



VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Química
Instituto de Ciencia Molecular

**Compuestos azamacrocíclicos con propiedades
anfifílicas. Estructura, comportamiento en
disolución acuosa y aplicaciones biomédicas**

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

Doctoranda

D^a. Mercy Elena Arteaga Vinza

Tutor

Dr. D. Enrique García-España Monsonís

Directores

Dra. D^a. María Teresa Albelda Gimeno

Dr. D. Salvador Blasco Llopis

Julio de 2025

València



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU

Dr. D. Enrique García-España Monsonís, Catedrático del Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València, **Dra. D^a. María Teresa Albelda Gimeno**, Profesora titular del Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València y **Dr. D. Salvador Blasco Llopis**, Profesor titular del Departamento de Química Inorgánica de la Universitat de València,

CERTIFICAN:

Que la presente memoria, titulada **“Compuestos azamacrocíclicos con propiedades anfifílicas. Estructura, comportamiento en disolución acuosa y aplicaciones biomédicas”**, que corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por **D^a. Mercy Elena Arteaga Vinza**, para su presentación como Tesis Doctoral en el programa de Doctorado de Nanociencia y Nanotecnología de la Universitat de València.

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

En Burjassot, a 17 de Julio de 2025

D. Enrique García-España Monsonís

D^a. María Teresa Albelda Gimeno

D. Salvador Blasco Llopis



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA



EXCELENCIA
MARÍA
DE MAEZTU

D^a. Mercy Elena Arteaga Vinza, graduada en Ingeniería Química por la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH), Ecuador, presenta esta memoria, titulada **“Compuestos azamacrocíclicos con propiedades anfifílicas. Estructura, comportamiento en disolución acuosa y aplicaciones biomédicas”**, en el marco del programa de doctorado en Nanociencia y Nanotecnología (RD 99/2011), con el fin de optar al título de doctora.

Y para que así conste, firma la presente en Burjassot, a 17 de julio de 2025.

D^a. Mercy Elena Arteaga Vinza

A Dios,

mi guía en cada paso,
porque sin su presencia,
este viaje no tendría sentido.

A mi madre, Dina Vinza Chamorro,

luz eterna en mi camino,
por enseñarme a soñar con los ojos despiertos,
a transformar el dolor en fuerza,
a ver en la educación el camino hacia un mejor porvenir,
y la vida, en un acto de amor.

*A todos los que me acompañaron,
en el alma, en la distancia,
en el tiempo y en el espacio:*

esta tesis es más que conocimiento;
es el eco de muchas voces,
el fruto de muchas manos,
y el latido de un corazón
que nunca dejó de creer.

AGRADECIMIENTOS

*La vida, un viaje alucinante
hacia la propia búsqueda.*

Mercy Arteaga

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo de numerosas personas e instituciones. A todos los que forman parte de estas páginas les dedico estas breves líneas, consciente de que no alcanzan a expresar todo lo que me han dado, me dan y confío que seguirán dándome.

Quiero comenzar agradeciendo a mi socio principal, al director de mi vida: **Dios**. Nada de esto sería posible sin su guía y dirección, nada de esto existiría sin ti.

A Mamá: mi inspiración y la razón para dar vida a este objetivo. Gracias por tu luz, tu amor incondicional, tu fe inquebrantable, tu sabiduría admirable y tu ejemplo constante de trabajo y valentía. Me enseñaste a soñar con los ojos despiertos, a luchar por un mundo más humano, justo y equitativo, y a escribir mi propia historia con propósito, esperanza y coraje. *Tu legado vive en mí en cada paso que doy.* Aunque el cáncer transformó tu presencia, tu amor, tu luz y tus sueños siguen vivos en este logro alcanzado. *Te amo en todos los tiempos y espacios.*

A Papá: por enseñarme que no hay límites ni edad para cumplir sueños. Por inspirarme a entender que la fe, el amor y la humanidad, junto con la ciencia, se entrelazan para hacer todo posible.

A mi hermana Elvia: gracias por creer en mí, por apoyarme siempre y sostenerme con tu amor aun a la distancia. Eres un ser humano extraordinario y este logro también es tuyo.

A mis mentores y apoyo académico:

Al profesor Enrique García-España, mi tutor de tesis: gracias por abrirme las puertas de su laboratorio y por el apoyo brindado durante esta etapa. “*SUPRAMOL*” fue el espacio donde sembré mis objetivos, y hoy los veo fructificar. ¡Gràcies! ¡Gràcies!

Al profesor Jonathan Sessler: por la maravillosa oportunidad de realizar mi estancia en su laboratorio en Universidad de Texas en Austin. Gracias por su apoyo, conocimientos, amabilidad y, sobre todo, humanidad. ¡Thanks a lot!

Al Dr. Nuno Basilio: gracias por acogerme en su laboratorio en la Universidade NOVA de Lisboa. Valoro profundamente no solo sus enseñanzas científicas, sino también su calidad humana. ¡Obrigada! ¡Obrigada!

A mis directores de tesis, Salvador Blasco y Teresa Albelda: por su tiempo, paciencia, conocimiento y el apoyo que me han brindado a lo largo de estos años de trabajo. *Ningún objetivo se alcanza en solitario; gracias por la guía que me han ofrecido en este camino.*

A Cooperación Internacional y la Universidad de Valencia: por la beca predoctoral “Juan Castelló”, que permitió rescatar este objetivo cuando parecía desvanecerse. Gracias por brindarme seguridad y calma durante mi primer año como doctoranda.

A la Consejería de Educación de la Comunidad Valenciana: Gracias por el apoyo brindado a través del programa “Santiago Grisolia”, que fue clave para dar continuidad a este objetivo. También agradezco la beca que

me permitió realizar una estancia en la Universidad de Texas en Austin, una experiencia transformadora, llena de aprendizajes y crecimiento. En memoria del profesor Santiago Grisolia: “*Si no pedaleas, te caes*”.

A COST/Supramolecular Luminescent Chemosensors for Environmental Security (LUCES): gracias por la beca que me permitió realizar la estancia en la Universidad NOVA de Lisboa. *La magia encendida en esa etapa, me aseguraré de que nunca se apague.*

A mi familia, amigos y comunidad científica:

A mis hermanas, hermanos y sobrinos: gracias por acompañarme en el camino y en la conquista de nuevos horizontes, tanto en la vida como en la ciencia. *¡Son mi equipo extraordinario!*

A Nadia: gracias por tu escucha incansable, por abrazarme en los momentos de miedo y por tu amistad genuina. Has sido un pilar en este camino y una luz de alegría en mis días. *Llegamos juntas al final, y lo celebro contigo.*

A Abhy: por tu humanidad y compañerismo en mi camino científico. Desde cualquier lugar del mundo, celebraré la vida y la fortuna de haberte conocido, mi gran amigo. Gracias por *To Zinda Ho Tum (Then You Are Alive)*, y por tanto más...

A Jesi y Andrés: gracias por estar, incluso en la distancia. Con su amistad y apoyo hicieron más ligero el camino y más cálido cada paso.

A Víctor: gracias por tu cariño y apoyo en los momentos difíciles. Has sido un gran amigo en los veranos e inviernos de la vida.

A Karina: El tiempo de conocernos fue corto, guardo cada recuerdo en mi corazón y mi memoria. Seguiré labrando en el mundo de la ciencia y estoy segura un día haremos ciencia juntas en el cosmos.

A Claudia Rocco: Por ser faro, guía y sostén en mi camino científico. Tu humanidad y empatía en el ámbito académico me inspiran a no olvidar la dimensión más profunda de la ciencia. *Unidas por enlaces covalentes, más allá del laboratorio.*

Al grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (España), al grupo del profesor Jonathan Sessler (EE. UU.) y al grupo del profesor Nuno Basilio (Portugal): gracias por su compañerismo, sus enseñanzas y por hacer de cada estancia una experiencia enriquecedora, llena de aprendizajes, ciencia, nuevas culturas y humanidad. *La mejor ciencia florece en la diversidad.*

A todos quienes han sido parte de este objetivo, de este viaje: gracias por dar vida a lo que un día fue un sueño, y hoy es una realidad. Han sido parte de la aventura viviente, del sueño de verano que una niña imaginó en el corazón de la Amazonía Ecuatoriana. Su apoyo y compañía han sido invaluable. Llevo cada recuerdo en mi corazón.

En este momento, mientras contemplo la vida entre el mundo visible e invisible, navegando entre átomos y moléculas, me doy cuenta de lo enriquecedor que ha sido este camino. Espero que también disfruten de este viaje humano y científico.

Entre árboles milenarios encontré mi pasión.

La esperanza florece, es vibrante.

El nuevo renacer no desvanece.

Llegó el fin de una etapa... y a la vez, el comienzo de una nueva aventura en este bello viaje llamado vida.

Gracias por dar un nuevo vuelo a mi alma...

Este trabajo recibió la financiación de la Universitat de València y del Ayuntamiento de Valencia mediante la Beca de doctorado Juan Castelló (2020). A partir de octubre de 2021, la tesis fue financiada por el Programa “Santiago Grisolia” del Ministerio de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital (GRISOLIAP/2021/073), a través del contrato CPI-21-244. Asimismo, contó con una subvención para la realización de una estancia larga fuera de la comunidad Valenciana, CIBAFP/2022/48.

En 2025, la investigación también se benefició de financiación para una estancia corta por parte de COST Action CA22131 – Supramolecular Luminescent Chemosensors for Environmental Security (LUCES).

Además, la presente tesis doctoral contó con el apoyo del proyecto “Amino Nanozymas: Aplicaciones Biológicas” (CIPROM/2021/030), financiado por la Conselleria de Educación, Cultura, Universidades y Empleo a través del programa Prometeo para grupos de investigación de excelencia.

Índice general

Índice de figuras	XXII
Índice de tablas	XXXII
Abstract	XXXIV
Glosario	XLII
1. Introducción	1
1.1 La Química Supramolecular	4
1.1.1 Fuerzas intermoleculares	4
1.1.2 Reconocimiento molecular	8
1.1.3 Catálisis supramolecular	9
1.1.4 Transporte	9
1.1.5 Autoensamblaje	11
1.2 Nanotecnología y Nanomedicina	12
1.2.1 Sistemas de transporte de fármacos	15
1.2.2 Transporte de fármacos en infecciones y neurodegeneración.	18
1.3 Estructuras y ensamblajes supramoleculares	21
1.3.1 Sistemas microheterogéneos	21
1.3.2 Estructura y morfología micelar	24

1.3.3	Concentración micelar crítica	26
1.3.4	Distribución de tamaño y alteraciones morfológicas.....	33
1.3.5	Dinámicas y modelos micelares	34
1.3.6	Cinética de la formación de micelas	36
1.4	El Dioxígeno y sus especies.....	39
1.4.1	El dioxígeno.....	39
1.4.2	Las especies reactivas de oxígeno	40
1.4.3	El radical superóxido	41
1.4.4	Enfermedades asociadas a las ROS	47
1.5	Los sistemas antioxidantes.....	52
1.5.1	Superóxido dismutasa.....	52
1.5.2	Miméticos de la SOD.....	64
1.6	Una nueva perspectiva	68
1.6.1	Diseño de nuevos miméticos. Aspectos a tener en cuenta.....	70
1.6.2	Actividad catalítica de la reacción química de clic de cicloadición catalizada por surfactantes de cobre azida-alquino [3 + 2] en agua	73
2.	Objetivos	89
3.	Materiales y Métodos	96
3.1	Reactivos y disolventes.....	98
3.2	Técnicas instrumentales	98
3.2.1	Medidas potenciométricas	98
3.2.2	Dispersión dinámica de luz.....	102
3.2.3	Resonancia magnética nuclear.....	102
3.2.4	Análisis elemental (CHNS).....	103
3.2.5	Espectrometría de masas.....	103
3.2.6	Difracción de rayos X de monocristalino.	103
3.2.7	Espectroscopia UV-Visible	104

3.2.8	Espectroscopia de Emisión de Fluorescencia	104
3.2.9	Microscopía de Fuerza Atómica	104
3.2.10	Microscopía Electrónica de Transmisión.....	105
3.2.11	Determinación del potencial ζ	105
3.2.12	Ensayo de actividad de superóxido dismutasa.....	106
3.2.13	Determinación de concentración micelar crítica	114
3.2.14	Ensayos de permeabilidad artificial en paralelo	119
3.2.15	Estudios computacionales.....	124
4.	Síntesis y Caracterización	128
4.1	Introducción	130
4.1.1	Protección de los grupos amino	130
4.1.2	Ciclación/Condensación	131
4.1.3	Funcionalización de la poliamina ciclada.....	132
4.1.4	Eliminación de los grupos protectores.....	132
4.1.5	Metilación de las aminas secundarias.....	133
4.2	Síntesis de los ligandos	135
4.2.1	Protección de grupo amino con grupo tosilo	135
4.2.2	Procedimiento de ciclación/condensación.....	136
4.2.3	Procedimiento de funcionalización.....	137
4.2.4	Procedimiento general de detosilación	138
4.2.5	Metilación de las aminas secundarias.....	139
4.3	Síntesis y caracterización de pytren y derivados.....	140
4.3.1	Síntesis de tren Ts	140
4.3.2	Síntesis de pytren Ts	140
4.3.3	Funcionalización de pytren Ts	142
4.3.4	Síntesis de pytren bromhidrato	145
4.3.5	Síntesis de metilación de aminas secundarias.....	148

4.4 Bibliografía	152
5. Comportamiento ácido-base y Química de coordinación	154
5.1 Introducción	156
5.2 Comportamiento ácido-base	157
5.3 Química de coordinación	161
5.3.1 Estudio de complejación con Cu(II)	161
5.3.2 Estudio de complejación con Mn(II)	166
5.3.3 Estudio de complejación con Fe(II).....	169
5.4 Bibliografía	172
6. Ensamblajes Supramoleculares	173
6.1 Introducción	175
6.2 Determinación de la Concentración micelar crítica	176
6.3 Medidas de DLS	180
6.4 Microscopía TEM y AFM.....	187
6.5 Dinámica molecular	190
6.6 Bibliografía	194
7. Actividad Catalítica	195
7.1 Introducción	197
7.2 Actividad de los complejos de Cu(II)	198
7.3 Actividad de los complejos de Mn(II)	200
7.4 Actividad de los complejos de Fe(II).....	201
7.5 Actividad catalítica de la reacción química de clic de cicloadición catalizada por surfactantes de cobre azida-alquino [3 + 2] en agua.....	203
7.5.1 Preparación in situ del tensioactivo Cu(II).....	203
7.5.2 Reacción de clic de cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(II) utilizando tensioactivos preparados con Cu(II)L8-Me3 y Cu(II)L16-Me3	203

7.5.3 Estudios catalíticos de la reacción química de clic de cicloadición de azida-alquino [3+2] catalizada por tensioactivos de cobre en agua.	205
7.6 Bibliografía	209
8. Permeabilidad y Citotoxicidad	210
8.1 Introducción	212
8.2 Ensayo de permeabilidad de membranas.	213
8.3 Estudio de toxicidad.....	216
8.4 Bibliografía	219
9. Conclusiones	220
A. Espectros RMN	230
B. Ensamblajes Supramoleculares	241

Índice de figuras

1.1	Representación esquemática de las interacciones; A) Ion-Ion, B) Ion-Dipolo y C) Dipolo-Dipolo.	5
1.2	Esquema de dos tipos de interacciones π - π : A) Cara con cara, B) De borde a cara.	6
1.3	Modelos que representan el reconocimiento molecular de un compuesto.	8
1.4	Esquema de catálisis supramolecular: la hidrólisis de fenilacetato catalizada por ciclodextrinas.	9
1.5	Procesos de transporte mediante transportador a través de especies neutras (A), pares iónicos (B) o canales (C).	10
1.6	Primer cuadrado supramolecular sintetizado por Fujita en los años 90.	12
1.7	Evolución en el desarrollo de los nanomedicamentos.	14
1.8	Representación esquemática de los mecanismos de transporte a través de membranas. (A) <i>Difusión pasiva</i> : incluye (i) difusión facilitada mediante proteínas	17

- transportadoras y (ii) difusión simple a través de la bicapa lipídica. (B) *Difusión activa*: transporte mediado por proteínas que requieren energía para mover moléculas contra su gradiente de concentración.....
- 1.9 Estructura y función de la BHE. La BHE está compuesta estructuralmente por células endoteliales, la membrana basal vascular, pericitos y los pies terminales de los astrocitos. Las células endoteliales presentan uniones estrechas sin fenestración ni actividad pinocítica, lo que impide el transporte paracelular de la mayoría de las moléculas, iones y fármacos. Estas uniones están compuestas por proteínas como claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión de unión (MAU), además de proteínas citoplasmáticas accesorias como Zonula occludens-1 (ZO-1), entre otras. 19
- 1.10 Molécula anfipática (A) y esquema de micela (B). Estructura química de la molécula anfipática, atendiendo a su dualidad polar-apolar: (I) El grupo polar suele contener heteroátomos como O, S, P o N en funciones químicas tales como alcoholes, ácidos, sulfonatos, fosfatos o aminas. Presenta afinidad por los solventes polares (agua) y se denomina grupo hidrofílico o hidrófilo. Dependiendo de la carga que porten, los clasificamos como agentes tensoactivos catiónicos (positiva) o aniónicos (negativa). En caso de no presentar carga iónica, hablaríamos de agentes tensoactivos denominados no-iónicos. En caso de que la molécula presente cargas positivas y negativas simultáneamente, estaríamos hablando de tensoactivos Zwitteriónicos, en la cual la carga final es neutra sin contraiones. (II) Grupo 22

	apolar: formado generalmente por una cadena hidrocarbonada de tipo alquilo o alquilbenceno, que puede incluir ocasionalmente heteroátomos como oxígeno o halógenos. Este segmento presenta baja solubilidad en medios polares como el agua, debido a su carácter hidrofóbico o lipofílico.	
1.11	Representación esquemática de una micela inversa en un medio no polar.	23
1.12	Representación simplificada de diversas formas de sistemas de ensamblajes compuestos por tensioactivos.	25
1.13	Cambio en la forma y estructura de las micelas con cambios en la concentración de surfactante.	26
1.14	Dependencia de la temperatura de la solubilidad del surfactante en la región del <i>punto de Krafft</i>	32
1.15	Ilustración grafica de la estructura de una micela de SDS.	35
1.16	Esquema de formación de las diferentes especies reactivas de oxígeno a partir del oxígeno triplete.	41
1.17	Orbitales moleculares del anión superóxido en su estado fundamental.	42
1.18	Producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en células de mamíferos.	44
1.19	Representación esquemática de la división proteolítica de APP mediante dos rutas: en la ruta no amiloidogénica, la APP es dividida por la α -secretasa y luego por la γ -secretasa, formando péptidos A β truncados (como A $\beta_{17-40/42}$). Alternativamente, la APP es dividida por la β -secretasa, produciendo A β_{1-16} truncado. En la ruta amiloidógena, la APP es dividida por las β y γ -secretasas, formando péptidos	50

	A β completos (como A $\beta_{1-40/42}$). En esta segunda ruta, el péptido A β interactúa con los iones metálicos presentes en el cerebro, formando oligómeros y luego fibrillas, precursoras de las placas amiloides.	
1.20	Representación esquemática de la estructura monomérica de la enzima Cu ₂ Zn ₂ -SOD, así como de su centro activo. (PDB 1AZV)	55
1.21	Representación esquemática del mecanismo propuesto para el ciclo catalítico de Cu ₂ Zn ₂ -SOD.	56
1.22	Representación esquemática de la estructura de la enzima MnSOD, así como el detalle de su centro activo. (PDB 2AW9)	58
1.23	Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la enzima Mn-SOD.	59
1.24	Representación de la estructura de la enzima FeSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1ISA)	61
1.25	Representación de los potenciales medios de la reducción de los pares Mn ³⁺ /Mn ²⁺ y Fe ³⁺ /Fe ²⁺ para los sistemas libres y cuando están coordinados por las enzimas Mn-SOD y Fe-SOD. Adaptación del trabajo de Miller et al.	63
1.26	Representación esquemática de los complejos de Mn (II) con el ligando [15]aneN5 y algunos de sus derivados.	65
1.27	Complejos de Mn(II) con actividad SOD de A) Shen et al., B) Valtancoli et al., C) Mahy et al., D) Ghosh et al. y Salvemini.	66
1.28	Representación de diversos complejos binucleares de Cu(II) o Cu(II)- Zn(II) descritos por A) Lippard et al., B) Rey et al., C) Lehn et al. y D) Kiss et al.	67

1.29	Representación de diversos ligandos desarrollados por el grupo GQS-UV. (A) Estructura del ligando denominado <i>pytren</i> (L), el cual ha sido funcionalizado con diferentes grupos para dar lugar a otros ligandos derivados.	69
1.30	Reacción de CuAAC catalizada por tensioactivos que contienen Cu(II).	73
3.1	Esquema de los componentes de un sistema potenciométrico.	100
3.2	Generación de superóxido mediante el sistema xantina/xantina oxidoreductasa.	107
3.3	Mecanismo de reducción de NBT.	107
3.4	Evolución de A ₅₆₀ en función del tiempo en un ensayo de SOD típico.	109
3.5	A) Espectro de emisión de fluorescencia del pireno (2x10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹) en [SDS] de (12 mM) (es decir, por encima de la CMC), y (4 mM) (es decir, por debajo de la CMC). B) Cociente de intensidades de la estructura fina (I/III) en función de [surfactante].	115
3.6	Esquema de difusión pasiva mediante el ensayo PAMPA.	121
3.7	Permeabilidad y límites de cuantificación de los compuestos de ensayo.	123
4.1	Esquema de reacción para la síntesis de compuestos macrocíclicos propuesto por Richman y Atkins.	130
4.2	Esquema de reacción de la síntesis de los ligandos.	134
4.3	Esquema del mecanismo de reacción de tosilación de un grupo amino.	135
4.4	Esquema de mecanismo de reacción de ciclación.	136
4.5	Esquema de mecanismo de reacción de funcionalización.	137

4.6	Esquema de mecanismo de reacción de eliminación de grupos tosilo.	138
4.7	Esquema de mecanismo de reacción de metilación siguiendo el procedimiento de Eschwweiler-Clarke adaptado de [23]. ...	139
5.1	Diagramas de distribución de especies para la protonación de L8-H , L8-Me3 , L16-H , L16-Me3 , L22-H y L22-Me3 simulados para $[L]_{\text{Total}}=1\text{mM}$	160
5.2	Diagramas de especiación para los sistemas Cu^{2+} - L8-H , Cu^{2+} - L8-Me3 , Cu^{2+} - L16-H y Cu^{2+} - L16-Me3 . $[\text{Cu}^{2+}]=[\text{L}]_{\text{Total}}=10^{-3}\text{mol/L}$	163
5.3	Estructura cristalina de $[\text{CuL8-H}](\text{ClO}_4)_2$. A) Detalle del empaquetamiento en el que los aniones perclorato se representa en púrpura; la unidad macrocíclica de L8-H en azul y la cola hidrofóbica en gris. B) Unidad asimétrica del cristal. No se muestra el desorden.	166
5.4	Diagramas de especiación para los sistemas Mn^{2+} - L8-H , Mn^{2+} - L8-Me3 , Mn^{2+} - L16-H y Mn^{2+} - L16-Me3 . $[\text{Mn}^{2+}]=[\text{L}]_{\text{Total}}=10^{-3}\text{mol/L}$	168
5.5	Diagramas de especiación para los sistemas Fe^{2+} - L8-H , Fe^{2+} - L8-Me3 , Fe^{2+} - L16-H y Fe^{2+} - L16-Me3 . $[\text{Fe}^{2+}]=[\text{L}]_{\text{Total}}=10^{-3}\text{mol/L}$	170
6.1	Cociente de intensidades de bandas vibratorias ($I_{\text{I}}/I_{\text{III}}$) en función de [ligando]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en tampón Tris 20 mM a pH 7.4. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	177
6.2	Datos de dispersión dinámica de luz (DLS) para soluciones vesiculares de L8-H , L8-Me3 , L16-H , L16-Me3 , L22-H y	182

	L22-Me3 . Soluciones preparadas en agua a pH 7.4 y medidas a temperatura ambiente.	
6.3	Imágenes seleccionadas de TEM. A) L8-H , B) L8-Me3 , C) L16-H , D) L16-Me3 , E) L22-H y F) L22-Me3 . Muestras preparadas a pH 7.4 y concentraciones superiores a sus respectivas CMC.	188
6.4	Esquema de imágenes obtenidas mediante AFM. (A) L8-H , (B-C) L8-Me3 . Muestras preparadas en agua a pH 7.4.	189
6.5	Esquema de simulación mediante dinámica molecular de una micela ensamblada con el ligando L8-H	191
6.6	Distribución radial de las moléculas de agua con respecto al centro de masa de la micela (COM). L8-H (izquierda) y L8-Me3 (derecha). Las líneas punteadas verticales representan los radios micelares calculados.	193
7.1	Estructura e imágenes de soluciones preparadas de tensioactivos Cu(II) L8-Me3 (A) y Cu(II) L16-Me3 (B).	204
7.2	Reacción de cicloadición azida-alquino [3 + 2] catalizada por tensioactivos que contienen Cu(II) (CuAAC).	204
7.3	La reacción de CuAAC catalizada por Cu(II) L16-Me3	207
8.1	Diagramas de distribución de especies para la protonación de L8-H (A), L8-Me3 (B), L16-H (C), L16-Me3 (D), L22-H (E) y L22-Me3 (F) simulados para [L] = 1mM (líneas azules continuas) y resultados de permeabilidad PAMPA (diagrama de dispersión negra con barras de error).	215
8.2	Esquema del estudio de toxicidad de los sistemas sintetizados mediante el ensayo HET-CAM (Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane). Tiempo de observación: 5 min. *Clasificación del efecto tóxico según el índice de	217

	irritación (IS): No irritante ($IS < 1$), irritante débil o leve ($1 \leq IS < 5$), irritante moderado ($5 \leq IS < 10$) o irritante fuerte o severo ($IS > 10$).	
A.1	Espectro de ^1H -NMR de L8Ts en CDCl_3 a 298 K.	232
A.2	Espectro de ^{13}C -NMR de L8Ts en CDCl_3 a 298 K.	232
A.3	Espectro de ^1H -NMR de L8-H en D_2O a 298 K.	233
A.4	Espectro de ^{13}C -NMR de L8-H en D_2O a 298 K.	233
A.5	Espectro de ^1H -NMR de L8-Me3 en CDCl_3 a 298 K.	234
A.6	Espectro de ^{13}C -NMR de L8-Me3 en CDCl_3 a 298 K.	234
A.7	Espectro de ^1H -NMR de L16Ts en CDCl_3 a 298 K.	235
A.8	Espectro de ^{13}C -NMR de L16Ts en CDCl_3 a 298 K.	235
A.9	Espectro de ^1H -NMR de L16-H en D_2O a 298 K.	236
A.10	Espectro de ^{13}C -NMR de L16-H en D_2O a 298 K.	236
A.11	Espectro de ^1H -NMR de L16-Me3 en CDCl_3 a 298 K.	237
A.12	Espectro de ^{13}C -NMR de L16-Me3 en CDCl_3 a 298 K.	237
A.13	Espectro de ^1H -NMR de L22Ts en CDCl_3 a 298 K.	238
A.14	Espectro de ^{13}C -NMR de L22Ts en CDCl_3 a 298 K.	238
A.15	Espectro de ^1H -NMR de L22-H en CDCl_3 a 298 K.	239
A.16	Espectro de ^{13}C -NMR de L22-H en CDCl_3 a 298 K.	239
A.17	Espectro de ^1H -NMR de L22-Me3 en CDCl_3 a 298 K.	240
A.18	Espectro de ^{13}C -NMR de L22-Me3 en CDCl_3 a 298 K.	240
B.1	Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L8-H]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	242
B.2	Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L8-Me3]. Datos de CMC medidos con el método	243

	de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	
B.3	Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L16-H] . Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	244
B.4	Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L16-Me3] . Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	245
B.5	Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L22-H] . Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	246
B.6	Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L22-Me3] . Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.	247

Índice de tablas

1.1	Valores de CMC de algunos surfactantes.	28
5.1	Logaritmos de las constantes de protonación de L8-H , L8-Me3 , L16-H , L16-Me3 , L22-H y L22-Me3 determinadas en 0.15 M NaCl a 298.1±0.1 K.	158
5.2	Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu^{2+} - L8-H , Cu^{2+} - L8-Me3 , Cu^{2+} - L16-H y Cu^{2+} - L16-Me3 , y de las constantes de formación del sistema Cu^{2+} - L previamente descritas con Cu(II).	163
5.3	Datos cristalográficos de la estructura cristalina de [CuL8-H] $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	165
5.4	Distancias de enlace y ángulos de la estructura cristalina de [CuL8-H] $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	166
5.5	Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Mn^{2+} - L8-H , Mn^{2+} - L8-Me3 , Mn^{2+} - L16-H y Mn^{2+} - L16-Me3 , y de las constantes de formación del sistema Mn^{2+} - L previamente informadas con Mn(II).	167

5.6	Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Fe^{2+} - L8-H , Fe^{2+} - L8-Me3 , Fe^{2+} - L16-H y Fe^{2+} - L16-Me3	170
6.1	Concentración micelar crítica en mM, medida por el método de fluorescencia de pireno en tampón Tris a pH 7.4 a temperatura ambiente. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar en la última cifra significativa.	178
6.2	Concentración micelar crítica en mM. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar en la última cifra significativa.	178
6.3	Tamaño promedio de las vesículas obtenidas por DLS.	182
6.4	Potencial ζ de los sistemas sintetizados a diferentes condiciones de pH y temperatura ambiente.	183
6.5	Datos obtenidos de la simulación de ligandos con cadena de 8 átomos de carbono.	191
7.1	Actividad SOD de los complejos Cu(II) a pH 7.4 determinada mediante el método de McCord-Fridovich con NBT como detector.	199
7.2	Actividad SOD de los complejos de Mn(II) a pH 7.4, determinada mediante el método de McCord-Fridovich con NBT como detector.	200
7.3	Resultados de la reacción de CuAAC catalizada por surfactante de Cu(II).	206

RESUMEN

Las poliaminas azamacrocíclicas representan plataformas moleculares altamente versátiles debido a su notable flexibilidad estructural, su elevada capacidad de coordinación con diversos iones metálicos, y la posibilidad de modular tanto el entorno electrónico como la geometría del centro metálico. Estas propiedades, junto con su adecuada biocompatibilidad, las convierten en sistemas prometedores para aplicaciones en el ámbito de la química médica y la nanobiotecnología. En el Grupo de Química Supramolecular de la Universitat de València (GQS-UV), se han desarrollado diversas familias de estas estructuras, funcionalizadas con piridinas, carboxilatos, alcoholes y otros grupos funcionales, lo que permiten ajustar finamente su solubilidad, selectividad, estabilidad y comportamiento redox, expandiendo así su campo de acción potencial.

Esta tesis se enmarca dentro de dicha línea de investigación y tiene como objetivo general el diseño, síntesis, caracterización y estudio de ligandos azamacrocíclicos anfífilicos, con aplicaciones orientadas al autoensamblaje supramolecular en solución acuosa, la evaluación de su actividad catalítica y su uso como sistemas para el transporte pasivo transmembrana. Se sintetizó una nueva familia de seis ligandos originales, derivados de estructuras previamente desarrolladas en el GQS-UV, en la que se incorporaron cadenas hidrocarbonadas lineales de 8, 16 y 22 átomos de carbono, con el propósito de potenciar su carácter anfífilico y facilitar su autoorganización en medios acuosos. La caracterización estructural de los compuestos obtenidos se llevó a cabo mediante técnicas de RMN, espectrometría de masas de alta resolución y análisis elemental, obteniendo datos consistentes y concluyentes.

Posteriormente, se estudiaron sus propiedades fisicoquímicas, centrándose especialmente en su capacidad para formar ensamblajes supramoleculares estables, a través de la determinación de la concentración micelar crítica (CMC) y técnicas complementarias como microscopía electrónica de transmisión (TEM), dispersión dinámica de luz (DLS) y microscopía de fuerza atómica (AFM), todo ello complementado de estudios computacionales basados en dinámica molecular. También se determinaron sus constantes de protonación y la distribución de especies en función del pH, utilizando técnicas potenciométricas. Además, se llevaron a cabo ensayos preliminares de toxicidad in vivo y estudios de permeabilidad celular para evaluar su capacidad de atravesar membranas celulares como sistemas de transporte pasivo.

En paralelo, se exploró su capacidad de coordinación con iones metálicos biológicamente relevantes (Cu^{2+} , Mn^{2+} y Fe^{2+}), y se analizó la actividad de los complejos obtenidos como miméticos de enzimas antioxidantes, en particular superóxido dismutasa (SOD). Con el fin de ampliar las aplicaciones de estos sistemas, también se estudió su desempeño como catalizadores en reacciones de interés sintético, especialmente en la reacción de cicloadición azida-alquino [3+2] catalizada por cobre (CuAAC), una transformación clave dentro del ámbito de la denominada química de “*clic*”. Para ello, se estableció una colaboración con el grupo del Prof. Lahoucine Bahsis, centrándose en el uso de surfactantes metálicos de Cu(II) derivados de ligandos azamacrocíclicos, en condiciones de medio acuoso.

Este enfoque no solo se alinea con los principios de la química verde, al utilizar agua como disolvente sostenible, sino que también permite profundizar en el efecto de los entornos micelares y vesiculares sobre la eficiencia catalítica. La formación de vesículas puede aumentar significativamente la concentración local de reactivos hidrofóbicos y

modificar el entorno de reacción, mejorando la velocidad, selectividad y rendimiento de la reacción.

En conjunto, esta tesis propone un enfoque, multidisciplinario y bioinspirado para el desarrollo racional de sistemas macrocíclicos multifuncionales, combinando herramientas de la química supramolecular, la coordinación metálica y el diseño molecular inteligente, con proyección hacia el desarrollo de agentes terapéuticos, nanosistemas funcionales y plataformas versátiles para la liberación controlada de fármacos en aplicaciones biomédicas.

ABSTRACT

Azamacrocyclic polyamines represent highly versatile molecular platforms due to their remarkable structural flexibility, their high capacity for coordination with various metal ions, and the possibility of modulating both their electronic environment and the geometry of the metal center. These properties, together with their suitable biocompatibility, make them promising systems for applications in the field of medicinal chemistry and nanobiotechnology. In the Supramolecular Chemistry Group of the University of Valencia (GQS-UV), several families of these structures have been developed, functionalized with pyridines, carboxylates, alcohols and other functional groups, which allow their solubility, selectivity, stability and redox behavior to be finely adjusted, thus expanding their potential field of action.

This thesis is framed within this line of research and has as its general objective the design, synthesis, characterization and study of amphiphilic azamacrocyclic ligands, with applications aimed at supramolecular self-assembly in aqueous solution, the evaluation of their catalytic activity and their use as systems for passive transmembrane transport. A new family of six original ligands was synthesized, derived from structures previously developed in the GQS-UV, in which linear hydrocarbon chains of 8, 16 and 22 carbon atoms were incorporated, with the purpose of enhancing their amphiphilic character and facilitating their self-organization in aqueous media. The structural characterization of the compounds obtained was carried out using NMR techniques, high-resolution mass spectrometry and elemental analysis, obtaining consistent and conclusive data.

Subsequently, its physicochemical properties were studied, focusing especially on its ability to form stable supramolecular assemblies, through the determination of critical micellar concentration (CMC) and complementary

techniques such as transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM), all complemented by computational studies based on molecular dynamics. Their protonation constants and the distribution of species as a function of pH were also determined, using potentiometric techniques. In addition, preliminary in vivo toxicity tests and cell permeability studies were carried out to evaluate their ability to cross cell membranes as passive transport systems.

In parallel, their ability to coordinate with biologically relevant metal ions (Cu^{2+} , Mn^{2+} and Fe^{2+}) was explored, and the activity of the complexes obtained as mimetics of antioxidant enzymes, in particular superoxide dismutase (SOD), was analyzed. In order to expand the applications of these systems, their performance as catalysts in reactions of synthetic interest was also studied, especially in the azide-alkyne [3+2] cycloaddition reaction catalyzed by copper (CuAAC), a key transformation within the field of the so-called click chemistry. To this end, a collaboration was established with Prof. Lahoucine Bahsis' group, focusing on the use of Cu(II) metal surfactants derived from azamacrocyclic ligands, under aqueous medium conditions.

This approach not only aligns with the principles of green chemistry, by using water as a sustainable solvent, but also allows for a deeper understanding of the effect of micellar and vesicular environments on catalytic efficiency. The formation of vesicles can significantly increase the local concentration of hydrophobic reactants and modify the reaction environment, improving the speed, selectivity and performance of the reaction.

Overall, this thesis proposes a multidisciplinary and bio-inspired approach to the rational development of multifunctional macrocyclic systems, combining tools from supramolecular chemistry, coordination and molecular design, with a projection towards the development of therapeutic agents and versatile platforms for the controlled release of drugs in biomedical applications.

RESUM

Les poliamines azamacrocícliques representen plataformes moleculars altament versàtils a causa de la seua notable flexibilitat estructural, la seua elevada capacitat de coordinació amb diversos ions metàl·lics i la possibilitat de modular tant l'entorn electrònic com la geometria del centre metàl·lic. Aquestes propietats, juntament amb una adequada biocompatibilitat, les converteixen en sistemes prometedors per a aplicacions en l'àmbit de la química mèdica i la nanobiotecnologia. Al Grup de Química Supramolecular de la Universitat de València (GQS-UV), s'han desenvolupat diverses famílies d'aquestes estructures, funcionalitzades amb piridines, carboxilats, alcohols i altres grups funcionals, que permeten ajustar finament la seua solubilitat, selectivitat, estabilitat i comportament redox, ampliant així el seu camp d'acció potencial.

Aquesta tesi s'emmarca dins d'aquesta línia d'investigació i té com a objectiu general el disseny, síntesi, caracterització i estudi de lligands azamacrocíclics amfifílics, amb aplicacions orientades a l'autoensamblatge supramolecular en solució aquosa, l'avaluació de la seua activitat catalítica i el seu ús com a sistemes per al transport passiu transmembrana. Es va sintetitzar una nova família de sis lligands originals, derivats d'estructures prèviament desenvolupades en el GQS-UV, en les quals es van incorporar cadenes hidrocarbonades lineals de 8, 16 i 22 àtoms de carboni, amb la finalitat d'impulsar el seu caràcter amfifílic i facilitar la seua autoorganització en medis aquosos. La caracterització estructural dels compostos obtinguts es va dur a terme mitjançant tècniques de RMN, espectrometria de masses d'alta resolució i anàlisi elemental, obtenint dades consistents i concloents.

Posteriorment, es van estudiar les seues propietats fisicoquímiques, centrant-se especialment en la seua capacitat per a formar ensamblatges

supramoleculars estables, mitjançant la determinació de la concentració micel·lar crítica (CMC) i tècniques complementàries com la microscòpia electrònica de transmissió (TEM), dispersió dinàmica de llum (DLS) i microscòpia de força atòmica (AFM), tot això acompanyat d'estudis computacionals basats en dinàmica molecular. També es van determinar les constants de protonació i la distribució d'espècies en funció del pH, utilitzant tècniques potenciomètriques. A més, es van realitzar assajos preliminars de toxicitat in vivo i estudis de permeabilitat cel·lular per a avaluar la seua capacitat de travessar membranes cel·lulars com a sistemes de transport passiu.

En paral·lel, es va explorar la seua capacitat de coordinació amb ions metàl·lics biològicament rellevants (Cu^{2+} , Mn^{2+} i Fe^{2+}), i es va analitzar l'activitat dels complexos obtinguts com a mimètics d'enzims antioxidants, en particular la superòxid dismutasa (SOD). Amb la finalitat d'ampliar les aplicacions d'aquests sistemes, també es va estudiar el seu comportament com a catalitzadors en reaccions d'interés sintètic, especialment en la reacció de cicloadició azida-alquí [3+2] catalitzada per coure (CuAAC), una transformació clau dins de l'àmbit de l'anomenada química del clic. Per a això, es va establir una col·laboració amb el grup del professor Lahoucine Bahsis, centrant-se en l'ús de surfactants metàl·lics de Cu(II) derivats de lligands azamacrocíclics, en condicions de medi aquós.

Aquest enfocament no sols s'alinea amb els principis de la química verda, en utilitzar aigua com a dissolvent sostenible, sinó que també permet aprofundir en l'efecte dels entorns micel·lars i vesiculars sobre l'eficiència catalítica. La formació espontània de vesícules pot augmentar significativament la concentració local de reactius hidrofòbics i modificar l'entorn de reacció, millorant així la velocitat, la selectivitat i el rendiment global dels processos catalítics estudiats.

En conjunt, aquesta tesi proposa un enfocament integral, multidisciplinari i bioinspirat per al desenvolupament racional de sistemes macrocíclics multifuncionals, combinant eines de la química supramolecular, la coordinació metàl·lica i el disseny molecular intel·ligent, amb projecció cap al desenvolupament d'agents terapèutics, nanosistemes funcionals i plataformes versàtils per a l'alliberament controlat de fàrmacs en aplicacions biomèdiques avançades.

Glosario

Simb.

δ	<i>Desplazamiento químico</i>
λ	<i>Longitud de onda</i>
μ	<i>Coefficiente cristalográfico de absorción</i>
μg	<i>Microgramo</i>
g	<i>Gramo</i>
μM	<i>Micromolar</i>
μL	<i>Microlitro</i>
ρ	<i>Densidad</i>

A

$\text{\AA}$	<i>Ångström, equivalente a 10-10 m</i>
A_{560}	<i>Intensidad de absorbancia medida a 560 nm</i>
$A\beta$	<i>Proteína beta-amiloide</i>
Abs	<i>Intensidad de absorbancia</i>
ADN	<i>Ácido desoxiribonucleico</i>
ATP	<i>Adenina trifosfato</i>
AFM	<i>Microscopía de fuerza atómica</i>

B

BHE *Barrera hematoencefálica*

C

CCDC *Centro de datos cristalográficos de Cambridge*

CDCl_3 *Cloroformo deuterado*

CHCl_3 *Cloroformo*

CH_2Cl_2 *Diclorometano*

CH_3CN *Acetonitrilo*

CSD *Base de datos estructural de Cambridge*

CuZn-SOD *Superóxido dismutasa de cobre y zinc*

CuAAC *Cicloadición de azida-alquino [3+2] catalizada por cobre*

CNS^+ *Alta penetración cerebral*

CMC *Concentración micelar crítica*

COM *Centro de masa de la micela*

D

D_2O *Óxido de deuterio o agua deuterada*

DLS *Dispersión dinámica de la luz*

DLVO *Teoría de dispersiones coloidales de Deryaguin-Landau-Verwey-Overbeek*

DCI *Ácido clorhídrico deuterado*

E

et al. *Y otros; del latín et alii*

EtOH *Etanol*

equiv.	<i>Equivalente(s)</i>
ESI	<i>Ionización por electrospray</i>
EA	<i>Enfermedad de Alzheimer</i>
EP	<i>Enfermedad de Parkinson</i>
ELA	<i>Esclerosis lateral amiotrófica</i>

F

F	<i>Factor de estructura, parámetro cristalográfico</i>
F000	<i>Factor de escala</i>
Fe-SOD	<i>Superóxido dismutasa de hierro</i>
FAD	<i>Flavina Adenosina Dinucleótido</i>

G

GQS-UV	<i>Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia</i>
--------	--

H

HEPES	<i>Tampón ácido 2-(4-(2-hidroxietil)-piperazin-1-il) etanosulfónico</i>
HET-CAM	<i>Hen,s Egg Test on Clorioallantoic Membrane</i>

I

IC	<i>Porcentaje o concentración de inhibición</i>
IC ₅₀	<i>Concentración necesaria de mimético SOD para reducir la concentración de iones radicales superóxido en disolución a la mitad</i>

I_{min}	<i>Momento de inercia mínimo</i>
I_{avg}	<i>Promedio de los momentos de inercia</i>
IS	<i>Índice de irritación</i>
ISO	<i>Organización Internacional de Normalización</i>

J

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

K

k_{cat}	<i>Constante catalítica</i>
K	<i>Unidad de temperatura, Kelvin</i>

M

m	<i>Multiplete</i>
M	<i>Molar</i>
Me	<i>Grupo metilo</i>
MeOH	<i>Metanol</i>
MF ⁺	<i>Monoformazano</i>
mg	<i>Miligramo</i>
mL	<i>Mililitro</i>
Milli-Q	<i>Marca comercial de la Millipore Corporation usada comúnmente para describir agua "ultrapura" de Tipo 1 (de acuerdo con el ISO 3696)</i>
mmol	<i>Milimol</i>
mM	<i>Milimolar</i>
mV	<i>Milivoltio</i>
Mn-SOD	<i>Superóxido dismutasa de manganeso</i>

Mo-co	<i>Cofactor de molibdeno</i>
MS	<i>Espectrometría de masas</i>

N

NADPH	<i>Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato</i>
NBT	<i>Nitroazul de tetrazolio</i>
NHE	<i>Electrodo normal de hidrogeno</i>
NaOH	<i>Hidróxido de sodio</i>
NaCl	<i>Cloruro de sodio</i>
NaOD	<i>Hidróxido de sodio deuterado</i>
NMR	<i>Resonancia magnética nuclear, también RMN</i>
nm	<i>Nanómetro</i>

O

$^1\text{O}_2$	<i>Oxígeno singlete</i>
$^3\text{O}_2$	<i>Oxígeno triplete</i>
OMS	<i>Organización Mundial de la Salud</i>

P

PPA	<i>Proteína precursora amiloidea</i>
PAMPA	<i>Permeabilidad de membrana artificial en paralela</i>
Pe	<i>Permeabilidad</i>
PDI	<i>Índice de polidispersión</i>

Q

q	<i>Cuadruplete</i>
---	--------------------

R

R_s	<i>Radio micelar</i>
R_g	<i>Radio de giro de una micela</i>
R	<i>Factor R, parámetro cristalográfico</i>
RMN	<i>Resonancia magnética nuclear, también NMR</i>
RNS	<i>Especies reactivas de nitrógeno</i>
ROI	<i>Intermedios reactivos de oxígeno</i>
ROS	<i>Especies reactivas de oxígeno</i>

S

s	<i>Singlete</i>
SOD	<i>Superóxido dismutasa</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato de sodio</i>
SCSIE	<i>Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental</i>
SXRD	<i>Difracción de rayos X de monocristal</i>
SNC	<i>Sistema nervioso central</i>

T

t	<i>Triplete</i>
THF	<i>Tetrahidrofurano</i>
tren	<i>Tris(2-aminoetil)amina</i>
Tren-Ts	<i>tris[2-(N-p-toluensulfonilaminoetil)]amina</i>
TPA	<i>Ácido fosfotúngstico</i>
TEM	<i>Microscopía electrónica de transmisión</i>
TLC	<i>Cromatografía en capa fina</i>
TRIS	<i>Tampón tris(hidroximetil)aminoetano</i>
TFD	<i>Terapia fotodinámica</i>

U

UV-Vis *Ultravioleta-visible*

V

v/v *Volumen por volumen*

vs. *Contra, del latín versus*

V *Voltios*

W

w *Pesos de ajuste del cristal*

X

XOR *Enzima xantina oxidoreductasa*

Z

Z *Número de moléculas por unidad asimétrica, parámetro
cristalográfico*

Capítulo 1

Introducción

*“Dejamos de temer
aquello que se ha
aprendido a entender.”*

— Marie Curie —

1.1 La Química Supramolecular

La Química Supramolecular, definida por Jean Marie Lehn como la "*Química más allá de la molécula*",¹ tiene como objetivo el estudio y diseño de ensamblajes moleculares complejos mediante interacciones no covalentes.^{2,3}

Este campo abarca la organización de entidades de gran complejidad, que resultan de la asociación de dos o más especies químicas por interacciones intermoleculares débiles, como enlaces de hidrógeno, interacciones π , fuerzas de Van der Waals, de dispersión, interacciones electrostáticas, entre otras. En estos sistemas, intervienen principios fundamentales como el reconocimiento molecular, la catálisis supramolecular, el transporte y el autoensamblaje, todos ellos esenciales para comprender la arquitectura y el comportamiento funcional de estos ensamblajes.

La Química Supramolecular es un área consolidada pero aún en expansión, como reflejan los premios Nobel de 1987 (Lehn, Cram y Pedersen) y 2016 (Stoddart, Sauvage y Feringa).

1.1.1 Fuerzas intermoleculares

Las fuerzas intermoleculares constituyen la base de la Química Supramolecular, ya que permiten la asociación reversible de especies moleculares mediante interacciones electrostáticas (ion-ion, ion-dipolo y dipolo-dipolo), los enlaces de hidrógeno, las interacciones π - π y catión- π , las fuerzas de Van der Waals y el efecto hidrofóbico.⁴ Estas interacciones, que difieren ampliamente en energía y direccionalidad, actúan de forma cooperativa para estabilizar ensamblajes supramoleculares. En los sistemas biológicos, desempeñan un papel esencial en fenómenos como el plegamiento de proteínas, el reconocimiento molecular y la formación de membranas. Su

comprensión es fundamental para el diseño racional de receptores, catalizadores y transportadores sintéticos que imitan funciones biológicas.^{5,6}

Interacciones electrostáticas

Se fundamentan en la atracción o repulsión culombiana entre cargas. En estas interacciones, las fuerzas ion-ion son no direccionales. Por otro lado, las interacciones ion-dipolo y dipolo-dipolo son direccionales, lo que significa que el dipolo eléctrico de una molécula debe orientarse en una dirección específica para maximizar la intensidad de la interacción con otra molécula (Figura 1.1).

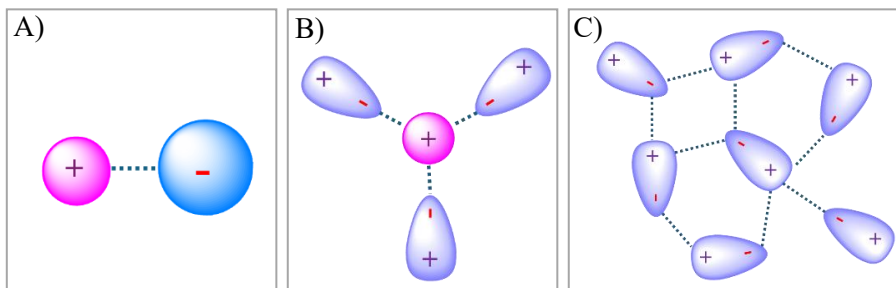


Figura 1.1: Representación esquemática de las interacciones; A) Ion-Ion, B) Ion-Dipolo y C) Dipolo-Dipolo.

La gran fortaleza de la interacción electrostática ha hecho que sea una herramienta esencial en química supramolecular y ha sido usada con abundancia en numerosos sistemas. Estas interacciones son la base de actuación de muchos receptores para cationes, como los éteres corona, criptandos o esferandos, y aniones como macrociclos poliamínicos protonados o peralquilados.⁷

Enlace de hidrógeno

Los enlaces de hidrógeno se encuentran entre las interacciones intermoleculares más fuertes y direccionales.^{5,6} Juegan un papel crucial en la naturaleza, tales como, en la alineación de los componentes moleculares de

los sistemas biológicos. Esta interacción no covalente puede considerarse como un caso particular de interacción dipolo-dipolo, donde un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo es atraído por un dipolo vecino. Son interacciones de un solo punto con una geometría bien definida, y sus magnitudes están determinadas por las fuerzas electrostáticas entre un átomo de hidrógeno dador y un átomo aceptor.⁸

Interacciones - π

Entre las principales interacciones π presentes en sistemas supramoleculares se encuentran las interacciones catión- π y las interacciones π - π . Las primeras, comunes en química organometálica (como en el ferroceno), aunque no se consideran interacciones no covalentes.⁹ En cambio, las interacciones π - π , ya sean *cara a cara* (Figura 1.2 (A)) o *borde a cara* (Figura 1.2 (B)), surgen de la atracción entre nubes electrónicas de sistemas aromáticos. Estas interacciones son relevantes tanto en sistemas sintéticos como en estructuras biológicas, como el ADN, donde contribuyen a la estabilidad de la doble hélice mediante el apilamiento de bases.

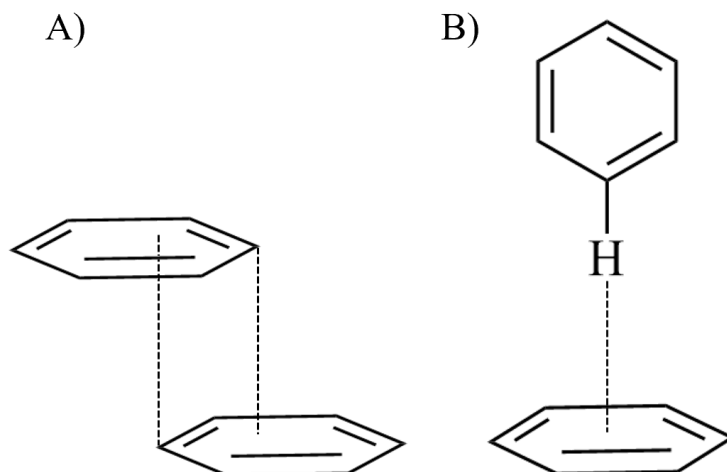


Figura 1.2: Esquema de dos tipos de interacciones π - π : A) Cara con cara, B) De borde a cara.⁹

Fuerzas de Van der Waals

Las fuerzas de Van der Waals, originadas por interacciones *dipolo inducido-dipolo inducido*, son atractivas pero débiles, no direccionales y decrecen rápidamente con la distancia. Aunque tienen un rol limitado en el diseño supramolecular, son relevantes en la formación de compuestos de inclusión, donde pequeñas moléculas se alojan en redes cristalinas o cavidades moleculares.^{9,10}

Efecto hidrofóbico

El efecto hidrofóbico se origina por la exclusión o agrupamiento de moléculas no polares en medios acuosos para minimizar su contacto con el agua, y está impulsado por factores termodinámicos como la entalpía y la entropía.⁹ Desde el punto de vista entálpico, el desplazamiento de agua desde cavidades hidrófobas reduce la energía del sistema, al permitir interacciones más estables con el solvente. En términos entrópicos, la liberación de moléculas de agua, previamente ordenadas dentro de las cavidades, aumenta el desorden del sistema, lo que hace que el proceso sea termodinámicamente más favorable y contribuya a su estabilidad.¹¹ Este efecto es esencial en sistemas biológicos, ya que favorece el plegamiento de proteínas, la estabilidad estructural de ácidos nucleicos y el autoensamblaje supramolecular, como en la formación de bicapas lipídicas, fundamentales para la organización celular.¹¹

Además de su importancia biológica, el efecto hidrofóbico se emplea en química supramolecular para inducir el autoensamblaje de moléculas sintéticas. Compuestos anfífilos diseñados artificialmente pueden formar micelas, vesículas o cápsulas supramoleculares, dependiendo del entorno y la arquitectura molecular.

1.1.2 Reconocimiento molecular

El *reconocimiento molecular* es el proceso mediante el cual una molécula receptora une y selecciona de manera específica un sustrato para cumplir una función determinada.¹² Esta selectividad depende del ajuste estérico y la adecuada correspondencia espacial entre el receptor y el sustrato, lo que maximiza las interacciones atractivas y minimiza las repulsivas. Este fenómeno es fundamental en biología, como se observa en la complementariedad de bases en ácidos nucleicos, la interacción entre neurotransmisores y sus receptores, y los procesos de transcripción y traducción genética. Según el modelo “*llave-cerradura*” de Fischer (Figura 1.3),¹³ la compatibilidad geométrica y electrónica en los sitios de unión es clave para una unión eficaz, y una mayor complementariedad incrementa la energía de unión, involucrando tanto enlaces no covalentes individuales como la superficie electrostática global.¹⁴⁻¹⁸

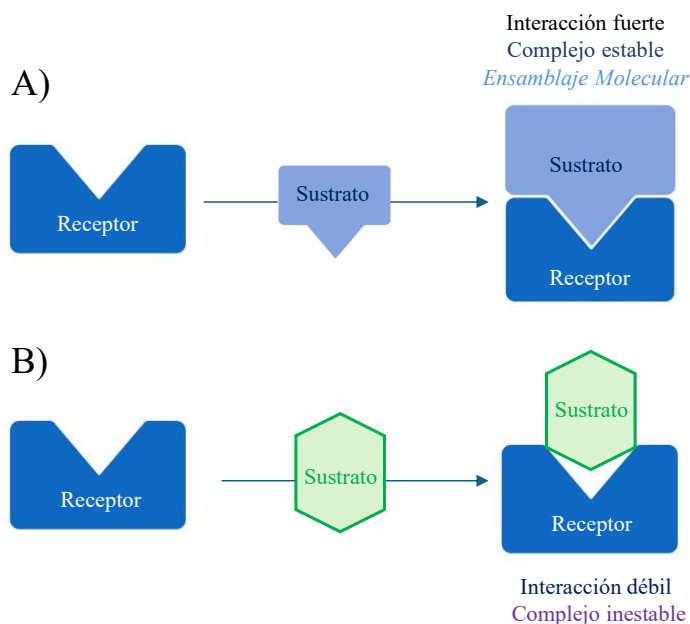


Figura 1.3: Modelos que representan el reconocimiento molecular de un compuesto.¹³

1.1.3 Catálisis supramolecular

La catálisis supramolecular aplica principios de química supramolecular, como interacciones no covalentes y reconocimiento molecular, para diseñar catalizadores que aceleran reacciones sin consumirse ni incorporarse permanentemente en el proceso (Figura 1.4).¹⁹ Estos sistemas aprovechan el autoensamblaje para lograr mayor selectividad y eficiencia en reacciones específicas. La catálisis supramolecular implica dos pasos clave: la unión selectiva del catalizador al sustrato para formar un ensamblaje supramolecular, y la posterior transformación de este complejo en productos, requiriendo complementariedad estructural entre catalizador y sustrato.¹⁷

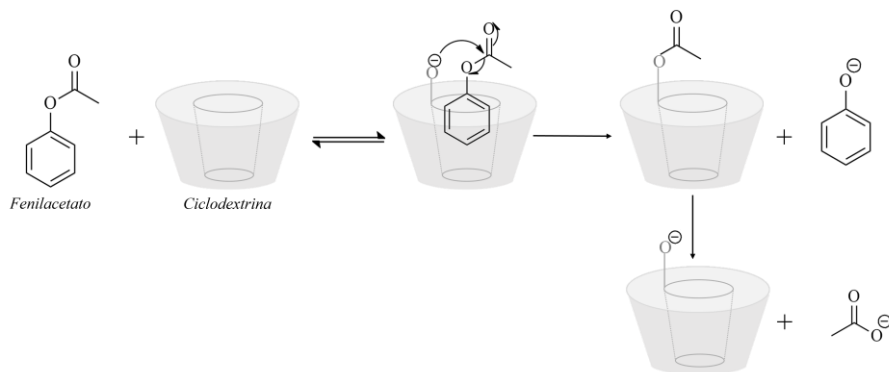


Figura 1.4: Esquema de catálisis supramolecular: la hidrólisis de fenilacetato catalizada por ciclodextrinas.¹⁹

1.1.4 Transporte

El transporte de materia y/o información es un fenómeno básico en una amplia variedad de procesos biológicos, desde la absorción de nutrientes en las células hasta la transmisión de señales en el sistema nervioso. En la Química, el estudio y diseño de sistemas de transporte se enfocan en comprender y desarrollar transportadores químicos capaces de facilitar el paso de sustratos específicos a través de barreras que normalmente serían impermeables a ellos.

Los transportadores pueden ser moléculas orgánicas, inorgánicas o biomoléculas diseñadas para interactuar selectivamente con ciertos sustratos y facilitar su transporte a través de membranas celulares u otras barreras biológicas. Estos transportadores a menudo funcionan mediante mecanismos de reconocimiento molecular, donde reconocen y se unen a los sustratos de manera selectiva, y luego los transportan a través de la barrera hacia el lado opuesto.²⁰

Las dos estrategias básicas para facilitar el transporte a través de una membrana son el transporte a través de un transportador molecular o a través de canales transmembrana (Figura 1.5). Ambos enfoques se basan en el mismo principio: el sustrato no puede atravesar la membrana por sí solo, pero puede hacerlo el aducto o complejo supramolecular que forma con el transportador.²¹

El proceso general implica cuatro etapas:

- Formación del complejo transportador-sustrato.
- Difusión del complejo a través de la membrana.
- Disociación del complejo.
- Redifusión del transportador al otro lado de la membrana.

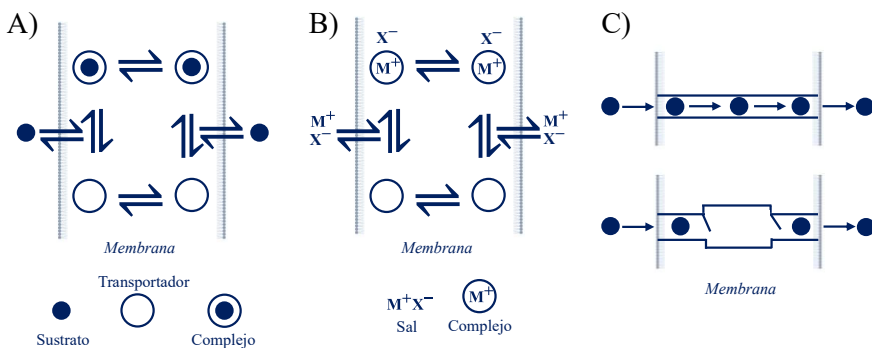


Figura 1.5: Procesos de transporte mediante transportador a través de especies neutras (A), pares iónicos (B) o canales (C).¹⁷

La complementariedad de interacciones entre el transportador/canal y la membrana, así como entre el transportador/canal y el sustrato, es fundamental para superar la barrera energética y facilitar el transporte.

1.1.5 Autoensamblaje

Autoensamblaje, en su sentido más general, significa la asociación o estructuración espontánea y reversible de especies moleculares para formar entidades supramoleculares más grandes y complejas de acuerdo con la información intrínseca contenida en los componentes.^{4,19,22}

Moléculas relativamente simples con funcionalidades complementarias pueden, bajo ciertas condiciones, interactuar entre sí para formar especies supramoleculares significativamente más complejas, unidas sólo en virtud de interacciones no covalentes (enlaces de hidrógeno, interacciones π - π e interacciones de Van der Waals). En la naturaleza se encuentran repetidamente ejemplos de tales procesos de autoensamblaje. La doble hélice del ADN requiere que dos hebras complementarias se entrelacen mediante enlaces de hidrógeno y se apilen en un proceso de autoensamblaje. Las hebras se reconocen entre sí y se unen para formar el producto termodinámicamente más estable. El plegamiento de proteínas y el ensamblaje viral funcionan de manera muy similar.⁹ Al igual que muchos de los ensamblados nanoscópicos en el mundo natural, es posible diseñar superestructuras artificiales.⁴ En este caso, el propio sistema químico se reorganiza hasta obtener el producto termodinámicamente más estable.

Entre las interacciones más utilizadas en los procesos de autoensamblaje sintético se encuentran las interacciones metal-ligando, principalmente debido a su labilidad y alto grado de direccionalidad. Los metales con preferencias de coordinación bien definidas pueden acoplarse con estructuras rígidas de ligandos para proporcionar rutas hacia autoensamblajes predecibles.^{9,23} El

autoensamblaje sintético permite también la obtención de estructuras complejas como las micelas, las membranas, las vesículas o los cristales líquidos (Figura 1.6).

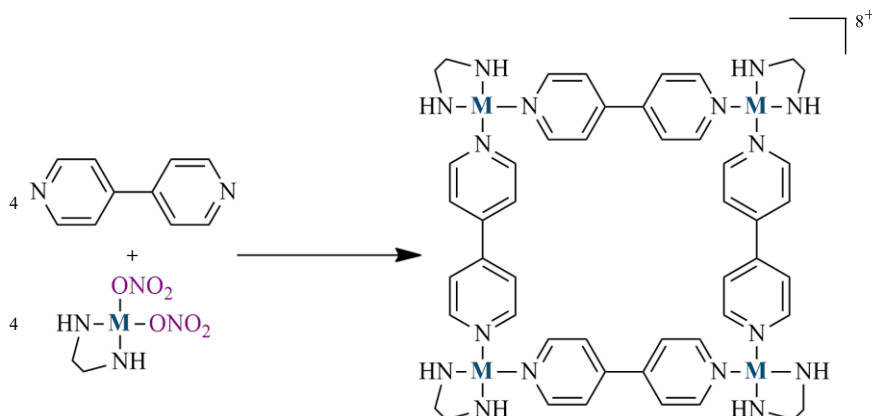


Figura 1.6: Primer cuadrado supramolecular sintetizado por Fujita en los años 90.²³

1.2 Nanotecnología y Nanomedicina

En la actualidad, se han realizado numerosos avances en el campo de la nanotecnología, un término multidisciplinario que abarca el estudio, diseño, síntesis y aplicación de materiales y sistemas funcionales a nivel de nanoescala ($< 100 \text{ nm}$).^{24,25} Más allá de la manipulación de la materia a escalas reducidas, lo fascinante de la nanotecnología radica en el estudio de las propiedades físicas y químicas únicas de las nanoestructuras, como la conductividad eléctrica, reactividad química, biocompatibilidad, entre otros.²⁶⁻²⁹

La convergencia de la nanotecnología con disciplinas como las ciencias de los materiales, la biología celular y molecular, las ciencias farmacéuticas y la medicina ha llevado a una revolución tecnológica con potenciales aplicaciones en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades,³⁰ surgiendo así el concepto de nanomedicina.³¹ La European Science Foundation define la nanomedicina

como "la aplicación de la nanotecnología al diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades, así como al entendimiento de los procesos patofisiológicos".³² La nanomedicina abarca tres áreas principales: la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos, diagnóstico, y terapia y diagnóstico (teranósticos).

