

# Universidad de Huelva

Departamento de Química "Profesor José Carlos Vílchez  
Martín"



## Diseño de moléculas con actividad biológica : síntesis e implicaciones en química supramolecular

Memoria para optar al grado de doctor  
presentada por:

**Miguel Ángel Romero Carrasco**

Fecha de lectura: 8 de julio de 2019

Bajo la dirección de los doctores:

Uwe Pischel

Jesús Fernández Arteaga

**Huelva, 2019**



# Universidad de Huelva

Centro de Investigación en Química  
Sostenible y Departamento de Química



## **Diseño de Moléculas con Actividad Biológica: Síntesis e Implicaciones en Química Supramolecular**

**Memoria para optar al grado de doctor presentada por:**

**Miguel Ángel Romero Carrasco**

Fecha de lectura:

Bajo la dirección del doctor:

Uwe Pischel

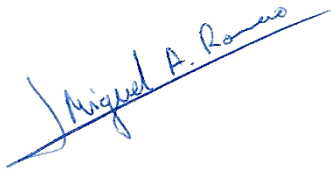
**Huelva, 2019**





## **Declaración de autoría y originalidad**

Yo, Miguel Ángel Romero Carrasco, con documento de identificación 48926371-N, declaro que asumo la autoría y originalidad de esta tesis doctoral, entendidas en el sentido de que no he utilizado fuentes sin citarlas debidamente. Todos los resultados mostrados aquí son resultados de mi propio trabajo, bajo la supervisión de los Dres. Uwe Pischel y Jesús Fernández Arteaga.



Fdo. Miguel Ángel Romero Carrasco



## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de tesis, los Dres. Uwe Pischel y Jesús Fernández Arteaga, por su confianza, apoyo y orientación desde el primer día en que entré a formar parte de su grupo de investigación.

En segundo lugar, voy a mencionar a esas personas con las que he compartido tantas horas de trabajo dentro del laboratorio y que además en muchos casos han pasado a formar parte de mi vida debido a la amistad que ha surgido entre nosotros. Jose, por enseñarme y ayudarme en mis primeros meses en el grupo. Antonio, por esos buenos ratos compartidos haciendo síntesis escuchando esa música mala que me ponías. Zoe, por tantos años juntos aguantándome y ayudándonos el uno al otro en todo. Cátia y Julián por echarme siempre una mano con los experimentos en las “máquinas”. Tania, has sido la mejor alumna de TFG, gracias por tu trabajo constante, así como por tu simpatía y alegría. Álvaro, por tus consejos y charlas tan interesantes sobre cualquier cosa. María y Cristina, por tantos y tantos momentos riéndonos juntos en la cocina con nuestras tonterías, gracias amigas no cambiéis nunca. A Patri, por tu sentido del humor y por tu ayuda constante. A mis recientes compañeros de laboratorio Anabel, David, Pilar, Agustín y Rubén, que aunque no me dejéis escribir esta tesis tranquilo con vuestras tonterías se agradece vuestra compañía y esos ratos agradables que pasamos juntos. Y en especial a Vânia por ser una gran amiga y consejera, que aunque me encantaba hacerte rabiar y

discutimos algunas veces, has estado ahí para todo lo que te he pedido y no tendré forma de agradecer todo lo que has hecho por mí.

También quiero dar las gracias a todos los compañeros que hicieron que mi estancia en el grupo de Lisboa fuera tan agradable, entre ellos Rita, Ambrosio, María, Andrea, Lúcia, Miguel, Artur, Tiago, Alfonso, Pedro. Y especialmente a dos personas, a Nuno por guiarme y enseñarme tanto en tan pocos meses, por ayudarme en cualquier cosa que necesitaba tanto dentro como fuera del laboratorio, por tu forma de ser y por tu profesionalidad, hace falta más gente como tú en el mundo de la investigación, gracias amigo. A Johan, el wey, el mexicano, como así te conocen todos los que me rodean, has sido mi un gran apoyo para mí, gracias por tu amistad, por estar siempre que te lo pedía, por esas fiestas juntos, por tantas cosas que no podría escribir aquí, sé que a pesar de la distancia tengo un amigo para toda la vida.

Para terminar, cómo no acordarme de esas personas, familia y amigos, que están conmigo día a día y que gracias a ellos y a su apoyo en los momentos no tan buenos han conseguido que sea la persona que soy hoy día, que no tirara la toalla y siguiera siempre adelante. Y de manera más especial a ti Laura, mi compañera de vida, la persona más importante, la que siempre ha estado ahí para todo, mi mejor amiga, no puedo explicar con palabras lo que significas para mí, gracias.



## Resumen

Uno de los grandes desafíos dentro de la Química Supramolecular es conseguir imitar el comportamiento de las biomoléculas. Para ello, es necesario el diseño de compuestos sintéticos que tengan gran afinidad y selectividad entre ellos (anfitriones y huéspedes). En esta disciplina, el reconocimiento molecular para la formación de complejos mediante uniones no covalentes establece la base de la química anfitrión-huésped.

Los cucurbit[ $n$ ]urilos son macrociclos con alta rigidez estructural que pueden formar complejos supramoleculares en disolución acuosa con afinidad y selectividad superiores a la de otros anfitriones. Así son capaces de alojar en su interior huéspedes con diferentes estructuras, grupos funcionales y con o sin carga. Además su baja toxicidad los hace realmente interesantes para el control de procesos biológicos, la administración de fármacos, la modificación de biomoléculas, entre otras aplicaciones biológicas.

En esta tesis doctoral, la estrategia a seguir incluye tanto la caracterización como el diseño y desarrollo de sistemas para la liberación supramolecular activada con luz de huéspedes de interés biológico de sus complejos con cucurbit[ $n$ ]urilos en agua. Para ello se utiliza un compuesto fotoactivo cuya entrada en el macrociclo está impedida inicialmente pero que tras ser irradiado genera una especie competidora que desplaza al huésped fuera de la cavidad.

El primero de los sistemas que se presenta en este trabajo consiste en el uso de un competidor protegido en primera instancia con un grupo protector fotosensible para la liberación activada por luz de productos naturales terpénicos de CB7. A continuación se detalla otro procedimiento para el desplazamiento de un tripéptido de su complejo ternario con CB8 mediante el empleo de un interruptor molecular chalcona/flavilio que se activa con dos *inputs* (luz y ácido). Por último se consigue desarrollar un sistema de liberación de aminoácidos y neurotransmisores del interior del anfitrión SCX4 (altamente soluble en medio acuoso) por competición de un catión flavilio, demostrándose también la reversibilidad del sistema.

De manera más general, se han caracterizado y perfeccionado sistemas supramoleculares que incluyen anfitriones sintéticos para la administración controlada por luz de especies de interés en condiciones biológicas.

## Abstract

One of the great challenges in Supramolecular Chemistry is the imitation of the behaviour of biomolecules. For this, the design of synthetic compounds that have great affinity and selectivity between them (hosts and guests) is necessary. In this discipline, molecular recognition for the formation of complexes by non-covalent bonds establishes the basis of host-guest chemistry.

Cucurbit[*n*]urils are macrocycles with high structural rigidity that can form supramolecular complexes in aqueous solution with higher affinity and selectivity than other hosts. Thus, they are able to bind guests with different structures, functional groups and charge status. Besides, their low toxicity makes them really interesting for the control of biological processes, drug delivery, modification of biomolecules, amongst other biological applications.

In this doctoral thesis, the strategy to be followed includes both the characterization and the design and development of systems for the light-activated supramolecular release of biological guests from their cucurbit[*n*]uril complexes in water. For this purpose, a photoactive compound is used whose entry into the macrocycle is initially prevented and after being irradiated generates a competing species that displaces the guest from the cavity.

The first of the systems presented in this work consists of the use of a protected competitor that in the first instance contains a photosensitive protective group for the light-induced release of

terpenic natural products from CB7. Next, another procedure is described for the displacement of a tripeptide from its ternary complex with CB8 by means of a chalcone/flavylium photoswitch that is activated with two inputs (light and acid). Finally, a system for the release of aminoacids and neurotransmitters from the SCX4 host (highly soluble in aqueous medium) was developed. The latter works by means of competition of a flavylium cation, showing the reversibility of the system.

Generally, supramolecular systems including synthetic hosts for light-controlled delivery of species of interest in biological conditions have been characterized and improved.



# Índice

|                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Capítulo 1: Introducción</b>                                                                       | <b>1</b>  |
| 1.1 Química Supramolecular                                                                            | 2         |
| 1.2 Química anfitrión-huésped                                                                         | 7         |
| - 1.2.1 Constantes de asociación                                                                      | 9         |
| - 1.2.2 Efecto hidrofóbico                                                                            | 11        |
| - 1.2.3 Anfitriones                                                                                   | 13        |
| 1.3 Cucurbiturilos                                                                                    | 15        |
| - 1.3.1 Propiedades de los CBn                                                                        | 17        |
| - 1.3.2 Química anfitrión-huésped de CBn                                                              | 20        |
| 1.4 Aplicaciones de los complejos supramoleculares con CBn                                            | 23        |
| - 1.4.1 Biocompatibilidad                                                                             | 23        |
| - 1.4.2 Administración de fármacos                                                                    | 24        |
| - 1.4.3 Control de procesos biológicos                                                                | 26        |
| - 1.4.4 Complejación de biomoléculas                                                                  | 27        |
| - 1.4.5 Sensores e interruptores moleculares                                                          | 29        |
| - 1.4.6 Fotoquímica en sistemas supramoleculares<br>con CBn. Liberación de huéspedes activada con luz | 32        |
| 1.5 Referencias                                                                                       | 35        |
| <b>Capítulo 2: Afinidad y selectividad de productos naturales<br/>terpénicos con CBn</b>              | <b>48</b> |
| 2.1 Introducción                                                                                      | 49        |
| 2.2 Caracterización supramolecular de complejos<br>terpeno/CBn                                        | 57        |
| - 2.2.1 Caracterización supramolecular de complejos<br>terpeno/CB7                                    | 57        |
| - 2.2.2 Caracterización supramolecular de complejos<br>terpeno/CB8                                    | 69        |

|                                                                                                     |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| - 2.2.3 Comparativa supramolecular CB7/CB8 como anfitrión                                           | 78         |
| 2.3 Liberación fotoactivada de huéspedes terpenos de sus complejos con CB7                          | 82         |
| - 2.3.1 Diseño y caracterización del sistema para la liberación activada con luz de terpenos de CB7 | 82         |
| - 2.3.2 Liberación fotoactivada de terpenos de CB7                                                  | 88         |
| 2.4 Conclusiones                                                                                    | 98         |
| 2.5 Procedimiento experimental                                                                      | 99         |
| 2.6 Referencias                                                                                     | 104        |
| <b>Capítulo 3: Lógica secuencial en liberación fotoinducida de huéspedes de CBn</b>                 | <b>112</b> |
| 3.1 Introducción                                                                                    | 113        |
| 3.2 Caracterización del sistema chalcona/flavilio                                                   | 119        |
| - 3.2.1 Fotoquímica del sistema chalcona/flavilio                                                   | 119        |
| - 3.2.2 Cinética y termodinámica del sistema chalcona/flavilio                                      | 124        |
| 3.3 Lógica secuencial del sistema chalcona/flavilio                                                 | 128        |
| 3.4 Caracterización supramolecular del complejo flavilio/CB8                                        | 131        |
| 3.5 Liberación fotoactivada de tripéptido de su complejo con CB8                                    | 135        |
| 3.6 Conclusiones                                                                                    | 137        |
| 3.7 Procedimiento experimental                                                                      | 138        |
| 3.8 Referencias                                                                                     | 142        |
| <b>Capítulo 4: Liberación activada con luz de especies biológicas de calixarenos</b>                | <b>146</b> |
| 4.1 Introducción                                                                                    | 147        |

|                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.2 Caracterización del sistema chalcona/flavilio                                                                      | 155        |
| 4.3 Caracterización supramolecular de los complejos individuales de lisina, arginina, acetilcolina y flavilio con SCX4 | 158        |
| 4.4 Liberación fotoactivada de lisina, arginina y acetilcolina de SCX4                                                 | 163        |
| 4.5 Conclusiones                                                                                                       | 168        |
| 4.6 Procedimiento experimental                                                                                         | 169        |
| 4.7 Referencias                                                                                                        | 170        |
| <b>Capítulo 5: Conclusiones generales</b>                                                                              | <b>175</b> |
| 5.1 Conclusiones generales                                                                                             | 176        |
| 5.2 General conclusions                                                                                                | 178        |
| <b>Capítulo 6: Desarrollo experimental general</b>                                                                     | <b>181</b> |
| 6.1 Desarrollo experimental general                                                                                    | 182        |
| - 6.1.1 Síntesis de CB7                                                                                                | 182        |
| - 6.1.2 Caracterización de CB7 y CB8                                                                                   | 184        |
| 6.2 Referencias                                                                                                        | 186        |
| <b>Contribuciones científicas derivadas de esta tesis doctoral</b>                                                     | <b>187</b> |
| <b>Currículum vitae</b>                                                                                                | <b>189</b> |
| <b>Anexos</b>                                                                                                          | <b>194</b> |
| Publicación 1                                                                                                          | 194        |
| Publicación 2                                                                                                          | 201        |
| Publicación 3                                                                                                          | 207        |



## Símbolos y abreviaturas

|                                    |                                            |
|------------------------------------|--------------------------------------------|
| $\epsilon$                         | Coeficiente de extinción molar             |
| $K$                                | Constante de asociación                    |
| $k_{\text{obs}}$                   | Constante de velocidad observada           |
| $\delta$                           | Desplazamiento químico                     |
| $I_{\text{abs}}$                   | Intensidad de luz absorbida                |
| $\lambda$                          | Longitud de onda                           |
| $\lambda_{\text{exc}}$             | Longitud de onda de excitación             |
| $\lambda_{\text{max}}$             | Longitud de onda de máxima absorción       |
| $\phi$                             | Rendimiento cuántico                       |
| $T$                                | Temperatura                                |
| $t$                                | Tiempo                                     |
| $\Delta C_p$                       | Variación de capacidad calorífica          |
| $\Delta H$                         | Variación de entalpía                      |
| $\Delta S$                         | Variación de entropía                      |
| $V$                                | Volumen                                    |
| <b>CB, CB<math>n</math></b>        | Cucurbiturilo, cucurbit[ $n$ ]urilo        |
| <b>DFT</b>                         | Teoría del funcional de la densidad        |
| <b>DTE</b>                         | Ditieniletano                              |
| <b>FG</b>                          | Fulgimida                                  |
| <b>GAG</b>                         | Glicosaminoglicano                         |
| <b>GC</b>                          | Cromatografía de gases                     |
| <b>Gly</b>                         | Glicina                                    |
| <b><math>^1\text{H}</math>-RMN</b> | Resonancia magnética nuclear de protón     |
| <b>HRMS</b>                        | Espectrometría de masas de alta resolución |

|                          |                                                                        |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| <b>ITC</b>               | Calorimetría Isoterma de titulación                                    |
| <b>MS</b>                | Espectrometría de masas                                                |
| <b>NOE</b>               | Efecto nuclear Overhauser                                              |
| <b>NVOC</b>              | 6-nitroveratriloxicarbonilo                                            |
| <b>PC</b>                | <i>Packing coefficient</i>                                             |
| <b>Phe</b>               | Fenilalanina                                                           |
| <b>PM</b>                | Peso molecular                                                         |
| <b>PPG</b>               | Grupo protector fotolábil                                              |
| <b>ROESY</b>             | Espectroscopia de correlación de efecto nuclear<br>Overhauser rotativo |
| <b>SCX<math>n</math></b> | <i>p</i> -sulfonatocalix[ $n$ ]areno                                   |
| <b>SPME</b>              | Microextracción en fase sólida                                         |
| <b>TLC</b>               | Cromatografía en capa fina                                             |
| <b>UV/vis</b>            | Ultravioleta-visible                                                   |



# ***CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN***

## 1.1. QUÍMICA SUPRAMOLECULAR

La Química Supramolecular tiene como objetivo el desarrollo de sistemas químicos basados en las interacciones intermoleculares no covalentes de sus componentes.<sup>1</sup> Algunas definiciones incluyen expresiones como “la química del enlace no covalente” o “la química no molecular”. Por su parte, el Premio Nobel de Química en 1987 por su contribución en esta área, Jean-Marie Lehn, propuso la definición de “química de los ensamblajes moleculares y del enlace intermolecular”<sup>2</sup> así como “química más allá de la molécula, teniendo en cuenta cualquier sistema organizado resultante de la asociación de dos o más especies químicas unidas por fuerzas intermoleculares”.<sup>3</sup>

Originalmente la Química Supramolecular incluía en su descripción la interacción no covalente entre un “anfitrión” y una molécula “huésped” (Figura 1.1). Sin embargo, más recientemente los trabajos en esta materia no sólo incluyen sistemas anfitrión-huésped sino también dispositivos moleculares y reconocimiento molecular, como el auto-ensamblaje.<sup>4</sup>

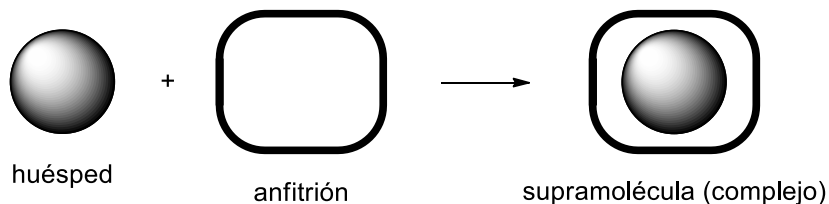


**Figura 1.1.** Representación del principio de la Química Supramolecular.

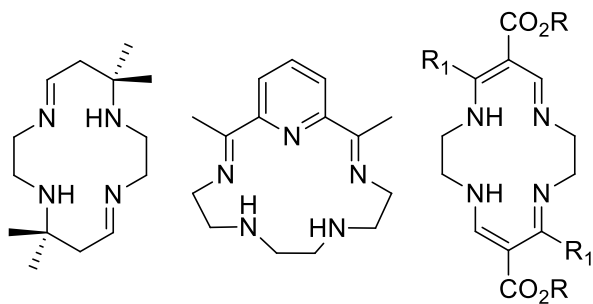
Aunque los primeros ejemplos de sistemas supramoleculares, así como los conceptos y raíces de la Química Supramolecular se

pueden remontar a los inicios de la química moderna, se puede considerar como una ciencia bastante joven ya que no fue hasta mediados o finales de los 60 cuando se produjo el gran desarrollo de esta disciplina con la aparición de ligandos macrocíclicos para cationes metálicos, estableciéndose entonces su origen. En la Tabla 1.1 se muestra la evolución en el tiempo.

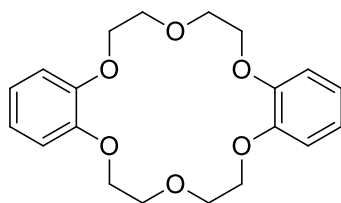
**Tabla 1.1.** Cronología de la Química Supramolecular.<sup>4</sup>

|      |                                                                                                                                                  |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1841 | C. Schafhäütl: estudio de la intercalación de grafito                                                                                            |
| 1849 | F. Wölher: clatrato de $\beta$ -quinol $H_2S$                                                                                                    |
| 1891 | Villiers and Hebd: compuestos de inclusion de ciclodextrina                                                                                      |
| 1893 | Alfred Werner: química de la coordinación <sup>5</sup>                                                                                           |
| 1894 | Emil Fischer: concepto de <i>lock and key</i> <sup>6</sup>                                                                                       |
| 1906 | Paul Ehrlich: introducción al concepto de receptor                                                                                               |
| 1937 | K. L. Wolf: el término “Supermoléculas” es acuñado                                                                                               |
| 1939 | Linus Pauling: enlaces de hidrógeno son incluidos en su libro <sup>7</sup>                                                                       |
| 1945 | H. M. Powell: estructura de rayos X de los cristal de compuestos de inclusión de $\beta$ -quinol; introducción del término clatrato <sup>8</sup> |
| 1949 | Brown y Farthing: síntesis de [2.2]-paraciclofano <sup>9</sup>                                                                                   |
| 1953 | Watson y Crick: estructura del ADN <sup>10</sup>                                                                                                 |
| 1959 | Donald Cram: intento de síntesis de complejos de transferencia de carga de ciclofano con $(NC)_2C=C(CN)_2$ <sup>11</sup>                         |
| 1961 | N. F. Curtis: primer macrociclo con base de Schiff de acetona con etilendiamina <sup>12</sup>                                                    |
| 1964 | Busch y Jäger: macrociclos con base de Schiff                                                                                                    |
| 1967 | Charles Pedersen: éteres corona <sup>13</sup>                                                                                                    |

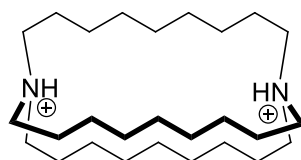
- 1968 Park y Simmons: anfitriones de aniones katapinandos<sup>14</sup>
- 1969 Jean-Marie Lehn: síntesis del primer criptando
- 1969 Ron Breslow: catalisis con ciclodextrinas<sup>15</sup>
- 1973 Donald Cram: anfitriones esfera
- 1978 Jean-Marie Lehn: introducción del término “Química Supramolecular”
- 1979 Gokel y Okahara: desarrollo de los éteres lazo
- 1981 Vögtle y Weber: anfitriones podando<sup>16</sup>
- 1986 A. P. de Silva: detección por fluorescencia de iones de metales alcalinos con derivados de éteres corona<sup>17</sup>
- 1987 Premio Nobel de Química a Donald J. Cram, Jean-Marie Lehn y Charles Pedersen
- 2000 Kimoon Kim: anfitriones cucurbiturilos<sup>18</sup>
- 2001 Anthony Day: control de la síntesis de cucurbiturilos<sup>19</sup>
- 2008 Ogoshi y Nakamoto: anfitriones pilararenos<sup>20</sup>
- 2016 Premio Nobel de Química a Fraser Stoddart, Jean-Pierre Sauvage y Ben Feringa



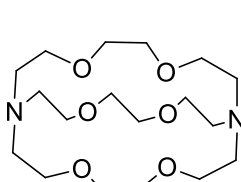
bases de Schiff



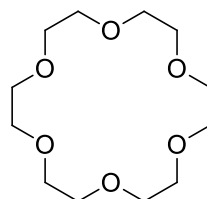
éter corona



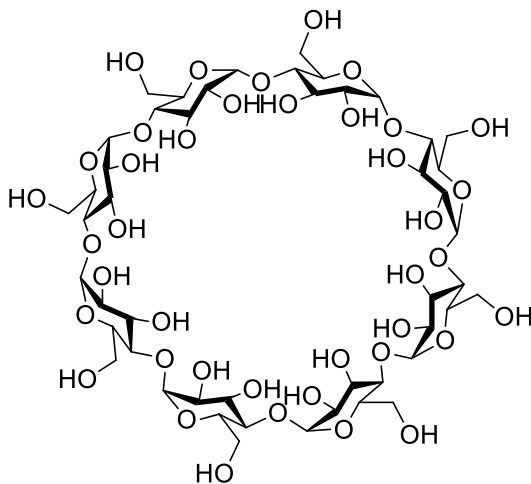
katapinando



criptando



podando



ciclodextrina

**Esquema 1.1.** Estructuras significativas de los macrociclos cuyos estudios ayudaron al impulso de la Química Supramolecular durante sus inicios.

Las especies supramoleculares tienen unas características muy definidas como su estructura, la distribución de sus componentes en el espacio y la naturaleza de los enlaces intermoleculares que permiten que estos componentes se mantengan juntos. Estas interacciones pueden ser de diferentes tipos: enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas, efectos hidrofóbicos, coordinación de iones metálicos, etc; y por tanto con distintos grados de fuerza. Por lo general los enlaces covalentes en las moléculas son más fuertes que estas interacciones intermoleculares de las especies supramoleculares, y como consecuencia, estas últimas son más flexibles y menos estables termodinámicamente.

En la formación de una supramolécula o complejo es necesario un proceso de reconocimiento molecular para que se produzca así la unión selectiva de sus componentes. Además si la especie que compleja puede reaccionar con la que es complejada, se pueden originar transformaciones químicas en esta última. Y si por ejemplo, el receptor también tiene una parte hidrofóbica puede ejercer de portador del sustrato para su transporte. Estas son las funciones principales de las especies supramoleculares: el reconocimiento molecular, la transformación y la translocación.<sup>21</sup>

Existen ciertos aspectos de las supramoléculas, como el reconocimiento molecular y la auto-organización, que se asemejan bastante con sistemas naturales. De ahí que el diseño, la síntesis y el estudio de estas especies en agua hayan adquirido tanto

interés,<sup>22-27</sup> ya que el gran desafío en esta materia es conseguir imitar el comportamiento de las biomoléculas.

## **1.2. QUÍMICA ANFITRIÓN-HUÉSPED**

La Química Supramolecular se puede dividir en dos grandes categorías: química anfitrión-huésped y auto-ensamblaje. Estas dos áreas se diferencian básicamente en la forma y el tamaño de sus componentes.

En primer lugar, el auto-ensamblaje se produce cuando no existe una diferencia de tamaño significativa entre las especies implicadas en las interacciones no covalentes. Lo que se forma es un agregado en el que los componentes están en equilibrio y el proceso se origina de manera espontánea (ver Figura 1.2).

En segundo lugar, la química anfitrión-huésped se encarga del estudio de sistemas supramoleculares donde una molécula llamada anfitrión, que es significativamente más grande, tiene la capacidad de alojar en su interior a otra más pequeña llamada huésped de manera no covalente para dar lugar a un complejo (Figura 1.2). Normalmente el anfitrión es un compuesto cíclico sintético que tiene una cavidad central considerable. El huésped por su parte, puede ser desde un simple catión metálico, hasta una molécula como por ejemplo una hormona o un neurotransmisor. Tanto el anfitrión como el huésped tienen sitios de unión, que son las partes de las especies con capacidad para formar parte de las interacciones

no covalentes debido a sus tamaños, geometrías o grupos funcionales.

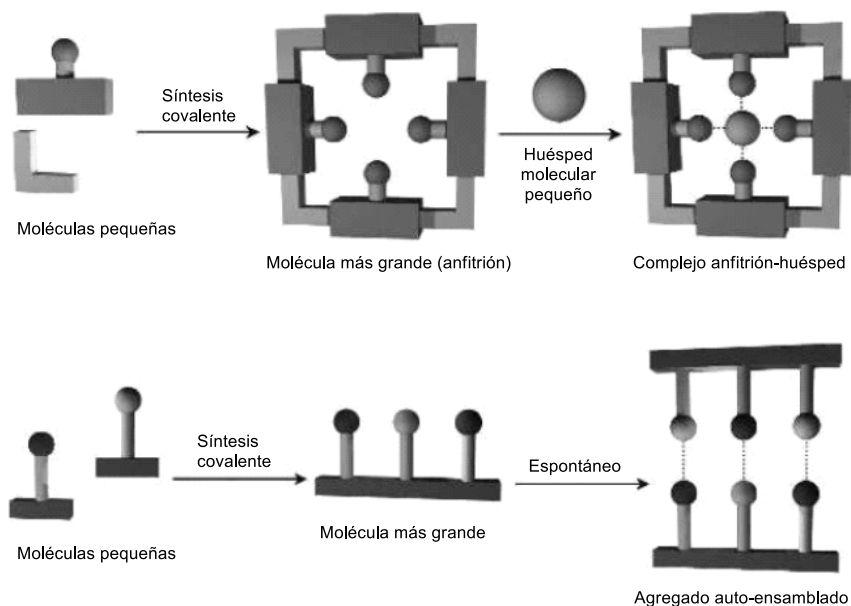


**Figura 1.2.** Representación del principio de la química anfitrión-huésped (arriba) y del auto-ensamblaje (abajo).<sup>28</sup>

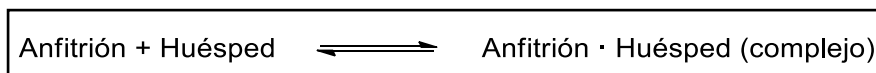
El también galardonado con el Premio Nobel de Química, Donald J. Cram, describió en 1977 los complejos anfitrión-huésped utilizando las siguientes expresiones: “Los complejos moleculares se mantienen unidos por enlaces de hidrógeno, por pares de iones, por interacciones  $\pi$  ácido-base, por unión metal-ligando, por fuerzas atractivas de van der Waals, por reorganización del disolvente, y por enlaces covalentes parcialmente formados o rotos (estados de transición). La gran organización estructural solamente se produce a través de múltiples sitios de unión. Un complejo molecular altamente estructurado se compone al menos de un anfitrión y un

huésped. La afinidad anfitrión-huésped implica una disposición estéreo-electrónica complementaria de los sitios de unión en el anfitrión y en el huésped. El componente anfitrión se define como una molécula orgánica o ion cuyos sitios de unión convergen en el complejo. El componente huésped es cualquier molécula o ion cuyos sitios de unión divergen en el complejo.”<sup>29</sup>

Cuando uno o varios huéspedes muestran una fuerza de unión por un anfitrión considerablemente mayor que otros huéspedes, se dice que esas especies (anfitrión y huésped) presentan selectividad entre ellas. La selectividad aparece en distintas circunstancias: cuando los sitios de unión del anfitrión y del huésped se complementan espacialmente y electrónicamente, cuando un anfitrión no necesita de un cambio conformacional para unirse a un huésped de la manera más estable posible,<sup>30</sup> o cuando dos o más sitios de unión actúan de manera conjunta para producir una interacción que es más fuerte que cuando los sitios de unión actúan de forma independiente.<sup>28</sup>

### 1.2.1. Constantes de asociación

El proceso de complejación de uno o varios huéspedes por parte de un anfitrión es un equilibrio cuya constante se denomina constante de asociación, *K*. En el siguiente esquema se representa el equilibrio para un complejo con estequiometría 1:1 anfitrión-huésped:



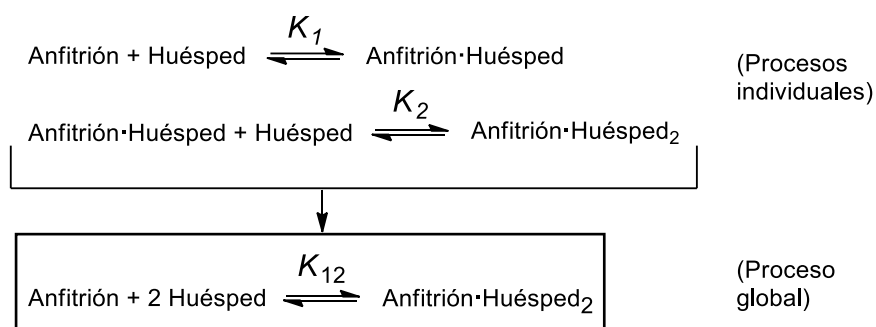
**Esquema 1.2.** Ejemplo general del equilibrio entre las especies libres y el complejo anfitrión-huésped.

La constante de asociación de un complejo 1:1 se calcula con la siguiente ecuación, en la que se utilizan las concentraciones de las especies en equilibrio y se expresa en  $M^{-1}$ :

$$K = \frac{[Anfitrión \cdot Huésped]}{[Anfitrión][Huésped]}$$

El parámetro  $K$ , permite conocer el grado de asociación proporcionando así información sobre la situación del equilibrio. Estas constantes de asociación se pueden calcular a partir de datos experimentales, como por ejemplo de valoraciones seguidas por espectroscopia de absorción UV/vis, de fluorescencia o de resonancia magnética nuclear.<sup>31</sup>

Cuando el complejo anfitrión-huésped no tiene estequiometría 1:1 sino que más de un huésped entra en el interior del anfitrión, existen tantas constantes de asociación como procesos de unión, y la constante de asociación global del complejo es el producto de las constantes de asociación individuales. Por ejemplo para un complejo 1:2 anfitrión-huésped:



**Esquema 1.3.** Equilibrios para una complejación anfitrión-huésped 1:2.

$$K1 = \frac{[Anfitrión \cdot Huésped]}{[Anfitrión][Huésped]} \quad K2 = \frac{[Anfitrión \cdot Huésped2]}{[Anfitrión \cdot Huésped][Huésped]}$$

$$K12 = \frac{[Anfitrión \cdot Huésped2]}{[Anfitrión][Huésped]^2} = K1 \cdot K2$$

### 1.2.2. Efecto hidrofóbico

El efecto hidrofóbico es la no afinidad del aceite con el agua.<sup>32</sup> Esto se produce generalmente por la exclusión de moléculas o grupos apolares de disolventes polares, particularmente agua. Cuando ocurre, el sistema se vuelve más favorable en términos de energía ya que las moléculas de agua prefieren interactuar con ellas mismas o con otros grupos o moléculas polares, y lo que se produce es una aglomeración de las especies no polares.

