

**DESARROLLO DE RUTAS SINTÉTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE
LIGANDOS ORGÁNICOS QUE PERMITAN LA SÍNTESIS DE BIOMIMÉTICOS
DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE NÍQUEL**

CAROLINA RAMOS COBO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2016**

**DESARROLLO DE RUTAS SINTÉTICAS PARA LA OBTENCIÓN DE
LIGANDOS ORGÁNICOS QUE PERMITAN LA SÍNTESIS DE BIOMIMÉTICOS
DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE NÍQUEL**

CAROLINA RAMOS COBO

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
PREGRADO EN QUÍMICA**

TUTOR:

JAMES WESTON, PhD.

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA
SANTIAGO DE CALI
2016**

APROBADO POR:

**NORA ELENA VALDERRUTEN, PhD.
EVALUADOR**

**JAMES WESTON, PhD.
DIRECTOR DEL PROYECTO**

**FECHA DE ENTREGA: 28 DE FEBRERO DEL 2017
SANTIAGO DE CALI, COLOMBIA**

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto no podría haberse culminado sin la compañía y apoyo incondicional de mis padres, mi hermana y mi familia. Agradezco a Dios profundamente por haberme permitido crecer alrededor de seres maravillosos que inculcaron en mí las ganas infinitas de aprender cosas nuevas y superarme día a día en todos los aspectos de mi vida.

Agradezco el acompañamiento y supervisión del profesor James Weston, quien con su sabiduría y paciencia me permitió desarrollar este trabajo de la mejor manera.

Finalmente, doy gracias a todos y cada uno de los profesores que me acompañaron en este proceso de formación pues me enseñaron el amor a la ciencia y lo asombroso que es la química.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	9
2.1. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	9
2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	9
2.3. OBJETIVOS	20
2.4. METODOLOGÍA	20
2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
2.6. CONCLUSIONES	53
2.7. RECOMENDACIONES	54
3. ANEXOS	55
3.1. ANEXO 1	55
3.2. ÍNDICE DE FIGURAS	56
4. BIBLIOGRAFÍA	59

RESUMEN

El presente proyecto de investigación pretende la generación de rutas sintéticas para la obtención de ligandos orgánicos que cumplan con los requerimientos electrónicos y estructurales presentes en el centro activo de la enzima superóxido dismutasa de níquel.

Para esto se plantearon inicialmente una serie de fragmentos de partida, determinados por análisis retrosintético del sitio activo de la enzima y, a partir de estos, se propusieron cinco rutas sintéticas que se analizaron en términos de sus posibles modificaciones y su potencial en la generación de biomiméticos de la enzima en estudio.

Esto permite concluir que, a través de estudios teóricos y computacionales, fue posible la obtención de cinco rutas sintéticas que permitieron la generación de ligandos orgánicos que cumplieron con las exigencias estructurales y electrónicas de la esfera de coordinación del ion níquel en el sitio activo de la enzima superóxido dismutasa de níquel.

De esta manera, el proyecto tiene como fin último contribuir a la información disponible sobre la síntesis de biomiméticos funcionales de la enzima superóxido dismutasa de níquel, ya que existe a nivel internacional un alto interés científico en estas macromoléculas como posible tratamiento de las enfermedades asociadas al daño oxidativo, además representa un desafío sintético bastante significativo, por lo que la información contenida en el presente proyecto podría representar un avance importante en la elaboración de rutas sintéticas para la obtención de la estructura de la esfera de coordinación primaria de la enzima superóxido dismutasa de níquel.

Palabras clave: retrosíntesis, rutas sintéticas, ligandos orgánicos, superóxido dismutasa de níquel, biomiméticos funcionales.

ABSTRACT

This research project aims to generate synthetic routes for the production of organic ligands that fulfill the electronic and structural requirements present in the active center of the enzyme Nickel superoxide dismutase.

To this end, were determined a series of starting fragments by retrosynthetic analysis of the active site of the enzyme, and from these were proposed five synthetic routes that were analyzed in terms of their possible modifications and their potential in the generation of biomimetics of the enzyme under study.

This allows to conclude that, through theoretical and computational studies, it was possible to obtain five synthetic routes that allowed the generation of organic ligands that met the structural and electronic requirements of the sphere of coordination of the ion in the active site of the nickel superoxide dismutase.

The final aim of the project is to contribute in the information available on the synthesis of functional biomimetics of the enzyme nickel superoxide dismutase, since there is a high international scientific interest in these macromolecules as a possible treatment of diseases associated with oxidative damage, in addition this representing a significant synthetic challenge, so the information contained in the present project could represent an important advance in the elaboration of synthetic routes to obtain the structure of the primary coordination sphere of the enzyme nickel superoxide dismutase.

Keywords: retrosynthesis, synthetic routes, organic ligand, nickel superoxide dismutase, functional biomimetic.

1. INTRODUCCIÓN

Las biomiméticas funcionales de la enzima superóxido dismutasa de níquel (NiSOD), han despertado alto interés en la comunidad científica debido a la complejidad de su funcionamiento, su potencial como biomimético y especialmente por las características únicas de su centro activo. Es por esto, que se han desencadenado diferentes investigaciones que han permitido obtener información acerca de la relación función-estructura de la enzima y más aún de las características de los ligandos orgánicos que acompañan al ion níquel en la esfera de coordinación primaria de la proteína.

El interés principal en esta enzima radica en las características de su actividad catalítica, puesto que es capaz de eliminar los radicales libres a nivel intracelular, convirtiéndolos en especies menos reactivas para el organismo como el agua y el peróxido. Es por esto que la mayoría de las investigaciones en este campo pretenden emular o biomimetizar el centro activo de la enzima, puesto que podría ser un potencial fármaco para el tratamiento de las enfermedades asociadas con el daño oxidativo.

El presente proyecto busca el diseño de rutas sintéticas que permitan la síntesis *de novo* de diferentes clases de ligandos orgánicos, que cumplan con los requisitos electrónicos y estructurales presentes en el sitio activo de la enzima Superóxido Dismutasa de Níquel.

Para esto se llevará a cabo una indagación en la literatura y en la base de datos *Reaxys*, y finalmente se propondrán una serie de rutas sintéticas que podrán ser consideradas para trabajos experimentales y teóricos en el futuro de esta línea de investigación. Se espera entonces que al final este proyecto, se haya generado un conocimiento imprescindible para el desarrollo de biomiméticas de las NiSOD por medio del diseño efectivo de una biblioteca de rutas sintéticas que permitan la obtención de los ligandos de la enzima. Además, se espera que el presente sea la base de proyectos de grado futuros del grupo de investigación del profesor James Weston.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. PLANTEAMIENTO DE LA PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Con el fin de obtener ligandos orgánicos adecuados para la síntesis de complejos organometálicos con potencial biomimético de la enzima superóxido dismutasa de níquel (NiSOD), este proyecto propone diseñar rutas sintéticas que permitan la síntesis *de novo* de diferentes clases de ligandos orgánicos que cumplan con las exigencias estructurales y electrónicas de las NiSODs. El presente formará la base para proyectos de grado futuros del grupo de investigación del profesor James Weston.

2.2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.2.1. ANIÓN RADICAL SUPERÓXIDO Y ESTRÉS OXIDATIVO

El anión radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) es un tipo de especie reactiva (Scandalios J., 2002) de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Apel & Hirt, 2004), el cual es generado durante muchos procesos biológicos, como por ejemplo, el metabolismo aeróbico, la fosforilación oxidativa, la fotosíntesis, y el proceso inmunitario de estimulación de macrófagos y neutrófilos (Broering, Truong, Gale, & Harrop, 2012). Sin embargo, estas especies ROS se generan en mayor proporción y de forma inevitable como un subproducto de metabolismo aeróbico (Falkowski, 2006) por la reducción unielectrónica del oxígeno molecular y se representa como una pérdida en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Bian, y otros, 2015).

Estos aniones radicales superóxido se caracterizan por poseer fuertes propiedades redox (Shin, Doddapaneni, & Park, 1992), funcionando en medios orgánicos como nucleófilo (Augusto & Miyamoto, 2011) y como un oxidante débil en soluciones acuosas, ocasionando que sean altamente peligrosos a nivel celular (Gutowski & Kowalczyk, 2013).

Si estas especies reactivas de oxígeno no son eliminadas, podrían ocurrir daños significativos a nivel celular (Schöneich, Pogocki, Hug, & Bobrowski, 2003), como la alteración de las macromoléculas (lípidos, proteínas, hidratos de carbono y ácidos nucleicos) (Skoumalová & Hort, 2012) y la modificación de los procesos celulares en términos de la funcionalidad de las membranas (Halliwell & Gutteridge, 2007), producción de enzimas, la inducción génica (Finkel, 2003), etc.

De hecho, a nivel fisiológico un exceso de radicales libres puede romper el equilibrio metabólico (Landis & Tower, 2005), produciendo un cuadro clínico conocido como estrés oxidativo, este se ha relacionado con numerosas patologías en humanos entre las que se encuentran el Alzheimer (Maes, 2016), Parkinson (Wanker, 2000), síntomas de envejecimiento en general (Soto, 2001), aterosclerosis, cáncer, insuficiencia renal aguda (IRA), insuficiencia renal crónica (IRC), catarata senil, diabetes mellitus, hipertensión arterial, etc. (Bar-Or & Bar-Or, 2015).

Sin embargo, bajo condiciones fisiológicas normales estas especies reactivas no son completamente eliminadas (Scandalios J., 2002), ya que son moléculas críticas en procesos biológicos como la transducción de señales, la plasticidad sináptica (Zuluaga Velez & Gaviria Arias, 2012), la defensa contra las infecciones y la respuesta inflamatoria (Battistoni, 2003).

2.2.2. SUPERÓXIDO DISMUTASAS

Para combatir el daño oxidativo (Fridovich, 1972) ocasionado por las especies reactivas de oxígeno y mantener las concentraciones límites de O_2^- ($\sim 10^{-10}$ M) (Gale, Cowart, Scott, & Harrop, 2011), los organismos aeróbicos han desarrollado una serie de metaloenzimas conocidas como superóxido dismutasas (SODs) (Gale, Patra, & Harrop, 2009).

En la actualidad, se han caracterizado cuatro tipos de SOD las cuales difieren en el cofactor metálico, encontrándose en esta familia a la superóxido dismutasa de cobre y zinc (Cu/ZnSOD), de manganeso (MnSOD), de hierro (FeSOD) y la superóxido dismutasa de níquel (NiSOD) (Packer, 2002). Dos clases de SOD han sido extensamente caracterizadas a través de análisis estructurales, bioquímicos y computacionales las Cu,ZnSOD y MnSOD o FeSOD (Barondeau, Kassmann, Bruns, Tainer, & Getzoff, 2004).

Las enzimas Cu,ZnSOD (también conocidas como SOD1 y SOD3 en humanos) (Perry, Shin, Getzoff, & Tainer, 2010) son proteínas homodiméricas o monodiméricas, cuya estructura secundaria principal son las hojas plegadas β (Desideri & Falconi, 2003). Estas se encuentran en eucariotas y algunos procariotas (Tomblin, Kasarskis, Xu, & Clair, 1998). Mutaciones puntuales en la Cu,ZnSOD humana demostraron que la enzima se relaciona con la enfermedad neurodegenerativa esclerosis amiotrófica lateral (ALS o enfermedad de Lou Gehrig) (Muller, y otros, 2008).

Por su parte, MnSOD y FeSOD son proteínas homodiméricas homólogas o homotetraméricas, con dos dominios principales plegados en forma de hélice α (Van Breusegem, y otros, 1999). Tres residuos de histidina, un ácido aspártico y una molécula de solvente, en geometría trigonal bipyramidal, coordinan el ión Fe/Mn (Miller A.-F. , 2001) (Figura 1). La expresión de MnSOD es generalmente inducida por su sustrato, el oxígeno. En contraste, FeSOD se expresa constitutivamente en el citosol de procariontes (Youn, y otros, 1996), eucariotes primitivos y algunas plantas verdes (Hopkin, Karen, Papazian, Madeleine, & Howa, 1992).

Recientemente, una tercera clase de SOD que contiene níquel como cofactor metálico fue descubierta en cepas de *Streptomyces* y cianobacterias (Palenik, y otros, 2003), conocidas como NiSOD (Kanth, Oh, & Sohng, 2010). El presente trabajo se enfoca en las características bioquímicas y estructurales de esta enzima.

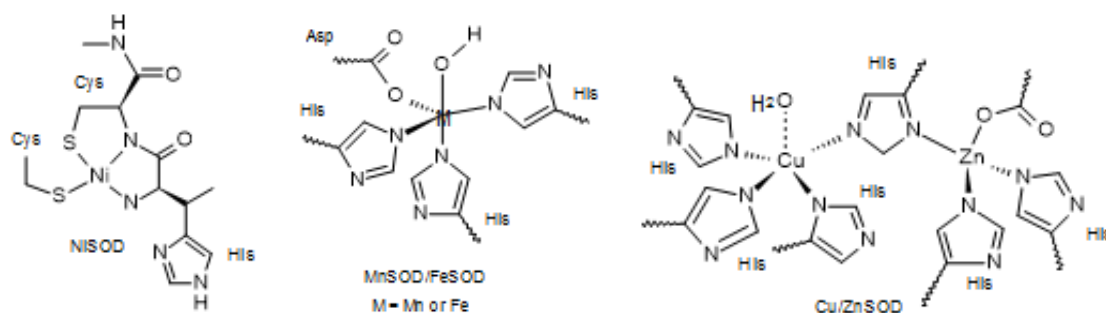
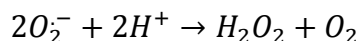
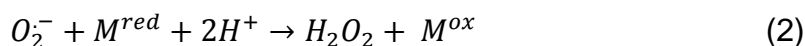


Figura 1. Primera esfera de coordinación en los centros activos de las SODs

Todas las enzimas SOD catalizan la desproporción del anión radical superóxido (Klug-Roth, Fridovich, & Rabani, 1973) para producir oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno a través de un proceso de oxidación y reducción (Nakane, y otros, 2014) [ecuaciones (1) y (2)].

El mecanismo catalítico se ha propuesto como tipo “*ping-pong*” (Parker, 2002), controlado por difusión ($k_{cat} \approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Bruno- Bárcena, Azcárate-Peril, & Hassan, 2010), debido a que el número de recambio (sustrato-producto) es tan alto, la velocidad de catálisis está determinada sólo por la frecuencia de colisiones entre SOD y el anión radical superóxido (Rotilio & Calabrese, 1974).



Estas SODs poseen diferentes características comunes: (a) una lisina cargada positivamente que hace parte del canal enzimático y que tiene como función guiar el sustrato aniónico al sitio activo (McAdam, Levelle, Fox, & Fielden, 1977), (b) el uso de un ion metálico que permite la dismutación del O_2^- incluso en el estado acuoso $[M(H_2O)]^{n+}$, (c) similitud en la esfera de coordinación primaria del cofactor metálico con la presencia de un enlace His-N (Lawrence & Sawyer, 1979), (d) afinidad del anión al centro del ion metálico oxidado M^{ox} siendo clave para soportar el mecanismo de esfera interna de transferencia electrónica (eT) para una de las dos reacciones parciales de la SOD (Broering, Truong, Gale, & Harrop, 2012). Los centros activos de las SODs se observan en la Figura 1.

El desarrollo de biomiméticas de SODs que permitan reducir los efectos moleculares causados por el estrés oxidativo, ha despertado un alto interés en el ámbito científico. Los estudios llevados a cabo están, en su mayoría, enfocados en la inhibición del crecimiento tumoral (Kensler, Bush, & Kozumbo, 1983) y en el tratamiento de desórdenes metabólicos relacionados con el sistema nervioso central (Russo, 2010). Para esto, se han sintetizado compuestos con base en metaloporfirinas (Weiss, y otros, 1992), poliamidas cíclicas de manganeso (Yamazaki & Takao, 2008), así como una serie de sales derivadas de manganeso (Lewis, y otros) y nitroxidos (Santos, y otros, 2001), que han sido diseñadas en la busca de biomiméticas potenciales de SOD (Batinić-Haberle, Rebouças, & Spasojević, 2010)

Sin embargo, la utilización de estas biomiméticas como fármacos tiene varios obstáculos, entre ellos, la rápida depuración renal, la lenta extravasación debido a su radio molecular y densidad de carga (Broering, Truong, Gale, & Harrop, 2012), y aún más su biotoxicidad (Miller A.-F. , 2004); estos factores afectan negativamente la farmacodinámica y farmacocinética. En la actualidad, ninguno de los biomiméticos sintetizados ha podido ser comercializado como fármaco, a pesar de las innumerables ventajas que representa para la calidad de vida de las personas; de ahí el reto y la necesidad de desarrollar biomiméticos funcionales que sobrepasen las desventajas enumeradas con anterioridad.

2.2.3. SUPERÓXIDO DISMUTASA DE NÍQUEL

La superóxido dismutasa de níquel (NiSOD) es el producto del gen *sodN*, que codifica la proteína más catorce aminoácidos en el extremo N-terminal que son removidos en la maduración de la enzima (Barondeau, Kassmann, Bruns, Tainer, & Getzoff, 2004). La NiSOD es una proteína pequeña con 117 aminoácidos que fue aislada por primera vez en 1996 de cepas de *Streptomyces* (Youn, Kim, Roe, Hah, & Kang, 1996) y sus primeras estructuras cristalográficas resueltas sólo estuvieron disponibles hasta el año 2004 (Barondeau, Kassmann, Bruns, Tainer, & Getzoff,

2004). En la actualidad, están disponibles dos estructuras sólidas de NiSOD pertenecientes a *S. coleicolor* y *S. seoulensis* (Wuerges J. , Lee, Kang, & Djinovic-Carugo, 2008).

A partir de diversos estudios bioquímicos fue posible determinar que las NiSOD no poseen ningún tipo de homología con otras proteínas de su familia (Herbst, y otros, 2009), aunque se ha propuesto que la relación entre estructura-función podría conservarse en aspectos como: el direccionamiento electrostático del O_2^- , en la presencia de un sitio activo para el enlace con el anión radical superóxido (Kim, Chung, Suh, Hah, & Roe, 1998), un enlace de hidrógeno que estabiliza la especie reactiva, ambientes químicos adecuados para las geometrías reducidas y oxidadas del ión metálico, y finalmente, un potencial redox apropiado (Benjumea Ballesteros, 2013).

Los estudios cristalográficos han revelado que NiSOD es un proteína homohexamérica (masa molecular total de 78 kDa) comprendida por seis subunidades y en cada una de ellas se alberga el ión Ni (III/II) (Broering, Truong, Gale, & Harrop, 2012). La proteína plegada tiene una forma globular con una cavidad interior hueca (Wuerges J., y otros, 2003). Un estudio más detallado de las subunidades revela que estas se encuentran ampliamente estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y puentes salinos (Bryngelson P. A., Arobo, Pinkham, Cabelli, & Maroney, 2004). Esta enzima presenta una esfera coordinación primaria única y utiliza un metal que generalmente no está asociado con la unión o activación del oxígeno molecular o sus derivados (Gale, Narendrapurapu,, Simmonett, Schaefer III, & Harrop, 2010)

Se ha establecido que en la estructura de la enzima, el sitio activo se compone únicamente de una secuencia de nueve aminoácidos (Barondeau & Getzoff, 2005), los cuales contienen todos los ligandos necesarios para la formación de un macrociclo orgánico conocido con el nombre de “gancho de níquel” (Figura 2). Esta secuencia provee el ambiente de coordinación requerido para llevar a cabo la acción catalítica de la enzima (Schmidt, y otros, 2008).

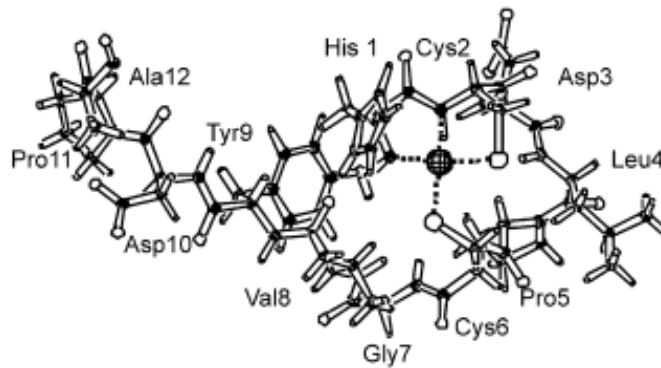


Figura 2. Estructura del gancho de níquel, vista del centro activo de la enzima superóxido dismutasa y los nueve aminoácidos necesarios para su función catalítica

A partir de esta estructura, se han desarrollado diferentes investigaciones en las que se pudo determinar que el motivo del gancho de níquel no presenta una estructura organizada en la apo-proteína (sin Ni^{II}) (Bryngelson P. A., Arobo, Pinkham, Cabelli, & Maroney, 2004), sin embargo, cuando se adiciona el ión metálico en su estado reducido ($\text{NiSOD}_{\text{red}}$) se da una reestructuración, logrando generar una coordinación cuadrado planar (Szilagyi, y otros, 2004) donde el Ni^{II} se encuentra ligado por los grupos tiolatos de la Cys2 y Cys6 en un arreglo *cis* (Barondeau, Kassmann, Bruns, Tainer, & Getzoff, 2004). La carboxiamida desprotonada de Cys2 y la amina primaria de His1 completan la esfera de coordinación N_2S_2 , característica de la enzima (Doukov, Iverson, Seravalli, Ragsdale, & Drennan, 2002). Mientras que en el estado oxidado Ni^{III} (NiSOD_{ox}) hay un cambio de geometría en el complejo, en este caso se presenta una piramidal cuadrada por la coordinación del grupo imidazol- $\text{N}\delta$ de la His1 (Gale, Narendrapurapu, Simmonett, Schaefer III, & Harrop, 2010). Se pueden observar los cambios estructurales entre la enzima reducida y oxidada durante el proceso de catálisis en la Figura 3.

