

20. Química

Síntesis y caracterización de complejos helicoidales de Ru (II) para su estudio como agentes coordinadores de ADN.

Staforelli, Sebastián; Escudero, Dayra; Orientador: Dr. Lemus, Luis

sebastian.staforelli@usach.cl, dayra.escudero@usach.cl

Facultad de Química y Biología

Universidad de Santiago de Chile

Resumen

En los últimos años, la química inorgánica medicinal ha realizado un gran esfuerzo en el diseño y evaluación de nuevos agentes sintéticos, aprovechando las diversas geometrías y números de coordinación de los metales, así como la amplia gama de ligandos disponibles, con el fin de obtener compuestos con propiedades deseables contra blancos biológicos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer. Entre los compuestos con propiedades interesantes para la modificación estructural del ADN están los heli-catos, debido a su similitud con biomoléculas como las α -hélices, su naturaleza catiónica y quiralidad intrínseca, favoreciendo así su interacción con el ADN. Sin embargo, la mayoría de los complejos helicoidales descritos en la bibliografía son racémicos, que pueden separarse en sus enantiómeros por procedimientos costosos y difíciles. Considerando ligandos quirales con al menos un centro de carbono ópticamente activo, es posible generar entornos de coordinación alrededor del metal para producir selectivamente conformaciones $\Delta\Delta$ o $\Lambda\Lambda$.

Ante los antecedentes sobre el carácter "topológico" del proceso de reconocimiento molecular, que da lugar al establecimiento de interacciones entre heli-catos y ADN, en este trabajo se estudia el efecto de la quiralidad de los heli-catos bimetálicos en sus afinidades hacia el ADN. La preparación, caracterización y evaluación de la interacción con ADN de dos complejos derivados de Ru (II) que tienen ligandos de bis-fenantrolina con espaciadores quirales, (R,R)-trans-1,2-ciclohexanodimino-1,10-fenantrolina y (S,S)-trans-1,2-ciclohexanodimino-1,10-fenantrolina. Los estudios de electroforesis, UV-vis y RMN indican una diferenciación en la interacción de ambos heli-catos con el ADN, que se atribuye al carácter enantioselectivo en el establecimiento de tales interacciones.

Palabras clave: Estructuras helicoidales, N ligandos, Rutenio, Quiralidad, ADN.

Introducción

La Química Supramolecular[1] ha desarrollado metodologías para el diseño de sistemas construidos a partir de componentes moleculares que interactúan a través de fuerzas intermoleculares no covalentes, convirtiéndose en un creciente campo de investigación. Un grupo de estructuras supramoleculares que han despertado gran interés debido a la arquitectura que presentan son conocidos como Helicatos,[2] definidos como estructuras auto-ensambladas constituidas por dos o más hebras de ligandos, que se unen y enrollan a través de una serie de cationes metálicos, dando como resultado una estructura helicoidal.[3] Al igual que el ADN, los helicatos son moléculas que poseen quiralidad, la que es definida por el sentido de giro de los ligandos al coordinar los centros metálicos, diferenciándose dos enantiómeros, siendo el enantiómero M aquel donde el ligando se enrolla a “mano izquierda” y el enantiómero P hacia “mano derecha” . (Figura 1.A).

Además, pueden existir dos situaciones posibles; si se opone la actividad óptica en los dos centros metálicos, surge la forma meso (no posee quiralidad) y si los dos centros metálicos son homquirales, se forma una mezcla racémica (formas $\Delta\Delta$ o P y las formas $\Lambda\Lambda$ o M) [4] (Figura 1.B).

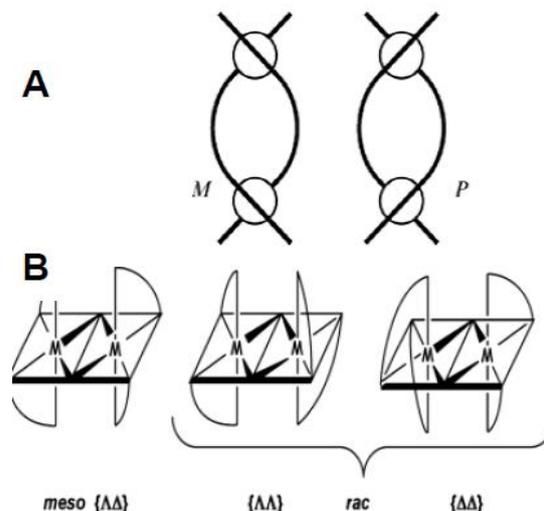


Figura 1. a) Representación de los enantiómeros bimetalicos helicoidales M y P. b) Visión esquemática de las posibilidades isomérica de un helicato.

Además del atractivo estructural que tienen éstos complejos helicoidales, presentan similitudes con estructuras biológicas como los “dedos de zinc y las alfa-hélices (Figura 2), que corresponden a segmentos proteicos que se enrollan sobre un eje helicoidal y se unen de manera reversible al surco mayor del ADN. Estas estructuras biológicas tienen la función de reconocer el ADN y regular su expresión genética [5]

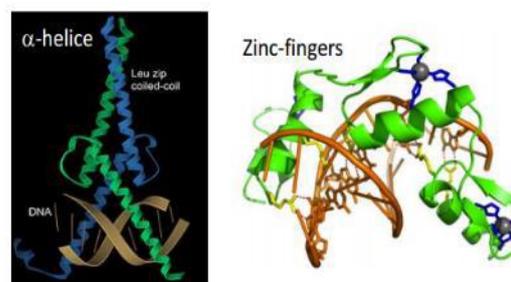


Figura 2. Alfa hélice y dedos de zinc unidos al surco mayor del ADN.

