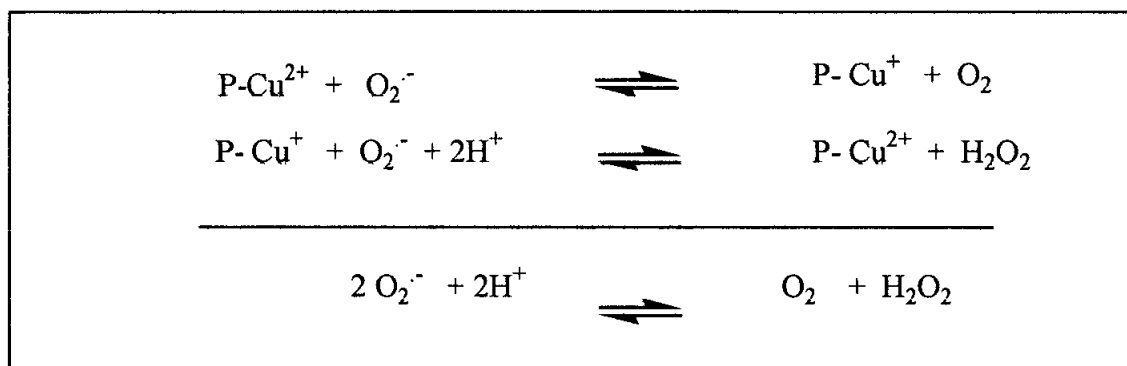


Figura 6.11.- Mecanismo de acción del enzima Cu/Zn-SOD<sup>85</sup>

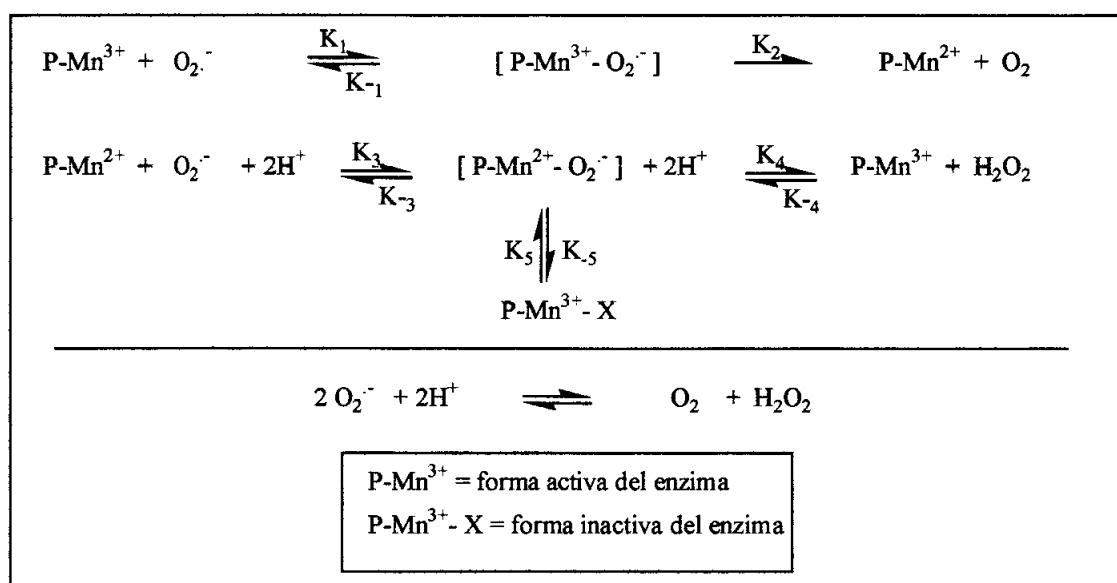


Figura 6.12.- Mecanismo de acción del enzima Mn-SOD

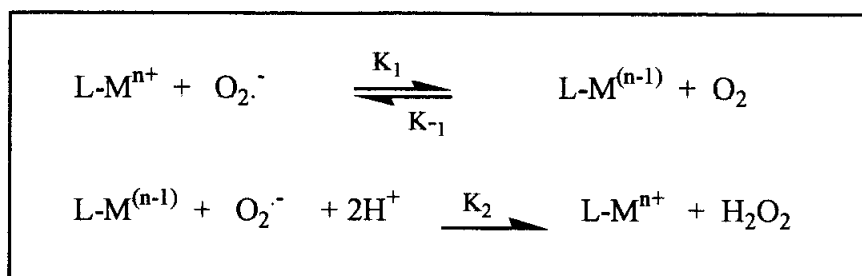
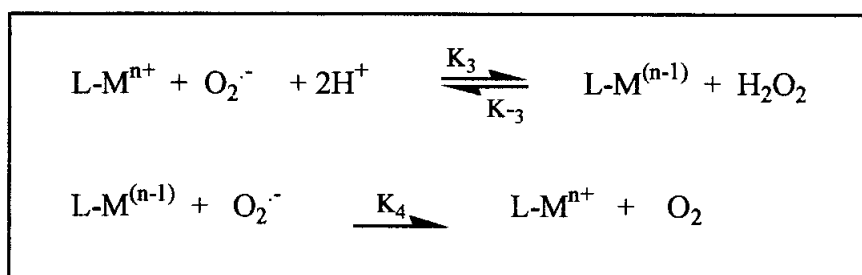
### 6.1.3.- COMPUESTOS MIMÉTICOS DEL ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASA

Dada la importancia de la acción de los enzimas SODs para el mantenimiento de la salud y la implicación del anión superóxido ( $O_2^-$ ), estos enzimas han sido ampliamente estudiados con el fin de desarrollarlos como agentes terapéuticos. El enzima natural se ha empleado en el tratamiento de tumores, isquemia cerebral e incluso el SIDA pero su uso es bastante limitado. La falta de éxito en este sentido puede ser atribuida a diversos factores:

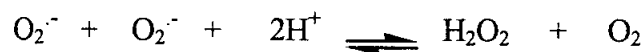
- 1) Un rango de dosis eficaz muy estrecho, caracterizado por una curva dosis – respuesta en forma de campana.
- 2) Falta de un método rutinario y exacto para monitorizar y cuantificar la actividad SOD
- 3) Incapacidad del enzima para acceder al espacio intracelular
- 4) Inestabilidad del enzima
- 5) Falta de biodisponibilidad oral
- 6) Inmunogenicidad
- 7) Elevado coste

El estudio de estos factores limitantes llevó a la conclusión de que éstos pueden ser superados con el desarrollo de compuestos sintéticos que mimeticen la acción del enzima SOD. Desde ese momento se han intentado sintetizar compuestos estables, no tóxicos, de bajo peso molecular, con la ventaja que pueden atravesar las membranas celulares y de bajo coste.<sup>96</sup> El objetivo de estos complejos es el de poder sustituir al enzima SOD catalizando la dismutación del superóxido ( $O_2^-$ ) pudiendo así ser aplicados en el tratamiento de enfermedades asociadas a un incremento del estrés oxidativo y/o eliminación insuficiente de radicales libres.

Por lo general los compuestos miméticos de SOD son complejos de metales de transición como cobre, hierro o manganeso (anotados como  $L-M^{n+}$ ) los cuales, al igual que ocurre en el centro activo del enzima, pueden llevar a cabo alternativas reducciones y oxidaciones del metal (mecanismo I) para obtener  $O_2$  y  $H_2O_2$ . Hay otros casos donde lo que ocurre son alternativas oxidaciones y reducciones (mecanismo II).

**Mecanismo I****Mecanismo II**

En ambos casos la reacción neta realizada por los compuestos miméticos es la misma y produce la dismutación espontánea del superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) por lo que se observa una disminución de la concentración de este radical tanto extra- como intracelular.<sup>97</sup>



El uso de los complejos presenta ventajas con respecto a las enzimas naturales como agentes farmacológicos puesto que carecen de los factores limitantes propios de la SOD, poseen mayor accesibilidad al espacio intercelular, mayor permeabilidad celular, ausencia de inmunogenicidad, mayor tiempo de vida en sangre, pueden ser administrados por varias vías y además su coste es menor.

Los complejos sintéticos con actividad superóxido dismutasa más estudiados son los de cobre, aunque los complejos de manganeso y hierro están en una fase de estudio posterior. Se sabe que son útiles en el tratamiento de muchas de las enfermedades generadas o potenciadas por aniones superóxido. Entre las aplicaciones más importantes se encuentran:<sup>98</sup>

- Tratamiento en procesos inflamatorios
- Tratamiento de isquemia
- Prevención y tratamiento de enfermedades lesión-reperfusión
- Tratamiento de shock hemorrágico
- Tratamiento hipoxia
- Prevención y tratamiento de lesiones producidas por irradiación
- Atenuación de lesiones por medicamentos utilizados en quimioterapia en el tratamiento de cáncer

Sin embargo, cabe tener en cuenta los efectos tóxicos que pueden poseer estos complejos por lo que a la hora de su síntesis debemos elegir con cuidado tanto el metal como el ligando más apropiado.<sup>87</sup>

Haciendo balance de las características estudiadas podemos ver que el desarrollo de miméticos de los enzimas SOD constituye un campo importante de investigación por la repercusión médica que pueden llegar a tener este tipo de compuestos. Se debe tener en cuenta que las características estructurales y energéticas del enzima SOD natural son el resultado de una larga adaptación a las condiciones óptimas de actividad sin daño a las células vecinas, tejidos y órganos. Por esta razón la investigación en este campo está abierta hasta encontrar un complejo tan inocuo y eficaz como el enzima natural, pero con las ventajas de los compuestos de síntesis.

#### **6.1.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD SOD DE COMPLEJOS DE Cu(II) Y Mn(II)**

Cualquier esfuerzo para desarrollar complejos miméticos del enzima SOD, debe conllevar un tipo de ensayo capaz de ofrecer una medida de la actividad SOD rápida y cuantitativa.<sup>86</sup> Actualmente existen dos tipos de métodos que nos permiten determinar la actividad SOD: métodos directos e indirectos.

Los métodos indirectos están limitados en cuanto que las verdaderas constantes catalíticas no pueden ser determinadas directamente. Dichas limitaciones pueden, con frecuencia, afectar a la interpretación de los resultados. Aún así, pueden indicar si un



compuesto es mimético del enzima SOD a niveles de actividad más bajos que los métodos directos.

Los métodos directos pueden ser de dos tipos, análisis cinético mediante “Stopped-flow” y la técnica de radiólisis de pulso. Ambos métodos permiten la medida precisa de la relación de dismutación del superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mediante visualización directamente de la curva cinética espectrofotométrica del anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) en solución tamponada. En ambos casos se obtienen constantes para la dismutación del superóxido en solución acuosa para pH fisiológico o superior. En el método de análisis cinético por “Stopped-flow” la limitación es que las relaciones sólo pueden ser determinadas para compuestos que poseen actividades catalíticas mayores que la  $K_{cat} > 10^{5,5} M^{-1} s^{-1}$  (para un pH = 7,4). Otros factores a tener en cuenta a la hora de determinar las constantes cinéticas mediante métodos directos son establecer si los compuestos miméticos poseen actividad catalítica que no estequiométrica o si actúan como oxido-reductasas en el mismo ensayo.<sup>86</sup>

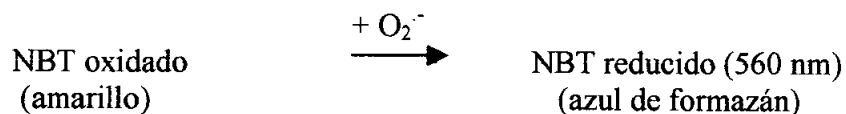
Además de las limitaciones expuestas, los métodos *in vitro*, presentan la incapacidad de replicar el entorno en el que se encuentran los miméticos del enzima SOD en el cuerpo. De hecho, algunos de los complejos miméticos de SOD *in vitro* no los son *in vivo*. Así pues, se ha hecho evidente la necesidad de un método bien establecido capaz de reproducir las condiciones fisiológicas que se dan en los sistemas vivos.<sup>86</sup> Con este objetivo, se ha desarrollado, por parte de nuestro grupo de investigación en colaboración con el departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia, un método *in vivo* basado en la protección de los complejos contra estrés oxidativo en diferentes cepas de *S. cerevisiae*.

#### **6.1.4.1.- Determinación *in vitro* de la actividad SOD**

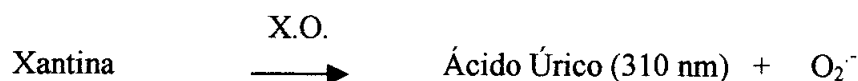
##### **FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

Para determinar la actividad SOD se ha generado un flujo constante y reproducible de aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) mediante el sistema xantina-xantina oxidasa. Como indicador de la presencia de los aniones superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) se ha utilizado la reducción del NBT (Nitro Blue Tetrazolium) que fue seguida espectroscópicamente a

560 nm. El porcentaje de reducción del NBT (Nitro Blue Tetrazolium) es utilizado como medida de la actividad SOD de los complejos.



Para evitar las interferencias que puedan producirse por las posibles reacciones laterales entre los complejos y el enzima xantina oxidasa con la consiguiente inhibición del enzima xantina oxidasa se realizaron medidas a 310 nm que nos indican la formación de ácido úrico a partir de la xantina. Las medidas se realizaron en presencia de las mismas concentraciones de complejo ensayadas a 560 nm pero en este caso la mezcla de reacción sustituye el NBT (Nitro Blue Tetrazolium) por tampón fosfato 50 mM, pH 7,8. El ácido úrico presenta un máximo de absorción a 310 nm con lo cual realizando medidas de absorción a esta longitud de onda podemos cuantificar la cantidad de ácido úrico que se ha formado. Si no existe interferencia por reacciones laterales entre la xantina oxidasa y los complejos, el valor de estas medidas será constante a concentraciones crecientes.



Para obtener la actividad SOD debida al complejo, el valor del porcentaje de inhibición del enzima xantina oxidasa se resta al valor del porcentaje de inhibición del NBT (Nitro Blue Tetrazolium):

$$\text{ACTIVIDAD SOD} = \% \text{ inhibición NBT} - \% \text{ inhibición X.O.}$$

La actividad SOD viene dada por el parámetro  $IC_{50}$ , que es la concentración de complejo que provoca una inhibición de la reducción del NBT del 50%.

### **PROTOCOLO GENERAL**

Para la realización del ensayo se ha preparado una dilución de enzima xantina oxidasa (X.O.) 1:20 v/v en tampón fosfato 50 mM, pH 7,8 (6,9 g  $K_2HPO_4$ , 445 ml NaOH 0,1M). Esta dilución debe permanecer en hielo durante la realización del ensayo para evitar la pérdida de actividad el enzima. Con esta dilución, en ausencia de

complejo, se obtiene en los ensayos un valor de control (blanco) de A/min a 560 nm de aproximadamente 0,05 A/min.

La mezcla de reacción constará de 13,3 ml de tampón fosfato potásico 50 mM (pH 7,8), 0,5 ml de NBT (Nitro Blue Tetrazolium) 2,24 mM y 1,7 ml de xantina 1,8 mM (ambas disoluciones se realizaron en tampón fosfato 50 mM, pH 7,8).

Los complejos fueron disueltos en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,8 (3,0 g TRIS, HCl 0,1M). Se prepararon alícuotas de 10 ml de concentraciones crecientes de complejo: 0,5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100  $\mu$ M.

La mezcla de ensayo se compone de 100  $\mu$ L de la disolución de complejo (que en el caso del blanco será sólo de tampón Tris-HCl), 100  $\mu$ L de la disolución de xantina oxidasa y 800  $\mu$ L de la mezcla de reacción realizada previamente.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se ha ensayado la actividad SOD para los complejos  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-MetilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

En la tabla 6.1 se presentan los valores de  $\text{IC}_{50}$  de cada complejo ensayado. Se incluye también el valor de  $\text{IC}_{50}$  para la sal de Mn(II) ( $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ).

**Tabla 6.1.- Valores de  $\text{IC}_{50}$  de los complejos**

COMPUESTO	$\text{IC}_{50}(\mu\text{M})$
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,65
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,27
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	3,46
$\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,15
$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,04

Hsmtz = sulfametizol; Hsmtzn = sulfametazina

El % de inhibición en función de la concentración de complejos se muestra en las figuras 6.13-6.16. Los complejos ensayados poseen una elevada actividad SOD, como indican los datos de  $\text{IC}_{50}$  que se presentan en la tabla. Todos los complejos presentan mayor actividad que la sal de manganeso a excepción del complejo

$Mn(smtz)_2(N\text{-MetilimH})_2 \cdot 3H_2O$ . Este hecho lo atribuimos a la total disociación del complejo dada la similitud del  $IC_{50}$  de este complejo con el de la sal de manganeso.

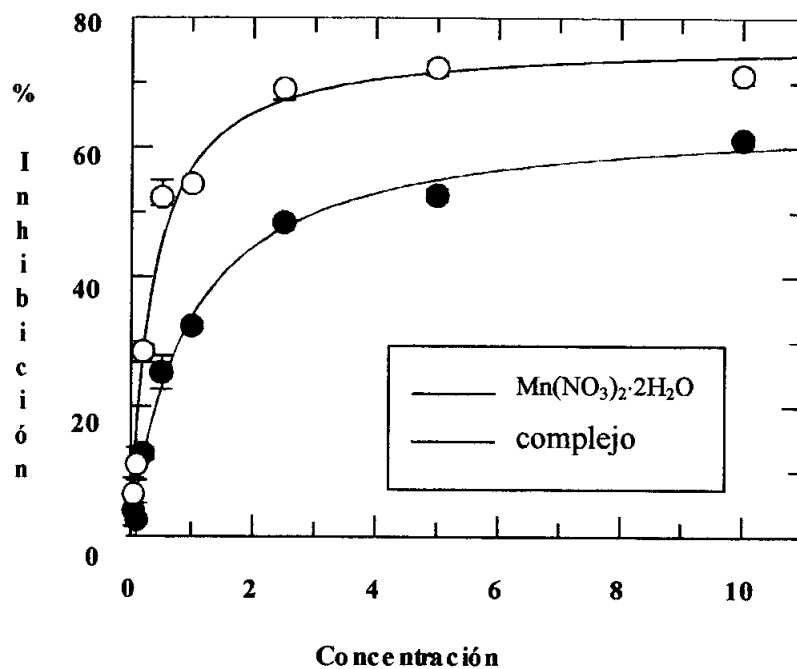


Figura 6.13.- Actividad SOD del complejo  $Mn(smtz)_2(py)_2 \cdot 4H_2O$

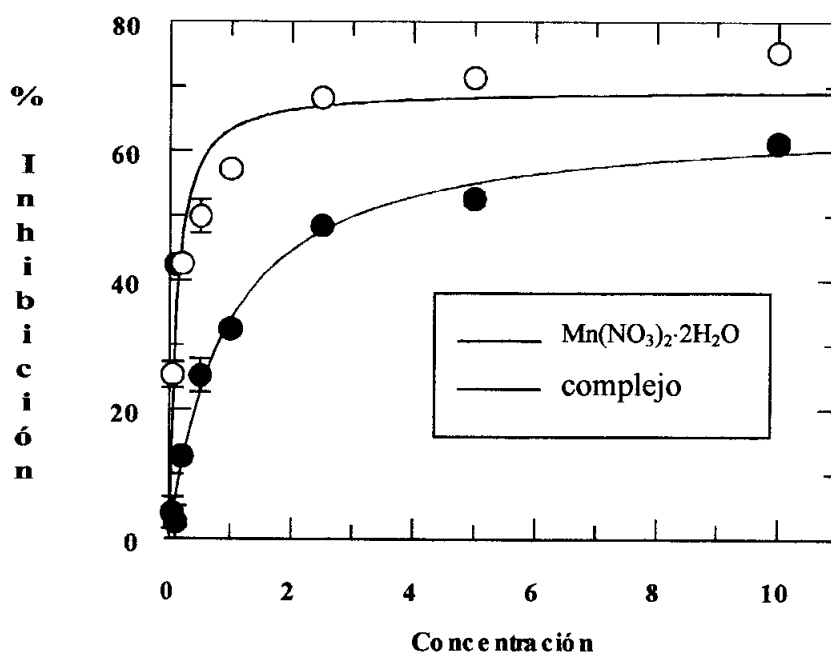


Figura 6.14.- Actividad SOD del complejo  $Mn(smtz)_2(imH)_2 \cdot H_2O$

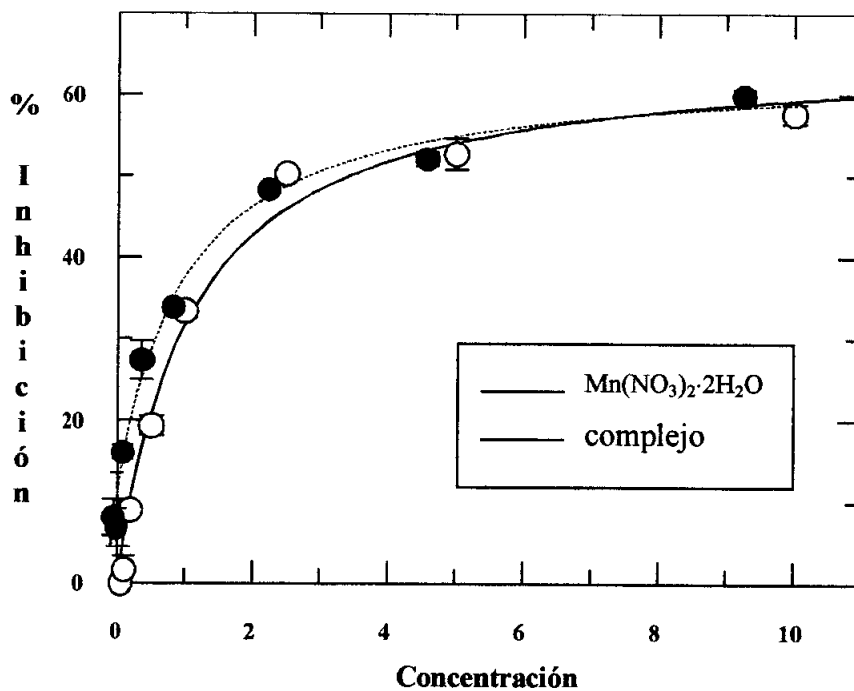


Figura 6.15.- Actividad SOD del complejo  $Mn(smtz)_2(N\text{-MetilimH})_2 \cdot 3H_2O$

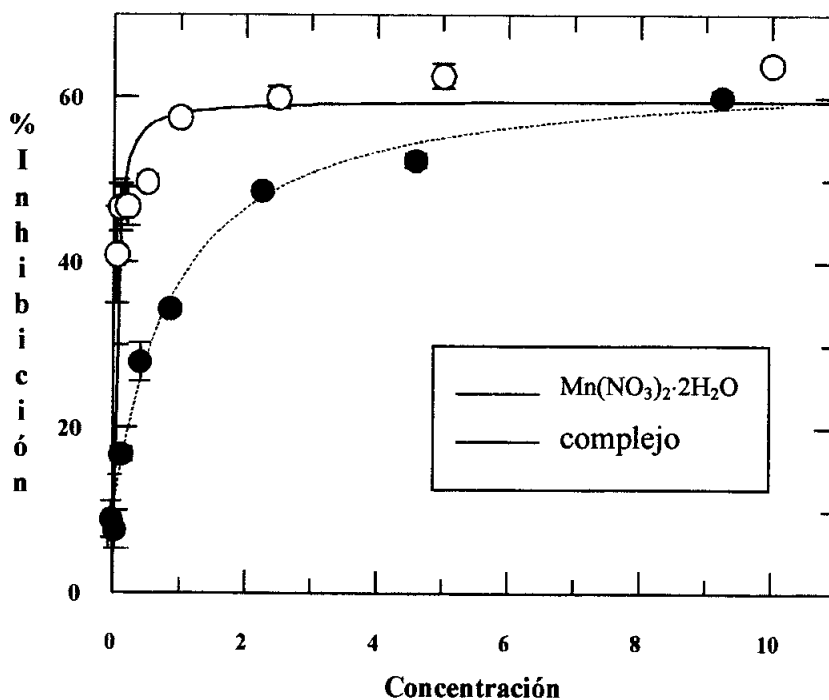


Figura 6.16.- Actividad SOD del complejo  $Mn(smtzn)_2 \cdot 3H_2O$

### **6.1.4.2.- Determinación *in vivo* de la actividad SOD**

Dada la ambigüedad que presenta la medida de la actividad SOD de los complejos miméticos de este enzima y ante los problemas que conlleva comparar los distintos métodos existentes, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un nuevo método *in vivo* en colaboración con el Departamento de Microbiología y Ecología de la Universidad de Valencia.

