



**Universitat de les
Illes Balears**

Facultat de Ciències

Memòria del Treball de Fi de Grau

Química de coordinación de iones metálicos y componentes de ácidos nucleicos.

Blas Moreno Vachiano

Grau de Química

Any acadèmic 2014-15

DNI de l'alumne: 43157864C

Treball tutelat per Àngel Terrón Homar
Departament de Química Inorgànica

S'autoritza la Universitat a incloure el meu treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Paraules clau del treball:

Guanina, adenina, citosina, timina, uracil, parell de bases, Au(III), Hg(II), Ag(I), Pt(II).

Índice

Abreviaturas.....	4
Motivación del tema	4
1. Introducción.....	4
1.1 Pares de bases	5
1.2 Incorporación de metal de transición entre pares de bases compuestos por pirimidinas.	8
1.3 Incorporación de metal de transición entre pares de bases compuestos por purinas y pirimidinas.	15
1.4 Recopilación de las estructuras de rayos X conocidas entre pares de bases en los que haya una base pirimidínica.	17
2. Parte experimental	18
2.1 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Hg^{+2}	18
2.2 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Ag^{+}	21
2.3 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Pt^{+2}	22
2.4 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Au^{+3}	26
2.5 Materiales y métodos.....	28
3 Resultados y discusión.	30

Abreviaturas más utilizadas:

Guanosina-5-monofosfato	GMP
Citidina-5-monofosfato	CMP
Guanina	G
Adenina	A
Citosina	C
Timina	T
Uracilo	C
5-Fluorouracilo	⁵ FU

Motivación del tema

Atendiendo al interés de la formación de pares de bases análogos a los que se forman en el reconocimiento de las cadenas de ADN o ARN (en los que un ion metálico sustituye a un protón implicado en un enlace de hidrógeno) se ha realizado un estudio bibliográfico exhaustivo de los pocos ejemplos descritos por difracción de rayos X en los que al menos contenga una base pirimidínica.

Utilizando sales de Hg^{+2} , Pt^{+2} , Ag^{+} y Au^{+3} , y una serie de bases púricas y pirimidínicas se ha realizado un estudio de exploración de posibles rutas sintéticas para aislar los compuestos deseados bien caracterizados. En la parte práctica se han ido modificando las condiciones de síntesis con el fin de obtener nuevos compuestos y, especialmente, cristales adecuados para ser determinados por medio de la difracción de rayos X.

1. Introducción

Desde 1950 se ha intentado incorporar metales de transición a los estudios con pares de bases para conocer los cambios que podrían producirse entre dichos pares de bases. Se descubrió que había diferencias significativas con los contraiones naturales de los pares de bases contenidos en el ADN y ARN intracelular (alcalinos y alcalinotérreos). Los iones alcalinos y alcalinotérreos naturales eran atraídos por medio de cargas electrostáticas, por los grupos fosfatos, con lo cual dichos cationes se disponían en la periferia de la estructura del ADN y ARN. No hay que olvidar también las interacciones del ion potasio con varios restos guanina en los telómeros del ADN y los tetrámeros de uracilo con sodio en los ARN. En contraposición, los metales de transición forman un enlace de coordinación con las nucleobases dando lugar a enlaces más fuertes a los anteriormente mencionados generando cinéticas de coordinación más lentas, lo cual provoca variaciones en la temperatura de fusión de los ácidos nucleicos, desplazamiento

de protones y preferencias específicas de los iones metálicos por las diferentes nucleobases.¹

En el presente trabajo el interés principal es establecer la posibilidad de incorporar un metal de transición entre un par de bases de ADN y también interacciones similares en el ARN que puedan explicar sus plegamientos (ej. Mg^{+2}).² Y en concreto revisar la bibliografía de compuestos modelos sobre el tema; y en la parte experimental avanzar en la síntesis y caracterización de modelos de la interacción del metal con los pares de bases seleccionadas en función de factores de solubilidad.³

1.1 Pares de bases

El enlace de hidrógeno lleva a cabo un papel importante en el ensamblaje de los pares de bases, controlando uno de los procesos biológicos necesarios para el reconocimiento selectivo entre las dos cadenas del ADN helicoidal. Dicha interacción no covalente es la responsable de la autorreplicación en el ADN y de la transmisión de información de una célula madre a una célula hija.⁴

Se conocen diferentes formas de unión entre los pares de bases, de hecho hay 28 reconocimientos posibles que incluyen como mínimo dos enlaces de hidrógeno.⁵ Comentaremos las más importantes, especialmente aquellas que tienen significado biológico.

1. **Watson-Crick.** Las nucleobases del ADN interactúan por medio de enlaces de hidrógeno uniendo una base pirimidínica y una base purica a la vez, por complementariedad en tamaño, forma y número de puntos de unión. De esta forma la timina y la adenina son reconocidas por tener dos puntos de unión característicos (el N^3 de la timina con el N^1 de la adenina y el O^4 de la timina con el N^6 de la adenina), mientras que la citosina y la guanina son reconocidas por tener tres puntos de unión característicos (el O^2 de la citosina con el N^2 de la guanina, el N^3 de la citosina con el N^1 de la guanina y el N^4 de la citosina con el O^6 de la guanina). Los pares de bases Watson-Crick son, con diferencia, los más abundantes en el ADN y el ARN. A continuación se puede observar en la ilustración Figura 1 dichas interacciones indicando todos sus enlaces de hidrógeno:

¹ B. Lippert en *Nucleic Acid-Metal Ion Interactions*, N. V. Hud (ed), Royal Society of Chemistry, Oxford (2009), pp 39-74.

² D. A. Megger, N. Megger, J. Müller, *Met. Ions in Life Science*, **10** (2012) 295-317.

³ A. Ono, H. Torigoe, Y. Tanaka, I. Okamoto, *Chem. Soc. Rev.*, **40** (2011) 5855-5866.

⁴ W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag, New York (1984).

⁵ I. Tinoko Jr en *RNA World*, R. F. Gesteland, J. F. Atkins (ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993), Apéndice 1 pp 603-607.

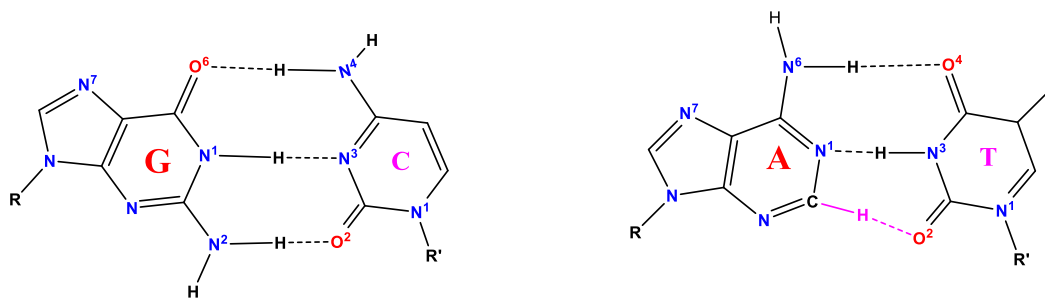


Figura 1. Pares de bases Watson-Crick.

2. **Hoogsteen.** Es una variación de los pares de bases habituales nombrados anteriormente. Se sabe que ocurre en el par de bases A-T y se deduce que también puede ocurrir en el par de bases G-C por medio de la protonación del N³ en la citosina. En el par de bases A-T se lleva a cabo un cambio en las posiciones enlazantes del enlace de hidrógeno, dicha modificación es el N³ de la timina y el N¹ de la adenina por el N³ de la timina y el N⁷ de la adenina (producido por un giro de 180° por parte de la adenina). El cambio de conformación de los pares de bases varía considerablemente las propiedades comparando con los pares de bases Watson-Crick. El ángulo entre los dos enlaces glucosídicos pasa a ser mayor (80°) al mismo tiempo que la distancia se hace menor. Las técnicas de RMN en ADN libre no identifican la presencia de pares de bases Hoogsteen en la estructura, dando a entender que la cantidad de dichos pares de bases se encuentran en una proporción muy reducida comparada con los pares de bases Watson-Crick. Sin embargo se sabe que están presentes en diferentes zonas del ADN, ya que provoca una distorsión significativa en la doble cadena de ADN⁶. En la imagen siguiente (Figura 2) podemos observar la diferencia entre los pares de bases Watson-Crick y Hoogsteen:

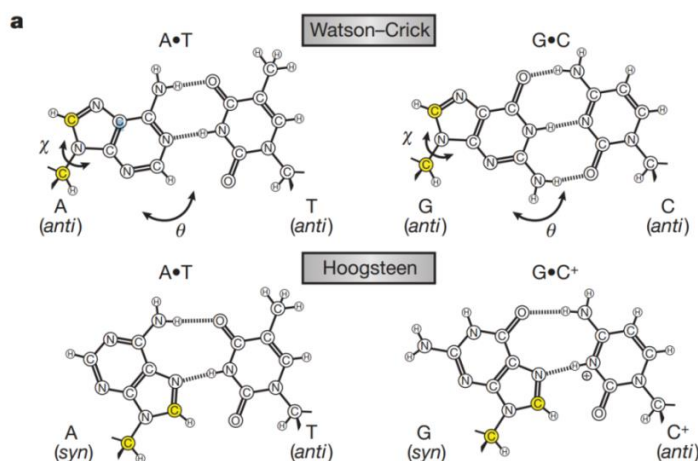


Figura 2. Diferencia entre pares de bases Watson-Crick y Hoogsteen⁷.

⁶ J. Aishima, R. K. Gitti, J. E. Noah, H. H. Gan, T. Schlick, C. Wolberger, *Nucleic Acids Research*, **30** (2002) 5244-5252.

⁷ E. N. Nikolova, E. Kim, A. A. Wise, P. J. O'Brien, I. Andricioaei, H. M. Al-Hashimi, *Nature*, **470** (2011), 498-502.

3. **Haschemeyer-Sobell** (o Hoogsteen inverso) es la unión por enlace de hidrógeno en el aducto timina-adenina.

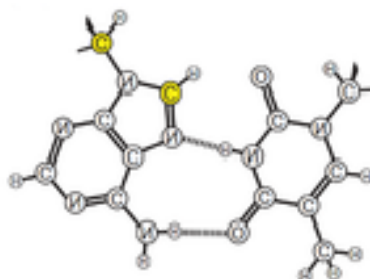


Figura 3. Estructura de los pares de bases Haschemeyer-Sobell.

Las diferentes nucleobases poseen características ácido-base, eso quiere decir que dependiendo del pH en el que se encuentren pueden actuar como ácido o como base. Cada una de las nucleobases posee un intervalo propio de pH diferente entre ellas, como se puede observar en la siguiente Figura 4:

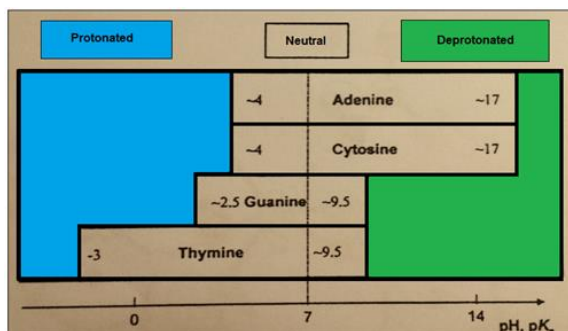


Figura 4. Intervalos de pH para las diferentes nucleobases.