Dada la similitud de los heli-catos con estructuras biológicas de reconocimiento de ADN, estos han sido utilizados para el estudio del tipo de interacción que existe entre estos complejos metálicos y el ADN, donde la naturaleza intrínsecamente quiral que presentan estos complejos, así como características topológicas (tamaño y forma) y la carga dada por los centros metálicos, son consideraciones claves en el proceso de reconocimiento y unión no covalente con el ADN. [6]

Hannon y colaboradores [7] han sido pioneros en la exploración de complejos helicoidales que interactúan con el ADN, a partir de la obtención del complejo $rac-[Fe^{II}_2L_3]^{4+}$ ($rac=racémico$), que está formado de tres ligandos bis(piridilimina) (L) que coordinan a dos centros de hierro (II) (Figura 3).

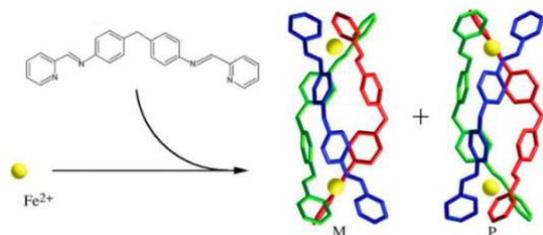


Figura 3. Helicato $[Fe_2L_3]^{4+}$, a la izquierda se muestra el enantiómero M y a la derecha el enantiómero P.

Del estudio sistemático del complejo de Fe(II) junto con el uso de complejos similares derivados de Ni(II), Ru(II) y Cu(I), Hannon logró establecer una serie de conclusiones respecto al tamaño, carga y tipo de metal, tienen sobre la interacción con ADN.

- Efectos del tamaño del complejo.

Hannon visualizó el grado de interacción del helicato $rac-[Fe_2L_3]^{4+}$ con doble hebras de ADN mediante microscopía de fuerza atómica (AFM, de sus siglas en inglés *Atomic Force Microscopy*), a diferentes concentraciones de helicato utilizando dos complejos monometálicos como control, $[Co(NH_3)_6]^{3+}$ y $[Ru(phen)_3]^{2+}$.

Estos dos complejos presentan características diferentes de unión al ADN, siendo el complejo de cobalto un agente de condensación de ADN y el complejo de rutenio un modelo de comparación de forma molecular “esférica”, teniendo la mitad de la carga catiónica y del tamaño que el complejo helicoidal de Fe (II). En comparación a éstos dos complejos monometálicos, el helicato ferroso no produce condensación de ADN, pero causa la curvatura en la doble hebra por su coordinación a ésta. Este resultado está atribuido al tamaño que posee el helicato $rac-[Fe_2L_3]^{4+}$ (longitud: 17,3 Å y ancho: 5,3 Å), que provoca importantes flexiones intramoleculares en el ADN, generando modificaciones en su conformación, en comparación al complejo de cobalto que solo actuó como agente de condensación de ADN y el complejo de rutenio que, considerando que es la mitad que el complejo helicoidal de Hierro en cuanto a carga, tamaño y forma, no logró efecto de curvatura en la doble hebra.

- Efectos de la carga del complejo.

Con el fin de evaluar el efecto de la carga catiónica de los helicatos en la fuerza y la extensión de la unión al ADN aniónico, Childs y colaboradores,[8] estudiaron helicatos dinucleares de Cu(I) $[\text{Cu}_2\text{L}_2]^{2+}$, resultando ser similares en tamaño y forma (longitud: 18,5 Å y ancho: 5,5 Å), pero de carga catiónica menor que al helicato de Fe (II) de triple cadena homóloga, determinando que este complejo di catiónico de Cu(I) se une al ADN menos fuertemente que el de hierro tetra catiónico, logrando sólo una agregación de las hebras, lo que confirma que la carga catiónica de los complejos es un factor importante frente a la unión a ADN polianiónico.

- Efectos del Metal.

Así también, en el grupo de Hannon, observaron que al comparar la afinidad del helicato $rac\text{-}[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ por el ADN con otros helicatos bimetálicos de triple hebra $[\text{M}_2\text{L}_3]^{4+}$ que poseen diferentes centros metálicos (M= Ni, Ru o Co) pero si el mismo tamaño, forma y carga, la afinidad de estos helicatos por ADN no depende del metal, induciendo todos ellos, efectos similares sobre la estructura de la doble hélice. [9]

De esta manera, este grupo de investigación permitió establecer que tanto la afinidad de interacción de helicatos con el ADN y sus modos de unión son independientes del metal, pero si están

fuertemente determinado por el tamaño y forma (definida por el ligando) y la carga catiónica que presentan estas metalo-estructuras. Además, las observaciones recogidas del trabajo de Hannon apuntan a que el proceso de reconocimiento entre helicato y el ADN es de carácter "topológico", debido a la forma, tamaño y carga que posee el complejo, dando origen al establecimiento de interacciones de distinta naturaleza y magnitud.

En general, los complejos que mejor se ajustan a la estructura de la doble hélice del ADN tienen mayor afinidad de unión, es por esto que Meistermann y colaboradores, [10] estudiaron por separado el efecto que generan los enantiómeros M y P de $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ (Figura 3.) al interactuar con ADN calf-thymus (ADN en forma B), a partir de imágenes de AFM, que indican que existe mayor interacción entre el ADN y el enantiómero M por sobre el enantiómero P del helicato, provocando el enantiómero M un marcado enrollamiento de las hebras de ADN (Figura 4b.), mientras el enantiómero P, solo logra una leve curvatura de las hebras (Figura 4c.).

