

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN EN POLÍMEROS Y MATERIALES

**Estudios Teóricos y Experimentales de Reconocimiento Molecular de
Aminoácidos Básicos por Receptores Artificiales Tipo Ciclofano en Medio
Orgánico**

TESIS

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIA DE MATERIALES

Presenta:

ABIGAIL MIRANDA DE LA ROSA

Hermosillo, Sonora

Noviembre 2014

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRAC.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	6
1.1 Reconocimiento Molecular y Química supramolecular.....	6
1.2 Química Receptor – Huésped. Receptores Artificiales.....	8
1.2.1 Receptores Artificiales.....	8
1.2.2 Síntesis de Receptores Macrocíclicos.....	11
1.2.2.1 Síntesis Asistida por Microondas.....	12
1.3 Estabilidad de los Complejos Supramoleculares.....	13
1.3.1 Interacciones no Covalentes.....	13
1.3.1.1 Interacciones Iónicas y Bipolares.....	13
1.3.1.2 Enlace de Hidrógeno.....	15
1.3.1.3 Enlace de Hidrógeno no Convencional.....	19
1.3.1.4 Interacciones π	19
1.3.1.5 Interacciones de van der Waals.....	21
1.3.1.6 Efecto hidrofóbico.....	23
1.3.2 Factores Entrópicos. Efecto Quelato y Preorganización.....	25
1.3.3 Efecto del Solvente en la Estabilidad de Complejos	27
1.3.4 Métodos de Determinación de la Estabilidad de Complejos Supramoleculares.....	31
1.3.4.1 Estudios Computacionales.....	31
1.3.4.1.1 Gaussian 09.....	33
1.3.4.1.2 Teoría del Funcional de la Densidad (DFT).....	33

1.3.4.1.3	Funcional Híbrido B3LYP.....	34
1.3.4.1.4	Funciones Base.....	34
1.3.5	Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN H^1).....	35
1.3.5.1	Fundamentos teóricos.....	36
1.3.5.2	Obtención de Constantes de Asociación (K_a) por RMN H^1	38
1.3.5.2	Espectroscopia de Difusión Ordenada (DOSY)....	42
1.4	Aminoácidos Básicos.....	44
2.	PARTE EXPERIMENTAL.....	47
2.1	Diseño Experimental.....	47
2.2	Materiales.....	54
2.3	Métodos.....	55
2.3.1	Síntesis de los Ciclofanos 1 y 2 (Cy1 y Cy2).....	55
2.3.2	Síntesis de los Ésteres de Hexilo (EHCy1 y EHCy2) y Etilfenilo (EFCy1 y EFCy2) Mediante Síntesis Asistida por Microondas..	55
2.3.3	Purificación de los Ciclofanos EHCy1, EHCy2, EFCy1 y EFCy2.....	57
2.3.4	Caracterización de los Ciclofanos y Ésteres Obtenidos.....	57
2.3.5	Estudios Teóricos de Reconocimiento Molecular Utilizando Gaussian 09.....	58
2.3.6	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	59
2.3.6.1	Espectroscopia de Difusión Ordenada (DOSY).....	59
2.3.6.2	Titulaciones.....	59
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3.1	Síntesis y Caracterización.....	61
3.1.1	Espectrometría de Masas de Alta Resolución.....	63
3.1.1.1	EHCy1.....	63
3.1.1.2	EFCy1.....	63
3.1.1.3	EHCy2.....	63
3.1.1.4	EFCy2.....	63
3.1.2	Resonancia Magnética Nuclear de 1H	64
3.1.3	Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C	63
3.1.4	Infrarrojo.....	73

3.2 Estudios Teóricos (DFT) de Reconocimiento Molecular del Precursor Ácido Cy1 con Arg-OMe.....	75
3.2.1 Cy1 y (Cy1) ²⁻ en su Forma Libre.....	75
3.2.2 Sistemas Cy1:Arg-OMe y (Cy1) ²⁻ :Arg-OMe.....	77
3.2.2.1 Cy1:Arg-OMe.....	79
3.2.2.2 (Cy1) ²⁻ :Arg-OMe.....	80
3.2.3 Gráficas de Densidad Electrónica y Diferencia de Energía de los Orbitales HOMO-LUMO.....	80
3.3 Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos (DFT) y Experimentales (RMN ¹ H) de EFCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe.....	83
3.3.1 Receptor EFCy1 en Forma Libre.....	83
3.3.2 Complejos Supramoleculares EFCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe.....	85
3.3.2.1 Estudios Teóricos (DFT).....	85
3.3.2.2 Estudios Experimentales (RMN ¹ H).....	89
3.3.2.2.1 Espectroscopia dde Difusión Ordenada (DOSY)..	89
3.3.2.2.2 Titulación Mediante RMN ¹ H.....	89
3.4 Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos (DFT) y Experimentales (RMN) de EHCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe.....	95
3.4.1 Receptor EHCy1 en su Forma Libre.....	95
3.4.2 Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos (DFT) y Experimentales (RMN ¹ H) de EHCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe...	95
3.4.2.1 Sistema EHCy1:Arg-OMe.....	95
3.4.2.2 Sistema EHCy1:Lis-OMe.....	98
3.4.2.3 Estudios Experimentales (RMN ¹ H) de EHCy1 con Arg- OMe.....	100
3.5 Estudios Experimentales (RMN ¹ H) de EHCy2 con Arg-OMe.....	102
CONCLUSIONES.....	104
PERSPECTIVAS.....	107
REFERENCIAS.....	108
ANEXOS.....	111
PRODUCTOS OBTENIDOS	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura del para[5]ciclofano. a) unidad aromática y b) puente alifático.....	10
Figura 2.	Comparación del flujo de calor en (a) las técnicas convencionales y en (b) la técnica asistida por microondas.....	14
Figura 3.	Representación de la interacción enlace de hidrógeno. El átomo aceptor es representado por la letra A y el donador por la letra D...	16
Figura 4.	Enlaces de hidrógeno presentes en el ADN. Estos se representan con una línea punteada entre guanina y citosina y adenina y timina. Esta interacción existe a lo largo de toda la doble hélice del ADN.....	16
Figura 5.	Geometrías de los puentes de hidrógeno: a) lineal; b) inclinado; c) donador bifurcado; d) aceptor bifurcado; e) trifurcado; f) tres centros bifurcados.....	18
Figura 6.	Geometrías de las interacciones $\pi-\pi$. a) Ordenamiento cara - cara y b) ordenamiento borde - cara.....	20
Figura 7.	Interacciones $\pi-\pi$ cara-cara que mantienen unidas a las capas de grafito. Representación de las capas a) con un enfoque desde arriba y b) con enfoque de lado.....	22
Figura 8.	Representación del efecto hidrofóbico. Puede apreciarse el desplazamiento de las moléculas de agua (área punteada) de la superficie hidrofóbica (área gris) durante éste efecto.....	24
Figura 9.	Interacción de moléculas orgánicas en solución acuosa durante el efecto hidrofóbico. a) Antes de interaccionar, donde existe mayor número de huecos, b) Unión de grupos hidrofóbicos formando un solo hueco. El área azul representa la capa de agua ordenada rodeando los grupos hidrofóbicos (huecos).....	26
Figura 10.	Comparación de las estructuras de los receptores 18-corona-6 (izquierda) y esferando (derecha) los cuales presentan diferente preorganización reflejándose en los valores de K_a en la unión de metales alcalinos. El esferando tiene un valor de K_a 10 órdenes de magnitud más grande que el 18-corona6.....	28
Figura 11.	Estructura del receptor A utilizado en los experimentos de variación de la polaridad del solvente con el huésped imidazol.....	30

Figura 12.	Orientación de los espines nucleares al azar (izquierda) y en presencia del campo magnético externo (derecha).....	37
Figura 13.	Variación en la intensidad de las señales de cafeína, agua y 2-etoxietanol de conforme varía el gradiente del pulso del campo (G) en un experimento de DOSY.....	42
Figura 14.	Estructura de los receptores Cy1 y Cy2.....	48
Figura 15.	Complejo supramolecular formado entre el receptor Cy1 y el huésped L-arginina metil éster.....	48
Figura 16.	Representación de la interacción de doble puente de hidrógeno entre un receptor ciclofano y el ácido acético.....	49
Figura 17.	Estructuras del precursor ácido y sus modificaciones. (a) Estructura base de los precursores ácidos. Conformaciones tipo balde de los derivados éster de: etil-fenilo (b) y hexilo (c).....	50
Figura 18.	Estructura de los huéspedes utilizados en este trabajo. a) Arg-OMe y b) Lis-OMe.....	52
Figura 19.	Espectro de ^1H RMN de EHCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.....	65
Figura 20.	Espectro de ^1H RMN de EHCy2 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.....	66
Figura 21.	Espectro de ^1H RMN de EFCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.	67
Figura 22.	Espectro de ^1H RMN de EFCy2 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.....	69
Figura 23.	Espectro de ^{13}C RMN de EHCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.....	70
Figura 24.	Espectro de ^{13}C RMN de EHCy2 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.....	71
Figura 25.	Espectro de ^{13}C RMN de EFCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.....	72
Figura 26.	Espectros de infrarrojo de los receptores Cy1 (línea roja) y EHCy1 (línea negra) obtenido en KBr.....	74

Figura 27.	Estructuras de las especies neutra (izquierda) y ionizada (derecha) de Cy1.....	76
Figura 28.	Conformaciones más estables de las especies Cy1 y (Cy1) ²⁻ obtenidas mediante estudios teóricos DFT. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de la cavidad (rojo) e interacción intramolecular (negro) en angstroms.....	76
Figura 29.	Estructuras más estables obtenidas para los sistemas con el receptor Cy1 y el huésped Arg-OMe neutros (izquierda) y iónicos (derecha). Las líneas punteadas corresponden a las distancias de la cavidad (rojo) e interacciones (negro) en angstroms.....	78
Figura 30.	Gráficos de densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO (a un nivel de contorno de 0.022 a.u.) para las especies iónicas y neutras de Cy1 y Arg-OMe, así como para las estructuras más estables de los complejos supramoleculares.....	82
Figura 31.	Estructuras de Cy1 y EFCy1 en su forma libre obtenidas por DFT y señales de los protones aromáticos de ambas especies obtenidos por RMN. Las líneas punteadas corresponden a las dimensiones de la cavidad (rojo) e interacción intramolecular (negro) en angstroms.....	84
Figura 32.	Estructuras más estables del receptor EFCy1 (izquierda) y del complejo EFCy1:Arg-OMe (derecha) obtenidas por DFT. Las líneas punteadas corresponden a las distancias en angstroms.....	86
Figura 33.	Conformaciones más estables del receptor Cy1 (izquierda) y complejo Cy1:Arg-OMe obtenidas por DFT. Comparar ambas conformaciones con las ilustradas en la figura 35. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de la cavidad (rojo) e interacciones (negro) en angstroms.....	86
Figura 34.	Conformaciones más estables de los complejos EFCy1:Lis-OMe (arriba) y EFCy1:Arg-OMe (abajo) obtenidas por DFT. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de enlaces no covalentes en angstroms.....	88
Figura 35.	Experimento de espectroscopia de difusión ordenada (DOSY) del receptor EFCy1 en forma libre (espectro inferior) y del complejo EFCy1:Arg-OMe (espectro superior).....	90

Figura 36.	Cambios de desplazamiento químico (hacia campo bajo) del protón amida de EFCy1 (4.5 mM) durante la titulación con ArgMe (450 mM).....	91
Figura 37.	Cambios de desplazamiento químico (hacia campo alto) de los protones aromáticos de EFCy1 con Arg-OMe durante la titulación..	91
Figura 38.	Curvas de titulación obtenidas de EFCy1 (4.5 mM) con ArgMe (450 mM), y con LisMe (450 mM), hasta lograr una relación molar de 10 en ambos casos.....	93
Figura 39.	Estructuras de EHCy1 y EFCy1 obtenidas por DFT y sus respectivos espectros de protón de las señales aromáticas de la cavidad en cada caso. Las líneas punteadas corresponden a las dimensiones de la cavidad (rojo) e interacción intramolecular (negro) en angstroms.....	96
Figura 40.	Estructuras más estables del receptor EHCy1 (izquierda) y del complejo EHCy1:Arg-OMe (derecha, comparar con la figura 33) mediante DTF. Las líneas punteadas corresponden a las distancias en angstroms.....	97
Figura 41.	Conformación más estable obtenida con el programa GAUSSIAN 09 para EHCy1:Lis-OMe y al nivel de teoría B3LYP/6-31G*. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de enlaces no covalentes en angstroms.....	99
Figura 42.	(a) Cambios de desplazamiento químico (hacia campo bajo) del protón amida de EHCy1 y (b) curva de titulación obtenida para EHCy1 (4.5 mM) con ArgMe (450 mM), hasta una relación molar de 10.....	101
Figura 43.	(a) Cambios de desplazamiento químico (hacia campo bajo) del protón amida de EHCy2 y (b) curvas de titulación obtenidas de EHCy2 (4.5 mM) con ArgMe (450 mM), hasta una relación molar de 10.....	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Interacciones no covalentes.....	14
Tabla 2.	Enlace de hidrógeno y sus propiedades (A, aceptor; D, donador)...	18
Tabla 3.	Influencia del solvente en la constante de afinidad del receptor A para el huésped orgánico neutro imidazol (298K).....	30
Tabla 4.	Clasificación de aminoácidos en base a la carga de su cadena lateral a pH=7.....	45
Tabla 5.	Condiciones de síntesis utilizadas para establecer los parámetros de reacción óptimos para la esterificación con cadenas hexílicas y etilfenílicas.....	62
Tabla 6.	Energías de complejación (ΔE_C) en kcal/mol, energía relativa de complejación (ΔE_{rel}) en kcal/mol y energía de ancho de banda ($\Delta E_{HOMO/LUMO}$) en eV, de los sistemas Cy1:Arg-OMe y Cy1 ²⁻ :(Arg-OMe)H ₂ ²⁺	79
Tabla 7.	Constantes de afinidad (K_a) y cambio de desplazamiento químico máximo ($\Delta\delta_c$) de los huéspedes con el receptor EFCy1.....	94

RESUMEN

La síntesis de cuatro nuevos receptores artificiales tipo ciclofano con cuatro grupos hexiléster (EHCy1 y EHCy2) y etilfeniléster (EFCy1 y EFCy2) como brazos pendientes, a partir de sus precursores con grupos ácido, se llevó a cabo exitosamente mediante la técnica asistida por microondas. Los receptores fueron caracterizados mediante espectrometría de masas de alta resolución, RMN ^1H y ^{13}C e infrarrojo.

Los estudios de reconocimiento molecular hacia aminoácidos básicos, tanto del precursor Cy1 (grupos ácidos pendientes) como de los receptores EHCy1 y EFCy1, fueron realizados teóricamente por el método de DFT al nivel de teoría B3LYP/6-31G* con ayuda del programa Gaussian 09.

El ciclofano Cy1 forma complejos supramoleculares estables con arginina, con mayor estabilidad el ciclofano en su forma neutra (-366 kcal/mol) que el ciclofano en su forma iónica (-340 kcal/mol). Al comparar estos resultados con los complejos supramoleculares de los receptores de los ciclofanos esterificados EHCy1 y EFCy1 se observa que, en términos de la energía de complejación calculada teóricamente, los complejos supramoleculares formados por el ciclofano Cy1 son un orden de magnitud más estables, lo cual se atribuye al costo entrópico del fuerte cambio conformacional de la cavidad del macrociclo en el caso de EHCy1 y EFCy1.

La energía de complejación del sistema EHCy1:Arg-OMe (-28 kcal/mol) indica que es más estable que el sistema EHCy1:Lis-OMe (-21 kcal/mol). En la estructura más estable del sistema EHCy1:Arg-OMe se observa la formación de 5 puentes de hidrógeno con los grupos amida del receptor y no intervienen las cadenas hexílicas del mismo, mientras que en el caso del sistema EHCy1:Lis-OMe se forman cuatro puentes de hidrógeno, dos de ellos con el grupo amida y dos con los grupos éster de las cadenas de EHCy1. La diferencia de estabildades se puede atribuir principalmente a la diferencia en el número de interacciones de cada sistema.

Por otro lado, la similitud en los valores de energías de complejación encontradas para EFCy1:Arg-OMe y EFCy1:Lis-OMe (-37 y -36 kcal/mol respectivamente) indican que EFCy1 no es capaz de discriminar entre los dos sustratos. Tanto Arg-OMe como Lis-OMe formaron tres interacciones intermoleculares con EFCy1. En ambos casos, se observa la participación del grupo amida y los grupos éster de los brazos etilfenílicos del receptor. La estabilidad semejante entre estos sistemas, se debe a que ambos complejos forman el mismo número de interacciones no covalentes y en los dos casos se observa la participación de un grupo amino y no participa la cadena lateral de Arg-OMe.

A pesar del menor número de interacciones no covalentes presentes en los complejos con EFCy1, se observa que estos sistemas son más estables que los complejos con EHCy1. La mayor estabilidad de los complejos formados con EFCy1 se atribuye a la diferencia en los efectos entrópicos durante la complejación.

En lo correspondiente a los estudios experimentales, la primera evidencia de la formación de complejos supramoleculares se obtuvo por espectroscopia de difusión ordenada (DOSY) para el sistema EFCy1:Arg-OMe en donde se encontró que el valor del coeficiente de difusión (D) encontrado para el complejo ($D = 3.77 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) resultó diferente de los coeficientes encontrados para EFCy1 ($D = 4.02 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) y Arg-OMe ($D = 5.86 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) en forma libre.

Los experimentos de reconocimiento molecular en medio orgánico (CDCl_3 :DMSO, 75:25) se llevaron a cabo por titulación mediante RMN ^1H con el receptor EFCy1 hacia Arg-OMe y Lis-OMe y con los receptores EHCy1 y EHCy2 hacia Arg-OMe. El protón más afectado durante la titulación en todos los casos fue el protón amida de los receptores, lo cual da evidencia de que el sitio de interacción de los huéspedes se lleva a cabo en ese grupo funcional, hecho que soporta la información con los estudios teóricos.

Los resultados con el receptor EFCy1 arrojan valores de constantes de $K_a = 40$ y 52 M^{-1} para Arg-OMe y Lis-OMe respectivamente. La similitud en los valores de K_a

indica que EFCy1 no discrimina entre los dos sustratos, lo cual también corresponde con los resultados de los estudios teóricos.

El valor de K_a obtenido para EHCy1:Arg-OMe (219 M^{-1}), indica que este complejo supramolecular es más estable que el encontrado para EFCy1:Arg-OMe ($K_a= 40 \text{ M}^{-1}$) lo cual no concuerda con los cálculos teóricos y es atribuido a que en éstos últimos estudios no se considera la presencia del disolvente.

Los resultados experimentales del sistema EHCy2:Arg-OMe ($K_a= 95 \text{ M}^{-1}$) indican que es de menor estabilidad que el sistema EHCy1:Arg-OMe ($K_a= 219 \text{ M}^{-1}$) lo que revela que no solo los grupos pendientes afectan la estabilidad del complejo, sino también los grupos presentes en la cavidad del receptor contribuyen en dicha estabilidad.

En general, las constantes de asociación obtenidas mediante RMN ^1H para todos los sistemas son relativamente bajas, lo cual se atribuye a la presencia de DMSO en el sistema.

ABSTRACT

Four new cyclophane receptors with four hexyl ester groups (EHCy1 and EHCy2) and ethyl phenyl ester groups (EFCy1 and EFCy2) as pendant groups were synthesized from their acid precursors (Cy1 and Cy2) using microwave assisted synthesis. The receptors were characterized by high resolution mass spectrometry, ^1H and ^{13}C NMR and infrared spectroscopy.

Molecular recognition studies toward basic amino acids, using precursor Cy1 (with acid pendant groups), and the modified receptors EHCy1 and EFCy1, were theoretically achieved through Gaussian 09 using DFT/B3LYP/6-31G* level of theory.

Cy1 forms stable supramolecular complexes with Arg-OMe, the complex formed with the neutral species (-366 kcal/mol) is more stable than the ionic species (-340 kcal/mol). Comparing these results with the supramolecular complexes obtained for the ester cyclophanes EHCy1 and EFCy1, in complexation energy (theoretically calculated) terms, the complexes formed with Cy1 are one order of magnitude more stable than modified receptors, which is attributed to the entropic cost due to the strong conformational cavity change in EHCy1 and EFCy1 cases.

The complexation energy of EHCy1:Arg-OMe system (-28 kcal/mol) is more favorable than the energy of EHCy1:Lis-OMe system (-21 kcal/mol). The most stable structure of EHCy1:Arg-OMe system, illustrates 5 hydrogen bonds with the amide groups of the receptor and the hexyl chains are not involved, while system EHCy1:Lis-OMe displays 4 hydrogen bonds, 2 of them interact with the amide group and 2 with the ester chains of EHCy1. The stability differences can be mainly attributed to the difference in the number of interactions in each system.

Otherwise, the similar complexation energy values for systems EFCy1:Arg-OMe and EFCy1:Lis-OMe (-37 and -36 kcal/mol respectively) indicate that EFCy1 does not discriminate between both substrates. Arg-OMe is capable to form 3 intermolecular interactions with EFCy1 as well as Lis-OMe does. In both cases, the participation of amide groups and ethyl phenyl pendant groups of the receptor is

observed. Due to the same number of non covalent interactions in both complexes, the stability of these systems is highly similar. Arg-OMe and Lis-OMe, participate with an amino group and the side chain do not interact in the complex.

Despite the smaller number of interactions in EFCy1 complexes in comparison to EHCy1 complexes, the first one is more stable than the last one. The statement above, is attributing to entropic effect differences during complexation.

With regard to experimental studies, the first evidence of the complexes formation was obtained by DOSY (Diffusion Ordered Spectroscopy) for EFCy1:Arg-OMe system, where the diffusion coefficient (D) for the complex ($D= 3.77 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), resulted different of the D values of the free receptor ($D= 4.02 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$) and free Arg-OMe ($D= 5.86 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$).

Molecular recognition experiments in organic media (CDCl_3 :DMSO, 75:25) were performed by ^1H NMR titrations using EFCy1 toward Arg-OMe and Lis-OMe and cyclophanes EHCy1 and EHCy2 toward Arg-OMe. The amide proton of all the receptors was the most affected proton during titration, which gives evidence that the interaction site is this functional group. This fact supports the theoretical information.

The results with EFCy1, give constant values of $K_a= 40$ and 52 M^{-1} for Arg-OMe and Lis-OMe respectively. The similar values of K_a indicate that EFCy1 do not discriminate between both substrates, which also correspond with the calculated results.

The K_a value for the EHCy1:Arg-OMe complex (219 M^{-1}), indicates that is more stable than the EFCy1:Arg-OMe complex (40 M^{-1}). This fact does not correspond to the theoretically studies and is explained by the absence of solvent in calculated analysis which is not considered.

The experimental data for EHCy2:Arg-OMe system ($K_a= 95 \text{ M}^{-1}$), indicate that this complex is less stable than EHCy1:Arg-OMe ($K_a= 219 \text{ M}^{-1}$) system, which show up that not only the pendant groups affect the complex stability, but also the functional groups present in the receptor cavity contribute to the stability.

In summary, the association constants obtained by ^1H NMR for all the systems are relatively low in comparison with the expected in organic media, this is attributed to the presence of DMSO in the system.

INTRODUCCIÓN

El reconocimiento molecular es el fenómeno responsable de la alta especificidad con que funcionan los sistemas bioquímicos tales como las hormonas, neurotransmisores, sistemas enzima-sustrato y sistemas antígeno-anticuerpo, entre otros.

Las interacciones no covalentes son parte fundamental del proceso de reconocimiento molecular y las investigaciones en esta área motivaron en buena medida el nacimiento de la química supramolecular, que es la rama de la química encargada del estudio de los complejos supramoleculares, los cuales son producto de la unión de dos especies químicas a través de interacciones no covalentes [1].

Desde el nacimiento de la química supramolecular, uno de los puntos de mayor atención es la síntesis de receptores específicos para sustratos de interés biológico. Diversos receptores sintéticos han funcionado como sistemas modelo de los procesos bioquímicos naturales y han proporcionado una idea clara y confiable de lo que sucede en dichos procesos [2,3].

Una ventaja de los receptores artificiales sobre los receptores naturales es que se pueden diseñar de acuerdo a lo que se desee estudiar, es decir, es posible elegir el tipo de grupos funcionales que se introducirán para conferirles las características de asociación. Esto facilita los estudios de este tipo de fenómenos *in vitro* [4, 5].

Los receptores artificiales más utilizados como sistemas modelo para el reconocimiento molecular son los compuestos macrocíclicos, ya que en la naturaleza existen una diversidad de compuestos macrocíclicos que llevan a cabo una amplia gama de actividades biológicas, por ejemplo, eritromicina es un antibiótico, epotilona B es anticancerígeno, anfotericina es antifúngico y rapamicina funciona como inmunosupresor [6].

Dentro de los compuestos macrocíclicos artificiales se encuentran los ciclofanos, los cuales se definen como compuestos cíclicos que contienen al menos una unidad aromática unida por uno o más puentes alifáticos. Son receptores capaces de enlazar especies iónicas y moléculas neutras, tanto inorgánicas como orgánicas [7].

Por otra parte, una clase de sustratos de mucho interés para los estudios de reconocimiento molecular por receptores artificiales son los aminoácidos, debido a la importancia que tienen a nivel biológico [8-14].

Los principales sitios de enlace de los aminoácidos son los grupos amino y carboxilato del carbono alfa pero el reconocimiento molecular depende principalmente de los grupos funcionales presentes en su cadena lateral; el rol que juegan las cadenas laterales es especialmente importante en los aminoácidos básicos como arginina y lisina cuyas cadenas laterales están positivamente cargadas a pH fisiológico. En general, los aminoácidos cargados ofrecen los mejores objetivos para el reconocimiento molecular en los sistemas bioquímicos. En particular, los aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina ofrecen la posibilidad de presentar alta especificidad en virtud de las diferencias en los grupos funcionales de la cadena lateral: amino, guanidinio e imidazol, respectivamente.

En estudios previos, llevados a cabo en el laboratorio de química supramolecular del DIPM-UNISON, los ciclofanos ácidos 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,-octaaza-17,40-dioxa [10.1.10.1.] paraciclofano (Cy1) y 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis (carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza [10.1.10.1.] paraciclofano (Cy2), precursores de los ésteres utilizados en este trabajo, fueron estudiados como receptores artificiales de los metil ésteres de aminoácidos básicos en medio acuoso, siendo el ciclofano Cy1 el que mostró mayor afinidad por el metil éster de arginina, donde las interacciones fueron fundamentalmente la formación de pares iónicos entre los grupos carboxilato del receptor y los grupos amino del huésped [15, 16]. Sin embargo, en medio acuoso generalmente no operan los puentes de hidrógeno debido a la competencia con el solvente por lo cual resulta interesante estudiar este tipo de sistemas en disolventes orgánicos.

En el presente trabajo de tesis, con el objetivo de estudiar las propiedades de reconocimiento molecular de los ciclofanos Cy1 y Cy2 hacia aminoácidos en medio orgánico, se recurrió a su modificación mediante la esterificación con grupos hexilo y etil fenilo en sus brazos carboxilato pendientes, para conferirles solubilidad en solventes orgánicos dando como resultado los ciclofanos EHCy1, EHCy2, EFCy1 y

EFCy2. Las reacciones de esterificación se llevaron a cabo por la técnica de síntesis asistida por microondas, la cual se caracteriza por emplear menor cantidad de solvente y tiempos de reacción que las técnicas convencionales de síntesis.

La afinidad de un receptor hacia su huésped puede inferirse mediante simulación computacional, obteniendo resultados confiables previos a los estudios experimentales. Aun cuando estos cálculos representan una aproximación y no necesariamente reflejan con exactitud lo que ocurre experimentalmente, pueden ser utilizados inicialmente para marcar la pauta del análisis experimental, a la vez que complementan esta información. Al llevar a cabo primero un análisis teórico es posible optimizar el tiempo y reactivos en el análisis experimental. Los estudios de simulación computacional del reconocimiento molecular entre los receptores sintetizados, tanto en su forma ácida como en su forma éster, y los derivados metiléster de los aminoácidos L-arginina y L-lisina, se llevaron a cabo utilizando el programa Gaussian 09 a fin de tener una primera evidencia de la formación de complejos supramoleculares receptor-huésped.

Finalmente los estudios de reconocimiento molecular en medio orgánico se realizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H) con el fin de establecer experimentalmente la capacidad de los ciclofanos esterificados para enlazar y reconocer selectivamente aminoácidos básicos, así como para determinar los sitios de unión y las interacciones responsables de la estabilidad de los complejos supramoleculares formados.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las propiedades de reconocimiento molecular de los derivados hexil-éster y etilfenil-éster de los receptores artificiales 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,-octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1.]paraciclofano (Cy1) y 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(carboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza[10.1.10.1.] paraciclofano (Cy2), hacia aminoácidos básicos, mediante estudios teóricos (DFT) y estudios experimentales de Resonancia Magnética Nuclear de Protón (RMN ^1H) en medio orgánico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los derivados éster (hexilo y etilfenilo) de los ciclofanos ácidos Cy1 y Cy2 mediante síntesis asistida por microondas.
2. Purificar y caracterizar los ciclofanos esterificados (EHCy1, EFCy1, EHCy2 y EFCy2) a través de las técnicas de RMN ^1H , RMN ^{13}C , Infrarrojo y espectrometría de masas de alta resolución.
3. Realizar cálculos teóricos utilizando el programa Gaussian 09 en conjunto con la teoría del funcional de la densidad (DFT) para establecer si los ciclofanos, tanto en su forma ácida como sus derivados hexil-éster y etilfenil-éster, son capaces de formar complejos supramoleculares estables con los derivados metiléster de los aminoácidos Arginina y Lisina.
4. Determinar por RMN ^1H las constantes de afinidad (K_a) en medio orgánico de los complejos supramoleculares formados entre los receptores EHCy1, EFCy1 y EHCy2 y los derivados metiléster de los aminoácidos Arginina y Lisina.
5. Definir los factores estructurales de los receptores que, de acuerdo con los cálculos teóricos y los resultados de RMN ^1H , influyen en la estabilidad de los complejos supramoleculares formados.

1. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1.1 Reconocimiento Molecular y Química supramolecular

Reconocimiento molecular es un término que se refiere a la interacción específica entre dos o más moléculas a través de enlaces no covalentes tales como el enlace de hidrógeno, coordinación metálica, fuerzas hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals e interacciones π - π . Además de estas interacciones directas, en solución, el solvente puede desempeñar un rol dominante en el reconocimiento molecular [17, 18].

En comparación con un enlace covalente, las interacciones intermoleculares son débiles; sin embargo, pueden resultar efectos muy grandes al acumular un gran número de efectos relativamente pequeños: al operar simultáneamente varias interacciones entre las moléculas que se unen, el reconocimiento molecular puede originar moléculas muy estables y es común obtener valores de decenas de kcal/mol para la energía libre de la reacción (ΔG°) [19].

Las interacciones no covalentes son difíciles de analizar. En este campo no se aprecian los efectos clásicos de las sustituciones que se observan en la química del enlace covalente en donde, por ejemplo, al añadir un grupo fenilo la velocidad de reacción se puede incrementar en un orden de 10^3 . Frecuentemente se trabaja al límite de la detectabilidad y la correcta interpretación es todo un reto. Además, las interacciones débiles son especialmente sensibles al medio ambiente. Una interacción que es muy fuerte en cloroformo puede no existir en DMSO, e inclusive, no existir en una mezcla 95% cloroformo y 5%DMSO [18].

A pesar de las dificultades, los químicos han profundizado los estudios de las interacciones no covalentes, para lo cual han sintetizado sistemas modelo con dos propósitos fundamentales: (1) comprender de mejor manera los procesos biológicos que se basan en el reconocimiento molecular (interacciones enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, entre muchos otros) y (2) obtener nuevos materiales (catalizadores, sensores, entre otros) que imiten las propiedades de los sistemas bioquímicos, área que se conoce como química biomimética [19].

Por lo anterior, recientemente surgió una nueva área de la química, la química supramolecular, la cual se ocupa de las interacciones no covalentes y fue denominada como la “química más allá de la molécula” por J.M. Lehn [1]. Es un área multidisciplinaria enfocada al estudio de ensamblajes moleculares unidos a través de interacciones no-covalentes, que puede verse como una extensión de la química clásica (química del enlace covalente), que une átomos para formar moléculas, a una química que estudia la unión de moléculas (química del enlace no covalente).

Los antecedentes de la química supramolecular datan desde el siglo XIX, cuando se establecieron los principios básicos de esta área. En particular, la idea de química de coordinación formulada por Alfred Werner (1893), el concepto de llave-cerradura por Emil Fisher (1894) y el descubrimiento de las ciclodextrinas –las primeras moléculas receptoras- por Villiers y Hebd (1891). Estos conceptos fueron refinados y modificados más adelante, pero las ideas básicas siguen vigentes; por ejemplo, Koshland formuló el concepto del ajuste inducido (1958) en el cual las moléculas sufren cambios conformacionales durante la formación del complejo receptor – huésped. El modelo de ajuste inducido, que substituye al modelo llave-cerradura, da una visión más dinámica del evento de enlace y facilita la explicación de fenómenos tales como el de cooperatividad [20].

La rápida expansión en la química supramolecular durante las últimas dos décadas ha dado como resultado una amplia diversidad de sistemas químicos supramoleculares pero, en general, la química supramolecular puede clasificarse en dos amplias categorías: El autoensamblaje y la química receptor – huésped. En esta última categoría dos o más moléculas o iones se mantienen unidos por interacciones no covalentes formando un complejo receptor – huésped o supramolécula, y es en dicha categoría donde se centra el presente trabajo de tesis.

1.2 Química Receptor – Huésped. Receptores Artificiales

En la química receptor – huésped, generalmente el nombre receptor es asignado a la molécula de mayor tamaño, la cual posee sitios de enlaces convergentes; también es muy común que los receptores presenten una cavidad o hueco central. Por ejemplo, en un sistema enzima-sustrato, la enzima sería el receptor y el sustrato sería el huésped; en química de coordinación, el ligante es el receptor y el ion metálico el huésped [33].

La pregunta fundamental que debe responder la química receptor – huésped es: ¿Qué receptor es adecuado para un determinado sustrato? De acuerdo al modelo llave-cerradura, la complementariedad es el principal factor. Muy frecuentemente se requieren de varias interacciones no covalentes para la formación de un complejo supramolecular estable, por lo que se necesita del efecto aditivo de varios sitios de enlace e incluso de efectos de cooperación entre ellos. A mayor complementariedad entre los sitios de enlace del receptor con los sitios de enlace del huésped, mayor la energía de enlace. Esta complementariedad no es sólo entre los enlaces no covalentes en lo individual, sino en la forma y distribución de carga de ambas moléculas. Un enlace selectivo es una combinación de un excelente ajuste estérico, que complemente muy bien las distribuciones de carga entre las superficies del huésped y de la cavidad del receptor, y un adecuado arreglo espacial de, por ejemplo, grupos donadores y aceptores de enlace de hidrógeno, maximizando de esta manera las fuerzas atractivas y minimizando las fuerzas repulsivas entre el receptor y el huésped [20].

1.2.1 Receptores Artificiales.

Diversos tipos de receptores se encuentran presentes en la naturaleza, los cuales cumplen funciones vitales para los organismos vivos, todas ellas asociados al reconocimiento molecular de un sustrato particular por un tipo de receptor específico. Debido a lo complejo de las moléculas que intervienen en los sistemas bioquímicos, como son las proteínas y los ácidos nucleicos, se ha recurrido a la síntesis de

moléculas relativamente pequeñas que puedan imitar las propiedades de los receptores naturales, a los cuales se les denomina receptores artificiales.