En la liberación de fármacos e ingeniería de tejidos, se utilizan nanosistemas para administrar medicamentos de manera precisa y promover la regeneración de tejidos. En el diagnóstico, los biosensores y nanobiosensores detectan biomoléculas específicas con alta sensibilidad y las técnicas de imagenología molecular mejoran la visualización de los tejidos. En la terapia y diagnóstico, los sistemas teranósticos combinan tratamiento y monitoreo simultáneo.

El avance de la nanomedicina ha transformado significativamente el campo de la medicina moderna, contribuyendo al desarrollo de una amplia variedad de nanosistemas diseñados para aplicaciones terapéuticas innovadoras en el tratamiento de enfermedades complejas, como el cáncer y las patologías neurodegenerativas (Figura 1.7). Estos avances están revolucionando el enfoque médico, permitiendo tratamientos más precisos y efectivos.

En esta revisión se describen los principales nanomedicamentos que ya han sido comercializados o que se encuentran en fases avanzadas de estudio clínico,³³ con el objetivo de tratar diversas enfermedades de manera más eficiente. Entre estos se destacan: nanoliposomas, micelas, dendrímeros, nanopartículas y conjugados poliméricos, cada uno con propiedades únicas que optimizan la administración de fármacos.

- **Nanoliposomas**, como por ejemplo el Doxil, que encapsulan fármacos dentro de una membrana lipídica, lo que permite una liberación

controlada y dirigida, reduciendo los efectos secundarios no deseados al atacar específicamente las células malignas.³⁴

- **Micelas**, como Genexol-PM, incrementan la solubilidad y biodisponibilidad de medicamentos hidrofóbicos, facilitando su circulación en el organismo y mejorando su eficacia terapéutica.^{31,32}
- **Dendrimeros**, como VivaGel, son capaces de transportar múltiples moléculas terapéuticas y agentes de diagnóstico de manera simultánea, ofreciendo una plataforma versátil para la liberación dirigida de fármacos y la mejora en tratamientos combinados.^{34,35}
- **Nanopartículas**, como Abraxane,³³ proporcionan una liberación precisa y controlada de fármacos, particularmente en oncología, donde son capaces de acumularse selectivamente en los tejidos tumorales gracias a la permeabilidad y retención mejorada de los tumores.
- **Conjugados poliméricos** mejoran tanto la estabilidad como el control sobre la liberación de fármacos, permitiendo una dosificación prolongada y más efectiva, especialmente en terapias dirigidas para el cáncer y otras enfermedades crónicas.³⁵⁻³⁸

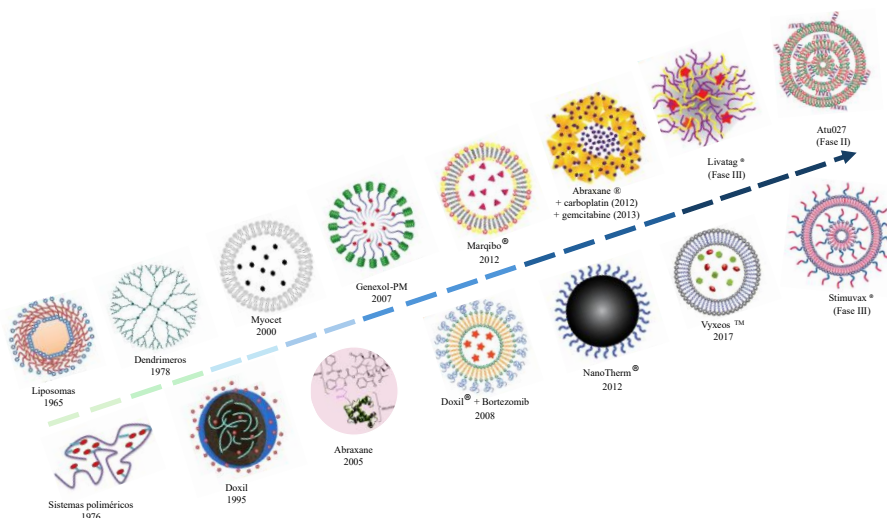


Figura 1.7: Evolución en el desarrollo de los nanomedicamentos.³³

El notable incremento en la cantidad de publicaciones, investigaciones y ensayos clínicos que emplean nanosistemas como micelas, liposomas y nanopartículas, y su creciente presencia en el ámbito clínico, refleja las enormes ventajas que la nanotecnología aporta a la medicina contemporánea. Esto marca un cambio de paradigma en el tratamiento de enfermedades graves, abriendo la puerta a terapias más efectivas, con menos efectos adversos y un mayor control sobre la administración de fármacos.

En la siguiente sección se profundizará en los distintos sistemas de transporte de fármacos, explorando sus características y mecanismos de acción.

1.2.1 Sistemas de transporte de fármacos

A lo largo de la historia, los sistemas de transporte de fármacos han evolucionado desde métodos primitivos como la masticación de hierbas y la inhalación de gases medicinales, hasta técnicas más avanzadas. Los primeros sistemas reconocidos de transporte fueron desarrollados por los químicos persas Rhazes (865–925)³⁹ y Avicenna (980–1037),⁴⁰ quienes usaron una cubierta de mucílago con extractos de psyllium, plata y oro para mejorar su liberación. En los siglos XIX y XX, se introdujo el método de encapsulación conocido como “Pearl coating”, que utilizaba una cubierta de talco y mucílago.⁴¹ Hoy en día, los sistemas de transporte de fármacos se clasifican en generaciones, reflejando su evolución y sofisticación, incluyendo el uso de micelas y liposomas como estructuras de la generación actual.^{32,42,43}

Uno de los mayores retos en el desarrollo de fármacos, tanto para el tratamiento como diagnóstico, es asegurar que alcancen específicamente el sitio de acción. Esta dificultad es especialmente compleja en patologías como el cáncer, donde los fármacos suelen presentar baja sensibilidad y especificidad, además de alta toxicidad y frecuentes reacciones adversas graves.⁴⁴ En estos casos, la ventana terapéutica es muy estrecha, ya que la

concentración mínima eficaz y la concentración mínima toxica están muy próximas. Por ello, un sistema de transporte adecuado es fundamental para reducir la toxicidad, al controlar la distribución temporal y espacial del fármaco dentro del organismo.⁴⁵

Estos desafíos subrayan la importancia de desarrollar estrategias efectivas para la entrega de medicamentos, que aseguren que los compuestos terapéuticos puedan sobrevivir al ambiente hostil del sistema digestivo, no sean tóxicos y puedan ser absorbidos eficientemente en el cuerpo para alcanzar sus sitios de acción específicos.

Mecanismos de transporte de fármacos

El transporte de fármacos a través de las membranas celulares puede ser activo o pasivo (Figura 1.8).^{46,47} En el transporte pasivo, las moléculas se mueven a favor de su gradiente de concentración sin gasto de energía, mediante difusión simple (atravesando directamente la bicapa lipídica) o difusión facilitada que requiere canales iónicos o proteínas transportadoras específicas para moléculas más grandes o cargadas.^{48,49} En contraste, el transporte activo implica el uso de energía (generalmente Adenosín Trifosfato (ATP)) para mover sustancias en contra de su gradiente, y se divide en transporte activo primario, donde la energía proviene directamente del ATP y transporte activo secundario, que usa el gradiente de otra molécula para impulsar el movimiento.^{48,49} Estos mecanismos permiten la absorción, distribución y eliminación eficiente de fármacos, adaptándose a sus propiedades químicas y al entorno biológico.

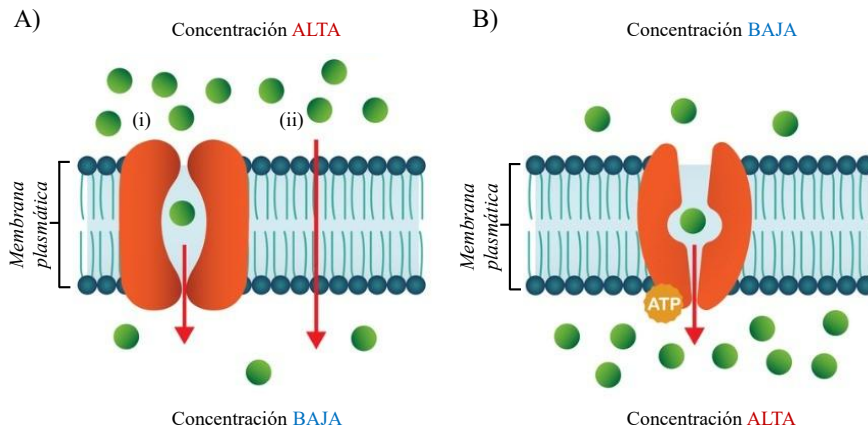


Figura 1.8: Representación esquemática de los mecanismos de transporte a través de membranas. (A) *Difusión pasiva*: incluye (i) difusión facilitada mediante proteínas transportadoras y (ii) difusión simple a través de la bicapa lipídica. (B) *Difusión activa*: transporte mediado por proteínas que requieren energía para mover moléculas contra su gradiente de concentración.

Factores que afectan el transporte de fármacos

El transporte de fármacos está influenciado por varios factores clave que determinan su eficacia y biodisponibilidad. La solubilidad del fármaco ya sea lipofílica o hidrofílica, afecta su capacidad para atravesar membranas celulares: un equilibrio adecuado entre ambas es esencial.⁵⁰ El tamaño molecular influye en la facilidad con la que un fármaco puede cruzar las barreras celulares, siendo los compuestos pequeños más permeables.⁴⁸

La ionización, dependiente del pH y el pKa del fármaco, determina si una molécula puede atravesar la membrana, ya que las formas no ionizadas penetran más fácilmente.

Además, el gradiente de concentración impulsa el transporte pasivo, mientras que la presencia de proteínas transportadores facilita o regula el paso de fármacos, tanto de forma pasiva como activa, siendo cruciales para moléculas grandes o que requieran transporte contra gradientes de concentración.^{51,52}

1.2.2 Transporte de fármacos en infecciones y neurodegeneración.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer (EA) y el Parkinson (EP), afectan aproximadamente a mil millones de personas en todo el mundo.⁵³ Entre los trastornos neurológicos también se incluyen los traumatismos craneoencefálicos y las infecciones neurológicas. El aumento de la expectativa de vida global ha contribuido significativamente a la creciente prevalencia de afecciones como el accidente cerebrovascular, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, impactando de manera considerable en la sociedad y la economía.

Actualmente, la mayoría de los tratamientos disponibles se limitan a aliviar los síntomas y no solucionan la raíz del problema, lo que dificulta la recuperación funcional del paciente y limita las posibilidades de mejorar su calidad de vida.⁵⁴ Por ello, existe un creciente interés en el desarrollo de terapias más eficaces, capaces de intervenir en etapas tempranas y modificar el curso de la enfermedad. En los últimos años, la investigación se ha centrado en el desarrollo de nuevos fármacos basados en biomoléculas y formulaciones innovadoras, como nanopartículas, con el objetivo de mejorar la eficacia terapéutica y la selectividad hacia el sistema nervioso central.⁵⁵⁻⁵⁸

No obstante, uno de los principales desafíos para el tratamiento eficaz de las enfermedades neurológicas sigue siendo la necesidad de que estos fármacos alcancen su diana terapéutica en el cerebro. Para lograrlo, deben atravesar en cantidades adecuadas la barrera hematoencefálica (BHE). Un medicamento puede ser eficaz en estudios *in vitro*, pero si no logra atravesar la BHE *in vivo*, no tendrá efecto terapéutico.⁵⁴

La BHE es una barrera física, metabólica y de transporte que controla estrictamente la transferencia de sustancias de la sangre a los tejidos nerviosos y viceversa, contribuyendo a la homeostasis cerebral y protegiendo al cerebro de sustancias nocivas que pueden llegar a él.⁵⁵ Las células endoteliales, que constituyen la estructura principal de esta barrera, forman uniones estrechas y compactas que dificultan el paso de muchas sustancias (Figura 1.9). Además, la permeabilidad del endotelio cerebral está influenciada por células de la unidad neurovascular, y suele verse afectada por la mayoría de las patologías del sistema nervioso central (SNC). Sin embargo, la disfunción de la BHE es generalmente significativa solo en las etapas avanzadas de estas enfermedades.^{53,54}

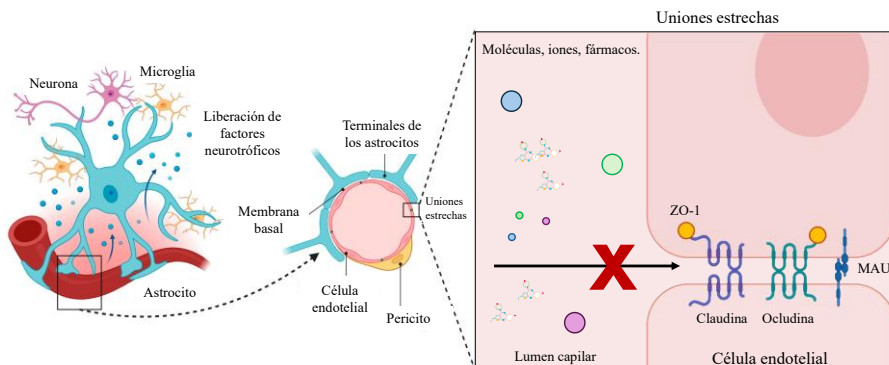


Figura 1.9: Estructura y función de la BHE. La BHE está compuesta estructuralmente por células endoteliales, la membrana basal vascular, pericitos y los pies terminales de los astrocitos. Las células endoteliales presentan uniones estrechas sin fenestración ni actividad pinocítica, lo que impide el transporte paracelular de la mayoría de las moléculas, iones y fármacos. Estas uniones están compuestas por proteínas como claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión de unión (MAU), además de proteínas citoplasmáticas accesorias como Zonula occludens-1 (ZO-1), entre otras.^{55,59}

Frente a esta barrera, diversas estrategias han sido propuestas para facilitar la llegada de fármacos al cerebro. Una de las más directas es la inyección intracerebral que, aunque permite la administración local, es altamente invasiva y conlleva riesgos importantes, como daño tisular, infecciones o

hemorragias, además de que su acción queda limitada a la región adyacente al sitio de inyección.⁶⁰ Alternativamente, se ha investigado la administración oral o intravenosa, en la que el fármaco viaja por el torrente sanguíneo hasta la BHE. A pesar de los desafíos que impone su selectividad, esta vía sigue siendo una de las más atractivas por su carácter menos invasivo y su viabilidad para tratamientos sistémicos.⁵⁵

Otra ruta en estudio es la administración nasal, que busca aprovechar las conexiones entre la cavidad nasal y el sistema nervioso central, particularmente a través del nervio olfativo y el nervio trigémino. Esta estrategia podría permitir el acceso directo al cerebro sin necesidad de atravesar la BHE de forma tradicional. Sin embargo, aún enfrenta limitaciones como su baja eficiencia de absorción, posibles riesgos de toxicidad y la necesidad de optimizar formulaciones para mejorar su eficacia.^{54,61}

También se ha explorado el uso de agentes químicos o estímulos físicos para alterar temporalmente las uniones estrechas del endotelio cerebral y así facilitar el paso de fármacos. No obstante, esta aproximación implica riesgos importantes, como toxicidad neuronal y alteraciones en la función de la BHE.^{54,61}

Ante estas limitaciones, en la última década se han intensificado los esfuerzos en el desarrollo de sistemas de transporte innovadores capaces de atravesar la BHE. Las nanopartículas, péptidos, micelas y liposomas han cobrado especial relevancia debido a su bajo costo, facilidad de producción, baja inmunogenicidad y, sobre todo, su capacidad de ser modificados químicamente para mejorar su especificidad y funcionalidad.^{54,55}

Estas estrategias representan un enfoque prometedor para mejorar la entrega de fármacos al sistema nervioso central, abriendo nuevas posibilidades terapéuticas frente a patologías neurológicas complejas y estableciendo una

base sólida para futuras líneas de investigación en el tratamiento de enfermedades cerebrales.

1.3 Estructuras y ensamblajes supramoleculares

1.3.1 Sistemas microheterogéneos

El término "microheterogéneo" hace referencia a sistemas que presentan dominios estructuralmente distintos a escala nanométrica o microscópica, como ocurre en disoluciones que contienen agregados autoensamblados de tensioactivos.⁶² Los sistemas microheterogéneos se pueden clasificar en dos grandes grupos: ensamblajes moleculares compuestos por tensioactivos o lípidos (micelas, liposomas, etc.), y sistemas poliméricos orgánicos o inorgánicos. Los ensamblajes moleculares organizados, como micelas, vesículas, microemulsiones y otros, han sido objeto de un amplio estudio en la última década.

La palabra "micela" fue introducida por primera vez por J.W. McBain en 1913 en el campo de la química de superficies y coloides. McBain utilizó este término para describir la agrupación de moléculas de tensioactivos en solución acuosa.⁶³ Los tensioactivos y lípidos, se encuentran entre los productos químicos disponibles más versátiles. Tienen aplicaciones en muchas áreas, incluida la Química, la Biología y Farmacia.⁶⁴⁻⁶⁸

Los agentes tensoactivos o surfactantes (del inglés Surface Active Agent) son compuestos orgánicos con capacidad de influir a través de su naturaleza química sobre la tensión superficial de una fase líquida en contacto con otra fase, sólida, líquida o gaseosa. Desde el punto de vista estructural, un tensoactivo es una molécula de origen anfipático, es decir, una molécula formada por dos partes de naturaleza opuesta, una parte polar o hidrofílica,

conocida como “cabeza” y otra apolar o hidrofóbica, a menudo conocida como “cola” (Figura 1.10). La parte hidrófoba del agregado forma el núcleo de la micela, mientras que los grupos de cabezas polares están ubicados en la interfaz micela-agua en contacto e hidratados por una serie de moléculas de agua.^{62,69}

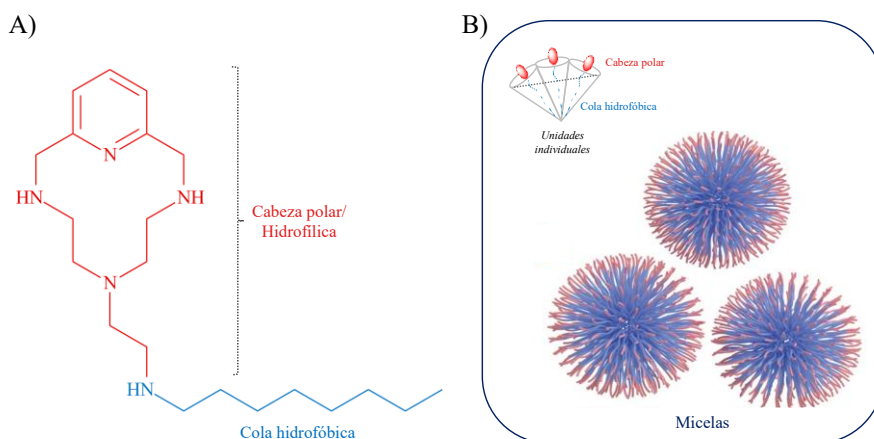


Figura 1.10: Molécula anfipática (A) y esquema de micela (B). Estructura química de la molécula anfipática, atendiendo a su dualidad polar-apolar: (I) El grupo polar suele contener heteroátomos como O, S, P o N en funciones químicas tales como alcoholes, ácidos, sulfonatos, fosfatos o aminas. Presenta afinidad por los solventes polares (agua) y se denomina grupo hidrofílico o hidrófilo. Dependiendo de la carga que porten, los clasificamos como agentes tensoactivos catiónicos (positiva) o aniónicos (negativa). En caso de no presentar carga iónica, hablaríamos de agentes tensoactivos denominados no-iónicos. En caso de que la molécula presente cargas positivas y negativas simultáneamente, estaríamos hablando de tensoactivos Zwitteriónicos, en la cual la carga final es neutra sin contraiones. (II) Grupo apolar: formado generalmente por una cadena hidrocarbonada de tipo alquilo o alquilbenceno, que puede incluir ocasionalmente heteroátomos como oxígeno o halógenos. Este segmento presenta baja solubilidad en medios polares como el agua, debido a su carácter hidrofóbico o lipofílico.⁶⁹

Una de las propiedades más importantes de los tensoactivos es su capacidad de ser absorbidos en la interfase, disminuyendo así la tensión superficial, que es manifestación de las fuerzas cohesivas intramoleculares en los líquidos. La saturación de las moléculas en la superficie de la disolución permite la formación de ensamblajes moleculares en la misma. La característica

unificadora de estos sistemas es su diseño estructural. Dependiendo de la carga neta de la cabeza hidrofílica, estos ensamblajes pueden clasificarse como catiónicos, aniónicos o no iónicos. Los tensioactivos no iónicos pueden ser zwitteriónicos o dipolares.⁷⁰

La forma y el tamaño de estos ensamblajes moleculares dependen de varios factores, como la longitud de la cadena de hidrocarburos, la concentración, la temperatura, el grupo principal, los contraiones, otros aditivos, y la naturaleza del medio, ya sea polar o no polar.⁷⁰ Por ejemplo, los tensioactivos de cadena simple, como el dodecilsulfato sódico (SDS) ($\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$), forman micelas cuasi esféricas con un diámetro menor o igual a 30 Å. Por otro lado, los tensioactivos y lípidos con múltiples cadenas de hidrocarburos, como el cloruro de dodecildimetilamonio (DODAC) y la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPC), forman vesículas unilamelares o multilamelares más grandes. Además, la asociación de los tensioactivos no se limita solo a medios acuosos. En presencia de solventes no polares, los tensioactivos pueden formar micelas inversas,⁷⁰ donde las colas hidrofóbicas se orientan hacia el exterior y las cabezas hidrofílicas se agrupan hacia el interior (Figura 1.11). Un ejemplo de esto es el Aerosol-OT en octano.⁶²

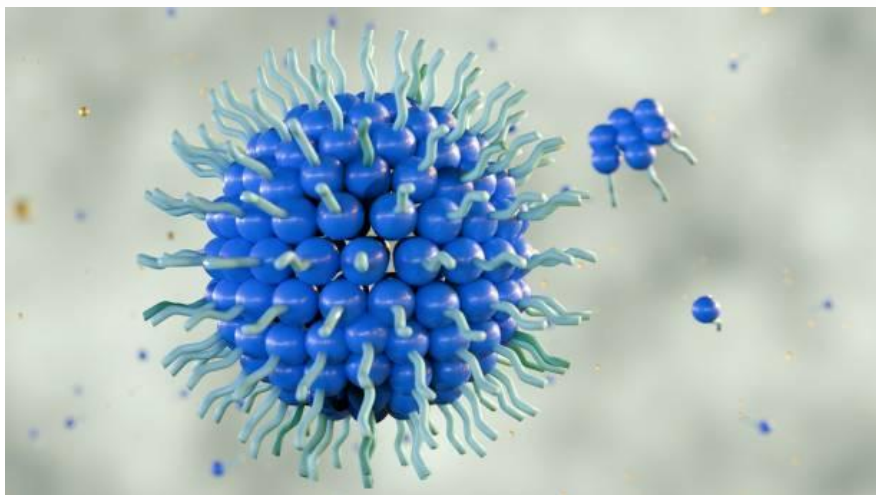


Figura 1.11: Representación esquemática de una micela inversa en un medio no polar.⁷⁰

1.3.2 Estructura y morfología micelar

Desde la propuesta inicial de McBain sobre la presencia de agregados moleculares en soluciones jabonosas debido a cambios en la conductividad eléctrica con la concentración de jabón, la estructura de los ensamblajes micelares ha sido objeto de discusión.⁶³ Hartley propuso que las micelas son esféricas, con grupos cargados en la superficie, mientras que McBain sugirió la coexistencia de formas laminares y esféricas. Los estudios de rayos X de Harkins y otros apoyaron el modelo sándwich o laminar. Posteriormente, Debye y Anacker propusieron que las micelas tienen forma de varilla, con sección transversal circular y cabezas polares en la periferia y colas de hidrocarburos en el interior. Sin embargo, en 1956, el modelo de micelas esféricas de Hartley fue establecido por Reich desde el punto de vista de la entropía, y la forma esférica se considera ahora generalmente aceptada como aproximación a la estructura real (Figura 1.12).

La formación de micelas por tensioactivos iónicos se debe a un equilibrio entre la atracción de las cadenas hidrofóbicas y la repulsión electrostática entre los grupos cargados. Aunque las micelas tienen carga neta debido a los grupos iónicos de los tensioactivos, esta carga es parcialmente compensada por las contraiones del medio, algunos de los cuales permanecen asociados a la superficie de la micela, formando la llamada “*capa de Stern*”. En contraste, para los tensioactivos no iónicos, la atracción de la cadena de hidrocarburos se contrapone a los requisitos de hidratación y espacio de los grupos hidrófilos. Por lo tanto, la estructura micelar resultante está determinada por un equilibrio entre las fuerzas de repulsión entre los grupos hidrófilos y las fuerzas de atracción de corto alcance entre los grupos hidrofóbicos. En otras palabras, la estructura química del tensioactivo es la que tiene mayor influencia sobre el tamaño y la forma de sus micelas.^{69,70} Sin embargo, como

se ha mencionado anteriormente, la forma y el tamaño de las micelas dependen no solo de su estructura básica, sino también de factores como la concentración, la temperatura, naturaleza del medio y otros.

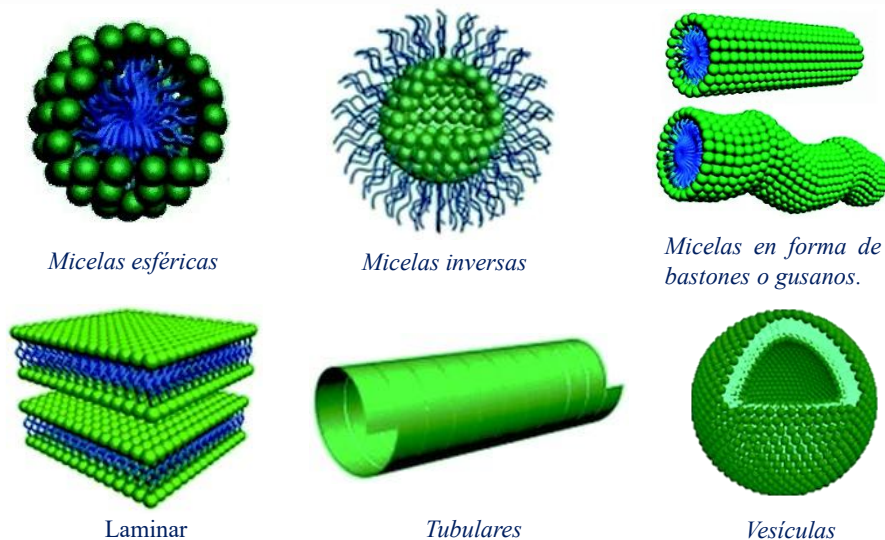


Figura 1.12: Representación simplificada de diversas formas de sistemas de ensamblajes compuestos por tensioactivos.⁷¹ *Color verde: cabeza hidrófila, *Color azul: cola hidrófoba.

Los avances en técnicas de investigación como la resonancia magnética nuclear (RMN), dispersión dinámica de luz (DLS), etc. han contribuido significativamente a comprender la naturaleza de las micelas. Los experimentos de dodecil sulfato de sodio y otras micelas iónicas respaldan el modelo básico de Hartley de micelas esféricas. Sin embargo, a medida que aumenta la concentración del surfactante iónico, la forma de las micelas iónicas cambia de esférica a cilíndrica, hexagonal y laminar (Figura 1.13). Por otro lado, para las micelas no iónicas, la forma parece cambiar directamente de esférica a laminar con el aumento de la concentración.⁶⁹

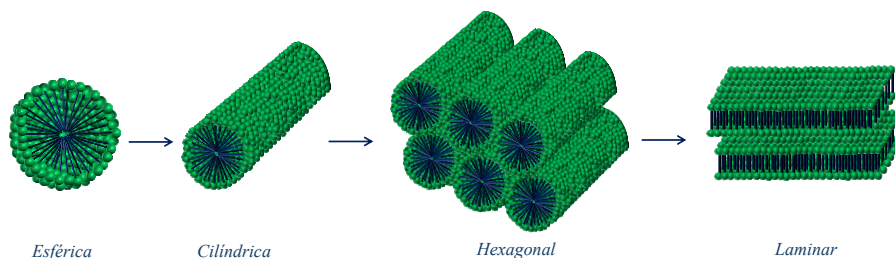


Figura 1.13: Cambio en la forma y estructura de las micelas con cambios en la concentración de surfactante.⁷⁰ *Color verde: cabeza hidrófila, *Color azul: cola hidrófoba.

Las micelas formadas por tensioactivos iónicos son ensamblajes caracterizados por un núcleo hidrofóbico compacto, rodeado por una capa superficial más flexible o hidratada. Se ha observado que la unión de iones metálicos divalentes a estas micelas provoca cambios mínimos en su volumen, sin inducir una reorganización estructural significativa. Estos iones afectan principalmente la carga superficial, la repulsión electrostática y la estabilidad del sistema, pero no alteran de forma sustancial la arquitectura global del ensamblaje.⁶⁹

Por otra parte, diversos estudios de RMN han demostrado que la penetración del agua en el núcleo hidrofóbico de las micelas es muy pequeña, con menos de una molécula de agua por molécula de tensioactivo. Aunque el interior del núcleo micelar permanece prácticamente libre de agua, los datos indican un contacto sustancial entre el agua y el hidrocarburo en la interfaz núcleo-superficie.⁶⁹ Por tanto, la interacción entre agua e hidrocarburo se restringe principalmente a la superficie del núcleo micelar.

1.3.3 Concentración micelar crítica

La concentración micelar crítica (CMC) se define como la concentración a partir de la cual comienza la formación espontánea de micelas. Experimentalmente, este punto corresponde a una discontinuidad o cambio

abrupto en la pendiente de una curva que representa alguna propiedad físico-química (ϕ) frente a la concentración total del surfactante (C_t).^{63,70}

$$C = \text{CMC}, (d^3\phi/dC_t^3)_{\text{máx}} = 0 \quad (1.1)$$

Donde

$$\phi = \alpha[S] + \beta[M]: \text{función de la disolución de tensioactivo.} \quad (1.2)$$

α y β son constantes de proporcionalidad, y $[S]$ y $[M]$ son las concentraciones del tensioactivo monomérico y de la micela, respectivamente.

A bajas concentraciones, propiedades como la conductancia, la tensión superficial y características espectrales de RMN indican que no hay una agrupación apreciable del surfactante. Por encima de la CMC, estas propiedades muestran un cambio abrupto, lo que refleja la formación de ensamblajes supramoleculares.

La CMC se puede determinar gráficamente identificando el punto de intersección entre dos regiones lineales en la curva que relaciona una propiedad físico-química con la concentración del tensioactivo: una correspondiente a bajas concentraciones, donde predominan los monómeros, y otra a altas concentraciones, donde se forman micelas. Cuando se estudia la variación de la CMC en función de factores químicos o físicos, es importante emplear métodos de determinación consistentes para garantizar la comparabilidad de los resultados.

Las técnicas más comunes para determinar la CMC incluyen la medición de conductividad, tensión superficial, solubilización de compuestos poco solubles en agua y fluorescencia de sondas orgánicas, como el pireno.⁷⁰ El método del pireno, utilizado desde hace más de 50 años, es una técnica simple y rápida que lo ha consolidado como sonda fluorescente por excelencia en el estudio de sistemas microheterogéneos, como micelas, polímeros, proteínas,

péptidos y membranas biológicas.⁷² Su sensibilidad a la polaridad del disolvente, reflejada en la estructura fina de su fluorescencia, lo hace especialmente útil para la determinación de la CMC de sistemas micelares, además de ofrecer ventajas como una respuesta rápida y bajo costo.⁷³⁻⁷⁸

Una recopilación detallada de valores experimentales de CMC puede encontrarse en el trabajo de A. Domínguez y colaboradores, que incluyen además una discusión de la metodología experimental (Tabla 1.1).⁷⁹

Tabla 1.1: Valores de CMC de algunos surfactantes.⁷⁹

Surfactante	Método	Condiciones ^a	CMC (mol/L)
SDS	Conductancia	Sin aditivos	8.0×10^{-3}
SDS	Conductancia	[TMU]= 1 mol/L	$1.4\text{-}1.5 \times 10^{-2}$
SDS	Conductancia	[HCl]= 6 mmol/L	5.5×10^{-3}
SDS	BZA-abs	Sin aditivos	7.8×10^{-3}
SDS	BZA-abs	[HCl]= 33 mmol/L	2.8×10^{-3}
SDS	Fluorescencia	Sin aditivos	7.4×10^{-3}
TTABr	Conductancia	Sin aditivos	3.9×10^{-3}
TTABr	BZA-abs	Sin aditivos	3.5×10^{-3}
TTABr	BZA-abs	[HCl]= 33 mmol/L	0.8×10^{-3}
TTABr	Fluorescencia	Sin aditivos	3.5×10^{-3}
TTABr	Fluorescencia	[NaBr]= 0.2 mol/L	2.3×10^{-4}
TTABr	Fluorescencia	[TMU]= 0.56 mol/L	5.9×10^{-3}
C ₁₂ E ₉	BZA-abs	Sin aditivos	1.6×10^{-4}
C ₁₂ E ₉	Fluorescencia	Sin aditivos	1.7×10^{-4}
C ₁₂ E ₉	Fluorescencia	15% HC ₃ OH	3.4×10^{-4}

^aTodos los experimentos fueron realizados a 25 °C.

Efecto de la cadena hidrocarbonada

La longitud de la cadena hidrocarbonada influye de forma decisiva en el valor de la CMC. Para una serie homóloga de surfactantes, la CMC decrece logarítmicamente al aumentar el número de átomos de carbono en la cadena

hidrocarbonada. Se ha observado que, en cadenas lineales de hasta 16 átomos de carbono, la adición de un grupo metilo puede reducir aproximadamente a la mitad el valor de la CMC. En tensioactivos no iónicos, el efecto es aún más pronunciado: añadir dos carbonos a la cadena puede reducir la CMC en un orden de magnitud. Esto se debe a que el aumento del carácter hidrofóbico de la cadena hidrocarbonada disminuye la concentración de surfactante necesaria para formar micelas.⁷⁰ La dependencia de la CMC del número de átomos de carbono (n_c) en la cadena de alquilo puede escribirse para muchas clases de anfifilos como:

$$\log \text{CMC} = a - bn_c \quad (1.3)$$

Habitualmente, la CMC se expresa en mol/L, y a y b son constantes del sistema. En presencia de sales añadidas, el parámetro b tiende a aumentar para los anfifilos iónicos.

Además, en estructuras más complejas, como cadenas ramificadas o insaturadas, se ha descrito un aumento general del valor de la CMC, atribuido a la disminución del carácter hidrofóbico efectivo.

Influencia de la cabeza hidrofílica

La carga del grupo polar tiene un efecto determinante sobre la CMC, ya que modula las interacciones electrostáticas entre cabezas polares. Para una longitud de cadena de alquilo dada, los tensioactivos no iónicos presentan valores de CMC significativamente inferiores a los iónicos, debido a la ausencia de repulsión entre grupos de cabeza. Los tensioactivos zwitteriónicos generalmente se encuentran en valores intermedios entre estos dos grupos.⁷⁰ En los no iónicos, tanto el tamaño como la capacidad de hidratación del grupo hidrofílico afectan de forma significativa la CMC. Por otro lado, en los

tensioactivos iónicos, añadir grupos cargados adicionales en la región polar puede aumentar la repulsión entre cabezas, lo que eleva la CMC.

Contraión

El tipo de contraión influye en la CMC en función de su grado de hidratación, polarizabilidad y capacidad de asociación con la micela. Contraiones más polarizables y de mayor valencia se asocian con mayor eficacia al grupo polar, modificando significativamente el valor de la CMC.⁷⁰ Así, en medio acuoso y para surfactantes aniónicos, se ha observado empíricamente que la CMC decrece según la secuencia: $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{N}(\text{CH}_3)_4^+ > \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_4^+ > \text{Ca}^{2+} = \text{Mg}^{2+}$. Cuando el contraión es el catión de una amina primaria, la CMC decrece al aumentar la longitud de la cadena de la amina. En el caso de los surfactantes catiónicos, el valor de la CMC decrece según la secuencia $\text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^-$. En presencia de contraiones orgánicos con al menos 4 o 5 carbonos (como n-butilamina), pueden formarse micelas mixtas, lo que modifica el valor observado de la CMC.

Efecto de la temperatura y presión

El efecto de la temperatura sobre la CMC es complejo, ya que intervienen mecanismos contrapuestos que afectan tanto a la región hidrofílica como a la hidrofóbica del tensioactivo. Por una parte, el aumento de temperatura reduce la hidratación del grupo polar, lo que favorece la micelización; por otra, desestabiliza las interacciones hidrofóbicas, lo que la dificulta. El equilibrio entre ambos efectos determina la tendencia final de la CMC con la temperatura. En consecuencia, la CMC presenta un valor mínimo característico, que suele situarse en torno a 25 °C para surfactantes iónicos y 50 °C para no iónicos.

En el caso de los surfactantes iónicos, existe una temperatura mínima por debajo de la cual no se forman micelas, debido a la baja solubilidad del surfactante en agua. Esta temperatura se conoce como temperatura de Kraft, y corresponde al punto en el que la solubilidad del surfactante iguala a la CMC, permitiendo así la formación de micelas.⁷⁰ Al superar esta temperatura crítica, la solubilidad del surfactante aumenta de forma abrupta, lo que facilita el proceso de micelización. Por el contrario, en disoluciones que contienen surfactantes no iónicos, el comportamiento térmico es diferente. A temperaturas elevadas, las soluciones micelares de surfactante pueden separarse en dos fases líquidas; este punto se denomina temperatura de enturbiamiento (o "cloud point").⁷⁰

En cuanto a la presión, su influencia sobre la CMC es mínima, incluso bajo condiciones de alta presión.⁷⁰

Influencia de la fuerza iónica

La presencia de electrolitos en solución afecta significativamente a la CMC de los tensioactivos iónicos, al modificar las interacciones electrostáticas en la interfase micelar; en los no iónicos, el efecto es menos acusado.⁷⁰ En el caso de los surfactantes iónicos, la adición de sales incrementa la fuerza iónica del medio, apantallando las cargas de los grupos polares y reduciendo la repulsión entre las cabezas iónicas. En los tensioactivos no iónicos, las sales compiten con los grupos hidrofílicos del surfactante por las moléculas de agua, afectando su hidratación y disminuyendo la CMC, aunque este efecto se manifiesta principalmente a concentraciones elevadas de sal.

Influencia de la presencia de compuestos orgánicos

La adición de pequeñas cantidades de sustancias orgánicas puede producir cambios significativos en el valor de la CMC en disolución acuosa. Estas

sustancias se pueden clasificar en dos grupos, según su influencia sobre la CMC. Un primer grupo incluye compuestos polares con cadenas alquílicas medias o largas, como ciertos alcoholes, que tienden a disminuir la CMC.⁷⁰ El segundo grupo está formado por compuestos que aumentan la CMC al modificar propiedades del medio, como la constante dieléctrica o la capacidad para formar enlaces de hidrógeno. Dentro de este último grupo se encuentran la urea, formamida, N-metilacetamida, entre otros.⁷⁰

Solubilidad de los anfifilos. El fenómeno Krafft.

La solubilidad de los tensioactivos influye significativamente en la CMC. Debido a su tendencia a agregarse, la solubilidad de los tensioactivos presenta una fuerte dependencia con la temperatura, como se observa en la Figura 1.14.

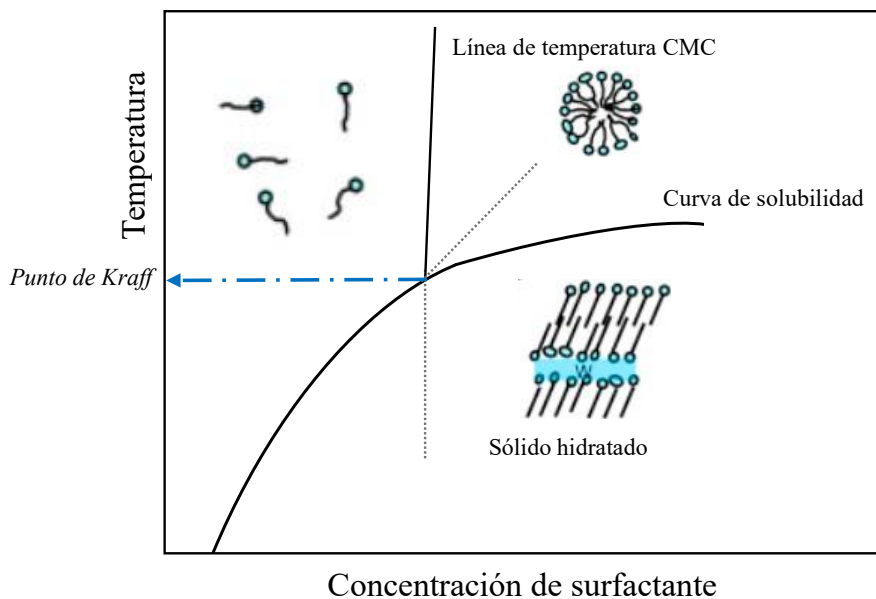


Figura 1.14: Dependencia de la temperatura de la solubilidad del surfactante en la región del punto de Krafft.⁷⁰

Para un tensioactivo dado, a temperatura ambiente, una mayor solubilidad en agua suele estar asociada a un valor más alto de CMC. Esto se debe a que, al estar más estabilizado en su forma monomérica, el tensioactivo requiere una

concentración mayor para que sus moléculas comiencen a ensamblarse y formen micelas.

La solubilidad de los tensioactivos depende estrechamente de la temperatura, especialmente en relación con su capacidad para formar micelas. A temperaturas inferiores al *punto de Krafft*, estos compuestos suelen permanecer en estado sólido o cristalino, con una solubilidad muy limitada. Al alcanzar dicho punto, la concentración de monómeros en disolución iguala la CMC, y a partir de ese momento el sistema comienza a formar micelas. Dado que las micelas son mucho más solubles que los monómeros individuales, se produce un aumento aparente y abrupto de la solubilidad total.

Este fenómeno, conocido como *punto de Krafft*,⁷⁰ está influido por factores estructurales como la longitud de la cadena alquílica o la naturaleza del contraión. Además, la presencia de impurezas puede modificar notablemente la temperatura a la que ocurre esta transición, debido a la relación directa entre el *punto de Krafft* y la temperatura de fusión de la fase sólida del tensioactivo. Por tanto, el comportamiento del tensioactivo en estado sólido es clave para entender los procesos de solubilización y la formación de ensamblajes supramoleculares, como las micelas, en solución acuosa.

1.3.4 Distribución de tamaño y alteraciones morfológicas

El "número de agrupación" de una micela hace referencia a la cantidad de moléculas necesarias para su formación. El número de agrupación de micelas es polidisperso, lo que implica que las micelas en una disolución no presentan el mismo tamaño ni la misma cantidad de moléculas. Este número varía dependiendo del tipo de tensioactivo y las condiciones del medio (temperatura, contraión, etc). En general, se ha observado que el número de agregación micelar aumenta tanto con la concentración de tensioactivo como con la adición de sales. Para tensioactivos iónicos, como el dodecilsulfato

sódico (SDS), el número de agregación suele estar en el rango de 50 a 100 moléculas por micela.⁷⁰ Para tensioactivos no iónicos, como los surfactantes basados en óxido de etileno, el número de agregación puede ser más bajo, típicamente entre 20 y 50 moléculas por micela.⁷⁰

1.3.5 Dinámicas y modelos micelares

Las micelas son estructuras dinámicas que se forman y disocian rápidamente en una escala de tiempo de milisegundos a microsegundos.⁸⁰ El estudio de los parámetros cinéticos de la formación y descomposición de las micelas requiere, por tanto, la utilización de métodos de relajación.^{81,82} Estos estudios sobre la dinámica micelar revelan la existencia de dos procesos de relajación: un proceso rápido (10^{-9} - 10^{-6} s) que corresponde al intercambio de monómeros entre la fase acuosa y las micelas de diferentes tamaños, y un proceso lento (10^{-6} - 10^{-3} s) que corresponde a la formación o descomposición de las micelas.⁸³

La forma más simple de representar la estructura micelar es mediante el modelo de Hartley,⁸⁴ que supone que, a pequeñas concentraciones de surfactante no muy por encima de la CMC, las micelas son esféricas con un radio similar a la longitud de la cadena hidrocarbonada del surfactante.^{85,86} Dentro de la micela esférica, se distinguen varias regiones: la región hidrofóbica (*core*), que alberga las cadenas hidrocarbonadas de los surfactantes; la *capa de Stern*, que separa la fase acuosa del núcleo micelar y contiene los grupos de cabeza iónicos, parcialmente neutralizados por contraiones y agua; la *capa difusa de Gouy-Chapman*, que corresponde al volumen de la disolución perturbado eléctricamente por la presencia de la micela y donde se encuentran los contraiones no asociados; y por último, la masa acuosa, que únicamente contiene el disolvente y no se ve influenciado por la micela (Figura 1.15). Este modelo no explica el contacto que puede

existir entre el agua y las colas hidrocarbonadas de las micelas, ni aclara la disposición de dichas colas en el *core*. Por tanto, se han propuesto otros modelos alternativos para tratar de aclarar estos puntos.

El modelo de Menger⁸⁷ sugiere la posibilidad de que exista un cierto grado de contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas. Estas cadenas se distribuyen en el *core* de manera aleatoria, lo que permite la existencia de huecos en los que pueden acomodarse moléculas de agua. Por lo tanto, una parte de las cadenas hidrocarbonadas está en contacto con el agua en la superficie micelar. En la Figura 1.15 ilustra gráficamente estos modelos en el caso de una micela de SDS.

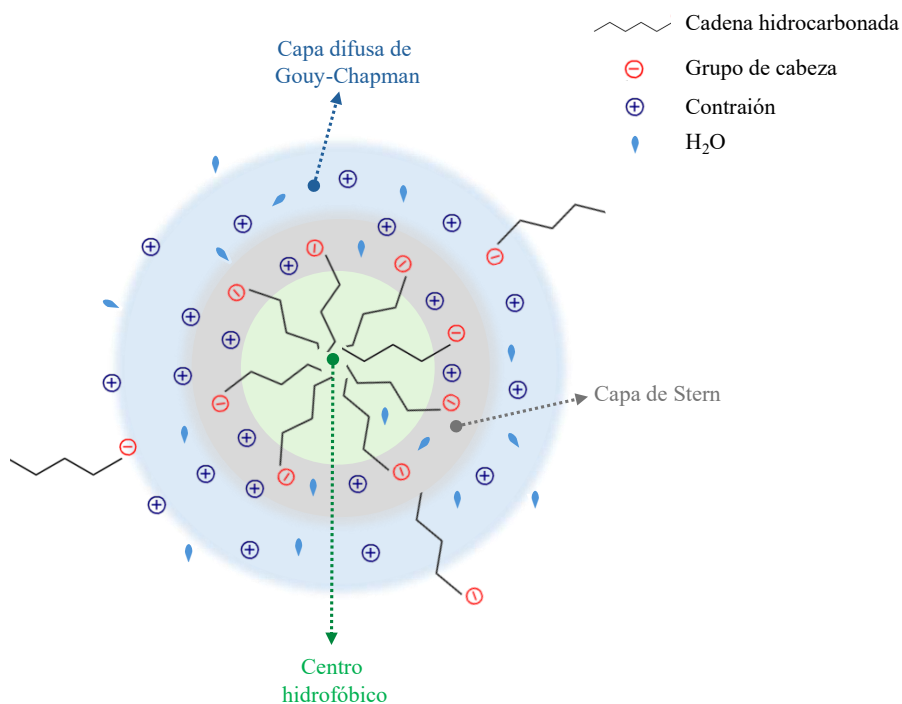


Figura 1.15: Ilustración gráfica de la estructura básica de una micela.

Otros modelos más recientes, como el modelo de Fromherz,⁸⁸ plantean un *core* en el que no existe agua, pero al mismo tiempo proponen una disposición de

las colas hidrocarbonadas de forma que existe contacto entre estas y el agua. Por otro lado, el modelo de Dill y Flory⁸⁹⁻⁹¹ también aboga por este contacto, basándose en teorías estadísticas y en impedimentos estéricos. Según esta teoría, las cadenas hidrocarbonadas del surfactante se distribuyen de manera aleatoria.

1.3.6 Cinética de la formación de micelas

El fenómeno de micelización se desarrolla en un equilibrio dinámico de asociación-disociación, influenciado por la concentración de monómeros, la temperatura y las constantes de velocidad. Desde el punto de vista termodinámico, este proceso está impulsado por la reducción de la energía libre del sistema, lo que facilita una formación espontánea de micelas, predominantemente de naturaleza entrópica.⁹²

La cinética de la micelización ha sido objeto de estudio durante décadas. En 1974, Aniansson y Wall⁷⁰ propusieron un modelo teórico que explicó de manera coherente los resultados experimentales, el cual ha sido ampliamente aceptado y utilizado desde entonces.

Si bien la formación de micelas ocurre en múltiples etapas, a nivel global sigue una cinética de reacción de primer orden, independientemente del orden de reacción. Su comportamiento puede describirse mediante ecuaciones matemáticas que representan el equilibrio dinámico entre los monómeros de surfactante y las micelas en solución.

Equilibrio de micelización

La formación de micelas es un proceso dinámico, representado por la siguiente reacción química:



El equilibrio de micelización está determinado por la constante de equilibrio K_m :

$$K_m = \frac{[M]}{[S]^n} \quad (1.5)$$

Cuando la concentración de surfactante en solución, representado como S , alcanza un valor igual o superior a la CMC, comienza de forma significativa la formación de micelas, designadas como M . Cada micela está compuesta por un número determinado n de monómeros de surfactante. En equilibrio, la concentración de monómeros libres en solución se representa como $[S]$, mientras que la concentración de micelas formadas se indica como $[M]$. Este equilibrio dinámico entre monómeros y micelas es característico de los sistemas tensioactivos en solución acuosa.

Modelo cinético de nucleación y crecimiento

El proceso de micelización puede modelarse en términos de un modelo de nucleación y crecimiento, en el que las micelas crecen a partir de pequeños agregados de monómeros de surfactante.

La velocidad de formación de micelas está dada por:

$$\frac{d[M]}{dt} = k_+[S]^n - k_-[M] \quad (1.6)$$

En este sistema, k_+ representa la constante de velocidad de agregación de monómeros en micelas, mientras que k_- es la constante de velocidad de disociación de micelas en monómeros. En condiciones de equilibrio, la velocidad neta de formación de micelas es cero, es decir, $\frac{d[M]}{dt} = 0$. Por lo tanto, se cumple la siguiente relación:

$$k_+[S]^n = k_-[M] \quad (1.7)$$

A partir de esta igualdad se deduce la expresión para la constante de equilibrio K_m , que relaciona las concentraciones en equilibrio:

$$K_m = \frac{k_+}{k_-} \quad (1.8)$$

Dependencia de la energía libre de micelización

La formación de micelas se puede describir también en términos de la energía libre de Gibbs ΔG . La energía libre de formación de micelas está dada por:

$$\Delta G_m = RT \ln(\text{CMC}) \quad (1.9)$$

Donde R es la constante de los gases, T es la temperatura absoluta, y ΔG_m es la energía libre de micelización. Un valor negativo de ΔG_m indica que el proceso de micelización es espontáneo.

La energía libre estándar de micelización puede descomponerse en sus componentes entálpica y entrópica:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (1.10)$$

Aquí, ΔH_m representa la entalpía de micelización, asociada a la formación de interacciones no covalentes entre las cadenas hidrofóbicas, mientras que ΔS_m corresponde a la entropía de micelización, relacionada principalmente con la liberación de moléculas de agua estructuradas alrededor de los monómeros individuales.

En la mayoría de los casos, la micelización es un proceso impulsado por la entropía ($\Delta S_m > 0$), ya que el ensamblaje de los tensioactivos reduce la superficie de contacto hidrofóbico con el agua, liberando moléculas de agua ordenadas y aumentando la entropía del sistema.

1.4 El Dioxígeno y sus especies

1.4.1 El dioxígeno

El oxígeno es uno de los elementos más abundantes en el Universo y juega un papel fundamental tanto en el entorno atmosférico terrestre como en el acuático.⁹³ Puede encontrarse en su forma diatómica, compuesta por dos átomos de oxígeno, representada como O_2 (dioxígeno). Sin embargo, también puede presentarse en su forma triatómica, O_3 , conocida como ozono.

En el planeta Tierra, el oxígeno constituye aproximadamente el 20.9 % de la atmósfera, mientras que en la corteza terrestre representa alrededor del 47.7 %. Desde una perspectiva biológica, el oxígeno desempeña un papel esencial en dos procesos biológicos fundamentales: la respiración celular y la fotosíntesis. En este contexto, se destaca el papel que tiene en los organismos aerobios, donde actúa como aceptor final de electrones en los procesos metabólicos, lo que les permite obtener energía mediante la oxidación de la materia orgánica.

Hace millones de años, la atmósfera terrestre tenía bajos niveles de oxígeno y las condiciones químicas eran muy diferentes. La vida se originó en ambientes con bajos niveles de este gas, por lo tanto, los primeros seres vivos eran probablemente anaerobios. Sin embargo, con el tiempo, los organismos autótrofos fotosintéticos comenzaron a liberar oxígeno como subproducto de la fotosíntesis, lo que enriqueció la atmósfera con dioxígeno. Esto llevó a una adaptación gradual de los seres vivos a las nuevas condiciones ricas en oxígeno. La mayoría de los organismos anaerobios primitivos se extinguieron debido a que el oxígeno representaba un elemento tóxico para ellos, y algunos sobrevivieron en ambientes donde el oxígeno no podía penetrar. Otros organismos desarrollaron mecanismos de defensa contra los efectos tóxicos⁹⁴

del oxígeno y, eventualmente, comenzaron a utilizarlo en sus procesos metabólicos, evolucionando hacia organismos aerobios.

La utilización de dioxígeno por los organismos aerobios proporciona una ventaja evolutiva significativa sobre los anaerobios debido a la cantidad de energía que pueden obtener a través de la respiración aerobia. En términos energéticos, la respiración aerobia es mucho más eficiente que la fermentación anaerobia. Mientras que la fermentación anaerobia produce solo dos moléculas de ATP (Adenosín Trifosfato o Trifosfato de Adenosina) por cada molécula de glucosa, la respiración aerobia puede producir hasta 38 moléculas de ATP.⁹⁵

A pesar de la ventaja evolutiva de utilizar el dioxígeno en el metabolismo, los organismos aerobios deben enfrentar la toxicidad inherente del oxígeno. El dioxígeno tiene la capacidad de oxidar completamente la materia orgánica, reacción que es favorable desde el punto de vista energético. Sin embargo, esta reacción presenta una alta barrera energética, lo que impide su ocurrencia espontánea en condiciones fisiológicas. Esta barrera cinética es lo que permite la existencia de vida en una atmósfera rica en oxígeno, ya que evita que la oxidación ocurra de manera descontrolada. No obstante, aún pueden ocurrir ciertas reacciones que conduzcan a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) como los radicales libres, que son altamente dañinos para las células.

1.4.2 Las especies reactivas de oxígeno

El oxígeno forma compuestos con la mayoría de los elementos, generando desde óxidos estables hasta especies altamente reactivas. Algunas de estas especies muestran alta reactividad frente a biomoléculas, lo que puede provocar daño celular y contribuir al desarrollo de diversas patologías. Estas

especies se agrupan bajo el nombre de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés).

Las ROS son derivados del dioxígeno (O_2), caracterizados por su elevada reactividad química, especialmente frente a estructuras biológicas.^{94,96} Entre las ROS se incluyen especies como el ozono (O_3), el oxígeno singlete (1O_2) y tres compuestos clave conocidos como intermediarios reactivos de oxígeno (ROI): anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$).^{97,98} En la Figura 1.16 se ilustra la formación de las diferentes especies reactivas de oxígeno y sus respectivas interconversiones.

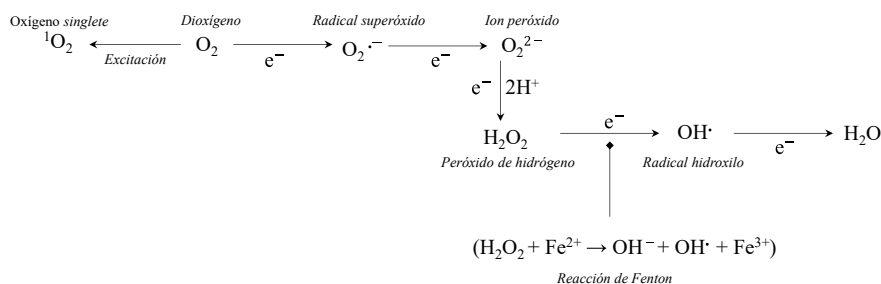


Figura 1.16: Esquema de formación de las diferentes especies reactivas de oxígeno a partir del oxígeno triplete.⁹⁶

En los últimos años, algunos autores han ampliado el término ROS para incluir compuestos reactivos de nitrógeno, cloro o bromo, como el peroxinitrato (O_2NOO^-), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el ácido hipobromoso ($HOBr$).⁹⁹ No obstante, en este trabajo nos centraremos en los ROI ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y $OH^{\cdot}$), ya que constituyen las ROS predominantes en sistemas biológicos.

1.4.3 El radical superóxido

El radical superóxido es una de las especies reactivas de oxígeno más relevantes desde el punto de vista biológico, tanto por su implicación en rutas metabólicas como por su papel en procesos patológicos. A continuación, se discutirán los aspectos más importantes de su química.

Química del radical superóxido

El anión superóxido es de naturaleza radicalaria y de fórmula química $\text{O}_2^{\bullet-}$. Es un producto de la reducción del dioxígeno por un electrón según la siguiente reacción:



Esta reducción parcial permite el apareamiento de uno de los dos electrones desapareados del O_2 en estado triplete, generando un radical aniónico con carga -1 y un espín igual a 1/2. La configuración electrónica del radical superóxido se muestra en la Figura 1.17.

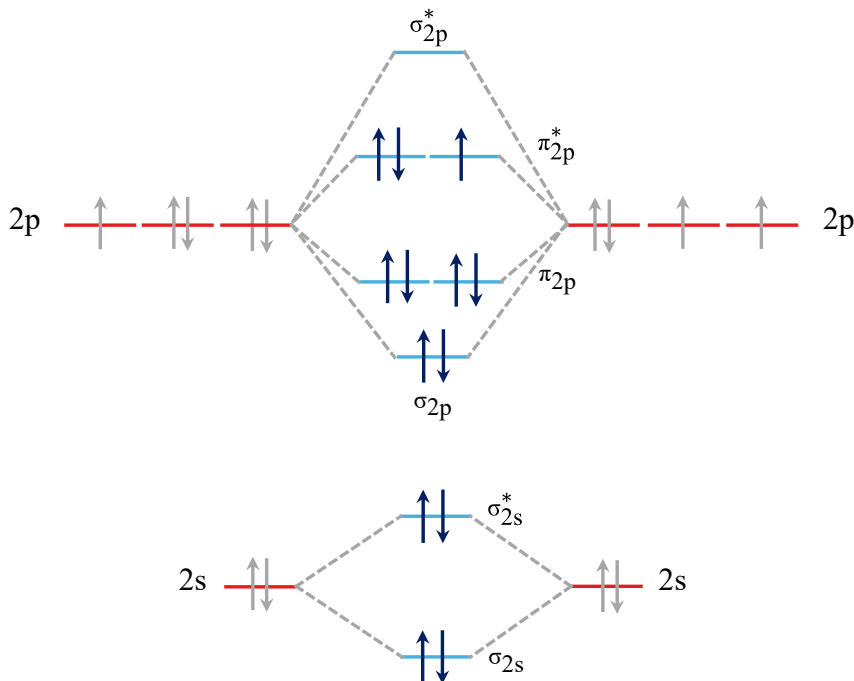


Figura 1.17: Orbitales moleculares del anión superóxido en su estado fundamental.¹⁰⁰

El superóxido presenta una reactividad moderada con la materia orgánica debido a su naturaleza paramagnética, especialmente en comparación con otras ROS, como el radical hidroxilo.¹⁰¹ No obstante, su presencia en los organismos no es completamente inocua, ya que tiene cierta capacidad para

oxidar la materia orgánica y contribuir a la generación de otras ROS mucho más reactivas.^{102,103}

En disoluciones acuosas, el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) actúa como una base débil y puede protonarse reversiblemente para formar el radical hidroperóxido ($\text{HO}_2^{\bullet}$).

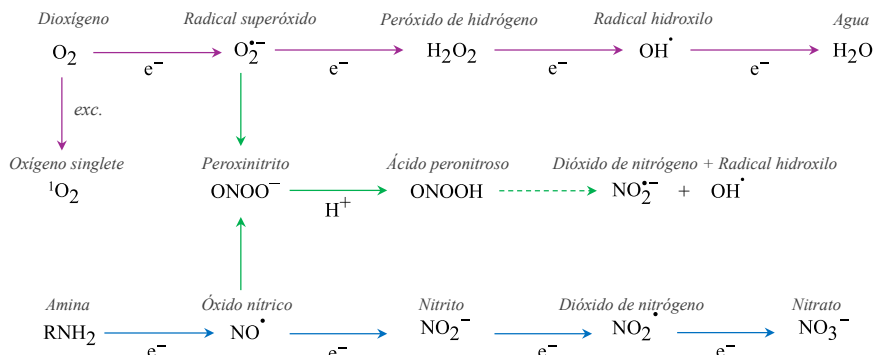


El estado de protonación del superóxido afecta significativamente a su capacidad oxidante o reductora. En un medio aprótico, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ actúa como un oxidante de fuerza moderada, cediendo un electrón y convirtiéndose en O_2 . Sin embargo, en medios próticos, puede formar la especie $\text{HO}_2^{\bullet}$, que es un oxidante mucho más fuerte y muy inestable frente a la dismutación. Estos aspectos se discutirán con más detalle en la siguiente sección.

Especies reactivas derivadas del superóxido

El radical superóxido es un compuesto altamente peligroso para el organismo debido a su capacidad para generar nuevas y más tóxicas especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS). Como se muestra en la Figura 1.18, la generación de superóxido puede conducir a la formación de compuestos como el peroxinitrito ($\text{ONOO}^{\bullet}$) y el radical hidroxilo ($\text{OH}^{\bullet}$), los cuales tienen una mayor capacidad para reaccionar con la materia orgánica y, por lo tanto, degradar los tejidos. A continuación, se examinarán en detalle estas reacciones y sus implicaciones biológicas.

Ruta de generación de especies reactivas de oxígeno.



Ruta de generación de especies reactivas de nitrógeno.

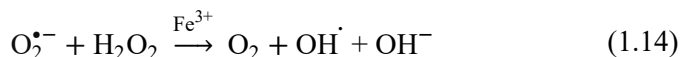
Figura 1.18: Producción de las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en células de mamíferos.¹⁰⁴

Partiendo de la reducción monoelectrónica del dioxígeno, se forma el radical superóxido, que puede dismutarse de forma espontánea o catalizada por las enzimas superóxido dismutasas (SODs) generando H_2O_2 y O_2 . A partir de aquí, el H_2O_2 puede descomponerse a través de dos mecanismos principales:

- *Dismutación en agua y dioxígeno:* Mediado por la enzima catalasa, esta ruta de eliminación del peróxido no produce productos tóxicos.
- *Reacción con metales:* El H_2O_2 puede reaccionar con metales como $Fe(II)$ mediante la reacción de Fenton, generando el radical hidroxilo ($OH^{\bullet}$) (ecuación 1.13).¹⁰⁵ El $OH^{\bullet}$, producto de esta reacción, presenta una elevada reactividad, lo que convierte en una especie extremadamente tóxica. Este radical puede reaccionar tanto con compuestos inorgánicos como orgánicos, afectando componentes celulares esenciales como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos. Su alta reactividad le permite causar daños en los tejidos que superan el alcance de cualquier otra ROS.¹⁰⁶



Otro método para la formación del radical $\text{OH}^\bullet$ a partir de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 es mediante la reacción de Haber-Weiss (ecuación 1.14), con la participación de Fe^{3+} como catalizador.¹⁰⁷ Esta reacción va acoplada a la de Fenton a causa de la generación de Fe^{3+} en esta última.