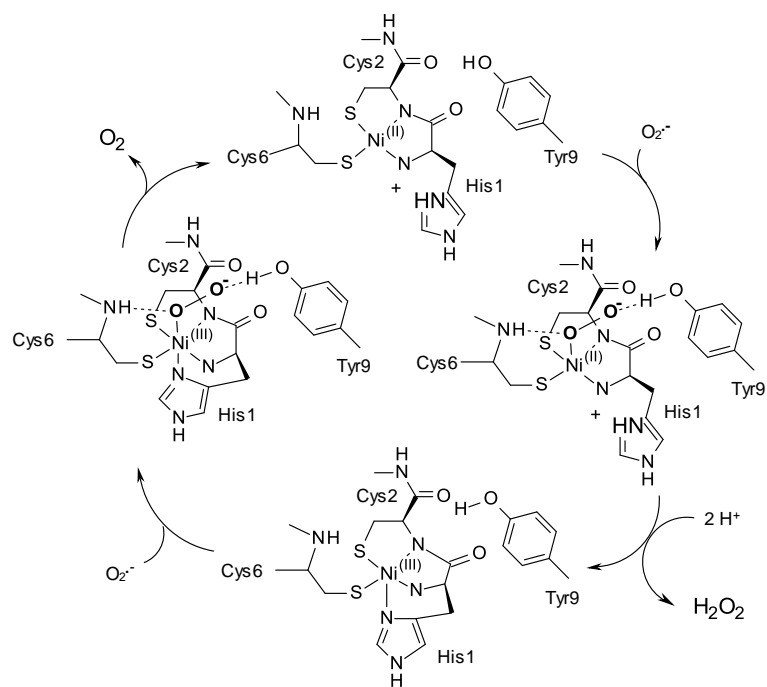


Figura 3. Mecanismo propuesto para el modo de acción de la NiSOD. Se observan los cambios estructurales y en el número de oxidación del níquel durante el proceso de catálisis enzimática

La esfera de coordinación primaria de la NiSOD es única y diferente de cualquier otra metaloenzima de su familia. De hecho, existen pocos sitios metálicos en la biología con una amina N-terminal y una carboxiamida-N incorporadas como ligandos de coordinación para el ión metálico (Ryan, Johnson, Cabelli, Brunold, & Maroney, 2010). Adicionalmente, el enlace Ni-SCys es recurrente en la biología redox del níquel, y al parecer permite la modulación del potencial redox del cofactor metálico para facilitar la transferencia electrónica bajo condiciones fisiológicas (Batinić-Haberle, Rebouças, & Spasojević, 2010).

Está ampliamente documentado que la coordinación de tiolatos en los centros de coordinación cuadrado planar del Ni^{II} aumentan la sensibilidad hacia el O₂ y las especies radicales de oxígeno (Kovacs, 2004), en gran parte por la desestabilización de los orbitales π de los grupos tiolatos debido a interacción de repulsión p(π)-d(π) entre los orbitales S(p) y Ni(d) (Gale, Narendrapurapu, Simmonett, Schaefer III, & Harrop, 2010).

Estas numerosas y únicas características de la superóxido dismutasa de níquel la hacen un foco de investigación a nivel mundial, en especial, por su posible papel

como fármaco para combatir el estrés oxidativo y las innumerables afecciones de salud relacionadas con este cuadro clínico.

2.2.4. BIOMIMÉTICOS DE LA SUPERÓXIDO DISMUTASA DE NÍQUEL

El desarrollo de biomiméticos de estas enzimas se ha convertido un desafío para los investigadores debido no sólo a sus complejas características estructurales sino también por la naturaleza del cofactor metálico y su influencia en las características de la farmacocinética y la farmacodinámica, que afectan radicalmente su potencial como medicamento. De hecho, existen pocas biomiméticas conocidas de la NiSOD y hasta el momento ningún sistema propuesto ha logrado ser comercializado como fármaco.

Haciendo uso de la bioquímica fundamental que gobierna la reacción de dismutación en el centro activo de la enzima NiSOD se ha iniciado la construcción de complejos de bajo peso molecular [*low-molecular weight* (MW)], también conocidos como modelos sintéticos, análogos o biomiméticos. Los cuales reproducen el ambiente de coordinación primaria observado en la enzima (Dhar , Nethajia , & Chakravarty, 2004). Este método ha sido denominado *synthetic analogue approach*, y se ha convertido en un nuevo paradigma en la química bioinorgánica que ha permitido aportar valiosa información sobre la estructura y mecanismo de numerosas metaloenzimas (Manessia, Papaefstathioua, Raptopouloub, Terzisb, & Zafiropoulosa, 2004). El objetivo de esta metodología es determinar los fundamentos que rigen las propiedades electrónicas y estructurales de los sitios activos que permiten la catálisis enzimática por medio de compuestos *low-MW* (Broering, Truong, Gale, & Harrop, 2012).

Se han sintetizado varios biomiméticos de NiSOD. Por una parte, Shearer y colaboradores prepararon algunos metalopéptidos basados en los primeros 12 o 7 residuos del extremo N-terminal del sitio activo de la NiSOD de *S.coelicolor*. En contraste con los modelos de compuestos inorgánicos, estos péptidos exhibieron actividad catalítica (Tietze, Voigt, Mollenhauer, & Buntkowsky, 2014). Igualmente, se han llevado a cabo análisis con mutantes del metalopéptido, en el que la His1 fue reemplazada por aminoácidos de Asp o Ala. En ambos casos, se observó una actividad SOD disminuida (Shearer & Long , 2006).

Al mismo tiempo, Weston y colaboradores examinaron complejos peptídicos SOD-activos basados en los primeros seis y nueve aminoácidos del extremo N-terminal de la NiSOD. La resonancia magnética nuclear tridimensional de los péptidos exhibió, en contraste con el enlace *cis* Leu4-Pro5 en la enzima nativa, un enlace *trans* entre estos aminoácidos en el complejo peptídico. Con estos resultados, se logró concluir que la orientación de este enlace podría tener algún tipo de efecto en el mecanismo catalítico y que debía ser tenido en cuenta al momento de comparar cómo llevan a cabo su función los metalopéptidos sintéticos y la enzima nativa

NiSOD (Schmidt, y otros, 2008). En esta misma investigación, se llevaron a cabo modificaciones en la secuencia de este péptido para demostrar que el grupo imidazol de la His1, en contraste con la conclusión de Shearer y colaboradores, no es esencial para la función del metalopéptido, debido a que la actividad catalítica no desaparece completamente al cambiar el aminoácido por una alanina (Tietze, Voigt, Mollenhauer, & Buntkowsky, 2014). Incluso, cálculos DFT indican que el grupo carbonilo en el enlace peptídico Pro5-Leu4 probablemente asuman el rol de quinto ligando y fuercen al sustrato a entrar al centro metálico desde el lado contrario (comparado con la enzima nativa) (Pelmenschikov & Siegbahn, 2006).

Estas discrepancias a nivel investigativo son sumamente importantes para determinar la forma de catálisis de la NiSOD. Como consecuencia de esto se han propuesto varios criterios importantes (Gans, Gill, & Johnson, 1998) para el diseño y síntesis de biomiméticos de la enzima: (a) Los ligandos deben contener una mezcla de nitrógeno/azufre para mimetizar la esfera de coordinación primaria observada en la enzima. En efecto, el prerrequisito para la actividad redox del níquel en la biología es la coordinación con ligandos CysS (Grapperhaus & Darensbourg, 1998). (b) Más allá de una simple replicación estequiométrica de los átomos donantes, es la naturaleza electrónica de la coordinación con nitrógeno y azufre y la disposición espacial de estos átomos, lo que define un buen biomimético (Tietze, Voigt, Mollenhauer, & Buntkowsky, 2014). (c) Debe contener un ligando neutro adicional N-donador para replicar la conversión redox de bajo espín (*low-spin*) 4C-5C en la Ni(II/III)SOD (Van Heuvelen, Cho, Dingee, Riordan, & Brunold, 2010). (d) El constructo de los ligandos debe ser capaz de sufrir modificaciones similares a las sucedidas en el ambiente de la matrix proteica de la NiSOD (Cho, Van Heuvelen, Yap, Brunold, & Riordan, 2008). (e) Además, los puentes de hidrógeno o las interacciones electrostáticas deben ser consideradas en la construcción de los modelos, puesto que determinan el “*fine-tuning*” del biomimético para el cumplimiento exitoso de la dismutación del anión radical superóxido (Shearer & Long, 2006).

Grupos de investigación han empleado algunos o todos estos criterios para crear: (a) pequeños péptidos de 3-12 aminoácidos que mimetizan la secuencia primaria de la NiSOD, (b) ligandos mixtos que contienen nitrógeno-azufre o nitrógeno-oxígeno que se asemejan electrónicamente y estructuralmente a lo que se observa en la enzima, (c) marcos electrónicos precisos compuestos por N_2S_2 o N_3S_2 , (d) ligandos asimétricos N_2S que se aproximan al centro activo del ión metálico con una coordinación abierta donde los donores N exógenos se unen (NiN_3S) y (e) ligandos asimétricos N_2S con coordinación abierta donde los ligandos S exógenos se unen para crear especies del tipo NiN_2S_2 (Tietze, Voigt, Mollenhauer, & Buntkowsky, 2014)

2.2.5. REQUISITOS ELECTRÓNICOS Y ESTRUCTURALES DE LA NiSOD

Las estructuras cristalográficas revelan la presencia de una mezcla de igual proporción del estado de oxidación diamagnético (Ni^{II}) y el estado de oxidación paramagnético (Ni^{III}), un hecho bastante inusual que sugiere una alta estabilización del estado Ni^{III} el cual generalmente es un estado de oxidación efímero en procesos catalíticos con níquel (Barondeau, Kassmann, Bruns, Tainer, & Getzoff, 2004). En la enzima este estado de oxidación es muy estable y restringido estéricamente (Grapperhaus, Mullins, Kozlowski, & Mashuta, 2004).

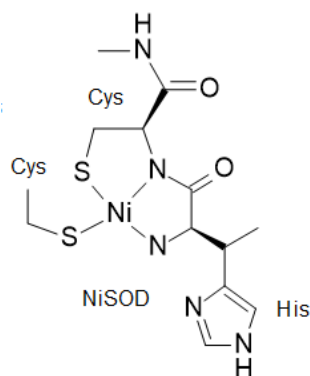


Figura 1. Estructura química del centro activo de la NiSOD

El ambiente catalítico de las SODs en el sitio activo (donde se encuentra el ion metálico) es responsable por llevar a cabo por lo menos tres funciones conocidas:

- Ajustar el potencial redox del metal en un valor óptimo para la catálisis (Miller A., 2008)
- Controlar el acceso de los aniones al sitio activo (Bertini, Banci, & Piccioli, 1990)
- Proveer una fuente de protones para la formación del peróxido de hidrógeno.

El potencial de reducción de la pareja O_2/O_2^- es $-160 \text{ mV vs. E.N.H.}$ (Electrodo normal de hidrógeno) mientras que para la pareja $\text{O}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ es de $870 \text{ mV vs. E.N.H.}$ El punto medio entre estos dos valores ($365 \text{ mV vs. E.N.H.}$) es el potencial óptimo para la reacción catalítica de las Superóxido dismutasas (Herbst, y otros, 2009).

El níquel es una opción inusual como cofactor metálico para las SOD, esto es debido a que el potencial de reducción del $\text{Ni}_{\text{ac}}(\text{III})/(\text{II})$ es 1.94 V para la especie de espín bajo $\text{Ni}(\text{III})$ y 2.24 V para la especie de espín alto $\text{Ni}(\text{II})$ (Kunishita, y otros, 2009), que es mucho mayor al rango biológico apreciado. Sin embargo, el potencial redox de la pareja $\text{Ni}(\text{III})/\text{Ni}(\text{II})$ es 290 mV (Benjumea Ballesteros, 2013).

Esto demuestra que el ambiente proteínico es crítico para adecuar el potencial de reducción del ion metálico y así asegurar la potencia enzimática óptima para la catálisis.

La mayoría de las SODs presentan una segunda esfera de coordinación que involucra la generación de puentes de hidrógeno entre moléculas de agua que rodean la proteína, y juegan un papel fundamental en optimizar el potencial redox unielectrónico del sitio activo. En contraste con esto, el sitio activo del níquel de la NiSOD posee una cisteína (donador de S), tres diferentes tipos de donadores de nitrógeno, y no posee un ligando tipo acua/hidroxo. La estrategia de usar cisteínas/ligandos tiolatos para acceder a estados de oxidación superiores, en este caso para la dupla Ni (III/II), es muy común en una que otra que involucra el comportamiento redox del níquel (Gale E. M., 2012), pero no tiene precedente en las SODs, y es inesperado debido a la fácil oxidación de los grupos tiolatos en presencia de H₂O₂ y O₂.

Para la síntesis de complejos de níquel con el ambiente de coordinación requerido *cis*-[N₂S₂] uno de los mayores retos es precisamente la inestabilidad inherente del enlace metal-sulfuro (M-SR) y su susceptibilidad a la oxidación (Sigel, Sigel, & Sigel, 2007). Es probable que en esta enzima los otros dos ligandos (amino y amida) jueguen un papel fundamental en el *fine-tuning* del potencial redox (Díaz López C. A., 2012).

Se demostró en el grupo de investigación del profesor James Weston, que los requisitos estructurales y electrónicos que el ligando orgánico de la enzima NiSOD debe cumplir son: el aumento en el número de coordinación del metal asociado al cambio redox, para lo cual es necesario la presencia de un quinto ligando lábil en posición axial, la coordinación del metal por parte de dos ligandos donores sulfuros en *cis*, de un grupo amino primario además de un grupo amida (Benjumea Ballesteros, 2013) (Figura 4). Con el cumplimiento de los anteriores, se podrá lograr la modulación efectiva del potencial redox y de esta manera se lograría la síntesis de un biomimético potencial de la enzima superóxido dismutasa de níquel.

Esto implica que en el ejercicio sintético la biomimética enzimática debe lograr tener un estado de oxidación Ni^{III} que sea lo suficientemente estable para formarse, así como la modulación correcta del potencial redox.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. OBJETIVO GENERAL

Proponer y desarrollar rutas sintéticas teóricas para la obtención de ligandos orgánicos que cumplan con las exigencias estructurales y electrónicas de la esfera de coordinación del ion níquel en el sitio activo de la superóxido dismutasa de níquel (NiSOD).

2.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.3.2.1.** Proponer rutas sintéticas teóricas, con base en la literatura, para la generación de diferentes clases de ligandos orgánicos que cumplan las exigencias estructurales y electrónicas presentes en el centro de coordinación del níquel en la enzima.
- 2.3.2.2.** Analizar estas rutas en términos de a) posibles modificaciones sintéticas adicionales y b) su potencial en la generación de biomiméticos de la enzima NiSOD.

2.4. METODOLOGÍA

Para el diseño de rutas sintéticas que buscan la generación de diferentes clases de ligandos orgánicos, que cumplan los requisitos estructurales y electrónicos de la enzima superóxido dismutasa de níquel, fue necesario iniciar con una investigación en la literatura primaria de la estructura del sitio activo de la enzima NiSOD. A partir de lo anterior, se hizo uso de estrategias retrosintéticas para la obtención de los ligandos de la enzima. Este es un enfoque del diseño de síntesis aportado por el químico estadounidense Elías James Corey y se basa en planificación de la ruta partiendo desde el producto final hasta llegar a unos compuestos de partida asequibles, mediante una secuencia de pasos lógicos (Corey, 1990).

Posteriormente, se utilizó la base de datos *Reaxys* (Elsevier, 2008) para determinar si los equivalentes sintéticos propuestos son conocidos y se encuentra reportada su respectiva ruta sintética. Esta base de datos es una nueva herramienta basada en la web (no requiere instalación de softwares) diseñada para ayudar a los investigadores y profesionales en química en su flujo de trabajo, transformando la síntesis de nuevos compuestos en un proceso simple y eficiente. *Reaxys* ofrece acceso directo a millones de datos profundizados y validados experimentalmente, contenido seleccionado por especialistas, clasificados para los químicos, garantizando así un acceso instantáneo a los datos deseados; bases de datos de química orgánica, inorgánica, organometálica, además de patentes, reunidas en una única colección; acceso a 80 categorías de hechos, estructurados alrededor de

sustancias y reacciones, acompañadas de referencias bibliográficas; una única búsqueda por estructura o reacción proporciona instantáneamente todos los datos experimentales relevantes, como: punto de fusión, espectroscopía NMR, ecotoxicidad, bioactividad, entalpía de combustión, distancias interatómicas, etc. Por esto es una excelente herramienta en la planificación y estructuración de las rutas sintéticas propuestas en este trabajo.

Conociendo los fragmentos retrosintéticos de partida, se prosiguió con el diseño de una serie de rutas finales que acoplen los equivalentes sintéticos propuestos para la generación del ligando complejo (Matriz de marco lógico en *anexos*).

Todo este proyecto se llevó a cabo gracias al uso de las bases de datos (local y remoto) de libre acceso para los estudiantes de la Universidad Icesi, obteniendo artículos de investigación importantes de revistas de renombre internacional como *American Chemical Society*, *Science Direct*, *Science Magazine*, *Scopus*, etc.

2.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Diseño retrosintético

En los años de 1950, el profesor Elias J. Corey desarrolló un método sistemático para el diseño de rutas sintéticas de moléculas complejas. Esta estrategia fue tan eficiente que permitió que Corey fuese laureado con el Premio Nobel de Química en el año 1990 (Nobel Prize, 1990). Hoy en día, esta técnica es conocida como retrosíntesis y se ha convertido en una herramienta poderosa usada por científicos a nivel mundial (Wang, y otros, 2016).

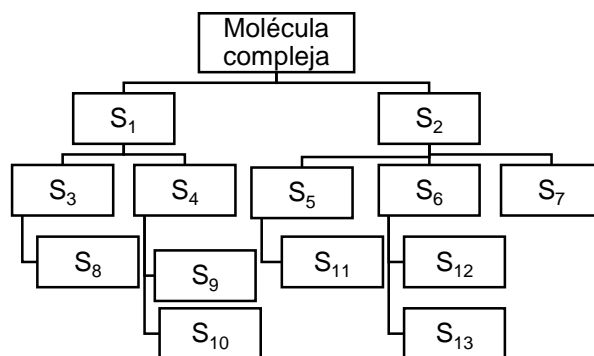


Figura 5. Ilustración general del proceso de retrosíntesis. Donde se parte de una molécula compleja que es fragmentada en diferentes sintones (denotados como S_n); se repite el proceso hasta que se llega a precursores simples o disponibles comercialmente. *Adaptado de Divakaran, 2008*

En esta técnica, se lleva a cabo un proceso de fragmentación teórica de una molécula compleja (Figura 5), que es el proceso inverso a la reacción sintética, generando una serie de precursores (también conocidos como sintones). Cada precursor es luego examinado de la misma manera y el proceso se repite hasta que se encuentra con una estructura simple o comercialmente disponible (Divakaran, 2008). En otras palabras, el análisis retrosintético permite la resolución de problemas de síntesis, por medio de la transformación de una estructura compleja en una secuencia progresiva de moléculas cada vez más simples lo que permite, finalmente, obtener moléculas de partida supremamente simple en comparación con la molécula compleja inicial (Corey, 1990).

El análisis retrosintético es usado en campos diversos de la ciencia, incluyendo la síntesis orgánica, la bioquímica, la química de materiales, y la ingeniería de sistemas metabólicos (Carbonell, Planson, & Faulon, 2013). La gran aplicabilidad y eficiencia de la técnica ha desencadenado la creación de diversos softwares que permiten llevar a cabo el proceso retrosintético completo (Turrina, Garcia, Cox, Casci, & Wright, 2016). En este proyecto, se hace uso de esta técnica como una herramienta para el diseño de rutas sintéticas, que permitan la obtención de ligandos orgánicos capaces de formar complejos organometálicos con iones de níquel y además ser potenciales biomiméticos de la NiSOD.

En el grupo de investigación del profesor James Weston se han llevado a cabo diversas investigaciones del centro activo de la enzima NiSOD. Como resultado de estos estudios, se ha podido determinar los requisitos estructurales y electrónicos que un ligando orgánico de un metalocomplejo de níquel, debe cumplir para lograr la correcta modulación de su potencial redox. En el desarrollo del marco teórico, se hizo mención de estos requisitos, un sumario general es:

- Presencia de un quinto ligando lábil en posición axial
- La coordinación del metal por parte de dos ligandos donores sulfuros en *cis*
- La coordinación del metal por un grupo amino primario
- La coordinación del metal por un grupo amida

El presente proyecto no contempla la presencia de un quinto ligando axial flexible, debido a las conclusiones extraídas de la investigación de Weston *et al.* donde se afirma que la presencia de este ligando no es indispensable para la actividad SOD (Schmidt, y otros, 2008). Sin embargo, se recomienda tener en cuenta esta característica estructural en el desarrollo de trabajos posteriores de esta línea de investigación.

Con el cumplimiento de los requisitos mencionados, es posible establecer el siguiente motivo estructural general del centro activo de la NiSOD:

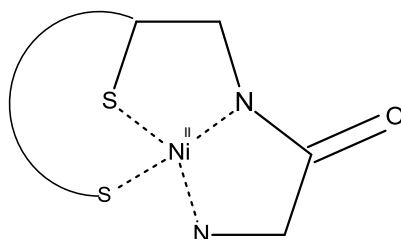


Figura 6. Motivo estructural general de la estructura química del centro activo de la NiSOD

Esta estructura general formó el punto de partida del diseño retrosintético en el presente trabajo. Es posible llevar a cabo el proceso de fragmentación de la molécula en dos partes, primero haciendo un corte o desconexión vertical (Estrategia 1) y luego haciéndole un corte horizontal a la estructura general (Estrategia 2). De esta manera, se establecieron las primeras dos estrategias generales para atacar el problema de investigación.

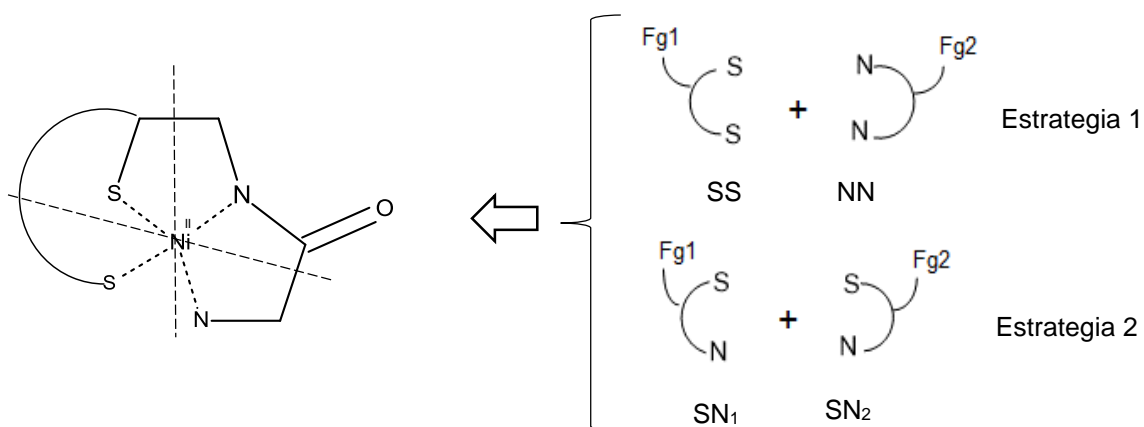


Figura 7. Estrategias generales para el diseño de equivalentes sintéticos usando la técnica de retrosíntesis

En cuanto a la Estrategia 1, se generan dos fragmentos retrosintéticos SS y NN, que poseen dos grupos tiol y dos grupos amino, respectivamente. Entre las ventajas que podría acarrear la elección de esta estrategia retrosintética está el hecho de que funcionan a través de reacciones de síntesis diferentes, esto gracias a la presencia exclusiva de un mismo elemento en cada fragmento, ya sea de nitrógeno o de azufre, lo que podría limitar los problemas sintéticos, como por ejemplo, los asociados con procesos de condensación y/o la formación de ligandos mixtos no deseados.

