



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA Y FISICOQUÍMICA**

**Efecto de dimetil- $\beta$ -ciclodextrina en la interacción de  
moléculas heterocíclicas con ADN y metales de  
transición de importancia biológica**

**Memoria para optar al título de Químico**

**Erick Giovanni Faúndez Reyes**

**Patrocinante y Directora de Tesis**

**Dra. Carolina Jullian Matthaei**

**Director de Tesis**

**Dr. Gerald Zapata**

**Santiago, Diciembre 2016**

# Índice

## Tabla de contenido

Índice .....	i
Índice de tablas .....	ii
Índice de figuras .....	ii
Resumen .....	iv
Effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin on the interaction of heterocyclic molecules with DNA and transition metals of biological importance .....	v
1. Introducción.....	1
2. Hipótesis .....	6
3. Objetivo general .....	6
4. Objetivos específicos .....	6
5. Reactivos y Equipos .....	7
5.1 Reactivos .....	7
5.2 Equipos.....	7
6. Metodología .....	8
6.1 Caracterización espectroscópica de ligandos y complejos de inclusión L-DMCD .....	8
6.2 Determinación de la estequiometría de los complejos .....	9
6.3 Determinación de las constantes de asociación .....	10
6.4 Estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos .....	11
6.5 Modelamiento molecular de la interacción de los ligandos TPPM y C7 con DMCD .....	12
6.7 Determinación de la unión de los compuestos heterocíclicos con ADN.....	14
7. Resultados y discusión .....	15
7.1 Caracterización espectroscópica de ligandos y complejos de inclusión L-DMCD .....	15
7.2 Determinación de la estequiometría de los complejos .....	25
7.3 Determinación de las constantes de asociación .....	26
7.4 Estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos .....	30
7.5 Modelamiento matemático de la interacción de los ligandos TPPM y C7 con DMCD .....	32
7.6 Estudio de las propiedades de los ligandos y complejos frente a iones metálicos .....	36
7.7 Determinación de la unión de los compuestos heterocíclicos con ADN.....	41
8. Conclusiones .....	47
9. Referencias .....	48

# Índice de tablas

Tabla 6.1	Volúmenes de ligando y DMCD, para cada tubo en el análisis de job.....	9
Tabla 6.2	Volumen solución stock DMCD/TPPM/buffer en 10 tubos para determinación de Ka ...	10
Tabla 6.3	Volumen solución stock DMCD/C7/buffer en 10 tubos para determinación de Ka .....	10
Tabla 6.4	Concentraciones de ligandos y DMCD de las cuatro soluciones utilizadas en el análisis.	13
Tabla 6.5	concentraciones de las soluciones preparadas para el análisis de ADN .....	14
Tabla 7.1	Constantes de asociación para el ligando TPPM a distintas temperaturas y coeficiente de correlación para las distintas modelos.....	27
Tabla 7.2	Constantes de asociación para el ligando C7 a distintas temperaturas y coeficiente de correlación para los distinto modelos.....	29
Tabla 7.3	Parámetros termodinámicos obtenidos para los complejos TPPM-DMCD y C7-DMCD. .	31
Tabla 7.4	Datos obtenidos por docking para el proceso de formación del complejo TPPM-DMCD	33
Tabla 7.5	Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrogeno.....	34
Tabla 7.6	Tabla de comparación para las energías libres teóricas de los compuestos obtenidos por dinámica molecular y experimentalmente. ....	34
Tabla 7.7	Datos obtenidos por docking para el proceso de formación del complejo C7-DMCD.....	35
Tabla 7.8	Parámetros $n$ y $K_a$ obtenidos para el ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD de la interacción con ADN.....	42
Tabla 7.9	Tabla de $K_a$ y $n$ para la interacción de TPPM y ADN en distintos análisis. ....	44

# Índice de figuras

Fig. 1.1. Representación esquemática de quimiosensores fluorescentes integrados y espaciados al reaccionar con un analito.....	2
Fig. 1.2. Estructuras de los ligandos 6-([1,2,3] Triazolo[1,5-a]piridin-3-il)piridin-2-il)piridin-2-il)metanona (TPPM) y 3-(1H-benzimidazol-2-il)-7-(dietilamino) cromen-2-ona (C7). .....	3
Fig. 1.3. Estructura de $\alpha$ -Ciclodextrina, $\beta$ -Ciclodextrina y $\delta$ -Ciclodextrina. ....	4
Fig. 1.4. Estructura de Heptakis (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -ciclodextrina (DMCD). ....	5
Fig. 7.1. Espectros de absorción UV-vis en buffer HEPES pH 7,4 a 25°C para TPPM y TPPM-DMCD, [TPPM]= 0.02mM, [DMCD]= 7mM, .....	15
Fig. 7.2. Espectros de fluorescencia TPPM y TPPM-DMCD, en buffer pH 7.4, a 25°C [TPPM]=0,02 mM y [DMCD]= 7 mM, excitando a 320nm. ....	16
Fig. 7.3 Espectro de fluorescencia en función del pH, para el ligando TPPM a 30 °C, excitando a 320nm. ....	17
Fig. 7.4. Gráfico de variación de la intensidad de fluorescencia a 410 nm en función del pH para el ligando TPPM a 30 °C a 320 nm. ....	17
Fig. 7.5. Espectro de fluorescencia en función del pH para el complejo TPPM-DMCD a 30°C., excitando a 320nm.....	18
Fig. 7.6. Gráfico de intensidad de fluorescencia a 410nm en función del pH para el complejo TPPM-DMCD a 30°C. ....	18
Fig. 7.7. Gráfico comparativo de intensidad de fluorescencia en función del pH para el ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD, excitando a 320 nm, 30 °C y tomando el máximo a 410nm.....	19
Fig. 7.8. Espectros de absorbancia UV-vis de C7 y C7-DMCD, en buffer HEPES pH: 7,4, a 25 °C [C7]=0.5 mM y [DMCD]= 7 mM.....	20
Fig. 7.9. Espectros de fluorescencia C7 y C7-DMCD, en buffer HEPES pH: 7.4, a 25°C [C7]=0.5mM y [DMCD]= 7mM. ....	21
Fig. 7.10. Espectro de fluorescencia en función del pH para el ligando C7 a 30 °C. ....	21
Fig. 7.11. Gráfico de intensidad a 500nm de fluorescencia de C7 en función del pH. Excitando a 445 nm. ....	22
Fig. 7.12. Espectros de fluorescencia en función del pH para el complejo C7-DMCD a 30 °C, excitando a 445 nm. ....	22
Fig. 7.13. Gráfico de intensidad de fluorescencia a 500nm en función del pH para el complejo C7-DMCD a 30°C. ....	23
Fig. 7.14. Grafico comparativo de intensidad de fluorescencia en función del pH para el ligando C7 y el complejo C7-DMCD a 30°C, excitando a 450nm. ....	24
Fig. 7.15 Gráfico de Job para el complejo TPPM-DMCD a 30°C.....	25
Fig. 7.16 Gráfico de Job para el complejo C7-DMCD a 30°C. ....	25
Fig. 7.17. Serie de espectros de fluorescencia del complejo TPPM-DMCD, en buffer HEPES. 25 °C, pH 7,4 excitando a 320nm. ....	26
Fig. 7.18. Gráfico de intensidad de fluorescencia vs concentración de DMCD, a 25, 30 y 35 C, para el complejo TPPM-DMCD analizado con la ecuación 6.2.....	27

Fig. 7.19. Serie de espectros de fluorescencia del complejo C7-DMCD, a 25°C, en buffer HEPES pH 7,4.....	28
Fig. 7.20 Gráfico de intensidad de fluorescencia vs concentración de DMCD, a 25, 30 y 35°C, para el complejo C7-DMCD analizado con la ecuación 6.2 .....	29
Fig. 7.21. Gráfico de van` t Hoff para el complejo TPPM-DMCD. ....	30
Fig. 7.22 Gráfico de van` t Hoff para el complejo C7-DMCD.....	31
Fig. 7.23. Conformación estructural para el complejo TPPM-DMCD más probable (más favorecida), obtenido por docking molecular .....	32
Fig. 7.24. Conformación estructural para el complejo TPPM-DMCD de mejor energía de acoplamiento, obtenida por docking molecular .....	33
Fig. 7.25. Conformación estructural para el complejo C7-DMCD menor energía (más favorecida), obtenido por docking molecular. ....	35
Fig. 7.26. Espectros de fluorescencia del ligando TPPM (arriba) y el complejo TPPM-DMCD (abajo) al agregar metales. ....	36
Fig. 7.27. Screening TPPM en presencia (azul) y ausencia (rojo) de DMCD, pH 7.4 a 30 °C. ....	37
Fig. 7.28. Screening TPPM en presencia (azul) y ausencia (rojo) de Zn a 30°C, pH 7.4.....	38
Fig. 7.29. Espectros de fluorescencia del ligando C7 (arriba) y el complejo C7-DMCD (abajo) al agregar metales, a 30°C. ....	39
Fig. 7.30. Screening C7 en presencia (rojo) y ausencia (negro) de DMCD a 25°C, pH 7.4. ....	40
Fig. 7.31 Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción ligando TPPM con ADN a 30°C, r=0.98; pendiente=0.85; intercepto=3.5192. ....	41
Fig. 7.32. Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción complejo TPPM-DMCD con ADN a 30°C r=0.98; pendiente=0.86; intercepto=3.52746. ....	42
Fig. 7.33. Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción ligando TPPM con ADN en presencia de Zn a 30°C, r=0.97; pendiente=1.12; intercepto=6.87483. ....	43
Fig. 7.34. Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción complejo TPPM-DMCD con ADN en presencia de Zn a 30°C, r=0.97; pendiente=1.02; intercepto=6.0857. ....	44
Fig. 7.35. Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción ligando C7 con ADN a 30 °C, r=0.99; pendiente=0.43; intercepto=2.3811. ....	45
Fig. 7.36 Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción complejo C7-DMCD con ADN a 30°C, r=0.95; pendiente=0.56; intercepto=1.9574. ....	46

# Resumen

En esta tesis se estudió la complejación de los ligandos 6-([1,2,3]Triazolo[1,5-a]piridin-3-il)piridin-2-il)piridin-2-il)metanona (**TPPM**) y 3-(1H-benzimidazol-2-il)-7-(dietilamino) cromen-2-ona (**C7**) con 2,6 dimetil- $\beta$ -ciclodextrina (**DMCD**); además se analizó su posible aplicación como quimiosensores fluorescentes y las interacciones de estos con ADN.

Para ello se determinaron las constantes de asociación de cada complejo mediante técnicas fluorimétricas, a tres temperaturas de trabajo (25, 30 y 35° C).

Con esta información se realizó el estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos mencionados. Los resultados muestran que el proceso de formación de los complejos tanto TPPM-DMCD como C7-DMCD es espontáneo, ambos procesos son endotérmicos, y el proceso de inclusión está determinado por el factor entrópico.

A ambos complejos de inclusión se les realizó el estudio frente a diferentes metales divalentes (Zn (II), Ni (II), Mg (II), Cu (II), Co (II), Cd (II), Mn (II), Ca (II) y Fe (II)). Con el complejo de inclusión C7-DMCD no hubo grandes cambios por la presencia de los diferentes metales. En cambio el complejo TPPM-DMCD frente a Zn (II) presenta un aumento de intensidad de fluorescencia de casi 10 veces, presentándose como un buen quimiosensor fluorescente.

Se determinó la unión de los ligandos y complejos con ADN, mediante una titulación de ADN y posterior análisis fluorimétrico. El ligando C7 y el complejo C7-DMCD no presentaron sitios de unión o variaciones frente a ADN. Mientras que el ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD presentan interacción con ADN y un sólo sitio de unión, además se analizó el complejo TPPM-DMCD-Zn, el cual destacó por poseer un sólo sitio de unión y una constante de asociación de  $1,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

## Effect of dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin on the interaction of heterocyclic molecules with DNA and transition metals of biological importance

In this thesis was studied the complexation of ligands 6 - ([1,2,3] Triazolo [1,5-a] pyridin-3-yl) pyridin-2-yl) pyridin-2-yl) methanone (**TPPM**) and 3- (1H-benzimidazol-2-yl) -7- (diethylamino) chromen-2-one (**C7**) with 2,6-dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (**DMCD**). The possible application of these complexes as fluorescent chemosensors and the interactions of these with DNA were also analyzed.

For that, the association constants of each complex were determined by fluorimetric techniques, at three working temperatures (25, 30 and 35°C).

With this information was carried out the study of the thermodynamic properties of the mentioned complexes. The results show that the formation process of the complexes both TPPM-DMCD and C7-DMCD is spontaneous, both processes are endothermic, and the inclusion process is determined by the entropic factor.

Both inclusion complexes were subjected to the study of different divalent metals (Zn (II), Ni (II), Mg (II), Cu (II), Co (II), Cd (II), Mn (II), Ca (II) y Fe (II)); With the inclusion complex C7-DMCD there were no major changes in presence of different metals. In contrast, the TPPM-DMCD complex in presence of Zn, exhibits an increase in fluorescence intensity of almost 10 times, presenting as a good fluorescent chemosensor.

Binding of the ligands and complexes with DNA was determined by DNA titration and subsequent fluorimetric analysis. The C7 ligand and the C7-DMCD complex did not show binding sites or variations against DNA. While the TPPM ligand and the TPPM-DMCD complex exhibit interaction with DNA and a single binding site, the TPPM-DMCD-Zn complex was also analyzed, Which stands out for having a single binding site and an association constant of  $1.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ .

# 1. Introducción

Los metales tienen un rol fundamental en la sociedad actual desde un punto de vista industrial como también en el día a día de las personas, ya que desde el punto de vista de la salud los metales cumplen funciones biológicas de gran importancia. Por ejemplo, metales como el zinc, cobre, hierro y níquel juegan un papel importante como elementos traza en la construcción de tejidos y estructuras del cuerpo, en reacciones bioquímicas y en el metabolismo humano, en forma de metaloproteínas (hemoglobina que transporta oxígeno, anhidrasa carbónica que favorece la disociación del ácido carbónico, etc.).<sup>1,2,3</sup> Estos metales son inocuos en concentraciones trazas, pero son tóxicos a mayores concentraciones.

La ingesta de metales tanto por personas como por animales, se produce a través del agua y los alimentos, normalmente a dosis bajas; sin embargo, existen zonas geográficas donde la concentración de metales puede exceder lo recomendado (estas zonas normalmente poseen actividad industrial, agrícola o minera, o bien son zonas costeras).<sup>4,5,6</sup> Por consiguiente, es importante detectar y cuantificar la presencia de iones metálicos, aun cuando éstos se encuentren en bajas concentraciones, para evaluar riesgos de salud y para el monitoreo ambiental continuo.

Un enfoque interesante y de actualidad en el análisis de metales, es el uso de métodos basados en la espectroscopia de fluorescencia, debido a la gran selectividad, sensibilidad, tiempo de medición acotado y bajo costo.

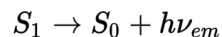
La fluorescencia es un tipo particular de luminiscencia, que caracteriza a ciertas sustancias las cuales son capaces de absorber energía en forma de radiaciones electromagnéticas y luego emitir parte de esa energía en forma de radiación electromagnética a una longitud de onda diferente.

La fluorescencia ocurre cuando un átomo o molécula vuelve a su estado fundamental después de haber sido excitada electrónicamente.

Excitación:



Fluorescencia (emisión) :



$h\nu$  = es un término genérico para la energía del fotón con

$h$  = constante de Planck

$\nu$  = frecuencia de la luz.

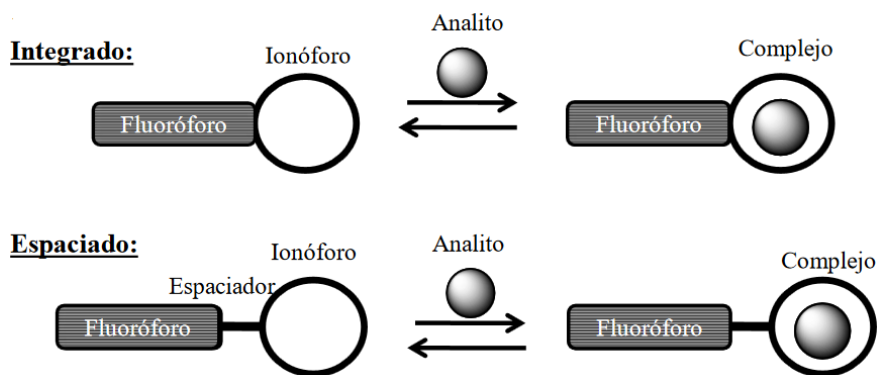


(Las frecuencias específicas de la luz excitadora y emitida son dependientes en cada sistema en particular). El estado  $S_0$  se llama estado fundamental de la molécula fluorescente y  $S_1$  es su primer estado electrónico excitado

En general las sustancias fluorescentes absorben energía en forma de radiación electromagnética de onda corta (ej: radiación gamma, rayos x, UV, etc), y luego la emiten nuevamente a una longitud de onda más larga; los ejemplos más notables de fluorescencia ocurren cuando la luz absorbida se encuentra dentro del rango ultravioleta del espectro -invisible al ojo humano y la luz emitida se encuentra en la región visible.

En las últimas décadas se han diseñado moléculas con la capacidad de detectar especies metálicas utilizando la fluorescencia como técnica de medición. A este tipo de moléculas sintéticas se les denomina **quimiosensores fluorescentes**.<sup>7</sup>

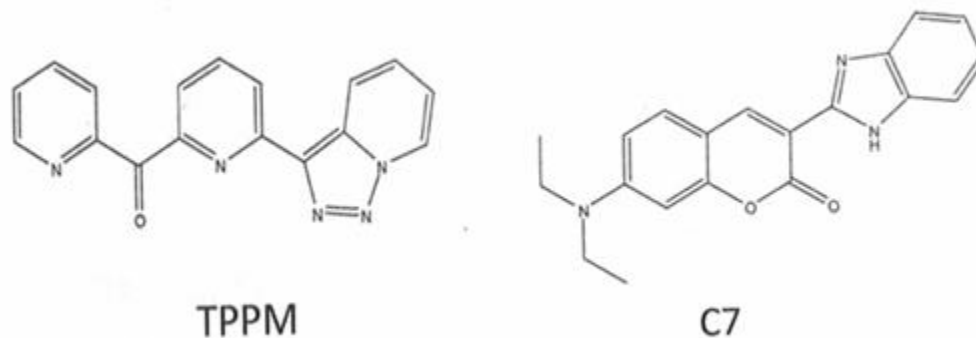
El diseño clásico de un quimiosensor fluorescente consta de dos entidades moleculares interconectadas: 1) un receptor o ionóforo responsable del reconocimiento y captación del analito y 2) un fluoróforo capaz de señalar el evento de reconocimiento. Estas entidades pueden estar juntas o separadas por una cadena, como se muestra en la Fig. 1.1.



**Fig. 1.1.** Representación esquemática de quimiosensores fluorescentes integrados y espaciados al reaccionar con un analito.