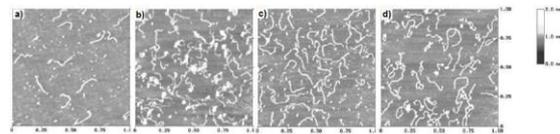


Figura 4. Imágenes AFM de fragmentos de 200 pb de ADN lineal incubado con $[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ a 37°C. a) ADN libre, b) ADN incubado con enantiómero M en relación 10:3, c) ADN incubado con enantiómero P en relación 10:3 d) ADN incubado con $rac\text{-}[\text{Fe}_2\text{L}_3]^{4+}$ en relación 10:3.

Así también, el papel que juega la quiralidad de helicanos sobre la modificación de las estructuras de ADN ha sido abordado por Yu y colaboradores,[11] quienes estudiaron los mismos helicanos $[M_2L_3]^{4+}$ ($M= Fe(II)$ o $Ni(II)$) como agentes de unión a ADN telomérico humano G-quadruplex, mostrando que la selectividad quiral en la estabilización del ADN G-quadruplex resultó ser más fuerte para el enantiómero P que para el enantiómero M (Figura 5), y de manera interesante esta selectividad quiral resultó nuevamente ser, independiente del metal.

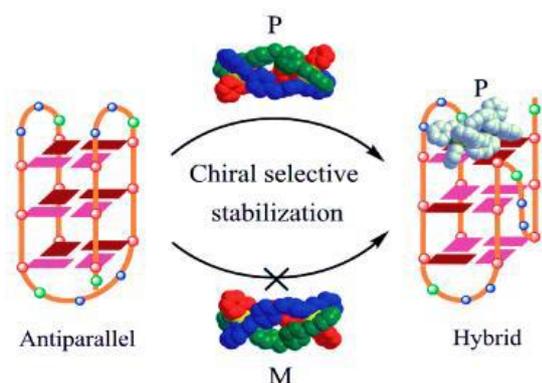


Figura 5. Enantioselectividad en la estabilización y unión del ADN telomérico G-quadruplex con helicanos.

Este hallazgo indica que la **enantioselectividad** en la unión de helicanos con ADN no se limita a seguir la regla general que el enantiómero M siempre se asocia con B-ADN, confirmando que la interacción complejo-ADN dependerá tanto de la helicidad del enantiómero sintético, como del ADN con el que interactúa.[12]

Últimamente, ha existido una aproximación en esta línea mediante el estudio de helicanos que poseen ligandos flexibles con centros estereogénicos en los espaciadores que unen los fragmentos coordinantes, los cuales son capaces de dirigir el sentido de giro del helicano con la obtención de "ligandos pro-quirales",[13] En este enfoque, el grupo de investigación de Scott[14] ha estudiado nuevos complejos helicoidales ópticamente puros de $Fe(II)$ y $Zn(II)$ de triple hebra, a partir de ligandos pro-quirales mucho más flexibles en comparación con los clásicos helicanos rígidos, denominando a éstos como "**Flexicatos**".

La característica principal de este grupo de complejos es su pureza óptica dada por la información quiral contenida en el ligando, que es transferida eficientemente al centro metálico durante la coordinación, además de ser solubles y estables en medio acuoso y sus propiedades se pueden ajustar u optimizar, siendo fácilmente disponibles en una escala práctica (figura 6).

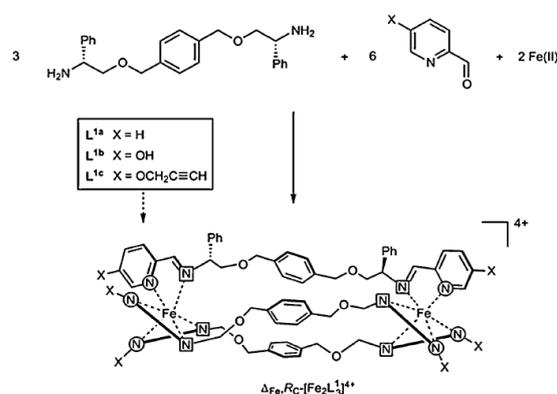


Figura 6. Auto ensamblaje de flexicato de $Fe(II)$ enantioméricamente puro.

En este trabajo se presenta la preparación y caracterización de un ligando bis-fenantrolina para la obtención de un complejo bi-metálico de rutenio (II), donde el diseño del ligando (fragmentos coordinantes y espaciador) favorece la formación preferencial de un complejo helicoidal.

Así también, se discute el efecto que tiene la quiralidad de los helicanos sobre su afinidad por coordinar ADN, donde el sentido de giro de los complejos favorece la coordinación de uno de los enantiómeros por sobre el otro (enantioselectividad), confirmando que el reconocimiento que da origen al establecimiento de interacciones entre helicato y ADN es de tipo “topológico”.

Objetivos

- Sintetizar y caracterizar un complejo bimetálico de Ru(II) derivado de un ligando bisfenantrolina, cuyo diseño favorezca la obtención de una estructura helicoidal y confiera un sentido de giro preferencial en la conformación del complejo obtenido.
- Evaluar modificaciones estructurales, cambios conformacionales o cortes en las hebras o degradación del ADN causados por la coordinación de los helicanos, mediante el uso de las técnicas de electroforesis.