En la Estrategia 2 se da la fragmentación de la molécula en dos partes "equivalentes". Estos equivalentes sintéticos SN₁ y SN₂ le confieren una ventaja a la etapa de síntesis, ya que al ser iguales permiten la obtención de un complejo

simétrico a través de una sola ruta sintética. Sin embargo, la formación de complejos con este tipo de simetría va en contra de las disposiciones atómicas observadas en la enzima y de manera esquemática en la Figura 6.

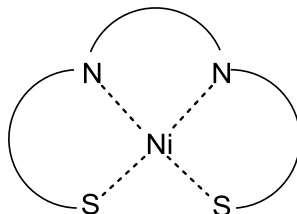


Figura 8. Posible macrociclo simétrico formado al hacer uso de la Estrategia 2

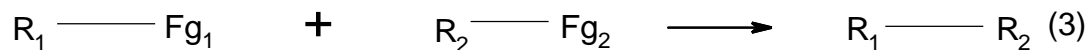
Para cada una de las estrategias planteadas hay variables inmutables que deben ser aseguradas para el correcto proceso de síntesis.

En primer lugar: deben plantearse reacciones de acoplamiento de los fragmentos retrosintéticos propuestos, esto se llevó a cabo haciendo uso de grupos funcionales reactivos (Fg1, Fg2), que permiten la unión de los fragmentos y así la formación del macrociclo buscado.

En segundo lugar: deben determinarse métodos de protección/desprotección de los grupos principales de los ligandos (amino y tiol), para asegurar –a nivel experimental- que en la etapa de acoplamiento sólo se dé la reacción entre Fg₁ y Fg₂.

2.5.2. Reacciones de Acoplamiento

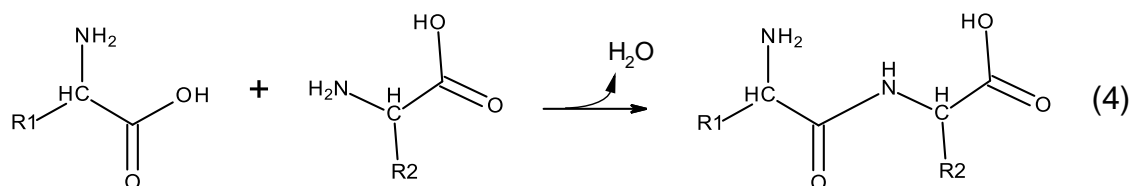
Con el fin de lograr unir los fragmentos retrosintéticos individuales propuestos en la Estrategia 1 y Estrategia 2, se hace uso de grupos funcionales reactivos denotados en la siguiente ecuación y a lo largo del presente texto como Fg₁ y Fg₂.



El presente proyecto se limitó al uso de síntesis de amidas como estrategia de acoplamiento, por medio de la condensación de un ácido carboxílico y un grupo amino como estrategia para unión de los equivalentes sintéticos.

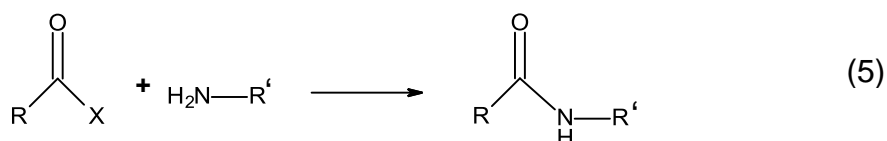
En la naturaleza la síntesis de proteínas se lleva a cabo a través de una secuencia de reacciones de acoplamiento peptídico (formación del enlace amida por la reacción entre alfa-aminoácidos) bastante complejas (Montalbetti & Falque, 2005).

De esta manera los aminoácidos se enlazan entre sí para formar macromoléculas, cada grupo amida es conocido como enlace peptídico, y este último se forma mediante una reacción de condensación entre el grupo carboxilo de un aminoácido y el grupo amino de otro (Brown, LeMay, Bursten, & Murphy, 2009) acompañado de una hidrólisis (Jaramillo, 2002).



Los enlaces peptídicos, no sólo son conectores claves para la síntesis de proteínas en la naturaleza, de hecho, en la actualidad, la química sintética hace uso de este grupo funcional para la obtención de fármacos y compuestos con actividad biológica (Pattabiraman & Bode, 2011). Por lo que se han desarrollado una amplia variedad de técnicas sintéticas para la formación de enlaces tipo peptídico pero a nivel de laboratorio.

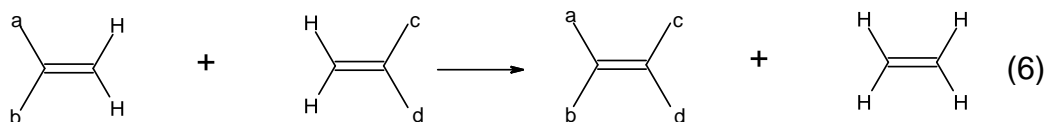
El proceso generalmente requiere la activación del ácido carboxílico terminal en la presencia de reactivos de acoplamiento. La activación consiste en reemplazar el grupo hidroxilo por un buen grupo saliente (grupo reactivo X, en la ecuación). La reacción entre el intermediario activado y la amina es conocida como *coupling reaction* (Joullié & Lassen, 2010).



Dependiendo de las características estructurales de la molécula blanco y de los diferentes desafíos sintéticos asociados con la misma, existen diferentes estrategias para obtener el enlace amida. El rango de métodos va desde el uso “sencillo” de haluros de acilo, anhídridos y carbodiimidas (Lanigan, Starkov, & Sheppard, 2013) hasta técnicas más elaboradas como *low-racemization inducing methods* (Bodanszky, 2003). Todas estas metodologías para la ligación de fragmentos mediado por los enlaces amidas, ofrecen estrategias convergentes para la síntesis de moléculas altamente funcionalizadas de interés biológico (Falque & Montalbetti, 2008).

Aunque el presente proyecto se enfoque en el acoplamiento utilizando la generación de un enlace amida, existen otros métodos sintéticos que pueden usarse para la formación de enlaces entre fragmentos, uno de estos es la reacción de

metátesis (Chauvin, 2005) El esquema general de esta reacción se observa en la ecuación (6) (Katz & McGinnis, 1975)



De forma general, se puede describir como un proceso catalítico en el que el metal-carbeno se adiciona a una de las olefinas mediante una cicloadición [2+2] dando un metalociclobutano, que por posterior ciclorreversión, libera una molécula de etileno (sólo si la olefina es terminal). Se genera así un nuevo intermedio metal-carbeno que reaccionará con la otra olefina mediante el mismo mecanismo de cicloadición y ciclorreversión (Herisson & Chauvin, 1970). Finalmente, se libera el producto de metátesis y se regenera el catalizador, comenzando de nuevo el ciclo catalítico (Ulman & Grubbs, 1988).

Sin embargo, bajo el epígrafe “metátesis” se engloba una gran variedad de transformaciones (Nevado Blázquez, 2008): (a) la metátesis de olefinas, entre las que se puede encontrar la formación de olefinas cíclicas, la formación de dienos, la polimerización de olefinas cíclicas y acíclicas y por último el intercambio de grupos entre dos olefinas (*cross-metathesis*) (Katz & Rothchild, 1976), (b) la metátesis de eninos, que implica la reacción de un alqueno con un alquino para dar un 1,3-dieno (Kulkarni & Diver, 2003) y (c) la metátesis de alquino, a partir de la cual se pueden obtener selectivamente alquenos *Z* ó *E* (Grubbs & Chang, 1998).

La metátesis es una forma llamativa de acoplar fragmentos “equivalentes” o que presenten alta simetría (Hoveyda & Zhugralin, 2007). Además esta reacción presenta ventajas sintéticas como lo son el ser altamente selectiva (Lippard & Grubbs, 2007) por lo que puede llevarse a cabo en la presencia de numerosos grupos funcionales y también evita reacciones de hidrólisis en el macrociclo sintético. El uso de la reacción de metátesis, se propone como estrategia alternativa para la unión de fragmentos retrosintéticos, por lo que se recomienda sea considerado en proyectos de grado futuros de esta línea de investigación.

2.5.3. Estrategia 1

La estrategia 1 involucra la fragmentación de la estructura general propuesta en dos partes antisimétricas (fragmento retrosintético SS y NN). Obteniéndose lo que se observa a continuación:

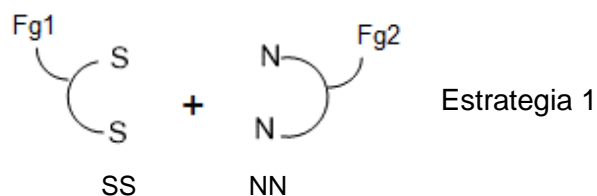


Figura 9. Estrategia 1 para el diseño de equivalentes sintéticos. Donde Fg₁ y Fg₂ son los grupos funcionales reactivos (amina o ácido carboxílico) para la generación de un enlace amida entre los fragmentos retrosintéticos

2.5.3.1. Fragmento retrosintético SS

2.5.3.1.1. Química del azufre

Los tioles son homólogos pesados de azufre de los alcoholes. Estudios estructurales han demostrado que la carga negativa del ion tiolato se distribuye sobre un espacio de mayor volumen que la carga de un ion alcóxido; ello determina que el ion tiolato sea más estable (Yurkanis Bruice, 2008) y, en consecuencia, los tioles son ácidos más fuertes que los alcoholes. Los iones tiolato, más grandes, se solvatan menos que los alcóxido esto hace que los primeros sean mejores nucleófilos en disolventes próticos (Wade, 2011).

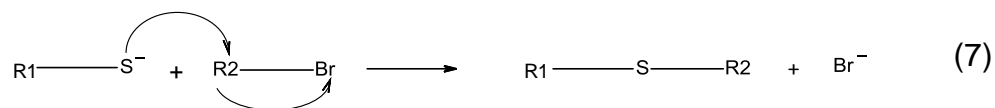
Además, el azufre es un nucleófilo excelente porque su nube electrónica es polarizable. El resultado es que los sulfuros reaccionan con facilidad con los haluros de alquilo para formar sales de sulfonio (Cotton & Wilkinson, 2005). Como tiene un grupo saliente débilmente básico, un ion sulfonio experimenta con facilidad reacciones de sustitución nucleofílica. Al igual que otras reacciones S_N2 , la reacción se efectúa mejor si el grupo que sufre el ataque nucleofílico es metilo o alquilo primario (Cotton & Wilkinson, 1996). Un ejemplo de esto en la biología es SAM, un agente metilante que es una sal de sulfonio (Voet, Voet, & Pratt, 2006).

Como el azufre no es tan electronegativo como el oxígeno, los tioles no son buenos formadores de puentes de hidrógeno. En consecuencia, presentan atracciones intermoleculares más débiles y sus puntos de ebullición son menores que los de los alcoholes.

En la naturaleza los enlaces disulfuro (-S-S-) intramoleculares e intermoleculares ayudan a estabilizar la estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas. Estos enlaces covalentes se forman por el enlace oxidativo de grupos sulfhidrilo (-SH), existentes en dos residuos de cisteína de la misma o diferentes cadenas polipeptídicas. Esta reacción puede tener lugar espontáneamente sólo cuando hay un agente oxidante adecuado (Lodish, y otros, 2004). Este tipo de enlace también

conocido como puente disulfuro impide que, cuando se desnaturaliza la proteína, adopte de forma total la configuración de ovillo estadístico, sobre todo cuando las cisteínas que se unen están separadas por muchos aminoácidos (Freifelder, 2003). Sí se tuviese experimentalmente un ambiente oxidante adecuado, la formación de puentes disulfuro entre las moléculas (que son producto de reacción) podría tener consecuencias indeseadas e inadvertidas en los pasos sintéticos posteriores y aún más en la capacidad de que el producto obtenido pudiese llegar a ser un biomimético funcional de la enzima.

Por otra parte, los análogos con azufre de los éteres son llamados sulfuros o tioéteres. Estos son fáciles de sintetizar por medio de la síntesis de Williamson de éteres, usando un ion tiolato como nucleófilo, el azufre juega el papel de agente reductor moderado (Wade, 2011).



Por otro lado, deben ser considerados en la etapa de síntesis los compuestos derivados de la oxidación del azufre. Los tioles y sulfuros pueden transformarse en compuestos en los que uno, dos o incluso tres átomos de oxígeno estén enlazados con el azufre, aumentando la valencia de este último átomo hasta cuatro o seis (Gutshe & Pasto, 1979). Por ejemplo, se da la formación de grupos funcionales como los sulfonilos y los sulfóxidos (entre otros de menor interés sintético).

El primero de ellos es un grupo funcional RSO_2^- , que se obtiene generalmente como sustituyente del ácido sulfónico por medio de la remoción de uno de los grupos hidroxilo (Ege, 2004). De hecho, la reacción de los derivados sulfonilo con alcoholes y aminas permite obtener ésteres y amidas de ácidos sulfónicos (sulfonamidas), respectivamente (Braña, Cacho, & Guisado, 2006). Si se piensa en el proceso sintético, se tiene que para la Estrategia 1, los equivalentes sintéticos NN y SS deberán ser preparados en procedimientos separados, lo que asegura la baja posibilidad de formación de grupos funcionales como sulfonamidas. Sin embargo, el reto real radica en evitar la oxidación inicial de los compuestos azufrados.

Mientras que los sulfóxidos son compuestos que tienen dentro de su estructura un grupo funcional sulfínico unido a dos átomos de carbono (Pasto & Johnson, 2003), generalmente, los sulfóxidos se consideran como sulfuros oxidados. Se obtienen de la oxidación de sulfuros o tioéteres, de la adición de ácidos sulfénicos a alcoholes alílicos y del rearrreglo de ésteres de sulfonato (Albores Velasco, Caballero Arroyo, González Quezada, & Pozas Horcasitas, 2006). En este tipo de compuestos la interacción S-O tiene un aspecto electrostático distintivo (diferente al enlace C-O), que le confiere a la molécula un carácter dipolar significativo por lo que puede ser partícipe de reacciones de eliminación, de la oxidación de Swern, preparación de epóxidos, reacción de Pummer (Beyer & Walter, 1987), etc.

Probablemente, sea la formación de estos compuestos oxoazufrados los responsables de que los sistemas planteados para biomimetizar la NiSOD, sean sumamente inestables en la presencia de oxígeno después de un periodo corto de tiempo (Shearer, Neupane, & Callan, 2009) y además generen especies poliméricas no deseadas en la mezcla de reacción (Glass, Krause, Laurence, & Jackson, 2012).

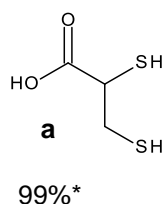
Debido a las características químicas de los átomos de azufre y su influencia en los grupos funcionales que lo poseen, es necesario que para la etapa sintética deban establecerse estrategias de protección/desprotección y así obtener el producto deseado sin reacciones colaterales.

2.5.3.1.2. Fragmentos retrosintéticos SS propuestos

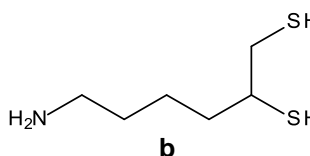
Se inició con el diseño de posibles estructuras de partida que cumplieran con los requisitos estructurales presentes en la enzima, a continuación se llevó a cabo la búsqueda de estos equivalentes sintéticos haciendo uso de la base de datos de *Reaxys*. En este banco de datos se procedió a graficar computacionalmente la estructura *query* y se encontraron (o no) rutas sintéticas reportadas para el fragmento diseñado. Debido a que este proyecto se enfoca en el diseño de estructuras orgánicas, se evitaron las estructuras similares a las cisteínas originales del péptido. De esta manera se escogieron los siguientes fragmentos como posibles puntos de partida para la Estrategia 1.

Los fragmentos encontrados fueron clasificados como estructuras alifáticas o aromáticas.

Fragmentos retrosintéticos SS alifáticos

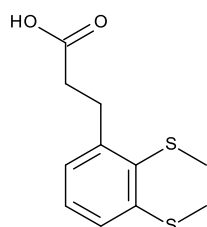


Dang, Sobczak, Mebel,
Chatgialloglu, & Wnuk, 2012



USA Patente nº
WO2005/14524 A2, 2005

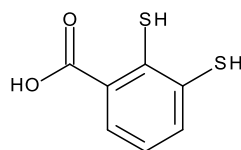
Fragmentos retrosintéticos SS aromáticos



c

PubChem Compound ID:
117358333

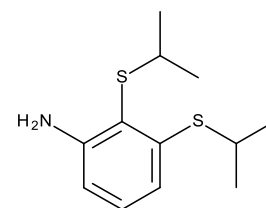
(NIH - National Center for
Biotechnology
Information, 2016)



d

64%*

(Schimann, Backer, &
Enoch, 1996)



e

91%*

(Okamura, Ushijima, Omi,
& Onitsuka, 2013)

Figura 10. Fragmentos retrosintéticos SS propuestos, se presentan los porcentajes de rendimiento (*) de la reacción reportado por la fuente bibliográfica

La reacción de síntesis del equivalente sintético SS alifático **a** presenta un porcentaje de rendimiento sumamente alto lo que representa una ventaja significativa para la etapa de síntesis. Sin embargo, un análisis detallado de la estructura, permite evidenciar que este equivalente sintético no presenta flexibilidad en el extremo carboxílico, esto significa que para que la reacción de acoplamiento se lleve a cabo de la manera correcta y los grupos funcionales se orienten adecuadamente para la coordinación con el átomo de níquel, es necesario que el ligando NN con el que se acople posea una cadena flexible donde está unido el grupo funcional reactivo (Fg₂) que permitirá la formación del enlace.

El fragmento retrosintético **b** presenta una estructura con una ramificación medianamente flexible que posee un grupo amino terminal, sin embargo, su reacción sintética está patentada por lo que los detalles de la ruta para su obtención no son de dominio público.

Para los fragmentos retrosintéticos SS aromáticos, se debe tener en cuenta cuál sería el efecto tanto en el potencial redox como en capacidad biomimética de adicionar al ligando una estructura orgánica como el benceno.

Estudios sistemáticos del efecto que supone la variación estructural de los ligandos sobre el potencial redox de complejos de níquel mostraron que la adición de un

grupo bencénico, y en general, un mayor grado de insaturación en el macrociclo desfavorece la formación del Ni^{III} (Lovecchio, Gore, & Busch, 1974), por lo que este efecto deberá ser tenido en cuenta en estudios electroquímicos futuros de este tema de investigación.

A pesar de que la reacción de dismutación pudiera verse afectada al hacer uso de estructuras cíclicas se ha documentado que la inclusión de grupos tioles disminuyen el potencial redox del par Ni^{III}/Ni^{II} a valores cercanos al óptimo (Green, Brothers, Darensborug, & Rockcliffe, 2009), permitiendo que el uso de compuestos aromáticos no represente (necesariamente) una limitación para los fragmentos propuestos.

El equivalente sintético **c** representa una vía llamativa para la generación de macrociclos orgánicos de la NiSOD, principalmente porque su estructura ya posee los grupos tioles protegidos evitándose pasos adicionales en la ruta sintética, además presenta un extremo (con un grupo carboxílico) bastante flexible, lo que permitiría acoplar los fragmentos de la manera y orientación deseada. Sin embargo, el compuesto no presenta una ruta sintética disponible para la comunidad científica (patente) por lo que la única opción de obtención es la compra.

El equivalente sintético **d** presenta en su estructura un grupo carboxílico poco flexible, lo que se considera un inconveniente; sin embargo, soluciones alternativas para el acoplamiento incluyen desde la reacción con un ligando NN que tenga la flexibilidad necesaria para evitar problemas en la síntesis del macrociclo deseado hasta el uso de aminoácidos pequeños como la glicina que sirva como un puente entre los fragmentos, facilitando la unión de los mismos y por ende la formación del macrociclo. Estas estrategias deberán ser tenidas en cuenta en la etapa de síntesis.

Para el fragmento retrosintético **e** se observa en su estructura la ventaja de poseer los grupos tioles protegidos; sin embargo, al igual que la mayoría de los fragmentos de esta sección, no presenta un grupo amino con flexibilidad. Por lo que deberán implementarse estrategias en la etapa de síntesis que permitan la reacción de acoplamiento entre los fragmentos y aún más la orientación correcta de los grupos funcionales en la esfera de coordinación primaria del níquel.

2.5.3.1.3. Estrategias de protección de los grupos tioles

Existen básicamente dos formas de proteger los grupos tioles, independientemente de la metodología sintética utilizada (Hiskey, 2000). Por un lado están aquellos grupos que se liberan en la etapa final de la síntesis, al tiempo que los restantes protectores permanentes. Por otro lado, aquellos grupos cuya eliminación es independiente del resto de protectores permanentes (Grant, 2002).

En el primer grupo están el *p*-metilbencilo (Meb) (Erickson & Merrifield, 1973) y el *p*-metoxibencilo (Mob) (Akabori, Sakakibara, Shimonishi, & Y.A., 1964), eliminables

con HF y compatibles con la química Boc (Ramos Tomillero, y otros, 2013); también pertenecen a este grupo el tritilo (Trt) (McCurdy, 1989) y trimetoxibencilo (Tmob) (Munson, García-Echeverría, Albericio, & Barany, 1992), lábiles al ácido trifluoroacético (TFA) y aptos para la química Fmoc. Al usar los reactivos de este grupo, la acidólisis final dará lugar al macrociclo buscado con las funciones tiol libres. Los grupos Mob, Trt y Tmob pueden además eliminarse, previamente a la acidólisis final, con yodo o trifluoroacetato de talio (III) [Tl(tfa)₃].

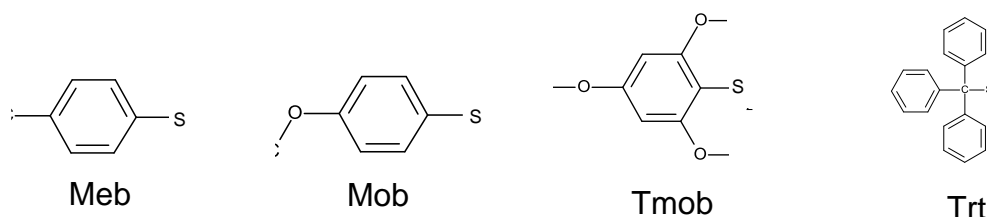
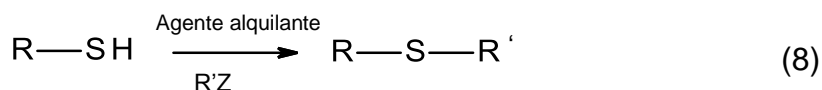


Figura 11. Grupos protectores de la función tiol

La desprotección de las funciones tiol puede también llevarse a cabo independientemente de la acidólisis. Una alternativa para ello es la protección con el grupo acetamidometilo (Acm) (Zhang, y otros, 2008) que es totalmente estable frente a ácidos y eliminable mediante oxidación con acetato de mercurio (II) [Hg(OAc)₂], seguido de tratamiento con β-mercaptoetanol para dar el grupo tiol libre. Este grupo protector es compatible con las metodologías sintéticas Boc y Fmoc (Hiskey, 2000).