El receptor normalmente está constituido por 2 o más heteroátomos tales como N, O, y/o S debido a que éstos tienen pares de electrones libres disponibles que se enlazan a los metales mediante sus orbitales  $d$  desocupados. Dentro de estos heteroátomos destaca el nitrógeno ya que se han desarrollado una gran cantidad de sensores en el último tiempo que lo contienen.<sup>8,9</sup> En el caso del fluoróforo, la fluorescencia más intensa es la que presentan los compuestos aromáticos, seguido de los compuestos que contienen estructuras alifáticas y alicíclicas de carbonilo o estructuras con dobles enlaces conjugados que pueden presentar fluorescencia.<sup>10</sup>

De acuerdo a lo anterior, en esta tesis se propone el estudio de dos ligandos como candidatos de quimiosensores fluorescentes. Los ligandos (L) 6-([1,2,3]Triazolo[1,5-a]piridin-3-il)piridin-2-il)piridin-2-il)metanona (**TPPM**) y 3-(1H-benzimidazol-2-il)-7-(dietilamino)cromen-2-ona (**C7**) (Fig.1.2 a y b, respectivamente) los cuales pueden presentar propiedades quelantes interesantes con metales de transición debido a los heteroátomos de su estructura y son de interés debido a sus grupos funcionales aromáticos<sup>11,12</sup>.



**Fig. 1.2.** Estructuras de los ligandos 6-([1,2,3] Triazolo[1,5-a]piridin-3-il)piridin-2-il)piridin-2-il)metanona (TPPM) y 3-(1H-benzimidazol-2-il)-7-(dietilamino) cromen-2-ona (C7).

Una solubilidad en ambiente acuoso es necesaria para utilizar el quimiosensor en cuerpos biológicos. Sin embargo, estos ligandos poseen una solubilidad baja en ambientes acuosos y en condiciones fisiológicas. Esta solubilidad limitada se puede solucionar utilizando ciclodextrinas (CD) para formar complejos de inclusión L-CD, que de acuerdo a estudios anteriores mejora notoriamente la solubilidad de los ligandos.

Las **ciclodextrinas** son oligosacáridos cíclicos con una cavidad interior en su estructura. Las CD tienen una estructura en forma de cono truncado con una cavidad interior de 5 a 8 Å, y poseen una capacidad hidrofóbica debido a los enlaces C-H. Los pares de electrones no enlazantes de los oxígenos glicosídicos se dirigen hacia el interior de la cavidad, produciendo una alta densidad electrónica y mostrando carácter de base de Lewis. Las CD muestran además una capacidad hidrofílica en su superficie externa,<sup>13</sup> lo que a la ha llevado a convertirse en un compuesto popular para la formación de estructuras supramoleculares.

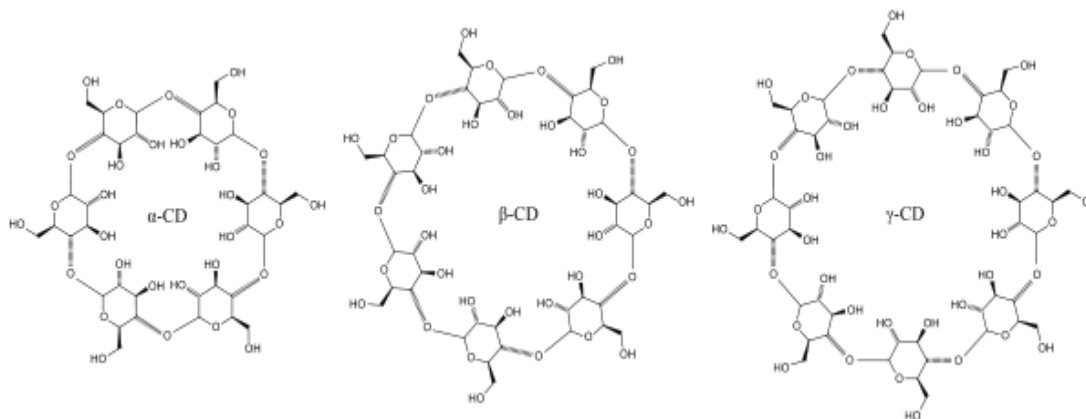
Según el número de unidades de glucosa que forman la ciclodextrina, ésta se nombra con una letra griega diferente:

$\alpha$ -Ciclodextrina: n = 6 moléculas de glucosa (Diámetro/Altura de la cavidad: 4,7..5,3/7,9A).

$\beta$ -Ciclodextrina: n = 7 moléculas de glucosa (Diámetro/Altura de la cavidad: 6,0..6,5/7,9A).

$\gamma$ -Ciclodextrina: n = 8 moléculas de glucosa (Diámetro/Altura de la cavidad: 7,5..8,3/7,9A).

$\delta$ -Ciclodextrina: n = 9 moléculas de glucosa.



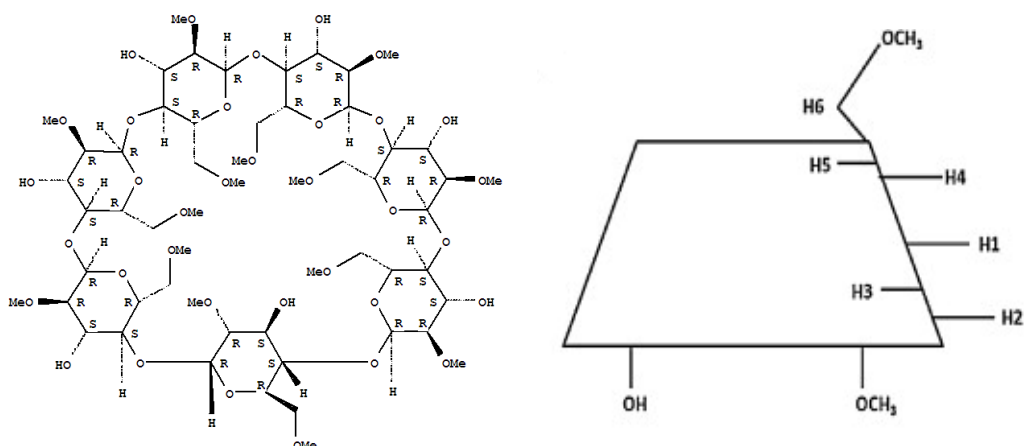
**Fig. 1.3.** Estructura de  $\alpha$ -Ciclodextrina,  $\beta$ -Ciclodextrina y  $\delta$ -Ciclodextrina.

Dependiendo del volumen del ligando se debe elegir una CD acorde, para una inclusión exitosa.

De esta manera la molécula huésped puede ingresar en un medio hidrofílico sin necesariamente cambiar su solubilidad, sino es la ciclodextrina en sí la que se disuelve en agua mientras que la molécula huésped está en el interior hidrofóbico de la ciclodextrina. Entre las ventajas que presentan las ciclodextrinas, destacan su baja toxicidad, lo que permite que sean utilizadas en química analítica, agricultura, en industrias farmacéuticas y alimentarias.<sup>13</sup>

Sin embargo, las CD naturales tienen una solubilidad limitada en agua. Para cambiar las propiedades físicas y químicas de las ciclodextrinas se han desarrollado diversos derivados. Unos de los más utilizados son los derivados parcialmente metilados que tienen una solubilidad en agua hasta 150 veces superior a la del producto de partida.<sup>14</sup>

Debido a lo antes mencionado se elige a la Heptakis(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -ciclodextrina (DMCD) como molécula receptora de los ligandos (Fig. 1.4), ya que al metilar los grupos hidroxilos libres, produce un aumento en la solubilidad de la CD y además modifica la capacidad de complejación de la misma.<sup>14,15,16</sup>



**Fig. 1.4.** Estructura de Heptakis (2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -ciclodextrina (DMCD).

Con la formación del complejo L-DMCD se soluciona el problema de solubilidad; sin embargo, es necesario determinar la estabilidad del complejo de inclusión y la selectividad del proceso de complejación. Las constantes de asociación ( $K_a$ ) son índices útiles de la fuerza vinculante y son de gran ayuda para la comprensión y evaluación de la formación del complejo de inclusión.

Es importante también señalar que los compuestos heterocíclicos aromáticos son fundamentales en la estructura de los cuerpos biológicos y en la funcionalidad de algunos mecanismos, estos compuestos también pueden presentar actividad biológica destacando su posible uso en farmacología.<sup>17,18</sup> El diseño de compuestos que se unan selectivamente a las secuencias o estructuras específicas del ADN, es un área de gran interés.<sup>19,20</sup> Las pequeñas moléculas sintéticas que se intercalan en uno o más puntos con las secuencias de ADN podrían ser utilizadas para inhibir selectivamente o modular la expresión genética, por lo que son valiosos para una variedad de estrategias de quimioterapia.<sup>21,22</sup>

Los ligandos al complejarse con la DMCD adquieren conformaciones que pueden o no dejar expuestos a los heteroátomos, que son los que pueden interactuar con ADN, por lo que es importante analizar la conformación espacial que adquieren los ligandos al unirse con la DMCD. Una herramienta muy útil en este sentido es el acoplamiento molecular o *docking*, este es un método que predice la conformación preferida de una molécula, al estar unida a otra, con el fin de formar un complejo estable.

## 2. Hipótesis

De acuerdo a las características hidrofóbicas de los ligandos TPPM y C7, éstos podrían ser candidatos para ser incluidos en la DMCD, mejorando así su solubilidad en solución acuosa. Debido a la presencia de heteroátomos y aromaticidad en su estructura, los ligandos TPPM y C7 serían candidatos para formar complejos con metales y podrían ser usados como quimiosensores fluorescentes y con muy buenas posibilidades de presentar interacciones con ADN.

## 3. Objetivo general

Formación de los complejos de inclusión de 6-([1,2,3]Triazolo[1,5- a]piridin-3- il)piridin-2- il)piridin-2-il)metanona (**TPPM**) y 3-(1H- benzimidazol-2- il)-7- (dietilamino)cromen-2- ona (**C7**) con 2,6-dimetil  $\beta$ -ciclodextrina para estudiar el efecto de metales de transición y ADN sobre los complejos de inclusión formados.

## 4. Objetivos específicos

- I. Formación de los complejos de inclusión TPPM y C7 con 2,6-dimetil  $\beta$ -ciclodextrina.
- II. Determinar constantes de asociación de los complejos formados a diferentes temperaturas.
- III. Estudiar las propiedades termodinámicas de los complejos.
- IV. Determinar la estequiometría de los complejos.
- V. Hacer estudios de modelamiento molecular de los ligandos TPPM y C7 con DMCD.
- VI. Realizar estudios espectroscópicos a los ligandos TPPM y C7 frente a metales de transición.
- VII. Determinar la unión y sitios de unión de los ligandos y complejos L-DMCD con ADN.

# 5. Reactivos y Equipos

## 5.1 Reactivos

- ❖ 6-([1,2,3]Triazolo[1,5-a]piridin-3-il)piridin-2-il)piridin-2-il)metanona (TPPM)
- ❖ 3-(1H-benzimidazol-2-il)-7-(dietilamino)cromen-2-ona (C7). 98%. Marca Aldrich
- ❖ Heptakis (2,6-di-*O*-methyl)- $\beta$ -ciclodextrina (DMCD).98%. Marca Aldrich
- ❖ Buffer HEPES 7.4
- ❖ Metanol grado analítico.
- ❖ Buffer Britton Robinson
- ❖ Perclorato de cobalto (II) hexahidratado. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de cadmio (II) hidratado. 99.999%. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de manganeso (II) hidratado. 99%. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de níquel (II) hexahidratado. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de hierro (II) hidratado 98%. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de calcio (II) tetrahidratado. 99%. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de cobre (II) hexahidratado. 98%. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de Zinc (II) hexahidratado. Marca Aldrich
- ❖ Perclorato de magnesio (II) hexahidratado. 99%. Marca Aldrich.

## 5.2 Equipos

- ❖ Los espectros de emisión, se registraron en un Espectrómetro de Luminiscencia Perkin Elmer LS 55, acoplado a baño termorregulado marca Lauda modelo Alpha Ra 8. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El software correspondiente al equipo es FL Winlab y los espectros se analizaron utilizando Origin.
- ❖ Los espectros de Absorción Molecular fueron obtenidos en un equipo Agilent 8453. Las celdas utilizadas fueron de cuarzo con paso óptico de 1 cm.
- ❖ La formación de complejos se realizó en un Baño termorregulado con vibración Thermo Scientific modelo 2875.
- ❖ El pH fue medido utilizando un pHmetro Oaklon modelo acorn series.

## 6. Metodología

### 6.1 Caracterización espectroscópica de ligandos y complejos de inclusión L-DMCD

Debido a la baja solubilidad de los ligandos en agua, la preparación de los complejos de inclusión se realizó disolviendo 0.001 g aproximadamente de ligando en 1 mL de metanol. De esta solución se tomaron alícuotas de 20  $\mu$ L, que se agregaron a una solución de 3mL de DMCD, con la concentración adecuada para formar una solución 1:1 Ligando-DMCD, contenidas en frascos ámbar mantenidos en un baño termostático con vibración durante 24 horas, en condiciones de temperatura controlada 25, 30 y 35°C respectivamente.

En esta tesis se utilizó Buffer Britton Robinson 0,1 M, el cual tiene la característica de poder utilizarlo en un amplio rango de pH. Se trabajó en un rango de pH de 2- 12.

Para el estudio de pH se prepararon 80 mL de una solución de ligando 0.05 mM y a esta solución se le modificó el pH con una solución concentrada de NaOH. Se tomaron alícuotas de 2,4 mL a medida que varía el pH de la solución, de las cuales se registran espectros UV-vis y fluorescencia.

Para el complejo ligando -ciclodextrina se procede de la misma manera, comenzando con concentraciones  $[L]=0,05$  mM y  $[DMCD]= 5$  mM.

Finalmente se graficó el máximo de emisión de fluorescencia en función del pH.

## 6.2 Determinación de la estequiometría de los complejos

Para determinar la estequiometría de los complejos de inclusión se utilizó el método gráfico de Job.<sup>23</sup> Este método se ideó para determinar experimentalmente la relación estequiométrica en la que se combinan los reactivos en una reacción. Se basa en la realización de una serie de reacciones empleando cantidades diferentes de cada reactivo pero manteniendo constante la cantidad total de ambos. Puede entonces medirse una variable del sistema, relacionada con la masa, y representarse gráficamente contra las cantidades de reactivos utilizadas.

Para esto se preparó una solución de DMCD 0,1 mM y una solución de ligando 0,1 mM, y a partir de estas soluciones se prepararon diez tubos (ver Tabla 6.1) que se analizaron mediante espectroscopia de fluorescencia.

**Tabla 6.1** Volúmenes de ligando y DMCD, para cada tubo en el análisis de Job.

N° de tubo	volumen L (μL)	volumen DMCD (μL)
1	300	2700
2	600	2400
3	900	2100
4	1200	1800
5	1500	1500
6	1800	1200
7	2100	900
8	2400	600
9	2700	300
10	3000	0

Diversos espectros de fluorescencia fueron registrados, excitando a 320 nm para TPPM y 450 nm para C7. Posteriormente, se graficó la fluorescencia en función de la fracción molar del ligando utilizado.

Esta metodología permite determinar la relación estequiométrica de inclusión de acuerdo a la ecuación 6.1 como sigue:

$$n = (1-x)/x \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Dónde:

x : fracción molar donde se observa el máximo

n : relación estequiométrica anfitrión: huésped



### 6.3 Determinación de las constantes de asociación

La determinación de las constantes de asociación se realizó utilizando espectroscopia de fluorescencia, para lo cual se prepararon los complejos de inclusión agregando cantidades de L y DMCD de acuerdo a las tablas 6.2 y 6.3 en frascos ámbar, (donde la concentración del ligando en cada tubo fue de 0,026 mM para TPPM y 0,012 mM para C7, y las concentraciones de ciclodextrina variando desde 0 a 0,01 M) y llevados a un baño termostático con vibración durante 24 h, en condiciones de temperatura controlada 25, 30 y 35 °C respectivamente.

**Tabla 6.2** Volumen solución stock DMCD/TPPM/buffer en 10 tubos para determinación de Ka

N° frasco	L (μL)	DMCD (μL)	buffer HEPES 7.4 (μL)
1	20	0	2700
2	20	100	2600
3	20	200	2500
4	20	300	2400
5	20	400	2300
6	20	500	2200
7	20	1000	1700
8	20	1500	1200
9	20	2000	700
10	20	2700	0

**Tabla 6.3.** Volumen solución stock DMCD/C7/buffer en 10 tubos para determinación de Ka

N° frasco	L (μL)	DMCD (μL)	buffer HEPES 7.4 (μL)
1	10	0	2700
2	10	100	2600
3	10	200	2500
4	10	300	2400
5	10	400	2300
6	10	500	2200
7	10	1000	1700
8	10	1500	1200
9	10	2000	700
10	10	2700	0

Una vez finalizado el tiempo de agitación se procedió a registrar los espectros de fluorescencia, excitando a 320 nm para TPPM y 450 nm para C7.

Se determinó la constante de asociación de acuerdo a la ecuación de decaimiento de fluorescencia (ecuación 6.2) donde  $F_0$  es la fluorescencia medida en ausencia de ligando,  $F_\infty$  es fluorescencia al tiempo infinito,  $F$  es la fluorescencia medida y  $K_a$  corresponde a la constante de asociación.

$$F = F_0 + \frac{(F_\infty - F_0)K_a[DMCDs]_0}{1 + K_a[DMCDs]_0} \quad \text{Ecuación 6.2}$$

## 6.4 Estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos

Los parámetros termodinámicos se obtuvieron siguiendo la formación de los complejos de inclusión a diferentes temperaturas (25, 30 y 35°C).

Una vez obtenidas las constantes de asociación de los complejos L-DMCD, mediante la ecuación de van't Hoff (ecuación 6.2) se graficó Ln Ka versus 1/T. De acuerdo a esto se obtiene una ecuación de la recta correspondiente a la ecuación 6.3

$$\ln K_a = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Dónde:

$$R = 8.314 \text{ J/K}^*\text{mol}$$

Ka = constante de asociación

T = temperatura en grados kelvin

$\Delta H$  = variación de entalpía

$\Delta S$  = variación de entropía

A partir de esta ecuación de la recta, se obtiene la pendiente (ecuación 6.4) que corresponde a la variación de entalpía y el intercepto (ecuación 6.5) del cual se puede obtener la variación de entropía.

$$\textit{pendiente} = -\frac{\Delta H}{R} \quad \text{Ecuación 6.4}$$

$$\textit{intercepto} = \frac{\Delta S}{R} \quad \text{Ecuación 6.5}$$

Luego, con los valores de  $\Delta H$  y  $\Delta S$  obtenidos experimentalmente, se obtiene el valor de  $\Delta G$  a 298 K utilizando la ecuación de la energía libre de Gibbs (ecuación 6.6):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad \text{Ecuación 6.6}$$

## 6.5 Modelamiento molecular de la interacción de los ligandos TPPM y C7 con DMCD

Los ligandos TPPM y C7 fueron construidos utilizando el programa GaussView, y posteriormente fueron optimizados utilizando el programa Gaussian 09, a nivel HF y usando un conjunto de bases 6-31G(d). Las cargas Merz Kollman de los ligandos fueron obtenidas utilizando la ruta pop=mk iop(6/33=2).

Utilizando la estructura de la DMCD obtenida de una cristalografía de rayos x desde el Protein data bank, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando el programa AutoDock 4.0 para los complejos, TPPM-DMCD y C7-DMCD, respectivamente.

Los mapas de grilla fueron calculados usando AutoGrid4, el cual, realiza un pre-cálculo de reconocimiento de cada tipo de átomo dentro de la grilla y de los átomos del ligando. El volumen escogido para los mapas de grilla fue de 40x40x40 puntos, con un punto de grilla de 0,375 Å y la opción de detectar automáticamente el centro de rotación de los ligandos.