Además de las especies reactivas de oxígeno, el radical superóxido puede reaccionar con diversos compuestos nitrogenados, generando una segunda familia de especies tóxicas. En los fagocitos, las enzimas NADPH-oxidasa e iNOS (óxido nítrico sintasa inducible) generan simultáneamente $\text{O}_2^{\bullet-}$ y $\text{NO}^\bullet$ a partir de NADPH y L-arginina respectivamente. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ junto con $\text{NO}^\bullet$ favorece la formación del peroxinitrito ($\text{ONOO}^\bullet$), que puede protonarse para formar ácido peroxinitroso (ONOOH). La característica clave de esta especie es su inestabilidad, lo que la lleva a descomponerse en dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2^\bullet$) y nuevamente en radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$).¹⁰⁴

Producción endógena del radical superóxido

A nivel biológico, el radical superóxido se genera a partir de dos sistemas principales: la cadena respiratoria mitocondrial y los fagocitos. En la cadena respiratoria, surge como subproducto de la respiración celular, mientras que en los fagocitos se produce como parte del sistema de defensa del organismo.¹⁰⁸ A continuación, se amplía cada uno de estos procesos:

La *cadena respiratoria mitocondrial* es un proceso esencial para la producción de ATP en las células a través de la fosforilación oxidativa. Se lleva a cabo en la membrana interna de la mitocondria y consta de varios complejos enzimáticos (I-IV) (NADH deshidrogenasa, succinato deshidrogenasa, citocromo c reductasa, citocromo c oxidasa). Durante la respiración celular, los electrones se transfieren a través de estos complejos, reduciendo

finalmente el oxígeno a agua en el complejo IV. Aunque la cadena de transporte mitocondrial está diseñada para reducir completamente el O_2 a agua, una pequeña fracción de electrones puede escapar de los complejos I y III generando $O_2^{\bullet-}$ como subproducto y provocando daño oxidativo sobre componentes celulares esenciales, especialmente el ADN mitocondrial.¹⁰⁹

En células fagocíticas como los neutrófilos, macrófagos y monocitos, el superóxido se produce masivamente durante la llamada "explosión respiratoria" mediante la acción de la enzima NADPH oxidasa.¹⁰⁴ Esta producción de superóxido es fundamental para la destrucción de patógenos, ya que el $O_2^{\bullet-}$ es un precursor de otras ROS con potentes efectos antimicrobianos, como el H_2O_2 y el $OH^{\bullet}$. Sin embargo, la producción excesiva y descontrolada de superóxido y otras ROS puede derivar en daño tisular e inflamación si no se controla adecuadamente. Para regular y minimizar este daño oxidativo, los fagocitos emplean mecanismos antioxidantes que aseguran que las ROS sean efectivas contra patógenos sin causar daño excesivo a las células del propio organismo.¹⁰⁹

Las ROS presentan una reactividad elevada frente a biomoléculas, que las convierte en armas eficaces frente a patógenos, pero también en agentes potencialmente tóxicos.^{104,110}

Para que los ROS funcionen como sistemas de defensa sin dañar los tejidos, deben estar bajo estricto control metabólico celular. Si se desequilibra la actividad entre sistemas prooxidantes y antioxidantes, se produce el estrés oxidativo. Esto ocurre cuando los niveles de ROS superan la capacidad de eliminación de los antioxidantes celulares, causando daño irreparable y, en ocasiones, apoptosis celular.⁹⁶ El estrés oxidativo en un tejido provoca la pérdida de su funcionalidad y está relacionado con diversas enfermedades,

destacando entre ellas las neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer y el Huntington.

1.4.4 Enfermedades asociadas a las ROS

La literatura científica sobre enfermedades asociadas a ROS es muy abundante. En los últimos años, se ha descubierto que el estrés oxidativo contribuye a la aparición de diversas patologías, entre las que se incluyen: diabetes,¹¹¹ cáncer,¹¹²⁻¹¹⁴ desórdenes neurodegenerativos como Alzheimer^{115,116} y Parkinson,^{117,118} variedades hereditarias de esclerosis lateral amiotrófica (ALS),^{119,120} inflamación,¹²¹ enfermedad de Huntington,¹²² hipertensión,¹²³ isquemia,¹²⁴ síndrome de dificultad respiratoria aguda,¹²⁵ fibrosis pulmonar idiopática,¹²⁶ enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC),¹²⁷ asma,^{128,129} entre otros.

En ciertas patologías, las ROS pueden tener efectos tanto perjudiciales como beneficiosos. Estas especies reactivas pueden promover o prevenir la muerte celular, la inflamación y el envejecimiento. En este contexto, es importante destacar tres patologías estrechamente relacionadas con las ROS: el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas^{130,131} y el envejecimiento.⁹⁸

ROS y su relación con el cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular anómala y desregulada.¹³² Aunque comúnmente usamos el término "cáncer" en singular, en realidad nos referimos a más de cien enfermedades diferentes, cada una de ellas potencialmente causada por distintos factores. A pesar de los avances en diagnóstico y tratamiento, los mecanismos celulares que desencadenan la transformación celular maligna siguen sin estar completamente esclarecidos.

Se han desarrollado tratamientos de amplio espectro para controlar el cáncer, como el cis-platino¹³³ o estrategias basadas en la inducción de estrés oxidativo, como la terapia fotodinámica (TFD) y el uso de ROS.¹³⁴

La TFD está basada en el uso de sustancias fotosensibilizantes que, activadas con una luz de adecuada longitud de onda y en presencia de oxígeno, generan ROS que ocasionan la muerte celular. Actualmente, se utiliza con éxito en el tratamiento del cáncer cutáneo no-melanocitario y se está experimentando en otras aplicaciones, como las infecciones superficiales.¹³⁵

Anteriormente se ha indicado que una acumulación excesiva de ROS en los tejidos puede causar daño celular incompatible con la supervivencia o el correcto funcionamiento de las células. Por ello, la terapia antitumoral se ha centrado en seguir una de las dos estrategias: la estimulación de la generación de ROS mediante agentes prooxidantes en el entorno del tejido canceroso, contribuyendo así a su degradación y, en última instancia, a su destrucción, o la inhibición de los sistemas antioxidantes que las células cancerosas utilizan como defensa.^{134,136}

Sin embargo, estas estrategias deben aplicarse con precaución, ya que en algunos contextos, las ROS pueden favorecer la progresión tumoral.¹³⁷⁻¹³⁹ Por ejemplo, niveles moderados de ROS pueden promover la activación de rutas de señalización que estimulan la proliferación celular y la resistencia a tratamientos.^{138,140}

Enfermedades neurodegenerativas

Otro grupo de enfermedades asociadas a las ROS lo constituyen las enfermedades neurodegenerativas. Aunque hasta la actualidad las causas no son de todo claras, en este grupo se incluyen enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson y el Huntington, así como trastornos como la

esclerosis lateral amiotrófica y la ataxia espinocerebelar.¹⁴¹⁻¹⁴³ La característica principal que comparten estas enfermedades es provocar un daño gradual en el tejido neuronal, lo que conduce a un deterioro progresivo y, como resultado, a la pérdida de las funciones motoras y cognitivas. En caso del Alzheimer, esto ocasiona la pérdida de memoria, dificultades en el habla y movimiento, mientras que el Parkinson se caracteriza por problemas de movilidad como rigidez, temblores, entre otros.^{144,145}

Biológicamente, estas enfermedades implican la degeneración y muerte de células neuronales,¹⁴⁶ impulsada por el estrés oxidativo y una alta concentración de ROS. Además, se observa la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas, como la beta-amiloide en el Alzheimer y la alfa-sinucleína en el Parkinson.¹⁴⁷ Estas acumulaciones interfieren con la función normal de las neuronas y pueden desencadenar procesos neurodegenerativos.

Una de las características más distintivas de la enfermedad de Alzheimer es el depósito de placas proteicas en el córtex cerebral, específicamente en el espacio extracelular,¹⁴⁸ conocidas como placas amiloides.¹⁴⁹ En 1907, Aloïs Alzheimer describió la aparición de estas placas, que provienen de la degradación metabólica de una proteína transmembrana conocida como proteína precursora amiloide (PPA), presente principalmente en el sistema nervioso central.¹⁵⁰ La PPA contiene tres dominios, pero solo uno, el péptido β -amiloide ($A\beta$) es responsable de la formación de agregados tras su liberación (Figura 1.19). La formación de estos aglomerados proteicos contribuye al desarrollo de esta enfermedad.¹⁵¹

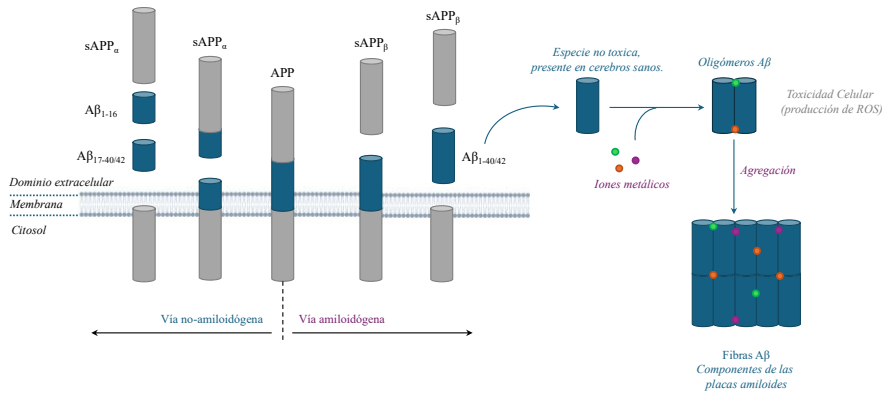


Figura 1.19: Representación esquemática de la división proteolítica de APP mediante dos rutas: en la ruta no amiloidogénica, la APP es dividida por la α -secretasa y luego por la γ -secretasa, formando péptidos A β truncados (como A $\beta_{17-40/42}$). Alternativamente, la APP es dividida por la β -secretasa, produciendo A β_{1-16} truncado. En la ruta amiloidogénica, la APP es dividida por las β y γ -secretasas, formando péptidos A β completos (como A $\beta_{1-40/42}$). En esta segunda ruta, el péptido A β interactúa con los iones metálicos presentes en el cerebro, formando oligómeros y luego fibrillas, precursoras de las placas amiloides.¹⁴⁹

La toxicidad de las proteínas beta-amiloide (A β) se manifiesta cuando estas se encuentran en su forma aglomerada. Dos factores principales contribuyen a la formación de las placas amiloides:

Mutaciones Genéticas: La mutación de genes específicos relacionados con la metabolización de la proteína precursora amiloide (PPA), como PSEN1 y PSEN2,¹⁵² incrementa la producción de A β al estimular la vía amiloidogénica de degradación de la PPA. Esto resulta en una mayor concentración de A β en el espacio extracelular.^{148,153}

Presencia de Metales en Disolución: Metales como Cu(II) y Zn(II) actúan como agregadores de las proteínas A β . La elevada concentración de A β en el medio, junto con la presencia de estos metales, conduce a la formación de oligómeros de A β , que son insolubles y precursores de las fibras A β .^{154,155} La agregación sucesiva de estas fibras resulta en la formación de placas amiloides.

La toxicidad de las placas amiloides se ve incrementada por la presencia de metales con actividad redox, como el Cu(II) y el Fe(II).^{156,157} Estos metales complejados en las placas A β alteran su reactividad redox, permitiendo la generación de ROS,¹⁵⁸ como superóxido y peróxido de hidrógeno, que posteriormente forman radicales hidroxilo altamente tóxicos.¹⁵⁹ El estrés oxidativo resultante, que supera la capacidad de los sistemas antioxidantes del organismo, degrada el tejido neuronal y contribuye al desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

Mecanismos similares, basadas en acumulación proteica y el estrés oxidativo, también están implicados en otras enfermedades neurodegenerativas, como el Parkinson¹⁴⁷ o enfermedad de Huntington.¹⁶⁰

Envejecimiento

Dentro de las enfermedades asociadas a ROS, un área de interés es su influencia en el proceso del envejecimiento.^{98,161} Diversas teorías atribuyen el envejecimiento a una combinación de factores como el daño acumulado en el ADN,¹⁶² el estrés oxidativo,¹⁶³ la disfunción mitocondrial, los cambios epigenéticos, la disminución de la capacidad de reparación celular y la inflamación crónica.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Entre estos factores, la producción elevada de ROS destaca significativamente.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

En 1957, Denham Harman propuso la hipótesis de que los radicales de oxígeno generados endógenamente por el metabolismo aeróbico causaban un daño acumulado en los tejidos, lo que constituye el envejecimiento.^{170,171} Años más tarde, el descubrimiento de la superóxido dismutasa, una enzima universal presente en todos los seres vivos cuya única función es eliminar el superóxido, proporcionó evidencia a la hipótesis planteada por Harman, ya que demostraba la necesidad de los seres vivos de defenderse contra el estrés oxidativo.¹⁷² El aumento de ROS en las células propicia su senescencia y

contribuye al proceso de envejecimiento y a la aparición de enfermedades relacionadas con la edad.

Para contrarrestar los daños causados por las ROS, el organismo cuenta con una serie de sistemas de defensa antioxidantes, entre los que destaca la familia de las SODs. Esta enzima es capaz de convertir el superóxido en peróxido de hidrógeno, una forma menos tóxica de ROS, que luego puede ser neutralizada por otras enzimas antioxidantes como la catalasa y el glutatión peroxidasa. En conjunto, estos sistemas antioxidantes ayudan a mantener el equilibrio redox en la célula y a protegerla del daño oxidativo. Este tema será abordado más ampliamente en el siguiente apartado.

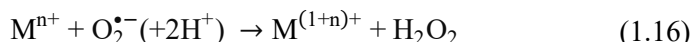
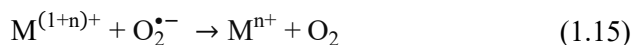
1.5 Los sistemas antioxidantes

1.5.1 Superóxido dismutasa

La producción continua de especies reactivas de oxígeno produce graves daños directos e indirectos al organismo. Para protegerse, los seres vivos poseen sistemas de defensa, entre los cuales destaca la enzima superóxido dismutasa (SOD), que desempeña un papel crucial en la prevención del estrés oxidativo.⁹⁸

En los organismos aerobios, la dismutación espontánea del $\text{O}_2^{\bullet-}$ ocurre a una velocidad relativamente alta. Sin embargo, esta velocidad no es lo suficientemente rápida para mantener la concentración de superóxido en niveles bajos y evitar sus efectos tóxicos. Para contrarrestar estos efectos dañinos, los organismos vivos necesitan acelerar significativamente esta reacción. Aquí es donde entra en juego la enzima SOD, que cataliza esta reacción con una notable eficiencia catalítica, acercándose a menudo a la velocidad limitada por difusión, que es del orden de $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.¹⁷³

Las SOD, forman una familia de metaloenzimas cuyo centro activo contiene un metal redox-activo que permite la dismutación del radical superóxido mediante transferencia monoelectrónica. Esta reacción es posible gracias a que el metal actúa como intermediario en la transferencia de electrones, siguiendo un mecanismo denominado "ping-pong".¹⁷⁴ En este proceso, el metal del centro activo de la enzima sufre un proceso de reducción, que es seguido rápidamente por otro de oxidación, con el que vuelve a su estado inicial. Esto conlleva a la degradación de dos moléculas de superóxido ($O_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O_2), representadas en las ecuaciones 1.15 y 1.16.¹⁷⁴



A través de este mecanismo, la familia del superóxido dismutasas logra acelerar la velocidad de dismutación de los radicales superóxido en comparación con el proceso de degradación espontánea. Esto resulta en una reducción significativa del tiempo de vida media de estas especies, hasta en un orden de magnitud.¹⁷⁴

En función del metal electroactivo, podemos encontrar diferentes tipos de SOD. La SOD de Cu y Zn (CuZn-SOD) está presente en el citoplasma celular, mientras que la SOD de Mn (Mn-SOD) está principalmente en las mitocondrias.^{175,176} Por otro lado, la SOD de Fe (Fe-SOD) se encuentra en células procariotas. Recientemente se ha descubierto la SOD de Ni (NiSOD),^{177,178} presente en bacterias como *Streptomyces*¹⁷⁹ y cianobacterias.¹⁸⁰ Estas diferentes formas de SOD desempeñan un papel crucial en la protección celular contra el estrés oxidativo en sus respectivos entornos. A continuación, estudiaremos la estructura y el mecanismo de cada uno de estos sistemas.

Superóxido dismutasa de Cu y Zn

La superóxido dismutasa de cobre y cinc ($\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$) fue estudiada por primera vez por Irwin Fridovich y Joe M. McCord en 1969. Ellos demostraron que una conocida proteína azul de cobre, la eritrocupreína, era capaz de catalizar la dismutación del radical superóxido.¹⁷² A partir de entonces, esta familia de enzimas pasaría a conocerse como superóxido dismutasa. Estas enzimas se encuentran principalmente en el citosol y el entorno extracelular de las células eucariotas.^{181,182}

La CuZn-SOD es una enzima dimérica con un peso molecular de aproximadamente 32 kDa. Cada una de sus unidades monoméricas contiene un centro activo con un átomo de cobre y otro de cinc, conectados a través del ligando puente imidazol de una histidina. En el centro activo, el cobre está coordinado por tres histidinas (His-96, His-98 e His-163) y débilmente unido a una molécula de agua, presentando una geometría de coordinación de pirámide de base cuadrada muy distorsionada. Por otro lado, el cinc está coordinado por dos histidinas (His-113, His-121 e His-124) y un residuo de aspartato (Asp-127)¹⁸³ que actúa como ligando bidentado, formando un tetraedro distorsionado (Figura 1.20).

En la reacción de catálisis de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$, cada metal del centro activo desempeña una función específica. El cobre actúa como metal electroactivo, encargado de la reducción y oxidación directa de los radicales superóxido, cambiando su estado de oxidación entre +2 y +1 a lo largo del ciclo catalítico. En cambio, el cinc tiene una función estructural y no participa directamente en la dismutación de los radicales superóxido.

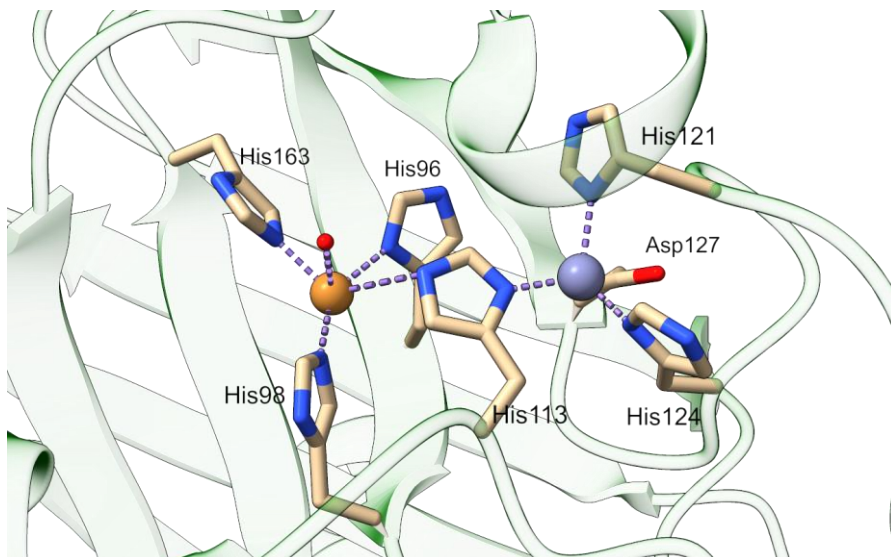


Figura 1.20: Representación esquemática de la estructura monomérica de la enzima Cu₂Zn₂-SOD, así como de su centro activo. (PDB 1AZV)¹⁸⁴

Este hecho se ha verificado al sustituir el cinc por otros cationes divalentes como Cu(II), Co(II), Cd(II) o Hg(II), observándose que la pérdida de actividad catalítica es mínima.¹⁸⁵ Por lo tanto, se considera que el papel del cinc está relacionado con la estabilización de la estructura de la proteína, permitiendo que mantenga su actividad en un amplio intervalo de pH.¹⁸⁴

Durante la primera semirreacción, la reducción de Cu(II) a Cu(I) debilita el enlace con la histidina puente (His-63), que cambia su modo de coordinación, quedando transitoriamente unida solo al Zn (Figura 1.21).¹⁸⁶ Este enlace se restablece en la segunda semirreacción del ciclo, cuando el Cu(I) vuelve a su forma oxidada Cu(II).

El segundo aspecto importante es la estructura del centro activo de la Cu₂Zn₂-SOD, fundamental para su función catalítica. El metal con actividad catalítica de este sistema proteico se encuentra en el fondo de una cavidad cónica de alrededor de 15 Å de profundidad, donde el cobre está expuesto en una posición lábil, mientras que el cinc está completamente cubierto por la

estructura de la proteína.¹⁸⁵ La cavidad cónica tiene un diámetro que se estrecha progresivamente hacia el fondo, limitado el acceso del solvente al complejo de Cu(II) y reduce su exposición al entorno. Esto garantiza que el cobre esté en la posición adecuada para su función catalítica. El radical superóxido, puede acceder al centro activo a través de esta cavidad, y el pequeño diámetro del fondo de esta facilita su interacción con el cobre.¹⁸⁵

Alrededor del centro activo, la Cu₂Zn₂-SOD presenta una serie de residuos altamente conservados entre especies, principalmente ácido glutámico y lisina, que están cargados a pH fisiológico. Estos aminoácidos generan un gradiente electrostático a lo largo de la estructura del centro activo. Este gradiente electrostático atrae al radical superóxido (que tiene carga negativa) hacia el interior de la cavidad, hasta el entorno cercano al cobre.¹⁸⁵ Este mecanismo contribuye significativamente a la eficacia de la enzima.

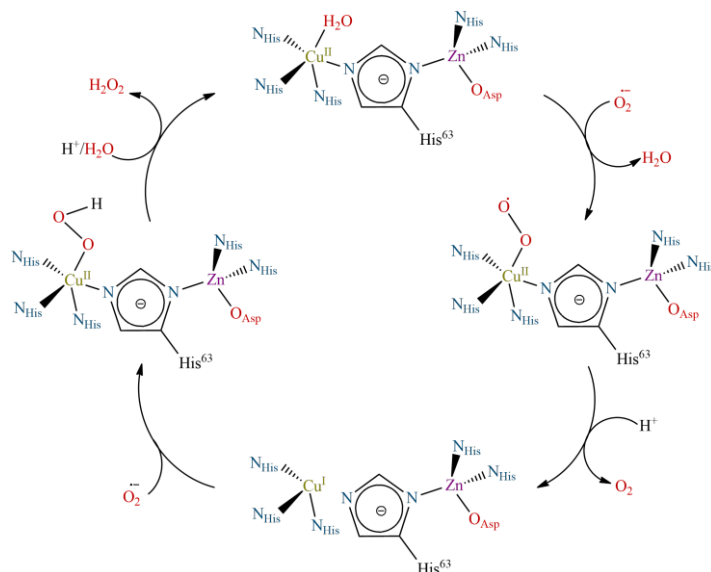


Figura 1.21: Representación esquemática del mecanismo propuesto para el ciclo catalítico de Cu₂Zn₂-SOD.^{186,187}

Finalmente, es importante destacar la influencia de las moléculas de agua en el proceso catalítico de la Cu₂Zn₂-SOD. Diversos autores han observado la

presencia de una cadena de moléculas de agua cuya posición es prácticamente invariable en todas las estructuras cristalográficas.¹⁸⁴ Esta cadena de agua conecta, a través de una red de enlaces de hidrógeno, el agua de coordinación con el disolvente, lo que podría jugar un papel esencial en la regulación de la actividad catalítica de la enzima.^{188,189}

Superóxido dismutasa de Mn

La superóxido dismutasa de manganeso (Mn-SOD), descubierta por primera vez por Fridovich y Handler en 1970,¹⁹⁰ es una metaloproteína que contiene un átomo de Mn (II) en su centro activo. Se encuentra presente en casi todos los seres vivos, desde bacterias hasta organismos eucariotas superiores y su distribución varía según el tipo de célula. En organismos eucariotas, se encuentra en la matriz mitocondrial, mientras que en las bacterias puede estar presente en todo el citosol. Su ubicación en el entorno mitocondrial la convierte en el principal sistema antioxidante celular, ya que estos orgánulos son una de las principales fuentes de radicales superóxido.¹⁹¹ Por lo tanto, cualquier alteración en la expresión o función de esta enzima puede tener repercusiones significativas en la salud celular y contribuir al desarrollo de diversas enfermedades.¹⁹²

A nivel estructural, la enzima Mn-SOD puede presentarse en forma dimérica, típicamente encontrada en bacterias, o en su forma tetramérica, más común en organismos eucariotas. En ambas formas, cada subunidad contiene un solo átomo de manganeso en su centro activo y se mantiene invariable (Figura 1.22). Este átomo de manganeso está unido a cuatro ligandos de la proteína, que consisten en tres histidinas y un residuo de aspartato, además de una molécula de agua, adoptando una geometría de bipirámide trigonal.¹⁷⁴

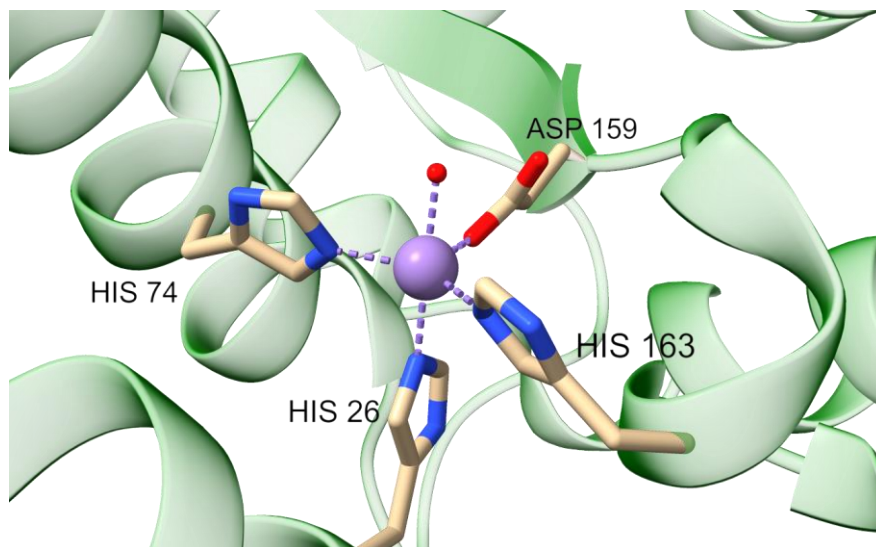


Figura 1.22: Representación esquemática de la estructura de la enzima MnSOD, así como el detalle de su centro activo. (PDB 2AW9)¹⁵⁸

El metal cataliza dismutaciones por un electrón en la enzima Mn-SOD. Al igual que en la enzima $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$, la dismutación de los radicales superóxido implica la participación del metal en su centro activo a través de un mecanismo cíclico de reducción y oxidación. Sin embargo, a diferencia de la enzima $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$, donde el metal varía entre los estados de oxidación +2 y +1, en la enzima Mn-SOD el manganeso varía entre los estados +3 y +2. Esta diferencia en los estados de oxidación del metal es la primera distinción en el mecanismo de acción entre estas dos enzimas.

La segunda diferencia significativa entre ambas enzimas Mn-SOD y $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ está en la forma en que el superóxido interactúa con el metal enzimático. En la enzima Mn-SOD, el $\text{O}_2^{\bullet-}$ se une al manganeso a través de su posición de coordinación insaturada (primera semirreacción), sin romper enlaces ni desplazar agua de coordinación (Figura 1.23). En cambio, en la enzima $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$, el superóxido reemplaza una molécula de agua en la primera semirreacción del ciclo. No hay consenso sobre el mecanismo exacto de la

segunda semirreacción (oxidación de Mn^{2+} de superóxido a H_2O_2),¹⁹³ pero algunos investigadores respaldan el modelo asociativo de esfera interna.^{187,193} Algunos estudios estructurales como los obtenidos de las MnSOD de *Caenorhabditis elegans* y de *Homo sapiens* (PDB ID 5AG2 y 5T30),^{194,195} respaldan un mecanismo de esfera interna en el que el superóxido se une directamente al manganeso reducido, como se ha observado con aniones análogos como el azida (N_3^-). Otros trabajos, sin embargo, proponen un mecanismo de esfera externa, en el que el superóxido reacciona sin coordinarse al metal.¹⁹⁶ En este modelo el radical superóxido podría captar un protón del agua de coordinación para formar una especie hidroxilada.^{181,187}

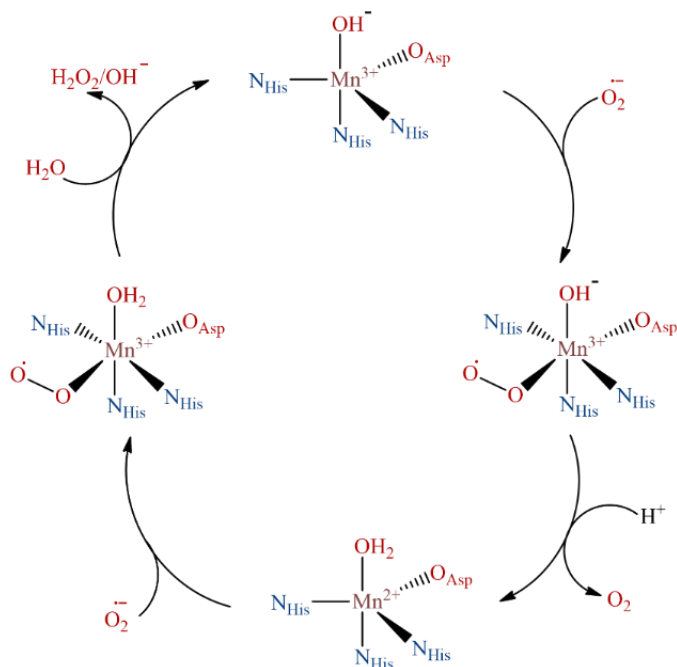


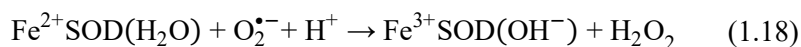
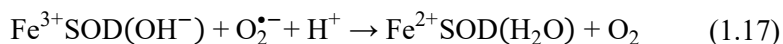
Figura 1.23: Representación esquemática del ciclo catalítico propuesto para la enzima Mn-SOD.^{187,193}

Aun así, evidencias recientes sugieren que el mecanismo de esfera externa es poco probable en estos sistemas, debido a la afinidad y comportamiento del anión hidropéroxido con iones metálicos trivalentes.⁹³ Asimismo, se ha

observado que el ligando axial del manganeso, que corresponde a una molécula de agua cambia su estado de protonación durante el ciclo catalítico: en el estado Mn (III) aparece como ion hidroxilo (OH^-), mientras que en el estado Mn (II) aparece como H_2O . Esta modulación refleja la estrecha relación entre la actividad catalítica y la dinámica del entorno de coordinación enzimático.

Superóxido dismutasa de Fe

Las enzimas Mn-SOD y Fe-SOD son muy similares entre sí, tanto en la organización general del apoenzima como en la estructura del centro activo, siendo la principal diferencia entre ambas el metal que se encuentra en dicho centro. La Fe-SOD es una enzima procariota presente principalmente en algunas bacterias y en el citosol de las plantas. Su estructura proteica es muy similar a la de la Mn-SOD: ambas son dímeros formados por la unión de dos monómeros de 22 kDa cada uno (Figura 1.24).¹⁹⁷ Cada monómero de Fe-SOD contiene un centro activo independiente, donde un átomo de hierro está coordinado por tres histidinas, un residuo de aspartato y una molécula de agua, adoptando una geometría de bipirámide trigonal. En esta disposición, una de las histidinas y el agua de coordinación ocupan las posiciones axiales del complejo, mientras que los otros residuos se sitúan en el plano ecuatorial.¹⁹⁸ En las ecuaciones 1.17 y 1.18 se resume la dismutación de los radicales superóxido catalizada por la Fe-SOD.



Al igual que en otras SOD, la dismutación del radical superóxido por la Fe-SOD sigue un mecanismo de "ping-pong", con alternancia entre los estados de oxidación +3 y +2 del hierro. Durante este proceso, el agua de coordinación

se desprotona al oxidarse el metal, de forma análoga a lo observado en la Mn-SOD (Figura 1.23).

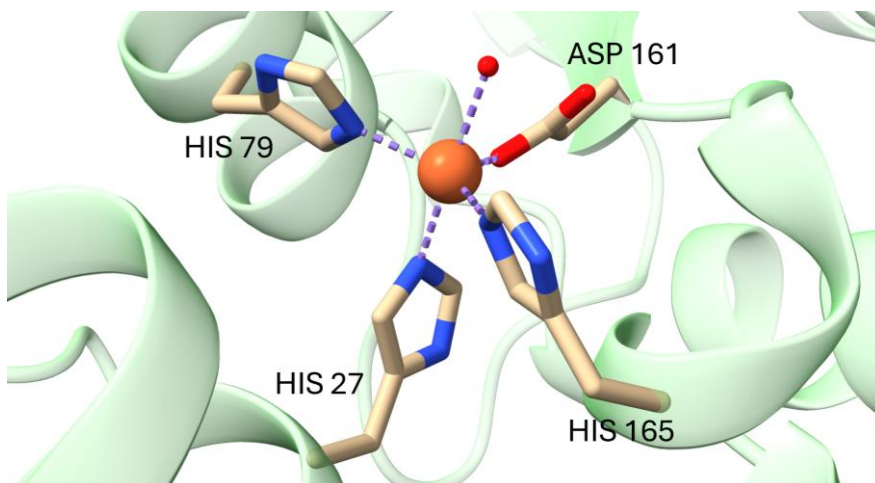


Figura 1.24: Representación de la estructura de la enzima FeSOD, así como de su centro activo. (PDB ID 1ISA)¹⁹⁷

Aunque existe una gran similitud entre las enzimas Fe-SOD y Mn-SOD tanto desde el punto de vista estructural como en su mecanismo catalítico, hay una diferencia significativa en cuanto a la selectividad del metal en el centro activo. Cuando se intercambia el hierro en la Fe-SOD por un átomo de manganeso, la actividad SOD del sistema no se mantiene y se ve significativamente reducida.¹⁷⁴ Esto indica que la afinidad y la eficiencia catalítica de cada enzima están estrechamente ligadas al metal específico presente en su centro activo, destacando la importancia del entorno químico particular que cada metal proporciona para la actividad enzimática óptima.

La diferencia en la actividad enzimática entre Fe-SOD y Mn-SOD se debe a los potenciales de reducción relativos de sus metales centrales. La reducción de Mn^{3+} a Mn^{2+} (conversión de un sistema d^4 a d^5) es más favorable que la de Fe^{3+} a Fe^{2+} (d^5 a d^6) debido a la repulsión electrónica en el hierro.^{199,200} Los potenciales de reducción del par $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ son entre 300 y 700 mV más altos

que los del par $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$, lo que también reduce la reactividad del manganeso en reacciones tipo Fenton en comparación con el hierro, haciéndolo más seguro en situaciones de estrés oxidativo.²⁰⁰ Sin embargo, esto disminuye la eficiencia del manganeso en la actividad SOD y evita que el manganeso pueda ser intercambiado por hierro en sus respectivas enzimas.

Ahora bien, para que un sistema tenga actividad SOD, su potencial de reducción debe situarse idealmente a medio camino entre los potenciales de las dos reacciones redox que cataliza: la reducción del superóxido a peróxido (890 mV frente a un electrodo normal de hidrogeno, NHE) y la oxidación del superóxido a oxígeno molecular (-160 mV NHE).²⁰⁰ Si el potencial es demasiado bajo, el sistema puede reducir el superóxido pero no extraer electrones. Si es demasiado alto, puede oxidar el superóxido pero no transferir los electrones que haya ganado a una segunda molécula de superóxido. La autonomía de las SODs en su funcionamiento antioxidante radica en su capacidad de operar sin depender de fuentes externas de electrones.

El potencial medio de reducción del hexaacu complejo de Fe^{3+} es de 770 mV, situado entre las dos reacciones a catalizar, pero por encima del punto medio. La estructura de la enzima Fe-SOD ajusta el entorno de coordinación del hierro para reducir su potencial de reducción justo al valor medio, optimizando su actividad SOD. En contraste, el hexaacu complejo de Mn^{3+} tiene un potencial de reducción mucho mayor (1510 mV), lo que obliga a la enzima Mn-SOD a generar un entorno que reduzca significativamente su potencial para alcanzar la eficiencia necesaria en la actividad SOD (Figura 1.25).^{201,202}

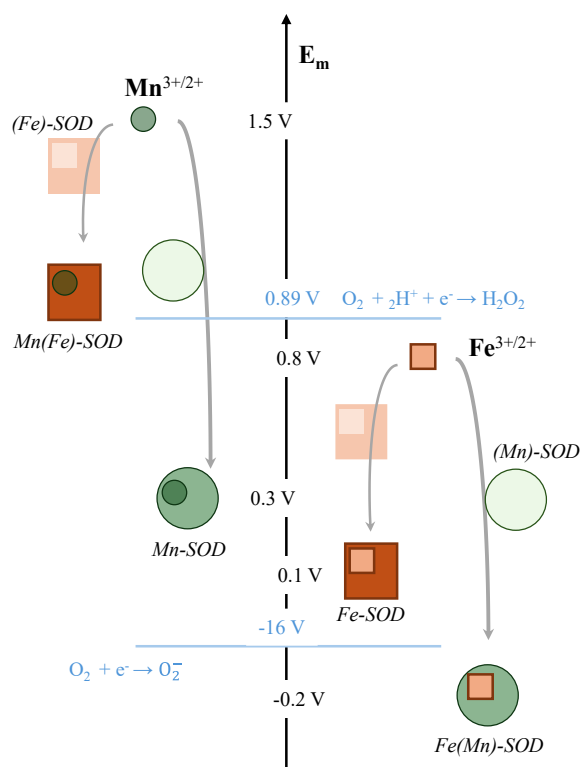
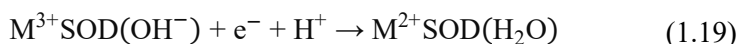


Figura 1.25: Representación de los potenciales medios de la reducción de los pares $\text{Mn}^{3+}/\text{Mn}^{2+}$ y $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ para los sistemas libres y cuando están coordinados por las enzimas Mn-SOD y Fe-SOD. Adaptación del trabajo de Miller et al.²⁰⁰

Cambiar el metal en las enzimas Fe-SOD y Mn-SOD resulta en sistemas inactivos debido a que no logran ajustarse al intervalo deseado de potencial. La Fe-SOD no puede reducir suficientemente el potencial al introducir manganeso en lugar de hierro, mientras que la Mn-SOD no puede mantener un potencial adecuado al sustituir el manganeso por hierro. Esta diferencia se debe a cómo cada proteína afecta la protonación del hidroxilo coordinado al metal durante la reducción de la forma oxidada M^{3+} .^{200,201,203}



Las enzimas SOD de Mn y Fe utilizan estrategias opuestas para ajustar el potencial de reducción de los metales que contienen. La enzima Mn-SOD

dificulta la protonación del hidroxilo coordinado al metal, lo que favorece la forma trivalente del manganeso y reduce significativamente su potencial de reducción. Al contrario, la enzima Fe-SOD facilita la protonación del hidroxilo coordinado al hierro, lo que estabiliza la forma trivalente del metal, pero en menor medida que la enzima Mn-SOD.²⁰¹⁻²⁰⁴ Estas diferencias en las estrategias de protonación contribuyen a las variaciones en el potencial de reducción de las enzimas SOD de Mn y Fe.

1.5.2 Miméticos de la SOD

Un compuesto modelo o mimético de una metaloproteína es un complejo metálico que imita la estructura, propiedades o función del centro activo de una enzima. Estos miméticos son interesantes por dos razones: proporcionan información sobre los mecanismos catalíticos de la enzima nativa y pueden desempeñar funciones similares en aplicaciones químicas, biomédicas y farmacéuticas. En el ámbito farmacéutico, los miméticos de metaloproteínas son especialmente importantes porque muchas enfermedades se deben a la carencia, exceso o disfunción de enzimas específicas.²⁰⁵⁻²⁰⁷ Suministrar la enzima correcta en la cantidad apropiada tiene un efecto terapéutico y un potencial uso como fármaco. Sin embargo, a veces es difícil suministrar enzimas directamente debido a problemas de obtención, purificación, degradación o porque no atraviesan la membrana celular. Por lo tanto, la introducción de nuevos sistemas miméticos es esencial para compensar la deficiencia de antioxidantes y tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo.

En las últimas décadas, los investigadores han centrado sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos sistemas antioxidantes, determinando aspectos fundamentales para que el tratamiento sea efectivo. Entre los requisitos más importantes, los antioxidantes deben ser compuestos de bajo peso molecular,

con capacidad ionófora y, por su puesto, mostrar actividad antioxidante.^{208,209} Además, en los últimos años se han introducido sistemas con capacidad SOD en ausencia de un metal activo.²¹⁰ Sin embargo, hasta el momento, la mayor parte de los trabajos se han centrado en el estudio de los miméticos de las familias Mn-SOD y Cu₂Zn₂-SOD.²¹¹

Miméticos de la enzima Mn-SOD

Aunque la actividad SOD de los complejos de Mn(II) se identificó a finales de los años 70, la síntesis y caracterización de miméticos de Mn-SOD con aplicaciones terapéuticas comenzó en la década de 1990. Investigadores pioneros como Dennis P. Riley, Inés Batinić-Haberle e Irwin Fridovich fueron responsables del desarrollo de complejos de manganeso con ligandos azamacrocíclicos y porfirínicos con el mayor potencial terapéutico obtenido hasta el momento. De esta familia de complejos destacan los compuestos basados en el pentaazaciclopentadecano, estudiados por Riley (Figura 1.26),^{182,212,213} por su potencial para tratar enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, con algunos derivados que presentan una constante catalítica comparable a las enzimas Mn-SOD nativas.²¹⁴

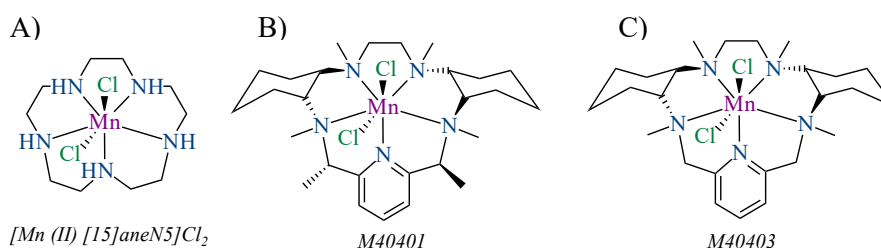


Figura 1.26: Representación esquemática de los complejos de Mn (II) con el ligando [15]aneN5 y algunos de sus derivados.^{182,212}

A lo largo del tiempo, varios autores han realizado modificaciones en la estructura de los ligandos utilizados en los miméticos de la enzima Mn-SOD (Figura 1.27). Una de las alteraciones más notables es la adición de cadenas

con grupos dadores adicionales en el macrociclo. Estos grupos, además de coordinar al metal, crean un entorno hidrófobo en el centro de coordinación (como piridinas, indoles, benzoimidazoles, etc.), favoreciendo la actividad SOD de los sistemas.²¹⁵ Otra alteración estructural relevante implica la apertura de la cadena.

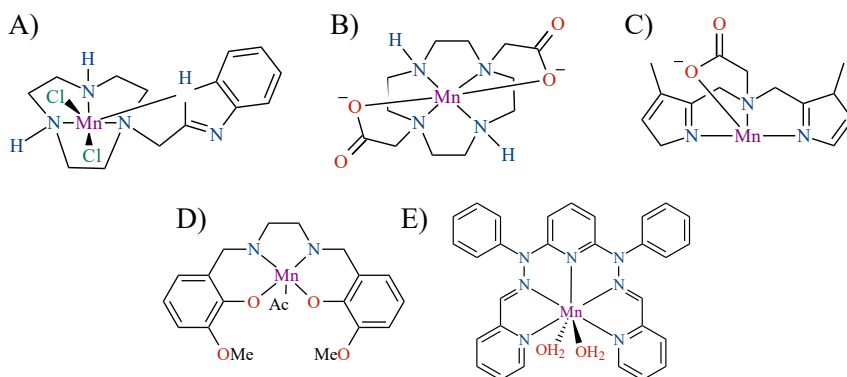


Figura 1.27: Complejos de Mn(II) con actividad SOD de A) Shen et al.,²¹⁵ B) Valtancoli et al.,²¹⁶ C) Mahy et al.,²¹⁷ D) Ghosh et al.²¹⁸ y Salvemini.²¹³

Miméticos de la enzima $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$

Los miméticos de la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ son un grupo importante de complejos con actividad SOD. La mayoría de los esfuerzos para reproducir el centro activo de las $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ se han centrado en imitar la enzima superóxido dismutasa de cobre y cinc, tratando de reproducir estructuralmente el centro activo de la enzima mediante la síntesis de complejos binucleares con un puente imidazol, que conecta bien dos átomos de cobre, o un átomo de cobre y otro de cinc (Figura 1.28).²¹⁹⁻²²⁴ El puente imidazolato es un motivo estructural visualmente llamativo; sin embargo, su función es principalmente estructural y contribuye poco a la reactividad.

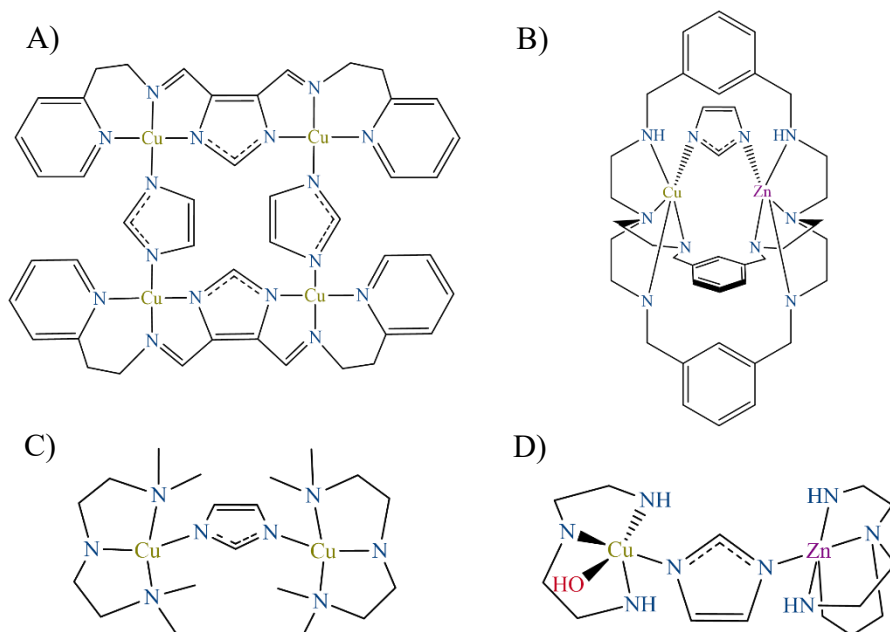


Figura 1.28: Representación de diversos complejos binucleares de Cu(II) o Cu(II)- Zn(II) descritos por A) Lippard et al.,²¹⁹ B) Rey et al.,²²³ C) Lehn et al.^{220,221} y D) Kiss et al.²²⁴

El diseño de miméticos de enzimas $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ sigue la misma filosofía que rige en los sistemas biológicos: imitar la estructura del centro activo para lograr una función similar. Sin embargo, en los últimos años, ha habido un enfoque diferente: diseñar complejos de Cu(II) sin similitud estructural con el centro activo de la enzima $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ y evaluar su capacidad como catalizadores de la dismutación del superóxido. Este enfoque ha resultado en una variedad de complejos mononucleares, binucleares e incluso trinucleares que, aunque carecen de similitud estructural con la $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{-SOD}$ nativa, presentan actividad catalítica frente al anión superóxido.²²⁵⁻²²⁷ Dentro de estas áreas de trabajo, una de las más desarrollada hasta el momento se basa en el uso de ligandos azamacrocíclicos.

1.6 Una nueva perspectiva

Las poliaminas azamacrocíclicas destacan por su gran versatilidad como ligandos, derivada de su elevada flexibilidad estructural, la posibilidad de introducir múltiples grupos dadores, y su capacidad para modular el entorno electrónico del metal central.²²⁸⁻²³⁰ Esta versatilidad las convierte en plataformas ideales para diseñar complejos con propiedades específicas, ajustando tanto la geometría de coordinación como el potencial redox del ion metálico. Además, su carácter polifuncional y su buena biocompatibilidad han impulsado su aplicación en campos tan diversos como la catálisis, la biomedicina y la química supramolecular.

En el Grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (GQS-UV) se han sintetizado diferentes familias de poliaminas macrocíclicas con propiedades ajustadas a distintas aplicaciones, desde sistemas para el reconocimiento molecular hasta agentes para la liberación controlada de fármacos y sistemas antioxidantes (Figura 1.29). Entre estas familias destacan los derivados funcionalizados con piridinas, pirimidinas, carboxilatos o grupos aromáticos, que permiten modular tanto la solubilidad como la selectividad de coordinación hacia distintos metales de interés biológico.²³⁰⁻

241

Una línea destacada dentro de esta investigación ha sido el desarrollo de miméticos de SOD. A partir de ligandos macrocíclicos como los que aparecen en la Figura 1.29, se han diseñado y evaluado complejos metálicos con Mn (II) y Cu (II), que presentan actividad SOD tanto *in vitro* como *in vivo*.²⁴²⁻²⁴⁴ Distintas modificaciones estructurales han permitido mejorar su capacidad de dismutar radicales superóxido y ajustar el potencial de reducción del metal central, logrando valores compatibles con los de las enzimas nativas.

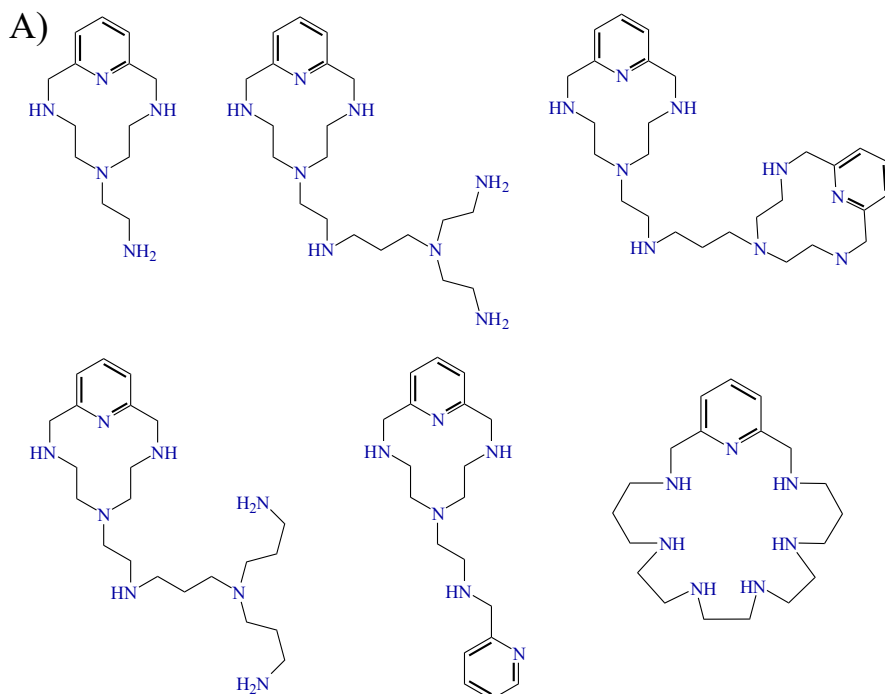


Figura 1.29: Representación de diversos ligandos desarrollados por el grupo GQS-UV. (A) Estructura del ligando denominado *pytren* (**L**), el cual ha sido funcionalizado con diferentes grupos para dar lugar a otros ligandos derivados.²⁴²⁻²⁴⁴

Aunque se han logrado avances significativos, aún queda mucho por explorar en el diseño de nuevas poliaminas que den lugar a miméticos más eficaces y estables en condiciones fisiológicas. En este contexto, los ligandos presentados en esta tesis supondrían un avance al integrar elementos estructurales y estrategias orientadas a favorecer el autoensamblaje, aumentando así su versatilidad biológica. El objetivo es analizar cómo estas modificaciones afectan la actividad SOD, así como la influencia de las cadenas hidrocarbonadas en la formación de ensamblajes supramoleculares.

La estrategia para diseñar y sintetizar los nuevos compuestos se centra en modificar el azamacrocíclico piridínico general (Figura 1.29, A), siguiendo principios básicos de diseño.

1.6.1 Diseño de nuevos miméticos. Aspectos a tener en cuenta

Para diseñar ligandos efectivos para miméticos de SOD, es fundamental considerar tanto su modo de coordinación con el metal como su capacidad para facilitar el ciclo redox durante la catálisis de dismutación del superóxido. El átomo metálico constituye el núcleo de cualquier mimético de SOD, por lo que el diseño debe enfocarse en su modo de coordinación. Durante la dismutación del superóxido, el metal debe alternar cíclicamente entre su forma oxidada y reducida, por lo que requiere que el ligando pueda complejarlo en ambas formas. La afinidad entre el ligando y el metal debe ser equilibrada: una interacción demasiado débil puede liberar el metal al medio, reduciendo la actividad SOD y aumentando el estrés oxidativo; una interacción demasiado fuerte puede estabilizar en exceso el complejo, bloqueando el ciclo catalítico. Por lo tanto, la intensidad de la interacción entre ambos elementos del sistema debe mantenerse dentro de valores límite de estabilidad.

En este aspecto, es importante tener en cuenta la influencia del ligando sobre el potencial redox del metal. Para que el mimético de la SOD tenga actividad dismutasa, el potencial de reducción del metal debe situarse alrededor de 0.35 V frente al electrodo normal de hidrógeno (NHE), resultado de la semisuma de los potenciales formales de reducción y oxidación del superóxido. Sin embargo, algunos autores, como D. Salvemini, recomiendan que los miméticos tengan potenciales ligeramente superiores a 0.35 V para favorecer la reacción de oxidación inicial del superóxido. Esto desfavorece la segunda semirreacción del ciclo catalítico y con ello la generación de peróxido de hidrógeno y, por tanto, de especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de este proceso.²⁴⁵

Geometría de coordinación

Otro aspecto importante a tener en cuenta en el diseño de miméticos de SOD es la geometría

y las tensiones estructurales del centro metálico. En las diferentes formas de SOD, los ligandos coordinados al metal presentan una gran rigidez conformacional, lo que obliga al metal a adaptarse a la forma del centro de coordinación. Esto provoca tensiones estructurales que desestabilizan parcialmente el complejo metálico, conocido como *estado entático*, lo que es fundamental para la eficacia catalítica de la enzima.

El estado entático reduce la diferencia energética entre el complejo metálico y el estado de transición de la reacción, disminuyendo la barrera energética y aumentando la velocidad de catálisis. Por lo tanto, al diseñar nuevos miméticos de SOD, es importante que sean capaces de coordinar el metal con suficiente rigidez para inducir un estado entático, acelerando así la velocidad de dismutación del superóxido.

Índice de coordinación del metal

La tercera característica clave del centro de coordinación en miméticos de SOD es el índice de coordinación del metal. En las enzimas superóxido dismutasa, el metal presenta un índice de coordinación relativamente bajo, lo que facilita la entrada y salida de sustratos y productos, permitiendo una rápida interacción del superóxido con el centro activo metálico y evitando así su saturación completa. Esta facilidad de acceso es esencial para mantener una alta velocidad de dismutación, proceso en el cual dos moléculas de superóxido se transforman en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Por lo tanto, para mejorar la actividad dismutasa, el ligando diseñado no debe saturar completamente las

posiciones de coordinación del metal, pero tampoco debe estar demasiado insaturado, para conseguir formar complejos estables.

Presencia de residuos auxiliares

El cuarto factor importante en el diseño de miméticos de SOD se centra en el entorno del centro de coordinación. Más allá del complejo metálico, el sitio activo de las enzimas SOD incluye residuos que facilitan la entrada del superóxido y otros procesos catalíticos. Por lo tanto, introducir grupos que estabilicen y orienten el superóxido en el centro activo del mimético puede ser una estrategia efectiva para mejorar la actividad del sistema.

Visto el estado del arte, queda claro que, aunque se han conseguido avances importantes en el diseño de miméticos de SOD y en sistemas de transporte capaces de atravesar la BHE, aún existen retos significativos por superar. La aplicación de principios de Química Supramolecular, como el autoensamblaje y la funcionalización dirigida, ofrece un enfoque prometedor para mejorar la especificidad y la eficacia de estos compuestos. En particular, la incorporación de cadenas hidrofóbicas y la metilación de aminas en estructuras macrocíclicas, junto con el desarrollo de nanoensamblajes supramoleculares, puede optimizar tanto la actividad catalítica como la capacidad de transporte. Por ello, esta tesis propone aprovechar las herramientas y conceptos de la Química Supramolecular para diseñar miméticos de SOD que superen las limitaciones actuales y contribuyan al avance de tratamientos para enfermedades neurodegenerativas y trastornos asociados al estrés oxidativo.

1.6.2 Actividad catalítica de la reacción química de clic de cicloadición catalizada por surfactantes de cobre azida-alquino [3 + 2] en agua

Con el objetivo de ampliar las aplicaciones de los sistemas diseñados, se decidió explorar su desempeño en reacciones de interés sintético. En este contexto, se estableció una colaboración con el grupo del Profesor Lahoucine Bahsis, Universidad Cadi Ayyad, para estudiar la reacción de cicloadición azida-alquino [3 + 2], catalizada por surfactantes de Cu(II) en medio acuoso, una transformación clave dentro de la denominada *química de "clic"* (Figura 1.30).

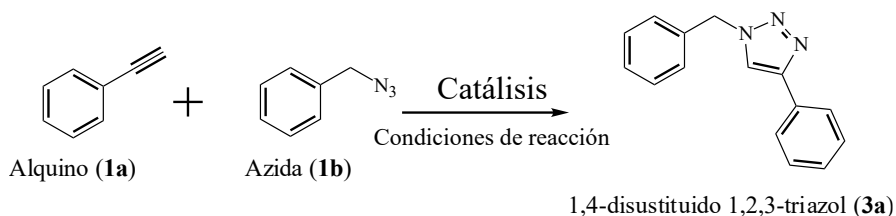


Figura 1.30: Reacción de CuAAC catalizada por tensioactivos que contienen Cu(II).

Este enfoque no solo se alinea con los principios de la química verde, sino que también promueve el desarrollo de metodologías catalíticas sostenibles, en las que el agua actúa como medio de reacción alternativo y ecológico.²⁴⁶ Sin embargo, el entusiasmo por incorporar agua en los diseños experimentales ha recibido ciertas críticas. Esto se debe en parte a la confusión en la literatura respecto a términos como "*en el agua*", "*con agua*" y "*sobre el agua*".²⁴⁷ Si bien el uso de agua como solvente ofrece varias ventajas, incluido el bajo costo, la no toxicidad y facilidad de manejo, los contraargumentos en contra de su uso con frecuencia se centran en cuestiones posteriores, como la cantidad de disolventes orgánicos que aún se requieren, los problemas con el aislamiento del producto y la pérdida del catalizador. De hecho, mientras que la catálisis homogénea en medios orgánicos ya es importante en la química

verde, Sheldon sugirió que la solución del catalizador debería permanecer en el reactor.²⁴⁸ Como resultado, el concepto de reciclaje de catalizadores y, por lo tanto, la reducción de disolventes orgánicos, son objetivos prácticos valiosos. Recientemente, un interesante campo de estudio llamado "*Química de los medios micelares acuosos*" examina cómo la presencia de micelas, agregados de moléculas de surfactante en solución, afecta a diversas reacciones y procesos químicos.^{249,250} El conocimiento fundamental de los sistemas micelares y sus efectos en la cinética de reacción, la termodinámica y los equilibrios forma la base de las nuevas leyes y principios que regulan la química en tales entornos.²⁵¹ Las concentraciones de reactivos pueden aumentar significativamente cuando los reactivos se concentran dentro de los núcleos hidrofóbicos de las micelas. Esto puede aumentar considerablemente la velocidad de reacción de compuestos hidrofóbicos poco solubles. El cambio en el entorno local dentro de la micela puede ayudar a catalizar las reacciones, involucrando iones o moléculas polares, estabilizando estados de transición o especies intermedias.²⁵²

Las interacciones y fenómenos que surgen cuando las partículas interactúan entre sí a escala nanométrica se denominan efecto "nano a nano".²⁵³ En el contexto de la catálisis heterogénea, donde las nanopartículas pueden actuar como transportadores o sitios activos para reacciones catalíticas, este fenómeno es especialmente relevante.²⁵³ MacMillan se ha mostrado optimista respecto a las innovaciones en la química de los surfactantes y sistemas micelares, pese a los desafíos como los problemas de solubilidad de los compuestos hidrofóbicos.²⁵⁴ Estos nuevos desarrollos pueden ayudar a abordar los problemas de solubilidad y facilitar mucho las reacciones que de otro modo serían complicadas en un entorno acuoso. A partir de estos avances, se desarrollan nuevas técnicas y aplicaciones que consolidan la síntesis en agua como una metodología prometedora en Química Orgánica.²⁵⁵

El descubrimiento de las reacciones químicas de clic, en particular la reacción de cicloadición de azida-alquino [3+2] catalizada por cobre (CuAAC), ha beneficiado enormemente a varios campos, como la química orgánica, la ciencia de los materiales, la química de polímeros y el desarrollo de fármacos. Se ha demostrado la eficiencia, selectividad y adaptabilidad de la reacción de clic CuAAC. La combinación de la química de clic con otras estrategias sintéticas, como el fotoclic o las reacciones electroquímicas, podría dar lugar a materiales funcionales avanzados y mejorar los sistemas de administración de fármacos. En este trabajo se presenta el estudio de la actividad catalítica de nuevos surfactantes de Cu(II), derivados de ligandos aza-macrocíclicos, en la reacción CuAAC, variando la concentración del tensioactivo de Cu(II). Los tensioactivos de Cu(II) muestran buena actividad catalítica en el clic de 1,2,3-triazol y alta regioselectividad en la formación de isómero 1,4 en agua a temperatura ambiente.

1.7 Bibliografía

- [1] Lehn J.-M. *From Molecular to Supramolecular Chemistry. In Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd, 1995; pp 1–9.
- [2] Lehn J.-M.; *Angewandte Chemie International Edition in English*; **1988**; 27; 89–112.
- [3] Steed J. W.; Atwood J. L.; *Supramolecular Chemistry*; John Wiley & Sons; 2013.
- [4] Cragg P. J.; *Supramolecular Chemistry. In Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Ltd; 2016; pp 1–42.
- [5] Glusker J. P. *Directional Aspects of Intermolecular Interactions. In Design of Organic Solids*; Weber E.; Aoyama Y.; Caira M. R.; Desiraju G. R.; Glusker J. P.; Hamilton A. D.; Meléndez R. E.; Nangia A.; Eds. Springer: Berlin, Heidelberg, 1998; pp 1–56.
- [6] Braga D.; Grepioni, F.; *Acc. Chem. Res.*; **2000**; 33; 601–608.
- [7] Beer P. D.; Gale P. A.; Smith D. K.; Smith D. of C. D. K.; *Supramolecular Chemistry*; Oxford University Press; 1999.
- [8] Jorgensen W. L.; Pranata J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**; 112; 2008–2010.
- [9] Rotello V. M.; *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry By Jonathan W. Steed (Durham University, U.K.), David R. Turner (Monash University, Australia), and Karl J. Wallace (University of Southern Mississippi).*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester; **2007**.
- [10] Atwood J. L.; Steed J. W.; *Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*; CRC Press, 2004.
- [11] Southall N. T.; Dill K. A.; Haymet A. D. J.; *J. Phys. Chem. B*; **2002**; 106; 521–533.
- [12] Schneider H.-J.; Yatsimirsky A. K.; *Chem. Soc. Rev*; **2008**; 37; 263–277.
- [13] Fischer E.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1894**; 27; 2985–2993.
- [14] Suckling, C. J. *Molecular Recognition — A Universal Molecular Science? Experientia*; Springer Netherlands; 1991, 47, 1093–1095.
- [15] Gellman S. H.; *Chem. Rev.*; **1997**; 97; 1231–1232.
- [16] Aoyama Y.; *Supramolecular Chemistry*; Eds. Balzani V.; De Cola L.; Kluwer, Dordrecht; 1992; p. 27.
- [17] Lehn J.-M.; *Angewandte Chemie International Edition in English*; **1990**; 29; 1304–1319.
- [18] Kraut J.; *Science*; **1988**; 242; 533–540.
- [19] Leeuwen P. W. N. M. van; Raynal M.; *Supramolecular Catalysis: New Directions and Developments*; John Wiley & Sons; **2022**.

- [20] Lodish H.; *Biología celular y molecular*; Ed. Médica Panamericana, 2005.
- [21] García L. F. J.; *La biología celular y molecular del aparato de golgi*; Plaza y Valdes; 1997.
- [22] Lehn J.-M.; *Science*; **2002**; 295; 2400–2403.
- [23] Fujita M.; Yazaki J.; Ogura K.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1990**; 112; 5645–5647.
- [24] National Nanotechnology Initiative. (2016). *2016 NNI Strategic Plan*. **2016**
- [25] Rojas-Aguirre Y.; Aguado-Castrejón K.; González-Méndez I.; *Educ. Quím.*; **2016**; 27; 286–291.
- [26] Malik S.; Muhammad K.; Waheed Y.; *Molecules*; **2023**; 28; 661.
- [27] Bhushan B.; *Handbook of Nanotechnology*; Springer; 2017.
- [28] Roco M. C.; Mirkin C. A.; Hersam M. C.; *J. Nanopart. Res.*; **2011**; 13; 897–919.
- [29] McNeil S.E.; *J. Leukoc. Biol.*; **2005**; 78; 585–594.
- [30] Kumar A.; Mansour H. M.; Friedman A.; Blough E. R., Eds.; *Nanomedicine in Drug Delivery*; CRC Press; **2013**.
- [31] Freitas R. A.; *Nanomedicine*; **2005**; 1; 2–9.
- [32] Duncan R.; Gaspar R.; *Mol. Pharmaceutics*; **2011**; 8; 2101–2141.
- [33] Li Z.; Tan S.; Li S.; Shen Q.; Wang K.; *Oncol. Rep.*; **2017**; 38; 611–624.
- [34] Ruiz M. E.; Gantner M. E.; Talevi A.; *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.*; **2014**; 9; 99–128.
- [35] Kumari P.; Ghosh B.; Biswas S.; *J. Drug Target.*; **2016**; 24; 179–191.
- [36] Xia W.; Tao Z.; Zhu B.; Zhang W.; Liu C.; Chen S.; Song M.; *Int. J. Mol. Sci.*; **2021**; 22; 9118.
- [37] Pérez-Herrero E.; Fernández-Medarde A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; **2015**; 93; 52–79.
- [38] Dong P.; Rakesh K. P.; Manukumar H. M.; Mohammed Y. H. E.; Karthik C. S.; Sumathi S.; Mallu P.; Qin H.-L.; *Bioorg. Chem.*; **2019**; 85; 325–336.
- [39] Amr S. S.; Tbakhi A.; *Ann. Saudi Med.*; **2007**; 27; 305–307.
- [40] Tibi S.; *J. R. Soc. Med.*; **2006**; 99; 206–207.
- [41] Reza Rezaie H.; Esnaashary M.; Aref Arjmand A.; Öchsner A.; *A Review of Biomaterials and Their Applications in Drug Delivery*. Springer Briefs in Applied Sciences and Technology; **2018**; 1-65.
- [42] Torchilin V. P.; *Pharm. Res.*; **2007**; 24; 1–16.
- [43] Langer R.; *Nature*; **1998**; 392; 5–10.
- [44] Hanahan D.; Weinberg R. A.; *Cell.*; **2011**; 144; 646–674.
- [45] Bozzuto G.; Molinari A.; *Int. J. Nanomed.*; **2015**; 10; 975–999.
- [46] Gao W.; Zhang L.; *J. Drug Target.*; **2015**; 23; 619–626.
- [47] Yokoyama M.; *J. Artif. Organs*; **2005**; 8; 77–84.
- [48] You G.; Morris M. E.; *Drug Transporters: Molecular Characterization and Role in Drug Disposition*; John Wiley & Sons; **2022**.