Este nuevo método está basado en la protección que ejercen los complejos de manganeso y cobre sobre la levadura *S. cerevisiae* contra el estrés oxidativo generado por los radicales libres producidos por menadiona (Vitamina K<sub>3</sub>: 2-metil-1,4-naftoquinona; C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) o por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Consiste en observar la diferencia de crecimiento que existe, en presencia de complejo, entre una cepa silvestre y una cepa mutada, que carece del gen que expresa el enzima Cu/Zn-SOD. Este ensayo nos ha permitido determinar de forma cualitativa la actividad SOD de los complejos en células.

Características de las cepas:

- **W303-1a**: Cepa salvaje de *S. cerevisiae*.  
MATa ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3 leu2-112 can1-100
- **ATCC 96687**: Cepa de *S. cerevisiae* que posee una delección en el gen SOD1 que expresa la biosíntesis del enzima Cu/Zn-SOD.  
MATa ura3-52 trp-289 his3-Δ1 leu2-3, 112; Sod1::URA3

### **CONDICIONES DEL ENSAYO**

Este tipo de ensayo debe realizarse en condiciones totalmente estériles. Por esto, tanto el material como el medio, rico en glucosa, YPD sólido y líquido (20 g. peptona, 20 g. glucosa, 10 g. extracto de levadura, 1,5% agar (sólo medio sólido)) utilizados, deben ser esterilizados previamente a los ensayos. Para ello se introduce en un autoclave el material a 120 °C y 1 atm. de presión durante 20 minutos y el medio a 120 °C y 1 atm. pero sólo 15 minutos para evitar la caramelización que puede producirse en el medio al poseer glucosa. El asa de platino utilizado en la siembra se esteriliza previamente

mediante flameado y todos los procesos seguidos durante la realización del ensayo se llevan a cabo al abrigo de la llama del mechero de gas para evitar la posible contaminación de las muestras.

### **FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

Las levaduras obtienen energía por dos procesos metabólicos dependiendo de la fuente de energía utilizada. Estos procesos son dos: respiración y fermentación.<sup>99</sup> En el caso concreto de *S. cerevisiae*, cuando en el medio la concentración de glucosa es elevada, estas levaduras dirigen su metabolismo hacia el proceso de fermentación, debido al efecto Crabtree.<sup>100</sup> Según este efecto, una elevada concentración de glucosa inhibe (reprimiendo o inactivando) los enzimas respiratorios con lo cual la levadura se ve forzada a seguir la ruta de la fermentación.

La **fermentación** es un conjunto de reacciones de oxidación-reducción, en el cual las sustancias orgánicas actúan como dadores y aceptores de electrones y, a partir de la glucosa, se obtiene etanol y CO<sub>2</sub> y se genera ATP. Esta ruta constituye un despilfarro de glucosa comparado con la fosforilación oxidativa ya que se consume mucha más glucosa que en el proceso de respiración.<sup>101</sup>

La vía de fermentación de la glucosa se puede dividir en tres etapas que se detallan en la figura 6.17:<sup>102</sup>

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |   |                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------|
| <p><b><u>Etapa 1.-</u></b> Reacciones de preparación. Formación de un compuesto intermedio clave, el gliceraldehido.</p> <p><b><u>Etapa 2.-</u></b> 1ª reacción de oxidación-reducción. Producción de ATP y formación de piruvato.</p> <p><b><u>Etapa 3.-</u></b> 2ª reacción de oxidación-reducción. Producción de productos de fermentación (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH y CO<sub>2</sub>).</p> | } | <b><u>GLUCOLISIS</u></b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------------|

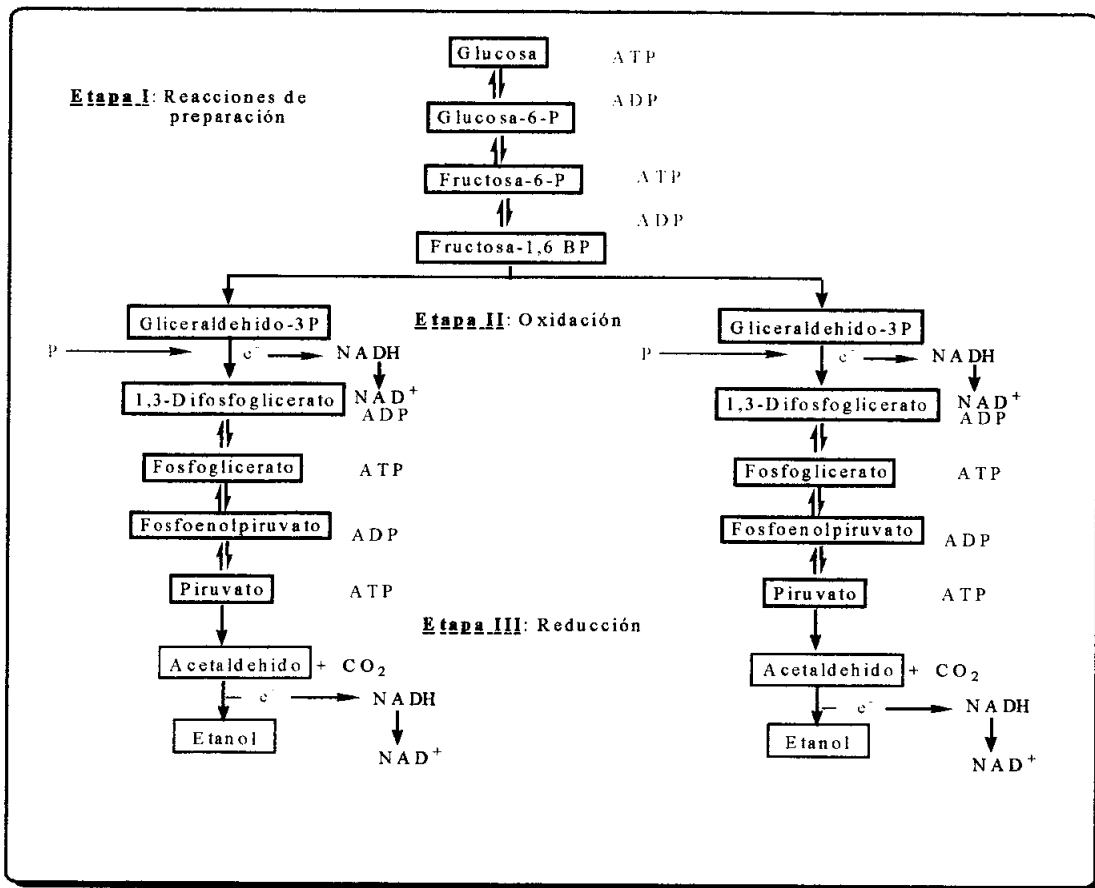


Figura 6.17.- Esquema de la ruta metabólica para la fermentación

**PROTOCOLO GENERAL**

1º) Se prepara una batería de tubos con medio YPD sólido (15 ml por tubo) que se colocarán en placas Petri cuando llegue el momento. Hasta el momento de su utilización estos tubos permanecen en la cámara fría a 4°C. Se prepara también una batería de YPD líquido (3ml por tubo) y se guardan a Tª ambiente. Todos los tubos son esterilizados antes de guardar.

2º) El día anterior al ensayo se realiza la siembra de las diferentes cepas. Con un asa de platino se toma una colonia de células de la placa donde están creciendo y se suspenden en un tubo con medio YPD líquido (3 ml) (cada cepa en un tubo distinto). Se dejan crecer las células hasta fase estacionaria durante toda la noche a 28 °C.

3º) Se prepara también el día anterior al ensayo la menadiona. Ésta será 40 mM y 5 mM. Las disoluciones se guardan en el congelador envueltas en papel de aluminio para evitar su exposición a la luz .



4º) Se disuelven los complejos el mismo día del ensayo para evitar posibles disociaciones u oxidaciones. Se prepara una disolución 10 mM. Algunos de los complejos se han disuelto en H<sub>2</sub>O, otros en DMSO/etanol (en máxima relación 1:4 para tener en el volumen final menos del 5% de DMSO). Cuando se realiza en medio etanol, bactericida, la disolución de complejo no debe esterilizarse aunque sí el recipiente donde se introduce. Si el complejo se ha disuelto en H<sub>2</sub>O se debe filtrar con una jeringuilla con filtro antes de introducir en el recipiente estéril.

5º) Una vez han crecido las células se hacen diferentes diluciones de cada cepa ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) y se realiza el recuento de las mismas al microscopio. Con este dato se realizan los cálculos para saber qué dilución de la muestra patrón de células se debe tomar si se pretende que la cantidad final en la placa Petri sea de  $10^6$  células. El volumen añadido de células es constante y siempre es de 100 µL.

6º) Se funde el medio YPD sólido a 120 °C y se dejan los tubos, con el medio, a Tª entre 45-50 °C para poder trabajar con ellos. Se añade en cada uno el volumen que le corresponde de disolución de complejo o de disolvente y células (tabla 6.2). Se agita y se coloca en una placa Petri.

**Tabla 6.2.- Concentraciones y volúmenes de los complejos ensayados**

Volumen disolución complejo (µL)	Volumen disolvente (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final de complejo (µM)
<b>Complejos de Manganeso</b>			
0	300	300	0
120	180	300	80
210	90	300	140
300	0	300	200
<b>Complejos de Cobre</b>			
0	300	300	0
90	210	300	25
200	100	300	55
300	0	300	85

7°) Cuando las placas están frías, se colocan los discos de celulosa (6 mm de diámetro) impregnados con menadiona o con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las concentraciones y los volúmenes de estos productos que colocamos en cada disco dependen de la cepa con la que se trabaja:

**Cepa W303-1a:** 15  $\mu\text{L}$  de menadiona (40 mM) y 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (35%)

**Cepa ATCC 96687:** 5  $\mu\text{L}$  de menadiona (5 mM) y 5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1/2 de la disolución al 35%).

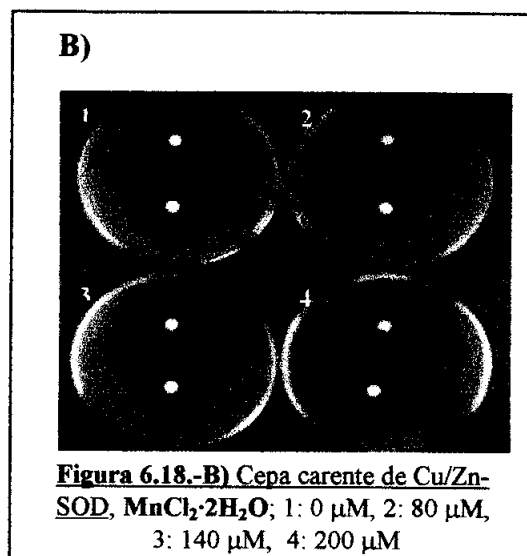
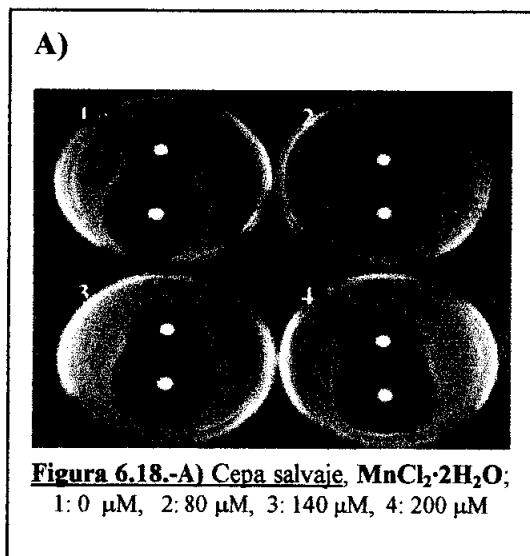
8°) Se colocan las placas en estufa a 28 °C. Al cabo de 72 horas el crecimiento observado nos permite calcular, mediante la medida de los halos de inhibición de crecimiento, la protección que ejercen los complejos frente a los radicales que se han generado.

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Se ha ensayado la actividad SOD para los complejos  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$ ,  $\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . El resto de complejos no han podido ser ensayados por problemas de insolubilidad.

Las figuras 6.18-6.25 muestran los resultados para los complejos y para las sales de Cu(II) y Mn(II). El halo de inhibición de crecimiento corresponde a la zona más oscura observada en las figuras. La zona clara corresponde a la de crecimiento celular. Los puntos blancos situados en la parte superior de cada placa son discos de celulosa impregnados con menadiona y los situados en la parte inferior están impregnados con  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cada medida ha sido realizada por triplicado (tres placas por cepa y concentración de complejo) por lo que el valor obtenido de porcentaje de reducción del diámetro de inhibición es la media de estas tres medidas. Al diámetro del halo de inhibición de crecimiento de la levadura para concentración 0 de complejo se le asigna el valor de 100%.

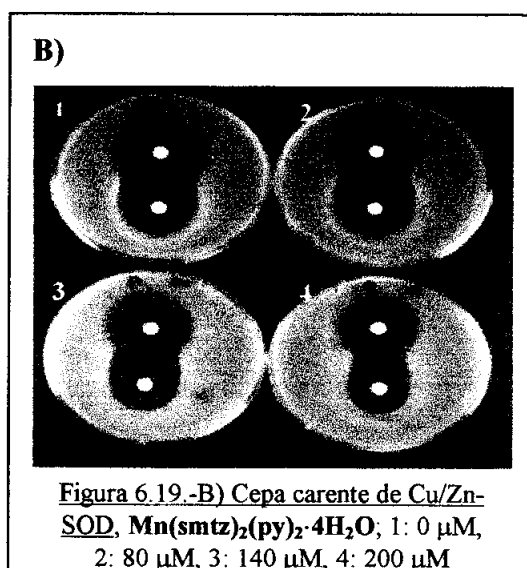
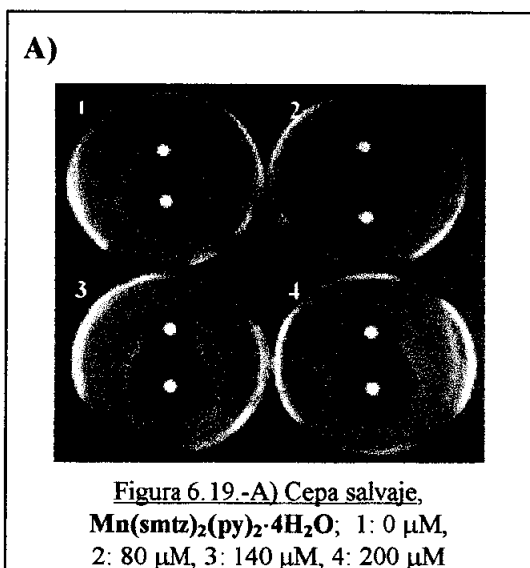
- Complejos de Manganeso



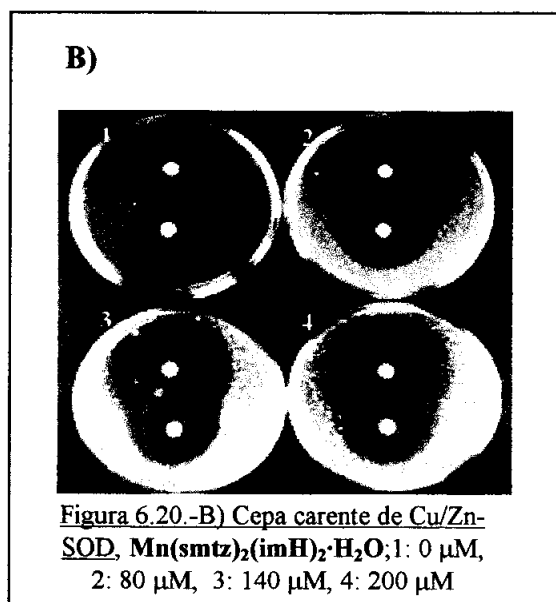
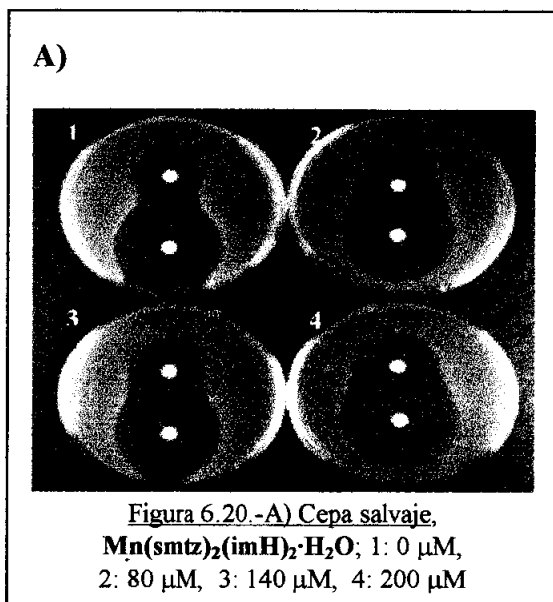
En la figura 6.18.-A) se observa cómo la sal de Mn(II) no afecta prácticamente a la cepa salvaje de *S. cerevisiae*. Este efecto se puede interpretar por el hecho de que esta cepa posee, funcionales, todos los mecanismos de defensa frente a los radicales libres. Puesto que este hecho se repite en todos los ensayos, a la hora de discutir los resultados nos centraremos en la cepa carente del enzima Cu/Zn-SOD.

En la figura 6.18.-B), se observa cómo, para la cepa mutada, la sal  $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ejerce, sobre el crecimiento celular, un ligero efecto protector frente a los radicales libres generados por menadiona o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que no depende de la concentración. Las diferencias de diámetro de halo a concentración 0  $\mu\text{M}$  entre las dos cepas se atribuye al hecho de que la cepa mutada es más sensible que la cepa salvaje.

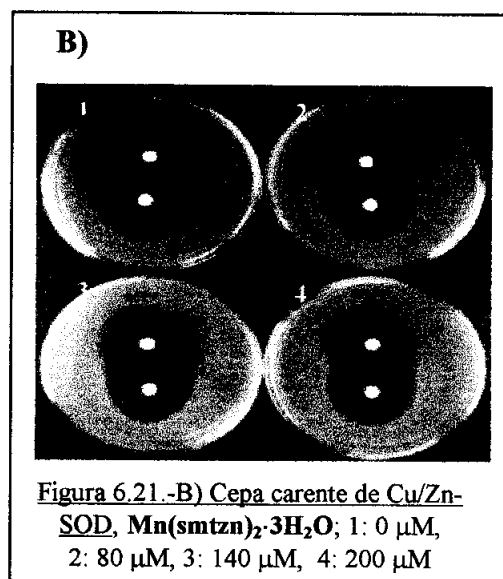
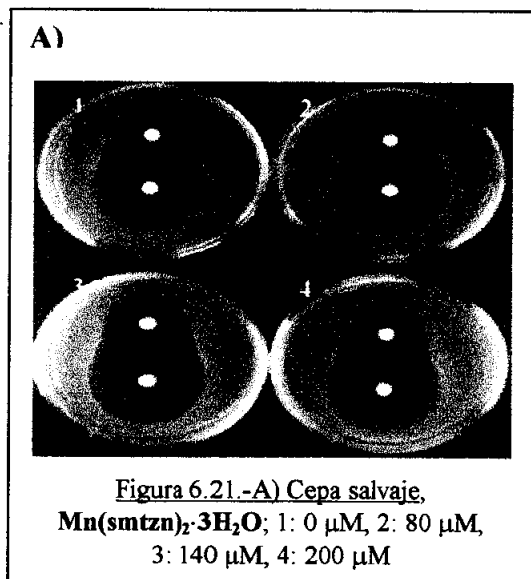
Efectuada la comparación de la sal de Mn(II) con los complejos para la cepa carente de Cu/znc SOD, en todos los casos, los complejos presentan mayor actividad SOD que la sal. Este fenómeno es mejor observado cuando el estrés oxidativo está producido por la menadiona.