Posteriormente se realizó el acoplamiento con el Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), en el cual se utilizaron las siguientes condiciones: población con número de individuos igual a 50, número máximo de evaluaciones de energía 2500000, número máximo de 27000 generaciones, velocidad de mutación de 0,02 y velocidad de entrecruzamiento de 0,08. Las evaluaciones se realizaron con dieléctrico por defecto y la elección de la conformación más estable fue basada de acuerdo a la puntuación energética (scoring), a la población de estructuras obtenidas y con respecto al conocimiento previo sobre la actividad correspondiente a cada ligando.

Como resultado de estos estudios de docking molecular se obtuvieron las mejores conformaciones de los ligandos dentro de la ciclodextrina.

Estas estructuras fueron finalmente usadas para simulaciones de dinámica molecular con el fin de obtener energías libres de los complejos utilizando la metodología MMPBSA.

## 6.6 Estudio de las propiedades de los ligandos y complejos frente a iones metálicos

Se prepararon 4 soluciones de los ligandos de acuerdo a la tabla 6.4.

**Tabla 6.4.** Concentraciones de ligandos y DMCD de las cuatro soluciones utilizadas en el análisis.

	TPPM	C7	DMCD
solución 1	0,4 mM	0	0
solución 2	0,4 mM	0	3 mM
solución 3	0	0,6 mM	0
solución 4	0	0,6 mM	3 mM

Se prepararon soluciones de 5 mL de sales de perclorato aproximadamente 20 mM, de los siguientes metales: Zn (II), Ni (II), Mg (II), Cu (II), Co (II), Cd (II), Mn (II), Ca (II) y Fe (II).

De cada una de las soluciones preparadas de acuerdo a la Tabla 6.4, se tomaron alícuotas de 2,7 mL y se agregaron cantidades suficientes de las soluciones de perclorato para obtener una concentración de 0,01 M de metal, proceso que se repitió por separado para el análisis de cada metal, se midieron sus espectros de fluorescencia, para comparar los máximos de intensidad normalizados con un blanco y analizar la sensibilidad de los ligandos.

Además, es importante analizar la selectividad de los complejos como quimiosensores; por lo que, a las soluciones anteriores que ya poseen la alícuota de perclorato de metal (II) se agregaran alícuotas del metal al cual se medirá la selectividad, comparando el efecto de este en la intensidad del máximo de fluorescencia.

## 6.7 Determinación de la unión de los compuestos heterocíclicos con ADN

Varias soluciones fueron preparadas de acuerdo a la Tabla 6.5. A estas soluciones se adicionaron alícuotas de 20 a 200  $\mu\text{L}$  hasta el plató ADN para obtener una recta, de donde es posible calcular los sitios de unión de los compuestos con ADN

**Tabla 6.5** concentraciones de las soluciones preparadas para el análisis de ADN

	TPPM	C7	DMCD	Zn
solución 1	0,4 mM	0	0	0
solución 2	0.4 mM	0	3 mM	0
solución 3	0	0.65 mM	0	0
solución 4	0	0.65 mM	3 mM	0
solución 5	0.4 mM	0	0	10 mM
solución 6	0.4 mM	0	3 mM	10 mM

Se prepararon 500  $\mu\text{L}$  de una solución de ADN a la cual se le calculó su concentración mediante absorción UV-vis utilizando la ecuación 6.7

$$A = \epsilon * b * c \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Dónde:

A=absorción

$\epsilon$ = absortividad molar ( $6600 [\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$  en el caso del ADN a 260 nm)

B= ancho de la cubeta (1 [cm])

C= concentración molar de la solución.

Una vez obtenida la concentración de ADN, se realizó una titulación de ADN sobre la solución de ligando o de complejo a temperatura constante (25, 30 y 35°C) y se graficó  $\text{Log} [\text{ADN}]$  vs  $\text{Log} \frac{F_0 - F}{F}$ , Obteniéndose una ecuación de la recta correspondiente a la ecuación 6.8.

$$\text{Log} \frac{F_0 - F}{F} = n \text{Log} [\text{ADN}] + \text{Log} K_a \quad \text{Ecuación 6.5}$$

Dónde:

$F_0$  = fluorescencia del blanco.

$K_a$  = constante de asociación ADN-ligando

F = fluorescencia

n = número de lugares de enlace ligando-ADN

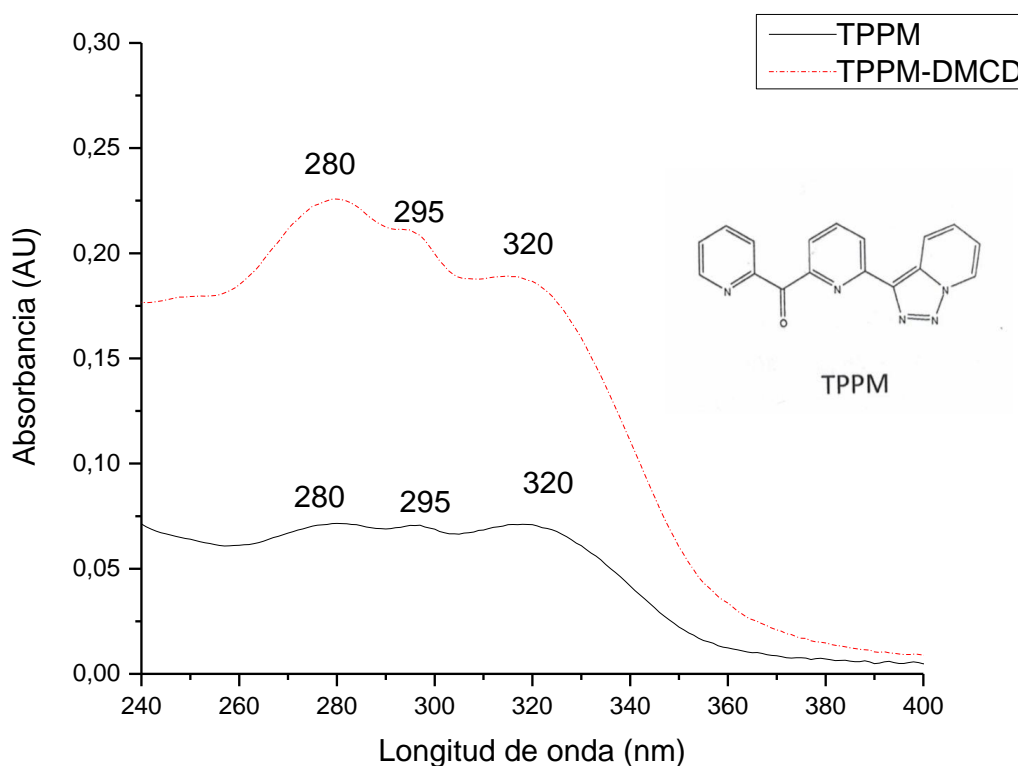
La titulación sigue un comportamiento lineal donde "Log  $K_a$ " corresponde al intercepto y "n" a la pendiente,  $Y = ax + b$ .

# 7. Resultados y discusión

## 7.1 Caracterización espectroscópica de ligandos y complejos de inclusión L-DMCD

### *Ligando TPPM*

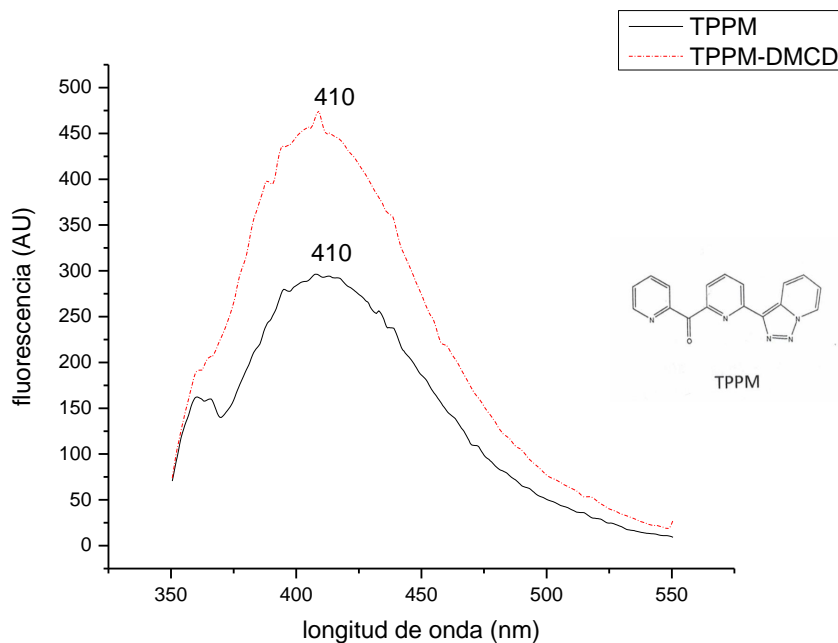
Para el caso del ligando TPPM, se tomaron espectros UV-vis y de fluorescencia antes y después de la formación del complejo, los que se pueden observar en la Fig. 7.1



**Fig. 7.1.** Espectros de absorción UV-vis en buffer HEPES pH 7,4 a 25°C para TPPM y TPPM-DMCD, [TPPM]= 0.02mM, [DMCD]= 7mM,.

Se puede apreciar que los máximos no sufren desplazamientos, pero la intensidad en el caso del complejo se ve aumentada notoriamente, por lo que se infiere que el complejo TPPM-DMCD se formó exitosamente, debido a que el ligando TPPM se encuentra en la misma concentración en ambos casos y el aumento de intensidad es atribuible a que el complejo TPPM-DMCD tiene la capacidad de almacenar más energía.

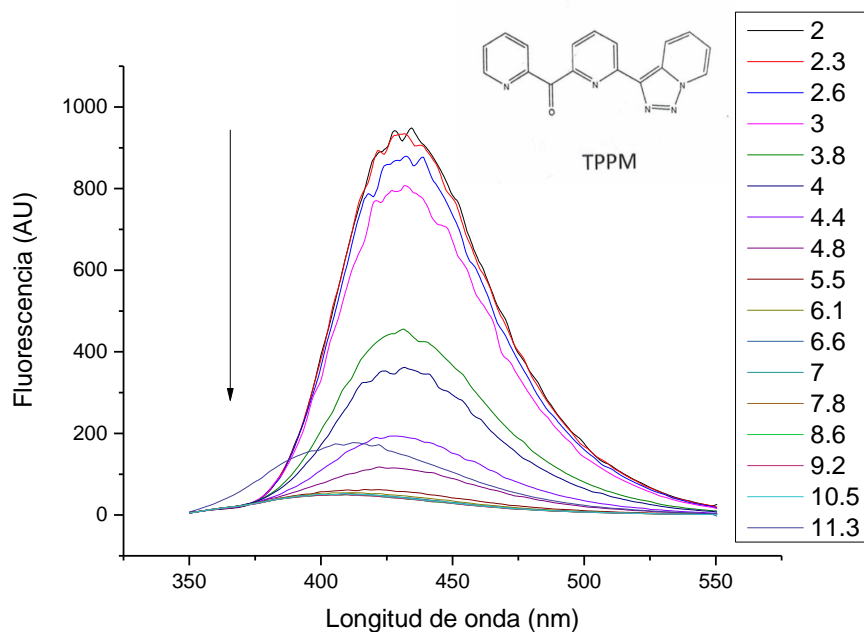
En los espectros de fluorescencia se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia, como se observa en la Fig. 7.2. De acuerdo a estos datos se corrobora la formación del complejo TPPM-DMCD.



**Fig. 7.2.** Espectros de fluorescencia TPPM y TPPM-DMCD, en buffer pH 7.4, a 25°C [TPPM]=0,02 mM y [DMCD]= 7 mM, excitando a 320nm.

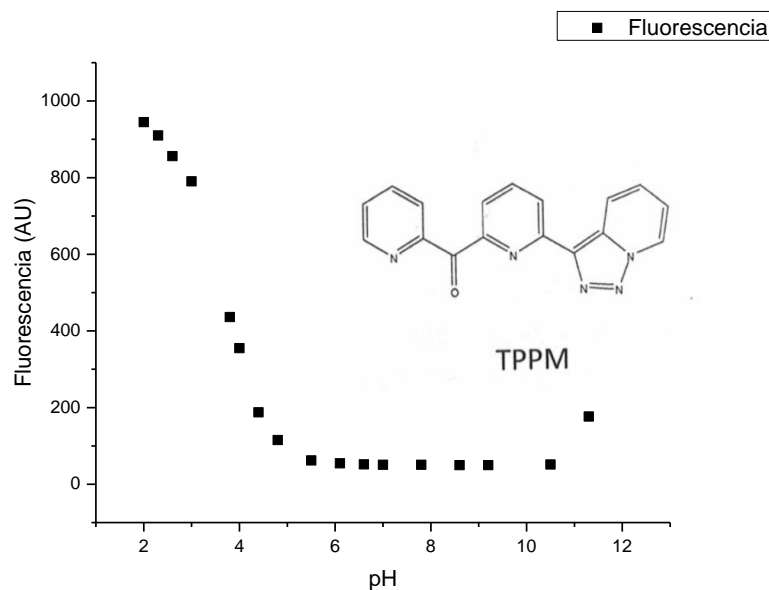
Como se desea un quimiosensor para detectar metales en ambiente acuoso, es necesario que el ligando y el complejo no presenten variación en la intensidad de fluorescencia en el rango de pH 6-8.

Se analizó el espectro de fluorescencia en función del pH excitando en el máximo de absorbancia de menor energía que en este caso corresponde a 320 nm, como se observa en la Fig. 7.3.



**Fig. 7.3** Espectro de fluorescencia en función del pH, para el ligando TPPM a 30 °C, excitando a 320nm.

Se observó un desplazamiento del máximo de fluorescencia y una variación en la intensidad, se realizó un gráfico de intensidad de fluorescencia en función del pH para observar la variación de intensidad, como se observa en la Fig. 7.4.

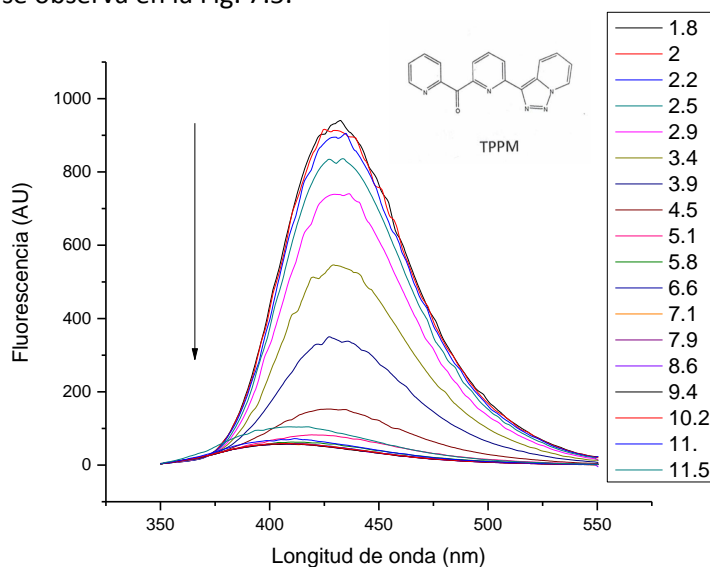


**Fig. 7.4.** Gráfico de variación de la intensidad de fluorescencia a 410 nm en función del pH para el ligando TPPM a 30 °C a 320 nm.



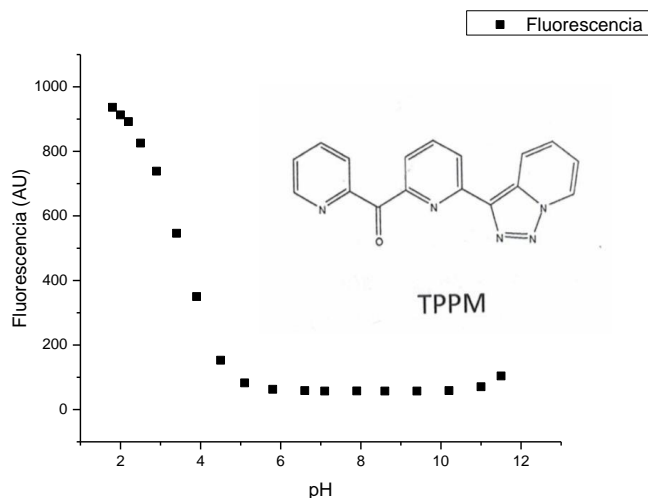
En esta figura se observó una disminución de la intensidad de fluorescencia con el aumento del pH, hasta un valor de 6, donde la intensidad permanece constante hasta pH 11. Lo cual da un amplio rango de trabajo, por lo cual sería adecuado para trabajar como quimiosensor en ambiente acuoso

También se analizó la intensidad de fluorescencia en función del pH para el complejo TPPM-DMCD, como se observa en la Fig. 7.5.



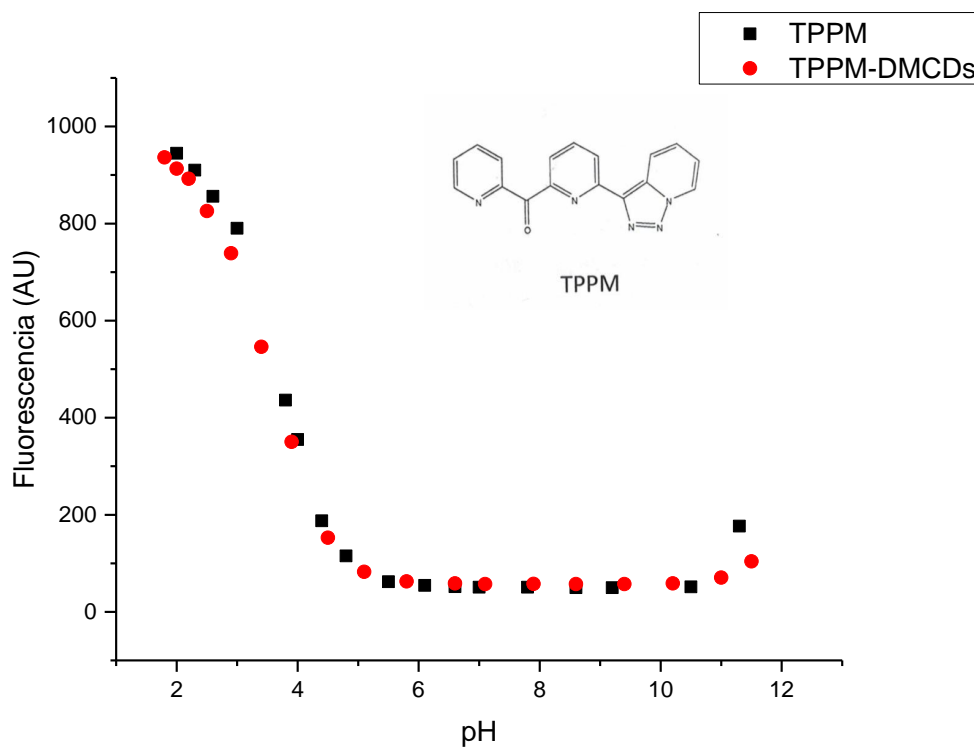
**Fig. 7.5.** Espectro de fluorescencia en función del pH para el complejo TPPM-DMCD a 30°C., excitando a 320nm.

Se observó un desplazamiento del máximo de fluorescencia y una variación en la intensidad. De igual forma que para el ligando TPPM, se analizó la intensidad de fluorescencia en función del pH del complejo TPPM-DMCD, como se observa en la Fig. 7.6.



**Fig. 7.6.** Gráfico de intensidad de fluorescencia a 410nm en función del pH para el complejo TPPM-DMCD a 30°C.

Se compararon los resultados del ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD. Para comprobar si la presencia DMCD afecta la intensidad de fluorescencia en función del pH, se analizaron a iguales concentraciones de TPPM y en el caso del complejo en un exceso de DMCD, para asegurarse la completa formación de éste, ajustando los slits excitación y emisión para que comenzaran en puntos similares. Todo esto en función del pH, como se observa en la Fig. 7.7.