Todos los métodos mencionados, en mayor o menor extensión, pueden dar lugar a reacciones de dimerización y oligomerización (Andreu & Rivas, 1997). Éstas se pueden minimizar empleando condiciones diluidas en solución, o bien trabajando en fase sólida, aprovechando el efecto de *pseudo-dilución* (Mazur & Jayalekshmy, 1979) asociado a las reacciones sobre soporte polimérico. Para facilitar las experimentales se propone como principal mecanismo de protección/desprotección de los grupos azufrados la metilación/desmetilación.

Existen diferentes procedimientos para alquilar estos grupos funcionales usando, por ejemplo, reactivos clásicos denotados como R'Z en la ecuación y que generalmente son electrófilos de alquilo (Lamoureux & Agüero, 2009).



2.5.3.2. Fragmento retrosintético NN

2.5.3.2.1. Química del nitrógeno y reactividad de los grupos aminos

El nitrógeno es el elemento más electronegativo del grupo V (Huheey, Keiter, & Keiter, 2007), este átomo presenta diversas características interesantes, por ejemplo, solamente los cuatro orbitales de la capa L están disponibles para la formación de enlace, de forma que el nitrógeno forma un máximo de cuatro enlaces (Rayner-Canham, 2000) (tetraédrico) cuando está en forma de iones amonio sustituidos y de óxidos de amina. Además, es el único elemento del grupo V que existe en forma de moléculas diatómicas a temperatura ambiente y el único que permanece en esa forma en los estados líquido y sólido (House, 2008).

La existencia de muchos estados de oxidación del nitrógeno hace que un estudio detallado de sus reacciones resulte un trabajo excesivo para este texto. Se mostraran por tanto las características más sobresalientes de este átomo.

El nitrógeno forma enlaces simples, dobles y triples estables con el carbono, demostrando la facilidad de formación de enlace π *p-p* (Gillespie, 1990). La mayoría de compuestos que contienen nitrógeno y oxígeno comprenden, de manera análoga, enlaces múltiples (Cotton & Wilkinson, Basic inorganic chemistry, 1996). Cuando reacciona con oxígeno, se forman especies como HNO_2 y $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$, que son ácidos débiles pero también forma ácidos que se ionizan por completo en medio acuoso como el HNO_3 (Miessler & Tarr, 2011).

Una de las especies químicas más interesantes que forma el nitrógeno son los cianuros orgánicos (nitrilos) (Sharpe, 1993), los cuales son compuestos prácticamente neutros y no forman sales con ácidos acuosos (Allinger, y otros, 2000). Las reacciones de los nitrilos pueden dividirse, en general, en reacciones del grupo ciano (CN) y reacciones de los aniones de nitrilos que tienen hidrógenos alfa (RCH-CN) (Well, 1978).

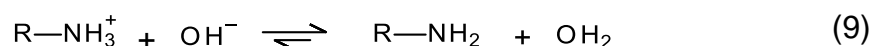
Para el desarrollo de biomiméticos de la NiSOD se han sintetizado una serie de metalocomplejos, en algunos de ellos se ha hecho uso de especies nitrogenadas diferentes a las encontradas en la enzima nativa como lo es el grupo amidato. Estos últimos, son especies nucleófilas (Gray & Haight, 2003) que suelen actuar a través del nitrógeno, atacando a diferentes electrófilos. Los complejos metal-amidato han sido materia de investigación en las últimas décadas (Huh, y otros, 2014), principalmente por su importancia en áreas como la bioquímica y la química medicinal. Este grupo funcional está presente en metaloenzimas importantes como la nitrogenasa (Peters, y otros, 1997), la nitrilhidratasa (Nagahima, y otros, 1998) y la carbón monóxido dehidrogenasa/acetil Co-A sintasa (CODH/ACS) (Darnault, y otros, 2003). Además, se ha establecido que tiene cierta implicación en el avance de enfermedades neurodegenerativas como *mad cow*, *kuru* y Creutzfeldt-Jakob (Millhauser, 2004). Otra característica importante de los grupos amidatos es que

funcionan como potenciales sistemas de liberación específicos para dianas moleculares relevantes (Rose & Mascharak, 2008).

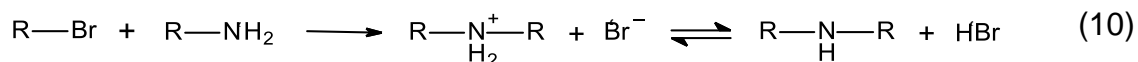
A pesar de que las características químicas de estos grupos funcionales que contienen nitrógeno son sumamente imprescindibles para la química orgánica, este trabajo se centra en la importancia y reactividad de los grupos nitrogenados que posee el macrociclo orgánico de la NiSOD, como por ejemplo las amidas.

Por otra parte, las amidas son derivados alquilados del amoniaco. El par de electrones no enlazados en el átomo de nitrógeno le permite actuar de base y de nucleófilo (Carey & Sundberg, 2007).

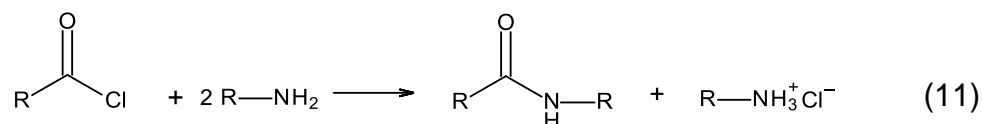
Este grupo funcional se caracteriza porque el grupo saliente de una amina (:NH_2) es una base sumamente fuerte (Boyd & Morrison, 1990). La protonación del grupo amino lo hace mejor grupo saliente, pero no tan bueno como un alcohol protonado. Por consiguiente, el grupo saliente de una amina protonada no se puede disociar y formar un carbocatión, ni ser reemplazada por un ion haluro (Yurkanis Bruice, 2008). Tampoco se pueden desplazar los grupos amino protonados por nucleófilos fuertemente básicos, como el ion hidroxilo, porque el nucleófilo reaccionaría inmediatamente con el hidrógeno ácido del grupo NH_3^+ convirtiéndose en agua, un mal nucleófilo (Warren & Wyatt, 2008).



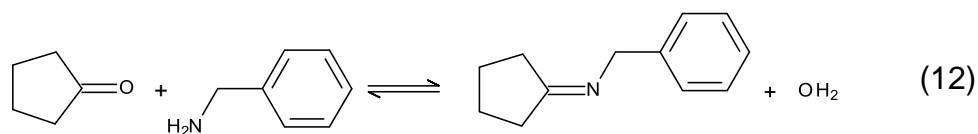
Las aminas reaccionan como nucleófilos en una gran variedad de reacciones: en aquellas de sustitución nucleofílica, que alquilan la amina (Bruckner, 2002), por ejemplo,



en reacciones de sustitución nucleofílica del grupo acilo, donde se acila la amina (Wade, 2011),



y también en reacciones de adición nucleofílica-eliminación, las reacciones de aldehídos y cetonas con aminas primarias para formar iminas y con aminas secundarias para formar enaminas (Carey & Sundberg, 2007):



Cabe mencionar que las arilaminas primarias reaccionan con ácido nitroso para formar sales de arildiazonio. Estas tienen amplia aplicación en síntesis porque una gran variedad de nucleófilos pueden sustituir el grupo diazonio. Esta reacción permite preparar una variedad mayor de bencenos sustituidos, en comparación con los de reacciones de sustitución electrofílica aromática (Yurkanis Bruice, 2008).

Además de sus características como nucleófilos, las aminas se oxidan con facilidad, de la siguiente manera: aminas primarias se oxidan a hidroxilamina, que a su vez se oxidan a compuestos nitrosos, que se siguen oxidando hasta compuestos nitro. Para oxidar las aminas se agrega peróxido de hidrógeno, peroxiácidos y otros agentes oxidantes comunes. Las reacciones de oxidación parecen implicar radicales, pero no se comprenden en su totalidad (McMurry, Castellion, & Ballantine, 2007).

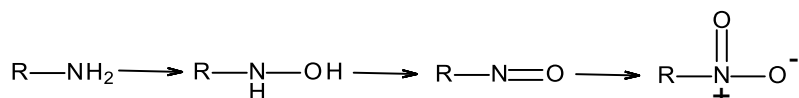


Figura 12. Oxidación progresiva de una amina primaria pasando por una hidroxilamina, seguido de un compuesto nitroso y finalmente a un compuesto nitro

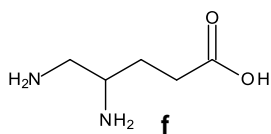
Los óxidos de amina terciaria sufren la reacción de eliminación de Cope, para esta reacción no se necesita una base fuerte puesto que el óxido de amina funciona como su propia base (Warren & Wyatt, 2008). Así, una reacción de eliminación de Cope se efectúa bajo condiciones moderadas y es una reacción E2 intramolecular donde interviene una eliminación sin, donde el producto principal es el que se obtiene eliminando un protón del carbono β que tenga más hidrógenos (Wade, 2011).

Debido al carácter nucleófilo y básico de las aminas, es necesario crear estrategias de protección de estos grupos nitrogenados sobre todo para permitir que se den las reacciones de acoplamiento entre fragmentos por los sitios deseados, evitando de esta manera reacciones colaterales y por tanto productos no deseados.

2.5.3.2.2. Fragmentos retrosintéticos NN propuestos

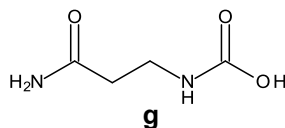
Siguiendo con los equivalentes sintéticos resultantes al hacer la desconexión de la Estrategia 1 y haciendo uso de la metodología propuesta, se realizó la búsqueda en la base de datos de *Reaxys* para determinar los sintones del tipo NN reportados en la literatura.

Fragmentos retrosintéticos NN alifáticos



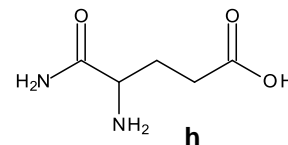
88%*

Altman, Shoef, Wilchek, &
Warshawsky, 1984



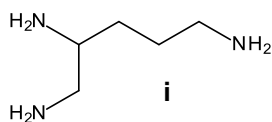
PubChem Compound
ID: 87552186

NIH-National Center of
Biotechnology
Information, 2015



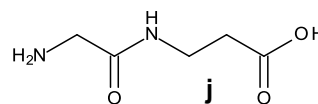
82%*

Stewart, 1980



PubChem Compound
ID: 21705243

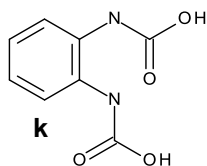
NIH-National Center of
Biotechnology
Information, 2007



67%*

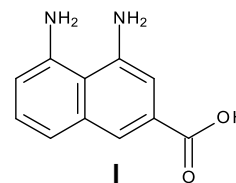
Livingston, Doherty, & Zeldes,
1974

Fragmentos retrosintéticos NN aromáticos



PubChem Compound
ID: 21491509

NIH-National Center of
Biotechnology
Information, 2007



66%*

Ekstrand, 1980

Figura 13. Fragmentos retrosintéticos NN propuestos, se presentan los porcentajes de rendimiento (*) de la reacción reportados por la fuente bibliográfica

Estos fragmentos retrosintéticos NN pueden analizarse según las ventajas y desventajas que presentan para el proceso sintético. En primer lugar, el equivalente sintético **f** presenta una cadena medianamente flexible con la presencia de un grupo carboxílico que servirá para las reacciones de acoplamiento. Además se encuentran su método de síntesis con un rendimiento de reacción aceptable que podría ser implementado en proyectos posteriores que involucren la síntesis de los ligandos.

El equivalente sintético **g** se caracteriza porque sus características estructurales se acercan más a la estructura nativa del macrociclo de la NiSOD. Se pueden lograr ciertas modificaciones en esta molécula, puesto que se ha demostrado que ciertos grupos aniónicos como los amidatos son muy efectivos en la estabilización de la especie Ni^{III} (Sugiura & Mino, 1979). Trabajos adicionales, concluyeron que se podía lograr una estabilidad adicional en los complejos de níquel al incluir grupos tiolatos en la esfera de coordinación (Baidya, y otros, 1992), y así obtener una coordinación mixta amidato-tiolato más estable.

El equivalente sintético **h** presenta una cadena flexible unida al grupo carboxílico, lo que permitiría la reacción de acoplamiento y la generación de un macrociclo orgánico con la disposición espacial esperada. El equivalente sintético **i** se caracteriza por tener únicamente el grupo funcional amina en todas su ramificaciones, a pesar de que su ruta sintética no está disponible, es posible usar la ramificación más larga como medio de acoplamiento de fragmentos, sin embargo, se convierte en un reto sintético la protección selectiva porque en toda la estructura sólo se presentan aminas primarias, pudiendo generarse diversos productos de acoplamiento y por tanto problemas sintéticos que debieran solucionarse en caso de que se escogiese este equivalente sintético para estudios experimentales posteriores.

Por su parte, el equivalente sintético **j** presenta un rendimiento de reacción algo más bajo (67%) lo que representa una desventaja importante en la etapa sintética; sin embargo, presenta en su estructura una cadena flexible (larga) unida a un ácido carboxílico, lo que lo hace un fragmento de interés para establecerse en una ruta sintética de la esfera de coordinación primaria de la NiSOD.

Para los equivalentes sintéticos NN aromáticos debe tenerse en cuenta (al igual que con los SS aromáticos) el efecto de la aromaticidad en el potencial redox y en el potencial como biomimético del macrociclo. En un estudio de macrociclos nitrogenados, se demostró el efecto de factores como el grado de insaturación del ligando, su carga y el tamaño del anillo sobre la facilidad de oxidación o reducción de complejos de níquel (Lovecchio, Gore, & Busch, 1974) donde se determinó que la presencia de anillos aromáticos en la segunda esfera de coordinación ocasiona un aumento en el potencial, es decir, el estado Ni^{III} se desestabiliza.

Estudios sistemáticos donde se evaluaron los efectos de la periferia del ligando macrocíclico con el ambiente de coordinación *cis*-bisamidato/bisamino, indican que

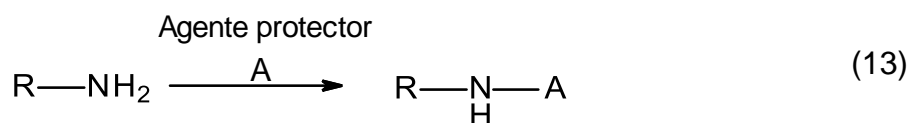
los macrociclos de doce y trece miembros forman la cavidad ideal para el posicionamiento del Ni^{II} (Munjal, Kumar, Sharma, & Gupta, 2011).

El equivalente sintético **k** presenta una posibilidad de escoger por medio de cual nitrógeno se lleva a cabo la reacción de acoplamiento; sin embargo, representa un desafío sintético el hecho de que este no presente los grupos funcionales amino o amida libres para la coordinación directa con el níquel. Por lo que su participación en una ruta sintética propuesta podría no ser muy eficaz.

El equivalente sintético **l** presenta un sistema conjugado de dos anillos aromáticos, se sabe que el tamaño del anillo influye en la estabilización del estado oxidado, además que la presencia estos sistemas contribuyen de manera aditiva al potencial (Lovecchio, Gore, & Busch, 1974), pudiendo desviar la ventana de potencial óptima para la dismutación de los radicales de oxígeno a valores donde no sea posible la reacción. Además de esto presenta un grupo amino de cadena no flexible por lo que posiblemente no se logrará el correcto acoplamiento de los equivalentes sintéticos debido a la suma en el impedimento estérico por los anillos aromáticos. Sin embargo, se pueden plantear soluciones como (mencionada con anterioridad) el acoplamiento adicional de algún aminoácido o estructura orgánica que sirva como puente entre los fragmentos y el uso de un ligando SS con cadena flexible para el acoplamiento.

2.5.3.2.3. Estrategias de protección de grupos aminos

El factor más importante a considerar cuando se escoge un grupo protector (A) de un grupo amino es la facilidad con que este se podrá separar o eliminar en las etapas posteriores de la síntesis.



Las aminas se han protegido en forma de amidas cuando se llevan a cabo reacciones de sustitución electrofílica aromática en aminas cíclicas. Sin embargo, una amida no es un grupo protector adecuado en la síntesis de macromoléculas complejas, ya que no habría manera de eliminar el grupo protector sin hidrolizar otros enlaces (Gilbert & Martin, 2006) formados durante el proceso sintético.

Un grupo protector que se puede hidrolizar en condiciones ácidas y anhidras, que no afectan a los enlaces formados, es el carbamato de bencilo o el de *terc*-butilo. Estos carbamatos se preparan por reacción de una amina primaria con un derivado de un éster carbónico (Ege, 2004).

El cloroformiato de *terc*-butilo no es muy estable; en su lugar, se puede emplear como reactivo para la protección de grupos amino el azidoformiato de *terc*-butilo, en

el que el ion azida es el grupo saliente en la reacción de sustitución (Graham & Fryhle, 2008). En la actualidad hay otros *terc*-butoxicarbonil-derivados que son tanto o más efectivos y menos tóxicos. El grupo protector *terc*-butoxicarbonilo se abrevia habitualmente como Boc (Sorrell, 2006).

Los grupos bencilo o *terc*-butilo son excelentes grupos protectores ya que dan lugar a carbocationes o radicales estables (Mathews, Van Holde, Appling, & Anthony-Cahill, 2013). En efecto, en condiciones ácidas, en ausencia de agua, se rompen dando ácidos carbámicos, que pierden dióxido de carbono y regeneran el grupo amino. Así, el grupo *terc*-butoxicarbonilo se elimina cuando se trata con un ácido tal como el ácido trifluoroacético en diclorometano o el cloruro de hidrógeno anhidro en éter (Ege, 2004). Por otra parte, el grupo benciloxycarbonilo se elimina por tratamiento con un ácido más fuerte, como el bromuro de hidrógeno anhidro disuelto en ácido trifluoroacético o en ácido acético (Fackler & Falvello, 2011).

Los grupos aminos en forma de carbamato no son ni básicos ni nucleófilos, por lo que se mantienen protegidos hasta que se elimina el grupo protector en el momento adecuado de la síntesis (Campos García, Vázquez Cruz, & Escolano Miron, 2009).

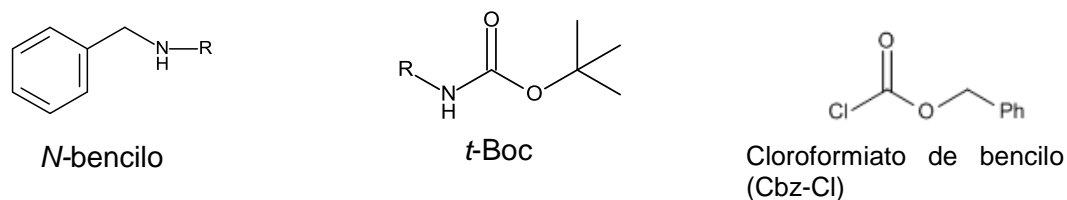


Figura 14. Estructuras de grupos protectores para el grupo funcional amina

2.5.4. Estrategia 1: Ligandos orgánicos propuestos

En la búsqueda de obtener un macrociclo orgánico similar al encontrado en la NiSOD, se encontraron los siguientes cinco ligandos orgánicos que cumplen con las exigencias electrónicas y estructurales presentes en el centro activo de la enzima en estudio.

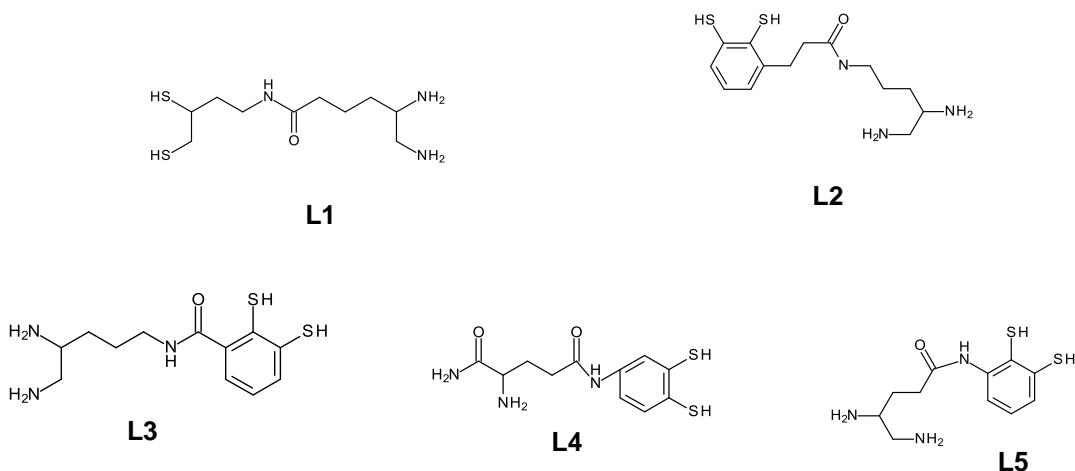


Figura 15. Ligandos orgánicos diseñados para la obtención de biomiméticas de la NiSOD

El ligando **L1** presenta una ventaja estructural que es la presencia de un enlace a un grupo carboxílico C=O cercano al níquel puesto que este podría actuar como un quinto ligando en la esfera de coordinación del macrociclo orgánico. Esto se evidenció en estudios anteriores con aminoácidos donde, en contraste con la configuración *cis* del enlace Leu4-Pro5 (leucina-prolina) presente en la enzima madura, el modelo peptídico presentaba una configuración *trans* lo que al parecer obligaba al átomo de níquel a coordinarse con el extremo C-terminal del enlace entre estos aminoácidos. Posteriormente esta hipótesis fue corroborada por medio de cálculos DFT. Sin embargo, esta coordinación modificada ocasiona un cambio en el estado de oxidación del constructo sintético evitando la detección de la presencia en solución de la especie Ni^{III} (Schmidt, y otros, 2008).

En **L2** hay la presencia de un anillo aromático que podría tener consecuencias en el potencial como biomimético de la enzima, al ser parte de la segunda esfera de coordinación del níquel pudiendo afectar las interacciones electrostáticas entre este átomo y sus ligandos principales. En estudios sistemáticos de ligandos tetra-azo macrocíclicos se establecieron cómo podían afectar elementos estructurales de los ligandos al potencial redox de la cupla Ni^I/Ni^{III}, en estos se determinó que el tamaño del anillo influye en la estabilización del estado oxidado del níquel (Lovecchio, Gore, & Busch, 1974). Experimentalmente, se encontró que una cavidad de mayor tamaño (*hole size*) estabiliza mejor el estado Ni^I, mientras que el Ni^{III} se encuentra con mejores interacciones en una cavidad de menor tamaño (Sharma, Upreti, & Gupta, 2008), esto acorde con lo esperado por el radio iónico de estas especies. Estos aspectos deben tenerse en cuenta para determinar la potencialidad como biomimético del macrociclo propuesto.