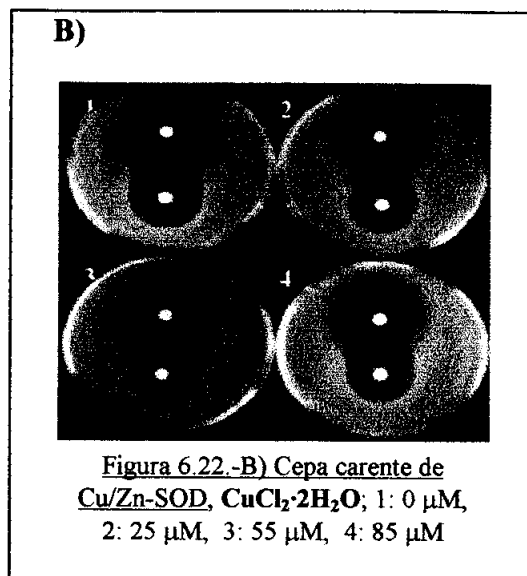
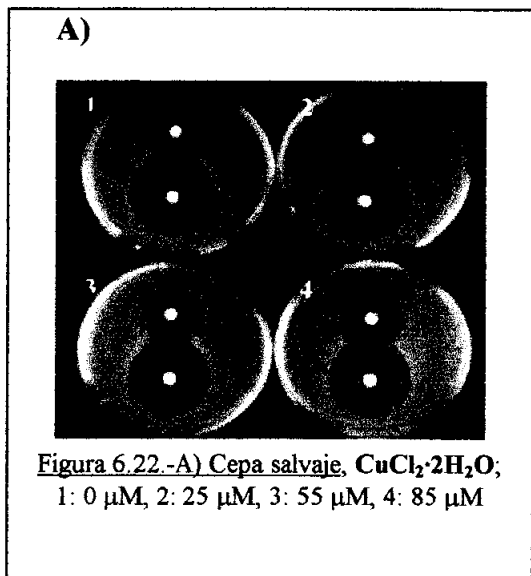
En la figura 6.19.-B) se observa cómo el complejo  $\text{Mn(smtz)}_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  presenta actividad SOD *in vivo* para la cepa mutada. Se aprecia cierto efecto protector contra los radicales libres generados por la menadiona o el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este efecto es más evidente para el primero de estos oxidantes, y parece que depende de la concentración de complejo puesto que a mayores concentraciones se observa mayor reducción del diámetro del halo de inhibición de crecimiento de *S. cerevisiae*. Para el  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se observa tan claramente este efecto protector.



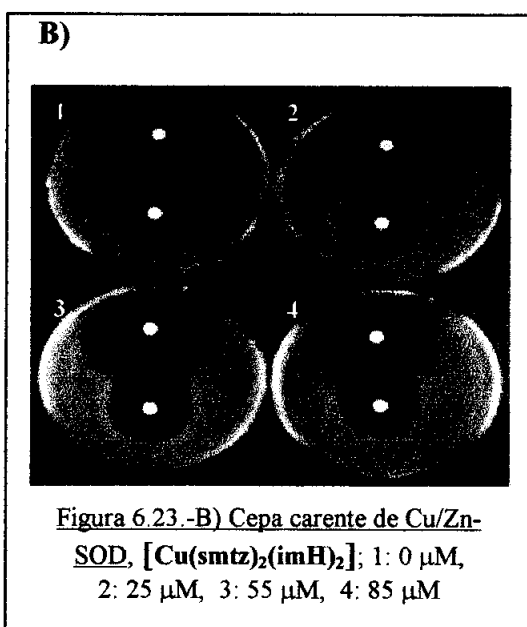
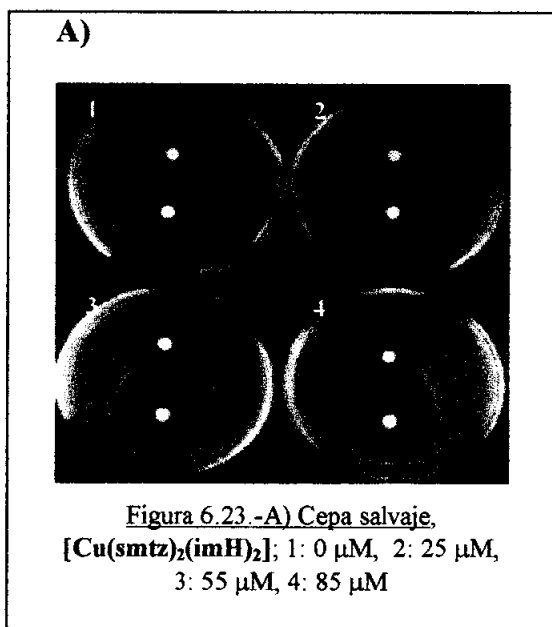
Para el complejo  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  el hecho de no apreciarse crecimiento celular en la placa control y el aumento de crecimiento con la concentración de complejo, parece indicar actividad SOD *in vivo*.



Para el complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se observa cierto efecto protector cuando tratamos la cepa carente de Cu/Zn-SOD con el complejo si el estrés oxidativo se produce por adición de menadiona. Se aprecia una disminución del halo de inhibición similar para todas las concentraciones. Cuando el estrés está generado por  $\text{H}_2\text{O}_2$  no parece observarse este efecto protector.

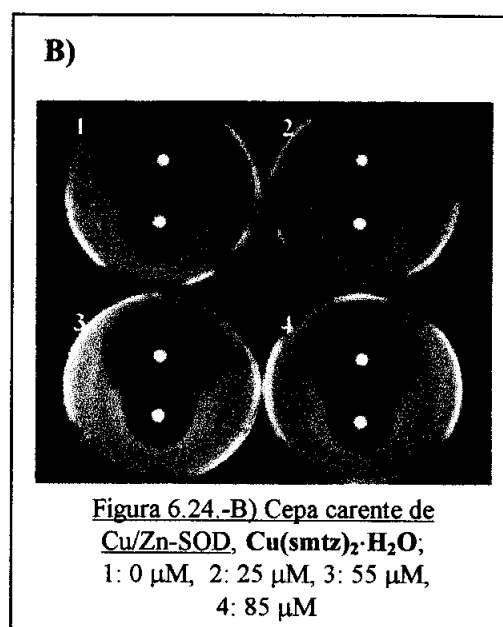
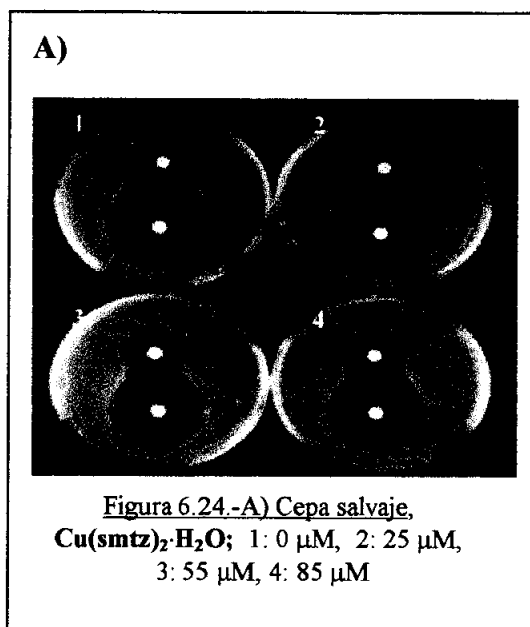
- Complejos de Cobre

La sal de  $\text{Cu(II)}$ ,  $\text{CuCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , no ejerce efecto protector ni tóxico sobre el crecimiento celular de la cepa salvaje (figura 6.22.-A). Para la cepa carente de  $\text{Cu/Zn-SOD}$  se observa un ligero efecto protector frente a los radicales libres (figura 6.22.- B).

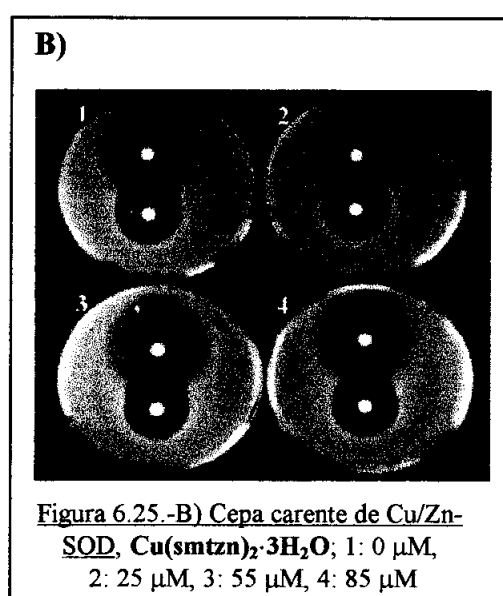
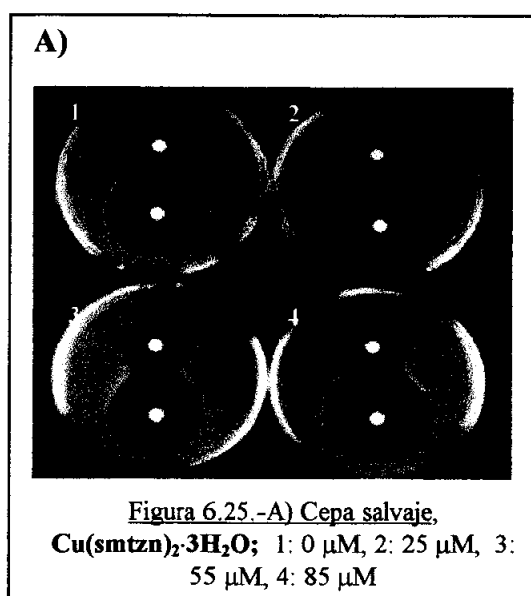


El complejo  $\text{Cu(smtz)}_2(\text{imH})_2$  presenta, para la cepa mutada (figura 6.23.-B), cierto efecto protector contra los radicales libres generados por la menadiona o el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Este efecto es más evidente para el primero de estos oxidantes, y se observa que no

depende de la concentración de complejo puesto que a mayores concentraciones no se observa mayor reducción del diámetro del halo de inhibición de crecimiento de *S. cerevisiae*. Cuando se compara con el ensayo realizado para la cepa carente de Cu/Zn-SOD de la sal de Cu(II) se aprecia mayor efecto protector del complejo que de la sal.



La figura 6.24.-B) nos muestra que el complejo  $\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  no presenta actividad SOD ya que no se aprecia efecto protector del complejo, frente a especies tóxicas sobre la cepa que presenta una delección en el gen que codifica el enzima Cu/Zn-SOD.



Tampoco el complejo  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  ejerce protección frente a los radicales libres puesto que en la figura 6.25.-B) no se aprecia prácticamente disminución en el diámetro del halo de inhibición de crecimiento celular para ninguna de las dos especies formadoras de radicales libres.

Los ensayos realizados para determinar la actividad SOD de los complejos han revelado que:

- Todos los complejos de manganeso ensayados *in vitro* presentan actividad SOD excepto el complejo  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-metilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Este hecho se evidencia por los bajos valores de  $\text{IC}_{50}$  encontrados.
- Los complejos de manganeso ensayados mediante el método *in vivo* han presentado actividad SOD *in vivo* aunque en distintos grados.
- Los complejos  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  presentan actividad SOD. Ésta es más evidente en el primer caso, por la fuerte reducción del diámetro del halo de inhibición observada. Estos resultados se refuerzan con los bajos valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos por métodos *in vitro*.
- Para los complejos de cobre,  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$ ,  $\text{Cu}(\text{smtz})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y  $\text{Cu}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  de los que sólo se ha ensayado la actividad SOD por el método *in vivo*, sólo el complejo  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$  presenta actividad SOD y ésta es no dependiente de la concentración.
- El efecto protector de este complejo así como el observado para el complejo  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  puede estar relacionada con la existencia de ligandos heteroaromáticos, tales como imidazoles o piridina, en estos complejos. Este hecho ha sido observado anteriormente por nuestro grupo de investigación con complejos de Cu(II) y sulfonamidas *N*-sustituidas e imidazoles y derivados en métodos *in vitro*.<sup>24</sup> Del mismo modo este efecto ha sido descrito en la bibliografía por otros autores como *Rizzarelli et al.*<sup>103</sup>

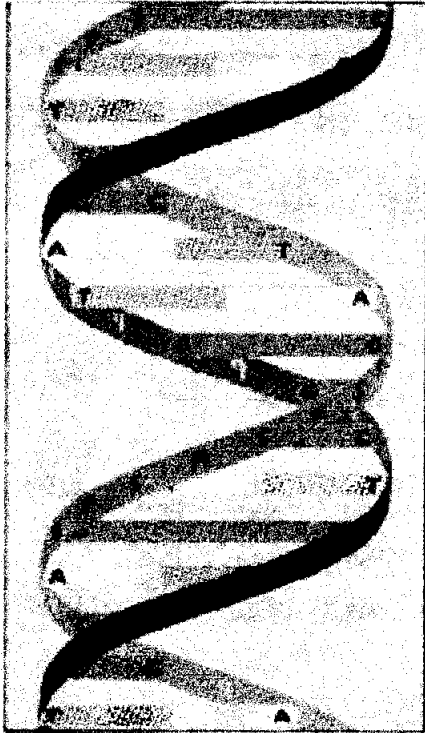


## 6.2.- ACTIVIDAD NUCLEASA

### 6.2.1.- ÁCIDOS NUCLEICOS: IMPORTANCIA Y ESTRUCTURA

Es bien conocida la importancia de los ácidos nucleicos en la vida. La información requerida por los organismos para mantenerse vivos, reproducirse y hacer posible su diversidad está codificada por los ácidos nucleicos.<sup>104</sup>

El ADN (ácido desoxiribonucleico) es el material genético de los organismos celulares,



mientras que el ARN (ácido ribonucleico) lo es de algunos virus. Casi siempre el ADN existe bajo la forma de una doble hélice, formada por dos ramas complementarias. Los nucleótidos son los ladrillos de los ácidos nucleicos. Están formados por una molécula de fosfato inorgánico (P), unida a un azúcar (S = ribosa, en el ARN; desoxirribosa en el ADN). El azúcar, a su vez, está unido a una base nitrogenada (figura 6.26). Ésta puede ser una base púrica, adenina (A) o guanina (G), o una base pirimidínica, citosina (C) o timina (T). En el ARN, el uracilo (U) sustituye a la timina (figura 6.26).<sup>105</sup>

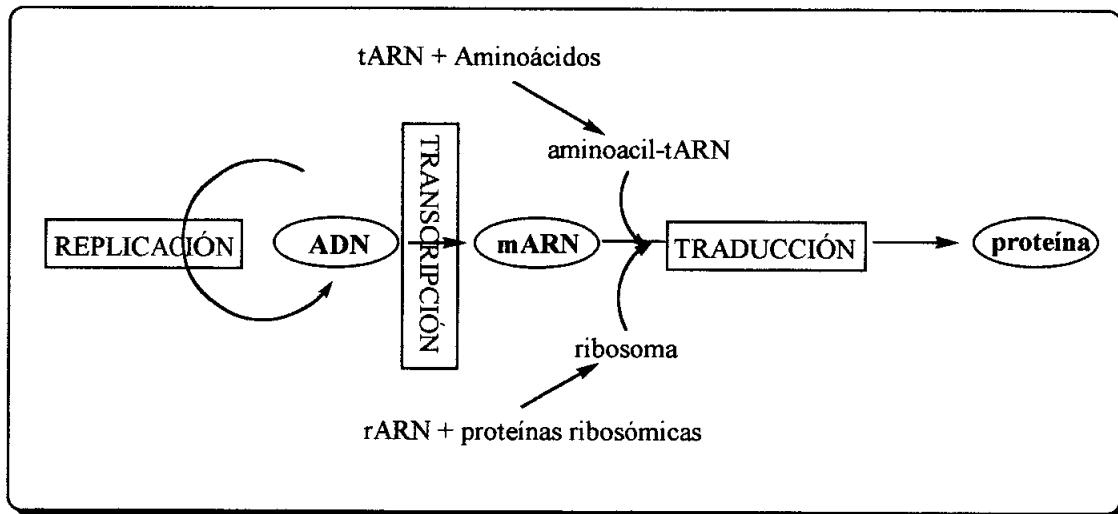
La doble cadena discurre de forma antiparalela con las dos hebras de nucleótidos enfrentadas. Los

ácidos nucleicos son polímeros de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster que unen los carbonos 5' y 3' de los azúcares componentes de nucleótidos adyacentes. La estructura se escribe por convenio en dirección 5'-3' (figura 6.27).<sup>106</sup>



Figura 6.27.-Doble hélice de ADN

Todos los organismos contienen las instrucciones que especifican los mecanismos por los cuales se elabora su estructura y se mantienen sus funciones. Estas instrucciones genéticas, denominadas genoma, han de poder ser copiadas fielmente y transmitidas durante la reproducción a posteriores generaciones. En los sistemas biológicos, la información que especifica la estructura primaria de una proteína está codificada en el ADN. Ésta información es copiada en el proceso de *transcripción*, cuando se sintetiza el ARN. Una parte de la información de las moléculas de ARN transcritas es *traducida* por medio de la síntesis de las cadenas polipeptídicas. Así se puede generalizar diciendo que la información almacenada en el genoma de la célula fluye desde el ADN hasta el ARN y de éste a la proteína (figura 6.28).<sup>104</sup>

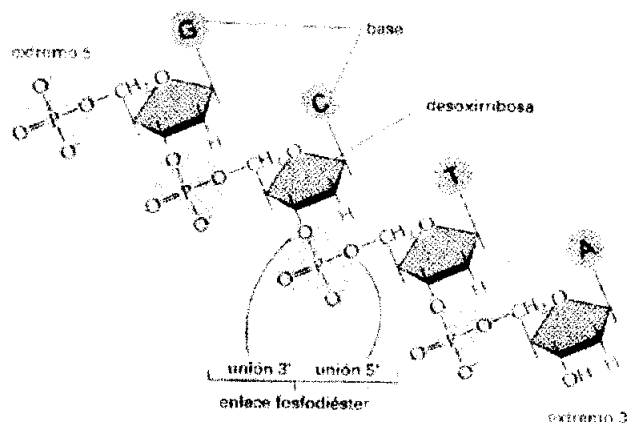


**Figura 6.28.- Participación de los ácidos nucleicos en la transmisión de información genética.**

### 6.2.2.- NUCLEASAS : IMPORTANCIA DEL ENLACE FOSFODIESTER

Durante los procesos a los que se ve sometido el ADN en el desempeño de su función, éste puede sufrir una serie de daños que la propia célula se encarga de reparar. Estos mecanismos de reparación celular actúan con una eficacia extraordinaria y son catalizados por diferentes conjuntos de enzimas. Entre estas enzimas podemos encontrar las nucleasas (o enzimas de restricción), que hidrolizan el enlace fosfodiéster permitiendo que otros enzimas actúen restaurando el nucleótido correcto y restableciendo el equilibrio de la doble hélice.<sup>106</sup>

## ESQUELETO DE AZÚCAR FOSFATO DEL DNA



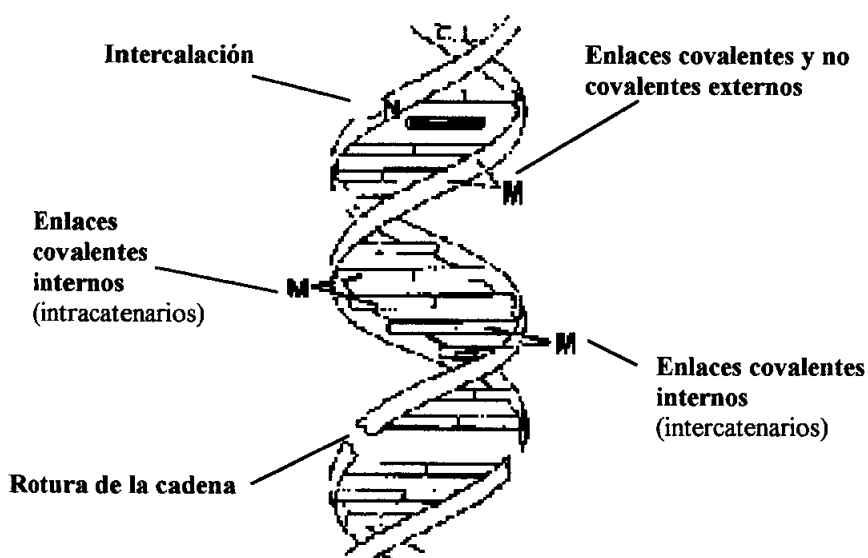
**Figura 6.29.- Esqueleto de azúcar-fosfato del ADN**

Las **nucleasas** son capaces de catalizar la hidrólisis de los enlaces P-O en unos pocos segundos. Esta eficacia es impresionante ya que esta misma hidrólisis cuando no está catalizada es una reacción extremadamente lenta a  $T^a$  ambiente (la vida media de la unión fosfodiéster ha sido estimada en unos 200 millones de años a pH 7). La rotura del enlace se produce mediante mecanismos  $\text{SN}_2$ .<sup>107</sup>

La razón por la que la naturaleza ha elegido los enlaces fosfodiéster como nexo entre nucleótidos en el material genético podría estar relacionada con su carga negativa y con la alta estabilidad del enlace respecto a su hidrólisis, lo cual reduce la posibilidad del ataque nucleofílico en el enlace de ADN. Puesto que la hidrólisis de estos enlaces fosfodiéster es necesaria para la reparación del ADN y para muchas de las fases de la transcripción y transducción, existen enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces P-O del grupo fosfato del ADN. Estos enzimas hidrolíticos son metaloenzimas con iones metálicos en sus centros activos. Durante la pasada década, han sido determinadas, con excelente resolución, estructuras cristalinas de estas metaloenzimas, las cuales han indicado que los iones divalentes situados en sus centros activos juegan un importantísimo papel en dos eventos catalíticos: la neutralización de la carga negativa P-O por la formación de complejos con el catión y la intervención en el ataque nucleofílico del  $\text{H}_2\text{O}/\text{OH}^-$  (o un residuo aminoacídico) al átomo de fósforo que va a ser escindido.