Las interacciones hidrofóbicas son bastante importante en la formación de complejos supramoleculares en agua entre huéspedes orgánicos y anfitriones sintéticos, y se pueden dividir en dos componentes energéticas: la entálpica y la entrópica.

La variante entálpica tiene lugar cuando moléculas de agua se estabilizan al ser expulsadas de la cavidad del anfitrión durante el proceso de unión de un huésped (Figura 1.3). Como normalmente el interior del anfitrión tiene carácter hidrofóbico las moléculas de agua que se encuentran dentro tienen una alta energía y no interactúan fuertemente con las paredes de éste, entonces al entrar un huésped son expulsadas fácilmente. Luego este agua

liberada interacciona con el agua exterior y disminuye así la energía del sistema.

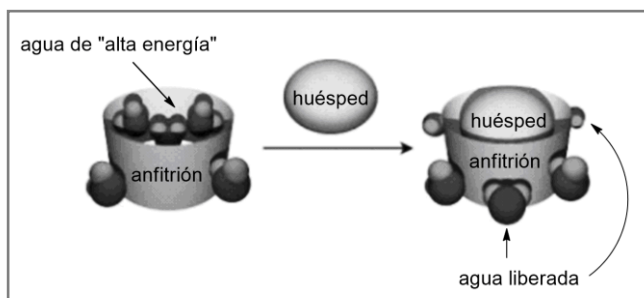


**Figura 1.3.** Desplazamiento de moléculas de agua de una cavidad hidrofóbica.<sup>28</sup>

La entropía de las interacciones hidrofóbicas aparece porque, en un proceso de formación de un complejo, inicialmente el huésped en disolución está interaccionando con las moléculas de agua próximas a él, que se ordenan a su alrededor; y esas interacciones se rompen antes de unirse al anfitrión, provocando el desorden de estas moléculas de agua próximas (Figura 1.4). Por lo que se produce una ganancia entrópica y se reduce la energía libre del sistema.<sup>33</sup>

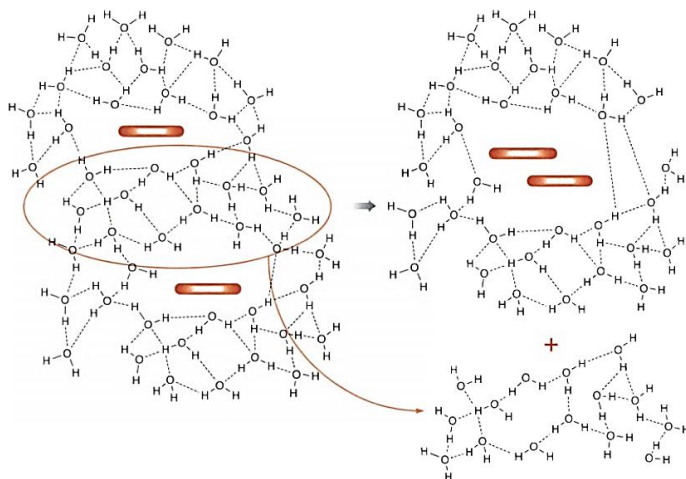


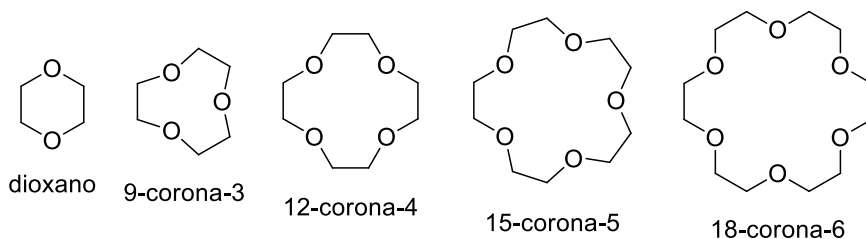
**Figura 1.4.** Representación del efecto hidrofóbico. Primero existe una ordenación de las moléculas de agua alrededor de las especies y después al producirse la

interacción entre las dos especies se libera parte del agua “ordenada”, produciéndose un aumento de entropía.<sup>33</sup>

### 1.2.3. Anftriones

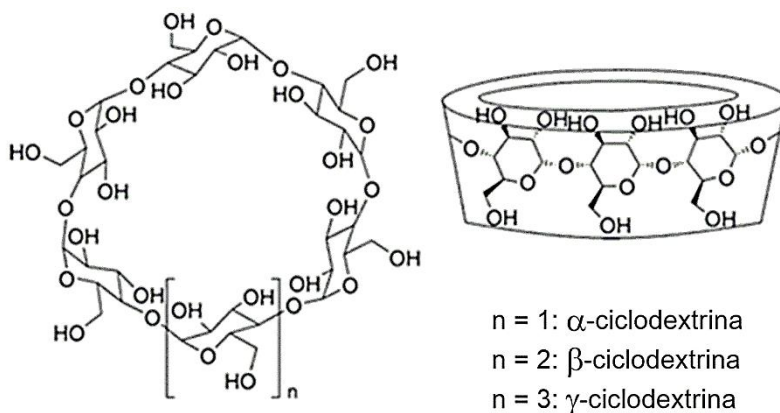
Dentro de la química anfitrión-huésped existe una multitud de macrociclos sintéticos utilizados como anftriones que se han ido descubriendo a lo largo del tiempo, algunos de los cuales ya se han presentado anteriormente en el apartado 1.1 (inicios de la Química Supramolecular). Entre todos ellos, los que destacan por ser los más prometedores en cuanto a posibles aplicaciones son: éteres corona, ciclodextrinas, calixarenos, pilararenos y cucurbiturilos.

Los éteres corona son oligómeros cíclicos de dioxano. La unidad básica que se repite a lo largo de la estructura de cualquier éter corona es etileno-oxi. Por lo cual estos macrociclos son del tipo  $(-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-)_n$  y su propiedad más importante es la habilidad para complejar cationes.<sup>34</sup>



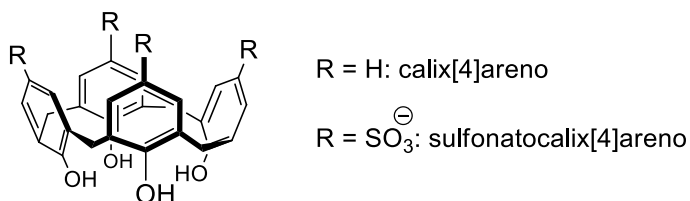
**Esquema 1.4.** Oligómeros cíclicos del dioxano.

Por su parte, las ciclodextrinas (CD) son oligómeros cíclicos de amilosa. Son bastante usadas en Química Supramolecular por su solubilidad en agua, y para la encapsulación de fármacos, perfumes y aromas. Tienen baja toxicidad y además son biodegradables.<sup>35</sup>



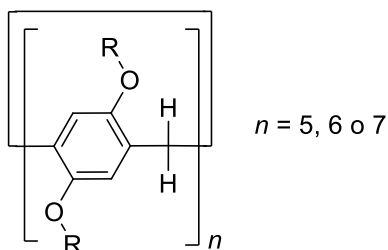
**Esquema 1.5.** Estructuras de las ciclodextrinas más comunes.<sup>36</sup>

Otra familia de macrociclos son los calixarenos, oligómeros cíclicos de fenol y formaldehído. Se pueden modificar fácilmente y tienen aplicaciones, por ejemplo, en polimerización supramolecular.<sup>37</sup>



**Esquema 1.6.** Estructura de un calixareno de 4 unidades.

Uno de los anfitriones más recientes son los pilararenos (nombrados así en 2008 por Ogoshi<sup>20</sup>). Se componen de unidades hidroquinonas unidas por puentes metileno en las posiciones *para*. Son solubles en disolventes orgánicos y pueden usarse en la fabricación de rotaxanos y sensores fluorescentes, entre otros.



**Esquema 1.7.** Estructuras de los pilar[*n*]arenos más estudiados.<sup>38</sup>

Pero hay una familia de macrociclos, los cucurbiturilos, que ha atraído bastante la atención debido a la gran cantidad de posibilidades que ofrece a la hora de trabajar en química anfitrión-huésped<sup>39</sup> y sus múltiples aplicaciones, entre las que destaca su uso potencial en procesos biológicos.<sup>39,40</sup> En los siguientes apartados se mostrará detalladamente la química de estos anfitriones.

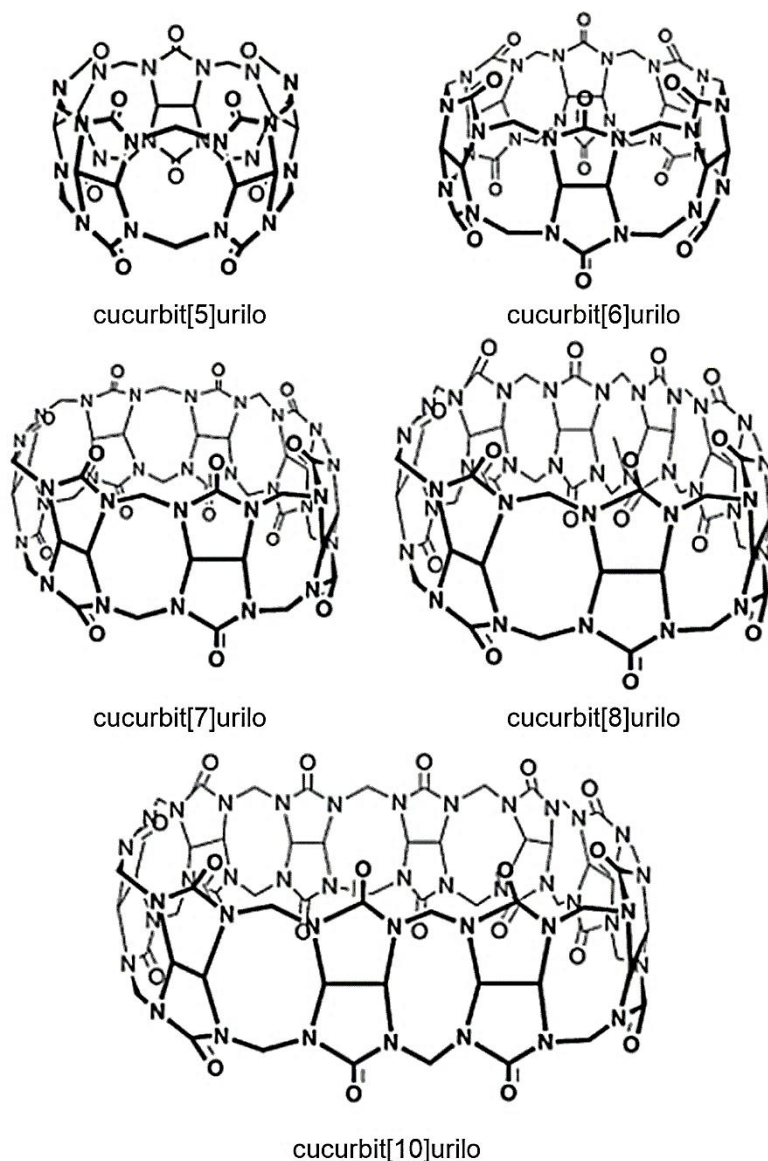
### 1.3. CUCURBITURILOS

Todo comenzó cuando en 1905 Behrend y sus colaboradores publicaron que en la condensación ácida entre el glicolurilo y el formaldehído en exceso<sup>41</sup> se producía con buen rendimiento (40-70%) un material cristalino blanco (tras recrystalizar en ácido sulfúrico concentrado) que era soluble en agua y capaz de formar complejos con sales metálicas y colorantes.

No fue hasta unos 75 años después, en 1981, cuando Mock consiguió esclarecer la estructura de ese sólido blanco, que constaba de seis unidades de glicolurilo unidas por doce puentes metileno. Como el macrociclo tenía gran parecido con una calabaza (miembro más destacado de la familia de las cucurbitáceas), decidió ponerle el nombre de cucurbiturilo.<sup>42</sup>

A partir de ahora en esta tesis, para clarificar los términos se llamará cucurbit[6]urilo al cucurbiturilo de Mock, y en su forma abreviada CB6, mientras que a sus homólogos se les nombrará cucurbit[ $n$ ]urilo (CB $n$ ) donde  $n$  es el número de unidades de glicolurilo.

El descubrimiento de la estructura del CB6 permitió el rápido desarrollo, durante los años 80 y 90 del siglo pasado, de su Química Supramolecular.<sup>40,43-45</sup> Después en el nuevo milenio, esta familia de anfitriones ha visto incrementada su importancia enormemente tras la aparición de los homólogos CB5, CB7, CB8 y CB10 (estructuras en Esquema 1.8);<sup>18,46</sup> así como de los derivados alquilados e hidroxilados.<sup>19,47</sup> Más recientemente se han sintetizado CBs aún más grandes como CB13, CB14 y CB15.<sup>48,49</sup>



**Esquema 1.8.** Estructuras de los homólogos cucurbit[ $n$ ]urilos.<sup>50</sup>

### 1.3.1. Propiedades de los CB $n$

Las características estructurales que definen a la familia de los CB $n$  son la estructura simétrica, con carbonilos con alta densidad electrónica en los portales y una cavidad hidrofóbica. Las

estructuras y los parámetros físicos de los homólogos  $CB_n$  se caracterizaron por métodos espectroscópicos y cristalografía de rayos X.<sup>18</sup> Los dos portales que proporcionan las entradas a la cavidad hidrofóbica tienen un diámetro medio ( $b$  en la Figura 1.5) que aumenta progresivamente de  $CB_5$  a  $CB_{10}$ . Así también el diámetro de la cavidad ( $a$  en la Figura 1.5) se agranda al añadir unidades de glocolorilo. Sin embargo, al igual que ocurre en las ciclodextrinas, todos los homólogos  $CB_n$  tienen la misma profundidad ( $c$  en la Figura 1.5).

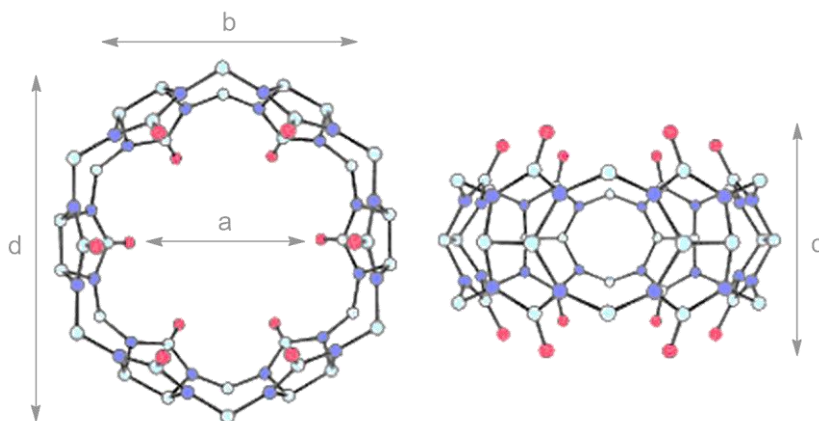


**Figura 1.5.** Vista superior y lateral de la estructura de rayos X de  $CB_6$ . Código de colores: carbono, celeste; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo.<sup>18</sup>

**Tabla 1.2.** Dimensiones y propiedades físicas de CB*n*.

|                                                         |   | <b>CB5</b> | <b>CB6</b>         | <b>CB7</b>         | <b>CB8</b> | <b>CB10<sup>[b]</sup></b> |
|---------------------------------------------------------|---|------------|--------------------|--------------------|------------|---------------------------|
| <b>PM</b> (g mol <sup>-1</sup> )                        |   | 830        | 996                | 1163               | 1329       | 1661                      |
| <b>diámetro portal</b> (Å) <sup>[a]</sup>               | a | 2.4        | 3.9                | 5.4                | 6.9        | 9.0-11.0                  |
| <b>diámetro cavidad</b> (Å) <sup>[a]</sup>              | b | 4.4        | 5.8                | 7.3                | 8.8        | 10.7-12.6                 |
| <b>altura</b> (Å) <sup>[a]</sup>                        | c | 9.1        | 9.1                | 9.1                | 9.1        | 9.1                       |
| <b>diámetro externo</b> (Å) <sup>39</sup>               | d | 13.1       | 14.4               | 16.0               | 17.5       | ---                       |
| <b>volumen cavidad</b> (Å <sup>3</sup> ) <sup>[a]</sup> |   | 82         | 164                | 279                | 479        | 870 <sup>51</sup>         |
| <b>solubilidad en agua</b> (mM) <sup>[54]</sup>         |   | 3-4        | 0.05               | 5                  | <0.1       | <0.05 <sup>51</sup>       |
| <b>estabilidad</b> (°C) <sup>[a]</sup>                  |   | >420       | 425 <sup>52</sup>  | 370                | >420       | >300 <sup>53</sup>        |
| <b>pK<sub>a</sub></b>                                   |   | ---        | 3.02 <sup>54</sup> | 2.20 <sup>55</sup> | ---        | ---                       |

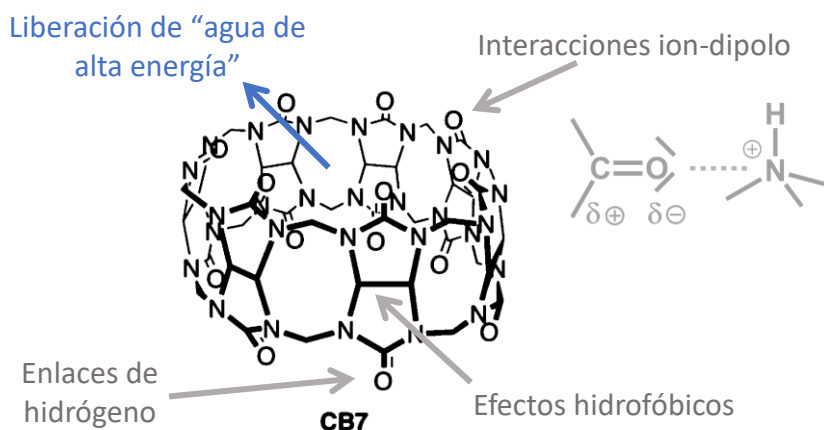
<sup>[a]</sup>Ref. [40]. <sup>[b]</sup>Determinado para el complejo CB5@CB10.<sup>46</sup>

Como el diámetro de los portales carbonilo suele ser 2 Å menor que la cavidad, al complejarse o disociarse un huésped el proceso está un poco más forzado por el impedimento estérico.<sup>56</sup> También cabe resaltar que además los tamaños de las cavidades de la familia cucurbiturilo abarcan un rango mayor que los de las ciclodextrinas.<sup>39</sup>

La solubilidad en agua es limitada para todos los CB*n*, siendo un poco mayor para CB5 y CB7, sin embargo mejora bastante al bajar el pH o aumentando la salinidad del medio.<sup>39,40</sup> Los pK<sub>a</sub> de los ácidos conjugados de CB6 y CB7 son 3.02 y 2.20, por lo tanto los carbonilos de los portales son bases muy débiles. Por último, los análisis termogravimétricos comprobaron la gran estabilidad térmica de todos los homólogos, que no se degradan hasta los 300 °C.

### 1.3.2. Química anfitrión-huésped de CB $n$

En el proceso de unión de un huésped a un anfitrión CB $n$ , se pueden producir diferentes interacciones (ver Esquema 1.9 para CB7), y no todas tienen la misma influencia en la formación del complejo supramolecular.<sup>40,57-60</sup>



**Esquema 1.9.** Posibles interacciones del CB7 en la complejación de huéspedes.

Generalmente, las grandes fuerzas impulsoras en la entrada de los diferentes huéspedes en los cucurbiturilos son el efecto hidrofóbico (en el cual la liberación de moléculas de agua de la cavidad del macrociclo tiene una gran aportación) y las interacciones ion-dipolo. En contraposición, las interacciones de enlace de hidrógeno no son suficientemente fuertes para inducir la unión, en realidad es poco probable que los enlaces de hidrógeno huésped-anfitrión superen a los enlaces de hidrógeno del huésped con las moléculas de agua en disolución.<sup>39,60-62</sup> Por tanto, las especies cargadas positivamente son buenos huéspedes para CB $n$  ya que las interacciones ion-dipolo que

pueden experimentar, incrementan la calidad de la unión supramolecular.<sup>62</sup>

Como ocurre con todos los macrociclos que tienen una cavidad hidrofóbica, la hidrofobicidad del huésped también es bastante importante en la estabilidad de los complejos de CBn.<sup>61</sup> Un hecho a tener en cuenta (visto en la sección 1.2.2) es que en el proceso de desolvatación de los huéspedes, se genera otra fuerza impulsora para la creación del complejo con el anfitrión, que está relacionada con el área superficial del huésped y que produce un efecto hidrofóbico “clásico” con una contribución favorable de la entropía. Este efecto es distinto al efecto hidrofóbico “no clásico” resultante de la liberación de moléculas de agua de alta energía de la cavidad del cucurbiturilo, el cual está favorecido por entalpía.<sup>63,64</sup>

La capacidad de unión de los CBn hacia sus huéspedes, en general, iguala o supera en afinidad y selectividad a la de otros anfitriones, como los éteres corona o las ciclodextrinas.<sup>65-68</sup> Las moléculas huéspedes que los cucurbiturilos pueden complejar con gran selectividad pueden ser muy diferentes en cuanto a estructura, tener distintos grupos funcionales y ser neutras o cargadas positivamente (increíblemente el homólogo CB5 puede complejar aniones como  $\text{Cl}^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ).<sup>46,69</sup> Además esta familia de macrociclos presenta constantes de asociación ( $K$ ) grandes, principalmente en el rango de  $10^5$  a  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , y excepcionalmente hasta  $10^{17} \text{ M}^{-1}$ .<sup>70-73</sup>

Otra característica a tener en cuenta en la química anfitrión-huésped de los CBn es la alta rigidez estructural de estos anfitriones,

en comparación por ejemplo con las ciclodextrinas, que unida a las dos zonas del macrociclo que favorecen los grupos cargados positivamente y la otra zona que favorece las partes hidrofóbicas (Esquema 1.9) inducen la gran selectividad en la unión supramolecular. No obstante la rigidez estructural de estos anfitriones limita el tamaño de las moléculas que pueden ser encapsuladas,<sup>74</sup> problema que se puede cubrir con la diferenciación de tamaños de los homólogos de la familia, de CB5 a CB10.

Es importante también, a la hora de elegir huéspedes para cucurbiturilos, tener en cuenta que estos anfitriones son selectivos hacia el tamaño, la forma y los grupos funcionales de la molécula que alojan en su interior.<sup>39</sup>

Si nos fijamos en la termodinámica del proceso de complejación, en complejos no covalentes más fuertes (como proteínas-ligandos) o con otros macrociclos (como ciclodextrinas) se produce una compensación de la ganancia de entalpía con una disminución de la entropía del sistema.<sup>72,75-78</sup> Sin embargo, esto no se aplica en todos los casos de formación de complejos con CBn,<sup>75,79,80</sup> lo cual se relaciona entre otros factores, al papel que tiene la liberación de agua de “alta energía” como fuerza dominante en la complejación.<sup>61</sup>

Para terminar, cabe destacar que nuestro grupo de investigación en colaboración con el grupo de Nau, desarrolló en 2014 un nuevo método para determinar la fuerza y selectividad de la complejación de huéspedes con CB7 y CB8 mediante el desplazamiento de colorantes que sirven de indicadores y que tienen una respuesta

óptica diferente cuando están encapsulados en uno u otro cucurbiturilo.<sup>81</sup>

## **1.4. APLICACIONES DE LOS COMPLEJOS SUPRAMOLECULARES CON CBN**

Una vez mostradas la historia, las propiedades y la química anfitrión-huésped de la familia CBN, es apropiado hacer una recopilación de los usos y aplicaciones que se le pueden dar a este tipo de complejos supramoleculares. Destacando sobre todo su empleo en procesos biológicos mediante el control con luz de los equilibrios de complejación y liberación.

### **1.4.1. Biocompatibilidad**

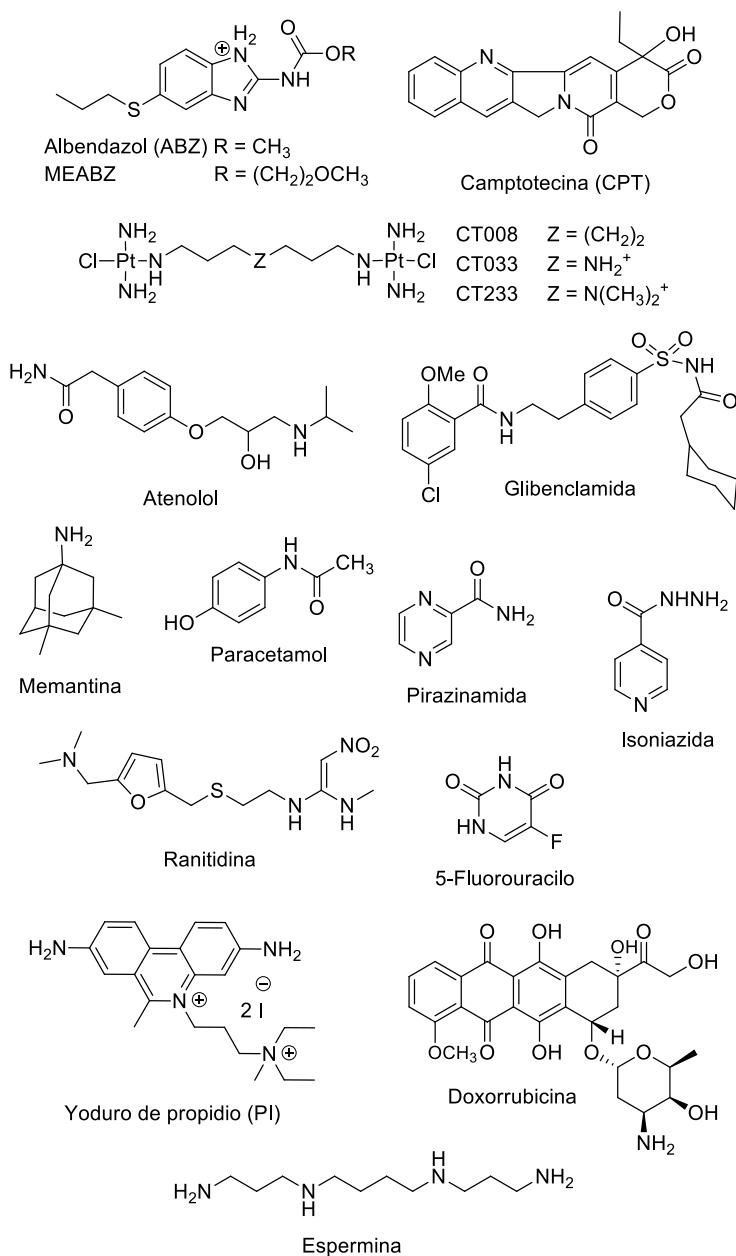
En primer lugar, para utilizar cucurbiturilos en aplicaciones biológicas, además de ser solubles en agua, tienen que ser capaces de actuar convenientemente en el medio biológico en el que son empleados, es decir, deben ser biocompatibles. Esto implica que no deben provocar una respuesta inmune del organismo en el que actúe y además tener una baja toxicidad.<sup>82</sup> En 2008, Williams lo definió la siguiente forma: “La biocompatibilidad se refiere a la capacidad de un biomaterial para realizar su función deseada con respecto a una terapia médica, sin provocar ningún efecto local o sistemático indeseable en el receptor o beneficiario de esa terapia, pero generando la respuesta celular o tisular beneficiosa más apropiada en esa situación específica, y optimizando el rendimiento clínicamente relevante de esa terapia”.<sup>83</sup>

Algunos estudios sobre la toxicidad *in vitro* e *in vivo* de CBN ( $n = 5, 7$  y  $8$ ) determinaron una alta tolerancia de las células (de animales y humanos) a estos macrociclos hasta una concentración de milimolar para CB5 y CB7, y en el rango de la solubilidad del CB8.<sup>84,85</sup> Se ha demostrado también que complejos de CB7 y CB8 cruzan la membrana celular,<sup>86</sup> lo que los coloca como buenos candidatos para el transporte y liberación de fármacos.<sup>87-89</sup> Además, el CB7 no cruza la barrera hematoencefálica y la acumulación en hígado y bazo es muy baja respecto a la de los riñones. Su pronta eliminación en la orina después de un incremento de su actividad en los riñones indica que el CB7 se excreta sin modificación química.<sup>90</sup>

#### **1.4.2. Administración de fármacos**

Los cucurbiturilos proporcionan varios beneficios en la administración de medicamentos. Facilitan la solubilidad de fármacos poco solubles en agua.<sup>91-93</sup> Ayudan a mantener la eficacia máxima de un medicamento al protegerlo de reacciones químicas no deseadas dentro del cuerpo.<sup>90</sup> Mejoran la estabilidad química del huésped después de la encapsulación mediante la reducción o prevención a la oxidación del aire, la degradación térmica, la sensibilidad a la luz, o la hidrólisis en disolución acuosa, por nombrar algunos ejemplos.<sup>94-97</sup> Proporcionan un método de liberación del fármaco lenta,<sup>98,99</sup> o controlada con estímulos celulares internos como cambios de pH,<sup>100</sup> reacciones redox<sup>101</sup> o estímulos externos como un campo magnético.<sup>102</sup> Y además los CBN pueden liberar el

medicamento específicamente en un conjunto de células enfermas o invasoras (microorganismos).<sup>101,103</sup>



**Esquema 1.10.** Estructuras de algunos fármacos que son favorecidos por interacciones con CBr.

Recientemente se han publicado estudios muy interesantes de administración de moléculas biológicamente activas con cucurbiturilos.<sup>74,104-107</sup> En este aspecto nuestro grupo de investigación también ha tenido gran aportación con el desarrollo de sistemas donde se liberan especies biológicas mediante el uso de estímulos externos, como el pH o la luz (esto se mostrará con más detalle en la sección 1.4.6).<sup>108,109</sup>

### **1.4.3. Control de procesos biológicos**

Otro ámbito donde se emplean los complejos supramoleculares con C<sub>Bn</sub> es en el control de procesos biológicos, como la catálisis enzimática. Nau presentó un principio basado en la interacción de CB7 con el colorante fluorescente dapoxil para monitorizar la actividad de *aminoácido descarboxilasas*.<sup>110</sup> Isaacs por su parte, utilizó el CB7 para formar complejos con inhibidores de *anhidrasa carbónica bovina* y de *acetilcolinesterasa* y recuperar así sus actividades catalíticas.<sup>111</sup> De nuevo Nau en 2011, desarrolló un método para determinar la actividad e inhibición de una termolisina respecto a la hidrólisis de péptidos, mediante el uso de CB7 y naranja de acridina como sistema fluorescente.<sup>112</sup> Por otra parte también se demostró que los cucurbiturilos pueden controlar procesos biocatalíticos, en este caso, inhibiendo la hidrólisis enzimática de sustratos ADN y luego reactivar esas *endonucleasas* con la adición de poliaminas que entran en las cavidades de los C<sub>Bn</sub> (Figura 1.6).<sup>113</sup>