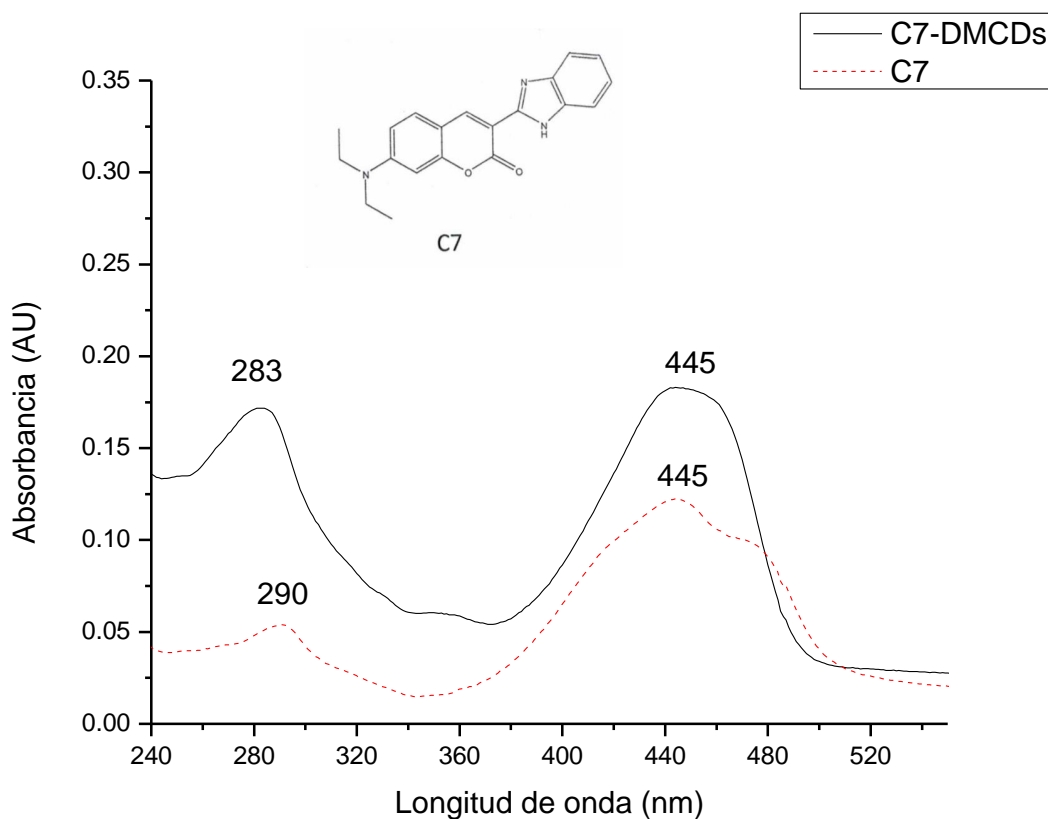


**Fig. 7.7.** Gráfico comparativo de intensidad de fluorescencia en función del pH para el ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD, excitando a 320 nm, 30 °C y tomando el máximo a 410nm.

Las intensidades medidas poseen un comportamiento idéntico. El complejo es ideal para trabajar ópticamente en fluorescencia en el rango de pH 6-11.

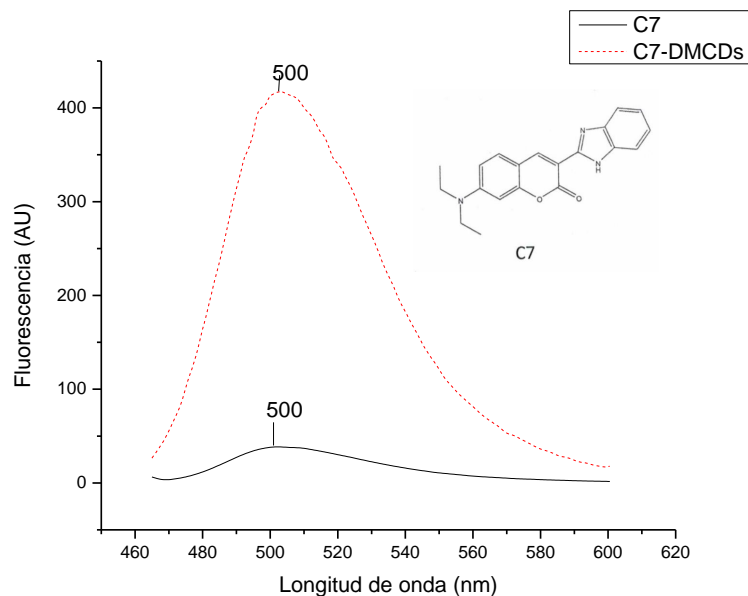
## Ligando C7

En el caso del ligando C7 se obtuvo un comportamiento similar al observado con el ligando TPPM como se puede apreciar en el espectro de absorción UV-vis en la Fig. 7.8. Se realizaron espectros de absorción y fluorescencia a igual concentración de ligando para la solución de C7 y C7-DMCD. En la figura se muestra un aumento de la intensidad de absorción y la mantención del máximo a 445 nm, y un pequeño desplazamiento del segundo peak desde 290 a 283 nm el cual no resulta significativo ya que es un pequeño cambio y el máximo de excitación a utilizar es 445 nm en este caso.



**Fig. 7.8.** Espectros de absorbancia UV-vis de C7 y C7-DMCD, en buffer HEPES pH: 7,4, a 25 °C [C7]=0.5 mM y [DMCD]= 7 mM.

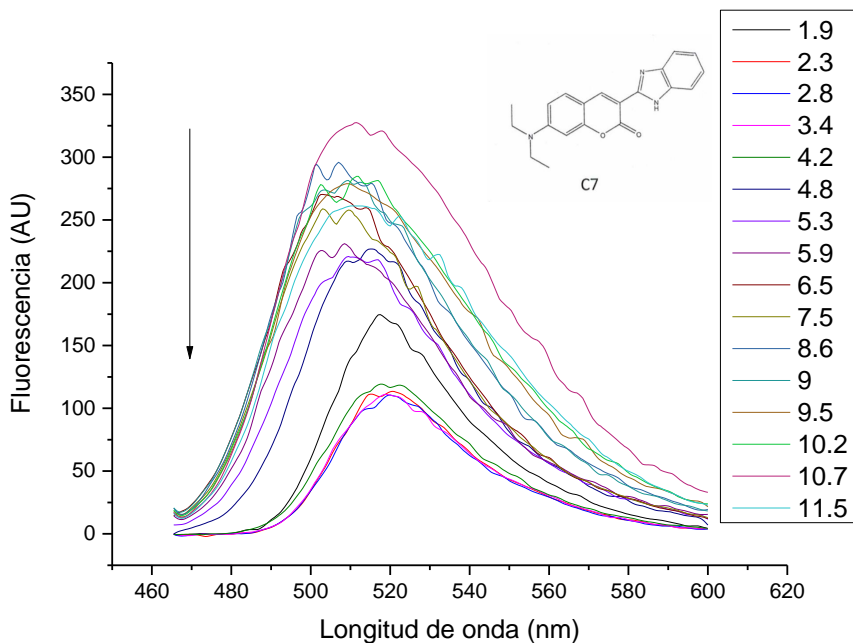
En los espectros de fluorescencia, se observó un incremento en la intensidad máxima, que se muestra en la Fig. 7.9; sin embargo, en esta ocasión no se presenta un desplazamiento.



**Fig. 7.9.** Espectros de fluorescencia C7 y C7-DMCD, en buffer HEPES pH: 7.4, a 25°C [C7]=0.5mM y [DMCD]=7mM.

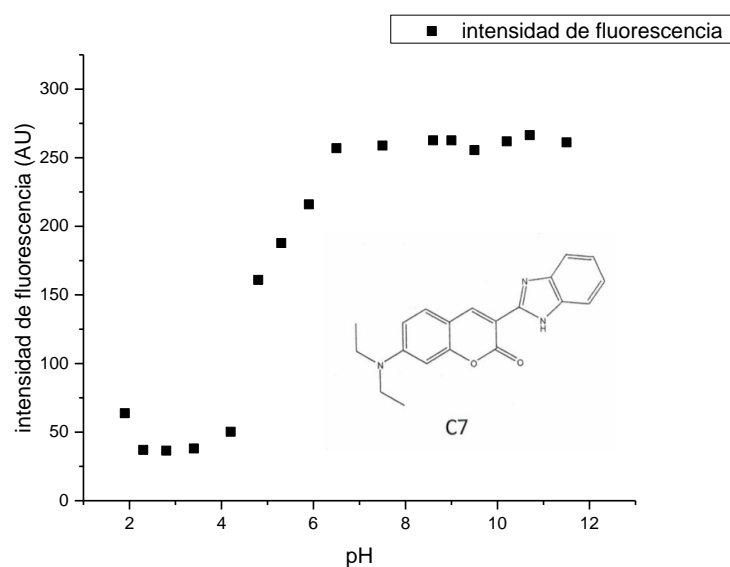
Los espectros de fluorescencia y absorción UV-vis confirman la formación del complejo C7-DMCD.

Se analizó el espectro de fluorescencia en función del pH para comprobar el comportamiento, como se observa en la Fig. 7.10.



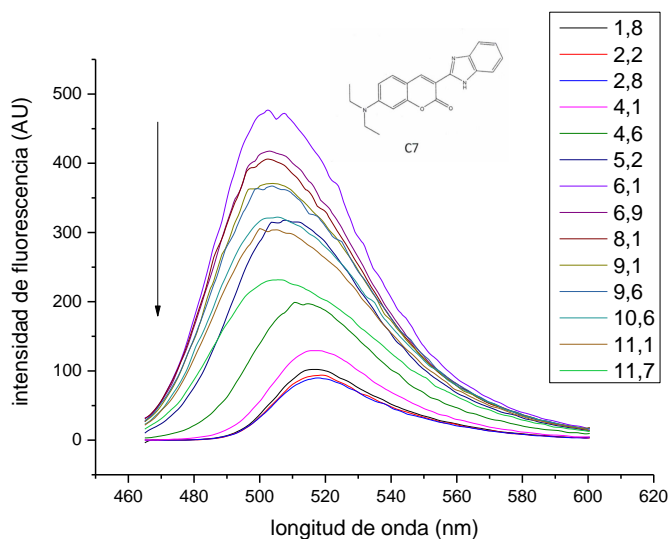
**Fig. 7.10.** Espectro de fluorescencia en función del pH para el ligando C7 a 30 °C.

Se observó una variación de la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento del máximo de fluorescencia. Como se observa en la Fig.7.11, se analizó la intensidad de fluorescencia en función del pH para el ligando C7. De acuerdo a la figura, la intensidad de fluorescencia permanece constante a pH ácidos y a partir de pH 4, la intensidad aumenta casi 5 veces para permanecer constante a partir del pH 6. Esto nos indica que al trabajar con este ligando a pH 7 la emisión no aumenta por efecto del pH.



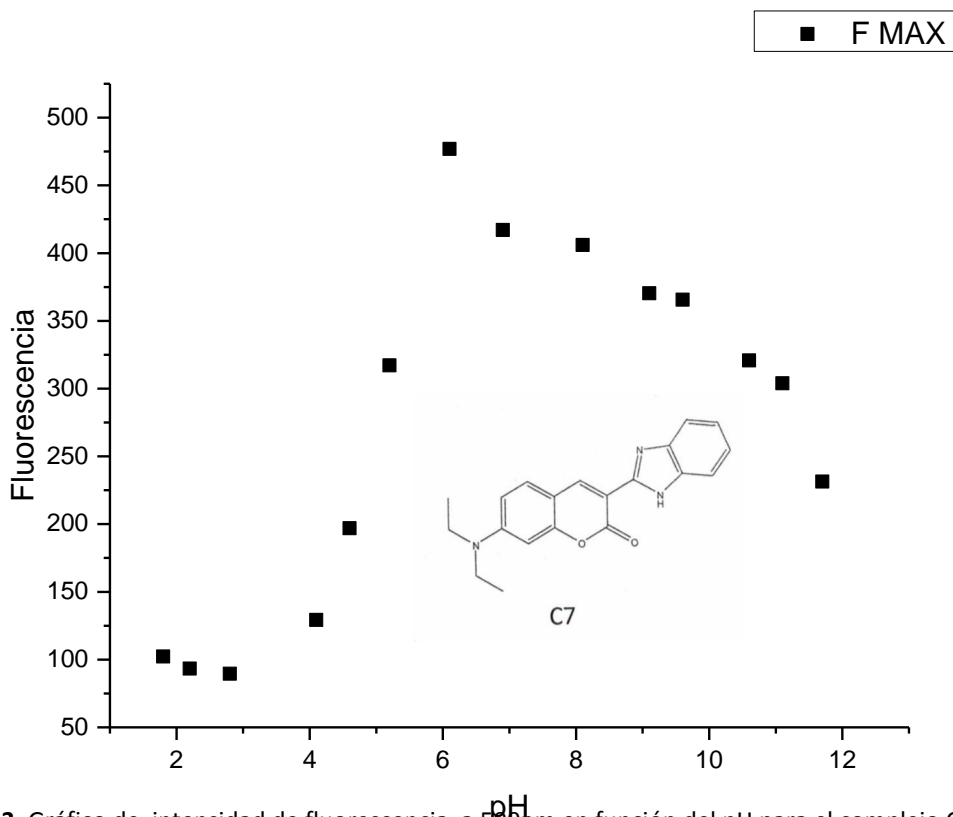
**Fig. 7.11.** Gráfico de intensidad a 500nm de fluorescencia de C7 en función del pH. Excitando a 445 nm.

Se realizó el espectro de fluorescencia en función del pH para comprobar el comportamiento del complejo C7-DMCD, como se observa en la Fig. 7.12.



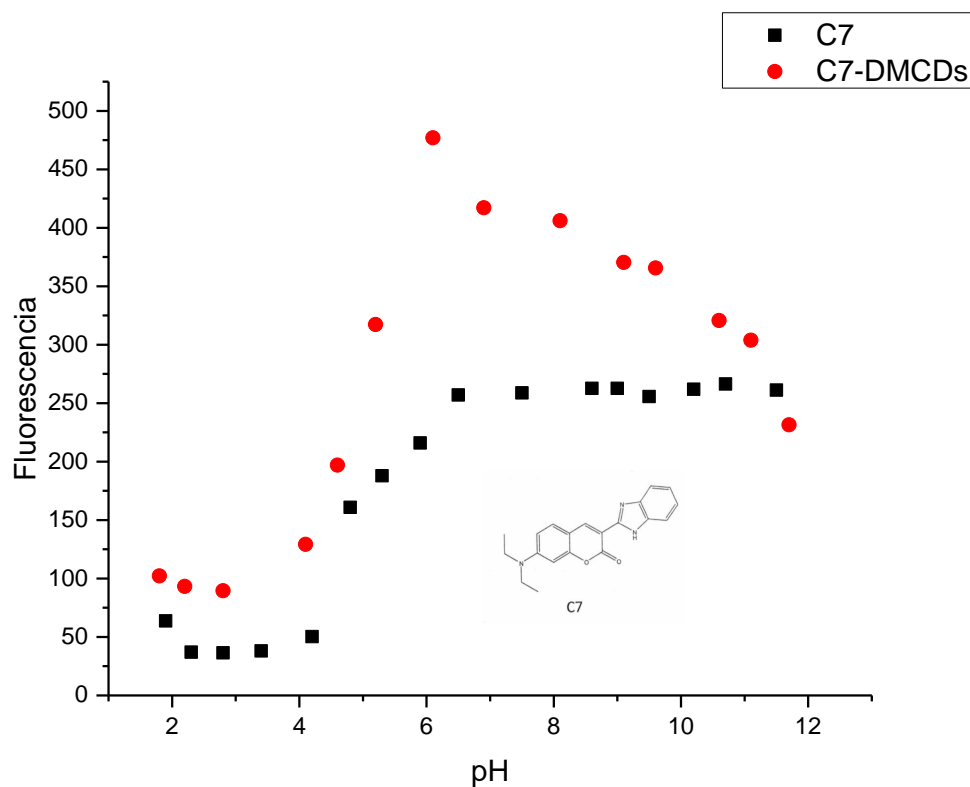
**Fig. 7.12.** Espectros de fluorescencia en función del pH para el complejo C7-DMCD a 30 °C, excitando a 445 nm.

Se observó un desplazamiento del máximo y una variación de la intensidad de fluorescencia para el complejo C7-DMCD; sin embargo, los cambios son menores en comparación con el ligando C7. De igual forma se analizó la variación de la intensidad de fluorescencia en función del pH, como se observa en la Fig. 7.13.



**Fig. 7.13.** Gráfico de intensidad de fluorescencia a 500nm en función del pH para el complejo C7-DMCD a 30°C.

Se analizó la intensidad de fluorescencia en función del pH para el complejo C7-DMCD y se comparó con el ligando C7, ajustando los slits para que la intensidad de fluorescencia inicial sean similares, como se observa en la Fig. 7.14.



**Fig. 7.14.** Grafico comparativo de intensidad de fluorescencia en función del pH para el ligando C7 y el complejo C7-DMCD a 30°C, excitando a 450nm.

En este caso se observó un cambio considerable, la intensidad cambia su comportamiento y tiene un máximo a un pH más bajo. En la zona de estabilidad encontrada anteriormente pH 6,0 a 10,5 se muestra una gran variación de intensidad lo que significa que el pH debe estar bien definido ya que cualquier cambio provoca un aumento o disminución en la intensidad de fluorescencia, lo que complicaría el trabajo con fluorescencia de este complejo.

## 7.2 Determinación de la estequiometría de los complejos

Para determinar la estequiometría del complejo de inclusión, se utilizó el método de job (descrito en metodología), donde se obtuvo un gráfico de fluorescencia\*[Ligando] en función de la fracción molar, de acuerdo a esta metodología se reemplazó la fracción molar donde se observa el máximo en la ecuación 6.1. Para ambos complejos se obtuvo un valor de 0,5, como se observa en la Fig. 7.15 y en la Fig. 7.16.

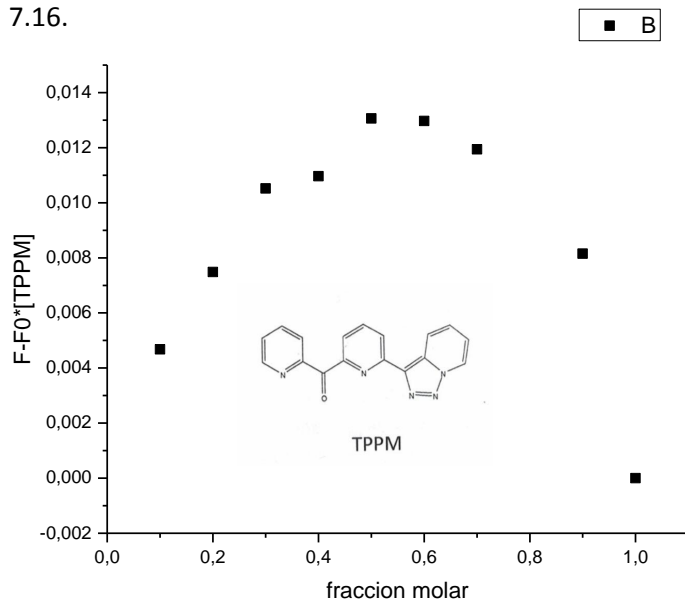


Fig. 7.15 Gráfico de Job para el complejo TPPM-DMCD a 30°C.