- [49] Golan D. E.; Armstrong E. J.; Armstrong A. W.; *Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy*; Wolters Kluwer; **2017**.
- [50] Di L.; Kerns E. H.; & Carter G. T.; *Curr Pharm Des.*; **2009**; 15; 2184-2194.
- [51] Ayrton A.; Morgan P.; *Xenobiotica*; **2008**; 38; 676-708.
- [52] Zhou SF.; Wang LL.; Di YM.; Xue CC.; Duan W.; Li CG.; et al.; *Curr Med Chem.*; **2008**; 15; 1981-2039.
- [53] World Health Organization.; *Los trastornos neurológicos afectan a millones de personas en todo el mundo: informe de la OMS.*; Organización Mundial de la Salud; 2024.
- [54] Saraiva C.; Praça C.; Ferreira R.; Santos T.; Ferreira L.; Bernardino L.; *J. Control. Release.*; **2016**; 235; 34-47.
- [55] Oller-Salvia B.; Sánchez-Navarro M.; Giralt E.; Teixidó M.; *Chem. Soc. Rev.*; **2016**; 45; 4690-4707.
- [56] Malcor J.-D.; Payrot N.; David M.; Faucon A.; Abouzid K.; Jacquot G.; Floquet N.; Debarbieux F.; Rougon G.; Martinez J.; Khrestchatsky M.; Vlieghe P.; Lisowski V.; *J. Med. Chem.*; **2012**; 55; 2227-2241.
- [57] Böckenhoff A.; Cramer S.; Wölte P.; Knieling S.; Wohlenberg C.; Gieselmann V.; Galla H.-J.; Matzner U.; *J. Neurosci.*; **2014**; 34; 3122-3129.
- [58] Agrawal M.; Ajazuddin; Tripathi D. K.; Saraf S.; Saraf S.; Antimisiaris S. G.; Mourtas S.; Hammarlund-Udenaes M.; Alexander A.; *J. Control. Release*; **2017**; 260; 61-77.
- [59] Asimakidou E.; Tan J.K.S.; Zeng J.; Lo C.H.; *Pharmaceutics.*; **2024**; 17; 612.
- [60] Rivero Morey R. J.; Ramírez Morfa C. A.; Rivero Morey, J.; Univ. Méd. Pinareña; **2020**; 16; 389-389.
- [61] Ogawa K.; Kato N.; Kawakami S.; *Chem. Pharm. Bull.*; **2020**; 68; 567-582.
- [62] Kalyanasundaram K.; *Photochemistry in Microheterogeneous Systems*; Elsevier; 2012.
- [63] Vincent B.; *Adv Colloid Interface Sci.*; **2014**; 203; 51-54.
- [64] Li H.; Hu D.; Liang F.; Huang X.; Zhu Q.; *R. Soc. Open Sci.*; **2020**; 7; 192092.
- [65] Wu Y.-P.; Zhou W.; Zhao J.; Dong W.-W.; Lan Y.-Q.; Li D.-S.; Sun C.; Bu X.; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2017**; 56; 13001-13005.
- [66] Wong F. W. F.; Ariff A. B.; Stuckey D. C.; *Crit Rev Biotechnol.*; **2018**; 38; 31-46.
- [67] Yin K.; Zeng X.; Liu W.; Xue Y.; Li X.; Wang W.; Song Y.; Zhu Z.; Yang, C.; *Anal. Chem.*; **2019**; 91; 6003-6011.

- [68] Liu K.; Zheng L.; Ma C.; Göstl R.; Herrmann A.; *Chem. Soc. Rev.*; **2017**; 46; 5147–5172.
- [69] Moroi Y.; *Micelles: Theoretical and Applied Aspects*; Springer Science & Business Media; 1992.
- [70] Lindman B.; Wennerström H.; *Top Curr Chem*; **1980**; 87; 1–87.; Naqvi A. Z.; Khatoon S.; Kabir-ud-Din.; *J. Solut. Chem.*; **2011**; 40; 643–655.; Palladino P.; Ragone R.; *Langmuir*; **2011**; 27; 14065–14070.; Alam Md. S.; Mohammed Siddiq A.; Mythili V.; Priyadharshini M.; Kamely N.; Mandal A. B.; *J. Mol. Liq.*; **2014**; 199; 511–517.; Pisárčik M.; Devínsky F.; Pupák M.; *Open Chem.*; **2015**; 13; 000010151520150103.; Chi X.; Peters G. M.; Brockman C.; Lynch V. M.; Sessler J. L.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2018**; 140; 13219–13222.; He S.; Xu B.; Zhang Y.; *J. Surfactants Deterg.*; **2019**; 22; 1269–1277.
- [71] Song S.; Song A. y Hao J.; *RSC Advances*; **2014**; 4, 41864–41875.
- [72] Piñeiro L.; Novo M.; Al-Soufi W.; *Adv. Colloid Interface Sci.*; **2015**; 215; 1–12.
- [73] Scholz N.; Behnke T.; Resch-Genger U.; *J. Fluoresc.*; **2018**; 28; 465–476.
- [74] Sternhagen G. L.; Gupta S.; Zhang Y.; John V.; Schneider G. J.; Zhang D.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2018**; 140; 4100–4109.
- [75] Kalyanasundaram K.; Thomas J. K.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1977**; 99; 2039–2044.
- [76] Hutchinson J. A.; Burholt S.; Hamley I. W.; Lundback A.-K.; Uddin S.; Gomes dos Santos A.; Reza M.; Seitsonen J.; Ruokolainen J.; *Bioconjugate Chem.*; **2018**; 29; 2296–2308.
- [77] Son S.; Shin E.; Kim B.-S.; *Biomacromolecules*; **2014**; 15; 628–634.
- [78] Hussain E.; Niu N.; Zhou H.; Shahzad S. A.; Yu C.; *Analyst*; **2018**; 143; 4283–4289.
- [79] Dominguez A.; Fernandez A.; Gonzalez N.; Iglesias E.; Montenegro L.; *J. Chem. Educ.*; **1997**; 74; 1227.
- [80] Aniansson G. E. A.; *J. Phys. Chem.*; **1978**; 82; 2805–2808.
- [81] Schick M. J.; *Micellization, Solubilization, and Microemulsions*, Vols. 1 and 2, Mittal K. L. (Ed.); J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed.; 1978; 16; 153–154.
- [82] Muller N.; In *Micellization, Solubilization and Microemulsions* (Vol. 1, 229); Mittal K. L. (Ed.); Plenum Press.; 1977.
- [83] Montenegro L.; Influencia de no electrolitos y surfactantes no iónicos en la estructura y formación de micelas de SDS: Reactividad de Nitrosocompuestos en estos medios. Ph.D. tesis; Universidad de la Coruña; 1996.
- [84] Nash T.; *Nature*; **1958**; 182; 1536–1536.

- [85] Missel P. J.; Mazer N. A.; Benedek G. B.; Young C. Y.; Carey M. C.; *J. Phys. Chem.*; **1980**; 84; 1044–1057.
- [86] La Mesa C.; *Colloid & Polymer Sci.*; **1990**; 268; 959–964.
- [87] Menger F. M.; *Acc. Chem. Res.*; **1979**; 12; 111–117.
- [88] Fromherz P.; The Assembly of Amphiphiles: Molecular and Phenomenological Models.; Luisi, P. L., Straub, B. E., (Eds.); In *Reverse Micelles: Biological and Technological Relevance of Amphiphilic Structures in Apolar Media* (pp 55–68.); Springer US.; 1984.
- [89] Dill K. A.; Flory P. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1980**; 77; 3115–3119.
- [90] Dill K. A.; Flory P. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **1981**; 78; 676–680.
- [91] Dill K. A.; Koppel D. E.; Cantor R. S.; Dill J. D.; Bendedouch D.; Chen S.-H.; *Nature*; **1984**; 309; 42–45.
- [92] Wishnia A.; Lappi S. J.; *J. Mol. Biol.*; **1974**; 82; 77–89.
- [93] Tans P.; Thoning K.; NOAA ESRL Global Monitoring Division. *How We Measure Background CO₂ Levels on Mauna Loa*, Report; NOAA: 2018.
- [94] Halliwell B.; *Annu. Rev. Nutr.*; **1996**; 16; 33–50.
- [95] Rich P. R.; *Biochem. Soc. Trans.*; **2003**; 31; 1095–1105.
- [96] Mittler R.; *Trends. Plant. Sci.*; **2017**; 22; 11–19.
- [97] Nathan C.; Ding A.; *Cell.*; **2010**; 140; 871–882.
- [98] Nathan C.; Cunningham-Bussel A.; *Nat. Rev. Immunol.*; **2013**; 13; 349–361.
- [99] Halliwell B.; *Plant. Physiol.*; **2006**; 141; 312–322.
- [100] Martínez Á. Complejos de ligandos azamacrocíclicos como miméticos de enzimas con actividad antioxidante.; Ph.D. tesis; Universitat de València; 2019.
- [101] Nordberg J.; Arnér E. S.; *Free. Radic. Biol. Med.*; **2001**; 31; 1287–1312.
- [102] Mohammad M.; Khan A. Y.; Subhani M. S.; Bibi N.; Ahmad S.; Saleemi S.; *Research on Chemical Intermediates*; **2001**; 27; 259–267.
- [103] Hayyan M.; Hashim M. A.; AlNashef I. M.; *Chem. Rev.*; **2016**; 116; 3029–3085.
- [104] Fang F. C.; *Nat. Rev. Microbiol.*; **2004**; 2; 820–832.
- [105] Prousek J.; *Pure Appl. Chem.*; **2007**; 79; 2325–2338.
- [106] Phaniendra A.; Jestadi D. B.; *Ind. J. Clin. Biochem.*; **2015**; 30; 11–26.
- [107] Koppenol W. H.; *Redox Rep.*; **2001**; 6; 229–234.
- [108] Su J.; Groves J. T.; *Inorg. Chem.*; **2010**; 49; 6317–6329.
- [109] Singh U.; Jialal I.; *Pathophysiology*; **2006**; 13; 129–142.
- [110] Memar M. Y.; Ghotaslou R.; Samiei M.; Adibkia K.; *Infect. Drug. Resist.*; **2018**; 11; 567–576.
- [111] Maritim A. C.; Sanders R. A.; Watkins J. B.; *J. Biochem. Mol. Toxicol.*; **2003**; 17; 24–38.

- [112] Weydert C. J.; Waugh T. A.; Ritchie J. M.; Iyer K. S.; Smith J. L.; Li L.; Spitz D. R.; Oberley L. W.; *Free Radic. Biol. Med.*; **2006**; 41; 226–237.
- [113] Kumari S.; Badana A. K.; G, M. M.; G, S.; Malla R.; *Biomark. Insights*; **2018**; 13; 1177271918755391.
- [114] Kumar B.; Koul S.; Khandrika L.; Meacham R. B.; Koul H. K.; *Cancer Res.*; **2008**; 68; 1777–1785.
- [115] Chauhan V.; Chauhan A.; *Pathophysiology*; **2006**; 13; 195–208.
- [116] Barnham K. J.; Bush A. I.; *Curr. Opin. Chem. Biol.*; **2008**; 12; 222–228.
- [117] Dias V.; Junn E.; Mouradian M. M.; *J. Parkinsons Dis.*; **2013**; 3; 461–491.
- [118] Kocatürk P. A.; Akbostanci M. C.; Tan F.; Kavas G. Ö.; *Pathophysiology*; **2000**; 7; 63–67.
- [119] Valentine J. S.; Hart P. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*; **2003**; 100; 3617–3622.
- [120] Rakhit R.; Chakrabartty A.; *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*; **2006**; 1762; 1025–1037.
- [121] Blake, D. R.; Allen, R.; *Ann. Rheum. Dis.*; **1988**; 47; 792.
- [122] Singh A.; Kukreti R.; Saso L.; Kukreti S.; *Molecules*; **2019**; 24; 1583.
- [123] Togliatto G.; Lombardo G.; Brizzi M. F.; *Int. J. Mol. Sci.*; **2017**, 18 (9), 1988.
- [124] Zhou T.; Prather E. R.; Garrison D. E.; Zuo L.; *Int. J. Mol. Sci.*; **2018**; 19; 417.
- [125] Wilson J. N.; Pierce J. D.; Clancy R. L.; *Heart Lung*; **2001**; 30; 370–375.
- [126] Cheres P.; Kim S.-J.; Tulasiram S.; Kamp, D. W.; *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*; **2013**; 1832; 1028–1040.
- [127] Boukhenouna S.; Wilson M. A.; Bahmed K.; Kosmider B.; *Oxid. Med. Cell. Longev.*; **2018**; 2018; 5730395.
- [128] Sahiner U. M.; Birben E.; Erzurum S.; Sackesen C.; Kalayci O.; *World Allergy Organ. J.*; **2011**, 4 (10), 151–158.
- [129] Comhair S. A. A.; Erzurum S. C.; *Antioxid. Redox Signal.*; **2010**; 12; 93–124.
- [130] Liu Z.; Zhou T.; Ziegler A. C.; Dimitrion P.; Zuo L.; *Oxid. Med. Cell. Longev.*; **2017**; 2525967.
- [131] Kumar A.; Ratan R.; *J. Huntington's Dis.*; **2016**; 5; 1–21.
- [132] Cooper G. M.; Cooper G. M.; *The Cell*, 2nd ed.; Sinauer Associates; 2000.
- [133] Fennell D. A.; Summers Y.; Cadranel J.; Benepal T.; Christoph D. C.; Lal R.; Das M.; Maxwell F.; Visseren-Grul C.; Ferry D.; *Cancer Treat. Rev.*; **2016**; 44; 42–50.
- [134] Ribas J.; Mattiolo P.; Boix J.; *Curr. Drug Targets*; **2015**; 16; 31–37.
- [135] Cohen D. K.; Lee P. K.; *Cancers*; **2016**; 8; 90.

- [136] Li L.; Ishdorj G.; Gibson S. B.; *Free Radic. Biol. Med.*; **2012**; 53; 1399–1410.
- [137] Hu Y.; Rosen D. G.; Zhou Y.; Feng L.; Yang G.; Liu J.; Huang P.; *J. Biol. Chem.*; **2005**; 280; 39485–39492.
- [138] Panieri E.; Gogvadze V.; Norberg E.; Venkatesh R.; Orrenius S.; Zhivotovsky B.; *Free Radic. Biol. Med.*; **2013**; 57; 176–187.
- [139] Raza M. H.; Siraj S.; Arshad A.; Waheed U.; Aldakheel F.; Alduraywish S.; Arshad M.; *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*; **2017**; 143; 1789–1809.
- [140] Murphy M. P.; Holmgren A.; Larsson N.-G.; Halliwell B.; Chang C. J.; Kalyanaraman B.; Rhee S. G.; Thornalley P. J.; Partridge L.; Gems D.; Nyström T.; Belousov V.; Schumacker P. T.; Winterbourn C. C.; *Cell Metab.*; **2011**; 13; 361–366.
- [141] Gaugler J.; James B.; Johnson T.; Marin A.; Weuve J.; *Alzheimers Dement.*; **2018**; 14; 367–429.
- [142] Pollari E.; Goldsteins G.; Bart G.; Koistinaho J.; Giniatullin R.; *Front. Cell Neurosci.*; **2014**; 8; 131.
- [143] Matilla-Dueñas A.; Ashizawa T.; Brice A.; et al.; *Lancet Neurol.*; **2014**; 13; 269–302.
- [144] Liu Z.; Zhou T.; Ziegler A. C.; Dimitrion P.; Zuo L.; *Oxid. Med. Cell. Longev.*; **2017**; 2525967.
- [145] Hamer M.; Chida Y.; *Psychol. Med.*; **2009**; 39; 3–11.
- [146] Radi E.; Formichi P.; Battisti C.; Federico A.; *J. Alzheimers Dis.*; **2014**; 42; S125–S152.
- [147] Cookson, M. R.; *Annu. Rev. Biochem.*; **2005**; 74; 29–52.
- [148] Chow V. W.; Mattson M. P.; Wong P. C.; Gleichmann M.; *Neuromolecular Med.*; **2010**; 12; 1–12.
- [149] Cheignon C.; Tomas M.; Bonnefont-Rousselot D.; Faller P.; Hureau C.; Collin F.; *Redox Biol.*; **2018**; 14; 450–464.
- [150] Jakob-Roetne R.; Jacobsen H.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*; **2009**; 48; 3030–3059.
- [151] Xiao Y.; Ma B.; McElheny D.; Parthasarathy S.; Long F.; Hoshi M.; Nussinov R.; Ishii Y.; *Nat. Struct. Mol. Biol.*; **2015**; 22; 499–505.
- [152] Nasica-Labouze J.; Nguyen P. H.; Sterpone F.; Berthoumieu O.; Buchete N.-V.; Côté S.; De Simone A.; Doig A. J.; Faller P.; Garcia A.; Laio A.; Li M. S.; Melchionna S.; Mousseau N.; Mu Y.; Paravastu A.; Pasquali S.; Rosenman D. J.; Strodel B.; Tarus B.; Viles J. H.; Zhang T.; Wang C.; Derreumaux P.; *Chem. Rev.*; **2015**; 115; 3518–3563.
- [153] Yuksel M.; Tacal O.; *Eur. J. Pharmacol.*; **2019**; 856; 172415.

- [154] Kang J.; Lemaire H. G.; Unterbeck A.; Salbaum J. M.; Masters C. L.; Grzeschik K. H.; Multhaup G.; Beyreuther K.; Müller-Hill B.; *Nature*; **1987**; 325; 733–736.
- [155] Tiiman A.; Palumaa P.; Tõugu V.; *Neurochem. Int.*; **2013**; 62; 367–378.
- [156] Bayr H.; *Crit. Care Med.*; **2005**; 33; S498.
- [157] Meyer E. P.; Ulmann-Schuler A.; Staufenbiel M.; Krucker T.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **2008**; 105; 3587–3592.
- [158] Uttara B.; Singh A. V.; Zamboni P.; Mahajan R. T.; *Curr. Neuropharmacol.*; **2009**; 7; 65–74.
- [159] Opazo C.; Huang X.; Cherny R. A.; Moir R. D.; Roher A. E.; White A. R.; Cappai R.; Masters C. L.; Tanzi R. E.; Inestrosa N. C.; Bush A. I.; *J. Biol. Chem.*; **2002**; 277; 40302–40308.
- [160] Labbadia J.; Morimoto R. I.; *Trends Biochem. Sci.*; **2013**; 38; 378–385.
- [161] Finkel T.; Holbrook N. J.; *Nature*; **2000**; 408; 239–247.
- [162] López-Otín C.; Blasco M. A.; Partridge L.; Serrano M.; Kroemer G.; *Cell*; **2013**; 153; 1194–1217.
- [163] Ristow M.; Schmeisser S.; *Free Radic. Biol. Med.*; **2011**; 51; 327–336.
- [164] Campisi J.; *Annu. Rev. Physiol.*; **2013**; 75; 685–705.
- [165] Kirkwood T. B. L.; *Cell*; **2005**; 120; 437–447.
- [166] De Magalhães J. P.; Passos J. F.; *Mech. Ageing Dev.*; **2018**; 170; 2–9.
- [167] Lynch D. B.; Jeffery I. B.; O’Toole P. W.; *WIREs Syst. Biol. Med.*; **2015**; 7; 131–138.
- [168] Shadyab A. H.; LaCroix A. Z.; *Ageing Res. Rev.*; **2015**; 19; 1–7.
- [169] Sergiev P. V.; Dontsova O. A.; Berezkin G. V.; *Acta Naturae.*; **2015**; 7; 9–18.
- [170] Harman D. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry.; *J. Gerontol.*; **1956**; 11; 298–300.
- [171] Beckman K. B.; Ames B. N.; *Physiol Rev.*; **1998**; 78; 547–581.
- [172] Mccord J.; Fridovich I.; McCOrd J. M.; and Fridovich I.; *J. Biol. Chem.*; **1969**; 244; 6049–6055.
- [173] Valentine J. S.; Doucette P. A.; Zittin Potter S.; *Annu. Rev. Biochem.*; **2005**; 74; 563–593.
- [174] Abreu I. A.; Cabelli D. E.; *Biochim. Biophys. Acta*; **2010**; 1804; 263–274.
- [175] Salvemini D.; Riley D. P.; Cuzzocrea S.; *Nat. Rev. Drug Discov.*; **2002**; 1; 367–374.
- [176] Younus H.; *Int. J. Health Sci. (Qassim).*; **2018**; 12; 88–93.
- [177] Barondeau D. P.; Kassmann C. J.; Bruns C. K.; Tainer J. A.; Getzoff E. D.; *Biochemistry*; **2004**; 43; 8038–8047.
- [178] Ryan K. C.; Johnson O. E.; Cabelli D. E.; Brunold T. C.; Maroney M. J.; *J. Biol. Inorg. Chem.*; **2010**; 15; 795–807.

- [179] Youn H. D.; Youn H.; Lee J. W.; Yim Y. I.; Lee J. K.; Hah Y. C.; Kang S. O.; *Arch. Biochem. Biophys.*; **1996**; 334; 341–348.
- [180] Palenik B.; Brahamsha B.; Larimer F. W.; Land M.; Hauser L.; Chain P.; Lamerdin J.; Regala W.; Allen E. E.; McCarren J.; Paulsen I.; Dufresne A.; Partensky F.; Webb E. A.; Waterbury J.; *Nature*; **2003**; 424; 1037–1042.
- [181] Cabelli D. E.; Riley D.; Rodriguez J. A.; Valentine J. S.; Zhu H.; *Models of Superoxide Dismutases*. Biomimetic Oxidations Catalyzed by Transition Metal Complexes; 2000.
- [182] Riley D. P.; *Chem Rev.*; **1999**; 99; 2573–2588.
- [183] Lucas H. R.; Meyer G. J.; Karlin K. D.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2009**; 131; 13924–13925.
- [184] Hart P.J.; Liu H.; Pellegrini M.; Nersissian A.M.; Gralla E.B.; Valentine J.S.; Eisenberg D.; *Protein Sci.*; **1998**; 7; 545–555
- [185] Bertini I.; Manganl S.; Viezzoli M. S. *Structure and Properties of Copper-Zinc Superoxide Dismutases*. Advances in Inorganic Chemistry; 1998.
- [186] Hitchler M. J.; Domann F. E.; *Antioxid Redox Signal.*; **2014**, 20; 1590–1598.
- [187] Holm R. H.; Kennepohl P.; Solomon E. I.; *Chem Rev.*; **1996**; 96; 2239–2314.
- [188] Rypniewski W. R.; Mangani S.; Bruni B.; Orioli P. L.; Casati M.; Wilson K. S.; *J. Mol. Biol.*; **1995**; 251; 282–296.
- [189] Djinić Carugo K.; Battistoni A.; Carri M. T.; Polticelli F.; Desideri A.; Rotilio G.; Coda A.; Wilson K. S.; Bolognesi M.; *Acta Cryst. D.*; **1996**; 52; 176–188.
- [190] Keele B. B.; McCord J. M.; Fridovich I.; *J. Biol. Chem.*; **1970**; 245; 6176–6181.
- [191] Holley A. K.; Bakthavatchalu V.; Velez-Roman J. M.; St Clair D. K.; *Int. J. Mol Sci.*; **2011**; 12; 7114–7162.
- [192] Miao L.; St Clair D. K.; *Free. Radic. Biol. Med.*; **2009**; 47; 344–356.
- [193] Azadmanesh J.; Borgstahl G. E. O.; *Antioxidants (Basel)*; **2018**; 7; 25.
- [194] Hunter G. J.; Trinh C. H.; Bonetta R.; Stewart E. E.; Cabelli D. E.; Hunter T.; *Protein Sci.*; **2015**; 24; 1777–1788.
- [195] Azadmanesh J.; Trickel S. R.; Borgstahl G. E. O.; *J. Struct. Biol.*; **2017**; 199; 68–75.
- [196] Eisenschmid T. C.; Kirss R. U.; Deutsch P. P.; Hommeltoft S. I.; Eisenberg R.; Bargon J.; Lawler R. G.; Balch A. L.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1987; 109; 8089–8091.
- [197] Lah M. S.; Dixon M. M.; Patridge K. A.; Stallings W. C.; Fee J. A.; Ludwig M. L.; *Biochemistry*; 1995; 34; 1646–1660.

- [198] Yikilmaz E.; Rodgers D. W.; Miller A.-F.; *Biochemistry*; **2006**; 45; 1151–1161.
- [199] Gupta, R.; Borovik, A. S.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2003**; 125; 13234–13242.
- [200] Miller A.-F.; *FEBS Lett.*; **2012**; 586; 585–595.
- [201] Vance C. K.; Miller A.-F.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1998**; 120; 461–467.
- [202] Vance C. K.; Miller A.-F.; *Biochemistry*; **2001**; 40; 13079–13087.
- [203] Schwartz A. L.; Yikilmaz E.; Vance C. K.; Vathyam S.; Koder R. L.; Miller A.-F.; *J. Inorg. Biochem.*; **2000**; 80; 247–256.
- [204] Miller A.-F.; *Acc. Chem. Res.*; **2008**; 41; 501–510.
- [205] Christen Y.; *Am. J. Clin. Nutr.*; **2000**; 71; 621S–629S.
- [206] Boillée S.; Vande Velde C.; Cleveland D. W.; *Neuron*; **2006**; 52; 39–59.
- [207] Ivanović-Burmazović I.; Filipović M.; *Reactivity of Manganese Superoxide Dismutase Mimics toward Superoxide and Nitric Oxide: Selectivity versus Cross-Reactivity (Chapter 3)*; Eldik R. van; Ivanović-Burmazović I., Eds.; Adv. Inorg. Chem.; 2012.
- [208] Adlard P. A.; Cherny R. A.; Finkelstein D. I.; Gautier E.; Robb E.; Cortes M.; Volitakis I.; Liu X.; Smith J. P.; Perez K.; Laughton K.; Li Q.-X.; Charman S. A.; Nicolazzo J. A.; Wilkins S.; Deleva K.; Lynch T.; Kok G.; Ritchie C. W.; Tanzi R. E.; Cappai R.; Masters C. L.; Barnham K. J.; Bush A. I.; *Neuron*; **2008**; 59; 43–55.
- [209] Crabb E.; Moore E. A.; *Metals and Life*; Crabb E.; Moore E. A., Eds.; RSC Publishing; 2009.
- [210] Ward M. B.; Scheitler A.; Yu M.; Senft L.; Zillmann A. S.; Gorden J. D.; Schwartz D. D.; Ivanović-Burmazović I.; Goldsmith C. R.; *Nature Chem.*; **2018**; 10; 1207–1212.
- [211] Schwizer F.; Okamoto Y.; Heinisch T.; Gu Y.; Pellizzoni M. M.; Lebrun V.; Reuter R.; Köhler V.; Lewis J. C.; Ward T. R.; *Chem. Rev.*; **2018**; 118; 142–231.
- [212] Weiss R.H.; Riley D.P.; *Drugs Future*; **1996**; 21; 383–389.
- [213] Salvemini D.; *Analgesic methods using synthetic coordination compound catalysts for the dismutation of superoxide radicals and the prevention of opioid tolerance*. Patent WO 9858636; 1998.
- [214] Salvemini D.; Wang Z. Q.; Zweier J. L.; Samouilov A.; Macarthur H.; Misko T. P.; Currie M. G.; Cuzzocrea S.; Sikorski J. A.; Riley D. P.; *Science*; **1999**; 286; 304–306.
- [215] Li Q.-X.; Luo Q.-H.; Li Y.-Z.; Pan Z.-Q.; Shen M.-C.; *Eur. J. Inorg. Chem.*; **2004**; 22; 4447–4456.
- [216] Failli P.; Bani D.; Bencini A.; Cantore M.; Di Cesare Mannelli L.; Ghelardini C.; Giorgi C.; Innocenti M.; Rugi F.; Spepi A.; Udisti R.; Valtancoli B.; *J. Med. Chem.*; **2009**; 52; 7273–7283.

- [217] Durot S.; Policar C.; Cisnetti F.; Lambert F.; Renault J.-P.; Pelosi G.; Blain G.; Korri-Youssoufi H.; Mahy J.-P.; *Eur. J. Inorg. Chem.*; **2005**; 17; 3513–3523.
- [218] Singh O.; Tyagi N.; Olmstead M. M.; Ghosh K.; *Dalton Trans.*; **2017**; 46; 14186–14191.
- [219] Kolks G.; Frihart C.R.; Rabinowitz H.N.; Lippard S.J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1976**; 98; 5720–5721.
- [220] Coughlin P. K.; Dewan J. C.; Lippard S. J.; Watanabe E.; Lehn J. M.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1979**; 101; 265–266.
- [221] Coughlin P. K.; Lippard S. J.; *Inorg. Chem.*; **1984**; 23; 1446–1451.
- [222] Zhou Y.-H.; Fu H.; Zhao W.-X.; Chen W.-L.; Su C.-Y.; Sun H.; Ji L.-N.; Mao Z.-W.; *Inorg. Chem.*; **2007**; 46; 734–739.
- [223] Pierre J.-L.; Chautemps P.; Refaif S.; Beguin C.; El Marzouki A.; Serratrice G.; Saint-Aman E.; Rey P.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1995**; 117; 1965–1973.
- [224] Szilágyi I.; Labádi I.; Hernadi K.; Pálkó I.; Nagy N. V.; Korecz L.; Rockenbauer A.; Kele Z.; Kiss T.; *J. Inorg. Biochem.*; **2005**; 99; 1619–1629.
- [225] Casanova J.; Alzuet G.; Borrás J.; Carugo O.; *J. Chem. Soc.*; **1996**; 11; 2239–2244.
- [226] Le X.; Liao S.; Liu X.; Feng X.; *J. Coord. Chem.*; **2006**; 59; 985–995.
- [227] González-Álvarez M.; Alzuet G.; Borrás J.; del Castillo Agudo L.; García-Granda S.; Montejo-Bernardo J. M.; *Inorg. Chem.*; **2005**; 44; 9424–9433.
- [228] Sornosa Ten. A.; Superóxido Dismutasas Abióticas; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia; 2008.
- [229] Sornosa-Ten A.; Humbert N.; Verdejo B.; Llinares J.M.; Elhabiri M.; Jezierska J.; Soriano C.; Kozłowski H.; Albrecht-Gary A.M. y García-España E.; *Inorg. Chem.*; **2009**; 48; 8985–8997.
- [230] Sornosa-Ten A.; Albelda T.; Frías J.C.; García-España E.; Llinares J.M.; Budimir A.; Piantanida I.; *Org. Biomol. Chem.*; **2010**; 8; 2567–2574.
- [231] Verdejo B.; Química Supramolecular de Piridinofanos sintéticos; Tesis Doctoral; Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Valencia; 2007.
- [232] Verdejo B.; Ferrer A.; Blasco S.; Castillo C.E.; González J.; Latorre J.; Mániz M.A.; Basallote M.G.; Soriano C.; García-España E.; *Inorg. Chem.*; **2007**; 46; 5707–5719.
- [233] Albelda M.T.; García-España E.; Jiménez H.R.; Llinares J.M.; Soriano C.; Sornosa-Ten A.; Verdejo B.; *Dalton Trans.*; **2006**; 4474–4481.
- [234] Lincoln K. M.; Richardson T. E.; Rutter L.; Gonzalez P.; Simpkins J. W.; Green K. N.; *ACS Chem. Neurosci.*; **2012**; 3; 919–927.
- [235] Scott L. E.; Orvig C.; *Chem. Rev.*; **2009**; 109; 4885–4910.

- [236] Braymer J. J.; DeToma A. S.; Choi J.-S.; Ko K. S.; Lim M. H.; *Int. J. Alzheimers Dis.*; **2011**; 1; 623051.
- [237] Clares M. P.; Serena C.; Blasco S.; Nebot A.; del Castillo L.; Soriano C.; Doménech A.; Sánchez-Sánchez A. V.; Soler-Calero L.; Mullor J. L.; García-España A.; García-España E.; *J. Inorg. Biochem.*; **2015**; 143; 1–8.
- [238] Guijarro L.; Inclán M.; Pitarch-Jarque J.; Doménech-Carbó A.; Chicote J. U.; Trefler S.; García-España E.; García-España A.; Verdejo B.; *Inorg. Chem.*; **2017**; 56; 13748–13758.
- [239] Belda R.; Blasco S.; Verdejo B.; Jiménez H. R.; Doménech-Carbó A.; Soriano C.; Latorre J.; Terencio C.; García-España E.; *Dalton Trans.*; **2013**; 42; 11194–11204.
- [240] Nebot-Guinot A.; Liberato A.; Máñez M. A.; Clares M. P.; Doménech A.; Pitarch-Jarque J.; Martínez-Camarena A.; Basallote M. G.; García-España E.; *Inorg. Chim. Acta*; **2018**; 472; 139–148.
- [241] Verdejo B.; Ferrer A.; Blasco S.; Castillo C. E.; González J.; Latorre J.; Máñez M. A.; Basallote M. G.; Soriano C.; García-España E.; *Inorg. Chem.*; **2007**; 46; 5707–5719.
- [242] Clares M. P.; Blasco S.; Inclán M.; Agudo L. del C.; Verdejo B.; Soriano C.; Doménech A.; Latorre J.; García-España E.; *Chem. Commun.*; **2011**; 47; 5988–5990.
- [243] Pont I.; Calatayud-Pascual A.; López-Castellano A.; Albelda E.P.; García-España E.; Martí-Bonmatí L.; Frias J.C.; Albelda M.T.; *PLoS One.*; **2018**; 13; e0190540.
- [244] Serena C.; Calvo E.; Clares M. P.; Diaz M. L.; Chicote J. U.; Beltrán-Debon R.; Fontova R.; Rodriguez A.; García-España E.; García-España A.; *PLoS One.*; **2015**; 10; e0119102.
- [245] Muscoli C.; Cuzzocrea S.; Riley D. P.; Zweier J. L.; Thiemermann C.; Wang Z.-Q.; Salvemini D.; *Br. J. Pharmacol.*; **2003**; 140; 445–460.
- [246] Blackmond D. G.; Armstrong A.; Coombe V. & Wells A.; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2007**; 46, 3798–3800.
- [247] Narayan S.; Muldoon J.; Finn M. G.; Fokin V. V.; Kolb H. C. & Sharpless K. B.; *Angew. Chem. Int. Ed.*; **2005**; 44, 3275–3279.
- [248] Sheldon R. A.; *Green Chem.*; **2007**; 9, 1273–1283.
- [249] Dussart-Gautheret J.; Yu J.; Ganesh K.; Rajendra G.; Gallou F. & Lipshutz B.H.; *Green Chem.*; **2022**; 24, 6172–6178.
- [250] Hedouin G.; Ogulu D.; Kaur G. & Handa S.; *Chem. Commun.*; **2023**; 59, 2842–2853.
- [251] Schick M. J.; *Nonionic surfactants: Physical chemistry.*; CRC Press.; 1987.
- [252] Sorella G.L.; Strukul G. & Scarso A.; *Green Chem.*; **2015**; 17, 644–683.
- [253] Lipshutz B.H.; *Johns. Matthey Technol. Rev.*; **2017**; 61, 196–202.

- [254] Lelais G. & MacMillan D.W.C.; *Aldrichimica Acta*; **2006**; 39, 79-87.
[255] MacMillan D.W.C.; *Nature*; **2008**; 455, 304–308.

Capítulo 2

Objetivos

*“Medir lo que es medible
y tratar de hacer medible
lo que todavía no lo es.”*

— Galileo Galilei —

El objetivo general de este trabajo se centra en el diseño, síntesis, caracterización y estudio de ligandos azamacrocíclicos anfifílicos, con el propósito de investigar su comportamiento en la formación de sistemas vesiculares en solución acuosa, así como evaluar su capacidad antioxidante como miméticos de SOD y analizar su potencial como sistema de transporte pasivo. Pretende comprender la naturaleza y magnitud de las variables que influyen en la cinética de reacción y su impacto en el ensamblaje supramolecular, especialmente en la formación de estructuras micelares y/o vesículas.

El trabajo desarrollado en esta tesis ha sido organizado en torno a siete objetivos secundarios:

Objetivo 1. *Diseño, síntesis y caracterización de ligandos azamacrocíclicos anfifílicos.*

Este objetivo se enfoca en el desarrollo y optimización de las rutas sintéticas, tanto a partir de estrategias previamente descritas como mediante nuevos procedimientos adaptados a la incorporación de unidades hidrofóbicas. Partiendo de algunos ligandos anteriormente sintetizados en el GQS-UV, se llevará a cabo la síntesis de una nueva familia de ligandos, incorporando grupos funcionales adicionales para mejorar sus propiedades y aplicaciones.

La caracterización de los ligandos se realizará mediante técnicas como la resonancia magnética nuclear (RMN), que proporcionará información detallada sobre la estructura molecular; la espectrometría de masas, que determinará la masa molecular; y el análisis elemental, que confirmará la pureza y la composición de los ligandos sintetizados.

Objetivo 2. *Caracterización del comportamiento ácido-base en disolución acuosa de los ligandos sintetizados.*

Se determinarán las constantes de protonación de los ligandos sintetizados mediante técnicas potenciométricas. Una vez obtenidos los datos, se elaborarán diagramas de distribución de especies en función del pH, lo que servirá para conocer el grado de protonación del ligando a pH fisiológico. Además, se identificarán las especies predominantes en función del pH y se analizará la secuencia de protonación del receptor.

Objetivo 3. *Estudio de la capacidad de coordinación de los ligandos sintetizados con iones metálicos de transición de interés biológico.*

Se estudiará el comportamiento en disolución acuosa frente a la coordinación con iones metálicos (Cu(II), Mn(II) y Fe(II)) y se analizará la estabilidad de los mismos.

Objetivo 4. *Estudio de propiedades Físicoquímicas de los compuestos anfifílicos.*

Este objetivo tiene como finalidad estudiar las propiedades físicoquímicas de los compuestos anfifílicos, en particular la determinación de la concentración micelar crítica (CMC) bajo diferentes condiciones de pH y concentración, utilizando la fluorescencia del pireno como sonda molecular, un método ampliamente empleado en el análisis de sistemas micelares. Para profundizar en la caracterización de los ensamblajes supramoleculares, se emplearán diversas técnicas: la microscopía electrónica de transmisión (TEM) para evaluar su tamaño y morfología; la dispersión dinámica de luz (DLS) para

determinar el tamaño hidrodinámico, la distribución de tamaños y el potencial ζ ; y la microscopía de fuerza atómica (AFM) para obtener información adicional sobre su estructura. Además, la investigación se complementará con estudios computacionales.

Objetivo 5. *Estudio de la capacidad catalítica de los complejos metálicos.*

Se prestará especial atención a la capacidad de estos ligandos para imitar el comportamiento de la enzima SOD en presencia de los metales Cu(II), Mn(II) y Fe(II). Además, se analizará su potencial para catalizar otras reacciones, como la cicloadición catalizada por surfactantes de cobre azida-alquino [3 + 2] en agua, una reacción clave dentro del campo de la *Química de los medios micelares acuosos*.

Objetivo 6. *Ensayos de toxicidad.*

Dado que este trabajo tiene un enfoque biomédico, se hará un estudio preliminar de la posible toxicidad de los compuestos sintetizados *in vivo*.

Objetivo 7. *Análisis del transporte pasivo.*

Este estudio parte de la hipótesis de que la incorporación de propiedades anfifílicas al ligando base mejorará su capacidad de transporte transmembrana. Para comprobarlo, se llevará a cabo la medida de su permeabilidad frente a modelos de membranas biológicas.

Capítulo 3

Materiales y Métodos

*“La explicación sencilla
siempre sigue
a la solución compleja.”*

— Regla de Lunsford —

3.1 Reactivos y disolventes

Todos los reactivos y disolventes utilizados en esta tesis, incluidos acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, etanol, acetato de etilo, hexano, metanol, tetrahidrofurano (THF) y amoníaco, fueron adquiridos a proveedores como Sigma-Aldrich, TCI, Fisher o Acros orgánicos, y fueron empleados en su forma original, sin modificaciones, salvo que se indique lo contrario.

En determinadas ocasiones, fue necesario emplear disolventes secos, que se obtuvieron mediante un sistema de purificación SPS-800 (MBRAUN SPS Systems).

El agua de alta pureza (resistividad 18.2 M Ω .cm) se obtuvo utilizando un equipo Milli-Q de Millipore, equipado de un cartucho de pulido Quantum® EX (QTUM000EX).

3.2 Técnicas instrumentales

3.2.1 Medidas potenciométricas

Fundamentos

La potenciometría es una técnica para el estudio de equilibrios en disolución. Se fundamenta en la medición de la fuerza electromotriz de una disolución, la cual está influenciada por la concentración en equilibrio de las especies detectadas por el electrodo. Esta concentración, a su vez, se ve afectada por las condiciones iniciales y las constantes de equilibrio del sistema. Cuando los equilibrios en estudio involucran protones, es decir, se trata de equilibrios ácido-base, esta fuerza electromotriz se puede medir con un electrodo de pH.

La fuerza electromotriz medida con un electrodo de pH se relaciona con la concentración de protones presentes de la disolución a través de la ecuación de Nernst.

$$E = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln[H^+] \quad (3.1)$$

$$E^{o'} = E^o + E_J + E_{asym} \quad (3.2)$$

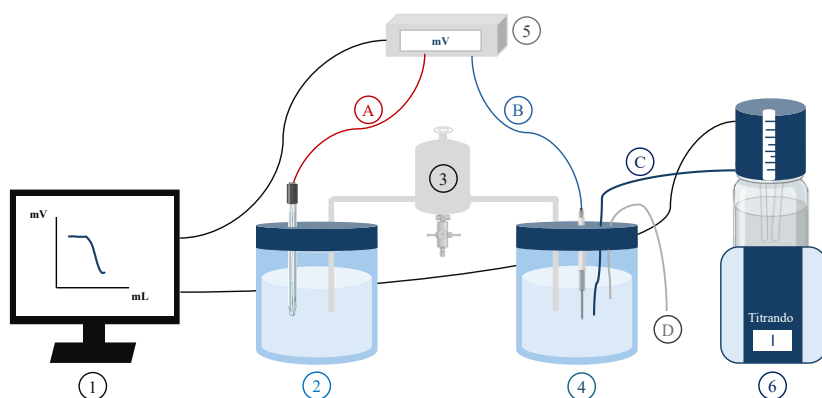
Donde $E^{o'}$ se considera constante a efectos prácticos e incluye E^o como el potencial estándar, E_J es el potencial de unión líquida y E_{asym} es el potencial de asimetría; que depende del tiempo.

Descripción del equipo

Las mediciones potenciométricas se llevaron a cabo utilizando el dispositivo de titulación Titrando 905 controlado desde un ordenador que ejecuta el software Tiamo 2.3 (Figura 3.1). La configuración constaba de dos celdas separadas (celda de medición y celda de referencia) unidas por un puente salino. Tanto la celda de referencia como el puente salino se llenaron con NaCl 0.5M. La celda de medición contenía el electrolito de soporte y un electrodo de pH de vidrio (Metrohm 6.0150.100). El electrodo de referencia era un Ag/AgCl (electrodo de referencia Metrohm 6.0726.107 Ag/AgCl en solución de KCl 3M).

El electrodo de vidrio fue calibrado como una sonda de concentración de iones de hidrógeno mediante la valoración de cantidades previamente estandarizadas de HCl con soluciones de NaOH 0.1 M libres de carbonato CO_3^{2-} y el punto de equivalencia fue determinado por el método de Gran.^{1,2} El electrodo de referencia fue un electrodo de Ag/AgCl en solución saturada de KCl. Como electrolitos de medición se utilizó NaCl 0.15 M y debido a la menor solubilidad de algunos sistemas en agua, en su lugar se utilizó NaCl 0.15 M en EtOH:H₂O 30:70 % v/v. Tanto la celda de medida como la de

referencia fueron termostatadas a 298.1 ± 0.1 K con un baño de agua Haake EK51. Además, la celda de medida cuenta con una salida de burbujeo de un gas inerte (Argón) para desoxigenar la muestra y dispone también de agitación magnética.



1. Sistema informático
2. Celda de referencia
3. Puente salino Wilhelm
4. Celda de medida
5. pH-metro
6. Bureta automática

- A. Electrodo de referencia
- B. Electrodo de medida
- C. Entrada valorante
- D. Entrada argón

Figura 3.1: Esquema de los componentes de un sistema potenciométrico.

Calibración de los electrodos

Antes de iniciar cualquier medida potenciométrica, se realizó la calibración de los electrodos. Como primer paso, se estandarizó la solución de HCl utilizando TRIS. Posteriormente, se realizó la calibración, que consistió en valorar una solución de ácido fuerte (HCl 0.1 M) con una base fuerte (NaOH 0.1 M). Esta calibración tenía dos finalidades: calibrar los electrodos y verificar el grado de carbonatación de la base. Todos los datos recolectados fueron analizados utilizando el software Tiamo 2.3. Mediante el método de Gran,^{1,3} el software

Tiamo 2.3 determina el potencial estándar de la solución (E°), el producto iónico del agua (pK_w) y la concentración exacta de la solución valorante (NaOH). Aunque la concentración de NaOH se conoce previamente, el grado de carbonatación puede determinarse también a través de la diferencia en los valores de concentración de NaOH calculados utilizando las zonas ácida y básica. Idealmente, este grado debería permanecer por debajo del 1%.¹⁻³

Toma y análisis de datos

Los datos de potenciometría se recolectaron automáticamente mediante el software Tiamo 2.3. Este programa controla tanto las adiciones del valorante sobre la celda de medición mediante bureta automática, así como la lectura y registro del potencial mediante el pH-metro. Una vez finalizada la medición de la potenciometría el programa genera un fichero con los datos de volumen y el potencial.

Las valoraciones potenciométricas se llevaron a cabo dentro del rango de pH entre 2.0 y 11.0, con una concentración de muestra de aproximadamente 0.05 M. Se tomaron 10 medidas por cada punto de las constantes de equilibrio a determinar. Además, las valoraciones potenciométricas se realizaron al menos por duplicado para cada sistema.

Las constantes de equilibrio del sistema se determinaron a partir de los datos potenciométricos con el programa HYPERQUAD.⁴ Este programa emplea el método de Levenberg-Marquard⁵ para el ajuste no lineal por mínimos cuadrados de los datos experimentales y la determinación de las constantes de equilibrio. Mediante este ajuste se obtienen las constantes globales de equilibrio.

Finalmente, se empleó el programa HySS⁶ para representar los diagramas de distribución de especies a partir de las constantes de equilibrio.

3.2.2 Dispersión dinámica de luz

La distribución del tamaño de partícula de las vesículas preparadas se determinó mediante dispersión dinámica de luz (DLS), utilizando un equipo Malvern DTS Zetasizer 2000, en el Instituto de Ciencia de Materiales de la Universidad de Valencia.

Para la preparación de las muestras, los ligandos se disolvieron en agua a pH 7.4. Antes de realizar las medidas de DLS, la solución se filtró utilizando una jeringa equipada con un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.22 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro. Este proceso de filtración se llevó a cabo para eliminar sólidos y partículas de mayor tamaño presentes en la muestra.

3.2.3 Resonancia magnética nuclear

Todos los compuestos obtenidos en procesos intermedios y ligandos sintetizados fueron caracterizados mediante espectros de resonancia magnética nuclear utilizando los equipos Bruker Advance DPX300 (imán Bruker de 300 MHz, 7 T) y Bruker Advance DRX500 (imán Bruker de 500 MHz, 11,7 T) ubicados en el Servicio Central de Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia.

Se emplearon disolventes deuterados apropiados a las características de cada muestra. En el caso del agua deuterada (óxido de deuterio), los ajustes de pD deseado se realizaron utilizando gotas de ácido clorhídrico deuterado (DCl) o hidróxido de sodio deuterado (NaOD) teniendo en cuenta la relación:⁷

$$\text{pH} = \text{pD} - 0.4 \quad (3.3)$$

Para el procesamiento y visualización de datos, se utilizó el programa MestReNova 14.2.3.⁸

3.2.4 Análisis elemental (CHNS)

El análisis elemental de los compuestos sintetizados fue realizado por el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, utilizando un Analizador Elemental Carlo-Erba CHNS1100. Cada muestra fue analizada en duplicado para garantizar la reproducibilidad de los resultados.

3.2.5 Espectrometría de masas

El análisis de espectroscopia de masas (ESI-MS) se llevó a cabo en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia. Se utilizó un espectrómetro de masas con trampa de iones ESQUIRE 3000 PLUS, acoplado a un cromatógrafo líquido de alta resolución AGILENT 1100 (HPLC-MS). Este sistema cuenta con una fuente de ionización por electro-spray (ESI) que garantiza la precisión y la fiabilidad de los resultados obtenidos.

3.2.6 Difracción de rayos X de monocristalino.

Los cristales se midieron en un difractómetro de rayos X Bruker D8 Venture propiedad del SCSIE. Este difractómetro está equipado con un goniómetro de cuatro círculos de geometría Kappa, radiación de Mo K $_{\alpha}$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$), beam stoppers, colimadores y una unidad Oxford de baja temperatura que funcionaba a 130K.

El monocristal se montó utilizando aceite de parafina⁹ sobre la parte superior de un micromontaje en la cabeza del goniómetro y se trasladó inmediatamente al difractómetro. La indexación, estrategia y recopilación de datos se realizaron con el paquete de software APEX3. La estructura inicial se resolvió

con métodos directos utilizando SIR2014¹⁰ y la estructura resultante se refinó con SHELXT2018.¹¹ Además, la determinación final de la estructura cristalina se llevó a cabo mediante el software OLEX2.¹² La resolución de la estructura fue realizada por Salvador Blasco.

3.2.7 Espectroscopia UV-Visible

Los espectros de absorción fueron registrados mediante un espectrofotómetro UV Agilent 8453. Se utilizaron celdas de poliestireno con 1cm de camino óptico.

3.2.8 Espectroscopia de Emisión de Fluorescencia

Los espectros de emisión se registraron utilizando un fluorímetro TM-2/2003-PTI modular con lámpara de Xenón, equipado con láser de nitrógeno (PTI, GL-3300) y láser de tinte (PTI, GL-302). La geometría utilizada fue siempre en ángulo recto. Las celdas empleadas fueron de cuarzo Hellma con 1 cm de camino óptico y las cuatro caras transparentes. La temperatura se mantuvo termostatada a $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$.

3.2.9 Microscopía de Fuerza Atómica

Las mediciones de Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) se realizaron en condiciones ambientales normales utilizando un instrumento *Bruker Dimension Icon with ScanAsyst* en modo sin contacto, en ICMOL de la Universidad de Valencia. La sonda AFM era un voladizo de silicio sin contacto con alta frecuencia de resonancia (300 kHz) y un revestimiento reflectante de aluminio en la parte posterior (Tap300-G, suministrado por Sensors).

Para la preparación de las muestras, los ligandos se diluyeron en agua a pH 7.4, y se depositó 2 μ L sobre un sustrato de silicio de 1 cm² (NOVA Electronic Materials), que posteriormente se dejó secar al aire. La señal obtenida se procesó utilizando los softwares ScanAsyst Imaging y NanoScope, y los datos se representaron mediante el programa Gwyddion versión 2.65.

3.2.10 Microscopía Electrónica de Transmisión

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universidad de Valencia, utilizando un microscopio JEOL JEM-1010 que funciona a 100 kV, equipado con una cámara digital AMT de 8 Mpx.

Para la preparación de las muestras, los ligandos se disolvieron en agua a pH 7.4. Se depositó una gota de la muestra sobre una película de Parafilm M (Bemis), y sobre ella una rejilla de cobre de malla 400. En otro sustrato de parafilm M (3 cm²), se colocaron tres gotas de ácido fosfotúngstico (TPA, H₃PW₁₂O₄₀). Con una pinza, se tomó la rejilla con la muestra y se colocó sobre el TPA durante 1 min. Finalmente, se retiró la rejilla y se puso en el portamuestras, donde se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior medición.

3.2.11 Determinación del potencial ζ

El potencial eléctrico de la superficie interfacial entre las vesículas y el medio de dispersión, conocido como potencial zeta, fue medido utilizando un instrumento Malvern DTS Zetasizer 2000, en el Instituto de Ciencia de Materiales de la Universidad de Valencia.

3.2.12 Ensayo de actividad de superóxido dismutasa

Fundamento

En esta tesis, la actividad superóxido dismutasa (SOD) se ha determinado mediante un método indirecto ampliamente validado,¹³ basado en la inhibición de la reducción de un indicador (citocromo c y/o azul de tetrazolio) por el radical superóxido.^{14,15} Esta técnica, desarrollada originalmente por Beauchamp y Fridovich en 1971,¹⁴⁻¹⁷ ha sido objeto de diversas optimizaciones,¹⁸ aunque conserva como principio fundamental la competencia entre el indicador y la SOD (o su mimético) por el radical superóxido generado en el sistema. La cinética de reducción del indicador se monitoriza espectrofotométricamente, lo que permite cuantificar la actividad antioxidante del compuesto en estudio. Esta metodología ha sido empleada en todas las mediciones descritas en el presente trabajo.

Método de McCord-Fridovich

El método de McCord-Fridovich para determinar la actividad SOD de un compuesto se fundamenta en la reducción de un indicador cromogénico cuya velocidad de reducción puede medirse mediante técnicas UV-Vis. Los indicadores más comúnmente empleados son el citocromo c y el azul de tetrazolio, también conocido como nitrobluetetrazolium o NBT.

Los aniones superóxido se generan a través del sistema xantina/xantina oxidorreductasa. La xantina oxidorreductasa (XOR) es una enzima molibdoflavina que cataliza las reacciones finales en la degradación de purinas en primates, convirtiendo la hipoxantina en xantina y luego la xantina en ácido úrico.^{19,20} La XOR tiene una estructura funcional homodimérica, con cada subunidad conteniendo cuatro centros redox: un cofactor de molibdeno, dos centros hierro-azufre (2Fe-2S) y un sitio de Flavina Adenosina Dinucleótido

(FAD). Durante la oxidación de la xantina a ácido úrico por la XOR, se produce una "fuga de electrones" en la cual una fracción de moléculas de oxígeno es reducida a superóxido en lugar de oxidar al sustrato (Figura 3.2).²¹

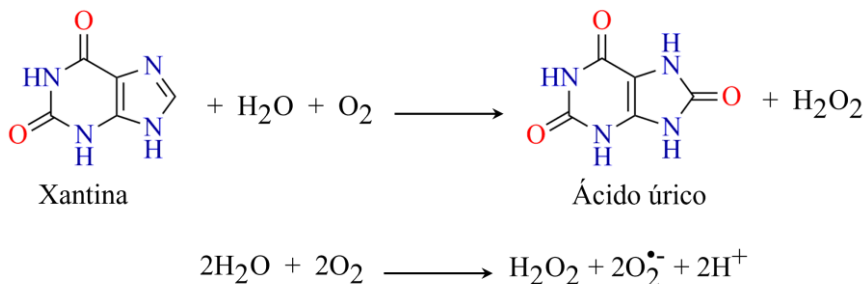


Figura 3.2 Generación de superóxido mediante el sistema xantina/xantina oxidorreductasa.²⁰

Como indicador utilizamos el NBT (Figura 3.3). Este sistema reacciona con las especies de superóxido generando una señal cuantificable. El NBT es de un color amarillo pálido en forma oxidada; cuando este reacciona con los radicales superóxido generados por la xantina oxidorreductasa, se reduce a monoformazano (MF^+), que es de color violeta. El MF^+ tiene un máximo de absorbancia a 560 nm que no está presente en la muestra en su forma oxidada. Siguiendo la variación de la intensidad de absorción en función del tiempo, se puede determinar indirectamente la cantidad de radicales superóxido producidos por el sistema xantina/xantina oxidorreductasa.

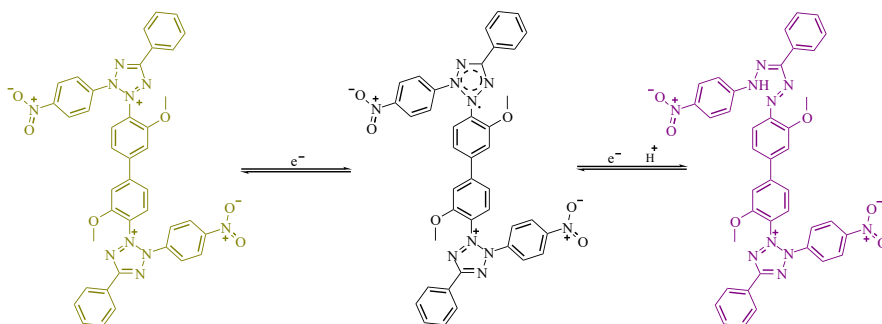


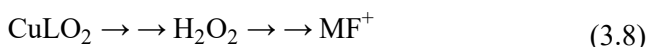
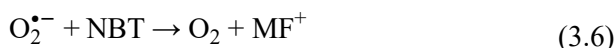
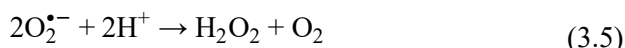
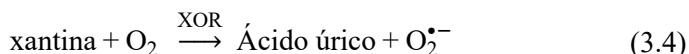
Figura 3.3 Mecanismo de reducción de NBT.²²

Si se añade una muestra que no tiene actividad SOD a una solución, todo el superóxido reaccionará con el NBT, lo que resultará en una reacción rápida y una gran variación de la A_{560} con el tiempo. Por otro lado, si la muestra presenta actividad SOD, esta competirá con el sistema NBT/MF⁺ por la eliminación de los aniones superóxido. Como resultado de esta inhibición, la tasa de cambio de A_{560} con el tiempo (dA_{560}/dt) disminuirá. Mediante esta determinación cinética, y basándonos en la derivación matemática mostrada en la siguiente sección, es posible calcular la constante catalítica y el valor de IC_{50} para la eliminación del anión superóxido estudiado.

Mecanismo de reacción

El proceso de reducción del NBT a MF⁺ en presencia de un sistema eliminador de $O_2^{\bullet-}$ es un fenómeno complejo que implica varias reacciones y una cinética extensa. Este mecanismo fue propuesto por Casella y colaboradores,²³ en 2004 y posteriormente fue desarrollado por Salvador Blasco en su tesis doctoral.²²

El mecanismo de reducción del NBT se puede representar mediante las siguientes reacciones:



El sistema xantina/xantina oxidorreductasa proporciona un flujo constante de aniones superóxido (reacción (3.4)). Estos radicales, que son autodegradados por una reacción bimolecular (ecuación (3.5)), también reaccionan con el NBT para producir MF⁺ (reacción (3.6)). Además, en presencia de un ligando (L) eliminador de $O_2^{\bullet-}$, los superóxidos pueden catalizar su dismutación a O_2 y

H_2O_2 (reacción (3.7)). Durante este proceso, los superóxidos pueden reaccionar con ligandos, formando ROS, lo que proporciona una nueva vía para la formación de MF^+ (reacción (3.8)). Esta reacción es un equilibrio rápido, por lo que la cantidad de ROS residual es muy pequeña y se aplica la hipótesis del estado estacionario.

Para reducir el número de variables involucradas en la reacción se han planteado las siguientes condiciones; a. La concentración de xantina oxidorreductasa a un flujo constante y suficiente. b. La concentración de NBT fue lo suficientemente alta para asegurar que se dé una reacción catalítica y no un proceso estequiométrico. Ambos factores influyen en un aumento de la absorbancia lineal durante el ensayo experimental. Este proceso se describe en la Figura 3.4.

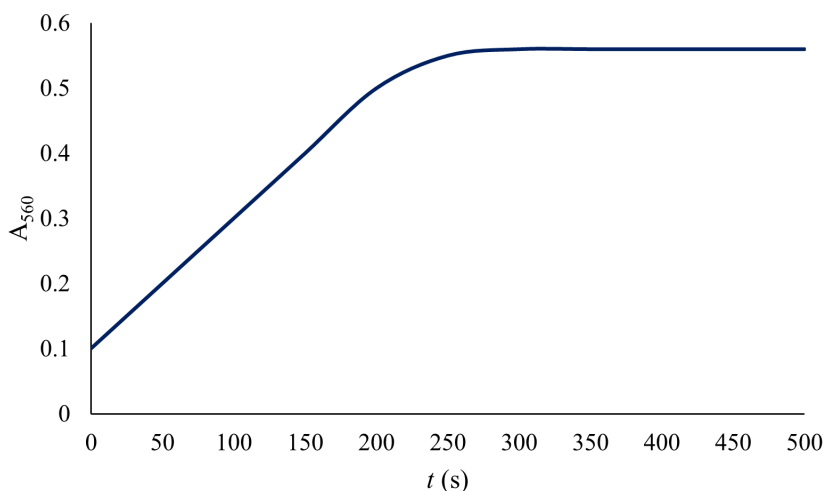


Figura 3.4: Evolución de A_{560} en función del tiempo en un ensayo de SOD típico.

Este esquema muestra la variación de A_{560} de una solución de xantina y NBT cuando se ha añadido una dosis de XOR. En los primeros momentos, se activa el ciclo catalítico, seguido de la reacción de oxidación-reducción. Durante esta etapa, todo el $\text{O}_2^{\bullet-}$ producido se consume y la velocidad de generación de

$O_2^{\bullet-}$ alcanza el estado estacionario. Posteriormente, la producción de $O_2^{\bullet-}$ disminuye hasta ser casi nula debido al agotamiento de la xantina.

La formación de MF^+ está determinada mediante las reacciones (3.6) y (3.8), y la velocidad de esta formación puede simplificarse considerando que se mantiene la concentración de NBT lo suficientemente alta como para permanecer constante (ecuación (3.9) y (3.10)).

$$v_{3.6} = k_{3.6} [O_2^{\bullet-}][NBT] \quad (3.9)$$

$$v_{3.6} = k_{3.6} [O_2^{\bullet-}] \quad (3.10)$$

La velocidad de la ecuación (3.8) depende de la afinidad de ligando con el anión superóxido. Llamemos f a la eficiencia relativa de la reacción (3.8) respecto de (3.6), cuya velocidad es:

$$v_{3.8} = f k_{3.6} [CuLO_2] \quad (3.11)$$

La reacción (3.7) se considera un equilibrio rápido definido por una constante de equilibrio K lo que permite aplicar la hipótesis del estado estacionario. Además, durante el ensayo, la concentración de aniones superóxido es muy baja en comparación con la concentración total de complejo, lo que permite realizar algunas aproximaciones.

$$[CuL] + [CuLO_2] \approx [Cu]_{tot} \quad (3.12)$$

$$[O_2^{\bullet-}] + [CuLO_2] \approx [O_2^{\bullet-}]_{tot} \quad (3.13)$$

Siguiendo estas consideraciones, podemos deducir lo siguiente

$$[O_2^{\bullet-}] = \frac{[O_2^{\bullet-}]_{tot}}{1 + K[CuL]_{tot}} \quad (3.14)$$

$$[CuLO_2] = \frac{[O_2^{\bullet-}]_{tot} K[CuL]_{tot}}{1 + K[CuL]_{tot}} \quad (3.15)$$

Por último, la velocidad global de formación de MF^+ viene dada por la suma de las velocidades $v_{3.6}$ y $v_{3.8}$:

$$v = v_{3.6} + v_{3.8} = k_{3.6}([O_2^{\bullet-}]_{tot} + f[CuLO_2]_{tot}) \quad (3.16)$$

$$v = K_{3.6}[\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{tot}} \frac{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}}{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}} \quad (3.17)$$

La ley de Lambert-Beer nos permite relacionar $[\text{MF}^+]$ con la absorbancia:

$$\frac{d(A_{560})}{dt} = \epsilon_{560} \cdot l \cdot \frac{d[\text{MF}^+]}{dt} = \text{Constante en el tramo lineal} \quad (3.18)$$

Sustituyendo la concentración de MF^+ por la ecuación anterior y reuniendo las constantes en S_0 tenemos:

$$\frac{d(A_{560})}{dt} = S = S_0 \frac{1 + fK[\text{CuL}]_{\text{tot}}}{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}} \quad (3.19)$$

Donde $S_0 = \epsilon_{560} \cdot l \cdot k_{3.6} \cdot [\text{O}_2^{\bullet-}]_{\text{tot}}$ y representa la media de los controles, ϵ_{560} el coeficiente de extinción y S representa la media de las medidas del compuesto de ensayo para cada concentración. Por último, la inhibición la expresamos como la disminución de la actividad respecto al blanco. En el blanco $[\text{L}] = 0$, por lo tanto, $S = S_0$. Así pues, la inhibición (IC) será igual a:

$$\text{IC} = \frac{S_0 - S}{S_0} = \frac{(1 + f)K[\text{CuL}]_{\text{tot}}}{1 + K[\text{CuL}]_{\text{tot}}} \quad (3.20)$$

De este modo, la actividad antioxidante de un imitador de SOD se puede evaluar mediante la medición de la variación de A_{560} en el tiempo para una mezcla que contiene, xantina/XOR/NBT.