Los rangos de pH que aparecen en la Figura 4 son orientativos, ya que esos valores fluctúan dependiendo del tipo de sustituyente que contenga en una posición concreta. En el caso del uracilo cambiando el sustituyente en la posición 5 obtenemos los diferentes valores de pK_a observados a continuación:²

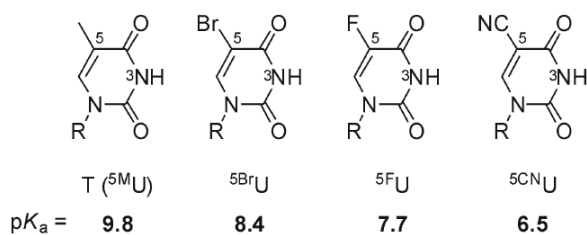


Figura 5. Diferentes valores de pK_a para los diferentes derivados de uracilo para la protonación del grupo amino desprotegido.

Cuando un metal de transición relativamente polarizante (como es el caso del Hg^{+2} , Pt^{+2} , etc.) interacciona con las nucleobases provoca una reordenación de la distribución electrónica que en algunos casos facilita la desprotonación del grupo amino (por ejemplo de la adenina). Podríamos decir que actúa como un grupo sustituyente análogo al metilo, fluoruro o ciano que hemos representado en la Figura 5. También cabe la posibilidad que el metal de transición se encuentre unido a un coligando o incluso al disolvente, capaz de ceder H, disminuyendo aún más el valor del pKa del grupo amino, obteniendo valores similares al rango fisiológico, como se indica en la Figura 6.⁸

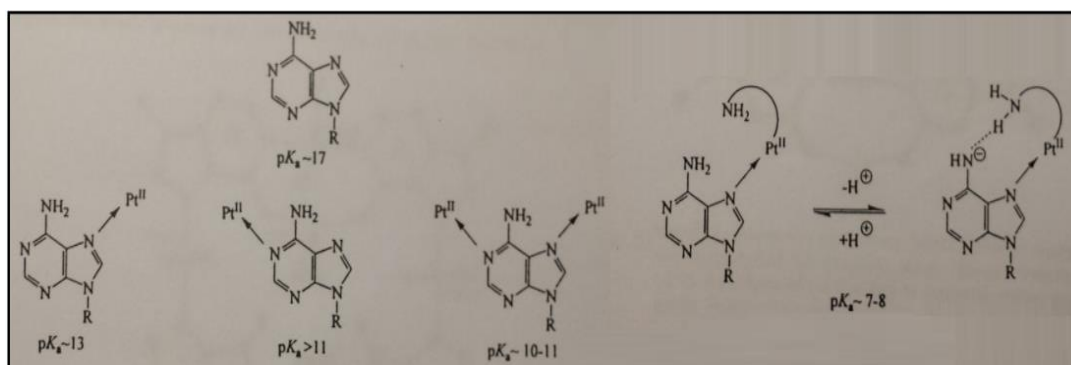


Figura 6. Variación del pKa del grupo amino en función del ión metal (Pt^{+2}).⁸

1.2 Incorporación de metal de transición entre pares de bases compuestos por pirimidinas.

La interacción de un ion metálico entre pares de bases de un ácido nucleico es un tema de gran interés. En estos casos se desearía que el metal sustituyera a unos de los hidrógenos del enlace entre las bases. La selectividad y la variación de las propiedades de los ácidos nucleicos podría ser objeto de diferentes aplicaciones.² A continuación se irán refiriendo los datos de la bibliografía existente.

1.2.1 Hg^{+2} incorporado entre pares de bases no estándar T:T.

En el año 1952, se observó una disminución de la viscosidad y un aumento de la turbidez en el ADN al añadir HgCl_2 . Las primeras explicaciones de la reducción de tamaño y aumento en el peso molecular del ADN era que el Hg^{+2} interactuaba con los grupos fosfato disminuyendo la repulsión entre ellos favoreciendo dicha compactación al mismo tiempo que parte del Hg^{+2} era agregado al ADN. Más adelante mediante la medida en el índice de refracción (obteniendo valores similares al ADN libre) y gracias al espectro de absorción UV (obteniendo variaciones considerables al ADN libre) se dedujo que el Hg^{+2} se encontraba interactuando directamente con los pares de bases.⁹

⁸M. Garijo, M. Sven, M. Roitzsch, M. Morell, P. Lax, G. Kampf, H. Sigel, B. Lippert, *Chem. Eur. J.*, **10** (2004) 106.

⁹C. A. Thomas, *J. Am. Chem. Soc.*, **76** (1954) 6032-6034.

La formación del complejo propuesto por Katz¹⁰ contenía una composición 2:1, compuesto por 2 nucleobases de timina desprotonadas unidas con el ion metálico Hg⁺². El complejo resultante, con una carga igual a 0, se encuentra en una conformación cisoide mostrada en la Figura 7.³

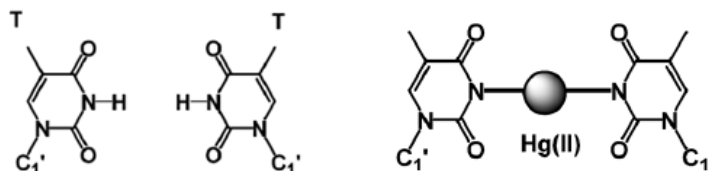


Figura 7. Representación de los pares de bases no estándar T:T y la formación del complejo T-Hg-T.¹¹

La estabilidad del compuesto de Hg(II) con dos hebras de ADN es tal que su temperatura de fusión aumenta considerablemente cerca de 10°C (de 37 a 47°C). Dicha estabilización es mayor que la presentada por el par de bases A:T llegando a un valor de temperatura de fusión de 44°C. Por lo tanto, la formación del complejo T-Hg-T de dos restos timina de un ADN es, además de favorable, selectivo; revelando una constante de unión para la formación de este complejo con un valor de 10⁶ M⁻¹.¹¹

Los estudios llevados a cabo para la determinación de este complejo se describen a continuación:

-Estudiando el ¹H-RMN para el par de bases T:T y para la formación del complejo T-Hg-T, se observa en los pares de bases T:T las banda características de los protones del grupo imino (N³) de las timinas, este espectro comparado con el obtenido a continuación para la formación del complejo T-Hg-T, indica como dichas bandas van desapareciendo a medida que va aumentando la concentración de Hg⁺² en el medio, deduciéndose que el ion metálico Hg⁺² va sustituyendo los protones del átomo N³ de las timinas formando el complejo T-Hg-T.

-El marcado isotópico con N¹⁵ para el grupo imino situado en el átomo N³ de cada una de las timinas detectado mediante ¹⁵N-RMN, proporcionó la primera prueba sobre la formación de este complejo dentro de la doble hélice de ADN. A medida que aumentaba la cantidad de Hg⁺² en el medio, la señal del ¹⁵N era desplazada hasta un valor igual a 30 ppm.¹²

Se han descrito también dos estructuras cristalinas. La primera con la base 1-metiltimina que se observa en la siguiente Figura 8.¹³ Los grupos 1-metil de la timina están en trans (configuración transoide).

¹⁰ S. Katz, *Biochim. Biophys. Acta*, **68** (1963) 240-253.

¹¹ H. Torigoe, A. Ono, T. Kozasa, *Chem. Eur. J.*, **16** (2010) 13218-13225.

¹² Y. Tanaka, S. Oda, H. Yamaguchi, Y. Kondo, C. Kojima, A. Ono, *J. Am. Chem. Soc.*, **129** (2007) 244-245.

¹³ L. D. Kosturko, C. Folzer, R. F. Stewart, *Biochemistry*, **13** (1974) 3949-3952.

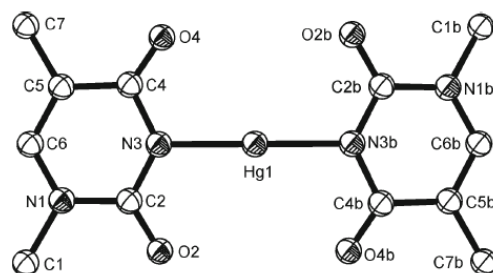


Figura 8. Estructura molecular del complejo T-Hg-T usando como nucleobase la 1-metilimidina que presenta la disposición transoide.²

La segunda estructura de rayos X corresponde a un dúplex artificial complementario, salvo en varias posiciones que enfrentan bases de timina. Esta estructura ha sido obtenida muy recientemente, y en ella podemos observar que los restos de ribosa están en posición cisoide como en el ADN (Figura 9).¹⁴

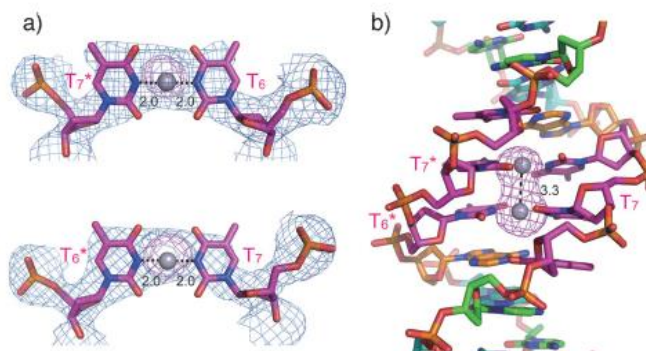


Figura 9. Estructura de rayos X para el complejo T-Hg-T, a) indica el fragmento de la imagen b) para observar la formación del complejo T-Hg-T en posición cisoide, b) representa la localización del complejo T-Hg-T en el dodecámero con polinucleótidos complementarios en posición cisoide.¹⁴

La formación de esta interacción T-Hg-T con ADN ha sido utilizada ampliamente en forma de sensor para la detección de Hg^{+2} (contaminante tóxico para el medio ambiente) en disolución acuosa. El motivo principal para ese uso es la atenuación que provoca en la fluorescencia la presencia de Hg^{+2} en los oligonucleótidos (elegidos estratégicamente) dispuestos en forma de cadena lineal. Al incorporar Hg^{+2} modifica su estructura en forma de horquilla. Ningún otro catión contiene tan alta especificidad ni tan alta influencia en el espectro de fluorescencia, por ello, con este método se obtienen límites de detección considerablemente bajos.²

1.2.2 Hg^{+2} incorporado entre pares de bases no estándar U:U.

De forma análoga al caso anterior, los pares de bases no estándar U:U sustituyen a los pares de bases T:T en el ARN. La única diferencia entre la nucleobase timina y el uracilo es el grupo metilo en la posición del carbono 5. Por ese motivo, es comprensible

¹⁴ J. Kondo, T. Yamada, C. Hirose, I. Okamoto, Y. Tanaka, A. Ono, , *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53** (2014) 2385-2388.

la formación del complejo U-Hg-U análogo al caso anterior, pero relacionado con interacciones en el ARN.