El estudio de estas enzimas durante los últimos veinte años ha abierto paralelamente un importante campo de investigación para los bioinorgánicos destinado a la búsqueda de nucleasas artificiales que compitan con las naturales. Las nucleasas artificiales o **nucleasas químicas** son complejos de metales de transición. Estos nuevos “escindidores” del ADN y del ARN podrían tener un prometedor futuro como agentes antivirales o antitumorales si pudieran ser usados para crear daño en el ADN presente en las células cancerosas o en el ADN retroviral integrado dentro de las células infectadas.<sup>107</sup>

Para poder actuar como nucleasas químicas, los complejos metálicos deben ser capaces de unirse al ADN. Las posibles interacciones entre los complejos y el ADN pueden resumirse principalmente en cuatro (figura 6.30):<sup>108</sup>



**Figura 6.30.-Modos de interacción complejo metálico-ADN**

- a) **Intercalación** Consiste en la inserción de una molécula entre dos pares de bases adyacentes. Dicha inserción se mantiene por enlaces de Van der Waals y es condición la planaridad de la molécula que se intercala. Ejemplos de este tipo de interacción son los complejos metal-terpiridina, metal- (1,10-fenantrolina) o las metaloporfirinas entre otros.

- b) **Enlaces covalentes y no covalentes externos** La carga negativa de la doble hélice puede interactuar con una serie de moléculas cargadas positivamente mediante interacciones electrostáticas o unión P-O. La carga resultante se reduce, lo que favorece su estabilidad y conformación. Los ejemplos más frecuentes de complejos que utilizan este tipo de interacción con el ADN son los complejos metal-amina.
- c) **Enlaces covalentes internos (intra- e intercatenarios)** Un número de iones aqua-metal se unen covalentemente a las bases del ADN. Éstos son ejemplos de iones metálicos sencillos sin un entorno complicado y, al igual que en la interacción externa, la sustitución de los ligandos altera la afinidad y especificidad de la unión. Ejemplos de este tipo de interacción son el mercurio y la plata así como los complejos platino-amina.
- d) **Escisión de la cadena de ADN** La escisión de la cadena implica la rotura de los enlaces de la doble hélice y esta rotura puede ser en una sola cadena o en las dos. La inducción química de la escisión de la cadena por los complejos metálicos puede estar iniciada por reacciones de transferencia de electrones centradas en el ión metálico y producción de especies radicalarias del oxígeno. Los complejos Cu-(1,10)fenantrolina, Co-(1,10)fenantrolina y Fe-EDTA-(unidor de ADN) son los ejemplos más claros de este modo de interacción.

### 6.2.3.- MODELOS DE NUCLEASAS QUÍMICAS

Los numerosos estudios realizados en este área han puesto de manifiesto la capacidad de determinados complejos para mimetizar la actividad nucleasa de las endonucleasas naturales. Se ha determinado con éxito el mecanismo mediante el cual se produce la escisión de ADN en algunos complejos metálicos. Éstos se han convertido en los modelos para la síntesis, caracterización y estudio de otros complejos estructural y funcionalmente similares. Entre los más importantes encontramos los complejos Cu(phen)<sub>2</sub>, Fe-BLM o Mn-TMPyP (phen ≡ fenantrolina, BLM ≡ bleomicina, TMPyP ≡ *meso*-tetrakis(4-*N*-metilpiridimiumil)porfirina).<sup>109</sup>

### 6.2.3.1.- Complejos Cu-fenantrolina

El complejo  $\text{Cu}(\text{phen})_2$  fue el primero en ser reconocido como nucleasa química por *Sigman et al.* Las especies activas responsables de la ruptura del ADN son todavía materia de debate. Un punto de vista aceptado es considerar que  $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2$  (o  $\text{Cu}^{\text{II}}(\text{phen})_2$  antes de ser reducido) difunde libremente hacia la doble cadena de ADN, se une a éste y reacciona con el peróxido de hidrógeno para romper el ADN. Algunos estudios indican que los radicales hidroxilo difusibles producidos no son causa de la escisión de la cadena del ADN mientras que otros mencionan que son estas especies radicalarias las que rompen el ADN. El modelo de ruptura del ADN por el  $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2$  activado consiste en su unión al surco menor de una doble hélice dextrógira (figura 6.31). La ruptura específica observada se describe como una preferencia por la unión a los tripletes 5'-TAT, lo cual sugiere un comportamiento de unión al surco menor más que un comportamiento de intercalación, para el que las preferencias GC son esperadas. Como se esperaría en el mecanismo de unión al surco menor, los enlaces C-H del C-1' y C-4' de las desoxirribosas (dos enlaces C-H accesibles del surco menor), son las principales dianas del  $\text{Cu}^{\text{I}}(\text{phen})_2$  activado. Mediante el marcaje con  $^{32}\text{P}$  en el extremo 5', *Sigman et al.* han demostrado que los fosfoglicolatos-3' resultantes de la química del C-4' son productos de degradación menor comparados con aquellos generados por la química del C-1' la cual representa entre el 80-90% del daño al ADN. Después de la oxidación al enlace C-H del C-1' y liberación de la base atacada, la primera  $\beta$ -eliminación libera un extremo 5'-P y un residuo de azúcar dañado en el extremo 3' de la cadena de ADN. La 5-metileno-2(5H)-furanona (5-MF) es liberada de su precursor por un paso térmico o un tratamiento con piperidina necesario para facilitar la segunda  $\beta$ -eliminación.

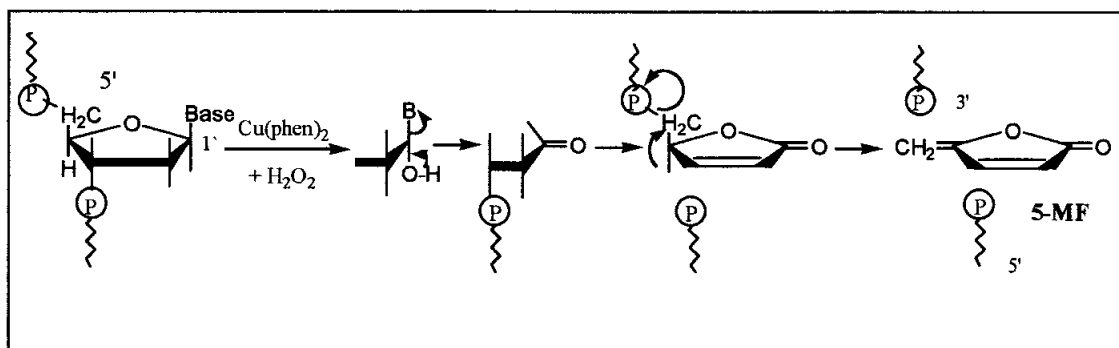


Figura 6.31.- Mecanismo de degradación del ADN por  $\text{Cu}(\text{phen})_2$

### 6.2.3.2.- Complejos Fe-bleomicina

Las bleomicinas son una familia de antibióticos glicopeptídicos antitumorales producidos por *Streptomyces verticillus* (figura 6.32).

Los cinco átomos de nitrógeno de la bleomicina son capaces de enlazar fuertemente algunos cationes metálicos (hierro, manganeso, cobre, cobalto o zinc). Esta potente droga anticancerígena está siendo en la actualidad extensamente usada en quimioterapia en asociación con otras drogas en el tratamiento de la enfermedad de Hodgkin o de cánceres de cuello y cabeza entre otros.

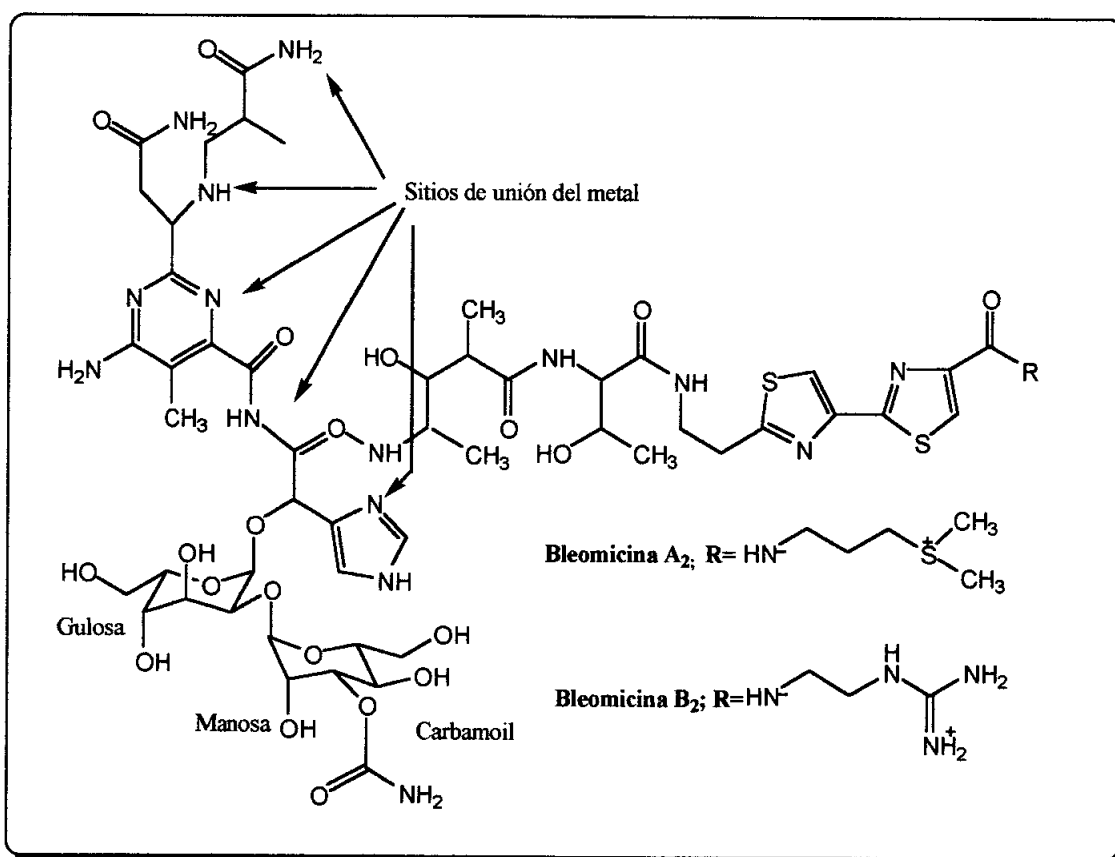
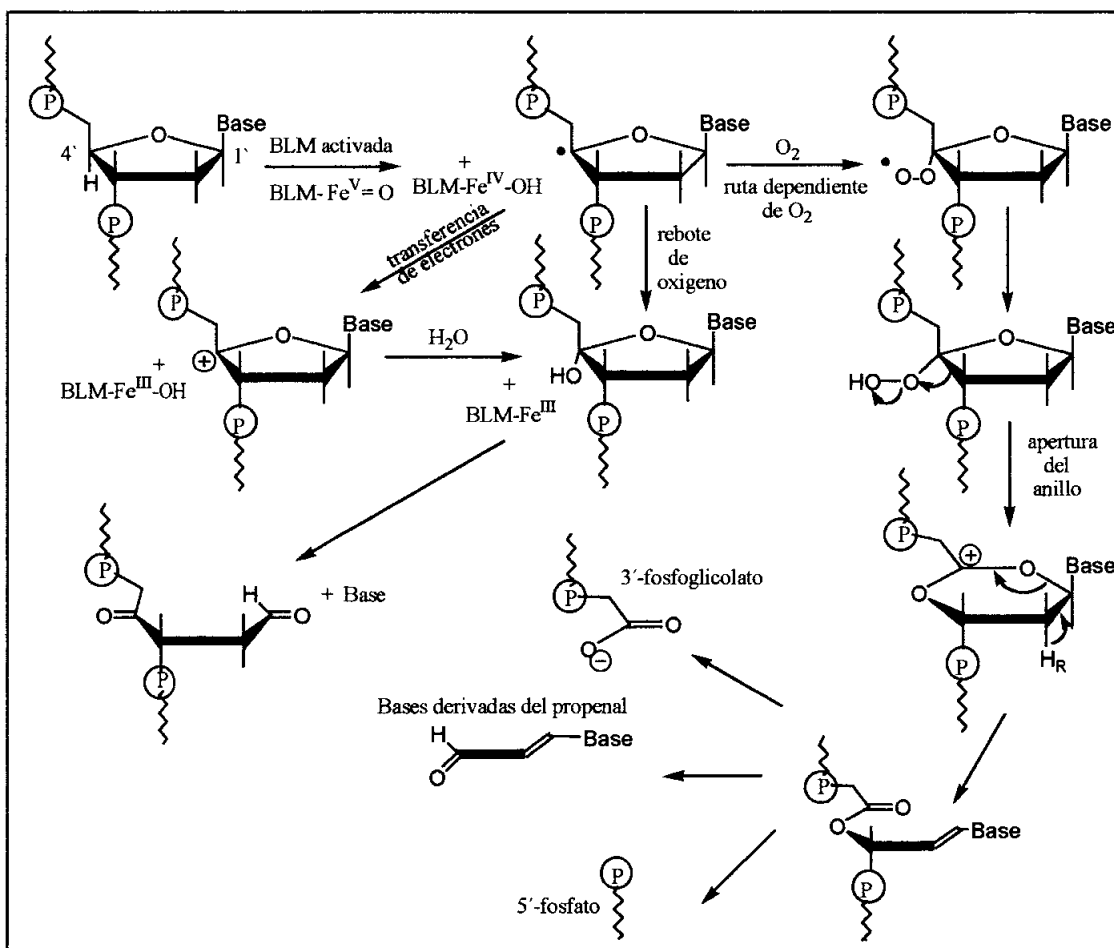


Figura 6.32.- Estructura de las bleomicinas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>

La citotoxicidad de la bleomicina hacia las células cancerosas es dependiente de oxígeno y está relacionada con su capacidad para inducir cortes en una cadena o en las dos cadenas del ADN. La penetración celular limita su citotoxicidad. La degradación oxidativa del ADN por la bleomicina implica la captación del átomo de hidrógeno en la posición 4' de las unidades de desoxiribosa por una especie transitoria, resultante de la activación del Fe-BLM por dos equivalentes reductores en presencia de oxígeno

molecular. El modelo de rotura del ADN no está a favor de las especies  $\text{OH}\cdot$  difusibles como agentes captadores del átomo de hidrógeno. Los sitios más frecuentes de corte, mediante este mecanismo, son las secuencias 5'-pirimidina (5'-G, 5'-A).

El radical en el 4' puede reaccionar según tres rutas: 1) con oxígeno molecular para generar un hidroperóxido inestable en 4', el cual se escinde a la correspondiente base derivada del propenal, a 3'-fosfoglicolato o a 5'-fosfato, 2) con el grupo OH coordinado del complejo  $\text{BLM-Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$  mediante un mecanismo de rebote para dar el sitio 4' hidroxilado, 3) con el  $\text{BLM-Fe}^{\text{IV}}\text{-OH}$  via transferencia de un electrón para producir un catión intermediario que reacciona con agua (figura 6.33).



**Figura 6.33.- Mecanismo de degradación del ADN por Fe-BLM activado**

Los cortes en la doble cadena inducidos por la BLM resultan de dos cortes en cada cadena producidos por la misma molécula de bleomicina que actúa como catalizador. El factor esencial que establece la relación entre el corte de una cadena o de



las dos cadenas en un sitio específico está relacionado con la eficiencia con la cual el complejo Fe-BLM puede ser reactivado.

### **6.2.3.3.- Complejos Mn-porfirina**

Desde la publicación de los primeros trabajos acerca de la intercalación y propiedades de escisión de algunos derivados catiónicos de porfirinas, una gran variedad de porfirinas y metaloporfirinas han llamado la atención de los investigadores y ha generado un gran número de trabajos en el campo de la escisión química y fotoquímica del ADN.

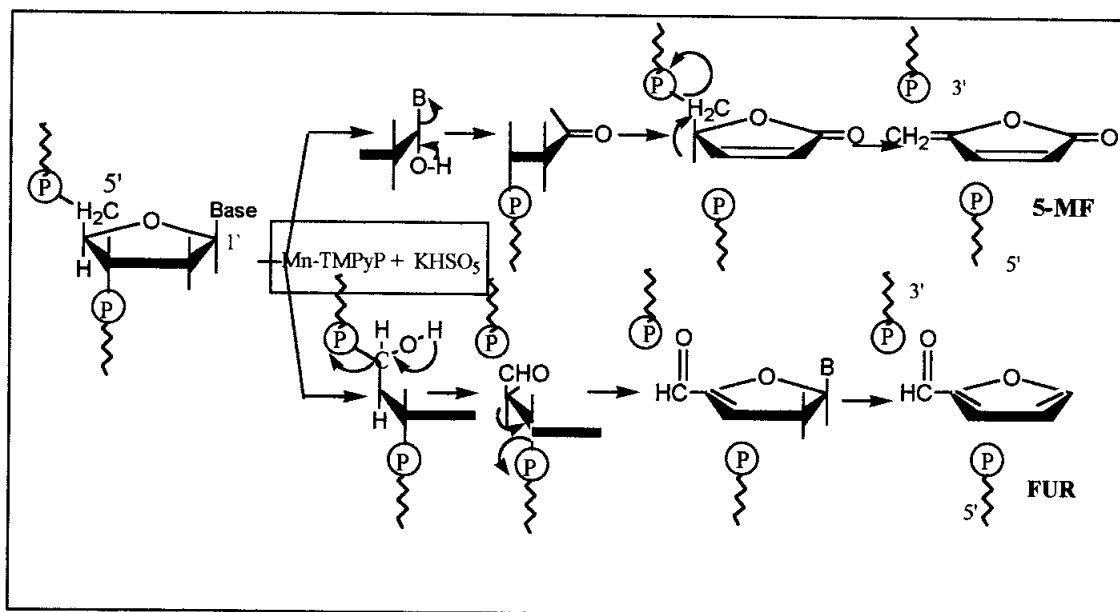
Este tipo de ligandos puede unirse a una variedad de metales como son Zn, Fe, Cu, Mn o Co, los cuales modulan su interacción y reactividad con el ADN.

Los mecanismos de unión dependen de la naturaleza del metal, de su tamaño y su carga y de la localización de los diferentes sustituyentes en la periferia de la porfirina. En ausencia de datos cristalográficos por R-X sobre el complejo porfirina-ADN, los conocimientos sobre el proceso de unión se basa en los resultados de una variedad de estudios fisico-químicos. Actualmente es perfectamente conocido el mecanismo de rotura del ADN por el sistema Mn-TMPyP/KHSO<sub>5</sub> (figura 6.34). Los análisis electroforéticos de unión al ADN y especificidad y ruptura indican que las porfirinas catiónicas de manganeso o hierro se unen al surco menor y rompen el ADN en las cuatro posibles posiciones del nucleótido, lo cual sugiere fuertemente que las desoxirribosas son los sitios primarios de ataque. Estudios en más profundidad han evidenciado dos mecanismos principales:

- 1.- Se demostró que un modelo simplificado de ADN, era escindido por Mn-TMPyP/ KHSO<sub>5</sub> a pH neutro, con liberación espontánea de adeninas libres y después de calentamiento, se formó un producto de degradación inestable identificado como 5-metileno-2(5H)-furanona (5-MF), proponiendo un mecanismo de oxidación del C-1'. La primera  $\beta$ -eliminación creó un extremo 5'-fosfato y la segunda se acompañó de la liberación de (5-MF).

2.- Utilizando otros ADNs se demostró que la hidroxilación del C-5' da un aldehído en C-5' en el extremo de una de las cadenas y un 3'-fosfato en la otra a T<sup>a</sup> ambiente. Por calentamiento, dos  $\beta$ -eliminaciones produjeron la formación de FUR y la liberación de bases libres, dejando un fosfato en el extremo 5'.

Ambas rutas (1 y 2) produjeron el mismo fosfato terminal pero los productos de degradación y la cronología de la liberación de bases y rotura del ADN fue a la inversa.



**Figura 6.34.- Mecanismo de degradación del ADN por Mn-TMPyP**

El C1' es el principal sitio de hidroxilación para ADN de Calf thymus y polímeros de GC mientras el ataque selectivo al C-5' es observado para los polímeros de AT o las secuencias ricas en AT en el ADN, lo cual indica que el mecanismo de rotura del ADN es altamente dependiente de la secuencia.

La hélice simple de cadena sencilla abierta o el extenso surco menor de los polímeros de doble cadena ricos en secuencias GC permite al C-1' ser oxidado. Para polímeros de doble hélice ricos en secuencias AT el estrecho surco menor restringe el acceso a C-1', profundamente localizado en el surco y entonces C-5', que se localiza en la entrada del surco es preferido.

#### **6.2.4.- ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD NUCLEASA**

A la vista de los datos obtenidos gracias al estudio de los modelos de nucleasas químicas se ha desarrollado todo un campo de investigación basado en los complejos metálicos. Este área de estudio posee un interesante futuro en cuanto que las nucleasas químicas poseen tres usos generales:<sup>107</sup>

- 1) Pueden ser utilizadas para comprobar la variabilidad conformacional del ADN y del ARN.
- 2) Pueden servir como agentes “huella” y complementar a la extensamente usada DnasaI en esta aplicación.
- 3) Permiten el diseño de nuevos agentes nucleolíticos específicos de sitio.

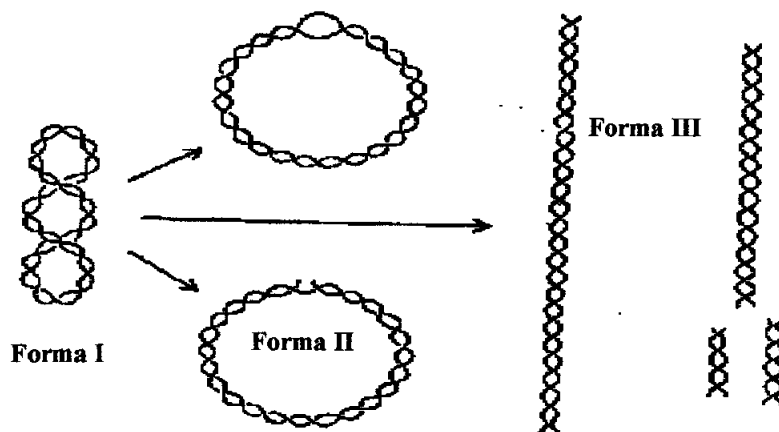
Se puede destacar que químicos y bioquímicos llevan algunas décadas trabajando en este área. A pesar de que se conocen más de 2400 enzimas de restricción específicos de sitio, éstos sólo representan 188 secuencias específicas diferentes, por lo que parece una necesidad encontrar endonucleasas químicas capaces de degradar al ADN y ARN en sitios específicos.<sup>107</sup>

#### **FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA**

En el presente trabajo se presentan los estudios realizados con los complejos para dilucidar si poseen la capacidad de escindir la doble cadena de ADN mediante procesos de oxidación-reducción. Los resultados se han obtenido mediante el estudio de la migración de las distintas formas del ADN en un campo eléctrico en geles de agarosa.