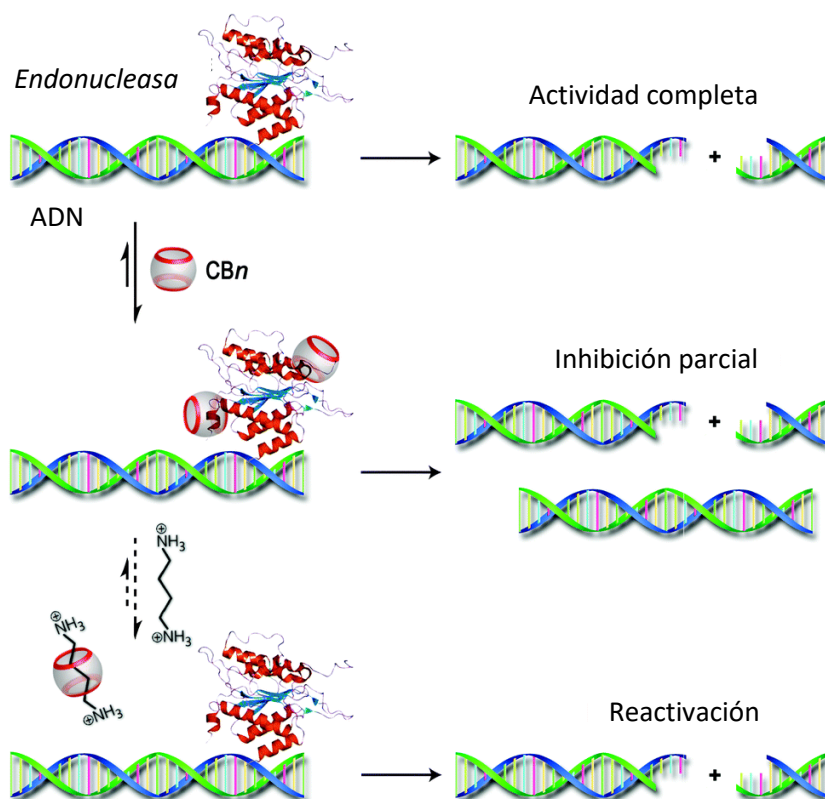


**Figura 1.6.** Ilustración esquemática de la inhibición de las enzimas de restricción de ADN con anfitriones CBn y su reactivación mediante la unión competitiva de poliaminas.<sup>113</sup>

#### 1.4.4. Complejación de biomoléculas

El homólogo CB7 es bastante utilizado en el reconocimiento de biomoléculas, tales como aminoácidos, péptidos y proteínas. En 2011, Urbach publicó que el CB7 es capaz de unirse selectivamente a la insulina por un solo sitio, el residuo aromático N-terminal, de una manera simple y sin modificar químicamente la hormona,<sup>114</sup> por lo que este macrociclo puede ser utilizado para la detección y separación de proteínas según la identidad del residuo terminal. Además si añadimos un grupo aminometil al fenilo *N*-terminal se

pueden alcanzar afinidades del rango de nanomolar.<sup>115</sup> Otro ejemplo donde aparece esta complejación incluye el marcado de las proteínas de la membrana plasmática con ferroceno y luego tras la desintegración de la célula, la captura con CB7 de manera eficiente sólo de las proteínas de la membrana para liberarlas después con un competidor a temperatura ambiente, lo cual puede ser de gran utilidad en proteómica de membrana.<sup>116,117</sup>

También el CB8 ha sido utilizado ampliamente en el reconocimiento y complejación de este tipo de biomoléculas. Urbach mostró la habilidad del par CB8-viológeno de metilo para encapsular tripéptidos de glicina y residuos de triptófano,<sup>118</sup> así como la unión 2:1 de aminoácidos aromáticos con CB8 (Figura 1.7).<sup>119</sup>

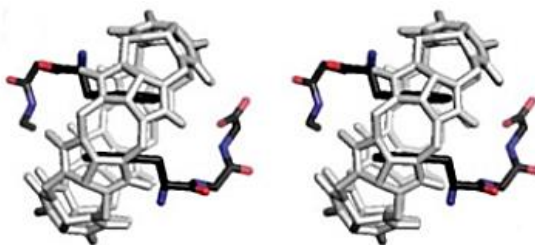


**Figura 1.7.** Estructura cristalina del complejo 1:2 CB8·Phe-Gly-Gly.<sup>119</sup>

En 2013 Scherman demostró por primera vez la formación de un complejo ternario de CB8 con pentapéptidos (relacionados con el Alzheimer) que tienen el residuo Phe en el medio de la secuencia y no en el N-terminal,<sup>120</sup> con perspectivas hacia la dimerización de péptidos.<sup>121</sup>

Estos son sólo unos ejemplos, pero existen otros muchos trabajos en este campo, incluyendo complejación de polipéptidos en CB6,<sup>122</sup>

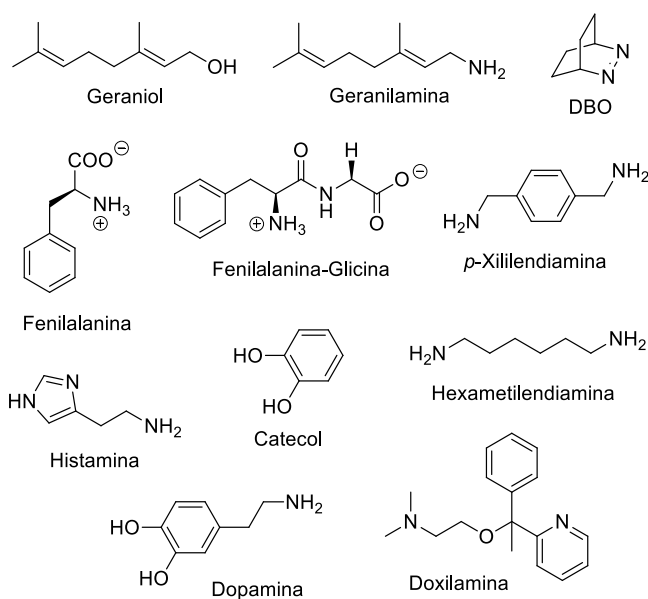
conjugación de proteínas con polímeros,<sup>123</sup> tetramerización de proteínas en CB8,<sup>124</sup> detección de biocompuestos quirales,<sup>125</sup> detección intracelular<sup>126</sup> y complejación de esteroides.<sup>127</sup>

#### **1.4.5. Sensores e interruptores moleculares**

El diseño de sensores e interruptores con  $CBn$  ha experimentado un auge recientemente. Los sensores son sistemas supramoleculares, formados normalmente por un cucurbiturilo y un colorante, que sirven para la detección de diferentes compuestos orgánicos mediante cambios en sus propiedades fotofísicas (fluorescencia, absorción, etc). Los interruptores moleculares son máquinas que pueden alternar entre dos estados diferentes mediante los estímulos apropiados (químicos, electroquímicos y fotoquímicos).

Algunos de los sensores moleculares que contienen cucurbiturilos más destacados son: un complejo de 2,7-dimetildiazapirenio ( $Me_2DAP^{2+}$ ) con CB8 que encapsula catecol o dopamina, produciéndose una transferencia de carga en el interior de la cavidad con el consecuente cambio en la fluorescencia del  $Me_2DAP^{2+}$ ,<sup>128</sup> un conjunto de derivados de  $CBn$  fluorescentes que actúan como sonda para la detección y cuantificación de aminas, usadas en medicamentos sin receta, con un potencial de abuso conocido,<sup>129</sup> un sensor de CB8 y colorante dicatiónico para la localización de analitos quirales a concentraciones micromolares monitorizado por señales de dicroísmo circular inducido, aplicable también en el reconocimiento de la secuencia de péptidos.<sup>125</sup> Otros sensores son los de Urbach que también desarrolló un complejo

fluorescente de CB7 con tetrametilrodamina<sup>126</sup> y Ouari que demostró la capacidad de los CBs para disociar y detectar en agua agregados del colorante carbazol.<sup>130</sup> Además se ha conseguido identificar un numeroso grupo de huéspedes con gran afinidad y selectividad hacia CB7 y CB8, usando los colorantes DMAT y proflavina como sondas, dando a conocer a los terpenos como una nueva clase de analitos que pueden ser detectados por el CB8.<sup>81</sup>



**Esquema 1.11.** Algunas especies detectadas con sensores de CBn.

La familia CBn es ideal para el desarrollo de interruptores moleculares debido a la alta afinidad y selectividad en sus procesos de unión. Entre los interruptores descritos hasta ahora cabe distinguir algunos de ellos. Un complejo supramolecular de Scherman de CB8 con viológeno de metilo y/o derivados de azobenceno que se estimula tanto con luz como electroquímicamente, y puede estar en tres posiciones diferentes,

como complejo heteroternario 1:1:1, como complejo homoternario 2:1 o en estado disociado.<sup>131</sup> Un complejo entre un colorante antraceno y CB8 que produce la dimerización del antraceno en el interior del CB8 fotoquímicamente y luego mediante un segundo estímulo químico (adición de un competidor) se libera el dímero que indirectamente genera una señal fluorescente mediante fotociclodeversión con luz UV; este sistema es reversible y se puede utilizar en operaciones lógicas (Figura 1.8).<sup>132</sup> Y otro sistema consistente en un nitroespiropirano modificado con un derivado de cadaverina que permite su anclaje a CB7, lo cual mejora excelentemente las propiedades de ese fotointerruptor espiropirano-merocianina para sus aplicaciones en medio acuoso.<sup>133</sup>

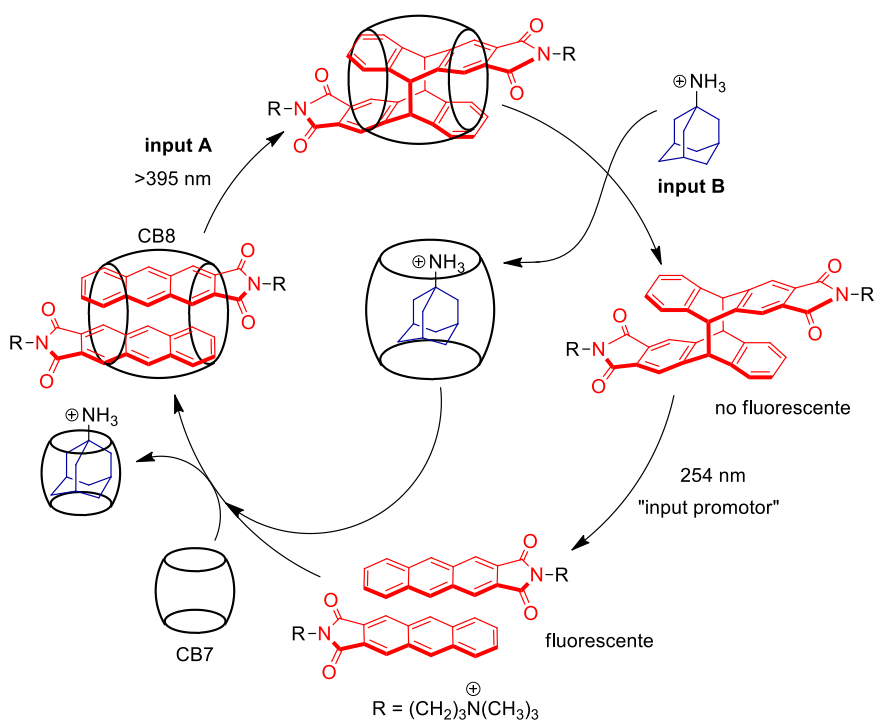


**Figura 1.8.** Interruptor molecular reversible entre el derivado de antraceno y su dímero.<sup>132</sup>

#### **1.4.6. Fotoquímica en sistemas supramoleculares con CBn. Liberación de huéspedes activada con luz.**

En el apartado 1.4.2 hemos visto la capacidad de los CBn para solubilizar, proteger, estabilizar, transportar y liberar huéspedes de interés biológico en medio acuoso. Ahora vamos a centrarnos en este último aspecto, la liberación controlada, pero mediante la aplicación de un estímulo externo (que ha aparecido en ejemplos de la sección anterior 1.4.5) como es la luz. Esta forma de activar especies e inducir cambios en equilibrios supramoleculares será de gran importancia a lo largo de esta tesis doctoral.

Comparada con otros estímulos externos, la luz se puede considerar un elemento de control ideal para manipular sistemas químicos *in situ*.<sup>134-137</sup> Es una fuente de energía eficiente, ecológica y ultrarrápida. Además tiene otras ventajas como que se puede encender y apagar fácilmente, permite un control espaciotemporal con una longitud de onda e intensidad de irradiación reguladas con precisión, puede funcionar en espacios confinados y la excitación con fotones puede inducir una respuesta rápida.<sup>138</sup>

Por lo tanto, es interesante la utilización de este estímulo para activar fotoquímicamente especies y convertirlas en huéspedes que se unan cualitativamente a cucurbiturilos y puedan competir y desplazar a un compuesto de interés biológico previamente complejoado para liberarlo de manera controlada.

Asimismo, para hacer funcionar a estos sistemas, se pueden llevar a cabo diferentes estrategias que se detallan a continuación, como el uso de grupos protectores fotolábiles (PPGs) o de interruptores moleculares (presentados en el apartado anterior 1.4.5).

La introducción de PPGs que se puedan eliminar con longitudes de ondas mayores (luz visible), permite realizar un control externo de procesos biológicos de forma no tóxica y en el interior de los tejidos.<sup>139</sup> Los requerimientos para realizar este tipo de ruptura con una longitud de onda selectiva son: tener un máximo de absorción claro y estrecho, que el rendimiento cuántico de irradiación sea alto y que no haya transferencia de energía intra/intermolecular. Además cabe resaltar que la exposición a la luz debe ajustarse para no producir ningún efecto en las muestras biológicas, la parte liberada tras la desprotección no debe tener toxicidad, la solubilidad de la molécula bioactiva protegida y desprotegida puede variar notablemente y el proceso de desprotección con luz tiene gran dependencia del disolvente.<sup>140</sup>

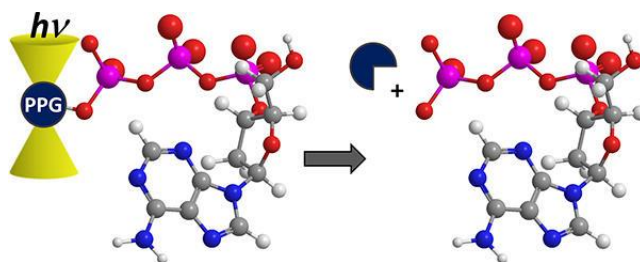


**Figura 1.9.** Representación del proceso de desprotección activado con luz.<sup>141</sup>

Por otro lado, los interruptores moleculares que se pueden activar con luz, son sistemas supramoleculares multicomponente que

permiten liberar selectivamente compuestos de interés. Para llevar a cabo el control con luz de las interacciones no covalentes en el sistema, una opción es el uso de huéspedes fotosensibles con diferente afinidad por el macrociclo, antes y después de la irradiación, debido a cambios estructurales fotoinducidos. Es decir, tras exponerse a la acción de la luz el huésped libre se convierte en un competidor eficiente para conseguir el desplazamiento de la molécula con bioactividad que en el estado inicial se encuentra en el interior del cucurbiturilo.

Existen varios sistemas en los cuales se han utilizado estos interruptores fotoactivables para desplazar especies de CBs entre los que destacan: un sistema anfitrión-huésped 1:1 de Scherman compuesto de CB8 y un azobenceno dicatiónico que permite controlar mediante el uso de luz la captura y liberación de una serie de segundas moléculas huéspedes con importancia biológica;<sup>142</sup> un procedimiento consistente en la liberación de cadaverina de CB7 mediante un salto de pH inducido con luz que activa la capacidad de competir de un colorante;<sup>108</sup> y otro sistema de un interruptor reversible *trans*-chalcona/flavilio que permite administrar memantina estimulando con luz (Figura 1.10).<sup>109</sup>

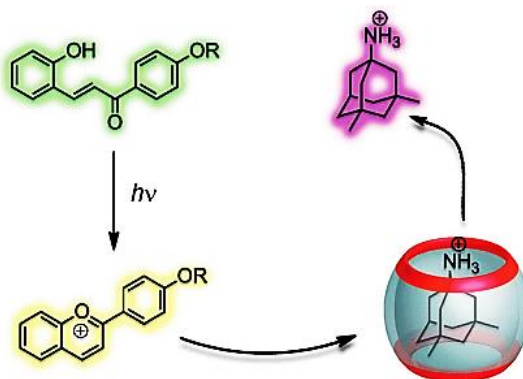


**Figura 1.10.** Administración del fármaco memantina, mediante un interruptor molecular que incluye las especies *trans*-chalcona y flavilio, y se activa con luz.<sup>109</sup>

En este capítulo, se ha mostrado la importancia de la química de los cucurbiturilos y sus numerosas aplicaciones en el ámbito biológico. A continuación en este trabajo se expondrán tanto la caracterización supramolecular de moléculas bioactivas con anfitriones sintéticos CBn, así como el diseño y funcionamiento de sistemas activados con luz, donde de manera controlada se lleva a cabo la liberación de estas especies de interés en medio acuoso.

## 1.5. REFERENCIAS

- [1] J.-M. Lehn, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 4763.
- [2] J.-M. Lehn, *Pure Appl. Chem.* **1978**, 50, 871.
- [3] J.-M. Lehn, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 91; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1988**, 27, 89.
- [4] J. W. Steed, J. L. Atwood, (2009), *Supramolecular Chemistry 2nd Edition*, Wiley.

- [5] A. Werner, *Z. Anorg. Chem.* **1893**, 3, 267.
- [6] E. Fischer, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.
- [7] L. Pauling, (1939), *The Nature of the Chemical Bond and the Structure of Molecules and Crystals*, Cornell University Press.
- [8] D. E. Palin, H. M. Powell, *Nature* **1945**, 156, 334.
- [9] C. J. Brown, A. C. Farthing, *Nature* **1949**, 164, 915.
- [10] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **1953**, 18, 123.
- [11] D. J. Cram, R. H. Bauer, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 5971.
- [12] N. F. Curtis, D. A. House, *Chem. Ind.* **1961**, 42, 1708.
- [13] C. J. Pedersen, *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 7017.
- [14] C. H. Park, H. E. Simmons, *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 2431.
- [15] R. Breslow, O. Campbell, *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, 91, 3085.
- [16] E. Weber, F. Vögtle, (1981), *Host Guest Complex Chemistry I*, Springer.
- [17] A. P. de Silva, S. A. de Silva, *Chem. Commun.* **1986**, 23, 1709.
- [18] J. Kim, I.-S. Jung, S.-Y. Kim, E. Lee, J.-K. Kang, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 540.
- [19] A. I. Day, A. P. Arnold, R. J. Blanch, B. Snushall, *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 8094.

- [20] T. Ogoshi, S. Kanai, S. Fujinami, T. Yamagishi, Y. Nakamoto, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 5022.
- [21] J.-M. Lehn, (1995), *Supramolecular Chemistry*, VCH.
- [22] G. V. Oshovsky, D. N. Reinhoudt, W. Verboom, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 2366.
- [23] M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754.
- [24] G. C. L. Wong, J. X. Tang, A. Lin, Y. Li, P. A. Janmey, C. R. Safinya, *Science* **2000**, *288*, 2035.
- [25] G. A. Silva, C. Czeisler, K. L. Niece, E. Beniash, D. A. Harrington, J. A. Kessler, S. I. Stupp, *Science*, **2004**, *303*, 1352.
- [26] F. A. Aldaye, A. L. Palmer, H. F. Sleiman, *Science* **2008**, *321*, 1795.
- [27] J. Voskuhl, B. J. Ravoo, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 495.
- [28] J. W. Steed, D. R. Turner and K. J. Wallace, (2007), *Core Concepts in Supramolecular Chemistry and Nanochemistry*, Wiley.
- [29] E. P. Kyba, R. C. Helgeson, K. Madan, G. W. Gokel, T. L. Tarnowski, S. S. Moore, D. J. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2564.
- [30] D. J. Cram, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1039.
- [31] P. Thordason, *Chem Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305.
- [32] N. T. Southall, K. A. Dill, A. D. J. Haymet, *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 521.

- [33] E. V. Anslyn, D. A. Dougherty, (2006), *Modern Physical Organic Chemistry*, University science books.
- [34] G. W. Gokel, W. M. Leevy, M. E. Weber, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 2723.
- [35] G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 803.
- [36] F. Hapiot, S. Tilloy, E. Monflier, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 767.
- [37] D.-S. Guo, Y. Liu, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 5907.
- [38] M. Xue, Y. Yang, X. Chi, Z. Zhang, F. Huang, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 1294.
- [39] J. Lagona, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, L. Isaacs, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 4922; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 4844.
- [40] J. W. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, K. Kim, *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 621.
- [41] R. Behrend, E. Meyer, F. Rusche, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1905**, 339, 1.
- [42] W. A. Freeman, W. L. Mock, N.-Y. Shih, *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 7367.
- [43] W. L. Mock, *Top. Curr. Chem.* **1995**, *175*, 1.
- [44] R. Hoffmann, W. Knoche, C. Fenn, H.-J. Buschmann, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1994**, *90*, 1507.
- [45] K. Kim, *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31*, 96.

- [46] A. I. Day, R. J. Blanch, A. P. Arnold, S. Lorenzo, G. R. Lewis, I. Dance, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 285; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 275.
- [47] S. Y. Jon, N. Selvapalam, D. H. Oh, J.-K. Kang, S.-Y. Kim, Y. J. Jeon, J. W. Lee, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 10186.
- [48] Q. Li, S.-C. Qiu, J. Zhang, K. Chen, Y. Huang, X. Xiao, Y. Zhang, F. Li, Y.-Q. Zhang, S.-F. Xue, Q.-J. Zhu, Z. Tao, L. F. Lindoy, G. Wei, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 4020.
- [49] X.-J. Cheng, L.-L. Liang, K. Chen, N.-N. Ji, X. Xiao, J.-X. Zhang, Y.-Q. Zhang, S.-F. Xue, Q.-J. Zhu, X.-L. Ni, Z. Tao, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7252.
- [50] W. M. Nau, O. A. Scherman, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 492.
- [51] S. Liu, P. Y. Zavalij, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 16798.
- [52] P. Germain, J. M. Letoffe, M. P. Merlin, H.-J. Buschmann, *Thermochim. Acta* **1998**, *315*, 87.
- [53] C. Parente Carvalho, Supramolecular cucurbituril complexes for applications in bio-relevant contexts (Tesis doctoral). Universidad de Huelva.
- [54] H.-J. Buschmann, E. Cleve, E. Schollmeyer, *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *193*, 93.
- [55] I. Hwang, W. S. Jeon, H.-J. Kim, D. Kim, H. Kim, N. Selvapalam, N. Fujita, S. Shinkai, K. Kim, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2007**, *46*, 210.

- [56] C. Márquez, R. R. Hudgins, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5806.
- [57] E. Masson, X. X. Ling, R. Joseph, L. Kyeremeh-Mensah, X. Y. Lu, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 1213.
- [58] W. M. Nau, M. Florea, K. I. Assaf, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 559.
- [59] D. H. Macartney, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 600.
- [60] P. Cintas, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *17*, 205.
- [61] K. I. Assaf, W. M. Nau, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 394.
- [62] W. L. Mock, N.-Y. Shih, *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 4440.
- [63] F. Biedermann, W. M. Nau, H.-J. Schneider, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11158.
- [64] F. Biedermann, V. D. Uzunova, O. A. Scherman, W. M. Nau, A. De Simone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318.
- [65] H.-J. Buschmann, K. Jansen, E. Schollmeyer, *Thermochim. Acta* **2000**, *346*, 33.
- [66] H. Fujiwara, H. Arakawa, S. Murata, Y. Sasaki, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1987**, *60*, 3891.
- [67] H.-J. Buschmann, K. Jansen, C. Meschke, E. Schollmeyer, *J. Solution Chem.* **1998**, *27*, 135.

- [68] R. M. Izatt, R. E. Terry, B. L. Haymore, L. D. Hansen, N. K. Dalley, A. G. Avondet, J. J. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 7620.
- [69] J.-X. Liu, L.-S. Long, R.-B. Huang, L.-S. Zheng, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 10168.
- [70] S. J. Barrow, S. Kasera, M. J. Rowland, J. del Barrio, O. A. Scherman, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 12320.
- [71] S. Liu, C. Ruspic, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, P. Y. Zavalij, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15959.
- [72] M. V. Rekharsky, T. Mori, C. Yang, Y. H. Ko, N. Selvapalam, H. Kim, D. Sobransingh, A. E. Kaifer, S. Liu, L. Isaacs, W. Chen, S. Moghaddam, M. K. Gilson, K. Kim, Y. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 20737.
- [73] L. Cao, M. Sekutor, P. Y. Zavalij, K. Mlinaric-Majerski, R. Glaser, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 988; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 1006.
- [74] D. Ma, G. Hettiarachchi, D. Nguyen, B. Zhang, J. B. Wittenberg, P. Y. Zavalij, V. Briken, L. Isaacs, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 503.
- [75] M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1875.
- [76] K. N. Houk, A. G. Leach, S. P. Kim, X. Y. Zhang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 4872.
- [77] Y. Inoue, Y. Liu, L.-H. Tong, B.-J. Shen, D.-S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10637.

- [78] Y. Inoue, T. Hakushi, Y. Liu, L.-H. Tong, B.-J. Shen, D.-S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 475.
- [79] S. Moghaddam, C. Yang, M. Rekharsky, Y. H. Ko, K. Kim, Y. Inoue, M. K. Gilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3570.
- [80] W. S. Jeon, K. Moon, S. H. Park, H. Chun, Y. H. Ko, J. Y. Lee, E. S. Lee, S. Samal, N. Selvapalam, M. V. Rekharsky, V. Sindelar, D. Sobransingh, Y. Inoue, A. E. Kaifer, K. Kim, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 12984.
- [81] J. Vázquez, P. Remón, R. N. Dsouza, A. I. Lazar, J. F. Arteaga, W. M. Nau, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9897.
- [82] M. E. Davis, M. E. Brewster, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 1023.
- [83] D. F. Williams, *Biomaterials* **2008**, *29*, 2941.
- [84] V. D. Uzunova, C. Cullinane, K. Brix, W. M. Nau, A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 2037.
- [85] G. Hettiarachchi, D. Nguyen, J. Wu, D. Lucas, D. Ma, L. Isaacs, V. Briken, *PLoS One* **2010**, *5*, e10514.
- [86] P. Montes-Navajas, M. González-Bejar, J. C. Scaiano, H. García, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2009**, *8*, 1743.
- [87] R. Oun, R. S. Floriano, L. Isaacs, E. G. Rowan, N. J. Wheate, *Toxicol. Res.* **2014**, *3*, 447.

- [88] W.-J. Ma, J.-M. Chen, L. Jiang, J. Yao, T.-B. Lu, *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 4698.
- [89] L. Cao, G. Hettiarachchi, V. Briken, L. Isaacs, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 12033.
- [90] A. I. Day, J. G. Collins; J. W. Steed, J. L. Atwood, P. A. Gale (2012), *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterials*, Wiley.
- [91] Y. J. Zhao, D. P. Buck, D. L. Morris, M. H. Pourgholami, A. I. Day, J. G. Collins, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4509.
- [92] N. Dong, S. F. Xue, Q. J. Zhu, Z. Tao, Y. Zhao, L.-X. Yang, *Supramol. Chem.* **2008**, *20*, 659.
- [93] Y. Zhao, M. H. Pourgholami, D. L. Morris, J. G. Collins, A. I. Day, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 3328.
- [94] F. J. McInnes, N. G. Anthony, A. R. Kennedy, N. J. Wheate, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 765.
- [95] N. J. Wheate, V. Vora, N. G. Anthony, F. J. McInnes, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2010**, *68*, 359.
- [96] R. Wang, D. H. Macartney, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 1955.
- [97] J. Mohanty, H. Pal, A. K. Ray, S. Kumar, W. M. Nau, *Chem. Phys. Chem.* **2007**, *8*, 54.
- [98] M. J. Pisani, Y. Zhao, L. Wallace, C. E. Woodward, F. R. Keene, A. I. Day, J. G. Collins, *Dalton Trans.* **2010**, *39*, 2078.

- [99] X. Huang, Y. Tan, Q. Zhou, Y. Wang, *e-Polymers*, **2008**, 95, 1.
- [100] S. Angelos, N. M. Khashab, Y.-W. Yang, A. Trabolsi, H. A. Khatib, J. F. Stoddart, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 12912.
- [101] K. M. Park, D.-W. Lee, B. Sarkar, H. Jung, J. Kim, Y. H. Ko, K. E. Lee, H. Jeon, K. Kim, *Small* **2010**, 6, 1430.
- [102] C. R. Thomas, D. P. Ferris, J.-H. Lee, E. Choi, M. H. Cho, E. S. Kim, J. F. Stoddart, J.-S. Shin, J. Cheon, J. I. Zink, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 10623.
- [103] J. Kim, Y. Ahn, K. M. Park, Y. Kim, Y. H. Do, D. H. Oh, K. Kim, *Angew. Chem. Int.* **2007**, 119, 7537.
- [104] A. R. Kennedy, A. J. Florence, F. J. McInnes, N. J. Wheate, *Dalton Trans.* **2009**, 7695.
- [105] J. del Barrio, S. T. J. Ryan, P. G. Jambrina, E. Rosta, O. A. Scherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5745–5748.
- [106] X. Zhou, X. Su, P. Pathak, R. Vik, B. Vinciguerra, L. Isaacs, J. Jayawickramarajah, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, 139, 13916.
- [107] K. I. Kuok, S. Li, I. W. Wyman, R. Wang, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2017**, 1398, 108.
- [108] J. Vázquez, M. A. Romero, R. N. Dsouza, U. Pischel, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 6245.
- [109] N. Basílio, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 15208.
- [110] A. Hennig, H. Bakirci, W. M. Nau, *Nat. Methods* **2007**, 4, 629.

- [111] S. Ghosh, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4445.
- [112] G. Ghale, V. Ramalingam, A. R. Urbach, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7528.
- [113] C. P. Carvalho, A. Norouzy, V. Ribeiro, W. M. Nau, U. Pischel, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 2866.
- [114] J. M. Chinai, A. B. Taylor, L. M. Ryno, N. D. Hargreaves, C. A. Morris, P. J. Hart, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8810.
- [115] L. A. Logsdon, C. L. Schardon, V. Ramalingam, S. K. Kwee, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 17087.
- [116] D.-W. Lee, K. M. Park, M. Banerjee, S. H. Ha, T. Lee, K. Suh, S. Paul, H. Jung, J. Kim, N. Selvapalam, S. H. Ryu, K. Kim, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 154.
- [117] K. M. Park, J. Murray, K. Kim, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 644.
- [118] M. E. Bush, N. D. Bouley, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14511.
- [119] L. M. Heitmann, A. B. Taylor, P. J. Hart, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12574.
- [120] S. Sonzini, S. T. J. Ryan, O. A. Scherman, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 8779.
- [121] H. D. Nguyen, D. T. Dang, J. L. J. van Dongen, L. Brunsveld, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 895.

- [122] H.-J. Buschmann, L. Mutihac, R. C. Mutihac, E. Schollmeyer, *Thermochim. Acta* **2005**, *430*, 79.
- [123] F. Biedermann, U. Rauwald, J. M. Zayed, O. A. Scherman, *Chem. Sci.* **2011**, *2*, 279.
- [124] D. T. Dang, J. Schill, L. Brunsveld, *Chem. Sci.* **2012**, *3*, 2679.
- [125] F. Biedermann, W. M. Nau, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 1.
- [126] A. T. Bockus, L. C. Smith, A. G. Grice, O. A. Ali, C. C. Young, W. Mobley, A. Leek, J. L. Roberts, B. Vinciguerra, L. Isaacs, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 16549.
- [127] A. I. Lazar, F. Biedermann, K. R. Mustafina, K. I. Assaf, A. Hennig, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13022.
- [128] V. Sindelar, M. A. Cejas, F. M. Raymo, W. Chen, S. E. Parker, A. E. Kaifer, *Chem. Eur. J.* **2005**, *11*, 7054.
- [129] T. Minami, N. A. Esipenko, A. Akdeniz, B. Zhang, L. Isaacs, P. Anzenbacher Jr, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15238.
- [130] H. Yin, F. Dumur, Y. Niu, M. M. Ayhan, O. Grauby, W. Liu, C. Wang, D. Siri, R. Rosas, A. Tonetto, D. Gigmes, R. Wang, D. Bardelang, O. Ouari, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 33220.
- [131] F. Tian, D. Jiao, F. Biedermann, O. A. Scherman, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1207.
- [132] C. P. Carvalho, Z. Domínguez, J. P. Da Silva, U. Pischel, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2698.