Existen dos tipos generales de receptores artificiales: los receptores de cadena abierta y los de cadena cerrada o macrociclos. Los compuestos macrocíclicos son los más utilizados para imitar los procesos biológicos y dentro de estos se encuentran los éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos y ciclofanos. Cada grupo se diferencia por sus grupos funcionales, los cuales les confieren características de reconocimiento hacia sustratos afines a estos grupos, ya sean hidrofóbicos o hidrofílicos [2, 25].

Dado que en este trabajo se utilizan los receptores artificiales denominados ciclofanos se describirán con mayor detalle a continuación.

Un compuesto macrocíclico tipo ciclofano se define de manera concreta como una molécula cíclica que contenga al menos una unidad aromática unida al menos por un puente alifático [21] (figura 1). La presencia de anillos aromáticos le confiere a la molécula una estructura bien definida, con profundidad suficiente y la rigidez adecuada para la organización de los sitios de enlace.

Para lograr que un ciclofano adquiera solubilidad en agua se introducen cierto número de grupos cargados ya sea en el borde de la cavidad o más cercanos a los sitios de enlace. Otra característica de los ciclofanos es que pueden manejarse en disolventes orgánicos como receptores de compuestos orgánicos o iones metálicos [22, 23, 24]. El hecho de que los ciclofanos sean tan utilizados para llevar a cabo el reconocimiento molecular, se debe a que cumplen con muchas de las características que deben satisfacer los receptores artificiales para realizar este fenómeno, las cuales son [21]:

1. Manifestar selectividad en el reconocimiento de moléculas huésped en base a su constitución y configuración.
2. Ser químicamente estables.
3. Contar con sitios para la introducción de grupos catalíticos o sitios de reconocimientos adicionales.
4. Tener la posibilidad de unirse a compuestos poliméricos.
5. Deben ser sintetizados por métodos sencillos.

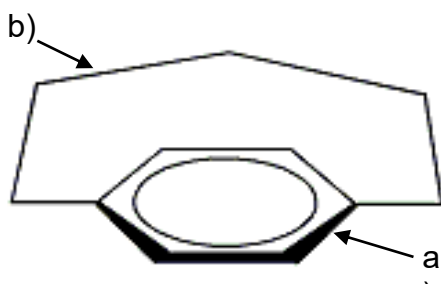


Figura 1. Estructura del para[5]ciclofano. a) unidad aromática y b) puente alifático.

Se considera que los ciclofanos son el centro de los receptores artificiales pues tienen una gran capacidad de complejación hacia sustratos de diferente naturaleza: compuestos orgánicos e inorgánicos, en forma de cationes o aniones e inclusive moléculas neutras [23].

1.2.2 Síntesis de Receptores Macrocíclicos.

La síntesis de receptores macrocíclicos implica tomar en cuenta dos puntos importantes para que la reacción se lleve a cabo con éxito: es preciso aumentar la reactividad de los reactantes y se debe evitar oligomerización lineal o polimerización de los mismos. Este último problema suele ocurrir debido a que los reactivos son dos compuestos bifuncionales.

Para evitar los problemas anteriores, existen tres métodos de síntesis que ayudan a reducir la probabilidad de que eso ocurra y con esto aumentan el rendimiento de reacción: 1) método de alta dilución, 2) método de reacciones templadas o con efecto plantilla y 3) método de control conformacional. Cada uno de los métodos se describe a continuación:

1. Método de alta dilución: en soluciones suficientemente diluidas es más probable que se lleve a cabo una reacción intramolecular, conduciendo a la formación del macrociclo y por lo tanto se reduce la probabilidad de reacción intermolecular con la que se favorece la formación del polímero [26].
2. Método de reacciones templadas o con efecto plantilla: estas reacciones se llevan a cabo en presencia de iones metálicos, los cuales activan y orientan mediante complejación a uno de los reactantes en la macrociclización [27]. Este método se emplea en la síntesis de éteres corona y el rendimiento de reacción se ve aumentado considerablemente por la selección apropiada del metal.
3. Método de control conformacional: algunas ciclizaciones se pueden llevar a cabo exitosamente en soluciones concentradas debido a que las conformaciones de los reactivos iniciales favorecen solo una de todas las posibles reacciones [28]. Los compuestos que participan en esta metodología son de estructuras rígidas en los cuales las distancias entre los grupos de condensación en ambos componentes son iguales.

1.2.2.1 Síntesis Asistida por Microondas. Los métodos de síntesis anteriores son eficientes para reacciones de ciclización; sin embargo, en muchos casos se desea mejorar las propiedades de un receptor macrocíclico y se recurre a su modificación estructural. Estas modificaciones no siempre requieren de los cuidados de una ciclización y pueden llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis menos complicadas. Una técnica relativamente nueva y ampliamente utilizada para síntesis química es la técnica de microondas; con ella es posible sintetizar o modificar diversidad de compuestos en tiempos relativamente más cortos, con rendimientos más altos y empleando cantidades de solventes mínimas o nulas.

La radiación electromagnética de las microondas se encuentra en el rango de frecuencias de 0.3 – 300 GHz, que corresponde a longitudes de onda entre 1 mm y 1 m. Por lo tanto, la región de microondas en el espectro electromagnético cae entre el infrarrojo y las ondas de radio. Son principalmente utilizadas en telecomunicación o para transferencia de energía. Por ejemplo, las longitudes de onda comprendidas entre 1 y 25 cm son utilizadas como transmisores del RADAR. Por otro lado, todos los hornos de microondas de uso doméstico y todos los reactores de microondas para síntesis química disponibles comercialmente, operan a una frecuencia de 2.45 GHz (correspondiente a una longitud de onda de 12.25 cm) con el fin de evitar la interferencia con la telecomunicación y las frecuencias de los teléfonos móviles.

Tradicionalmente la síntesis orgánica se lleva a cabo mediante conducción de calor con ayuda de una fuente externa. Este es un método relativamente lento e ineficiente para transmitir energía a un sistema ya que depende de las corrientes de convección y de la conductividad térmica de varios materiales y generalmente la temperatura del recipiente es más elevada que la temperatura de la mezcla de reacción.

En contraste, la radiación con microondas produce calentamiento interno eficiente debido al acoplamiento directo de la energía de las microondas con las moléculas presentes en la mezcla de reacción. Por lo tanto, la radiación con microondas aumenta la temperatura de toda la mezcla simultáneamente, mientras que con el calentamiento convencional la mezcla de reacción que se encuentra en contacto con las paredes del recipiente se calienta primero. Los materiales

(borosilicatos, cuarzo o teflón) de los cuales están elaborados los recipientes para los reactores de microondas modernos son transparentes a las mismas y permiten que la radiación pase a través de ellos invirtiendo el gradiente de temperatura en comparación con el calentamiento convencional (figura 2).

En resumen, la técnica de microondas puede ser utilizada para mejorar los métodos convencionales de síntesis, ya que debido a la alta eficiencia en el calentamiento de reacción es posible disminuir los tiempos y volúmenes de reacción y aumentar los rendimientos de la misma [29].

1.3 Estabilidad de los Complejos Supramoleculares

1.3.1 Interacciones no Covalentes

Las interacciones no covalentes representan la energía que mantiene unidas a las especies supramoleculares. Son considerablemente más débiles que los enlaces covalentes, cuya energía se ubica entre $150 - 450 \text{ kJ mol}^{-1}$ para enlaces sencillos.

Las interacciones no covalentes se encuentran en el rango de 2 kJ mol^{-1} para las fuerzas de dispersión, hasta 300 kJ mol^{-1} para las interacciones iónicas. Sin embargo, cuando estas interacciones se presentan de manera cooperativa pueden existir complejos supramoleculares muy estables. El término “no covalente” incluye un amplio rango de atracciones y repulsiones que se resumen en la tabla 1 y se describen a continuación.

1.3.1.1 Interacciones Iónicas y Bipolares. Se dividen en tres categorías: 1) interacción ión-ión, 2) interacción ión-dipolo y 3) interacción dipolo-dipolo. Las tres están basadas en la atracción entre cargas opuestas expresada en la ley de Coulomb: "La magnitud de cada una de las fuerzas eléctricas con que interactúan dos cargas puntuales es directamente proporcional al producto de las cargas e inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que las separa".

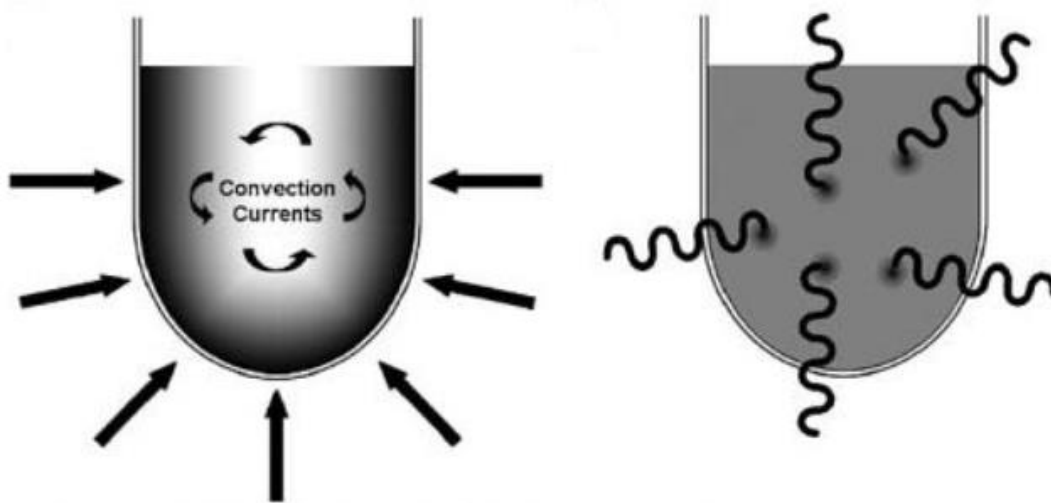


Figura 2. Comparación del flujo de calor en (a) las técnicas convencionales y en (b) la técnica asistida por microondas [29].

Tabla 1. Interacciones no covalentes.

Interacción	Fuerza (kJ mol ⁻¹)	Ejemplo
ión-ión	200-300	Cloruro de tetrabutilamonio.
Ion-dipolo	50-200	Sal en agua
Dipolo-dipolo	5-50	Acetona
Enlace de hidrógeno	4-120	Agua, etanol.
π - π	0-50	Benceno y grafito
van der Waals	<5 (varía dependiendo del área)	Interacción de argón con HCl
Hidrofóbico	No existe un valor	Inclusión de compuestos en ciclodextrinas.

Fuente: [30].

- 1) Interacción ión-ión: es la más fuerte de todas y puede compararse con el enlace covalente al tener una magnitud de fuerza de 300 kJ mol^{-1} . Este tipo de interacciones son no direccionales, lo cual significa que ocurren en cualquier orientación.
- 2) Ión-dipolo: es de tipo direccional, es decir, se requiere que las moléculas se orienten entre sí, de tal manera que solo se presenta cuando ambas especies se encuentran en la dirección óptima. La energía está entre los $50\text{-}200 \text{ kJ mol}^{-1}$.
- 3) Dipolo – dipolo: presenta dependencia de la orientación para que se lleve a cabo y es más débil que la interacción ión – dipolo ya que la densidad de carga en los iones es mayor que en los dipolos. A pesar de ser de las interacciones direccionales más débiles, son muy importantes porque proporcionan a las especies moleculares un determinado arreglo espacial. Dicha disposición geométrica es fundamental en los procesos biológicos[30].

1.3.1.2 Enlace de Hidrógeno. Es un tipo especial de interacción dipolo-dipolo entre un protón unido a un grupo donador (D) y un grupo aceptor (A) (figura 3) y es considerada la interacción no covalente de mayor importancia en la química supramolecular. Se caracteriza por ser fuerte y de alto grado de direccionalidad. La energía de ésta interacción está en el intervalo de $4 - 120 \text{ kJ mol}^{-1}$, aunque la mayoría se ubica por debajo de los 60 kJ mol^{-1} .

Los donadores de enlace de hidrógeno son grupos con un átomo de hidrógeno unido a un átomo electronegativo, formando así un dipolo, en donde el átomo de hidrógeno tendrá carga positiva parcial. Los grupos aceptores de enlace de hidrógenos son dipolos con átomos que contienen electrones disponibles (no enlazantes), como por ejemplo el átomo de oxígeno en el grupo carbonilo, con los cuales puede interactuar el hidrógeno con carga parcial positiva.

En la naturaleza existen varios tipos de moléculas biológicamente importantes que contienen varios grupos funcionales tanto aceptores como donadores de enlace de hidrógeno: aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos, entre otros. Un ejemplo sobresaliente es el ADN, en donde los numerosos enlaces de hidrógeno son los responsables de mantener unida la doble hélice de su estructura (figura 4).

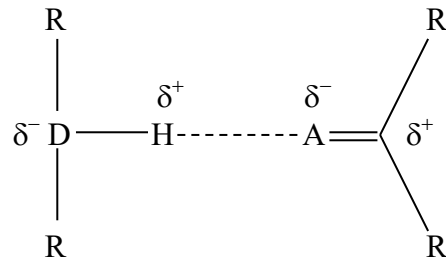


Figura 3. Representación de la interacción enlace de hidrógeno. El átomo aceptor es representado por la letra A y el donador por la letra D [30].

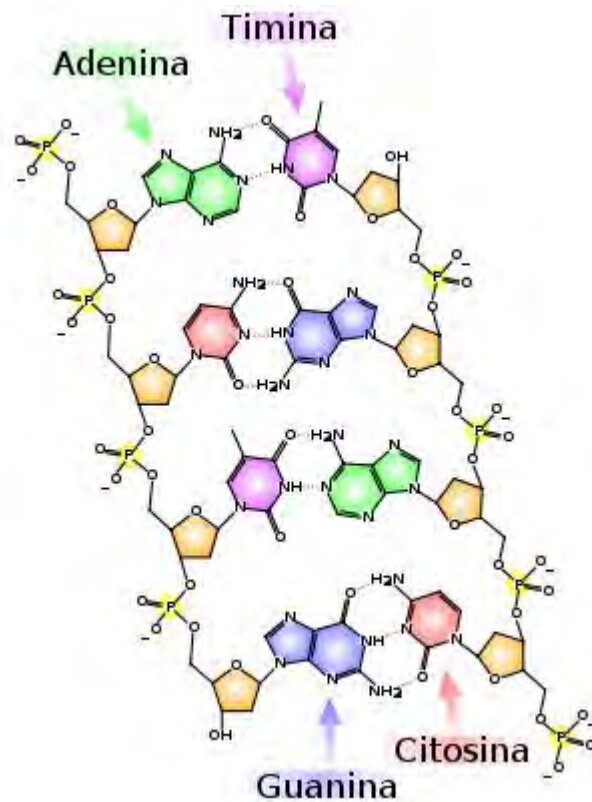


Figura 4. Enlaces de hidrógeno presentes en el ADN. Estos se representan con una línea punteada entre guanina y citosina y adenina y timina. Esta interacción existe a lo largo de toda la doble hélice del ADN.

La fuerza del enlace de hidrógeno difiere entre varios sistemas y no necesariamente esta correlacionada con la acidez de Brønsted del donador de protón. La fuerza de la interacción depende principalmente del tipo de átomo electronegativo unido al átomo de hidrógeno y de la geometría que adopta el enlace de hidrógeno en la estructura. Las diferentes geometrías de los enlaces de hidrógeno se muestran en la figura 5.

La geometría de un enlace de hidrógeno y el tipo de grupo donador y aceptor determinan la longitud y fuerza de la interacción, ésta última se clasifica en tres categorías: fuerte, intermedia y débil (tabla 2).

El enlace de hidrógeno fuerte tiene carácter similar al covalente (por ello se le conoce como enlace), en donde el átomo de hidrógeno esta cerca del punto central entre el átomo donador y aceptor. La interacción es más intensa cuando el hidrógeno está situado entre dos bases fuertes, por ejemplo en el ión HF^{2-} que es prácticamente lineal con el átomo de hidrógeno entre los dos átomos de flúor ($\text{F}\cdots\text{H}\cdots\text{F}^-$) [30].

Se forman enlaces de hidrógeno de fuerza intermedia entre un donador y un aceptor neutros, vía pares de electrones no enlazantes, como sucede en la auto asociación de ácidos carboxílicos. Este tipo de enlace no tiene geometría lineal sino que está ligeramente flexionado y su distribución angular está influenciada por factores estadísticos.

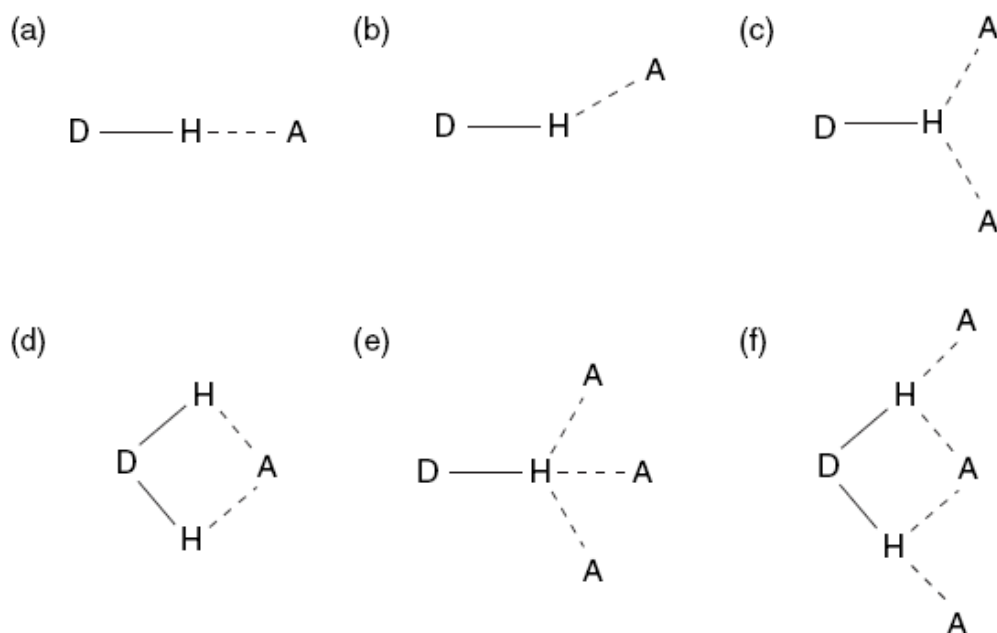


Figura 5. Geometrías de los puentes de hidrógeno: a) lineal; b) inclinado; c) donador bifurcado; d) aceptor bifurcado; e) trifurcado; f) tres centros bifurcados [30].

Tabla 2. Enlace de hidrógeno y sus propiedades (A, aceptor; D, donador).

<i>Interacción/propiedad</i>	<i>Fuerte</i>	<i>Moderado</i>	Débil
D-H...A	Principalmente covalente	Principalmente electrostático	electrostático
Energía de interacción (kJ mol ⁻¹)	60-120	16-60	<12
H...A	1.2-1.5	1.5-2.2	2.2-3.2
D...A	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Ángulo de interacción	175-180	130-180	90-150

Fuente: [30].

1.3.1.3 Enlace de Hidrógeno no Convencional. El enlace de hidrógeno no convencional es un enlace débil, ya que es aún menos lineal e involucra interacciones del tipo: CH---O, CH---N, OH--- π , NH--- π , CH---S; en algunos casos puede formar interacciones perpendiculares CH--- π , las cuales comúnmente se consideran como interacciones de van der Waals.

¿Qué hace diferentes a estas interacciones para ser consideradas como enlaces de hidrógeno y no interacciones de van der Waals? La diferencia fundamental es la direccionalidad del enlace, es decir, enlaces con simetrías cercanas a la linealidad son favorecidas energéticamente sobre aquellos “doblados”. En contraste, las interacciones de van der Waals son isotrópicas, es decir, sus energías son independientes del ángulo de contacto.

Un ejemplo de la relevancia del puente de hidrógeno no convencional se encuentra el caso de los puntos de fusión, en donde generalmente, un elevado punto de fusión se asocia a la presencia de puentes de hidrógeno. Al comparar los puntos de fusión del resorcinol (molécula con dos grupos alcohol) con la 1,4-benzoquinona (molécula con dos grupos cetona), los cuales tienen un peso molecular comparable, se observa que la 1,4-benzoquinona, la cual forma puentes de hidrógeno no convencionales, tiene mayor punto de fusión (116°C) que el resorcinol (111°C) [31, 32].

1.3.1.4 Interacciones π . Existen dos tipos de interacciones π que se presentan en los sistemas supramoleculares: (i) interacción catión- π , e (ii) interacción π - π .

Las interacciones π - π se presentan generalmente de dos formas. El primer tipo es la interacción cara-cara, en donde dos sistemas de anillos aromáticos paralelos, separados por una distancia 3.5 Å, se encuentran desplazadas uno del otro de tal manera que la interacción se da entre el centro de un anillo y la esquina del otro (figura 6 a). El segundo tipo es cuando hay un ordenamiento borde-cara, en donde un átomo de hidrógeno de uno de los anillos interactúa en orientación perpendicular con respecto al centro del otro anillo (figura 6 b).

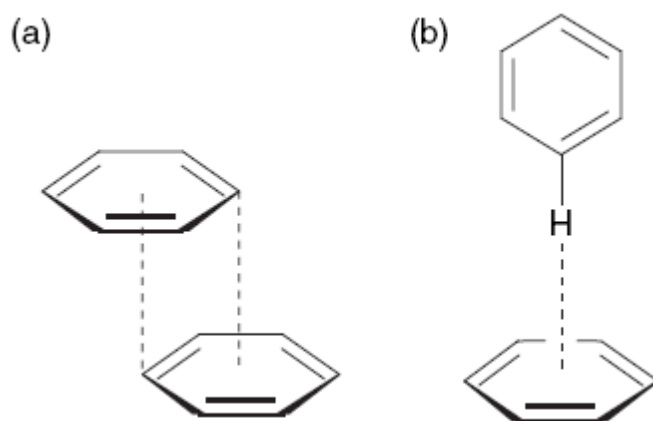


Figura 6. Geometrías de las interacciones π - π . a) Ordenamiento cara - cara y b) ordenamiento borde - cara.

La interacción $\pi-\pi$ surge de la atracción entre la carga negativa originada por la nube electrónica del sistema conjugado del anillo y la carga positiva del esqueleto de enlaces σ de una molécula vecina.

Las interacciones $\pi-\pi$ existen en la naturaleza y las podemos encontrar en la interacción cara-cara que se presenta entre las bases del ADN. Otro ejemplo es la estructura del grafito, que se mantiene unida mediante interacciones $\pi-\pi$ cara-cara (figura 7), las cuales son débiles y por lo tanto las capas que conforman el grafito se deslizan fácilmente unas con respecto a otras. Es por el deslizamiento de estas capas que el grafito se emplea en lubricantes.

1.3.1.5 Interacciones de van der Waals (interacciones de dispersión).

Las interacciones de van der Waals son efectos de dispersión que surgen de fluctuaciones de la distribución de electrones entre especies muy cercanas entre sí. La nube de electrones de una molécula es capaz de moverse de su ubicación momentánea en la molécula y con ello formar un dipolo instantáneo en la molécula. Este tipo de interacciones es no direccional [30].

Este desplazamiento en la distribución de electrones (o dipolo) entre dos especies adyacentes alineará a las moléculas de tal manera que la carga parcial positiva de una será atraída por la carga parcial negativa de otra y se producirá una interacción de London. La fuerza de éstas interacciones es dependiente de la polarizabilidad de la molécula; entre mayor sea ésta, mayor será la fuerza de interacción. La energía potencial de las interacciones de London decrece rápidamente conforme la distancia (r) entre las moléculas aumenta (depende del recíproco de la sexta potencia de la distancia; es decir, $1/r^6$). Este tipo de fuerzas son las responsables de la desviación de la idealidad de los gases reales. También son importantes en la formación de compuestos de inclusión o encapsulamiento de moléculas orgánicas pequeñas por cavidades moleculares [30].

Las interacciones de van der Waals o de dispersión también son conocidas como interacciones de London. Sin embargo, algunos autores agrupan las interacciones dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y las interacciones de dispersión con el nombre de interacciones de van der Waals.

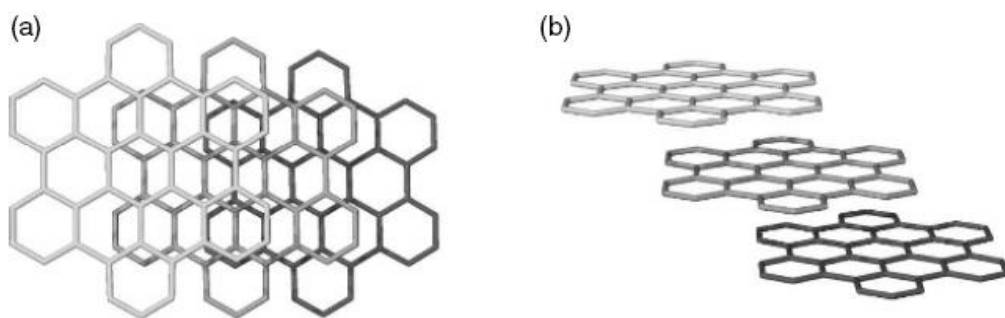


Figura 7. Interacciones $\pi-\pi$ cara-cara que mantienen unidas a las capas de grafito. Representación de las capas a) con un enfoque desde arriba y b) con enfoque de lado.

1.3.1.6 Efecto Hidrofóbico. El efecto hidrofóbico surge de la exclusión de los grupos o moléculas no polares de una solución acuosa (figura 8). Ésta situación es energéticamente más estable porque las moléculas de agua interactúan más fuerte entre ellas o con otras moléculas polares que con las no polares.

El efecto hidrofóbico juega un papel importante en algunos sistemas supramoleculares, por ejemplo, en el reconocimiento molecular de moléculas orgánicas por ciclofanos o ciclodextrinas en agua.

Dicha interacción puede dividirse en dos componentes energéticos conocidos como efecto hidrofóbico entálpico y efecto hidrofóbico entrópico [30].

Las interacciones con efecto hidrofóbico entálpico se presentan cuando un huésped reemplaza el agua contenida en una cavidad. Esto ocurre fácilmente ya que el agua no interactúa fuertemente con la cavidad hidrofóbica del receptor y la energía del sistema es alta. Una vez que el agua ha sido desplazada por el huésped, la energía del sistema disminuye por la interacción de las moléculas de agua excluidas de la cavidad con el resto del solvente. En este caso también hay un factor entrópico, ya que el agua que previamente se encontraba ordenada dentro de la cavidad se desordena fuera de la misma.

Las interacciones que presentan efecto hidrofóbico entrópico se presentan cuando hay dos o más moléculas orgánicas en solución acuosa, en donde cada una de ellas se encuentra rodeada de una capa ordenada de moléculas de agua con el fin de mantenerlas en solución.

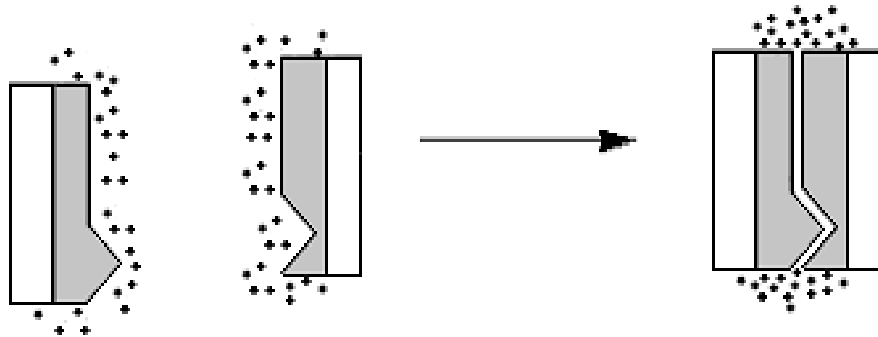


Figura 8. Representación del efecto hidrofóbico. Puede apreciarse el desplazamiento de las moléculas de agua (área punteada) de la superficie hidrofóbica (área gris) durante éste efecto.

Al llevarse a cabo la combinación de las mismas, se da la formación de una nueva capa de agua que rodea al complejo supramolecular formado. Sucedió esto, la superficie orgánica que se mantiene en solución disminuye, y con ello, la capa ordenada de moléculas de agua también será menor, hay menos interrupciones (un hueco en la fase acuosa en lugar múltiples huecos) y por lo tanto una ganancia entrópica y la energía libre del sistema disminuye [30] (figura 9).

1.3.2 Factores Entrópicos. Efecto Quelato y Preorganización

La formación de un complejo supramolecular formado por dos o más moléculas es desfavorable entrópicamente. El costo entrópico necesita ser compensado por la entalpía liberada durante la unión receptor – huésped y en virtud de ello existen diversas estrategias para reducir al mínimo dicho costo entrópico.

Una de ellas es incorporar más de un sitio de enlace en el receptor. Cuando el primer enlace se forma, el costo entrópico de unir dos moléculas es alto, pero el segundo y los subsecuentes enlaces entre las dos mismas moléculas ya no sufren la pérdida de entropía y por lo tanto su contribución a la energía libre de enlace es mayor. Este efecto es llamado efecto quelato y es muy conocido en química de coordinación desde hace mucho tiempo. Ligandos bidentados generan anillos y el efecto quelato depende del tamaño de dichos anillos. El tamaño óptimo es de anillos de cinco miembros, anillos más pequeños sufren de tensión angular y anillos más grandes requieren mayor cambio conformacional para formar el complejo.

Los mismos argumentos pueden utilizarse en la formación de un complejo supramolecular. Si el mismo número de sitios de enlace se incorporan a un receptor macrocíclico, la unión del huésped será más favorable, ya que cada ciclización reduce la flexibilidad conformacional del receptor libre y por lo tanto el costo entrópico será menor durante la complejación en el caso de un receptor macrocíclico comparado con un receptor análogo de cadena abierta. Estos conceptos fueron desarrollados por Donald Cram en el llamado principio de preorganización [20]: un receptor diseñado para poseer sitios de enlace en una conformación fija, complementaria a la conformación del huésped, lo unirá con mucha mayor fuerza que un receptor más flexible, el cual requerirá de un mayor cambio conformacional para la formación del complejo (mayor costo entrópico).

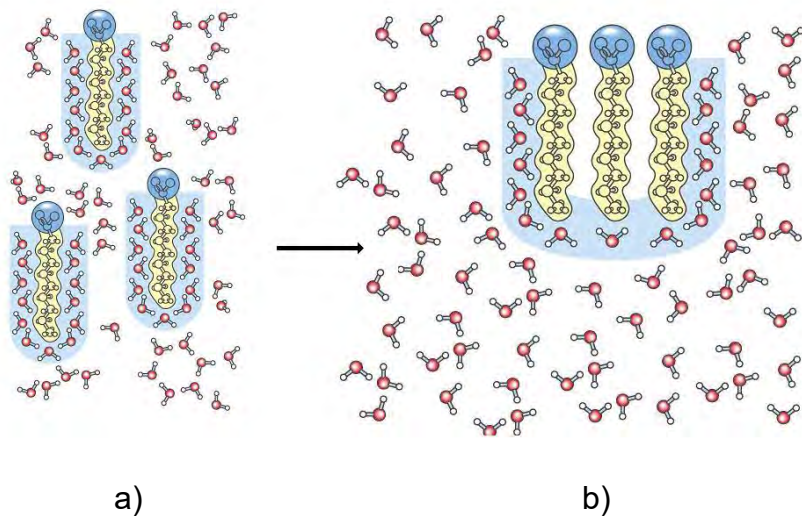


Figura 9. Interacción de moléculas orgánicas en solución acuosa durante el efecto hidrofóbico. a) Antes de interactuar, donde existe mayor número de huecos, b) Unión de grupos hidrofóbicos formando un solo hueco. El área azul representa la capa de agua ordenada rodeando los grupos hidrofóbicos (huecos).

Un ejemplo muy claro del principio de preorganización se presenta al comparar el ligando 18-corona-6, relativamente flexible, con el esferando de alta rigidez mostrado en la figura 10, el cual presenta seis átomos de oxígeno de una manera preorganizada para enlazar iones alcalinos: las constantes de asociación difieren en un factor de 10^{10} [20].

Cuando se discuten factores entrópicos se debe tener presente que existen complejos supramoleculares estables cuya entalpia de enlace es desfavorable, lo cual significa que su formación es conducida por entropía (entropy-driven host-guest binding). Esto es posible si el receptor en su forma libre contiene moléculas de solvente como huésped, las cuales se reemplazan por huéspedes de mayor tamaño. En esta circunstancia el complejo receptor-huésped libera más moléculas que las que se enlazan y la reacción global tiene una ganancia entrópica por el incremento de moléculas libres. En la siguiente sección se discute este fenómeno en mayor detalle.

1.3.3 Efecto del Solvente en la Estabilidad de Complejos.

En un sistema en donde se forman complejos anfitrión-huésped existen interacciones que compiten para formar a la especie supramolecular, estas pueden ser tanto de huéspedes potenciales e inclusive moléculas del solvente.

El número de moléculas del solvente es mucho mayor que las moléculas presentes del anfitrión y del huésped dentro del sistema, por lo que suelen marcar una diferencia significativa en la dinámica y energías de asociación propias de la interacción.

La importancia del solvente en la química supramolecular puede ser sumamente exagerada. En los casos de estado sólido, las moléculas de solvente normalmente son incluidas como huéspedes en las redes cristalinas y usualmente intervienen en la nucleación y deposición de un compuesto cristalino.

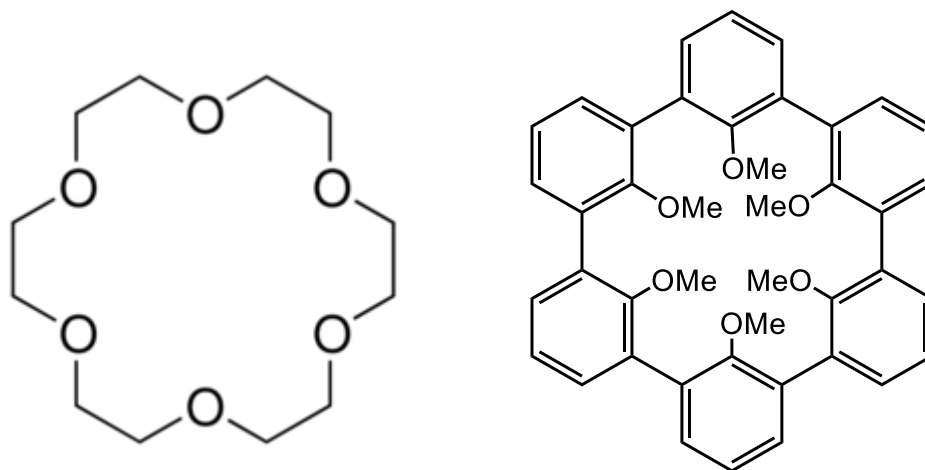


Figura 10. Comparación de las estructuras de los receptores 18-corona-6 (izquierda) y esferando (derecha) los cuales presentan diferente preorganización reflejándose en los valores de K_a en la unión de metales alcalinos. El esferando tiene un valor de K_a 10 órdenes de magnitud más grande que el 18-corona6 [20].

Por otro lado, cuando el anfitrión y el huésped están en solución, estos se encuentran rodeados por moléculas de solvente unidas a través de interacciones no covalentes. Para que ocurra la formación del complejo la mayoría de estas interacciones necesitan romperse, generando con ello modificaciones entálpicas y entrópicas. De esta manera, todos los fenómenos de complejación en solución están en competencia con las interacciones de solvatación

Entálpicamente se requiere un consumo de energía para romper los enlaces solvente-anfitrión y solvente-huésped. Sin embargo, este fenómeno provoca la remoción de moléculas de solvente, lo que les permite tener más grados de libertad en solución, aumentando en consecuencia la entropía y facilitando la formación de enlaces solvente-solvente [33, 34]. Los solventes polares, particularmente el agua, compiten efectivamente por sitios formadores de enlace de hidrógeno generando efectos hidrofóbicos de gran importancia.