Procedimiento experimental

Para la realización de un ensayo típico de actividad SOD, se prepararon varias disoluciones. En primer lugar, se disolvió xantina a una concentración de 0.250 mM en tampón HEPES, obteniéndose un volumen total de 40 mL. Posteriormente, se añadió 2.08 mg de azul de tetrazolio (NBT) a esta disolución de xantina/HEPES, agitando hasta su completa disolución. Esta solución, por ser fotosensible, se almacenó en un frasco de vidrio topacio y se utilizó el mismo día de su preparación. Paralelamente, se preparó una dilución 1/20 (v/v) de xantina oxidasa en tampón HEPES, la cual se mantuvo en baño

de hielo hasta su uso. Finalmente, se realizaron las diluciones del compuesto en estudio en tampón TRIS, a concentraciones de 0.5, 1, 2, 5, 10, 25, 50 y 100 μM .

Para medir la SOD, se empleó una cubeta desechable de poliestireno de 1 mL de capacidad. Se introduce 800 μL de la solución NBT/xantina, 100 μL de compuesto y 100 μL de enzima xantina oxidorreductasa. La mezcla se agita y se coloca rápidamente en el equipo UV-vis para medir la variación de A_{560} durante dos minutos. Además de las muestras preparadas, se realiza lo mismo con un blanco llamado "control", que contiene el mismo volumen de tampón TRIS en lugar de muestra. Mediante el blanco se puede conocer la actividad de la xantina oxidorreductasa y corregir su concentración, que debe estar en un rango entre $8 \cdot 10^{-4}$ y $12 \cdot 10^{-4}$ UA/s. Para cada concentración a estudiar, se realizan 3 réplicas.

Todas las mediciones cinéticas se llevaron a cabo de acuerdo con las siguientes condiciones experimentales:

Temperatura: 25°C
 pH: 7.4
 λ_{Lectura} : 560nm
 Tiempo cinético total: 120s
 Tiempo entre lecturas: 1 s
 Ruta óptica de la cubeta: 1 cm

Cálculos

La inhibición viene dada por la ecuación (3.20). Además, el error en cada punto se puede calcular utilizando la fórmula de propagación de errores (ecuación (3.21)), que permite estimar la incertidumbre asociada con la medida de la inhibición.

$$\epsilon_{IC}^2 = \frac{(S \cdot \epsilon_{S_0})^2 + (S_0 \cdot \epsilon_S)^2}{S_0^2} \quad (3.21)$$

Para cuantificar la actividad de los compuestos en el ensayo de SOD, se representa el porcentaje de inhibición (IC) en función de la concentración del compuesto. Los investigadores pioneros en estos ensayos tomaron el valor de la concentración donde IC = 50 % como medida estándar de la actividad. Desde entonces, este dato se ha utilizado como referencia para comparar las actividades de diferentes sustancias con actividad SOD.

El valor de IC₅₀, puede determinarse de dos maneras principales: a. Por interpolación, y b. Haciendo el ajuste de los datos de la ecuación (3.20) y despejando el valor correspondiente:

$$IC_{50} = \frac{1}{(1 - 2f) K} \quad (3.22)$$

Además, es posible obtener una aproximación de la constante catalítica a partir del IC₅₀ mediante la siguiente expresión.^{24,25}

$$k = k_{\text{detector}} \cdot [\text{detector}] / IC_{50} \quad (3.23)$$

Los datos para los detectores más habituales son los siguientes: para el NBT $k_{\text{NBT}} = 5.94 \pm 0.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y si es citocromo c, entonces $k_{\text{CytC}} = 2.6 \pm 0.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.²⁶

La constante catalítica, es una medida de la actividad que es independiente de las condiciones experimentales.

Este parámetro es útil para comparar resultados obtenidos a través de diferentes métodos, tanto indirectos como directos. Sin embargo, es fundamental ser extremadamente cuidadoso al hacer estas comparaciones, ya que las variaciones en los métodos y las condiciones experimentales pueden influir significativamente en los resultados. Por lo tanto, cualquier

comparación debe considerar las diferencias en los procedimientos utilizados para asegurar que las conclusiones sean válidas.

Todo el proceso de cálculos y resultados matemáticos está automatizado en el programa SUPERSOD (<https://github.com/salvadorblasco/supersod>), el cual proporciona directamente los valores de cinética, constante catalítica e IC_{50} .

3.2.13 Determinación de concentración micelar crítica

La determinación de la concentración micelar crítica (CMC) se realizó con el método de medida por fluorimetría de sondas orgánicas, para ello se utilizó el pireno. Este compuesto ha sido utilizado durante más de 50 años como sonda fluorescente para sistemas microheterogéneos como las micelas, polímeros, proteínas, péptidos y membranas biológicas.^{27,28} La sensibilidad de la estructura fina de fluorescencia del pireno a la polaridad del disolvente lo convierte en una herramienta ampliamente utilizada para la determinación de la CMC de sistemas micelares.²⁹⁻³³

Fundamento

El método de fluorimetría del pireno para determinar la CMC se basa en el uso del pireno como sonda fluorescente en una disolución de solvente polar que contiene un surfactante o tensioactivo. En este proceso, se mide la fluorescencia del pireno, que cambia según su entorno. Cuando se alcanza la CMC, se observa una transición en la razón entre las intensidades de la estructura fina de las bandas I y III del pireno. Este cambio refleja la transición de un entorno hidrofílico a uno hidrofóbico, asociado a la formación de micelas en la solución.^{34,35} Este cambio puede ser detectado y cuantificado usando un fluorímetro.

Experimentalmente, la CMC se encuentra trazando una gráfica de la relación lineal entre la concentración de surfactante y la relación (I_I/I_{III}) de sus intensidades de fluorescencia en los picos I y III (Figura 3.5).

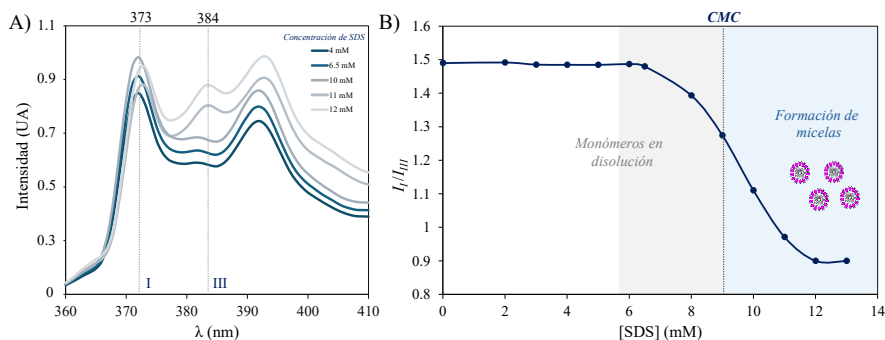


Figura 3.5: A) Espectro de emisión de fluorescencia del pireno en soluciones de SDS a distintas concentraciones: por debajo (4 mM) y por encima (12 mM) de la CMC. B) Cociente de intensidades de la estructura fina (I_I/I_{III}) en función de [surfactante].³⁵

Para determinar el valor de la CMC, se ajustaron los datos experimentales por minimización de mínimos cuadrados mediante un modelo para la intensidad de fluorescencia en estado estacionario.²⁷ Este modelo permite calcular la concentración de micelas en solución $[M] = ([S]_0 - \text{CMC})/n$ a partir de la concentración total de tensioactivo ($[S]_0$), el valor de la CMC, y el número de agregación (n) y se describe mediante las siguientes ecuaciones:

Ancho de la transición relativa,

$$r = \frac{\sigma}{\text{CMC}} \quad (3.24)$$

A niveles bajos de concentración de $[S]_0$, predominan los tensioactivos monoméricos, mientras que a niveles altos de $[S]_0$, las micelas determinan las propiedades de la solución. La transición entre estas regiones alrededor de la CMC no es abrupta, sino gradual, dentro de un intervalo de concentración de transición con un ancho σ . Este ancho σ se refiere al ancho de una función de Gauss que describe la segunda derivada (curvatura) de la concentración de tensioactivo monomérico $[S_I]$ con respecto a $[S]_0$. Cuanto más pequeña sea σ ,

más nítida será la transición entre las dos regiones lineales por debajo y por encima de la CMC.

Para la concentración de monómeros tensioactivos $[S_I]$ en una solución con concentración total de tensioactivo $[S]_0$ está basado en la “condición de Phillips” y tiene la forma de función sigmoidea normalizada centrada alrededor de CMC y con ancho de transición relativo r y concentración relativa $S_0 = [S]_0/\text{CMC}$:

$$[S_I] = \text{CMC} \left[1 - \frac{A}{2} \left(\sqrt{\frac{2}{\pi}} r \exp\left(-\frac{(S_0-1)^2}{2r^2}\right) + (S_0 - 1) \left(\text{erf}\left(\frac{S_0-1}{\sqrt{2}r}\right) - 1 \right) \right) \right] \quad (3.25)$$

Donde A es la constante de normalización (para pequeños $r < 0.5$: $A \approx 1$):

$$A = \frac{2}{1 + \sqrt{\frac{2}{\pi}} r \exp\left(-\frac{1}{2r^2}\right) + \text{erf}\left(\frac{1}{\sqrt{2}r}\right)} \approx 1 \quad (r < 0.5) \quad (3.26)$$

La concentración de tensioactivos agregados (micelas) $[S_m]$, es la diferencia entre la concentración total y la concentración de los tensioactivos monoméricos:

$$[S_m] = [S]_0 - [S_I] \quad (3.27)$$

La concentración de micelas $[M]$, depende del número de agregación medio (n), que se considera constante alrededor de la CMC:

$$[M] = \frac{[S_m]}{n} \quad (3.28)$$

Para valores pequeños típicos de r ($r < 0.5$), la fracción de tensioactivos micelizados $[S_m]/[S]_0$ en el CMC es $[S_m](\text{CMC})/\text{CMC} \approx r/\sqrt{2\pi} \approx 0.4r$ y por lo tanto la concentración de micelas en el CMC viene dada por:

$$[M](\text{CMC}) \approx \frac{\text{CMC}}{n} \frac{r}{\sqrt{2\pi}} = \frac{1}{n} \frac{\sigma}{\sqrt{2\pi}} \approx 0.4 \frac{\sigma}{n} \quad (3.29)$$

Procedimiento experimental

Solución metanólica de pireno

- Se preparó una solución metanólica de pireno (10 mL) a una concentración de 2.47mM. Posteriormente, esta disolución se diluyó 20 veces, lo que resultó en una solución final (P_1) de trabajo con una concentración 0.123mM.

Solución de los compuestos de ensayo

Se prepararon disoluciones de los compuestos de ensayo en un intervalo de concentraciones entre 0.01 y 40 mM, cada una con un volumen total de 2 mL utilizando agua Milli-Q. Para los ensayos a pH fisiológico, se utilizó tampón TRIS en lugar de agua ultrapura. Las disoluciones se ajustaron a diferentes valores de pH (4, 6, 7, 7.4, 8, 9, 10) mediante la adición de HCl o NaOH, según fuera necesario. Todas las disoluciones se dejaron reposar durante 12 horas antes del ensayo para asegurar el equilibrio de los compuestos en disolución.

Para preparar la disolución madre del primer compuesto de ensayo (L_1) a pH ácido, se disolvieron 40mM de L_1 en 1.5mL de agua Milli-Q ajustada a pH 4. Posteriormente, se comprobó el pH y se completó el volumen con agua ácida hasta alcanzar un total de 2mL manteniendo pH 4.

Se tomó 1 mL de esta disolución L_1 como referencia inicial para calibrar el fluorímetro. Luego, se prepararon disoluciones a diferentes concentraciones. Para la primera muestra (C_1), se tomó 1 mL de L_1 y se añadió 0.5mL de agua Milli-Q a pH 4, ajustando el pH si era necesario, y completando el volumen hasta 2mL. El proceso se repitió para las siguientes muestras (C_2 , C_3 , ..., C_f), asegurando que cada disolución mantuviera el pH y volumen requeridos. De la última disolución (C_f), se descartó 1 mL.

Para medir la fluorescencia, se preparó un blanco de referencia del pireno (P_2), con 1 mL de agua Milli-Q ajustada a pH 4. A continuación, se añadieron 17 μ L de una disolución estándar de pireno (P_1) a cada muestra preparada (L_1 , P_2 , C_1 , C_2 , ..., C_f). Finalmente, se registraron los datos de fluorescencia para todas las muestras.

Antes de estudiar los compuestos de ensayo, se validó el método de fluorimetría del pireno utilizando un surfactante conocido, el dodecilsulfato de sodio (SDS).

Para cada ensayo experimental se realizaron 3 tipos de mediciones: blanco, de control y el compuesto a estudiar. Las muestras se prepararon con 12 h de antelación para asegurar que los compuestos alcanzaran el equilibrio en la disolución. Para medir la fluorescencia se empleó una cubeta de cuarzo con capacidad de 1 mL.

El ensayo comienza con la medición del blanco (P_2), que contiene la disolución de trabajo (agua Milli-Q) a su respectivo pH. Este paso permite determinar la fluorescencia del pireno en la disolución de trabajo. El pireno se excitó a una longitud de onda de 334 nm, y su emisión se registró a 373 y 384 nm, correspondiente al primer y tercer rango vibratorio. Las rendijas utilizadas para la excitación y emisión se ajustaron a 8 y 2 nm. Posteriormente, se midió la muestra de control (L_1), que corresponde a la disolución con la concentración más alta del compuesto de ensayo. Esta medida se realiza para regular las rendijas de excitación y emisión del fluorímetro. Finalmente, se midieron los compuestos de ensayo. Cada experimento se realizó por duplicado.

Cálculos

En cada experimento se registraron las bandas de emisión del pireno a longitudes de onda de 373 y 384nm. Con estos datos, se calculó la relación de las intensidades entre los pares de bandas (I_I/I_{III}) y se representó gráficamente en función del logaritmo de la concentración de las soluciones (Figura 3.5 (A)). Para determinar el valor de la CMC, los datos experimentales se ajustaron por mínimos cuadrados utilizando un modelo para la intensidad de fluorescencia²⁷ en estado estacionario. Para la elaboración de las curvas de CMC se utilizó un script en Python, haciendo uso de la biblioteca SciPy.

3.2.14 Ensayos de permeabilidad artificial en paralelo

Fundamento

El ensayo de permeabilidad de membrana artificial en paralelo (PAMPA) es un método no celular ampliamente utilizado en las primeras etapas del desarrollo de fármacos para predecir la capacidad de los compuestos de atravesar membranas por difusión pasiva.³⁶⁻³⁹ Este método fue introducido por Kansy y colaboradores en 1998 y, desde entonces, ha evolucionado hasta consolidarse como un modelo biomimético eficiente debido a su rapidez, versatilidad y bajo coste.³⁷

Una de las principales ventajas del ensayo PAMPA es su capacidad para evitar los problemas de precipitación que suelen surgir al trabajar con compuestos de baja solubilidad a concentraciones clínicamente relevantes en ensayos celulares.³⁷ Este aspecto es particularmente útil en la evaluación de compuestos con propiedades fisicoquímicas complejas.

El ensayo PAMPA se lleva a cabo en un soporte poroso de membrana de 96 pocillos, donde se evalúa la capacidad de un compuesto para difundirse desde

un compartimento donante, a través de una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) impregnada con lípidos disueltos en un solvente orgánico, hacia un compartimento aceptor (placa PAMPA). Estas membranas pueden formularse para simular diferentes tipos de barreras biológicas, como la barrera hematoencefálica o la membrana mitocondrial, lo que permite un análisis de la permeabilidad en contextos fisiológicos relevantes.

Procedimiento

Material requerido

Para los ensayos PAMPA realizados con los compuestos de esta tesis, se utilizaron placas de 92 pocillos diseñadas para sistemas de compartimentos donante y receptor. Como placa donante se empleó el modelo MultiScreen-IP (MAIPNTR10) de Merck-Millipore, con membrana de PVDF hidrófoba, transparente, no estéril, y un tamaño de poro de 0.45 μm . La placa receptora correspondió al modelo MATRNPS50 de la misma compañía. Para la lectura espectrofotométrica, se utilizó una placa compatible con UV (modelo MSCPNUV40), también de Merck-Millipore.

Preparación de soluciones

Se preparó una solución al 1% (p/v) del lípido de membrana en dodecano ($\sim 500\mu\text{L}$ /placa), aplicando ultrasonido para asegurar su completa disolución. El compuesto de ensayo (L, 1 mM) se disolvió en 0.5 mL de agua Milli-Q o DMSO, y posteriormente se diluyeron 100 μL de esta disolución en 1 mL de agua Milli-Q ajustada a pH 4.

Este procedimiento se repitió para cada uno de los valores de pH de establecidos (4, 6, 7, 8 y 10), verificando y ajustando el pH con HCl o NaOH cuando fue necesario. Además, se prepararon 10 mL de agua Milli-Q ajustada a cada uno de los pH indicados.

Procedimiento experimental

El ensayo se realiza utilizando placas de 96 pocillos con base porosa (Merck), específicas para ensayos de difusión pasiva. El lípido de membrana utilizado fue un extracto de lípidos polares del cerebro, disuelto en dodecano (Avanti polar lipids). Se preparó una solución al 1% (p/v) del lípido en dodecano, utilizando aproximadamente 500 μL por placa, aplicando ultrasonido para asegurar una disolución completa.

Para llevar a cabo el ensayo, se depositan 5 μL de la solución de lípido sobre la frita porosa de cada pocillo de la placa donante. A continuación, se añaden 150 μL de la solución de donante que contiene el compuesto de ensayo en cada pocillo de la placa donante. Después se incorporaron 300 μL de tampón TRIS en cada pocillo de la placa aceptora. Posteriormente, se ensamblaron ambas placas garantizando el contacto entre la membrana y el tampón del compartimento aceptor. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 16 horas (Figura 3.6).

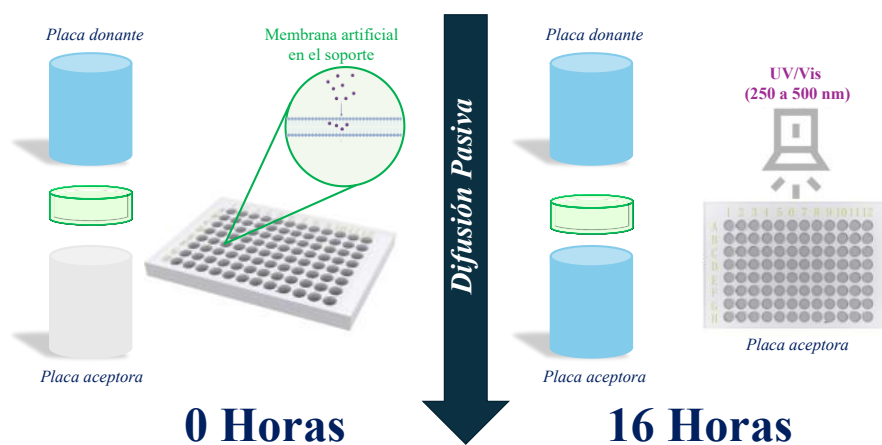


Figura 3.6: Esquema de difusión pasiva mediante el ensayo PAMPA.

En paralelo, se preparó una placa de referencia con idéntica disposición de compuestos que la placa PAMPA, donde cada pocillo contenía 300 μL del

compuesto de ensayo. Después de la incubación, la placa PAMPA se desmonta y se registran los espectros de absorción UV/Vis de 250 a 500nm, tanto para la placa aceptora como para la placa de referencia. El ensayo también permitió evaluar el efecto del pH sobre la permeabilidad, mediante el ajuste previo de las disoluciones utilizadas.

Cálculos

El valor de permeabilidad efectiva (P_e) se determina a partir de la relación entre la concentración del compuesto en el compartimento aceptor (A_A) al finalizar el ensayo y la concentración teórica en equilibrio (A_E) según las siguientes ecuaciones:³⁸

$$P_e = -K \cdot \ln\left(1 - \frac{C_A}{C_E}\right) \quad (3.30)$$

Donde:

$$K = \frac{V_D \cdot V_A}{S \cdot t \cdot (V_D + V_A)} \quad (3.31)$$

Si se trata de una sola especie absorbente cuya absorbancia es la misma en ambas fases.

$$A_A = \varepsilon \cdot l \cdot C_A \quad (3.32)$$

$$A_E = \varepsilon \cdot l \cdot C_E \quad (3.33)$$

$$P_e = -\frac{V_D \cdot V_A}{S \cdot t \cdot (V_A + V_D)} \ln \frac{A_A}{A_E} \quad (3.34)$$

Donde V_D y V_A son los volúmenes de los pocillos en las placas donante y aceptora, respectivamente (0.15cm^3 y 0.30cm^3); S es la superficie efectiva de la membrana (0.24cm^2); t es el tiempo de incubación; C_A concentración del compuesto en el compartimento aceptor al finalizar el ensayo; C_E concentración teórica de equilibrio; y A_A/A_E la razón entre las absorbancias medidas en la placa aceptora y la placa de referencia.

El balance de masa establece que:

$$C_E \cdot (V_A + V_D) = C_0 \cdot V_D = C_A \cdot V_A + C_D \cdot V_D \quad (3.35)$$

Y el error de propagación de permeabilidad (σ_{P_e}) viene dado por:

$$\sigma_{P_e} = \frac{C \cdot \sigma_r}{1 - r} \quad (3.36)$$

Siendo r , la relación de absorbancias entre la placa aceptora y la de referencia o equilibrio.

$$r = \frac{A_A}{A_E} \quad (3.37)$$

Donde:

$$\left(\frac{\sigma_r}{r}\right)^2 = \left(\frac{\sigma_{A_A}}{A_A}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{A_E}}{A_E}\right)^2 \quad (3.38)$$

Los cálculos de permeabilidad efectiva se representaron mediante un ajuste no lineal tal como se muestra en la Figura 3.7. En ella se ilustran las curvas de permeabilidad para los compuestos de ensayo, junto con los límites de cuantificación del método.

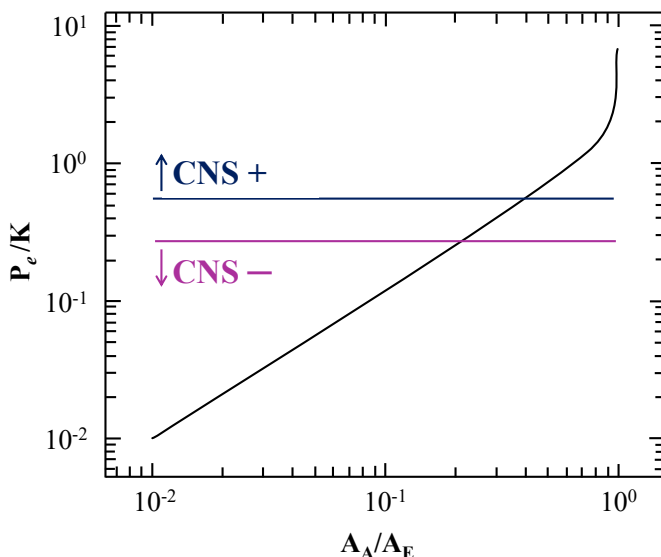


Figura 3.7: Permeabilidad y límites de cuantificación de los compuestos de ensayo.

3.2.15 Estudios computacionales

Los estudios computacionales sobre micelas han cobrado especial importancia como herramienta para interpretar a nivel molecular los datos experimentales. En particular, las simulaciones de dinámica molecular permiten obtener una visión detallada a escala molecular de las propiedades de las micelas. Estas simulaciones permiten explorar cómo las moléculas interactúan y se organizan en soluciones, ofreciendo información que complementa los resultados experimentales.

El dodecilsulfato de sodio (SDS), un tensioactivo ampliamente utilizado como modelo en estudios teóricos, ha sido objeto de numerosas simulaciones que han contribuido significativamente a comprender la formación y el comportamiento de micelas.

En este estudio se simuló un sistema compuesto por 100 moléculas de un ligando específico (L) mediante dinámica molecular. Durante la simulación, las moléculas se agruparon para formar una única micela, que se mantuvo estable a lo largo del tiempo. A partir de los datos obtenidos sobre el momento de inercia (I) de la micela, se calculó la excentricidad promedio (e) utilizando la siguiente ecuación:⁴⁰

$$e = 1 - \frac{I_{min}}{I_{avg}} \quad (3.39)$$

Este cálculo de la excentricidad proporciona una medida de cuán elíptica o esférica es la micela, lo que ayuda a describir con mayor precisión su geometría y las interacciones internas entre las moléculas de ligando.

También se estimó el radio micelar promedio (R_s) a partir del radio de giro (R_g). El R_s representa el radio de una esfera equivalente al tamaño global de la micela, mientras que el R_g corresponde a la raíz cuadrada del promedio de las

distancias al cuadrado entre los átomos y el centro de la masa de la micela. El R_s se ha estimado utilizando la ecuación (3.40).⁴⁰

$$R_s = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g \quad (3.40)$$

Los resultados de estas simulaciones ofrecen una base sólida para comparar y comprender mejor los datos experimentales relacionados con las micelas formadas por estos ligandos.

3.3 Bibliografía

- [1] Gran G.; *Analyst*; **1952**, 77, 661–671.
- [2] Rossotti F. J. C.; Rossotti H.; *J. Chem. Educ.*; **1965**, 42, 375.
- [3] Gran G.; Dahlenborg H.; Laurell S.; Rottenberg M.; *Acta Chem. Scand.*; **1950**, 4, 559–577.
- [4] Gans P.; Sabatini A.; Vacca A.; *Talanta*.; **1996**, 43, 1739–1753.
- [5] Fortran I.; Press W.; Teukolsky S.; Vetterling W.; Flannery B.; *Numerical recipes in FORTRAN: The art of scientific computing (2nd ed.)*; Cambridge, U.K.: Camb. Univ. Press; 1992.
- [6] Alderighi L.; Gans P.; Ienco A.; Peters D.; Sabatini A.; Vacca A.; *Coord. Chem. Rev.*; **1999**, 184, 311–318.
- [7] Covington A. K.; Paabo Maya.; Robinson R. Anthony.; Bates R. G.; *Anal. Chem.*; **1968**, 40, 700–706.
- [8] Kuhn S.; Cobas C.; Barba A.; Colreavy-Donnelly S.; Caraffini F.; Borges R. M.; *J. Magn. Reson.*; **2023**, 348, 107381.
- [9] Hope H.; *Acta Crystallogr., Sect. B*; **1988**, 44 (1), 22–26.
- [10] Burla M. C.; Caliendo R.; Carrozzini B.; Cascarano G. L.; Cuocci C.; Giacovazzo C.; Mallamo M.; Mazzone A.; Polidori G.; *J. Appl. Crystallogr.*; **2015**, 48, 306–309.
- [11] Sheldrick, G. M.; *Acta Crystallogr. Sect. Found. Adv.*; **2015**, 71, 3–8.
- [12] Dolomanov O. V.; Bourhis L. J.; Gildea R. J.; Howard J. A. K.; Puschmann H.; *J. Appl. Crystallogr.*; **2009**, 42, 339–341.
- [13] Pisoschi A. M.; Negulescu G. P.; *Biochem. Anal. Biochem.*; **2012**, 01 (01).
- [14] MacDonald-Wicks L. K.; Wood L. G.; Garg M. L.; *J. Sci. Food Agric.*; **2006**, 86, 2046–2056.
- [15] Riley D. P.; *Chem. Rev.*; **1999**, 99, 2573–2588.
- [16] Beauchamp C.; Fridovich I.; *Anal. Biochem.*; **1971**, 44, 276–287.
- [17] Beyer W.; Imlay J.; Fridovich I.; *Superoxide Dismutases. In Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Cohn W. E., Moldave K., Eds.; Academic Press; 1991.
- [18] Oberley L. W.; Spitz D. R.; *Assay of Superoxide Dismutase Activity in Tumor Tissue. In Methods in Enzymology; Oxygen Radicals in Biological Systems*; Academic Press; 1984.
- [19] Cantu-Medellin N.; Kelley E. E.; *Redox Biol.*; **2013**, 1, 353–358.
- [20] Hodges G. R.; Young M. J.; Paul T.; Ingold K. U.; *Free Radic. Biol. Med.*; **2000**, 29, 434–441.
- [21] Harrison R.; *Free Radic. Biol. Med.*; **2002**, 33, 774–797.

- [22] Llopis S. B.; Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes. Ph.D. thesis, Universitat de Valencia, **2011**.
- [23] Cejudo-Marín R.; Alzuet G.; Ferrer S.; Borrás J.; Castiñeiras A.; Monzani E.; Casella L.; *Inorg. Chem.*; **2004**, 43, 6805–6814.
- [24] Durot S.; Policar C.; Cisnetti F.; Lambert F.; Renault J.-P.; Pelosi G.; Blain G.; Korri-Youssoufi H.; Mahy J.-P.; *Eur. J. Inorg. Chem.*; **2005**, 2005, 3513–3523.
- [25] Pasternack R. F.; Halliwell B.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1979**, 101, 1026–1031.
- [26] Bielski B. H. J.; Richter H. W.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1977**, 99, 3019–3023.
- [27] Piñeiro L.; Novo M.; Al-Soufi W.; *Adv. Colloid Interface Sci.*; **2015**, 215, 1–12.
- [28] Ramamurthy V. (Ed.); *Photochemistry in Organized and Constrained Media*; VCH Publishers; 1991.
- [29] Scholz N.; Behnke T.; Resch-Genger U.; *J. Fluoresc.*; **2018**, 28, 465–476.
- [30] Sternhagen G. L.; Gupta S.; Zhang Y.; John V.; Schneider G. J.; Zhang D.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2018**, 140, 4100–4109.
- [31] Kalyanasundaram K.; Thomas J. K.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1977**, 99, 2039–2044.
- [32] Son S.; Shin E.; Kim B.-S.; *Biomacromolecules*; **2014**, 15, 628–634.
- [33] Hussain E.; Niu N.; Zhou H.; Shahzad S. A.; Yu C.; *Analyst*; **2018**, 143, 4283–4289.
- [34] Myers D.; *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*; Wiley; 1999.
- [35] Dominguez A.; Fernandez A.; Gonzalez N.; Iglesias E.; Montenegro L.; *J. Chem. Educ.*; **1997**, 74, 1227.
- [36] Wohnsland F.; Faller B.; *J. Med. Chem.*; **2001**, 44, 923–930.
- [37] Kansy M.; Avdeef A.; Fischer H.; *Drug Discov. Today Technol.*; **2004**, 1, 349–355.
- [38] Schmidt D.; Lynch J.; *MultiScreen® Filter Plates for PAMPA*; Millipore Corporation; 2003.
- [39] He S.; Zhiti A.; Barba-Bon A.; Hennig A.; Nau W. M.; *Front. Chem.*; **2020**, 8, 597927.
- [40] Palazzesi F.; Calvaresi M.; Zerbetto F.; *Soft Matter*; **2011**, 7, 9148–9156.

Capítulo 4

Síntesis y Caracterización

*“No solo presento moléculas:
presento el arte oculto de la
cooperación de la materia.”*

— Mercy Arteaga —

4.1 Introducción

La metodología de síntesis de azamacrociclos propuesta por Jack E. Richman y Thomas J. Atkins en los años setenta, conocida como la síntesis de "análogos nitrogenados de los éteres corona" (Figura 4.1),^{1,2} ha demostrado ser una herramienta valiosa y adaptable para las investigaciones en química y bioquímica. Su versatilidad ha permitido su aplicación en múltiples contextos, lo que ha abierto nuevas posibilidades en la síntesis de compuestos con propiedades específicas.

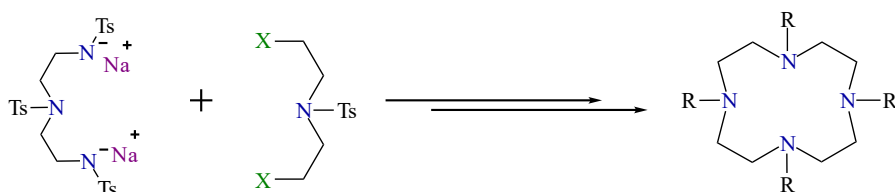


Figura 4.1: Esquema de reacción para la síntesis de compuestos macrocíclicos propuesto por Richman y Atkins.¹

Originalmente, la síntesis de Richman-Atkins se destacó por su rapidez y buen rendimiento para obtener aminas cíclicas de tamaño medio a grande. Este enfoque se basa en la condensación de una sal sódica de bis-*p*-toluenosulfonamida con bis-tosilatos, bis-mesilatos o bis-haluros, en condiciones de alta dilución.³ En los últimos años se han desarrollado diversas variantes de esta reacción.^{1,2} En este trabajo se emplea una de esas variantes, desarrollada previamente por nuestro grupo,⁴ para la síntesis de los ligandos presentados en esta tesis. Un esquema detallado del procedimiento sintético se muestra en la Figura 4.2.

4.1.1 Protección de los grupos amino

La protección de grupos amino utilizando cloruro de *p*-toluenosulfonilo (TsCl), introducida por Emil Fischer,⁵ es ampliamente empleada en síntesis orgánica.⁶ Sus beneficios incluyen monofuncionalidad con aminas primarias,

estabilidad, facilidad de separación y la posibilidad de generar derivados sin introducir nuevos centros estereogénicos. Aunque esta metodología es especialmente eficiente con aminas primarias, las aminas secundarias también pueden ser tosiladas bajo condiciones adecuadas, especialmente cuando no existe impedimento estérico. Esta estrategia es esencial para la manipulación selectiva de grupos amino durante la síntesis de compuestos orgánicos.⁷⁻⁹

4.1.2 Ciclación/Condensación

En la síntesis mediante la metodología de Richman-Atkins, la reacción implica el ataque nucleofílico de una amina tosilada al carbono activado de un bis-derivado adecuado (por ejemplo, bis-tosilatos, derivados de piridina, etc.), y se lleva a cabo en presencia de una base que mantiene desprotonado el grupo sulfonamida permitiendo así la formación eficiente del enlace deseado.

Los grupos tosilo desempeñan un papel crucial al incrementar la acidez de las aminas, aumentando su reactividad frente al ataque nucleofílico. Además, debido a su tamaño, estos grupos confieren rigidez a la cadena poliamínica, favoreciendo la preorganización de la cadena durante la reacción de ciclación. Una vez se ha producido la reacción del primer grupo amino secundario, las repulsiones estéricas causadas por los grupos tosilo provocan el plegamiento de la poliamina, posicionando la segunda amina terminal cerca del carbono bencílico sin reaccionar de la piridina. Así, la longitud de la cadena poliamínica y la cantidad de grupos tosilo influyen en la formación de monómeros frente a polímeros.⁷⁻⁹

El segundo aspecto crucial en esta reacción es la aplicación de condiciones de alta dilución. El agente electrofílico se añade gota a gota sobre la disolución que contiene la cadena nucleofílica, con el objetivo de evitar altas concentraciones locales de reactivos. Esta estrategia favorece la formación del producto de condensación con una relación molar 1:1, minimizando la

formación de subproductos de policondensación. La reacción se lleva a cabo en acetonitrilo seco, en presencia de carbonato potásico, que actúa como base para neutralizar el ácido generado durante el proceso y evitar la protonación de la amina. En conjunto, estas condiciones contribuyen a mejorar la eficiencia y la selectividad en la síntesis de poliazamacrociclos 1:1.

4.1.3 Funcionalización de la poliamina ciclada

La funcionalización es un aspecto clave en química supramolecular ya que permite modular las propiedades del receptor.¹⁰ Este proceso implica la introducción de grupos funcionales en la estructura molecular, con el fin de conferirle características particulares.² Al incorporar grupos específicos, se pueden modificar diversas propiedades químicas y físicas de la molécula, lo que amplía su aplicabilidad en contextos específicos. Por ejemplo, la incorporación de un grupo fluoróforo¹¹ durante la funcionalización puede dotar al compuesto de propiedades fluorescentes,¹² permitiendo su aplicación en técnicas de imágenes o marcado celular. La introducción de grupos acetato,^{2,13} que aportan átomos dadores adicionales, puede influir en la capacidad de formar enlaces químicos específicos o participar en interacciones moleculares específicas. Asimismo, la incorporación de grupos lipófilos o hidrófilos puede alterar significativamente la solubilidad del sistema.

4.1.4 Eliminación de los grupos protectores

La eliminación de grupos sulfonamida, introducidos como grupos protectores de aminas secundarias mediante cloruros de tosilo, fue históricamente un aspecto de interés en síntesis orgánica debido a la notable estabilidad de estos grupos bajo condiciones estándar.⁸ A lo largo de los años, se han desarrollado numerosos métodos efectivos, tanto reductores como fuertemente ácidos. Algunos ejemplos incluyen el uso de Li/NH_3 reportado por el grupo de

Heathcock en los años ochenta,¹⁴ la reacción de transferencia electrónica fotosensibilizada desarrollada por el grupo de Ayadim,¹⁵ que utilizó radiación ultravioleta, EtOH, H₂O, NaBH₄ y 1,2-dimetoxibenceno, así como el procedimiento descrito por Kudav,¹⁶ basado en una combinación de HClO₄ y AcOH.

La elección del método para la eliminación de los grupos tosilo, que generalmente constituye la etapa final de la síntesis, depende de las condiciones requeridas. En este trabajo, se adoptó el método de detosilación propuesto por el grupo de Snyder en los años cincuenta,^{17,18} que implica la escisión de los sistemas de sulfonamida en condiciones fuertemente ácidas generadas por una mezcla de ácido bromhídrico, ácido acético y fenol. La reacción se llevó a cabo en condiciones de reflujo durante 24 a 48 h. Dado que se forma Br₂ durante la reacción, fue necesario añadir un aceptor de bromo suficientemente eficaz para proteger las aminas de la adición electrofílica. En este contexto, el fenol desempeña un papel crucial durante la reacción, actuando como eliminador de radicales.¹⁷ Este enfoque se eligió por su practicidad y eficacia, y se empleó para obtener todos los ligandos presentados en esta tesis (Figura 4.2).

4.1.5 Metilación de las aminas secundarias

El procedimiento de metilación empleado en este trabajo se fundamenta en una ligera variación de la reacción de Eschweiler-Clarke,^{19,20} que utiliza formaldehído y ácido fórmico para la alquilación de las aminas. Este enfoque presenta dos ventajas que lo hacen especialmente adecuado para la metilación de los compuestos estudiados: en primer lugar, muestra una selectividad pronunciada hacia los grupos amino frente a otros nucleófilos, lo que facilita la síntesis de aminas terciarias a partir de secundarias; en segundo lugar, evita que la reacción continúe hasta formar grupos amino cuaternarios.^{21,22}

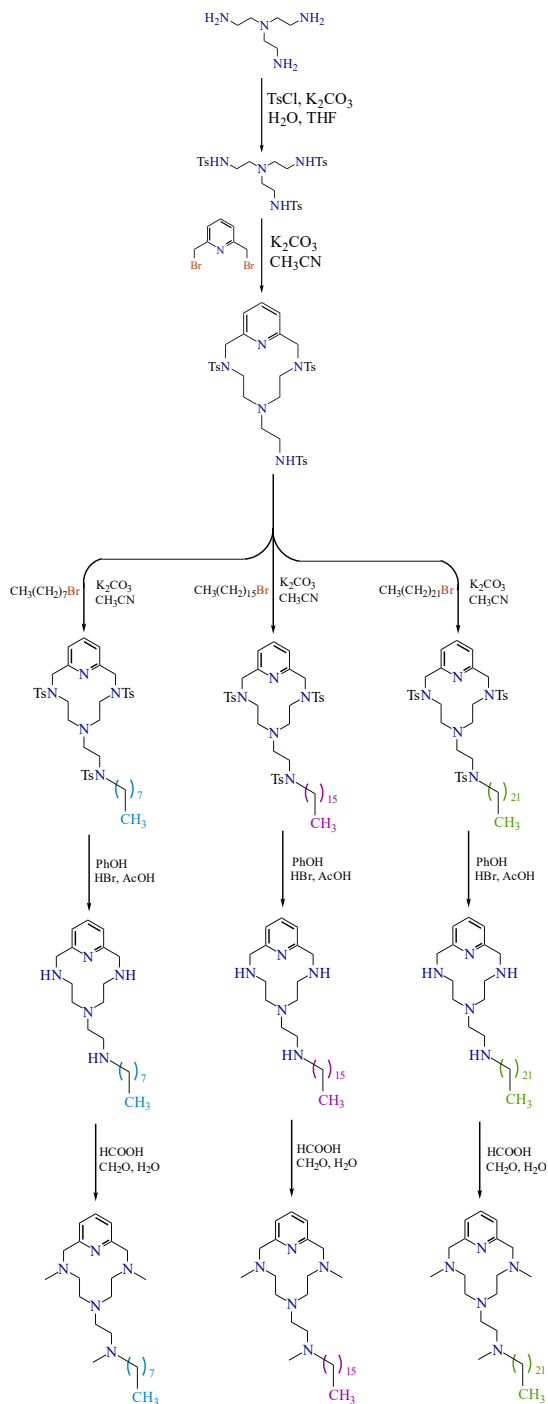


Figura 4.2: Esquema de reacción de la síntesis de los ligandos.

4.2 Síntesis de los ligandos

4.2.1 Protección de grupo amino con grupo tosilo

Mecanismo

En la reacción de tosilación, el grupo que se desea proteger es nucleofílico y protonable; por ello requiere la presencia de una base que lo mantenga desprotonado. El reactivo utilizado es el cloruro de tosilo (cloruro del ácido *p*-toluensulfónico). El mecanismo de la reacción consiste en una sustitución nucleofílica en la cual la amina actúa como nucleófilo desplazando al cloruro y formando un enlace sulfonamida (Figura 4.3).

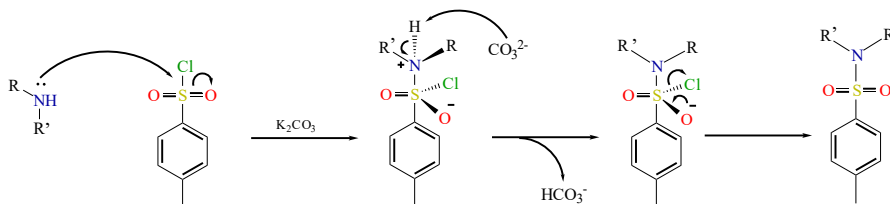


Figura 4.3: Esquema del mecanismo de reacción de tosilación de un grupo amino.²³

Procedimiento general

La poliamina a tosilar (10.26 mmol) se disuelve en THF (100 mL). A esta solución se añade una disolución acuosa de K_2CO_3 (1.2 equivalentes por cada grupo amino a tosilar, en 100 mL de agua). Ambas disoluciones se mezclan en un matraz de fondo redondo, bajo fuerte agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se añade gota a gota cloruro de tosilo (1.1 equivalente por grupo amino a tosilar), previamente disuelto en THF (50 mL). La mezcla se mantiene en agitación por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se elimina el disolvente orgánico a presión reducida. La fase acuosa resultante se extrae con CH_2Cl_2 (3×50 mL) y la fase orgánica se seca sobre Na_2SO_4 anhidro. Tras filtrar el sólido, se elimina el disolvente bajo presión reducida hasta obtener un residuo seco. Este residuo se suspende en etanol y se lleva a reflujo durante

3 horas. Finalmente, se deja enfriar la mezcla, se filtra el sólido blanco formado y se lava con etanol. El rendimiento típico del proceso es del 75 %.

4.2.2 Procedimiento de ciclación/condensación

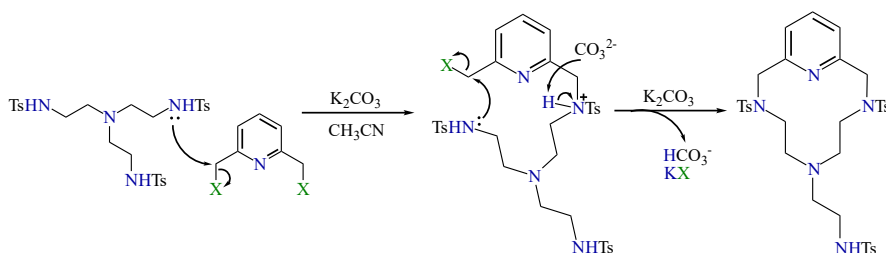


Figura 4.4: Esquema de mecanismo de reacción de ciclación.

Procedimiento general de ciclación

La amina tosilada (2.08 mmol) y K_2CO_3 (10 equiv. por grupo amino a ser alquilado) se suspenden en acetonitrilo anhidro (150 ml) en un matraz de fondo redondo. Posteriormente, el derivado de piridina se disuelve en 50 ml de acetonitrilo anhidro, con una relación molar de 1: 1.1 (amina tosilada: derivado de piridina), y se coloca en un embudo de adición. La mezcla se calienta hasta reflujo y, bajo agitación intensa, se añade gota a gota el contenido del embudo de adición sobre la suspensión inicial durante 3h. La reacción se mantiene a reflujo, en atmósfera inerte, durante 24 h. Transcurrido este tiempo, se enfría la mezcla y se filtra el sólido (K_2CO_3). El disolvente de la solución resultante se evapora a presión reducida. Al sólido obtenido se le añade H_2O y se extrae con CH_2Cl_2 (3x50 mL). Las fracciones de fase orgánica se juntan, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, y tras la filtración se elimina el CH_2Cl_2 a presión reducida. Finalmente, el producto se purifica por recristalización en etanol caliente. El rendimiento típico es del 85 %.

4.2.3 Procedimiento de funcionalización

Mecanismo

Para llevar a cabo la funcionalización, se dispone de diversas estrategias sintéticas, y en este trabajo se ha optado por la utilización de la reacción entre una amina primaria o secundaria y un haluro de alquilo. Este enfoque, representado en la Figura 4.5, ha sido empleado como método clave en la síntesis, permitiendo la introducción selectiva de grupos específicos en la molécula objetivo.

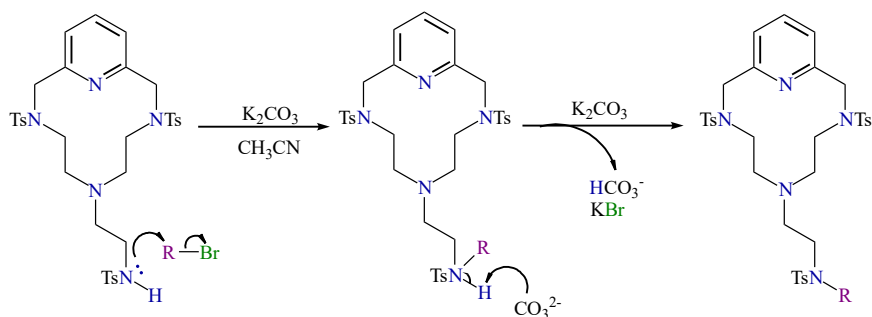


Figura 4.5: Esquema de mecanismo de reacción de funcionalización.

Procedimiento general

La amina que se desea funcionalizar (4.21 mmol) y K_2CO_3 (10 equiv. por grupo amino a funcionalizar) se suspenden en acetonitrilo anhidro (200 mL) en un matraz de fondo redondo de dos bocas. Posteriormente, el bromuro de alquilo se disuelve en 50 mL de acetonitrilo anhidro, con una relación molar de 1: 1.3 (amina: bromuro de alquilo), y se coloca en un embudo de adición. La mezcla se calentó hasta reflujo y, bajo agitación intensa, se añade gota a gota el contenido del embudo de adición sobre la suspensión inicial. La reacción se mantiene a reflujo, en atmósfera inerte, durante 4 días. Transcurrido este tiempo, se enfría la mezcla y se filtra el sólido (K_2CO_3). El disolvente de la solución resultante se evapora a presión reducida, obteniéndose un aceite amarillento. El rendimiento típico es del 85 %.

4.2.4 Procedimiento general de detosilación

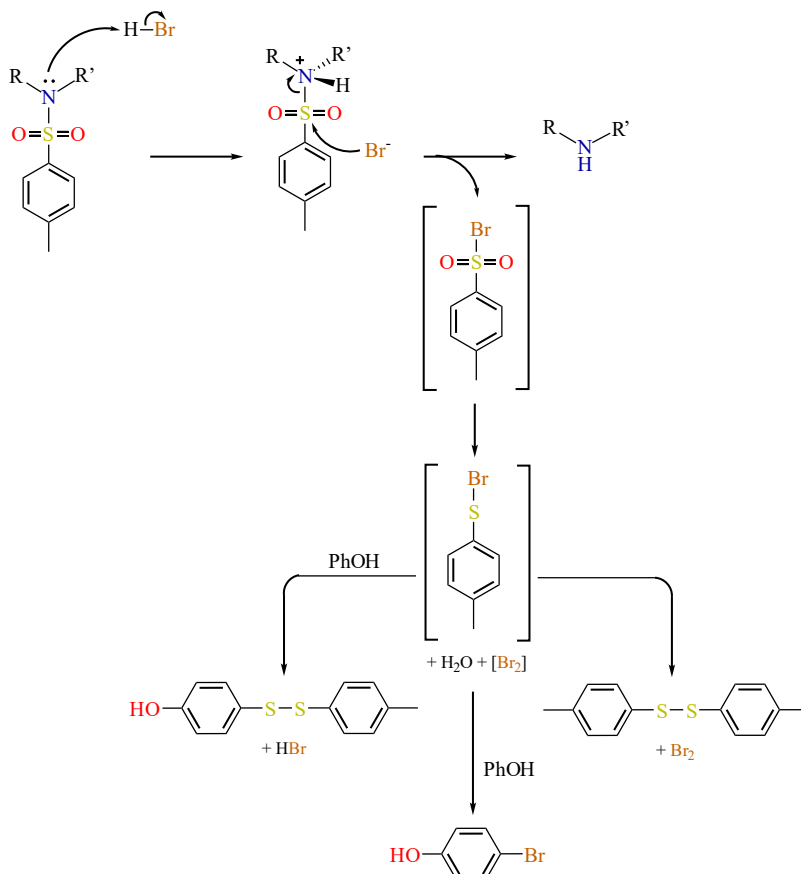


Figura 4.6: Esquema de mecanismo de reacción de eliminación de grupos tosilo.²³

Procedimiento general

El compuesto tosilado (3.15 mmol) y el fenol (12.7 equiv. por grupo protector) se suspenden en HBr-AcOH al 33 % (12.7 L por grupo protector). La mezcla se calienta a reflujo durante 24h. La suspensión resultante se filtra y se lava varias veces con EtOH anhidro, obteniéndose el producto como un sólido blanco en forma de sal de bromhidrato de la amina. El rendimiento típico es del 45–50 %.

4.2.5 Metilación de las aminas secundarias

Mecanismo

El mecanismo de la reacción implica el ataque de una amina no terciaria al carbonilo de una molécula de formaldehído protonado, generando un ion iminio intermedio. Posteriormente, el catión iminio reacciona con el ácido fórmico para producir una amina metilada, liberando dióxido de carbono como subproducto gaseoso. Un análisis más detallado del mecanismo de reacción se presenta en la Figura 4.7.

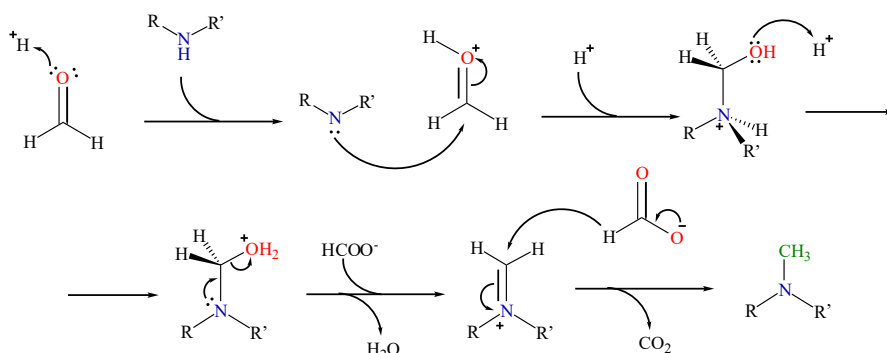


Figura 4.7: Esquema de mecanismo de reacción de metilación siguiendo el procedimiento de Eschwweiler-Clarke adaptado de [23].

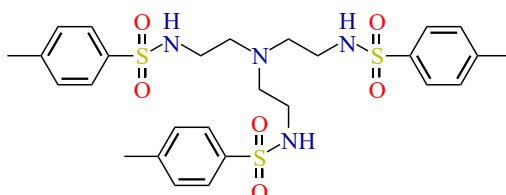
Procedimiento general

La sal de bromhidrato de la amina (1.63 mmol) se disuelve junto con ácido fórmico (46 equiv. por amina a alquilar) y formaldehído (46 equiv. por amina a alquilar) en 5 mL de agua Milli-Q, y se agita a 100 °C durante 4 días. Posteriormente, la mezcla se neutraliza con lentejas de NaOH. A continuación, se realiza una extracción líquido-líquido con CH₂Cl₂/Agua/Amoniaco. La fase orgánica se seca sobre Na₂SO₄ anhidro y se elimina el CH₂Cl₂ a presión reducida. Una vez alcanzada la sequedad, el compuesto se obtiene en forma de aceite. El rendimiento típico es del 80 %.

4.3 Síntesis y caracterización de pytren y derivados

4.3.1 Síntesis de tren Ts

Para obtener el **tren Ts**²⁴ (tris[2-(*N*-*p*-toluensulfonilaminoetil)]amina), se partió de la poliamina comercial tren (tris-(2-aminoetil)amina) y se realizó la reacción según lo descrito en la Figura 4.3. Como producto se obtuvo un sólido blanco.



Rendimiento: 80%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.80 – 7.73 (m, 6H), 7.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 6H), 5.92 (t, *J* = 6.1 Hz, 3H), 2.87 (q, *J* = 3.9 Hz, 6H), 2.44 (dd, *J* = 6.5, 4.2 Hz, 6H), 2.39 (s, 9H).

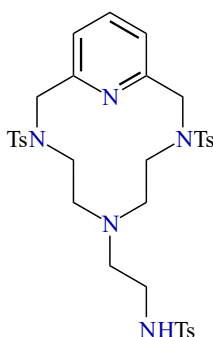
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 143.3, 136.9, 129.8, 127.2, 54.1, 40.9, 21.6.

4.3.2 Síntesis de pytren Ts

Se ha llamado **Pytren Ts**, por simplicidad y mejor comprensión, siguiendo una nomenclatura alfanumérica abreviada derivada de la empleada para los éteres corona y criptandos. *Pytren* hace referencia a la poliamina utilizada como esqueleto principal, mientras que *Ts* se relaciona con el grupo tosilo presente en la estructura.

La ciclación del **tren Ts** (tris[2-(*N*-*p*-toluensulfonilaminoetil)]amina) con un espaciador piridina da como resultado el **pytren Ts**^{24,25} (6-[2-(*p*-toluensulfonilamino)etil]-3,6,9-triaza-3,9-*p*-toluensulfonil-1-(2,6)-

piridinaciclodecafano). La reacción se llevó a cabo según lo indicado en la Figura 4.4, en condiciones de alta dilución, utilizando 2,6-bis(bromometil)piridina (2.25 g, 8.49 mmol) en acetonitrilo seco (100 mL), y **tren Ts** (5.18 g, 8.51 mmol) con K_2CO_3 (11.76 g, 85.08 mmol) disuelto en CH_3CN seco (400 mL) durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se enfrió y se filtró el sólido (K_2CO_3). El disolvente de la solución resultante se evapora a presión reducida. Al sólido obtenido se le añade H_2O y se extrae con CH_2Cl_2 (3x50 mL). Las fracciones de fase orgánica se juntan, se seca sobre Na_2SO_4 anhidro, y tras la filtración se elimina el CH_2Cl_2 a presión reducida. Finalmente, el producto se purificó por recristalización de etanol caliente, dando lugar a la formación de cristales similares a las lentejas.



Rendimiento: 75%

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.72 (ddd, J = 14.9, 8.1, 1.7 Hz, 7H), 7.36 – 7.26 (m, 8H), 5.05 (s, 1H), 4.31 (s, 4H), 3.07 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 2.85 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 2.46 (s, 6H), 2.41 (s, 3H), 2.38 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.32 (t, J = 7.4 Hz, 4H).

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ 155.6, 144.2, 144.0, 139.3, 137.3, 136.3, 130.4, 127.6, 124.2, 55.2, 54.3, 52.3, 46.0, 41.1, 22.1.

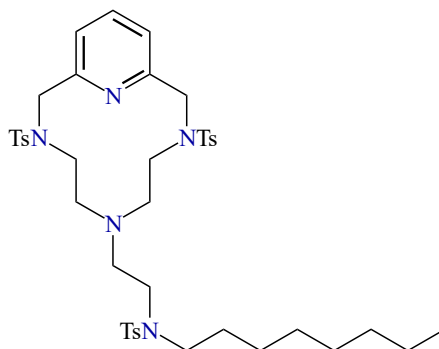
4.3.3 Funcionalización de pytren Ts

En la funcionalización del **Pytren Ts** se asignan los nombres IUPAC correspondientes a todos los ligandos empleados. Sin embargo, para facilitar la lectura y la comprensión, en el texto, tablas y figuras se utiliza una nomenclatura simplificada. Esta se basa en identificar cada ligando según el número de átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada que funcionaliza al **Pytren Ts**, de modo que un ligando con una cadena de ocho átomos de carbono se designa como **L8Ts**, uno con dieciséis átomos de carbono como **L16Ts** y uno con veintidós átomos de carbono como **L22Ts**.

Síntesis de L8Ts

El **L8Ts** (*N*-(2-(3,9-ditosil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecafano-6-il)etil)-*N*-octanil-4- metilbencenosulfonamida) se obtiene al hacer reaccionar el grupo amino de la cadena lateral del **pytren Ts** (6-[2- (*p*-toluensulfonilamino)etil]-3,6,9-triaza-3,9-*p*-toluensulfonil-1-(2,6)-piridinaciclodecafano) con el bromuro de alquilo, 1-bromooctano.

Se siguió el procedimiento descrito en la Figura 4.5 utilizando **pytren Ts** (6-[2- (*p*-toluensulfonilamino)etil]-3,6,9-triaza-3,9-*p*-toluensulfonil-1-(2,6)-piridinaciclodecafano) (3.00 g, 4.21 mmol), 1-bromooctano (1.06 g, 5.48 mmol) y K₂CO₃ (5.82 g, 42.11 mmol). El producto final tiene un aspecto aceitoso de color amarillento.



Rendimiento: 85%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (tt, $J = 7.6, 2.3$ Hz, 7H), 7.38 – 7.27 (m, 8H), 4.34 (s, 4H), 3.16 – 3.08 (m, 4H), 3.00 (dd, $J = 14.9, 7.6$ Hz, 4H), 2.57 – 2.49 (m, 2H), 2.43 (d, $J = 8.0$ Hz, 9H), 2.38 – 2.30 (m, 4H), 1.44 (d, $J = 7.3$ Hz, 2H), 1.23 (s, 10H), 0.89 – 0.85 (m, 3H).

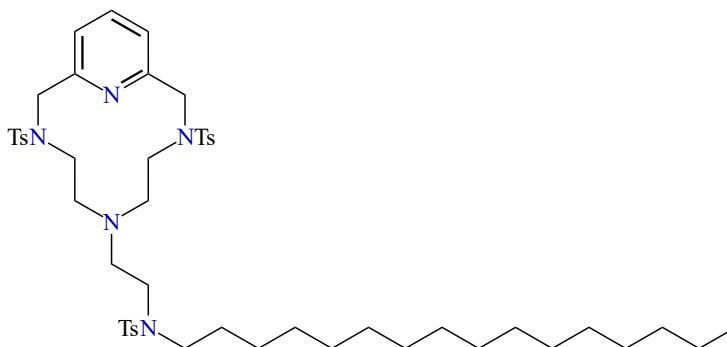
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 154.9, 143.5, 143.0, 136.7, 135.9, 135.7, 129.9 (d, $J = 3.8$ Hz), 129.7, 127.3 – 127.0 (m), 123.9, 54.7, 54.5, 53.8, 51.4, 49.4, 46.7, 45.5, 44.3, 31.7, 29.2, 28.7, 28.2, 26.7, 22.6, 21.5, 14.1.

MS (ESI) m/z : 824.35 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

Síntesis de L16Ts

La amina **L16Ts** (*N*-(2-(3,9-ditosil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecaféano-6-il)etil)-*N*-hexadecil-4-metilbencenosulfonamida) se obtiene siguiendo el mismo procedimiento que en la síntesis del **L8Ts**.

Esta amina se funcionalizó mediante una reacción entre el **pytren Ts** (2.47 g, 3.47 mmol), el 1-bromohexadecano (1.38 g, 4.51 mmol) y K_2CO_3 (4.79 g, 34.66 mmol), como se describe en la Figura 4.5. Como producto, se obtuvo un aceite de color amarillento.



Rendimiento: 78%

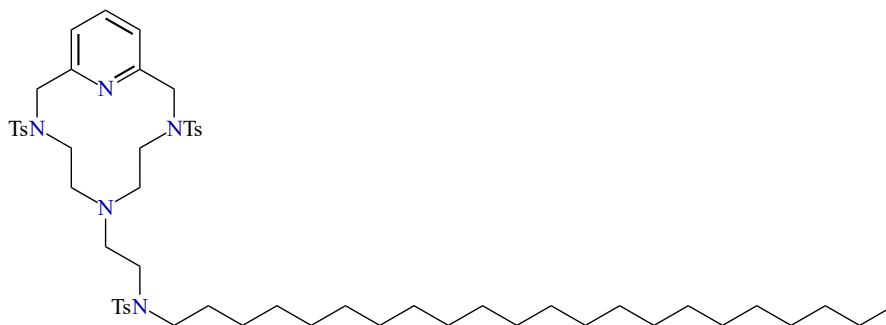
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.74 (t, $J = 7.8$ Hz, 7H), 7.36 – 7.27 (m, 8H), 4.34 (s, 4H), 3.12 (t, $J = 7.8$ Hz, 4H), 3.06 – 2.97 (m, 4H), 2.58 – 2.49 (m, 2H), 2.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 9H), 2.34 (t, $J = 8.0$ Hz, 4H), 1.45 (s, 2H), 1.26 – 1.23 (m, 26H), 0.88 (s, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 154.9, 143.5, 143.0, 138.7, 136.7, 135.9, 129.9, 129.7, 127.2, 123.9, 54.5, 51.4, 49.4, 46.7, 44.3, 31.9, 29.7, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.8, 28.6, 28.2, 26.7, 25.9, 22.7, 21.6, 21.5, 14.1.

MS (ESI) m/z : 936.48 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

Síntesis de L22Ts

El **L22Ts** (*N*-(2-(3,9-ditosil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecaféano-6-il)etil)-*N*-docosil-4-metilbencenosulfonamida) se obtuvo a partir de **pytren Ts** (2.00 g, 2.81 mmol). Se funcionalizó la amina mediante una reacción con 1-bromodocosano (1.42 g, 3.65 mmol) y K_2CO_3 (3.88 g, 28.07 mmol), tal como se indica en la figura 4.5. Como producto se obtuvo un aceite de color amarillento.



Rendimiento: 83%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.77 – 7.70 (m, 7H), 7.36 – 7.27 (m, 8H), 4.33 (s, 4H), 3.16 – 3.08 (m, 4H), 3.01 (dd, $J = 14.8, 7.3$ Hz, 4H), 2.53 (t, $J = 7.7$ Hz, 2H), 2.43 (d, $J = 7.9$ Hz, 9H), 2.38 – 2.31 (m, 4H), 1.44 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.25 (d, $J = 1.0$ Hz, 38H), 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 155.1 (d, $J = 12.3$ Hz), 143.6, 143.1, 138.7, 136.7, 135.9, 130.1 – 129.8 (m), 129.7, 127.4 – 127.0 (m), 123.9, 54.8, 54.5, 53.8, 51.8, 51.5, 49.4, 46.8, 45.5, 44.4, 40.6, 34.1, 32.9, 31.9, 29.7, 29.7, 29.6, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 28.8, 28.2, 26.7, 22.7, 21.6, 21.5, 14.1.

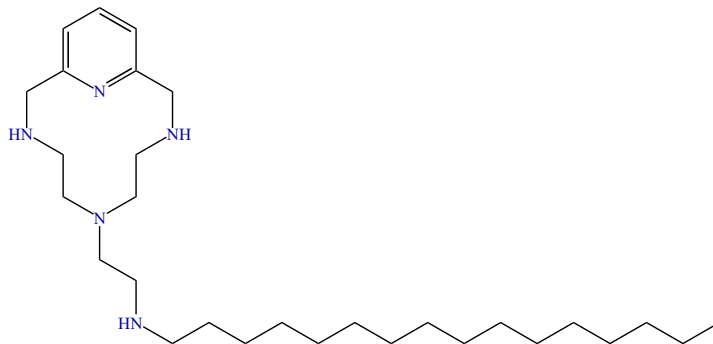
MS (ESI) m/z : 1020.57 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

4.3.4 Síntesis de pytren bromhidrato

Síntesis de L8-H

El **L8-H** (*N*-(2-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecaféano-6-il)etil)-*N*-octanil), en forma de sal bromhidrato, se obtuvo mediante la detosilación del **L8Ts** (*N*-(2-(3,9-ditosil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecaféano-6-il)etil)-*N*-octanil-4- metilbencenosulfonamida) siguiendo el procedimiento que se indica en la Figura 4.6.

Para ello, se emplearon **L16Ts** (2.95 g, 3.15 mmol) y fenol (11.30 g, 120.07 mmol) en 120 mL de HBr/HAc al 33 %. Como resultado se obtuvo un sólido beige correspondiente a la sal bromhidrato de **L16-H**.