- [133] J. R. Nilsson, C. P. Carvalho, S. Li, J. P. Da Silva, J. Andréasson, U. Pischel, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 3691.
- [134] J. Zhang, Q. Zou, H. Tian, *Adv. Mater.* **2012**, *25*, 378.
- [135] J. Zhang, J. Wang, H. Tian, *Mater. Horiz.* **2014**, *1*, 169.
- [136] G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 4900.
- [137] A. Credi, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4003.
- [138] D.-H. Qu, Q.-C. Wang, Q.-W. Zhang, X. Ma, H. Tian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7543.
- [139] J. P. Olson, M. R. Banghart, B. L. Sabatini, G. C. R. Ellis-Davis, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 15948.
- [140] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358.
- [141] P. Klán, T. Solomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- [142] J. del Barrio, S. T. J. Ryan, P. G. Jambrina, E. Rosta, O. A. Scherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5745.

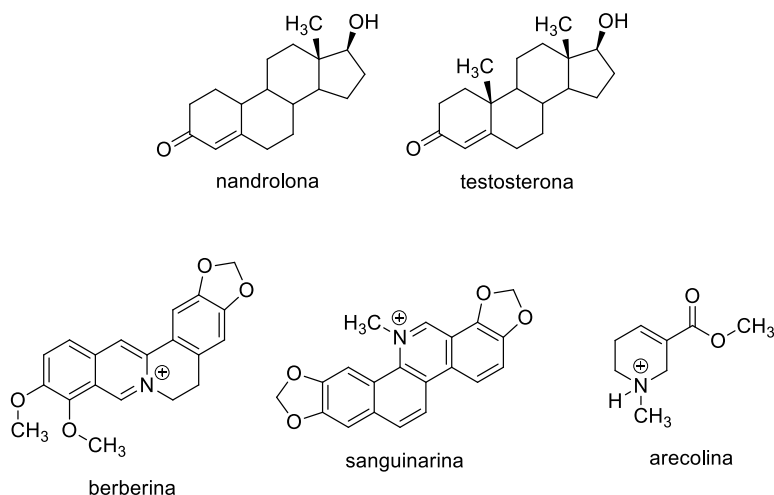
***CAPÍTULO 2. AFINIDAD Y  
SELECTIVIDAD DE PRODUCTOS  
NATURALES TERPÉNICOS CON  
CBn***

## 2.1. INTRODUCCIÓN

Últimamente, los productos naturales han adquirido gran interés como huéspedes de  $CB_n$  ( $n=7$  o  $8$ ).

Nau y sus colaboradores han demostrado que los esteroides, a pesar de que no disponen de elementos convencionales para su reconocimiento (como puentes de hidrógeno, cargas), se unen con gran afinidad (a concentraciones subnanomolares) sobre todo a  $CB_8$ . Esta excelente disposición a formar complejos se da principalmente por el reconocimiento por parte de la cavidad de sus formas y tamaños tan peculiares, además de por el efecto hidrofóbico.<sup>1</sup>

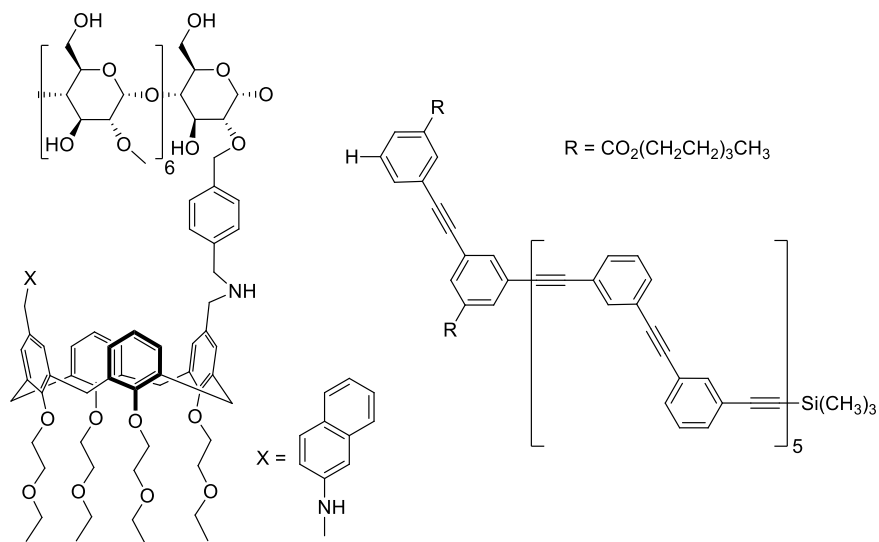
Otros compuestos naturales como los alcaloides presentan una gran capacidad de unión con  $CB_7$ . La berberina, una sal de amonio cuaternaria con estructura de isoquinolina (Esquema 2.1), de gran interés biológico (actividad antitumoral, antiviral y antibacterial)<sup>2,3</sup> experimenta un gran aumento de su fluorescencia tras su inclusión en el macrociclo lo que permite su detección en el rango de nanomolar.<sup>4</sup> En el caso de la sanguinarina se ha encontrado que el  $CB_7$  puede impedir la adición nucleofílica de  $OH^-$  cuando está en forma de iminio para dar la alcalonamina.<sup>5</sup> Y en el uso de arecolina como fármaco, se ha demostrado que la hepatotoxicidad de este compuesto disminuye in vitro al encapsularse en  $CB_7$ .<sup>6</sup>



**Esquema 2.1.** Estructura de productos naturales huéspedes de CBs.

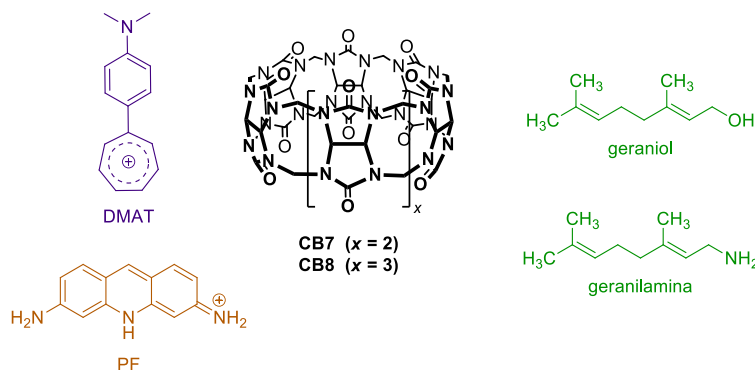
Los terpenos, por su parte, son componentes principales de los aceites esenciales, muy utilizados en perfumería y en aditivos alimentarios. Además tienen importancia en otros campos como la medicina y en la síntesis de productos naturales donde participan como productos intermedios. Por todo ello, el estudio de las interacciones supramoleculares en medio acuoso de estos compuestos de carácter terpénico con macrociclos artificiales es bastante interesante. Sin embargo, hay pocos trabajos sobre reconocimiento molecular de terpenos ya que no es nada sencillo experimentar con ellos en agua.<sup>7</sup> Algunos publicados son un sensor fluorescente de  $\beta$ -ciclodextrina unida por un puente aminoxililo a un calix[4]areno que contiene un fluoróforo (Esquema 2.2),<sup>8</sup> un oligómero anfifílico de *m*-fenileno etinileno (Esquema 2.2) para la complejación diastereoselectiva de terpenos,<sup>9</sup> y un sensor de seroalbúmina bovina con PRODAN como colorante que es desplazado por el huésped terpénico.<sup>7</sup> Por lo tanto, el estudio de la

afinidad y selectividad de los productos naturales terpenos, en sistemas anfitrión-huésped, con cucurbiturilos (CB7 y CB8) resulta bastante atractivo.



**Esquema 2.2.** Sensor de  $\beta$ -ciclodextrina-calix[4]areno (izquierda) y oligómero *m*-fenileno etinileno (derecha)

En estudios previos para identificar huéspedes que se unen con gran afinidad y selectividad a CB7 y/o CB8, Nau y Pischel ya demostraron que terpenos, como geranilamina y geraniol, actúan como excelentes huéspedes con preferencia por el homólogo de mayor tamaño (estructuras en Esquema 2.3).<sup>10</sup>



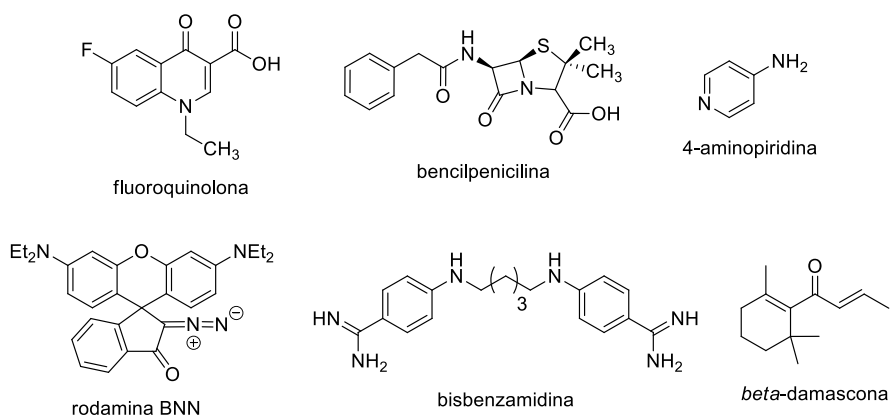
**Esquema 2.3.** Estructuras de los colorantes (izquierda), anfitriones (centro) y algunos huéspedes (derecha) utilizados por nuestro grupo en trabajos previos.<sup>10</sup>

Normalmente, en la formación de complejos supramoleculares con CBs se encuentran grandes constantes de asociación, lo cual está relacionado con la liberación de moléculas de agua de alta energía del interior de la cavidad del macrociclo.<sup>11</sup> Este proceso generalmente está favorecido por su entalpía y en algunos casos por entropía.

Por otro lado, estas interacciones supramoleculares de carácter no covalente permiten que la carga (huésped) del interior del macrociclo pueda ser liberada por acción de la luz, lo cual es una ventaja ya que posibilita tener un control espacio-temporal del proceso.<sup>12,13</sup> Para llevar a cabo estas fotoliberaciones es necesario generar un especie que compita con el terpeno y que sea capaz de desplazarlo fuera de la cavidad. Los llamados *caged compounds* son compuestos que contienen un grupo protector fotosensible que al ser irradiados selectivamente liberan el compuesto con capacidad

de desplazar. No obstante, a veces la síntesis de estos productos no es nada sencilla.

Existen en la bibliografía casos de liberación fotoinducida de diferentes tipos de moléculas, por ejemplo el grupo de Feringa utilizó esta técnica para controlar la actividad de antibióticos,<sup>14</sup> Etchenique y sus colaboradores la usaron para administrar 4-aminopiridina (un compuesto que incrementa la actividad neuronal)<sup>15</sup> de un complejo de rutenio.<sup>16</sup> También se ha aplicado con biomoléculas,<sup>17</sup> colorantes fluorescentes (como rodaminas y bisbenzamidinas),<sup>18,19</sup> o productos naturales (como compuestos orgánicos volátiles)<sup>20,21</sup> (estructuras en Esquema 2.4).

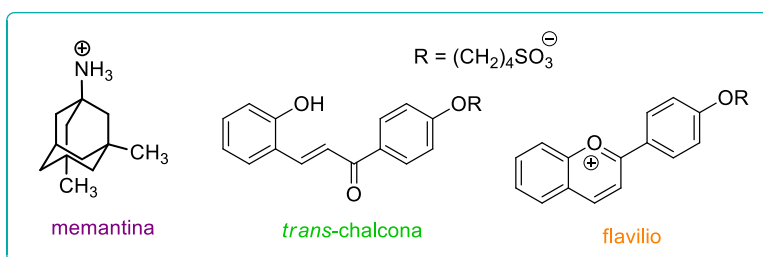
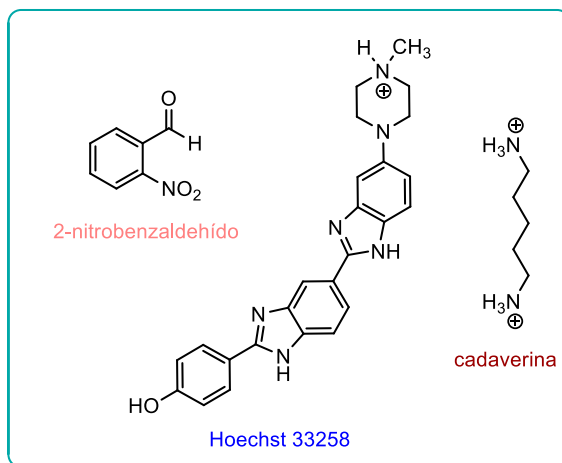


**Esquema 2.4.** Especies usadas en estudios de activación con luz.

Un aspecto importante a destacar en este proceso de eliminación del grupo fotolábil es que tiene que ser altamente selectivo y, aprovechando la diferenciación en las interacciones de huéspedes (en nuestro caso terpenos) con un determinado anfitrión, conseguir

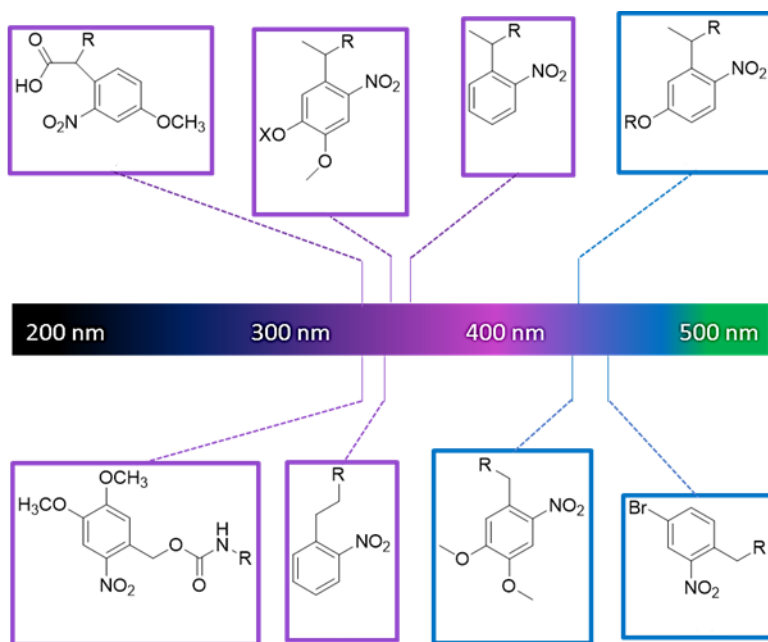
un desplazamiento por parte de la especie activada que dependa únicamente de equilibrios químicos.

En trabajos recientes, se ha dado a conocer la liberación fotoinducida de huéspedes de complejos con CB7 mediante distintos mecanismos. En primer lugar, un método que combina un salto de pH de 8 a 5 activado con luz (producido por la donación de un protón del 2-nitrobenzaldehído) y la capacidad (dependiente del pH) de un colorante (Hoechst 33258) de formar complejo con el cucurbiturilo<sup>22,23</sup> y liberar al huésped (cadaverina, una diamina elegida como modelo de poliaminas conocidas por sus funciones biológicas<sup>24</sup>) (estructuras en Esquema 2.5).<sup>25</sup> En segundo lugar, se llevó a cabo el desplazamiento fotoactivado del fármaco memantina (usado en pacientes con Alzheimer) controlando el equilibrio anfitrión-huésped con un sistema fotocrómico *trans*-chalcona/flavilio, en el cual la especie cargada flavilio tiene una afinidad por el CB tres órdenes de magnitud mayor que la especie no cargada chalcona (estructuras en Esquema 2.5).<sup>26</sup> Sin embargo, estos procedimientos precisan de un control del pH, que limita su número de aplicaciones.



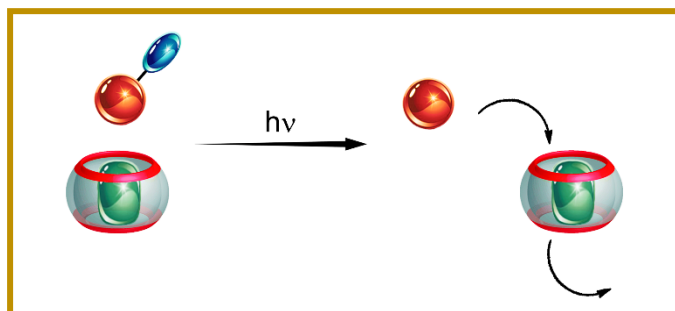
**Esquema 2.5.** Compuestos utilizados en trabajos previos de fotoliberación.

Teniendo en cuenta todo esto, en este trabajo se ha desarrollado un sistema para la liberación fotoinducida compuesto por un competidor protegido previamente con el grupo fotosensible *o*-nitrobencilo (cuya fotoquímica es bien conocida, Esquema 2.6),<sup>12,13,17,27,28</sup> huéspedes terpenos y CB7 como anfitrión; donde las diferencias de afinidad de los productos naturales con la cavidad permiten una liberación selectiva y ordenada.



**Esquema 2.6.** Derivados *o*-nitrobencilo utilizados en sistemas selectivos de longitud de onda.<sup>13</sup>

La ventaja de este sistema *plug-and-play* es que puede ser utilizado ampliamente con otros huéspedes funcionales ya que no necesita que ni el anfitrión ni el huésped sean activos fotoquímicamente como en otros procedimientos publicados anteriormente.<sup>29-40</sup>



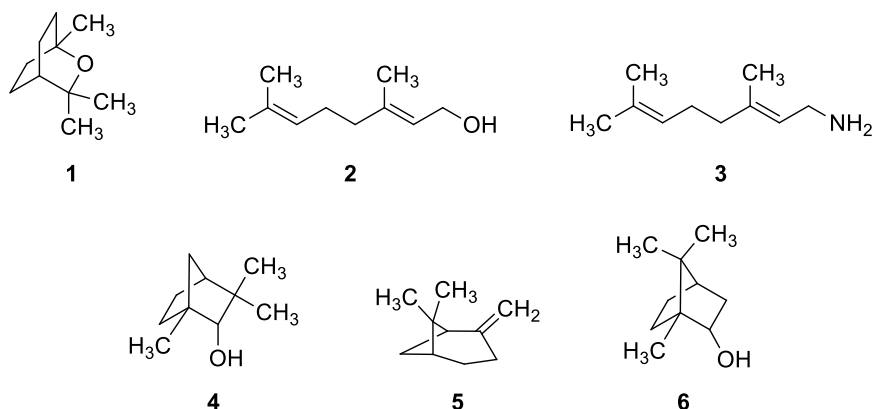
**Esquema 2.7.** Representación del principio de liberación activada con luz.

## 2.2. CARACTERIZACIÓN SUPRAMOLECULAR DE COMPLEJOS TERPENOS/CB<sub>n</sub>

En este apartado, se desarrolla un estudio de las interacciones supramoleculares de una variedad de huéspedes terpenos (con diferentes estructuras, grupos funcionales y con o sin carga) con los dos macrociclos anfitriones CB7 y CB8.

### 2.2.1. Caracterización Supramolecular de complejos terpeno/CB7

En primer lugar, se evalúa la afinidad de huéspedes terpenos con el homólogo de menor tamaño CB7 en medio acuoso. Los elegidos en esta sección son una muestra característica de compuestos principales de aceites esenciales: eucaliptol (**1**), geraniol (**2**), geranilamina (**3**), fenchil alcohol (**4**), β-pineno (**5**) y borneol (**6**) (Esquema 2.8).

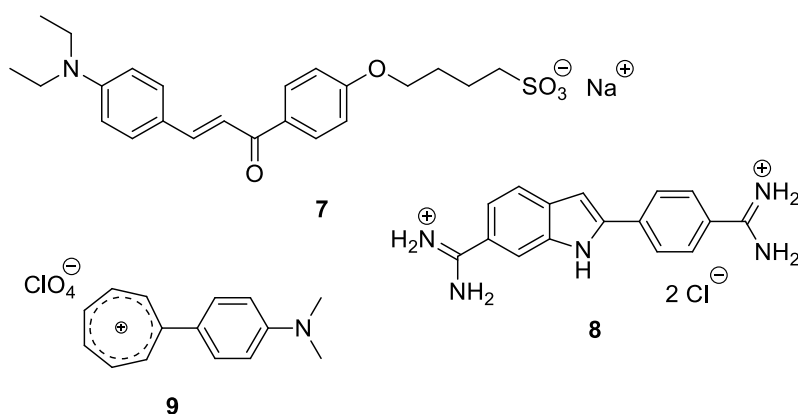


**Esquema 2.8.** Estructuras de los huéspedes terpenos.

Como se mencionó anteriormente en la introducción de este capítulo, la baja solubilidad de algunos terpenos en agua es un

asunto que complica realmente esta caracterización supramolecular, reto que también se le presentó a Nau y colaboradores en su estudio con esteroides.<sup>1</sup>

Por lo tanto, para determinar los parámetros que describen cómo es la interacción anfitrión-huésped nos encontramos diferentes situaciones. Por una parte, están los terpenos con suficiente solubilidad en agua (**1**, **3**, **4**, y **6**) con los que se utilizó la calorimetría isoterma de titulación (ITC), técnica que permite medir constantes de asociación de hasta aproximadamente  $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ . Para verificar los resultados se usó la valoración de desplazamiento competitivo del colorante **7** o **8** (estructuras en esquema 2.9), ya que los huéspedes no tienen propiedades fotofísicas, mediante espectroscopia de absorción UV/Vis obteniéndose valores similares.



**Esquema 2.9.** Estructuras de los colorantes utilizados.

Por otra parte, sólo se emplearon valoraciones de desplazamiento competitivo del colorante **7**, **8** o **9** monitorizadas por espectroscopia de fluorescencia y/o absorción UV/vis, para los huéspedes poco

solubles en agua (**2** y **5**) y para el que se une tan fuerte al macrociclo (**6**), que su constante de asociación no se puede estimar con ITC. Cabe destacar que fue necesario el uso de etanol como co-disolvente (0.2-0.4% en volumen) para llevar a cabo los experimentos de desplazamiento competitivo.

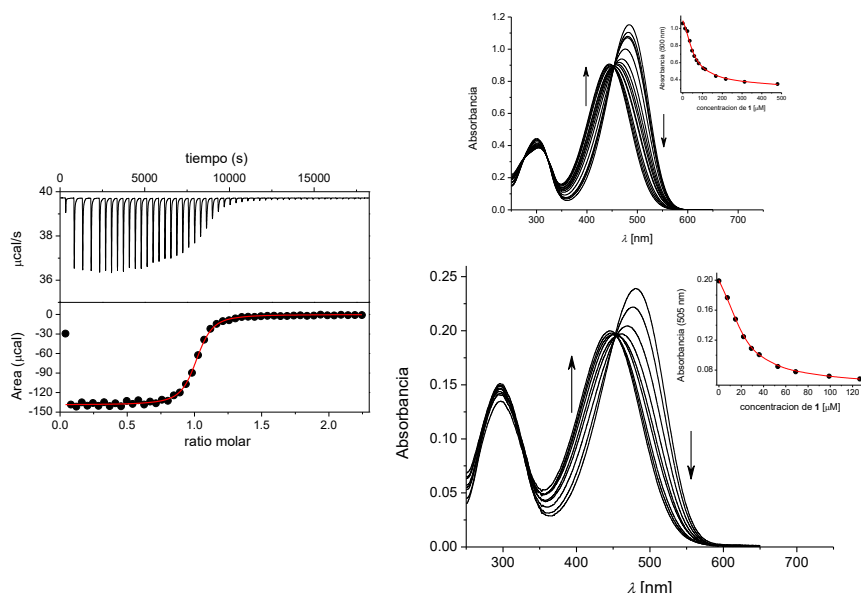


**Figura 2.1.** Izquierda: datos de calorimetría isoterma de titulación (ITC) para la complejación de CB7 con **1** (0.4 mM). Derecha arriba: desplazamiento competitivo de **7** (26.8  $\mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 (43.9  $\mu\text{M}$ ) con eucaliptol (**1**) en agua a pH 9, monitorizado por absorción UV/vis. Figura insertada: curva de valoración correspondiente.  $K_{\text{CB7}}(\textbf{7}) = 2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; ref. [41]. Derecha abajo: espectros de absorción UV/vis del desplazamiento competitivo de **7** (6.7  $\mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 (17.7  $\mu\text{M}$ ) con eucaliptol (**1**) en agua (0.2% vol. etanol como co-disolvente) a pH 9. Figura insertada: curva de valoración correspondiente.  $K_{\text{CB7}}(\textbf{7}) = 1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; de este trabajo.

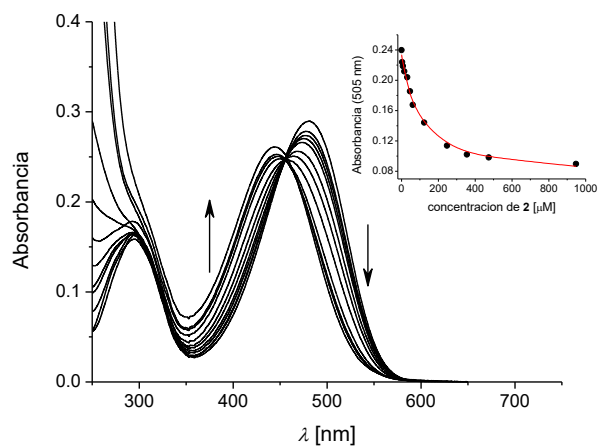


**Figura 2.2.** Espectros de absorción UV/vis del desplazamiento competitivo de **7** ( $7.4 \mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 ( $18.6 \mu\text{M}$ ) con geraniol (**2**) en agua (0.2% vol. etanol como co-disolvente) a pH 9. Figura insertada: curva de valoración correspondiente.  $K_{\text{CB7}}(\mathbf{7}) = 1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; de este trabajo.

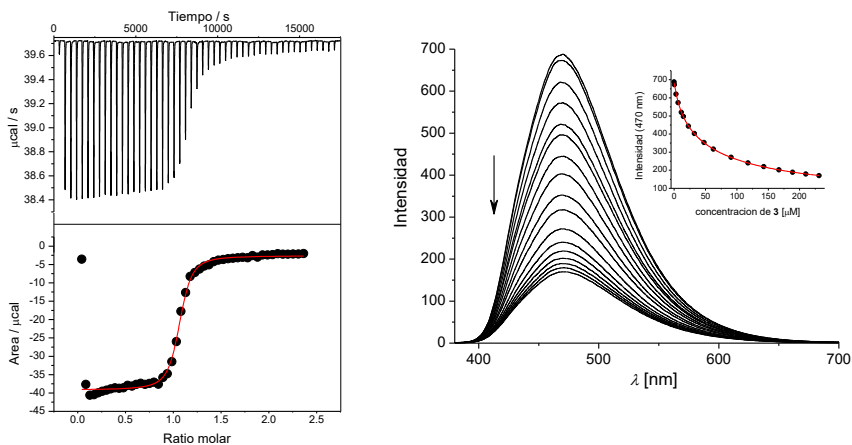


**Figura 2.3.** Izquierda: datos de ITC obtenidos para la valoración de geranilamina (**3**) ( $0.1 \text{ mM}$ ) con CB7 ( $0.75 \text{ mM}$ ) en agua (pH 5.5). Derecha: Espectros de fluorescencia del desplazamiento competitivo de **8** ( $10 \mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 ( $10 \mu\text{M}$ ) con geranilamina (**3**) en agua a pH 7. Figura insertada: curva de valoración correspondiente.  $K_{\text{CB7}}(\mathbf{6}) = 1.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ; ref. [42].

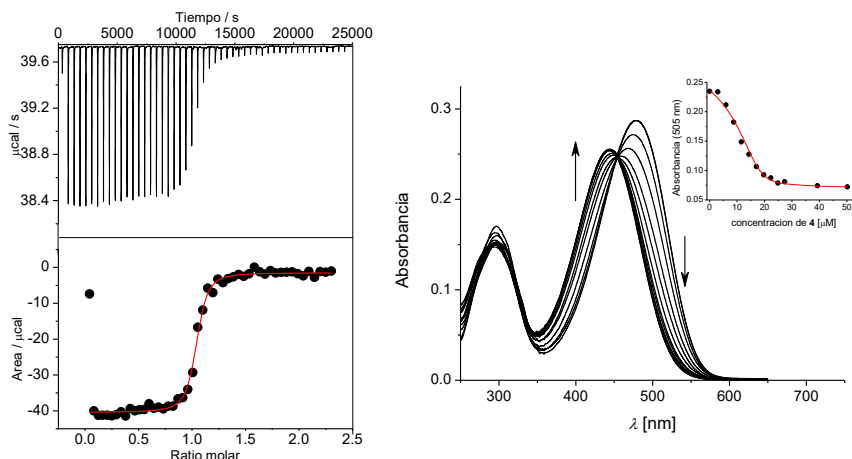


**Figura 2.4.** Izquierda: datos de ITC obtenidos para la valoración de fenchil alcohol (**4**) (0.098 mM) con CB7 (0.75 mM) en agua. Derecha: espectros de absorción UV/vis del desplazamiento competitivo de **7** (7.4  $\mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 (17.7  $\mu\text{M}$ ) con fenchil alcohol (**4**) en agua (0.2% vol. etanol como co-disolvente) a pH 9. Figura insertada: curva de valoración correspondiente.  $K_{\text{CB7}}(\mathbf{7}) = 1.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ ; de este trabajo.

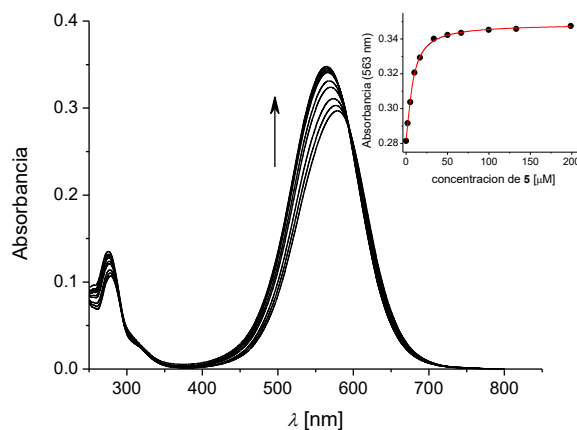


**Figura 2.5.** Espectros de absorción UV/vis del desplazamiento competitivo de **9** (10  $\mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 (10  $\mu\text{M}$ ) con  $\beta$ -pineno (**5**) en agua (hasta 0.4% vol. etanol como co-disolvente) a pH 4. Figura insertada: curva de valoración correspondiente.  $K_{\text{CB7}}(\mathbf{9}) = 2.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ; ref. [10].