Es por lo anterior que una discusión de la constante de afinidad sin mencionar el solvente carece de sentido. Hoy en día, un experimento común para diferenciar la afinidad de un receptor hacia varios huéspedes, consiste en disminuir la constante aparente variando la competitividad del solvente. De esta forma, las constantes muy grandes que resultan difíciles de medir en un determinado solvente, se ven disminuidas en solventes más competitivos y se vuelven experimentalmente medibles.

Un ejemplo de la influencia del solvente en las constantes de unión se muestra en la tabla 3 para el sistema del receptor A con el huésped imidazol (figura 11). En ella se observa claramente que la afinidad aumenta en solventes no polares, donde el mayor valor fue de $128,000 \text{ M}^{-1}$ obtenido en 1,1,2,2-tetracloroetano. Esto se debe a que este solvente es demasiado grande para entrar en la cavidad del receptor evitando así la competencia con el huésped por el sitio de unión [33].

Tabla 3. Influencia del solvente en la constante de afinidad del receptor A para el huésped orgánico neutro imidazol (298K) [33].

Solvente	Tipo de solvente	$K_{1:1}$ (M ⁻¹)
CH ₂ Cl ₂	No polar	240
CHCl ₃	No polar	490
CH ₃ CCl ₃	No polar	8161
CHCl ₂ CHCl ₂	No polar, de cadena más larga	128000
Tetrahidrofurano (THF)	No polar, coordinante	29.0
2-Me-THF	No polar, coordinante	77.0
2,5-Me ₂ -THF	No polar, coordinante	185
2,2-Me ₂ -THF	No polar, coordinante	156
2,2,5,5-Me ₄ -THF	No polar, coordinante impedido estéricamente	1067
Tetrahidropirano	No polar, coordinante	104
1,4-dioxano	No polar, coordinante	87
<i>ter</i> -butilmetiléter	No polar, coordinante	566
<i>iso</i> -propanol	Polar, prótico	13
<i>ter</i> -butil alcohol	Polar, prótico	66
Acetonitrilo	Polar, aprótico, coordinante	No se detecta asociación

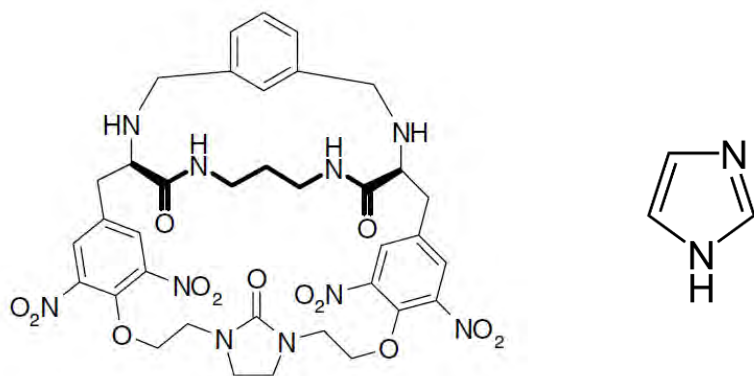


Figura 11. Estructura del receptor A utilizado en los experimentos de variación de la polaridad del solvente con el huésped imidazol [33].

1.3.4 Métodos de Determinación de la Estabilidad de Complejos Supramoleculares.

Una de las razones del lento avance de la química supramolecular en sus primeros años, a pesar de su evidente importancia en aspectos fundamentales para la química y la biología, es que las interacciones no covalentes requieren de métodos sofisticados para su estudio, los cuales no se habían desarrollado en los inicios de la química supramolecular [35]. El desarrollo de técnicas e instrumentos de mayor sensibilidad y poder de resolución, y sobre todo, la capacidad de procesamiento de las señales por los equipos de cómputo, ha permitido el avance en la química supramolecular. Dos técnicas que han hecho aportaciones significativas al estudio de la formación y estabilidad de los complejos supramoleculares son: química computacional y resonancia magnética nuclear.

1.3.4.1 Estudios Computacionales. La química computacional es la rama de la química teórica que se encarga del modelaje de aspectos químicos con ayuda de la computadora, la cual tiene aplicaciones en diversas ramas de la ciencia como lo son la química orgánica e inorgánica, espectroscopia, bioquímica, física, ciencia de materiales, entre otros.

La química computacional tiene como desafíos principales: predecir la estructura molecular, caracterizar a una molécula de acuerdo a sus niveles de energía y propiedades electrónicas, verificar la estabilidad de los sistemas químicos y determinar las diferencias de energía de diferentes estados, explicar los avances de las reacciones químicas, así como sus mecanismos a nivel atómico y molecular. Esta rama de la química se fundamenta en la mecánica cuántica.

Mediante la química computacional es posible eliminar buena parte del tiempo requerido en estudios experimentales y reducir los costos tanto en investigación como en docencia. Las ventajas que proporcionan los datos obtenidos por computadora no implica el abandono de los estudios experimentales, sino que debe considerarse a la química computacional como una guía poderosa para predecir el comportamiento molecular y va de la mano con la química experimental [35, 36].

En química computacional existen diversos métodos para la obtención de la información, los cuales se clasifican en tres grupos: 1) Mecánica Molecular, 2)

Semiempíricos y 3) DFT/*ab-initio* No todos los tipos de cálculos son posibles en todos los métodos, ni existe un método que sea el mejor para todo cálculo. El método a elegir depende de la información que se desea obtener y para cada uno existen ventajas y desventajas, las cuales se mencionan a continuación:

1. Mecánica molecular. Utiliza la física clásica y depende de campos de fuerza con parámetros obtenidos empíricamente. Se caracteriza por sus tiempos cortos de obtención de datos y por no requerir recursos sofisticados de cómputo. La principal desventaja es que solo se aplica a un limitado número de moléculas las cuales son generalmente sistemas de gran tamaño como las enzimas y no calcula sus propiedades electrónicas.
2. Métodos semiempíricos. Se aplican los principios de la física cuántica y parámetros empíricos obtenidos experimentalmente. Para los cálculos se requiere menos recursos de cómputo que en los métodos *ab initio*, y es capaz de calcular estados de transición y estados excitados. Los sistemas que pueden ser estudiados por estos métodos comprenden a moléculas de tamaño medio (a nivel de cientos de átomos).
3. *ab-initio*/DFT. Al igual que los métodos semiempíricos utiliza la física cuántica pero, a diferencia de estos últimos, no utiliza parámetros experimentales y es más riguroso matemáticamente. Puede estudiarse un amplio campo de sistemas y es capaz de calcular estados de transición y estados excitados. La principal desventaja es que necesita de recursos sofisticados de cómputo para un análisis eficiente, pero debido a esto los resultados obtenidos son de alta precisión. Los sistemas que califican para estudiarse por este método son sistemas pequeños (decenas de átomos) [35].

Con la descripción anterior podemos partir para seleccionar el mejor método para un sistema dado. En el presente trabajo de tesis, los sistemas a estudiar son complejos supramoleculares formados entre ciclofanos y aminoácidos los cuales cuentan con 220 átomos aproximadamente, por lo cual se seleccionó un método *ab initio* modificado, el método DFT, para el análisis teórico. El programa utilizado para ejecutar el método DFT fue el Gaussian 09 y se describirá a continuación.

1.3.4.1.1 Gaussian 09. Es un programa comercial utilizado en química teórica y fue lanzado inicialmente en año de 1970 por John Pople y su grupo de investigación en la Universidad Carnegie-Mellon con el nombre de Gaussian 70 el cual se ha actualizado continuamente desde entonces.

Los resultados que se logran con ayuda de éste programa se obtienen resolviendo la ecuación de Schrödinger basándose en la teoría de orbitales moleculares (TOM), en donde, a partir de unos parámetros iniciales (el tipo de método, funciones base y coordenadas iniciales de la molécula), calcula la función de onda molecular y se obtienen una serie de propiedades atómicas y moleculares tales como energía de la molécula, optimización de las coordenadas y densidad electrónica. De esta manera es posible obtener de manera precisa la energía conformacional de una molécula o complejo supramolecular y compararlo con resultados experimentales.

A partir de los cálculos es posible obtener la estructura de los sistemas estudiados utilizando el programa Gaussview u otros programas que permitan su visualización tales como pymol o chemcraft.

El programa Gaussian 09 puede utilizarse con el método de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT por sus siglas en inglés) en el cual debe señalarse el funcional que se utilizará durante los cálculos y este a su vez se utiliza con un funcional de base. A continuación se resumirá brevemente cada uno de los componentes utilizados comúnmente en la realización de cálculos teóricos con el programa Gaussian 09 [35].

1.3.4.1.2 Teoría del funcional de la densidad (DFT). Los métodos *ab initio* tradicionales se basan en una función de onda multielectrónica. Esta resolución de la ecuación de Schrödinger permite describir de forma exacta el comportamiento de sistemas muy pequeños pero su capacidad de predicción se ve limitada ya que son funciones demasiado complejas de resolver. El método DFT reformula este problema para ser capaz de obtener la energía y la distribución electrónica del estado fundamental, trabajando con el funcional de la densidad electrónica en lugar de

trabajar con la función de onda. DFT es más simple ya que la densidad electrónica sólo depende de 3 variables mientras que la función de onda de un sistema de N electrones depende de $3N$ variables.

La principal ventaja de utilizar la densidad electrónica y no una función de onda multielectrónica, es que es una magnitud mucho más simple que es más fácil de calcular y en consecuencia es posible analizar sistemas mucho más complejos [37].

1.3.4.1.3. Funcional híbrido B3LYP. Un funcional híbrido se refiere a la combinación del cálculo DFT con cálculos proveniente del método de Hartree-Fock. La hibridación con el intercambio exacto “Hartree-Fock” provee un esquema sencillo para mejorar muchas propiedades moleculares. Esta combinación hace que los resultados de sean más precisos y es necesaria para los cálculos con el método de DFT.

En el año de 1993, Axel Becke introdujo el enfoque híbrido para la construcción de aproximaciones del funcional de la densidad, y con ello nació el funcional de Becke. Más tarde Lee, Yang y Parr, introdujeron 3 parámetros más al funcional de Becke y el nombre cambió a B3LYP [36].

Un funcional híbrido de intercambio-correlación se construye como la combinación lineal del funcional del intercambio exacto de Hartree-Fock y cualquier número de funcionales de la densidad de intercambio y correlación explícitos. El funcional B3LYP posee bajos valores de error para la determinación de distancias de enlace [38].

1.3.4.1.4. Funciones de base. Existen dos tipos de funciones de base: las de Slater (STO) y tipo gaussianas (GTO). Las primeras se consideran de mejor descripción pero computacionalmente complicadas. Las funciones gaussianas dan una descripción de menor calidad pero se consideran de alta eficiencia.

El éxito de los cálculos teóricos radica en la correcta elección de la base, cuanto más pequeña sea, más bajo será el nivel de cálculo y cuanto mejor sea el tipo de base menor será el número de funciones requeridas para alcanzar el mismo nivel de precisión.

Una de las bases de mayor eficiencia en combinación con un buen nivel de cálculo es la función base **6-31G (d)** o también denominada 6-31G*, en la cual la capa interna de electrones en un orbital se describe con una función contraída de la combinación lineal de **seis** funciones primitivas. La capa de valencia se describe con una función interna formada por combinación lineal de **tres** funciones primitivas y **una** externa. Por último, a cada átomo diferente del hidrógeno se le añaden orbitales **d** (ó f). Es debido a estos parámetros que se le denomina con ese nombre [36, 38].

1.3.5 Resonancia Magnética Nuclear de Protón (H^1 RMN).

El fenómeno de resonancia magnética nuclear fue reportado en 1946. A partir de esa época RMN se ha convertido en una de las herramientas más poderosas en el mundo de la química orgánica, ya que con la información que proporciona es posible la obtención inequívoca de la estructura de un compuesto. Puede utilizarse únicamente para el estudio de núcleos con número de espín de $\frac{1}{2}$ tales como: 1H , ^{13}C , ^{19}F y ^{31}P .

Las características principales de ésta técnica se indican en su nombre: *resonancia*: éste término se refiere a la igualación de la frecuencia precesional del protón con la radiofrecuencia proveída por el instrumento de RMN, lo cual provoca que el protón cambie su espín y vaya de un nivel bajo a un nivel alto de energía; *magnética*: ya que se utiliza un campo magnético externo para orientar los núcleos bajo estudio, ya sea a favor o en contra de éste. Por último el término *nuclear*: se debe a que en ésta técnica se analizan a los núcleos capaces de presentar el fenómeno de resonancia.

1.3.5.1 Fundamentos Teóricos. Los núcleos con número atómico impar son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos, al tener carga positiva, poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se encuentran orientados al azar. Sin embargo, cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la figura 12, los núcleos con espín positivo se orientan en dirección al campo, en un estado de mínima energía denominado estado espín α , mientras que los núcleos con espín contrario se orientan en dirección opuesta al campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín β . Existen más núcleos en el estado espín α que en espín β y aunque la diferencia de población no es muy grande es lo suficiente para establecer las bases de la espectroscopia de RMN.

Los experimentos que se realizan mediante RMN se llevan a cabo tomando lectura de una muestra contenida en un tubo la cual se coloca dentro del equipo haciéndose girar. Al aplicar un campo magnético externo (B_0) se provocará la alineación de los diferentes protones ya sea a favor o en contra de B_0 . Dependiendo del ambiente químico de cada protón éstos absorberán a campo bajo o campo alto, lo cual dependerá de la densidad electrónica alrededor de los mismos. A mayor densidad electrónica alrededor de un protón, absorberá a campo más alto y viceversa. Los valores a los cuales absorben los protones se denominan desplazamientos químicos (δ) y son los que se registran en la pantalla del equipo para posteriormente interpretarlos.

La diferencia de energía de los estados paralelo y antiparalelo depende de la fuerza del campo aplicado B_0 , cuanto mayor sea éste existirá mayor diferencia energética entre los dos estados de espín.

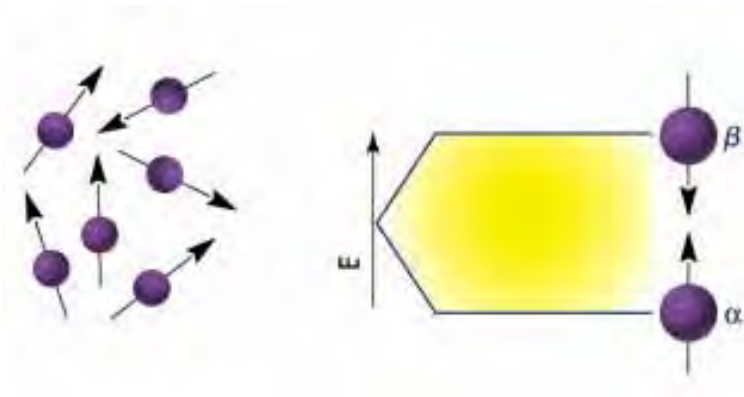


Figura 12. Orientación de los espines nucleares al azar (izquierda) y en presencia del campo magnético externo (derecha).

Cuando una muestra es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín α son promovidos al estado de espín β . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (rf) del espectro electromagnético. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía (ΔE) entre los estados de espín α y β . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN.

1.3.5.2. Obtención de Constantes de Asociación (K_a) por RMN H^1 . La importancia de la determinación de constantes de afinidad en el reconocimiento molecular radica en que las constantes son específicas para cada reacción y nos proporcionan directamente la estabilidad del complejo resultante. Entre mayor es el valor de K_a mayor estabilidad del complejo supramolecular formado.

Al igual que los receptores biológicos, los receptores artificiales se comportan de diferente manera de acuerdo a las condiciones en que se encuentren (presencia de metales, protones, pH del medio, temperatura, entre otros). A partir de las variaciones en estos parámetros se establecen las condiciones óptimas de reconocimiento molecular, para lo cual se tiene que obtener las constantes de asociación [5].

De manera muy general, para la determinación de K_a , debe de existir un sistema de equilibrio común, como se indica en la Ecuación (1), de la cual se obtiene K_a mediante la Ecuación (2).



$$K_a = \frac{[HR]}{[R][H]} \quad (2)$$

$$[R]_0 = [R] + [HR] \quad (3)$$

$$[H]_0 = [H] + [HR] \quad (4)$$

R: Receptor; H: Huésped; RH: Complejo Rece

ptor-Huésped (R-H)

$[R]_0$: Concentración inicial del receptor.

$[H]_0$: Concentración inicial del huésped.

$[R]$, $[H]$, $[RH]$: Concentración del receptor, huésped y el complejo respectivamente.

La ecuación 5 se obtiene despejando $[R]$ y $[H]$ de las Ecuaciones (3) y (4) y sustituyendo en la Ecuación (2).

$$K_a = \frac{[HR]}{([R]_0 - [HR]) ([H]_0 - [HR])} \quad (5)$$

De la ecuación (5) podemos determinar K_a .

En el caso de RMN 1H , los estudios se basan en que al menos un protón del sitio de unión de un complejo debe mostrar un desplazamiento químico que presente diferencia significativa de su valor en forma libre. Dicha diferencia proporciona la magnitud y la fuerza de unión de un complejo así como la estructura del mismo.

El cambio en el desplazamiento químico (δ) en las señales de los protones se debe a que en el complejo, la distancia que separa al receptor y al huésped es lo suficientemente pequeña para que su ambiente químico sea diferente y con ello también lo sea el valor de δ .

Si la velocidad de intercambio entre las formas libre y complejada del receptor es lo suficientemente lenta en la escala de tiempo en el que transcurre el fenómeno de resonancia, se logran observar diferentes señales (δ_R y δ_{HR}) para cada una de las formas del receptor. En éste caso, la fracción molar (n) del complejo (HG) puede calcularse partiendo de las intensidades relativas de las señales del complejo y receptor en forma libre.

$$\frac{I_{RH}}{I_{RH} + I_R} = n_{RH} \quad (6)$$

como:

$$[RH] = n_{RH}[H]_0 \quad (7)$$

sustituyendo ésta expresión en la Ecuación (5) se obtiene:

$$K_a = \frac{n_{RH}/[R]_0}{(1 - n_{RH}) ([H]_0/[R]_0 - n_{RH})} \quad (8)$$

Los parámetros de la ecuación 8 pueden obtenerse experimentalmente y con ello es posible calcular K_a .

El otro caso, cuando la velocidad de intercambio entre la forma libre y complejada es muy rápida, se registra una sola señal en el espectro, a un valor de desplazamiento químico promedio:

$$\delta = n_R \delta_R + n_{RH} \delta_{RH} \quad (9)$$

El cambio en la señal del protón del receptor con respecto a la posición del mismo en ausencia del sustrato, es proporcional al porcentaje de receptor que se encuentra en forma de complejo. Por lo tanto la constante de formación del complejo se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$\Delta\delta = \Delta\delta_{\max} [RH]/[R]_0 \quad (10)$$

En donde $\Delta\delta_{\max}$ es la diferencia de desplazamiento químico máximo del protón del receptor utilizado para el monitoreo de la titulación espectroscópica, es decir cuando la totalidad del receptor se encuentra como complejo. Lo anterior sucede cuando las concentraciones de sustrato son suficientemente elevadas $[H]_0/[R]_0 = \infty$.

$[RH]$ se sustituye por los valores de $\Delta\delta$ obtenidos de una titulación y despejando éste término de la ecuación (10) se obtiene:

$$[RH] = \frac{\Delta\delta_i}{\Delta\delta_{\max}} [R]_0 \quad (11)$$

Con lo anterior puede calcularse K_a de la forma:

$$K_a = \frac{\Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} [R]_0}{([H]_{0,i} - \Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} [R]_0) ([R]_0 - \Delta\delta_i/\Delta\delta_{\max} [R]_0)} \quad (12)$$

$[H]_0$ de la ecuación (8) se sustituyó por $[H]_{0,i}$ como se muestra en la Ecuación (12) lo cual se refiere a que la concentración del sustrato es diferente en cada solución que se utiliza en la titulación.

La obtención de K_a se realiza con el ajuste de los datos a partir de la curva de titulación, el cual puede realizarse mediante un método lineal o un método no lineal. El método lineal es muy sencillo, sin embargo, en este caso se requiere linearizar la ecuación y el ajuste de los resultados transformados no es estadísticamente equivalente al ajuste de los resultados primarios, ya que cualquier transformación de los datos cambia su valor estadístico [39].

En los casos en los que el grado de complejación es pequeño, o bien cuando las concentraciones del receptor y del huésped son bajas, se debe realizar un balance de masa para calcular K_a quedando la ecuación de la siguiente forma:

$$\delta_{obs} = \delta_H + 0.5\Delta\delta_{\infty} \left\{ \frac{[H]_T + [G]_T + \frac{1}{K} - \sqrt{\left([H]_T + [G]_T + \frac{1}{K}\right)^2 - 4[H]_T \cdot [G]_T}}{[H]_T} \right\} \quad (13)$$

En donde: δ_{obs} es el desplazamiento químico observado, δ_H es el desplazamiento del receptor en forma libre y $\Delta\delta_{\infty}$ es cambio máximo de desplazamiento químico inducido por complejación (CIS).

La ecuación 13 se emplea para ajustar las gráficas construidas directamente del desplazamiento químico (δ_{obs}) vs $[G]_T$ y para el ajuste de los datos experimentales queda de la siguiente forma:

$$\delta_{obs} = P1 + 0.5.P2 \left\{ \frac{P3 + X + \frac{1}{P4} - \sqrt{\left(P3 + X + \frac{1}{P4}\right)^2 - 4P3 \cdot X}}{P3} \right\} \quad (14)$$

donde:

$$P1 = \delta H$$

$$P2 = \Delta\delta_{\infty} \text{ (CIS)}$$

$$X = [G]_r$$

$$P3 = [H]_r$$

$$P4 = K_a$$

El ajuste no lineal proporciona el valor de K_a (P4) y CIS (P2).

1.3.5.3 Espectroscopia de Difusión Ordenada (DOSY). La espectroscopia de difusión ordenada (DOSY) se enfoca en la separación de las señales presentes en una mezcla de diferentes especies en base a su coeficiente de difusión (D) el cual depende de las diferencias de tamaño (peso molecular), forma y las propiedades físicas del medio ambiente tales como viscosidad y temperatura.

La medición de la difusión se lleva a cabo mediante la observación de la atenuación de las señales de RMN generando un gradiente del pulso del campo durante el experimento. El grado de atenuación es una función de la amplitud de pulso del gradiente magnético (G) y se produce a una velocidad proporcional al coeficiente de difusión (D) de la molécula (figura 13).

Esta técnica puede aplicarse en la química supramolecular para obtener evidencias de la formación de un complejo, dado que, al formar el complejo, se forma una nueva especie con un nuevo peso molecular y por lo tanto con un tamaño más grande.

Lo anterior modifica su difusión en el medio y se observa la aparición de una señal nueva, que no corresponde al receptor ni al huésped obteniendo con ello una prueba de la existencia del complejo supramolecular [41].

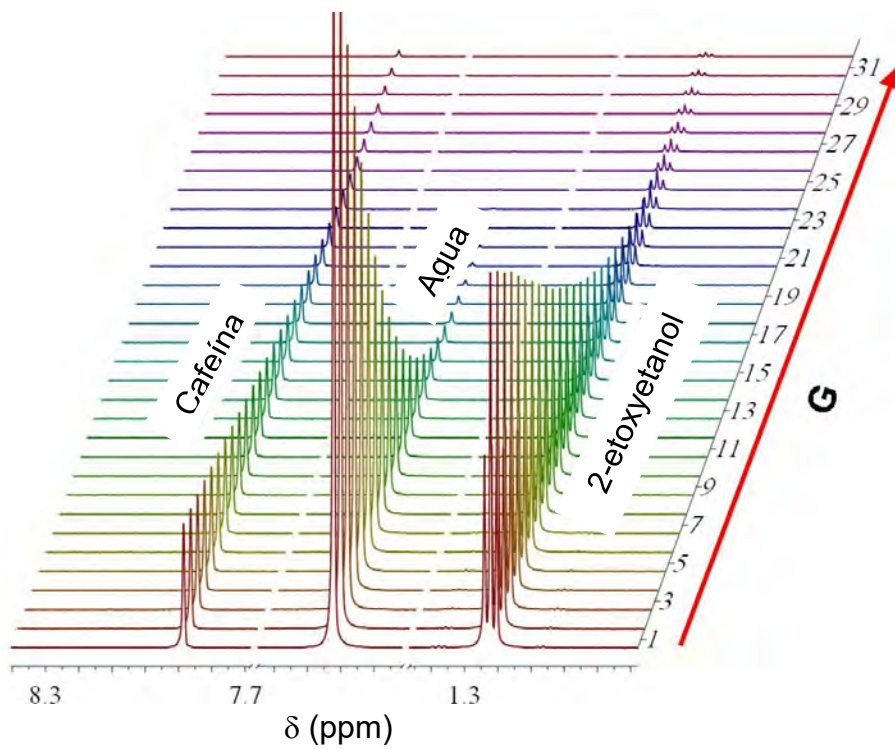


Figura 13. Variación en la intensidad de las señales de cafeína, agua y 2-etoxyetanol de conforme varía el gradiente del pulso del campo (G) en un experimento de DOSY.

1.4 Aminoácidos Básicos

Un aminoácido es una molécula que contiene un grupo carboxilo (-COOH) y un grupo amino (-NH₂) I. Los α -aminoácidos pueden representarse en general por NH₂-CHR-COOH, siendo R una cadena lateral característica de cada aminoácido la cual varía químicamente. Se conoce un gran número de aminoácidos, pero solo veinte de ellos forman a las proteínas uniéndose mediante enlaces covalentes conocidos como enlaces peptídicos. En todos los aminoácidos que componen proteínas (excepto la glicina) el carbono α es un carbono asimétrico (el carbono α es el adyacente al grupo carboxilo y amino). De esta manera, los aminoácidos se encuentran en dos formas, una es la imagen espejo de la otra (formas D y L).

Los veinte aminoácidos suelen clasificarse en cuatro grupos en base a la carga de su cadena lateral: aminoácidos con grupos R no polares o hidrofóbicos, aminoácidos con grupos R polares sin carga, aminoácidos cuyos grupos R están cargados positivamente y aquellos en los que se encuentran cargados negativamente. Esta clasificación se presenta en la tabla 4.

Nuestro organismo no es capaz de sintetizar todos los aminoácidos que requiere, por ello se clasifican como esenciales y no esenciales, el primer grupo se refiere a aquellos aminoácidos que el cuerpo humano no es capaz de producir y por lo tanto se deben suministrar a través de la dieta. Por otro lado los aminoácidos no esenciales son aquellos que si pueden ser sintetizados por el organismo [42].

Dentro de los aminoácidos esenciales se encuentran los tres aminoácidos con carga positiva: Lisina ,arginina e histidina.

Tabla 4. Clasificación de aminoácidos en base a la carga de su cadena lateral a pH=7.

No polares	Polares	Cargados Positivamente	Cargados negativamente
Alanina	Glicina	Lisina	Ácido aspártico
Valina	Serina	Arginina	Ácido glutâmico
Leucina	Treonina	Histidina	
Isoleucina	Cisteina		
Prolina	Asparagina		
Metionina	Glutamina		
Fenilalanina	Tirosina		
Triptofano			

Los aminoácidos están involucrados en procesos metabólicos diferentes de la síntesis de proteínas como los son la catálisis enzimática y la transmisión de señales del sistema nervioso. En ambos procesos el reconocimiento molecular es fundamental para que éstos últimos se lleven a cabo. La capacidad que tenga un aminoácido para unirse a un determinado anfitrión dependerá de los grupos presentes en el mismo, es decir, además de los grupos amino y carboxilo, la cadena lateral es determinante en el modo de interacción, ya sea por la polaridad de la misma o bien, por los efectos estéricos que pudiera presentar en el sistema.

El conocer cómo se da el reconocimiento de una macromolécula (o receptor) hacia un aminoácido ha despertado gran interés por elucidar estos procesos a nivel elemental, así como para la aplicación de dicho conocimiento en enfermedades como la epilepsia y el Alzheimer, lo cual permitiría en un futuro nuevas estrategias para su tratamiento [43, 44].

En general, los aminoácidos cargados ofrecen los mejores objetivos para el reconocimiento molecular en los sistemas bioquímicos. En particular, los aminoácidos básicos lisina, arginina e histidina ofrecen la posibilidad de presentar alta especificidad en virtud de las diferencias en los grupos funcionales de la cadena lateral: amino, guanidinio e imidazol, respectivamente.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Diseño Experimental

Los ciclofanos Cy1 y Cy2 (figura 14), precursores de los receptores sintetizados en la presente tesis, fueron reportados como receptores capaces de formar complejos supramoleculares en solución acuosa, con aminas catiónicas biológicamente importantes (feniletilamina, tiramina y dopamina) [2, 45] y con aminoácidos básicos (arginina y lisina) [16]. La estabilidad de los complejos fue proporcionada, principalmente, por interacciones electrostáticas entre los grupos carboxilatos pendientes ($-\text{CH}_2\text{COO}^-$) de los receptores y los grupos amino $-\text{NH}_3^+$ de los huéspedes, formando pares iónicos en solución acuosa (figura 15).

En estudios posteriores, la metil-esterificación de los grupos ácidos pendientes de Cy1 y Cy2 confirió a los receptores solubilidad en medio orgánico, y fueron capaces de formar complejos supramoleculares estables con ácidos carboxílicos a través de doble enlace de hidrógeno en cloroformo (figura 16) [46].

En el presente trabajo, con la síntesis de los derivados hexil y etilfenil éster de Cy1 y Cy2, se pretende que el incremento en la longitud de la cadena de los brazos pendientes provoque un aumento en la cavidad de los ciclofanos, formando estructuras en forma de balde (figura 17) y de esta manera lograr que los receptores sean capaces de formar complejos de inclusión. Además se espera que, al igual que los derivados metilestér, los derivados hexil y etilfenil éster sean solubles en solventes no polares, lo cual es importante ya que los ciclofanos poseen varios sitios potenciales para participar como aceptores o donadores en enlaces de hidrógeno; en medio acuoso, dichas interacciones se debilitan por la competencia con el solvente, mientras que en medio orgánico la participación de enlaces de hidrógeno múltiples entre el receptor y el huésped puede dar lugar a complejos supramoleculares con alta estabilidad.

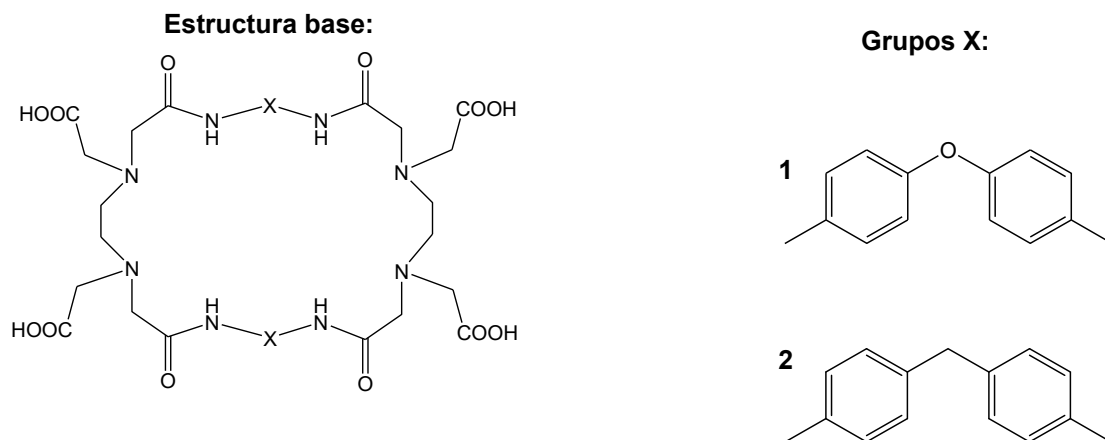


Figura 14. Estructura de los receptores Cy1 y Cy2.

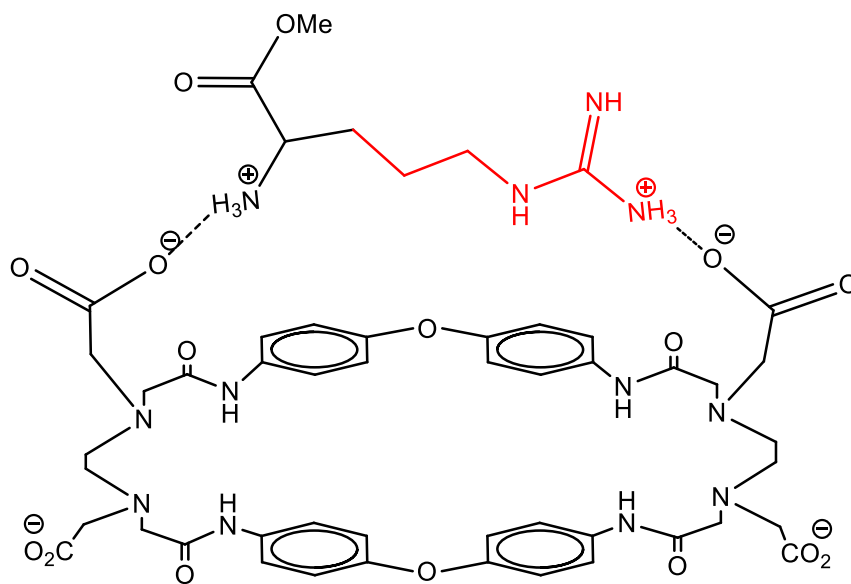


Figura 15. Complejo supramolecular formado entre el receptor Cy1 y el huésped L-arginina metil éster.

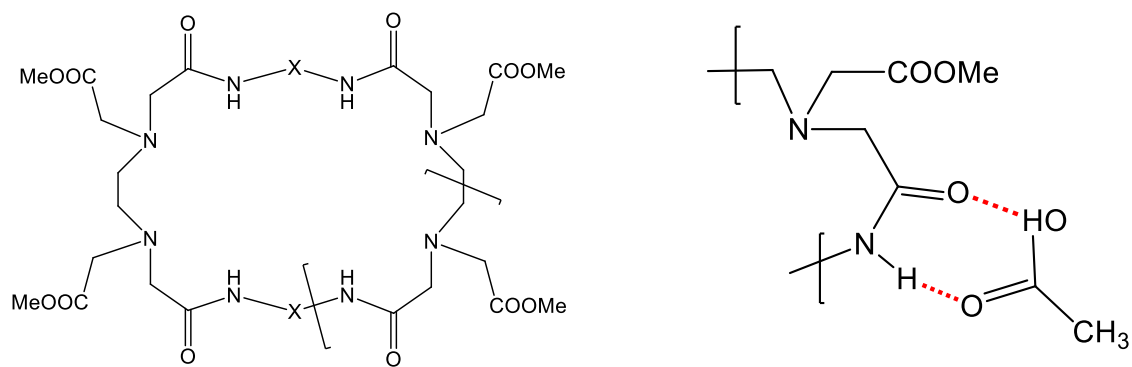


Figura 16. Representación de la interacción de doble puente de hidrógeno entre un receptor ciclofano y el ácido acético.