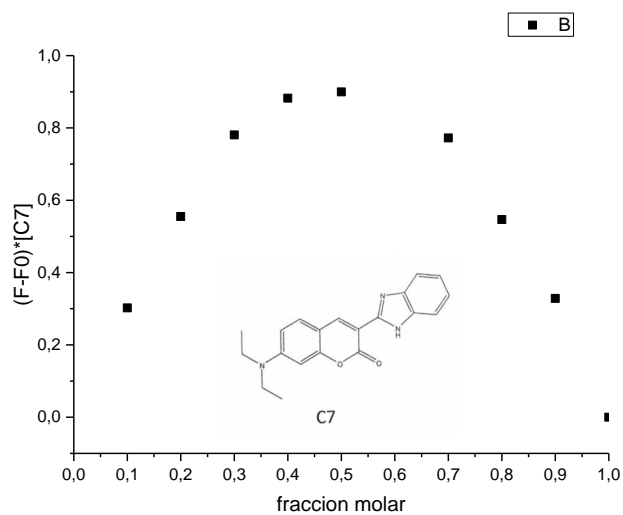


Fig. 7.16 Gráfico de Job para el complejo C7-DMCD a 30°C.

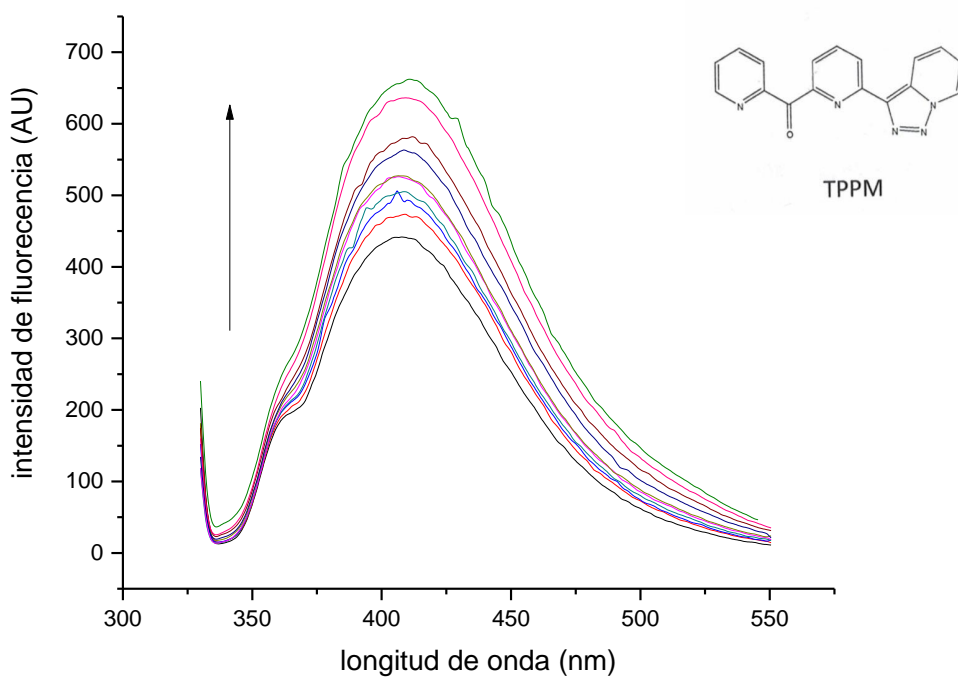
Como en ambos casos la fracción mayor corresponde a 0,5. Se determinó una relación 1:1 para el complejo TPPM-DMCD y C7-DMCD.



### 7.3 Determinación de las constantes de asociación

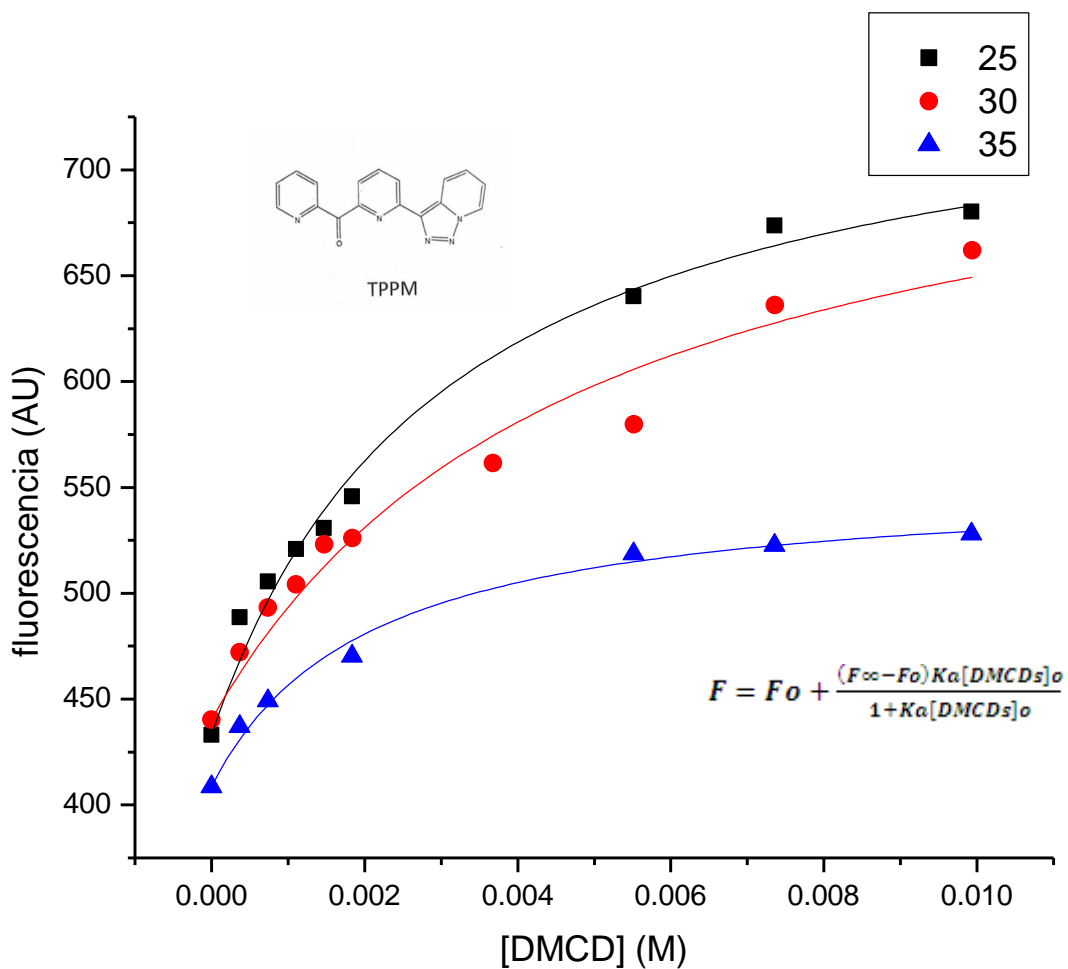
## Ligando TPPM

Las constantes de asociación se determinaron por fluorescencia debido a que por absorción las variaciones son imperceptibles, dificultando de esta manera la determinación de las constantes por esta metodología. En la Fig. 7.17 se puede observar la variación de la intensidad de fluorescencia en función del aumento de la concentración de DMCD, lo que nos confirma la formación del complejo de inclusión.



**Fig. 7.17.** Serie de espectros de fluorescencia del complejo TPPM-DMCD, en buffer HEPES. 25 °C, pH 7,4 excitando a 320nm.

Utilizando la intensidad de emisión en el máximo de fluorescencia y la variación de la concentración de DMCD, se observó el aumento de la emisión con el aumento de la concentración de DMCD. Este mismo estudio se realizó a 25, 30 y 35°C. Las constantes de asociación se calcularon de acuerdo a la metodología y se analizó su comportamiento utilizando la ecuación 6.2 (Fig. 7.18). Al ajustarse el comportamiento se puede calcular la constante de asociación ( $K_a$ ) para la inclusión TPPM-DMCD a la temperatura correspondiente.



**Fig. 7.18.** Gráfico de intensidad de fluorescencia vs concentración de DMCD, a 25, 30 y 35 C, para el complejo TPPM-DMCD analizado con la ecuación 6.2

Con las  $K_a$  calculadas para el complejo TPPM-DMCD se construyó la tabla 7.1, donde se puede apreciar el aumento de las constantes en función de la temperatura.

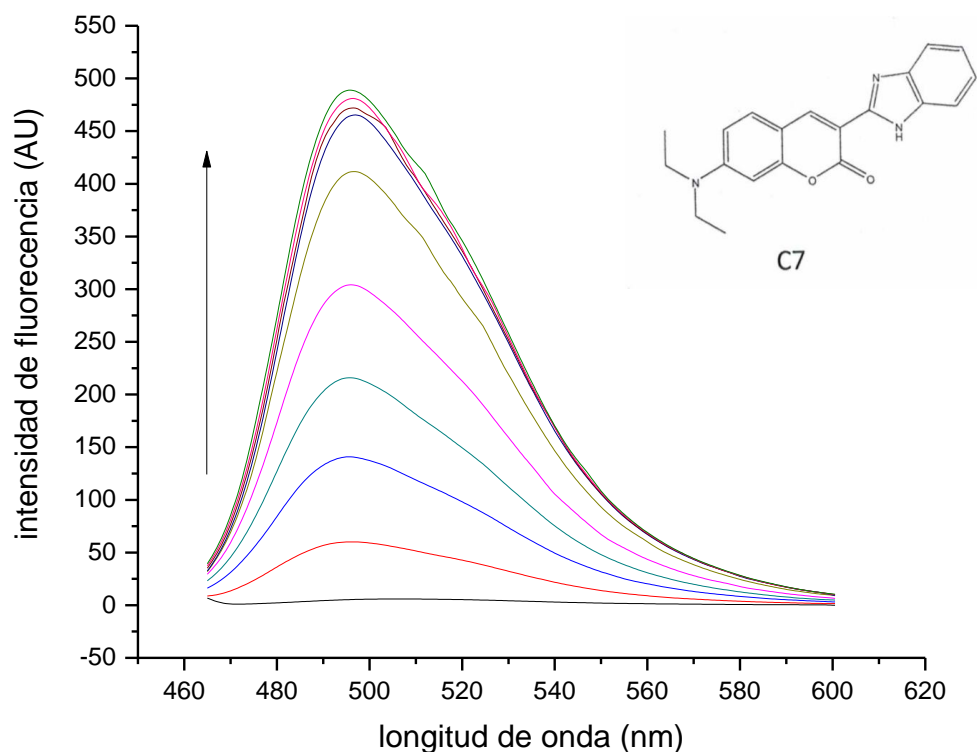
**Tabla 7.1.** Constantes de asociación para el ligando TPPM a distintas temperaturas y coeficiente de correlación para las distintos modelos.

T (°C)	$K_a$ [ $M^{-1}$ ]	r
25	209.6	0.98
30	327.8	0.98
35	501.7	0.99

Las  $K_a$  de formación del complejo TPPM-DMCD aumentan directamente con la temperatura de forma lineal.

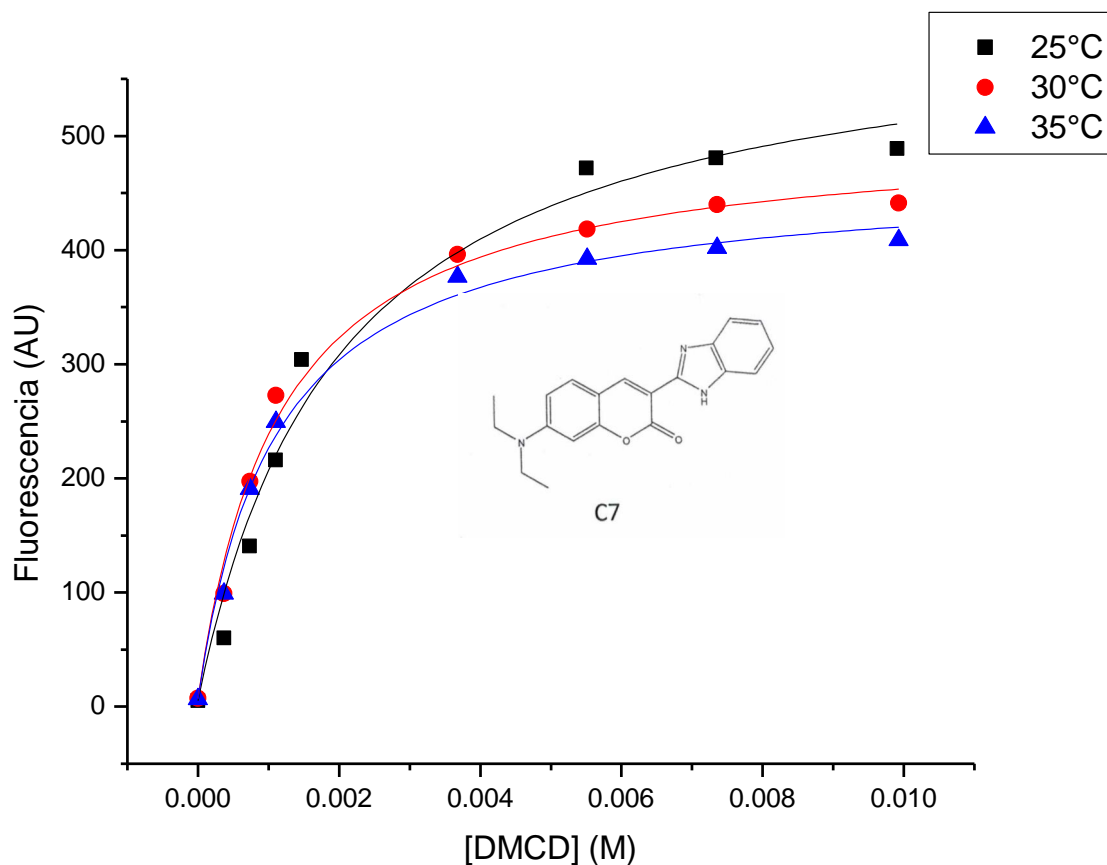
## Ligando C7

Para el complejo C7-DMCD se observa el mismo comportamiento al aumentar la concentración de ciclodextrina, no se observa desplazamiento del máximo de emisión, sólo un aumento de la fluorescencia (Fig. 7.19). Se realizó este mismo estudio a 25, 30 y 35°C, para ver su comportamiento. Los valores estimados de  $K_a$  se obtuvieron por la ecuación 6.2 obteniéndose valores con  $r$  0.98-0.99.



**Fig. 7.19.** Serie de espectros de fluorescencia del complejo C7-DMCD, a 25°C, en buffer HEPES pH 7,4.

Se construyeron los gráficos de máximo de intensidad vs concentración de DMCD con el mismo procedimiento utilizado para el complejo TPPM-DMCD, obteniéndose la Fig. 7.20.



**Fig. 7.20** Gráfico de intensidad de fluorescencia vs concentración de DMCD, a 25, 30 y 35°C, para el complejo C7-DMCD analizado con la ecuación 6.2

Con los datos obtenidos se construyó la tabla resumen para el complejo C7-DMCD (tabla 7.2.) donde se puede apreciar el aumento de las constantes en función de la temperatura.

**Tabla 7.2.** Constantes de asociación para el ligando C7 a distintas temperaturas y coeficiente de correlación para los distintos modelos.

T (°C)	Ka [M <sup>-1</sup> ]	r
25	496.6	0.98
30	868.2	0.99
35	918.2	0.99

Se observó un aumento de las Ka al aumentar la temperatura para el complejo C7-DMCD, mostrando el mismo comportamiento que el complejo TPPM-DMCD.

## 7.4 Estudio de las propiedades termodinámicas de los complejos

Se utilizaron las  $K_a$  obtenidas anteriormente para calcular los parámetros termodinámicos energía libre de Gibbs, cambio de entalpía y de entropía ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  y  $\Delta S$ ) de los complejos L-DMCD para determinar si la formación del complejo está regida por la energía entrópica o entálpica. Primero las constantes de asociación a diferentes temperaturas se graficaron de acuerdo a la ecuación de van't Hoff (ecuación 6.2), al graficar  $\ln K_a$  versus  $1/T$  se obtiene una recta cuya pendiente corresponde a  $-\frac{\Delta H}{R}$  y el intercepto a  $\frac{\Delta S}{R}$  donde  $R$  es  $8.314 \text{ J/K}\cdot\text{mol}$ .

El gráfico  $\ln K_a$  v/s  $1/T$  para el complejo TPPM-DMCD fue construido utilizando los datos de la tabla 7.1 y se muestra a en la Fig. 7.21.

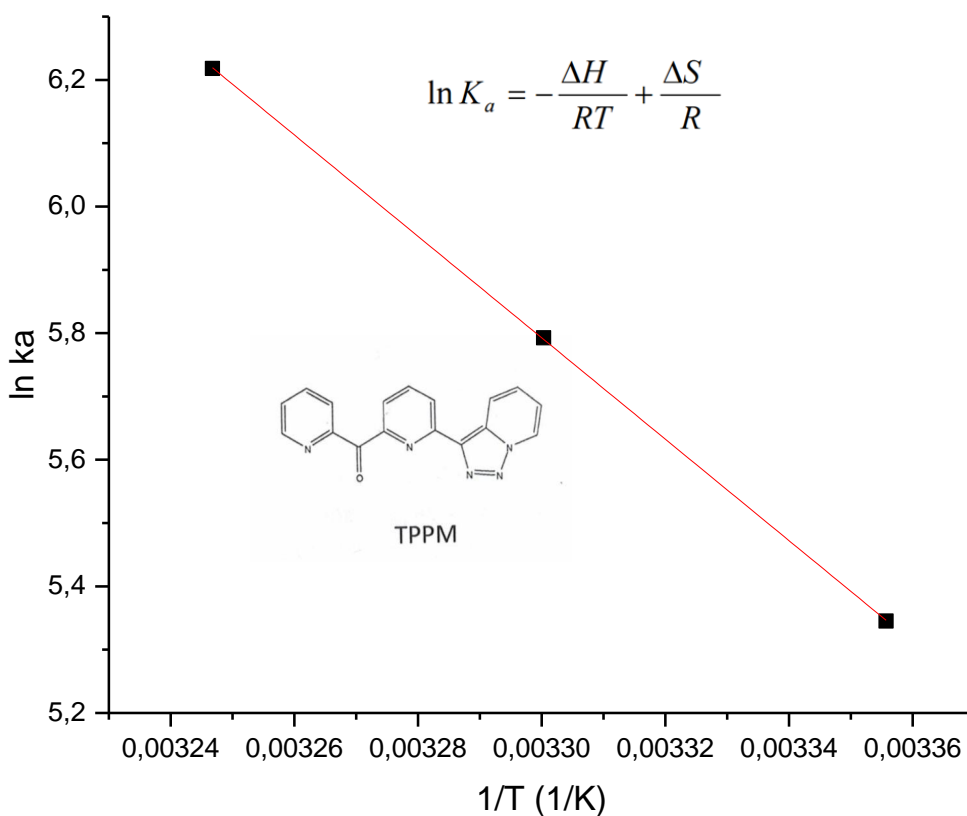
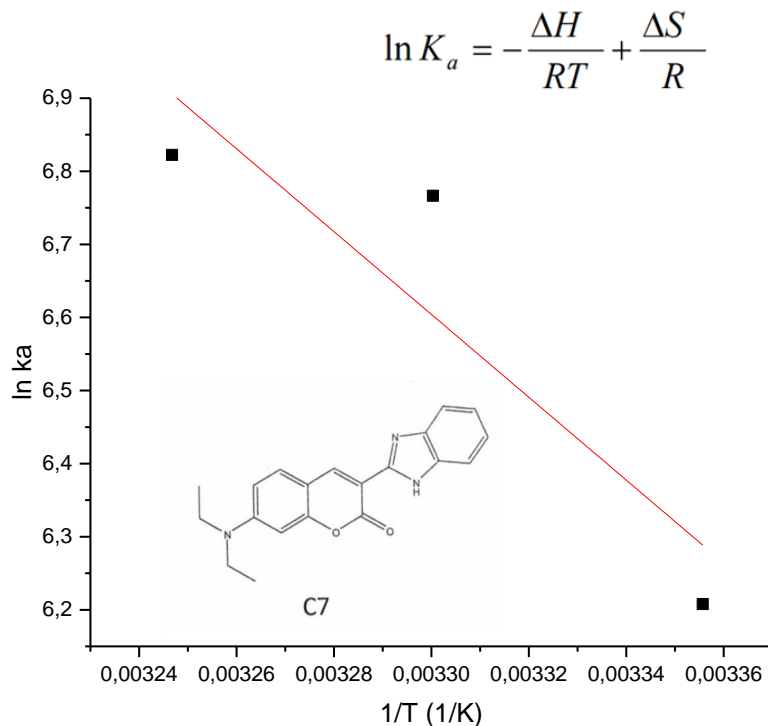


Fig. 7.21. Gráfico de van't Hoff para el complejo TPPM-DMCD.