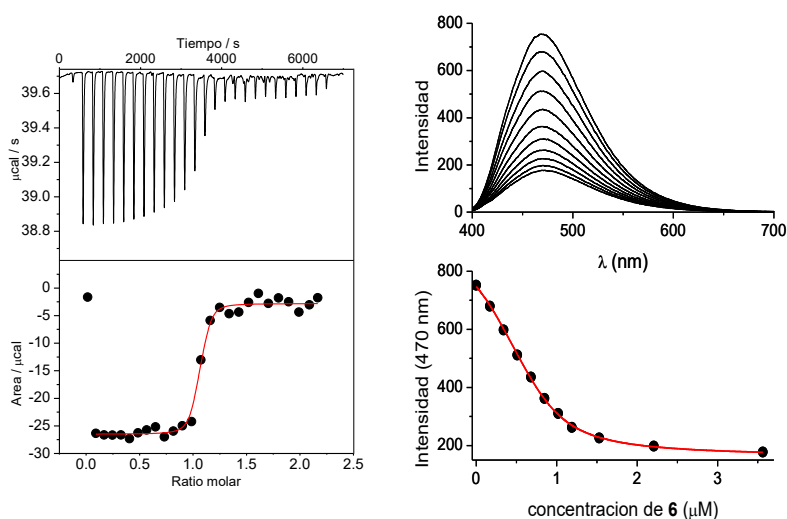


**Figura 2.6.** Izquierda: datos de ITC obtenidos para la valoración de borneol (**6**) (0.022 mM) con CB7 (0.16 mM) en agua. Derecha: desplazamiento competitivo de **8** ( $[8] = [CB7] = 1 \mu\text{M}$ ;  $K_{CB7(8)} = 1.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) por **6**, monitorizado por espectroscopia de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 362 \text{ nm}$ ; punto isobástico en los espectros de absorción UV/vis).

El geraniol (**2**) es el que tiene una afinidad por el CB7 menor, en cambio la geranilamina (**3**) tiene un grupo amino protonable que le permite unirse con una fuerza dos órdenes de magnitud superior. Los terpenos bicíclicos  $\beta$ -pineno (**5**) y borneol (**6**) son los huéspedes que se unen con más fuerza. Cabe destacar que los regioisómeros fenchil alcohol (**4**) y borneol (**6**), diferenciados mínimamente en las posiciones de los sustituyentes del esqueleto [2.2.1]heptano, presentan grandes diferencias en cuanto fuerza de unión. Por tanto, la afinidad de los huéspedes terpénicos estudiados abarca un rango de cuatro órdenes de magnitud ( $10^4$ - $10^8 \text{ M}^{-1}$ ), ver Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Afinidad de huéspedes **1-6** con CB7.

| Huésped  | $K$ ( $10^6 \text{ M}^{-1}$ ) <sup>[a]</sup> | $\Delta H$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) | $T\Delta S$ (kJ mol <sup>-1</sup> ) |
|----------|----------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>1</b> | 0.85 <sup>[b]</sup> [0.34] <sup>[c]</sup>    | -37.4 <sup>[b]</sup>               | -3.6 <sup>[b]</sup>                 |
| <b>2</b> | 0.046 <sup>[c]</sup>                         |                                    |                                     |
| <b>3</b> | 3.2 <sup>[b]</sup> [1.9] <sup>[d]</sup>      | -39.7 <sup>[b]</sup>               | -2.5 <sup>[b]</sup>                 |
| <b>4</b> | 4.8 <sup>[b]</sup> [8.6] <sup>[c]</sup>      | -42.3 <sup>[b]</sup>               | -4.1 <sup>[b]</sup>                 |
| <b>5</b> | $\geq 10$ <sup>[e]</sup>                     |                                    |                                     |
| <b>6</b> | 260 <sup>[d]</sup>                           | -61.7 <sup>[b,f]</sup>             | -13.7 <sup>[g]</sup>                |

[a] Datos obtenidos por métodos alternativos mostrados en corchetes. [b] Determinado por ITC en agua a 25°C. [c] Medido por desplazamiento de **7** en agua (pH 9). [d] Medido por desplazamiento de **8** en agua (pH 7) controlado por fluorescencia. [e] Estimado por desplazamiento de **9** en buffer acetato 10 mM (pH 4). Sólo se da un límite inferior debido a una mayor incertidumbre a causa de la baja solubilidad de **5**. [f] Constantes de asociación mayores que  $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$  son difíciles de medir por valoración directa en ITC. No obstante, el valor de  $\Delta H$  se puede medir de manera segura por ITC. [g] El valor de  $-T\Delta S$  se calculó de  $\Delta G$  (vía  $K$ ) y  $\Delta H$ .

La complejación de los terpenos **1**, **3**, **4**, y **6** está favorecida entálpicamente<sup>11</sup> como señalan los datos de ITC (Tabla 2.1). Además indican que no hay aumento de entropía ligado a este proceso lo que descarta casi totalmente que haya aporte del efecto hidrofóbico clásico. Este comportamiento se encuentra frecuentemente en la interacción de huéspedes con CB7 y se deduce que es debido a la liberación de moléculas de agua de alta energía al volumen de agua circundante desde el interior del macrociclo.<sup>11</sup>

Para corroborar el hecho de la unión de los terpenos por la cavidad CB7, se realizaron medidas mediante espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Una gran ventaja es que todos estos huéspedes tienen grupos metilos cuyas señales de protones son magníficos indicadores para saber el estado en que se encuentran los terpenos respecto a su encapsulación con CB7. Para los terpenos bicíclicos, en la escala de tiempo de RMN la cinética de intercambio es lenta por lo que se observan a la vez el huésped unido y libre.

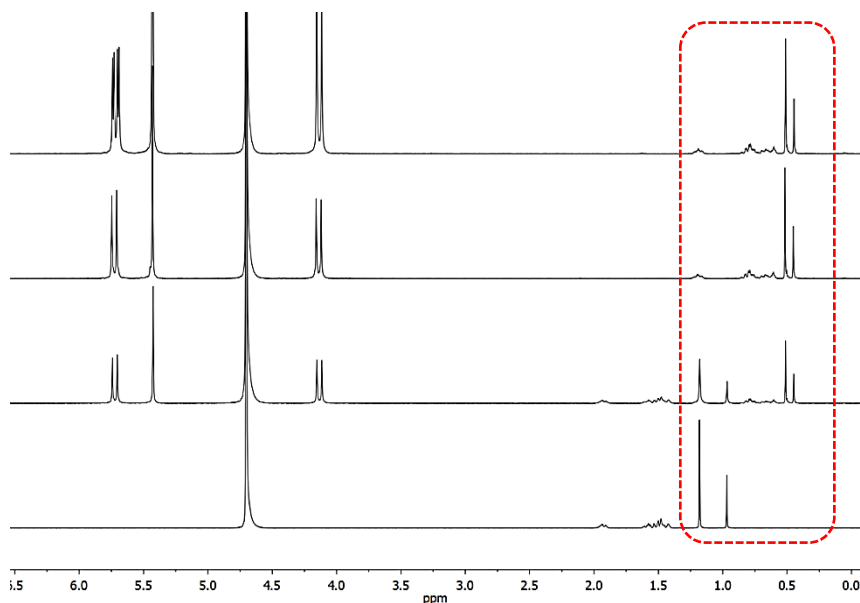


**Figura 2.7.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de eucaliptol (**1**, 1 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de CB7, pH 6.5. De abajo a arriba: 0 mM, 0.4 mM, 1 mM, 2 mM CB7.

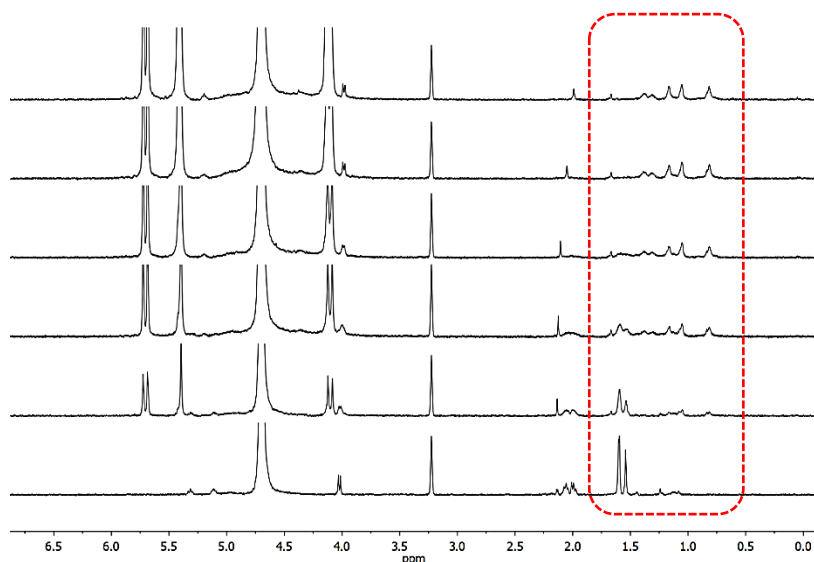


**Figura 2.8.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de geraniol (**2**, 0.2 mM en  $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$  60:1) en presencia de diferentes concentraciones de CB7, pD 6.5. De abajo a arriba: 0 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.5 mM, 0.7 mM CB7.

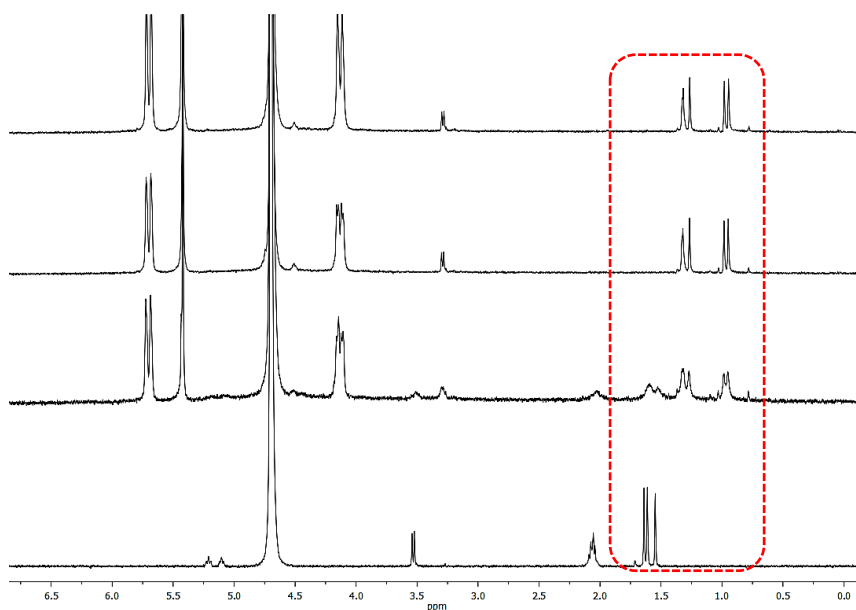


**Figura 2.9.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de geraniamina (**3**, 0.35 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de CB7, pD 5.5. De abajo a arriba: 0 mM, 0.25 mM, 0.49 mM, 0.74 mM CB7.

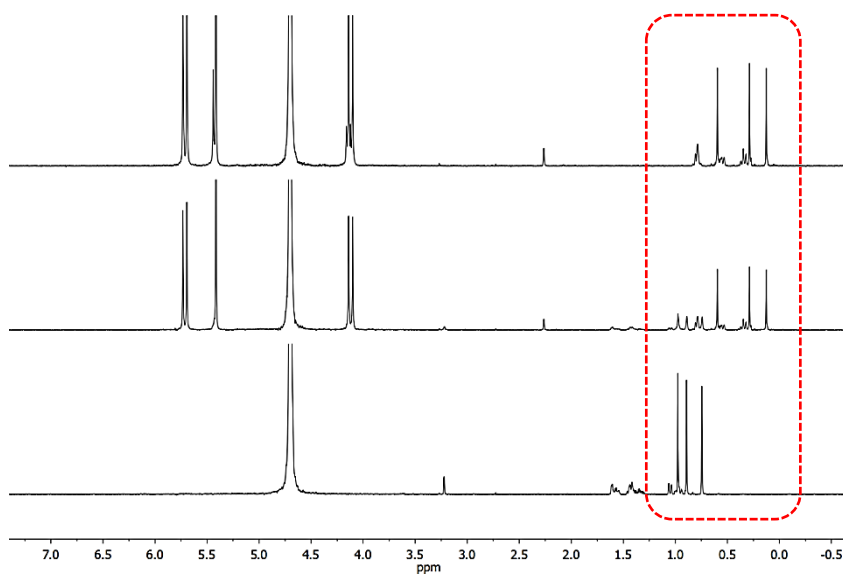


**Figura 2.10.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de fenchil alcohol (**4**, 0.35 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de CB7, pD 6.5. De abajo a arriba: 0 mM, 0.23 mM, 0.46 mM CB7.

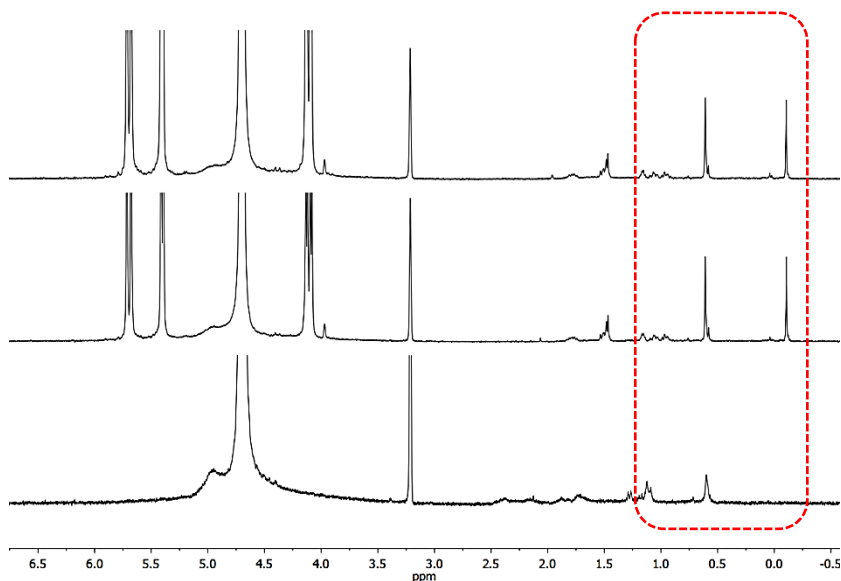


**Figura 2.11.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de  $\beta$ -pineno (**5**, 0.25 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de CB7, pD 6.5. De abajo a arriba: 0 mM, 0.5 mM,

1 mM CB7. Los picos se vuelven más nítidos después de la adición de CB7, debido probablemente al incremento de solubilidad del complejo.

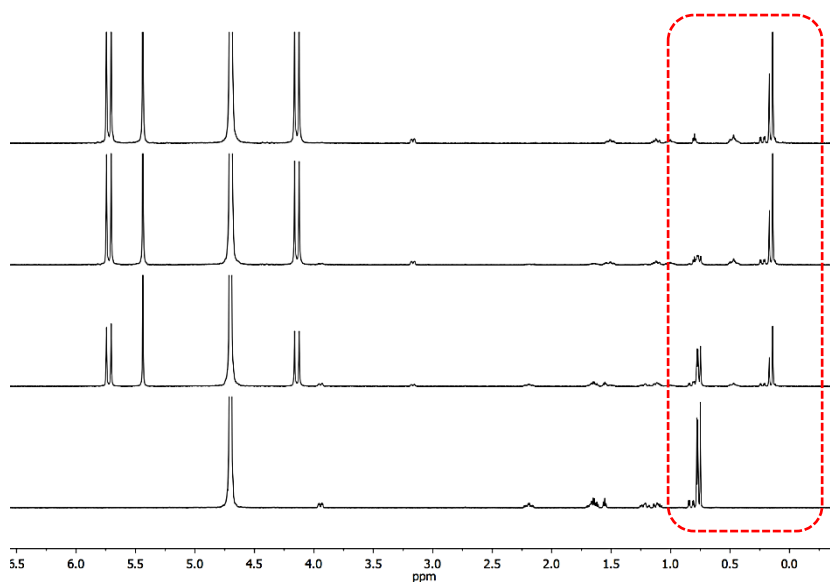


**Figura 2.12.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de borneol (**6**, 0.45 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en presencia de diferentes concentraciones de CB7, pD 6.5. De abajo a arriba: 0 mM, 0.18 mM, 0.36 mM, 0.46 mM CB7.

Como se aprecia en las Figuras 2.7 a 2.12, se puede confirmar que los huéspedes se encuentran situados profundamente en el interior de la cavidad ya que se producen desplazamientos químicos a campo más alto de entre 0.5 a 1.0 ppm.

Por último, un aspecto muy interesante de la complejación de los terpenos con CB7, es la capacidad del macrociclo de retener en fase acuosa al producto natural perfumado y evitar que pase a la fase gas. Para estudiar este comportamiento, diseñamos un experimento modelo con eucaliptol (**1**) como huésped en disolución acuosa, en ausencia o presencia de CB7 y usando la técnica

microextracción en fase sólida (SPME)<sup>43</sup> a temperatura constante (24 °C) con una fibra de sílice fundida recubierta de poliácrlato (85  $\mu\text{m}$  de revestimiento). Las concentraciones de **1** y CB7 se optimizaron (50  $\mu\text{M}$  y 120  $\mu\text{M}$  respectivamente) para conseguir un 98% de terpeno encapsulado. El eucaliptol volátil capturado con la fibra se inyecta en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector espectrómetro de masas, para cuantificar la concentración relativa de **1** en el espacio de cabeza del vial que contiene la disolución acuosa.

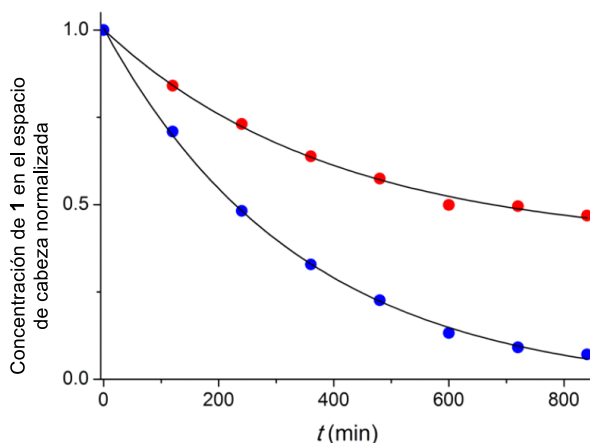


**Figura 2.13.** Transferencia de **1** (50  $\mu\text{M}$ ) de la disolución acuosa (pH 7) a la fase gas, en ausencia (puntos azules) y presencia de CB7 (120  $\mu\text{M}$ , puntos rojos); cuantificados por SPME. Las concentraciones normalizadas de **1** son expresadas como áreas del pico de cromatografía divididas por el área del pico a tiempo cero para cada experimento. El tiempo corresponde a la duración de la apertura del vial que contiene la disolución a la atmósfera. Cada punto fue medido después de cerrar el vial otra vez y esperar 10 minutos de re-equilibrio del sistema.

Como se puede observar en la Figura 2.13, el CB7 inmoviliza al eucaliptol enormemente (es importante mantener todos los

parámetros experimentales constantes, fundamentalmente los tiempos de extracción y desorción), y retarda su volatilización desde la disolución acuosa notablemente ya que tiene un tiempo de vida media de 229 minutos en ausencia del macrociclo y de 679 minutos en presencia de éste.

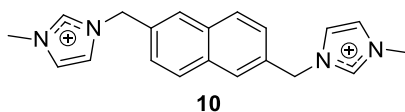
### **2.2.2. Caracterización Supramolecular de complejos terpeno/CB8**

Una vez evaluadas las interacciones supramoleculares de los huéspedes terpénicos con CB7, ahora se muestra en este apartado la formación de complejos con el macrociclo de mayor tamaño CB8. Los terpenos elegidos para este estudio, son una muestra representativa de los anteriores (sección 2.2.1) ya que hay huéspedes bicíclicos y acíclico, neutros y con carga y con diferentes grupos funcionales: éter, alcohol y amina. Son eucaliptol (**1**), geranilamina (**3**) y fenchil alcohol (**4**) (Esquema 2.8).

Primero, es necesario tener una idea de la calidad de la interacción terpeno-CB8, y así poder utilizar la técnica adecuada para poder cuantificarla. En un test previo de desplazamiento seguido por absorción UV/vis se observó que los huéspedes terpénicos tenían fuerza suficiente para excluir al ya conocido colorante ariltropilio **9** (estructura en Esquema 2.9,  $K = 2.6 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-2}$ )<sup>10</sup> que forma complejo 2:1 con CB8. Por lo tanto, las constantes de asociación de estos tres terpenos deben ser razonablemente grandes.

Así, la valoración de desplazamiento competitivo de un colorante se convierte en la herramienta indispensable para examinar la

interacción supramolecular entre el terpeno y el CB8 para formar el complejo 1:1. Ahora, se presenta el reto de encontrar un colorante que forme este tipo de complejos 1:1 con CB8 y que tenga una constante  $K$  adecuada para nuestro estudio. No es nada sencillo esta búsqueda ya que el CB8 tiende a dar cabida a dos huéspedes debido a su tamaño como en el caso de **9** y otros colorantes.<sup>44</sup> Buscando en la bibliografía existe un colorante fluorescente derivado de naftaleno **10** (estructura en Esquema 2.10) que forma complejo 1:1, sintetizado por el grupo de Scherman ( $K = 3.6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ).<sup>45</sup> Además, la fluorescencia de **10** es de gran utilidad para poder medir constantes de afinidad supuestamente tan altas, ya que posibilita trabajar a concentraciones muy bajas del complejo **10**·CB8. La constante de unión de **10** con CB8 medida por nosotros en agua a pH 7 por ITC fue de  $1.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , un valor concordante con el mencionado previamente.



**Esquema 2.10.** Estructura del colorante utilizado.

Entonces, una vez determinado el sistema para el desplazamiento competitivo, se procede a realizar las medidas para obtener las constantes de asociación anfitrión-huésped. En primer lugar se determinan realizando un ajuste de los cambios en la fluorescencia del colorante (Figura 2.14c y 2.14d) y en segundo lugar, se ajustan las curvas de valoración de cada huésped con CB8 por absorbancia UV/ vis (Figura 2.14a y 2.14b) para verificar los valores.

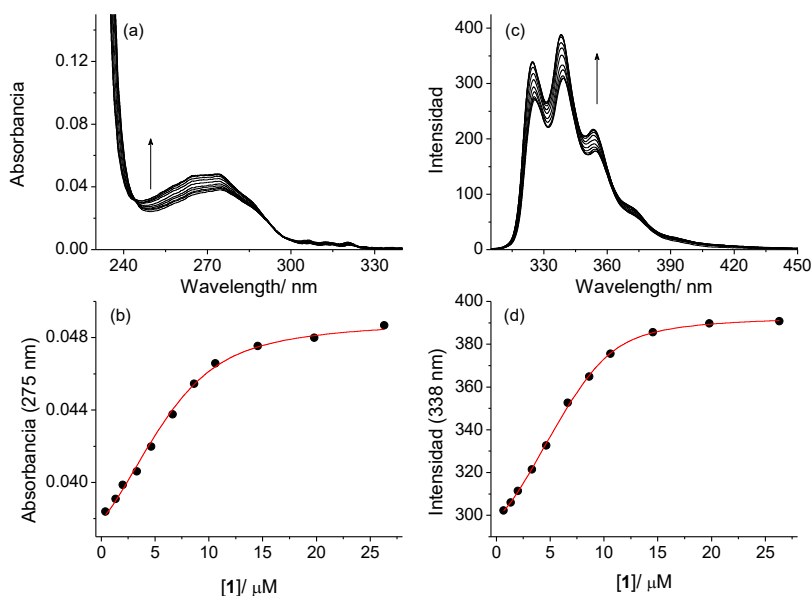


**Figura 2.14.** Valoración de desplazamiento competitivo del complejo **10**-CB8 (10  $\mu$ M) con el terpeno **1** en agua a pH 7. a) espectros de absorción UV/vis, b) curva de valoración de absorción UV/vis (a 275 nm), c) espectros de fluorescencia ( $\lambda_{exc}$  = 294 nm, punto isobéstico), y d) curva de valoración de fluorescencia (a 338 nm). Las curvas rojas corresponden a un ajuste con un modelo de unión competitiva 1:1.

Cabe destacar que las constantes de afinidad son medidas a pH 7, excepcionalmente la  $K$  del aminoterpeno **3** se mide también en disolución ligeramente ácida (pH 5.5) y es bastante similar a la obtenida a pH 7 (ver Tabla 2.2) debido a su alto valor de  $pK_a$ . Pues bien, comparando los resultados de afinidad obtenidos para los tres terpenos, la geranilamina **3** se une más fuerte que eucaliptol **1** y fenchil alcohol **4**. Esto puede ser explicado por las interacciones ion-dipolo del ion amonio de **3** con los carbonilos del anfitrión, las cuales estabilizan más el complejo.

**Tabla 2.2.** Afinidad de huéspedes **1**, **3** y **4** con CB8.

| Huésped                        | $K (10^6 \text{ M}^{-1})^{[a]}$ | $\Delta H (\text{kJ mol}^{-1})^{[b]}$ | $T\Delta S (\text{kJ mol}^{-1})$ |
|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|
| <b>1</b> [45 %] <sup>[c]</sup> | 230                             | -45.7                                 | 2.0 <sup>[e]</sup>               |
| <b>3</b> [45 %] <sup>[c]</sup> | 740 [860] <sup>[d]</sup>        | -47.5                                 | 3.1 <sup>[e]</sup>               |
| <b>4</b> [51 %] <sup>[c]</sup> | 320                             | -51.5                                 | -3.0 <sup>[e]</sup>              |

[a] Medida por valoración de desplazamiento competitivo, monitorizada por fluorescencia. [b] Determinado por ITC. [c] En corchetes se da el *PC*. [d] Medida a pH 5.5. [e] Calculado usando los valores de *K* medidos por desplazamiento competitivo y  $\Delta H$  de las medidas de ITC.

Las constantes de asociación para **1**, **3** y **4** abarcan un rango de  $(2.3\text{-}7.4) \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$  (ver Tabla 2.2), lo que coincide con una afinidad nanomolar (1.4-4.3 nM). Además las *K* medidas siguiendo por espectroscopia de absorción UV/vis el desplazamiento competitivo del colorante **10** fueron similares y el proceso de competición uniforme ya que se observaron puntos isosbéticos.

Para explicar la afinidad tan grande de los terpenos con el macrociclo mayor CB8 hay que tener en cuenta también cómo se ajustan los huéspedes en la cavidad en términos de tamaño. Existe un parámetro que permite cuantificar este ajuste llamado *packing coefficient* ( $PC = V_{\text{huésped}} \cdot 100\% / V_{\text{cavidad anfitrión}}$ ). El volumen de la cavidad interna del CB8<sup>46</sup> es  $367 \text{ \AA}^3$  y los volúmenes moleculares calculados son de  $165 \text{ \AA}^3$  para **1** y **4** y de  $187 \text{ \AA}^3$  para **3**.<sup>47</sup> Por lo tanto, el *PC* es 45 % para los terpenos **1** y **4** y 51% para el terpeno **3**, asumiendo una inclusión completa. Esto es un poco más pequeño

que el *PC* medio para CB8 ( $53 \pm 15\%$ )<sup>46</sup> y que el *PC* ideal sugerido por Rebek (55%);<sup>48</sup> pero los valores “reales” de *PC* para los complejos terpeno-CB8 pueden incluso estar más próximos al valor ideal de 55 % si se asume la flexibilidad mayor del CB8 respecto a los homólogos CB7 y CB6 que son más rígidos.

En lo que a la termodinámica del proceso se refiere, la calorimetría isoterma de titulación (ITC) no permite medir las constantes de asociación de los terpenos con CB8 ya que son mayores de  $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , pero sí que ofrece valores fiables de  $\Delta H$  (Tabla 2.2 y Figura 2.15).

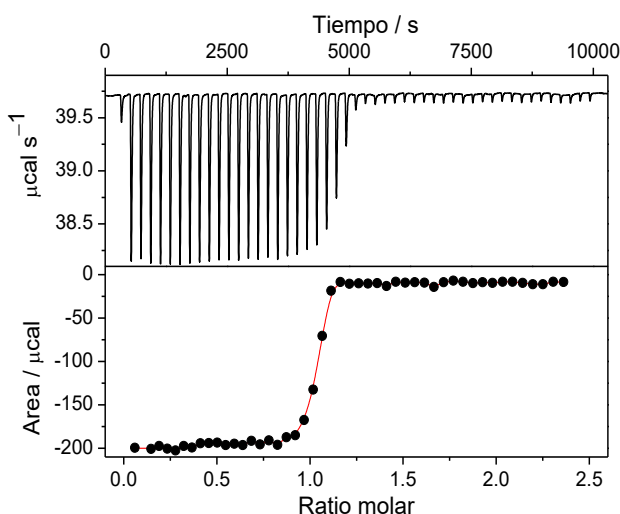


**Figura 2.15.** Datos de calorimetría isoterma de titulación (ITC) para la complejación de **1** con CB8 (0.1 mM) a pH 7; 25 °C. La línea roja sirve para guiar la vista, no es una línea de ajuste. Al igual que ocurre con los otros terpenos **3** y **4**, la posición de la inflexión y la nivelación tan nítida fuera de la curva de valoración indican una fuerte unión 1:1.

Las interacciones de los huéspedes terpénicos con CB8 están controladas por la entalpía de acuerdo con la liberación de agua de

alta energía del interior de la cavidad.<sup>11</sup> Pero en el caso de **1** y **3** también están ligeramente favorecidas por la entropía, que en el caso de geranilamina **3** puede ser explicado por la deshidratación del grupo amonio;<sup>49</sup> mientras que los valores de **1** y **4** no se pueden razonar con total certeza en base a los resultados actuales.<sup>50</sup> Cabe destacar que las variaciones de entropía no compensan a los cambios de entalpía, hecho que ya se observó anteriormente para la formación de complejos con cucurbiturilos.<sup>49,51</sup>

Las variaciones en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p$ ) para la formación de complejos terpeno-CB8 dan información sobre el reajuste del agua en el proceso de complejación. Esto se puede medir siguiendo los cambios de entalpía al variar la temperatura (Figura 2.16).

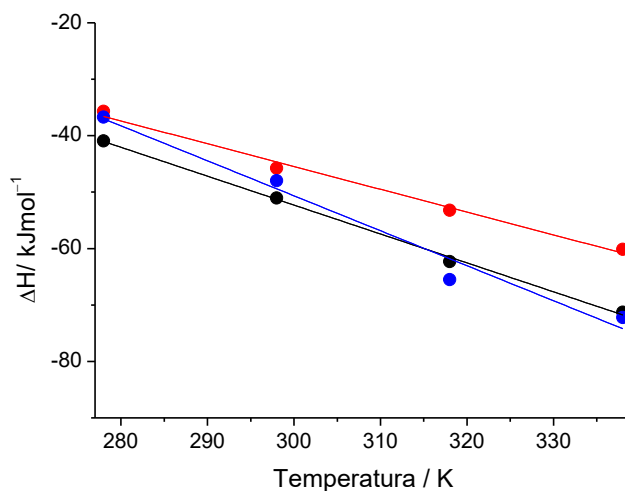


**Figura 2.16.** Gráfico de la entalpía de complejación de **1** (rojo), **3** (azul) y **4** (negro) con CB8 variando la temperatura.

Los valores obtenidos fueron  $-400 \pm 30$ ,  $-620 \pm 70$ , y  $-510 \pm 20 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  para **1**, **3**, y **4** respectivamente. Cuando hay un reordenamiento

importante del agua en una complejación anfitrión-huésped se obtienen valores negativos de  $\Delta C_p$ ,<sup>49</sup> que se produce porque existe efecto hidrofóbico.

Otra herramienta a la que recurrimos para tener mayor comprensión sobre estos complejos con CB8 fueron los cálculos mediante la teoría del funcional de la densidad (DFT) para encontrar la estructura de los complejos más favorable energéticamente.