Cabe mencionar que el grupo de Bioinorgánica de la UIB ha proporcionado, previamente a la estructura de Ono,¹⁴ los mejores ejemplos que existen en la bibliografía para las interacciones entre uracilos U-Hg-U.¹⁵ Se utilizó, en un caso, como nucleobase el N¹-hexil-5-fluorouracilo, obteniendo como resultado el complejo [Hg(N¹-hexil-5-fluorouracilato)₂]₂·6H₂O que podemos observar en la Figura 10.

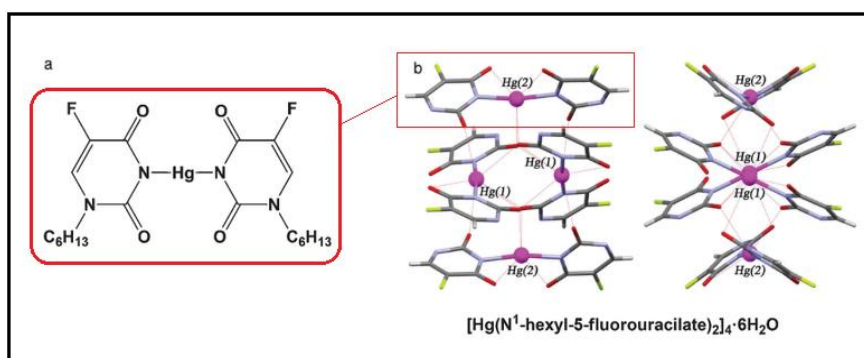


Figura 10. Estructura determinada para [Hg(N¹-hexil-5-fluorouracilato)₂]₂·6H₂O donde las cadenas alifáticas de cada uracilo han sido omitidas.

En la Figura 10, se observa como el Hg⁺² se enlaza al N³ del fluorouracilo además de interactuar con los oxígenos colindantes generando una estructura similar a las palas de una hélice con ángulos de 32,95° [Hg (1)] y 68,10° [Hg (2)] entre los planos del anillo de cada uracilo del par formado. Dicha torsión es observada en muchas estructuras de ADN mejorando el apilamiento de las bases en las hebras.¹⁵

También cabe mencionar la estructura obtenida con el ligando N1-(3-hidroxipropil)-5-fluorouracilo con el Hg⁺² detallada por el grupo de Bioinorgánica de la UIB por medio de difracción de rayos X. Se presenta como un complejo en el que hay dímeros U-Hg-U con un enlace esencialmente en línea. En estado sólido se observa que el Hg se enlaza, además del N³ de los ligandos, a los grupos hidroxilos O (10) para formar planos. Dicha estructura se ilustra en la siguiente Figura 11.¹⁶

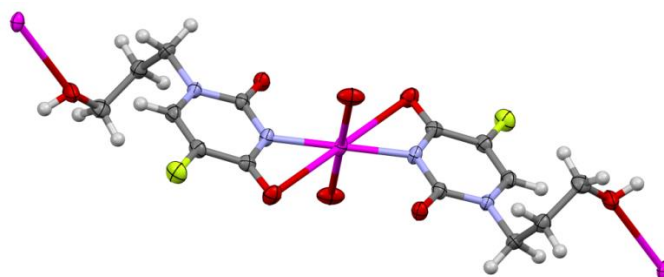


Figura 11. Estructura lineal del complejo [Hg(N¹-(3-hidroxipropil)-5-fluorouracilato)₂].¹⁶

¹⁵ M. Barceló-Oliver, B. A. Baquero, A. Bauzá, A. García-Raso, R. Vic, I. Mata, E. Molins, A. Terrón, A. Frontera, *Dalton Trans*, **42** (2013) 7631-7642.

¹⁶ A. Bauza, A. Terrón, M. Barceló-Oliver, A. Garcia-Raso, A. Frontera, *Inorg. Chem. Acta*, aceptado para su publicación DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ica.2015.04.028>.

De esta forma permite extender la estructura en dos dimensiones, generando la siguiente formación de capas en el compuesto.

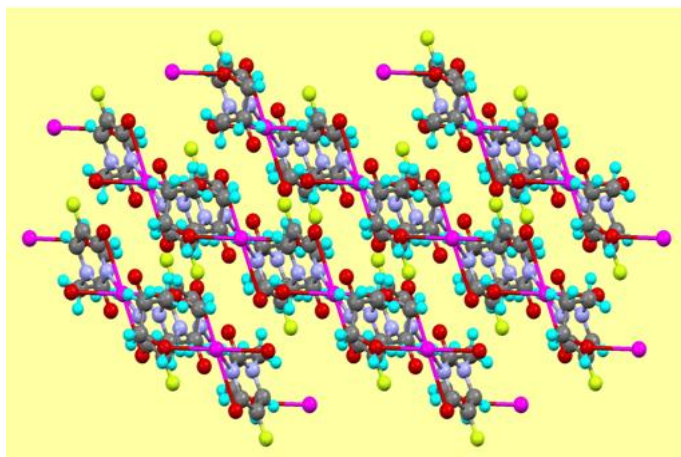


Figura 12. Formación de capas a partir de las cadenas del complejo.¹⁶

Las capas se apilan entre sí gracias a una novedosa interacción C-F...O=C y enlaces de hidrógeno dando lugar a la estructura tridimensional.

1.2. 3 Ag⁺ incorporado entre pares de bases no estándar U:U.

Se ha observado que el ion Ag⁺ es capaz de interactuar con los pares de bases U:U, de forma similar al Hg⁺², sustituyendo los protones situados en el N³ de ambos uracilos. Existen diferencias significativas entre los complejos U-Hg-U y U-Ag-U, ya que el ion Ag⁺ además de enlazarse con los N³ de los uracilos es capaz de interactuar con los oxígenos colindantes de las nucleobases, formando una cadena 1D infinita y estabilizando la formación del complejo. Dichas interacciones pueden observarse en la Figura 10.¹⁵

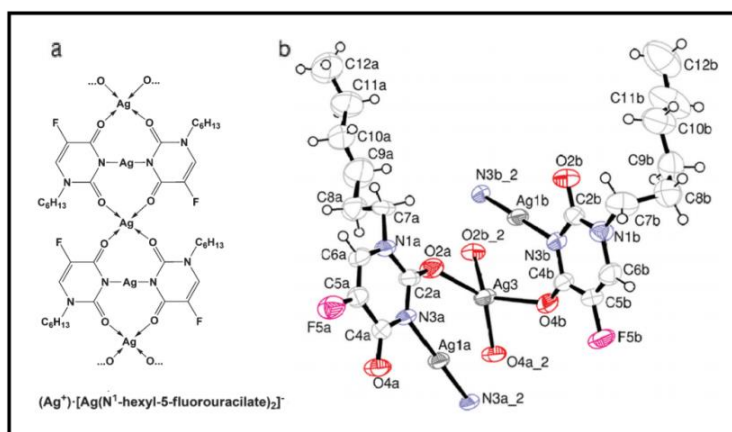


Figura 13. Estructura de la unidad asimétrica del compuesto polimérico (Ag⁺)[Ag(N¹-hexil-5-fluorouracilato)₂].

En la Figura 10 se observa como el segundo ion Ag^+ se encuentra coordinado a través de otros cuatro átomos de oxígeno en un ambiente tetraédrico distorsionado. Estos iones alinean las distintas unidades monoméricas.

1.2.4 Ag^+ incorporado entre pares de bases no estándar C:C.

La citosina es también una nucleobase natural con la cual se han llevado a cabo múltiples experimentos con diferentes iones metálicos de transición. Se ha descrito por diferentes autores la formación de un par de bases citosina-citosinio (citosina protonada en el N^3).¹⁷ Al parecer, el ion metálico capaz de estabilizar considerablemente este par de bases no estándares C-C de una manera selectiva es la Ag^+ .¹⁸

El complejo C-Ag-C se formaría mediante la sustitución del protón situado en el N^3 de una de las citosinas por el ion Ag^+ . Dicho complejo es estabilizado por medio de una conformación transoide, ya que posibilita la formación de enlaces de hidrógeno entre los pares de bases estabilizando la formación del complejo. Dicha conformación haciendo uso de una citosina y una 5-metilcitosina aumenta el punto de fusión aproximadamente $18,9^\circ\text{C}$ en comparación con el par de bases C:C. En cambio para dos citosinas la conformación cisoid solo consigue aumentar la temperatura del punto de fusión $4,8^\circ\text{C}$.¹⁹ La constante de unión específica entre la Ag^+ y los pares de bases C:C en el dúplex de ADN se encuentra en el rango de 10^{-5}M^{-1} .²⁰

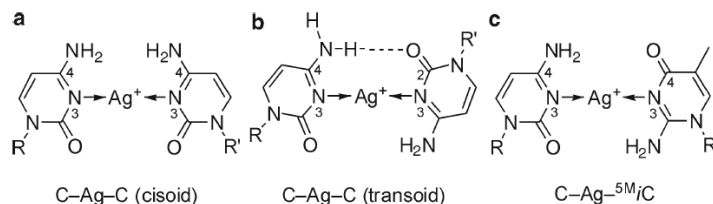


Figura 14. Representación de las diferentes conformaciones para el complejo C-Ag-C. En el a) podemos observar la conformación cisoid, en el b) podemos observar la conformación transoid y en el c) podemos observar la conformación transoid de la citosina y la 5-metilcitosina.¹⁹

De forma similar al sensor de Hg^{+2} , al introducir una cadena de oligonucleótidos produce una disminución de la fluorescencia al haber en la disolución cierta cantidad de Ag^+ , ya que produce la formación del complejo C-Ag-C generando un cambio de conformación en la cadena de oligonucleótidos, obteniendo límites de detección en el rango de nanomolar.²¹

1.2.5 Diferente grado de interacción entre metales de transición y derivados pirimidínicos variando las condiciones del medio.

¹⁷ M. Barceló-Oliver, B. A. Baquero, A. Bauzá, A. García-Raso, A. Terrón, I. Mata, E. Molins, A. Frontera, *CrysEngComm*, **14** (2012) 5777-5784.

¹⁸ T. Yamane, N. Davidson, *Biochim. Biophys. Acta*, **55** (1962) 609-621.

¹⁹ T. Ono, K. Yoshida, Y. Saotome, R. Sakabe, I. Okamoto, A. Ono, *Chem. Commun.*, **47** (2011) 1542-1544.

²⁰ H. Torigoe, Y. Miyakawa, A. Ono, T. Kozasa, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **30** (2011) 149-167.

²¹ Y. Wen, F. Xing, S. Song, L. Wang, Y. Long, D. Li, C. Fan, *Chem. Commun.*, **46** (2010) 2596-2598.