El ADN utilizado para los ensayos es plásmido (pUC 18). Los plásmidos existen como moléculas cíclicas de ADN superenrollado covalentemente cerrado. La rotura de una cadena hace que este estado superenrollado (forma I), se convierta en un estado simple cíclico relajado (forma II). Cuando se produce la rotura en la otra cadena de la doble hélice se obtiene la forma lineal del ADN (forma III). La extensión de la degradación de la simple cadena puede ser seguida analizando el comportamiento electroforético del ADN superenrollado en geles de agarosa antes y después del tratamiento oxidante/reductor. La forma I superenrollada migra más rápidamente que la

forma II relajada. La forma III, lineal, migra en los geles de agarosa en una posición intermedia entre la formas I y la forma II.



**Figura 6.35.- Varias formas de ADN circular y su conversión a forma lineal**

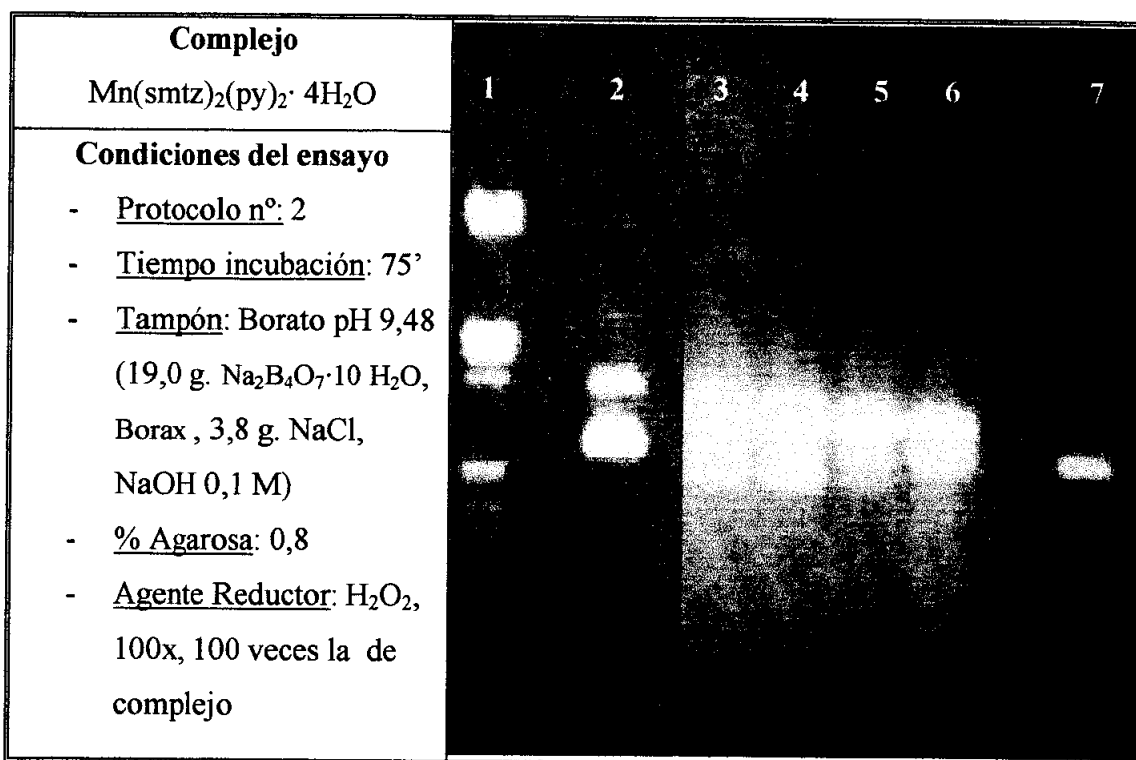
### **PROTOCOLO GENERAL**

En las experiencias realizadas se utilizó un protocolo general basado en los métodos descritos por Karlin<sup>110</sup> y Lehn<sup>111</sup> aunque con ligeras modificaciones. Los experimentos fueron llevados a cabo con ADN del plásmido pUC18 aislado de cultivos de *E. coli* (HTB1) que fueron amablemente cedidas por el Prof. Marcel·lí del Olmo (Universidad de Valencia). El ADN fue purificado utilizando un kit de purificación Qiagen Plasmid Maxi. La pureza del ADN se determinó espectroscópicamente a 260 nm. La razón de absorbancia UV a 260 y 280 nm,  $A_{260}/A_{280} > 1.9$  indicó que el ADN estaba suficientemente libre de proteína. Algunos de los ensayos realizados se llevaron a cabo con ADN comercial (plásmido pUC18) ya purificado. Éste ADN se adquirió a la casa Roche Diagnostics GMBH.

La muestra consistió en una mezcla de reacción, de volumen final 20  $\mu\text{L}$ , constituido por a) tampón (el mismo donde se había disuelto el complejo), b) ADN pUC18 (comercial o purificado por nosotros), c) complejo en disolución y d) agente oxidante o reductor. Esta mezcla de reacción se dejó incubar, se cargó en un gel de agarosa (0,6-0,8%) y se sometió a electroforesis en tampón TBE (108 g. TRIS, 55 g. ácido bórico, 7,44 g. EDTA) durante 2 horas a 80 V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio durante 15 minutos y se fotografiaron con un sistema Gelprinter Plus TDI.

**RESULTADOS Y DISCUSIÓN****- COMPLEJOS DE Mn(II)**

A)



Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carrera 3: complejo 60 μM, carrera 4: complejo 80 μM, carrera 5: complejo 100 μM, carrera 6: 120 μM; carrera 7: DNA lineal.

Protocolo n° 2: 19 μL tampón, 3 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 19 μL complejo, 19 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3 μL.

En la electroforesis A) se aprecia que el complejo Mn(smtz)<sub>2</sub>(py)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O presenta “a priori” actividad nucleasa y que ésta es dependiente de la concentración puesto que a mayor concentración se produce una mayor degradación del ADN. Las carreras 3 y 4 muestran las bandas correspondientes a las formas I (superenrollado) y II (circular) del ADN. En la carrera 5 se observa que la banda de ADN superenrollado prácticamente ha desaparecido, se aprecia la banda de ADN circular y aparece cierta cantidad de ADN lineal (forma III). En la carrera 6 la banda de ADN superenrollado ya no aparece, pero si se observan claramente las bandas de ADN circular y lineal y aparece un ligero fondo. Este efecto de fondo se conoce como “smearing”. Al no poseer una electroforesis donde se aprecie la actividad de la sal de Mn(II) en este tampón, para referenciarla con la del complejo, no permite pronunciarse sobre la actividad nucleasa de éste. El hecho de utilizar un tampón de pH tan elevado nos llevó a pensar en la

posibilidad de que éste produjera en el medio los  $\cdot\text{OH}$  necesarios para iniciar la reacción de corte al ADN y no fuese el metal el encargado de iniciarla mediante procesos redox. Con el fin de buscar condiciones más fisiológicas para los ensayos se optó por cambiar de tampón. Se escogió el tampón TRIS-HCl a pH 7,8 por ser este valor de pH un valor más próximo al pH fisiológico.

B)

<b>Complejo</b>	
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	
<b>Condiciones del ensayo</b>	
- <u>Protocolo n°:</u> 3	
- <u>Tiempo incubación:</u> 180'	
- <u>Tampón:</u> Tris-HCl, pH 7,8 (3,0 g. de TRIS, HCl 0,1 M)	
- <u>% Agarosa:</u> 0,8	
- <u>Agente Reductor:</u> $\text{H}_2\text{O}_2$ , 100x	

Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carreras 3:  $\text{Mn}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$ , carrera 4:  $\text{Mn}^{2+}$  110  $\mu\text{M}$ , carrera 5:  $\text{Mn}^{2+}$  110  $\mu\text{M}$ , carrera 6:  $\text{Mn}^{2+}$  130  $\mu\text{M}$ , carrera 7:  $\text{Mn}^{2+}$  130  $\mu\text{M}$ , carrera 8:  $\text{Mn}^{2+}$  180  $\mu\text{M}$ , carrera 9:  $\text{Mn}^{2+}$  180  $\mu\text{M}$ , carrera 10:  $\text{Mn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$ ; carrera 11: complejo 100  $\mu\text{M}$ , carrera 12: complejo 110  $\mu\text{M}$ , carrera 13: complejo 110  $\mu\text{M}$ , carrera 14: complejo 130  $\mu\text{M}$ , carrera 15: complejo 130  $\mu\text{M}$ , carrera 16: complejo 180  $\mu\text{M}$ , carrera 17: complejo 180  $\mu\text{M}$ , carrera 18: complejo 200  $\mu\text{M}$ ; carrera 19: DNA lineal.

Protocolo n°: 3: 8  $\mu\text{L}$  tampón, 3  $\mu\text{L}$  pUC 18 o pBR322 (0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 19  $\mu\text{L}$  complejo, 15  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 6/10  $\mu\text{L}$

La electroforesis B) muestra una actividad nucleasa similar para la sal de Mn(II) y para el complejo. En ambos casos las carreras correspondientes a las concentraciones 100-130  $\mu\text{M}$ , tanto de  $\text{Mn}^{2+}$  (carreras 3-7) como de complejo (carreras 11-15), nos muestran las bandas pertenecientes al ADN superenrollado. Para las concentraciones 180-200  $\mu\text{M}$ , en ambos casos se aprecian las bandas pertenecientes al ADN circular y también unas bandas, ligeras, de ADN lineal.

A la vista de estos resultados se optó por cambiar el agente reductor y se decidió utilizar agentes oxidantes: peroxodisulfato sódico,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , (electroforesis C) y monopersulfato potásico, “oxone” (electroforesis D y E)

C)

<b>Complejo</b>	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
$\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	
<b>Condiciones del ensayo</b>	
- <u>Protocolo n°:</u> 5	
- <u>Tiempo incubación:</u> 120'	
- <u>Tampón:</u> Tris-HCl, pH 7,8	
- <u>% Agarosa:</u> 0,8	
- <u>Agente Oxidante:</u> $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , 20, 50 y 100x	

**Carrera 1:** marcador de fragmentos; **carrera 2:** pUC18 control; **carrera 3:**  $\text{Mn}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  20x); **carrera 4:** complejo 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  20x); **carrera 5:**  $\text{Mn}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  50x); **carrera 6:** complejo 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  50x); **carrera 7:**  $\text{Mn}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  100x); **carrera 8:** complejo 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  100x); **carrera 9:**  $\text{Mn}^{2+}$  150  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  20x); **carrera 10:** complejo 150  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  20x); **carrera 11:**  $\text{Mn}^{2+}$  150  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  50x); **carrera 12:** complejo 150  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  50x); **carrera 13:**  $\text{Mn}^{2+}$  150  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  100x); **carrera 14:** complejo 150  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  100x); **carrera 15:**  $\text{Mn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  20x); **carrera 16:** complejo 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  20x); **carrera 17:**  $\text{Mn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  50x); **carrera 18:** complejo 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  50x); **carrera 19:**  $\text{Mn}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  100x); **carrera 20:** complejo 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  100x).

**Protocolo n°5:** 7  $\mu\text{L}$  tampón, 1  $\mu\text{L}$  pUC 18 o pBR322 (0,25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), 6  $\mu\text{L}$  complejo, 6  $\mu\text{L}$  de oxidante, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3  $\mu\text{L}$

Se decidió, entonces, ensayar este mismo complejo de Mn(II) con otro oxidante más potente que el peroxodisulfato sódico con el que otros autores habían trabajado. Este potente oxidante es una sal triple compuesta por  $2\text{KHSO}_5$ ,  $\text{KHSO}_4$  y  $\text{K}_2\text{SO}_4$  y la casa Alfa-Ventron lo ha comercializado bajo el nombre de *oxone*. Según los ensayos realizados por Meunier *et al.*<sup>111</sup>, complejos de  $\text{Mn}^{3+}$ -porfirina han revelado actividad nucleasa cuando son tratados con este oxidante.

D)

<b>Complejo</b> $Mn(smtz)_2(py)_2 \cdot 4H_2O$	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
<b>Condiciones del ensayo</b>	
- <u>Protocolo n°:</u> 5	
- <u>Tiempo incubación:</u> 120'	
- <u>Tampón:</u> Tris-HCl, pH 7,8	
- <u>% Agarosa:</u> 0,6	
- <u>Agente Oxidante:</u> Oxone, 20, 50 y 100x	

Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carrera 3:  $Mn^{2+}$  100  $\mu M$  (oxone 20x), carrera 4: complejo 100  $\mu M$  (oxone 20x); carrera 5:  $Mn^{2+}$  100  $\mu M$  (oxone 50x); carrera 6: complejo 100  $\mu M$  (oxone 50x); carrera 7:  $Mn^{2+}$  100  $\mu M$  (oxone 100x), carrera 8: complejo 100  $\mu M$  (oxone 100x); carrera 9:  $Mn^{2+}$  150  $\mu M$  (oxone 20x), carrera 10: complejo 150  $\mu M$  (oxone 20x); carrera 11:  $Mn^{2+}$  150  $\mu M$  (oxone 50x), carrera 12: complejo 150  $\mu M$  (oxone 50x); carrera 13:  $Mn^{2+}$  150  $\mu M$  (oxone 100x), carrera 14: complejo 150  $\mu M$  (oxone 100x); carrera 15:  $Mn^{2+}$  200  $\mu M$  (oxone 20x), carrera 16: complejo 200  $\mu M$  (oxone 20x); carrera 17:  $Mn^{2+}$  200  $\mu M$  (oxone 50x), carrera 18: complejo 200  $\mu M$  (oxone 50x); carrera 19:  $Mn^{2+}$  200  $\mu M$  (oxone 100x), carrera 20: complejo 200  $\mu M$  (oxone 100x).

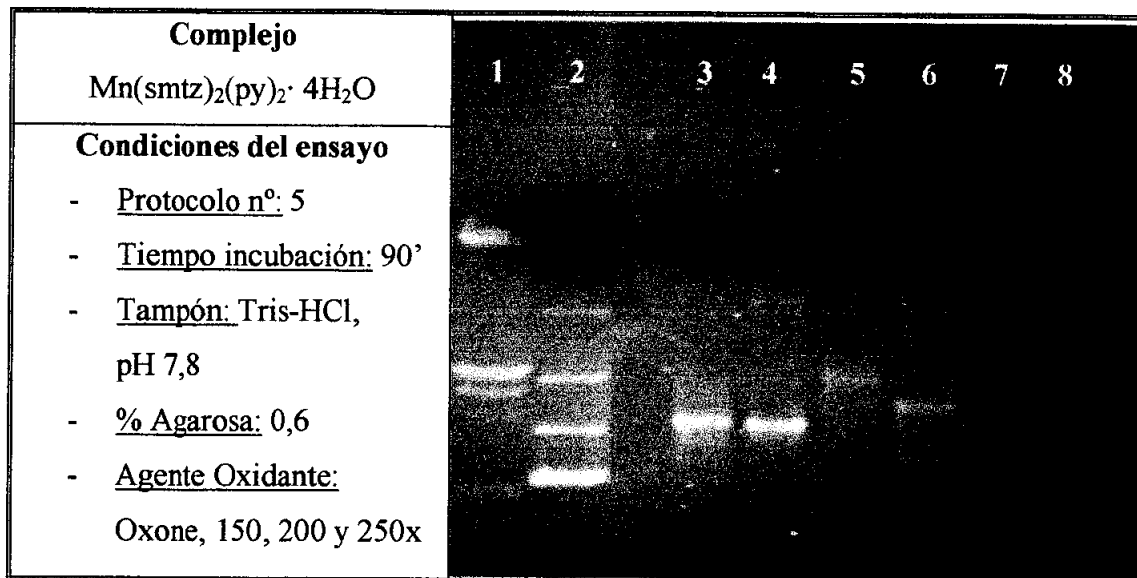
Protocolo n°5: 7  $\mu L$  tampón, 1  $\mu L$  pUC 18 o pBR322 (0,25  $\mu g/\mu L$ ), 6  $\mu L$  complejo, 6  $\mu L$  de oxidante, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3  $\mu L$

Para el complejo de Mn(II), no se observa, *a priori*, mayor actividad que para la sal de Mn(II). En la electroforesis D) se observa cómo prácticamente todo el ADN tratado está en su forma superenrollada, observándose ligeros incrementos en determinadas carreras que no pueden ser atribuidas a la actividad nucleasa ni del complejo ni de la sal puesto que en ambos casos son iguales.

Sólo para la carrera 20 (correspondiente al complejo) no se observa la banda correspondiente a la forma del ADN superenrollado y todo el ADN presente en la carrera está en forma de ADN circular. Para ratificar estos resultados, se decidió repetir la experiencia con esta concentración de complejo y sal de Mn(II) pero a concentraciones de oxidante mucho más elevada (150, 200 y 250x).



E)



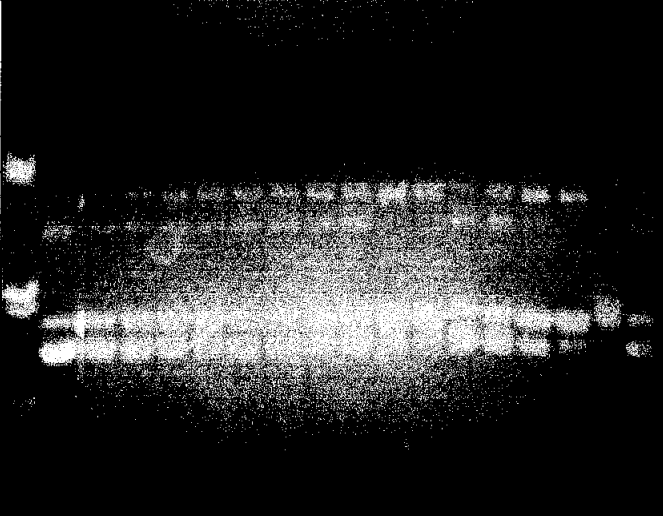
Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carrera 3:  $Mn^{2+}$  200  $\mu M$  (*oxone* 150x), carrera 4: complejo 200  $\mu M$  (*oxone* 150x); carrera 5:  $Mn^{2+}$  200  $\mu M$  (*oxone* 200x), carrera 6: complejo 200  $\mu M$  (*oxone* 200x); carrera 7:  $Mn^{2+}$  200  $\mu M$  (*oxone* 250x), carrera 8: complejo 200  $\mu M$  (*oxone* 250x).

Protocolo n°5: 7  $\mu L$  tampón, 1  $\mu L$  pUC 18 o pBR322 (0,25  $\mu g/\mu L$ ), 6  $\mu L$  complejo, 6  $\mu L$  de oxidante, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3  $\mu L$

La electroforesis E) muestra los resultados para el ensayo con el complejo y la sal de Mn(II). Se tomó la misma concentración que en la electroforesis anterior había producido un resultado positivo (carrera 20), 200  $\mu M$ , pero se aumentaron las concentraciones de oxidante y el tiempo de incubación fue ligeramente inferior (90'). Los resultados obtenidos demuestran que para estas condiciones de ensayo el  $Mn^{+2}$  posee una actividad nucleasa ligeramente superior a la del complejo aunque las diferencias entre ellos no son significativas. Se observa también que, aunque un incremento en la concentración de *oxone* implica un aumento de la degradación del ADN, éste no pone de manifiesto una preferencia por alguna de las sustancias ensayadas.

Cuando se ensayan concentraciones aún superiores de oxidante (electroforesis no mostrada), concentraciones mayores a 250x, la degradación del ADN ha sido tal que no nos permite manifestarnos acerca del comportamiento del complejo o de la sal de Mn(II) en condiciones tan drásticas.

F)

Complejo Mn(smtz) <sub>2</sub> (py) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18
<b>Condiciones del ensayo</b> - <u>Protocolo n°:</u> 5 - <u>Tiempo incubación:</u> 90 y 180' - <u>Tampón:</u> Tris-HCl, pH 7,8 - <u>% Agarosa:</u> 0,6 - <u>Agente Oxidante:</u> Oxone/Ascorbato, 50 y 100x	

Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carrera 3: Mn<sup>2+</sup> 100 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 90', carrera 4: complejo 100 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 90'; carrera 5: Mn<sup>2+</sup> 100 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 90'; carrera 6: complejo 100 μM (*oxone*/Ascorbato.100x), 90'; carrera 7: Mn<sup>2+</sup> 100 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 180', carrera 8: complejo 100 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 180'; carrera 9: Mn<sup>2+</sup> 100 μM (*oxone*/Ascorbato. 100x), 180', carrera 10: complejo 100 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 180'; carrera 11: Mn<sup>2+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 90', carrera 12: complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 90'; carrera 13: Mn<sup>2+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 90'; carrera 14: complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato.100x), 90'; carrera 15: Mn<sup>2+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato. 50x), 180', carrera 16: complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 180'; carrera 17: Mn<sup>2+</sup> 100 μM (*oxone*/Ascorbato. 100x), 180', carrera 18: complejo 100 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 180'.