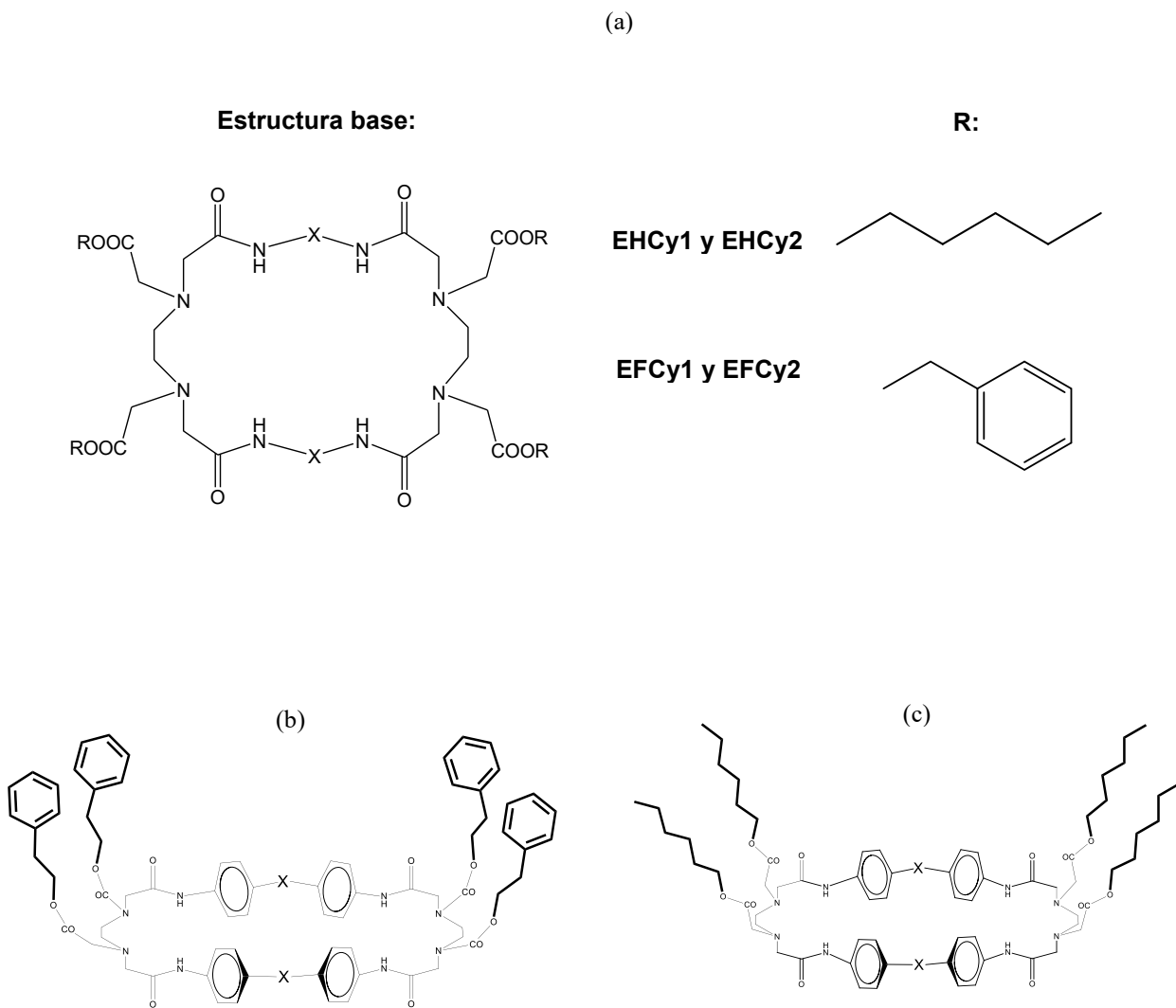


Figura 17. Estructuras del precursor ácido y sus modificaciones. (a) Estructura base de los precursores ácidos. Conformaciones tipo balde de los derivados éster de: etil-fenilo (b) y hexilo (c).

La razón de sintetizar dos derivados éster por cada ciclofano ácido, es obtener dos tipos de cadenas en los grupos pendientes que difieran en la rigidez y la naturaleza de la misma, ya que los grupos hexilo son más flexibles que los grupos etilfenilo; además el tipo de interacciones que se pueden presentar es diferente ya que las cadenas hexílicas pueden formar interacciones de van der Waals mientras las cadenas etilfenílicas también pueden formar interacciones $\pi-\pi$.

Los ciclofanos esterificados EHCy1, EHCy2, EFCy1 y EFCy2 se utilizarán como receptores artificiales en estudios de reconocimiento molecular de los aminoácidos básicos arginina y lisina en su forma metil éster (figura 18). Estos huéspedes poseen grupos amino en su cadena lateral que les confieren la capacidad de formar puentes de hidrógeno adicionales a los que se puedan presentar en los grupos amino y éster del carbón alfa.

Para determinar la estabilidad de un complejo existen diversos métodos, tanto teóricos como experimentales. En este trabajo los estudios teóricos coadyuvan a determinar tanto la estabilidad de los complejos supramoleculares como el tipo de interacciones que operan en los sistemas de interés; además, a partir de ellos es posible obtener la conformación más estable de cada sistema. Para ellos se utilizará el método de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés) el cual es un procedimiento variacional alternativo a la solución de la ecuación de Schrödinger, donde el funcional de la energía electrónica es minimizado con respecto a la densidad electrónica. Esto lo hace un método muy confiable y útil para calcular las estructuras de complejos supramoleculares. Para los estudios teóricos se utilizará el programa GAUSSIAN 09 realizando el cálculo con ayuda del funcional híbrido B3LYP y la función base 6-31G*.

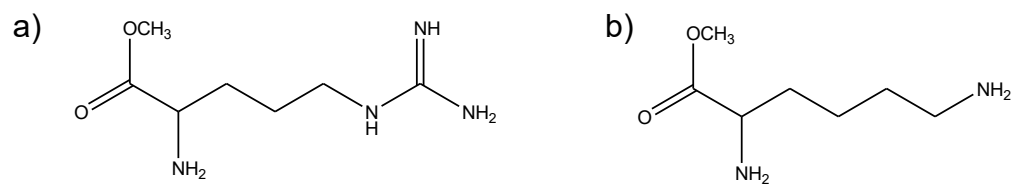


Figura 18. Estructura de los huéspedes utilizados en este trabajo. a) Arg-OMe y b) Lis-OMe.

Por otra parte, para determinar experimentalmente la constante de asociación (K_a) de un sistema y establecer los grupos funcionales que participan en las interacciones responsables de la formación de un complejo supramolecular, la técnica por excelencia es Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN ^1H). Los cambios en los desplazamientos químicos de las señales que se observan durante la formación del complejo receptor - huésped es la principal razón por la cual esta técnica es, por mucho, el método más importante para obtener las constantes de asociación. Inclusive, seleccionando apropiadamente las condiciones experimentales, se pueden obtener constantes de asociación confiables aún y cuando el cambio máximo en los desplazamientos químicos de las señales sea < 0.03 ppm [39]. Los protones que intervienen o están más próximos a los grupos funcionales que participan en la formación de la asociación receptor – sustrato son los que sufrirán los mayores cambios de desplazamiento químico y, en consecuencia, es posible proponer la estructura del complejo supramolecular.

2.2 Materiales

Los ciclofanos Cy1 y Cy2 y sus respectivos ésteres hexílicos EHCy1 y EHCy2 y etilfenílicos EFCy1 y EFCy2, fueron sintetizados y purificados de acuerdo a los procedimientos señalados en la sección de métodos para los cuales se utilizaron los siguientes reactivos:

1. Etilendiaminotetraacético dianhídrido (EDTA, $C_{10}H_{12}N_2O_6$) 98% ALDRICH
2. 4,4'-oxidianilina ($C_{12}H_{12}N_2O$) 97 % ALDRICH
3. 4,4'-metilendianilina ($C_{13}H_{14}N_2$) 97% ALDRICH
4. 1-Iodoheptano ($C_7H_{13}I$) 98% ALDRICH
5. 2-(Iodoetil)-1-benceno (C_8H_9I) 98% ALDRICH
6. Bicarbonato de potasio ($KHCO_3$) 99.7% Productos Químicos Monterrey
7. N,N,-dimetilformamida (DMF, C_3H_7NO) 99.9% Fisher Chemicals. Desecado previamente a las síntesis agregando malla molecular de 1.6 mm para eliminar la posible humedad contenida por el mismo.
8. Agua mQ
9. Éter de petróleo (99.99% Faga Lab)
10. Diclorometano (99.5% Vetec)
11. Acetona pura (100%)

Para los estudios de reconocimiento molecular se utilizaron los siguientes huéspedes y solventes, tal y como se obtuvieron de la fábrica.

12. L-Arginina metil éster dihidrocloruro ($C_7H_{11}N_3O_2 \cdot 2HCl$) 97% ALDRICH
13. L-Lisina metil éster dihidrocloruro ($C_7H_{16}N_2O_2 \cdot 2HCl$) 98% ALDRICH
14. L-Fenilalanina metil éster ($C_{10}H_{13}NO_2$) 98% ALDRICH
15. $CDCl_3$ 99.96% ALDRICH (con 1% de TMS como referencia)
- 16. DMSO 99.96% ALDRICH**

2.3 Métodos

2.3.1 Síntesis de los Ciclofanos 1 y 2 (Cy1 y Cy2).

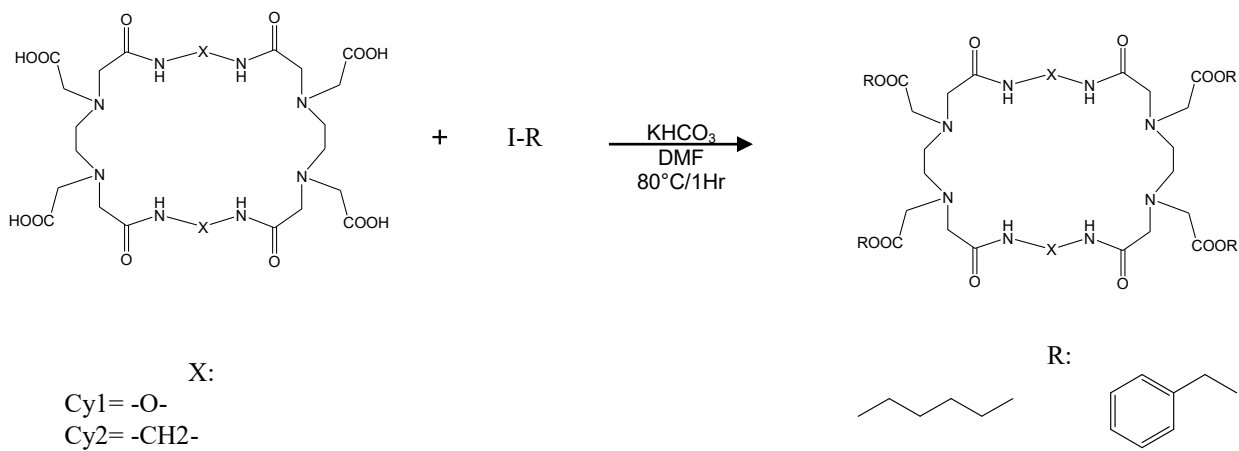
La síntesis de Cy1 y Cy2 se llevó a cabo por el método propuesto por Inoue y colaboradores [2], mediante la reacción de ciclización del EDTA dianhídrido con las correspondientes diaminas aromáticas (4,4'-oxidianilina y 4,4'-metilendianilina). La principal diferencia entre los ciclofanos es la rigidez, la cual depende del grupo funcional entre los anillos aromáticos de las diaminas aromáticas (-O- en Cy1 y -CH₂- en Cy2).

2.3.2 Síntesis de los Ésteres de Hexilo (EHCy1 y EHCy2) y Etilfenilo (EFCy1 y EFCy2) Mediante Síntesis Asistida por Microondas.

A partir de los receptores Cy1 y Cy2, mediante la síntesis asistida por microondas, se obtuvieron los receptores EHCy1 y EHCy2, EFCy1 y EFCy2. Esta técnica tiene la ventaja de reducir la cantidad de solvente empleado por técnicas convencionales, además de disminuir considerablemente el tiempo de reacción.

El procedimiento fue el siguiente: se hicieron reaccionar 1.0 equivalentes de Cy1 o Cy2, con 4.2 equivalentes de los yoduros correspondientes, 1-yodohexano o 2-(yodoetil)-1-benceno, para formar los ésteres hexilo y etilfenilo respectivamente, y 8.0 equivalentes de KHCO₃ con 5 mL de DMF como disolvente (esquema 1).

Las mejores condiciones para la esterificación se determinaron llevando a cabo la reacción a diferentes condiciones y monitoreando los productos mediante cromatografía de capa fina, estableciéndose finalmente las siguientes condiciones de reacción como óptimas: 80°C, 150 W, a presión constante durante 120 min, utilizando un equipo de microondas CEM Discover.



Esquema 1. Síntesis de los ciclofanos EHCy1, EHCy2, EFCy1 y EFCy2.

2.3.3 Purificación de los Ciclofanos EHCy1, EHCy2, EFCy1 y EFCy2.

Para la purificación de los ésteres sintetizados se siguieron los siguientes pasos: se agregaron 10 mL de agua y 10 mL de éter de petróleo a la solución de DMF obtenida de la mezcla de reacción para extraer el exceso de yoduro a la fase de éter de petróleo; se agitó la mezcla y se dejó reposar para la separación de fases durante 5 minutos para posteriormente, con ayuda de una pipeta Pasteur, extraer el éter de petróleo de la parte superior de la mezcla. El proceso de extracción se llevó a cabo diez veces de la misma forma. Se realizó un segundo tratamiento a la emulsión DMF/agua, pero en este caso utilizando diclorometano para extraer a los ésteres sintetizados. Con ayuda de una pipeta Pasteur se separó la fase inferior de la mezcla, correspondiente al diclorometano, el cual adquirió un color amarillo debido a la presencia del éster, y se recolectó en un vaso de precipitado de 100 mL. El procedimiento de extracción con diclorometano se realizó hasta que la fase inferior perdió el color amarillo. El volumen total de diclorometano recolectado se concentró en una placa de calentamiento hasta evaporar totalmente este disolvente. Una vez evaporado el diclorometano se agregaron 5 mL de acetona pura al extracto concentrado en el vaso y se filtró la parte insoluble. El sobrenadante amarillo se recolectó en un vial de 15 mL previamente pesado y se evaporó totalmente en una placa de calentamiento. Una vez evaporada la acetona se enfría el vial durante 5 minutos y posteriormente con ayuda de una espátula se raspa el precipitado. Finalmente el polvo obtenido se seca durante 6 horas en estufa de vacío a 25°C y se pesa para la obtención del rendimiento.

2.3.4 Caracterización de los Ciclofanos y Ésteres Obtenidos.

La formación de los productos de interés fue confirmada por:

- RMN ^1H y ^{13}C en un equipo Bruker Avance 400, a 25°C utilizando CDCl_3 como disolvente.
- Infrarrojo (IR) con un equipo (Perkin Elmer), modelo Spectrum GX con un sistema FT-IR, formando pastillas de KBr.
- Espectrometría de masas en un equipo de alta resolución (JEOL), modelo XH110Ade (Universidad de Arizona).

2.3.5 Estudios Teóricos de Reconocimiento Molecular Utilizando Gaussian 09.

Para determinar si es posible la formación de un complejo supramolecular y, en su caso, las estructuras más estables para los sistemas Cy1:Arg-OMe, EHCy1:Arg-OMe/Lis-OMe y EFCy1:Arg-OMe/Lys-OMe, se realizaron estudios teóricos mediante química computacional.

Los cálculos cuánticos se llevaron a cabo con el programa Gaussian 09 [36]. Las optimizaciones geométricas fueron llevadas a cabo con el método de la teoría del funcional de la densidad (DFT)-B3LYP [37], acoplado al conjunto de bases 6-31G* [46]. Los cálculos por el método DFT requiere de recursos de cómputo sofisticados y eficientes por lo cual se recurrió a realizarlos con ayuda del Área de Cómputo de Alto Rendimiento de la Universidad de Sonora (ACARUS) [35].

Se calcularon las energías de complejación (ΔE_C) (ecuación 15) para 70 estructuras posibles de los complejos supramoleculares:

$$\Delta E_C = E_{(R-H)} - (E_R + E_H) \quad (15)$$

En donde E_{R-H} se refiere a la energía del complejo receptor-huésped, E_R se refiere a la energía del receptor libre y E_H , a la energía del huésped libre.

Primeramente, tanto los receptores como los huéspedes se dibujan con ayuda del programa Gaussview del cual se originan los archivos de entrada correspondientes a cada molécula y son enviados por separado al programa GAUSSIAN 09, para minimizar la energía de cada uno de ellos.

Una vez finalizado el proceso de minimización energética de las moléculas del receptor y del sustrato, se realizó una búsqueda conformacional de los sistemas, la cual consiste en obtener una secuencia de posibles conformaciones cubriendo la superficie del receptor con el huésped. En cada caso se obtuvieron aproximadamente 70 modos de interacción cuyas geometrías fueron optimizadas.

Para cada conformación del complejo supramolecular se calculó la energía de disociación relativa. De esta forma, a la geometría más estable de un determinado sistema se le asignó un valor de 0 kcal mol⁻¹ de energía de complejación relativa y

el resto de las estructuras tienen valores positivos, en donde el valor más grande corresponde a la conformación menos estable.

Además, para obtener la energía de ancho de banda ($\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$) y correlacionar este valor con la estabilidad de los complejos supramoleculares formados, se calcularon las energías de los orbitales HOMO y LUMO, a un nivel de contorno de 0.022 a.u., para las especies iónicas y neutras de Cy1 y Arg-OMe en forma libre, así como para las estructuras más estables de los complejos supramoleculares formados.

2.3.6 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

2.3.6.1 Espectroscopia de Difusión Ordenada (DOSY). Esta técnica se basa en la obtención del coeficiente de difusión (D) de una molécula dada o un complejo supramolecular en solución, mediante un gradiente de pulsos del campo aplicado [41].

El experimento se realizó para comprobar la formación del complejo EFCy1:Arg-OMe, dado que, al unirse estas dos especies, forman una nueva entidad presente en la solución, con un nuevo peso molecular y por lo tanto con diferente valor de D que el encontrado para cada especie independiente.

El experimento se realizó en la universidad de Arizona, en un equipo Bruker AVANCE 600 a 289 K. Para ello se prepararon tres tubos: uno para el receptor EFCy1, uno para el huésped Arg-OMe y otro tubo con una mezcla receptor:huésped en relación 1:1. Las tres soluciones se prepararon a una concentración de 1 mM de cada compuesto en una mezcla de CDCl_3 :DMSO 75:25. Se determinó D para cada solución y se compararon los valores para cada caso. Si en el tubo de la mezcla, además de los coeficientes obtenidos para los tubos 1 y 2 (receptor y huésped en su forma libre), se obtiene un nuevo coeficiente D, se tiene evidencia inequívoca de la formación de una nueva especie, en este caso el complejo supramolecular.

2.3.6.2 Titulaciones. Se utilizó un espectrómetro modelo Bruker AVANCE 400 a una temperatura fija de 289 K (16 °C). La titulación se realizó en un tubo que contiene 0.5 mL de solución (en una mezcla CDCl_3 :DMSO- d_6 en relación 75:25) 4.5

mM de los diferentes receptores, a la cual se le añadieron 10 alícuotas de 5 μ L de solución de huésped 450 mM, tomando lectura de la solución de receptor libre y de cada inyección. En cada lectura se observan cambios en los valores correspondientes a los desplazamientos químicos de los protones aromáticos y amida de los receptores, debidos a la interacción entre los dos compuestos.

Conforme aumenta el valor de la relación molar del sistema, éste se encontrará más cercano a la saturación, por lo que el cambio en los desplazamientos químicos entre las lecturas, es cada vez menor. Una vez alcanzada la saturación, se procede al cálculo de K_a para cada sistema; para lo cual se utilizó la ecuación de ajuste no lineal para un modelo 1:1 (balance de masa) en el programa OriginPro 8.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Síntesis y Caracterización

A partir de la reacción asistida por microondas entre los precursores ácidos Cy1 y Cy2 con 1-iodohexano y (2-iodoetil)benceno, se sintetizaron cuatro nuevos receptores macrocíclicos con grupos pendientes hexiléster y etilfeniléster: 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(hexilcarboximetil)- 1, 4, 7, 10, 24, 27, 30, 33 -octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1]paraciclofano (**EHCy1**), 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(hexilcarboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza-[10.1.10.1]paraciclofano (**EHCy2**), 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis(etilfenilcarboximetil)- 1, 4, 7, 10, 24, 27, 30, 33 -octaaza-17,40-dioxa[10.1.10.1] paraciclofano (**EFCy1**) y 2,9,25,32-tetraoxo-4,7,27,30-tetrakis (etilfenilcarboximetil)-1,4,7,10,24,27,30,33-octaaza-[10.1.10.1]paraciclofano (**EFCy2**).

Las mejores condiciones de reacción fueron 80°C de temperatura por un tiempo de 120 minutos, de acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 5. Esto representa una mejora significativa respecto a las condiciones de la síntesis convencional, para la cual se requirió un tiempo de 20 h a temperatura ambiente para la obtención de los derivados metiléster [46].

Todos los productos de reacción son sólidos de color amarillo y se obtuvieron con los siguientes rendimientos: 43% para EHCy1 (punto de fusión: 82-84°C), 40% para EHCy2 (punto de fusión: 116-118°C) y 52% para EFCy1(punto de fusión 87-88°C). EFCy2 no fue posible su purificación.

La formación de los receptores fue confirmada mediante espectrometría de masas de alta resolución, RMN ¹H, RMN ¹³C e IR, cuyos resultados se muestran a continuación.

Tabla 5. Condiciones de síntesis utilizadas para establecer los parámetros de reacción óptimos para la esterificación con cadenas hexílicas y etilfenílicas.

No. de Reacción	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	25	No reacción
2	50	No reacción
3	60	No reacción
4	60	No reacción
5	60	No reacción
6	70	Incompleta
7	80	120
8	90	120

3.1.1 Espectrometría de Masas de Alta Resolución

Los espectros de masas de alta resolución para los ciclofanos EHCy1, EFCy1, EHCy2 y EFCy2 se presentan en el anexo 1. Los resultados obtenidos para los cuatro ciclofanos confirman la formación de los tetraésteres y se descarta la formación de los tri, di y monoésteres ya que no se observan los picos correspondientes a estas especies. Además, a partir del análisis isotópico del espectro de alta resolución del pico del ión molecular, se obtuvo la composición elemental para los ciclofanos, misma que en todos los casos proporcionó los resultados esperados teóricamente para cada fórmula molecular y es indicada entre paréntesis en cada caso.

3.1.1.1 EHCy1. Los picos de mayor intensidad se presentan a valores de m/z de 1249.40 y 1271.60 los cuales coinciden con los valores esperados para los iones $(M-H)^+$ y $(M-Na)^+$ respectivamente. Análisis isotópico ($C_{68}H_{96}N_8O_{14}$): C= 65.31% (65.36%), H= 7.82% (7.74%), N= 17.91% (17.93%) y O= 8.96 (8.97%).

3.1.1.2 EFCy1. Señal de mayor intensidad a 1329.30 m/z lo cual correlaciona con el ión molecular esperado. Análisis isotópico ($C_{76}H_{80}N_8O_{14}$): C= 68.61% (68.66), H= 6.14% (6.07%), N= 16.84% (16.85) y O= 8.42% (8.43%).

3.1.1.3 EHCy2. Muestra los picos m/z a 1245.38 $[(M-H)^+]$ y 1267.53 $[(M-Na)^+]$, además del pico de mayor intensidad a 623.34 m/z correspondiente a la especie $(M/2-H)^+$. Análisis isotópico ($C_{70}H_{100}N_8O_{12}$): C= 67.44% (67.50), H= 8.17% (8.09), N=15.40 % (15.41), O= 8.99% (9.00).

3.1.1.4 EFCy2. Pico de mayor intensidad a 1325.55 m/z cuyo valor correlaciona con el ión molecular esperado. Análisis isotópico ($C_{76}H_{80}N_8O_{14}$): C= 69.47% (69.47), H= 6.28% (6.28), N=8.31% (8.31), Na= 1.7% (1.7) y O= 14.24% (14.24). En este caso, a pesar de que se logró la formación del tetraéster, no se logró su purificación.

3.1.2 Resonancia Magnética Nuclear de ^1H

Los espectros de RMN ^1H con su correspondiente asignación de señales para EHCy1, EHCy2 y EFCy1 se muestran en las figuras 19-21.

En los espectros de los tres receptores la señal de los protones *g*, que corresponde a los protones del carbono unido al oxígeno del grupo éster, se presenta a ≈ 4.1 ppm, lo que confirma la formación del éster. En todos los casos, la intensidad relativa de la señal *g* es la esperada para el macrociclo con los cuatro grupos pendientes esterificados.

Las señales de los protones aromáticos *e* se presentan como un doblete a 6.7 ppm para EHCy1 y EFCy1, y 7.0 ppm para EHCy2, mientras que los protones aromáticos *d*, también como doblete, se ubican a 7.4 ppm en EHCy1, 7.7 ppm en EFCy1 y 7.5 ppm en EHCy2.

Es importante resaltar que los protones aromáticos *d* para el hexiléster (EHCy1) se ubican con 0.3 ppm de diferencia respecto al etilfeniléster (EFCy1), lo cual indica que la posición relativa de los planos de los grupo fenilo es diferente en ambos casos; este comportamiento debe atribuirse al efecto del tipo de cadena éster sobre el arreglo de la cavidad del macrociclo.

En las señales *d* y *e* de EFCy1 se observan desdoblamientos adicionales al doblete que se observa en el precursor Cy1. Esto se atribuye a un aumento en la rigidez de la cavidad del macrociclo por efecto de las cadenas etilfenílicas de los brazos pendientes. Dicho efecto también se observa, aunque en menor medida, en EHCy1, y no se observa en EHCy2, indicando menor rigidez –mayor flexibilidad- en los receptores con cadenas hexílicas.

En ambos receptores EHCy1 y EHCy2, las señales correspondientes a los protones alifáticos (*h*, *i*, *j*, *k* y *l*) de las cadenas hexílicas aparecen entre 0.9-1.7 ppm.

En EFCy1 el protón bencílico *h* de las cadenas etilfenílicas se presenta a 3 ppm y los protones aromáticos del grupo fenilo del éster (*i,j* y *k*) a 7.2 ppm.

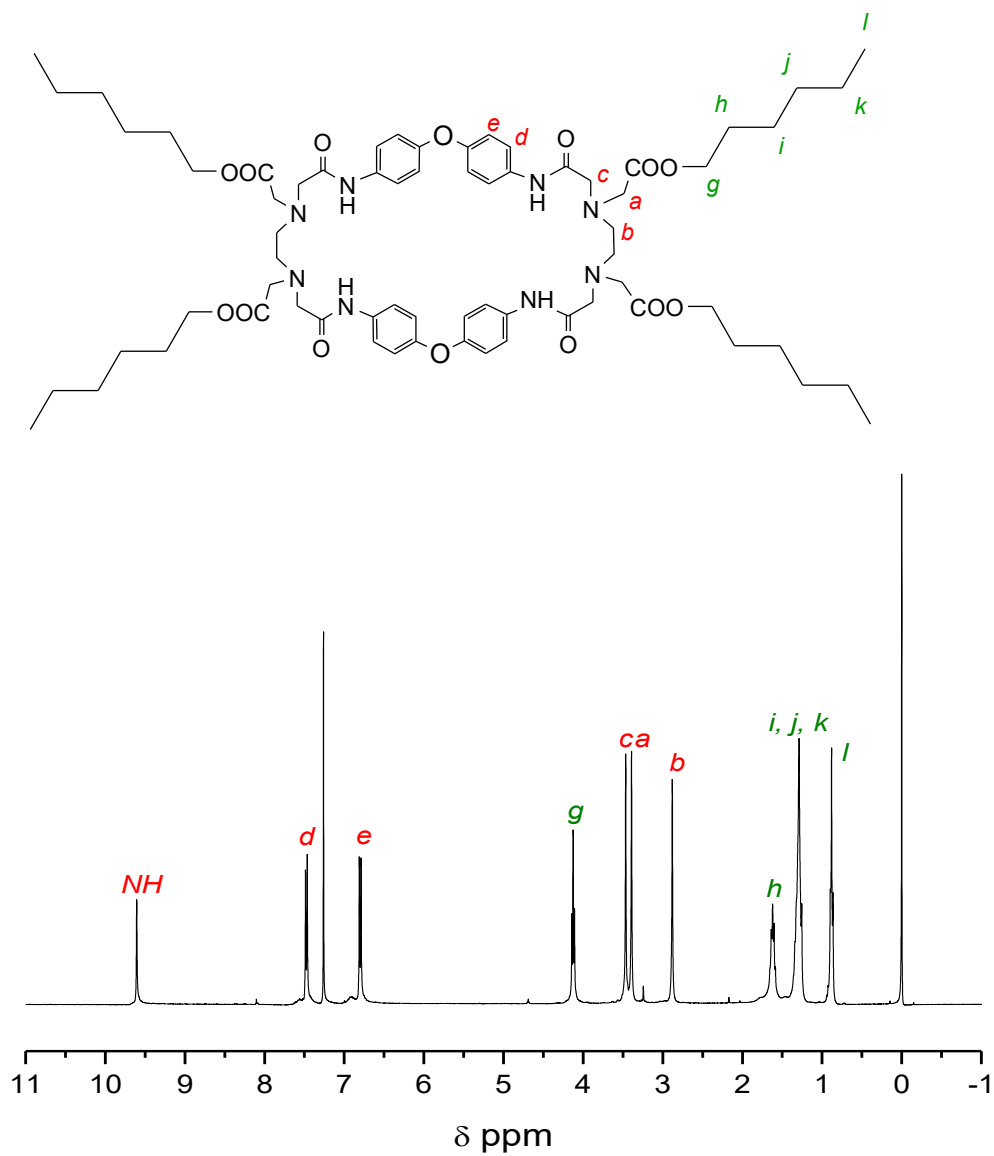


Figura 19. Espectro de ^1H RMN de EHCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.

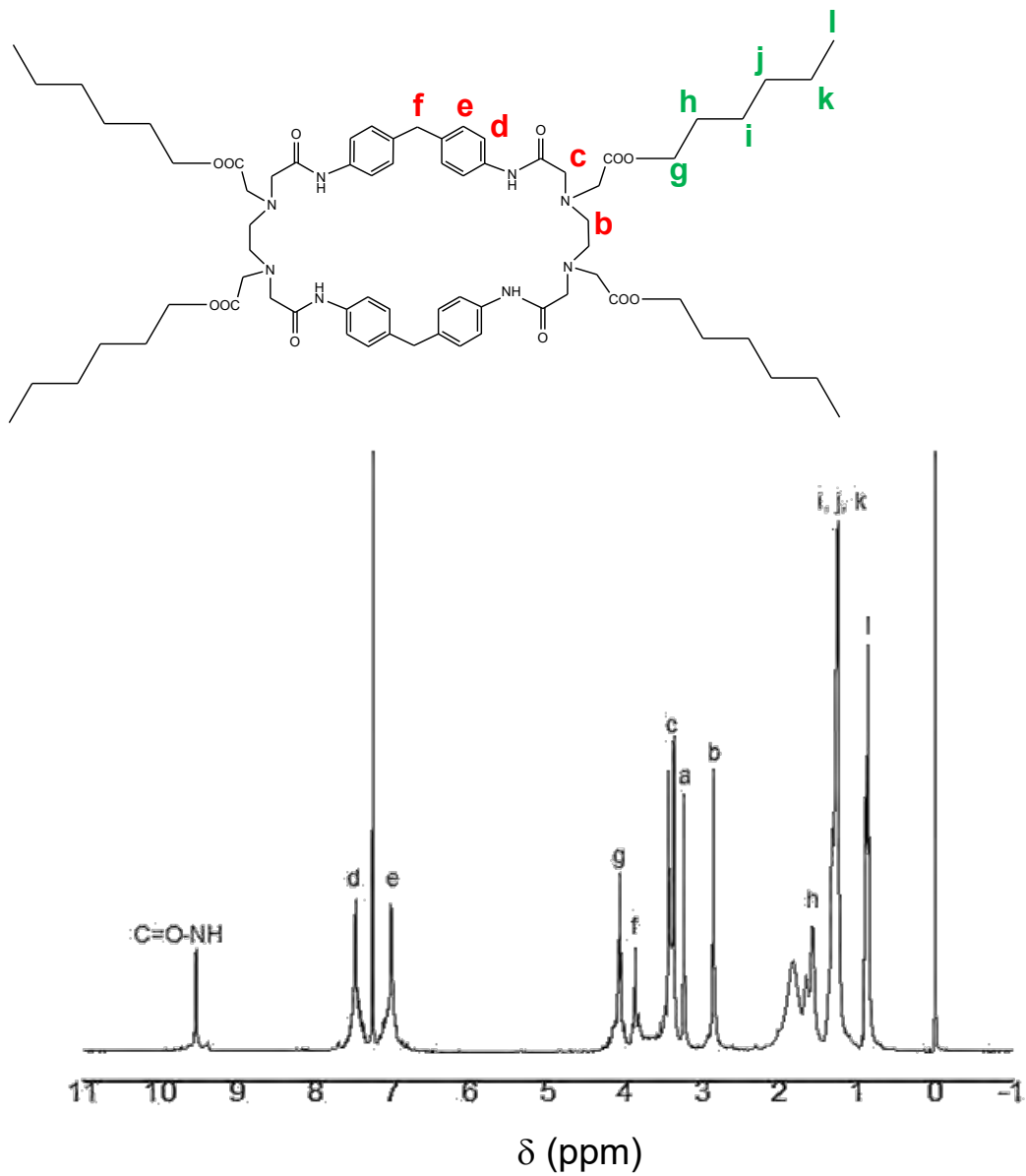


Figura 20. Espectro de ^1H RMN de EHCy2 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.

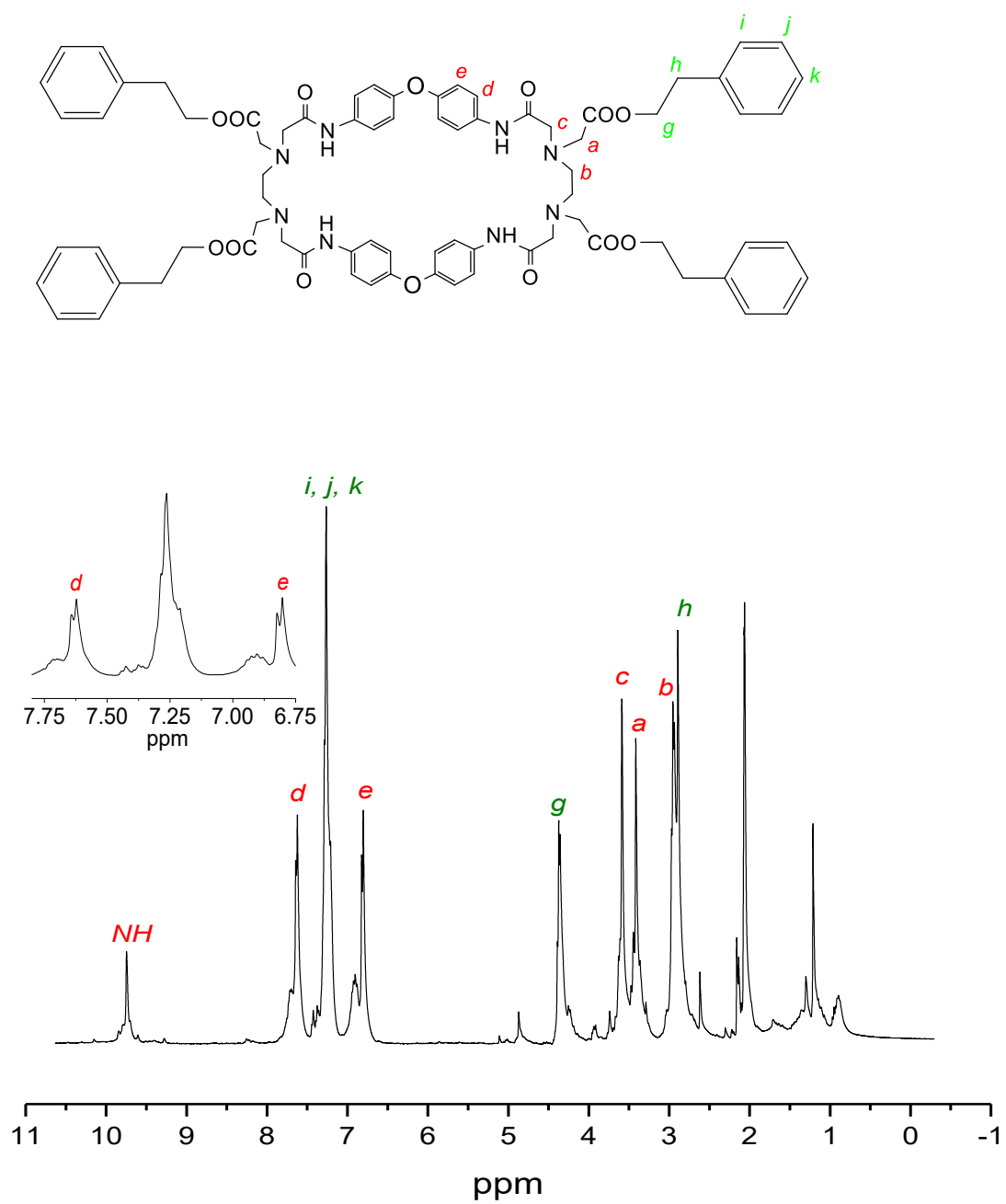


Figura 21. Espectro de ^1H RMN de EFCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.