En la Figura 5 se observa como una misma nucleobase presenta diferente pKa dependiendo del sustituyente en la posición 5, de igual forma, el cambio en el pKa de los derivados pirimidínicos está íntimamente relacionada con el carácter nucleofílico del ligando variando así la afinidad de los diferentes metales de transición como es el caso de la Ag^+ y del Hg^{+2} . En el caso del ligando 5-fluorouracilo contiene un pKa de 7,7, el ion Hg^{+2} genera mayor estabilidad con el ligando que el ion Ag^+ , aumentando la temperatura de fusión, tanto en pH ligeramente ácido como neutro, con un valor de 7°C .²²

Sin embargo en unas condiciones de pH ligeramente básicas ocurre todo lo contrario, el ion Ag^+ es capaz de generar mayor estabilización con el ligando que el ion Hg^{+2} , aumentando la temperatura de fusión 14°C mientras que el ion Hg^{+2} sólo consigue aumentarla 6°C . Como modelo de esta interacción existe un monocristal del complejo $[\text{Ag}_2(1\text{-metiluracilato})_2]$ que fue estudiado por difracción de rayos X obteniendo la siguiente estructura (Figura 15).²³

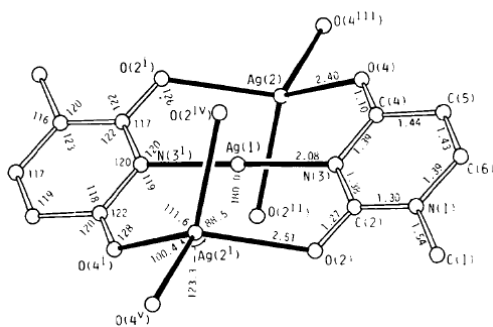


Figura 15. Estructura del complejo $[\text{Ag}_2(1\text{-metiluracilato})_2]$.²³

1.3 Incorporación de metal de transición entre pares de bases compuestas por purinas y pirimidinas.

En la actualidad se dispone de pocas estructuras en los que un metal de transición es incorporado entre pares de bases complementarias (Watson-Crick) obteniendo como resultado monocristales para llevar a cabo un análisis de rayos X. Los metales de transición que han hecho posible la obtención de resultados óptimos de los cuales se han conseguido determinar las estructuras de dichos monocristales han sido Au^{+3} y Pt^{+2} .

En el caso del ion metálico Au^{+3} , se ha obtenido un monocristal con los pares de bases C:G formando un complejo C-Au-G.²⁴ Dicho complejo monocristalino se obtuvo mediante la dispersión de una disolución de Au^{+3} sobre un cristal de ARN obteniendo diferentes señales de absorción para el cristal de ARN antes y después de ponerlo en contacto con dicha disolución. Dichas señales anómalas se encontraban relacionadas

²² I. Okamoto, K. Iwamoto, Y. Watanabe, Y. Miyake, A. Ono, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48** (2009) 1648-1651.

²³ K. Aoki, W. Saenger, *Acta Cryst.*, **C40** (1984) 775-778.

²⁴ E. Ennifar, P. Walter, P. Dumas, *Nucl. Acid. Res.*, **31** (2003) 2671-2682.

con el ion Au^{+3} que se había incorporado en la estructura del cristal de ARN indicando la desprotonación del N^1 de la guanina e incorporándose dentro del par de bases (similar a la incorporación de Hg^{+2} entre los pares de bases T-T, que necesita la previa desprotonación para incorporarse en la estructura). La incorporación del ion Au^{+3} genera una distorsión que favorece la geometría de plano cuadrado propia de este tipo de ion metálico de transición y parece indicar la desprotonación del N^1 de la guanina. En la Figura 16 se puede observar dicha estructura geométrica de plano cuadrado para el complejo.

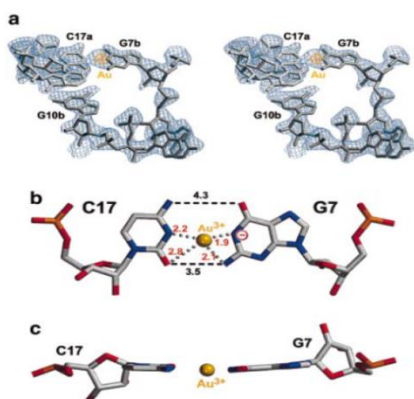


Figura 16. Representación de la estructura del complejo C-Au-G en un ARN.²⁴

Sería conveniente disponer de una estructura cristalina con bases modelos que permitiera una mayor precisión en la determinación, ya que esta se refiere a una macromolécula de ARN.

Para el caso del ion metálico Pt^{+2} , se han obtenido dos estructuras monocristalinas, en una utilizando el par de bases C:G, y en otra haciendo uso del par de bases A:T.

En el primer caso, a partir del transplatino ($[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$), se obtuvo un monocristal cuya estructura fue determinada mediante rayos X sobre el complejo C-Pt-G (Figura 17) en el que el complejo de partida ha sustituido los dos cloruros. En dicha figura se observa cómo el transplatino se une a la guanina por el N^7 , en vez de por el N^1 , generando pares de bases Hoogsteen con el transplatino intermedio, diferente al habitual que sería por medio de pares de bases Watson-Crick.²⁵

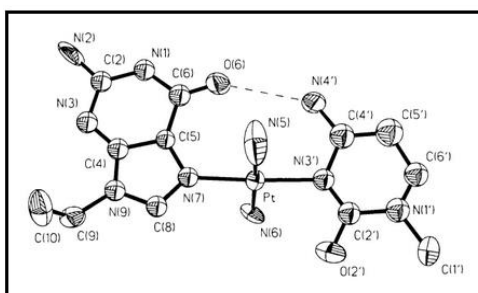


Figura 17. Estructura del transplatino incorporado entre el par de bases G:C.

²⁵ A. Erxleben, S. Metzger, J. F. Britten, C. J. L. Lock, A. Albinati, B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, **339** (2002) 461.

Esta coordinación del Pt(II) con el N⁷ de la guanina de un ADN altera su estructura y provoca que la célula reconozca como dañada la misma. Al no poder reparar el error genético la célula genera una serie de reacciones en cadena que finaliza con la muerte celular por apoptosis, por ese motivo se utiliza el cisplatino como medicamento anticancerígeno.²⁶

El siguiente complejo fue formado a partir de dos bases, 9-etiladenina y 1-metiluracilo, y el complejo metálico *trans*-[PtCl₂(NH₂-CH₃)₂] en el que se conservan los ligandos metilammino y se sustituyen los dos grupos cloruro por las bases mencionadas. Resulta ser un complejo cuaternario, sintetizado a partir de una extrema acidificación con posterior formación de monocristales, dichos monocristales están compuestos por dos 9-etiladenina, y dos 1-metiluracilatos unidos a través de tres transplatinos. Entre los pares de bases, el *trans*-[Pt(NH₂-CH₃)₂]⁺² se encuentra unido al N³ del 1-metiluracilato y al N¹ de la 9-etiladenina mientras que uniendo los dos pares de bases por el N⁷ de ambas 9-etiladeninas se encuentra el *trans*-[Pt(NH₃)₂]⁺².²⁷ Por medio de la difracción de rayos X se obtiene dicha estructura del complejo cuaternario que resulta ser perfectamente planar y se puede observar en la siguiente Figura 18.

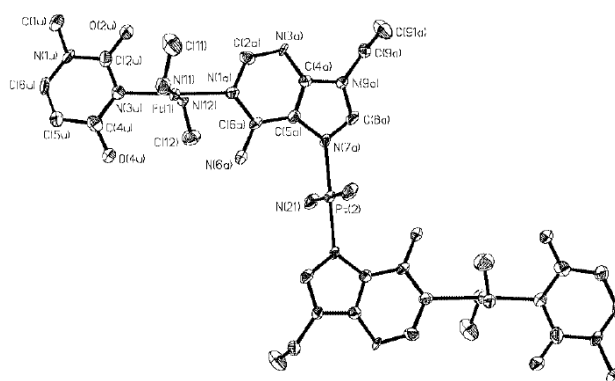


Figura 18 Estructura del complejo cuaternario.

También se obtuvo la estructura relacionada del complejo (1,3-dimetiluraciloC⁵)Hg(9-metiladenina)NO₃·H₂O en la que el metal enlaza al N⁶ de la adenina y el C⁵ del uracilo (Figura 19).²⁸

²⁶ K. R. Barnes, S. J. Lippard, "Cisplatin and Related Anticancer Drugs: Recent Advances and Insights" en A. Sigel, H. Sigel (eds), *Met. Ions Biol. System.*, **42** (2004) 143-177.

²⁷ M. S. Luth, M. Willermann, B. Lippert, *Chem. Commun.*, (2001) 2058-2059.

²⁸ F. Zamora, M. Kunsman, M. Sabat, B. Lippert, *Inorg. Chem.* **36** (1977) 1583-87.

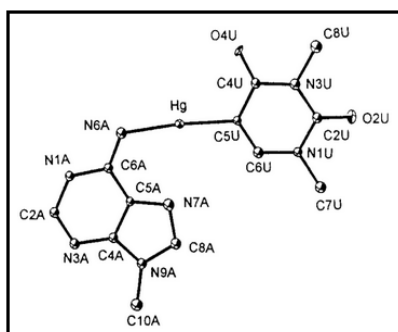


Figura 19: Ejemplo de complejo organometálico caracterizado mediante rayos X. Estructura del complejo [(1,3-dimetiluracilo-C5)Hg(9-metiladenina)]NO₃·H₂O.

1.4 Recopilación de las estructuras de rayos X conocidas entre pares de bases en los que haya una base pirimidínica.

Para finalizar esta introducción se hace una lista de todas las estructuras conocidas de metales con pares de bases en las que haya alguna base pirimidínica (Tabla 1). Hay que resaltar el muy escaso número de estructuras resueltas. Esta escasez, a pesar de su enorme importancia en conocimiento básico y posibles aplicaciones, resalta enormemente el interés del tema y su dificultad ya que son muchos los laboratorios a lo largo de los años los que han trabajado en el tema.

Tabla 1.

Metal	Compuesto	Figura	Referencia (año)
Ag	Con 1-metiluracilo obteniendo U-Ag-U.	15	23 (1984)
	Con citosina obteniendo C-Ag-C.	14	21 (2010)
	Cadena 1D infinita con N1-hexil-5-fluorouracilo obteniendo ^{5F} U-Ag- ^{5F} U.	13	15 (2013)
Hg	Dúplex de dodecámeros en presencia de enlaces T-Hg-T.	9	14 (2014)
	Con 1-metiltimina obteniendo T-Hg-T.	8	13 (1974)
	Con N1-hexil-5-fluorouracilo obteniendo ^{5F} U-Hg- ^{5F} U.	10	15 (2013)
	Con N ¹ -hidroxipropil-5-fluorouracilo obteniendo ^{5F} U-Hg- ^{5F} U.	12	16 (en vías de publicación)
	Con el 1,3-dimetiluracilo y la 9-metiladenina obteniendo U-Hg-A.	19	28 (1977)
Pt	El transplatino con C:G se obtiene C-Pt-G.	17	25 (2002)
	El transplatino con A:U se obtiene un complejo cuaternario A-Pt-U-Pt-U-Pt-A.	18	27 (2001)
Au	ARN con presencia de interacción G-Au-C.	16	24 (2003)

2. Parte experimental

Las horas de trabajo realizadas en el laboratorio de este Trabajo de Fin de Grado han sido realizadas en este cuatrimestre. Cabe mencionar que recibí una beca de colaboración para trabajar en esta área, que permitió familiarizarme con la temática de la investigación.