Por su parte, **L3** presenta una estructura similar a la de **L2** por lo que las consideraciones anteriores, en cuanto a la introducción de grupos aromáticos en la

segunda esfera de coordinación del níquel, también deben tenerse en cuenta en este caso, sobre todo por su posible efecto en el potencial redox pudiendo desplazarlo hacia valores poco cercanos al establecido para la reacción de dismutación del anión radical superóxido y por ende su potencial como biomimético de la enzima NiSOD.

En **L4** existen motivos estructurales interesantes como la presencia de todos los grupos funcionales (a excepción del quinto ligando) presentes en la esfera de coordinación primaria, ocasionando un complejo del tipo $\text{NiN}^{\text{amino}}\text{N}^{\text{amida}}\text{S}_2^{\text{tiol}}$ a diferencia de los anteriores que eran $\text{NiN}_2^{\text{amino}}\text{S}_2^{\text{tiol}}$. Se sabe que la introducción de grupos amidas (o amidatos) al ambiente cuadrado planar del níquel disminuye el potencial redox hasta valores entre 0,87 a 1,09V vs. SHE (Electrodo estándar de hidrógeno) (Singh, Hundal, & Gupta, 2008) una ventana de potencial cercana al óptimo buscado (0,35 vs. SHE), por lo que se recomiendan estudios electroquímicos a futuro para este ligando.

La estructura de **L5** presenta un grupo aromático (en su segunda esfera de coordinación) y la ausencia del grupo amida lo que probablemente desplace el valor de potencial a rangos mayores de lo esperado y por tanto se produzca una destabilización del estado Ni^{III} , importante para la reacción de dismutación. A pesar de esto, el macrociclo propuesto cumple con las características espaciales esperadas formando un complejo cuadrado planar con el átomo de níquel, por lo que no se descarta su actuar como potencial biomimético de la NiSOD, sólo a través de estudios espectro y electroquímicos se determinará si este ligante es apropiado para la función deseada o si necesita modificaciones adicionales en su estructura para lograr la modulación correcta del potencial redox del macrociclo orgánico.

2.5.5. Estrategia 1: Acoplando los equivalentes sintéticos

Se indagó (de forma gráfica) que la geometría tridimensional del complejo orgánico formado fuese la correcta y por ende que permita la formación de una geometría cuadrado planar con el níquel, como la que exhibe la enzima NiSOD, se propusieron las siguientes rutas sintéticas haciendo uso de los equivalentes sintéticos SS y NN propuestos para la Estrategia 1.

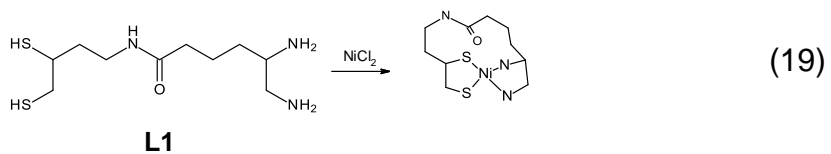
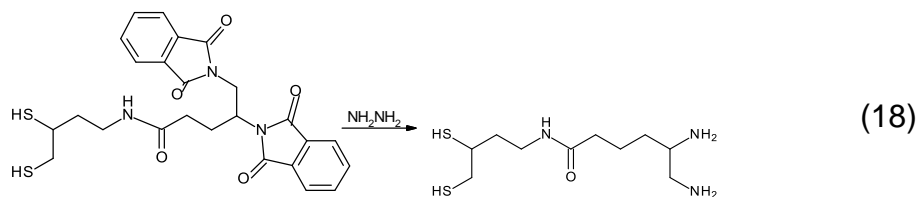
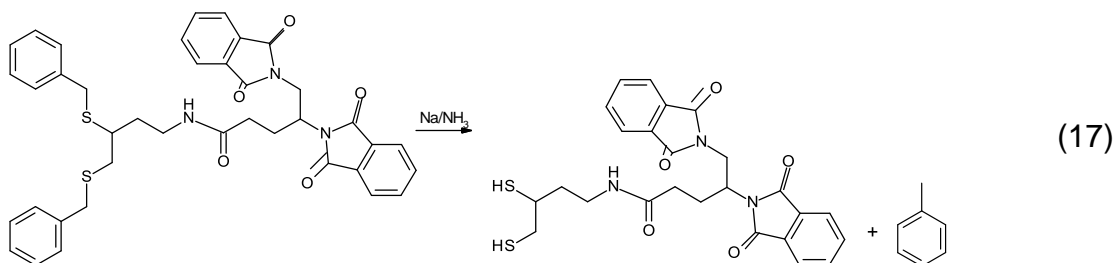
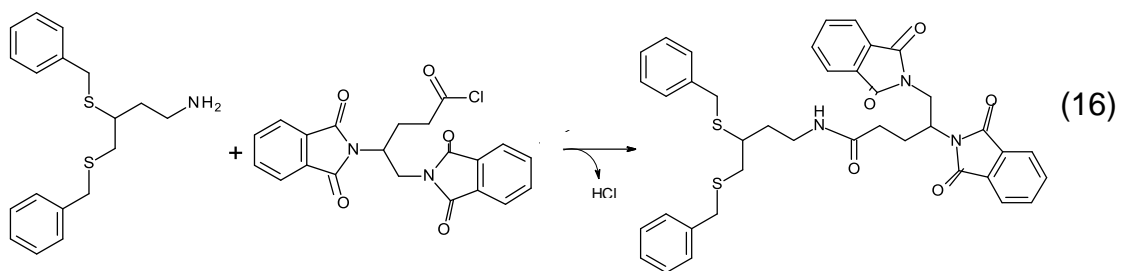
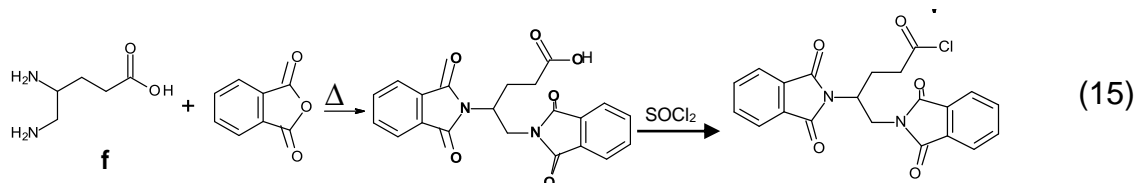
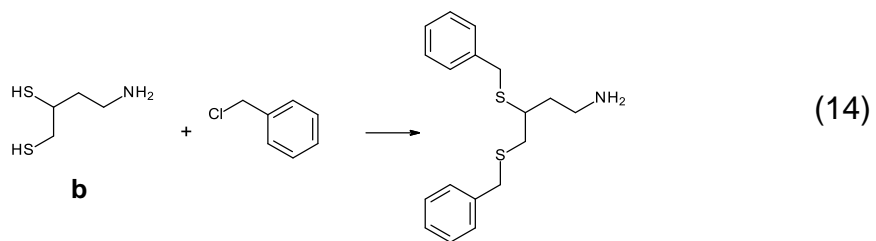
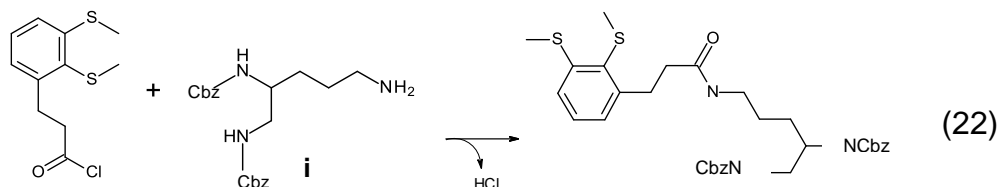
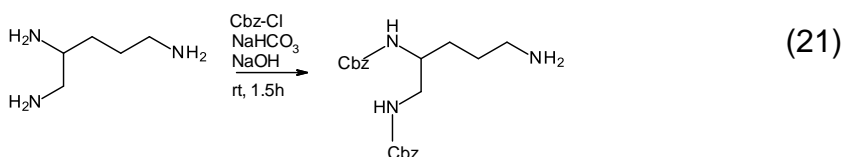
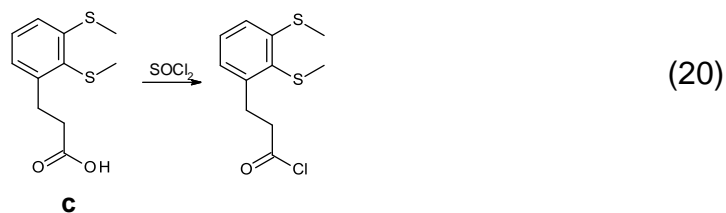


Figura 16. Ruta sintética 1 para la Estrategia 1

La ruta retrosintética anterior, se inicia con la protección del grupo tiol del equivalente sintético **b** (ecuación 14) haciendo uso de cloruro de bencilo, esta estrategia de protección es selectiva para grupos -SH, -OH, -COOH (Divakaran, 2007). A continuación se lleva a cabo la protección de la amina del equivalente sintético **f** (ecuación 15) por medio del reactivo isobenzofuran-1,3-diona (Feichtinger, Zapf, Sings, & Goodman, 1998); con estos grupos funcionales protegidos es posible orientar la reacción únicamente hacia el acoplamiento de los fragmentos retrosintéticos.

Entonces, al ligando NN **f** se le debe llevar a cabo una reacción de activación (ecuación 16) en el grupo carboxílico por medio de su conversión a cloruro de ácido (Yurkanis Bruice, 2008). Después, se da la formación del enlace amida entre **f** (activado y protegido) y **b** (protegido) (ecuación 17) lo que genera una sola macroestructura.

Se procede con la desprotección de los grupos funcionales del centro de coordinación de la enzima, tiol y amino, en ese orden (ecuación 18 y 19, respectivamente). Finalmente, se obtiene el macrociclo orgánico deseado con las características estructurales buscadas y se añade al medio de reacción una sal de níquel (NiCl_2) (ecuación 17) para lograr la mimetización del centro activo de la enzima NiSOD obteniéndose un complejo del tipo NiN_2S_2 .



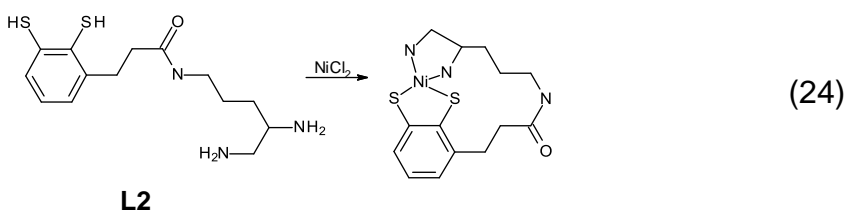
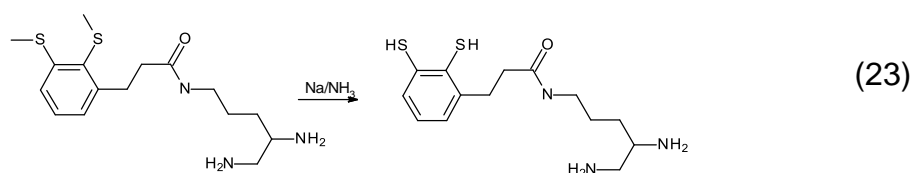


Figura 17. Ruta sintética 2 para la Estrategia 1

En esta ruta retrosintética, se inicia con la activación del grupo carboxílico perteneciente al equivalente sintético **c** (ecuación 20). Gracias a que los grupos tioles ya están protegidos se evitan pasos en la ruta sintética, siendo un equivalente sintético de partida llamativo para trabajos experimentales futuros.

El equivalente sintético **i** sufre una reacción de protección en los grupos aminos (ecuación 21), este tipo de reacción con cloroformiato de bencilo Cbz), tiende a proteger selectivamente grupos amino que se encuentren ligeramente cercanos (o conjugados) (Jarowicki & Kocienski, 1999) por medio del control del pH de la solución (pH 9-11) que se logra con la adición de una solución buffer $\text{NaHCO}_3\text{-NaOH}$. Sí en la mezcla de reacción no se añade la solución tampón, se generarían una cantidad considerable de derivados *bis*- y *tris*-Cbz.

A continuación se lleva a cabo la reacción de amidación (ecuación 22) y por ende la unión de los fragmentos retrosintéticos individuales.

Subsiguientemente, se lleva a cabo la reacción de desprotección del grupo tiol (ecuación 21) por medio de Na/NH_3 (Fuchs, 2011) y finalmente se hace adición al macrociclo orgánico de una sal de níquel (ecuación 24) obteniendo el complejo final con estructura buscada.

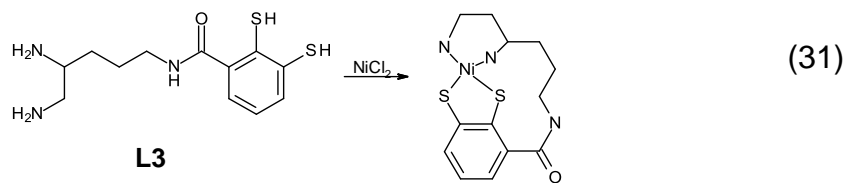
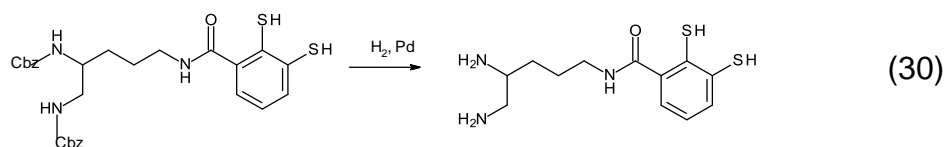
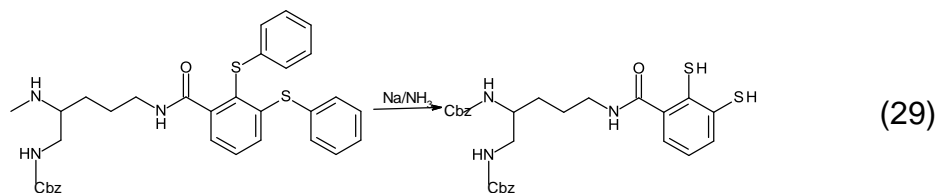
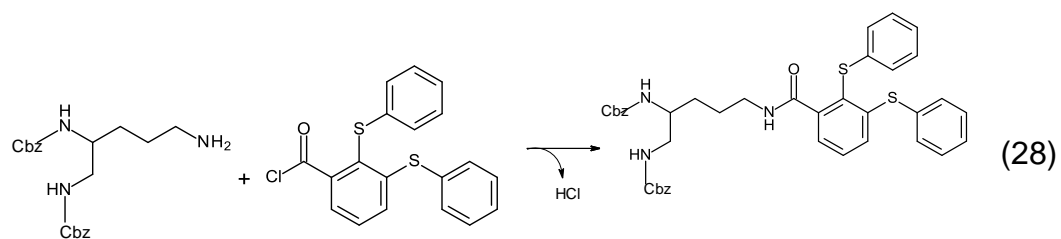
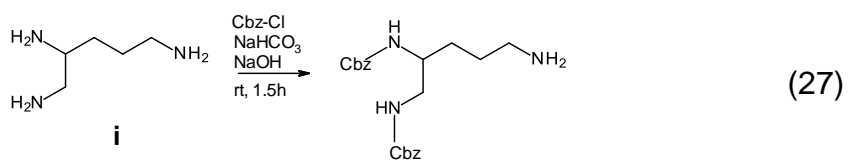
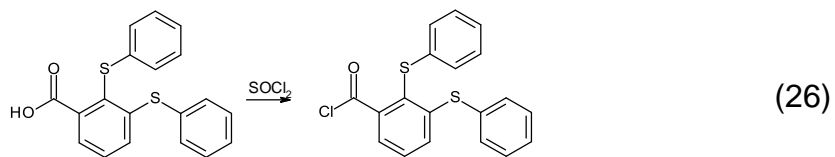
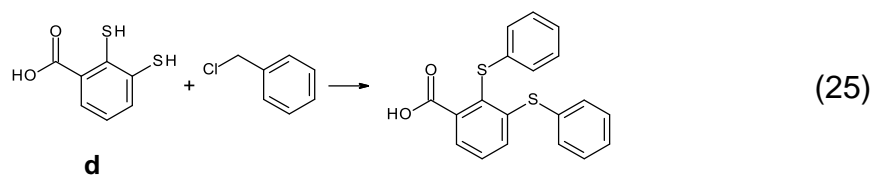
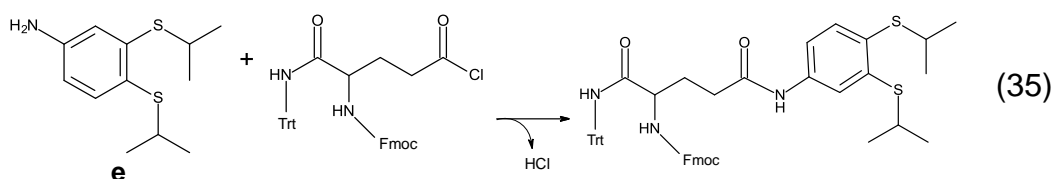
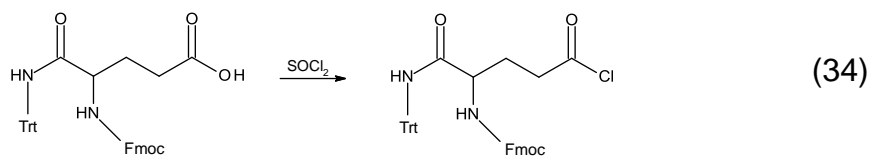
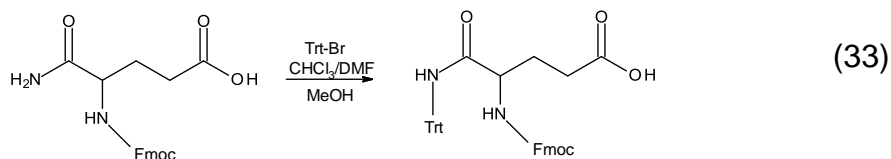
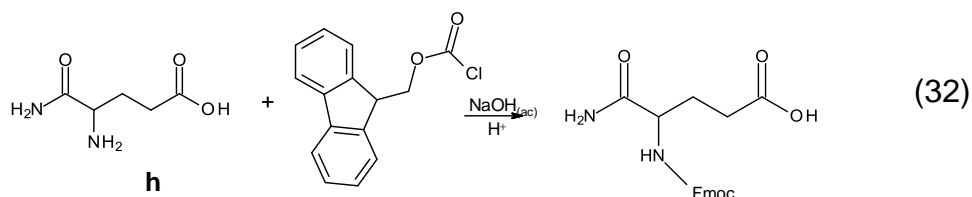


Figura 18. Ruta sintética 3 para la Estrategia 1

La ruta sintética 3 inicia con la protección del grupo tiol del equivalente sintético **d** (ecuación 25), por medio del grupo protector cloruro de bencilo, seguido de la activación del ácido carboxílico a cloruro de ácido (ecuación 26) haciendo uso del reactivo SOCl_2 (Ege, 2004).

El equivalente sintético **i** sufre una reacción de protección en los grupos aminos (ecuación 27) con el cloroformiato de bencilo, lo que permite una protección selectiva de las aminos cercanas.

A continuación, se procede a generar el enlace amida entre los fragmentos (ecuación 28), obteniéndose una estructura orgánica única que sufre reacciones de desprotección en sus grupos aminos y tioles (ecuación 29 y 30, respectivamente) y finalmente esta estructura reacciona con una sal de níquel (ecuación 31) formando la estructura “cíclica” al final de la ruta.



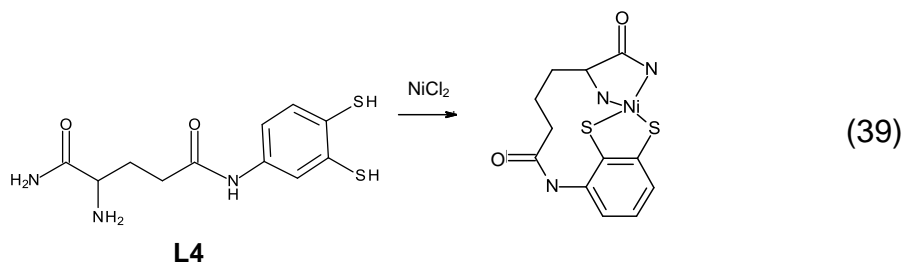
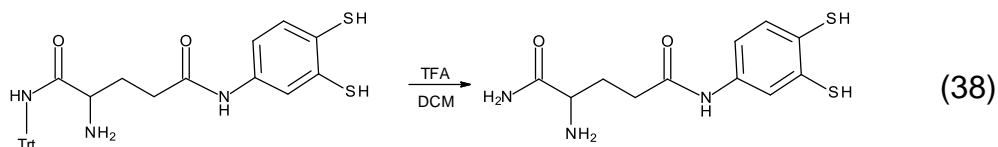
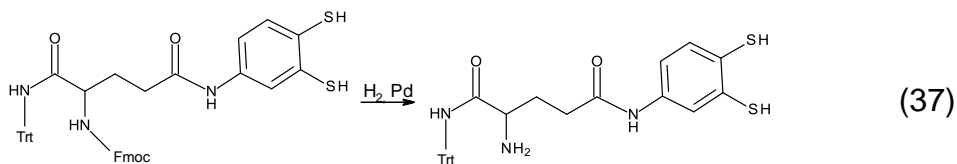
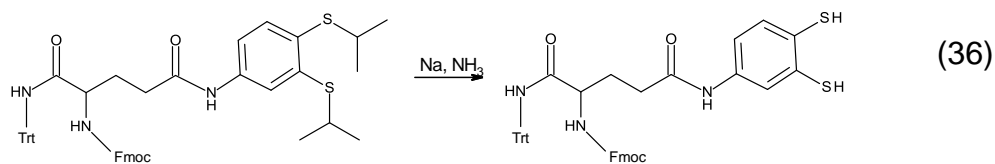


Figura 19. Ruta sintética 4 para la Estrategia 1

En la ruta retrosintética 4 se elige para ligando SS L el equivalente sintético **e**, este posee la ventaja sintética de tener los grupos funcionales tiol protegidos, por lo que no son necesarios estos pasos en la ruta (Figura 19).

Se inicia la ruta con la protección del grupo amino del equivalente sintético **h** (ecuación 32), haciendo uso del grupo protector 9-fluorenilmetilcarbamat (Spivey & Maddaford, 1999), seguido de la protección de la amida primaria por medio del reactivo trifenilmetil (*trityl* o Trt) (ecuación 33) (Sureshbabu & Narendra, 2011). A continuación, se lleva a cabo una activación del extremo carboxílico (ecuación 34) por medio de la generación de un cloruro de ácido (estrategia más usada en laboratorios de docencia) (Balanta, 2016).

Se da la reacción entre el cloruro de ácido (de **h**) y la amina (de **e**) (ecuación 3), permitiendo la unión de los equivalentes sintéticos NN y SS. Se procede con la desprotección de los grupos tioles, el amino y el amida (en ese orden) (ecuación 36, 37 y 38) (Jarowicki & Kocienski, 1999). Finalmente, se obtiene una estructura orgánica que se coordina con un ión de Ni^{II} (ecuación 39) y que tiene la presencia tanto de un grupo amino como de una amida.