**Protocolo n°5:** 7 μL tampón, 1 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 6 μL complejo, 6 μL de oxidante, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3 μL

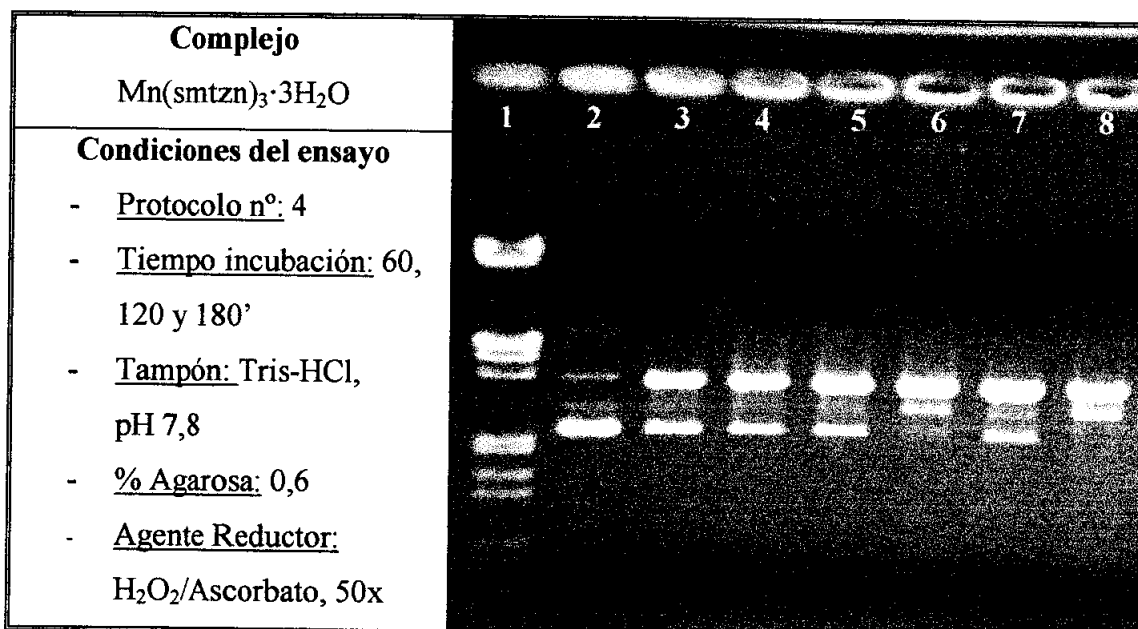
Dados los resultados negativos del uso de *oxone* como agente oxidante se pensó en utilizar una combinación de agente reductor y agente oxidante. El hecho de utilizar una combinación de agentes había dado los mejores resultados en los ensayos de actividad nucleasa realizados, mejor que los agentes reductores por separado. En este caso la combinación no dio resultados positivos. La electroforesis F) muestra los resultados obtenidos para el complejo y la sal de Mn(II) con la mezcla *oxone*/ascorbato. En ella no se observan diferencias significativas en cuanto a la actividad nucleasa de la sal de Mn(II) y el complejo. En todas las carreras se aprecian las formas de ADN superenrollado y circular e incluso para las concentraciones más elevadas de *oxone*/ascorbato y de sal de Mn(II) o de complejo se observa una actividad nucleasa ligeramente superior para la sal de Mn(II) que para el complejo.

Ensayos preliminares realizados con el complejo  $Mn(smtz)_2(imH)_2 \cdot H_2O$  tampoco muestran actividad nucleasa para este complejo (electroforesis no mostrada).

En general se observa que los complejos de Mn(II) a diferentes pHs y tratados con distintos agentes activantes producen un corte en el ADN de manera similar al producido por las sales de Mn(II). En consecuencia, estos complejos no poseen una actividad nucleasa característica del propio complejo.

### - COMPLEJOS DE Mn(III)

G)

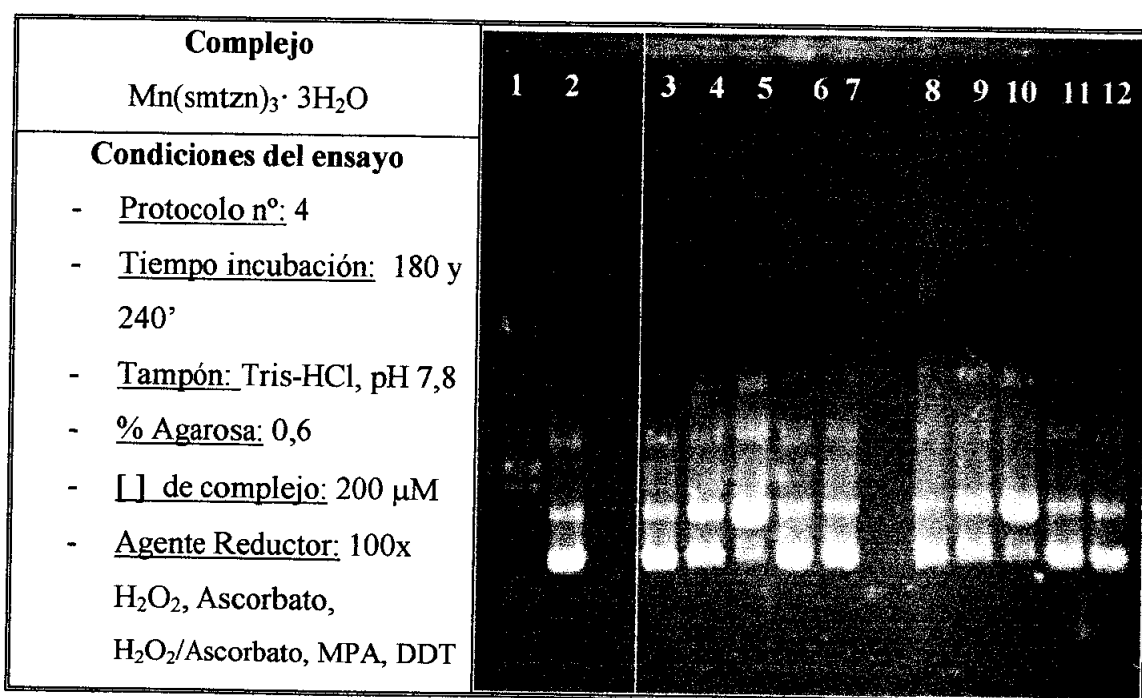


Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carrera 3:  $Mn^{3+}$  200  $\mu M$  ( $H_2O_2$ /Ascorbato 50x), 60'; carrera 4: complejo 200  $\mu M$  ( $H_2O_2$ /Ascorbato 50x), 60'; carrera 5:  $Mn^{3+}$  200  $\mu M$  ( $H_2O_2$ /Ascorbato 50x), 120'; carrera 6: complejo 200  $\mu M$  ( $H_2O_2$ /Ascorbato 50x), 120'; carrera 7:  $Mn^{3+}$  200  $\mu M$  ( $H_2O_2$ /Ascorbato 50x), 180'; carrera 8: complejo 200  $\mu M$ , ( $H_2O_2$ /Ascorbato 50x), 180'.  
Protocolo n°: 4: 6  $\mu L$  tampón, 2  $\mu L$  pUC 18 o pBR322 (0,25  $\mu g/\mu L$ ), 6  $\mu L$  complejo, 3  $\mu L$   $H_2O_2$ , 3  $\mu L$  Ascorbato, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3  $\mu L$

Para el complejo  $Mn(smtzn)_3 \cdot 3H_2O$ , la electroforesis G) nos muestra claramente que este complejo posee actividad nucleasa mayor que la sal de Mn(III) y que ésta es dependiente del tiempo de incubación de la mezcla de reacción. Se observa en la foto que a menores tiempos (60'), la actividad para el complejo y para la sal de Mn(III) es similar puesto que para este tiempo en ambas carreras (3 y 4) se aprecian las bandas correspondientes a las formas de ADN superenrollado y circular y éstas son similares.

Cuando aumentamos el tiempo de incubación (120') observamos en las carreras 5 y 6 que mientras que la sal (carrera 5) no experimenta cambio alguno con respecto al tiempo anterior, este cambio sí es observado para el complejo (carrera 6), encontrándose en esta carrera las formas de ADN circular y lineal. Si el tiempo de incubación sigue aumentando (180') este efecto se ve potenciado y, mientras que la carrera correspondiente a la sal de Mn(III) (carrera 7) no muestra cambio respecto a tiempos menores, en la carrera del complejo (carrera 8) la forma superenrollada ya no se aprecia, observándose las formas circular, lineal y cierto fondo o *smearing*.

H)

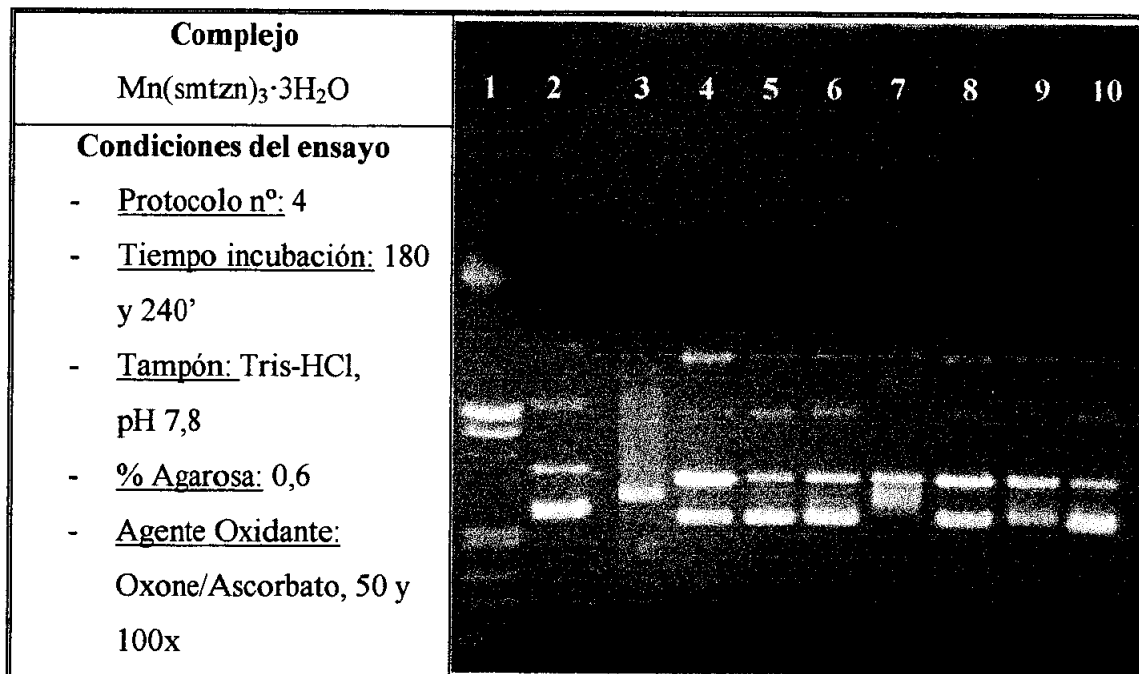


Carrera 1: marcador de fragmentos; carrera 2: pUC18 control; carrera 3: complejo 200 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100x), 180'; carrera 4: complejo 200 μM (Ascorbato 100x), 180'; carrera 5: complejo 200 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 180'; carrera 6: complejo 200 μM, (MPA 100x), 180'; carrera 7: complejo 200 μM (DDT 100x), 180'; carrera 8: complejo 200 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100x), 240'; carrera 9: complejo 200 μM (Ascorbato 100x), 240'; carrera 10: complejo 200 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 240'; carrera 11: complejo 200 μM, (MPA 100x), 240'; carrera 12: complejo 200 μM (DDT 100x), 240'.

Protocolo n°: 4: 6 μL tampón, 2 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 6 μL complejo, 3 μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 3 μL Ascorbato, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3 μL.

A la vista del resultado positivo obtenido en la electroforesis G), se repitió el ensayo con diferentes agentes reductores (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ascorbato, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato, MPA (ácido mercaptopropiónico) y DDT (ditiotreitolo)) a concentraciones 100 veces superiores a las del complejo. El orden de efectividad del complejo como nucleasa en presencia de estos reductores fue: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato > Ascorbato > MPA ≈ DDT ≈ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

I)



**Carrera 1:** marcador de fragmentos; **carrera 2:** pUC18 control, **carrera 3:** Mn<sup>3+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 180', **carrera 4:** complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 180'; **carrera 5:** Mn<sup>3+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 180'; **carrera 6:** complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 180'; **carrera 7:** Mn<sup>3+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 240'; **carrera 8:** complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato 50x), 240'; **carrera 9:** Mn<sup>3+</sup> 200 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 240'; **carrera 10:** complejo 200 μM (*oxone*/Ascorbato 100x), 240'.

**Protocolo n°:** 4: 6 μL tampón, 2 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 6 μL complejo, 3 μL *oxone*, 3 μL Ascorbato, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3 μL

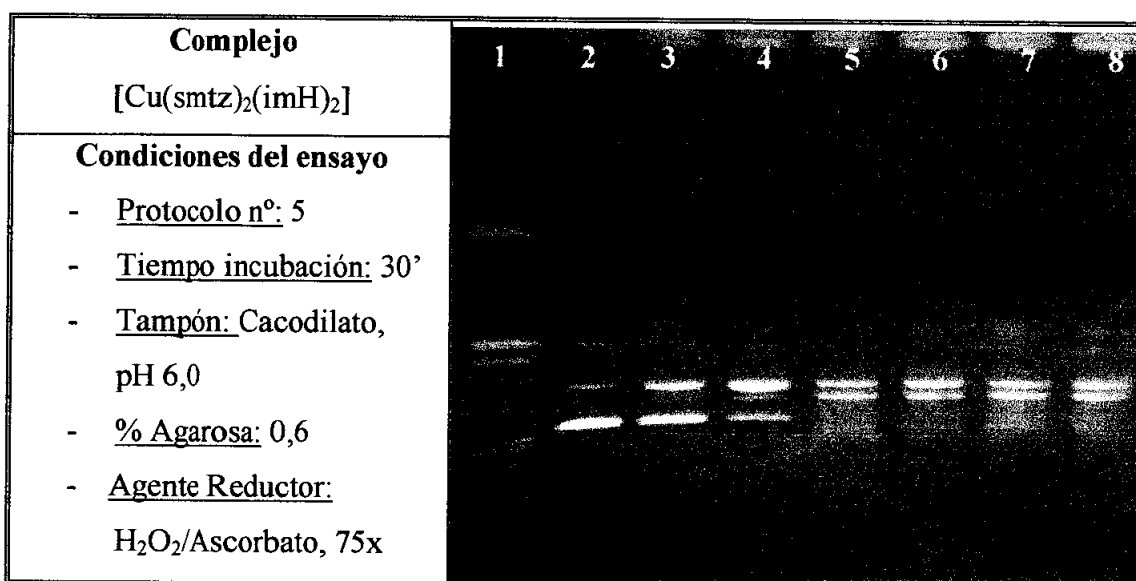
La electroforesis I) nos muestra el ensayo realizado con una mezcla de oxidante y reductor (*oxone*/Ascorbato). En ella observamos que para una concentración de *oxone*/Ascorbato 50x la sal de Mn(III) produce un corte mayor que para una concentración de *oxone*/Ascorbato de 100x. Este hecho puede atribuirse, para la concentración 50x, a la formación de una especie con un estado de oxidación superior que resultaría ser muy activa. Esta especie no se formaría en el caso de concentración 100x o si se formase la especie no sería tan activa como en el caso anterior. En cuanto al complejo, a concentración 50x de *oxone*/Ascorbato se observa un corte al ADN ligeramente menor que para el Mn<sup>+3</sup>. Ésto implicaría la formación, por parte del complejo, de una especie distinta a la formada por el Mn<sup>+3</sup> o al hecho de que esta especie sea más resistente al *oxone*/Ascorbato, lo cual daría lugar a la formación de menos radicales libres. Este comportamiento para el complejo es confirmado con respecto al Mn<sup>+3</sup> para una concentración 100x de *oxone*/Ascorbato. En ambos casos a mayor tiempo de incubación de la mezcla de reacción menor actividad nucleasa.

### - COMPLEJOS DE Cu(II)

Estudios previos, no mostrados, con otros complejos de Cu(II) dieron como resultado que el tampón cacodilato pH 6,0 era el tampón idóneo para la disolución de estos complejos. Se estudió la disolución de los complejos en otros tampones de diferentes pHs (borato pH 9,5, TRIS-HCl pH 7,8) pero estos estudios no dieron resultados positivos.

Los ensayos realizados dieron los siguientes resultados:

J)

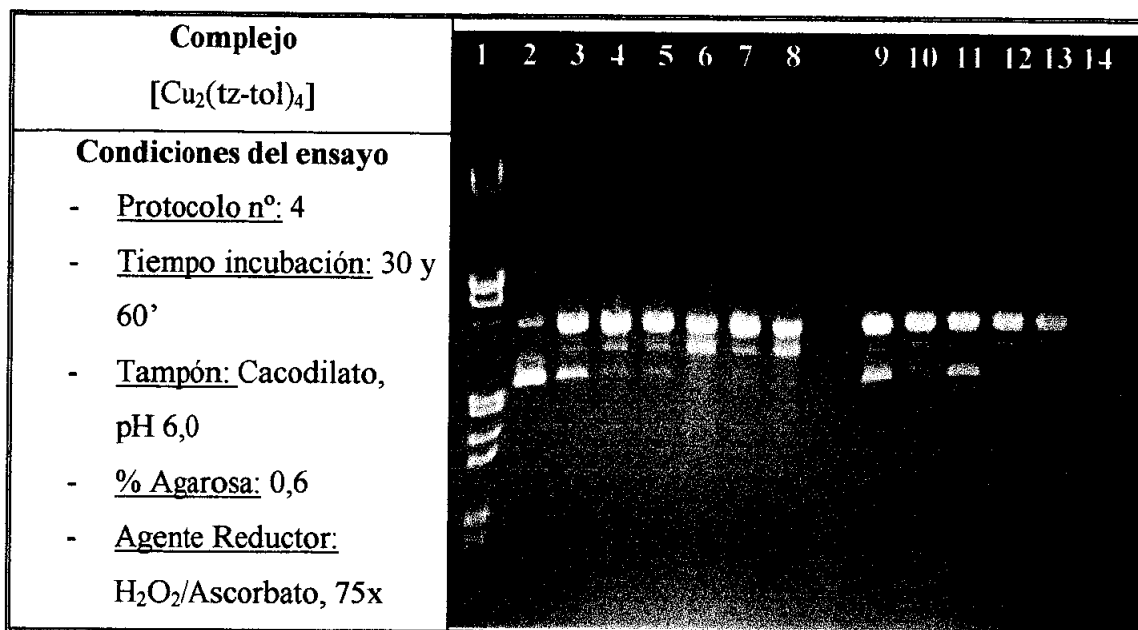


**Carrera 1:** marcador de fragmentos; **carrera 2:** pUC18 control; **carrera 3:** Cu<sup>2+</sup> 50 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x); **carrera 4:** complejo 50 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x); **carrera 5:** Cu<sup>2+</sup> 75 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x); **carrera 6:** complejo 75 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x); **carrera 7:** Cu<sup>2+</sup> 100 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x); **carrera 8:** complejo 100 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x).

**Protocolo n°5:** 7 μL tampón, 1 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 6 μL complejo, 6 μL de oxidante, tampón carga(xilencianol/azul de bromofenol): 3 μL

Para el complejo [Cu(smtz)<sub>2</sub>(imH)<sub>2</sub>], observamos en la electroforesis J) como sólo es a menores concentraciones (50 μM) (carreras 3 y 4) cuando se observa mayor actividad nucleasa para el complejo (carrera 4) que para la sal de Cu(II) (carrera 3). En la carrera 3 se aprecia el corte del ADN hasta la forma circular mientras que en la carrera 4 el corte observado llega hasta lineal. En el caso de las concentraciones restantes (75 y 100 μM) el corte observado para el complejo es similar al observado para el Cu<sup>2+</sup> (corte hasta lineal y con fondo en todos los casos).

K)

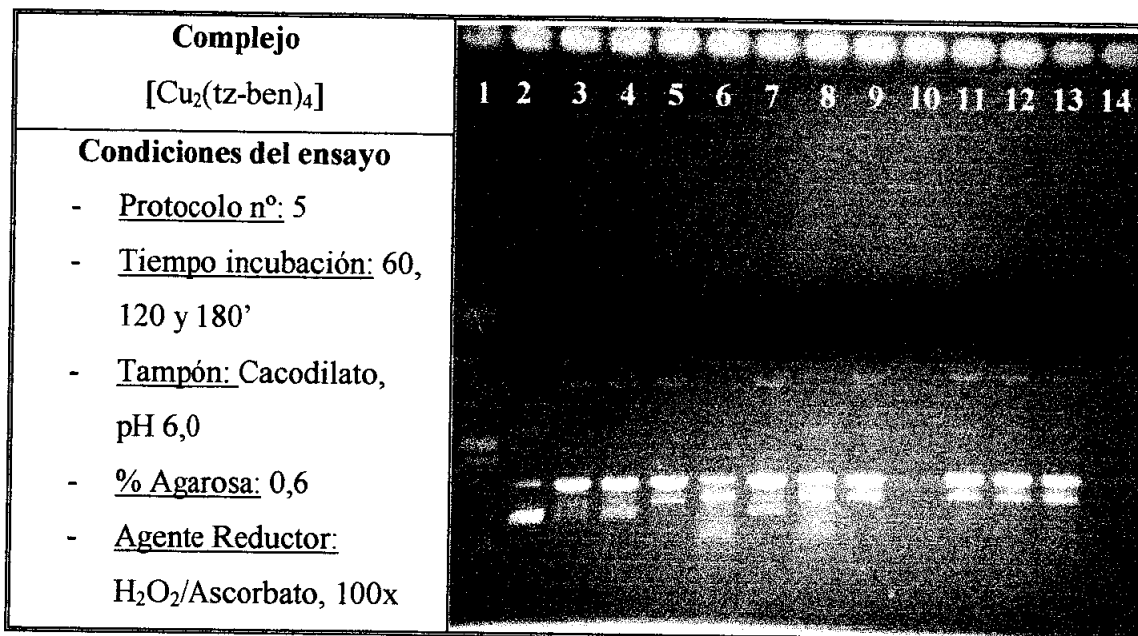


**Carrera 1:** marcador de fragmentos; **carrera 2:** pUC18 control; **carrera 3:** Cu<sup>2+</sup> 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 30'; **carrera 4:** Cu<sup>2+</sup> 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 30'; **carrera 5:** Cu<sup>2+</sup>+L 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 30'; **carrera 6:** Cu<sup>2+</sup>+L 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 30'; **carrera 7:** complejo 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 30'; **carrera 8:** complejo 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 30'; **carrera 9:** Cu<sup>2+</sup> 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 60'; **carrera 10:** Cu<sup>2+</sup> 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 60'; **carrera 11:** Cu<sup>2+</sup>+L 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 60'; **carrera 12:** Cu<sup>2+</sup>+L 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 60'; **carrera 13:** complejo 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 60'; **carrera 14:** complejo 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 75x), 60'.  
**Protocolo n°: 4:** 6 μL tampón, 2 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 6 μL complejo, 3 μL oxone, 3 μL Ascorbato, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3 μL

La electroforesis K) nos muestra los ensayos realizados para el complejo a dos tiempos. Se observa cómo para 30' el ADN tratado con Cu<sup>+2</sup>, 20 μM (carrera3), presenta menor grado de degradación (formas superenrollada y circular) que el tratado con Cu+L (carrera 5) (forma circular y ligeramente forma lineal). Esta degradación con Cu+L es similar a la presentada por el ADN tratada con el complejo (carrera 7). Este patrón se repite para concentración 40 μM aunque aquí encontramos un ligero fondo o *smearing* en las muestras tratadas con Cu+L y con el complejo (carreras 6 y 8).