Materiales y Métodos

Los reactivos necesarios para la síntesis de los ligandos y los complejos fueron utilizados sin previo tratamiento y corresponden a reactivos grado síntesis: 1,10-fenantrolina monohidratado $\geq 99.5\%$ (Merck), peróxido de hidrógeno al 30% (Merck), KOH (Merck), Na_2SO_4 anhidro 99,4% (J.T. Baker), cianuro de potasio $\geq 96\%$, cloruro de benzoilo $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich), NaOH $\geq 99\%$ (Merck), ácido clorhídrico 32% (Merck), cloruro de tionilo $\geq 99.0\%$ (Merck), borohidruro de sodio $\geq 96\%$ (Sigma-Aldrich), dióxido de selenio $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich), (1R,2R)-(-)-1,2-diaminociclohexano $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich). El complejo precursor de rutenio utilizado fue $\text{Ru}(\text{DMSO})_4\text{Cl}_2$.

Para el estudio mediante electroforesis se utilizaron los siguientes reactivos: ADN plasmidial pBR322 de E. coli ER2272 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en solución buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) (New England BioLabs), enzima de restricción Eco RI (20,000 unidades/mL, New England Biolabs), buffer TAE 50x (Tris-Acetato; EDTA grado ultra puro, Amresco), buffer de carga azul-celeste 6x (Winkler), GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X en agua (Biotium), ADN decámero 1 μmol de dúplex liofilizado d(5'-CGCGATCGCG-3')₂ (Integrated DNA Technologies) y sal sódica del ácido-3-trimetilsilil propiónico (TSP, Sigma-Aldrich).

Todos los solventes utilizados son de procedencia Merck. Metanol fue secado con CaCl_2 y tamiz molecular 4 Å durante 12 h, previo tratamiento del tamiz el cual fue activado a 400°C durante 3 h. Acetonitrilo usado en medidas de voltametría cíclica fue secado usando P_2O_5 y recogido directamente desde el destilador para usarlo de manera inmediata en las medidas electroquímicas. El resto de solventes fue utilizado sin previo tratamiento: Ácido acético glacial, Etanol pa. 99,5%, cloroformo pa. 99%, diclorometano pa. 99,5%, acetonitrilo pa. 99,9%, metanol pa. 99,9 %, piridina 99%, cloroformo-d 1 99,8%, acetonitrilo-d 3 99%, acetona-d 6 99,9%, 1,1,2,2-tetracloroetano-d 2 99,5%, metanol-d 4 99,8%.

Todas las soluciones acuosas para experimentos de electroforesis fueron preparadas con agua libre de nucleasas, mientras que para las soluciones utilizadas en experimentos de RMN 1D con ADN fueron preparadas con agua milli-Q (Heal Force, Ultra Pure Water System).

Síntesis del precursor 2-carbaldehído-1,10-fenantrolina.

La síntesis de 2-carbaldehído-1,10-fenantrolina fue realizada siguiendo el procedimiento reportado previamente en literatura [15] y como se describe en la figura 7.

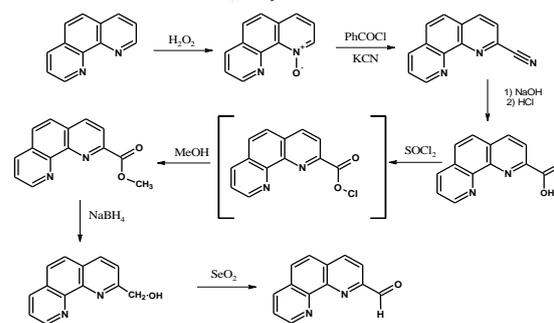


Figura 7. Esquema de síntesis del precursor 2-carbaldehído-1,10-fenantrolina.

Síntesis de los ligandos (R,R)-(2-DPIM) ((R,R)-trans-1,2-ciclohexanodiimino-1,10-fenantrolina) y (S,S)-(2-DPIM) ((S,S)-trans-1,2-ciclohexanodiimino-1,10-fenantrolina)).

La síntesis del ligando (R,R)-trans-1,2-ciclohexanodiimino-1,10-fenantrolina, (R,R)-2-DPIM, fue realizada según el esquema de síntesis que se muestra en la figura 8. 600 mg (2,9 mmol) del precursor 2-carbaldehído-1,10-fenantrolina y 164,8 mg (3,3 mmol) de (1R,2R)-(-)-1,2-diaminociclohexano se mezclaron en 4 mL de metanol anhidro en un reactor tipo Parr. La mezcla de reacción se irradió en un horno de microondas (MW) durante 20 min a aproximadamente 800W de potencia. Después, el producto resultante se extrajo con éter etílico para dar un sólido marrón con un rendimiento del 83%. Para la obtención del ligando (S,S)-trans-1,2-ciclohexanodiimino-1,10-fenantrolina, (S,S)-2-DPIM, se realizó el mismo procedimiento experimental anterior, pero esta vez utilizando el espaciador (1S,2S)-(+)-1,2-

diaminociclohexano.

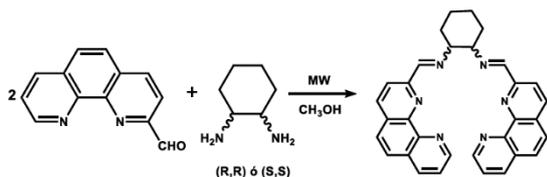


Figura 8. Esquema de la síntesis del ligando dímero (R,R)-(2-DPIM) ó (S,S)-(2-DPIM).