Utilizando el mismo procedimiento se construye la gráfica de van't Hoff para el complejo C7-DMCD (fig. 5.4.2), en este caso se utilizaron los datos de la tabla 7.2.



**Fig. 7.22** Gráfico de van't Hoff para el complejo C7-DMCD.

De acuerdo a esto podemos ver nuestro resumen con los parámetros termodinámicos obtenidos para TPPM-DMCD y C7-DMCD (tabla 7.3). Para la determinación de  $T\Delta S$  y  $\Delta G$  utilizando una temperatura de 298 K,  $\Delta G$  se determinó utilizando la ecuación 6.6.

**Tabla 7.3.** Parámetros termodinámicos obtenidos para los complejos TPPM-DMCD y C7-DMCD.

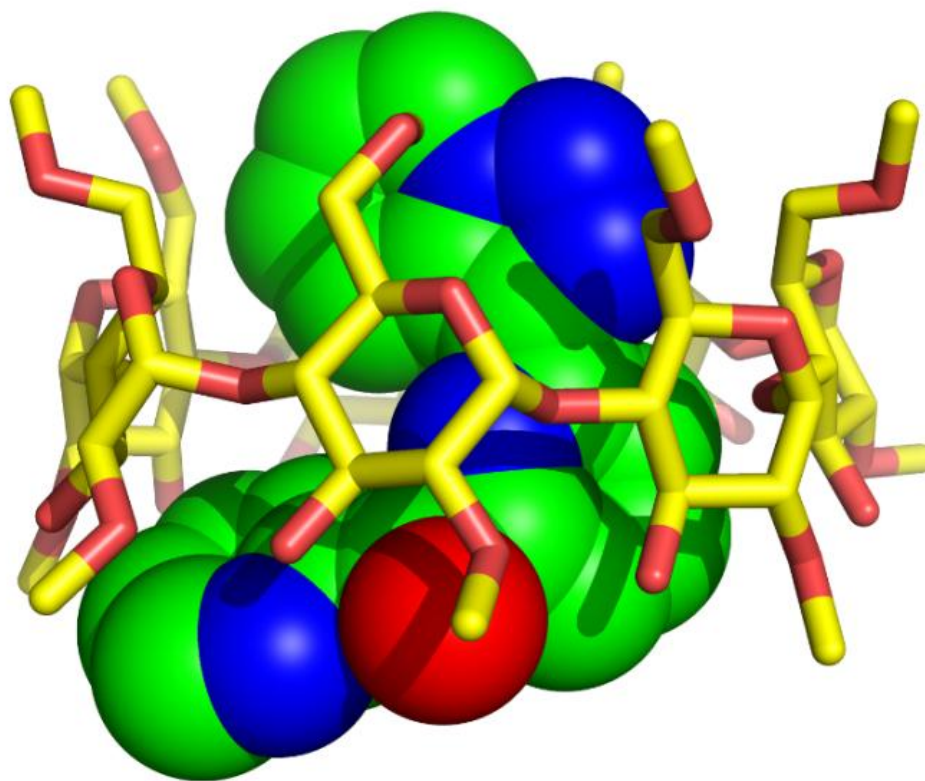
	$\Delta H$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\Delta S$ ( $\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ )	$T\cdot\Delta S$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )	$\Delta G$ ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )
TPPM-DMCD	66.6	270	80.5	-13.9
C7-DMCD	47.1	210	62.6	-15.5

Se obtiene una entalpía de formación positiva para ambos complejos, por lo que el proceso es endotérmico, se observa una diferencia de aproximadamente  $2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  al comparar los ligandos, estando más favorecida la formación del complejo C7-DMCD. Las entropías de formación observadas son casi iguales siendo menor la del complejo C7-DMCD. El análisis de la energía libre de Gibbs permite determinar que el proceso es espontáneo, además se observó que son procesos endotérmicos y ambos procesos son predominantemente entrópicos, debido a que el valor de entropía es determinante en la energía libre de Gibbs, mostrando que los procesos están regidos por las fuerzas hidrofóbicas.

## 7.5 Modelamiento matemático de la interacción de los ligandos TPPM y C7 con DMCD

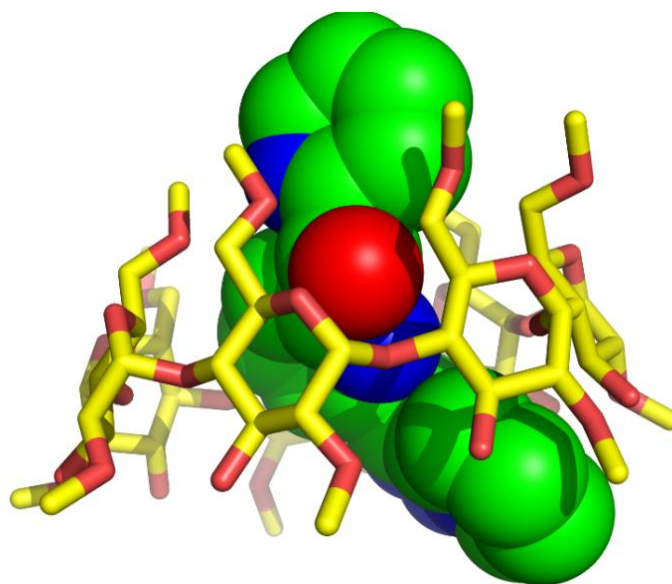
### *Ligando TPPM*

Como resultado del docking molecular se obtuvieron distintas conformaciones de los ligandos estudiados dentro de la cavidad de la CD en los complejos. Se analizaron las conformaciones más probables y las energía de acoplamiento más estables. Para el complejo TPPM se obtuvieron 2 tipos de conformaciones solamente, A y B. La conformación A corresponde a la conformación más probable y se observa en la Fig. 7.23.



**Fig. 7.23.** Conformación estructural para el complejo TPPM-DMCD más probable (más favorecida), obtenido por docking molecular

La conformacion B, corresponde a la de menor score y se muestra en la fig 7.24.



**Fig. 7.24.** Conformacion estructural para el complejo TPPM-DMCD de mejor energia de acoplamiento, obtenida por docking molecular

Las conformaciones A y B, mantienen el anillo central del ligando dentro de la CD; sin embargo, la conformación A mantiene el anillo piridinico monosustituido hacia el extremo de diámetro de apertura menor de la DMCD es decir hacia el lado de los hidroxilos; sin embargo, la conformación B presenta el opuesto.

Las conformaciones A y B son altamente probables debido a que ambas poseen interacción entre los nitrógenos del ligando con los grupos metoxilos del extremo de diámetro de apertura mayor de la DMCD, además de esto el grupo carbonilo del ligando TPPM interacciona con el grupo metoxilo de la DMCD.

Se construyó la tabla 7.4 con los datos obtenidos por docking correspondientes al proceso de formación del complejo TPPM-DMCD.

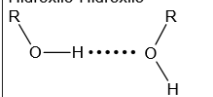
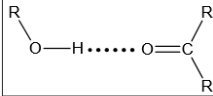
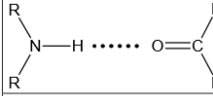
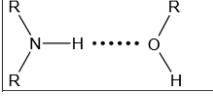
**Tabla 7.4. Datos obtenidos por docking para el proceso de formación del complejo TPPM-DMCD**

	Conformación A	Conformación B
score	-22.4 kJ*mol <sup>-1</sup>	-22.2 kJ*mol <sup>-1</sup>
Población	97	137

Se analizaron las distancias entre átomos para buscar posibles puentes de hidrógenos en las estructuras determinadas, de acuerdo a la tabla 7.5.



**Tabla 7.5.** Distancias de interacción entre donador y aceptor para puentes de hidrogeno.

Tipo	Distancia Donor-Aceptor (Å)
Hidroxilo-Hidroxilo 	2'8 ± 0'1
Hidroxilo-carbonilo 	2'8 ± 0'1
Amida-carbonilo 	2'9 ± 0'1
Amida-hidroxilo 	2'9 ± 0'1

Sin embargo, no se observa ningún tipo de puente de hidrógeno, lo que nos indica que las interacciones son entrópicas específicamente interacción hidrofóbicas.

Para poder determinar cuál de las dos estructuras es más probable ya que las dos obtenidas por acoplamiento no muestran diferencias, se realizaron estudios de dinámica molecular, de la cual se obtuvieron datos de comportamiento para el complejo. Sin embargo, fue necesario utilizar la herramienta MMPBSA, para determinar las energías libres de unión. Analizando los datos obtenidos por la dinámica molecular con la ayuda de la herramienta MMPBSA, se obtuvo la energía libre como se aprecia en la tabla 7.6.

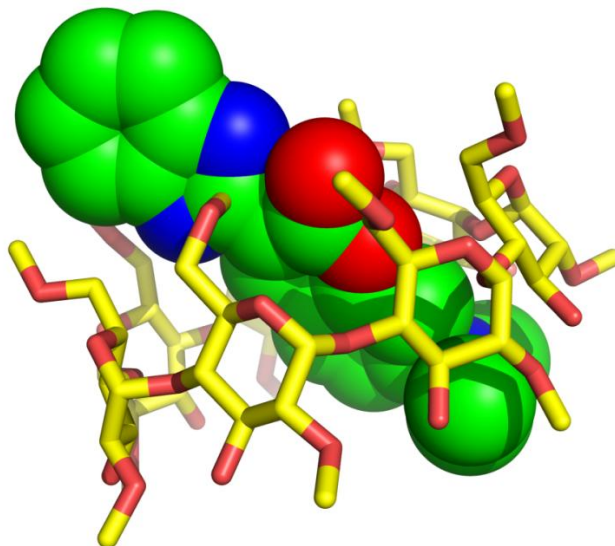
**Tabla 7.6.** Tabla de comparación para las energías libres teóricas de los compuestos obtenidos por dinámica molecular y experimentalmente.

Complejo	energía libre dinámica molecular (kJ* $\text{mol}^{-1}$ )	energía libre experimental (kJ* $\text{mol}^{-1}$ )
TPPM-DMCD A	-6.5	-13.9
TPPM-DMCD B	-2.5	-13.9

Se pudo observar que las energía libres calculadas mediante dinámica molecular difieren mucho de la obtenida experimentalmente, debido a que el cálculo es una aproximación. Sin embargo, se pueden comparar entre dinámicas los datos. Se observa que la estructura A posee una energía mucho menor que la estructura B. De esto se puede inferir que la estructura correspondiente como real es la conformación A, como se observa en la Fig. 7.23. La diferencia energética puede deberse a que la piridina disustituída (más voluminosa) se encuentra hacia el extremo de diámetro de apertura mayor es decir el metilado, el efecto estérico generado en el caso contrario sería responsable de la diferencia de coste energético.

## Ligando C7

Para el complejo C7-DMCD se realizó el mismo procedimiento, sin embargo, el resultado del docking muestra solo una conformación posible. Fig. 7.25.



**Fig. 7.25.** Conformación estructural para el complejo C7-DMCD menor energía (más favorecida), obtenido por docking molecular.

Para el complejo C7-DMCDs la conformación menor energía y más poblada, es la misma debido al tamaño del ligando y la rigidez estructural que posee. Esto indica que la conformación probable de este complejo sería la observada en la Fig. 7.25.

Con los datos obtenidos en el Docking para el complejo C7-DMCDs se construyó la tabla 7.7.

**Tabla 7.7.** Datos obtenidos por docking para el proceso de formación del complejo C7-DMCD.

	Conformación
score	-19.47 kJ*mol <sup>-1</sup>
población	400

Se analizaron las distancias entre átomos para buscar posibles puentes de hidrógenos en las estructuras determinadas, de acuerdo a la tabla 7.5. Sin embargo, no se observaron puentes de hidrogeno.

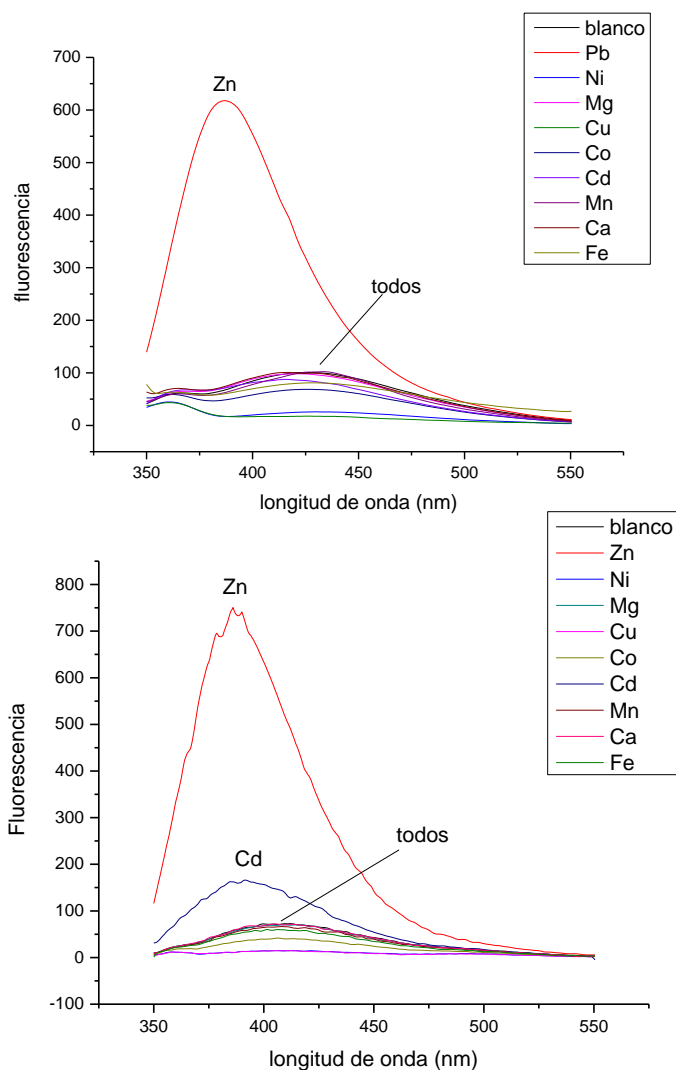
Como se obtuvo sólo una estructura probable debido al gran tamaño del ligando en comparación con la DMCD, no fue necesario realizar más estudios. Como resultado se obtuvo que el ligando C7 se incluye parcialmente dentro de la DMCD, debido a su rigidez estructural y tamaño, quedando expuesto al solvente el radical 1H-benzimidazol-2-il.

## 7.6 Estudio de las propiedades de los ligandos y complejos frente a iones metálicos

### Ligando TPPM

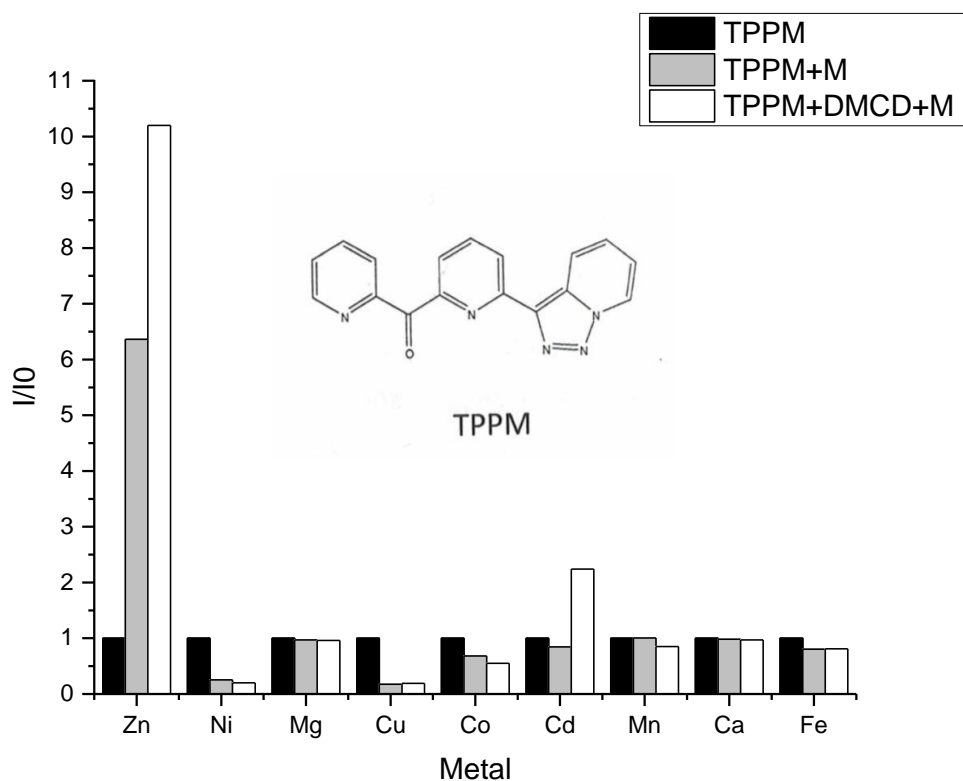
Se realizó el estudio del efecto de los diferentes metales divalentes Zn (II), Ni (II), Mg (II), Cu (II), Co (II), Cd (II), Mn (II), Ca (II) y Fe (II), frente al ligando TPPM en presencia y ausencia de ciclodextrina. Para ello se prepararon soluciones de TPPM de 0,04 mM y complejos de inclusión donde la concentración del TPPM fue de 0,04 mM y 3 mM de ciclodextrina. A cada muestra se le agregó una concentración de metal de forma que se obtuviera una concentración final de 0.01 mM en solución.

Se analizaron los espectros de fluorescencia del ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD al agregar los metales como se muestra en la Fig. 7.26.



**Fig. 7.26.** Espectros de fluorescencia del ligando TPPM (arriba) y el complejo TPPM-DMCD (abajo) al agregar metales.

Para poder comparar, se normalizaron las intensidades con respecto a la solución de ligando (blanco), la comparación de las intensidades con y sin DMCD se aprecian en la Fig. 7.27.