En los espectros de RMN ^1H de los receptores EHCy1, EHCy2 y EFCy1, las intensidades relativas de todas las señales corresponden a las esperadas lo cual confirma su pureza.

El espectro de RMN ^1H de EFCy2 se muestra en la figura 22, en el cual se observan más señales de las esperadas, lo que indica falta de pureza del receptor. Es importante indicar que el espectro de masas del precursor Cy2 presenta las señales de las especies 3:3 y 4:4 (anexo 2), por lo cual es probable que en este caso se tenga una mezcla de etilfenilésteres de dichas especies (esto no ocurre en el caso de EHCy2 ya que se utilizó Cy2 proveniente de otro lote de síntesis).

3.1.3 Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C

Los espectros de ^{13}C RMN de EHCy1, EHCy2 y EFCy1, con sus respectivas asignaciones para cada señal, se muestran en las figuras 23-25. Debido a la baja solubilidad del receptor EFCy2, no se pudo obtener el espectro de RMN ^{13}C . A continuación, a manera de ejemplo, se describen las asignaciones para EHCy1. Se observan las 15 señales esperadas para cada tipo de carbono: las 5 señales ubicadas en la región de 14 – 32 ppm son asignadas los 5 carbonos alifáticos de la cadena éster del macrociclo; las tres señales que se encuentran entre 53 y 60 ppm corresponden a los grupos metileno unidos a los grupos amino del macrociclo; la señal ubicada en 65 ppm corresponde a los carbonos unidos al oxígeno del éster; los carbonos aromáticos que contienen átomos de hidrógeno se ubican en 118 y 121 ppm, mientras que los carbonos aromáticos unidos a nitrógeno y oxígeno se presentan en 132 y 153 ppm respectivamente. Por último los carbonos pertenecientes a los grupos carbonilo de amida y carboxilo aparecen en 168 ppm el primero y 172 pm el segundo.

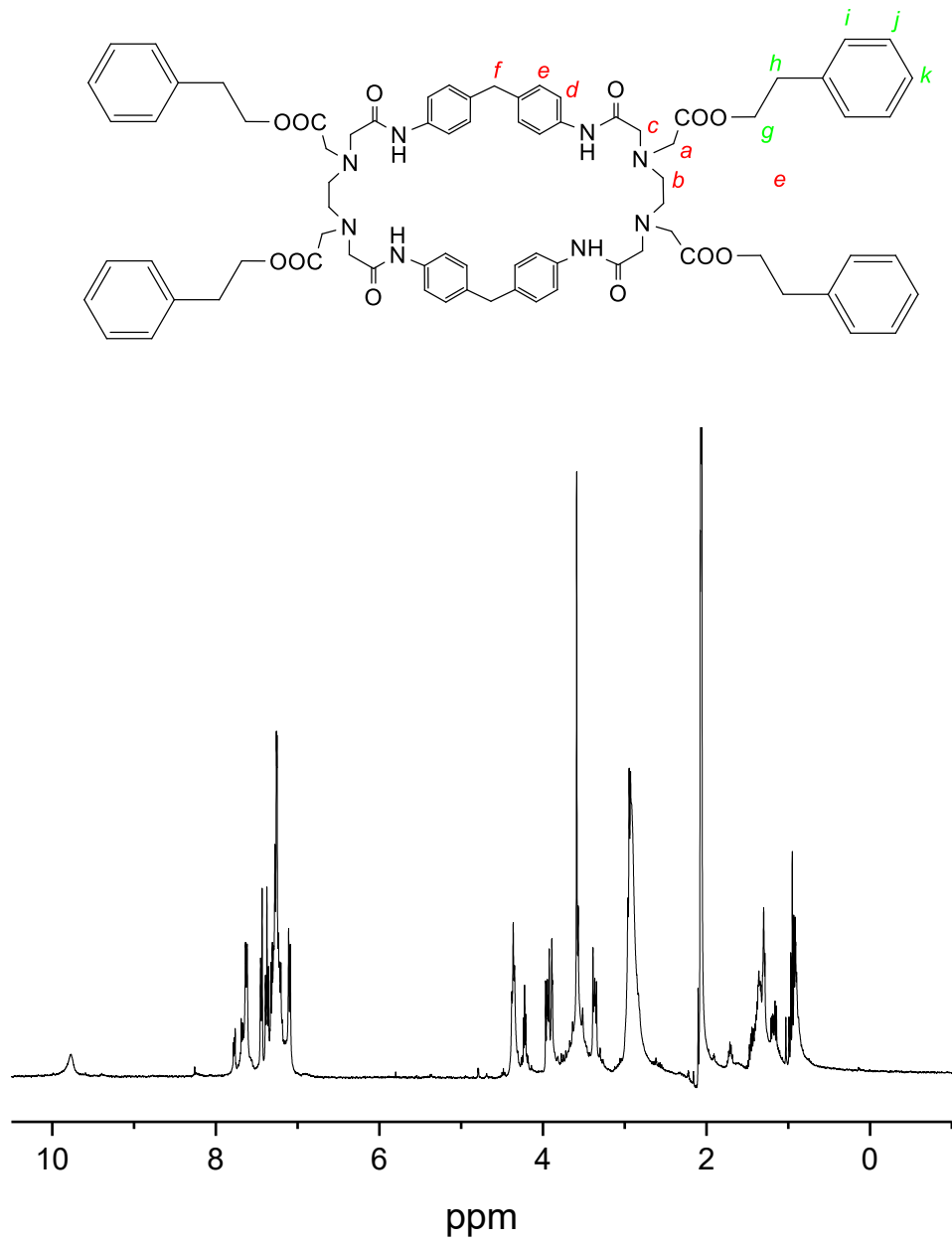


Figura 22. Espectro de ^1H RMN de EFCy2 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.

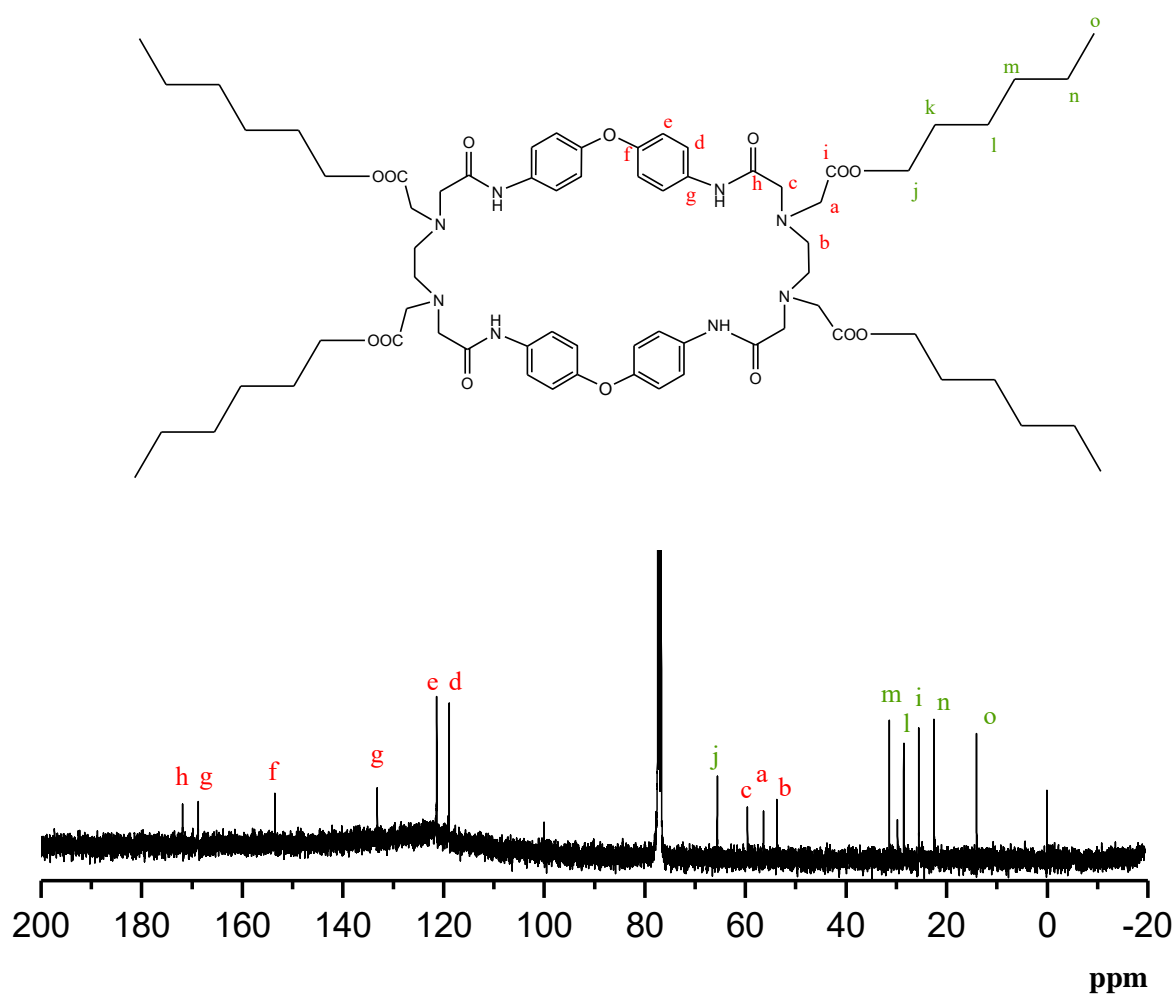


Figura 23. Espectro de ^{13}C RMN de EHCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.

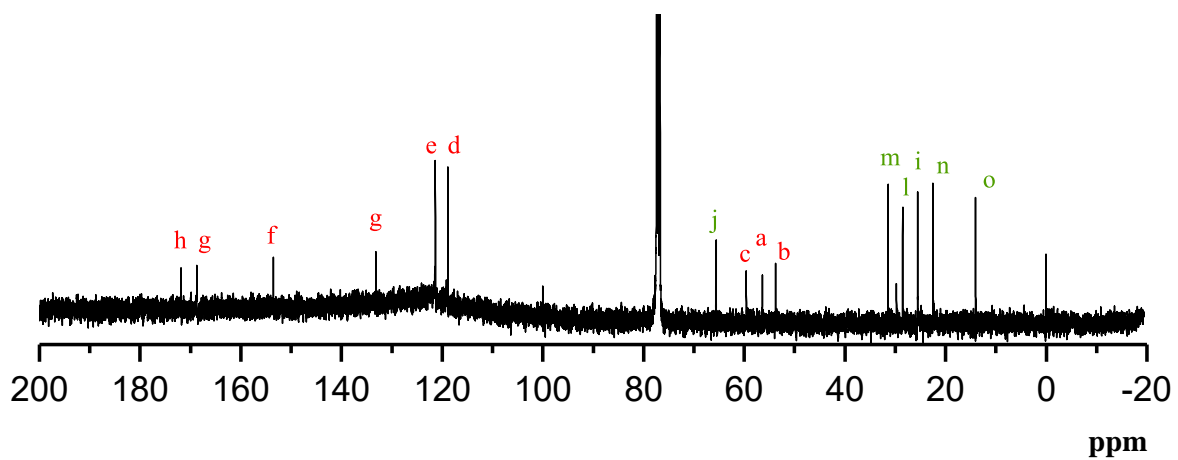
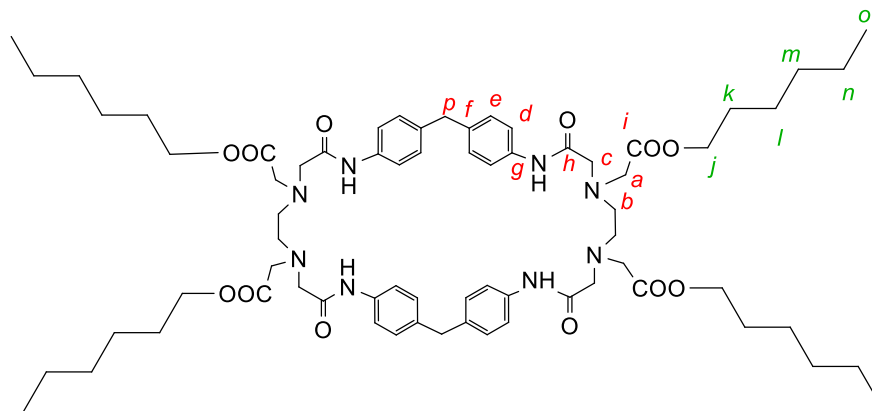


Figura 24. Espectro de ^{13}C RMN de EHCy2 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz

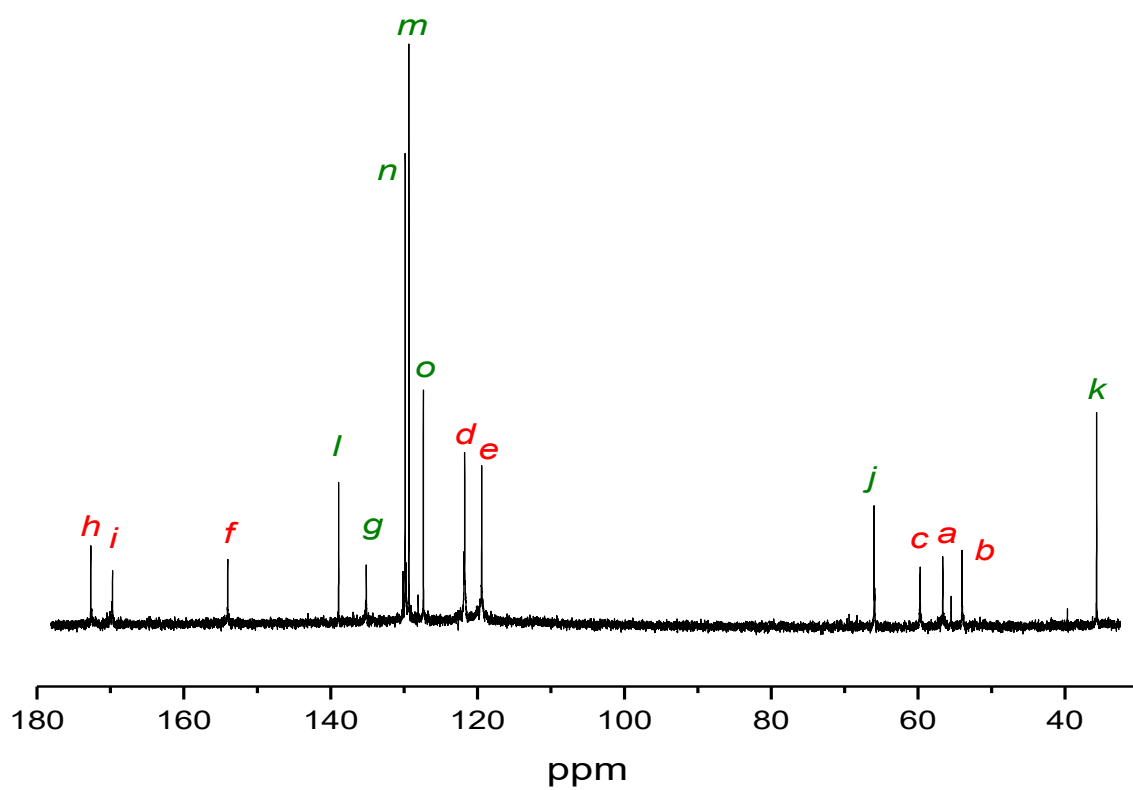
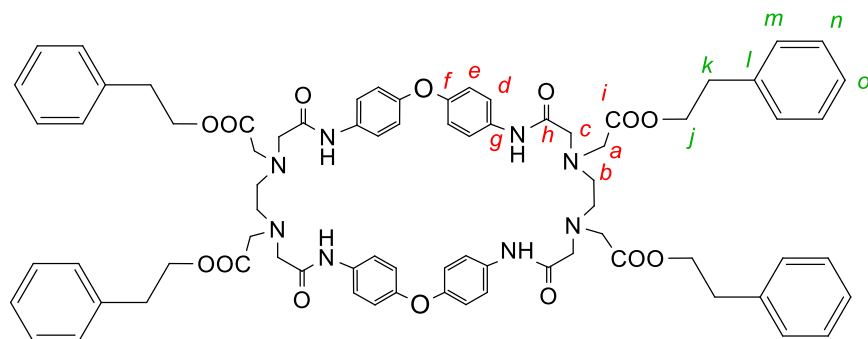


Figura 25. Espectro de ^{13}C RMN de EFCy1 en CDCl_3 obtenido a 25°C en un equipo Bruker de 400 MHz.

3.1.4 Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo para los ciclofanos EHCy1, EHCy2, EFCy1 y EFCy2 se presentan en el anexo 3.

Como ejemplo, los espectros de IR para los receptores Cy1 (forma ácida) y EHCy1 (hexiléster) se muestran en la figura 26. La primera evidencia de la formación de EHCy1 es la desaparición de la banda ancha a los 3000 cm^{-1} que corresponde al OH de los grupos carboxilo de Cy1, los cuales no están presentes en EHCy1. La formación del éster se confirma con el desplazamiento de una de las bandas correspondientes a los dos tipos de grupos carbonilos (amida y ácido) que en Cy1 aparecen empalmadas en 1680 cm^{-1} y se desdoblán en dos señales a 1720 y 1680 cm^{-1} en EHCy1, la primera de las cuales corresponde al grupo carbonilo del éster.

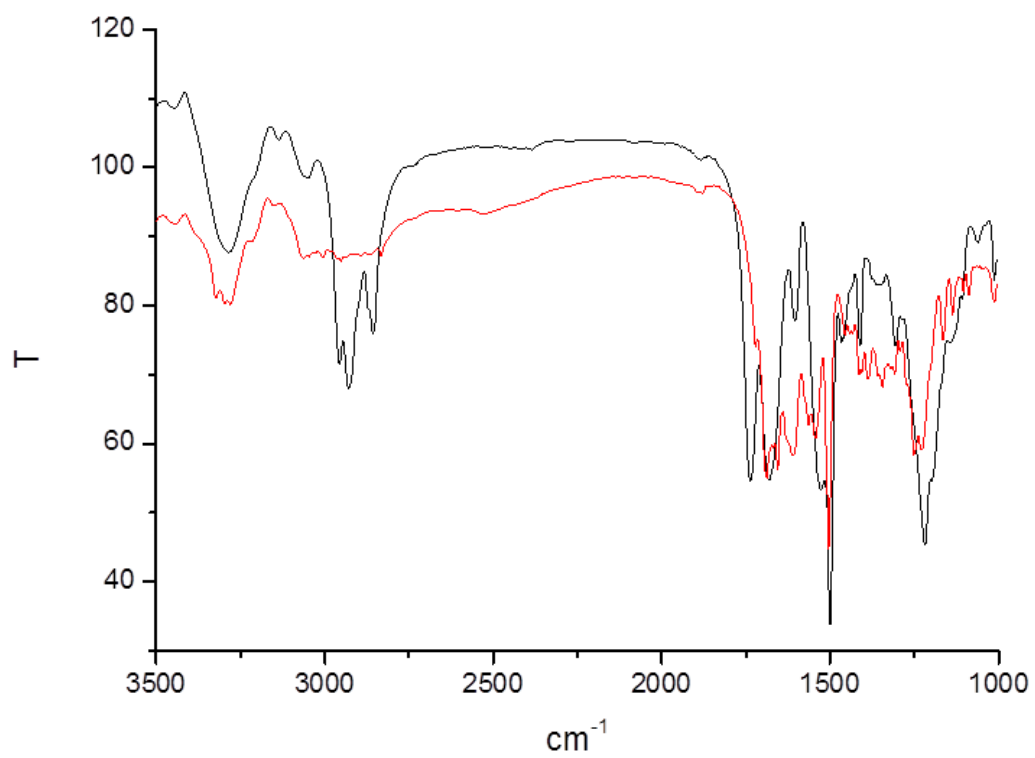


Figura 26. Espectros de infrarrojo de los receptores Cy1 (línea roja) y EHCy1 (línea negra) obtenido en KBr.

3.2 Estudios Teóricos (DFT) de Reconocimiento Molecular del Precursor Ácido Cy1 con Arg-OMe

Los estudios teóricos de reconocimiento molecular se llevaron a cabo para el receptor Cy1, tanto en su forma neutra como en su forma ionizada, hacia arginina metil éster (Arg-OMe) (figura 27). Se obtuvieron las conformaciones más estables, del receptor y de los sustratos en su forma libre, así como de los complejos supramoleculares formados, y se calcularon las energías de complejación (ΔE) y de complejación relativa (ΔE_{rel}) y las energía de ancho de banda ($\Delta E_{HOMO/LUMO}$) de los complejos supramoleculares más estables de cada sistema.

3.2.1 Cy1 y (Cy1)²⁻ en su Forma Libre.

Cy1 en su forma neutra es más estable que (Cy1)²⁻, con una diferencia de energía de 2.53 kcal/mol y un valor $\Delta E_{HOMO/LUMO}$ de 4.51 eV comparado con 1.06 eV para (Cy1)²⁻.

Las geometrías más estables para ambas especies se presentan en la figura 28. Como puede observarse las geometrías son no simétricas y son muy diferentes entre ellas. El ciclofano aniónico tiene ángulos Phe-O-Phe más pequeños y una cavidad menor que el ciclofano neutro; además, en (Cy1)²⁻ uno de los carboxilatos pendientes forma un enlace de hidrógeno intramolecular con un grupo amino de la cavidad, con una distancia de enlace de 1.80 Å. El cambio del ángulo Phe-O-Phe se confirma experimentalmente mediante el espectro de RMN ¹H, en el cual la señal de los protones aromáticos en posición orto respecto al átomo de oxígeno que une los grupos fenilo, sufre un desplazamiento a campo alto al protonarse los nitrógenos amina, mismos que se encuentran muy alejados de los protones aromáticos. De acuerdo a Inoue y colaboradores [2, 45], dicho desplazamiento se explica por el cambio de ángulo entre los planos moleculares de los dos grupos fenilos vecinos [45].

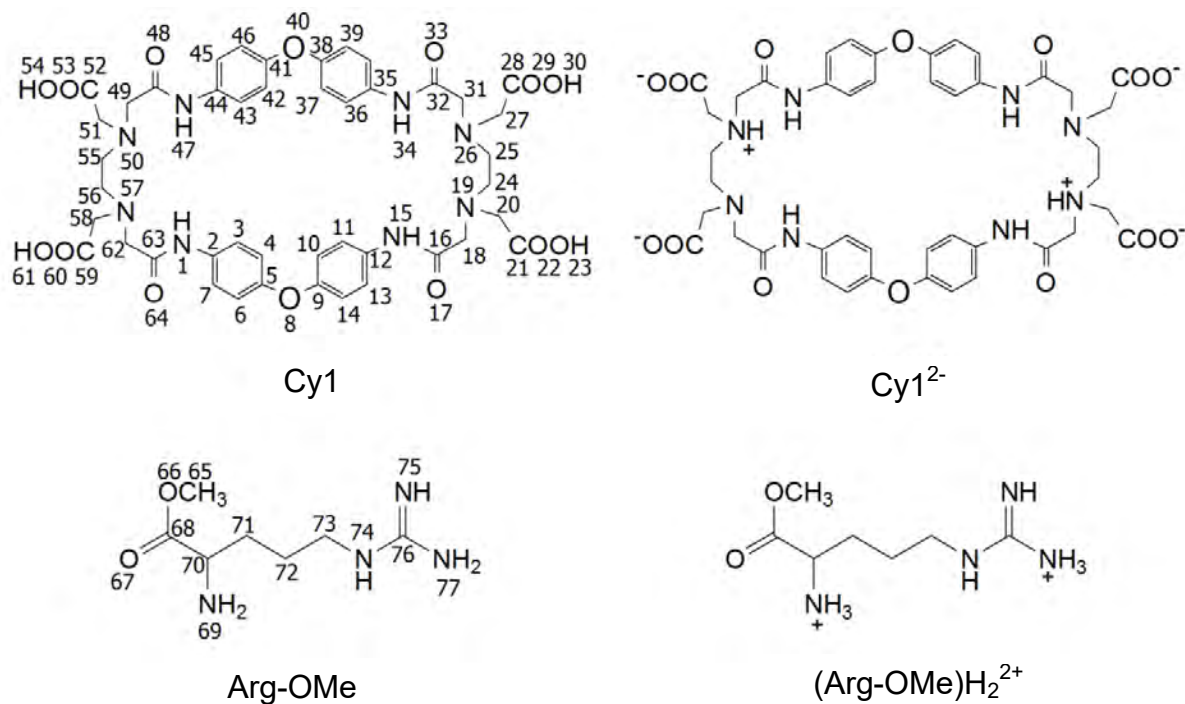


Figura 27. Estructuras de las especies neutra (izquierda) y ionizada (derecha) de Cy1.

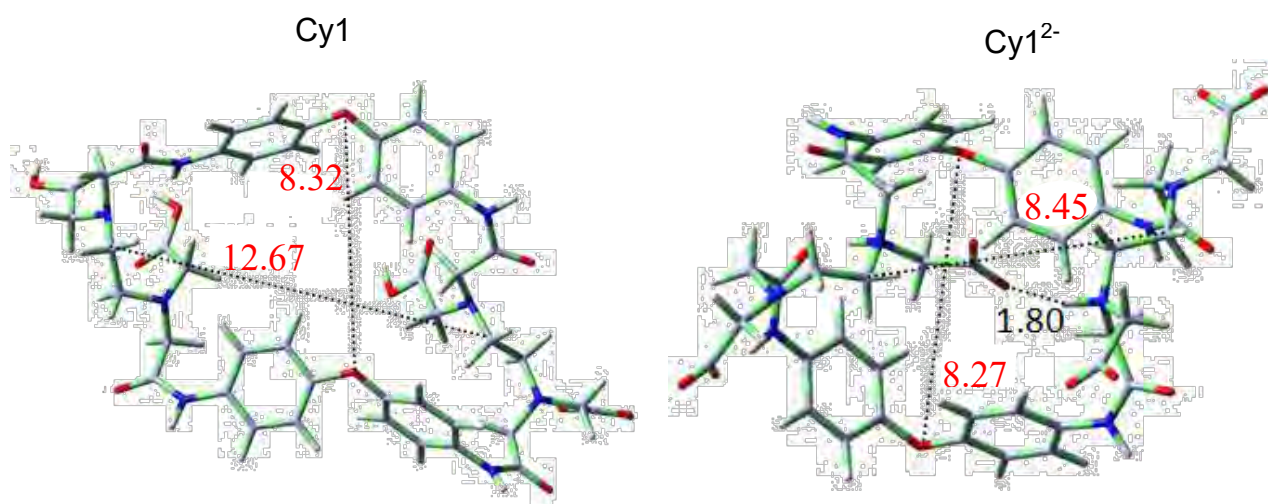


Figura 28. Conformaciones más estables de las especies Cy1 y (Cy1)²⁻ obtenidas mediante estudios teóricos DFT. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de la cavidad (rojo) e interacción intramolecular (negro) en angstroms.

3.2.2 Sistemas Cy1:Arg-OMe y (Cy1)²⁻:Arg-OMe

El reconocimiento molecular del receptor Cy1 ácido se trabajó bajo dos escenarios (figura 27): (1) arginina metil éster (Arg-OMe) y Cy1 no están cargados, simulando un ambiente en medio orgánico y (2) Ambas especies son iónicas, Cy1²⁻ y (Arg-OMe)H₂²⁺, y el sistema es globalmente neutro, simulando un ambiente en medio acuoso a un pH apropiado.

De acuerdo con los cálculos teóricos, Cy1 forma complejos supramoleculares estables con Arg-OMe, tanto en su forma neutra como en su forma iónica, con mayor estabilidad los complejos formados entre las especies neutras. Con la complejación, las conformaciones de los ciclofanos son modificadas en ambos casos.

El análisis conformacional da como resultado cerca de 70 estructuras estables para los complejos supramoleculares, tanto en su forma neutra como en su forma iónica; sin embargo, en el presente trabajo se utilizan solo las conformaciones más estables, aquellas con energías relativas de disociación menores a 40 kcal/mol. De esta manera, se reportan ocho conformaciones para las especies neutras y tres conformaciones para las especies iónicas (anexo 4). En la figura 29 se muestran las tres estructuras más estables de cada sistema y en la tabla 6 se presentan las energías de complejación (ΔE_C), las energías relativas de complejación (ΔE_{rel}) y las diferencias de energía entre los orbitales HOMO/LUMO ($\Delta E_{HOMO/LUMO}$) para cada una de esas conformaciones.

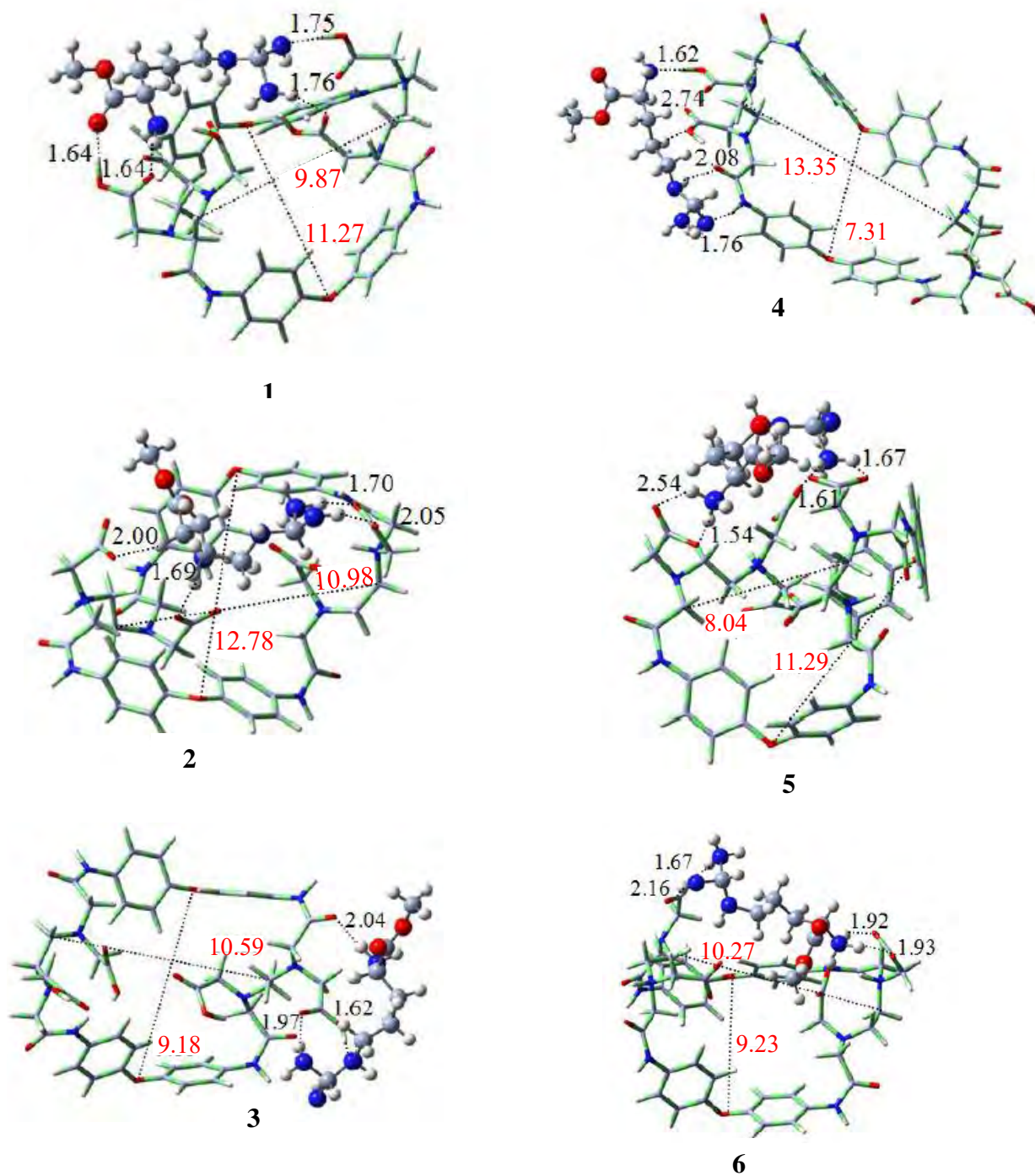


Figura 29. Estructuras más estables obtenidas para los sistemas con el receptor Cy1 y el huésped Arg-OMe neutros (izquierda) e iónicos (derecha). Las líneas punteadas corresponden a las distancias de la cavidad (rojo) e interacciones (negro) en angstroms.

Tabla 6. Energías de complejación (ΔE_c) en kcal/mol, energía relativa de complejación (ΔE_{rel}) en kcal/mol y energía de ancho de banda ($\Delta E_{HOMO/LUMO}$) en eV, de los sistemas Cy1:Arg-OMe y Cy1²⁺:(Arg-OMe)H₂²⁺.

	ΔE_c	ΔE_{rel}	$\Delta E_{HOMO/LUMO}$
Cy1:Arg-OMe			
1	-365.9	0.000	2.13
2	-358.5	5.81	2.47
3	-353.7	11.09	3.06
Cy1²⁺:(Arg-OMe)H₂²⁺			
4	-339.7	27.29	3.37
5	-337.2	28.02	3.57
6	-326.8	39.05	3.85

3.2.2.1 Cy1:Arg-OMe. En la estructura 1 de la figura 29 Arg-OMe se encuentra ubicada sobre la cavidad del Cy1 formando 4 enlaces de hidrógeno que involucran a tres de los grupos carboxilos del receptor y a los grupos guanidinio y alfa NH₂ de Arg-OMe, originando la estructura de mayor estabilidad, asignándole a la misma una energía relativa de disociación de 0.00 kcal/mol. La estructura 2 le sigue en estabilidad (ΔE_{rel} 5.81 kcal/mol), debido a una red de 3 enlaces de hidrógeno y una interacción van der Waals; en esta estructura Arg-OMe se ubica por uno de los lados del macrociclo e intervienen dos de los grupos carboxilos del receptor, interactuando con los grupos guanidinio y alfa NH₂ de arginina. La estructura 3 (E_{rel} 11.09 kcal/mol) es formada por dos enlaces de hidrógeno entre el grupo guanidinio de Arg-OMe y un grupo carboxilo de Cy1, más un enlace de hidrógeno en el grupo amida del receptor y el grupo alfa amino del huésped. Aunque hay un menor número de interacciones que en otras estructuras, la molécula de Arg-OMe se encuentra enfrente de Cy1 sin ningún impedimento estérico que afecte su estabilidad.