Síntesis del complejo $[Ru^{II}_2((R,R)\text{-}2\text{-DPIM})_2](NO_3)_4$ y $[Ru^{II}_2((S,S)\text{-}2\text{-DPIM})_2](NO_3)_4$.

Para la síntesis de cada uno de los complejos, se utilizaron los ligandos (R,R)-(2-DPIM) y (S,S)-(2-DPIM) (0,55 g, 0,89 mmol) y $Ru(DMSO)_4Cl_2$ (0,54 g, 1,11 mmol), siendo mezclados con 5 ml de metanol en un reactor metálico de tipo Parr. La mezcla de reacción se irradió 2 veces durante 30 min a una potencia de 800 W en un horno microondas. Posteriormente, el producto resultante fue extraído con metanol y rotoevaporado para dar una mezcla aceitosa de productos de color marrón, la cual fue disuelta en agua y filtrada para eliminar sólidos insolubles. El sólido resultante fue filtrado y purificado con una columna cromatográfica de alúmina usando acetonitrilo-agua-solución saturada de KNO_3 en proporciones de 20:1:1 como fase móvil. La presencia de KNO_3 en la columna cromatográfica produjo el reemplazo de los iones de cloruros por NO_3^- .

Electroforesis.

El estudio de la interacción de los complejos $[Ru^{II}_2((R,R)\text{-}2\text{-DPIM})_2](NO_3)_4$ y $[Ru^{II}_2((S,S)\text{-}2\text{-DPIM})_2](NO_3)_4$ con ADN se realizó mediante la técnica de electroforesis en gel.

Se preparó una solución stock de plasmidio pBR322, utilizada para incubar 7 muestras con 2 μL cada una, además de la preparación de las 2 soluciones stock del complejo a 0,56 mM y 1,7 mM en agua milli-Q, tomando los volúmenes necesarios para lograr concentraciones de 3,75 μM , 7,5 μM , 18,78 μM , 37,56 μM y 225 μM , adicionado posteriormente 2 μL de agua libre de nucleasas, incubando todas las muestras durante 30 min. para adicionar 3 μL de buffer de carga, llegando a un volumen total de 10 μL . Para los 2 complejos se utilizó un control de plasmidio lineal (carril 8), el cual se obtuvo incubando 1 μg (1 μL) de plasmidio pBR322 con 1 μL de enzima de restricción Eco RI, agregando 5 μL de solución buffer NeBuffer 10X y 43 μL de agua libre de nucleasas, manteniéndose durante 200 min en un baño de agua a 37°C.

Estudio de la interacción oligonucleótido-complejo. Determinación de la constante de unión K_b , mediante RMN.

Para los complejos bimetálicos $[Ru^{II}_2((R,R)\text{-}2\text{-DPIM})_2](NO_3)_4$ y $[Ru^{II}_2((S,S)\text{-}2\text{-DPIM})_2](NO_3)_4$ se prepararon soluciones stock de concentración 1,14 μM en buffer fosfato (10 mM) pH=7,0 en 90% H_2O / 10%

D₂O. La solución de ADN se preparó a partir de 1 μmol de oligonucleótido dúplex d(5'-CGCGATCGCG3')₂ disuelto en 1000 μL del mismo buffer, obteniendo una solución de concentración 1 mM de dúplex ([ADN]). De esta solución de ADN se tomaron 500 μL y se añadieron sucesivamente alícuotas de 40 μL de complejo, que corresponden a incrementos de 0,1 equiv. hasta llegar a un valor de $r=[ADN]/[complejo]=1,7$. Luego, las adiciones se incrementaron en 0,2 hasta alcanzar 2,0 equiv. Luego de cada adición, se registraron espectros de RMN-¹H. La temperatura se mantuvo constante a 300 K a lo largo de la titulación.

Resultados y Discusión

Síntesis y caracterización de helicatos de Ru(II).

Se prepararon ligandos quirales (S,S)-2-DPIM y (R,R)-2-DPIM por condensación de 2 eq de 2-carbaldehído-1,10-fenantrolina con 1 eq de los espaciadores quirales (S,S) Y (R,R)-trans-1,2-ciclohexanodimino, respectivamente. La reacción asistida por microondas de los ligandos con Ru(DMSO)₄Cl₂, produjo los helicatos ópticamente activos P-[Ru₂((R,R)-2-DPIM)₂]⁴⁺ y M-[Ru₂((S,S)-2-DPIM)₂]⁴⁺, después de la precipitación en forma de sales de nitrato y purificación en columna cromatográfica.

Pequeñas diferencias en los espectros de RMN de ambos helicatos surge de la

conformación de los espaciadores ciclohexano, que evidencian el carácter enantiomérico de ambos complejos (figura 9).

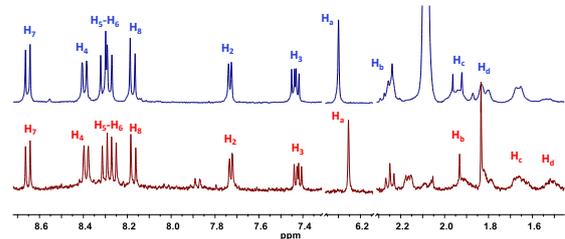


Figura 9. Espectros de ¹H-NMR de helicatos M- (rojo) y P- (azul) de Ru (II), en CD₃OD a 300K.