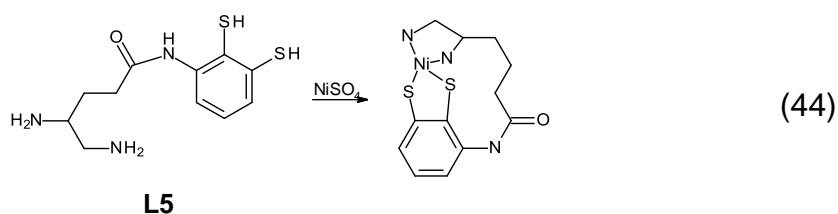
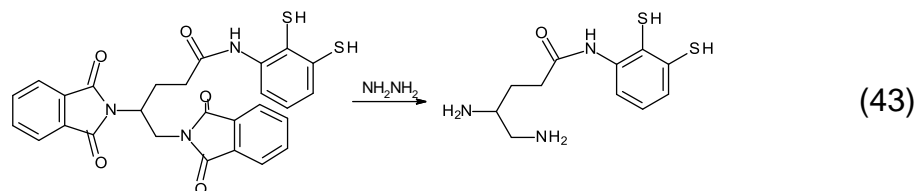
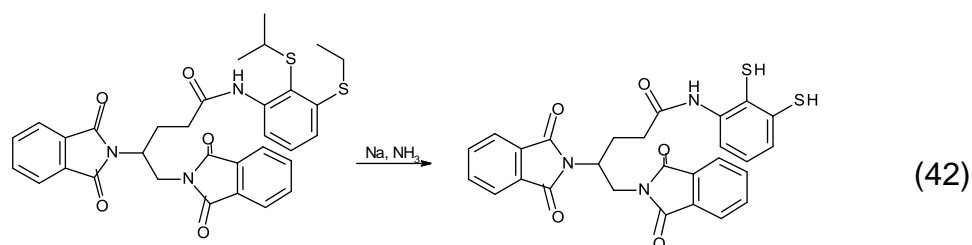
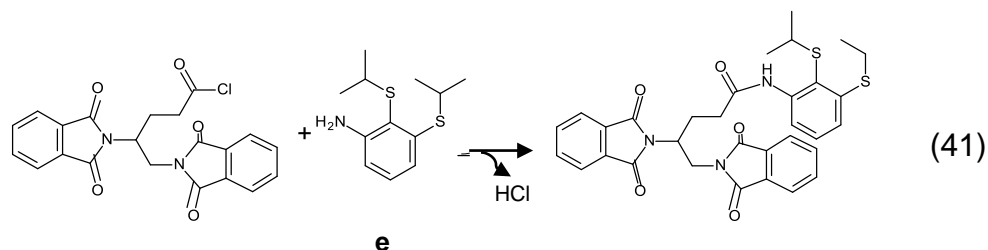
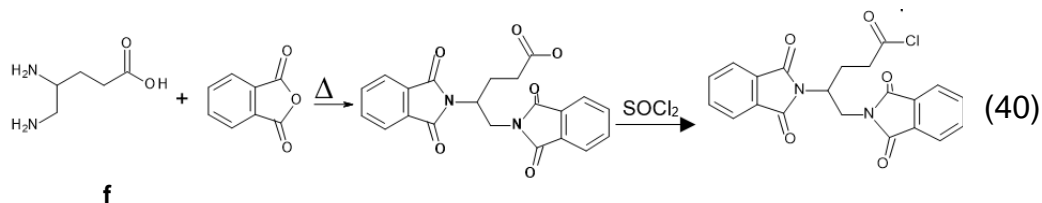


Figura 20. Ruta sintética 5 para la Estrategia 1

La estrategia sintética de la figura anterior, involucra la unión del equivalente sintético **e** (que presenta la ventaja sintética de poseer los grupos tiol protegidos) con el equivalente sintético **f**.

La reacción inicial es la protección del grupo amino haciendo uso de isobenzofuran-1,3-diona (McNaught, 1992) seguido de la activación del ácido

carboxílico (ecuación 40) presente en esta misma estructura **f**. Se procede a realizar la reacción de amidación entre los fragmentos (ecuación 41) y se obtiene una única estructura. A esta última se le somete a reacciones de desprotección de sus grupos funcionales principales (amino y tiol) (ecuación 42 y 43, respectivamente). Posteriormente, esta estructura se pone a reaccionar con una sal de níquel (ecuación 44) y se obtiene el macrociclo observado en el último paso de reacción.

No existen muchos complejos cuadrados planar tipo NiN_2S_2 reportados en la literatura, posiblemente debido a la alta susceptibilidad a la oxidación (Chohan & Maroney, 2006) y dimerización (Henderson, Bouwman, Spek, & Reedijk, 1997) de los grupos tiolatos. Este tipo de coordinación presenta potenciales del par $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ entre -0,129 y 0.342V vs. SHE (Electrodo estándar de hidrógeno), intervalo en el cual se encuentra el valor óptimo del potencial de dismutación de la NiSOD (0.35V vs. SHE), por lo que la modulación del potencial redox no debería ser un reto para la generación de biomiméticas de la NiSOD.

Los compuestos reportados del tipo $\text{NiN}_2^{\text{amino}}\text{S}_2^{\text{tiol}}$, en su mayoría utilizan bases de Schiff como ligandos. Los complejos más sencillos de este tipo presentan comportamientos de oxidación irreversible (Kruger, Peng, & Holm, 1991) a diferencia de lo observado en la naturaleza para la enzima NiSOD. Estudios electroquímicos futuros podrían determinar si los macrociclos orgánicos finales propuestos presentan una ventana de potencial adecuada para la dismutación de especies ROS.

Los complejos tipo $\text{NiN}^{\text{amino}}\text{N}^{\text{amida}}\text{S}_2^{\text{tiol}}$, tienen un potencial de oxidación irreversible en 0,262V vs. SHE (Mathrubootham, y otros, 2010). Este comportamiento redox puede deberse a la formación de puentes disulfuro y posterior destrucción del complejo. Esto indica que replicar el ambiente cuadrado planar del níquel en la enzima es insuficiente para determinar que un complejo posea actividad SOD, por lo que deben tenerse en cuenta la presencia de elementos estructurales adicionales que permitan estabilizar el estado oxidado del níquel y además que eviten la descomposición de los ligandos (Benjumea Ballesteros, 2013) en el proceso catalítico.

La falta de actividad SOD en los complejos modelo puede deberse a que en la mayoría de estos no se contempla la participación del quinto ligando lábil en posición axial y al parecer este elemento estructural tiene relación con la estabilización de la especie Ni^{III} (Díaz López C. A., 2012). Hasta la fecha sólo sea reportado un compuesto sintético que cumple con todas las características estructurales de la NiSOD, sin embargo, no presenta actividad SOD (Gale, Simmonett, Telser, Schaefer, & Harrop, 2011). Por esto, para garantizar la reversibilidad $\text{Ni}^{\text{II}}/\text{Ni}^{\text{III}}$ es necesario tener en cuenta las características estructurales de la enzima, incluidos los factores estéricos que al parecer son los responsables de la inactivación de la actividad SOD por la formación de puentes disulfuro.

Las rutas propuestas durante este apartado son altamente recomendables para ejecutarse en los laboratorios de investigación durante proyectos futuros de esta línea de investigación, puesto que los reactivos en su mayoría son de fácil acceso o pueden ser sintetizados. Sin embargo, los equivalentes sintéticos **b**, **c**, **i**, **j**, sólo pueden ser adquiridos por medios comerciales por lo que podría representar un gasto significativo así como un tiempo de espera por entrega que debe ser tenido en cuenta en estudios experimentales posteriores.

2.5.6. Estrategia 2

La siguiente estrategia retrosintética a considerar es la denotada como Estrategia 2 (Figura 6). En este caso, la fragmentación del macrociclo en partes simétricas ocasiona la generación de un par de estructuras “equivalentes” que poseen tanto un grupo amino como un tiol, sin embargo, cada equivalente sintético se diferencia en el grupo reactivo que posee. De esta forma, se asegura que en la etapa de síntesis se logre el acoplamiento de estos por medio de la formación de un enlace amida.

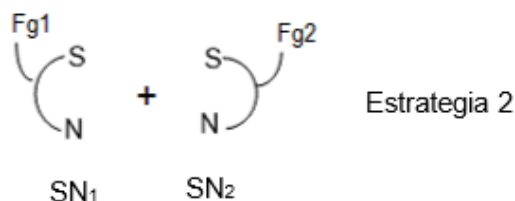


Figura 21. Estrategia retrosintética 2 para el diseño de equivalentes sintéticos

2.5.6.1. Química de los grupos tioles junto con los aminos

Uno de los aspectos claves que deben ser considerados en la etapa sintética de este tipo de ligandos bidentados, son las características químicas inherentes a cada grupo funcional (que hacen parte de una misma molécula). En este caso particular, los equivalentes sintéticos propuestos presentan tanto grupos tioles como aminos.

Se sabe que en condiciones neutras, una amina es mejor nucleófilo que un tiol (Camps García, Vázquez Cruz, & Escolano Mirón, 2009); sin embargo, esta reactividad puede invertirse tanto en medio ácido, por protonación de la amina, como en medio básico, por desprotonación del grupo tiol (Ege, 2004). De esta manera, la escogencia del solvente de reacción y el pH del medio, podrán determinar fuertemente que grupo funcional estará de cierta manera involucrado en reacciones adversas durante la etapa de síntesis.

También deben considerarse las posibles reacciones entre los grupos funcionales principales de la molécula, en este caso conocidas como *coupling reaction* (Kolodych, y otros, 2015). Las investigaciones han sido exhaustivas para determinar

cómo se llevan a cabo las reacciones entre los grupos tioles y las aminas por su aplicabilidad en la síntesis y diseño de péptidos (Hata & Kinumaki, 2016). De hecho, se cree que el poder entender las complejas interacciones entre estos grupos funcionales podría permitir que un diseño proteínico donde la superficie del péptido tuviese características distintivas y por tanto pudiese cumplir funciones de interés medicinal (Enzo, 2011).

Investigadores en la Universidad de Texas, han desarrollado un mecanismo secuencial de dos pasos para la reacción de acoplamiento entre un grupo amino y uno tiol via química haciendo uso de un derivado del ácido de Meldrum (Diehl, y otros, 2016). Esta reacción es reversible, pudiendo obtenerse nuevamente los reactivos de partida. Se busca que a partir de este tipo de investigaciones sean posibles procedimientos como la modificación proteica (Moses & Moorhouse, 2007), librerías multicomponentes (Baskin, y otros, 2007) y síntesis de oligómeros (Gandini, 2013), que podrían (vía química) regresar a sus componentes iniciales.

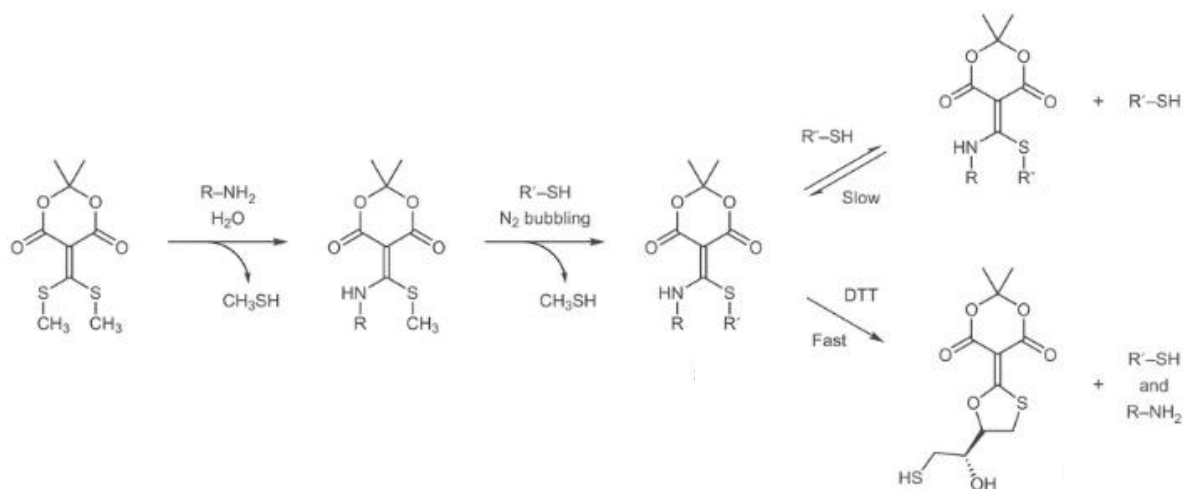


Figura 22. *Coupling-reaction* entre un grupo amino y un tiol

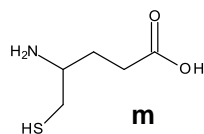
Teniendo en cuenta los aspectos relacionados con la reactividad (por separado y conjunta) entre los grupos amino y los tioles, es necesario tener sumo cuidado en la etapa sintética de este tipo de equivalente sintético, generando planes sintéticos adecuados donde se protejan selectivamente los grupos funcionales y de esta manera las reacciones de síntesis se puedan dirigir hacia la parte de la molécula deseada.

2.5.6.2. Fragmentos retrosintéticos SN_1 y SN_2

Al igual que con los equivalentes sintéticos propuestos en la Estrategia 1, en esta etapa de la investigación se hizo uso de la base de datos de *Reaxys*, para determinar si existían rutas sintéticas de los fragmentos propuestos así como si

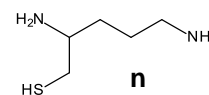
estaban disponibles comercialmente. Se enlistan a continuación las estructuras de mayor interés para el presente proyecto.

Fragmentos retrosintéticos SN alifáticos



100%*

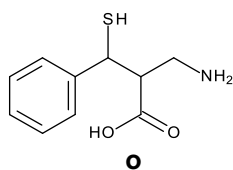
Bergeron, y otros, 1999



PubChem Compound
ID: 449406

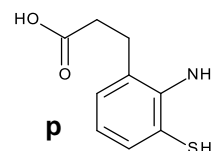
NIH-National Center of
Biotechnology
Information, 2005

Fragmentos retrosintéticos SN aromáticos



68%*

Matsubara, Yoneda, Harusawa, &
Kurihara, 1988



89%*

Nealey & Driscoll, 1967

Figura 23. Fragmentos retrosintéticos SN propuestos, se presentan los porcentajes de rendimiento (*) de la reacción reportado por la fuente bibliográfica

El equivalente sintético **m** tiene características estructurales que lo hacen ser un candidato a tener en cuenta para el planteamiento de rutas sintéticas por medio de este tipo de estrategias, puesto que presenta una cadena flexible que tiene un grupo carboxílico terminal por medio del cual podría llevarse a cabo la reacción de acoplamiento de los fragmentos. Además, el porcentaje de rendimiento de la reacción reportado por la fuente bibliográfica lo hace un constructo a tener en cuenta para etapas de síntesis de proyectos a futuro.

El ligando alifático tipo SN **n** podría ser un excelente candidato para plantearse una ruta sintética en la cual este sea el equivalente sintético de partida. Esto debido a que posee en su estructura una cadena flexible en el extremo amino, lo que le

permitiría acoplarse con un ligando cuya cadena *N*-terminal no tuviese necesariamente esas características de flexibilidad.

Para los fragmentos SN aromáticos debe tenerse en cuenta que pueden conducir a diferencias en el potencial redox del complejo, ya que la hibridación sp^3 y sp^2 del carbono tiene geometrías moleculares y distancias de enlace diferentes (Green, Brothers, Darensborug, & Rockcliffe, 2009) a las que se presentan en la enzima NiSOD. Se ha asumido que los efectos en la tensión del anillo sobre el potencial son relativamente pequeños conduciendo a un leve aumento en el mismo (Benjumea Ballesteros, 2013).

El equivalente sintético **o** tiene una desventaja estructural al no poseer una cadena flexible unida al extremo carboxílico (por donde se llevaría a cabo la reacción de unión de los fragmentos), por lo que obliga a que en una etapa de síntesis (e incluso para ser partícipe de una ruta sintética teórica) deba reaccionar con un ligando SN que posea una cadena flexible en su extremo amino.

Para el fragmento retrosintético **p**, se conoce su ruta de obtención y además presenta un porcentaje de rendimiento favorable, esto representa una ventaja para una investigación experimental del presente proyecto. El equivalente sintético también se caracteriza porque posee una cadena medianamente flexible en su extremo carboxílico, lo que le permitiría llevar a cabo las reacciones necesarias para la obtención del macrociclo orgánico sin mayores inconvenientes (por lo menos en la parte teórica).

Los complejos simétricos, como los esperados con esta estrategia, con dos grupos amino y dos grupos tiolato en posición *cis*, exhiben una estabilidad relativa en presencia de aire (Kaasjager, y otros, 2002), mientras que los compuestos simétricos análogos con dos grupos amida (en lugar de amino) resultan todavía bastante inestables y significativamente más sensibles al aire (Kruger, Peng, & Holm, 1991) por lo que no fueron contemplados como ligandos posibles en la Estrategia 2.

Debido a las limitaciones de tiempo y los alcances del presente trabajo, se plantean los anteriores equivalentes sintéticos como posibles ligandos orgánicos de níquel y se recomienda tenerlos en cuenta en estudios teóricos y experimentales futuros dentro de esta línea de investigación.

2.6. CONCLUSIONES

Se logró el desarrollo de un total de cinco rutas sintéticas, por medio de las cuales es posible obtener, de manera teórica, una serie de ligandos que cumplen con las exigencias estructurales y electrónicas de la esfera de coordinación del ion níquel en el sitio activo de la superóxido dismutasa de níquel (NiSOD).

Para esto, se determinaron un número significativo de equivalentes sintéticos cuyas estructuras fueron diseñadas para cumplir las exigencias planteadas en la literatura sobre los ligandos de la enzima en estudio. Además, se analizaron cada una de las estructuras y rutas propuestas con respecto a su potencial en la generación de biomiméticos de la enzima NiSOD.

2.7. RECOMENDACIONES

A lo largo de este proyecto se plantearon numerosas recomendaciones para tenerse en cuenta en proyectos futuros de este campo de investigación, un sumario general es:

- Para el diseño de los ligandos orgánicos se recomienda tener en cuenta la presencia de un quinto ligando lábil en posición axial. En este proyecto los ligandos propuestos cumplen con los demás requisitos electrónicos y estructurales de la NiSOD listados en la página 22.
- Una estrategia diferente para abordar la reacción de acoplamiento entre los fragmentos de partida (equivalentes sintéticos) es la reacción de metátesis y debido a las ventajas mencionadas a lo largo del presente proyecto, se recomienda altamente su uso para la proposición de rutas sintéticas.
- Tomar como punto de partida en proyectos de investigación futuros los fragmentos retrosintéticos propuestos en la Estrategia 2.
- Tener en cuenta las rutas sintéticas propuestas en el desarrollo del presente proyecto para ser estudiadas experimentalmente en investigaciones futuras.

3. ANEXOS

3.1. ANEXO 1

Tabla 1. Matriz de marco lógico.

OBJETIVO GENERAL			
Proponer y desarrollar rutas sintéticas para la obtención de ligandos orgánicos que cumplan con las exigencias estructurales y electrónicas de la esfera de coordinación del ion níquel en el sitio activo de la superóxido dismutasa de níquel (NiSOD).			
OBJETIVO ESPECÍFICO	ACTIVIDADES	INDICADOR	SUPUESTO
Proponer rutas sintéticas, con base en la literatura, para la generación de diferentes clases de ligandos orgánicos que cumplan las exigencias estructurales y electrónicas presentes en el centro de coordinación del níquel en la enzima.	<ul style="list-style-type: none">• Investigar en la literatura primaria la estructura de los ligandos presentes en el centro de coordinación del níquel en la enzima.• Analizar la estructura 3D de la enzima haciendo uso de bases de datos y bioinformática.• Elaborar una retrosíntesis para determinar cuál(es) podría ser los fragmentos de partida.• Investigar en la base de datos <i>Reaxys</i> si existen rutas sintéticas establecidas para los fragmentos escogidos.• Llevar a cabo una investigación sobre las posibles rutas de acoplamiento de los fragmentos para la obtención del ligando.	Determinación de diferentes rutas sintéticas que cumplan las exigencias de la literatura.	Acceso a la base de datos <i>Reaxys</i>

OBJETIVO ESPECÍFICO	ACTIVIDADES	INDICADOR	SUPUESTO
<p>Analizar las rutas sintéticas propuestas en términos de a) posibles modificaciones adicionales y b) su potencial en la generación de biomiméticos de la enzima NiSOD, y así establecer la ruta sintética más factible (cuestión de costo, tiempo y equipos)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Establecer un mecanismo de reacción para la retrosíntesis escogida (para cada ligando) • Determinar las posibles modificaciones sintéticas adicionales al mecanismo • Determinar si alguna de las rutas propuestas puede cumplir con las características de un biomimético de NiSOD. • Para las rutas con potencial de biomimético, determinar si es posible la compra de reactivos y la disponibilidad de equipos. 	<p>Análisis de cada ruta sintética y determinación de su potencial respecto a la introducción de modificaciones.</p>	<p>Desarrollo de rutas sintéticas iniciales</p>

Anexo 2

3.2. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Primera esfera de coordinación en los centros activos de las SODs	11
Figura 2. Estructura del gancho de níquel, vista del centro activo de la enzima superóxido dismutasa y los nueve aminoácidos necesarios para su función catalítica	14

Figura 3. Mecanismo propuesto para el modo de acción de la NiSOD. Se observan los cambios estructurales y en el número de oxidación del níquel durante el proceso de catálisis enzimática	15
Figura 2. Estructura química del centro activo de la NiSOD	18
Figura 5. Ilustración general del proceso de retrosíntesis. Donde se parte de una molécula compleja que es fragmentada en diferentes sintones (denotados como S_n); se repite el proceso hasta que se llega a precursores simples o disponibles comercialmente. <i>Adaptado de Divakaran, 2008</i>	21
Figura 6. Motivo estructural general de la estructura química del centro activo de la NiSOD	23
Figura 7. Estrategias generales de diseño de fragmentos usando la técnica de retrosíntesis	23
Figura 8. Posible macrociclo simétrico formado al hacer uso de la Estrategia 2	24
Figura 9. Estrategia 1 para el diseño de fragmentos. Donde Fg_1 y Fg_2 son los grupos funcionales reactivos (amina o ácido carboxílico) para la generación de un enlace amida entre los fragmentos	27
Figura 10. Fragmentos SS propuestos, se presentan los porcentajes de rendimiento (*) de la reacción reportado por la fuente bibliográfica	30
Figura 11. Grupos protectores de la función tiol	32
Figura 12. Oxidación progresiva de una amina primaria, pasando por una hidroxilamina, seguido de un compuesto nitroso y finalmente a un compuesto nitro	35
Figura 13. Fragmentos NN propuestos, se presentan los porcentajes de rendimiento (*) de la reacción reportados por la fuente bibliográfica	36
Figura 14. Estructuras de grupos protectores para el grupo funcional amino	39
Figura 15. Ligandos orgánicos diseñados para la obtención de biomiméticas de la NiSOD	39

Figura 16. Ruta sintética 1 para la Estrategia 1	42
Figura 17. Ruta sintética 2 para la Estrategia 1	43
Figura 18. Ruta sintética 3 para la Estrategia 1	44
Figura 19. Ruta sintética 4 para la Estrategia 1	46
Figura 20. Ruta sintética 5 para la Estrategia 1	47
Figura 21. Estrategia retrosintética 2 para el diseño de fragmentos	49
Figura 22. <i>Coupling-reaction</i> entre un grupo amino y un tiol	50
Figura 23. Fragmentos SN propuestos, se presentan los porcentajes de rendimiento (*) de la reacción reportado por la fuente bibliográfica	51

4. BIBLIOGRAFÍA

- Akabori, S., Sakakibara, S., Shimonishi, Y., & Y.A., N. (1964). A New Method For The Protection Of The Sulfhydryl Group During Peptide Synthesis. *Bulletin Of The Chemical Society Of Japan*, 433-434.
- Albores Velasco, M., Caballero Arroyo, Y., Gonzáles Quezada, Y., & Pozas Horcasitas, R. (2006). *Grupos Funcionales: Nomenclatura Y Reacciones Principales*. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma De México.
- Allinger, N., Cava, M., De Jongh, D., Johnson, C., Lebel, N., & Stevens, C. (2000). *Organic Chemistry*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Altman, J., Shoef, N., Wilchek, M., & Warshawsky, A. (1984). The Furan/Maleimide Diels–Alder Reaction: A Versatile Click–Unclick Tool In Macromolecular Synthesis. *Journal Of The Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic And Bio-Organic Chemistry*, 59-62.
- Andreu, D., & Rivas, L. (1997). *Péptidos En Biología Y Biomedicina*. Madrid: Consejo Superior De Investigaciones Científicas.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, And Signal Transduction. *Plant Biology*, 373-399.
- Augusto, O., & Miyamoto, S. (2011). Oxygen Radicals And Related Species. En *Principles Of Free Radical Biomedicine*. . Sao Paulo: Nova Science Publishers, Inc. .
- Baidya, N., Olmstead, M., Whitehead, J., Bagyinka, C., Maroney, M., & Mascharak, P. (1992). X-Ray Absorption Spectra Of Nickel Complexes With N3S2 Chromophores And Spectroscopic Studies On Hydride And Carbon Monoxide Binding At These Nickel Centers: Relevance To The Reactivity Of The Nickel Site(S) In [Feni] Hydrogenases. *Inorganic Chemistry*, 3612-3619.
- Balanta, D. (08 De 10 De 2016). *Ácidos Y Derivados De Ácidos Carboxílicos*. Obtenido De Universidad Del Valle: https://campusvirtual.univalle.edu.co/moodle/pluginfile.php/1092250/mod_folder/content/0/Taller%202020Quimica%20Organica%20II%20Ago%20Dic%202016%20-%20acidoderivados.pdf?forcedownload=1
- Barondeau, D., & Getzoff, E. (2005). Structural Insights Into Protein-Metal Ion Partnerships. *Current Opinion In Structural Biology*, 765-774.