Para un tiempo de incubación de la mezcla de reacción de 60', a concentración 20 μM el ADN tratado con Cu<sup>+2</sup> y Cu+L (carreras 9 y 11) presenta las formas superenrollada y circular mientras que para el complejo (carrera 13) se observan las formas circular y lineal. Para concentración 40 μM, el corte producido por el Cu<sup>+2</sup> y el Cu+L (carreras 10 y 12) es similar (formas superenrollada y lineal) mientras que la degradación observada para el complejo (carrera 14) es mayor (forma lineal y *smearing*). Con estos resultados concluimos que el complejo presenta mayor actividad nucleasa que el Cu<sup>+2</sup> o que el Cu+L.

L)



**Carrera 1:** marcador de fragmentos; **carrera 2:** pUC18 control; **carrera 3:** Cu<sup>2+</sup> 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 60'; **carrera 4:** complejo 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 60'; **carrera 5:** Cu<sup>2+</sup> 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 60'; **carrera 6:** complejo 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 60'; **carrera 7:** Cu<sup>2+</sup> 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 120'; **carrera 8:** complejo 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 120'; **carrera 9:** Cu<sup>2+</sup> 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 120'; **carrera 10:** complejo 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 120'; **carrera 11:** Cu<sup>2+</sup> 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 180'; **carrera 12:** complejo 20 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 180'; **carrera 13:** Cu<sup>2+</sup> 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 180'; **carrera 14:** complejo 40 μM (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Ascorbato 100x), 180'.

**Protocolo n°5:** 7 μL tampón, 1 μL pUC 18 o pBR322 (0,25 μg/μL), 6 μL complejo, 6 μL de oxidante, tampón carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%): 3 μL

En la electroforesis L) se observa cómo tanto la sal de Cu(II) como el complejo presentan actividad nucleasa, siendo, para todos los tiempos y todas las concentraciones la actividad nucleasa del complejo mayor que la del Cu<sup>+2</sup>. Estas diferencias en el corte al ADN son más evidentes en las carreras 5 y 6, 7 y 8, 9 y 10 y 13 y 14.

El ADN tratado con Cu<sup>+2</sup> presenta las formas circular o lineal dependiendo del tiempo y la concentración. El ADN tratado con el complejo presenta las formas circular, lineal y fondo o *smearing*. En algunos casos la degradación del ADN es tan intensa que no se aprecia este fondo. También en este caso la degradación del ADN es dependiente del tiempo de incubación y de la concentración.



A la vista de todos los resultados obtenidos en las pruebas de actividad nucleasa podemos concluir:

- que los complejos  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  son nucleasas químicas en procesos de oxidación-reducción.
- que el complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  es nucleasa en tampón TRIS-HCl, pH 7,8 mientras que los complejos  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  lo son en tampón cacodilato pH 6,0. Para estos complejos de Cu(II) este tampón es el que permite diferenciar la actividad nucleasa de los complejos con respecto a la propia del  $\text{Cu}^{+2}$ , lo cual no ocurre con los tampones borato pH 9,5 y TRIS-HCl pH 7,8.
- que en todos los casos los agentes reductores idóneos resultaron ser la combinación  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Ascorbato}$ , presentando mejores resultados que por separado.

### 6.2.5.- PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD

Los resultados positivos de actividad nucleasa obtenidos con los complejos de Cu(II) y Mn(III) indujeron a ensayar la posible especificidad de corte del ADN de los mismos. Se han ensayado los complejos  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$ .

### FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

Para estudiar la especificidad de los complejos se trató el ADN pUC18 con estos complejos, se precipitó y posteriormente se sometió a digestión con enzimas de restricción. En el caso que los complejos tuvieran especificidad se observarían dos bandas después del tratamiento con el enzima de restricción. Una banda correspondería al sitio de corte del complejo (específico y siempre el mismo) y la otra correspondería al sitio de corte del enzima de restricción (específico y siempre el mismo). En el caso de que el complejo cortase indistintamente se observarían gran cantidad de fragmentos de todos los tamaños puesto que el enzima siempre corta por el mismo sitio pero el complejo puede cortar por cualquiera. En este caso se observaría un fondo o *smearing*.

Como enzima se eligió EcoRI puesto que este enzima corta en el polilinker (secuencia corta donde cortan la mayoría de enzimas de restricción) del plásmido pUC18..

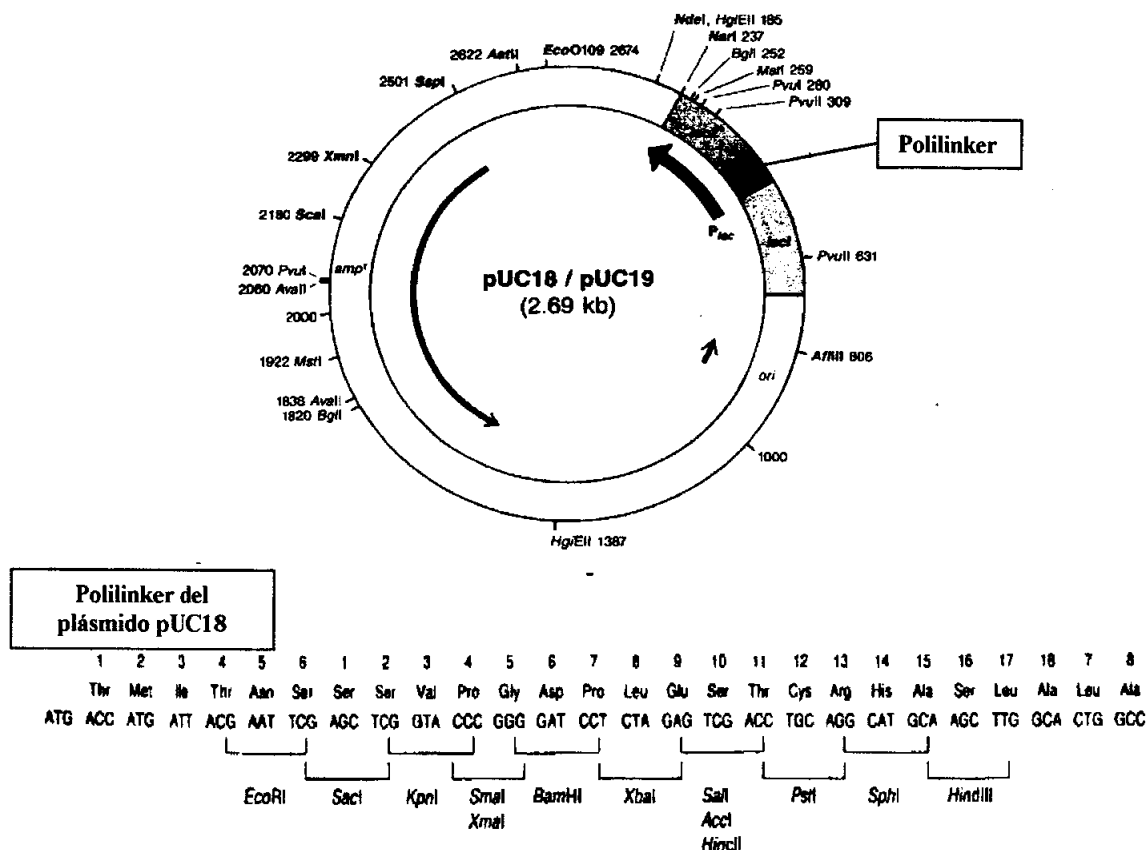


Figura 6.36.- Mapa de restricción de los plásmidos pUC18 y pUC 19<sup>112</sup>

**PROTOCOLO GENERAL**

Se sometieron las muestras a un proceso de incubación preparando la mezcla de reacción con un volumen final de 100 µL :30 µL de tampón (TRIS-HCl para el complejo de Mn(III) y cacodilato para el de Cu(II)) , 10 µL de ADN (pUC18), 30 µL de complejo, 15 µL de ascorbato y 15 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las concentraciones y los tiempos de incubación de cada complejo son diferentes y están de acuerdo con la posibilidad de obtener la mayor cantidad de ADN lineal pero sin que se llegue a producir smearing (degradación total del ADN).

1º) Se añadió a la mezcla de reacción el tampón de carga (xilencianol 0,25%, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%) y con 20 µL se realizó una electroforesis para comprobar la formación de ADN lineal.

2º) Precipitación del ADN después del corte con los complejos. A los 80 µL restantes se le añadieron 8 µL de acetato sódico 3 M pH 5,5 (1/10 del volumen) y 176 µL de etanol absoluto. Se dejó 45 minutos en la cámara a -80 °C. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de etanol al 70%. Se centrifugó de nuevo durante cinco minutos. El residuo se secó al vacío.

3º) Se añadieron 3 µL de tampón TE (1,2 g. TRIS, 0,37 g. EDTA, HCl 0,1M) y se separó en dos partes, 1 µL (para control) y 2 µL (para la digestión con el enzima de restricción). La mezcla de reacción para esta digestión consistió en 2 µL de ADN precipitado, 1 µL de tampón del enzima de restricción, 1 µL de enzima de restricción, 6 µL de H<sub>2</sub>O destilada. A esta mezcla se añadieron 2 µL de tampón de carga y se sometió a un baño a la Tª de 37 °C durante dos horas. En este punto el proceso se puede detener. Las muestras pueden ser congeladas y guardadas para realizar un nuevo proceso electroforético.

4º) Se realizó la electroforesis, 80 voltios durante 2 horas. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 6.31.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La electroforesis nos revela que para el ADN tratado con el complejo de Mn(III) pero no digerido con el enzima de restricción (carrera 3), se observa una ligera banda de ADN circular, una banda también pequeña de ADN lineal y gran cantidad de *smearing* o fondo. Cuando este ADN es digerido con el enzima de restricción (carrera 4) se observa la desaparición de la banda de ADN circular, una disminución de la banda de ADN lineal y un aumento del fondo. Este efecto es debido a que cuando el ADN se somete a la digestión, el enzima produce corte en el ADN circular dando ADN lineal y el ADN que era lineal se degrada totalmente dando *smearing* que aumenta el fondo.

**Figura 6.37.- Prueba de especificidad de los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con el enzima de restricción EcoRI**

Complejos	1	2	3	4	5	6	7	8
$[\text{Cu}_2(\text{Tz-Tol})_4]$ y $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$								
<b>Condiciones del ensayo</b>								
- <u>Tiempo incubación:</u> 30' y 120'								
- <u>Tampón:</u> cacodilato, pH 6,0 y TRIS- HCl pH 7,8								
- <u>% Agarosa:</u> 0,7								
- <u>[ ] de complejo:</u> 20 $\mu\text{M}$ y 200 $\mu\text{M}$								
- <u>Agente Reductor:</u> $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Ascorbato}$ , 50x y 75x								

Carrera 1: pUC18 control; carrera 2: DNA lineal; carrera 3: ADN tratado con  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , precipitado pero no digerido, carrera 4: ADN tratado con  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , precipitado y digerido; carrera 5: ADN tratado con  $\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4$ , precipitado pero no digerido, carrera 6: ADN tratado con  $\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4$ , precipitado y digerido; carrera 7: marcador de fragmentos  $P_{\text{HindIII}}$ , carrera 8: marcador de fragmentos  $P_{\text{p100}}$ .

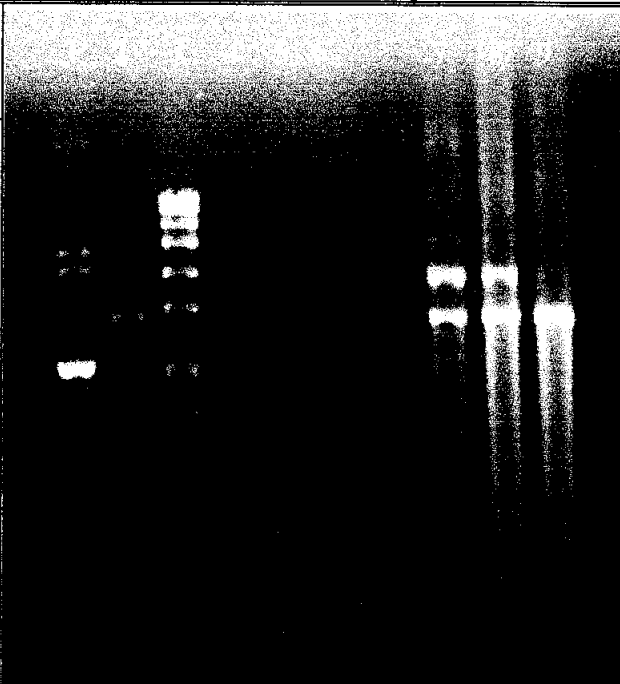
Tiempo de incubación: 30' para el complejo de Cu(II) y 120' para el complejo de Mn(III); Tampón: cacodilato pH 6,0 para el complejo de Cu(II) y TRIS-HCl pH 7,8 para el complejo de Mn(III); Concentración de complejo: 20  $\mu\text{M}$  para el complejo de Cu(II) y 200  $\mu\text{M}$  para el complejo de Mn(III); Agente reductor:  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Ascorbato}$ , 50x para el complejo de Cu(II) y 75x para el complejo de Mn(III).

Tras el experimento, no podemos manifestarnos respecto a la especificidad del complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  puesto que no partimos de la suficiente cantidad de ADN lineal. Deberíamos repetir la experiencia para intentar obtener más ADN lineal de partida.

Con respecto al complejo de Cu(II), observamos que el ADN tratado con este complejo, precipitado pero no digerido con el enzima EcoRI (carrera 5) da una banda de ADN circular y otra de ADN lineal. Cuando este ADN es digerido por el enzima de restricción (carrera 6) se observa cómo la banda de ADN circular prácticamente no existe debido a la acción del enzima de restricción al convertirse éste en ADN lineal por la acción del enzima. Se aprecia el ADN lineal y el fondo o *smearing* se ve incrementado claramente en esta carrera. La presencia de este fondo y la ausencia de bandas, como era esperado, nos permiten establecer la no especificidad de este complejo.

A la vista de los resultados se puede indicar que ambos complejos no son específicos *a priori*. Para poder manifestarnos con más seguridad acerca de la especificidad se debería repetir el ensayo con un nuevo enzima de restricción que no corte en el polilinker de pUC18, *Sca*. Con este nuevo enzima se pretende evitar la posibilidad de que los complejos corten en el mismo sitio que el enzima *EcoRI*, con lo que se observaría también un fondo o *smearing* después del tratamiento del ADN con el complejo y el enzima de restricción.

**Figura 6.38.- Prueba de especificidad de los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{Tz-Tol})_4]$  y  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  con los enzimas de restricción *EcoRI* y *Sca***

<b>Complejos</b>	
$[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$ y $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	
<b>Condiciones del ensayo</b>	
- <u>Tiempo incubación:</u> 30' y 120'	
- <u>Tampón:</u> cacodilato, pH 6,0 TRIS-HCl pH 7,8	
- <u>% Agarosa:</u> 0,7	
- <u>[ ] de complejo:</u> 20 $\mu\text{M}$ y 200 $\mu\text{M}$	
- <u>Agente Reductor:</u> $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Ascorbato}$ , 50x y 75x	

Carrera 1: pUC18 control; carrera 2: DNA lineal; carrera 3: marcador de fragmentos; carrera 4:  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  precipitado pero no digerido, carrera 5:  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  precipitado y digerido con *Sca*, carrera 6:  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  precipitado y digerido con *EcoRI*; carrera 7:  $\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4$  precipitado pero no digerido, carrera 8:  $\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4$  precipitado y digerido con *Sca*, carrera 9:  $\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4$  precipitado y digerido con *EcoRI*.

Los datos experimentales indican que no existe corte específico para ninguno de los complejos puesto que con ninguna de los dos enzimas de restricción se observan las bandas esperadas en el caso de especificidad. En el caso de que el sitio de corte del complejo coincidiese con el de alguno de los dos enzimas de restricción observaríamos un fondo o *smearing* para ese enzima pero para el otro enzima sí observaríamos bandas.

### 6.2.6- AFM (ATOMIC FORCE MICROSCOPY)

Con el fin de confirmar los datos obtenidos para determinar la capacidad nucleasa del complejo  $Mn(smtzn)_3 \cdot 3H_2O$  se ha usado la técnica de AFM (Atomic Force Microscopy).

#### **FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA AFM**

La microscopia de fuerzas atómicas es un técnica utilizada para la resolución de procesos y problemas materiales en una amplia variedad de tecnologías tales como electrónica, telecomunicaciones, biología, química, automoción, aeronáutica o industria energética entre otras.

Los principios de funcionamiento de la AFM son muy simples. Ésta es una técnica que produce imágenes tridimensionales. Con una punta afilada microscópica se realiza un barrido sobre la superficie de la muestra mediante mecanismos que hacen posible mantener la punta a una fuerza o masa constante sobre la superficie de la muestra. Los movimientos de la aguja arriba y abajo sobre el contorno de la superficie son detectados por un láser que los envía al fotodiodo dual del microscopio. El fotodetector mide la diferencia en la intensidad de la luz y la convierte en voltaje. El resultado es una imagen tridimensional.

Una de la ventajas de la AFM es que puede captar la imagen de superficies no conductoras por lo que su uso fue inmediatamente extendido para el análisis de sistemas biológicos como el análisis de cristales de aminoácidos y monocapas orgánicas.

Las aplicaciones de la AFM en biotecnología incluyen: análisis de ADN y ARN, complejos proteína-ácido nucleico, cromosomas, membranas celulares, proteínas y péptidos, cristales moleculares, polímeros y biomateriales, uniones ligando-receptor, etc.<sup>113</sup>



**Figura 6.39.- Imagen AFM tridimensional de cromosomas humanos**

### **PROTOCOLO GENERAL**

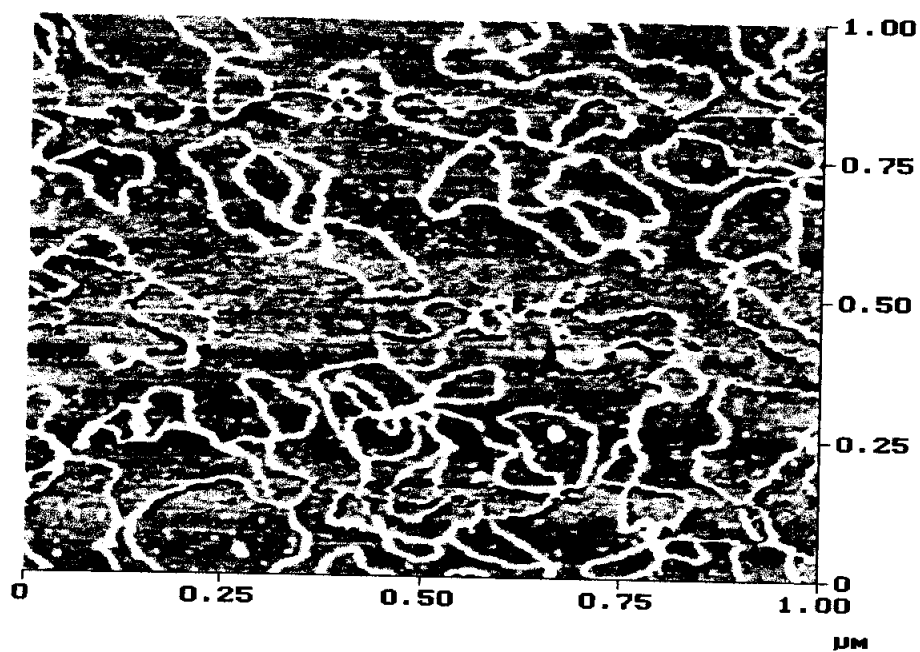
La preparación de los aductos ADN-complejo metálico se realizó incubando 15 ng de ADN de plásmido pBR322 de la casa comercial Boehringer Mannheim en un volumen apropiado con el complejo. La relación molar fue  $r_i = 0,5$ . El complejo fue disuelto en tampón HEPES. Las distintas disoluciones, al igual que el agua Milli-Q, se pasaron a través de filtros FP030/3 de 0,2 nm de la casa comercial Scheicher & Schueell GMBH y se centrifugaron a 4000 g varias veces con el fin de evitar los depósitos de sal y obtener un patrón limpio cuando fueron analizadas por AFM. Las reacciones se mantuvieron durante 2 horas a 37 °C.

Las muestras fueron preparadas colocando una gota de la solución de ADN (6  $\mu\text{L}$ ) o de disolución del aducto ADN-complejo metálico sobre una placa de mica verde (Ashville-Schoonmaker Mica Co.). Después de 5 minutos de adsorción a  $T^a$  ambiente, las muestras fueron enjuagadas con agua desionizada de 18  $\text{MWcm}^{-1}$  directamente sobre la superficie. Las muestras fueron secadas con argon sobre silica gel. Posteriormente las muestras se analizaron con un Nanoscope III Multimode AFM de la casa Digital Instrumentals Inc.