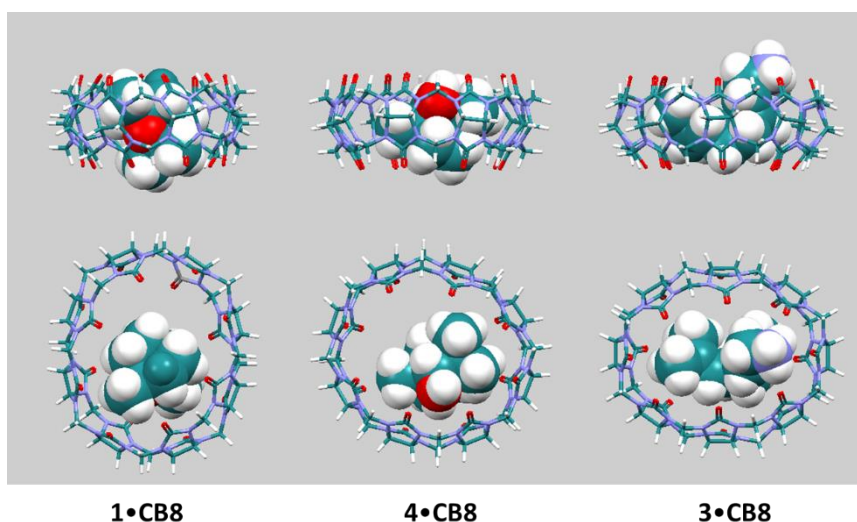


**Figura 2.17.** Estructuras optimizadas por DFT (funcional wb97XD) de los complejos de **1**, **4** y **3** con CB8; arriba: vistas laterales, abajo: vistas desde arriba.

Como se puede observar en la Figura 2.17, los terpenos bicíclicos **1** y **4** se encajan totalmente en la cavidad, mientras que el acíclico **3** adopta una conformación de U o herradura de alta energía observada para otros huéspedes por Kim<sup>52,53</sup> y Rebek.<sup>54</sup> Esta disposición de **3**, inusual para la asociación de huéspedes con anfitriones sintéticos, permite que la geranilamina quepa

completamente en el CB8, y se corroboró por ROESY bidimensional en RMN ya que hay un pico cruzado de NOE (efecto nuclear Overhauser) entre los protones de los grupos metilos terminales y los del metileno unido al grupo amino ( $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ ) (Figura 2.18).

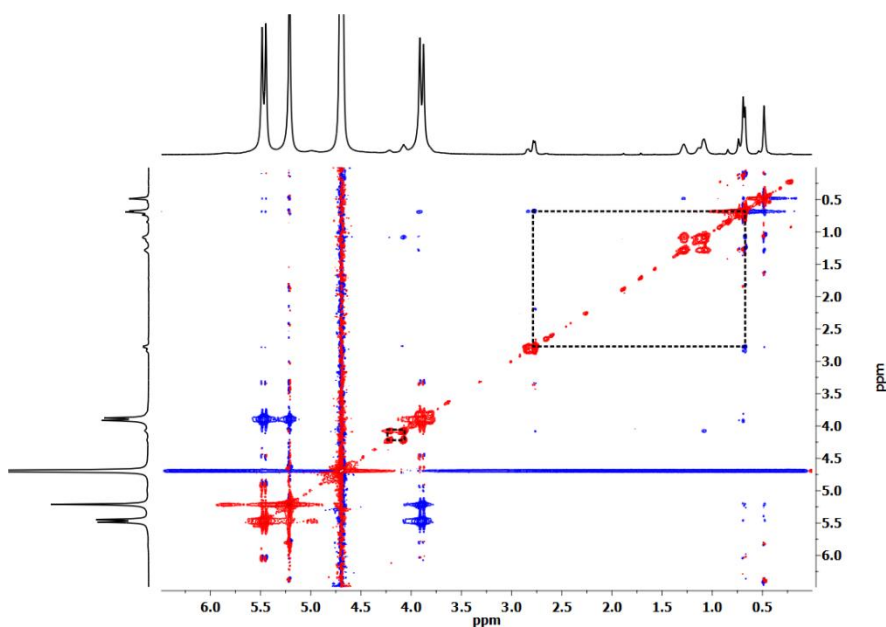


**Figura 2.18.** Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  ROESY de **3**-CB8 en  $\text{D}_2\text{O}$  a pH 5. El rectángulo punteado indica la posición de la señal NOE entre los  $-\text{CH}_3$  y el  $-\text{CH}_2\text{NH}_3^+$ .

Para terminar, se caracterizaron los complejos supramoleculares por  $^1\text{H}$ -RMN. Como ya se mencionó anteriormente los protones de los metilos de los terpenos **1**, **3** y **4** tienen señales que permiten saber claramente el estado del huésped.

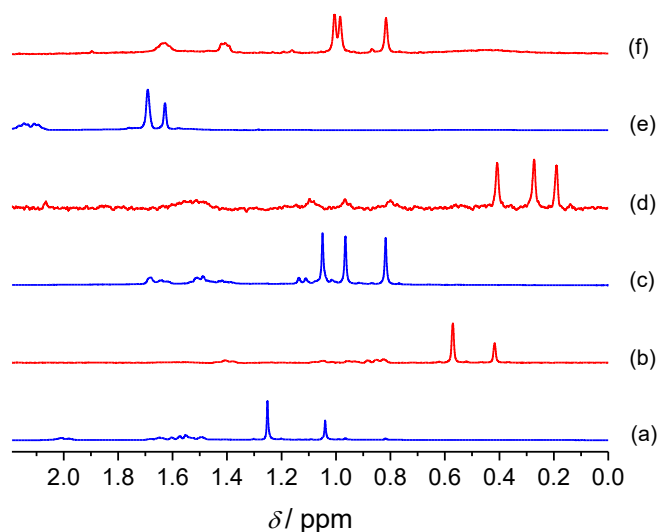


**Figura 2.19.** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN de a) **1** (180  $\mu\text{M}$ ), b) **1**·CB8 (todo a 180  $\mu\text{M}$ ), c) **4** (180  $\mu\text{M}$ ), d) **4**·CB8 (todo a 180  $\mu\text{M}$ ), e) **3** (200  $\mu\text{M}$ ), y f) **3**·CB8 (todo a 200  $\mu\text{M}$ ) en  $\text{D}_2\text{O}$  a pD 5.

Como era de esperar, los datos de la Figura 2.19 indican una inclusión profunda de todos los huéspedes terpenos en la cavidad interior del CB8, ya que se producen desplazamientos a campo más alto de los protones de los metilos bastante grandes ( $\Delta\delta$ , de -0.61 a -0.67 ppm para **1**; de -0.63 a -0.70 ppm para **4**; y de -0.60 a -0.81 ppm para **3**).

Además, para confirmar la afinidad de los huéspedes terpenos con CB8 por  $^1\text{H}$ -RMN diseñamos unos experimentos de competición de **1**, **3** y **4** con otros huéspedes del macrociclo ya conocidos. Por un lado, con memantina que tiene una interacción muy fuerte con CB8 ( $K = 4.3 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-1}$ ; pD 4.74, 50 mM buffer acetato).<sup>55</sup> Como se preveía, no se observó desplazamiento de la memantina al poner

una mezcla equimolar de terpeno, memantina y CB8, de acuerdo con que las constantes de asociación de los terpenos son tres órdenes de magnitud más bajas. Por otro lado, se probó la geranilamina (**3**) con 1-aminoadamantano que tiene una afinidad más pequeña ( $K = 8.2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ; pD 4.74, 50 mM buffer acetato).<sup>55</sup> Igual que antes se preparó una mezcla equimolar de los tres compuestos y se obtuvieron señales de RMN muy anchas que no corresponden ni a los complejos de los huéspedes con CB8 ni a los huéspedes libres. O sea, existe desplazamiento pero no total del derivado de adamantano por parte de **3** y un intercambio rápido entre los dos huéspedes a la temperatura del experimento que es 25 °C. Bajando la temperatura del equipo de RMN a 5 °C se ralentizó el intercambio de los huéspedes y se observaron señales más definidas del complejo **3**·CB8. Por lo que confirmamos que la geranilamina (**3**) tiene una alta afinidad por el CB8 ya que compite con el 1-aminoadamantano.

### **2.2.3. Comparativa Supramolecular CB7/CB8 como anfitrión**

Llegados a este punto, es interesante realizar un análisis comparativo, de algunos parámetros, que permitirá una comprensión mejor de las diferencias que se producen en las interacciones supramoleculares de los huéspedes terpenos con los cucurbiturilos al cambiar entre los anfitriones homólogos CB7 y CB8.

Por ejemplo, en la sección anterior 2.2.2, se calcularon los *packing coefficients* (PC) de los terpenos **1**, **3**, y **4** con CB8 y se obtuvieron

valores para los complejos terpeno-CB8 muy cercanos al valor ideal, lo que explica en parte la gran afinidad por este macrociclo. Pues bien, teniendo en cuenta el volumen menor del CB7 ( $242 \text{ \AA}^3$ ),<sup>46</sup> los *PC* son 68% para **1** y **4** y 77% para **3**, que comparando con el valor para huéspedes que se unen con la máxima afinidad a CB7 (60%)<sup>46</sup> están por encima. Hay que tener en cuenta que en los complejos con CB7 no todos los átomos del huésped están dentro de la cavidad, por lo que los valores de *PC* reales pueden ser un poco menores. De todas formas, estos *PC* concuerdan con las diferencias en las constantes de asociación *K* que son 2-3 órdenes de magnitud menores con CB7 que con CB8.

En aspectos termodinámicos, las complejaciones de los huéspedes terpénicos están favorecidas entálpicamente independientemente del cucurbiturilo. Sin embargo, el proceso es menos exotérmico con CB7 ( $\Delta H$  de -37 a -42 kJ mol<sup>-1</sup>) que con CB8 ( $\Delta H$  de -46 a -52 kJ mol<sup>-1</sup>) de acuerdo con un mejor ajuste dentro de este último.

En lo que se refiere a desplazamiento químico ( $\Delta\delta$ ) en espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN, es entre 0.1-0.3 ppm menor para los protones de los metilos de los terpenos **1**, **3**, y **4** en sus complejos con CB7 que con CB8, lo que indica una inclusión más profunda y eficaz en el anfitrión más grande.

Para terminar con esta comparativa se diseñaron dos ensayos de unión diferencial, con cada terpeno en presencia de los dos macrociclos a la vez. Esto permite ver la selectividad y la fuerza de la complejación. Primero, un test colorimétrico que se basa en la

diferente respuesta óptica del colorante **9** al complejarse con CB7 o CB8, y que ya fue utilizado anteriormente.<sup>10</sup> El colorante debe estar distribuido igualmente entre los dos macrociclos en el estado inicial, luego al añadir el terpeno se produce un desplazamiento competitivo del colorante de uno de los dos macrociclos, concretamente del CB por el que el terpeno tenga más afinidad y selectividad, dando lugar a una respuesta óptica en este caso un cambio en su absorción UV/vis.

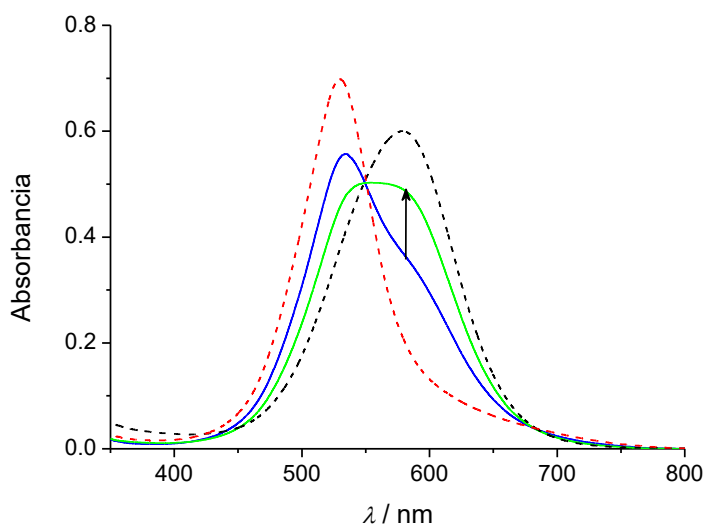


**Figura 2.20.** Ensayo de unión diferencial de **1**. El espectro azul representa la mezcla del colorante **9**, CB7, y CB8 (todo a 20  $\mu$ M). El espectro verde es la misma mezcla después de añadir **1** (20  $\mu$ M). Los espectros punteados corresponden a los complejos individuales de **9**-CB7 (negro) y **(9)<sub>2</sub>**-CB8 (rojo) a una concentración de 20  $\mu$ M. Todos los espectros fueron medidos en agua a pH 4.

En la Figura 2.20 se puede observar el resultado de este experimento. Las bandas espectrales de cada complejo del colorante **9** con cada macrociclo se distinguen bastante bien con

máximos de absorción a 530 y 578 nm. La mezcla de los dos complejos da lugar a una combinación de ambos espectros que al añadir una cantidad equimolar del terpeno (en la Figura 2.20 se muestra para **1** pero ocurre lo mismo para **3** y **4**) cambia y se vuelve más similar a la banda del complejo colorante-CB7, lo que quiere decir que el terpeno tiene preferencia por el CB8. Calculando el parámetro de calidad<sup>10</sup> del huésped en función de la afinidad y selectividad diferenciada por uno de los dos CBs se obtuvieron un 65%, 61% y 59% de preferencia por el CB8 para **1**, **3** y **4** respectivamente.

El otro experimento diseñado fue una serie de medidas en RMN para demostrar aún más si cabe la selectividad de los terpenos por el CB8. Se prepararon muestras de mezclas equimolares terpeno-CB7-CB8 y se compararon con los espectros de los complejos individuales (terpeno-CB7 por un lado y terpeno-CB8 por otro).

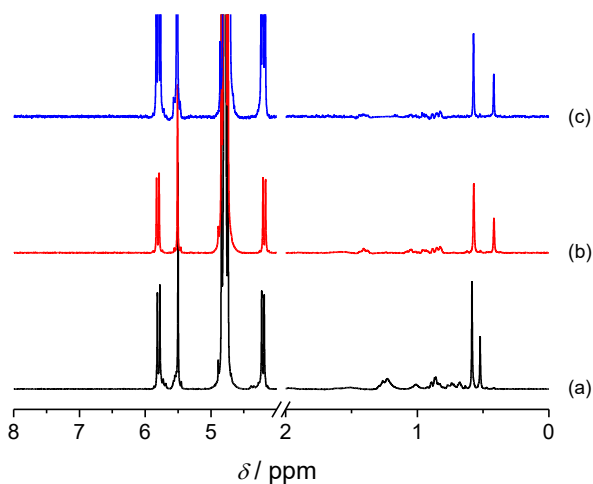


**Figura 2.21.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de a)  $1\cdot\text{CB7}$  (todo 1 mM), b)  $1\cdot\text{CB8}$  (todo 180  $\mu\text{M}$ ), y c) **1** en presencia de CB7 y CB8 (todo 200  $\mu\text{M}$ ), pD 5.

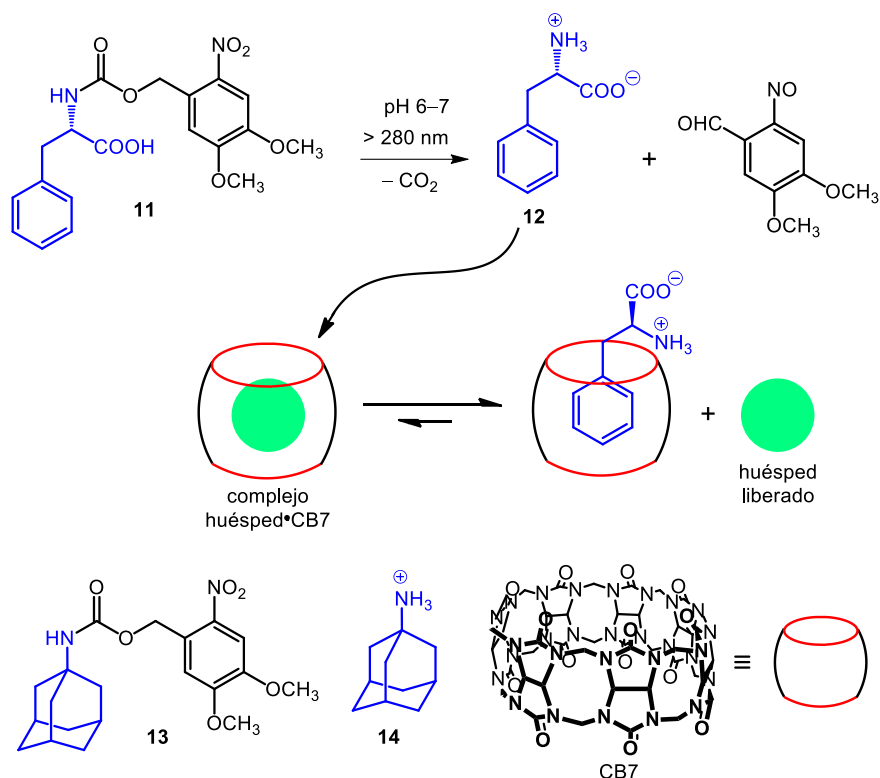
Como muestra la Figura 2.21, el terpeno **1** en este caso está totalmente alojado dentro del CB8. Lo mismo ocurre con **3** y **4**.

## **2.3. LIBERACIÓN FOTOACTIVADA DE HUÉSPEDES TERPENOS DE SUS COMPLEJOS CON CB7**

Ahora, se muestra el diseño de compuestos fotoprotegidos y su potencial uso como competidores de huéspedes de  $\text{CBn}$ . Por último, se lleva a cabo el desplazamiento de los terpenos fuera del CB7 por parte del competidor fotogenerado.

### **2.3.1. Diseño y caracterización del sistema para la liberación activada con luz de terpenos de CB7**

El sistema que ideamos para llevar a cabo la liberación supramolecular de los productos naturales terpénicos de sus complejos con cucurbiturilos (en este caso CB7) requiere de un planteamiento previo que compagina: un competidor protegido convenientemente con un grupo fotolábil que se active mediante su irradiación con luz, y el desplazamiento competitivo por parte de éste de un huésped complejoado previamente por un macrociclo (Esquema 2.11).



**Esquema 2.11.** Sistema de liberación fotoinducida, empleando el compuesto protegido **11** (mostrado en su forma de carga neutra). Al irradiar el competidor **12** se forma, que a diferencia de **11** es capaz de desplazar un huésped de CB7. Además, se muestran las estructuras del compuesto protegido alternativo **13**, del competidor **14** y del CB7.

Pues bien, decidimos usar el compuesto protegido **11** fenilalanina-NVOC (NVOC: 6-nitroveratriloxycarbonil). Éste no debe unirse al CB7 ya que la carga negativa del grupo carboxilato da lugar a repulsiones electrostáticas con los carbonilos del CB7<sup>56,57</sup> y el grupo amino está desactivado al estar enlazado al grupo NVOC.<sup>58</sup> Para confirmar esto, se realizaron algunos experimentos de control. Primero a nivel micromolar, añadiendo **11** al complejo del colorante **7** con CB7 ( $K_{CB7}$

=  $2.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ )<sup>41</sup> y siguiendo por espectroscopia de absorción UV/vis.

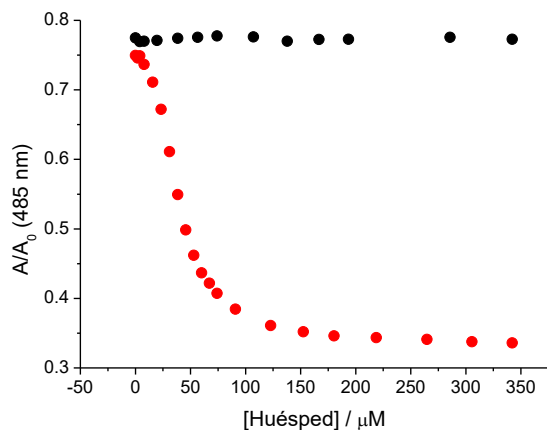


**Figura 2.22.** Valoración de desplazamiento competitivo del colorante **7** ( $18 \mu\text{M}$ ) con **11** (puntos negros) o **12** (puntos rojos) en agua a pH 9.

La figura 2.22 muestra claramente como el compuesto **11** no desplaza el colorante (cuya absorbancia se monitoriza) y por tanto no se une al CB7.

A concentraciones milimolares (siguiendo por  $^1\text{H}$ -RMN) tampoco se observa interacción entre **11** y el anfitrión, como se muestra en la siguiente Figura 2.23:

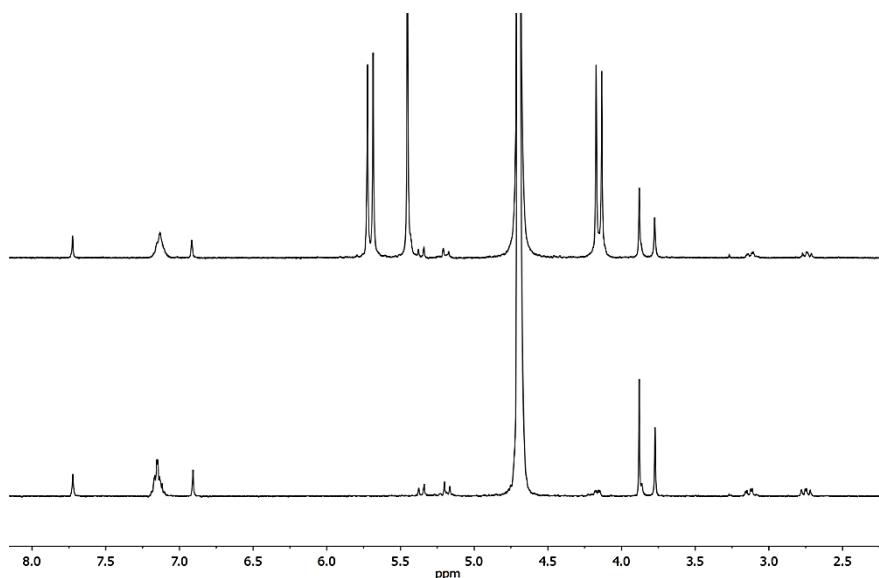


**Figura 2.23.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de **11** (0.5 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en ausencia (abajo) y presencia de CB7 0.5 mM (arriba).

Una vez visto que la afinidad de fenilalanina-NVOC **11** por el CB7 es insignificante, se procede a irradiarlo para liberar fenilalanina **12** y caracterizar su afinidad por el CB7. Esto se consigue irradiando a  $>280$  nm (aunque la fotorreacción se da también a 365 nm, necesita más tiempo de irradiación) (ver Figura 2.24).

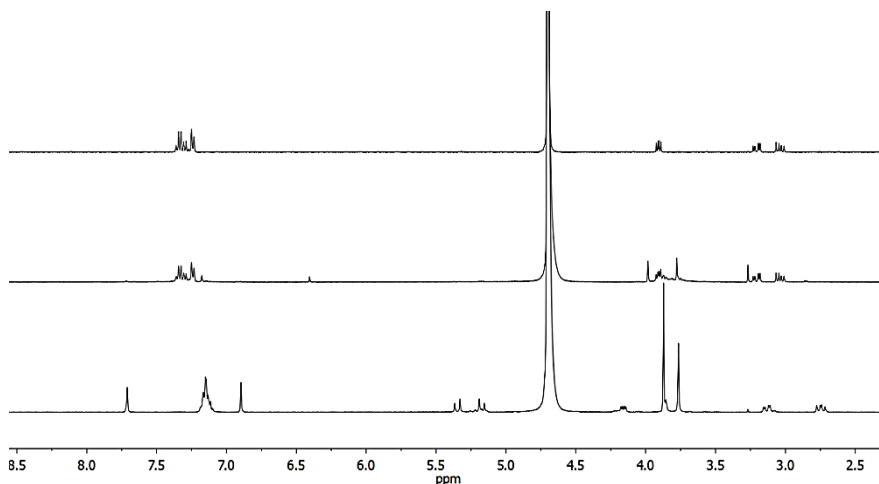


**Figura 2.24.** Abajo: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de fenilalanina-NVOC (**11**, 1 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ , pD 6.5). Centro: la misma disolución después de irradiarla ( $>280$  nm) durante 120 minutos. Arriba: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de fenilalanina (**12**, 1 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ).

La especie **12** formada tiene ahora un grupo amino protonable que interacciona con los portales del CB7 tipo ion-dipolo y compensa el efecto del carboxilato, lo cual proporciona una interacción supramolecular con CB7 mucho más fuerte ( $K_{\text{CB7}} = 1.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ )<sup>49</sup> y es capaz de desplazar al colorante **7** (ver figura 2.25).

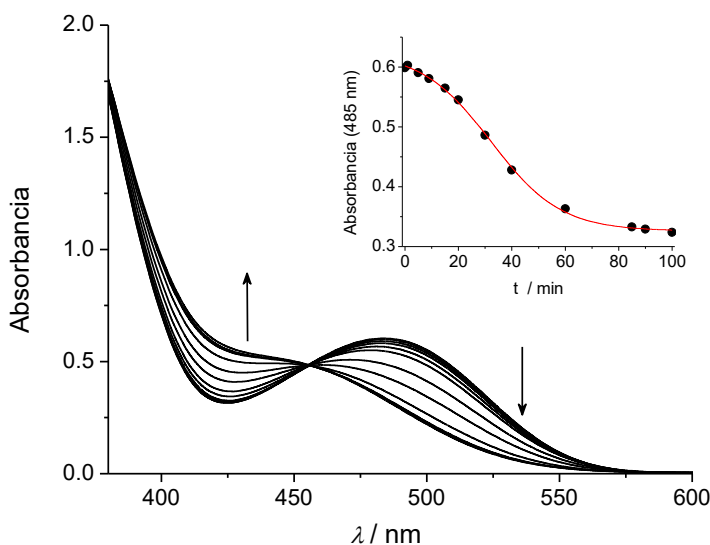


**Figura 2.25.** Cambios espectrales en absorción UV/vis al irradiar ( $>280$  nm) una mezcla del compuesto protegido **11** ( $500 \mu\text{M}$ ), el colorante **7** ( $20 \mu\text{M}$ ), y CB7 ( $50 \mu\text{M}$ ) a pH 7. Figura insertada: evolución de la fotorreacción/desplazamiento con el tiempo. No se observan cambios espectrales para la irradiación de un blanco donde no está presente el compuesto **11**.

También se confirmó esta afinidad de **12** por el cucurbiturilo con la valoración de desplazamiento competitivo correspondiente (ver figura 2.22) y por espectroscopia de RMN (Figura 2.26).

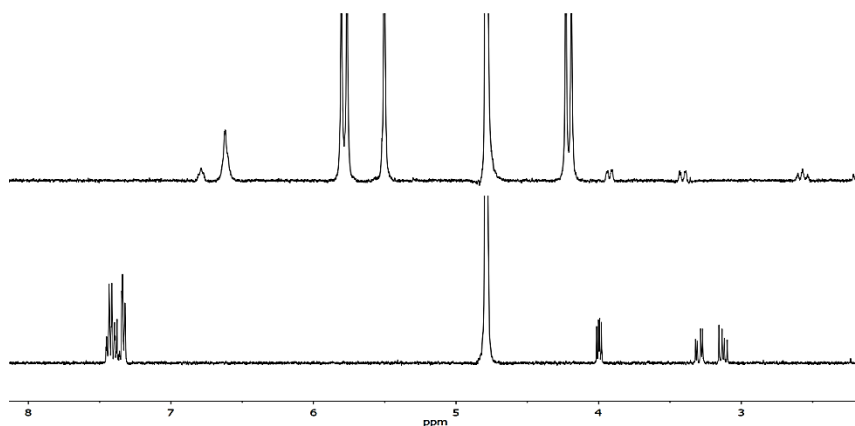


**Figura 2.26.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de fenilalanina (**12**, 1 mM en  $\text{D}_2\text{O}$ ) en ausencia (abajo) y presencia de CB7 1 mM (arriba).

Por tanto, por un lado la no interacción de **11** y por otro lado su conversión en el huésped **12** con gran afinidad por CB7 después de reaccionar con la luz nos proporcionan una herramienta adecuada para llevar a cabo la liberación de los huéspedes terpénicos.

Para ampliar aún más las posibilidades de desplazamiento de huéspedes activando mediante irradiación, decidimos sintetizar otro competidor protegido con el grupo NVOC, el 1-aminoadamantano-NVOC (**13**, estructura en Esquema 2.11), que al ser desprotegido produce el competidor extremadamente fuerte 1-aminoadamantano (**14**,  $K_{\text{CB7}} = 1.7 \cdot 10^{14} \text{ M}^{-1}$ ).<sup>59</sup> Además, la constante de asociación de **13** medida por desplazamiento de dihidrocloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol **8** ( $K_{\text{CB7}} = 1.1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ , estructura en Esquema 2.9)<sup>42</sup> y seguido por fluorescencia es  $K_{\text{CB7}} = 1.4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ . Por tanto, al activar con luz el compuesto **13** podemos liberar huéspedes con afinidades de orden de  $10^9$ - $10^{13} \text{ M}^{-1}$ .

### 2.3.2. Liberación fotoactivada de terpenos de CB7

Finalmente, una vez desarrollado el mecanismo para generar fotoquímicamente el competidor, se procede a inducir la liberación de los terpenos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** y **6** de sus complejos (previamente formados) con CB7.

En la sección 2.2.1 calculamos las constantes de asociación que abarcan cuatro órdenes de magnitud ( $10^4$ - $10^8$  M<sup>-1</sup>) para estos productos naturales terpénicos con CB7. Esta diferenciación en términos de afinidad por el macrociclo, se prevé de gran interés a la hora de desplazar los terpenos selectivamente fuera de la cavidad por acción del competidor.

Para ello, los complejos terpeno-CB7 (a concentración de entre 100 y 400 μM) se colocan en presencia de fenilalanina-NVOC (**11**) y se irradia la disolución, monitorizando todo el proceso por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN.

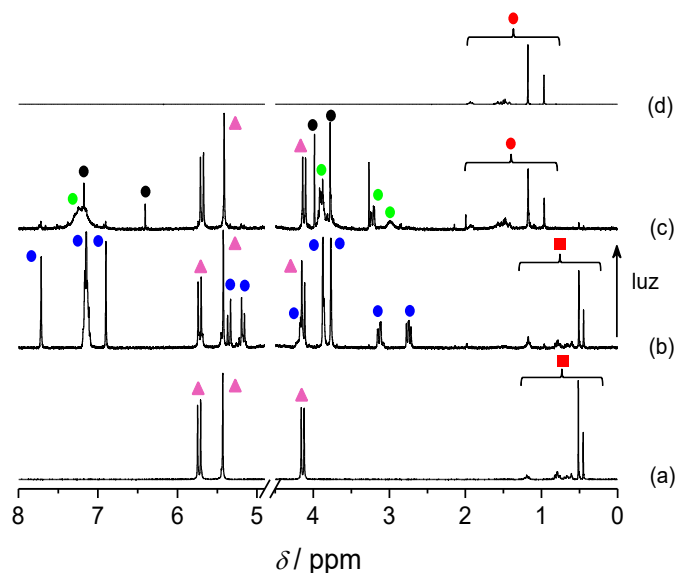


**Figura 2.27.** Espectros de <sup>1</sup>H-RMN de a) complejo **1**-CB7 (cada componente a 1 mM); b) una mezcla de **11** (1 mM), CB7 (125 μM), y **1** (100 μM) antes de irradiar; c) misma mezcla que (b) después de 120 minutos de irradiación (>280 nm); y d) sólo **1**; pD 6.5. Las señales están asignadas con códigos de colores: **1** rojo (complejado: ■, libre: ●); **11** azul ●; exceso **12** libre verde ●; fotoproducto derivado de NVOC negro ●; CB7 magenta ▲. Resaltar que **11** fue usado en gran exceso y que se asume que la velocidad de intercambio de **12** entre libre y complejo es intermedia. Las señales de <sup>1</sup>H-RMN de exceso de **12** libre aparecen anchadas, mientras que las señales de **12** complejo no se observan. La señal de HOD no se muestra para mejorar la claridad (ruptura del eje).

En estas condiciones optimizadas (ver leyenda de la Figura 2.27) el 87% de **1** está unido al CB7 antes de la irradiación, mientras que tras irradiar la muestra dos horas (filtro *cut-off* de 280 nm) el 93% de todo el eucaliptol (**1**) está fuera del macrociclo ( $K_{CB7}(\mathbf{1}) = 8.5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$

<sup>1</sup>), lo que se traduce en un 92% de liberación del eucaliptol unido al principio.

Se repite el experimento en condiciones similares para los demás terpenos, con concentraciones optimizadas de CB7, terpeno y competidor protegido.