- Barondeau, D., Kassmann, C. J., Bruns, C. K., Tainer, J. A., & Getzoff, E. D. (2004). Nickel Superoxide Dismutase Structure And Mechanism. *Biochemistry*, 8038-8047.
- Bar-Or, D., & Bar-Or, R. (2015). Oxidative Stress In Severe Acute Illness. *Redox Biology*, 340-345.
- Baskin, J., Prescher, J., Laughlin, S., Agard, N., Chang, P., Miller, I., . . . Bertozzi, C. (2007). Copper-Free Click Chemistry For Dynamic In Vivo Imaging. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 16793-16797.
- Batinić-Haberle, I., Rebouças, J., & Spasojević, I. (2010). Superoxide Dismutase Mimics: Chemistry, Pharmacology, And Therapeutic Potential. *Antioxidants & Redox Signaling*, 877-918.
- Battistoni, A. (2003). Role Of Prokaryotic Cu,Zn Superoxide Dismutase In Pathogenesis. *Biochemical Society Transaction*, 12326-1329.
- Benjumea Ballesteros, C. H. (2013). *El Efecto De La Esfera De Coordinación En El Potencial Redox De Biomiméticas De La Superóxido Dismutasa De Níquel*. Universidad De Los Andes, Bogotá.
- Bergeron, R. J., Wiegand, J., Weimar, W. R., Vinson, J. R., Bussenius, J., Yao, G. W., & Mcmanis, J. S. (1999). Desazadesmethyldesferrithiocin Analogues As Orally Effective Iron Chelators. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 95-108.
- Bertini, I., Banci, L., & Piccioli, M. (1990). Spectroscopic Studies On Cu₂Zn₂SOD - A Continuous Advancement Of Investigation Tools. *Coordination Chemistry Reviews*, 67-103.
- Beyer, H., & Walter, W. (1987). *Manual De Química Orgánica - Leherbuch Der Organischen Chemie 19 Auflage*. Barcelona: Reverté.
- Bian, H.-D., Wang, J., Wei, Y., Tang, J., Huang, F.-P., Yao, D., . . . Liang, H. (2015). Superoxide Dismutase Activity Studies Of Mn(II)/Cu(II)/Ni(II) Complexes With Schiff Base Ligands. *Elsevier*, 147-153.
- Bodanszky, M. (2003). *Principles Of Peptide Synthesis*. New York: Springer.
- Boyd, R. N., & Morrison, R. T. (1990). *Organic Chemistry, Fifth Edition*. Delaware: Fondo Educativo Interamericano.
- Braña, M., Cacho, M., & Guisado, C. (2006). Sulfonamida: El Grupo Mágico. *Anales De La Real Academia Nacional De Farmacia*, 317-341.

- Broering, E., Truong, P., Gale, E., & Harrop, T. (2012). Synthetic Analogues Of Nickel Superoxide Dismutase: A New Role For Nickel In Biology. *Biochemistry ACS*, 4-18.
- Brown, T., Lemay, E., Bursten, B., & Murphy, C. (2009). *Química La Ciencia Central*. México, D.C.: Pearson Education.
- Bruckner, R. (2002). *Advanced Organic Chemistry: Reaction Mechanisms*. San Diego: Harcourt Academic Press.
- Bruno- Bárcena, J., Azcárate-Peril, A., & Hassan, H. (2010). Role Of Antioxidant Enzymes In Bacterial Resistance To Organic Acid. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, 76, 2747-2753.
- Bryngelson, P. A., Arobo, S. E., Pinkham, J. L., Cabelli, D. E., & Maroney, M. J. (2004). Expression, Reconstitution, And Mutation Of Recombinant Streptomyces Coelicolor Nisod. *Journal Of American Chemistry Society*, 460-461.
- Bryngelson, P., Arobo, S., Pikham, J., Cabelli, D., & Maroney, M. (2004). Expression, Reconstitution, And Mutation Of Recombinant Streptomyces Coelicolor Nisod. *Journal Of The American Chemical Society*, 460-461.
- Bryngelson, P., Arobo, S., Pinkham, J., Cabelli, D., & Maroney, M. (2004). Expression, Reconstitution, And Mutation Of Recombinant Streptomyces Coelicolor Nisod. *Journal Of The American Chemical Society*, 460-461.
- Campos García, P., Vázquez Cruz, S., & Escolano Miron, C. (2009). *Química Farmaceutica I, Tomo I*. Barcelona: Edicions De La Universitat De Barcelona.
- Camps García, P., Vázquez Cruz, S., & Escolano Mirón, C. (2009). *Química Farmaceutica I. Tomo II - Síntesis De Fármacos*. Barcelona: Publicacions I Edicions De La Universitat De Barcelona.
- Carbonell, P., Planson, A.-G., & Faulon, J.-L. (2013). Retrosynthetic Design Of Heterologous Pathways. *Methods In Molecular Biology*, 149-173.
- Carey, F., & Sundberg, R. (2007). *Advanced Organic Chemistry: Reaction And Synthesis*. New York: Springer.
- Chauvin, Y. (2005). OLEFIN METATHESIS: THE EARLY DAYS. *Nobel Lecture*, 180-187.
- Cho, J., Van Heuvelen, K., Yap, G., Brunold, T., & Riordan, C. (2008). New Synthetic Routes To A Disulfidodinickel(II) Complex: Characterization And Reactivity Of A Ni₂(μ-H₂:H₂-S₂) Core. *Inorganic Chemistry*, 3931-3933.

- Chohan, B., & Maroney, M. (2006). Selective Oxidations Of A Dithiolate Complex Produce A Mixed Sulfonate/Thiolate Complex. *Inorganic Chemistry*, 9637-9639.
- Corey, E. J. (08 De Diciembre De 1990). *Nobel Prizes And Laureates*. Obtenido De Nobel Prize: https://www.nobelprize.org/Nobel_Prizes/Chemistry/Laureates/1990/Corey-Lecture.html
- Cotton, A., & Wilkinson, G. (1996). *Basic Inorganic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Cotton, A., & Wilkinson, G. (2005). *Advanced Inorganic Chemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Dang, T., Sobczak, A., Mebel, A., Chatgililoglu, C., & Wnuk, S. (2012). Investigation Of Reactions Postulated To Occur During Inhibition Of Ribonucleotide Reductase By 2'-Azido-2'-Deoxynucleotides. *Tetrahedron*, 5655-5667.
- Darnault, C., Volbeda, A., Jin Kim, E., Legrand, P., Vernede, X., Lindahl, P., & Fontecilla-Camps, J. (2003). Ni-Zn-[Fe₄-S₄] And Ni-Ni-[Fe₄-S₄] Clusters In Closed And Open Alpha Subunits Of Acetyl-Coa Synthase/Carbon Monoxide Dehydrogenase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 271-279.
- Desideri, A., & Falconi, M. (2003). Cu,Zn Superoxide Dismutase. *Biochemical Society Transactions*, 1322-1325.
- Dhar, S., Nethajia, M., & Chakravarty, A. (2004). Synthetic Analogue Approach For The Functional Domains Of Copper(II) Bleomycins And Its DNA Cleavage Activity. *Dalton Transactions*, 4180-484.
- Díaz López, C. (2012). *Hacia La Síntesis De Compuestos Biomiméticos Funcionales De La Níquel Superóxido Dismutasa*. Bogotá: Universidad De Los Andes. Recuperado El 24 De 04 De 2016
- Díaz López, C. A. (2012). *Hacia La Síntesis De Compuestos Biomiméticos Funcionales De La Níquel Superóxido Dismutasa*. Bogotá: Universidad De Los Andes.
- Diehl, K., Kolesnichenko, I., Robotham, S., Bachman, L., Zhong, Y., Brodbelt, J., & Anslyn, E. (2016). Click And Chemically Triggered Declick Reactions Through Reversible Amine And Thiol Coupling Via Conjugate Acceptor. *Nature Chemistry*, 968-973.

- Divakaran, R. (2008). *Retrosynthetic Analysis*. Obtenido De RD's Science Pages: [Http://Science-Blogs.Ucoz.Com/Resources/Notes/Msc/Theory/Retrosynth.Pdf](http://Science-Blogs.Ucoz.Com/Resources/Notes/Msc/Theory/Retrosynth.Pdf)
- Divakaran, R. (2007). *Protecting Groups In Organic Synthesis*. Obtenido De [Http://Science-Blogs.Ucoz.Com/Resources/Notes/Msc/Theory/Protectgroups.Pdf](http://Science-Blogs.Ucoz.Com/Resources/Notes/Msc/Theory/Protectgroups.Pdf)
- Doukov, T., Iverson, T., Seravalli, J., Ragsdale, S., & Drennan, C. (2002). A Ni-Fe-Cu Center In A Bifunctional Carbon Monoxide Dehydrogenase/Acetyl-Coa Synthase. *Science*, 567-572.
- Ege, S. (2004). *Organic Chemistry, Structure And Reactivity*. Lexinton: D.C. Heath And Company.
- Ekstrand, J. (1980). *Journal Fuer Praktische Chemie (Leipzig)*, 293.
- Elsevier. (2008). *Reaxys*. Obtenido De [Http://Www.Americalatina.Elsevier.Com/Sul/Es/Reaxys.Php?E=S&I=Es](http://Www.Americalatina.Elsevier.Com/Sul/Es/Reaxys.Php?E=S&I=Es)
- Enzo, A. (2011). *Bioinorganic Medicinal Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH.
- Erickson, B., & Merrifield, R. (1973). Acid Stability Of Several Benzylic Protecting Groups Used In Solid-Phase Peptide Synthesis. Rearrangement Of O-Benzyltyrosine To 3-Benzyltyrosine. *Journal Of The American Chemical Society*, 3750-3756.
- Fackler, J., & Falvello, L. (2011). *Techniques In Inorganic Chemistry*. Boca Raton: Taylor & Francis Group.
- Falkowski, P. (2006). Evolution: Tracing Oxygen's Imprint On Earth's Metabolic Evolution. *Science*, 1724-1725.
- Falque, V., & Montalbetti, C. (2008). Synthetic Chemistry: Formation Of The Amide Bond. *Wiley Encyclopedia Of Chemical Biology*, 1-17.
- Feichtinger, K., Zapf, C., Sings, H., & Goodman, M. (1998). Diprotected Triflylguanidines: A New Class Of Guanidinylation Reagents. *Journal Of Organic Chemistry*, 3804-3805.
- Finkel, T. (2003). Oxidant Signals And Oxidative Stress. *Current Opinion In Cell Biology*, 247-254.
- Fogorasi, E., Croitoru Mircea, D., Fulop, I., & Muntean, D. L. (2016). Is The Oxidative Stress Really A Disease? *Acta Medica Marisiensis* , 112-120.

- Foundation, W. A. (2005). *USA Patente N° WO2005/14524 A2*.
- Freifelder, D. (2003). *Physical Biochemistry Applications To Biochemistry And Molecular Biology*. San Francisco: Freeman And Company.
- Fridovich, I. (1972). Superoxide Radical And Superoxide Dismutase. *Accounts Of Chemical Research*, 321-326.
- Fuchs, P. (2011). *Handbook Or Reagents For Organic Synthesis*. Great Britain: John Wiley & Sons, Ltd.
- Gale, E. M. (2012). *COORDINATION CHEMISTRY INSPIRED BY NICKEL SUPEROXIDE DISMUTASE: UNDERSTANDING NICKEL AND SULFUR IN THE CONTEXT OF ANTI-OXIDANT DEFENSE*. Athens: University Of Georgia.
- Gale, E. M., Patra, A. K., & Harrop, T. (2009). Versatile Methodology Toward Ni²⁺ Complexes As Nickel Superoxide Dismutase Models: Structure And Proton Affinity. *Inorganic Chemistry*, 5620-5622.
- Gale, E., Cowart, D., Scott, R., & Harrop, T. (2011). *Inorganic Chemistry ACS*, 10460-10471.
- Gale, E., Narendrapurapu, B., Simmonett, A., Schaefer III, H., & Harrop, T. (2010). Exploring The Effects Of H-Bonding In Synthetic Analogues Of Nickel Superoxide Dismutase (Ni-SOD): Experimental And Theoretical Implications For Protection Of The Ni-Scys Bond. *Inorganic Chemistry*, 7080-7096.
- Gale, E., Simmonett, A., Telser, J., Schaefer, H., & Harrop, T. (2011). Toward Functional Ni-SOD Biomimetics: Achieving A Structural/Electronic Correlation With Redox Dynamics. *Inorganic Chemistry*, 9216-9218.
- Gandini, A. (2013). The Furan/Maleimide Diels–Alder Reaction: A Versatile Click–Unclick Tool In Macromolecular Synthesis. *Progress In Polymer Science*, 1-29.
- Gans, P., Gill, B., & Johnson, L. (1998). Spectrochemistry Of Solutions. Part 25. Cyano-Complexation Of Nickel(II), Palladium(II) And Platinum(II) In Liquid Ammonia. *Journal Of The Chemical Society, Dalton Transactions*, 345-349.
- Gilbert, J., & Martin, S. (2006). *Experimental Organic Chemistry: A Minisccale And Microscale Approach*. Belmont: Thomson Brooks.
- Gillespie, R. (1990). *Chemistry*. Madrid: Editorial Reverté.

- Glass, A., Krause, M., Laurence, J., & Jackson, T. (2012). Controlling The Chiral Inversion Reaction Of The Metallopeptide Ni-Asparagine-Cysteine-Cysteine With Dioxygen. *Inorganic Chemistry*, 10055-10063.
- Graham, S., & Fryhle, C. (2008). *Organic Chemistry*, . New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- Grant, G. (2002). *Synthetic Peptides: A User's Guide*. Oxford: Oxford University Press.
- Grapperhaus, C., & Darensbourg, M. (1998). Oxygen Capture By Sulfur In Nickel Thiolates. *Accounts Of Chemical Reviews*, 451-459.
- Grapperhaus, C., Mullins, C., Kozlowski, P., & Mashuta, M. (2004). Synthesis And Oxygenation Of A Nickel(II) And Zinc (II) Dithiolate: An Experimental And Theoretical Comparison. *Inorganic Chemistry*, 2859-2866.
- Gray, H., & Haight, G. (2003). *Basic Principles Of Chemistry*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Green, K. N., Brothers, S. M., Darensborug, M. Y., & Rockcliffe, D. A. (2009). Chemical Issues Addressing The Construction Of The Distal Ni- (Cysteine-Glycine-Cysteine)₂- Site Of Acetyl Coa Synthase: Why Not Copper? *Inorganic Chemistry*, 2780-2792.
- Grubbs, R., & Chang, S. (1998). Recent Advances In Olefin Metathesis And Its Application In Organic Chemistry. *Tetrahedron*, 4413-4450.
- Guerra, E. (2011). Estrés Oxidativo, Enfermedades Y Tratamientos Antioxidantes. *Anales De Medicina Interna*, 326-335.
- Gupta, B., & Elias, A. (2010). *Basic Organometallic Chemistry*. New York: Universities Press (India) Private Limited 2010.
- Gutowski , M., & Kowalczyk, S. (2013). A Study Of Free Radical Chemistry: Their Role And Pathophysiological Significance. *Acta ABP Biochimica Polonica*, 1-16.
- Gutshe, C. D., & Pasto, D. J. (1979). *Fundamentals Of Organic Chemistry*. New Jersey: Reverté.
- Halliwell , B., & Gutteridge, J. (2007). *Free Radicals In Biology And Medicine*. Oxford: Oxford University Press.
- Hata, T., & Kinumaki, S. (2016). Reactions Of Ammonia And Aliphatic Amines With Sulphur Dioxide. *Nature*, 1378-1379.

- Henderson, R. K., Bouwman, E., Spek, A. L., & Reedijk, J. (1997). A Unique Mononuclear Nickel Disulfonato Complex Obtained By Oxidation Of A Mononuclear Nickel Dithiolate Complex. *Inorganic Chemistry*, 4616-4617.
- Herbst, R., Guce, A., Bryngelson, P., Higgins, K., Ryan, K., Cabelli, D., . . . Maroney, M. (2009). The Role Of Conserved Tyrosine Residues In Nisod Catalysis: A Case Of Convergent Evolution. *Biochemistry*, 3354-3369.
- Herisson, J. L., & Chauvin, Y. (1970). Olefin Conversions. *Makromolekulare Chemie*, 141-160.
- Hiskey, R. G. (2000). Sulfhydryl Group Protection In Peptide Synthesis. En E. Gross, & J. Meienhofer, *The Peptides - Analysis, Synthesis, Biology* (Págs. 137-167). New York: Academic Press.
- Hiwatari, K., Kayaki, Y., Okita, K., Ukai, T., Shimizu, I., & Yamamoto, A. (2004). Selective Oxidative Carbonylation Of Amines To Oxamides And Ureas Catalyzed By Palladium Complexes. *Bulletin Of The Chemical Society Of Japan*, 2237-2250.
- Hopkin, Karen, Papazian, Madeleine, & Howa, S. (1992). Functional Differences Between Manganese And Iron Superoxide Dismutases In Escherichia Coli K-Lz. *The Journal Of Biological Chemistry*, 24253-24258.
- House, J. (2008). *Inorganic Chemistry*. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press.
- Hoveyda, A., & Zhugralin, A. (2007). The Remarkable Metal-Catalysed Olefin Metathesis Reaction. *Nature*, 243-251.
- Huh, D., Gibbons, J., Haywood, R., Moore, C., Rheingold, A., Ferguson, M., & Daley, C. (2014). Metal-Amidato Complexes: Synthesis, Characterization And Reactivity Of A Diamidato-Bis(Phosphine) Nickel (II) Complex. *Inorganica Chimica Acta*, 290-297.
- Huheey, J., Keiter, E., & Keiter, R. (2007). *Inorganic Chemistry: Principles Of Structure And Reactivity*. México: Alfaomega Grupo Editor.
- Jaramillo, L. M. (2002). *Química Orgánica General*. Obtenido De Universidad Del Valle:
[Http://Objetos.Univalle.Edu.Co/Files/Acidos_Carboxilicos_Y_Sus_Derivados.Pdf](http://Objetos.Univalle.Edu.Co/Files/Acidos_Carboxilicos_Y_Sus_Derivados.Pdf)
- Jarowicki, K., & Kocienski, P. (1999). Protecting Groups. *Journal Of The Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1589-1616.

- Joullié, M. M., & Lassen, K. M. (2010). Evolution Of Amide Bond Formation . *Arkivoc*, 189-250.
- Kaasjager, V., Bouwman, E., Gorter, S., Reedijk, J., Grapperhaus, C., Reibenspies, J., . . . T. L. (2002). Unique Reactivity Of A Tetradentate N(2)S(2) Complex Of Nickel: Intermediates In The Production Of Sulfur Oxygenates. *Inorganic Chemistry*, 1837-1844.
- Kanth, B., Oh, T., & Sohng, J. (2010). Identification Of Two Superoxide Dismutases (Fesod And Nisod) From *Streptomyces Peucetius* ATCC 27952. *Biotechnology And Bioprocess Engineering*, 785-792.
- Katz, T., & Mcginnis, J. (1975). Mechanism Of The Olefin Metathesis. *Journal Of The American Chemical Society*, 1592-1594.
- Katz, T., & Rothchild, R. (1976). Mechanism Of The Olefin Metathesis Of 2,2'-Divinylbiphenyl. *Journal Of The American Chemical Society*, 2519-2526.
- Kensler, T., Bush, D., & Kozumbo, W. (1983). Inhibition Of Tumor Promotion By A Biomimetic Superoxide Dismutase. *Science*, 75-77.
- Kim, E.-J., Chung, H.-J., Suh, B., Hah, Y., & Roe, J.-H. (1998). Transcriptional And Post-Transcriptional Regulation By Nickel Of Sodn Gene Encoding Nickel-Containing Superoxide Dismutase From *Streptomyces Coelicolor* Muller. *Molecular Microbiology*, 187-195.
- Klug-Roth, D., Fridovich, I., & Rabani, J. (1973). Pulse Radiolytic Investigations Of Superoxide Catalyzed Disproportionation. Mechanism For Bovine Superoxide Dismutase. *Journal Of The American Chemical Society*, 2786-2790.
- Kolodych, S., Koniev, O., Baatarkhuu, Z., Bonnefoy, J.-Y., Debaene, F., Cianférani, S., . . . Wagner, A. (2015). CBTF: New Amine-To-Thiol Coupling Reagent For Preparation Of Antibody Conjugates With Increased Plasma Stability. *Bioconjugate Chemistry*, 197-200.
- Kovacs, J. (2004). Synthetic Analogues Of Cysteinate-Ligated Non-Heme Iron And Non-Corrinoid Cobalt Enzymes. *Chemical Reviews*, 825-848.
- Kruger, H., Peng, G., & Holm, R. (1991). Low-Potential Nickel(III,II) Complexes: New Systems Based On Tetradentate Amidate-Thiolate Ligands And The Influence Of Ligand Structure On Potentials In Relation To The Nickel Site In [Nife]-Hydrogenases. *Inorganic Chemistry*, 734-742.
- Kulkarni, A., & Diver, S. (2003). Cycloheptadiene Ring Synthesis By Tandem Intermolecular Enyne Metathesis. *Organic Letters*, 3463-3466.