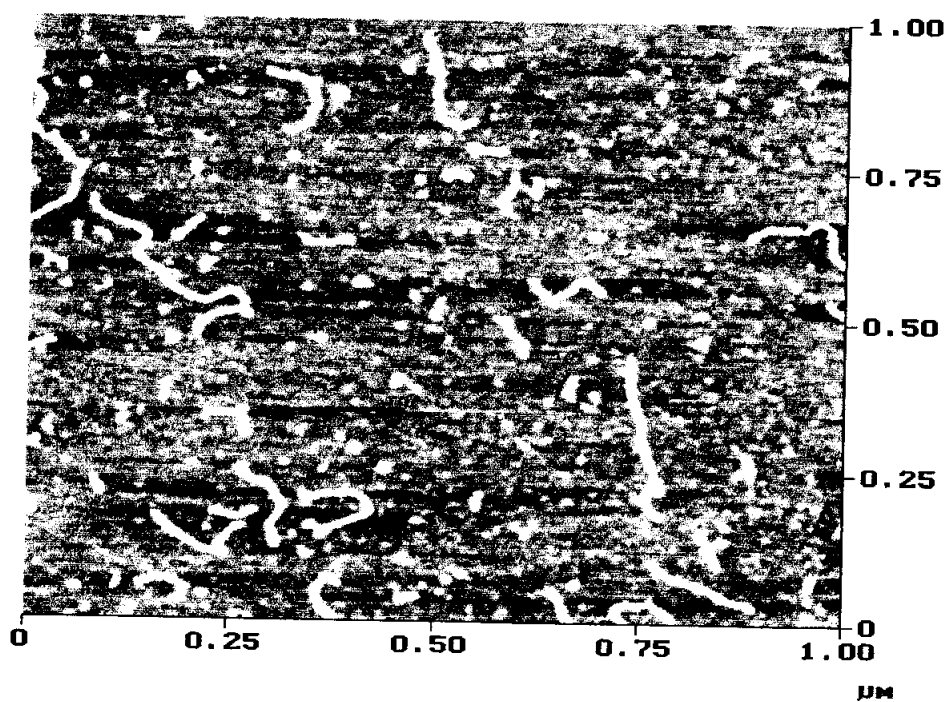
### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En las figuras 6.40 y 6.41 se muestran las imágenes obtenidas después de la incubación del plásmido pBR322 con complejo 40  $\mu\text{M}$ . El ensayo se llevó a cabo en ausencia y presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Ascorbato como forma activante del proceso. En ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Ascorbato, se observa el ADN de plásmido superenrollado. En presencia de ambos agentes reductores se observa una completa degradación de la doble cadena helicoidal del ADN de plásmido, mostrándose ADN lineal y fragmentos de menor número de pares de bases.

Los resultados deducidos mediante esta técnica vienen a confirmar aquellos obtenidos en geles de agarosa que demuestran que el complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$ /Ascorbato, se comporta como una nucleasa química inespecífica.



**Figura 6.40.- AFM del complejo  $Mn(smtzn)_3 \cdot 3H_2O$ ,  $40 \mu M$ , en tampón HEPES en ausencia de  $H_2O_2$ /Ascorbato como forma activante de la reacción.**



**Figura 6.41.- AFM del complejo  $Mn(smtzn)_3 \cdot 3H_2O$ ,  $40 \mu M$ , en tampón HEPES en presencia de  $H_2O_2$ /Ascorbato como forma activante de la reacción.**



# Capítulo 7: Conclusiones

---

---

## CONCLUSIONES

1.- Se han sintetizado y caracterizado 3 nuevos ligandos: *N*-(tiazol-2-il) toluenosulfonamida, *N*-(tiazol-2-il)bencenosulfonamida y *N*-(tiazol-2-il) naftalenosulfonamida. Se ha determinado la estructura cristalina de los complejos *N*-(tiazol-2-il) toluenosulfonamida y *N*-(tiazol-2-il) naftalenosulfonamida.

2.- Se han aislado y caracterizado complejos binarios de 4-amino-*N*-(5-metil 1,3,4-tiadiazol-2-il)bencenosulfonamida (sulfametizol), 4-amino-*N*-(4,6-dimetil-2-pirimidinil)bencenosulfonamida (sulfametazina), *N*-(tiazol-2-il) toluenosulfonamida, *N*-(tiazol-2-il) bencenosulfonamida y *N*-(tiazol-2-il) naftalenosulfonamida con los iones metálicos Mn(II), Mn(III) y Cu(II). Asimismo se han sintetizado, caracterizado y determinado la estructura de complejos ternarios de estas sulfonamidas e imidazoles y derivados.

3.- Mediante difracción de R-X, se ha determinado la estructura cristalina de los complejos  $[\text{Mn}(4\text{-metilimH})_2(\text{OH}_2)_4](\text{smtz})_2$ ,  $[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)]_n \cdot (\text{imH})$ ,  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$ ,  $[\text{Cu}(\text{smtz})(1,2\text{-dimetilimH})_3(\text{OH})] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$ .

4.- A partir de los estudios realizados se ha podido determinar el comportamiento de las distintas sulfonamidas como ligandos:

- el sulfametizol en forma desprotonada actúa como contraión en el complejo  $[\text{Mn}(4\text{-metilimH})_2(\text{OH}_2)_4](\text{smtz})_2$  y como ligando monodentado a través del N tiadiazol contiguo al grupo sulfonamido en los complejos  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$  y  $[\text{Cu}(1,2\text{-dimetilimH})_3(\text{smtz})(\text{OH})] \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ .

- la sulfametazina se comporta como ligando bidentado enlazado a un ión manganeso a través del N pirimidina y del N sulfonamido y como ligando monodentado frente a un ión manganeso contiguo a través del grupo amino en el complejo  $[\text{Mn}(\text{smtzn})_2(\text{OH}_2)]_n \cdot (\text{imH})$ .
- tz-tol y tz-naf actúan como ligandos puente a través de N tiazol enlazado a un Cu(II) y a través de N sulfonamido enlazado al Cu(II) contiguo.

5.- Se han interpretado los espectros infrarrojos (IR), electrónicos, de resonancia paramagnética electrónica (RPE) así como las medidas de las propiedades magnéticas de los todos complejos.

6.- La propiedades fisico-químicas del  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  demuestran que es un complejo dímero y que presenta una estructura cristalina similar a la de los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$ .

7.- El estudio de la variación de la susceptibilidad magnética frente a la temperatura de los complejos  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-naf})_4]$ , permite obtener valores de  $2J$  de -121,3, -114,1, -104,3  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente, indicando, estos valores un fuerte acoplamiento antiferromagnético entre los iones Cu(II).

8.- Se han realizado estudios de la capacidad mimética del enzima SOD de algunos de los complejos mediante dos métodos distintos:

- el método *in vitro* permite obtener valores de  $\text{IC}_{50}$  para los complejos de Mn(II) menores que los correspondientes a la sal de Mn(II) excepto el complejo  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{N-MetilimH})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ .

- se ha desarrollado un nuevo método para determinar la actividad SOD de los complejos de manganeso y cobre sintetizados. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que los complejos de Mn(II) ensayados *in vitro* también presentan actividad SOD *in vivo*. Este hecho demuestra que los complejos  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{py})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mn}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , y  $\text{Mn}(\text{smtzn})_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  son potentes agentes miméticos del enzima SOD.
- este método *in vivo* ha permitido ensayar los complejos de Cu(II) de los cuales, sólo el complejo  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$  presenta mayor actividad SOD que la sal correspondiente.

9.- Se ha estudiado la capacidad nucleasa de complejos de Mn(II), Mn(III) y Cu(II) mediante estudios electroforéticos en geles de agarosa. Los ensayos se han llevado a cabo con diferentes tampones y utilizando distintos agentes reductores. De los resultados obtenidos se deduce que, en las condiciones ensayadas, los complejos de Mn(II), no presentan mayor actividad nucleasa que la sal de Mn(II) ensayada. Los complejos,  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ,  $[\text{Cu}(\text{smtz})_2(\text{imH})_2]$ ,  $[\text{Cu}_2(\text{tz-tol})_4]$  y  $[\text{Cu}_2(\text{tz-ben})_4]$  presentan mayor actividad nucleasa que las sales correspondientes. La actividad nucleasa del complejo  $\text{Mn}(\text{smtzn})_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  se pone también de manifiesto mediante la técnica AFM.

# Capítulo 8: Bibliografía

---

---

- 1.-Frieden E., (1985), *Journal of Chemical Education*, 62(11), 917.
- 2.-Barán E.J., (1994) en *Química Bioinorgánica*, Ed. McGraw-Hill, Madrid.
- 3.-Hoyos Saavedra L.O., (2000), "*Síntesis de complejos metálicos como posibles modelos miméticos de las metaloenzimas*", Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela.
- 4.-Ochiai E-I., (1978), *J. Chem. Ed.*, 55(10), 631.
- 5.-[www.chemicalelements.com/elements/mn.html](http://www.chemicalelements.com/elements/mn.html)
- 6.-Luckey T.D., & Vernugopal B., (1978) en *Metal toxicity in mammals*, 2, Plenum press, NY.
- 7.-[www.shef.ac.uk/chemistry/web-elements/webelements/elements/text/Mn/key.html](http://www.shef.ac.uk/chemistry/web-elements/webelements/elements/text/Mn/key.html)
- 8.-Duffy J. A., (1974) en *Química Inorgánica General*, C.E.C.S.A.
- 9.-Hage R., (1996), *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 115, 385.
- 10.-Fraústo da Silva J.J.R., & Williams R.J.P., (1991) en *The biological chemistry of elements. The inorganic chemistry of life*, Clavendon Press, Oxford.
- 11.-Wieghardt K., (1989), *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, 1153.
- 12.-Keen C.L., Ensunsa J.L., & Clegg M.S., (2000), *Metals ions in biological systems*, 37, 89.
- 13.-[www.chemicalelements.com/elements/cu.html](http://www.chemicalelements.com/elements/cu.html)
- 14.-Cotton F.A., & Wilkinson G., (1988), en *Advanced Inorganic Chemistry. 5<sup>th</sup> edition*, John Wiley & Sons, NY.
- 15.-Kaim W., & Schwederski B., (1994), en *Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life*, John Wiley & Sons, Chichester.
- 16.-[www.Inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm](http://www.Inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc200.htm)
- 17.-Patrick G.L., (1998), en *An introduction to medicinal chemistry*, Oxford University Press.
- 18.-Korolkovas A., (1983), en *Compendio esencial de Química farmacéutica*, Ed. Reverté, Barcelona.
- 19.-[med.mme.edu.ar/posgrado/farmacologia/volumen%20111/CAP33%20sulfas%20y%20quinolonas.pdf](http://med.mme.edu.ar/posgrado/farmacologia/volumen%20111/CAP33%20sulfas%20y%20quinolonas.pdf)
- 20.-Casanova J., (1995), "*Compuestos de coordinación de Co(II), Ni(II), Cu(II) y Zn(II) con sulfatiazol*", Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.
- 21.-Casanova J., Alzuet G., Latorre J., & Borrás J., (1996), *Inorg. Chem.*, 36, 2052.

- 22.-Casanova J., Alzuet G., Borrás J., Amigó M., & Debaerdemaeker T., (1993), *Z. Kristallogr.*, 209, 271.
- 23.-Casanova J., Alzuet G., Borrás J., Timoneda J., García-Granda S., & Candano-garcía I., (1994), *J. of Inorg. Biochem.*, 56, 65.
- 24.-Casanova J., Alzuet G., Borrás J., & Carugo O., (1996), *J. Chem. Soc; Dalton Trans*, 2239.
- 25.-Casanova J., Alzuet G., Ferrer S., Borrás J., García-Granda S., & Perez-Carreño E. J., (1993), *J. Inorg. Biochem.*, 51, 689.
- 26.-Casanova J., Alzuet G., Borrás J., Latorre J., Sanau M., & García-Granda S., (1995), *J. Inorg. Biochem.*, 60, 219.
- 27.-Alzuet G., Ferrer-Llusar S., Borrás J., & Martínez-Mañez R., (2000), *Polyhedron*, 304(2), 170.
- 28.-Vogel A.I., (1989), Longman Scientific & Technical, 5ª edición.
- 29.-[www.vet.purdue.edu/depts/bms/courses/bms514/chmrx/sulfashd.hym](http://www.vet.purdue.edu/depts/bms/courses/bms514/chmrx/sulfashd.hym)
- 30.-[www.usp.org/veterinary/monographs/sulfonamides.pdf](http://www.usp.org/veterinary/monographs/sulfonamides.pdf)
- 31.-[www.tarius.com/frnews/documents/01-11070.htm](http://www.tarius.com/frnews/documents/01-11070.htm)
- 32.-Vollhardt K.P.C., (1994), en *Química Orgánica*, Ed. Omega, Barcelona.
- 33.-Atkins P.W., (1991), en *Fisicoquímica*, 3ª edición, Ed. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., Willington, Delaware, E.U.A.
- 34.-K. Burger, (1978), en *Coordination chemistry: Experimental Methods*, London Butterworhs.
- 35.-Oberley L.W & Spitz D.R., (1986) en *Handbook of methods for oxigen radicals research*, CRC Press, Boca Ratón.
- 36.-Silverstein R.M., & Webster F.X., (1998), en *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, NY.
- 37.-Prestch E., Clerc T. Seibl J., & Simon W., (1998), en *Tablas para la determinación estructural por métodos espectroscópicos*, Springer-Verlag Iberica, Barcelona.
- 38.-Lieber E., Calvanico N., & Rao C.N.R., (1963), *J.Org.Chem.*, 28, 257.
- 39.-Borrás E., Alzuet G., Borrás J., Server-Carrió J.J., Castiñeiras A., Liu-Gonzalez M., & Sanz-Ruiz F., (2000), *Polyhedron*, 19, 1859.
- 40.-Charles J. Pouchert, (1981), en *The Aldrich library of infrared spectra*, ed. III, Aldrich Chemical Company, Inc.

- 41.-García-Raso A., Fiol J.J., Martorell G., López-Zafra A., & M.Quirós, (1997), *Polyhedron*, 16, 613.
- 42.-Alzuet G., Ferrer-Llusar S., Borrás J., Castiñeiras A., Solans X. & Font-Bardía M., (1992), *Polyhedron*, 11(22), 2849.
- 43.-González-Álvarez M., (2001), "*Compuestos de cobre con sulfonamidas N-derivadas*", Trabajo de Investigación, Universidad de Valencia.
- 44.-Bruker, (1997), SMART and SAINT. Area detector control and integration Software, Bruker analytical X-Ray instruments Inc., Madison, Wisconsin, U.S.A.
- 45.-Sheldrick G.M., (1990), *Acta Cryst.*, A46, 467.
- 46.-Sheldrick G.M., (1997), SHELXL-97. Program for the refinement of crystal structures. University of Goettingen, Germany.
- 47.-International tables for X-ray crystallography, Vol C, (1995), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 48.-Spek A.L., (2000), PLATON. A multipurpose crystallographic tool, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.
- 49.-Nonius B.V., (1994), CAD4 Express Software, Delft, The Netherlands.
- 50.-Kretschmar M., (1997), GENHKL Program for the reduction of CAD4 diffractometer data, University of Tuebingen, Germany.
- 51.-North A.C.T, Phillips D.C., & Mathews F.S., (1968), *Acta Cryst.*, A24, 351.
- 52.-Keller, E., (1997), SCHAKAL-97. A computer program for the graphic representation of molecular and crystallographic models, University of Freiburg, Germany.
- 53.-Zsolnai L., (1997), ZORTEP. A program for the presentation thermal ellipsoids. University of Heidelberg, Germany.
- 54.-Cressey M., McKenzie E.D., & Yates S., (1987), *Inorg. Chim. Acta*, 129, 103.
- 55.-Arora D.L., Kanti E.D., Gupta S.P., & Sahni S.K., (1986), *J.Chem. Soc. A*, (1977), 5, 1499.
- 56.-Singh N.B., Singh J., (1979), *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 41, 1384.
- 57.-Colacio E., Costes J.P. Kivekäs R., Laurent J.P., Ruiz J., Sundberg M., (1991), *Inorg. Chem.*, 30, 1475.
- 58.-Sutton D., (1975), en *Espectros electrónicos de los complejos de los metales de transición*, Ed. Reverté, Barcelona.



- 59.-Que Jr. L., (2000), en *Physical methods in bioinorganic chemistry. Spectroscopy and magnetism*, University Science Books.
- 60.-Trautwein A.X., Bill E., Bominaar E.L., & Winkler H., (1991), *Structure and bonding*, 78.
- 61.-Wertz J.E., & Bolton J.R., (1991), en *Electron spin resonance. Elementary theory and practical applications*, Chapman & Hall.
- 62.-Drago R.S., (1997), en *Physical methods for chemists, 2<sup>nd</sup> edition*, Saunders College Publishing.
- 63.-Figgis B.N., & Hitchman M.A., (2000), en *Ligand field and its applications*, Wiley-VCH.
- 64.-Palmer G., (1980), en *Methods for determining metal ion environments in proteins: structure and function of metalloproteins*, Ed. Elsevier, North Holland.
- 65.-Pilbrow J.R., (1990), en *Transition ion electron paramagnetic resonance*, Oxford Science publications, Oxford.
- 66.-Sheldrick G.M., (1997), SADABS. Program for empirical absorption correction of area detector data. University of Goettingen, Germany.
- 67.-COLLECT, Nonius BV, 1997-2000.
- 68.-Otwinowski Z., & Minor M., (1997) in *Processing of X-Ray diffraction data collected in oscillation mode, Methods in enzymology*, 276: Macromolecular Crystallography, part A, 307-326, DENZO-SCALEPACK.
- 69.-Altomar A., Burla M.C., Camalli M., Cascarano G.L., Giavazzo C., Guagliardi A., Moliterni A.G.G., Polidori G., Spagna R. (1999), SIR97, *J. Appl. Cryst.* 32, 115-119.
- 70.- (a) Nardelli, M. *Comput. Chem.* (1983), 7, 95-97. (b) Nardelli, M. *J. Appl. Crystallogr.* (1995), 28, 659, PARST.
- 71.-ORTEP3 for Windows, Farrugia L.J., (1997), *J. Appl. Cryst.*, 30, 565.
- 72.-Izquierdo M., Casabó J., Díaz C., & Ribas J., (1983), *Polyhedron*, 2(6), 529.
- 73.-Hathaway B.J., (1987), en *Comprehensive coordination chemistry*, 5, Pergamon Press, NY.
- 74.-Lever A.B.P., (1984), en *Inorganic electronic spectroscopy, 2<sup>nd</sup> edition*, Ed. Elsevier, North Holland.
- 75.-Gonzalez-Perez J.M., Nguyen-Huy Dung, Nicolás-Gutierrez J., Viossat B., Busnot A., & Vicente-Gelabert M.L., (1989), *Inorg. Chim. Acta*, 166, 115.

- 76.-Alzuet Piña M.G., (1992), "*Complejos metálicos de acetazolamida y metazolamida, potentes inhibidores de la anhidrasa carbónica*", Tesis Doctoral, Universidad de Valencia.
- 77.- Kivelson D., & Neiman R., (1961), *J.Chem. Phys.*, 35(1), 149.
- 78.- Jain K.S., Garg S.B., & Bhoon Y.K., (1986), *Spectrochimica Acta*, vol 42A(9), 959.
- 79.-Bertini I., & Drago R., (1979), en *ESR and NMR of paramagnetic species in biological and related systems*, 215.
- 80.- Hathaway B.J., Billing E., (1970), *Coordin. Chem. Rev.*, 5, 143.
- 81.-Wasson J.R., Shyr C.I., & Trapp C., (1968), *Inorg.Chem.*, 7, 469.
- 82.- Wasserman E., Snyder L.C., & Yager W.A., *J.Chem. Phys.*, 41, 1763.
- 83.-Gutierrez L., Alzuet G., Borrás J., Castiñeiras A., Rodríguez-Fortea A., & Ruiz E., (2001), *Inorg. Chem.*, 40, 3089.
- 84.-Goodgame D.M.L., Nishida Y., & Winpenny R.E.P., (1986), *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 59, 344.
- 85.-Burch, P.E., (1989), "*DNA damage and cell lethality by photodynamically produced oxygen radicals*", Rice University, Houston, Texas.
- 86.-Riley D.P, (1999), *Chem. Rev.*, 99, 2573.
- 87.-[www.biomednet.com/hmsbeagle/70/notes/profile](http://www.biomednet.com/hmsbeagle/70/notes/profile)
- 88.-Weiss R.H., Fretland D.J., Baron D.A., Ryan U.S. & Riley D.P, (1996), *J.Biol.Chem.*, 271(42), 26149.
- 89.-Banci L. *et al.*, (1998), *Biochemistry*, 11780.
- 90.-Fridovich I., (1995), *Annu.Rev.Biochem.*, 64, 97.
- 91.-Li J. *et al.*, (1999), *Am. Chem. Society*.
- 92.-Leveque V.J.P. *et al.*, (2000), *Biochemistry*, 39, 7131.
- 93.-Renault C.A. *et al.*, (2000), *Inorg. Chem.*, 2000, 39, 2666.
- 94.- Edwards R.A *et al.*, (2001), *Biochemistry*, 40, 4622.
- 95.-Hearn.A.S. *et al.*, (1999), *J. Biol. Chem.*, 274(35), 24457.
- 96.-Goldstein S., & Czapski G., (1991), *Free Rad. Res. Comms.*, 12-13, 5.
- 97.-Krishna M.C. *et al.*, (1996), *J. Biol. Chem.*, 271(42), 26026.
- 98.-Lapluye G., (1990), *Advances in experimental medicine and biology*, 264, 59.
- 99.-Brock T.D., & Madigan M.T., (1993), en *Microbiología, 6ª Edición*, Prentice Hall Hispanoamericana.

- 100.-Walker G.M., (1998), en *Yeast physiology and biotechnology*, John Wiley & Sons, Chichester.
- 101.-Voet D., & Voet J.G., (1992), en *Bioquímica*, John Wiley & Sons, Barcelona.
- 102.-Stryer L., (1995), en *Bioquímica*, 4ª edición, Ed. Reverté, Barcelona.
- 103.- Bonomo R.P., Impellizzeri G., Pappalardo G., Purrello R., Rizzarelli E., & Tabbi G., (1998), *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 3851.
- 104.- Peretó J., Sendra R., Pamblanco M., & Bañó C., (1998), en *Fonaments de bioquímica*, Universitat de Valencia.
- 105.-Raulin F., (1994), en *La aparición de la vida*, RBA editores, Barcelona.
- 106.-Alberts B. Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D., (1996), en *Biología molecular de la célula*, 3ª edición, Ed. Omega, Barcelona.
- 107.-Sigman D.S., & Chen C.B., (1990), *Annu. Rev. Biochem.*, 59, 57.
- 108.-Farrel N., (1989), *Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents, Catalysis by metal complexes*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- 109.-Pratviel G., Bernadou J., & Meunier B., (1998), *Advances in inorganic chemistry*, 45, 251.
- 110.-Frey S.T., Sun H.H.J., Murthy N.N., & Karlin K.D. (1996), *Inorg. Chim. Acta*, 242, 329.
- 111.-Baudoin, O., Teulade-Fichon M.P., Vigneron J.P., & J.M.Lehn, (1998), *Chem. Commun.*, 2349.
- 112.-Sambrook, Fritsch & Maniatis, (1989), en *Molecular cloning. A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- 113.-[www.chembio.uoguelph.ca/educmat./chm729/afm](http://www.chembio.uoguelph.ca/educmat./chm729/afm)