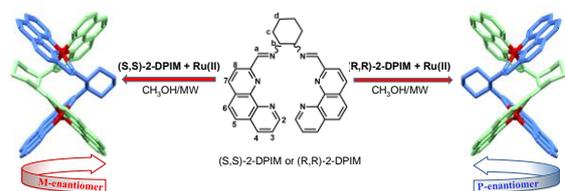


Figura 10. Esquema de síntesis geometría optimizada (DFT/wB97X-D3/Def2-TZVP) de los helicatos bimetalicos M y P de Ru (II).

Espectrometría de masas del complejo [Ru₂(2-DPIM)₂](NO₃)₄.

El espectro de masas del complejo [Ru^{II}₂((R,R)-2-DPIM)₂](NO₃)₄ mostró dos picos principales de ion molecular de similar intensidad relativa, en una ventana total de 0 a 2000 m/z. Los picos de iones moleculares aparecen a m/z = 298,2 y m/z = 659,3. A partir de la comparación con los patrones isotópicos calculados, figura 11, el pico de valor m/z = 298,2 correspondería a la especie tetra-catiónica esperada [Ru^{II}₂(R,R-2-DPIM)₂]⁴⁺ (1192,26/4), lo cual indica una relación metal-ligando 1:1 (sin contra-iones nitrato). Además, se descarta la formación

de la especie monometálica $[\text{Ru}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-2-DPIM})]^{2+}$, debido a que la presencia del doble enlace del grupo imina confiere rigidez al ligando, impidiendo la hexacoordinación de ambos fragmentos fenantrolínicos de la misma cadena a un átomo de rutenio.[16] Así también, no es probable que este pico sea atribuido a esta especie monometálica $[\text{Ru}^{\text{II}}((\text{R,R})\text{-2-DPIM})]^{2+}$ considerando una coordinación parcial del ligando, ya que en base a los resultados obtenidos mediante RMN, en el ligando bis-fenantrolínico coordinado se observa un único patrón de señales aromáticas, lo cual indica que no existe un fragmento fenantrolina descoordinado en el compuesto medido.

Respecto al segundo pico observado a $m/z = 659,3$, este correspondería a la especie bimetalica $\{[\text{Ru}^{\text{II}}_2((\text{R,R})\text{-2-DPIM})_2](\text{NO}_3)_2\}^{2+}$, cuya masa molar es 1316,22 g/mol y carga total es 2+ ($m/z=658,11$). La presencia de este pico como especie principal detectada en los espectros de masa señala que existe asociación de dos iones NO_3^- al complejo bimetalico catiónico, probablemente por atracción electrostática a los centros metálicos de Ru(II). Además, existe una diferencia entre los valores experimentales y calculados de 1 unidad de m/z , por lo que es posible que la molécula se encuentre protonada (o bien uno de los contraiones) debido a las condiciones experimentales de medida en el espectrómetro ESI-MS. Los resultados de espectrometría de masas por electrospray son coherentes con la fórmula propuesta para el complejo. Esto, junto a los resultados de caracterización por RMN confirman la formación de la especie bimetalica esperada.

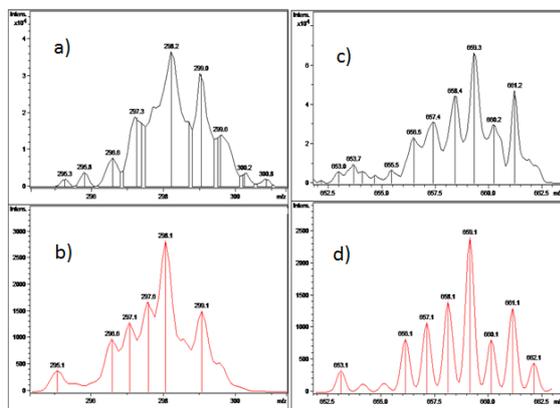


Figura 11. Patrón isotópico experimental (negro) y calculado (rojo) del complejo $[\text{Ru}_2((\text{R,R})\text{-2-DPIM})_2](\text{NO}_3)_4$. Los espectros calculados fueron obtenidos del software Burkert Daltonic DataAnalysis. Los espectros experimental y calculado en a) y b) corresponden a $[\text{Ru}_2((\text{R,R})\text{-2-DPIM})_2]^{4+}$ ($m/z = 298,2$) Los espectros experimental y calculado en c) y d) corresponden a $\{[\text{Ru}_2((\text{R,R})\text{-2-DPIM})_2](\text{NO}_3)_2\}^{2+}$, $m/z = 659,3$.

Caracterización mediante Dicroísmo Circular

Se realizaron mediciones de dicroísmo circular en acetonitrilo para evaluar la pureza óptica de ambos enantiómeros. Los ligandos libres mostraron bandas con signos opuestos por debajo de 330 nm. En consecuencia, las bandas a longitudes de onda superiores a 350 nm se atribuyen a la helicidad de los complejos.

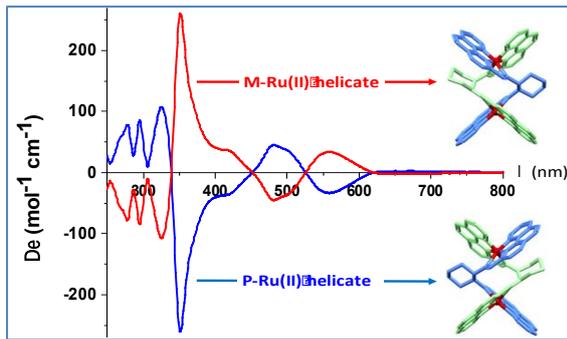


Figura 12. Espectros de CD de helicates de Ru (II) enantioméricamente puros M (rojo) y P (azul).