Rendimiento: 83%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, D_2O) δ 7.88 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.40 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H), 4.67–4.49 (m, 4H), 3.30 (d, $J = 22.3$ Hz, 6H), 3.11 (s, 4H), 2.90 (d, $J = 6.0$ Hz, 4H), 1.76 (s, 2H), 1.50–1.05 (m, 26H), 0.91–0.71 (m, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, D_2O) δ 148.6, 139.7, 122.3, 51.1, 50.5, 49.5, 48.5, 46.1, 43.7, 32.0, 30.1, 29.9, 29.6, 28.5, 26.7, 26.1, 22.7, 13.9.

MS (ESI) m/z : 474.45 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

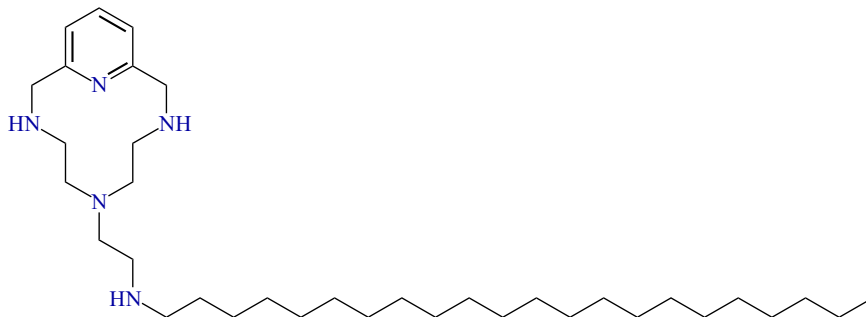
Análisis elemental: calculado (%) para $\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{N}_5 \cdot 0.4\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot 4.8\text{HBr}$: C, 40.97; H, 7.08; N, 7.91. Encontrado: C, 41.03; H, 6.66; N, 7.86.

Síntesis de L22-H

El **L22-H** (*N*-(2-(3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaciclodecafano-6-il)etil)-*N*-docosil), en forma de sal bromhidrato se obtuvo mediante la detosilación del **L22Ts**, siguiendo el mismo procedimiento utilizado para **L16-H**.

Se partió de **L22Ts** (*N*-(2-(3,9-ditosil-3,6,9-triaza-1(2,6)-piridinaclodecafano-6-il)etil)-*N*-docosil-4- metilbencenosulfonamida) (2.60

g, 2.55 mmol) y fenol (9.14 g, 97.12 mmol) en 97 mL de HBr/HAc al 33 %. Como resultado, se obtuvo un sólido beige correspondiente a la sal de bromhidrato de **L22-H**.



Rendimiento: 84%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.54 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.99 (d, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.93 (s, 4H), 2.81 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 2.67 – 2.61 (m, 4H), 2.54 (dd, $J = 6.8, 3.6$ Hz, 4H), 2.42 (dd, $J = 6.2, 4.0$ Hz, 4H), 1.54 – 1.44 (m, 2H), 1.25 (s, 38H), 0.87 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 158.9, 136.4, 120.1, 56.1, 55.9, 53.6, 50.1, 48.2, 47.3, 31.9, 30.2, 29.7, 29.7, 29.6, 29.4, 27.4, 22.7, 14.1.

MS (ESI) m/z : 558.54 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

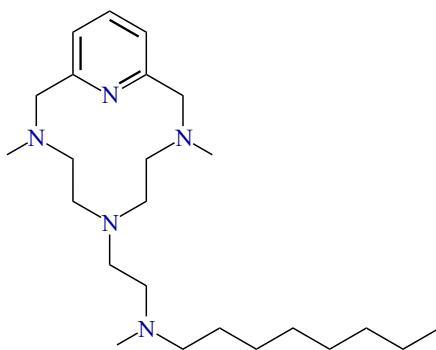
Análisis elemental: calculado (%) para $\text{C}_{35}\text{H}_{67}\text{N}_5 \cdot 1.8\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot 4\text{HBr}$: C, 48.64; H, 8.27; N, 7.42. Encontrado: C, 48.76; H, 7.96; N, 7.45.

4.3.5 Síntesis de metilación de aminas secundarias

El macrociclo metilado, se obtiene a partir de la metilación de las aminas secundarias del macrociclo desprotegido, mediante el procedimiento descrito en la Figura 4.7.

Metilación de L8-H

El **L8-H** en forma de sal bromhidrato (1.20 g, 1.62 mmol), ácido fórmico (46 equiv. por amina a alquilar) y formaldehído (46 equiv. por amina a alquilar), se disolvieron en 5 mL de agua Milli-Q y se agitaron a 100 °C durante 4 días. Como producto, se obtuvo un aceite de color amarillo correspondiente al compuesto metilado puro.



Rendimiento: 70%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.82 (s, 4H), 2.84 (s, 2H), 2.57 (d, *J* = 6.6 Hz, 4H), 2.48 (d, *J* = 7.4 Hz, 9H), 2.34 (s, 2H), 2.26–2.20 (m, 4H), 1.41 (s, 2H), 1.25 (d, *J* = 3.1 Hz, 12H), 0.91–0.82 (m, 3H).

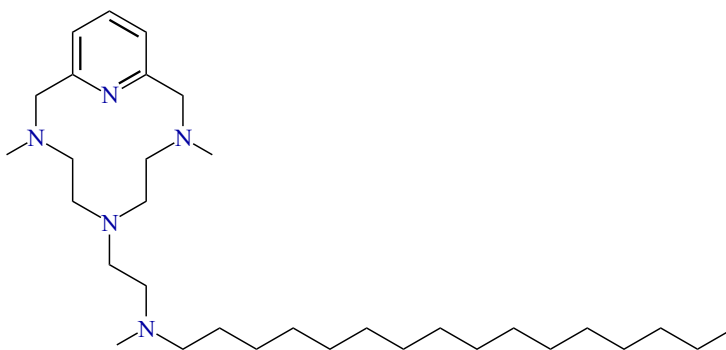
¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.4, 137.1, 122.0, 62.0, 58.3, 53.1, 52.6, 51.2, 45.4 (d, *J* = 30.2 Hz), 42.4, 31.9, 27.5, 22.7, 14.1.

MS (ESI) *m/z*: 404.20 ([M + H]⁺).

Análisis elemental: calculado (%) para C₂₄H₄₅N₅·2Cl: C, 60.74; H, 9.56; N, 14.76. Encontrado: C, 59.52; H, 9.08; N, 16.11.

Metilación de L16-H

El **L16-H** en forma de sal bromhidrato (2.00 g, 2.26 mmol), ácido fórmico (46 equiv. por amina a alquilar) y formaldehído (46 equiv. por amina a alquilar) se disolvieron en 5 mL de agua Milli-Q y se agitaron a 100 °C durante 4 días. Como producto, se obtuvo un aceite de color amarillo correspondiente al compuesto metilado puro.



Rendimiento: 73%

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 7.61 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.13 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 3.80 (s, 4H), 2.65 (dd, $J = 9.0, 5.5$ Hz, 4H), 2.49 (d, $J = 7.3$ Hz, 9H), 2.38 (dd, $J = 9.1, 5.7$ Hz, 4H), 2.31–2.22 (m, 4H), 1.42 (t, $J = 7.9$ Hz, 2H), 1.25 (d, $J = 1.6$ Hz, 28H), 0.87 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

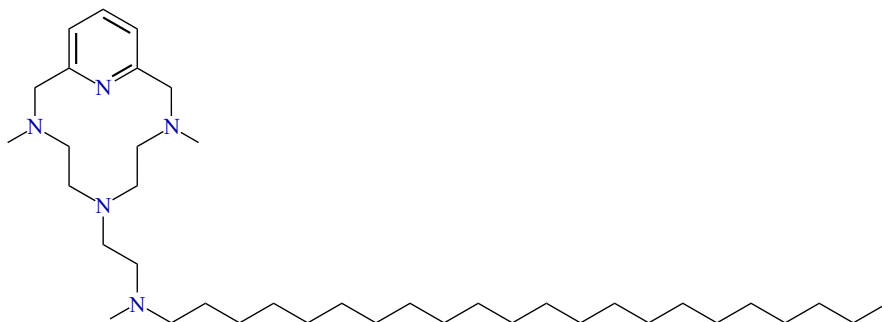
$^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ 157.1, 136.9, 122.3, 62.5, 58.5, 55.9, 52.6, 50.5, 45.3, 42.8, 31.9, 30.4 – 29.4 (m), 29.4, 27.6, 27.3, 22.7, 14.1.

MS (ESI) m/z : 516.50 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

Análisis elemental: calculado (%) para $\text{C}_{32}\text{H}_{61}\text{N}_5 \cdot 0.8\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot 1.8\text{Cl}$: C, 65.99; H, 10.59; N, 11.19. Encontrado: C, 66.17; H, 9.99; N, 11.2.

Metilación de L22-H

El **L22-H** en forma de sal bromhidrato (1.00 g, 1.02 mmol), ácido fórmico (46 equiv. por amina a alquilar) y formaldehído (46 equiv. por amina a alquilar) se disolvieron en 5 mL de agua Milli-Q y se agitaron a 100 °C durante 4 días. Finalmente, se obtuvo un sólido de color marrón.



Rendimiento: 85%

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.61 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.81 (s, 4H), 2.69 – 2.61 (m, 4H), 2.49 (d, *J* = 5.6 Hz, 9H), 2.39 – 2.33 (m, 2H), 2.31 – 2.26 (m, 2H), 2.18 (s, 4H), 1.42 (s, 2H), 1.25 (d, *J* = 1.9 Hz, 40H), 0.87 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 157.7, 137.4, 121.4, 61.4, 58.1, 52.5, 45.1, 42.0, 31.9, 29.7 (d, *J* = 3.4 Hz), 29.3, 27.5, 26.9, 22.7, 14.1.

MS (ESI) *m/z*: 600.59 ([M + H]⁺).

Análisis elemental: calculado (%) para C₃₈H₇₃N₅·1.2C₃H₆O: C, 73.42; H, 12.23; N, 11.27. Encontrado: C, 73.26; H, 12.01; N, 10.7.

4.4 Bibliografía

- [1] Richman J. E.; Atkins T. J.; *J. Am. Chem. Soc.*; **1974**, 96, 2268–2270.
- [2] Haines R.I.; *Rev. Inorg. Chem.*; **2001**, 21, 165–206.
- [3] Hoyer R. C.; Richman J. E.; Dantas G. A.; Lightbourne M. F.; Shinneman L. S.; *J. Org. Chem.*; **2001**, 66, 2722–2725.
- [4] Bencini A.; Burguete M. I.; Garcia-Espana E.; Luis S. V.; Miravet J. F.; Soriano C.; *J. Org. Chem.*; **1993**, 58, 4749–4753.
- [5] Fischer E. *Reduktion der Aryl-sulfamide durch Jodwasserstoff. In Untersuchungen über Aminosäuren, Polypeptide und Proteine II (1907–1919)*; Fischer E., Bergmann M., Eds.; Springer, 1923.
- [6] Greene T. W.; Wuts P. G. M.; *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd ed.; Wiley-Interscience: New York, 1999.
- [7] Hughes, A. B. *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 4: Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*; Wiley-VCH: Weinheim, 2009.
- [8] Wuts P. G. M.; Greene T. W. *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*; John Wiley & Sons, 2006.
- [9] Sureshbabu V. V.; Narendra N. *Protection Reactions. In Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd.; 2011.
- [10] Wainwright K. P.; *Coord. Chem. Rev.*; **1997**, 166, 35–90.
- [11] Bencini A.; Bianchi A.; Lodeiro C.; Masotti A.; Parola A. J.; Pina F.; Melo J. S. de; Valtancoli B.; *Chem. Commun.*; **2000**, 17, 1639–1640.
- [12] Bencini A.; Berni E.; Bianchi A.; Fornasari P.; Giorgi C.; Lima J. C.; Lodeiro C.; Melo M. J.; Melo J. S.; Parola A. J.; Pina F.; Pina J.; Valtancoli B.; *Dalton Trans.*; **2004**, 14, 2180–2187.
- [13] Frías J. C.; Soriano J.; Blasco S.; García-España E.; Rodríguez-Rodríguez A.; Esteban-Gómez D.; Carniato F.; Botta M.; Platas-Iglesias C.; Albelda M. T.; *Inorg. Chem.*; **2020**, 59, 7306–7317.
- [14] Heathcock C. H.; Smith K. M.; Blumenkopf T. A.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1986, 108, 5022–5024.
- [15] Ayadim M.; Habib Jiwan J. L.; Soumillion J. Ph.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1999, 121, 10436–10437.
- [16] Kudav D. P.; Samant S. P.; Hosangadi B. D.; *Synth. Commun.*; 1987.
- [17] Snyder H. R.; Heckert R. E.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1952, 74, 2006–2009.
- [18] Haskell B. E.; Bowlus S. B.; *J. Org. Chem.*; 1976, 41, 159–160.
- [19] Eschweiler W.; *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1905, 38, 880–882.

- [20] Clarke H. T.; Gillespie H. B.; Weissshaus S. Z.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1933, 55, 4571–4587.
- [21] Serrano-Plana J.; Oloo W. N.; Acosta-Rueda L.; Meier K. K.; Verdejo B.; García-España E.; Basallote M. G.; Münck E.; Que L.; Company A.; Costas M.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2015**, 137, 15833–15842.
- [22] Nebot-Guinot A.; Liberato A.; Máñez M. A.; Clares M. P.; Doménech A.; Pitarch-Jarque J.; Martínez-Camarena A.; Basallote M. G.; García-España E.; *Inorganica Chim. Acta*; **2018**, 472, 139–148.
- [23] Martínez-Camarena A.; Complejos de ligandos azamacrocíclicos como miméticos de enzimas con actividad antioxidante. Ph.D. thesis, Universitat de Valencia, **2019**.
- [24] Verdejo B.; Química supramolecular de piridinofanos sintéticos. Ph.D. thesis, Universitat de Valencia, **2007**.
- [25] Blasco S.; Complejos Metálicos de Compuestos Poliamínicos y su Aplicación como miméticos de Enzimas Protectoras Antioxidantes. Ph.D. thesis, Universitat de Valencia, **2011**.

Capítulo 5

Comportamiento ácido-base y Química de coordinación

*“En los ácidos y las bases,
encontramos el lenguaje
fundamental
de la reactividad química.”*

— Mercy Arteaga —

5.1 Introducción

Los ligandos azamacrocíclicos son relevantes en Química de Coordinación por su alta selectividad y adaptabilidad.¹ Su topología cerrada reduce los grados de libertad conformacional, proporcionando una geometría de coordinación predefinida.² Esto les confiere una gran afinidad hacia sustratos con geometría y tamaño compatibles. La química de estos ligandos es muy versátil, abarcando su interacción con metales, aniones, especies neutras, propiedades ácido-base, uso como sensores, y su participación en procesos dinámicos moleculares, entre otros.

En el ámbito biológico, los sistemas de defensa antioxidantes están dominados por metaloenzimas que dependen de metales como Cu(II), Mn(II) o Fe(II) en su centro activo. Estas enzimas desempeñan un papel fundamental en la neutralización de especies reactivas de oxígeno, gracias a su capacidad para participar en procesos redox.

En este contexto, los azamacrociclos estudiados en el presente trabajo presentan características estructurales que los hacen aptos para imitar la función de dichas metaloenzimas. En particular, contienen grupos amino que actúan como átomos dadores, capaces de coordinar metales dentro de cavidades macrocíclicas cuyo tamaño resulta compatible con el radio iónico de los metales de la primera serie de transición.

El grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (GQS-UV) sintetizó el ligando pytren (**L**)(*Capítulo 4*, pg. 141) mediante un procedimiento sencillo y con buen rendimiento. Estudios previos con derivados de **L** han mostrado interacciones prometedoras con metales de interés biológico, incluyendo actividad similar a la de la enzima superóxido dismutasa Mn-SOD.³

En este capítulo, se estudian las propiedades ácido-base y la química de coordinación de una serie de ligandos derivados del pytren, funcionalizados con cadenas hidrocarbonadas de 8, 16 y 22 átomos de carbono. Estos compuestos se agrupan en dos familias: los ligandos no metilados **L8-H**, **L16-H** y **L22-H**, y los correspondientes ligandos metilados **L8-Me3**, **L16-Me3** y **L22-Me3**. Los estudios se estructuran de manera secuencial: en primer lugar, se determinan las constantes de protonación mediante estudios potenciométricos, con el objetivo de caracterizar las propiedades ácido-base de los ligandos. A partir de estos resultados, se evalúa su comportamiento en disolución frente a iones metálicos de interés biológico como Cu(II), Mn(II) y Fe(II), presentes en los organismos vivos y relevantes por su participación en procesos redox.

A continuación, se presentan los resultados de los estudios ácido-base y la química de coordinación de los nuevos ligandos sintetizados, junto con su respectivo análisis y discusión.

5.2 Comportamiento ácido-base

Antes de discutir los resultados de los ligandos sintetizados, es importante considerar la molécula de partida, el pytren.⁴ Esta molécula es un ligando pentadentado, donde cada átomo de nitrógeno dispone de un par de electrones no compartidos, lo que lo hace susceptible de protonación. Sin embargo, solo tres de ellos se protonan en el intervalo de pH que puede explorarse mediante técnicas potenciométricas. La primera protonación se atribuye principalmente al grupo amina primario, que es más básico en disolución acuosa que los demás nitrógenos. Este dato se refleja en el elevado valor de la primera constante ($\log K = 10.20(6)$) (Tabla 5.1). La segunda y tercera protonación

ocurren en la cavidad macrocíclica, minimizando las repulsiones electrostáticas. No se observan ni la cuarta ni la quinta protonación en el intervalo de pH estudiado, que corresponderían a la amina terciaria y el nitrógeno de la piridina. Puesto que se mantiene el mismo núcleo básico, se espera que las propiedades no difieran significativamente, aunque, naturalmente, no serán exactamente iguales.

Las constantes de protonación de los ligandos derivados del pytren **L8-H**, **L16-H** y **L22-H** se determinaron en agua Milli-Q con NaCl como electrolito de soporte, y las de sus análogos metilados **L8-Me3**, **L16-Me3** y **L22-Me3** se determinaron en mezcla etanol/agua Milli-Q, utilizando el mismo electrolito, debido a su baja solubilidad en agua. Las constantes refinadas se muestran en la Tabla 5.1, junto con los valores previamente publicados para el ligando **L**, a fin de facilitar la comparación.⁴

Tabla 5.1: Logaritmos de las constantes de protonación de **L8-H**, **L8-Me3**, **L16-H**, **L16-Me3**, **L22-H** y **L22-Me3** determinadas en 0.15 M NaCl a 298.1±0.1 K.

Reacción ^(a)	L ^{(b)(c)}	L8-H ^(c)	L16-H ^(c)	L22-H ^(c)	L8-Me3 ^(d)	L16-Me3 ^(d)	L22-Me3 ^(d)
$H + L \rightleftharpoons HL$	10.20(6) ^(e)	10.04(1)	9.08(2)	8.37(2)	9.67(2)	9.25(2)	8.40(1)
$H + HL \rightleftharpoons H_2L$	9.18(6)	9.18(1)	8.21(2)	8.14(4)	7.85(2)	7.21(3)	8.02(7)
$H + H_2L \rightleftharpoons H_3L$	7.84(5)	7.64(1)	7.41(1)	6.62(3)	7.27(2)	7.10(3)	6.51(4)
$\log \beta$	27.22	26.86	24.70	23.13	24.77	23.56	22.94

a) Se omiten las cargas; b) valores de [4]; c) Medido en agua Milli-Q. d) Medido en H₂O:EtOH 70:30 v/v; e) Los valores entre paréntesis son desviaciones estándar de la última cifra significativa.

Con estas constantes, se ha simulado la distribución de especies en disolución, cuyos diagramas se muestran en la Figura 5.1. Se puede observar que, para todos los ligandos estudiados, se han determinado tres constantes de

protonación de valores relativamente similares, excepto en el caso de **L22-H** y **L22-Me3**. En estos ligandos, no fue posible determinar de forma precisa sus constantes de protonación debido a su baja solubilidad, incluso en mezclas hidroalcohólicas; por este motivo, no se incluyen en el análisis comparativo que se presenta a continuación.

Además, se calculó la basicidad global, definida como la suma de las constantes sucesivas. El efecto de la presencia de grupos octilo (**L8-H**) y hexadecil (**L16-H**) se puede cuantificar comparando estas constantes globales con las del ligando **L**; la introducción de cadenas hidrofóbicas de mayor longitud se traduce en una disminución de la basicidad global. Esta observación se atribuye al cambio en la energía de hidratación inducido por la incorporación de un grupo hidrofóbico.^{5,6}

Asimismo, si comparamos las constantes globales de **L**, **L8-Me3** y **L16-Me3** se observa una reducción adicional de la basicidad asociada a la metilación de los grupos amino secundarios de los compuestos **L8-H** y **L16-H**. Concretamente, **L8-Me3** reduce la basicidad en 2.5 unidades logarítmicas y **L16-Me3** en 3.7 unidades logarítmicas. Esta disminución se debe al aumento del efecto inductivo, es decir, un mayor efecto electrón donante inducido por la metilación.

En conjunto, tanto la incorporación de cadenas hidrocarbonadas como la metilación de los ligandos afectan a las constantes de protonación y, por consiguiente, a la basicidad global.

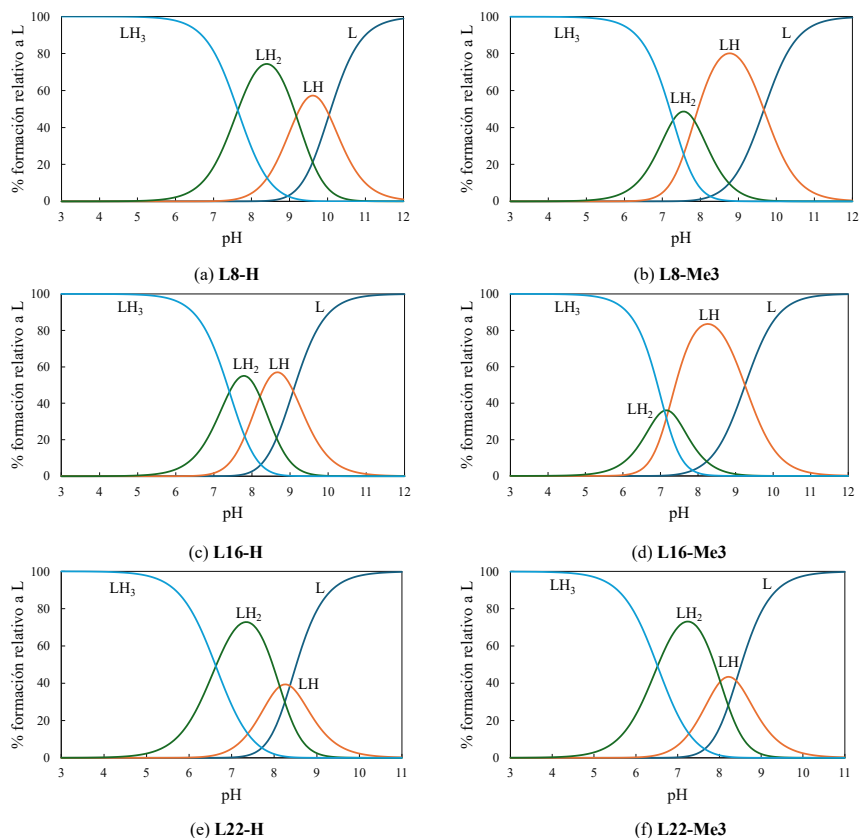


Figura 5.1: Diagramas de distribución de especies para la protonación de **L8-H**, **L8-Me3**, **L16-H**, **L16-Me3**, **L22-H** y **L22-Me3** simulados para $[L]_{\text{Total}}=1\text{mM}$.

Al analizar las constantes sucesivas para un mismo ligando, se observa una tendencia decreciente en sus valores, lo que indica que cada protonación sucesiva ocurre con menor afinidad, atribuible al aumento en la repulsión electrostática y a los efectos de solvatación de las especies más cargadas. Este comportamiento es consistente con lo descrito en estudios previos sobre poliaminas.⁷⁻¹⁰ La primera constante de protonación de cada ligando no metilado es la más alta dentro del sistema. En el caso de **L16-H**, difiere en aproximadamente 1 unidad logarítmica respecto a la primera constante del ligando **L**, mientras que para **L8-H** los valores son similares. Esto refleja la

elevada basicidad de la amina secundaria, que se protona en condiciones básicas, dando lugar a la especie monoprotonada, predominante hasta pH neutro. Esta basicidad se atribuye a la naturaleza química del grupo funcional, cuya amina secundaria tiene un par electrónico más accesible para la protonación, en contraste con los átomos de nitrógeno terciarios del macrociclo, cuya capacidad de captar protones se ve reducida por la distribución electrónica y las interacciones intramoleculares.

La constante de protonación también tiende a disminuir progresivamente con el aumento de la longitud de la cadena hidrocarbonada, como se observa al comparar **L**, **L8-H** y **L16-H**. En cuanto a la metilación de los grupos amino, el efecto sobre la primera constante depende del ligando: en **L16-H** frente a **L16-Me3**, la diferencia entre los valores es mínima, posiblemente debido a la competencia entre el efecto inductivo de la metilación y la disminución de la energía de hidratación asociada a las cadenas hidrocarbonadas.^{11,12} Por otro lado, en **L8-H** y **L8-Me3**, la constante de protonación es menor en la amina terciaria (**L8-Me3**) que en la secundaria (**L8-H**), reflejando el efecto inductivo de los grupos metilo, consistente con lo documentado en la literatura sobre metilación de poliaminas.⁵

5.3 Química de coordinación

5.3.1 Estudio de complejación con Cu(II)

Una vez conocido el comportamiento ácido-base, se procedió al estudio de la formación de complejos de cobre mediante valoraciones potenciométricas. Las constantes refinadas para la formación de los diferentes complejos de Cu(II) se recogen en la Tabla 5.2. **L22-H** y **L22-Me3** no pudieron ser estudiados debido a la baja solubilidad incluso en medio hidroalcohólico y la

formación de precipitado. Para los ligandos estudiados, los valores de las constantes son suficientemente elevados como para garantizar la formación cuantitativa de complejos estables. Los diagramas de distribución que se muestran en la Figura 5.2 indican que, desde pH ácido, los complejos mononucleares de tipo CuL^{2+} están prácticamente formados para los ligandos no metilados, mientras que en los ligandos metilados su formación completa se alcanza a $\text{pH} > 7$. Asimismo, se detecta una constante de protonación para el complejo. De acuerdo con las constantes de complejación, la estabilidad de los complejos CuL^{2+} formados con **L8-H** y **L16-H** es inferior a la del ligando de referencia **L**. Este comportamiento puede atribuirse, en parte, a que en **L8-H** y **L16-H** todos los grupos amino son secundarios, mientras que **L** tiene un grupo amino primario terminal. Es bien conocido que los grupos amino secundarios tienen un menor carácter electrón donante que los primarios. Además, la constante para **L8-H** es mayor que para **L16-H**, lo que puede atribuirse al mayor carácter hidrofóbico de esta última y al mayor obstáculo que puede experimentar para involucrar al grupo amino de la cadena lateral en la coordinación del metal. Por otro lado, los ligandos metilados **L8-Me3** y **L16-Me3** muestran una menor estabilidad que sus análogos no metilados **L8-H** y **L16-H**, debido a la conversión de aminas secundarias en terciarias.¹³⁻¹⁵

Tabla 5.2: Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Cu^{2+} –**L8-H**, Cu^{2+} –**L8-Me3**, Cu^{2+} –**L16-H** y Cu^{2+} –**L16-Me3**, y de las constantes de formación del sistema Cu^{2+} –**L** previamente publicados con Cu(II) .

Reacción ^(a)	L ^{(b)(c)}	L8-H ^(c)	L16-H ^(c)	L8-Me3 ^(d)	L16-Me3 ^(d)
$\text{Cu} + \text{L} \rightleftharpoons \text{CuL}$	20.43(3) ^(c)	19.46(1)	17.60(2)	15.35(6)	14.8(4)
$\text{CuL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{CuHL}$	3.85(3)	4.60(1)	4.27(2)	6.09(4)	5.86(6)
$\text{CuL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CuL(OH)} + \text{H}^+$	-11.01(3)	---	---	-10.6(1)	---

a) Se omiten las cargas; b) valores de [4]; c) Medido en agua Milli-Q. d) Medido en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 70:30 v/v; e) Los valores entre paréntesis son desviaciones típicas de la última cifra significativa.

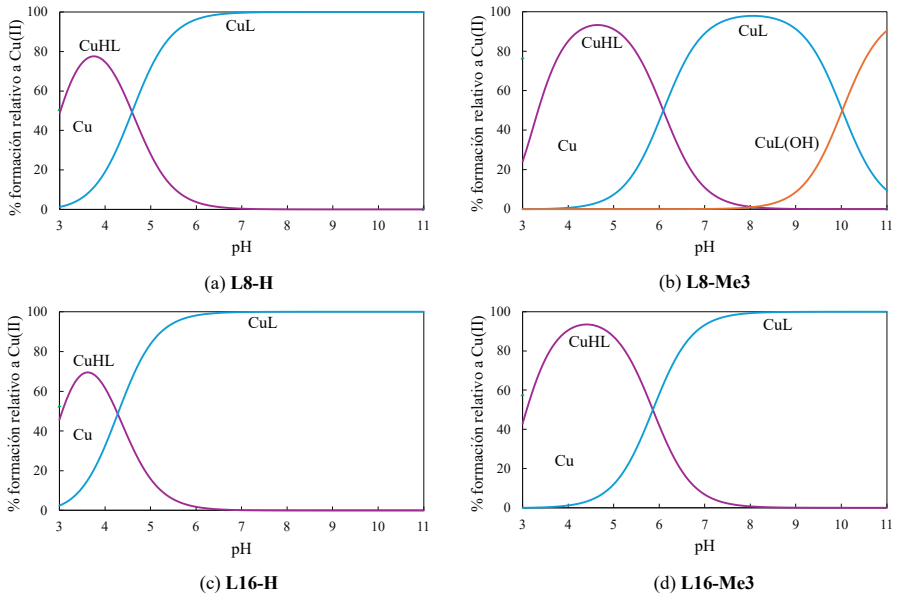


Figura 5.2: Diagramas de especiación para los sistemas Cu^{2+} –**L8-H**, Cu^{2+} –**L8-Me3**, Cu^{2+} –**L16-H** y Cu^{2+} –**L16-Me3**. $[\text{Cu}^{2+}]=[\text{L}]_{\text{Total}}=10^{-3}\text{mol/L}$.

Finalmente, se ha determinado el valor de la constante de formación de complejo hidroxilado para el ligando **L8-Me3**. Aunque este complejo hidroxilado no es relevante a pH fisiológico, ya que empieza a formarse a pH ~ 9 , puede interpretarse como consecuencia de la hidrólisis de un ligando acuo

del complejo, debido al efecto polarizante del ion Cu^{2+} sobre el enlace O–H. Para los demás ligandos, no fue posible ajustar experimentalmente la formación de una especie hidroxilada, lo cual no implica que estas no se formen, sino que su presencia no pudo resolverse con los datos disponibles.

Estructura cristalina del **L8-H** $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

La lenta evaporación de una solución que contenía **L8-H** y $\text{Cu}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en agua proporcionó monocristales adecuados para la difracción de rayos X. La unidad asimétrica contiene una sola unidad del complejo $[\text{CuL8-H}] \cdot 2\text{ClO}_4$, que está dispuesta en un sistema monoclinico, el grupo espacial $P2_1/c$ (Tabla 5.3). La estructura obtenida se muestra en la Figura 5.3. El átomo de Cu1 está coordinado en una geometría piramidal cuadrada bastante regular (parámetro de Addison, $\tau_5=0.289$).¹⁶ Esta geometría de coordinación es muy similar a la encontrada para estructuras de **L** y sus derivados, lo que indica que la geometría de coordinación está dirigida principalmente por el macrociclo central mientras que las cadenas laterales ejercen poca influencia. Por ejemplo, una estructura publicada de **CuL** (número CCDC 658959)⁴ tiene dos compuestos de coordinación distintos en la unidad asimétrica con $\tau_5=0.108$ y 0.332 respectivamente. En el caso de **L8-H**, la base de la pirámide cuadrada está formada por los átomos N1, N2, N4 y N5 mientras que el vértice axial corresponde a N3. Las distancias N–Cu–N se muestran en la Tabla 5.4. Los ángulos son bastante cercanos a los ángulos rectos, siendo el más agudo de 81.35° , y el más ancho de 101.21° . El centro de cobre presenta una distorsión de Jahn-Teller, evidente en el alargamiento del enlace Cu1–N3 ($2.200\text{\AA}$). En contraste, los enlaces Cu1–N2 y Cu1–N5 son ligeramente más cortos ($2.108\text{\AA}$ y $2.005\text{\AA}$ respectivamente) que el resto en el plano basal, debido a una mayor interacción metal-ligando en dichas posiciones. El empaquetamiento cristalino organiza las regiones hidrofóbicas en una disposición contigua. En

la Figura 5.3 (A), las regiones hidrófilas están coloreadas en gris, las catiónicas en azul y las aniónicas se muestran en púrpura. Se observa que el empaquetamiento está dispuesto en capas tipo sándwich con regiones catiónico-aniónicas mezcladas en el centro y las regiones hidrofóbicas hacia los lados superior e inferior, de modo que las capas adyacentes contactan a través de las cadenas alifáticas.

Tabla 5.3: Datos cristalográficos de la estructura cristalina de [CuL8-H] Cu(ClO₄)₂·6H₂O.

Composición	C ₂₁ H ₃₉ CuN ₅ , 2(ClO ₄)
Peso molecular (g·mol ⁻¹)	624.01
Tamaño (mm)	0.138×0.104×0.051
Grupo espacial	<i>P</i> 2 ₁ /c
Celda unidad:	
- a (Å)	20.919(5)
- b (Å)	8.778(3)
- c (Å)	14.947(4)
- α (Grados)	90
- β (Grados)	97.900(9)
- γ (Grados)	90
- V (Å ³)	2718.7(12)
Densidad (g·cm ⁻³)	1.53
Z	4
μ (mm ⁻¹)	1.05
F000	1308
Límites de difracción:	29 ≤ h ≤ -29
	12 ≤ k ≤ -12
	21 ≤ l ≤ -21
R(int)	0.1042
R(sigma)	0.0575
Reflexiones:	
- Reunido	58548
- Único	8299
Parámetros	365
Constraints	0
Restraints	1
R1:	
- Total	0.1138
- F ² > 2σ(F ²)	0.0706
wR2	
- Total	0.1911
- F ² > 2σ(F ²)	0.1661
S	1.029

CSDn. 2385466

Tabla 5.4: Distancias de enlace y ángulos de la estructura cristalina de [CuL8-H] Cu(ClO₄)₂·6H₂O.

Ángulos (en grados)	
Cu1–N1	1.930(3)
Cu1–N2	2.108(3)
Cu1–N3	2.200(3)
Cu1–N4	2.125(3)
Cu1–N5	2.005(3)

Distancias de enlace (Å)	
N1–Cu1–N2	81.35(13)
N1–Cu1–N3	100.12(13)
N1–Cu1–N4	81.67(13)
N1–Cu1–N5	174.30(14)
N2–Cu1–N3	84.29(12)
N2–Cu1–N4	156.96(14)
N4–Cu1–N3	83.48(12)
N5–Cu1–N2	97.13(14)
N5–Cu1–N3	85.15(14)
N5–Cu1–N4	101.21(14)

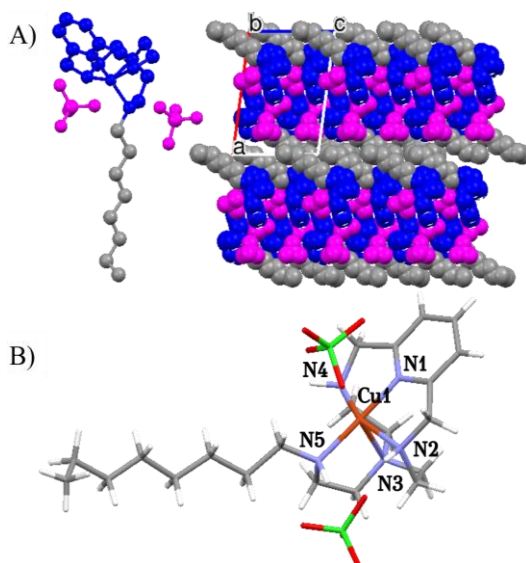


Figura 5.3: Estructura cristalina de [CuL8-H](ClO₄)₂. A) Detalle del empaquetamiento en el que los aniones perclorato se representa en púrpura; la unidad macrocíclica de L8-H en azul y la cola hidrofóbica en gris. B) Unidad asimétrica del cristal. No se muestra el desorden.

5.3.2 Estudio de complejación con Mn(II)

En segundo lugar, se ha estudiado la interacción de los ligandos L8-H, L16-H, L8-Me3 y L16-Me3 con Mn(II). L22-H y L22-Me3 no pudieron estudiarse debido a su baja solubilidad y a la formación de precipitado. La especiación de los ligandos con Mn(II) se ha determinado mediante potenciometría del mismo modo que sus análogos de cobre. En la Tabla 5.5 se presentan los valores logarítmicos de las constantes de formación determinadas, mientras que los correspondientes diagramas de distribución se muestran en la Figura 5.4.

Al analizar las constantes de formación, se observa que la estabilidad de los complejos MnL²⁺ sigue tendencias similares a las de Cu(II), aunque con valores menores. Los complejos de L8-H y L16-H son menos estables que el

ligando de referencia **L**, esto puede atribuirse a que sus grupos amino son secundarios, mientras que **L** posee un grupo amino primario terminal con mayor carácter donante.^{11,13,15} Por su parte, los ligandos metilados **L8-Me3** y **L16-Me3** forman complejos menos estables que sus análogos no metilados, debido a la transformación de aminas secundarias en terciarias y al aumento del efecto inductivo de los grupos metilo.¹³ Además, **L8-H** y **L8-Me3** generan complejos ligeramente más estables que **L16-H** y **L16-Me3**, siguiendo la misma tendencia observada para los sistemas de cobre.

Además, para cada ligando estudiado se puede observar que los valores de las constantes de estabilidad de los complejos con Mn(II) son menores que las correspondientes a los análogos con Cu(II). No obstante, como se muestra en la Figura 5.4, para una concentración total de ligando de 1 mM la fracción de Mn(II) libre a pH neutro es reducida, si bien no es cero. Estas menores constantes de formación explican que los complejos de manganeso requieran valores de pH más alcalinos para estabilizarse en comparación con los complejos de cobre.

Tabla 5.5: Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Mn^{2+} -**L8-H**, Mn^{2+} -**L8-Me3**, Mn^{2+} -**L16-H** y Mn^{2+} -**L16-Me3**, y de las constantes de formación del sistema Mn^{2+} -**L** previamente informadas con Mn(II).

Reacción ^(a)	L ^{(b)(c)}	L8-H ^(c)	L16-H ^(c)	L8-Me3 ^(d)	L16-Me3 ^(d)
$\text{Mn} + \text{L} \rightleftharpoons \text{MnL}$	11.43(1) ^(c)	10.03(1)	9.23(2)	7.53(1)	6.82(1)
$\text{MnL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{MnHL}$	5.89(4)	6.62(4)	---	7.12(1)	6.58(4)
$\text{MnL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{MnL}(\text{OH}) + \text{H}^+$	-10.85(1)	---	-11.30(9)	-10.65(4)	-9.94(4)

a) Se omiten las cargas; b) valores de [4]; c) Medido en agua Milli-Q. d) Medido en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 70:30 v/v; e) Los valores entre paréntesis son desviaciones típicas de la última cifra significativa.

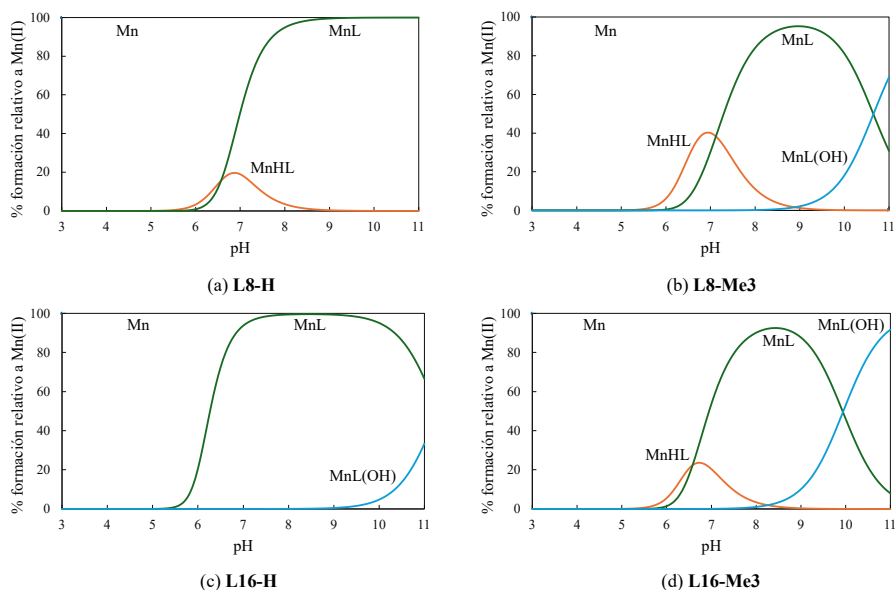


Figura 5.4: Diagramas de especiación para los sistemas Mn^{2+} -**L8-H**, Mn^{2+} -**L8-Me3**, Mn^{2+} -**L16-H** y Mn^{2+} -**L16-Me3**. $[\text{Mn}^{2+}] = [\text{L}]_{\text{Total}} = 10^{-3} \text{ mol/L}$.

Finalmente, se ha podido ajustar los valores de tres constantes de formación de complejos hidroxilados para los ligandos **L16-H**, **L8-Me3** y **L16-Me3**. Aunque estas especies son poco abundantes a pH fisiológico, ya que empiezan a formarse alrededor de $\text{pH} \sim 9$, las constantes obtenidas reflejan la tendencia a la hidrólisis de los complejos, atribuible al efecto polarizante del ion Mn^{2+} sobre los enlaces O-H del ligando coordinado. Es importante indicar que las constantes faltantes no se han podido determinar por ser especies muy minoritarias, lo cual no implica que dichos complejos no se formen en el equilibrio.

5.3.3 Estudio de complejación con Fe(II)

Por último, se ha estudiado la complejación de los sistemas sintetizados con Fe(II). Mediante estudios potenciométricos, se determinaron tres constantes de formación de complejos de Fe(II) para los ligandos **L8-H**, **L8-Me3**, **L16-H** y **L16-Me3**. Al igual que en los casos anteriores, los ligandos **L22-H** y **L22-Me3** no pudieron ser estudiados debido a su baja solubilidad en las condiciones experimentales utilizadas. En la Tabla 5.6 se presentan los valores logarítmicos de las constantes de formación, mientras que en la Figura 5.5 se muestran los diagramas correspondientes que ilustran la distribución de estos complejos.

Este estudio permite destacar tres aspectos. En primer lugar, para los cuatro ligandos estudiados se puede observar que los valores de las constantes de estabilidad con Fe(II) son menores que los correspondientes al Cu(II), pero mayores que los del Mn(II). Aunque estas constantes sugieren afinidad por el Fe(II), es importante señalar que este metal es susceptible a la oxidación en condiciones aeróbicas, lo que puede comprometer la estabilidad efectiva de los complejos en disolución. Además, los complejos con Fe(II) se forman a valores de pH mucho más alcalinos comparados con los del Cu(II). El hierro se encuentra cuantitativamente coordinado a $\text{pH} > 10$, como se puede ver en los diagramas de distribución de especies de la Figura 5.5. Segundo, se observa que los ligandos **L8-H**, **L16-H** y **L16-Me3** no muestran la presencia de metal libre a pH fisiológico (Figura 5.5), a diferencia de **L8-Me3** que sí tiene metal libre, aunque en cantidad reducida.

Tabla 5.6: Logaritmos de las constantes de estabilidad para los sistemas Fe^{2+} –**L8-H**, Fe^{2+} –**L8-Me3**, Fe^{2+} –**L16-H** y Fe^{2+} –**L16-Me3**.

Reacción ^(a)	L8-H ^(b)	L16-H ^(b)	L8-Me3 ^(c)	L16-Me3 ^(c)
$\text{Fe} + \text{L} \rightleftharpoons \text{FeL}$	10.65(4) ^(e)	9.75(3)	7.79(4)	8.65(6)
$\text{FeL} + \text{H} \rightleftharpoons \text{FeHL}$	8.13(8)	7.06(9)	7.97(8)	7.13(6)
$\text{FeL} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{FeL}(\text{OH}) + \text{H}^+$	-9.40(9)	-8.22(8)	-8.53(9)	-7.61(9)

a) Se omiten las cargas; b) Medido en agua Milli-Q. c) Medido en $\text{H}_2\text{O}:\text{EtOH}$ 70:30 v/v; e) Los valores entre paréntesis son desviaciones típicas de la última cifra significativa.

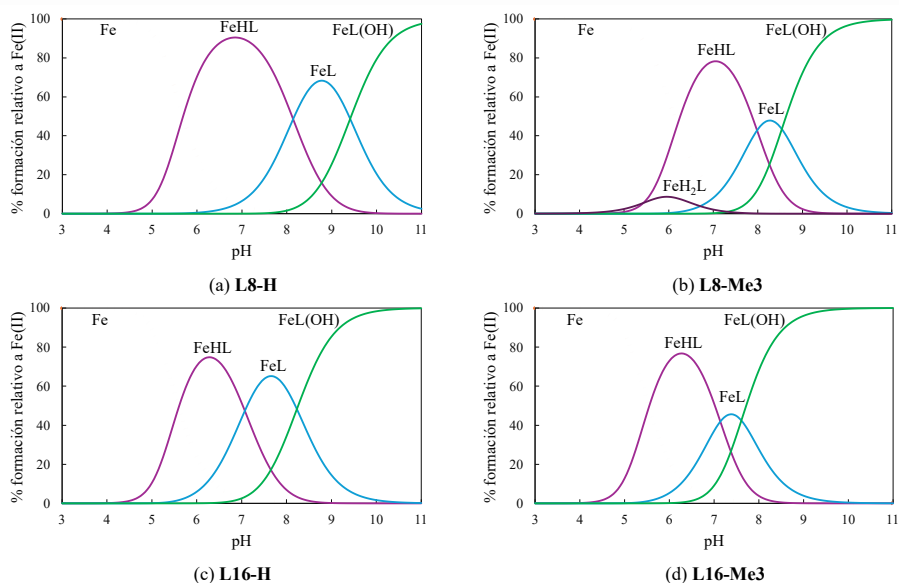


Figura 5.5: Diagramas de especiación para los sistemas Fe^{2+} –**L8-H**, Fe^{2+} –**L8-Me3**, Fe^{2+} –**L16-H** y Fe^{2+} –**L16-Me3**. $[\text{Fe}^{2+}] = [\text{L}]_{\text{Total}} = 10^{-3} \text{ mol/L}$.

Como último punto, al comparar la estabilidad de los complejos de FeL^{2+} de **L8-H** y **L16-H** se observa que la constante de estabilidad disminuye para **L16-H**. Este comportamiento también se presenta en la complejación con Cu(II) y Mn(II) , lo que pone de manifiesto la influencia de las cadenas hidrocarbonadas. Dicho efecto podría atribuirse tanto al mayor carácter

hidrofóbico como al incremento del impedimento estérico, que limitarían la participación del grupo amino secundario de la cadena lateral en la coordinación. De manera análoga, los ligandos metilados forman complejos menos estables que sus correspondientes no metilados para los metales estudiados.¹³⁻¹⁵

5.4 Bibliografía

- [1] Clares M. P.; Serena C.; Blasco S.; Nebot A.; del Castillo L.; Soriano C.; Domènech A.; Sánchez-Sánchez A. V.; Soler-Calero L.; Mullor J. L.; García-España A.; García-España E.; *J. Inorg. Biochem.*; **2015**, 143, 1–8.
- [2] Steed J. W.; Turner D. R.; Wallace K. J.; *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*; John Wiley & Sons, 2007.
- [3] Clares M.P, Blasco S., García-España E., et al.; *Chem. Commun.*; **2011**, 47, 5988–5990.
- [4] Verdejo B.; Ferrer A.; Blasco S.; Castillo C. E.; González J.; Latorre J.; Máñez M. A.; Basallote M. G.; Soriano C.; García-España E.; *Inorg. Chem.*; **2007**, 46, 5707–5719.
- [5] Bencini A.; Bernardo M. A.; Bianchi A.; Fusi V.; Giorgi C.; Pina F.; Valtancoli B.; *Eur. J. Inorg. Chem.*; 1999, 11, 1911–1918.
- [6] Albelda M. T.; García-España E.; Jiménez H. R.; Llinares J. M.; Soriano C.; Sornosa-Ten A.; Verdejo B.; *Dalton Trans.*; **2006**, 37, 4474–4481.
- [7] Blasco S.; Verdejo B.; Bazzicalupi C.; Bianchi A.; Giorgi C.; Soriano C.; García-España E.; *Org. Biomol. Chem.*; **2014**, 13, 843–850.
- [8] Sarneski J. E.; Surprenant H. L.; Molen F. K.; Reilley C. N.; Sarneski J. E.; Surprenant H. L.; Molen F. K.; Reilley C. N.; *Anal. Chem.*; 1975, 47 (13), 2116–2124.
- [9] Hague D. N.; Moreton A. D.; *J. Chem. Soc.*; 1994, 2, 265–270.
- [10] Frassinetti C.; Ghelli S.; Gans P.; Sabatini A.; Moruzzi M. S.; Vacca A.; *Anal. Biochem.*; 1995, 231, 374–382.
- [11] Golub G.; Lashaz A.; Cohen H.; Paoletti P.; Andrea Bencini; Valtancoli B.; Meyerstein D.; *Inorg. Chim. Acta*; 1997, 255 (1), 111–115.
- [12] Loudon G. M. *Organic Chemistry*; Roberts and Company, **2009**.
- [13] Nebot-Guinot A.; Liberato A.; Máñez M. A.; Clares M. P.; Domènech A.; Pitarch-Jarque J.; Martínez-Camarena A.; Basallote M. G.; García-España E.; *Inorg. Chim. Acta*; **2018**, 472, 139–148.
- [14] Golub G.; Cohen H.; Paoletti P.; Bencini A.; Messori L.; Bertini I.; Meyerstein D.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1995, 117, 8353–8361.
- [15] Bazzicalupi C.; Bencini A.; Ciattini S.; Giorgi C.; Masotti A.; Paoletti P.; Valtancoli B.; Navon N.; Meyerstein D.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*; **2000**, 14, 2383–2391.
- [16] Addison A. W.; Rao T. N.; Reedijk J.; van Rijn A.; Verschoor G. C.; *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*; 1984, 7, 1349–1356.

Capítulo 6

Ensamblajes

Supramoleculares

*“La autoorganización molecular no es azar:
es la expresión más pura
de la inteligencia química.”*

— Mercy Arteaga —

6.1 Introducción

El presente capítulo de resultados está dedicado al estudio de las propiedades de los ensamblajes supramoleculares formados por los ligandos sintetizados. La investigación se centró en evaluar la capacidad de estos compuestos para autoensamblarse en medio acuoso, con especial interés en su comportamiento en condiciones similares a las de los sistemas biológicos. Aunque los sistemas estudiados forman ensamblajes supramoleculares en disolución, su organización interna no puede establecerse con total certeza a partir de los datos disponibles. No obstante, los tamaños determinados mediante DLS y TEM se aproximan más a los valores característicos de vesículas que de micelas, por lo que en esta tesis se empleará el término *vesículas* al describir dichos autoensamblajes.

Una de las primeras propiedades analizadas fue la concentración micelar crítica (CMC), definida como la concentración mínima a la que comienzan a formarse ensamblajes supramoleculares.¹⁻³ La CMC se determinó mediante espectroscopía de fluorescencia (*Capítulo 3*, pg. 114), técnica que permite detectar la formación de vesículas a partir de los cambios en la intensidad relativa de las bandas correspondientes a distintos estados vibracionales del monómero del pireno, cuya fluorescencia es altamente sensible a la polaridad del entorno.^{4,5}

Además de la CMC, se caracterizaron otros aspectos fundamentales de los sistemas vesiculares, como su tamaño y morfología. Para ello, se utilizaron técnicas complementarias: dispersión dinámica de luz (DLS), microscopía electrónica de transmisión (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM), que proporcionan información estructural a escala nanométrica.

Asimismo, se evaluó el potencial zeta (ζ) con el objetivo de analizar la estabilidad coloidal de las vesículas en disolución acuosa. Este parámetro proporciona información sobre las interacciones electrostáticas entre partículas, lo que permite anticipar su comportamiento en distintos entornos de pH.

A continuación, se presentan y analizan los resultados obtenidos, destacando las características estructurales y fisicoquímicas de los ensamblajes supramoleculares y su relevancia en aplicaciones potenciales.

6.2 Determinación de la Concentración micelar crítica

Para la determinación de la CMC de los ligandos sintetizados, se utilizó la técnica de espectroscopía de fluorescencia con pireno como sonda.⁶ Los experimentos se realizaron en disolución acuosa, con pequeñas cantidades de metanol residual provenientes de la disolución madre del pireno y se prepararon soluciones a distintos valores de pH de entre 4 y 12. Para simular condiciones fisiológicas, se empleó una medida adicional en condiciones de pH 7.4 utilizando tampón Tris.

Los espectros de fluorescencia mostraron cambios característicos en la relación de intensidades de las bandas típicas del pireno conforme aumentaba la concentración del ligando, lo que evidenció la formación de vesículas. Para cuantificar la CMC, se aplicó un ajuste no lineal a los datos experimentales mediante el modelo sigmoideal descrito en la Ecuación 3.29 del *Capítulo 3*. Este enfoque permitió identificar con mayor precisión el punto de inflexión de la curva, correspondiente a la CMC, en comparación con métodos visuales o lineales.⁴ Los datos se ajustaron por mínimos cuadrados a un modelo para la

intensidad de fluorescencia en estado estacionario (Figura 6.1), y los valores obtenidos se resumen en las Tablas 6.1 y 6.2. Para validar el proceso de medida, éste se aplicó al dodecilsulfato sódico (SDS), un surfactante de CMC conocida.⁷

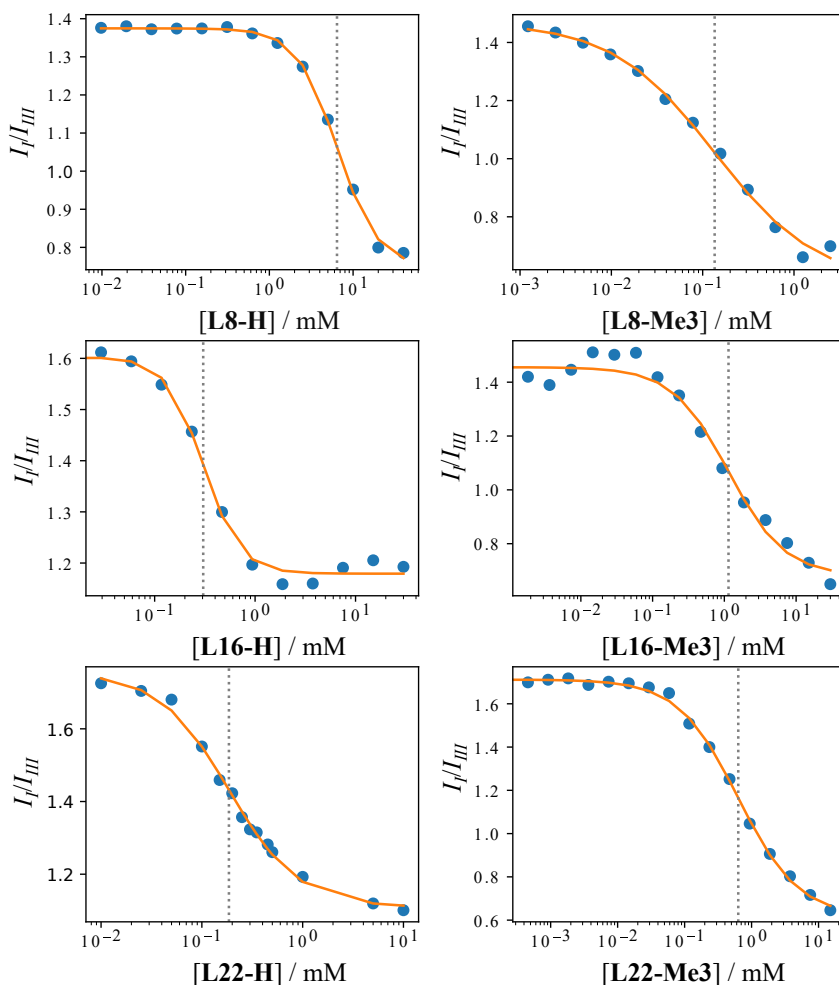


Figura 6.1: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [ligando]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en tampón Tris 20 mM a pH 7.4. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

Los valores de CMC obtenidos para los ligandos estudiados a pH fisiológico se encuentran en el rango de 0.13 a 6.40 mM. El ligando **L8-H**, que mostró la

mayor solubilidad en agua, presentó también el valor más alto de CMC (6.40(2) mM). La metilación tuvo un efecto importante sobre la CMC, aunque su impacto varió según la longitud de la cadena hidrocarbonada. En **L8-H**, la metilación provocó una disminución significativa de la CMC a 0.13(2) mM en su análogo **L8-Me3**, lo que indica que los grupos metilo en la cabeza polar incrementan la hidrofobicidad local y favorecen el empaquetamiento vesicular. En cambio, en ligandos de cadenas más largas, como **L16-H** y **L22-H**, la metilación generó un cambio mínimo en la CMC: **L16-H** mostró un valor de 0.30(2) mM frente a 1.10(2) mM en **L16-Me3**, y **L22-H** pasó de 0.18(1) mM a 0.63(4) mM en **L22-Me3**. Estos resultados indican que el efecto de la metilación no es uniforme, sino que depende de una interacción compleja entre la cabeza polar y la cadena hidrocarbonada.

Tabla 6.1: Concentración micelar crítica (CMC) en mM, medida por el método de fluorescencia de pireno en tampón Tris a pH 7.4 a temperatura ambiente. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar en la última cifra significativa.

Compuesto	L8-H	L8-Me3	L16-H	L16-Me3	L22-H	L22-Me3
CMC (mM)	6.40(2)	0.13(2)	0.30(2)	1.10(2)	0.18(1)	0.63(4)

Tabla 6.2: Concentración micelar crítica (CMC) en medio acuoso, expresada en mM. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar en la última cifra significativa.

Compuesto/ CMC (mM)						
pH	L8-H	L8-Me3	L16-H	L16-Me3	L22-H	L22-Me3
4	9.85(1)	0.37(2)	0.19(3)	0.90(2)	2.40(1)	2.70(3)
6	6.30(6)	1.34(8)	0.41(2)	0.62(6)	0.64(1)	0.30(2)
7	6.47(4)	2.29(1)	0.55(2)	1.30(1)	0.47(6)	0.69(6)
8	8.43(8)	2.60(2)	0.31(1)	0.97(8)	0.69(1)	1.30(2)
9	15.85(2)	3.34(9)	0.13(5)	1.18(9)	1.25(6)	1.10(2)
10	7.26(7)	2.17(1)	3.90(6)	1.26(9)	0.20(1)	1.00(2)

Al comparar los ligandos no metilados entre sí, se observa una clara tendencia a la disminución de la CMC al aumentar la longitud de la cadena de **L8-H** a **L16-H**, pasando de 6.40(2) mM a 0.30(2) mM. En cambio, entre **L16-H** y **L22-H**, la variación es mínima, con valores de 0.30(2) mM y 0.18(1) mM. Este comportamiento es coherente con lo descrito en la literatura, ya que las cadenas hidrocarbonadas más largas refuerzan las interacciones hidrofóbicas, favoreciendo el autoensamblaje a concentraciones más bajas. En los ligandos metilados, los valores de CMC son relativamente similares: **L8-Me3** presenta 0.13(2) mM, mientras que **L16-Me3** y **L22-Me3** muestran valores de 1.10(2) mM y 0.63(4) mM, respectivamente. Aunque la CMC es parecida entre los ligandos metilados, esto podría deberse a impedimentos estéricos introducidos por los grupos metilo o a cambios en la hidratación de la cabeza polar.

Adicionalmente, las diferencias de CMC observadas podrían estar influenciadas por la naturaleza de los contraiones presentes en solución (Cl^- , Br^- , OH^- , entre otros). La metilación modifica la distribución de carga en la cabeza polar, lo que altera las interacciones electrostáticas con el medio. En sistemas iónicos, la capacidad del contraión para estabilizar la región polar de la vesícula influye de manera directa en el proceso de autoensamblaje y podría explicar la variación de CMC. En conjunto, estos resultados muestran que la formación de vesículas depende de varios factores: longitud de la cadena hidrocarbonada, distribución de carga en la cabeza polar, el grado de hidratación y la interacción con los contraiones en solución.

Finalmente, al evaluar la CMC en función del pH (ácido, neutro y básico) de cada ligando, se observaron variaciones en algunos casos, sin una tendencia clara ni sistemática (Tabla 6.2). Aun cuando el pH modifica la CMC de un mismo ligando, la tendencia relativa entre **L8-H**, **L16-H** y **L22-H** y sus homólogos metilados se mantiene. Estas variaciones podrían deberse a

dificultades experimentales asociadas al control de la fuerza iónica en condiciones ácidas o básicas, o a la presencia de precipitado, especialmente en condiciones básicas.

6.3 Medidas de DLS

Para garantizar la formación efectiva de las vesículas, se prepararon disoluciones con concentraciones ligeramente superiores a los valores de CMC determinados previamente (Tabla 6.1). Una vez formadas, las disoluciones fueron filtradas con el fin de reducir interferencias debidas a polvo o agregados de gran tamaño, lo que favorece un mejor ajuste de los correlogramas en el análisis por dispersión dinámica de luz (DLS, por sus siglas en inglés). Posteriormente, las vesículas fueron caracterizadas mediante DLS, una técnica ampliamente utilizada para determinar el tamaño de partículas coloidales en suspensión. El principio de esta técnica se basa en la interacción de un haz láser con las partículas en movimiento browniano dentro de la disolución. La variación en la intensidad de la luz dispersada, provocada por estos desplazamientos aleatorios, permite calcular la velocidad de difusión de las partículas. Estos datos permiten obtener la distribución de tamaños y estimar el diámetro hidrodinámico promedio.

Antes de la medición, las muestras se dejaron en reposo durante 12 horas con el fin de asegurar que alcanzaran el equilibrio vesicular. Esta decisión se tomó tras observar que, dos horas después de preparar las disoluciones, los correlogramas obtenidos en la medición del tamaño vesicular no se ajustaban adecuadamente al modelo esperado, lo que indicaba que las vesículas aún no se habían estabilizado completamente.

Los resultados de tamaño promedio y del índice de polidispersión (PDI) se presentan en la Tabla 6.3 y se ilustran gráficamente en la Figura 6.2. Se observó que los ligandos con cadenas hidrocarbonadas más largas formaron vesículas de mayor tamaño. En particular, **L22-H** y **L22-Me3** generaron los ensamblajes más grandes, seguidos por **L16-H** y **L16-Me3**, mientras que **L8-H** y **L8-Me3** formaron vesículas considerablemente más pequeñas. Este comportamiento concuerda con el aumento del volumen molecular y la superficie hidrofóbica al incrementarse la longitud de la cadena hidrocarbonada, aunque no puede descartarse la influencia de otros factores como la hidratación de la cabeza polar o la organización supramolecular específica de cada ligando.

En cuanto al índice de polidispersión (PDI), este parámetro proporciona una medida cuantitativa de la heterogeneidad del sistema y se define como el cociente entre la varianza y el cuadrado de la media del tamaño de partícula. De acuerdo con las normativas ISO 13321:1996 E e ISO 22412:2008,^{8,9} un PDI cercano a 0.05 indica un sistema altamente monodisperso, mientras que valores cercanos a 0.7 reflejan una elevada heterogeneidad en la distribución de tamaños. Los sistemas estudiados, mostraron valores de PDI entre 0.17 y 0.54, lo que indica una dispersión de tamaño moderada. Esto sugiere que, si bien las vesículas no son completamente uniformes en tamaño, tampoco presentan una gran variabilidad.

Cabe destacar que el tamaño de las vesículas es un proceso dinámico y multifactorial, influido no solo por la longitud de la cadena, sino también por la concentración del tensioactivo, la temperatura del medio y la presencia de iones en solución. Aunque controlar con precisión la fuerza iónica es complejo debido a la naturaleza de los sistemas acuosos y a las múltiples interacciones presentes en disolución, en este estudio se procuró mantener constantes las

condiciones experimentales en la medida de lo posible. Esto permitió distinguir el efecto estructural de los ligandos y confirmar que la longitud de la cadena es un factor determinante en el tamaño de las vesículas.

Tabla 6.3: Tamaño promedio de las vesículas obtenidas por DLS.

Compuesto	Tamaño (nm)	PDI*
L8-H	181.6	0.344
L8-Me3	246.6	0.541
L16-H	290.5	0.546
L16-Me3	379.3	0.349
L22-H	369.1	0.248
L22-Me3	554.2	0.178

*Índice de polidispersión (PDI). Disoluciones preparadas en agua a pH 7.4 y Temperatura ambiente.