3.2.2.2 (Cy1)²⁻:(Arg-OMe)H₂²⁺. En la estructura 4 ($E_{\text{rel}} = 27.29$ kcal/mol) de la figura 29, (Cy1)²⁻ y (Arg-OMe)H₂²⁺ se encuentran cara a cara y tienen 4 puntos de contacto: doble par iónico entre el grupo guanidino de (Arg-OMe)H₂²⁺ y uno de los carboxilatos de (Cy1)²⁻; par iónico entre grupo alfa amino del huésped y carboxilato del receptor, y una interacción ion – dipolo inducido entre CH₂ de la cadena de (Arg-OMe)H₂²⁺ y otro de los grupos carboxilatos de (Cy1)²⁻. La ionización de los grupos carboxilo proporciona cierta flexibilidad al esqueleto macrocíclico, lo cual permite que (Cy1)²⁻ se curve hacia (Arg-OMe)H₂²⁺ maximizando los puntos de contacto, principalmente entre los grupos carboxilato del receptor y los grupos guanidinio y alfa amino de (Arg-OMe)H₂²⁺; sin embargo, esta situación provoca que el macrociclo adopte una configuración de mayor tensión, disminuyendo la estabilidad del complejo supramolecular en relación al complejo Cy1:Arg-OMe. Estructura 5 ($E_{\text{rel}} = 28.02$ kcal/mol) es muy similar a estructura 4, pero la curvatura de (Cy1)²⁻ hacia (Arg-OMe)H₂²⁺ es un poco más pronunciada, lo que origina las diferencias en estabilidad. En estructura 6 ($E_{\text{rel}} = 39.05$ kcal/mol) (Cy1)²⁻ también se curva hacia (Arg-OMe)H₂²⁺ y se observa que las interacciones iónicas entre el grupo guanidinio y uno de los carboxilato son más débiles (mayor distancia de enlace), lo que origina una menor estabilidad.

3.2.3 Gráficas de Densidad Electrónica y Diferencia de Energía de los Orbitales HOMO-LUMO.

La tabla 6 contiene las diferencias de energía $\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$ de las tres estructuras más estables de cada uno de los complejos supramoleculares. El grado en que se combinan los orbitales moleculares es proporcional a $S^2/\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$, donde S es el traslape y $\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$ es la diferencia en las energías de los orbitales moleculares HOMO y LUMO. Asumiendo que S es muy parecida para los orbitales considerados, entonces el grado de combinación de los orbitales moleculares depende de $\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$. Se puede observar que la estructura 1 (especies neutras) es la más estable y la que tiene el menor $\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$, con un valor de 2.13 eV. La estructura 6 es la menos estable (especies iónicas) y tiene el mayor valor de

$\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$ (3.85 eV). Sin embargo, no siempre decrece $\Delta E_{\text{HOMO/LUMO}}$ conforme se incrementa la estabilidad.

La observación visual de los orbitales HOMO/LUMO puede ayudar a entender las características de estabilidad de las diferentes estructuras que adoptan los complejos supramoleculares. La figura 30 presenta las gráficas de densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO para las especies iónicas y neutras de Cy1 y Arg-OMe, así como para las estructuras 1 y 4 de los complejos supramoleculares, las cuales son las estructuras más estables para cada sistema.

En Cy1 neutro, HOMO se ubica alrededor de los átomos 15 a 31, mientras que LUMO se encuentra alrededor de los átomos 41-56. En el caso de $(\text{Cy1})^{2-}$, las cargas negativas en los oxígenos 23, 30, 54 y 61, así como las cargas positivas en los nitrógenos 19 y 50, provocan que HOMO se desplace hacia los átomos 25-34 y LUMO hacia los átomos 35-50.

En Arg-OMe, los orbitales HOMO, tanto de la especie neutra como de la especie iónica, están ubicados principalmente sobre el grupo guanidinio y en el grupo alfa amino. En el caso de la especie iónica, la carga positiva provoca que HOMO se redistribuya y disminuya su volumen en los nitrógenos del grupo guanidinio. LUMO de la especie neutra se encuentra sobre el grupo metil éster y un poco sobre el grupo alfa amino; la distribución electrónica de LUMO de $(\text{Arg-OMe})\text{H}_2^{2+}$ también es diferente debido a la carga positiva.

En el complejo supramolecular de las especies neutras, Arg-OMe se ubica por arriba de HOMO, el cual se desplaza hacia los átomos 31-50 del receptor. Este radical cambio es debido a la fuerte interacción entre las especies. También se presenta un desplazamiento en LUMO, que se relocaliza hacia los grupos metil éster y alfa amino de Arg-OMe. Se observa que para las estructuras más estables, Arg-OMe está ubicado cerca tanto de HOMO como de LUMO, mientras que para las estructuras menos estables la interacción de Arg-OMe es sólo con uno de estos orbitales.

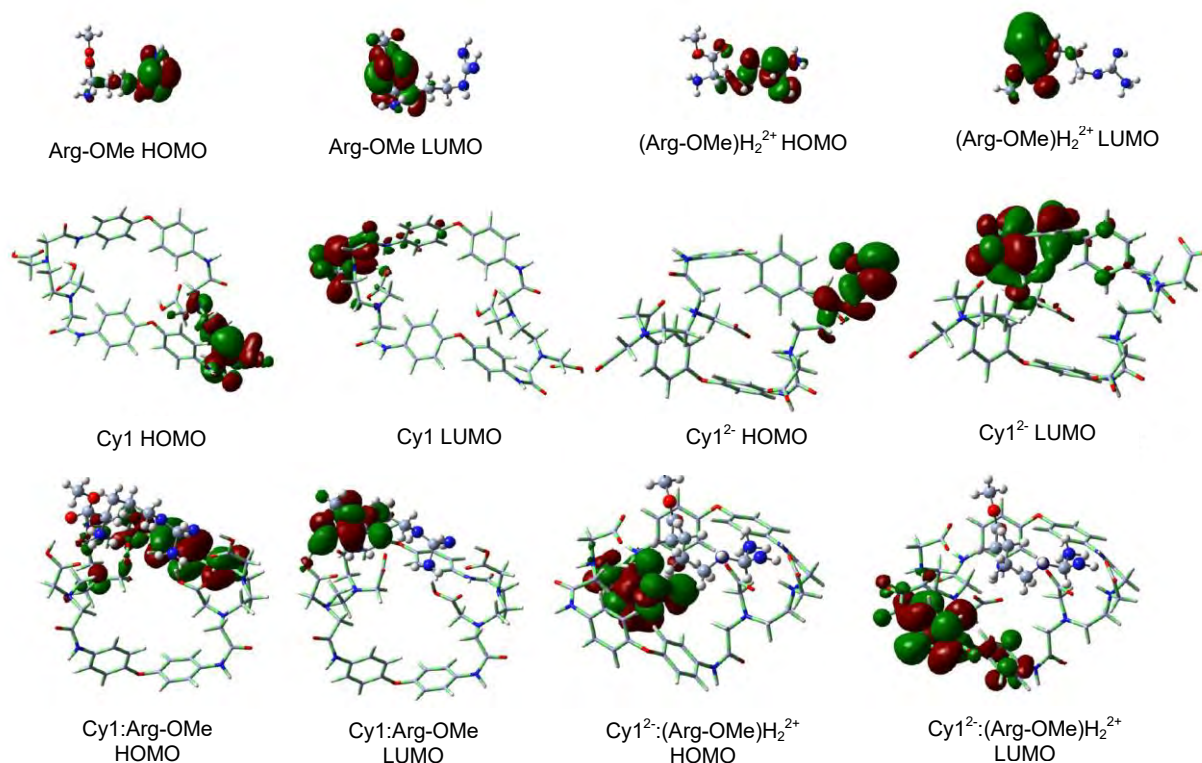


Figura 30. Gráficos de densidad electrónica de los orbitales HOMO y LUMO (a un nivel de contorno de 0.022 a.u.) para las especies iónicas y neutras de Cy1 y Arg-OMe, así como para las estructuras más estables de los complejos supramoleculares.

En el complejo supramolecular de las especies cargadas, $(\text{Arg-OMe})\text{H}_2^{2+}$ se ubica sobre HOMO y más distante de LUMO, en referencia al complejo entre especies neutras, lo cual era de esperarse debido a su menor estabilidad.

3.3 Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos (DFT) y Experimentales (RMN ^1H) de EFCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe

3.3.1 Receptor EFCy1 en Forma Libre.

La conformación más estable para EFCy1 se presenta en la figura 31. En primera instancia se observa que la posición de los brazos no forma estructura tipo balde, lo que hubiera sido deseable para aumentar la probabilidad de formación de complejos de inclusión con los huéspedes.

En la misma figura se observa también que los brazos etil fenílicos de EFCy1 provocan un cambio conformacional drástico de la cavidad con respecto al precursor ácido Cy1. Además, en EFCy1 se observa un enlace de hidrógeno intramolecular entre el oxígeno éter y un protón amida, lo cual aumenta la rigidez de la cavidad del macrociclo. Una evidencia de la mayor rigidez de EFCy1 respecto a Cy1 son los espectros de RMN ^1H en los cuales las señales de los protones aromáticos de la cavidad del macrociclo presentan un patrón de acoplamiento de primer orden para Cy1 y de segundo orden para EFCy1.

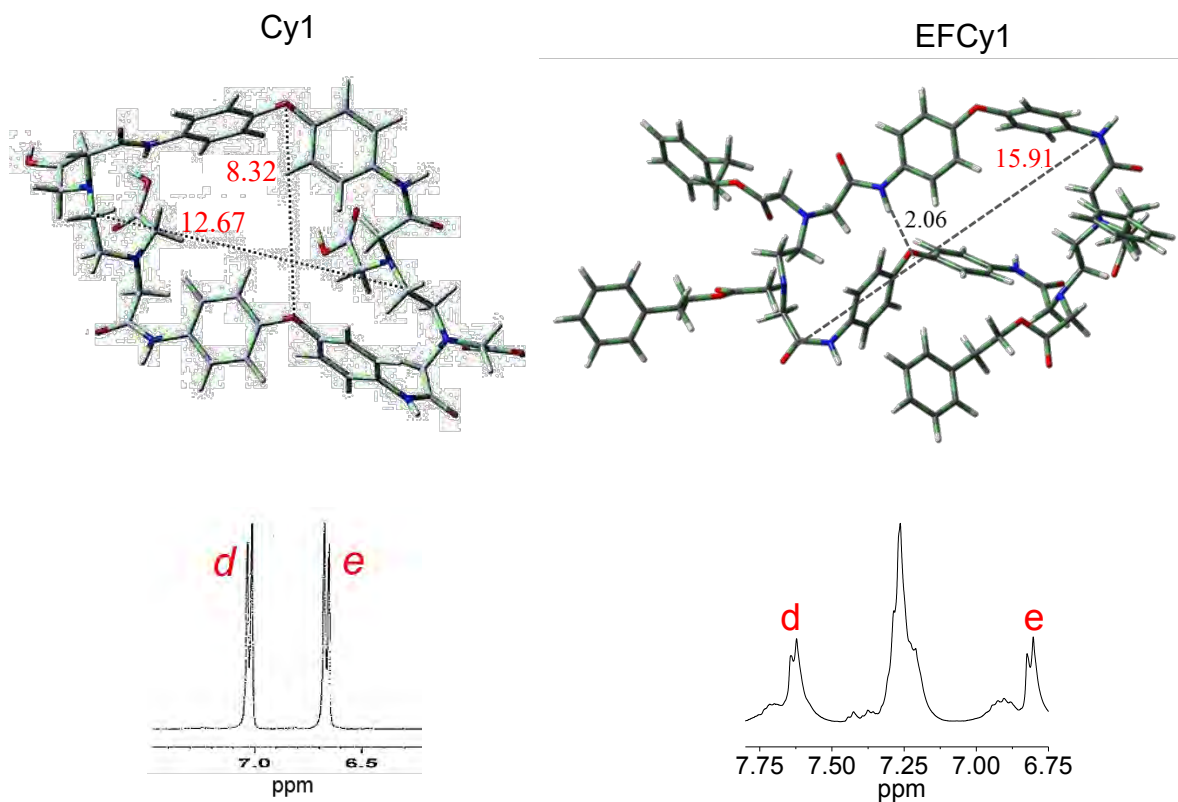


Figura 31. Estructuras de Cy1 y EFCy1 en su forma libre obtenidas por DFT y señales de los protones aromáticos de ambas especies obtenidos por RMN. Las líneas punteadas corresponden a las dimensiones de la cavidad (rojo) e interacción intramolecular (negro) en angstroms.

3.3.2 Complejos Supramoleculares EFCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe

3.3.2.1 Estudios Teóricos (DFT). Las 10 conformaciones más estables de los complejos supramoleculares de EFCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe así como las energías de complejación se presentan en el anexo 5.

En la figura 32 se presenta las estructuras más estables de EFCy1 y de su complejo supramolecular con Arg-OMe. En la estructura del complejo se aprecia la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo alfa amino de Arg-OMe y el carbonilo del grupo éster de uno de los brazos de EFCy1, además de dos interacciones de van der Waals entre el carbonilo de Arg-OMe y uno de los protones aromáticos de la estructura macrocíclica de EFCy1, y entre un hidrógeno metilo de Arg-OMe y un carbonilo amida de EFCy1.

La energía de complejación del complejo supramolecular EFCy1:Arg-OMe (-37 kcal/mol) es significativamente mayor que la energía del complejo Cy1:Arg-OMe (-365.9 kcal/mol), lo cual indica que la esterificación con cadenas etilfenilo de los grupos ácidos del receptor disminuye la estabilidad del complejo supramolecular en un orden de magnitud, efecto que se atribuye tanto a un menor número de interacciones receptor-huésped, como al costo entrópico debido a un mayor cambio conformacional de la cavidad de EFCy1 durante la complejación (ver figuras 32 y 33).

Por otra parte, como podemos observar en la figura 34, la estructura más estable del complejo supramolecular EFCy1:Lis-OMe es semejante a la encontrada para el sistema EFCy1:Arg-OMe. En dicha estructura se forman dos puentes de hidrógeno, uno de los cuales se da entre el grupo amino de la cadena lateral del huésped y el carbonilo amida de la estructura macrocíclica; el otro se forma con el mismo grupo amino y el carbonilo éster de uno de los brazos de EFCy1. Además se forma una interacción de van der Waals entre el nitrógeno del grupo amino de la cadena lateral del huésped y un hidrógeno bencílico de la cadena etilfenilica de EFCy1.

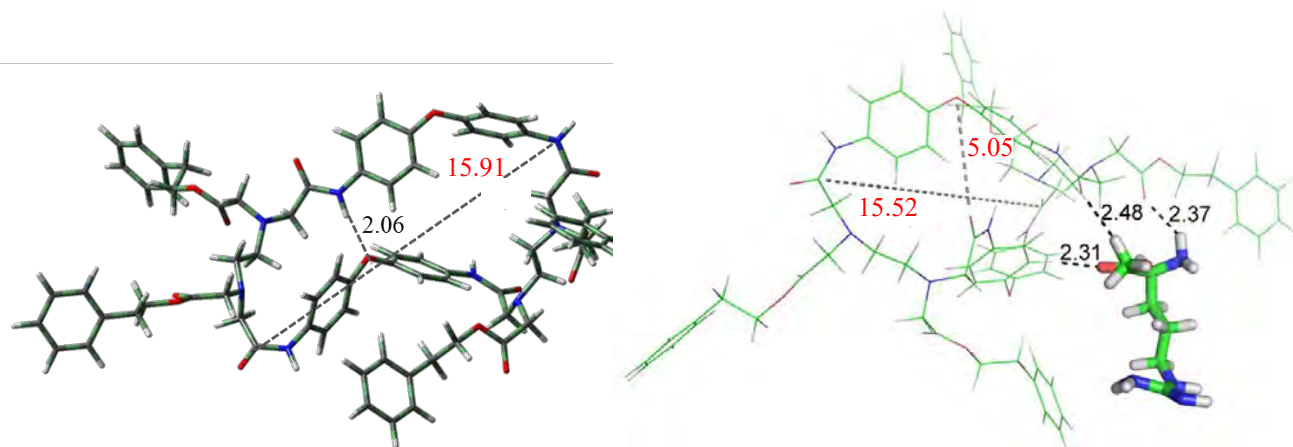


Figura 32. Estructuras más estables del receptor EFCy1 (izquierda) y del complejo EFCy1:Arg-OMe (derecha) obtenidas por DFT. Las líneas punteadas corresponden a las distancias en angstroms.

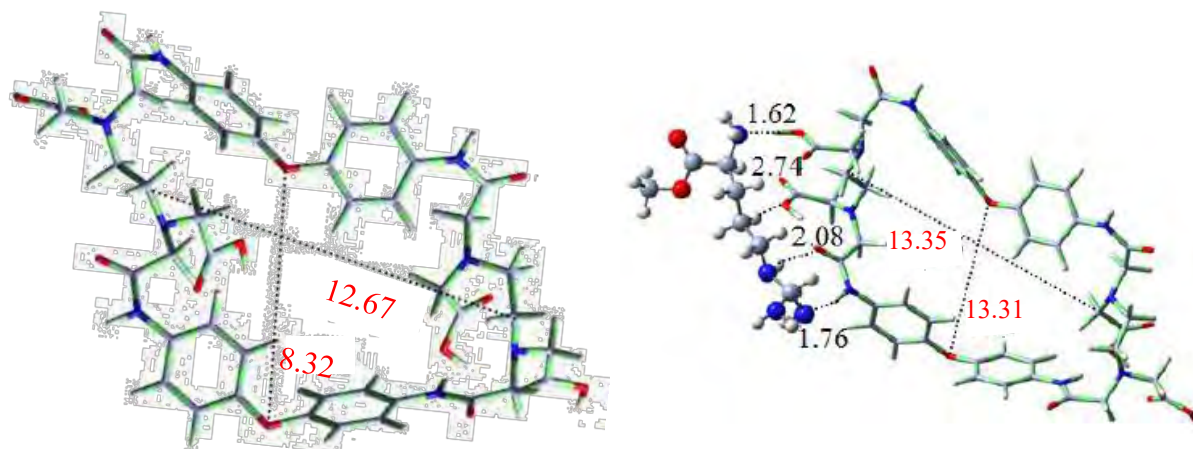


Figura 33. Conformaciones más estables del receptor Cy1 (izquierda) y complejo Cy1:Arg-OMe obtenidas por DFT. Comparar ambas conformaciones con las ilustradas en la figura 35. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de la cavidad (rojo) e interacciones (negro) en angstroms.

La energía de complejación encontrada para la estructura más estable del sistema EFCy1:Lis-OMe (-36 kcal/mol), permanece prácticamente igual a la encontradas para EFCy1:Arg-OMe (-37 kcal/mol), indicando que el receptor EFCy1 no discrimina entre Arg-OMe y Lis-OMe. La similitud en los valores de energía de los sistemas de EFCy1 con ambos huéspedes se atribuye a que en ambos sistemas se presenta el mismo número de interacciones, en donde los sitios de unión también son muy similares.

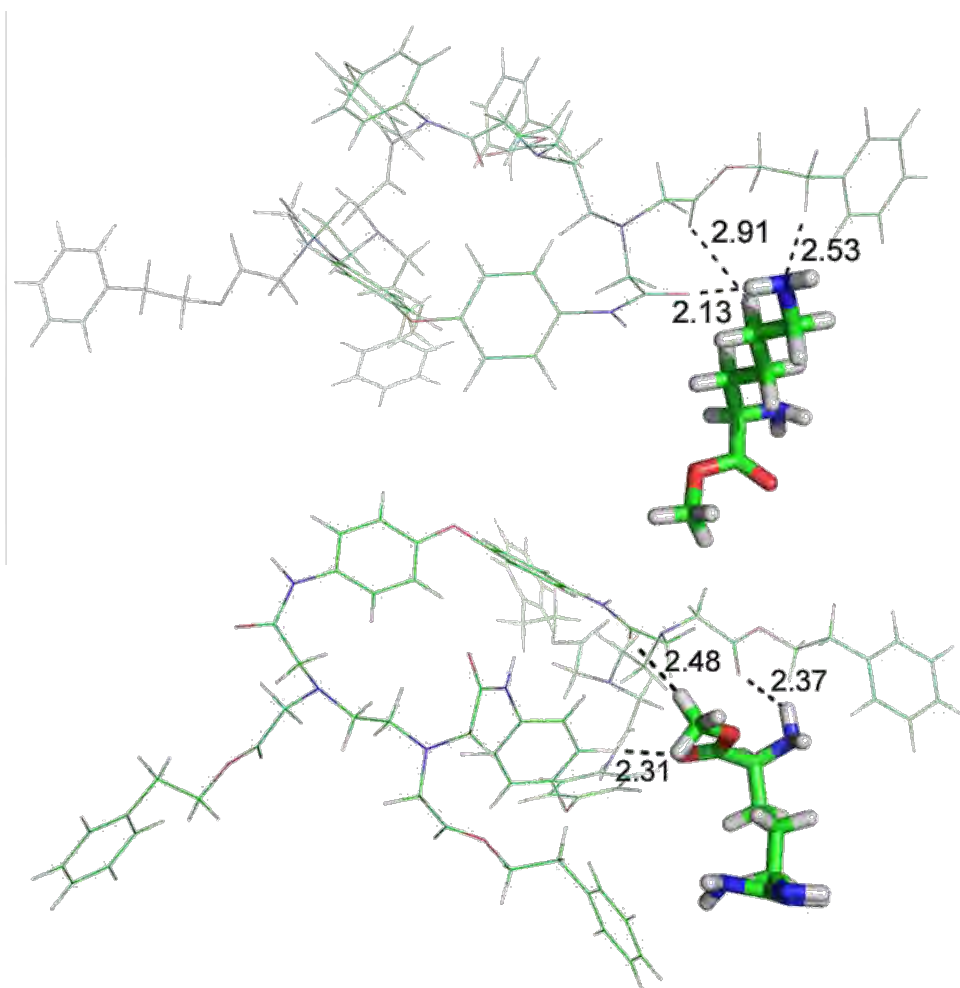


Figura 34. Conformaciones más estables de los complejos EFCy1:Lis-OMe (arriba) y EFCy1:Arg-OMe (abajo) obtenidas por DFT. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de enlaces no covalentes en angstroms.

3.3.2.2 Estudios Experimentales (RMN ^1H).

3.3.2.2.1 Espectroscopia de difusión ordenada (DOSY). La primera evidencia experimental de la formación del complejo EFCy1:Arg-OMe se obtuvo a partir del experimento de DOSY. En la figura 35 se presenta el espectro obtenido, en el cual se calculan las constantes de difusión (D) de receptor y huésped libres, así como del complejo supramolecular, y se grafican en función del desplazamiento químico. Se obtuvieron valores de coeficiente de difusión de $4.02 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para el EFCy1 libre y de $5.86 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ para Arg-OMe libre, mientras que la mezcla receptor:huésped presenta un valor de $3.77 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ que indica la presencia de una nueva especie de mayor peso molecular (menor D) que receptor y huésped libres, lo cual confirma la formación del complejo supramolecular.

3.3.2.2.2 Titulación mediante RMN ^1H . Los estudios experimentales para la obtención de K_a por RMN ^1H del receptor EFCy1 fueron realizados mediante titulación espectrométrica utilizando como huéspedes: Arg-OMe y Lis-OMe.

En ambos casos se observaron desplazamientos hacia campo bajo de los protones amida del receptor, lo cual es evidencia de la formación de los complejos supramoleculares. La Figura 36 muestra los desplazamientos observados para el protón amida de EFCy1 en presencia de Arg-OMe. Los protones aromáticos d presentan desplazamientos a campo alto (figuras 37); sin embargo, en este caso no fue posible ajustar las curvas de titulación debido en buena medida a la dificultad de medir con exactitud el desplazamiento químico dado el grado de ensanchamiento de las señales.

La evidencia experimental coincide satisfactoriamente con las estructuras propuestas por los estudios teóricos, en donde los grupos participantes del receptor en la formación de los complejos supramoleculares son precisamente el grupo amida y los hidrógenos aromáticos (ver figura 34).

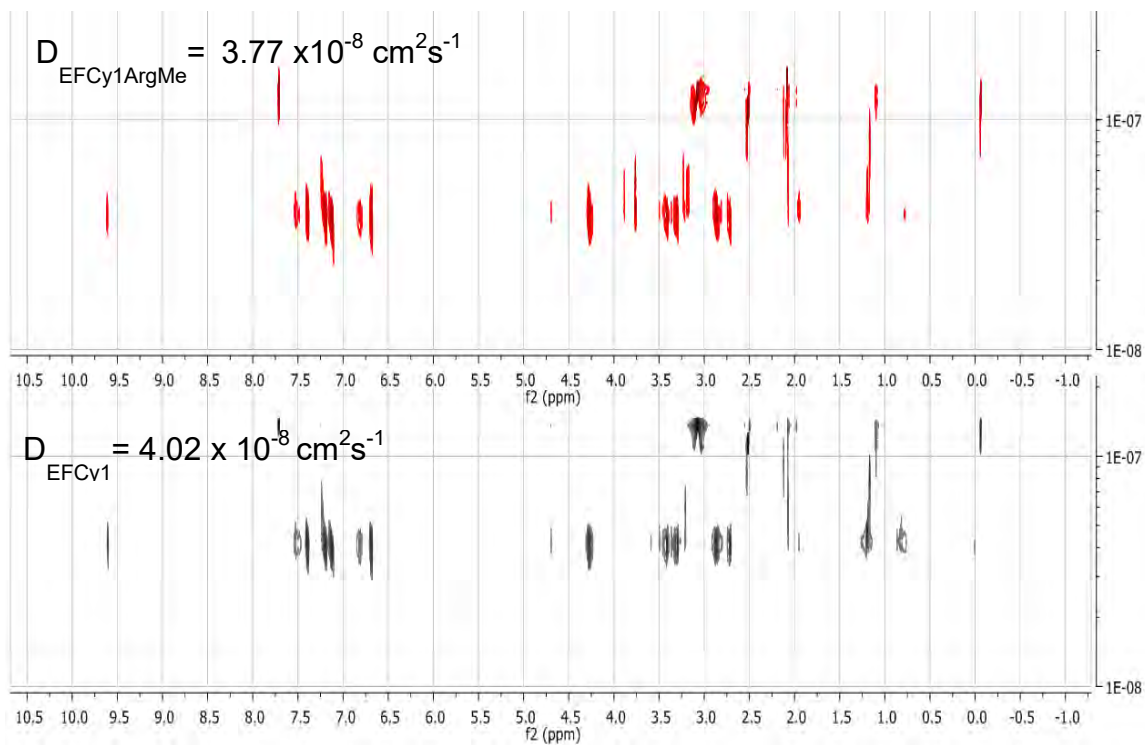


Figura 35. Experimento de espectroscopia de difusión ordenada (DOSY) del receptor EFCy1 en forma libre (espectro inferior) y del complejo EFCy:Arg-OMe (espectro superior).

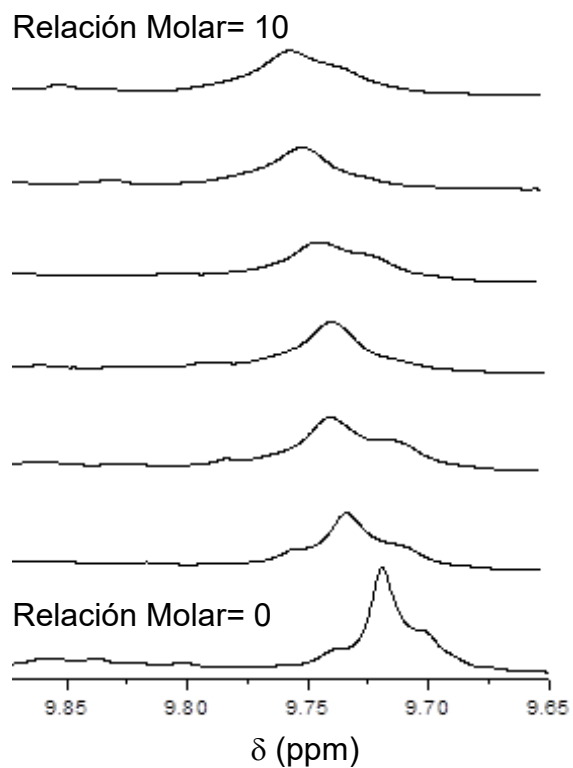


Figura 36. Cambios de desplazamiento químico (hacia campo bajo) del protón amida de EFCy1 (4.5 mM) durante la titulación con ArgMe (450 mM).

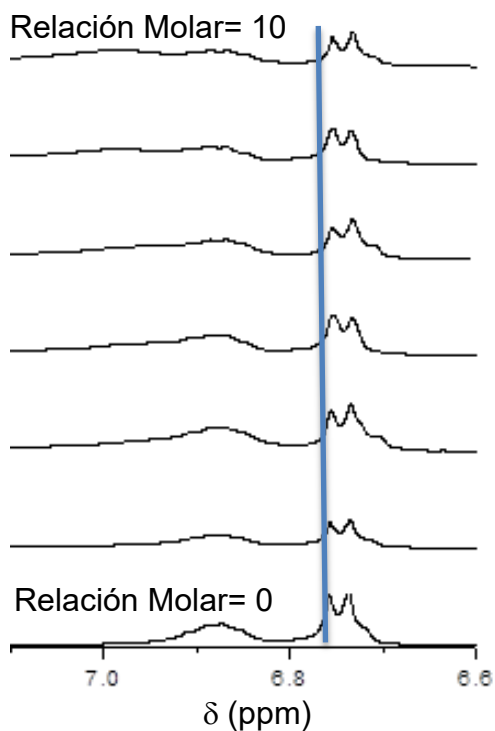


Figura 37. Cambios de desplazamiento químico (hacia campo alto) de los protones aromáticos de EFCy1 con Arg-OMe durante la titulación.

Por otra parte, de acuerdo a los estudios teóricos el grupo éster de uno de los brazos del receptor también participa en una de las interacciones con el huésped, sin embargo dicho enlace es muy débil (2.8 Å) y no provoca cambio en el desplazamiento químico en los protones *g* (CH₂ vecino a oxígeno de éster).

La figura 38 presenta las curvas de titulación obtenidas para los sistemas EFCy1:Arg-OMe y EFCy1:Lis-OMe y la tabla 7 presenta los valores de las constantes de asociación (K_a) y el cambio máximo en los desplazamientos químicos ($\Delta\delta_c$), obtenidos a partir de las curvas de titulación.

Los valores de las constantes de asociación para Arg-OMe y Lis-OMe son relativamente bajos, 40 M⁻¹ y 52 M⁻¹ respectivamente, y muy similares entre ellos.

El bajo valor de las K_a puede atribuirse a la alta proporción de DMSO en la mezcla de reacción (CDCl₃:DMSO, 75:25), el cual compite fuertemente con los huéspedes por la formación de enlaces de hidrógeno con los sitios de unión del receptor [18].

El otro aspecto a destacar es que EFCy1 no presenta selectividad hacia Arg-OMe o Lis-OMe. En este aspecto también coinciden los estudios teóricos con los estudios experimentales, ya que los valores de energía de complejación obtenidos teóricamente para EFCy1:Lis-OMe (-36 kcal/mol) y para EFCy1:Arg-OMe (-37 kcal/mol) son prácticamente iguales, indicando que el receptor EFCy1 no discrimina entre Arg-OMe y Lis-OMe.

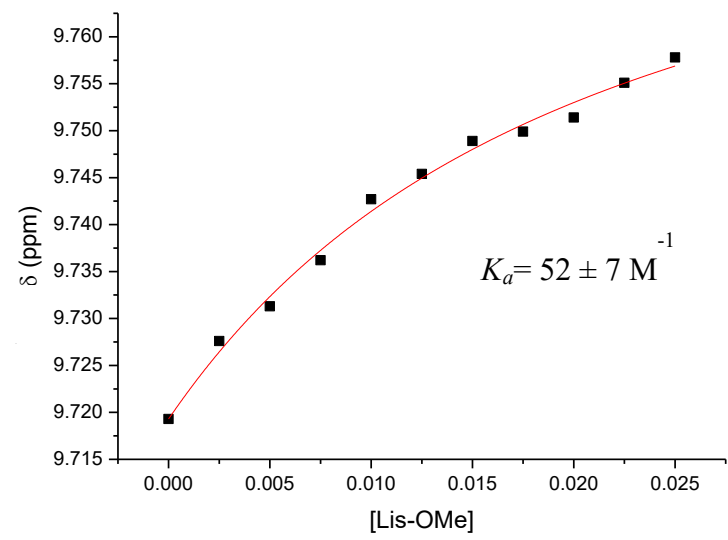
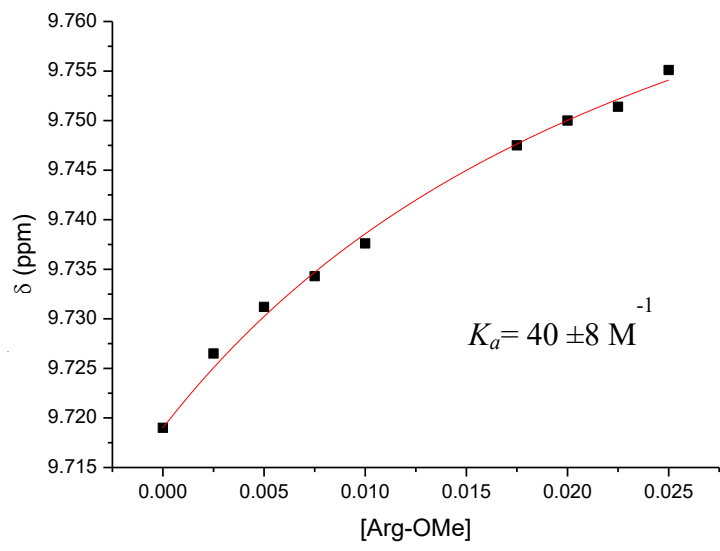


Figura 38. Curvas de titulación obtenidas de EFCy1 (4.5 mM) con ArgMe (450 mM), y con LisMe (450 mM), hasta lograr una relación molar de 10 en ambos casos.

Tabla 7. Constantes de afinidad (K_a) y cambio de desplazamiento químico máximo ($\Delta\delta_c$) de los huéspedes con el receptor EFCy1.

Sistema	$\Delta\delta_c$ (ppm)	K_a (Mol^{-1})
EFCy1:Arg-OMe	0.0367	40 ± 8
EFCy1:Lis-OMe	0.0385	54 ± 7

3.4 Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos (DFT) y Experimentales (RMN) de EHCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe.

3.4.1 Receptor EHCy1 en forma libre.

La geometría más estable para EHCy1 se presenta en la figura 39. Al igual que en el caso de EFCy1, no forma estructura tipo balde. La conformación del receptor libre se encuentra menos tensionada que en el caso de EFCy1, lo cual es posible correlacionarlo con los espectros de RMN ^1H de ambos receptores, en donde se observa menor grado de desdoblamiento de los protones aromáticos en EHCy1 que en EFCy1 (figura 39).

3.4.2 Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos (DFT) de EHCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe.

3.4.2.1 Sistema EHCy1:Arg-OMe. Las 10 conformaciones más estables de los complejos supramoleculares de EHCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe así como las energías de complejación se presentan en el anexo 6.

En la figura 40 se presenta la estructura más estable del complejo supramolecular EHCy1:Arg-OMe, en la cual se observa la formación de cinco enlaces de hidrógeno, todos a través de los grupos amida de la cavidad del receptor, los cuales interactúan con el grupo guanidinio (tres interacciones), el grupo alfa amino y el grupo éster de ArgMe .

Arg-OMe se encuentra en forma prácticamente lineal y se extiende sobre uno de los lados de EHCy1 y no se observa la participación de los grupos hexiléster pendientes.

La energía de complejación obtenida para el complejo supramolecular EHCy1:Arg-OMe fue de -28 kcal/mol. Al comparar con el complejo Cy1:Arg-OMe (-365.9 kcal/mol, figura 33) se observa una disminución de la estabilidad en un orden de magnitud, a pesar de que el número de interacciones receptor-huésped es mayor en EHCy1:Arg-OMe que en Cy1:ArgMe.