Se han utilizado Ag^+ y Au^{+3} y dos iones divalentes Pt^{+2} y Hg^{+2} . Todos estos iones metálicos se han escogidos por la facilidad con la que forman enlaces con las diferentes nucleobases, y por referencias bibliográficas anteriores como se ha indicado en el apartado anterior (Tabla 1).

Como ligandos se han utilizado diferentes combinaciones de bases púricas y pirimidínicas, como algunos nucleósidos o nucleótidos semejantes. Se ha atendido a criterios de solubilidad según el disolvente empleado y las particularidades red-ox de cada metal.

La motivación final es obtener estructuras cristalinas bien definidas.

2.1 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Hg^{+2} .

En el trabajo realizado en el laboratorio se ha utilizado, entre otros, el ion metálico Hg^{+2} para la obtención de complejos con pares de bases en forma de monocristales.

Se ha utilizado la N^1 -hexiltimina, una timina con una cadena alifática de seis carbonos en la posición N^1 sintetizada por el grupo de Bioinorgánica de la UIB.¹⁷ En otro intento de síntesis se utilizó como pares de bases la citidina-5-monofosfato (CMP) y la guanosina-5-monofosfato (GMP). En el último intento de síntesis, similar al anterior, se hizo uso de los pares de bases formados por guanosina y citidina.

2.1.1 Procedimiento experimental para la formación del complejo T-Hg-T usando como nucleobase N^1 -hexiltimina.

Se disuelve en un vaso de precipitados 1 mmol de N^1 -hexiltimina en 15 ml de acetonitrilo obteniendo una disolución de color amarillo. Se le añade 0,5 mmol de acetato de mercurio hasta un volumen total de 25 ml, al observar que no se disuelve por completo se le añaden 10 ml de acetonitrilo y se agita durante 1 hora. Una vez obtenida la disolución homogénea se filtra por gravedad para luego sellarlo con parafilm al cual se le hacen unos agujeros para la evaporación lenta del disolvente. Con el paso del tiempo se van formando gran cantidad de núcleos de cristalización por lo que se vuelve a filtrar por gravedad. Al evaporarse todo el disolvente se observa la formación de

cristales que observados a través del microscopio nos indican que no son de buena calidad.

Se observa como un líquido oleoso de color amarillo se queda impregnado en el fondo del vaso de precipitados parcialmente unido a los cristales obtenidos, por ese motivo redisolvemos los cristales en acetona con el fin de separar esa impureza de los cristales. Para sorpresa nuestra, dicha impureza también es soluble con acetona, pero al filtrar de nuevo por gravedad parte de la impureza queda retenido en el filtro.

Se lleva a cabo un espectro IR de la impureza para determinar su procedencia, dando como resultado un producto de hidrólisis del 1-bromo-hexano, reactivo que se utiliza en la síntesis de la N¹-hexiltimina. Se logra separar la impureza por medio de una disolución que contiene una mezcla de agua-acetona. Al evaporarse la acetona, la N¹-hexiltimina va cristalizando en superficie al ser menos soluble en agua que la impureza, de esa forma se consigue una buena separación de ambos compuestos.

Al obtener la N¹-hexiltimina pura, se repite el experimento añadiendo esta vez en un vaso de precipitados 0,25 mmol de acetato de mercurio en 27 ml de acetona obteniendo una coloración amarilla, luego se añade la N¹-hexiltimina en un volumen total de 60 ml del disolvente. Se agita la mezcla durante 1 hora generando una disolución totalmente transparente. Una vez evaporado todo el disolvente, se disuelve todo en 10 ml de acetona y 5 de agua MilliQ. Se observa la formación de cristales en el fondo del vaso de precipitados de color blanco con forma de bastones y placas (mezcla). Se filtran por gravedad y una vez secos se observan a través del microscopio, por el aspecto resultante de los cristales obtenidos resultar ser de N¹-hexiltimina, la nucleobase inicial.

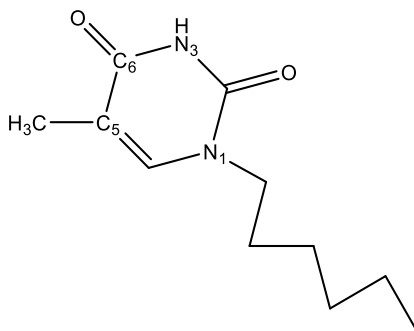


Figura 20. Representación de la N¹-hexiltimina.

El compuesto obtenido en acetonitrilo que deseamos cristalizar corresponde al sintetizado previamente en metanol, por el alumno de la UIB Francisco Pérez (incluido en su Trabajo Final de Grado), es el Hg(N¹-hexiltiminato)₂.

Fórmula: C₂₂H₃₄HgN₄O₄ que correspondiente a Hg(N¹-hexiltimina)₂.

Análisis elemental: C: 41,68 (calculado), 41,98 (experimental); H: 5,54 (cal), 5,62 (exp) y N: 9,05 (cal), 8,85 (exp).

IR(cm^{-1}): 449w (**weak**), 501w, 590w, 663w, 726w, 769w, 927w, 1047w, 1104w, 1159w, 1184w, 1216w, 1265w, 1294w, 1351m (**media**), 1383m, 1437m, 1591s (**strong**), 1655s, 2857m, 2929m, 2955m, 3060m, 3451m.

^1H RMN (DMSO- d_6): δ (ppm) 7.48[d,1H,C(6)-H], 3.62[t,2H,C(7)-H, $J=7.05$ Hz], 1.76[s,3H,C(13)-H], 1.55[t,2H], 1.23[m,6H], 0.83[t,3H, $J=6,60$ Hz].

También se intentó obtener cristales del compuesto por medio de otros disolventes y otras sales de mercurio (nitrato, cloruro, etc.) variando así las condiciones del medio para intentar optimizar su posterior cristalización. Se obtuvo en todos los casos el mismo compuesto en fases microcristalinas o cristalinas, pero en ningún caso con la calidad suficiente para poder hacer un estudio de difracción de rayos X a partir de un monocristal.

2.1.2 Procedimiento experimental para la formación del complejo C-Hg-G usando nucleobases CMP y GMP.

Se disuelve en 20 ml de agua MilliQ 0,5 mmol de CMP en forma ácida y se mezclan con 10 ml de agua MilliQ que contiene 0,5 mmol de GMP en forma de sal en un vaso de precipitados. Se agita durante media hora para homogeneizar la mezcla y favorecer la formación de pares de bases CMP-GMP. Se prepara una disolución de 60 ml de agua MilliQ que contiene 0,5 mmol de nitrato de mercurio. A la disolución que contiene los pares de bases (30 ml de agua MilliQ) se le añade gota a gota la disolución de nitrato de mercurio (un volumen igual a 10 ml). El aspecto turbio de la disolución indica que hay posibilidad de formar un gel, para reducirlo calentamos a 50°C durante 1 hora, introducimos un volumen de 25 ml de agua MilliQ y acidificamos hasta un $\text{pH} = 1$, llegando a un volumen final de 70 ml de la disolución transparente. Una vez se ha evaporado parte del agua genera la formación de un gel, dicha formación complica el estudio del complejo. Hasta que no es evaporado totalmente el gel no se obtiene ningún precipitado por lo que no es posible realizar un estudio espectroscópico. Al evaporarse completamente a sequedad nos queda en el fondo un precipitado que presenta la formación de dendrímeros que fueron observados a través del microscopio.

La formación de dendrímeros indica que dichas nucleobases se han ido uniendo unas con otras generando la formación de polímeros, dando a entender que es la estructura más estable en estas condiciones.

2.1.3 Procedimiento experimental para la formación del complejo C-Hg-G usando como nucleobases guanósina y citidina.

Se disuelve en un vaso de precipitados una cantidad de $5/12$ mmol de citidina en 5 ml de agua MilliQ. Se le añade a esta disolución una cantidad de $5/12$ mmol de guanósina quedando en suspensión, ya que es muy poco soluble. La formación del par de bases guanósina-citidina hace posible que la guanósina, insoluble en agua, se vuelva parcialmente soluble. Se le añaden 50 ml de agua MilliQ para mejorar la solubilidad del

par de bases. La disolución se calienta y se pone en agitación durante 1 hora favoreciendo la formación del par de bases, este hecho se deduce porque la disolución se vuelve transparente. Se dispone posteriormente a filtrar la disolución para eliminar restos de guanosina no formando par de bases con la citidina que pudieran interferir con el mercurio. A la disolución que contiene el par de bases se le añade cuidadosamente, gota a gota, una disolución de 50 ml en un vaso de precipitados que contiene 5/12 mmol de nitrato de mercurio observando la formación de burbujas provocadas posiblemente por la presencia de guanosina ya que contiene una parte hidrófoba y una parte hidrófila, similar a un agente surfactante o tensoactivo. Al final de la adición se dispone a medir el pH de la disolución observando un valor igual a 4. Esta disminución del pH indica que posiblemente el Hg^{+2} ha reaccionado con el par de bases generando la formación del complejo C-Hg-G. Se filtra de nuevo la disolución para eliminar posibles impurezas de los reactivos.

Con el paso del tiempo la disolución se evapora considerablemente, tan rápido que al evaporarse por completo no se obtiene un sistema cristalino, por ese motivo, se redissuelve todo en agua MilliQ y se vuelve a calentar para mejorar su redisolución. Se deja reposar tapado con parafilm para evaporarse más lentamente. Dando lugar a un precipitado de naturaleza polimérica, sin que aparezcan cristales adecuados, que era nuestro objetivo.

2.2 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Ag^+ .

Como en el caso del ion metálico Hg^{+2} , también se ha utilizado el Ag^+ , para la obtención de complejos con pares de bases con la intención de obtener monocristales de los derivados sintetizados.

En el primer caso, haciendo uso de la N^1 -hexiltimina,¹⁷ para formar el complejo T-Ag-T. También se intentó llevar a cabo el experimento haciendo uso de la nucleobase N^1 -hexilcitosina para la formación del complejo C-Ag-C, dicha síntesis ha sido realizada con anterioridad, pero los resultados aún no han sido publicados.