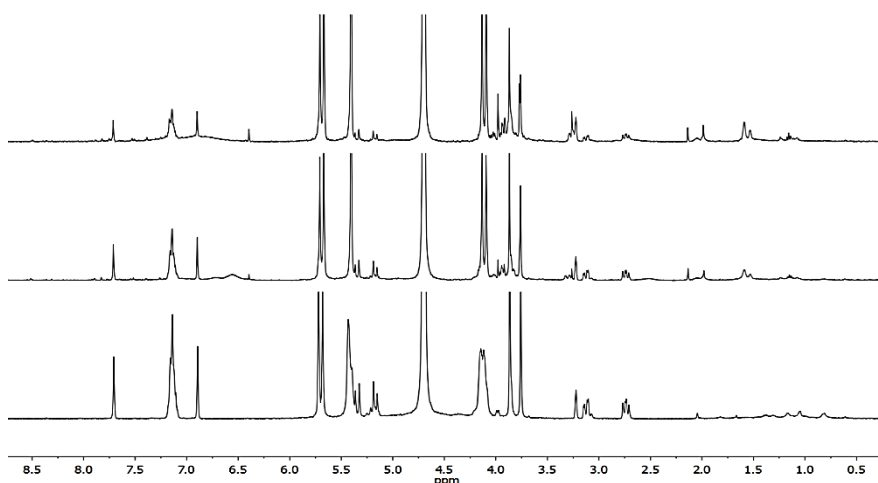


**Figura 2.28.** Fotoliberación de geraniol (**2**) de CB7 por irradiación con luz (>280 nm) monitorizada por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN. Condiciones: **11** (1 mM), CB7 (0.5 mM), y **2** (0.3 mM) en D<sub>2</sub>O:CD<sub>3</sub>OD 60:1, pD 6.5. Los espectros fueron adquiridos después de diferentes tiempos de irradiación; de abajo a arriba: 0 min, 45 min, 90 min.

Para el geraniol (**2**) se consiguió un 100% de liberación fotoinducida (Figura 2.28), de acuerdo con que es el huésped que tiene menor *K* con CB7 ( $K_{\text{CB7}}(\mathbf{2}) = 4.6 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$ ).

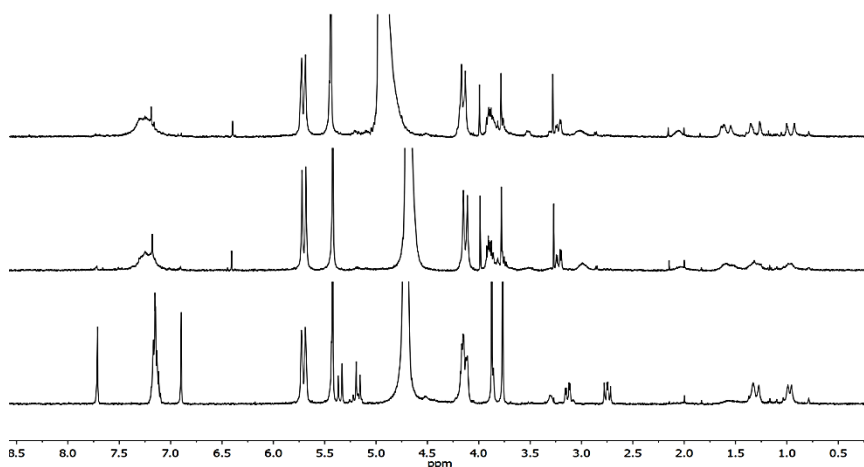


**Figura 2.29.** Fotoliberación de geranilamina (**3**) de CB7 por irradiación con luz (>280 nm) monitorizada por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Condiciones: **11** (1 mM), CB7 (0.4 mM), y **3** (0.4 mM) en  $\text{D}_2\text{O}$ , pD 5.5. Los espectros fueron medidos antes (0 min, abajo) y después de la irradiación (90 min, centro). El espectro de arriba corresponde a 90 min de irradiación, pero fue adquirido a 5 °C para disminuir la constante de la velocidad de intercambio.

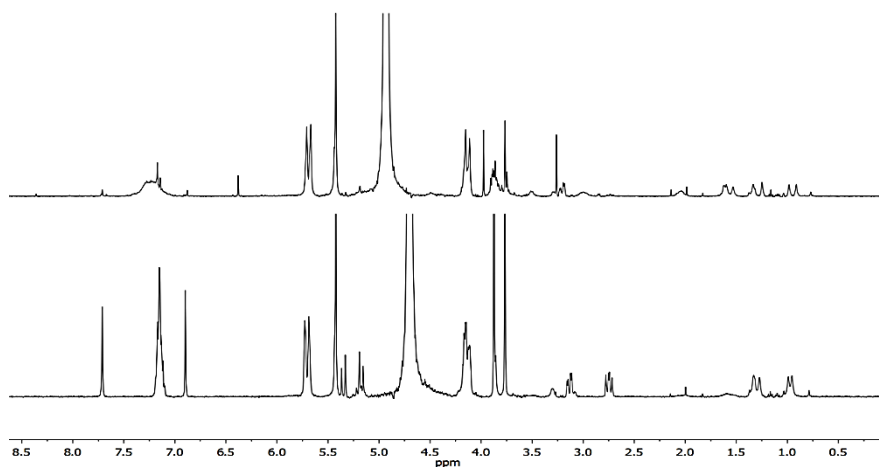


**Figura 2.30.** Fotoliberación de geranilamina (**3**) de CB7 en las mismas condiciones que en la Figura 2.29, excepto el pD que fue 8.0. Los espectros fueron medidos antes (0 min, abajo) y después de la irradiación (90 min, arriba). El espectro de

arriba fue adquirido a 5 °C para disminuir la constante de la velocidad de intercambio.

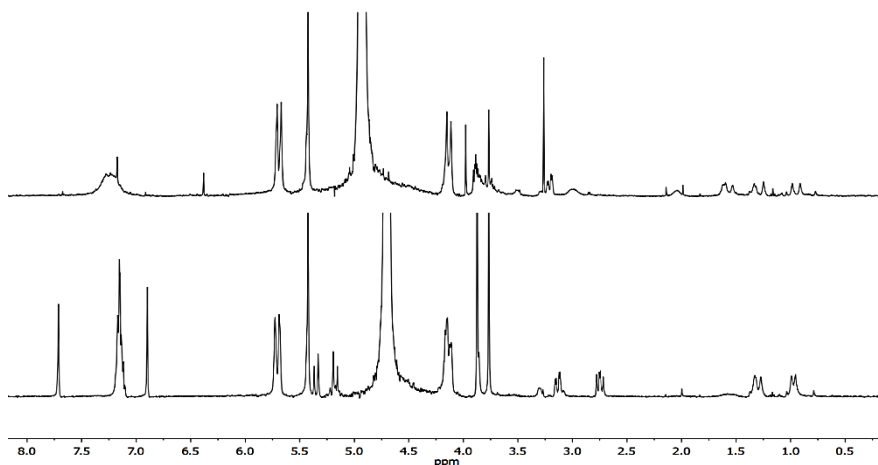


**Figura 2.31.** Fotoliberación de geranilamina (**3**) de CB7 en las mismas condiciones que en la Figura 2.29, excepto el pD que fue 6.5. Los espectros fueron medidos antes (0 min, abajo) y después de la irradiación (90 min, arriba). El espectro de arriba fue adquirido a 5 °C para disminuir la constante de la velocidad de intercambio.

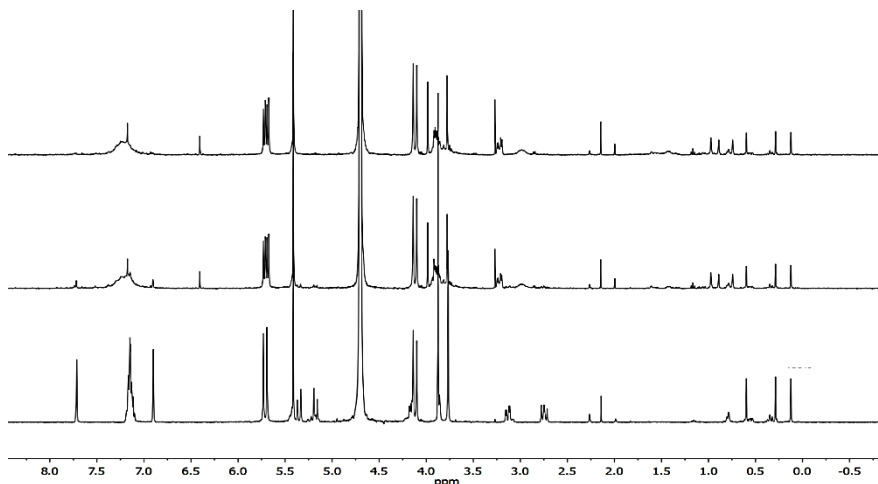


**Figura 2.32.** Fotoliberación de fenchil alcohol (**4**) de CB7 por irradiación con luz (>280 nm) monitorizada por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Condiciones: **11** (1 mM), CB7 (0.17 mM), y **4** (0.17 mM) en  $\text{D}_2\text{O}$ , pD 6.5. Los espectros fueron adquiridos

después de diferentes tiempos de irradiación: 0 min (abajo), 60 min (centro), y 120 min (arriba).

Geranilamina (**3**) y fenchil alcohol (**4**) que se unen un poco más fuerte al macrociclo, fueron menos desplazados por el competidor fenilalanina (**12**) (45% y 54% respectivamente) ( $K_{CB7}(\mathbf{3}) = 3.2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{CB7}(\mathbf{4}) = 4.8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ) (Figuras 2.29, 2.30, 2.31 y 2.32).

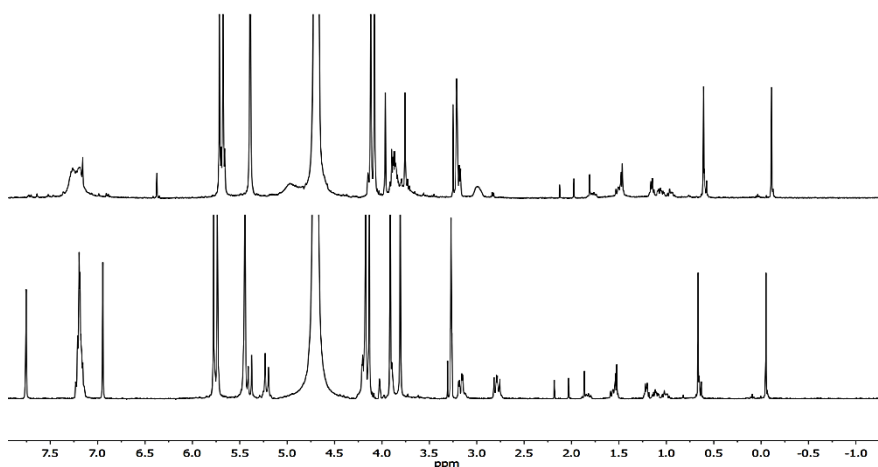


**Figura 2.33.** Fotoliberación de  $\beta$ -pineno (**5**) de CB7 por irradiación con luz ( $>280 \text{ nm}$ ) monitorizada por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Condiciones: **11** (1 mM), CB7 (0.5 mM), y **5** (0.5 mM) en  $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$  52:3, pD 6.5. Los espectros fueron medidos antes (0 min, abajo) y después de la irradiación (90 min, arriba).

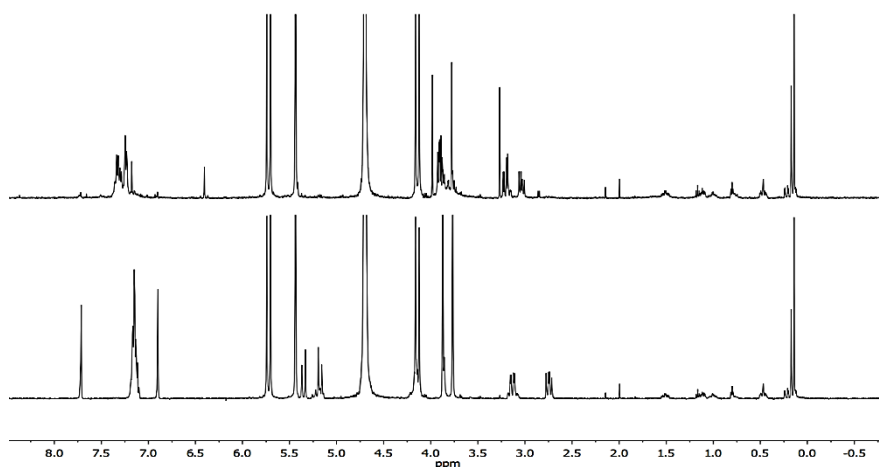


**Figura 2.34.** Fotoliberación de borneol (**6**) de CB7 por irradiación con luz (>280 nm) monitorizada por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Condiciones: **11** (1 mM), CB7 (0.23 mM), y **6** (0.23 mM) en  $\text{D}_2\text{O}$ , pD 6.5. Los espectros fueron medidos antes (0 min, abajo) y después de la irradiación (120 min, arriba).

Los huéspedes con la afinidad más alta,  $\beta$ -pineno (**5**) y borneol (**6**) no son desplazados ( $K_{\text{CB7}}(\mathbf{5}) \geq 1 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ ,  $K_{\text{CB7}}(\mathbf{6}) = 2.6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ) (Figuras 2.33 y 2.34).

Por lo tanto, como se preveía antes de realizar el experimento de desplazamiento fotoinducido, las diferencias en afinidad de los diferentes terpenos marcan claramente la eficacia de la liberación.

Para confirmar por un método alternativo, se usó SPME-GC-MS (como en la sección 2.2.1) con el objetivo de cuantificar en la liberación de eucaliptol (**1**), la concentración relativa de éste en el espacio de cabeza antes y después de la irradiación (6 horas con lámpara de TLC a 365 nm) de una disolución de 50  $\mu\text{M}$  de **1**, 120  $\mu\text{M}$  de CB7 y 240  $\mu\text{M}$  de **11**. Pues bien, estos experimentos determinaron que se produce un aumento de 2.5 veces de la

concentración de **1** en el espacio de cabeza como resultado de la fotoliberación.

Pero falta por demostrar que el sistema funciona también con los huéspedes más fuertemente unidos **5** y **6**, que no fueron desplazados en los experimentos anteriores con el competidor fenilalanina-NVOC (**12**). Para ello se probó a desplazar **6** con el precursor protegido 1-aminoadamantano-NVOC (**13**) que genera el competidor 1-aminoadamanto (**14**).

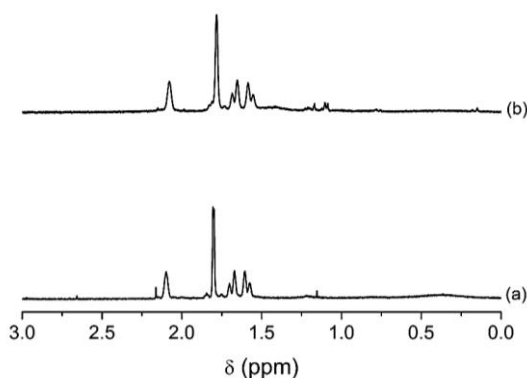


**Figura 2.35.** a) Espectro de <sup>1</sup>H-RMN parcial de una suspensión irradiada de **13** (1 mM) en D<sub>2</sub>O:CD<sub>3</sub>OD 50:5 (pD 6.8); >300 nm durante 120 min. b) Espectro de <sup>1</sup>H-RMN parcial de 1-aminoadamanto (1 mM) en D<sub>2</sub>O:CD<sub>3</sub>OD 50:5 (pD 6.8). Nota: **13** no es soluble en D<sub>2</sub>O o D<sub>2</sub>O:CD<sub>3</sub>OD 50:5. Sin embargo, al irradiar (>300 nm) se forman productos solubles en agua y la suspensión se vuelve transparente.

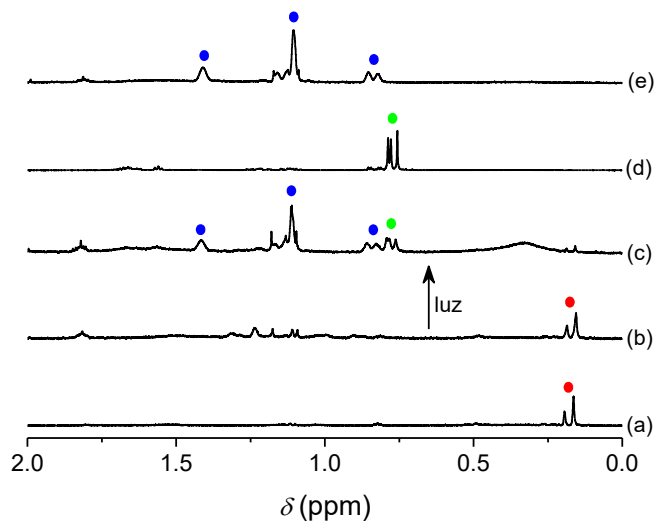


**Figura 2.36.** Fotoliberación de **6** de CB7 por irradiación con luz (>300 nm), monitorizada por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Condiciones: 1-aminoadamantano-NVOC (**13**, 2 mM), CB7 (500  $\mu\text{M}$ ), y **6** (250  $\mu\text{M}$ ) en  $\text{D}_2\text{O}:\text{CD}_3\text{OD}$  50:5; pD 6.8. Los espectros fueron adquiridos después de diferentes tiempos de irradiación: 0 min (b) y 240 min (c). Además se muestran los espectros de (a) **6** (250  $\mu\text{M}$ ) en presencia de CB7 (500  $\mu\text{M}$ ), (d) sólo **6** (1 mM), y (e) **14** (1 mM) en presencia de CB7 (1 mM). Las señales correspondientes están codificadas por colores: señales de los metilos del borneol complejoado ●, señales de los metilos de borneol (**6**) libre ●, señales del 1-aminoadamantano (**14**) complejoado ●.

Como se observa en la Figura 2.36, el competidor **14** generado al irradiar la muestra desplaza al borneol (**6**) cuantitativamente. Hay que resaltar que la insolubilidad de **13** en el rango de concentración milimolar resulta ser una ventaja ya que se evita que se produzca algo de desplazamiento antes de activar con luz, una vez que  $K_{\text{CB7}}(\textbf{13})$  es relativamente alta ( $1.4 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$ ), y sólo se forma el competidor **14** soluble en agua al irradiar.

Para terminar, se realiza un experimento para demostrar la versatilidad del sistema. Consiste en llevar a cabo el desplazamiento selectivo y secuencial de una mezcla de complejos de CB7 de cuatro terpenos (**1**, **2**, **4** y **6**) al generar irradiando el competidor fenilalanina (**12**).

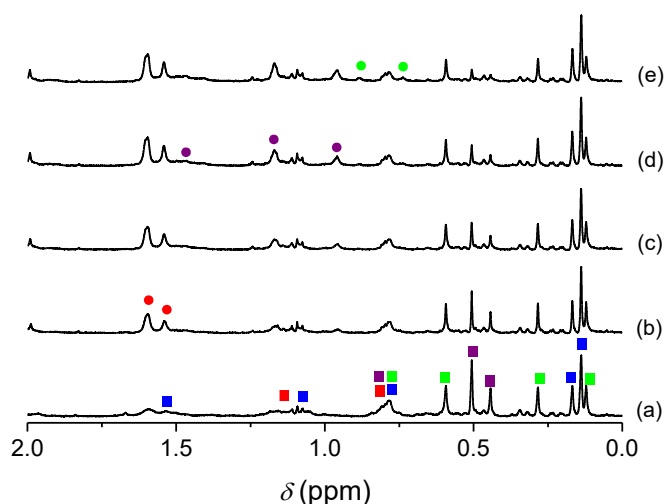


**Figura 2.37.** a) Mezcla de **1**, **2**, **4** y **6** (cada terpeno 150  $\mu$ M) con CB7 (600  $\mu$ M) y **11** (1 mM) en  $D_2O:CD_3OD$  60:1; pD 6.5. Del b) al e) la misma mezcla que en a) después de 10 min, 20 min, 40 min y 120 min de tiempo de irradiación, respectivamente. Las señales características de los terpenos complejados (■) y liberados (●) están codificadas por colores: **1** violeta, **2** rojo, **4** verde y **6** azul. En el espectro inicial (a) los cuadrados de colores corresponden los complejos terpenos-CB7. Los puntos de colores en los espectros (b), (d) y (e) indican la aparición de terpenos liberados. Para más claridad se han marcado únicamente en el espectro correspondiente donde su liberación llegó al nivel máximo en las condiciones de trabajo. El borneol complejoado (**6**, cuadrados azules en el espectro (a)) no es desplazado en absoluto.

En las condiciones experimentales elegidas (Figura 2.37) y de acuerdo con las diferentes afinidades de los terpenos por el anfitrión CB7 (Tabla 2.1), a los 10 minutos de irradiación el geraniol (**2**) se libera totalmente. Cuando se alcanzan los 40 minutos el eucaliptol (**1**) también es liberado en un 75%. El fenchil alcohol (**4**) que es más fuerte como huésped es desplazado fuera en un 25% a los 120 minutos. El borneol (**6**) resiste y no es desplazado por el competidor fenilalanina (**12**) como en el experimento individual anterior (ver Figura 2.34). Este orden de liberación corresponde a las fuerzas de los complejos.

Cabe destacar que esta secuencia de liberación, que es posible gracias a la alta selectividad de unión mostrada por el CB7, es algo que no sería posible con otros anfitriones que carecen de ella.<sup>10,55</sup>

## **2.4. CONCLUSIONES**

Se ha cuantificado con éxito las interacciones supramoleculares de varios productos naturales que son componentes principales de aceites esenciales, diferenciados estructuralmente, en sus grupos funcionales y en su carga, de la familia de los terpenos con los dos anfitriones artificiales homólogos CB7 y CB8.

La complejación con CB8 es mucho más fuerte y selectiva que con CB7, de acuerdo con un mejor ajuste del terpeno en la cavidad más grande, encontrándose afinidades del orden de nanomolar. Esta alta selectividad puede ser de utilidad en cromatografía de afinidad y para el diseño de sensores de desplazamiento. El proceso de

formación de complejos está favorecido por entalpía con ambos anfitriones.

Con el macrociclo de menor tamaño se ha encontrado un rango de afinidad por parte de los huéspedes bastante amplio, de cuatro órdenes de magnitud, lo que permitió diseñar y llevar a cabo la liberación inducida con luz de éstos de sus complejos con CB7 mediante la generación de un competidor previamente protegido con el grupo *o*-nitrobencilo.

Este sistema de desplazamiento fotoactivado es muy selectivo y permite la liberación secuencial de estos compuestos no cromofóricos, además puede ser usado con una amplia gama de huéspedes y competidores.

## 2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Materiales.

El cucurbit[7]urilo se preparó siguiendo un procedimiento bibliográfico conocido.<sup>60</sup> El cucurbit[8]urilo, los terpenos **1-6** y el colorante dihidrocloruro de 4',6-diamino-2-fenilindol (**8**) fueron adquiridos en Aldrich con la pureza más alta y se usaron tal como se recibieron. El colorante *trans*-chalcona **7** y el perclorato de *p*-*N,N*-dimetilaminofeniltropilio (**9**) estaban disponibles de estudios previos.<sup>41,10</sup> **9** fue una donación del Prof. Dr. em. W. Abraham (Universidad Humboldt de Berlín). El colorante **10** se sintetizó siguiendo el procedimiento de Scherman.<sup>45</sup> Fenilalanina-NVOC (**11**) fue sintetizado al igual que lo hizo Schultz.<sup>61</sup> 1-aminoadamantano-

NVOC (**13**) se preparó como se describe más abajo. Fenilalanina (**12**), 1-aminoadamantano (**14**) y el cloruro 6-nitroveratriloxicarbonilo también están disponibles comercialmente en Aldrich.

Síntesis de 1-aminoadamantano-NVOC (**13**): 1-aminoadamantano (100 mg, 0.66 mmol) y carbonato sódico (69.96 mg, 0.66 mmol) se disolvieron en 2.2 ml de agua milli-Q. El cloruro de 6-nitroveratriloxicarbonilo (NVOC-Cl, 182 mg, 0.66 mmol), disuelto en 1,4-dioxano (2.2 ml), se añadió lentamente bajo agitación a la disolución acuosa. Después de agitar durante 2 horas a temperatura ambiente, la reacción se diluyó con diclorometano (20 ml), seguidamente se adicionó una disolución acuosa de bisulfato de sodio (20 ml, 1 M). La fase orgánica se separó y la fase acuosa se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas combinadas se secaron con sulfato de sodio anhidro y luego se concentró a vacío para dar un sólido amarillo como producto crudo. La purificación por cromatografía con gel de sílice con eluyente *n*-hexano/*tert*-butilmetiléter (2:1) permitió obtener el producto **13** en forma de sólido ligeramente amarillo (122 mg, 47% de rendimiento).  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 7.71 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.44 (s, 2H), 4.74 (s, 1H), 3.98 (s, 3H), 3.95 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.95 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 6H), 1.67 ppm (s, 6H).  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 153.61, 148.08, 139.86, 128.88, 110.09, 108.26, 62.95, 56.55, 51.14, 41.94, 36.36, 29.54 ppm. Nota: no se observó el carbono del carbonilo (NH)(O)C=O. HRMS (ESI) calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  391.1869; encontrada 391.1866.

### **Desplazamiento competitivo.**

Las valoraciones de desplazamiento de un colorante indicador se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 cm, con concentraciones constantes de colorante y CB7, compensando en la disolución madre de terpeno para evitar efectos de dilución. Después de cada adición de terpeno, las disoluciones se dejan equilibrar el tiempo necesario hasta que no haya cambios en absorción o emisión. Para los terpenos menos solubles se usó hasta un 0.4% en volumen de etanol como co-disolvente. Los experimentos de unión diferencial se desarrollaron mediante la adición de terpenos (hasta una concentración final igual a la de macrociclos y colorante) a una mezcla equimolar de **9**, CB7 y CB8 a pH 4. A pH mayor el catión **9** se vuelve inestable. El pH de las disoluciones se ajustó mediante la adición de HCl o NaOH y midiendo con un pH-metro (Hanna HI221 o Crison basic 20+). Para las medidas de absorción UV/vis se utilizó un espectrofotómetro Varian Cary 50, Varian Cary 100 Bio o Shimadzu UV-1603. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron en un fluorímetro Varian Eclipse.

### **Colorimetría isoterma de titulación.**

Los experimentos de ITC se realizaron con un Nano ITC (TA Instruments). Las disoluciones se desgasificaron por completo antes de usarlas, agitando a vacío. En la celda de la muestra se coloca la disolución del terpeno y la autopipeta de 250 µl se llena con la disolución de CB7 (para las valoraciones con CB8 se rellenaron al contrario, la autopipeta con el terpeno y la celda con el CB8). Es

importante colocar la especie (anfitrión o huésped) que esté en mayor concentración en la autopipeta. Después de la estabilización de la línea base, los huéspedes terpenos se valoraron en una secuencia de 50 inyecciones de 5  $\mu$ l.

### **Espectroscopia de RMN.**

Para adquirir los espectros de RMN se usó un espectrómetro de 400 MHz (Agilent 400-MR o Bruker AMX-400). Como disolvente se utilizó D<sub>2</sub>O (en algunos casos con CD<sub>3</sub>OD como co-disolvente). El pD se ajustó con DCl o NaOD haciendo las correcciones por los efectos isotópicos con la ecuación  $pD = pH^* + 0.4$ , donde pH\* es la medida tomada del pH-metro.<sup>62</sup> Los espectros están referenciados en el pico residual del disolvente (4.79 ppm).

### **Cálculos DFT.**

Para realizar todos los cálculos se utilizó el programa Gaussian 09.<sup>63</sup> En primer lugar, se realizó un proceso de escaneado de la Superficie de Energía Potencial (PES), usando el Campo de Fuerza de Mecánica Molecular de Merck (MMFF).<sup>64-68</sup> El proceso de escaneado MMFF dio lugar a diferentes estructuras de mínimos de energía locales, de las cuales las más estables se seleccionaron para un proceso de optimización de geometría Hartree-Fock. Después, fueron optimizadas con un funcional DFT híbrido meta-GGA, wB97XD,<sup>69,70</sup> que contiene términos de dispersión empírica y correcciones de largo alcance. Se utilizó la base de Pople de doble zeta de valencia dividida con funciones de polariación d (6-31Gd) para las optimizaciones.<sup>71</sup> Se adoptaron los valores por defecto de Gaussian

09 para criterios de integraciones de cuadrícula numéricas, de campo auto-consistente (SCF) y de convergencia geométrica.

### **Fotoquímica.**

Los experimentos de irradiación se llevaron a cabo con una lámpara de Hg-Xe de 200 W con un filtro *cut-off* de 280 nm o con una lámpara de Xe de 150 W. Los experimentos con el compuesto protegido **13** se hicieron en una suspensión debido a que no es soluble en agua. El compuesto **13** se disolvió primero en CD<sub>3</sub>OD y luego se diluyó hasta la concentración final. Esta re-precipitación garantizó que las condiciones sean reproducibles y además el tiempo de irradiación hasta que se forman todos los productos de la fotoreacción, marcado por la solubilización total de la muestra, fue constante entre los diferentes experimentos. La solubilidad máxima de **13** en agua/metanol (95:5) es 200 µM. Se supone que la fotorreacción tiene lugar en disolución, con un re-equilibrio progresivo entre **13** sólido y **13** disuelto hasta que la fotorreacción se completa.

Para obtener el mejor rendimiento en las liberaciones, se optimizaron las concentraciones relativas de complejo terpeno-CB7 y de competidor protegido. También se hizo lo mismo con el pD. Para la mayoría de los terpenos el desplazamiento fotoinducido se hizo a pD cercano a 6.5, mientras que para geranilamina (**3**) se usó pD 5.5 un poco más ácido, ya que es el único huésped con un grupo amino protonable. No obstante este mismo experimento de liberación a pD mayores (6.5 y 8) dio rendimientos similares que en

disolución ácida (ver Figuras 2.29, 2.30, 2.31), lo que demuestra la robustez del sistema.

### **Microextracción en fase sólida.**

Los análisis mediante SPME, se realizaron con una fibra de sílice fundida recubierta de poliacrilato (85  $\mu\text{m}$  de revestimiento), extrayendo el analito (huésped) en fase gas del espacio de cabeza de un vial que contiene una disolución acuosa de 50  $\mu\text{M}$  de eucaliptol (**1**) que está en ausencia o en presencia de CB7 (120  $\mu\text{M}$ ) a temperatura constante (24 °C). Se optimizaron los tiempos de adsorción y desorción, 10 minutos y 5 minutos respectivamente. Para la determinación de la concentración relativa de **1** en fase gaseosa se inyectó la fibra en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones (Varian 3800 con un detector de masas Saturn 2200 y una columna HP-5MS de Agilent Technologies). La temperatura del inyector fue de 250 °C. El programa de temperatura empezó a 60 °C y con una velocidad de aumento de 10 °C / min, alcanzó los 250 °C donde se mantuvo durante los 5 minutos finales. Como gas portador se usó helio, con un flujo de 1 ml / min.

## **2.6. REFERENCIAS**

- [1] A. I. Lazar, F. Biedermann, K. R. Mustafina, K. I. Assaf, A. Hennig, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 13022.
- [2] A. Lesnau, J. Hils, G. Pohl, G. Beyer, M. Janka, L. T. T. Hoa, *Pharmazie* **1990**, *45*, 638.