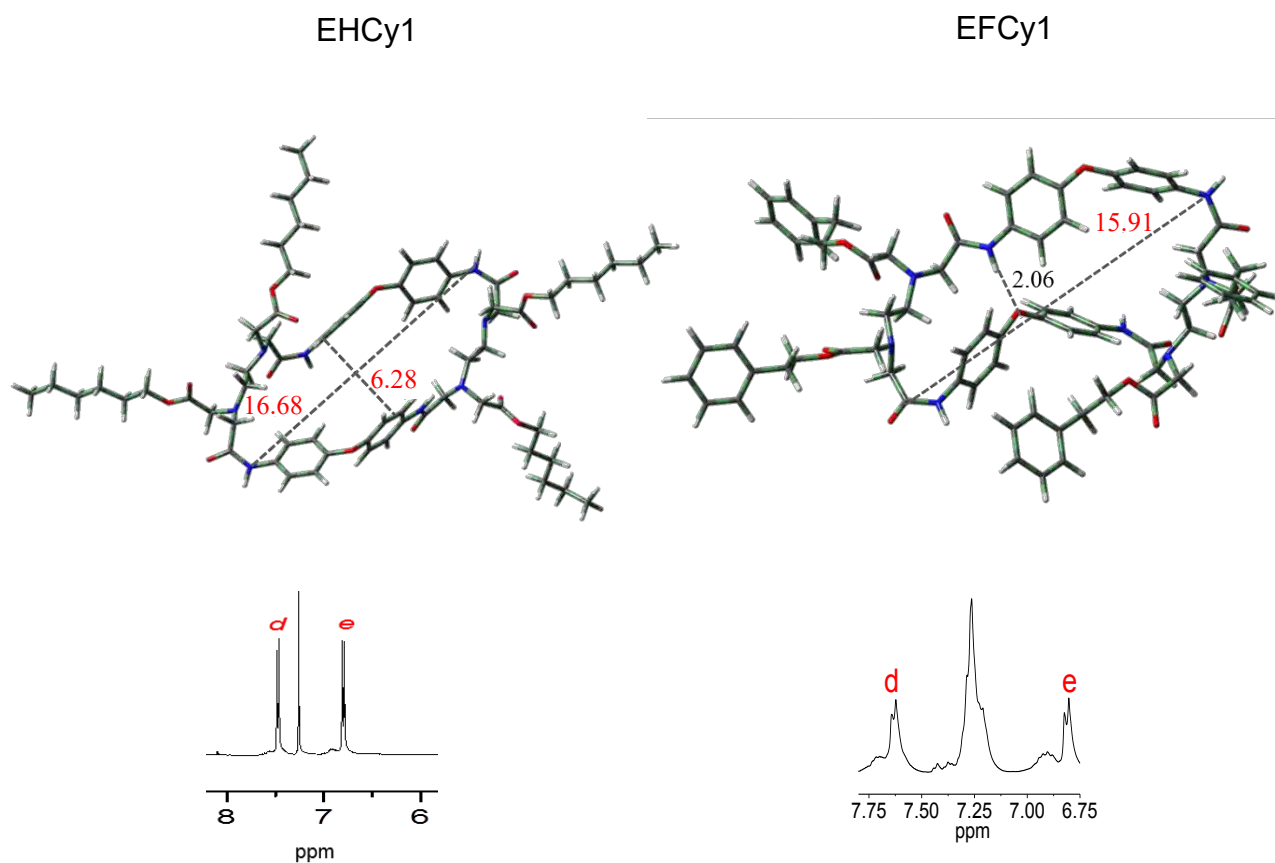


Figura 39. Estructuras de EHCy1 y EFCy1 obtenidas por DFT y sus respectivos espectros de protón de las señales aromáticas de la cavidad en cada caso. Las líneas punteadas corresponden a las dimensiones de la cavidad (rojo) e interacción intramolecular (negro) en angstroms.

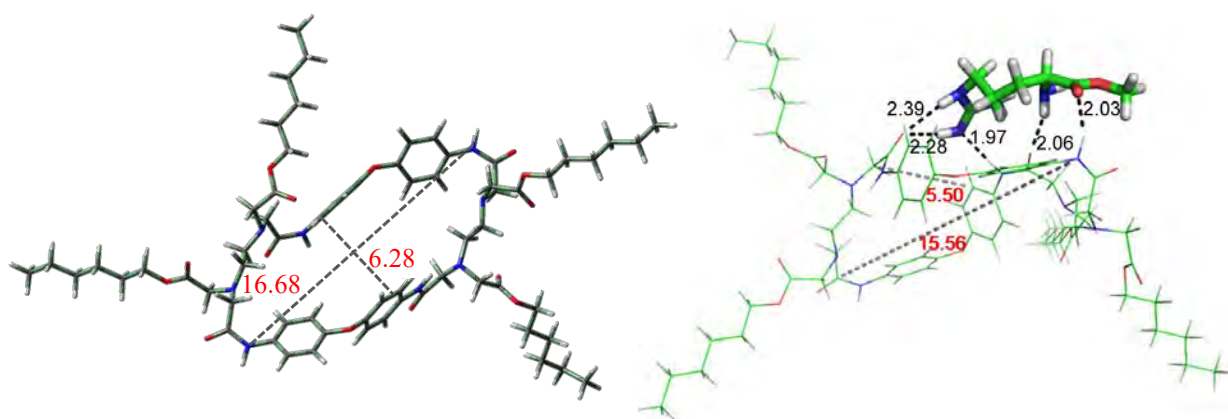


Figura 40. Estructuras más estables del receptor EHCy1 (izquierda) y del complejo EHCy1:Arg-OMe (derecha, comparar con la figura 33) mediante DTF. Las líneas punteadas corresponden a las distancias en angstroms.

Lo anterior puede explicarse ya que las interacciones en el receptor ácido son más fuertes, con distancias de enlace de 1.64, 1.75 y 1.76 Å, comparadas con el receptor hexil éster 1.97, 2.03, 2.06, 2.28 y 2.39 Å. Además, al no intervenir los grupos pendientes en EHCy1:Arg-OMe, todas las interacciones se presentan con los grupos amida de la cavidad del receptor, lo que ocasiona un cambio conformacional fuerte del esqueleto macrocíclico, con respecto al precursor Cy1, con el consecuente costo entrópico que provoca una disminución de la estabilidad del complejo supramolecular. Esta situación se puede considerar como un ejemplo del efecto conocido como compensación entalpía–entropía: en interacciones débiles aditivas, un incremento en la entalpía de enlace es compensado por un decremento en la entropía de enlace [47].

Por otra parte, la energía de complejación de EHCy1:Arg-OMe (-28 kcal/mol) es mayor a la encontrada para EFCy1:Arg-OMe (-37 kcal/mol), indicando que el complejo formado con EHCy1 es menos estable que el complejo con EFCy1, a pesar de formar un mayor número de interacciones receptor-huésped, lo cual se atribuye a efectos entrópicos, ya que durante la complejación hay un cambio conformacional más fuerte en el receptor EHCy1 (comparar cambios conformacionales en figuras 32 y 40).

3.4.2.2 Sistema EHCy1-Lis-OMe. En el complejo EHCy1:Lis-OMe (figura 41) se forman cuatro enlaces de hidrógeno: dos con la estructura macrocíclica y dos con los grupos oxígeno de dos de los brazos de EHCy1.

La energía de complejación para EHCy1:Lis-OMe (-21 kcal/mol) es mayor a la obtenida para EH1:Arg-OMe (-28 kcal/mol), indicando que el complejo formado con Lis-OMe es menos estable que el complejo con Arg-OMe. Esto indica que, a diferencia de los resultados de los sistemas con EFCy1, EHCy1 si presenta selectividad hacia Arg-OMe.

La mayor selectividad hacia Arg-OMe puede atribuirse a que en EHCy1:Lis-OMe hay menor número de enlaces cuya fuerza también es menor como consecuencia de las distancias de enlace 2.06, 2.29, 2.47 y 2.72 Å.

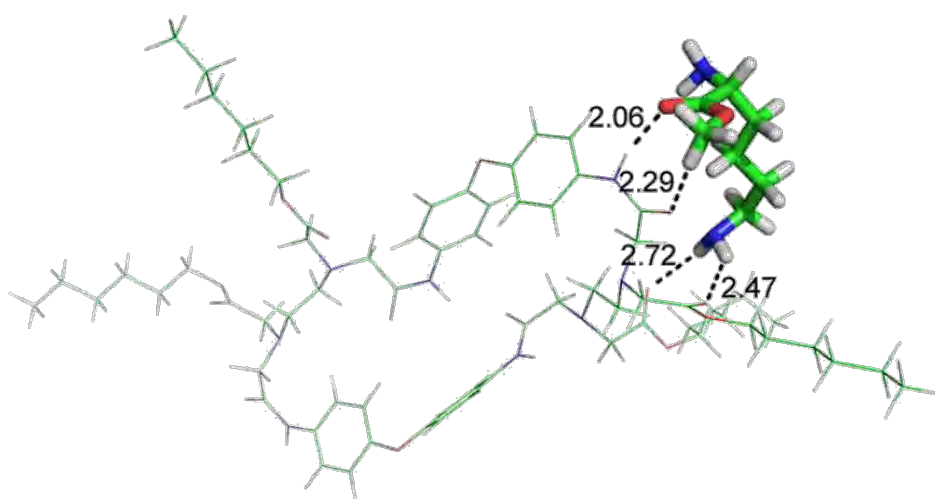


Figura 41. Conformación más estable obtenida con el programa GAUSSIAN 09 para EHCy1:Lis-OMe y al nivel de teoría B3LYP/6-31G*. Las líneas punteadas corresponden a las distancias de enlaces no covalentes en angstroms.

A pesar de que EHCy1 es capaz de discriminar entre Arg-OMe y Lis-OMe, los complejos obtenidos con este receptor son de menor estabilidad que los obtenidos para EFCy1 el cual no presenta selectividad por ninguno de los huéspedes.

3.4.2.3 Estudios experimentales (RMN ^1H) de EHCy1 con Arg-OMe. Los estudios experimentales para la obtención de K_a por RMN ^1H del receptor EHCy1 fueron realizados utilizando como huésped a Arg-OMe. Al igual que en el caso de EFCy1, se observaron los desplazamientos hacia campo bajo de los protones amida del receptor, lo cual es evidencia de la formación de los complejos supramoleculares. En la figura 42 (a) se muestran los desplazamientos observados para el protón amida de EHCy1 en presencia de Arg-OMe y la curva de titulación obtenida corresponde a la figura 42 (b).

El valor de K_a obtenido para el sistema EHCy1:Arg-OMe ($K_a=219 \text{ M}^{-1}$), es un orden de magnitud mayor que el obtenido para el sistema EFCy1:Arg-OMe, indicando que el complejo EHCy1:Arg-OMe ($K_a=40 \text{ M}^{-1}$) es menos estable que el complejo EFCy1:Arg-OMe, lo que no concuerda con cálculos teóricos. Estas diferencias se deben probablemente a la participación del solvente el cual no es considerado en los estudios teóricos.

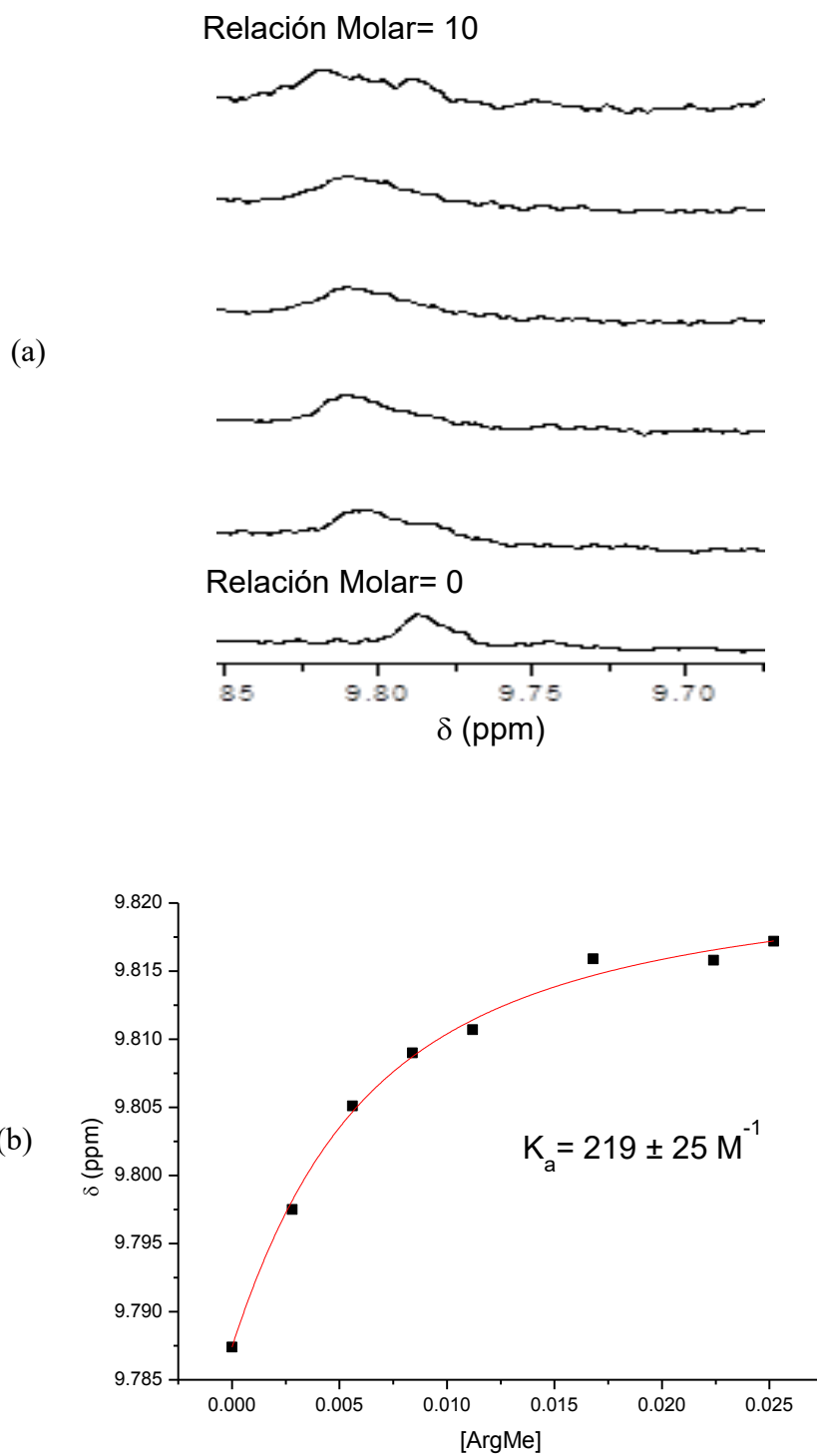


Figura 42. (a) Cambios de desplazamiento químico (hacia campo bajo) del protón amida de EHCy1 y (b) curva de titulación obtenida para EHCy1 (4.5 mM) con ArgMe (450 mM), hasta una relación molar de 10.

3.5 Estudios Experimentales (RMN ^1H) de EHCy2 con Arg-OMe.

Al igual que en los experimentos anteriores, se observaron desplazamientos hacia campo bajo de los protones amida del receptor, lo cual es evidencia de la formación de los complejos supramoleculares.

En la figura 43 (a) se muestran los desplazamientos observados para el protón amida de EHCy2 en presencia de Arg-OMe y la curva de titulación obtenida corresponde a la figura 43 (b).

El valor de K_a (95 M^{-1}) obtenido para el sistema EHCy2:Arg-OMe, indica que este complejo es de menor estabilidad que el complejo EHCy1:Arg-OMe ($K_a = 219 \text{ M}^{-1}$), lo cual revela que no solo los grupos pendientes del receptor afectan la estabilidad de los complejos supramoleculares, sino que también es importante el grupo funcional que conecta a los grupos fenilo de la cavidad de los receptores (-O- en el caso de EHCy1 y $-\text{CH}_2-$ en el caso de EHCy2).

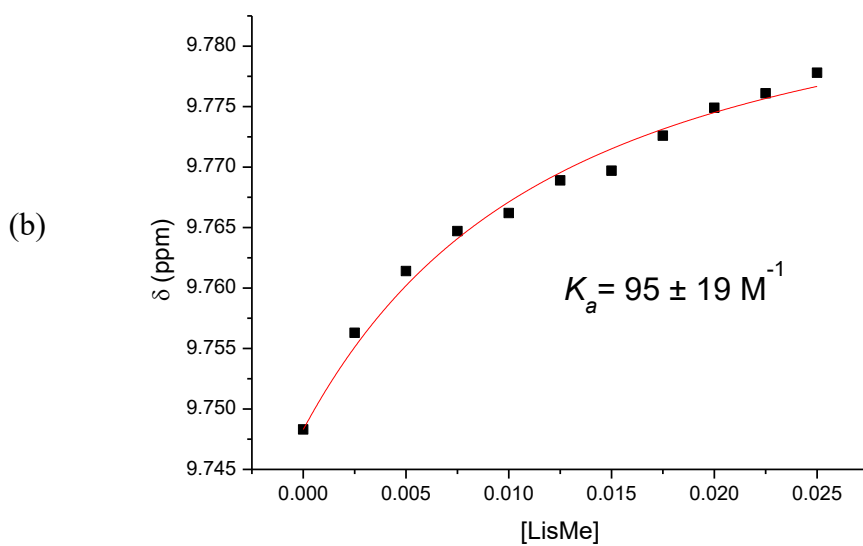
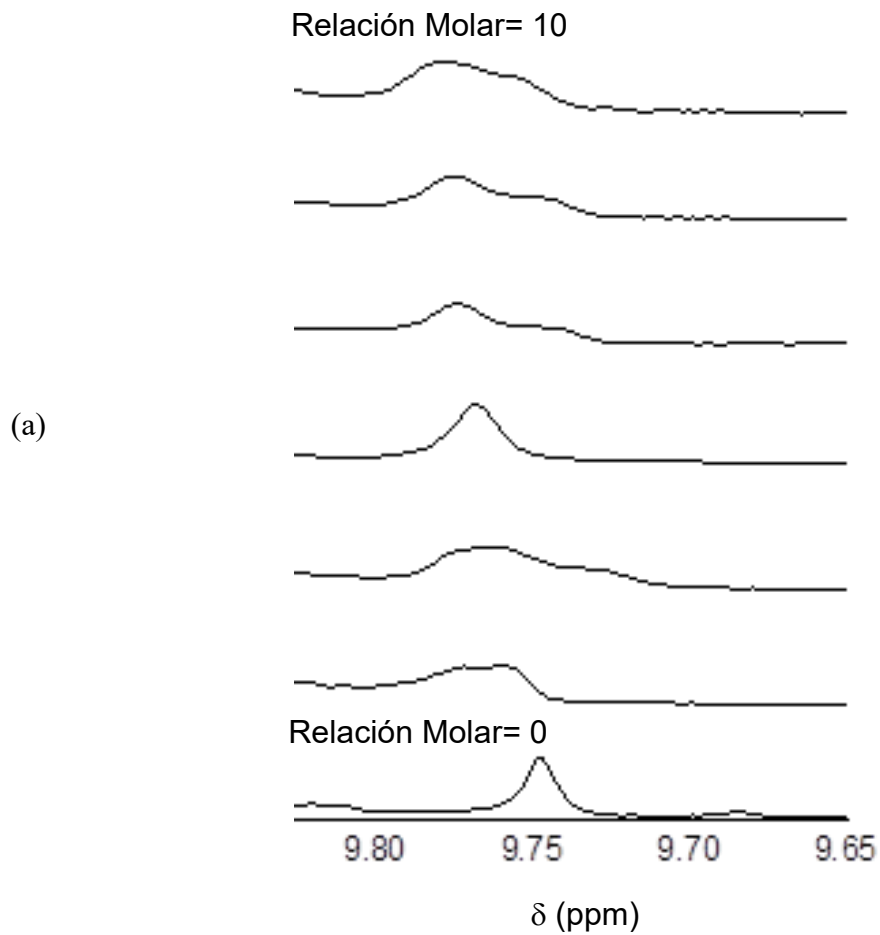


Figura 43. (a) Cambios de desplazamiento químico (hacia campo bajo) del protón amida de EHCy2 y (b) curvas de titulación obtenidas de EHCy2 (4.5 mM) con ArgMe (450 mM), hasta una relación molar de 10.

CONCLUSIONES

Se sintetizaron cuatro nuevos receptores con grupos éster (2 hexiléster y 2 etilfeniléster) como brazos pendientes, a partir de la esterificación de los grupos ácido pendientes de dos ciclofanos previamente reportados por Inoue y colaboradores. La técnica de microondas fue efectiva para la esterificación, con rendimientos del 40 al 52%.

Los espectros de RMN ^1H indican que la esterificación con cadenas hexil y etilfenil éster provocan un aumento en la rigidez de la cavidad de los ciclofanos, lo cual se infiere del patrón de acoplamiento de las señales de los protones aromáticos del esqueleto de los macrociclos.

Los estudios téoricos utilizando la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) indican lo siguiente:

- El ciclofano ácido con átomo de oxígeno entre los grupos fenilos (Cy1), precursor de los ciclofanos ésteres (EHCy1 y EFCy1), forma complejos supramoleculares estables con arginina, con mayor estabilidad el ciclofano en su forma neutra que en el ciclofano cuyos grupos amino y ácido se encuentran cargados.
- Ambos ciclofanos hexil y etilfenil éster (EHCy1 y EFCy1 respectivamente) forman complejos supramoleculares con los aminoácidos arginina metiléster (Arg-OMe) y lisina metiléster (Lis-OMe). Las estructuras obtenidas indican la participación de varias interacciones receptor –huésped, principalmente enlace de hidrógeno.
- Contrario a lo esperado, los complejos EFCy1:Arg-OMe son menos estables que los complejos Cy1:Arg-OMe. Este resultado se atribuye tanto a la disminución del número de interacciones como al costo entrópico originado por el fuerte cambio conformacional que se observa en el esqueleto macrocíclico de EFCy1 durante la formación del complejo.

- EFCy1 no presenta selectividad hacia Arg-OMe o Lis-OMe, ya que las energías obtenidas para ambos complejos supramoleculares son muy similares.
- EHCy1:Arg-OMe es más estable que EHCy1:Lis-OMe como consecuencia del mayor número y fuerza de las interacciones no covalentes formadas entre el receptor y el huésped. Es de destacar que en el caso de Arg-OMe no participan los brazos hexiléster, mientras que para Lis-OMe se forman dos enlaces de hidrógeno con dos de los brazos de EHCy1.
- El número de interacciones receptor – huésped es mayor en el caso de EHCy1; sin embargo, los complejos son más estables para EFCy1 que los formados por EHCy1, lo cual de nuevo se atribuye al factor entrópico de la complejación (cambio conformacional más drástico de la cavidad).

Los estudios experimentales utilizando RMN ^1H proporcionan la siguiente información:

- En el experimento DOSY se observa la formación de una nueva especie en la mezcla EFCy1:Arg-OMe con un valor de coeficiente de difusión de $3.77 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, lo cual confirma la formación del complejo supramolecular.
- Las titulaciones de RMN ^1H de EFCy1 con Arg-OMe y Lis-OMe muestran el desplazamiento de los protones amida, lo cual indica la formación de un complejo supramolecular en donde participan los grupos amida del receptor, hecho que concuerda con los estudios teóricos.
- Los valores de las constantes de asociación ($K_a = 40 \text{ M}^{-1}$ para Arg-OMe y 52 M^{-1} para Lis-OMe) obtenidas a partir de las curvas de titulación de EFCy1 confirman la formación de complejos supramoleculares y la ausencia de selectividad en EFCy1 para ambos aminoácidos, confirmando la información obtenida por los estudios teóricos.
- El valor de K_a obtenido para el sistema EHCy1:Arg-OMe (219 M^{-1}) indica que el complejo formado con EHCy1 y Arg-OMe es más estable que el encontrado con EFCy1, lo cual no concuerda con los valores de energía obtenidos

teóricamente y puede atribuirse a que en los estudios teóricos no se consideró el efecto del disolvente en la determinación de la estabilidad del complejo.

- El sistema EHCy2:Arg-OMe arrojó un valor de $K_a = 95 \text{ M}^{-1}$, el cual indica la menor estabilidad de este sistema con respecto al obtenido con EHCy1. Esto demuestra que no solo los grupos presentes en los brazos modificados de los ciclofanos influyen en la estabilidad del complejo sino también lo hacen los grupos funcionales dentro de la cavidad del receptor.
- Los valores relativamente bajos de K_a de los complejos supramoleculares pueden atribuirse a la alta proporción de DMSO (25%) en la mezcla de solventes ($\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$), la cual fue necesaria por cuestiones de solubilidad de los huéspedes.

PERSPECTIVAS

- Realizar los estudios teóricos y experimentales de reconocimiento molecular de Arg-OMe y Lis-OMe con los derivados metil éster de los precursores Cy1 y Cy2.
- Llevar a cabo los estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) de las reacciones de complejación, a fin de verificar experimentalmente la contribución de los factores entrópicos en la estabilidad de los complejos supramoleculares.
- Obtener cristales de los receptores en su forma libre y de los complejos supramoleculares para realizar cristalografía de rayos X y comparar las conformaciones obtenidas mediante los estudios teóricos.
- Extender los estudios teóricos y experimentales de reconocimiento molecular con Arg-OMe y Lis-OMe, utilizando como receptores otros ciclofanos de la biblioteca del DIPM de menor cavidad.
- Ampliar el trabajo de investigación hacia otros sustratos de igual interés biológico que permitan el análisis en disolventes de baja polaridad.

REFERENCIAS

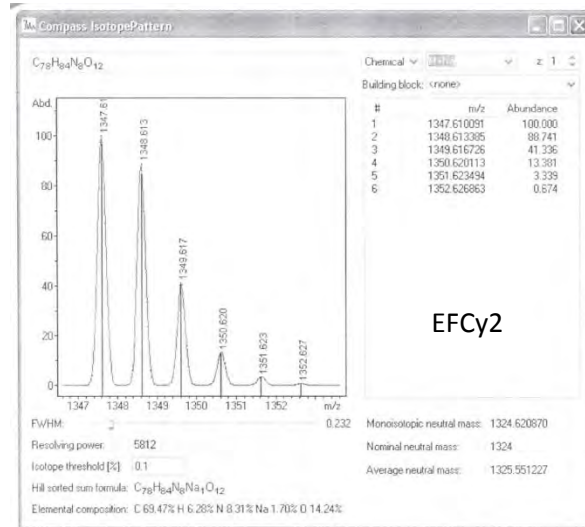
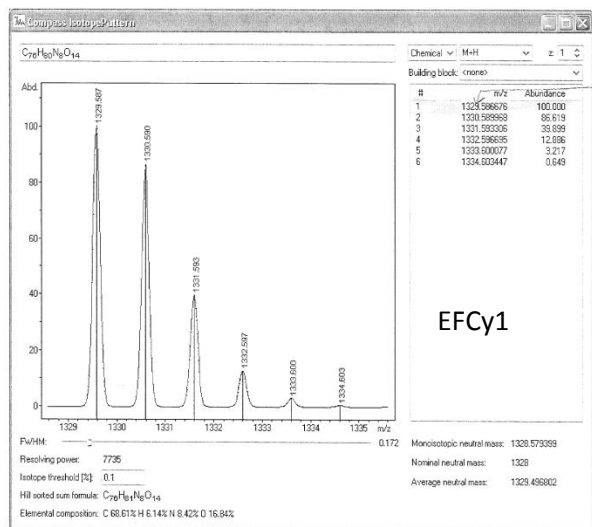
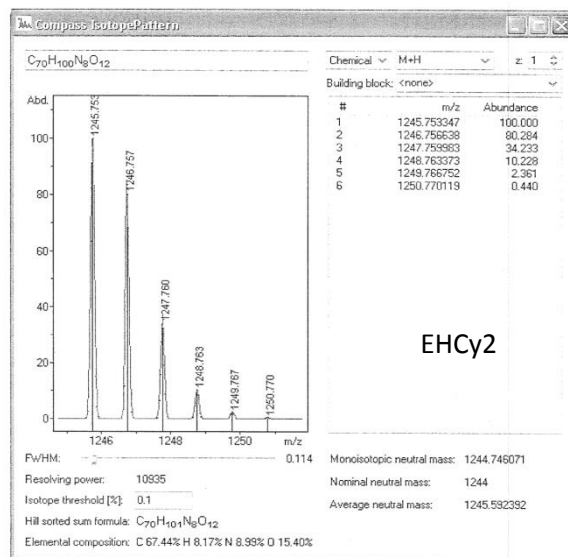
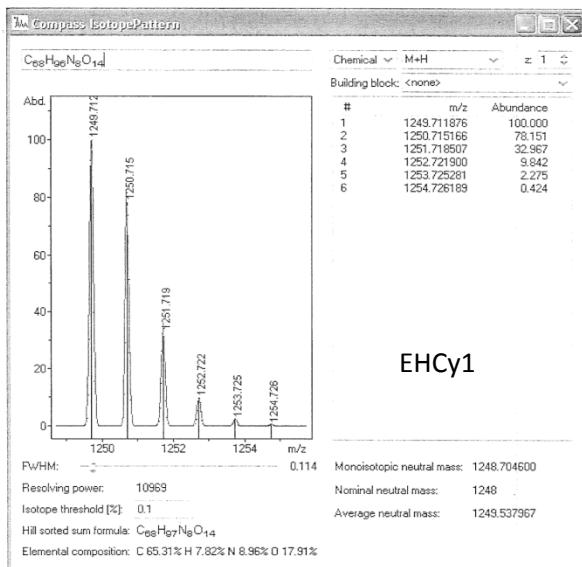
1. Lehn J. M. 1987. *Supramolecular chemistry— scope and perspectives molecules—supermolecules—molecular devices*. Louis Pasteur university France. p- 446.
2. M. B. Inoue, E. F. Velazquez, M. Inoue, Q. Fernando. 1997. Molecular recognition of phenethylamine, tiramine and dopamine with new anionic cyclophanes in aqueous media. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, 2113-2118.
3. Lindoy L. F. 1989. *The chemistry of macrocyclic ligand complexes*. Cambridge University Press ed. 1° Ed. New York. p., 160-183.
4. Cram D. J. and Cram J. M., 1997. *Container molecules and their guest. Angewandte Chemie*. 34:2563-2564.
5. Diederich F. 1990. "Molecular Recognition in Aqueous Solution Supramolecular complexation and catalysis". *J. Chem. Educ.* 67(10):813.
6. Madsen C. M., Clausen M. H. 2011. "Biologically Active Macrocyclic Compounds—from Natural Products to Diversity-Oriented Synthesis". *Eur. J. Org. Chem.* 3107–3115.
7. Yudkoff M. 2013. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and medical aspects*. 51(1):10-7.51(1):10-7.
8. Flodin N.W. 1997. *The metabolic roles, pharmacology, and toxicology of lysine*. *J Am Coll Nutr.* 16:7–21.
9. Wu G., and Meininger C. J. 2000. Arginine Nutrition and Cardiovascular Function. *J. Nutr.* 130:2626-2629.
10. Wu G., Davis P. K., Flynn N. E., Knabe D. A., Davidson J. T.. 1997. Endogenous Synthesis of Arginine Plays an Important Role in Maintaining Arginine Homeostasis in Postweaning Growing Pigs. *J. Nutr.* 127 (12) pp. 2342-2349.
11. Blemings K. P., Crenshaw T. D., Benevenga N. J.. 1998. Mitochondrial Lysine Uptake Limits Hepatic Lysine Oxidation in Rats Fed Diets Containing 5, 20 or 60% Casein. *J. Nutr.* 128 (12):2427-2434
12. Camacho F., Mazuecos J. 1999. Treatment of vitiligo with oral and topical phenylalanine: 6 years of experience. *Arch Dermatol.* 135(2):216-217.
13. Kane V., Wolf A., Jones M. 1974. *J. Am. Chem. Soc.* 96(8); 2643-2644.
14. McDonald M. J., D'cunha G. B. 2007. A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochem. Cell Biol.* 85: 273-282.
15. Miranda de la Rosa A. 2010. *Estudios de Reconocimiento Molecular de Aminoácidos Básicos por Receptores Tipo Ciclofano Mediante Calorimetría de Titulación Istotermica y Resonancia Magnética Nuclear de Protón*". Tesis Maestría. Universidad de Sonora.
16. Miranda de la Rosa A., De León A., Velázquez Contreras E.F. 2013. Molecular recognition of a cyclophane as a receptor towards arginine methyl ester: Theoretical perspectives. *Afinidad LXX*. p. 67-72.

17. Baron R., Setny P., McCammon J. A. 2013. Molecular Recognition and Ligand Association. *Annual Review of Physical Chemistry*. 64: 151-175.
18. Baron R., Setny P., McCammon J. A. 2010. Water in Cavity–Ligand Recognition. *J Am Chem Soc*. 132(34): 12091–12097.
19. Anslyn E. V., Dougherty D. A. 2004. *Modern Physical Organic Chemistry*. Capítulo 4.
20. Schalley C., Hirose K. 2007. *Analytical Methods in Supramolecular Chemistry*.
21. Ariga K., Kunitake T. 2006. *Supramolecular Chemistry – Fundamentals and Applications*. Berlin Heidelberg. Springer-Verlag Heidelberg ed. 2° Ed. p- 8, 28.
22. Diederich F. 1991. *Cyclophanes*. The royal society of chemistry ed. 1° Ed. Cambridge.
23. Overfield R. E., Scherz A., Kaufmann K. J., Wasielewski M. R. 1983. “Photophysics of Bis(chlorophyll1)cyclophanes: Models of Photosynthetic Reaction Centers” *J. Am. Chem. Soc.* (105): 4256-4260.
24. Tanaka K., Sagae H., Toyoda K., Noguchi K., Hirano M. 2007. “Enantioselective Synthesis of Planar-Chiral Metacyclophanes through Rhodium-Catalyzed Alkyne Cyclotrimerization”. *J. Am. Chem. Soc.* (129): 1522-1523.
25. Murakami Y., Kikuchi J., Ohno T., Hayashida O., Kojima M. 1990. “Syntheses of Macrocyclic Enzyme Models. 7.t Octopus Cyclophanes Having L-Aspartate Residues as Novel Water-Soluble Hosts. Aggregation Behavior and Induced-Fit Molecular Recognition”. *J. Am. Chem. Soc.* (112): 7672-7681.
26. Rodgers S. J., Yuen Ng C., Raymond K. N. 1985. High-dilution synthesis of macrocyclic polycatecholates. *J. Am. Chem. Soc.* 107 (13), pp 4094–4095.
27. Brigitte Bibal , Cédric Mongin and Dario M. Bassani. 2014. “Template effects and supramolecular control of photoreactions in solution”. *Chem. Soc. Rev.* 43, pp 4179-4198.
28. Bailey William F. W., Jiang X. L., McLeod C. E. 1995. Conformational Control in the Cyclization of an Unsaturated Vinylolithium: Synthesis of (.+.-)-Laurene. *J. Org. Chem.* 60 (24), pp 7791–7795.
29. Kappe C. O., Dallinger D., Murphree S. S. 2009. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists*. pp. 11-19.
30. Steed J. W., Turner D. R., Wallace K. J. 2007. *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*. Wiley ed. 1° Ed. Great Britain. p30, 17-26.
31. Steiner T., Desiraju G. R. 1998. Distinction between the weak hydrogen bond and the van der Waals. *Chem. Commun.* pp 891-892.
32. Desiraju G.R. 1996. The C-H---O Hydrogen Bond: Structural Implications and Supramolecular Design. *Acc. Chem. Res.* 29, pp 441-449.
33. Steed J. W., Atwood J. L. 2009. *Supramolecular Chemistry*. pp 363.
34. Diederich, F., Smithrud, D. B., Sanford, E. M., Wyman, T. B., Ferguson, S. B., Carcanague, D. R., Chao, I. y Houk, K. 1992. Solvent Effects in Molecular recognition “t. *Acta Chemica Scandinavica* 46: 205-215.