2.2.1 Procedimiento experimental para la formación del complejo T-Ag-T usando como nucleobase N^1 -hexiltimina.

Se disuelven 0,5 mmol de N^1 -hexiltimina y 0,5 mmol de nitrato de plata todo disuelto en 50 ml de acetona, la mezcla se trata a reflujo durante 1 hora, se disuelven totalmente los reactivos y la disolución queda totalmente transparente. Se filtra en caliente con papel de filtro para eliminar posibles impurezas. Al día siguiente se observa un precipitado, posiblemente impurezas, por ese motivo se filtra de nuevo por gravedad, el volumen se ha reducido hasta llegar a 20 ml aproximadamente, se cubre con parafilm para evitar la pérdida excesivamente rápida de disolvente y se protege de la exposición de la luz (el ion metálico Ag^+ presenta sensibilidad a la radiación lumínica). Al cabo del tiempo se evapora por completo la disolución obteniendo la formación de una capa resplandeciente sin llegar a formar cristales útiles, por ese motivo se redisolvió con

metanol y posteriormente se filtró. Al evaporarse por completo el metanol, se observó el precipitado mediante un microscopio, el resultado fue negativo ya que el precipitado no contenía cristales útiles para realizar la difracción de rayos X.

2.2.2 Procedimiento experimental para la formación del complejo C-Ag-C usando como nucleobase N¹-hexilcitosina.

La primera síntesis del compuesto C-Ag-C se llevó a cabo mediante 0,25 mmol de nitrato de plata y 0,25 mmol de N¹-hexilcitosina disuelto todo en 10 ml de metanol. Se calienta a reflujo durante 2 horas, se filtra y se deja cristalizar a temperatura ambiente, al cabo de 2 días salieron cristales puros.

Fórmula: $AgC_{20}H_{34}N_7O_5$ que corresponde a $Ag(N^1\text{-hexilcitosina})_2(NO_3)$.

Análisis elemental: C: 42,87 (calculado), 42.90 (experimental); H: 6.12 (cal.), 6.24 (exp.); N: 17.50 (cal.), 17.66 (exp.).

IR (cm⁻¹): 415vw, 446vw, 583w, 627w 725vw, 775m, 795w, 825vw, 1115w, 1198m, 1269m, 1375s, 1438w, 1459w, 1512s, 1626vs, 1668vs, 2857m, 2927w, 2957w, 3201m, 3351s.

¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 7.71 [d, 1H, H(6), J=7.2 Hz], 7.55 [br, s, 2H, N(4)-H2], 5.78 [d, 1H, H(5), J = 6.9 Hz], 3.66 [t, 2H, H(7), J= 7.2 Hz], 1.54 [br, m, 2H, H(8)], 1.22 [br s, 6H, H(9,10,11)], 0.82 [t, 3H, H(12), J=6.6 Hz].

Por consiguiente, se llevó a cabo otra preparación en la proporción 2 mmol de ligando por uno de sal del metal (en vez de 1:1 como en el caso anterior) metal-ligando, todo disuelto en 60 ml de metanol. Se mantuvo la disolución en reflujo durante aproximadamente 2 horas. Se le adicionó 1 mmol de NaSbF₆ (P. M. 258,7) disuelto en 20 ml de metanol. Se dejó reposar con evaporación lenta. Al cabo de aproximadamente 2 semanas aparecieron cristales (cuando la disolución estaba en 50 ml de metanol. Se han seleccionado algunos cristales que se enviaron al cristalógrafo ya que parecían ser adecuados mediante la observación al microscopio (27 de abril de 2015). Los cristales son blancos pero sensibles a la luz. En el momento de finalizar esta memoria el cristalógrafo está adquiriendo reflexiones en el espectrofotómetro, y ha podido determinar la celda unidad. Por tanto está pendiente de la resolución de la estructura que puede ser compleja.

El producto parece ser el mismo que en el caso inicial solo modificamos el anión, pero para corroborar nuestra deducción optamos por realizar otro análisis IR, RMN y enviar el producto a análisis elemental.

2.3 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Pt⁺².

En los procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Pt^{+2} , en dos de ellos hemos utilizado como sal del metal el tetracloruroplatino dipotásico ($K_2(PtCl_4)$) y en el último intento de síntesis con este metal se ha utilizado el *trans*-diamminodicloruroplatino(II) (*trans*- $Pt(NH_3)_2Cl_2$). Los dos compuestos que contienen dicho metal de transición actúan de diferente forma y se obtienen resultados totalmente diferentes.

En el primer caso, se utiliza la nucleobase 9-butiladenina en proporción estequiométrica con el metal complejante. En el otro caso en el que utilizamos, como en el caso anterior, el $K_2(PtCl_4)$ junto con la nucleobase sintetizada por el grupo de Bioinorgánica de la UIB, la N^1 -hexiltimina. Por último para el compuesto *trans*- $Pt(NH_3)_2Cl_2$ se pone en contacto con el par de bases N^1 -hexiltimina y 9-butiladenina (T-A) para intentar formar el complejo T-Pt-A.

2.3.1 Procedimiento experimental para la formación del complejo A-Pt-A usando como nucleobase 9-butiladenina.

Se añaden 0,5 mmol de 9-butiladenina en un vaso de precipitados que contiene 25 ml de agua MiliQ, la nucleobase utilizada no parece ser muy soluble por lo que se adiciona 10 gotas de una disolución de HCl 0,1 N hasta llegar a pH=2,5 con el fin de protonar la nucleobase (pK aproximadamente 3,5) y de esa forma disolverla completamente. Se calienta la disolución para mejorar la solubilidad de la nucleobase. Se le añade 0,5 mmol de la sal del metal en 15 ml de agua MilliQ, al parecer la disolución se aproxima a la saturación y con una textura gelatinosa.

Al añadir la sal del metal sobre la nucleobase presenta un cambio de coloración significativa, la disolución de la sal del metal pasa de un color naranja a un color naranja amarillento. Se pone en agitación durante 6 horas y en este tiempo se aprecia cómo va apareciendo un precipitado amarillo que parece ser no cristalino, esperamos al día siguiente para filtrar. El precipitado obtenido al día siguiente paso de ser amarillo a ser verde oscuro posiblemente por reacciones de reducción y oxidación provocadas por el ion metálico Pt^{+2} . La coloración verde puede ser debido a una combinación de colores, amarillo y negro. En la disolución resultante parece que aún pueda haber producto por lo que aislamos la disolución con parafilm y dejamos evaporar lentamente. A medida que pasan los días va precipitando producto del mismo color, posiblemente se trate del mismo producto. Dicho producto es filtrado en una placa filtrante, al filtrar aparece una especie de espuma posiblemente generada por la combinación entre el ligando y los iones cloruro de la disolución formando un tensoactivo.

El filtrado es utilizado para realizar la formación de pastillas que posteriormente fueron llevados al espectrómetro de IR, dicho espectro se hace a partir del segundo filtrado que aparenta ser más verde que el primero. El IR obtenido a partir de la pastilla nos indica la presencia de 9-butiladenina.

Posteriormente se pretende hacer un 1H -RMN del mismo precipitado, por lo que se llevan a cabo pruebas de solubilidad para determinar cuál es el disolvente apropiado para llevar a cabo el espectro del 1H -RMN. Se observa que con dimetilsulfóxido

(DMSO) es totalmente soluble, en cambio con agua MilliQ presenta una ligera solubilidad, por este motivo se utiliza el DMSO deuterado para llevar a cabo el espectro de ^1H -RMN. El espectro de ^1H -RMN obtenido indica que hay 9-butiladenedina ya que se observan bandas características de dicha nucleobase, sin embargo la presencia de agua dificulta la identificación completa del complejo. Se repite el espectro de ^1H -RMN y sigue indicando la presencia de agua en dicho espectro, la cual cosa hace pensar que el producto contiene en su interior agua coordinada.

Fórmula: $\text{C}_9\text{H}_{19}\text{Cl}_3\text{KN}_5\text{O}_3\text{Pt}$ que corresponde a $[\text{K}(\text{PtCl}_3)(9\text{-butiladenina})\cdot 3\text{H}_2\text{O}]$

Análisis elemental: C: 18,45 (calculado), 18,48 (experimental); H: 3,27 (cal.), 2,61 (exp.); N: 11,95 (cal.), 11,41 (exp.).

IR (cm^{-1}) del compuesto: 642vw, 772vw, 1114vw, 1205m, 1235w, 1347m, 1433m, 1502m, 1527m, 1652vs, 2871m, 2931m, 2958m, 3114m, 3259s, 3386s, 3508s.

IR (cm^{-1}) del ligando 9-butiladenina: 433vw, 539m, 667s, 719s, 767m, 798m, 844w, 902w, 946w, 1009s, 1071s, 1106m, 1202s, 1236vs, 1308vs (br), 1361s, 1415vs, 1481vs (br), 1517m, 1604vs (br), 1675vs, 2681m, 2740m, 2856vs, 2825vs (br), 3122vs, 3272vs, 3418m, 3577m.

Al comparar los dos espectros de IR se observa el desplazamiento de bandas, la unión de bandas e incluso la desaparición de otras bandas propias del ligando, indicando de esa forma la coordinación con el ion metálico. Especialmente se observa el desplazamiento de las bandas de anillo de 1675 y 1604 cm^{-1} en el ligando, a 1652 cm^{-1} en el complejo, lo que parece indicar la coordinación del ion metálico al anillo.^{29, 30}

El espectro de RMN no se resuelve bien del todo por la poca solubilidad del complejo. Aun así son visibles algunas señales características del ligando.

^1H RMN (DMSO- d_6) δ (ppm): 8,51 [s, 1H, H(2)], 8,44 [s, 1H, H(8)], 1,72 [m, 2H, H(11)], 1,20 [m, 2H, H(12)], 0,85 [t, 3H, H(13)].

2.3.2 Procedimiento experimental para la formación del complejo T-Pt-T usando como nucleobase N^1 -hexiltimina.

Se añaden 0,5 mmol de $\text{K}_2(\text{PtCl}_4)$ en un vaso de precipitados que contiene un volumen de 20 ml de agua MilliQ disolviendo toda la sal del metal y obteniendo un pH=5. A esta disolución se le añade 0,5 mmol de N^1 -hexiltimina en estado sólido, posteriormente se le añade un volumen de 15 ml de agua MilliQ para dispersar la timina sólida llegando a

²⁹ P. O. P. Ts'ò, *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, Volumen I, Academia Press, New York (1974).

³⁰ J. Duchesne (ed), *Physico-chemical Properties of Nucleic Acids*, volumen 2, Academia Press, London (1973).

un volumen total de 35 ml. Para aumentar la solubilidad de la N¹-hexiltimina por efecto de la formación del complejo se pone en agitación sin calentar hasta el día siguiente y protegido de la luz mediante papel de aluminio. Al día siguiente se observa que la reacción no se ha llevado a cabo completamente por ese motivo procedemos a calentar al baño maría a 70°C durante 2 horas. Luego filtramos en caliente la disolución para eliminar impurezas ya que se observa un precipitado de color violeta, la disolución resultante presenta una coloración marrón.

Al cabo de unos días se procede al filtrado obteniendo un precipitado de color azul pálido, una vez seco se dispone a hacer un espectro IR, un espectro ¹H-RMN y un análisis elemental. Pasados unos días se vuelve a observar la presencia de más precipitado, por lo que esta vez el filtrado se llevará a cabo en una placa filtrante. Una vez terminado el filtrado se observa la posible formación de cristales sobre la placa filtrante.