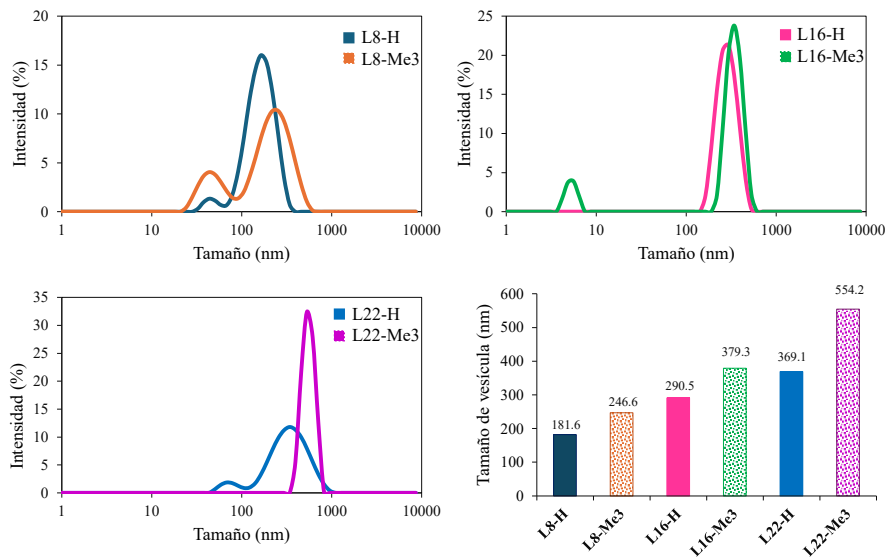


Figura 6.2: Datos de dispersión dinámica de luz (DLS) para soluciones vesiculares de **L8-H**, **L8-Me3**, **L16-H**, **L16-Me3**, **L22-H** y **L22-Me3**. Soluciones preparadas en agua a pH 7.4 y medidas a temperatura ambiente.

Además, se midió el tamaño de las vesículas en disolución acuosa bajo condiciones ácidas y básicas, con el objetivo de evaluar si en estos entornos también se forman estructuras ensambladas. Sin embargo, los correlogramas

obtenidos mediante DLS no se ajustaron correctamente. Este tipo de resultados suele asociarse con sistemas que no han alcanzado el equilibrio, en los que las partículas aún se encuentran en proceso de agregación o desagregación. Asimismo, una elevada polidispersidad, la presencia de agregados transitorios o la formación de ensamblajes muy grandes pueden afectar la calidad del ajuste.

Por otra parte, se determinó el potencial ζ en condiciones ácidas, neutras y básicas, ya que el pH influye directamente en el grado de protonación de la molécula y, por tanto, en la carga neta de los ensamblajes formados. Por ende, se espera que el potencial ζ varíe significativamente con el pH. Adicionalmente, se calculó el grado promedio de protonación a pH 7.4 a partir de los diagramas de especies construidos con las constantes de protonación de cada ligando (*Capítulo 5*). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Potencial ζ de los sistemas sintetizados a diferentes condiciones de pH y temperatura ambiente.

Compuesto	Grado de protonación promedio. (pH 7.4)	Potencial ζ (mV)		
		Ácido (pH 4)	Neutro (pH 7.4)	Básico (pH 10)
L8-H	2.63	+ 54.20	+ 12.50	---
L8-Me3	2.4	+ 37.30	+ 23.80	+ 1.84
L16-H	2.40	+ 56.00	+ 39.90	- 7.74
L16-Me3	1.5	+ 67.70	+ 50.60	+ 30.30
L22-H	1.7	+ 79.70	+ 52.00	- 46.20
L22-Me3	1.5	+ 41.00	+ 36.80	+ 26.50

A pH ácido, todos los ligandos presentan un grado de protonación cercano a 3, lo que indica que la cabeza polar está protonada, como se observa en los diagramas de distribución de especies (Figura 5.1, pg. 160). Este alto grado de

protonación se refleja en valores elevados del potencial ζ , que oscilan entre +37 y +80 mV, indicando una alta densidad de carga positiva en la superficie de las vesículas. Esta carga contribuye a la estabilidad coloidal mediante la repulsión electrostática entre las partículas. En condiciones básicas, los ligandos no metilados están casi completamente desprotonados, con un grado de protonación cercano a cero, lo que conlleva una notable disminución del potencial ζ . En particular, los ligandos **L16-H** y **L22-H** muestran incluso una inversión de la carga superficial, presentando valores negativos de potencial ζ (-7.74 mV y -46.20 mV respectivamente). Esta inversión podría explicarse por la adsorción selectiva de aniones en la corona vesicular. En el caso de **L8-H**, el potencial ζ no pudo medirse en medio básico, probablemente debido a la alta concentración iónica y a la inestabilidad del sistema bajo estas condiciones. Además, en este entorno se observó la formación de precipitado, lo que refleja la menor estabilidad de las vesículas.

A pH neutro, donde los grados de protonación son intermedios, el potencial electrocinético de las vesículas muestra diferencias notables entre los ligandos. Por ejemplo, **L8-H**, con un grado de protonación promedio de 2.63, presenta un potencial ζ de +12.50 mV, considerablemente menor que el observado a pH ácido, lo que refleja la pérdida parcial de protonación en las cabezas polares y la consecuente disminución de la carga positiva en la superficie vesicular. Por otro lado, **L8-Me3**, cuya cabeza polar está modificada con grupos metilo que bloquean parcialmente la protonación de la amina, exhibe un potencial ζ mayor (+23.80 mV), a pesar de tener un grado de protonación ligeramente inferior (2.4). Este aumento podría deberse a que la modificación estructural con grupos metilo favorece una orientación más expuesta a las aminas protonadas hacia el medio acuoso. Aunque la carga neta es menor, la accesibilidad y disposición espacial de las cargas positivas en la superficie vesicular pueden contribuir a un mayor potencial electrocinético.

En sistemas con cadenas hidrocarbonadas más largas, como **L22-H** y **L22-Me3**, ambos con grados de protonación similares (1.7 y 1.5), se observa que **L22-H** presenta un potencial ζ mayor. Esta diferencia podría estar relacionada con la conformación y la densidad de empaquetamiento en la corona vesicular, lo que afecta a cómo se distribuyen las cargas superficiales y su interacción con el entorno.

Es importante señalar que algunos ligandos metilados presentan valores de potencial ζ más elevados que los no metilados análogos en condiciones neutras y básicas, a pesar de presentar un grado de protonación ligeramente inferior. Esta observación plantea que la metilación puede influir en el potencial electrocinético, aunque su efecto no es uniforme en todos los medios, ya que esta tendencia no se mantiene de forma consistente en medio ácido. Esto indica que el impacto de los grupos metilo sobre el potencial ζ depende tanto del entorno químico como de la estructura específica del ligando. La inclusión de grupos metilo puede aportar rigidez y volumen a la cabeza polar, facilitando esta orientación y contribuyendo así al incremento del potencial electrocinético. Además, la longitud de la cadena hidrocarbonada también influye en el potencial ζ , ya que en condiciones ácidas los ligandos con cadenas más largas, como **L22-H**, tienden a formar vesículas con potenciales más elevados, posiblemente debido a un mayor empaquetamiento superficial que intensifica la repulsión electrostática entre partículas. Sin embargo, en medio básico, la inversión de carga observada en **L22-H** indica que la distribución de protones y la conformación tridimensional de los ligandos juegan un papel importante en la interacción con el entorno y en la estabilidad coloidal de las vesículas.

En conjunto, estos resultados demuestran que el potencial ζ no depende solo del número de grupos protonados, sino también de la distribución y

orientación espacial de las cargas en la superficie vesicular, la estructura química de los ligandos (incluyendo la presencia de sustituyentes como grupos metilo), la longitud de la cadena hidrocarbonada y las condiciones del medio, como el pH y la fuerza iónica. La comparación de los datos experimentales con los diagramas de protonación indica que el estado ácido-base de las cabezas polares es un factor clave que influye tanto en la estabilidad como en las propiedades electrocinéticas de las vesículas, proporcionando así una comprensión más completa del comportamiento coloidal de estos sistemas en distintos entornos.

Estos resultados son coherentes con la teoría DLVO (Deryaguin-Landau-Verwey-Overbeek),¹⁰⁻¹² que describe la estabilidad de dispersiones coloidales como el resultado del equilibrio entre dos fuerzas: la repulsión electrostática, generada por las cargas superficiales de las partículas, y la atracción de Van der Waals. La repulsión electrostática da lugar a una doble capa eléctrica que actúa como barrera contra la agregación, mientras que las fuerzas de Van der Waals promueven la atracción entre partículas a distancias cortas. Según esta teoría, un sistema coloidal se considera estable cuando el potencial ζ alcanza o supera ± 30 mV,¹⁰ lo que indica una repulsión suficiente para evitar la agregación.¹¹

Finalmente, la estabilidad a largo plazo de las vesículas se evaluó en dispersión acuosa a pH 7.4, monitoreando su tamaño durante 30 días a temperatura ambiente. Las mediciones semanales revelaron un ligero aumento en el tamaño vesicular, sin evidencia de agregación significativa. Estos resultados indican que los sistemas son estables bajo condiciones fisiológicas, lo que es relevante para su potencial uso en transporte de fármacos.

6.4 Microscopía TEM y AFM

Para comprender con mayor profundidad la morfología de las estructuras formadas por los distintos ligandos, se obtuvieron imágenes mediante TEM (Figura 6.3). En todos los casos estudiados, las vesículas presentan una morfología casi esférica. No obstante, se observan diferencias notables en su tamaño según la estructura del ligando. En particular, las vesículas formadas por el ligando con una cadena hidrocarbonada de 22 átomos de carbono (**L22-H**) resultan significativamente más grandes que las formadas por los demás compuestos estudiados. Esto indica que la longitud de la cadena alifática influye directamente en el tamaño del ensamblaje vesicular.

Además del tamaño promedio, las imágenes muestran cierta dispersión en el tamaño de las vesículas, lo que indica una variabilidad moderada entre ellas. Esta dispersión podría estar relacionada con factores estructurales intrínsecos, como diferencias conformacionales entre las vesículas o en el empaquetamiento de los ligandos. Asimismo, la concentración del tensioactivo desempeña un papel decisivo en el comportamiento vesicular. Como se ha indicado en la literatura,¹³ cerca de la concentración micelar crítica (CMC), las micelas tienden a adoptar formas esféricas y de menor tamaño; al aumentar la concentración, estas estructuras pueden crecer o reorganizarse en formas más complejas, como vesículas, bastones o láminas, lo que refleja la naturaleza dinámica del proceso de autoensamblaje.

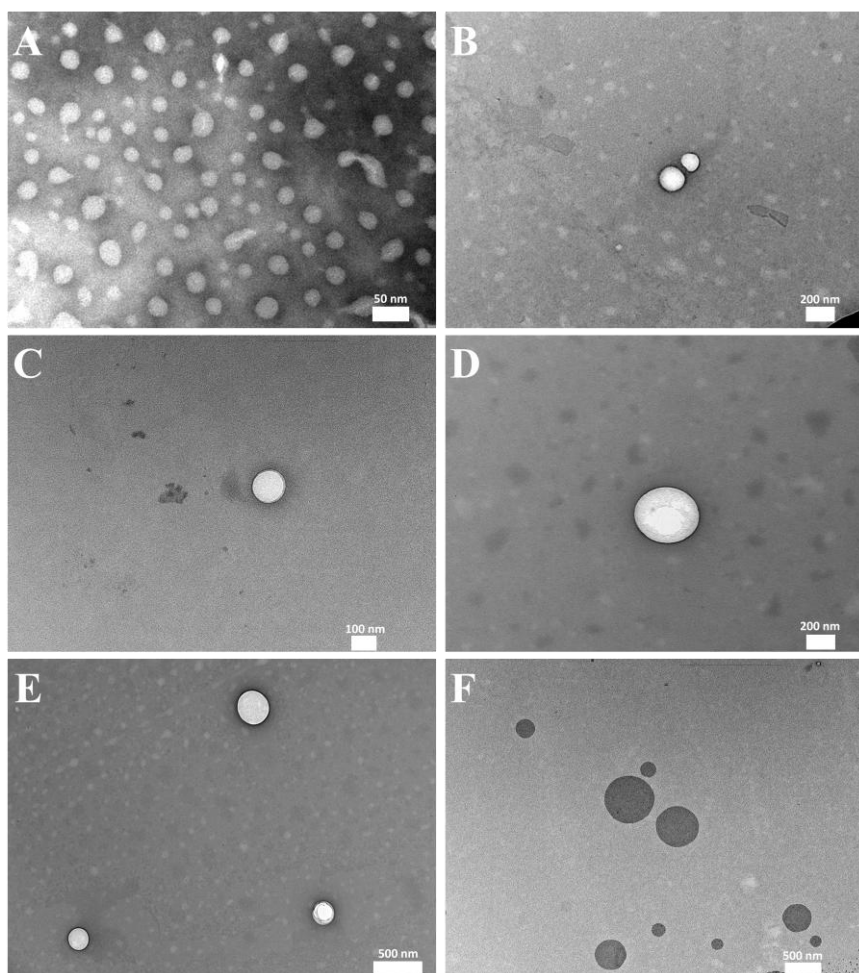


Figura 6.3: Imágenes seleccionadas de TEM. A) **L8-H**, B) **L8-Me3**, C) **L16-H**, D) **L16-Me3**, E) **L22-H** y F) **L22-Me3**. Muestras preparadas a agua a pH 7.4 y concentraciones superiores a sus respectivas CMC.

Con el fin de complementar las observaciones obtenidas por TEM y de profundizar en la caracterización morfológica, se llevaron a cabo análisis mediante AFM para los ligandos **L8-H** y **L8-Me3**. La Figura 6.4 presenta representaciones tridimensionales de ambos ligandos, confirmando la morfología esférica observada previamente y proporcionando información adicional sobre la topografía superficial de las vesículas.

Los resultados obtenidos mediante TEM y AFM permiten concluir que tanto la morfología como el tamaño de las vesículas dependen de combinación de factores, entre los que destacan la longitud de la cadena hidrocarbonada del ligando, su estructura química y la concentración del mismo. Comprender la interacción entre estas variables resulta esencial para el estudio de la estabilidad y el comportamiento coloidal de estos ensamblajes supramoleculares.

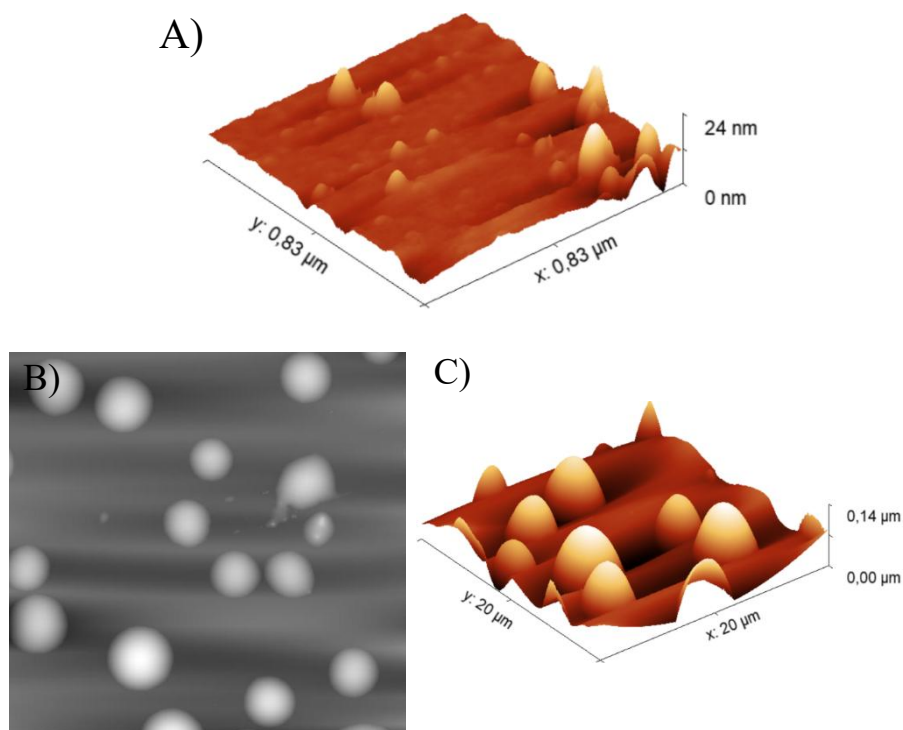


Figura 6.4: Esquema de imágenes obtenidas mediante AFM. (A) L8-H, (B-C) L8-Me3. Muestras preparadas en agua a pH 7.4.

6.5 Dinámica molecular

Para profundizar en las propiedades vesiculares de los ligandos **L8-H** y **L8-Me3**, se llevó a cabo una simulación de dinámica molecular. En esta simulación, se modelaron 100 moléculas de cada ligando en configuraciones iniciales que representan un ensamblaje micelar, para observar cómo interactúan y se organizan en un entorno que simula las condiciones experimentales. Durante la simulación, las moléculas se agruparon para formar una sola micela, que se mantuvo estable a lo largo del experimento (Figura 6.5). A partir de esta simulación, se recopilieron datos sobre el momento de inercia del sistema, que permiten calcular la excentricidad media de la micela mediante la Ecuación 6.1.¹⁴

$$e = 1 - \frac{I_{min}}{I_{avg}} \quad 6.1$$

Donde I_{min} es el momento de inercia más pequeño a lo largo del eje x, y o z y I_{avg} es el promedio de los tres momentos de inercia.

De manera similar, se estimó el radio micelar promedio (R_s) a partir del radio de giro (R_g) utilizando la siguiente ecuación.¹⁴

$$R_s = \sqrt{\frac{5}{3}} R_g \quad 6.2$$

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.5. En ambos casos, las simulaciones muestran partículas con alta esfericidad, reflejada en valores de excentricidad cercanos a cero, lo que indica una estructura bien definida bajo las condiciones modeladas. Aunque el tamaño de las estructuras simuladas es notablemente menor que el de los resultados experimentales, esta diferencia se debe a que en las simulaciones se formaron micelas, mientras que experimentalmente se observaron vesículas, que son ensamblajes de mayor tamaño. No obstante, la forma esférica predicha por las simulaciones

concuera con las observaciones mediante microscopía electrónica, lo que valida la consistencia general entre ambos enfoques y muestra que el modelo reproduce adecuadamente la morfología básica del sistema bajo condiciones controladas.

Tabla 6.5: Datos obtenidos de la simulación de ligandos con cadena de 8 átomos de carbono.

	L8-H	L8-Me3
Excentricidad, e	0.072	0.090
Radio micelar, R_s / Å	24.70	26.54

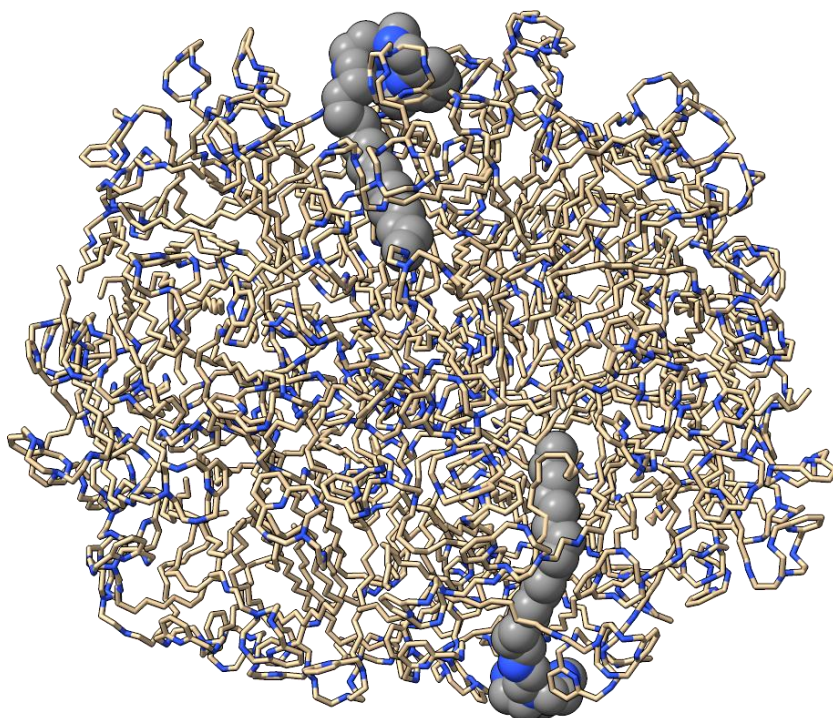


Figura 6.5: Esquema de simulación mediante dinámica molecular de una micela ensamblada con el ligando **L8-H**. La *cabeza hidrofílica* se representa en color azul (Ubicada en el exterior de la micela) * y la *cola hidrófoba* en color beige o gris (Ubicada en el interior de la micela). *

Además, se calculó la función de distribución radial ($g(r)$) de las moléculas de agua con respecto al centro de masa (COM) de la micela, lo que permitió obtener una visión más detallada de la estructura interna del ensamblaje. La Figura 6.6 ilustra claramente la distribución radial y la disposición espacial tanto de las moléculas de surfactante como del disolvente, destacando diferencias significativas en la densidad de moléculas de agua dentro y fuera de las micelas formadas por los ligandos **L8-H** y **L8-Me3**. En el caso de **L8-H**, se detecta una presencia leve de moléculas de agua en el interior de la micela; sin embargo, la señal débil indica que el núcleo permanece hidrofóbico, excluyendo eficazmente las moléculas de agua.

En el caso del ligando **L8-Me3** (Figura 6.6, B), se observa una ausencia total de señal de moléculas de agua en el interior de la micela, lo que indica una exclusión aún más efectiva del agua y, por ende, una mayor consistencia estructural. Estos resultados confirman que las micelas formadas por ambos ligandos presentan una estructura coherente y bien definida, con una organización interna que protege el núcleo hidrofóbico del entorno acuoso exterior. La exclusión de agua es esencial para la estabilidad de las micelas y sugiere que ambos ligandos forman micelas robustas, aunque **L8-Me3** parece proporcionar una estructura más compacta y uniforme.

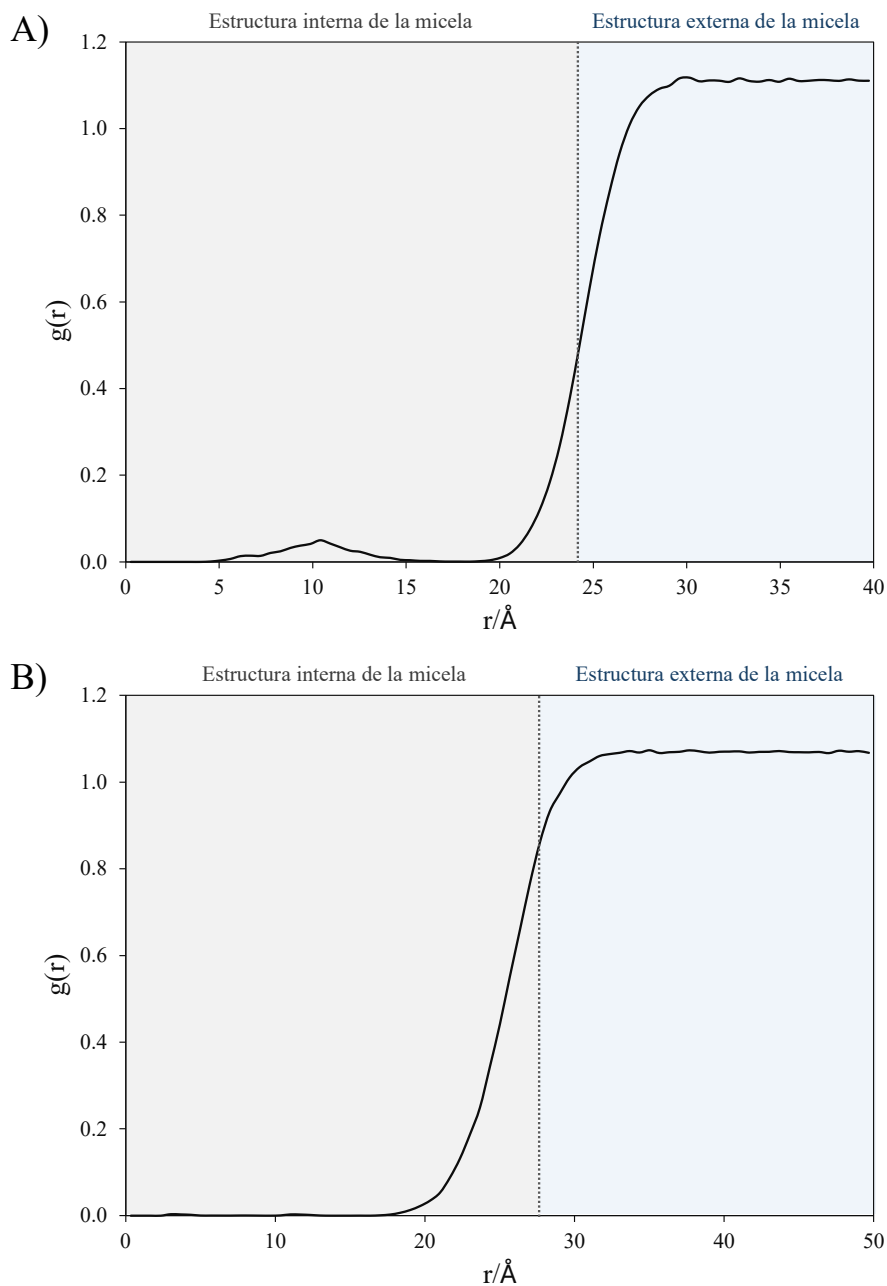


Figura 6.6: Distribución radial de las moléculas de agua con respecto al centro de masa de la micela (COM). **L8-H** (A) y **L8-Me3** (B). Las líneas punteadas verticales representan los radios micelares calculados.

6.6 Bibliografía

- [1] Wennerström H.; Lindman B.; *Phys. Rep.*; 1979, 52, 1–86.
- [2] Shrestha L. K.; Sato T.; Dulle M.; Glatter O.; Aramaki K.; *J. Phys. Chem. B.*; **2010**, 114, 12008–12017.
- [3] Vincent B.; *Adv Colloid Interface Sci.*; **2014**, 203, 51–54.
- [4] Piñeiro L.; Novo M.; Al-Soufi W.; *Adv Colloid Interface Sci.*; 2015, 215, 1–12.
- [5] Perinelli D. R.; Cespi M.; Lorusso N.; Palmieri G. F.; Bonacucina G.; Blasi P.; *Langmuir*; **2020**, 36, 5745–5753.
- [6] Kalyanasundaram K.; Thomas J. K.; *J. Am. Chem. Soc.*; 1977, 99, 2039–2044.
- [7] Dominguez A.; Fernandez A.; Gonzalez N.; Iglesias E.; Montenegro L.; *J. Chem. Educ.*; 1997, 74, 1227.
- [8] International Organization for Standardization. ISO 13321: Methods for determination of particle size distribution – Part 8: Photon correlation spectroscopy. Geneva: ISO; 1996.
- [9] International Organization for Standardization. ISO 22412: Particle size analysis – Dynamic light scattering. Geneva: ISO; 2008.
- [10] Derjaguin B & Landau L.; *Acta Physicochim URSS*. 1941; 14:633–662.
- [11] Hunter R.J.; *Foundations of colloid science*. Vol. 2. Oxford: Clarendon Press; 1995.
- [12] Chassagne C.; Introduction to colloid science: applications to sediment characterization. TU Delft OPEN Books; **2021**.
- [13] Lindman B.; Wennerström H.; *Top Curr Chem*; 1980; 87; 1–87.; Naqvi A. Z.; Khatoon S.; Kabir-ud-Din.; *J. Solut. Chem.*; **2011**; 40; 643–655.; Palladino P.; Ragone R.; *Langmuir*; **2011**; 27; 14065–14070.; Alam Md. S.; Mohammed Siddiq A.; Mythili V.; Priyadharshini M.; Kamely N.; Mandal A. B.; *J. Mol. Liq.*; **2014**.
- [14] Palazzesi F.; Calvaresi M.; Zerbetto F.; *Soft Matter*; **2011**, 7, 9148–9156.

Capítulo 7

Actividad catalítica

*“Donde la química se ralentiza,
el catalizador encuentra
camino invisibles.”*

— Mercy Arteaga —

7.1 Introducción

En capítulos anteriores se abordó la síntesis y caracterización de ensamblajes supramoleculares obtenidos, así como las propiedades ácido-base de los compuestos y su modo de complejación con metales como Cu(II), Mn(II) y Fe(II). Tal como se mencionó en el Capítulo 1 (*Introducción*), estos metales se encuentran presentes en organismos vivos y desempeñan un papel fundamental contra el estrés oxidativo, lo que justifica nuestro interés en estudiar sus complejos con los ligandos sintetizados. Además, el ligando pytren (**L**) y sus derivados han mostrado una actividad SOD significativa,¹ razón por la cual hemos modificado estructuralmente este ligando con la finalidad de mejorar sus propiedades de dismutación e imitar la actividad SOD de la enzima nativa, es decir, su capacidad para catalizar la reacción de dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

A lo largo de este capítulo, profundizaremos en el estudio de los miméticos de SOD con Cu(II), Mn(II) y/o Fe(II) y discutiremos la relación entre los complejos metálicos de los sistemas sintetizados y la estructura del centro activo de la SOD nativa. Para ello, el capítulo se ha organizado en tres secciones principales, de acuerdo con el metal empleado en la formación de complejos capaces de catalizar la dismutación del radical superóxido.

De manera complementaria, se ha explorado una segunda reacción catalítica: la cicloadición azida-alquino $[3 + 2]$ de tipo “*clic*”, catalizada por surfactantes de cobre en medio acuoso, con el objetivo de evaluar la versatilidad catalítica de los sistemas desarrollados.

Cada sección presenta los resultados obtenidos y su interpretación en el contexto de la actividad SOD como en el de la química “*clic*”, destacando las

modificaciones estructurales implementadas en los ligandos para optimizar su función catalítica. Cabe señalar que, de los seis ligandos sintetizados, aquellos con una cadena de 22 átomos de carbono (**L22-H** y **L22-Me3**) no pudieron ser estudiados debido a su baja solubilidad en agua.

7.2 Actividad de los complejos de Cu(II)

Los valores de la constante catalítica e IC_{50} de los cuatro sistemas estudiados se muestran en la Tabla 7.1, determinados mediante el método McCord-Fridovich. Esta tabla incluye también los datos del cobre libre, CuL y la enzima Cu₂Zn₂-SOD nativa de eritrocito bovino, a modo de comparación. A excepción del complejo Cu**L16-H** para el cual la actividad registrada es insignificante, todos ellos exhiben una actividad catalítica igual o mejor que la del ligando **L** en la dismutación del superóxido. La influencia de la longitud de la cadena alifática en los valores de actividad medidos parece ir en sentido contrario cuando se comparan los complejos CuL/Cu**L8-H**/Cu**L16-H**. De CuL a Cu**L8-H** hay una ligera disminución de la actividad y de Cu**L8-H** a Cu**L16-H** hay una fuerte disminución de la actividad. Esta tendencia se interpreta como un aumento de la lipofilicidad que conlleva el alargamiento de la cadena, lo que afecta negativamente la actividad catalítica. Se ha demostrado que la presencia de una molécula de agua en la esfera de coordinación metálica desempeña un papel relevante en el mecanismo catalítico.² Por lo tanto, un entorno más hidrofóbico alrededor del centro metálico en los complejos de cadena más larga podría impedir las interacciones necesarias con el disolvente, reduciendo así su actividad catalítica. La presencia de grupos amino metilados da como resultado una mejor actividad en comparación con el análogo no metilado. Este efecto de los grupos N-alquilo ya ha sido observado por otros autores para complejos

similares.² Esto sugiere que, aunque el entorno hidrofóbico es un factor muy importante, no es el único. También intervienen la energía de hidratación y la formación de puentes de hidrógeno, los cuales influyen significativamente en la eficacia catalítica del sistema. En cuanto a los sistemas metilados, **CuL8-Me3** y **CuL16-Me3** muestran actividades prácticamente comparables.

Finalmente, los complejos metilados tienen una actividad mucho mayor que la del cobre libre, lo cual indica que el ligando tiene una influencia positiva en el ciclo catalítico. No obstante, los complejos de **CuL8-H** y **CuL16-H** presentan una actividad próxima a la de cobre libre, o incluso inferior, en el caso del **CuL16-H**. Este comportamiento podría estar relacionado con una menor energía de hidratación del sistema, asociada a la presencia de cadenas hidrocarbonadas más largas, o con posibles variaciones en el mecanismo catalítico influenciadas por el entorno acuoso.

Tabla 7.1: Actividad SOD de los complejos Cu(II) a pH 7.4 determinada mediante el método de McCord-Fridovich con NBT como detector.

Complejo	IC ₅₀ / μM	k_{cat} / ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
CuL ^b	1.4(2)	$2.14(2) \cdot 10^6$
CuL8-H	1.69(1) ^a	$1.7(1) \cdot 10^6$
CuL8-Me3	0.489(1) ^a	$6.1(5) \cdot 10^6$
CuL16-H	>10	n/d [*]
CuL16-Me3	0.41(1) ^a	$7.1(6) \cdot 10^6$
Cu(ClO ₄) ₂ ^b	1.1(1)	$2.7 \cdot 10^6$
Cu ₂ Zn ₂ -SOD ^b	0.010(2)	$430 \cdot 10^6$

^aLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^bDatos tomados de la bibliografía.³ ^{*}Irrelevante.

7.3 Actividad de los complejos de Mn(II)

A continuación, se evalúa el potencial de los complejos de Mn(II) como miméticos de la SOD. Los resultados se presentan en la Tabla 7.2, que incluye, con fines comparativos, los datos correspondientes a MnL, MnSO₄ y MnSOD.

En general, los complejos de Mn(II) presentan una actividad similar a la del manganeso libre o, en algunos casos, prácticamente nula, como es el caso de MnL16-H. Este comportamiento sugiere que la coordinación del metal por parte del ligando origina complejos poco estables, lo que concuerda con los valores obtenidos en los estudios de equilibrio ácido-base y complejación (Figura 5.4, pg. 168).

Tabla 7.2: Actividad SOD de los complejos de Mn(II) a pH 7.4, determinada mediante el método de McCord-Fridovich con NBT como detector.

Complejo	IC ₅₀ / μM	k_{cat} / ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)
MnL ^b	1.4(1) ^a	2.05 10 ⁶
MnL8-H	6.1(1) ^a	4.9(4) 10 ⁴
MnL8-Me3	2.66(5) ^a	1.11(9) 10 ⁶
MnL16-H	>10	n/d*
MnL16-Me3	3.6(1) ^a	8.2(7) 10 ⁵
MnSO ₄ ^b	3.6(5) ^a	0.80 10 ⁶
MnSOD ^b	----	100 10 ⁶

^aLos valores en paréntesis indican el valor de la desviación estándar sobre la última cifra significativa. ^bDatos tomados de la bibliografía.³ *Irrelevante.

La presencia de grupos amino metilados en la estructura del ligando mejora notablemente su actividad catalítica frente a los análogos no metilados.² Sin embargo, la longitud de la cadena alifática tiene un efecto inverso: al comparar la serie MnL, MnL8-H y MnL16-H, se observa una leve disminución de la actividad de MnL a MnL8-H, seguida de una caída más pronunciada en MnL16-H. Esta tendencia, también observada en los complejos de Cu(II),

puede atribuirse al aumento de la lipofilicidad y a la consiguiente reducción en la energía de hidratación. Este entorno más hidrofóbico puede dificultar la transferencia de protones implicada en el ciclo catalítico, ralentizando la catálisis.

Por último, al comparar los complejos de Mn(II) con sus análogos de Cu(II), se observa que los primeros presentan valores de k_{cat} considerablemente más bajos. Este resultado se correlaciona con las constantes de complejación determinadas experimentalmente: los complejos con Cu(II) exhiben constantes significativamente mayores que los formados con Mn(II), lo que indica una mayor estabilidad de coordinación entre el metal y el ligando. En consecuencia, la menor estabilidad de los complejos de Mn(II) podría limitar su eficacia en los procesos redox implicados en la actividad tipo SOD.

7.4 Actividad de los complejos de Fe(II)

También se evaluó la actividad SOD de los complejos con Fe(II). En este caso, ninguno de ellos mostró una actividad catalítica destacada, con la excepción de FeL8-H, que presentó un valor de IC_{50} de 4.50(9) μ M y una constante catalítica de $6.6(5) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Sin embargo, incluso este valor es considerablemente inferior en comparación con los complejos análogos de cobre, por lo que no puede considerarse catalíticamente relevante.

La escasa actividad observada podría estar relacionada con la presencia de la cadena hidrocarbonada en la estructura del ligando. Al igual que en los sistemas basados en Cu(II) y Mn(II), se identifica una tendencia clara: el aumento en la longitud de la cadena alifática reduce la eficiencia catalítica del complejo, probablemente debido a un entorno más hidrofóbico que dificulta las interacciones con el disolvente o con especies reactivas del medio.

Además, diversos estudios han demostrado que el ion Fe(II) puede catalizar la deshidrogenación de aminas primarias y secundarias en condiciones oxidantes.⁴⁻⁶ En compuestos con estructuras químicas similares a los aquí estudiados, se ha descrito que este proceso puede conducir a la formación de iminas a partir de las aminas secundarias presentes en los ligandos.⁷ Esta transformación altera la naturaleza electrónica y estérica del entorno del metal, modificando potencialmente la geometría de coordinación y la estabilidad del complejo.

En el contexto de los complejos de hierro, la formación de estas especies oxidadas podría tener implicaciones importantes. El paso de Fe(II) a Fe(III), junto con la aparición de funciones imina, puede inducir una reorganización estructural que compromete la estabilidad del complejo o reduce su capacidad para participar eficientemente en el ciclo redox implicado en la dismutación del superóxido. Aunque se requieren estudios adicionales para confirmar este comportamiento, estos hallazgos sugieren que tanto la oxidación del metal como la transformación del ligando podrían afectar negativamente en la actividad tipo SOD.

7.5 Actividad catalítica de la reacción química de clic de cicloadición catalizada por surfactantes de cobre azida-alquino [3 + 2] en agua.

Tras analizar la actividad SOD de los ligandos con Cu(II), Mn(II) y Fe(II), y confirmar que los complejos Cu(II)L8-Me3 y Cu(II)L16-Me3 presentan una actividad catalítica destacada, se decidió explorar otras aplicaciones de estos sistemas. En este contexto, se estableció una colaboración con el grupo del Profesor Lahoucine Bahsis, Universidad Cadi Ayyad, para estudiar su desempeño en la reacción de cicloadición azida-alquino [3 + 2], catalizada por surfactantes de cobre en medio acuoso, una transformación clave dentro de la denominada *química de “clic”*.

7.5.1 Preparación *in situ* del tensioactivo Cu(II)

Una solución acuosa del ligando Lx se mezcló con una cantidad equimolar de iones Cu(II) a pH neutro. La formación del complejo fue instantánea, evidenciado por el cambio de color de azul claro (Cu²⁺ acuoso) a un azul más oscuro correspondiente al complejo macrocíclico cobre-piridina (Figura 7.1). Este procedimiento produce resultados óptimos dentro del rango de pH de 4 a 9. Si el pH es excesivamente ácido, los grupos amino se protonan, lo que impide la formación de complejos. Por el contrario, si el pH demasiado básico, el cobre puede precipitar en forma de hidróxido, evitando la formación de complejos. A pH neutro, la formación del complejo es instantánea y cuantitativa.

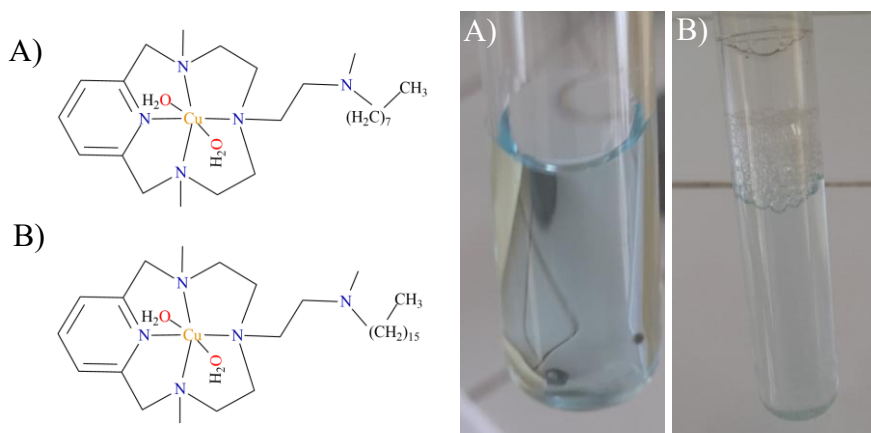


Figura 7.1: Estructura e imágenes de soluciones preparadas de tensioactivos Cu(II)L8-Me3 (A) y Cu(II)L16-Me3 (B).

7.5.2 Reacción de clic de cicloadición de azida-alquino catalizada por Cu(II) utilizando tensioactivos preparados con Cu(II)L8-Me3 y Cu(II)L16-Me3

Una mezcla de bencilazida (**1a**, 0.6 mmol), fenilacetileno (**2a**, 0.5 mmol) y la cantidad correspondiente de catalizadores de Cu(II)Lx en 3 mL de agua se colocó bajo una agitación magnética a temperatura ambiente y la reacción se monitoreó mediante TLC. Una vez completada la reacción, la mezcla se diluyó en acetato de etilo y la fase orgánica resultante se evaporó al vacío para obtener el 1,2,3-triazol (**3a**) puro.

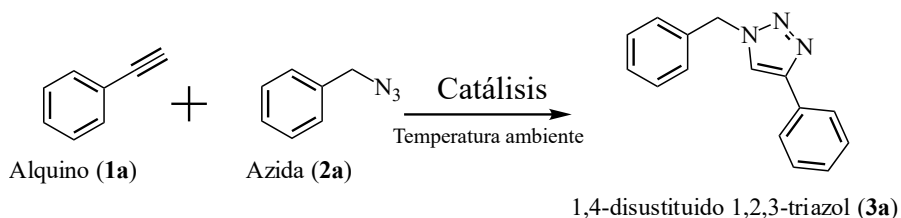


Figura 7.2: Reacción de cicloadición azida-alquino [3 + 2] catalizada por tensioactivos que contienen Cu(II) (CuAAC).

7.5.3 Estudios catalíticos de la reacción química de clic de cicloadición de azida-alquino [3+2] catalizada por tensioactivos de cobre en agua

Se evaluó la actividad catalítica del complejo de Cu(II)-L_x que contiene tensioactivos, en la reacción de cicloadición [3+2] de fenilacetileno (**1a**) y bencilazida (**2a**) catalizada por cobre (Figura 7.2), estrictamente en condiciones de reacción de “clic” en medio acuoso y teniendo en cuenta el efecto de la concentración micelar crítica (CMC) sobre la actividad catalítica del tensioactivo Cu(II). Los valores de CMC a pH de 7.4 (*Capítulo 6*) se utilizaron como referencia para preparar los sistemas tanto por encima como por debajo de la CMC, en el caso de Cu(II)L8-Me3 y Cu(II)L16-Me3, respectivamente. Se observó que el uso de CuSO₄ solo resultó en un bajo rendimiento del producto deseado (**3a**) a temperatura ambiente (Tabla 7.3). Las reacciones de CuAAC muestran que la ausencia de ácido ascórbico como agente reductor de los iones de Cu(II), para generar las especies de Cu(I) catalíticamente activas, conduce a bajos rendimientos, lo que indica la presencia de fuertes interacciones entre los iones de Cu(II) y los ligandos utilizados. No se observó la reducción de los iones Cu(II) a Cu(I) en presencia de alquinos terminales mediante el homoacoplamiento de alquinos terminales, conocida como reacción de Glaser, lo cual sugiere que los tensioactivos que contienen Cu(II) tienen un potencial redox elevado.^{8,9} En presencia del ácido ascórbico y trabajando a una concentración inferior a la CMC, los tensioactivos de Cu(II) dan como resultado la síntesis regioselectiva de 1,4-disustituido 1,2,3-triazol en agua a temperatura ambiente, pero con bajos rendimientos (10 a 40%). Estos resultados pueden explicarse por dos factores, el primero es la baja carga de iones de Cu(II) y el segundo es la parte lipofílica de estos metalo-surfactantes, que tienden a aislar los reactivos orgánicos

(bencilazida y fenilacetileno) y limitar su accesibilidad al centro metálico. En condiciones superiores a la CMC, se obtuvo un excelente rendimiento (40 a 90%) del triazol correspondiente tras 24 horas de reacción a temperatura ambiente en agua (Figura 7.3). Asimismo, se investigó el efecto de la cantidad de catalizador en la eficiencia de la reacción de CuAAC (Tabla 7.3).

Tabla 7.3: Resultados de la reacción de CuAAC catalizada por surfactante de Cu(II) ^a.

Entrada	Catalizador	Carga (mol%)		Rendimiento (%) ^b
1	Blanco	---		0
2	CuSO ₄	5		52
3	Lx	20		0
4	Cu(II) L8-Me3	0.08	CMC <	10
5	Cu(II) L8-Me3	0.16	CMC >	18
6	Cu(II) L16-Me3	0.30	CMC <	26
7	Cu(II) L16-Me3	0.60	CMC >	40
8 ^c	Cu(II) L8-Me3	0.08	CMC <	42
9 ^c	Cu(II) L8-Me3	0.16	CMC >	58
10 ^c	Cu(II) L16-Me3	0.30	CMC <	76
11 ^c	Cu(II) L16-Me3	0.60	CMC >	90

^a. Condiciones: fenilacetileno (0,5 mmol); benzil azida (0,6 mmol); agua (3 mL); catalizador a temperatura ambiente durante 24h. ^b. Rendimientos aislados. ^c Usando 10 eq. de ácido ascórbico.

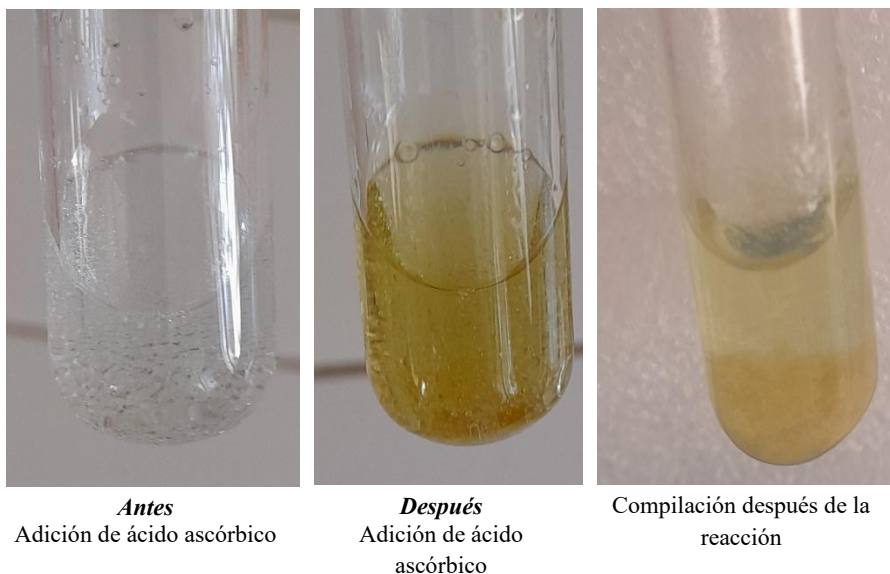


Figura 7.3: La reacción de CuAAC catalizada por Cu(II)L16-Me3

La concentración mínima de micelas, determinada por la CMC, desempeña un papel fundamental en la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (CuAAC). En concentraciones que superan la CMC, las moléculas de surfactante se agregan para formar micelas, creando así nanorreactores que concentran localmente tanto los reactivos hidrofóbicos, como los alquinos, como el catalizador de cobre. Se ha demostrado que esta mayor concentración dentro del núcleo hidrofóbico de la micela mejora la concentración efectiva de reactivos, lo que acelera la velocidad de reacción al facilitar una mayor interacción entre la azida y el alquino en las proximidades del catalizador de cobre. Además, se ha observado que las micelas estabilizan las especies de Cu(II), que a menudo son susceptibles a la oxidación o la precipitación. Esta estabilización mantiene la actividad catalítica y favorece la reacción. Por el contrario, en la región por debajo de la CMC, la presencia de micelas disminuye, lo que conduce a un entorno menos concentrado para los reactivos y el catalizador. Esto puede dar lugar a una velocidad de reacción reducida y

a una menor eficiencia general. Por lo tanto, la existencia de micelas en o por encima de la CMC es fundamental para establecer un entorno más propicio para la reacción de CuAAC, optimizando así tanto la cinética de la reacción como el rendimiento.

7.6 Bibliografía

- [1] Clares M. P.; Blasco S.; Inclán M.; Agudo L. del C.; Verdejo B.; Soriano C.; Doménech A.; Latorre J.; García-España E.; *Chem. Commun.*; **2011**; 47; 5988–5990.
- [2] Martínez-Camarena Á.; Sánchez-Murcia P. A.; Blasco S.; González L.; García-España E.; *Chem. Commun.*; **2020**, 56, 7511–7514.
- [3] Belda R.; Blasco S.; Verdejo B.; Jiménez H. R.; Doménech-Carbó A.; Soriano C.; Latorre J.; Terencio C.; García-España E.; *Dalton Trans.*; **2013**, 42, 11194–11204.
- [4] Zhang E.; Tian H.; Xu S.; Yu X.; Xu Q.; *Org. Lett.*; **2013**, 15, 2704–2707.
- [5] Giri C.; Topić F.; Mal P.; Rissanen K.; *Dalton Trans.*; **2014**, 43, 17889–17892.
- [6] Jaiswal G.; Landge V. G.; Jagadeesan D.; Balaraman E.; *Nat. Commun.*; **2017**, 8, 2147.
- [7] Clares M. P.; Acosta-Rueda L.; Castillo C. E.; Blasco S.; Jiménez H. R.; García-España E.; Basallote M. G.; *Inorg. Chem.*; **2017**, 56, 4400–4412.
- [8] Zhang G.; Yi H.; Zhang G.; Deng Y.; Bai R.; Zhang H.; Miller J. T.; Kropf A.J.; Bunel E.E. & Lei A.; *J. Am. Chem. Soc.*; **2014**; 136, 924–926.
- [9] Xiao Y.; Gao J.; Chen P.; Chen G.; Li Z. & Huang W.; *J. Chem. Res.*; **2021**; 45, 928–933.

Capítulo 8

Permeabilidad y Citotoxicidad

*“La ciencia no solo pregunta
qué hace una molécula,
sino a dónde puede llegar.”*

— Mercy Arteaga —

8.1 Introducción

El último capítulo de resultados de esta tesis se centra en el estudio preliminar del comportamiento de los compuestos sintetizados mediante dos enfoques complementarios: un modelo de Permeabilidad de Membrana Artificial Paralela (PAMPA) y un ensayo biológico HET-CAM (*Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane*), con el objetivo de valorar su potencial en aplicaciones biomédicas. Hasta este punto, se ha descrito la síntesis de los ligandos y la obtención de los ensamblajes supramoleculares; se ha analizado su comportamiento ácido-base en disolución y se ha determinado su capacidad de coordinación con metales como Cu(II), Mn(II) y/o Fe(II). Estos estudios han permitido caracterizar con detalle las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, estableciendo una base sólida para abordar su evaluación en condiciones más cercanas a entornos biológicos.

Dado el enfoque biomédico de la tesis, centrado en el desarrollo de sistemas con posible aplicación en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como Huntington,¹ en esta etapa se ha puesto el foco en dos aspectos fundamentales: por un lado, la capacidad de los compuestos para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), y por otro, su toxicidad *in vivo*. Estos dos factores resultan esenciales para determinar la viabilidad de cualquier compuesto con posibles efectos terapéuticos sobre el sistema nervioso central.

Para estudiar la permeabilidad a través de la BHE se ha empleado el método PAMPA, un modelo *in vitro* ampliamente utilizado para estimar la difusión pasiva de compuestos a través de membranas lipídicas.^{2,3} Esta metodología permite anticipar si una sustancia puede alcanzar su diana terapéutica en el cerebro, lo cual resulta imprescindible en el contexto de enfermedades neurodegenerativas. Desarrollar un compuesto con propiedades beneficiosas

carece de utilidad si no es capaz de cruzar la BHE y ejercer su acción en el tejido cerebral.

En paralelo, se ha evaluado la toxicidad de los sistemas sintetizados mediante el ensayo HET-CAM. Este método alternativo a la experimentación con animales permite evaluar el potencial irritante (o dañino) de una sustancia sobre una membrana biológica viva.^{4,5} A través de este ensayo se obtuvieron datos preliminares sobre la biocompatibilidad de los compuestos, un aspecto indispensable en el diseño de materiales con aplicaciones biomédicas.

En conjunto, estos estudios no constituyen un análisis biológico exhaustivo, pero sí aportan información preliminar relevante y necesaria para valorar el comportamiento de los compuestos en sistemas biológicos, y así sentar las bases para futuras investigaciones orientadas al desarrollo de aplicaciones terapéuticas en el ámbito de la nanomedicina y la neuroprotección.

8.2 Ensayo de permeabilidad de membranas.

El modelo PAMPA permitió obtener valores estimados de permeabilidad (Pe) para los seis sistemas sintetizados. Estos valores se evaluaron a distintos pH, ya que la carga neta del ligando, determinada por su grado de protonación, incluye significativamente su capacidad de atravesar la membrana. En general, una carga neta neutra o cercana a cero favorece la difusión pasiva, al reducir las interacciones con el entorno acuoso y facilitar la integración del compuesto en la membrana lipofílica del modelo PAMPA-BHE. En la literatura científica se acepta que un compuesto se considera de “alta penetración cerebral” (CNS+) si presenta valores de Pe superiores a $4 \times 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$, lo que indica un alto potencial de permeación a través de la BHE.⁶⁻⁸

Los resultados de permeabilidad se muestran en la Figura 8.1, junto con la distribución de especies. Para los ligandos con cadenas de 8 átomos de carbono (**L8-H** y **L8-Me3**), se observa un incremento progresivo de la permeabilidad con el aumento del pH. Esta tendencia se puede explicar considerando que, a medida que el pH aumenta, disminuye el grado de protonación del ligando, reduciéndose su carga eléctrica positiva. Una carga menor favorece la difusión pasiva a través de una membrana lipofílica como la simulada en el modelo PAMPA-BHE. Además, estos ligandos presentan la mayor hidrosolubilidad del conjunto, lo que podría justificar su comportamiento ascendente y continuo: su solubilidad les permite alcanzar la membrana con facilidad y, al reducir su carga, logran atravesarla más eficientemente.

En el caso del ligando **L16-H**, se observa una permeabilidad máxima en torno a pH neutro, seguida de una disminución en condiciones más básicas. Este comportamiento puede explicarse por el equilibrio necesario entre hidrosolubilidad y lipofilia: para que un compuesto atravesase eficazmente una membrana, debe presentar una solubilidad intermedia. Si es demasiado hidrosoluble, tiende a permanecer en el medio acuoso y no interactúa con la membrana; si es muy poco soluble, puede precipitar en el medio antes de alcanzarla. En este contexto, el ligando **L16-H** parece alcanzar un equilibrio óptimo a pH fisiológico, lo que justificaría los valores máximos de permeabilidad observados. La disminución a pH más básico podría deberse a una pérdida de solubilidad, que limita su disponibilidad para interactuar con la membrana y, por tanto, reduce su permeabilidad.

En contraste, el ligando **L16-Me3** apenas muestra variaciones en su permeabilidad con el aumento de pH, este comportamiento podría explicarse por la escasa variación de su carga con el pH o por la formación de

precipitados, los cuales no contribuyen al proceso de permeabilidad al impedir que el compuesto interactúe eficazmente con la membrana.

Por otro lado, el ligando **L22-Me3** presenta un ligero aumento de permeabilidad al pasar de pH ácido a neutro, alcanzando valores más elevados en medio básico. En cambio, el ligando **L22-H** muestra solo una variación mínima a lo largo del intervalo de pH estudiado, lo que puede atribuirse tanto a su baja solubilidad global como a su escasa variación de carga con el pH. Este comportamiento resulta similar al observado para **L16-Me3**.

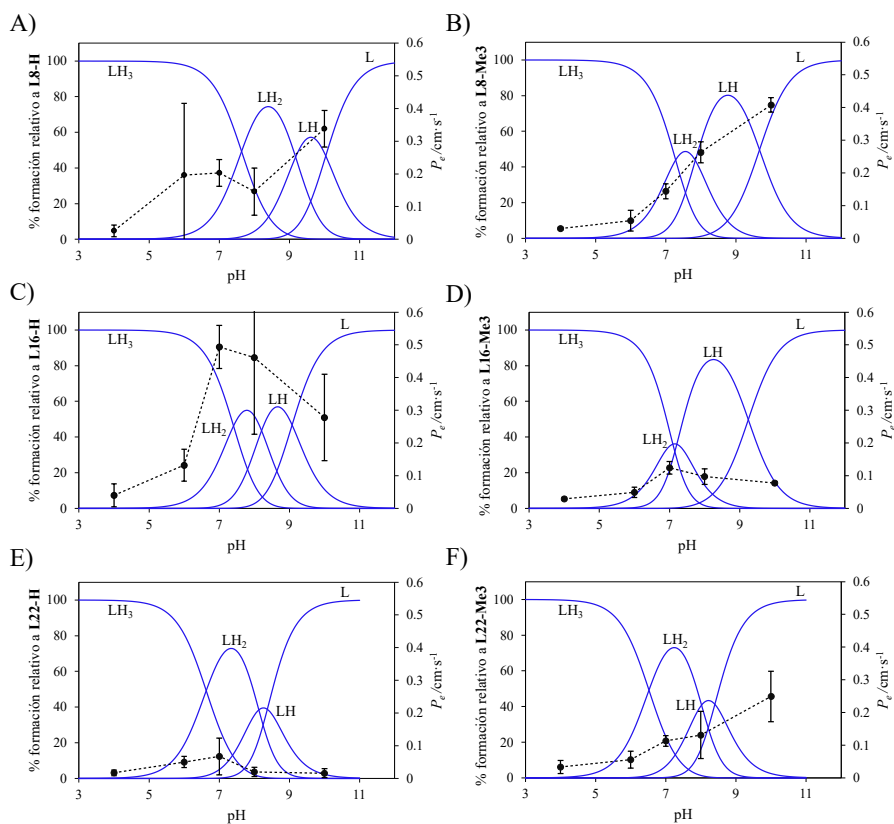


Figura 8.1: Diagramas de distribución de especies para la protonación de **L8-H** (A), **L8-Me3** (B), **L16-H** (C), **L16-Me3** (D), **L22-H** (E) y **L22-Me3** (F) simulados para $[L] = 1 \text{ mM}$ (líneas azules continuas) y resultados de permeabilidad PAMPA (diagrama de dispersión negra con barras de error).

Finalmente, estos resultados refuerzan la idea de que existe un rango óptimo de equilibrio entre hidrosolubilidad y lipofilia que favorece la permeabilidad a través de membranas biológicas. Este equilibrio se alcanza de forma más efectiva en compuestos con cadenas hidrocarbonadas intermedias, como el ligando **L16-H**, que muestran una permeabilidad máxima en condiciones cercanas al pH fisiológico. Así, los datos obtenidos apoyan la sugerencia de que no es únicamente la longitud de la cadena hidrocarbonada la que determina la capacidad de los compuestos para atravesar la BHE, sino más bien una combinación de factores, entre los que destacan la solubilidad, la carga neta y el estado de protonación. Cabe señalar, no obstante, que estas mediciones consideran únicamente el transporte pasivo a través de membranas, por lo que no deben interpretarse como una evaluación completa del comportamiento *in vivo*. Aun así, este tipo de análisis resulta fundamental para comprender el comportamiento de los sistemas sintetizados en entornos biológicos y, en consecuencia, valorar su potencial como agentes terapéuticos con actividad en el sistema nervioso central.

8.3 Estudio de toxicidad

La toxicidad de los ligandos sintetizados se evaluó mediante el método HET-CAM, realizado en colaboración con el profesor Juan Frías de la Universidad CEU Cardenal Herrera. Esta técnica *in vitro* es ampliamente reconocida para estimar el potencial irritante y tóxico de diversas sustancias, como compuestos químicos, farmacéuticos y cosméticos.^{9,10} El ensayo consiste en aplicar directamente la sustancia en estudio sobre la membrana corioalantoidea de huevos de gallina fecundados, la cual constituye un modelo altamente vascularizado y sensible. En este trabajo, se empleó el método HET-CAM para evaluar la seguridad y el posible efecto irritante de los ligandos sintetizados,

mediante la observación directa de alteraciones en la membrana tras la exposición.

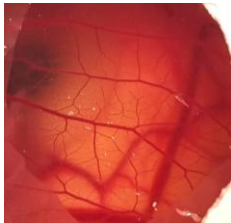
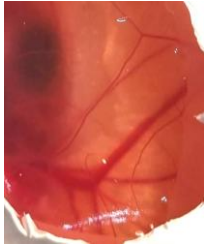
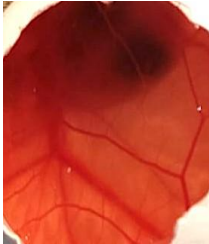
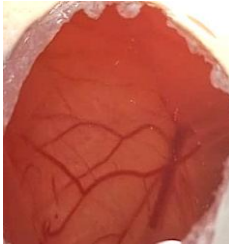
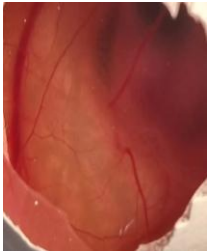
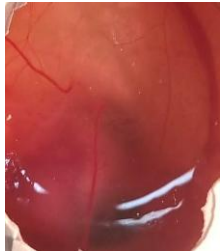
CONTROL + (NaOH 0.1 N)		CONTROL – (NaCl 0.9%)	
			
IS*=18.76 Irritante fuerte		IS*= 0 No irritante	
L8-H	CuL8-H	L8-Me3	CuL8-Me3
			
IS*= 0 No irritante	IS*= 0 No irritante	IS*= 0 No irritante	IS*= 7.23 Irritante moderado
L16-H	CuL16-H	L16-Me3	CuL16-Me3
			
IS*= 0 No irritante	IS*= 7.77 Irritante moderado	IS*= 1.25 Irritante leve	IS*= 0 No irritante

Figura 8.2: Esquema del estudio de toxicidad de los sistemas sintetizados mediante el ensayo HET-CAM (*Hen's Egg Test on Chorioallantoic Membrane*). Se utilizó una concentración de ligando (L) de 1 mM, con un volumen de adición de 300 µL por experimento. Tiempo de observación: 5 min. *Clasificación del efecto tóxico según el índice de irritación (IS): No irritante ($IS < 1$), irritante débil o leve ($1 \leq IS < 5$), irritante moderado ($5 \leq IS < 10$) o irritante fuerte o severo ($IS > 10$).

La Figura 8.2 muestra imágenes representativas de los efectos inducidos por los diferentes ligandos sobre la membrana corioalantoidea. Tras la aplicación de cada compuesto, se monitorizó la membrana durante un periodo de cinco minutos, registrando signos de toxicidad como hemorragias, lisis vascular o coagulación. A partir de estas observaciones, se calculó el índice de irritación (IS, por sus siglas en inglés).

Los resultados indicaron una respuesta no tóxica o de baja toxicidad para los compuestos **L8-H**, **CuL8-H**, **L8-Me3**, **L16-H** y **CuL16-Me3**. En cambio, el ligando **L16-Me3** mostró un efecto de toxicidad leve, mientras que los compuestos **CuL8-Me3** y **CuL16-H** presentaron una toxicidad moderada. La mayor citotoxicidad observada en los complejos metálicos **CuL8-Me3** y **CuL16-H** parece deberse a la coordinación del catión Cu(II), ya que los ligandos libres no mostraron efectos similares en ausencia del metal. Por el contrario, en el caso de **CuL16-Me3**, la formación del complejo con Cu(II) parece reducir su toxicidad respecto al ligando libre.

8.4 Bibliografía

- [1] Clares M. P.; Blasco S.; Inclán M.; Agudo L. del C.; Verdejo B.; Soriano C.; Doménech A.; Latorre J.; García-España E.; *Chem. Commun.*; **2011**, 47, 5988–5990.
- [2] Kansy M.; Avdeef A. & Fischer H.; *Drug Discov. Today Technol.*; **2004**; 1, 349–355.
- [3] Kansy M.; Senner F. & Gubernator K.; *J. Med. Chem.*; 1998; 41, 1007–1010.
- [4] Kishore A. S.; Surekha P. A.; Sekhar P. V. R.; Srinivas A.; Murthy P. B.; *Int. J. Toxicol.*; **2008**, 27, 449–453.
- [5] Lokman N. A.; Elder A. S. F.; Ricciardelli C.; Oehler M. K.; *Int. J. Mol. Sci.*; **2012**, 13, 9959–9970.
- [6] Bicker J.; Alves G.; Fortuna A.; Falcão A.; *Eur. J. Pharm. Biopharm.*; **2014**, 87, 409–432.
- [7] Nielsen P. E.; Avdeef A.; *Eur. J. Pharm. Sci.*; 2004, 22, 33–41.
- [8] Di L.; Kerns E. H.; Fan K.; McConnell O. J.; Carter G. T.; *Eur. J. Med. Chem.*; 2003, 38, 223–232.
- [9] Kalweit S.; Besoke R.; Gerner I.; Spielmann H.; *Toxicol. In Vitro*; 1990, 4, 702–706.
- [10] Luepke N.P.; *Food Chem. Toxicol.*; 1985, 23, 287-91.

Capítulo 9

Conclusiones

*"Cada hallazgo científico
no marca un final,
sino un punto de partida más alto
hacia horizontes aún por explorar".*

— Mercy Arteaga —

Conclusión 1. *Diseño, síntesis y caracterización de los ligandos*

El principal logro alcanzado en la síntesis y caracterización de los ligandos fue el diseño y obtención de una nueva familia de seis compuestos escorpiandos (**L8-H**, **L8-Me3**, **L16-H**, **L16-Me3**, **L22-H**, **L22-Me3**) con propiedades anfifílicas, una característica que no había sido estudiada previamente en el grupo de Química Supramolecular de la Universidad de Valencia (QSM-UV). Este avance ha permitido abrir una nueva línea de investigación dentro del grupo, ampliando significativamente las posibilidades de estudio y aplicación de estos ligandos.