- Kunishita, A., Doi, Y., Kubo, M., Ogura, T., Sugimoto, H., & Itoh, S. (2009). Ni(II)/H₂O₂ Reactivity In Bis[(Pyridin-2-Yl)Methyl]Amine Tridentate Ligand System. Aromatic Hydroxylation Reaction By Bis(Mu-Oxo)Dinickel(III) Complex. *Inorganic Chemistry*, 4997-5004.
- Lamoureux, G., & Agüero, C. (2009). A Comparison Of Several Modern Alkylating Agents. *ARKIVOC*, 251-264.
- Landis, G., & Tower, J. (2005). Superoxide Dismutase Evolution And Life Span Regulation. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 365-379.
- Lanigan, R., Starkov, P., & Sheppard, T. (2013). Direct Synthesis Of Amides From Carboxylic Acids And Amines Using B(OCH₂CF₃)₃. *The Journal Of Organic Chemistry*, 4512-4523.
- Lawrence, G., & Sawyer, D. (1979). Potentiometric Titrations And Oxidation-Reduction Potentials Of Manganese And Copper-Zinc Superoxide Dismutases. *Biochemistry*, 3045-3050.
- Lewis, E., Smith, L., Walton, P., Archibald, S., Foxon, S., & Giblin, G. (S.F.). Turning The Metal-Based Redox Potentials Of Manganese Cis,Cis-1,3,5-Triaminocyclohexane Complexes.
- Lippard, S., & Grubbs, R. (2007). *The Olefin Metathesis Reaction*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Livingston, Doherty, & Zeldes. (1974). Electron Spin Resonance Study Of Liquids During Photolysis. XIX. Aliphatic Dipeptides. *Journal Of The American Chemical Society*, 3198-3204.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M., . . . Darnell, J. (2004). *Molecular Cell Biology*. New York: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Lovecchio, F., Gore, E., & Busch, D. (1974). Oxidation And Reduction Behavior Of Macrocyclic Complexes Of Nickel. Electrochemical And Electron Spin Resonance Studies. *Journal Of The American Chemical Society*, 3109-3118.
- Maes, A. (2016). How Immune-Inflammatory Processes Link CNS And Psychiatric Disorders: Classification And Treatment Implications. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 3140-3147.
- Manessia, A., Papaefstathiou, G., Raptopoulou, C., Terzis, A., & Zafiropoulos, T. (2004). Synthetic Analogue Approach To Metallobleomycins: Syntheses, Structure And Properties Of Mononuclear And Tetranuclear Gallium(III)

- Complexes Of A Ligand That Resembles The Metal-Binding Site Of Bleomycin. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 2052-2062.
- Mathews, C., Van Holde, K. E., Appling, D. R., & Anthony-Cahill, S. (2013). *Biochemistry, Forth Edition*. Madrid: Pearson.
- Mathrubootham, V., Thomas, J., Staples, R., Mccracken, J., Shearer, J., & Hegg, E. L. (2010). Bisamidate And Mixed Amine/Amidate Ni_2S_2 Complexes As Models For Nickel- Containing Acetyl Coenzyme A Synthase And Superoxide Dismutase: An Experimental And Computational Study. *Inorganic Chemistry*, 5393-5406.
- Matsubara, Y., Yoneda, R., Harusawa, S., & Kurihara, T. (1988). AN ABNORMAL REACTION OF N-Tert-BUTOXYCARBONYL GROUP: MECHANISTIC CONSIDERATION FOR THE PREPARATION OF 2-OXOTETRAHYDRO-1,3-OXAZINE. *Heterocycles*, 667-672.
- Mazur, S., & Jayalekshmy, P. (1979). Chemistry Of Polymer-Bound O-Benzynes. Frequency Of Encounter Between Substituents On Cross-Linked Polystyrenes. *Journal Of The American Chemical Society*, 677-683.
- Mcadam, F., Levelle, F., Fox, R., & Fielden, E. M. (1977). A Pulse-Radiolysis Study Of The Manganese-Containing Superoxide Dismutase From *Bacillus Stearothermophilus*. *Biochem Journal*, 81-87.
- Mccurdy, S. (1989). The Investigation Of Fmoc-Cysteine Derivatives In Solid Phase Peptide Synthesis. *Peptide Research*, 147-152.
- Mcmurry, J., Castellion, M., & Ballantine, D. (2007). *Fundamentals Of General, Organic, And Biological Chemistry, Fifth Edition*. New Jersey: Prentice Hall.
- Mcnaught, A. (1992). *La Nomenclatura De Heterociclos*. Barcelona: Universidad De Murica.
- Miessler, G., & Tarr, D. A. (2011). *Inorganic Chemistry*. New Jersey: Pearson Prentice Hall.
- Miller, A. (2008). Redox Tuning Over Almost 1 V In A Structurally Conserved Active Site: Lessons From Fe-Containing Superoxide Dismutase. *Accounts Of Chemical Research*, 501-510.
- Miller, A.-F. (2001). Fe Superoxide Dismutase. En *Handbook Of Metalloproteins* (Págs. 668-682). Chinchester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Miller, A.-F. (2004). Superoxide Dismutases: Active Sites That. *Current Opinion In Chemical Biology*, 162-168.

- Millhauser, G. (2004). Copper Binding In The Prion Protein. *Accounts Of Chemical Research*, 79-85.
- Montalbetti, C., & Falque, V. (2005). Amide Bond Formation And Peptide Coupling. *Tetrahedron*, 10827-10852.
- Moses, J., & Moorhouse, A. (2007). The Growing Applications Of Click Chemistry. *Chemical Society Reviews*, 1249-1262.
- Muller, F., Liu, Y., Jernigan, A., Borchelt, D., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2008). Mnsod Deficiency Has A Differential Effect On Disease Progression In Two Different ALS Mutant Mouse Models. *Muscle Nerve*, 1173-1183.
- Munjal, M., Kumar, S., Sharma, S. K., & Gupta, R. (2011). Nickel And Cooper Complexes With Few Amide-Based Macrocyclic And Open-Chain Ligands. *Inorganica Chimica*, 144-154.
- Munson, M., García-Echeverría, C., Albericio, F., & Barany, G. (1992). S-2,4,6-Trimethoxybenzyl (Tmob): A Novel Cysteine Protecting Group For The N-9-Flourenylmethoxy-Carbonyl (Fmoc) Strategy Of Peptide Synthesis. *Journal Of Organic Chemistry*, 3013-3018.
- Nagahima, S., Nakasako, M., Dohmae, N., Tsujimura, M., Takio, K., Odaka, M., . . . Endo, I. (1998). Novel Non-Heme Iron Center Of Nitrile Hydratase With A Claw Setting Of Oxygen Atoms. *Nature Structural & Molecular Biology*, 347-351.
- Nakane, D., Wasada-Tsutsui, Y., Fu, Y., Hatanaka, T., Ozawa, T., & Masuda, H. (2014). A Novel Square-Planar Ni(II) Complex With An Amino-Carboxamido-Dithiolato-Type Ligand As An Active-Site Model Of Nisod. *Inorganic Chemistry*, 1-12.
- Nazario León, M. (06 De Octubre De 2005). Reacción De Metátesis. *El País*.
- Nealey, R., & Driscoll, J. (1967). 1-Substituted Phenothiazine Derivatives. *Journal Of Heterocycle Chemistry*, 587-590.
- Nevado Blázquez, C. (2008). La Reacción De Metátesis Como Herramienta Fundamental En La Síntesis Total De Productos Naturales Complejos. *An. Quím - Real Sociedad Española De Química*, 15-22.
- NIH - National Center For Biotechnology Information. (26 De Noviembre De 2016). *Pubchem Open Chemistry Database*. Obtenido De <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/82254073#section=Top>

- NIH - National Center For Biotechnology Information. (15 De Febrero De 2016). *Pubchem Open Chemistry Database*. Obtenido De <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/117358333#section=Top>
- NIH-National Center Of Biotechnology Information. (24 De 06 De 2005). *Pubchem Open Chemistry Database*. Obtenido De <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/449406>
- NIH-National Center Of Biotechnology Information. (12 De 05 De 2007). *Pubchem Open Chemistry Database*. Obtenido De <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21491509#section=Top>
- NIH-National Center Of Biotechnology Information. (05 De 12 De 2007). *Pubchem Open Chemistry Database*. Obtenido De <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/21705243#section=Top>
- NIH-National Center Of Biotechnology Information. (12 De 02 De 2015). *Pubchem: Open Chemistry Database*. Obtenido De <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/87552186#section=Top>
- Nobel Prize . (1990). *The Nobel Prize In Chemistry 1990: Elias James Corey*. Obtenido De https://www.nobelprize.org/Nobel_Prizes/Chemistry/Laureates/1990/Corey-Lecture.html
- Okamura, T.-A., Ushijima, Y., Omi, Y., & Onitsuka, K. (2013). Systematic Investigation Of Relationship Between Strength Of NH...S Hydrogen Bond And Reactivity Of Molybdoenzyme Models. *Inorganic Chemistry*, 381-394.
- Packer, L. (2002). *Methods In Enzymology: Superoxide Dismutase*. San Diego, California: Academic Press: An Elsevier Science Print.
- Palenik, B., Brahmsha, B., Larimer, F. W., Land, M., Hauser, L., Chain, P., . . . Waterbury, J. (2003). The Genome Of A Motile Marine Synechococcus. *Nature*, 1037-1042.
- Parker, L. (2002). Superoxide Dismutase. En *Methods Of Enzimology*. Elsevier Science.
- Pasto, D., & Johnson, C. (2003). *Organic Structure Determination*. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, Inc.
- Pattabiraman, V., & Bode, J. (2011). Rethinking Amide Bond Synthesis. *Nature*, 471-479.

- Pelmenschikov, V., & Siegbahn, P. (2006). Nickel Superoxide Dismutase Reaction Mechanism Studied By Hybrid Density Functional Methods. *Journal Of The American Chemical Society*, 7466-7475.
- Perry, J., Shin, D., Getzoff, E., & Tainer, J. (2010). The Structural Biochemistry Of The Superoxide Dismutases. *Biochim Biophys Acta*, 245-262.
- Peters, J., Stowell, M., Soltis, M., Finnegan, M., Johnson, M., & Rees, D. (1997). Redox-Dependent Structural Changes In The Nitrogenase P-Cluster. *Biochemistry*, 1181-1187.
- Ramos Tomillero, I., Mendive Tapia, L., Góngora Benítez, M., Nicolás, E., Tulla Puche, J., & Albericio, F. (2013). Understanding Acid Lability Of Cysteine Protecting Groups. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute - Molecules*, 5155-5162.
- Ravi Divakaran;. (2008). *Protecting Groups In Organic Synthesis*.
- Rayner-Canham, G. (2000). *Descriptive Inorganic Chemistry*. México: Pearson.
- Rose, M., & Mascharak, P. (2008). Fiat Lux: Selective Delivery Of High Flux Of Nitric Oxide (NO) To Biological Targets Using Photoactive Metal Nitrosyls. *Current Opinion In Chemical Biology*, 238-244.
- Rotilio, G., & Calabrese, L. (1974). Reduction And Inactivation Of Superoxide Dismutase By Hydrogen Peroxide. *Biochem Journal*, 43-48.
- Russo, A. (2010). Decreased Serum Cu/Zn SOD Associated With High Copper In Children With Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD). *Journal Of Central Nervous System Disease*, 1-6.
- Ryan, K. C., Johnson, O. E., Cabelli, D. E., Brunold, T. C., & Maroney, M. J. (2010). Nickel Superoxide Dismutase: Structural And Functional Roles Of Cys2 And Cys6. *Journal Of Biological Inorganic Chemistry : JBIC : A Publication Of The Society Of Biological Inorganic Chemistry*, 795-807.
- Santos, A. M., Kühn, F., Bruus-Jensen, K., Lucas, I., Romao, C., & Herdtwecka, E. (2001). Molybdenum(VI) Cis-Dioxo Complexes Bearing (Poly)Pyrazolyl-Methane And -Borate Ligands: Syntheses, Characterization And Catalytic Applications. *Journal Of The Chemical Society, Dalton Transactions*, 1332-1337.
- Sarikaya, M., Tamerler, C., Jen, A., Schulten, K., & Baneyx, F. (2003). Molecular Biomimetics: Nanotechnology Through Biology. *Nature Materials*.

- Scandalios, J. (2002). Oxidative Stress Responses - What Have Genome-Scale Studies Taught Us? *Genome Biology*, 1019-1020.
- Scandalios, J. (2002). The Rise Of ROS. *Trends In Biochemical Science*, 483–486.
- Schimann, D., Backer, T., & Enoch, F. (1996). Synthesis Of Water Soluble Fe And Ru Complexes Novel Thioether Thiolate Carboxylate Substituents. *Chemische Berichte*, 509-519.
- Schmidt, M., Zahn, S., Carella, M., Ohlenschlager, O., Gorlach, M., Kothe, E., & Weston, J. (2008). Solution Structure Of A Functional Biomimetic And Mechanistic Implications For Nickel Superoxide Dismutases. *Chembiochem*, 2135-2146.
- Schöneich, C., Pogocki, D., Hug, G., & Bobrowski, K. (2003). Free Radical Reactions Of Methionine In Peptides: Mechanisms Relevant To Beta-Amyloide Oxidation And Alzheimer's Disease. *Journal Of The American Chemical Society*, 13700-13713.
- Sharma, S., Upreti, S., & Gupta, R. (2008). Effect Of Ligand Architecture On The Structure And Properties Of Square-Planar Nickel(II) Complexes Of Amide-Based Macrocycles. *European Journal Of Inorganic Chemistry*, 2052-2063.
- Sharpe, A. (1993). *Inorganic Chemistry, Second Edition*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Shearer, J., & Long, L. (2006). A Nickel Superoxide Dismutase Maquette That Reproduces The Spectroscopic And Functional Properties Of The Metalloenzyme. *Inorganic Chemistry*, 2358-2360.
- Shearer, J., Neupane, K., & Callan, P. (2009). Metallopeptide Based Mimics With Substituted Histidines Approximate A Key Hydrogen Bonding Network In The Metalloenzyme Nickel Superoxide Dismutase. *Inorganic Chemistry*, 10560-10571.
- Shin, D. S., Doddapaneni, N., & Park, S. M. (1992). In Situ Spectroelectrochemical Studies Of Oxygen Reduction In Dimethyl Sulfoxide And Pyridine. *Inorganic Chemistry*, 4060-4064.
- Sigel, A., Sigel, H., & Sigel, R. K. (2007). *Nickel And Its Surprising Impact In Nature: Metal Ions In Life Sciences*. Switzerland: John Wiley & Sons Ltd.
- Singh, J., Hundal, G., & Gupta, R. (2008). Studies On Nickel(II) Complexes With Amide-Based Ligands: Syntheses, Structures, Electrochemistry And Oxidation Chemistry. *European Journal Of Inorganic Chemistry*, 134-139.

- Skoumalová, A., & Hort, J. (2012). Blood Markers Of Oxidative Stress In Alzheimer's Disease. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 2291-2300.
- Solomon, G. (2007). *Organic Chemistry, Second Edition*. México: Editorial Limusa.
- Sorrell, T. (2006). *Organic Chemistry*. Sausalito, California: University Science Books.
- Soto, C. (2001). Protein Misfolding And Disease; Protein Refolding And Therapy. *FEBS Letters*, 498-204.
- Spivey, A., & Maddaford, A. (1999). Chapter 2. Synthetic Methods. Part (V) Protecting Groups. *Annual Reports Section B (Organic Chemistry)*, 83-95.
- Stewart, F. H. (1980). Some Application Of Competitive Coupling In Peptide Synthesis. *Australian Journal Of Chemistry*, 2087-2095.
- Sugiura, Y., & Mino, Y. (1979). Nickel(III) Complexes Of Histidine-Containing Tripeptides And Bleomycin. Electron Spin Resonance Characteristics And Effect Of Axial Nitrogen Donors. *Inorganic Chemistry*, 1336-1339.
- Sureshbabu, V., & Narendra, N. (2011). Protection Reactions. En W.-V. V. Co, *Amino Acids, Peptides And Proteins In Organic Chemistry* (Págs. 1-98). Weinheim: Wiley.
- Symons, M. (2000). Cis- And Trans-Conformations For Peroxynitrite Anions. *Journal Of Inorganic Biochemistry*, 299-301.
- Szilagyi, R., Bryngelson, P., Maroney, M., Hedman, B., Hodgson, K., & Solomon, E. (2004). S K-Edge X-Ray Absorption Spectroscopic Investigation Of The Ni-Containing Superoxide Dismutase Active Site: New Structural Insight Into The Mechanism. *Journal Of The American Chemical Society*, 3018-3019.
- Tietze, D., Voigt, S., Mollenhauer, D., & Buntkowsky, G. (2014). NMR Crystallography As A Novel Tool For The Understanding Of The Mode Of Action Of Enzymes: SOD A Case Study. *Applied Magnetic Resonance*, 841-857.
- Tomblyn, M., Kasarskis, E. J., Xu, Y., & Clair, D. K. (1998). Distribution Of Mnsod Polymorphisms In Sporadic ALS Patients. *Journal Of Molecular Neuroscience*, 65-66.
- Turrina, A., Garcia, R., Cox, P., Casci, J., & Wright, P. (2016). Retrosynthetic Co-Templating Method For The Preparation Of Silicoaluminophosphate Molecular Sieves. *Chemistry Of Materials*, 4998-5012.

- Ulman, M., & Grubbs, R. (1988). Relative Rates Of Olefin Substrate With Ruthenium (II) Carbene Metathesis Initiators. *Organometallics*, 2484-2485.
- Universidad Nacional Autonoma De Mexico. (2011). *Diseño De Síntesis*. Obtenido De [Http://Depa.Fquim.Unam.Mx/Amyd/Archivero/SINTESISORGANICAFUNDAMENTOS_30322.Pdf](http://Depa.Fquim.Unam.Mx/Amyd/Archivero/SINTESISORGANICAFUNDAMENTOS_30322.Pdf)
- Van Breusegem, F., Slooten, L., Stassar, J.-M., Moens, T., Botterman, J., Van Montagu, M., & Inze, D. (1999). Overproduction Of Arabidopsis Thaliana Fesod Confers Oxidative Stress. *Plant Cell Physiology*, 515-523.
- Van Heuvelen, K., Cho, J., Dingee, T., Riordan, C., & Brunold, T. (2010). Spectroscopic And Computational Studies Of A Series Of High-Spin Ni(II) Thiolate Complex. *Inorganic Chemistry*, 6535-6544.
- Voet, D., Voet, J., & Pratt, C. (2006). *Fundamentals Of Biochemistry*. Madrid: Panamericana.
- Wade, L. (2011). *Química Orgánica*. México: Pearson Education.
- Wang, P., Wu, S., Tian, C., Yu, G., Jiang, W., Wang, G., & Mao, C. (2016). Retrosynthetic Analysis-Guided Breaking Tile Symmetry For The Assembly Of Complex DNA Nanostructures. *Journal Of The American Chemical Society*, 13579-13585.
- Wanker, E. (2000). Protein Aggregation In Huntington's And Parkinson's Disease: Implications For Therapy. *Molecular Medicine Today*, 387-391.
- Warren, S., & Wyatt, P. (2008). *Organic Synthesis: The Disconnection Approach*. Chichester: John Wiley & Sons, Inc.
- Weiss, R., Flickinger, A., Rivers, W., Hardy, M., Aston, K., Ryan, U., & Riley, D. (1992). Evaluation Of Putative Superoxide Dismutase Mimics. *The Journal Of Biological Chemistry*, 23049-23054.
- Well, A. (1978). *Structural Inorganic Chemistry*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Wood, P. M. (1988). The Potential Diagram For Oxygen At Ph 7. *Biochemical Journal*, 287-289.
- Wuerges, J., Lee, J., Kang, S., & Djinic-Carugo, K. (2008). Crystallization Of A Nickel Containing Superoxide Dismutase And Preliminary Phase Determination By MAD At The Ni K-Edge. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, D58.

- Wuerges, J., Lee, J.-W., Yim, Y.-I., Yim, H.-S., Kang, S.-O., & Djinojic Carugo, K. (2003). Crystal Structure Of Nickel-Containing Superoxide Dismutase Reveals Another Type Of Active Site. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America*, 8569-8574.
- Yamazaki, Y., & Takao, T. (2008). Metalation States Versus Enzyme Activities Of Cu, Zn-Superoxide Dismutase Probed By Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2.
- Youn, H.-D., Kim, E.-J., Roe, J.-H., Hah, Y., & Kang, S.-O. (1996). A Novel Nickel-Containing Superoxide Dismutase From *Streptomyces* Spp. *Biochem. J.*, 889-896.
- Youn, H.-D., Youn, H., Lee, J.-W., Yim, Y.-I., Lee, J. K., Chil Hah, Y., & Kang, S.-O. (1996). Unique Isozymes Of Superoxide Dismutase In *Streptomyces Griseus*. *Archives Of Biochemistry And Biophysics*, 341-348.
- Yurkanis Bruice, P. (2008). *Química Orgánica*. México: Pearson Education.
- Zambelli, B., & Ciurli, S. (2013). Nickel And Human Health. En A. Sigel, H. Sigel, & R. Sigel, *Interrelations Between Essential Metal Ions And Human Diseases* (Págs. 321-357). Springer.
- Zhang, S., Lin, F., Hossain, M., Shabanpoor, F., Tregear, G., & Wade, J. (2008). Simultaneous Post-Cysteine(S-Acm) Group Removal Quenching Of Iodine And Isolation Of Peptide By One Step Ether Precipitation. *International Journal Of Peptide Research And Therapeutics*, 301-305.
- Zuluaga Velez, A., & Gaviria Arias, D. (2012). Una Mirada Al Estrés Oxidativo. *Revista Médica De Risaralda*, 115-154.