Fórmula: C₄₄H₇₂ClKN₈O₈ que corresponde a K(N¹-hexiltimina)₄(Cl)

Análisis elemental: C: 58,05 (calculado), 57,72 (experimental); H: 8,08 (cal.), 7,93 (exp.); N: 12,39(cal.), 12,24(exp.).

IR (cm⁻¹): 418vw, 440vw, 549vw, 685w, 766w, 892w, 946w, 1006vw, 1050vw, 1102w, 1144w, 1219m, 1256m, 1361m (br), 1479s, 1506s, 1670vs (br), 2857m, 2926s (br), 3031m, 3156m.

¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): 11,15 [s, 1H, H(3)], 7,49 [s, 1H, H(6)], 3,56 [t, 2H, H(7)], 1,71 [s, 3H, H(5)], 1,50 [m, 2H, H(8)], 1,22 [m, 6H, H(9,10,11)], 0,82 [t, 3H, H(12)].

Tanto los datos de IR como los de RMN son espectros muy parecidos a los de la N¹-hexiltimina, sugiriendo que el platino(II) se ha coordinado en poca proporción.

Para concretar si el complejo formado es realmente el supuesto o si había presentes trazas del ion platino, procedemos a hacer un MALDI/ELSI, la técnica se llevó a cabo utilizando como disolvente acetona ya que se sabe que el precipitado es totalmente soluble con este disolvente. Los datos, no del todo concluyentes, nos permitieron identificar dos picos que podríamos asignar tentativamente como C₄₄H₆₈ClN₈O₈Pt₂⁺ (masa exacta teórica 1226,45; masa experimental estimada 1026,41) y C₄₄H₇₁ClN₈O₈Pt⁺ (masa exacta teórica 1069,47; masa experimental estimada 1069,29) con la presencia de 4 ligandos timina en los dos casos y la presencia de dos átomos de platino en el primer caso y de uno en el segundo. Sin embargo a pesar que el perfil isotópico es muy parecido, al repetir el espectro con referencias internas, para hacer un cálculo riguroso de la masa exacta, no fue posible hallar una buena correlación. Tal vez la interferencia con estos compuestos utilizados como referencia interna. Por lo que, sin poder afirmarlo de una manera concluyente, parece que parte del platino sí que interacciona con la timina, sin que hayamos obtenido las condiciones adecuadas para aislar el compuesto minoritario responsable del color del compuesto. Hay que mencionar que la primera fórmula contiene cierta similitud con un compuesto bien caracterizado por otros autores en los que cada ligando N¹-metiltimina se encuentra unido a dos iones metálicos *trans*-

$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{+2}$ y generando un enlace Pt-Pt.³¹ También cabe mencionar que la segunda fórmula tiene mucha relación con el compuesto obtenido a partir del 1-metiluracilo y el ion metálico paladio, bien caracterizado por otros autores.³²

Se volvió a repetir el experimento pero esta vez utilizando como disolvente una mezcla de acetona-agua (1:1), el resultado concluyó con la presencia de cristales planos correspondientes al ligando N¹-hexiltimina.

2.3.3 Procedimiento experimental para la formación del complejo T-Pt-A usando como pares de bases la N¹-hexiltimina y la 9-butiladenina.

Se disuelve 0,5 mmol de N¹-hexiltimina y 0,5 mmol de 9-butiladenina en un vaso de precipitados que contiene un volumen total de 30 ml de acetona. Se pone en agitación durante 1 hora para disolver completamente dichas nucleobases, posteriormente se filtra para eliminar impurezas sólidas que puedan quedar en la disolución o que no han reaccionado con su base complementaria (Watson-Crick). En otro vaso de precipitados se disuelve 0,5 mmol del compuesto *trans*-Pt(NH₃)₂Cl₂ en 20 ml de agua MilliQ al cual se le añade 1 mmol de nitrato de plata para eliminar los cloruro de la sal del metal dejando en disolución el complejo $[\text{trans-Pt}(\text{NH}_3)_2]^{+2}$, filtramos para eliminar el AgCl formado en la disolución. En la disolución de los pares de bases se le añade cuidadosamente y en agitación continua la disolución resultante del complejo metálico para llevar a cabo la posible formación del complejo T-Pt-A. Una vez terminada la adición se mantiene en agitación durante 1 hora para completar al máximo dicha reacción. Posteriormente la disolución es filtrada de nuevo para eliminar posibles impurezas existentes que puedan interferir en la cristalización del complejo deseado.

Al cabo de unos días, se observa la presencia de cristales planos y romboédricos, y otros en forma de aguja, son estructuras cristalinas de la N¹-hexiltiminan de forma casi cuantitativa. No se ha obtenido más cristales del resto de la disolución amarilla.

2.4 Procedimientos experimentales realizados con el ion metálico Au⁺³.

Como se puede observar en la Tabla 1, la presencia de compuestos de metales con pares de bases en los que interviene el ion metálico Au⁺³ son escasos, solo se ha conseguido obtener un cristal del complejo mediante el uso de un cristal de ARN sumergido en una disolución que contiene el ion metálico Au⁺³.

Se han llevado a cabo procedimientos experimentales con dicho ion metálico en los que se ha utilizado como pares de bases guanosina-citidina y GMP-CMP con la intención de obtener un compuesto similar al obtenido mediante el cristal de ARN pero en

³¹ O. Renn, B. Lippert, A. Albinati, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **29** (1990) 84.

³² M. Mizutani, S. Miwa, N. Fukushima, Y. Funahashi, T. Ozawa, K. Jitsukawa, H. Masuda, *Inorg. Chim Acta*, **339** (2002) 543.

condiciones diferentes, haciendo uso de la formación de los pares de bases en disolución añadiendo posteriormente el ion metálico.

2.4.1 Procedimiento experimental para la formación del complejo G-Au-C usando como pares de bases la guanósina y la citidina.

Se disuelven 0,5 mmol de guanósina y 0,5 mmol de citidina en 50 ml de agua MilliQ, la formación de los pares de bases hace posible la solubilidad de la guanósina en agua, ya que es prácticamente insoluble. La disolución de los pares de bases se pone en agitación mientras se añade cuidadosamente gota a gota la disolución de la sal del metal que contiene 0,5 mmol de $\text{Na}(\text{AuCl}_4)$ en aproximadamente 5 ml. Se observa cómo se produce un cambio de coloración provocado por la adición de la sal del metal. La disolución pasa a ser de color marrón, como posiblemente pueda ser fotosensible se le aísla de la luz mediante papel de aluminio. Al poco tiempo se observa un precipitado casi instantáneo por ese motivo se filtra con una placa filtrante y puesto previamente en un vaso con agua-hielo, el precipitado resulta tener un color burdeos, dicho precipitado es redisoluto completamente con una disolución de HCl 1N hasta $\text{pH}=1$. Al día siguiente se observa más precipitado, aproximadamente la misma cantidad, se filtra de nuevo para llevar a cabo un espectro de IR y un RMN cuando se encuentre una vez seco.

Fórmula: $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{Au}_2\text{Cl}_4\text{N}_8\text{O}_{10}$ que corresponde a $(\text{AuCl}_2)_2(\text{guanósina desprotonada})(\text{citidina desprotonada})$.

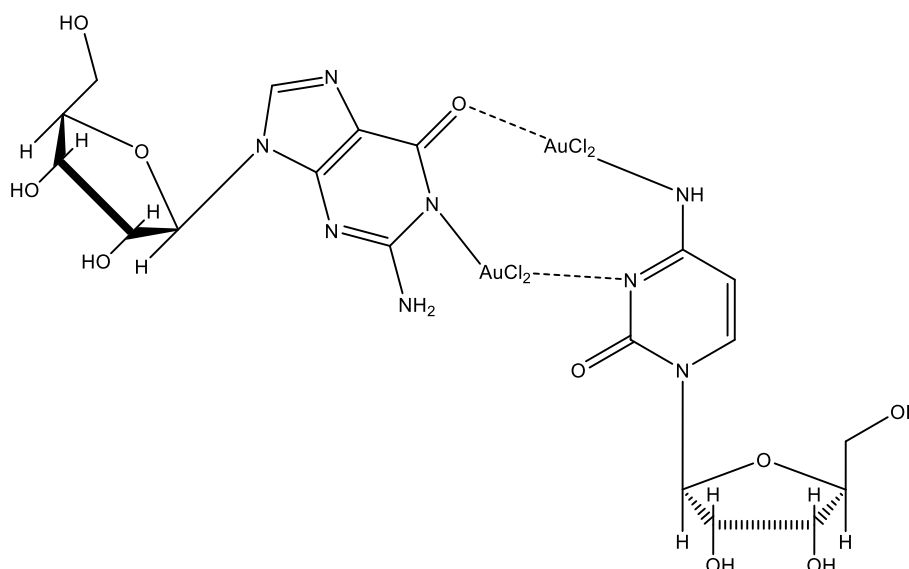


Figura 21. Representación del posible compuesto obtenido $(\text{AuCl}_2)_2(\text{guanósina desprotonada})(\text{citidina desprotonada})$.

Análisis elemental: C: 21,53 (calculado), 21,18 (experimental); H: 2,28 (cal.), 2,47(exp.); N: 13,38(cal.), 11,56(exp.).

IR (cm⁻¹) del compuesto: 619w, 772w, 861w, 1053s, 1177m, 1278m, 1347s, 1411s, 1503vs, 1639vs, 2930s, 3338vs.

IR (cm⁻¹) del ligando guanosina: 420w, 547m, 606s, 688vs, 748m, 775s, 822m, 881m, 918s, 1000m, 1049s, 1082vs, 1130vs, 1179s, 1223m, 1337s, 1395vs, 1425s, 1487vs, 1537vs, 1569s, 1624vs, 1692vs, 1733vs, 2731vs, 2896vs, 3208vs, 3571vs.

IR (cm⁻¹) del ligando citidina: 435w, 554s, 598s, 620s, 714vs, 790vs, 816s, 854m, 871m, 942s, 983s, 1054vs, 1101vs, 1135s, 1212s, 1247m, 1290vs, 1402s, 1431s, 1499vs, 1530vs, 1620vs, 1961w, 2919s, 3086vs, 3230vs, 3349vs, 3447vs.

Al comparar los espectros de IR del compuesto y de los ligandos se observa la desaparición de bandas y el desplazamiento de otras, propias de la coordinación de los ligandos con el ion metálico. También se puede observar como las bandas propias del anillo de la guanosina (1733vs, 1692vs, 1624vs cm⁻¹)^{29, 30} disminuyen su frecuencia en el espectro de IR del compuesto (1639vs, 1503vs cm⁻¹), indicando que se lleva a cabo la coordinación con el Au(III).

¹H RMN (DMSO-d₆) δ (ppm): No se ha obtenido un espectro de ¹H-RMN nítido, ya que el compuesto formado es insoluble en la gran mayoría de disolventes. Presenta mayor solubilidad en DMSO, e incluso en este caso la concentración disuelta no es suficiente para llevar a cabo un espectro de ¹H-RMN nítido.