Finalmente, todos los compuestos fueron caracterizados exhaustivamente mediante técnicas como resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas y análisis elemental, lo que garantiza la calidad de los resultados y establece una base sólida para futuras investigaciones.

Conclusión 2. *Caracterización del comportamiento ácido-base en disolución acuosa de los ligandos sintetizados.*

Este estudio ha proporcionado una caracterización detallada del comportamiento ácido-base de los ligandos derivados del pytren (**L**), destacando el impacto de modificaciones estructurales, como la introducción de cadenas hidrocarbonadas y la metilación de grupos amino, sobre sus constantes de protonación. La introducción de cadenas hidrocarbonadas más largas reduce progresivamente la basicidad global de los ligandos, una tendencia atribuida a la disminución de la energía de hidratación causada por el carácter hidrofóbico de estas cadenas.

Por otro lado, la metilación de los grupos amino genera un efecto inductivo que modifica las constantes de protonación, disminuyendo la basicidad global.

En conjunto, este análisis muestra cómo la combinación de efectos electrónicos e hidrofóbicos se refleja directamente en las propiedades ácido-base de estos sistemas. Cabe señalar que, si bien se determinaron las constantes de protonación de **L22-H** y **L22-Me3**, su baja solubilidad y la tendencia a formar precipitados limitaron su inclusión en la comparación con el resto de los ligandos y restringen tanto su análisis como sus posibles aplicaciones.

Conclusión 3. *Estudio de la capacidad de coordinación de los ligandos sintetizados con iones metálicos de transición de interés biológico.*

Los complejos con Cu(II) presentan la mayor estabilidad entre los ligandos estudiados, debido a la elevada compatibilidad electrónica y geométrica entre este catión y los grupos amino. Les siguen en estabilidad los complejos con Fe(II) y Mn(II), lo que refleja las diferencias en la afinidad de estos metales por los grupos amino de los ligandos. La incorporación de cadenas hidrocarbonadas más largas, como en **L16-H**, reduce el valor de la constante de formación de los complejos con los tres metales. Por su parte, la metilación de los grupos amino disminuye aún más la estabilidad de los complejos, ya que transformar aminas secundarias en terciarias.

Así mismo, se observa que los complejos con Cu(II) y Mn(II) se forman desde pH ácido, mientras que los de Fe(II) requieren un pH superior a 10 para lograr una coordinación cuantitativa. Sin embargo, la formación de óxidos de hierro a pH >8 afecta la estabilidad de los complejos, lo que limita su potencial para aplicaciones relacionadas con la actividad SOD. En conjunto, estos resultados subrayan la importancia de las modificaciones estructurales en los ligandos para optimizar su estabilidad, solubilidad y afinidad por metales específicos,

abriendo oportunidades para un diseño más racional en función de las necesidades de aplicaciones químicas y biológicas.

Conclusión 4. *Estudio de propiedades fisicoquímicas de los compuestos anfifílicos.*

Este estudio permitió caracterizar sistemas vesiculares formados por compuestos anfifílicos mediante una combinación de técnicas experimentales (pireno para la determinación de la CMC, TEM, DLS y AFM) complementadas con cálculos teóricos, lo que proporcionó una visión integral de sus propiedades fisicoquímicas y estructurales. Los resultados mostraron que la CMC presenta variaciones leves bajo diferentes condiciones de pH: en medio muy ácido, el exceso de protones genera repulsión entre las moléculas, mientras que en medio básico la ausencia de protones no favorece el equilibrio de los ensamblajes, lo que podría conducir a la formación de agregados.

Asimismo, se observó que la longitud de la cadena hidrocarbonada influye significativamente en el tamaño de las vesículas, siendo los ligandos con cadenas más largas los que originan estructuras de mayor tamaño (como en el caso de **L22-H** y **L22-Me3**). Los índices de polidispersión reflejaron una relativa uniformidad, aunque sin alcanzar una distribución completamente monodispersa, y el análisis del potencial ζ confirmó que, bajo condiciones ácidas, el exceso de protones en el entorno induce mayor polidispersidad, mientras que a pH básico un potencial ζ cercano a cero o negativo puede favorecer la agregación y reducir la estabilidad del sistema.

Las imágenes de microscopía revelaron que las vesículas presentan una forma casi esférica, siendo de mayor tamaño aquellas asociadas a ligandos de cadena larga (**L22-H** y **L22-Me3**). La estabilidad a largo plazo se evaluó

manteniendo las vesículas a pH 7.4 durante 30 días, observándose únicamente un leve aumento en su tamaño y sin indicios de agregación significativa, lo que indica estabilidad estructural bajo las condiciones experimentales.

Por otra parte, las simulaciones de dinámica molecular realizadas a los ligandos **L8-H** y **L8-Me3** respaldaron los resultados experimentales, mostrando la formación de vesículas estables, altamente esféricas y con exclusión eficiente del agua en su núcleo hidrofóbico. Estos resultados corroboran la utilidad de las simulaciones para comprender y predecir el comportamiento de los sistemas vesiculares, proporcionando una visión complementaria y precisa de sus propiedades estructurales y dinámicas.

Conclusión 5. *Determinación y estudio de la actividad superóxido dismutasa de los complejos miméticos estudiados.*

Los complejos de cobre con grupos amino metilados, como **CuL8-Me3** y **CuL16-Me3**, presentaron una actividad SOD significativa, destacándose el efecto positivo de la metilación sobre la actividad catalítica. Esto puede atribuirse a que los grupos amino terciario tienen una menor capacidad dadora, lo que reduce la estabilidad de complejación y favorece la actividad SOD. En contraste, los complejos con ligandos no metilados, como **CuL16-H**, mostraron una actividad insignificante. Además, se observó que el aumento en la longitud de las cadenas alifáticas afecta negativamente la actividad, como lo evidencia la serie $\text{CuL} > \text{CuL8-H} > \text{CuL16-H}$.

En el caso de los complejos de manganeso, su actividad fue similar o incluso inferior a la del manganeso libre, y en particular, **MnL16-H** presentó una actividad insignificante. Al igual que en los complejos de cobre, la longitud de las cadenas alifáticas influye negativamente en la actividad SOD,

disminuyendo la eficiencia catalítica a medida que aumenta la lipofilia o hidrofobicidad. Por su parte, los complejos de hierro mostraron en general una actividad SOD insignificante, con la excepción de FeL8-H, que presentó valores moderados pero inferiores a los de los complejos cúpricos. Este comportamiento podría deberse a que el Fe(II) cataliza la conversión de aminas en iminas bajo condiciones oxidantes, alterando la naturaleza del ligando y afectando negativamente su capacidad para participar en el ciclo redox.

En conclusión, la metilación de los ligandos, como regla general, mejora consistentemente la actividad SOD, mientras que el aumento en la longitud de las cadenas alifáticas tiene un impacto negativo sobre esta. Los complejos de cobre se destacan como los más prometedores entre los sistemas estudiados debido a su mayor actividad, y estabilidad, mostrando una actividad SOD superior en comparación con los complejos de manganeso y hierro. En particular, los complejos CuL8-Me3 y CuL16-Me3 se presentan como los mejores candidatos miméticos de SOD.

Conclusión 6. *Análisis del transporte pasivo mediante el ensayo PAMPA.*

El estudio del transporte pasivo transmembrana de los compuestos sintetizados a través del modelo PAMPA-BHE permitió evaluar su capacidad para atravesar una barrera simulada hematoencefálica. Los resultados indicaron que los valores de permeabilidad de los compuestos fueron inferiores a los umbrales establecidos para ser considerados de "alta penetración cerebral" (CNS+). Sin embargo, la permeabilidad es cuantificable y permite observar tendencias específicas relacionadas con las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, como el peso molecular, la lipofilia y la

solubilidad, que condicionaron su capacidad de penetración en diferentes condiciones de pH.

En general, los compuestos con menor peso molecular, como **L8-H** y **L8-Me3**, presentaron mayor hidrosolubilidad, lo que dificultó su paso a través de la membrana lipofílica del modelo, incluso a pH fisiológico. En contraste, **L16-H**, con un peso molecular intermedio y una cadena hidrocarbonada más lipofílica, presentó la mejor permeabilidad en estas condiciones, posiblemente debido a un equilibrio favorable entre lipofilia y polaridad. Por su parte, los ligandos con cadenas más largas, como **L22-H** y **L22-Me3**, mostraron una menor permeabilidad, atribuida a su mayor peso molecular e insolubilidad, factores que dificultan su tránsito por la membrana. Además, la influencia del pH sobre la permeabilidad fue notable en algunos compuestos, donde un menor grado de protonación favoreció su paso a través de la membrana lipofílica, mientras que en otros, problemas de solubilidad bajo condiciones básicas limitaron su permeabilidad.

El análisis de parámetros moleculares, como comportamiento ácido-base, el peso molecular y la estructura, permitió explicar estas tendencias, destacando la importancia de un equilibrio adecuado entre solubilidad e interacción lipofílica para maximizar la permeabilidad. Estos resultados proporcionan información clave para el diseño de nuevos ligandos con propiedades optimizadas para atravesar la BHE y contribuyen una base sólida para explorar aplicaciones futuras en el desarrollo de moléculas neuroterapéuticas.

Conclusión 7. *Ensayos de toxicidad.*

El estudio de toxicidad mediante el método HET-CAM permitió evaluar los efectos de los compuestos sintetizados sobre la membrana corioalantoidea,

mostrando resultados variados en función de la estructura y la complejación de los ligandos con Cu(II). Los compuestos, como **L8-H**, **CuL8-H**, **L8-Me3**, **L16-H** y **CuL16-Me3**, demostraron ser inocuos o presentar baja toxicidad. Sin embargo, se identificó un efecto de toxicidad leve para el compuesto **L16-Me3** y toxicidad moderada en **CuL8-Me3** y **CuL16-H**.

La toxicidad moderada observada en estos compuestos parece estar asociada con la complejación con Cu(II), lo que indica que la interacción ligando-metal influye en su comportamiento biológico. Por otro lado, el compuesto **CuL16-Me3** mostró una reducción de la toxicidad tras la complejación, evidenciando que las propiedades tóxicas de estos sistemas son sensibles tanto a la estructura del ligando como a su interacción con el metal.

Anexo A

Espectros RMN

Caracterización por RMN de los ligandos sintetizados y funcionalizados

*“Aquí descansan los datos
que no entraron en la historia principal,
pero sin los cuales
no habría historia que contar.”*

— Mercy Arteaga —

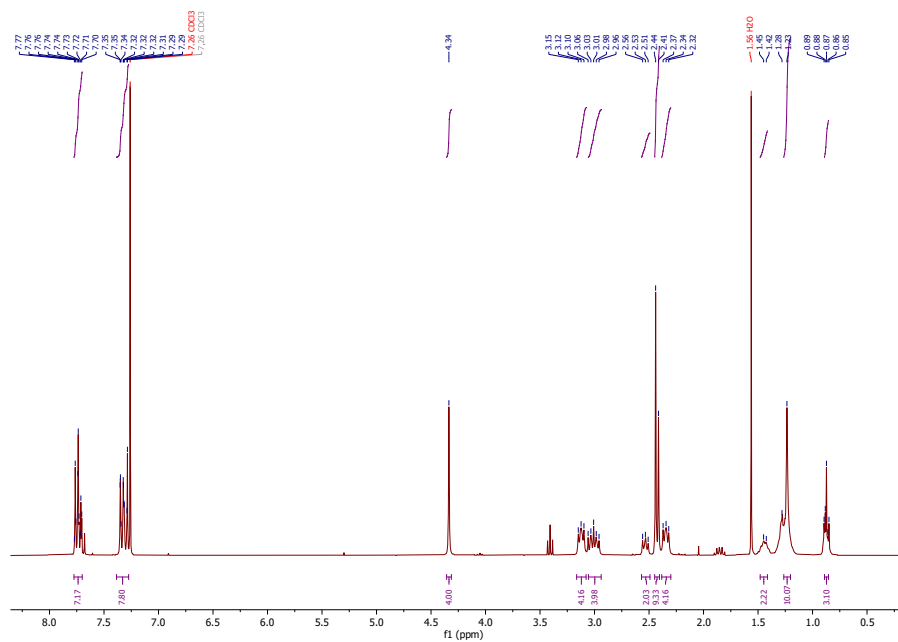


Figura A.1: Espectro de ^1H -NMR de **L8Ts** en CDCl_3 a 298 K.

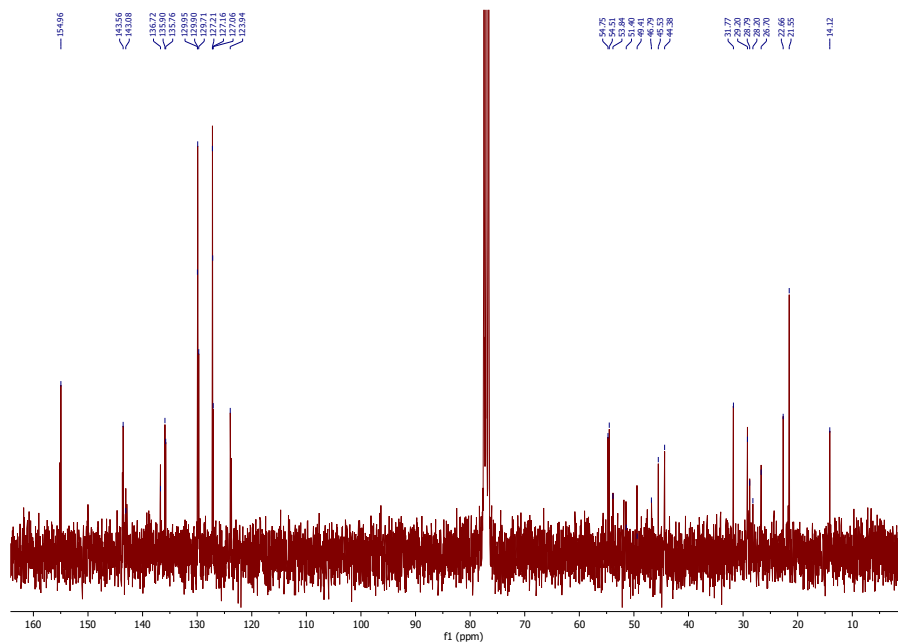


Figura A.2: Espectro de ^{13}C -NMR de **L8Ts** en CDCl_3 a 298 K.

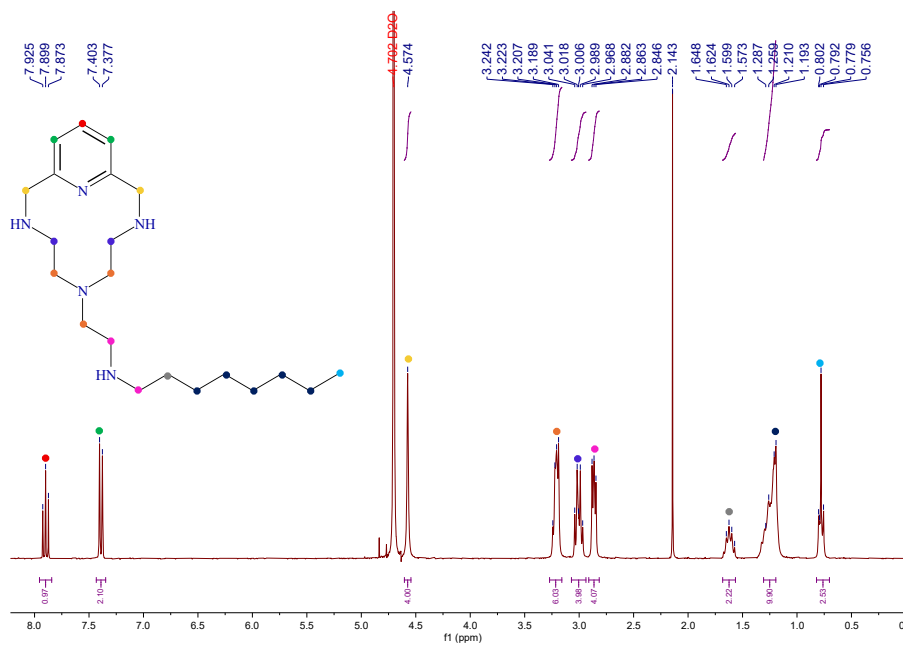


Figura A.3: Espectro de ^1H -NMR de L8-H en D_2O a 298 K.

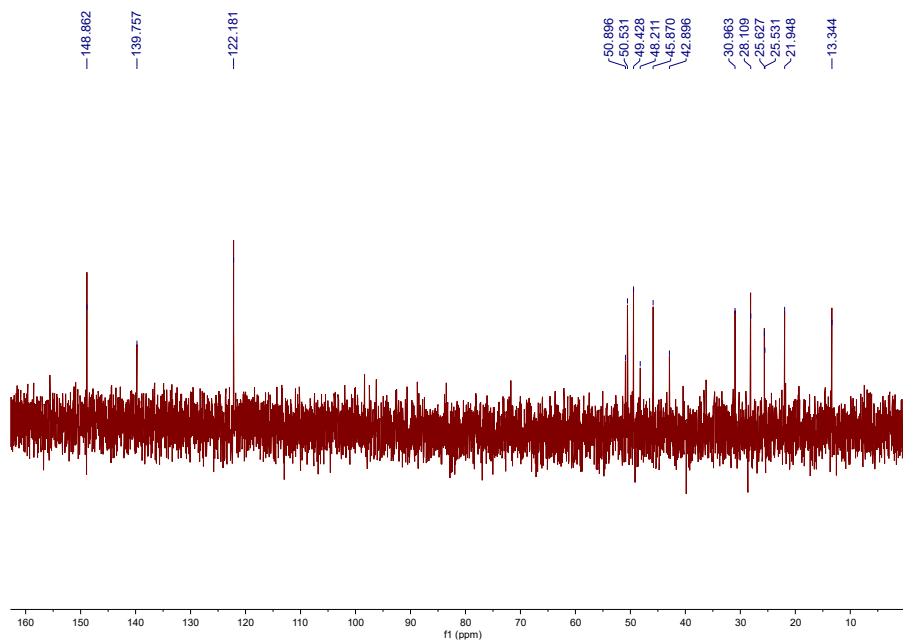


Figura A.4: Espectro de ^{13}C -NMR de L8-H en D_2O a 298 K.

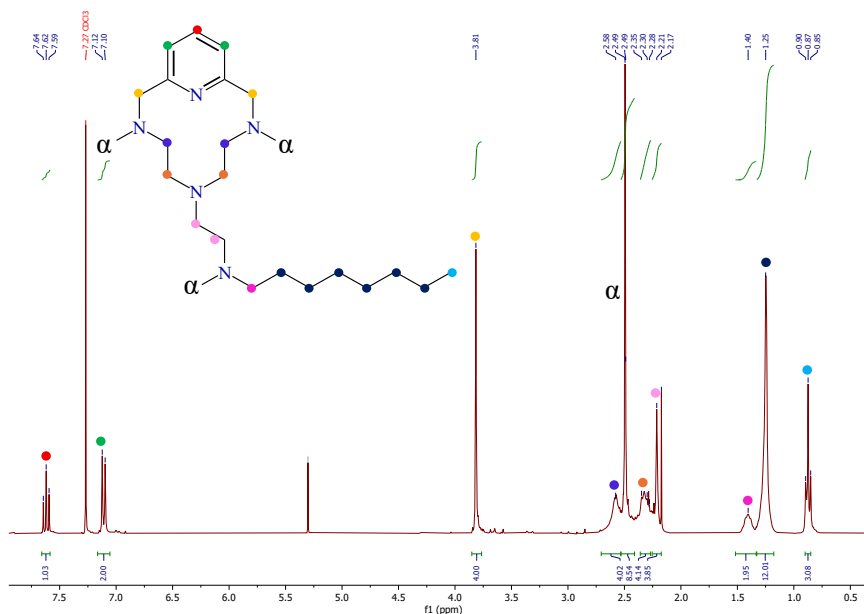


Figura A.5: Espectro de ^1H -NMR de L8-Me3 en CDCl_3 a 298 K.

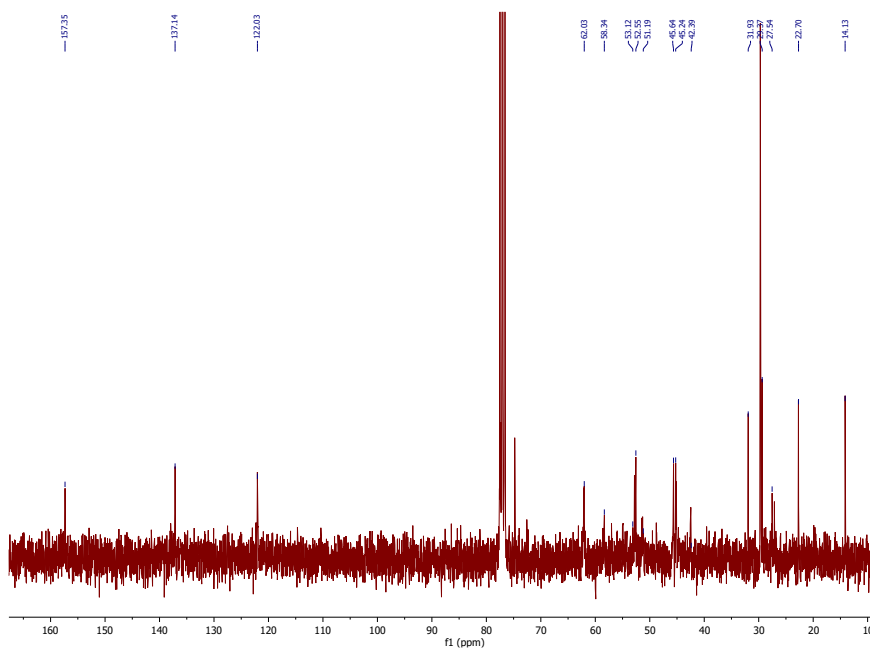


Figura A.6: Espectro de ^{13}C -NMR de L8-Me3 en CDCl_3 a 298 K.

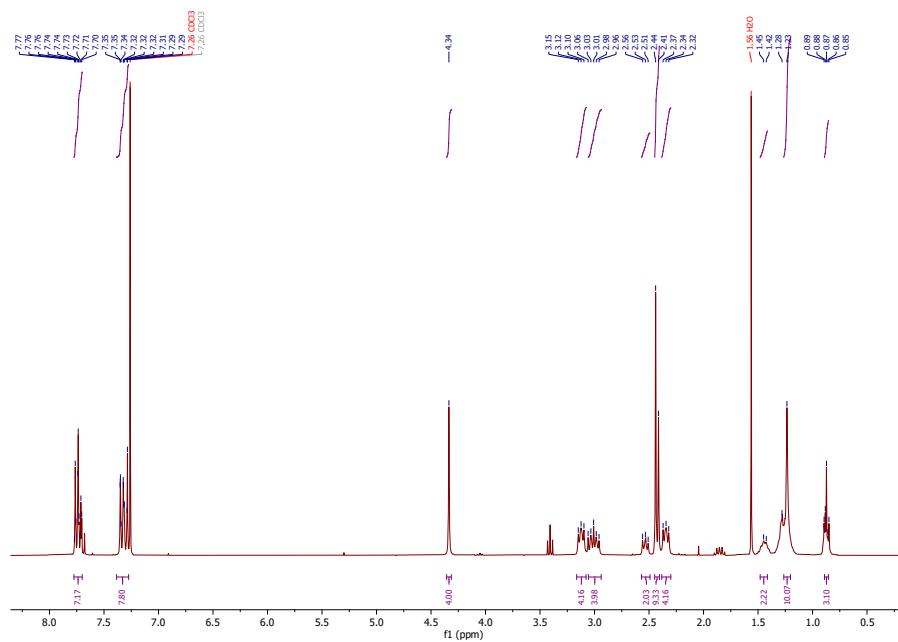


Figura A.7: Espectro de ¹H-NMR de L16Ts en CDCl₃ a 298 K.

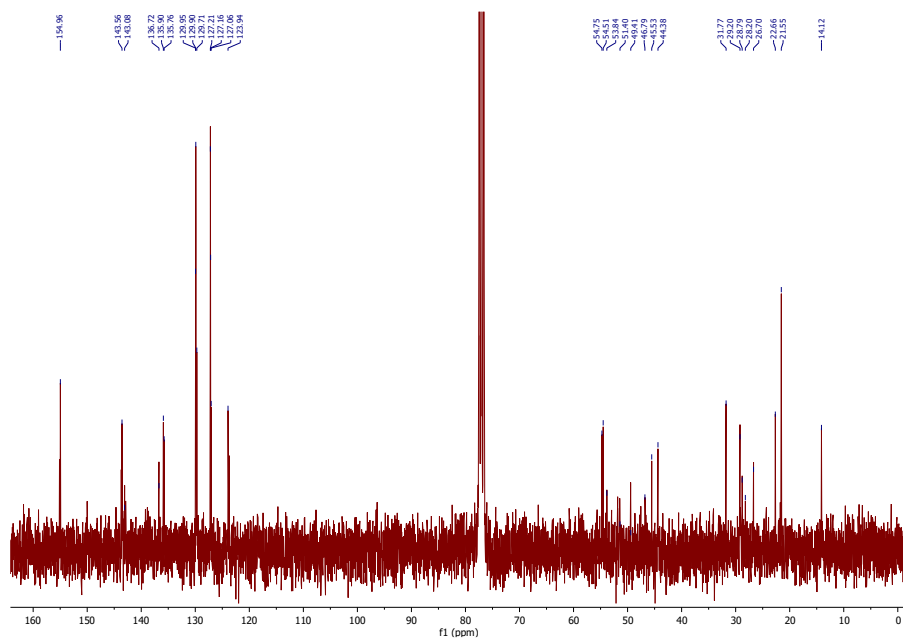


Figura A.8: Espectro de ¹³C-NMR de L16Ts en CDCl₃ a 298 K.

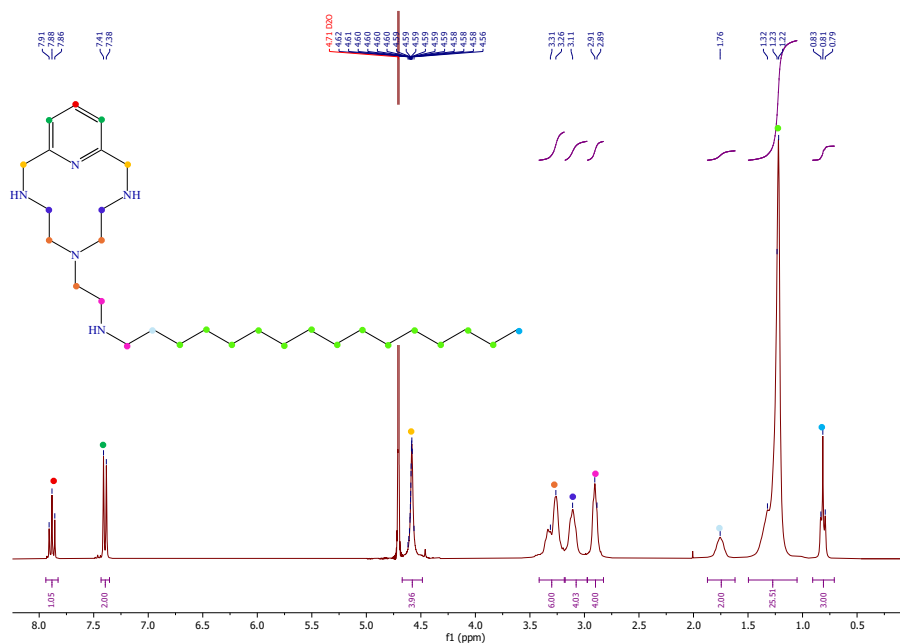


Figura A.9: Espectro de ¹H-NMR de L16-H en D₂O a 298 K.

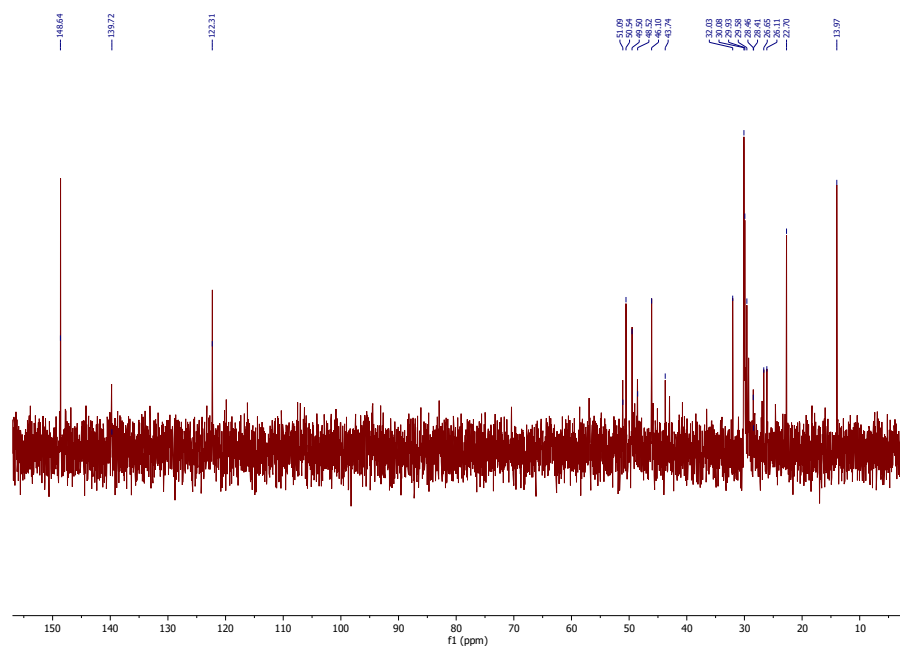


Figura A.10: Espectro de ¹³C-NMR de L16-H en D₂O a 298 K.

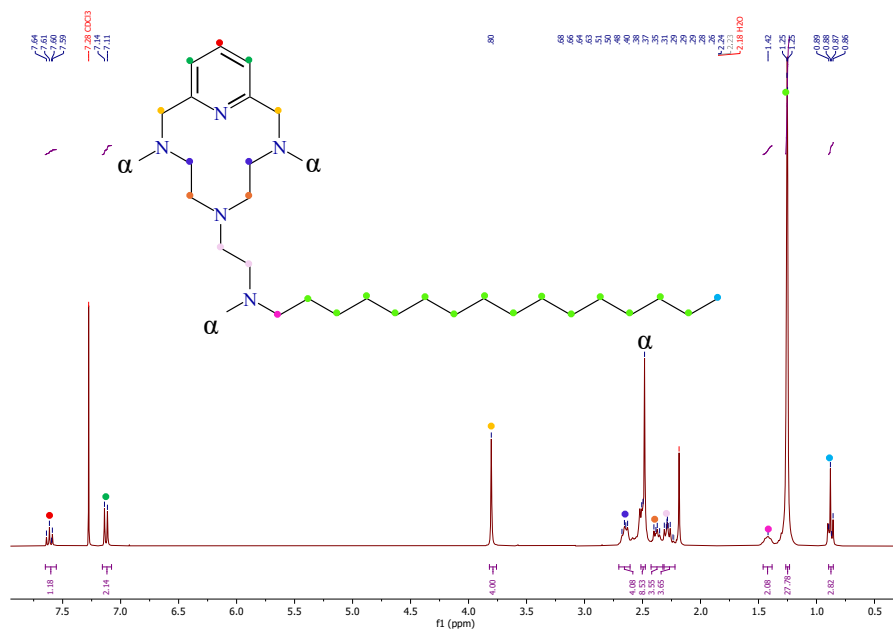


Figura A.11: Espectro de $^1\text{H-NMR}$ de L16-Me3 en CDCl_3 a 298 K.

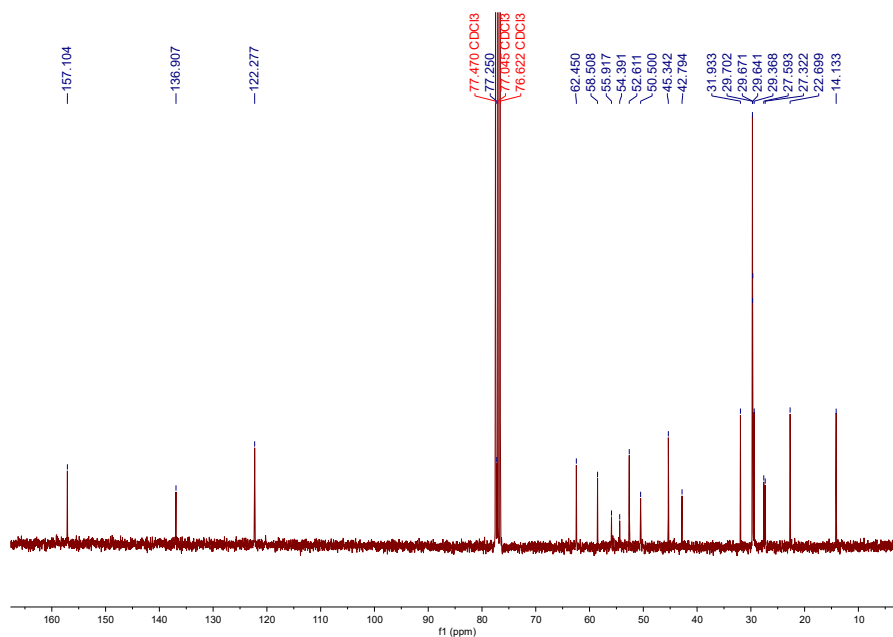
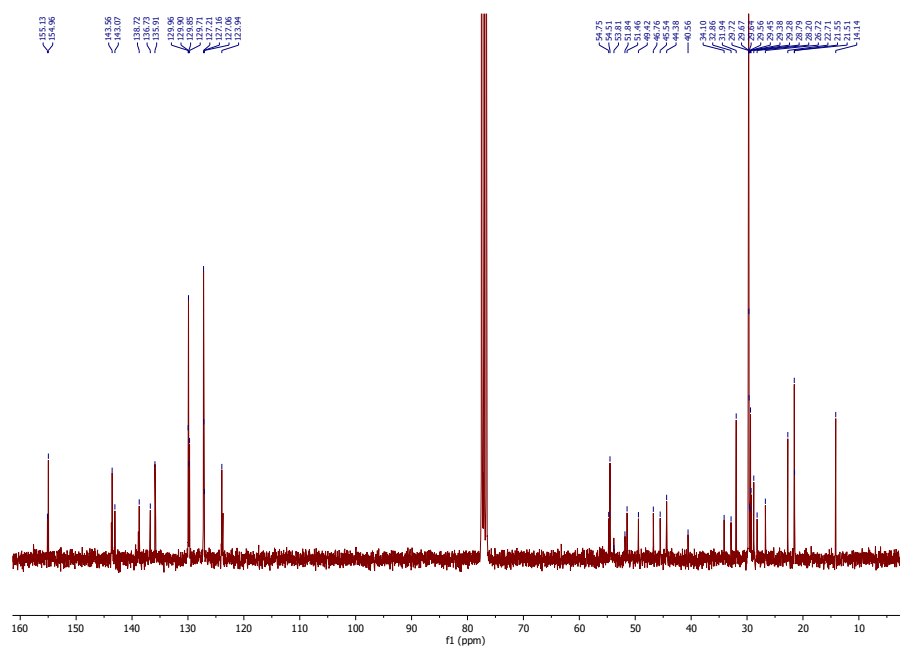
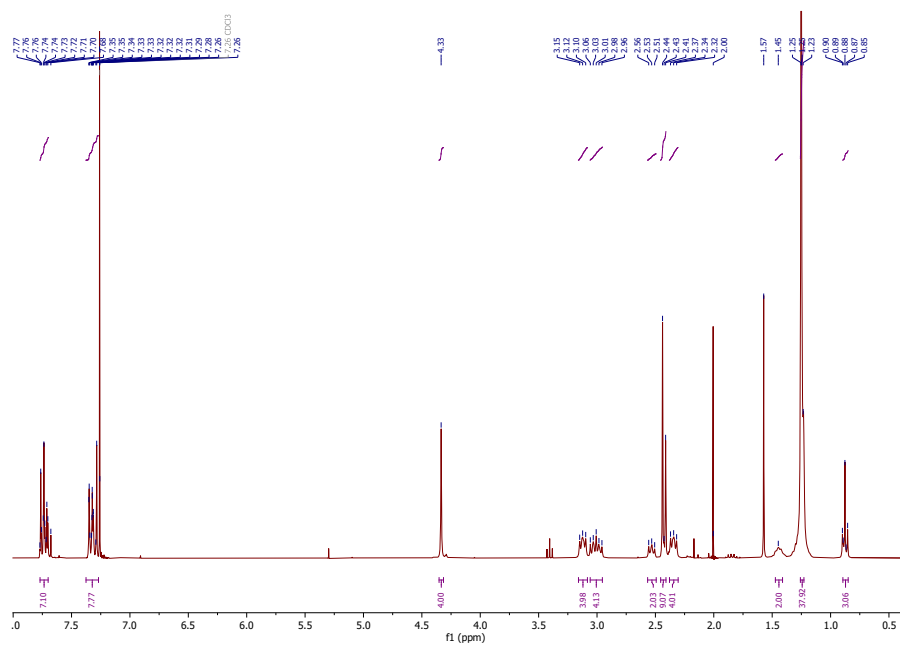


Figura A.12: Espectro de $^{13}\text{C-NMR}$ de L16-Me3 en CDCl_3 a 298 K.



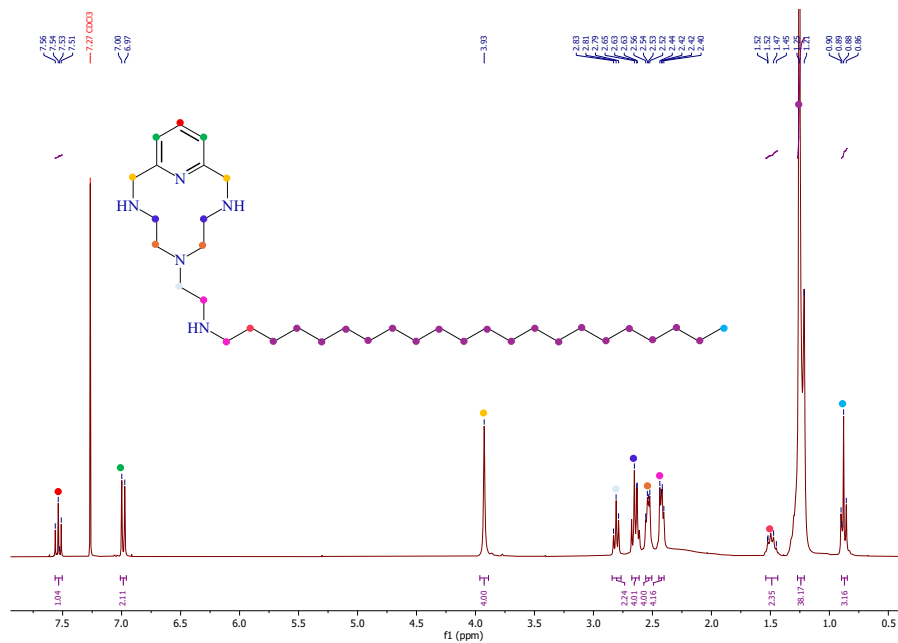


Figura A. 15: Espectro de ^1H -NMR de L22-H en CDCl_3 a 298 K.

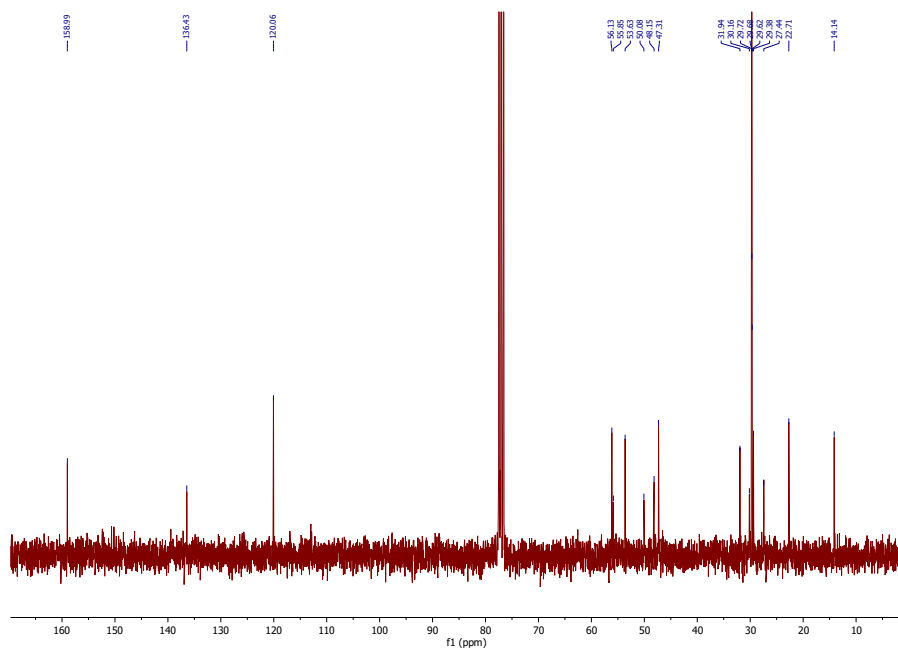


Figura A.16: Espectro de ^{13}C -NMR de L22-H en CDCl_3 a 298 K.

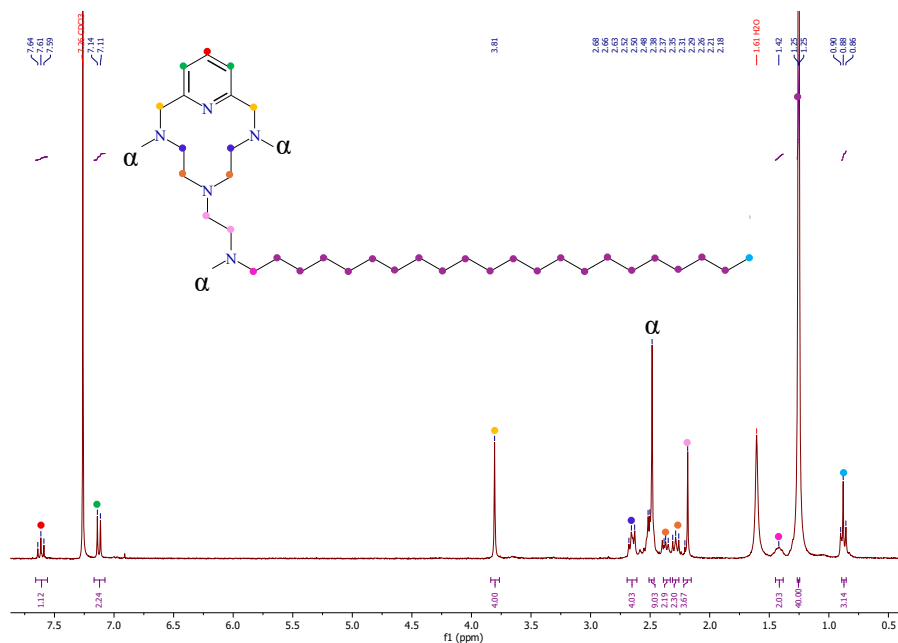


Figura A. 17: Espectro de ^1H -NMR de L22-Me3 en CDCl_3 a 298 K.

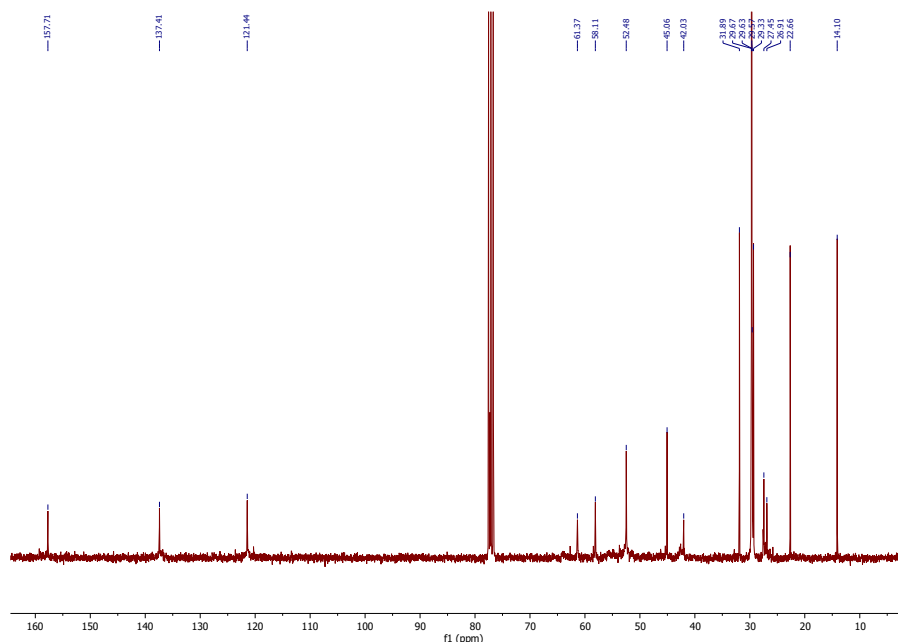


Figura A.18: Espectro de ^{13}C -NMR de L22-Me3 en CDCl_3 a 298 K.

Anexo B

Ensamblajes Supramoleculares

Concentración micelar crítica (CMC) de los ligandos funcionalizados.

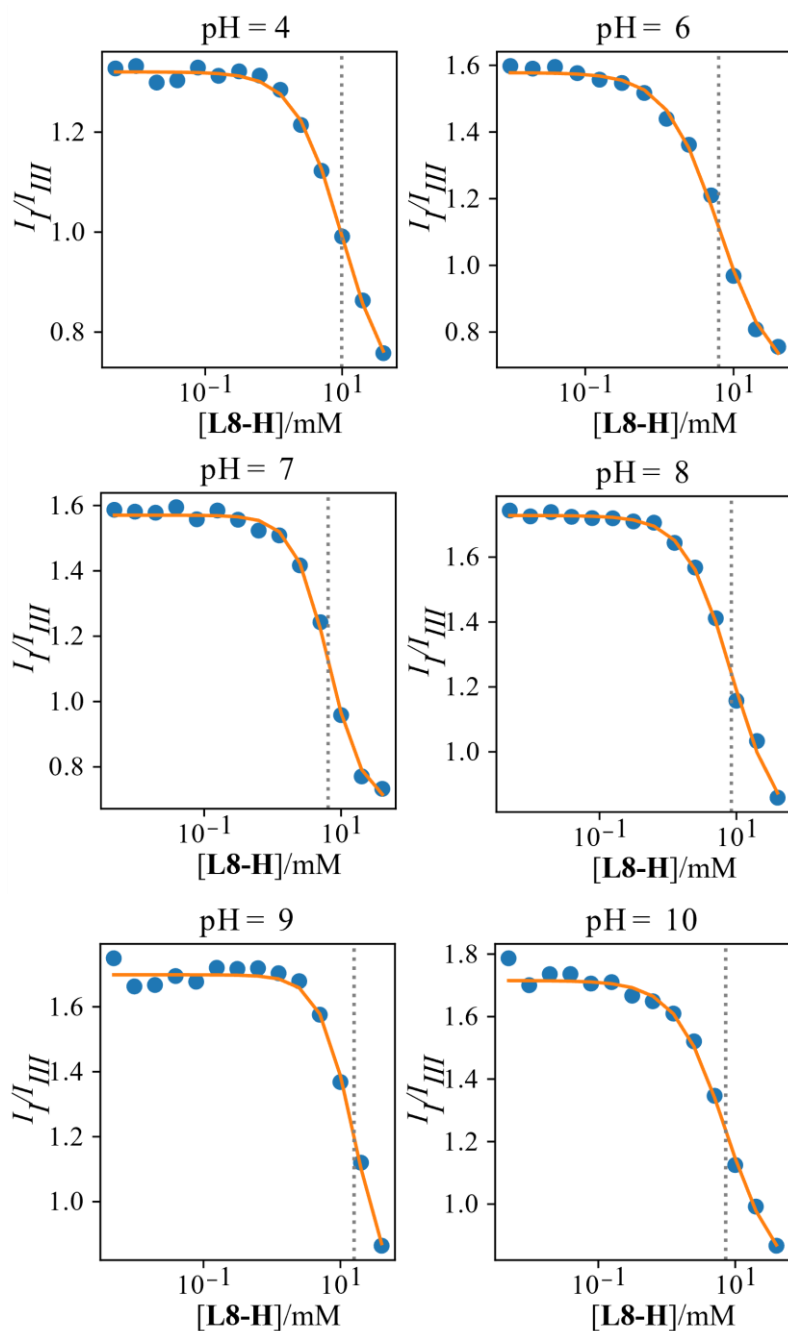


Figura B.1: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L8-H]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

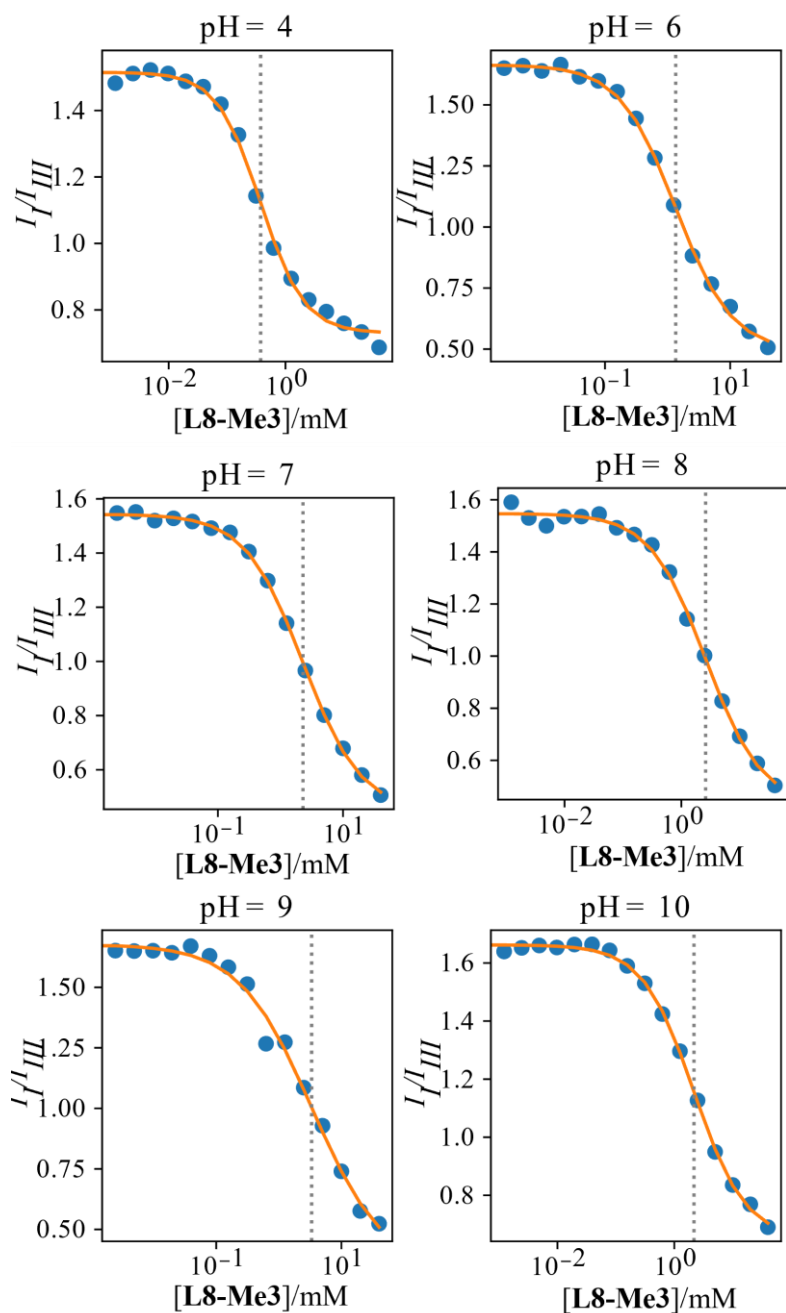


Figura B.2: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L8-Me3]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

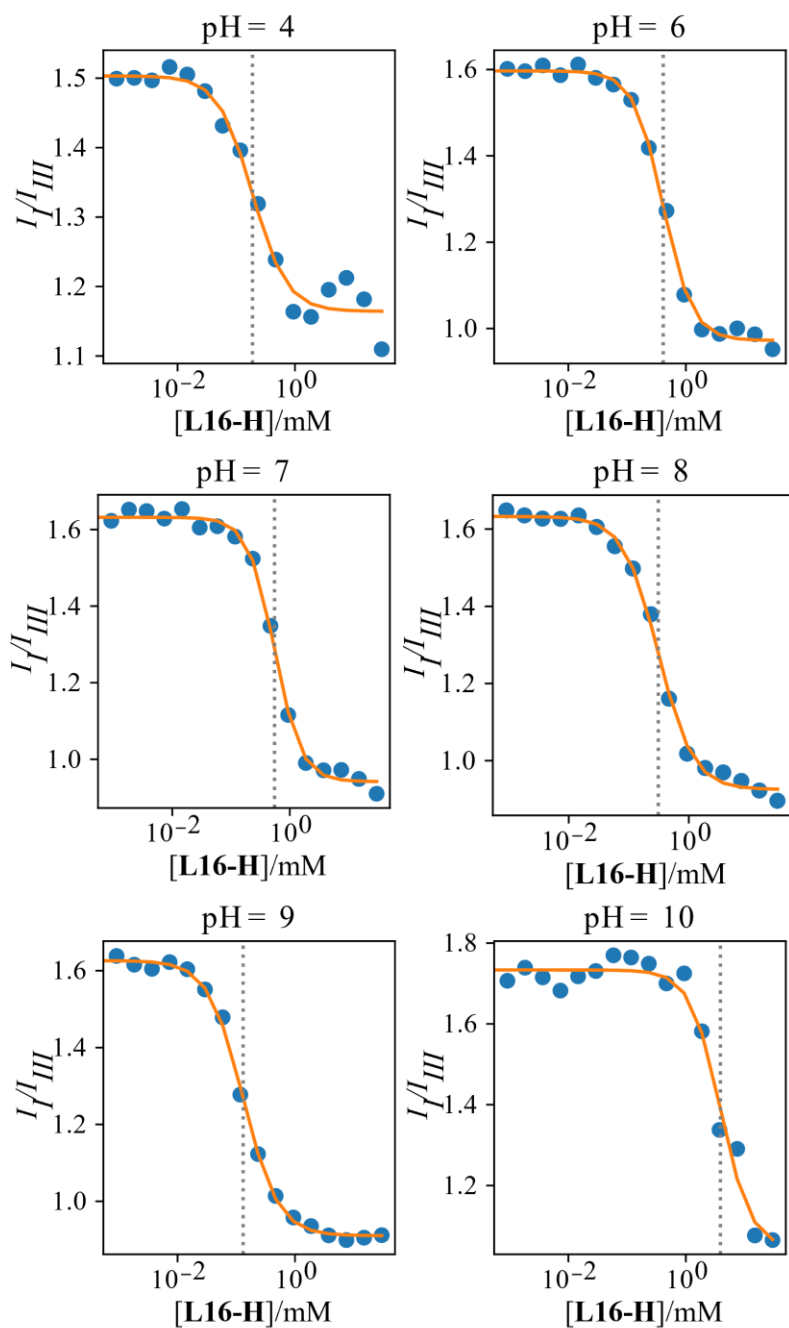


Figura B.3: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L16-H]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

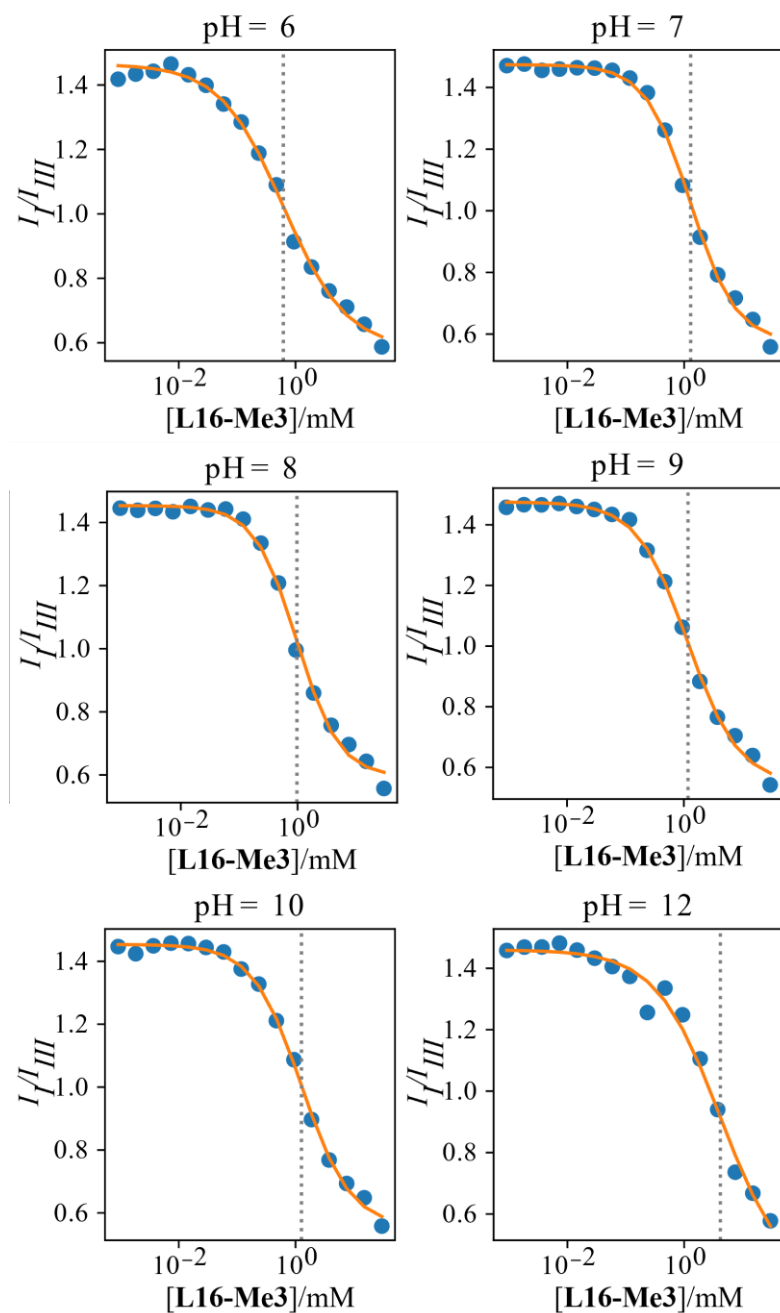


Figura B.4: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_v/I_m) en función de [L16-Me3]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

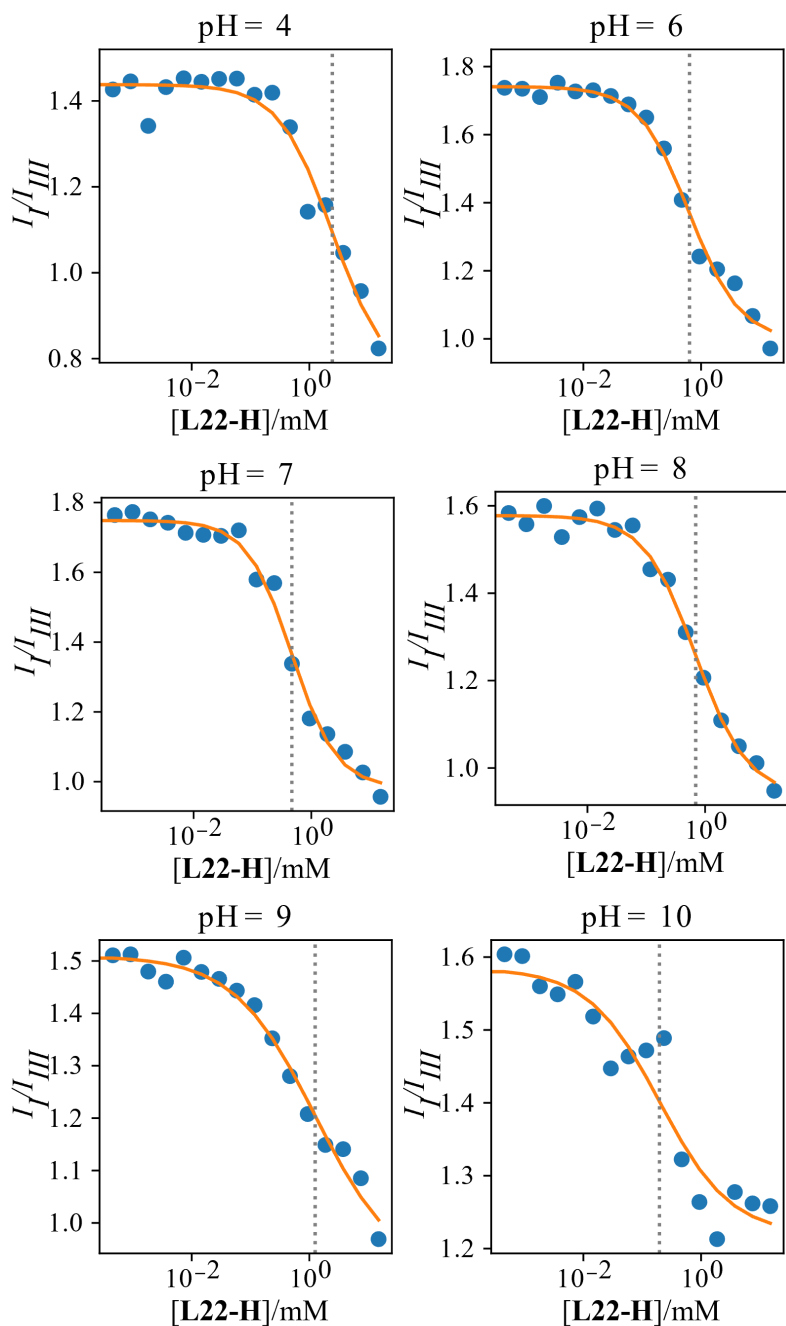


Figura B.5: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L22-H]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

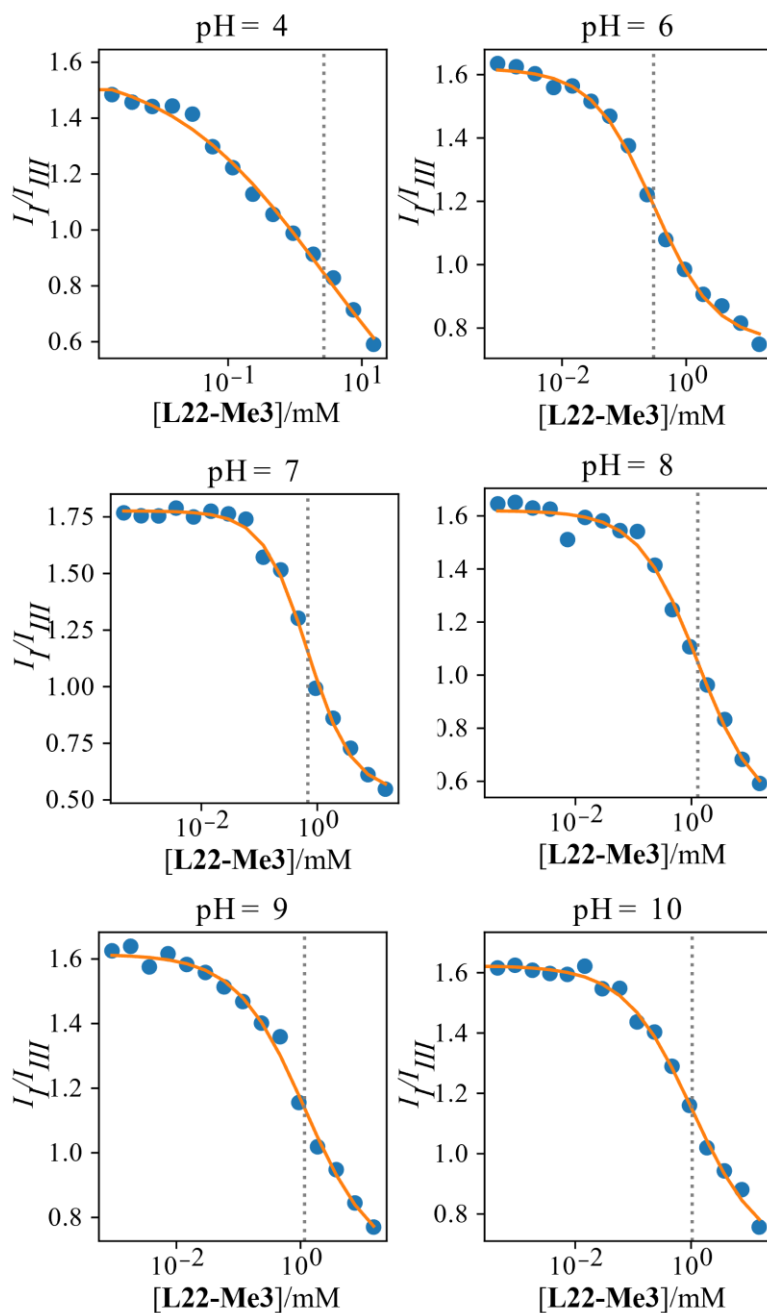


Figura B.6: Cociente de intensidades de bandas vibratorias (I_I/I_{III}) en función de [L22-Me3]. Datos de CMC medidos con el método de pireno en agua a diferentes valores de pH. La línea punteada representa el valor de CMC calculado.

*"Somos como la paja de páramo,
que se la arranca y vuelve a crecer...
y de paja de páramo
sembraremos al mundo".*

— **Dolores Cacuango**, líder indígena y defensora de los derechos de las mujeres ecuatorianas.