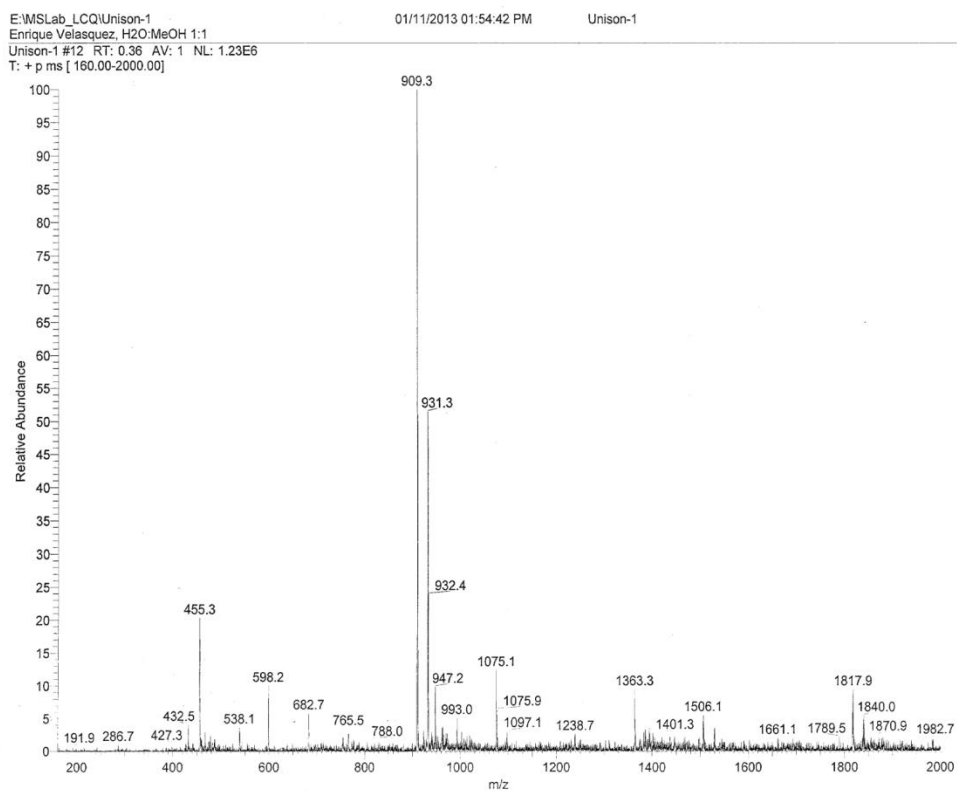
35. Nicolás Vázquez M. I., Marín Chiñas E., Castro Martínez F. M., Miranda Rubalcaba R. 2006. *Algunos aspectos básicos de la química computacional*. 1° Ed. pp 11-51.
36. Levine I. N. 2001. *Química cuántica*. 5° Ed. Ed. Prentice Hall. pp 467-527, 534, 554.
37. Fiolhais C., Noguera F. Marques M. 2003. A primer in density functional theory. Lecture notes in Physics. Springer ed.
38. M. del Campo J., Gázquez J. L., Trickey S. B., Vela A. 2012. Non-empirical improvement of PBE and its hybrid PBE0 for general description of molecular properties. *J. of Chem. Phys.* 136: 104108.
39. Schneider H. J., Yatsimirsky A. K. J. Wiley. 2000. Principles and methods in supramolecular chemistry. Wiley ed. pp 139.
40. Inoue M. 2013. Spectrometric Titration A guide to experimental methods. Colección textos ACADÉMICOS No. 98. 1° Ed.
41. Cohen Y., Avram L., Frish L. 2005. Diffusion NMR spectroscopy in supramolecular and combinatorial chemistry: an old parameter-new insights. *Angew. Chem. Int. Ed.* 44: 520-554.
42. Mathews C. K, van Holde K. E., Ahern K. G. 1990. *Biochemistry*. Person Education ed. 3° Ed. p83-91.
43. Malandro, MS., Kilberg, MS. 1996. Molecular biology of mammalian aminoacid transporters. *Annu Ver Biochem*, 65: 305-36.
44. Yudkoff M. 2013. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and medical aspects*. 7° Ed. Elsevier ed.
45. Velazquez E.F. 2000. Síntesis de [10.1.10.1] *Paraciclofanos Funcionalizados y Estudio de sus Propiedades de Complejación y Reconocimiento Molecular*. Tesis Doctorado DIPM. Universidad de Sonora.
46. Virués C., Navarro R. E., Velázquez E. F., Inoue M. 2008. Supramolecular Chemistry. Vol. 20 pp. 301-307.
47. Freire E. 2008. Do enthalpy and entropy distinguish first in class from best in class?. *Drug Discovery Today*. vol.13.

ANEXOS

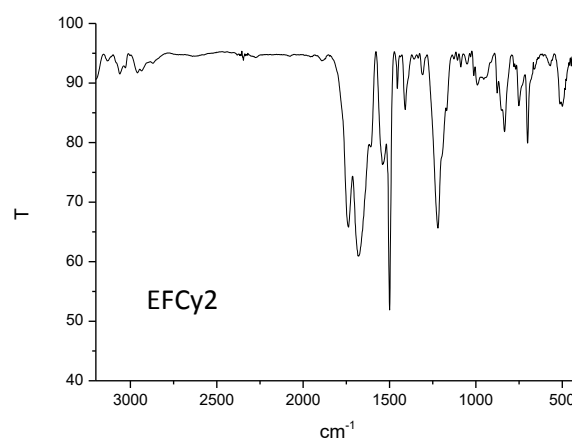
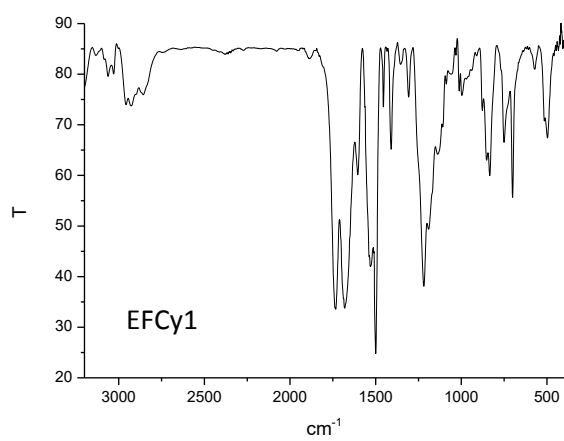
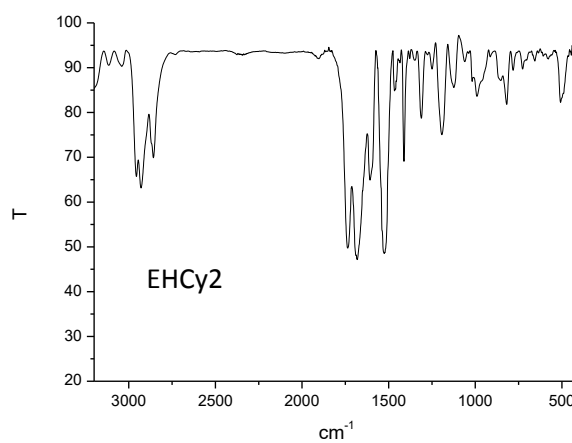
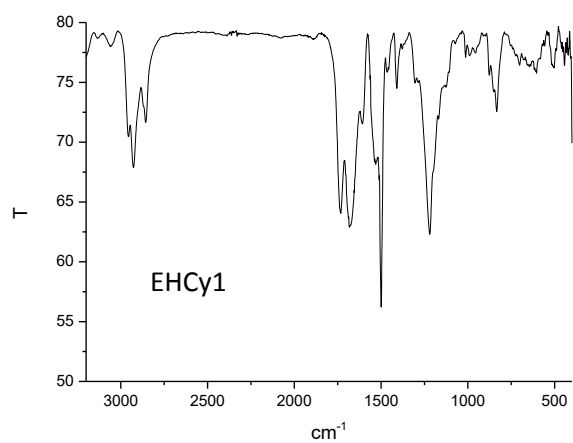
Anexo 1. Espectros de masas de alta resolución obtenidos para los ésteres EHCy1, EFCy1, EHCy2 y EFCy2.



Anexo 2. Espectro de masas de baja resolución obtenido para Cy2.



Anexo 3. Espectros de infrarrojo de los receptores EHCy1, EHCy2, EFCy1 y EFCy2.



Anexo 4. Estructuras más estables para los sistemas Cy1:Arg-OMe y Cy1²⁻ArgMeH₂²⁺.

Figura A4.1. Conformaciones más estables encontradas para el sistema: Cy1:Arg-OMe.

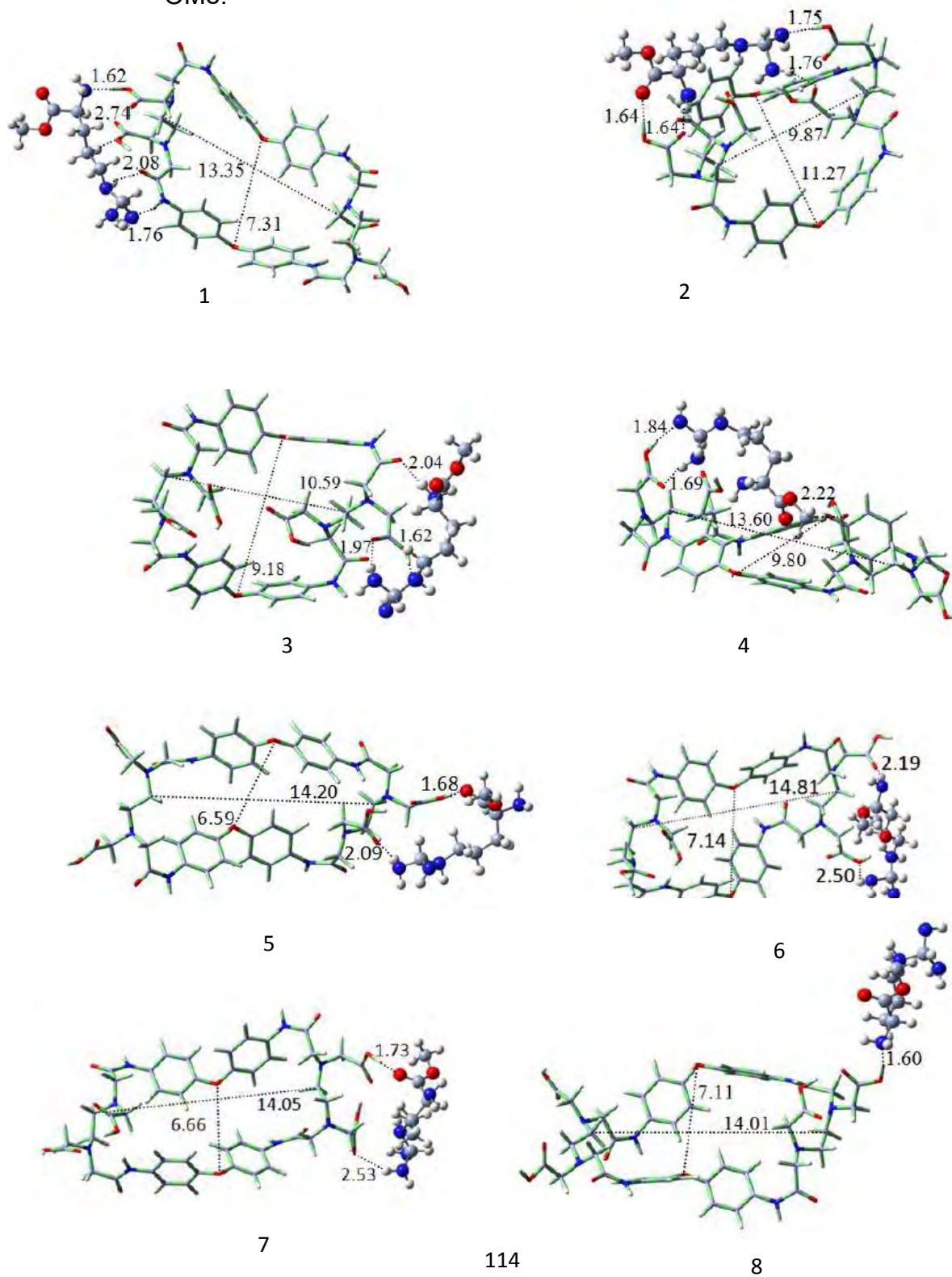
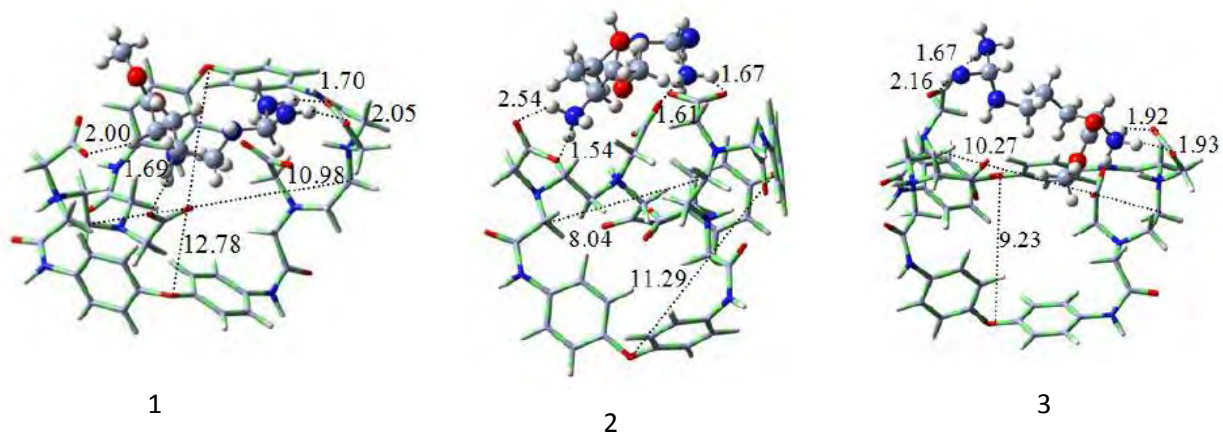


Figura A4.2. Conformaciones más estables encontradas para el sistema: $(\text{Cy1})^{2-} :(\text{Arg-OMeH}_2)^{2+}$.



Anexo 5. Conformaciones más estables de los sistemas EFCy1:Arg-OMe y EFCy1:Lis-OMe.

Figura A5.1 Conformaciones más estables encontradas para el sistema EFCy1:Arg-OMe.

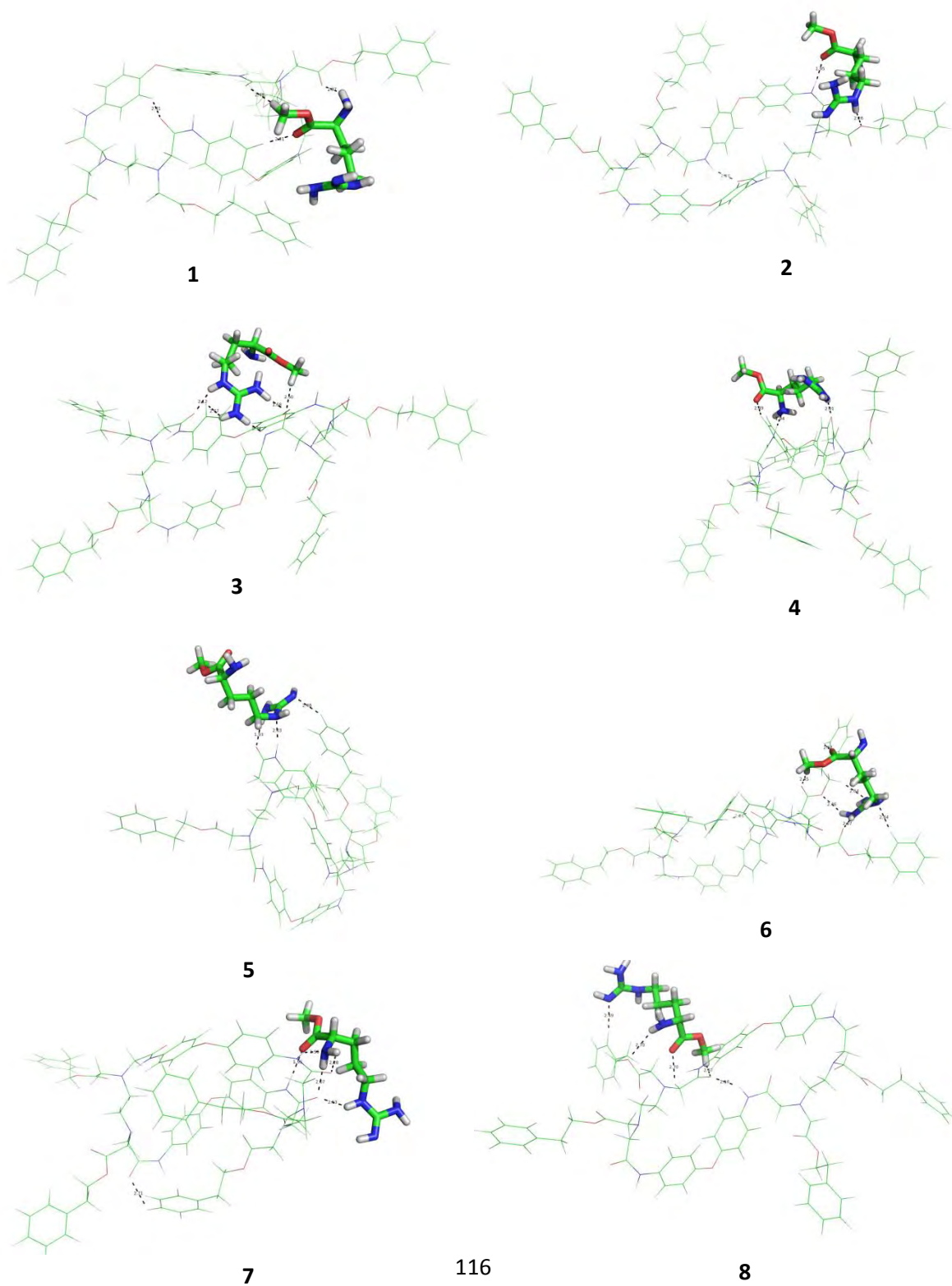
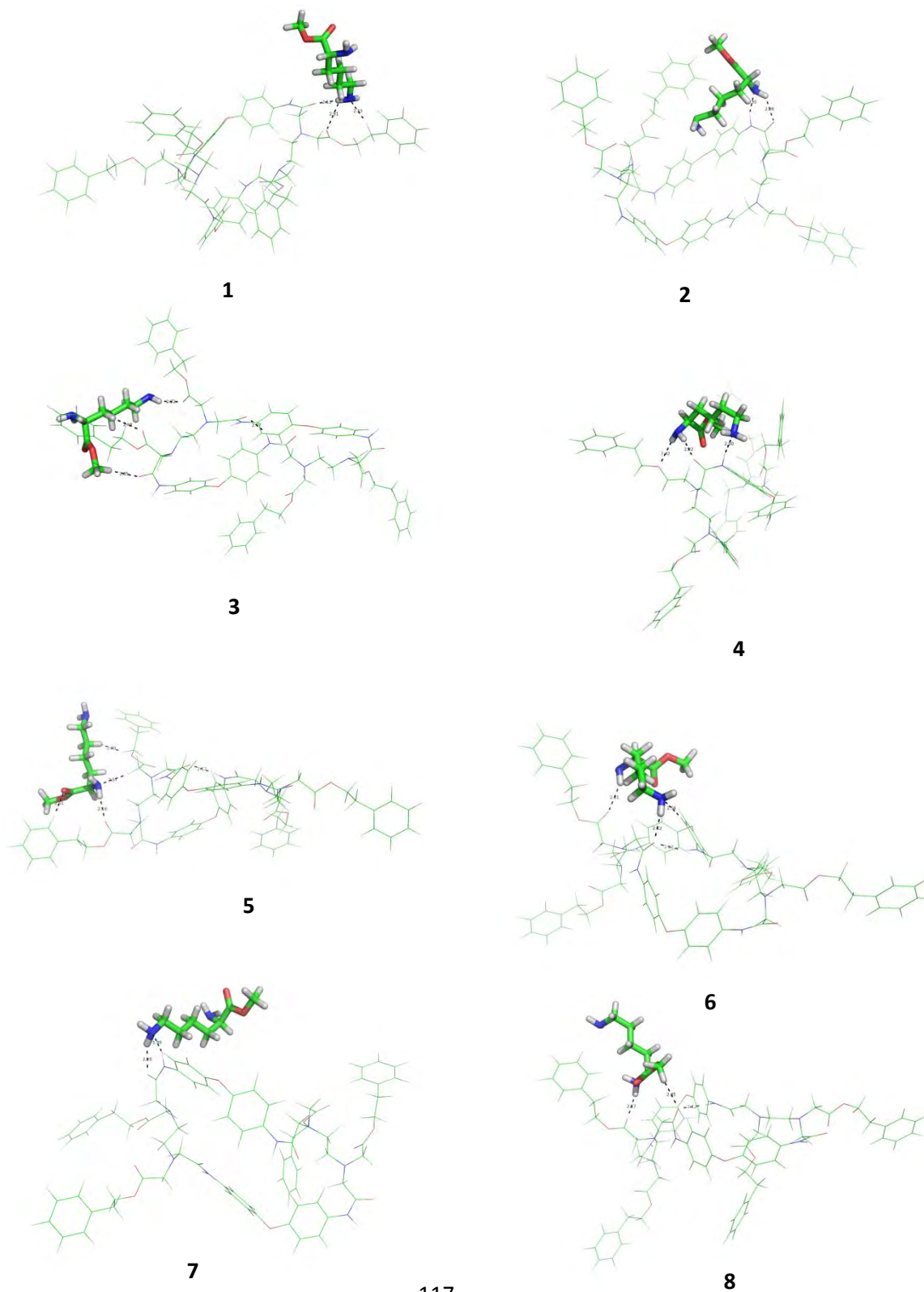


Figura A5.2 Conformaciones más estables encontradas para el sistema EFCy1:Lis-OMe.



Anexo 6. Conformaciones más estables de los sistemas EHCy1:Arg-OMe y EHCy1:Lis-OMe.

Figura A6.1 Conformaciones más estables encontradas para el sistema EHCy1-ArgMe.

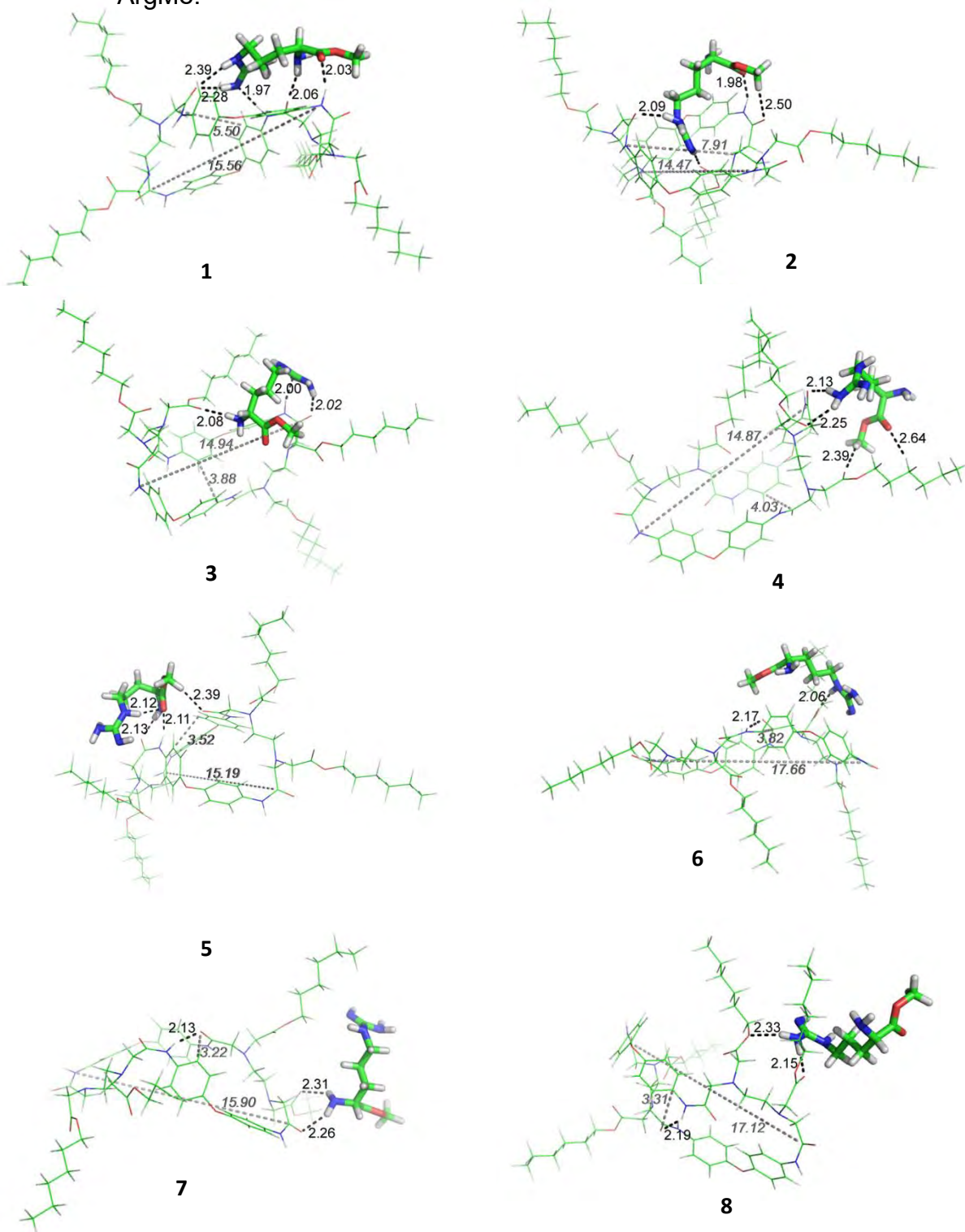
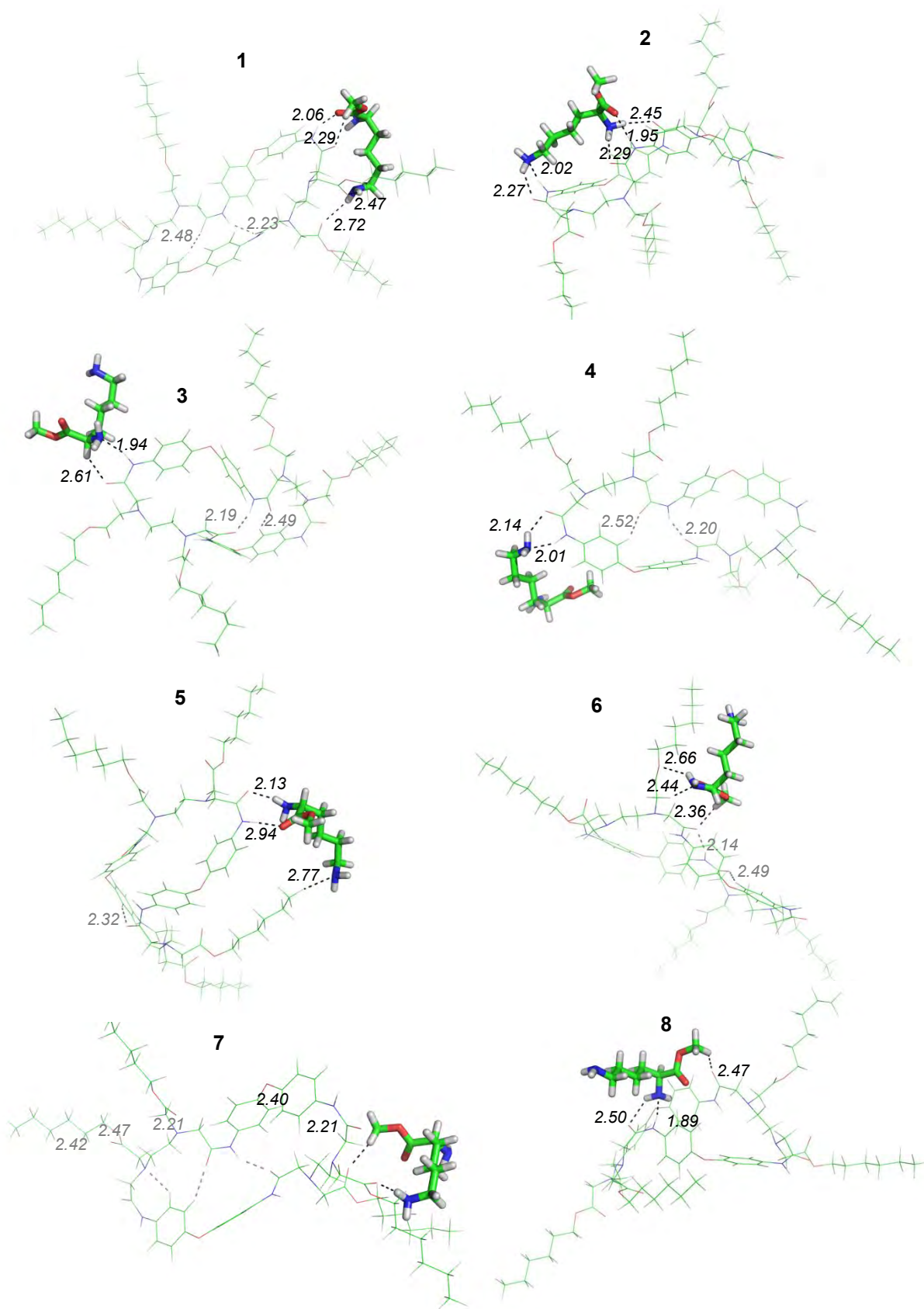


Figura A6.2. Conformaciones más estables encontradas para el sistema EHCy1:Lis-OMe.



PRODUCTOS OBTENIDOS

Congresos

1. 30° Congreso Latinoamericano de Química 2012. *Síntesis, Caracterización, Reconocimiento Molecular y Estudios Teóricos de Receptores Artificiales Tipo Ciclofano hacia Arginina Metil Éster*. Cancún, Q. Roo, 2012.
2. 46° Congreso Mexicano de Química 30° Congreso Nacional de Educación Química. *Síntesis y Caracterización de Receptores Artificiales Tipo Ciclofano en Medio Orgánico*. Querétaro, Qro., 2011.
3. Primer Encuentro Nacional de Usuarios de Cómputo de Alto Desempeño. *Cálculos Teóricos de Receptores Tipo Ciclofano hacia Arginina Metil Éster*. Celaya, Gto., 2012.
4. 48° Congreso Mexicano de Química 32° Congreso Nacional de Educación Química. *Síntesis y Caracterización de Receptores Artificiales Tipo Ciclofano y Reconocimiento Molecular Teórico/Experimental hacia Aminoácidos*. Guanajuato, Gto., 2013.
5. Primer Simposio de Resonancia Magnética Nuclear del Posgrado en Química. *Reconocimiento Molecular de Arginina y Lisina por un Receptor Macrocíclico Tipo Ciclofano Mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN ¹H)*. México, D.F., 2014.
6. IX Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales. *Síntesis y Caracterización de Receptores Artificiales Tipo Ciclofano en Medio Orgánico*. Hermosillo, Son., 2011.
7. XVII RUIM 2012. *Síntesis, Caracterización, Reconocimiento Molecular y Estudios Teóricos de Receptores Artificiales Tipo Ciclofano hacia Arginina Metil Éster*. Hermosillo, Son, 2012.
8. X Coloquio Bienal en Ciencia de Materiales. *Síntesis, Caracterización y Estudios de Reconocimiento Molecular Teóricos y Experimentales de Receptores Artificiales, Tipo Ciclofano hacia Aminoácidos*. Hermosillo, Son. 2013.

Estancia Doctoral

PROYECTO:

INTERACTION BETWEEN XENOESTROGENS AND CYCLODEXTRINS BY DOCKING/SCORING
FUNCTIONS

Bajo la dirección de: Dr. Pietro Cozzini

PERÍODO:

02 Mayo – 02 Julio del 2011

Artículo Publicado:

Molecular Recognition of a cyclophane as a receptor towards arginine methyl ester:
Theoretical perspectives

**Abigail Miranda-de la Rosa, Aned de León, Enrique F. Velázquez, Rocío Sugich-Miranda,
Rogerio Sotelo-Mundo, Motomichi Inoue**

Revista: AFINIDAD LXX, 561, Enero-Marzo 2013

Molecular recognition of a cyclophane as a receptor towards arginine methyl ester: Theoretical perspectives

Abigail Miranda-de la Rosa^a, Aned de Leon^{b*}, Enrique F. Velazquez^a, Rocio Sugich-Miranda^a, Rogerio Sotelo-Mundo^c, Motomichi Inoue^a

^aDepartamento de Investigación en Polímeros y Materiales, ^bDepartamento de Ciencias Químico-Biológicas, Universidad de Sonora, Apartado Postal 130, Hermosillo, Sonora 83000, México.

^cLaboratorio de Biología Molecular de Organismos Acuáticos, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora 83000, México.

Reconocimiento molecular de un ciclofano como receptor de arginina metiléster: Perspectivas teóricas

Reconeixement molecular d'un ciclofan com a receptor d'arginina metilèster: Perspectives teòriques

Recibido: 4 de octubre de 2012; revisado: 11 de enero de 2013; aceptado: 14 de enero de 2013

RESUMEN

En este estudio nos enfocamos en el reconocimiento molecular de arginina con un ciclofano como receptor. Este macrociclo consiste de dos unidades fenileno-O-fenileno unidas por dos cadenas EDTA y contiene cuatro grupos carboxilato pendientes. Para entender las interacciones de estos sistemas realizamos una búsqueda conformacional y optimizaciones geométricas con el uso de la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT). Decidimos enfocarnos en dos diferentes escenarios. En el primero, la arginina metiléster y el ciclofano no están cargados. En el segundo, ambas especies son iónicas y el sistema globalmente es neutral. Los cálculos revelan que de hecho interactúan favorablemente, donde la configuración más estable es aquella en la cual la arginina metiléster catiónica se extiende sobre el ciclo e interactúa con los grupos carboxilato desprotonados.

Palabras clave: aminoácidos, ciclofanos, reconocimiento molecular.

SUMMARY

In this study we focus on molecular recognition towards arginine methyl ester with a cyclophane as a receptor. This macrocycle consists of two phenylene-O-phenylene units linked by two EDTA chains and carries four pendant carboxylate groups. To understand the interactions of these systems we performed a conformational search and geometry optimizations with the use of the Density Functional Theory (DFT). We decided to focus on two different scenarios. In the first one, the arginine ester and the cyclophane are not charged. In the second one, both species are ionic and the system as a whole is neutral.

The computations revealed that they in fact interact favorably, where the most stable configuration is that in which cationic arginine methyl ester is extended above the cycle and interacts with the pendant deprotonated carboxylate groups.

Keywords: amino acids, cyclophanes, molecular recognition

RESUM

En aquest estudi ens enfocuem en el reconeixement molecular d'arginina amb un ciclofan com a receptor. Aquest macrocicle consisteix en dues unitats fenilè-O-fenilè unides per dues cadenes EDTA i conté quatre grups de carboxilat pendents. Per entendre les interaccions d'aquests sistemes realitzem una recerca conformacional i optimitzacions geomètriques amb l'ús de la Teoria del Funcional de la Densitat (DFT). Decidim enfocar-nos en dos escenaris diferents. En el primer, l'arginina metilèster i el ciclofan no estan carregats. En el segon, ambdues espècies són iòniques i el sistema és globalment neutral. Els càlculs revelen que de fet interactuen favorablement, on la configuració més estable és aquella en la qual l'arginina metilèster catiónica s'estén sobre el cicle i interactua amb els grups carboxilat desprotonats.

Mots clau: aminoàcids, ciclofans reconeixement molecular

* Corresponding autor. Email: d_aned@hotmail.com