2.4.2 Procedimiento experimental para la formación del complejo G-Au-C usando como pares de bases la guanosina-5-monofosfato y la citidina-5-monofosfato.

Este procedimiento experimental se lleva a cabo para obtener un espectro de ¹H-RMN aceptable y en continuo para averiguar lo que ocurre realmente durante el proceso de precipitación, ya que el obtenido en el procedimiento anterior no ha dado resultados concluyentes.

Se disuelven 0,1 mmol de CMP y GMP en 10 ml de agua MilliQ se agita durante 1 hora y se observa la formación de un gel producto de la formación del par de bases GMP-CMP. Al añadir 0,1 mmol de la sal del metal se observa cómo se va deshaciendo el gel, producido probablemente por la interacción del metal con el par de bases. El resultado final es que se mantiene todo en disolución, contrariamente al procedimiento experimental anterior. Al cabo de varios días aún se sigue manteniendo en disolución.

En el momento de redactar esta memoria todavía no ha aparecido precipitado que se pueda analizar.

2.5 Materiales y métodos.

Todos los reactivos, tanto orgánicos como inorgánicos, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, de calidad pro análisis y han sido usados sin purificación previa. Las bases sustituidas de cadena larga fueron sintetizadas de acuerdo con la bibliografía.^{17, 33, 34, 35,}

³⁶ En el caso de la N¹-hexiltimina se realizó un tratamiento para mayor purificación con base para formar el anión que se disuelve en agua y separarla de las impurezas de las timinas disustituidas en las posiciones N¹ y N³.

Los análisis elementales se llevaron a cabo en micro-analizadores Carlo Erba, modelo EA 1108, y Thermo Finnigan, modelo Flash EA 1112, por el servicio de microanálisis del instituto de química avanzada de Cataluña (IQAC) en Pedralbes Barcelona.

Los espectros de infrarrojo (IR) se tomaron en estado sólido (pastillas de KBr) y se midieron en el espectrómetro de la casa Broker Tensor 27, en un rango de número de onda de 4000 a 400 cm⁻¹.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (NMR) de ¹H se tomaron en el espectrómetro Bruker AMX300 a temperatura ambiente, empleando como disolventes dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆) y agua, usando sus correspondientes señales residuales como referencia. El desplazamiento químico de referencia para ambos es ¹H-NMR residual es δDMSO = 2.47 ppm y δD₂O = 4.79 ppm.

MALDI: Las mediciones de los espectros de masas se realizaron en un espectrómetro de masas Autoflex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) equipado con un láser de 200 Hz Smartbeam. Los espectros se registraron mediante el modo de reflexión positiva dentro del rango de masas de 60 a 1000 Da. La tensión IS1 era de 19 kV, la tensión del IS2 se mantuvo en 16.70 kV, la tensión de la lente era 8,10 kV, Reflector = 21.00 kV, Reflector 2 = 9,60 kV y el tiempo de retraso de extracción fue de 40 ns. La matriz empleada es trans-2-[3-(4-tert-Butilfenil)-2-metil-2-propenilidina]malononitrilo DCTB. En una proporción 50:10 matriz:muestra. Se depositaron 0.5 microlitros en una placa de maldi bruker (ground steel). Se realizaron un total de 500 disparos en tandas de 100 en 5 posiciones distintas de la placa. Se calibró internamente con PEG (polietilenglicol).

3 Resultados y discusión.

El objetivo esencial era obtener cristales de compuestos metálicos con pares de bases púricas y pirimidínicas atendiendo al escaso número de estructuras hasta ahora conocidas (Tabla 1). Este objetivo, pendiente de la valoración de un cristal enviado al

³³ M. Barceló-Oliver, C. Estarellas, A. García-Raso, A. Terrón, A. Frontera, D. Quiñonero, E. Molins, P. M. Deyà, *CrystEngComm*, **12** (2010) 362-365.

³⁴ M. Barceló-Oliver, C. Estarellas, A. García-Raso, A. Terrón, A. Frontera, D. Quiñonero, I. Mata, E. Molins, P. M. Deyà, *CrystEngComm*, **12** (2010) 3758-3767.

³⁵ M. Barceló-Oliver, A. Bauzá, B. A. Baquero, A. García-Raso, A. Terrón, E. Molins, A. Frontera, *Tetrahedron Letters*, **54** (2013) 5355-5360.

³⁶ M. Barceló Oliver, Tesis Doctoral: *Interaccions entre Ions Metàl·lics i Compostos d' Interès Biològic (Halouracils i derivats sintètics, Hipurats i Aciclovir)*, Universitat de les Illes Balears (2009).

cristalógrafo de Ag(I) con N¹-hexilcitosina, no se ha logrado. Cabe resaltar la dificultad del tema.

Se han obtenido sin embargo compuestos claramente caracterizados y cristalinos, sin que ningún monocristal tuviera la calidad suficiente.

En concreto Hg(N¹-hexiltiminato)₂, en el que el ligando pierde el protón del N³ por acción del metal. Este compuesto se ha intentado recrystalizar y obtener con diversos disolventes (metanol, acetonitrilo, acetona, acetona-agua y otros) y diversas sales (acetato, nitrato, cloruro); siempre se han obtenido precipitados cristalinos o microcristalinos pero ninguno adecuado para su estudio de difracción de rayos X. A partir de los datos espectroscópicos se confirma por ¹H-RMN la desprotonación del N³ y la presencia de las otras señales características del ligando con ligeros desplazamientos. Estos ligeros desplazamientos son propios de este tipo de ligandos pirimidínicos.

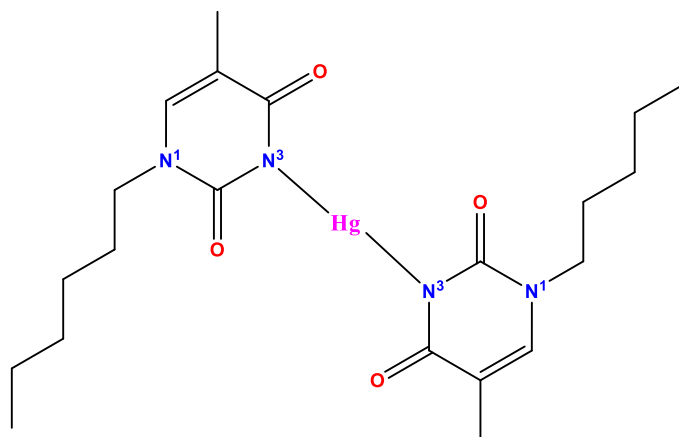


Figura 22. Estructura molecular del compuesto Hg(N¹-hexiltiminato)₂

Lo mismo ocurre con el complejo catiónico de plata Ag(N¹-hexilcitosina)₂(NO₃). En el que el catión plata enlaza posiblemente con el N³. En este caso se ha intentado también cambiar de anión, en concreto se ha utilizado el anión [SbF₆]⁻. La razón de escoger este agente precipitante no es tanto por la disminución del producto de solubilidad que se podría producir sino por las posibles interacciones anión- π que podrían tal vez obtenerse con los fluoruros terminales y la bases pirimidínica.²¹ De hecho se obtuvo un precipitado cristalino sin que se hubiera evaporado gran parte del disolvente metanol. En este tipo de compuestos se suele producir la formación de cristales cuando el disolvente ha casi desaparecido. Estas interacciones débiles pueden favorecer la nucleación del cristal como en casos anteriores.

En el caso de los pares de bases púrica-pirimidínica se han seguido dos estrategias: a) sintetizar primero el derivado con una base (como por ejemplo el compuesto [K(PtCl₃)(9-butiladenina)·3H₂O]) y poder proceder luego a la reacción con la segunda base; b) formación del par de bases en solución y hacerlo interaccionar con la sal metálica.

En el procedimiento a) hemos encontrado diversas dificultades. Por ejemplo la insolubilidad del complejo caracterizado $[K(PtCl_3)(9\text{-butiladenina})\cdot 3H_2O]$ que ha imposibilitado el segundo paso. En la reacción de compuestos con timina se nos han presentado fenómenos como la poca reactividad de la timina sin desprotonar y las reacciones red-ox secundarias de esta, especialmente si se desprotonaba en medio acuoso ($pK=9,8$).

En el caso del procedimiento b) nos hemos encontrado con situaciones diferentes. El ion $Hg(II)$ ha dado lugar a dendrímeros y fases no totalmente definidas o homogéneas. En el caso del ion $Pt(II)$ se ha producido la interacción preferentemente con una de las bases liberando la N^1 -hexiltimina (altamente insoluble en medio acuoso) sin que el deseado complejo ternario haya podido ser aislado.

Finalmente con el ion $Au(III)$ del que se conoce una interacción entre bases guanina y citosina en ARN^{24} la situación ha sido distinta y prometedora. Si bien en el caso de la utilización de bases como 9-etilguanina y citosina se produce un precipitado marrón insoluble en medio acuoso, otra perspectiva es posible utilizando nucleósidos o nucleótidos. En concreto, formando el par de bases utilizando guanosina y citidina se obtiene la disolución de éste (cabe recalcar que la guanosina es muy poco soluble en agua. Y se obtiene su disolución en este caso por la formación de los enlaces de hidrógeno Watson y Crick posiblemente). En este sistema Au -Guanosina-Citosina se consigue un precipitado definido, insoluble en agua y muy ligeramente soluble en DMSO. El análisis elemental y los espectros infrarrojos son concordantes con la fórmula propuesta en la Figura 20 sobre el compuesto $(AuCl_2)_2(\text{guanosina desprotonada})(\text{citidina desprotonada})$.

En ella se supone la desprotonación del N^1 del resto guanina, cosa que es factible, y la coordinación con el N^3 de la citosina. La coordinación de un metal a una base baja dramáticamente los pK de la base coordinada permitiendo la deprotonación de grupos amino, como indicó en muchos ejemplos Lippert,^{1,8,25,27,31} que permite el enlace con un segundo ion metálico. Obviamente el no poder realizar un estudio de RMN en solución lastra el ejemplo. Con $Au(III)$ se conocen algunos complejos aislados y cristalizados con bases, no con pares de bases. En concreto cabe señalar el complejo tricloruro(1-metilcitosinato)aurato(III) en el que el ion metálico se enlaza al N^3 .³⁷ También se ha descrito el tricloruro(1,9-dimetilguanina)aurato(III) en el que el Au se enlaza al N^7 de la base.³⁸ En este artículo también se indica la presencia de una cierta actividad red-ox del Au que afecta a la degradación de la guanina y la formación de especies de $Au(0)$ y $Au(I)$ de forma parcial a lo largo de semanas o meses.

Sin embargo, utilizando los mononucleótidos GMP y CMP se consiguen fases relativamente estables en medio acuoso, sin que haya hasta el momento sido posible aislarlas, que en futuros experimentos pueden ser estudiados.

³⁷ M. S. Holowaczak, M. D. Stancl, G. B. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **107** (1985) 5789-90.

³⁸ A. Shimanski, E. Fresissinger, A. Erxleben, B. Lippert, *Inorg. Chim. Acta*, **283** (1998) 223-32.