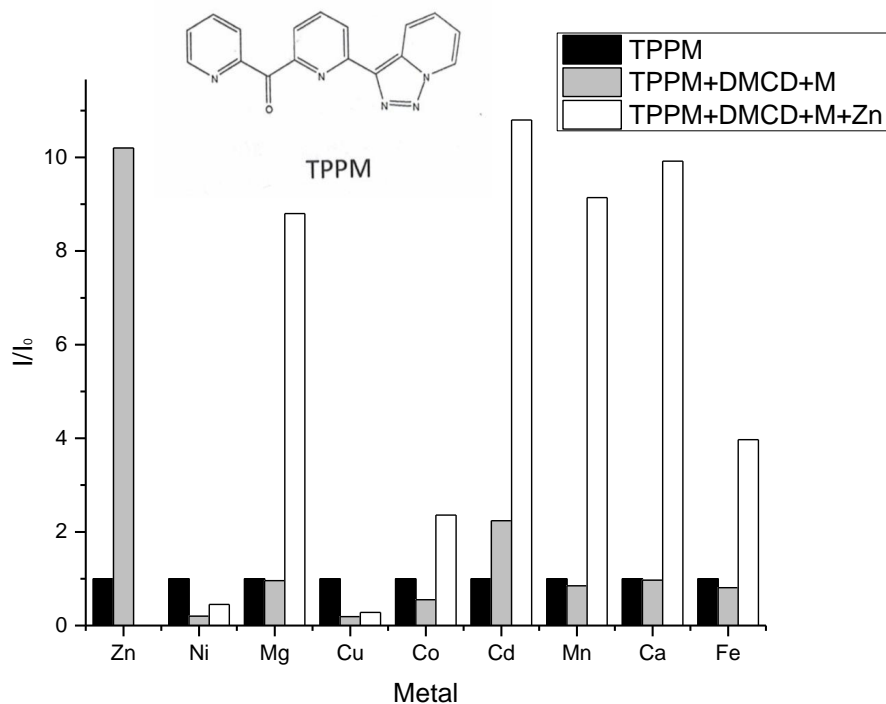


**Fig. 7.27.** Screening TPPM en presencia (azul) y ausencia (rojo) de DMCD, pH 7.4 a 30 °C.

Como se aprecia en la Fig. 7.27, prácticamente para todos los metales (II) existe apagamiento de la emisión del ligando por efecto de los metales, excepto para el Zn (II), donde se observa un aumento notable de la intensidad de fluorescencia de hasta 6 veces cuando el TPPM se encuentra libre en solución, mientras que en presencia de DMCD el aumento es de casi 10 veces. Lo que demuestra que el TPPM puede ser un muy buen sensor de Zn (II), al ver como aumenta su fluorescencia.

Para poder analizar y ver que tan buen sensor es TPPM para Zn (II), se hizo un estudio de selectividad para ver si en presencia de otros metales divalentes el ligando puede detectar al Zn.

Para observar la selectividad del complejo TPPM-DMCD se analizaron las soluciones agregando el metal y luego agregando Zn, con el objetivo de observar la diferencia en los máximos, atribuyéndole un aumento del peak a la interacción del complejo con Zn, como se observa en la Fig. 7.28.



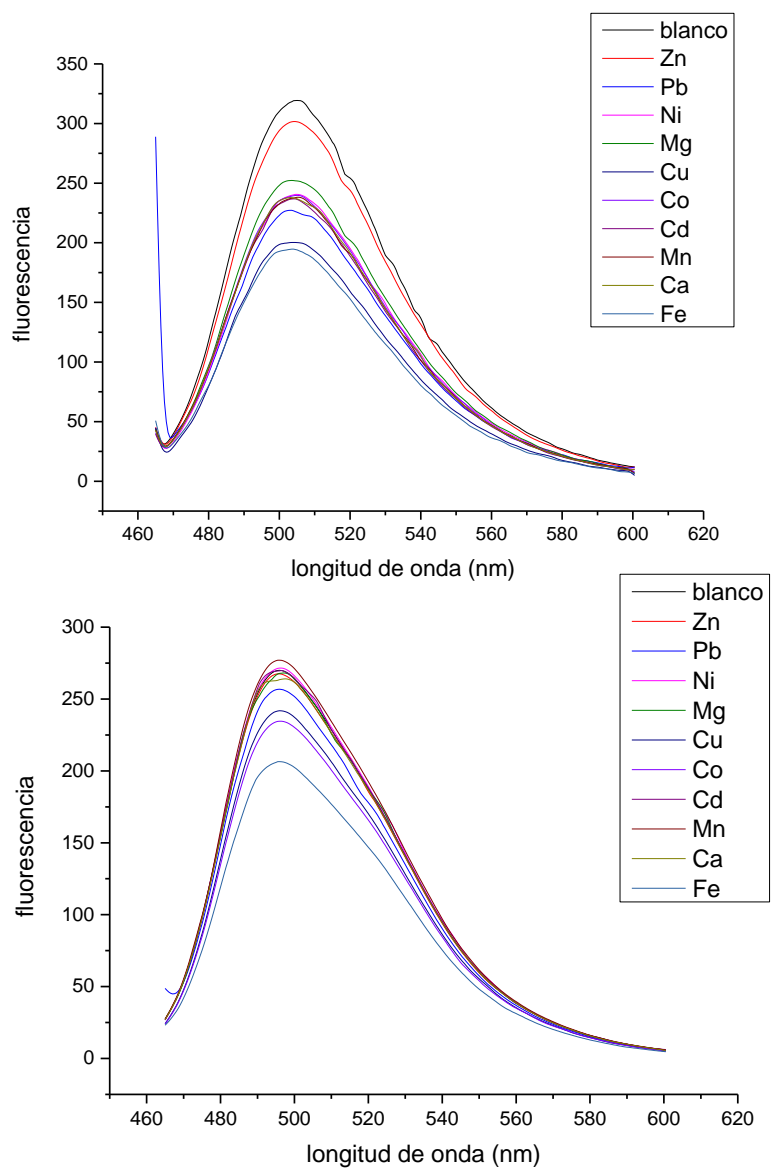
**Fig. 7.28.** Screening TPPM en presencia (azul) y ausencia (rojo) de Zn a 30°C, pH 7.4.

En todos los casos se observó un aumento en la intensidad al agregar Zn (II) atribuible al desplazamiento del metal por el Zn, de lo que se infiere una alta selectividad del TPPM por el Zn (II), excepto en presencia de Cu y Ni, donde no presenta selectividad.

Estos resultados indicaron que el complejo TPPM-DMCD puede ser un quimiosensor específico para Zn, debido a su sensibilidad y selectividad en ambiente acuoso, ya que el aumento de la intensidad de fluorescencia es de gran importancia, además es importante destacar que el Cd es uno de los principales interferentes de Zn a la hora de analizar y que en este caso se muestra un gran aumento de intensidad incluso en presencia de Cd, esto puede sugerir que el quimiosensor pudiera detectar Zn en estas condiciones, ya que el Cd es el principal interferente del Zn.

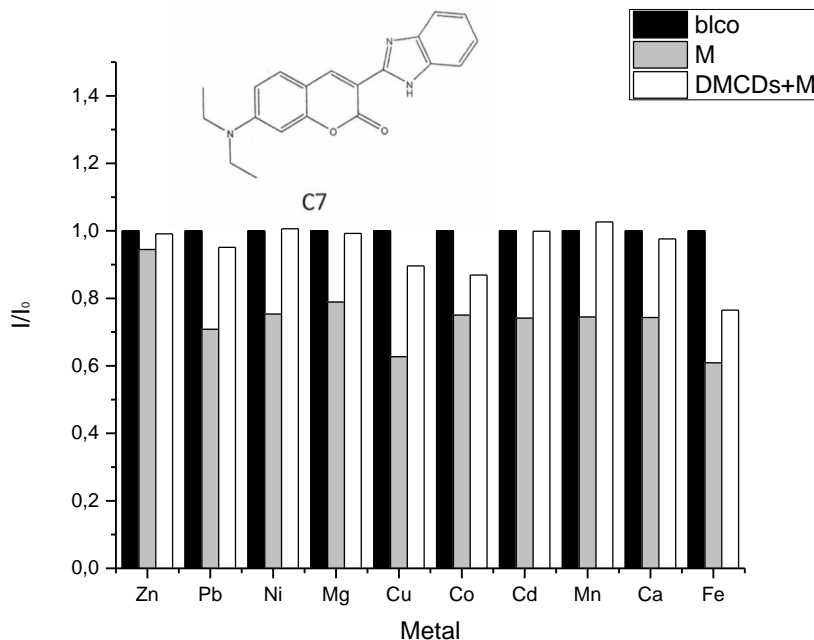
# Ligando C7

De igual forma se analizó el ligando C7 y el complejo C7-DMCD, Se realizaron los mismo análisis, con una concentración de 0,6 mM de C7 y 3,0 mM para DMCD. Analizando los espectros de fluorescencia al agregar metales en estado bivalente como se observa en la Fig. 7.29.



**Fig. 7.29.** Espectros de fluorescencia del ligando C7 (arriba) y el complejo C7-DMCD (abajo) al agregar metales, a 30°C.

Para analizar de mejor forma se hicieron gráficos de intensidad normalizados con respecto a la solución de ligando C7 y se compararon con un blanco, como se observa en la Fig. 7.30.



**Fig. 7.30.** Screening C7 en presencia (rojo) y ausencia (negro) de DMCD a 25°C, pH 7.4.

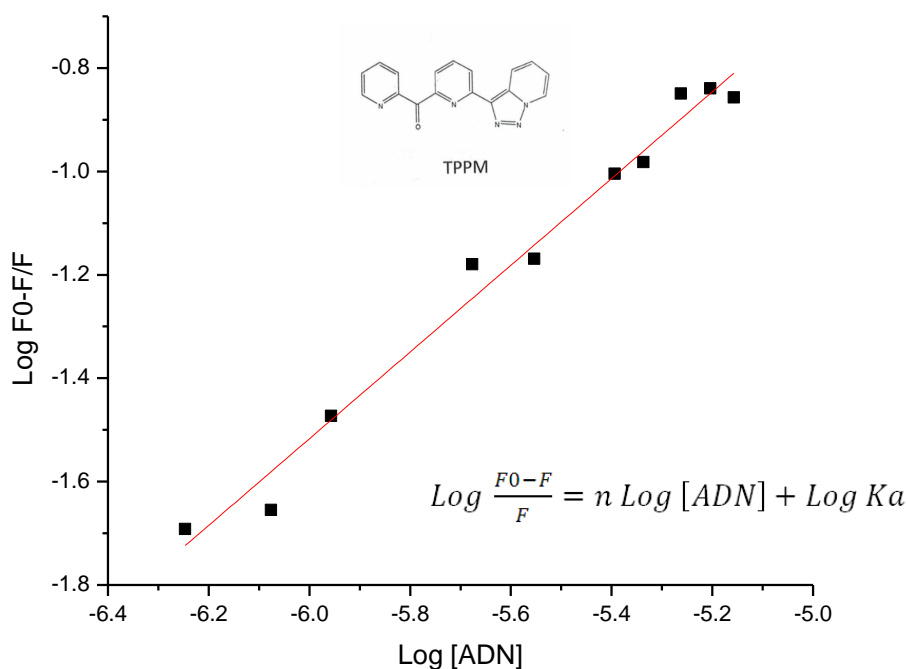
Para el ligando C7 la adición de los metales provoca un apagamiento de su fluorescencia. Para el cobre y Hierro son los metales donde el apagamiento es más pronunciado entre un 50 - 60%. Cuando el ligando C7 está incluido en la ciclodextrina, la adición de los metales prácticamente no ejerce ningún cambio en la emisión de C7. Esto nos podría estar indicando que el sitio de unión de los metales de la molécula C7 se encuentra muy protegida en la cavidad de la ciclodextrina, evitando que el metal forme el complejo.

Al no presentar ningún resultado destacable, no se realizaron análisis posteriores.

## 7.7 Determinación de la unión de los compuestos heterocíclicos con ADN

### Ligando TPPM

Para ello se determinó la constante de unión entre el ligando y el ADN de acuerdo a la ecuación 6.8. Donde se graficó  $\text{Log } (F_0-F)/F$  versus  $\text{Log } [\text{ADN}]$ , la pendiente entrega los sitios de unión del ligando en el ADN y el intercepto nos entrega la constante de unión  $K_a$ , primero se analizó el ligando TPPM con adición de ADN, se obtuvo la Fig. 7.31.

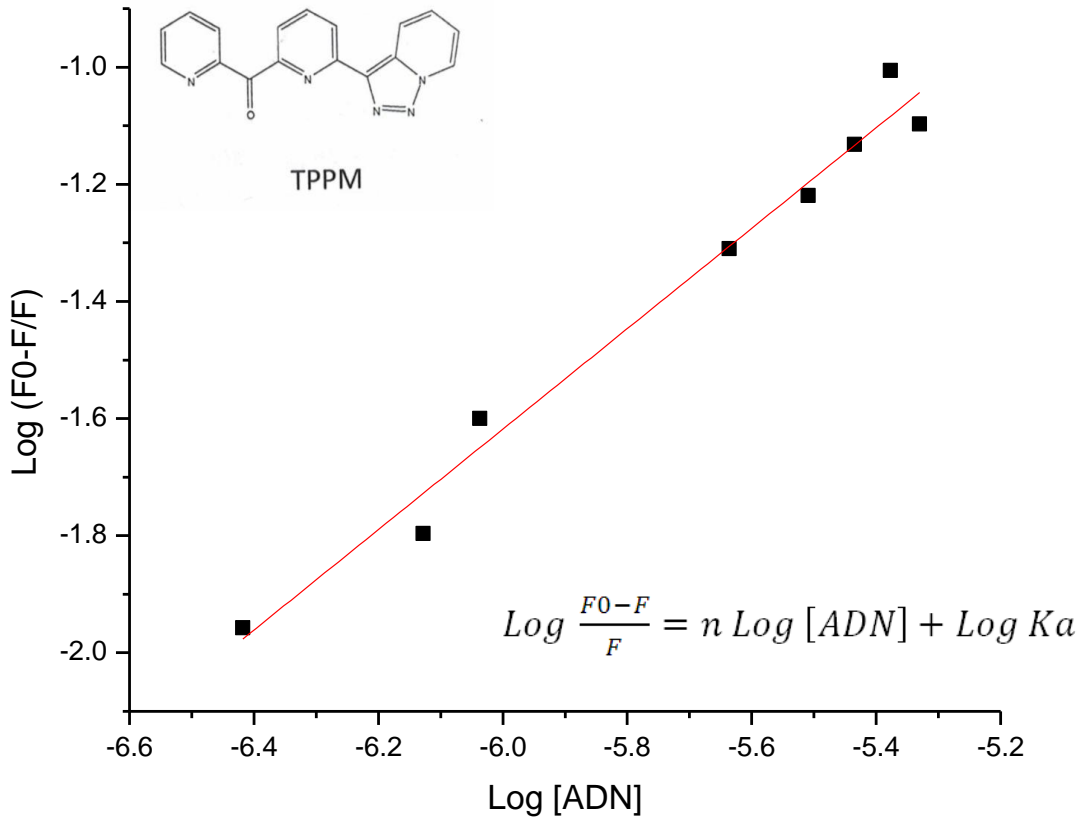


**Fig. 7.31** Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción ligando TPPM con ADN a 30°C,  $r=0.98$ ; pendiente=0.85; intercepto=3.5192.

En esta ecuación la pendiente “n” corresponde al número de lugares que se enlaza el ligando con el ADN. La pendiente dio como resultado 0.85. Lo que se puede aproximar a 1. Y el valor de la constante de asociación tiene un valor de  $3280,3 \text{ M}^{-1}$ .

Se realizó el mismo estudio pero esta vez en presencia de DMCD, para observar el efecto de esta en la unión con ADN. Para el complejo TPPM-DMCD se obtuvo la ecuación observada en la Fig. 7.32.





**Fig. 7.32.** Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción complejo TPPM-DMCD con ADN a 30°C  $r=0.98$ ; pendiente=0.86; intercepto=3.52746.

Se observó el mismo comportamiento que en la ecuación anterior y se obtiene una pendiente de 0,86 y un  $K_a$  de  $3368,7 M^{-1}$ , por lo que se asume un lugar de enlace con el ADN, la DMCD no afecta la interacción Ligando-ADN.

Se construyó la tabla 7.8 resumen con los parámetros obtenidos.

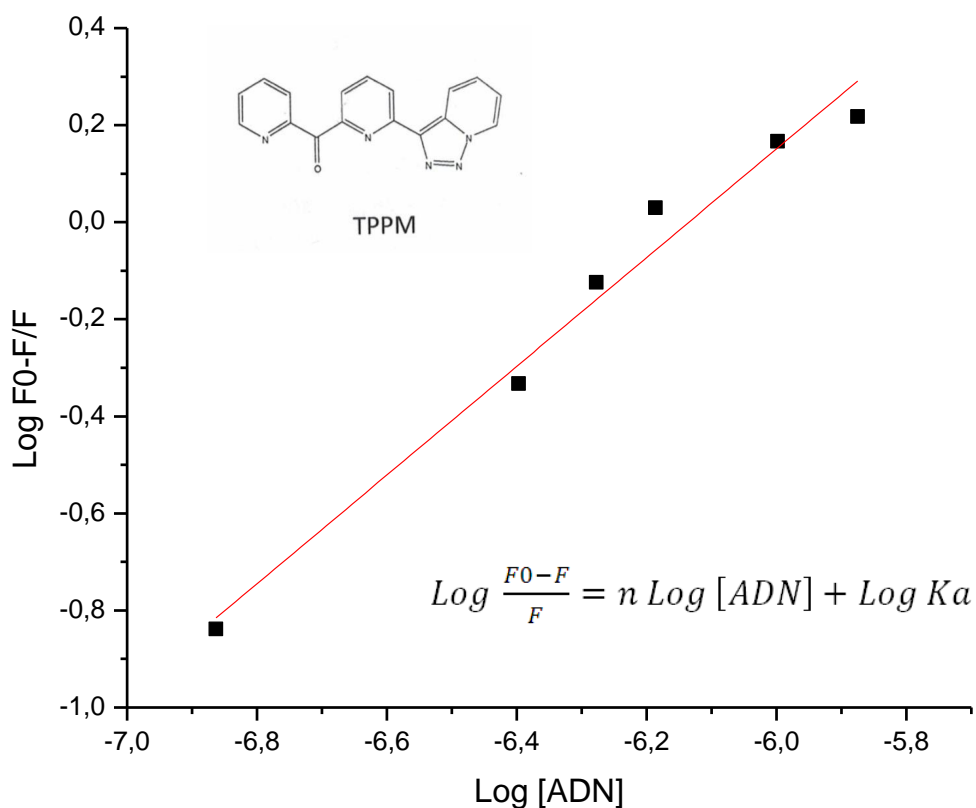
**Tabla 7.8.** Parámetros  $n$  y  $K_a$  obtenidos para el ligando TPPM y el complejo TPPM-DMCD de la interacción con ADN

	$n$	$K_a$
TPPM-ADN	0,85	3280,3
TPPM-DMCD-ADN	0,86	3368,7

La DMCD no parece afectar la interacción del ligando TPPM con ADN, ya que los parámetros calculados no sufren una variación notoria. Además la  $K_a$  del complejo TPPM-DMCD-ADN es aproximadamente 10 veces mayor que la  $K_a$  del complejo TPPM-DMCD, por lo que es probable que la DMCD funcionaría como un carrier para el ligando con respecto al ADN.

El complejo TPPM-DMCD mostro una gran posibilidad de ser un quimiosensor para Zn, por lo que se realizaron análisis de ADN en presencia para comprobar si existe una competencia entre estos o si puede utilizarse para ambos casos.