Interacción de los enantiómeros de Ru (II) con ADN plasmídico por electroforesis.

Los experimentos de electroforesis mostraron que ambos enantiómeros no pueden escindir el ADN plasmídico. Sin embargo, como se observa en la figura 13, la unión del enantiómero M induce un retraso más pronunciado en la migración del ADN, debido a la disminución de la carga aniónica en el biopolímero.

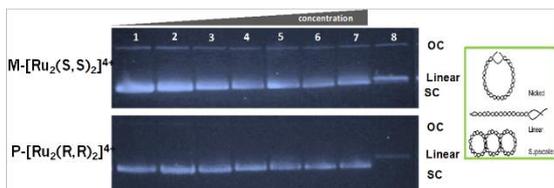


Figura 13. Interacción de pBR322 con M- $[\text{Ru}^{\text{II}}_2((\text{S,S})\text{-2-DPIM})_2]^{4+}$ y P- $[\text{Ru}^{\text{II}}_2((\text{R,R})\text{-2-DPIM})_2]^{4+}$. Línea 1: Control del plásmido SC 112,8 μM . Líneas 2-7: DNA 112,8 μM + Complejo, 2: 3,75 μM , 3: 7,5 μM , 4: 18,78 μM , 5: 37,56 μM , 6: 225 μM , 7: 1,13 mM. Línea 8: plásmido lineal control.

Determinación de la constante de unión aparente, K_b , por UV-Vis y $^1\text{H-NMR}$.

Experimentos UV-vis permitieron determinar las constantes de unión, K_b , de cada enantiómero sobre la unión de ct-

ADN, figura 14. Al igual que lo observado por electroforesis, el enantiómero M tiene una afinidad más alta por la unión al ADN, donde su valor K_b es un orden de magnitud mayor que el enantiómero P.

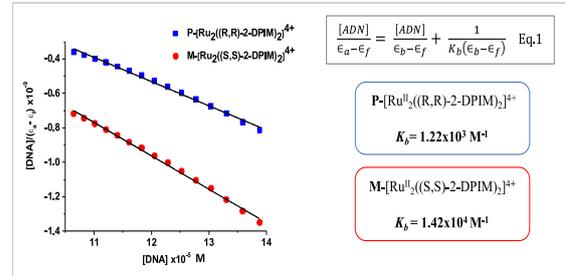


Figura 14. Determinación de K_b por titulación de ADN-ct con cada enantiómero.

La afinidad de cada enantiómero también se evaluó mediante RMN- ^1H , usando un oligonucleótido de secuencia conocida, d(5'-CGCGATCGCG-3') $_2$. El desplazamiento químico de H8 y H2 de la adenina central se usó en la ecuación 2 para determinar los valores de K_b , que resultaron mayores para el enantiómero M, figura 15.

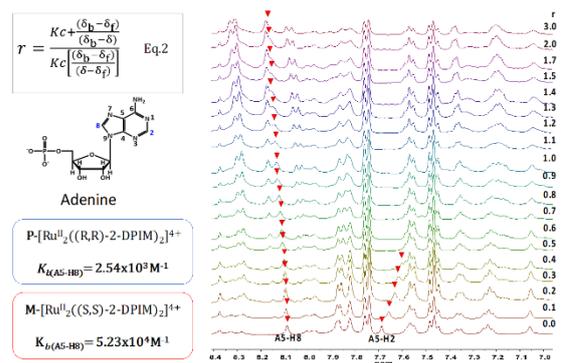


Figura 15. Determinación de K_b por valoración de un oligonucleótido con M- $[\text{Ru}^{\text{II}}_2((\text{S,S})\text{-2-DPIM})_2]^{4+}$. La relación [complejo] / [ADN] se indica como el valor r.

Conclusiones

La síntesis de los ligandos pro quirales bis-fenantrolínicos (R,R) y (S,S)-2-DPIM fue realizada con éxito a partir de una serie de reacciones de sustitución sobre el carbono 2 de 1,10-fenantrolina, terminando con el precursor 2-carbaldehído-1,10-fenantrolina, el cual permitió la obtención de los ligandos (R,R) y (S,S)-2-DPIM mediante reacción de condensación con el puente diamina (1R,2R)-(-)-1,2-diaminociclohexano y (1S,2S)-(-)-1,2-diaminociclohexano respectivamente.

Respecto a la formación de los complejos, la síntesis en microondas permitió reducir los tiempos de reacción considerablemente, ya que métodos tradicionales de síntesis de complejos fenantrolínicos de Ru(II) implican reacciones a reflujo durante varios días. Así también, en la evaluación de tres precursores de Ru se observó que el uso de Ru(DMSO)₄Cl₂ permitió la obtención de productos con las características esperadas para compuestos de fenantrolínicos de Ru(II).

Se sintetizaron los correspondientes complejos de Ru(II), obteniendo dos nuevos complejos helicatos bimetálicos, caracterizados todos en solución mediante espectroscopía RMN, espectrometría de masas y dicroísmo circular.

Los experimentos de unión a ADN mostraron que ambos enantiómeros son

capaces de unirse al ADN, sin actividad nucleasa. Los valores de K_b indican que el enantiómero M tiene una afinidad mayor hacia el ADN que el enantiómero P, dando cuenta que la interacción helicato-ADN es un proceso enantioselectivo.

Bibliografía

- [1] Lehn, J. M. (1993). Supramolecular chemistry. *Science*, 260, 1762-1763.
- [2] Hannon, M. J., & Childs, L. J. (2004). Helices and helicates: beautiful supramolecular motifs with emerging applications. *Supramolecular Chemistry*, 16(1), 7-22.
- [3] Lehn, J. M. (1995). *Supramolecular chemistry (Vol. 1)*. Vch, Weinheim.
- [4] a) Crassous, J. (2009). Chiral transfer in coordination complexes: towards molecular materials. *Chemical Society Reviews*, 38(3), 830-845. b) Howson, S. E., & Scott, P. (2011). Approaches to the synthesis of optically pure helicates. *Dalton Transactions*, 40(40), 10268-10277. c) Foley, F. M., Keene, F. R., & Collins, J. G. (2001). The DNA binding of the $\Delta\Delta$ -, $\Delta\Lambda$ - and $\Lambda\Lambda$ -stereoisomers of $[\{Ru(Me_2bpy)_2\}_2(\mu-bpm)]^{4+}$. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, (20), 2968-2974.
- [5] Brennan, R. G., & Matthews, B. W. (1989). The helix-turn-helix DNA binding motif. *J. Biol. Chem.*, 264(4), 1903-1906.

- [6] Hannon, M. J., Moreno, V., Prieto, M. J., Moldrheim, E., Sletten, E., Meistermann, Isaac, C. J., Sanders K. J & Rodger, A. (2001). Intramolecular DNA Coiling Mediated by a Metallo-Supramolecular Cylinder. *Angewandte Chemie*, 113(5), 903-908.
- [7] Moldrheim, E., Hannon, M. J., Meistermann, I., Rodger, A., & Sletten, E. (2002). Interaction between a DNA oligonucleotide and a dinuclear iron (II) supramolecular cylinder; an NMR and molecular dynamics study. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 7(7-8), 770-780.
- [8] Childs, L. J., Malina, J., Rolfsnes, B. E., Pascu, M., Prieto M. J., Broome, M. J., Rodger, P. M., Sletten, E., Moreno, V., Rodger, A. & Hannon, M. J. (2006). A DNA-binding copper(I) metallosupramolecular cylinder that acts as an artificial nuclease. *Chemistry - A European Journal*, 12(18), 4919-4927.
- [9] a) Pascu, M., Clarkson, G. J., Kariuki, B. M., & Hannon, M. J. (2006). Aggregation of iminebased metallo-supramolecular architectures through π - π interactions. *Dalton Transactions*, (22), 2635-2642. b) Hotze, A. C., Kariuki, B. M., & Hannon, M. J. (2006). Dinuclear Double-Stranded Metallosupramolecular Ruthenium Complexes: Potential Anticancer Drugs. *Angewandte Chemie*, 118(29), 4957-4960.
- [10] Meistermann, I., Moreno, V., Prieto, M., Moldrheim, E., Sletten, E., Khalid, S., Rogder, P., Peberdy, J., Isaac, C., Rodger, A. & Hannon, M. (2002). Intramolecular DNA coiling mediated by a metallo-supramolecular cylinder: Differential binding of P and M helical enantiomers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99(8), 5069-5074.
- [11] Yu, H., Wang, X., Fu, M., Ren, J., & Qu, X. (2008). Chiral metallo-supramolecular complexes selectively recognize human telomeric G-quadruplex DNA. *Nucleic acids research*, 36(17), 5695-5703.
- [12] Brabec, V., Howson, S. E., Kaner, R. A., Lord, R. M., Malina, J., Phillips, R. M., Abdallah, Q. M., McGowen, P. C., Rodger, A & Scott, P. (2013). Metallohelices with activity against cisplatinresistant cancer cells; does the mechanism involve DNA binding?. *Chemical Science*, 4(12), 4407-4416.
- [13] a) Castilla, A. M., Ramsay, W. J., & Nitschke, J. R. (2014). Stereochemistry in subcomponent self-assembly. *Accounts of chemical research*, 47(7), 2063-2073. b) Crassous, J. (2009). Chiral transfer in coordination complexes: towards molecular materials. *Chemical Society Reviews*, 38(3), 830-845.
- [14] a) Howson, S. E., Bolhuis, A., Brabec, V., Clarkson, G. J., Malina, J., Rodger, A., & Scott, P. (2012). Optically pure, water-

stable metallo-helical 'flexicate' assemblies with antibiotic activity. *Nature chemistry*, 4(1), 31-36. b) Kaner, R. A., Allison, S. J., Faulkner, A. D., Phillips, R. M., Roper, D. I., Shepherd, S. L., Simpson, D. H., Waterfield N. R & Scott, P. (2016). Anticancer metallohelices: nanomolar potency and high selectivity. *Chemical Science*.

[15] Sun, W. H., Jie, S., Zhang, S., Zhang, W., Song, Y., Ma, H., ... & Fröhlich, R. (2006). Iron complexes bearing 2-imino-1, 10-phenanthrolyl ligands as highly active catalysts for ethylene oligomerization. *Organometallics*, 25(3), 666-677.

[16] Constable, E. C., Zhang, G., Housecroft, C. E., Neuburger, M., & Zampese, J. A. (2010). Diastereoselective assembly of helicates incorporating a hexadentate chiral scaffold. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2010(13), 2000-2011.

Financiamiento

- Gastos Operacionales 21150493.