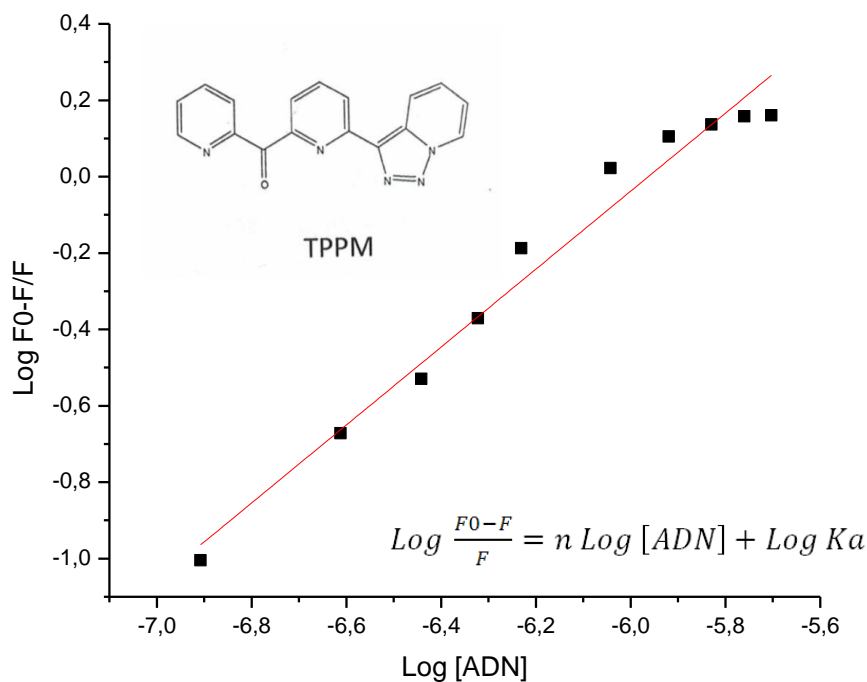
Primero se ve la influencia de Zn en la interacción de TPPM-ADN, para lo cual se realizó una adición de ADN en presencia de TPPM-Zn, como se observa en la Fig. 7.33.



**Fig. 7.33.** Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción ligando TPPM con ADN en presencia de Zn a 30°C,  $r=0.97$ ; pendiente=1.12; intercepto=6.87483.

De esta ecuación se obtuvo un valor de pendiente "n" de 1,12 y un  $K_a$  de  $7,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , mostrando un gran aumento en el valor de  $K_a$ . Esto puede ser atribuido a la distribución espacial que toma el ligando al enlazarse con Zn (II), la que le permitiría interactuar de una forma más efectiva con ADN.

Luego se analizó la influencia del Zn (II) en la interacción del complejo TPPM-DMCD, como se observa en la Fig. 7.34



**Fig. 7.34.** Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción complejo TPPM-DMCD con ADN en presencia de Zn a 30°C,  $r=0.97$ ; pendiente=1.02; intercepto=6.0857.

Se obtuvo una pendiente “n” de 1,02 y  $n K_a$  de  $1,2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ , lo que demuestra que al formarse el complejo de inclusión TPPM-DMCD afecta la  $K_a$ . Esto puede deberse a que modifica la conformación estructural del ligando TPPM o que el sitio de unión con ADN queda dentro de la DMCD obstaculizando el enlace con ADN.

Con los resultados obtenidos se construyó la tabla 7.9 con las  $K_a$  y los valores de pendiente “n” para cada análisis

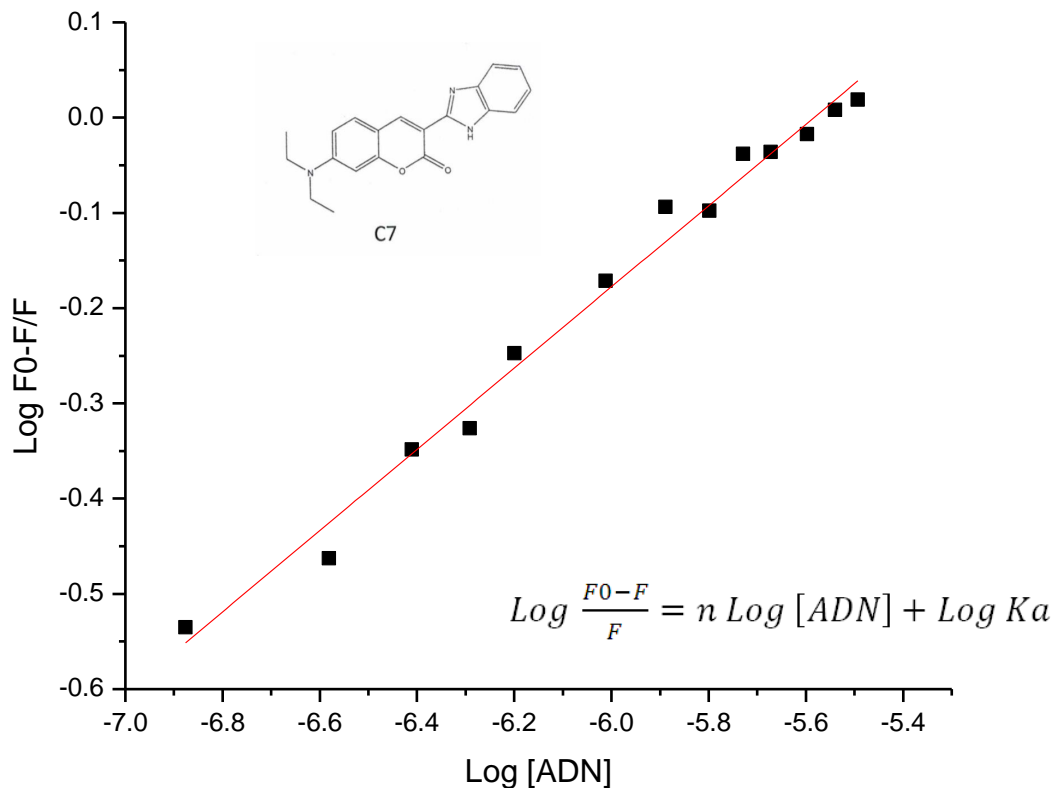
**Tabla 7.9.** Tabla de  $K_a$  y n para la interacción de TPPM y ADN en distintos análisis.

	TPPM-ADN	TPPM-DMCD-ADN	TPPM-Zn-ADN	TPPM-DMCD-Zn-ADN
n	0,85	0,86	1,12	1,02
$K_a$	3280,3	3368,7	$7,5 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^6$

Se observó que la DMCD no afecta notoriamente la  $K_a$  sino que es sólo una ayuda para la solubilización. En el caso de Zn (II) se ve un aumento sustancial sobre la  $K_a$ , esto puede deberse a que el ligando TPPM al quelar el Zn (II) cambia su conformación espacial lo que permite una mejor intercalación con el ADN. Al realizar el análisis de Zn (II) y DMCD se observa una disminución considerable, sin embargo la  $K_a$  sigue siendo muy alta en comparación a los otros casos (excepto en el caso TPPM en presencia de Zn), la disminución de la  $K_a$  es atribuible a una distorsión del ligando al incluirse dentro de la DMCD (como se observó en el análisis de modelamiento).

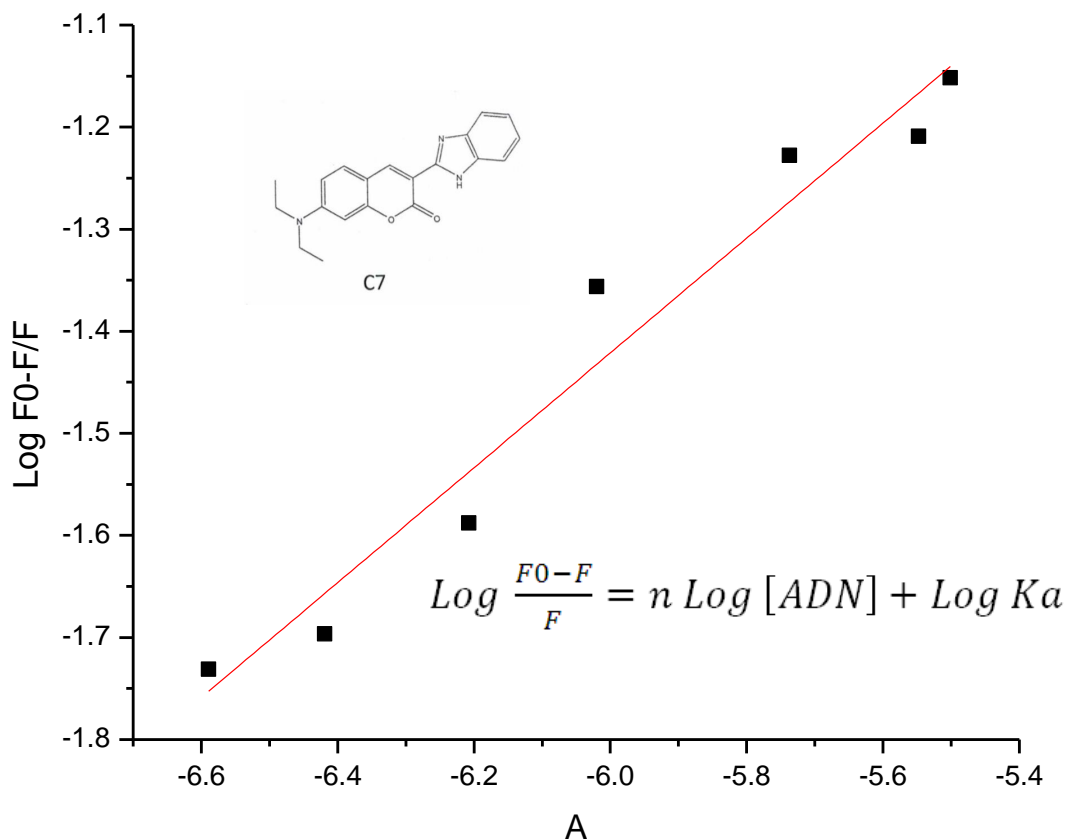
## Ligando C7

Se realizaron titulaciones de ADN para el ligando C7 y el complejo C7-DMCD, como se observó en la Fig. 7.35 y la Fig. 7.36; sin embargo, no se realizaron análisis en presencia de metales debido a que el ligando C7 como el complejo C7-DMCD no muestran actividad útil como quimiosensor.



**Fig. 7.35.** Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción ligando C7 con ADN a 30 °C,  $r=0.99$ ; pendiente=0.43; intercepto=2.3811.

Se obtuvo una pendiente  $n$  de 0.43 lo que indica que el ligando C7 no interacciona con ADN, esto también puede notarse en su valor de  $K_a$  el cual corresponde a  $240.5 \text{ M}^{-1}$ .



**Fig. 7.36** Ecuación lineal de comportamiento obtenido para la interacción complejo C7-DMCD con ADN a 30°C,  $r=0.95$ ; pendiente=0.56; intercepto=1.9574.

Se obtuvo un  $n$  de 0.56 y un  $K_a$  de  $90.6 \text{ M}^{-1}$  lo que demuestra una menor interacción del complejo C7-DMCD en comparación al ligando C7, además de esto las  $K_a$  C7-ADN y C7-DMCD-ADN son mucho menores que la  $K_a$  de C7-DMCD, por lo que el complejo ni el ligando serían buenos carriers.

En el caso de C7 se crea una competencia entre la DMCD y el ADN por la interacción con este. La  $K_a$  correspondiente de C7-ADN es mayor que la  $K_a$  correspondiente a la interacción C7-ADN, esto significa que el ligando C7 puede poseer una preferencia por la DMCD y que en presencia de esta se verá dificultada la interacción con ADN.

## 8. Conclusiones

El complejo C7-DMCD presentan una estequiometria 1:1, y sus procesos de formación son espontáneos. Endotérmicos y están predominados por factores entrópicos. Al igual que el complejo TPPM-DMCD, esto debido a que la formación del complejo depende de la inclusión del ligando dentro de la DMCD, por lo que las rotaciones y torsiones son de gran importancia en este proceso, como fue comprobado por modelamiento molecular.

El complejo C7-DMCD, no presenta propiedades útiles frente a metales bivalentes, lo que lo descarta como posible quimiosensor fluorescente

El complejo TPPM-DMCD presenta propiedades como quimiosensor, mostrando una sensibilidad excepcional frente a Zn (II) con una buena selectividad, por lo que es un gran candidato para ser un quimiosensor específico de Zn.

El complejo TPPM-DMCD presenta interacción con ADN, con una  $K_a$  de  $3368 \text{ M}^{-1}$ , y en presencia de Zn, el valor de  $K_a$  es 360 veces mayor aproximadamente, lo que nos estaría indicando que el complejo ternario TPPM-DMCD-Zn podría ser utilizado en futuros estudios con ADN.

## 9. Referencias

- 
- <sup>1</sup> Tracy Punshon, Zhigang Li, Carmen J. Marsit, Brian P. Jackson, Emily R. Baker, and Margaret R. Karagas. Placental Metal Concentrations in Relation to Maternal and Infant Toenails in a U.S. Cohort. . *Environ. Sci. Technol.*, **2016**, **50** (3), pp 1587–1594.
- <sup>2</sup> Claire E. Bartman, Haidy Metwally, and Lars Konermann. Effects of Multidentate Metal Interactions on the Structure of Collisionally Activated Proteins: Insights from Ion Mobility Spectrometry and Molecular Dynamics Simulations. *Anal. Chem.*, **2016**, **88** (13), pp 6905–6913.
- <sup>3</sup> Sarah E. J. Bowman, Jennifer Bridwell-Rabb, and Catherine L. Drennan. Metalloprotein Crystallography: More than a Structure. *Acc. Chem. Res.*, **2016**, **49** (4), pp 695–702.
- <sup>4</sup> Diana Vilela, Jemish Parmar, Yongfei Zeng, Yanli Zhao, and Samuel Sánchez. Graphene-Based Microbots for Toxic Heavy Metal Removal and Recovery from Water. *Nano Lett.*, **2016**, **16** (4), pp 2860–2866.
- <sup>5</sup> Daniel M. Woltering. Health Risk Assessment for Metals in Inorganic Fertilizers: Development and Use in Risk Management. *Environmental Impact of Fertilizer on Soil and Water*, **2003**, **10**, pp 124-147.
- <sup>6</sup> Eric P. Achterberg, Charlotte B. Braungardt, and Kate A. Howell. Eric P. Achterberg, Charlotte B. Braungardt, and Kate A. Howell. *Environmental Electrochemistry*, **2002**, **5**, pp 73-101.
- <sup>7</sup> Xiaoqiang Chen, Tuhin Pradhan, Fang Wang, Jong Seung Kim, and Juyoung Yoon. Fluorescent Chemosensors Based on Spiroring-Opening of Xanthenes and Related Derivatives. *Chem. Rev.*, **2012**, **112** (3), pp 1910–1956.
- <sup>8</sup> Li D. Chen, Xu U. Zou, and Philippe Bühlmann. Cyanide-Selective Electrode Based on Zn(II) Tetraphenylporphyrin as Ionophore. *Anal. Chem.*, **2012**, **84** (21), pp 9192–9198.
- <sup>9</sup> Maria J. Berrocal Aurelio Cruz Ibrahim H. A. Badr Leonidas G. Bachas. Tripodal Ionophore with Sulfate Recognition Properties for Anion-Selective Electrodes. *Anal. Chem.*, **2000**, **72** (21), pp 5295–5299.
- <sup>10</sup> Bamaprasad Bag Parimal K. Bharadwaj. Perturbation of the PET Process in Fluorophore–Spacer–Receptor Systems through Structural Modification: Transition Metal Induced Fluorescence Enhancement and Selectivity. *J. Phys. Chem. B*, **2005**, **109** (10), pp 4377–4390.
- <sup>11</sup> Rangappa S. Keri, Srinivasa Budagumpi, Ranjith Krishna Pai, R. Geetha Balakrishna. Chromones as a privileged scaffold in drug discovery: A review *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2014**, **78**, Pages 340-374
- <sup>12</sup> Harendra, S., Kripa, S., Rajesh, D., Lal Dhar, Y. Cycloaddition of 4-amino-3-mercapto-1,2,4 triazole to heteroacumulenes and antifungal activity of the resulting 1,2,4-triazolo[3,4-c]-1,2-dithia-4,5-diazines. *J. Agric. Food Chemical*, **1990**. **38** (7), 1483-1486.
- <sup>13</sup> Grégorio Crini. Review: A History of Cyclodextrins. *Chem. Rev.*, **2014**, **114** (21), pp 10940–10975.

- 
- <sup>14</sup> Wan-Sheung Li, San-Chi Wang, Tsong-Song Hwang, and Ito Chao. Substituent Effect on the Structural Behavior of Modified Cyclodextrin: A Molecular Dynamics Study on Methylated  $\beta$ -CDs. *J. Phys. Chem. B*, **2012**, **116** (11), pp 3477–3489.
- <sup>15</sup> Jullian. C. Improvement of galangin solubility using native and derivate cyclodextrins: an UV-vis and NMR study. *Journal of Chilean chemistry society*. **2009**. **54**, 201-203
- <sup>16</sup> Jullian. C., Morales-Montecinos.J., Carolina Jullian, Javier Morales-Montecinos, Gerald Zapata-Torres, Benjamín Aguilera, Jorge Rodriguez, Vicente Arán, Claudio Olea-Azar. Characterization, phase-solubility, and molecular modeling of inclusion complex of 5-nitroindazole derivative with cyclodextrins. **2008**. **1**(16), 5078-5084
- <sup>17</sup> David G. Hilmey Masako Abe Marina I. Nelen Corey E. Stilts Gary A. Baker Sheila N. Baker Frank V. Bright Sherry R. Davies Sandra O. Gollnick Allan R. Oseroff Scott L. Gibson Russell Hilf Michael R. Detty. Water-Soluble, Core-Modified Porphyrins as Novel, Longer-Wavelength-Absorbing Sensitizers for Photodynamic Therapy. II. Effects of Core Heteroatoms and Meso-Substituents on Biological Activity. *J. Med. Chem.*, **2002**, **45** (2), pp 449–461.
- <sup>18</sup> Caterina Fattorusso, Giuseppe Campiani, Gagan Kukreja, Marco Persico, Stefania Butini, Maria Pia Romano, Maria Altarelli, Sindu Ros, Margherita Brindisi, Luisa Savini, Ettore Novellino, Vito Nacci, Ernesto Fattorusso, Silvia Parapini, Nicoletta Basilico, Donatella Taramelli, Vanessa Yardley, Simon Croft, Marianna Borriello and Sandra Gemma. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Studies of 4-Quinolinyln- and 9-Acrydinylhydrazones as Potent Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.*, **2008**, **51** (5), pp 1333–1343.
- <sup>19</sup> J.B. Chaires. Drug-DNA interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1998**, **8**, 314-320.
- <sup>20</sup> Thurston, D. E.. Nucleic acid targeting: therapeutic strategies for the 21st century. *Br. J. Cancer*. **1999**. **80**. (Suppl. 1), 65-85.
- <sup>21</sup> Jenkins, T. C. Allosteric, Chiral-Selective Drug Binding to DNA. *Curr. Med. Chem.* **2000**. **7**,99-115.
- <sup>22</sup> Wemmer, D. E., and Dervan, P. B.. Targeting the minor groove of DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1997**. **7**, 355-361.
- <sup>23</sup> Zachary D. Hill and Patrick MacCarthy. Novel approach to Job's method: An undergraduate experiment. *J. Chem. Educ.*, **1986**, **63** (2), p 162