- [3] K. Iwasa, M. Kamigauchi, M. Ueki, M. Taniguchi, *Eur. J. Med. Chem.* **1996**, *31*, 469.
- [4] M. Megyesi, L. Biczók, I. Jablonkai, *J. Phys. Chem. C* **2008**, *112*, 3410.
- [5] Z. Miskolczy, M. Megyesi, G. Tárkányi, R. Mizsei, L. Biczók, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1061.
- [6] S. Li, X. Yang, Y. Niu, G. L. Andrew, D. Bardelang, X. Chen, R. Wang, *ChemistrySelect* **2017**, *2*, 2219.
- [7] M. M. Adams, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17068.
- [8] J. Bügler, J. F. J. Engbersen, D. N. Reinhoudt, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5339.
- [9] R. B. Prince, S. A. Barnes, J. S. Moore, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2758.
- [10] J. Vázquez, P. Remón, R. N. Dsouza, A. I. Lazar, J. F. Arteaga, W. M. Nau, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 9897.
- [11] F. Biedermann, V. D. Uzunova, O. A. Scherman, W. M. Nau, A. De Simone, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 15318.
- [12] P. Klán, T. Solomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- [13] M. J. Hansen, W. A. Velema, M. M. Lerch, W. Szymanski, B. L. Feringa, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 3358.

- [14] W. A. Velema, J. P. van der Berg, W. Szymanski, A. J. M. Driessen, B. L. Feringa, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1969.
- [15] M. Muller, P. W. Dierkes, W.-R. Schlue, *Brain Res.* **1999**, *826*, 63.
- [16] L. Zayat, C. Calero, P. Alborés, L. Baraldo, R. Etchenique, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 882.
- [17] C. Brieke, F. Rohrbach, A. Gottschalk, G. Mayer, A. Heckel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8446; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 8572.
- [18] V. N. Belov, C. A. Wurm, V. P. Boyarskiy, S. Jakobs, S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3520; *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3598.
- [19] M. I. Sánchez, O. Vázquez, M. E. Vázquez, J. L. Mascareñas, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11107.
- [20] A. Herrmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 5836; *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5938.
- [21] A. G. Griesbeck, O. Hinze, H. Görner, U. Huchel, C. Kropf, U. Sundermeier, T. Gerke, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 587.
- [22] C. P. Carvalho, V. D. Uzunova, J. P. Da Silva, W. M. Nau, U. Pischel, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 8793.
- [23] N. Barooah, J. Mohanty, H. Pal, A. C. Bhasikuttan, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2011**, *13*, 13117.
- [24] K. Igarashi, K. Kashiwagi, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2010**, *42*, 39.

- [25] J. Vázquez, M. A. Romero, R. N. Dsouza, U. Pischel, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 6245.
- [26] N. Basílio, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 15208.
- [27] M. C. Pirrung, *Chem. Rev.* **1997**, 97, 473.
- [28] S. Rajendran, R. Raghunathan, I. Hevus, R. Krishnan, A. Ugrinov, M. P. Sibi, D. C. Webster, J. Sivaguru, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 1159; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 1175.
- [29] F. Tian, D. Jiao, F. Biedermann, O. A. Scherman, *Nat. Commun.* **2012**, 3, 1207.
- [30] J. del Barrio, S. T. J. Ryan, P. G. Jambrina, E. Rosta, O. A. Scherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 5745.
- [31] Y. Kim, Y. H. Ko, M. Jung, N. Selvapalam, K. Kim, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, 10, 1415.
- [32] G. Yu, C. Han, Z. Zhang, J. Chen, X. Yan, B. Zheng, S. Liu, F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 8711.
- [33] M. Han, R. Michel, B. He, Y.-S. Chen, D. Stalke, M. John, G. H. Clever, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 1319; *Angew. Chem.* **2013**, 125, 1358.
- [34] P. Ceroni, A. Credi, M. Venturi, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, 43, 4068.
- [35] M. Zhang, X. Yan, F. Huang, Z. Niu, H. W. Gibson, *Acc. Chem. Res.* **2014**, 47, 1995.

- [36] P. Jagadesan, J. P. Da Silva, R. S. Givens, V. Ramamurthy, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1276.
- [37] D.-H. Qu, Q.-C. Wang, Q.-W. Zhang, X. Ma, H. Tian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7543.
- [38] F. A. Arroyave, P. Ballester, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 10866.
- [39] G. Ragazzon, M. Baroncini, S. Silvi, M. Venturi, A. Credi, *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 70.
- [40] A. Díaz-Moscoso, F. A. Arroyave, P. Ballester, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 3046.
- [41] N. Basílio, S. Gago, A. J. Parola, F. Pina, *ACS Omega* **2017**, *2*, 70.
- [42] Z. Miskolczy, L. Biczjk, M. Megyesi, I. Jablonkai, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 1645.
- [43] C.-H. Xu, G.-S. Chen, Z.-H. Xiong, Y.-X. Fan, X.-C. Wang, Y. Liu, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 12.
- [44] R. N. Dsouza, U. Pischel, W. M. Nau, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 7941.
- [45] D. Jiao, F. Biedermann, O. A. Scherman, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 3044.
- [46] W. M. Nau, M. Florea, K. I. Assaf, *Isr. J. Chem.* **2011**, *51*, 559.
- [47] Y. H. Zhao, M. H. Abraham, A. M. Zissimos, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 7368.

- [48] S. Mecozzi, J. Rebek Jr., *Chem. Eur. J.* **1998**, *4*, 1016.
- [49] M. V. Rekharsky, T. Mori, C. Yang, Y. H. Ko, N. Selvapalam, H. Kim, D. Sobransingh, A. E. Kaifer, S. Liu, L. Isaacs, W. Chen, S. Moghaddam, M. K. Gilson, K. Kim, Y. Inoue, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, *104*, 20737.
- [50] F. Biedermann, H.-J. Schneider, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 5216.
- [51] S. Moghaddam, C. Yang, M. Rekharsky, Y. H. Ko, K. Kim, Y. Inoue, M. K. Gilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3570.
- [52] Y. H. Ko, H. Kim, Y. Kim, K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4106.
- [53] K. Baek, Y. Kim, H. Kim, M. Yoon, I. Hwang, Y. H. Ko, K. Kim, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 4091.
- [54] Q. Shi, D. Masseroni, J. Rebek Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10846.
- [55] S. Liu, C. Ruspic, P. Mukhopadhyay, S. Chakrabarti, P. Y. Zavalij, L. Isaacs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15959.
- [56] G. Ghale, V. Ramalingam, A. R. Urbach, W. M. Nau, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 7528.
- [57] M. V. Rekharsky, H. Yamamura, Y. H. Ko, N. Selvapalam, K. Kim, Y. Inoue, *Chem. Commun.* **2008**, 2236.
- [58] Esas observaciones concuerdan con la unión débil de CB7 a péptidos que contienen fenilalanina en el C-terminal, donde se

encuentra una situación electrónica similar. Cabe destacar que péptidos con fenilalanina en el N-terminal se unen incluso más fuerte que la fenilalanina por sí misma, porque el carboxilato se sustituye por una amida; ver por ejemplo referencias [54] y [55].

[59] S. Moghaddam, C. Yang, M. Rekharsky, Y. H. Ko, K. Kim, Y. Inoue, M. K. Gilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 3570.

[60] C. Márquez, F. Huang, W. M. Nau, *IEEE Trans. Nanobiosci.* **2004**, *3*, 39.

[61] S. A. Robertson, J. A. Ellman, P. G. Schultz, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 2722.

[62] P. K. Glasoe, F. A. Long, *J. Phys. Chem.* **1960**, *64*, 188.

[63] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A. Marenich, J. Bloino, B. G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H. P. Hratchian, J. V. Ortiz, A. F. Izmaylov, J. L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V. G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, J. M. Millam, M. Klene, C.

Adamo, R. Cammi, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J. B. Foresman, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.

[64] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 490.

[65] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 520.

[66] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 553.

[67] T. A. Halgren, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 616.

[68] T. A. Halgren, R. B. Nachbar, *J. Comput. Chem.* **1996**, *17*, 587.

[69] Q. Wu, W. Yang, *J. Chem. Phys.* **2002**, *116*, 515.

[70] S. Grimme, *J. Comput. Chem.* **2006**, *27*, 1787.

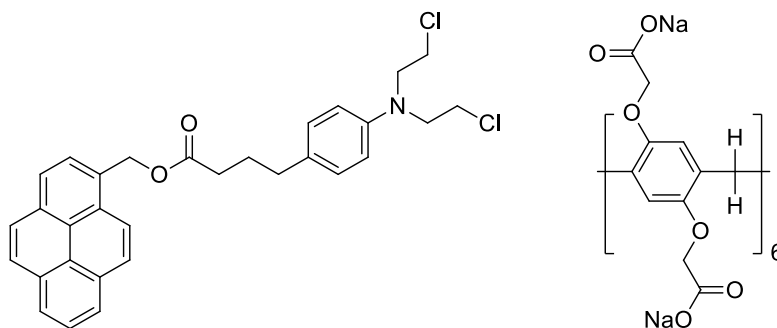
[71] G. A. Petersson, A. Bennett, T. G. Tensfeldt, M. A. Al-Laham, W. A. Shirley, J. Mantzaris, *J. Chem. Phys.* **1988**, *89*, 2193.

***CAPÍTULO 3. LÓGICA  
SECUENCIAL EN LIBERACIÓN  
FOTOINDUCIDA DE HUÉSPEDES  
DE CBn***

### 3.1. INTRODUCCIÓN

En Química Supramolecular, existe una tendencia reciente al aprovechamiento de sistemas con sensibilidad a la luz para inducir determinados procesos,<sup>1-3</sup> como puede ser la liberación controlada de compuestos de interés de sus complejos anfitrión-huésped.

Huang diseñó un sistema que contiene el fármaco anticancerígeno clorambucilo unido al fluoróforo pireno y encapsulado en un pilar[6]areno<sup>4</sup> (estructuras en Esquema 3.1) para favorecer la solubilidad en agua, que suministra el medicamento al ser irradiado con luz UV y se puede monitorizar por los cambios de fluorescencia del pireno.<sup>5</sup>

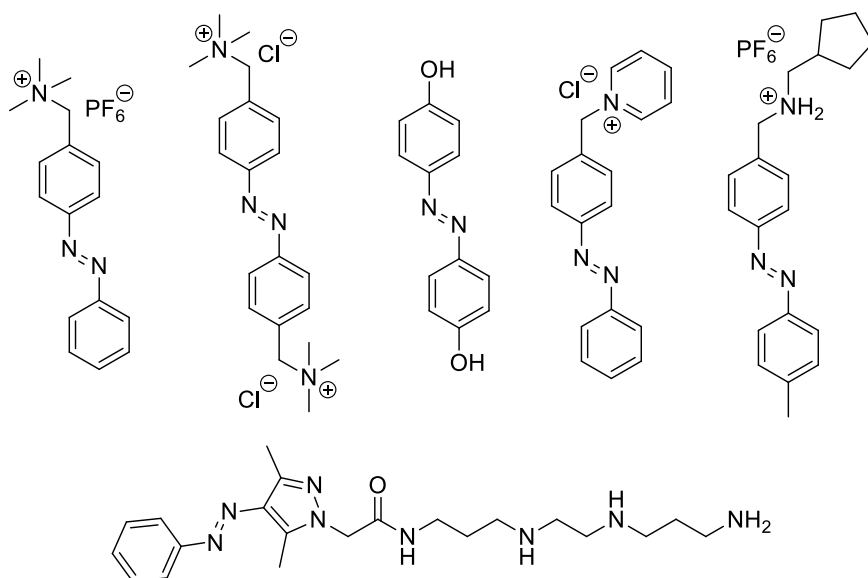


**Esquema 3.1.** Estructuras del huésped pireno-clorambucilo (izquierda) y el anfitrión derivado de pilar[6]areno (derecha).

Sobre la fotoquímica de los azobencenos se han publicado varios trabajos en los que se usan estas estructuras tanto en huéspedes como en anfitriones.

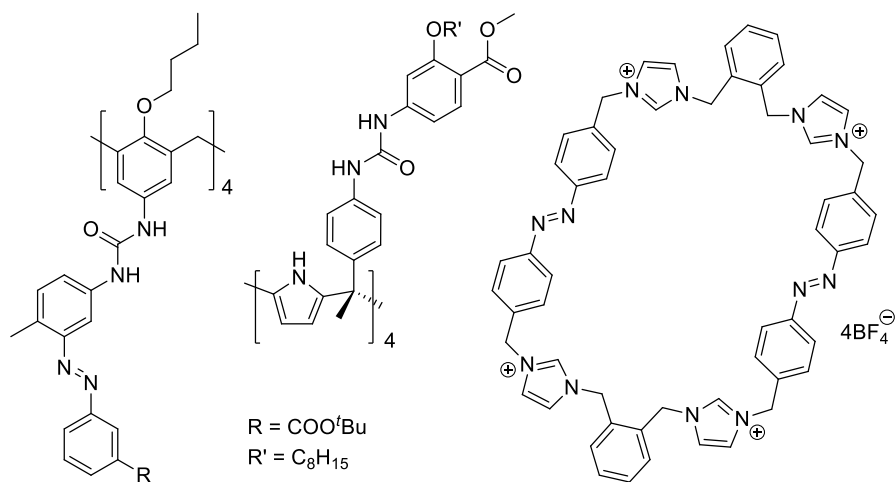
Huang y Liu caracterizan un complejo, que funciona en disolventes orgánicos, de un azobenceno que tiene un grupo amino cuaternario

con un pilar[6]areno que se disocia con luz UV y se restablece con luz visible.<sup>6</sup> Scherman y sus colaboradores desarrollaron un procedimiento para la liberación controlada en agua de diferentes especies como colorantes, aminoácidos y perfumes, que consiste en un complejo 1:1 de un azobenceno dicatiónico con CB8 que puede alojar en su interior un segundo huésped para formar un complejo heteroternario y posteriormente liberarlo mediante la fotoisomerización del azo-compuesto dentro del macrociclo.<sup>7</sup> Scherman también presentó complejos ternarios de CB8 con azobencenos (neutros o cargados) y cationes bipyridinio.<sup>8,9</sup> Otros sistemas supramoleculares donde se encuentran azobencenos están formados con éteres corona o  $\beta$ -ciclodextrinas.<sup>10,11</sup> La característica común en el uso de azobencenos como huéspedes (estructuras en Esquema 3.2) es que la afinidad con la especie que lo cubre cambia por acción de la luz, produciendo un incremento o disminución en la interacción.



**Esquema 3.2.** Derivados de azobenceno utilizados como huéspedes.

Ballester introdujo azobenceno en la estructura de cápsulas diméricas de calix[4]areno y calix[4]pirrol (Esquema 3.3) que pueden incluir en su interior pequeñas moléculas polares.<sup>12</sup> O. A. Scherman incluso sintetizó un anfitrión flexible que incluye en su estructura azobencenos e imidazolio (Esquema 3.3), que puede encapsular pequeñas moléculas en acetonitrilo y que al isomerizarse con luz se contrae y expulsa al huésped.<sup>13</sup>



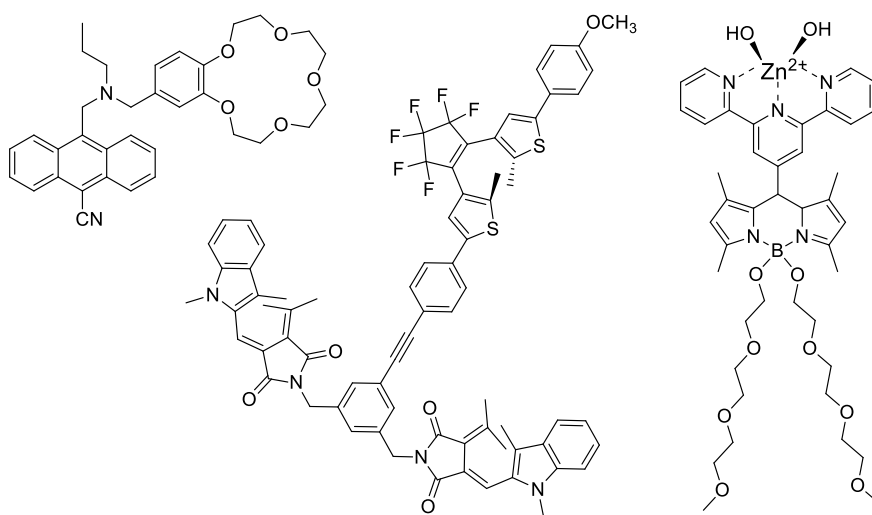
**Esquema 3.3.** Anftriones con azobencenos en su estructura.

En nuestro caso, como se detalló en el capítulo anterior hemos desarrollado diferentes sistemas en los que inducimos cambios en los equilibrios supramoleculares anfitrón-huésped (cucurbiturilos como anfitriones) mediante el uso de distintas especies que pasan a competir fuertemente por la cavidad al ser activadas con luz.<sup>14-16</sup>

Pues bien, en el estudio presentado en este capítulo vamos más allá y tratamos de introducir un nuevo componente en un sistema para la liberación fotoinducida de huéspedes de complejos con CB8, la lógica secuencial.<sup>17</sup> Este concepto a nivel molecular implica procesos que dependen del orden de aplicación de los estímulos al sistema supramolecular.

El hecho de usar procesos lógicos en sistemas supramoleculares es bastante tentador ya que puede tener múltiples aplicaciones.<sup>18,19</sup> El pionero fue de Silva que diseñó una puerta lógica tipo *AND*, consistente en un receptor derivado de éter corona (Esquema 3.4)

que al captar iones hidrógeno y sodio (*input* 1 y 2) experimenta un aumento en la intensidad de fluorescencia (*output*).<sup>20</sup> Otro sistema molecular un poco más sofisticado que se puede encontrar es una triada fotocrómica de un ditienileteno (DTE) y dos fulgimidas (FG) (estructura en Esquema 3.4) que puede funcionar como 13 dispositivos lógicos diferentes.<sup>21</sup> Por último destaca también un complejo de Zn con terpiridil-BODIPY (Esquema 3.4) que tiene la capacidad de matar células cancerígenas mediante apoptosis generada por acción del oxígeno singlete que produce el complejo de Zn cuando es irradiado con luz, además el dispositivo genera la información automáticamente con un señal fluorescente al detectar los cambios en la membrana celular.<sup>22</sup>



**Esquema 3.4.** Sistemas moleculares utilizados en procesos lógicos.

Sin embargo, las operaciones lógicas secuenciales conllevan un efecto de memoria (Figura 3.1), por lo que su uso en lógica

molecular no es trivial.<sup>17</sup> Para salvar este obstáculo, es necesario un planteamiento meticulouso que tenga en cuenta las diferencias cinéticas de los diferentes procesos químicos inducidos por sus respectivos *inputs*.<sup>23</sup>

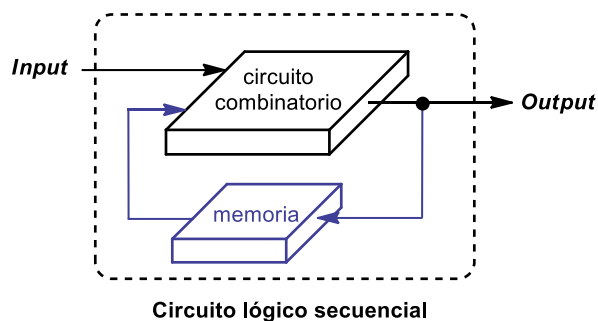
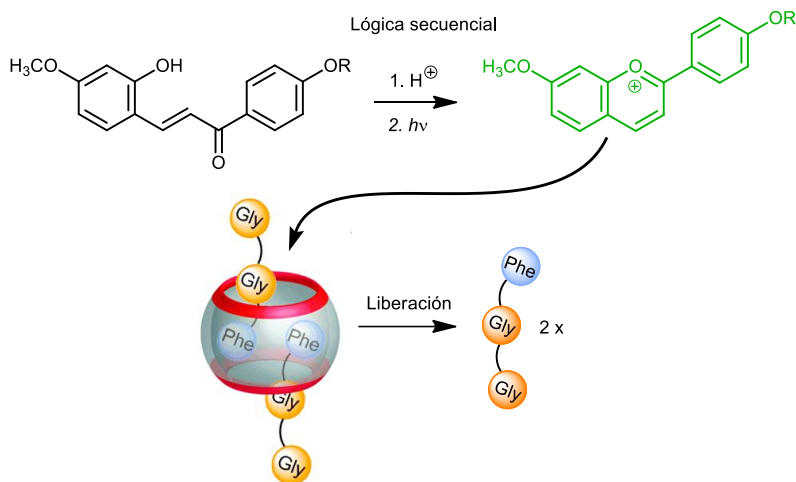


**Figura 3.1.** Representación general de un circuito de lógica secuencial.<sup>17</sup>

El dispositivo desarrollado por nosotros para aplicaciones de liberación consiste en un sistema chalcona/flavilio para inducir el desplazamiento por competición de un tripéptido, como modelo de huésped biológico, de su complejo con el cucurbiturilo CB8 (Esquema 3.5). En la química de la transformación de las chalconas en cationes flavilio tienen gran influencia dos parámetros, el pH y la luz,<sup>24-26</sup> lo que nos permite tener dos *inputs* que aplicados secuencialmente hacen que el sistema funcione de manera controlada.

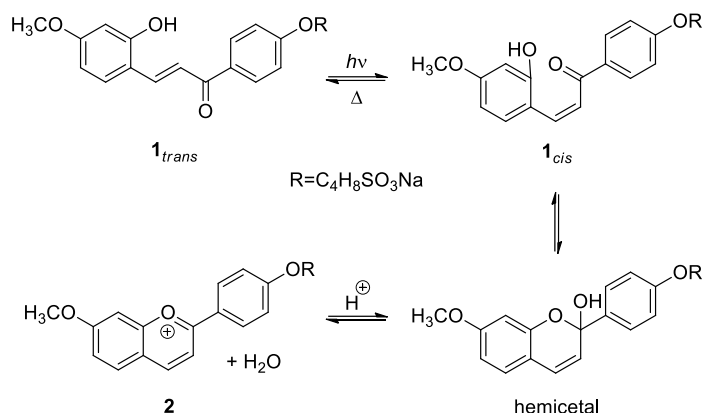


**Esquema 3.5.** Características principales del sistema diseñado para el desplazamiento de huéspedes de su complejo con el macrociclo, mediante el uso de lógica secuencial.

## 3.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA CHALCONA/FLAVILIO

### 3.2.1 Fotoquímica del sistema chalcona/flavilio

Se sintetizó la chalcona (**1**) que contiene un sustituyente metoxi teniendo en cuenta su papel como precursor del catión flavilio (**2**) y la dependencia de este sistema del orden en que se le aplican los estímulos.



**Esquema 3.6.** Reacciones químicas reversibles del sistema chalcona **1**/flavilio **2**.

Como se observa en el Esquema 3.6 inicialmente la chalcona se encuentra en su conformación más estable *trans* (**1<sub>trans</sub>**). Por acción de la luz, independientemente del pH, se isomeriza a su forma *cis* (**1<sub>cis</sub>**) que puede estar en equilibrio con la forma hemiacetal mediante un proceso de tautomerización de cierre de anillo y finalmente después de la deshidratación del hemiacetal, ahora sí dependiente del pH, se produce el catión flavilio (**2**).

Entonces, se estudió el comportamiento del sistema variando la acidez del medio acuoso por espectroscopia de absorción UV/vis tomando como referencia el comportamiento fotoquímico del sistema chalcona/flavilio sin el grupo metoxi.<sup>14</sup> A pH neutro (7.4) la especie **1<sub>cis</sub>** generada fotoquímicamente experimenta una reacción inversa de isomerización rápidamente para volver al isómero *trans* de la chalcona (**1<sub>trans</sub>**) y no se llega a obtener el catión flavilio (**2**). A medida que se aumenta la acidez del medio, la deshidratación del intermedio hemiacetal comienza a competir con la isomerización inversa y se empieza a formar el producto **2**. Conforme aumenta la

concentración de protones más eficaz es la formación del flavilio. A pH 2 la conversión a flavilio es total (rendimiento cuántico de la fotorreacción,  $\phi = 0.08$ , estimado con los espectros de absorción UV/vis y  $\epsilon_{458\text{ nm}} = 49000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$  para **2**, a pH 2) (ver Figura 3.2).

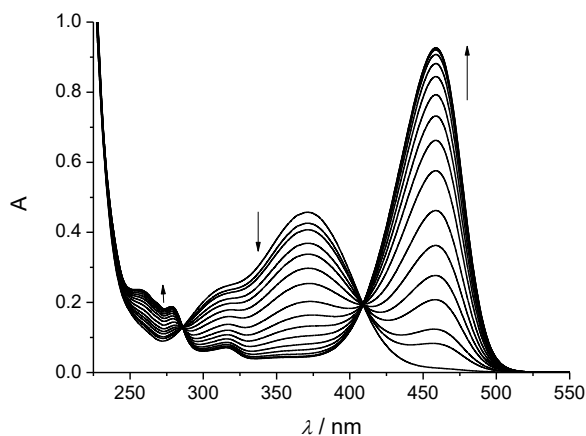


**Figura 3.2.** Espectros de absorción UV/vis de la irradiación (a 365 nm) de **1<sub>trans</sub>** en agua (18  $\mu\text{M}$ , pH 2.0, buffer citrato 10 mM). El intervalo de tiempo en que se midieron los espectros fue de 0 a 150 segundos de irradiación.

Por último a pH ligeramente ácido (pH 4.5) se encuentra una relación 80/20 [**2**]/[**1**] en el estado fotoestacionario (ver Figura 3.3)

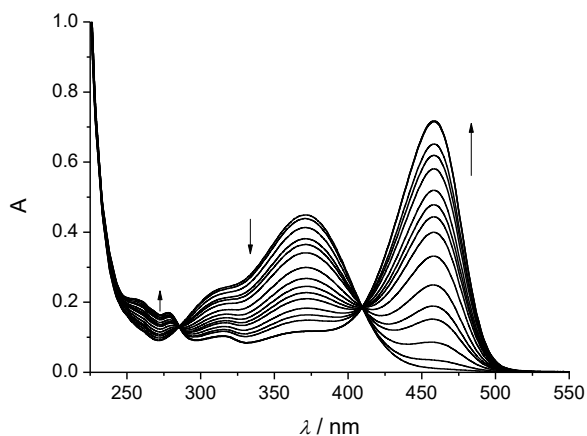


**Figura 3.3.** Espectros de absorción UV/vis de la irradiación (a 365 nm) de **1<sub>trans</sub>** en agua (18  $\mu$ M, pH 4.5, buffer citrato 10 mM). El intervalo de tiempo en que se midieron los espectros fue de 0 a 180 segundos de irradiación.

Como se puede apreciar en las dos figuras anteriores, conforme va aumentando el tiempo de exposición de la chalcona **1<sub>trans</sub>** a la luz de longitud de onda de 365 nm (elegida porque corresponde con la región de máxima absorbancia de la chalcona) emitida por la lámpara, se produce la disminución de su banda de absorción característica ( $\lambda_{\text{max}} = 371$  nm) y a su vez la aparición de una nueva banda ( $\lambda_{\text{max}} = 458$  nm) que permite corroborar la formación del catión flavilio (**2**). Asimismo, se observan dos puntos isobésticos a 286 nm y 409 nm. Las características espectrales de la chalcona permiten incluso irradiaciones a longitudes de onda del espectro visible (por encima de 400 nm).

También se estudió esta fototransformación de **1** en **2** mediante espectroscopia  $^1\text{H}$ -RMN.

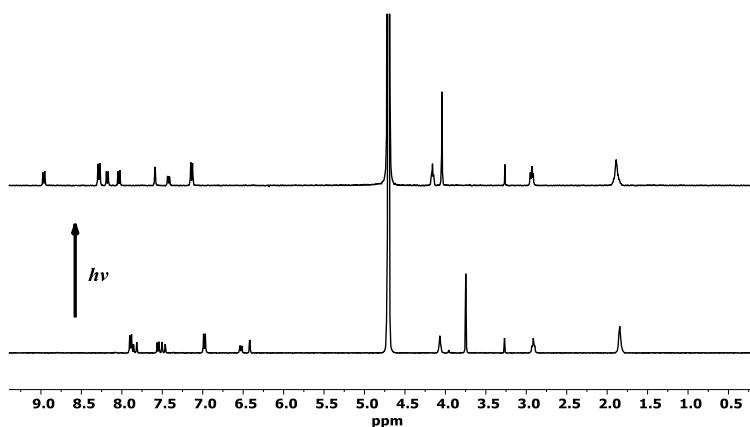


**Figura 3.4.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Abajo: chalcona **1** en  $\text{D}_2\text{O}$  (0.7 mM, pD 7.0). Arriba: misma muestra pero a pD 2 y después de irradiación a 365 nm.

Se perciben por tanto los cambios en los espectros de RMN (Figura 3.4) que confirman la generación de flavilio **2**.

Luego se optó por realizar experimentos para conocer más acerca de la transformación térmica inversa de catión flavilio (**2**) en *trans*-chalcona (**1<sub>trans</sub>**). A pH muy ácido ( $\leq 2$ ) el proceso es muy lento o directamente está paralizado, mientras que a pH menos ácido (4-5) sí que se da con velocidades significativas.

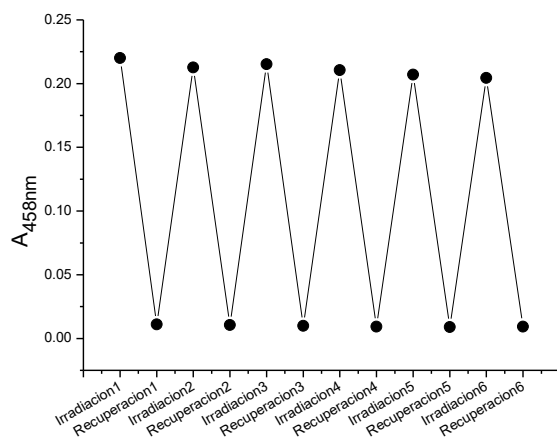


**Figura 3.5.** Absorbancia UV/vis a 458 nm de varios ciclos de irradiación (3 minutos a 365 nm) y reacción inversa térmicamente activada (50 minutos, 25 °C) de una disolución de **1** (5  $\mu$ M) en agua (pH 4.5, buffer citrato 10 mM).

En la Figura 3.5 se muestra como tras diferentes ciclos de formación a pH 4.5 de catión flavilio (absorbancia máxima a 458 nm) y de regreso hasta *trans*-chalcona (absorbancia inapreciable a 458 nm), el sistema sufre apenas una ligera fatiga.

### 3.2.2 Cinética y termodinámica del sistema chalcona/flavilio

Para obtener datos cinéticos y termodinámicos de la transformación fotoinducida de **1<sub>trans</sub>** en **2** y de la reacción térmica inversa, como las constantes de velocidad observadas ( $k_{\text{obs}}$ ) y el  $\text{p}K_{\text{a}}$  aparente, se siguieron estos procesos monitorizados por espectroscopia de absorción UV/vis (Figura 3.6 y 3.7).

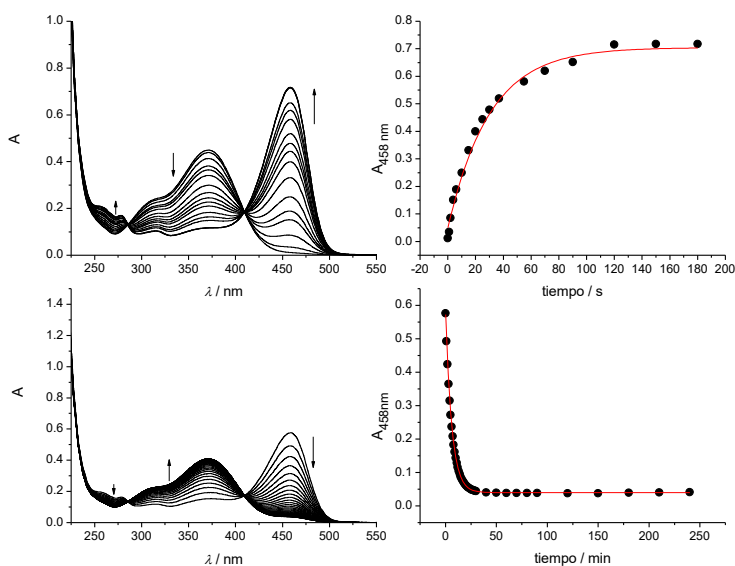


**Figura 3.6.** Arriba izquierda: espectros de absorción UV/vis de la irradiación (a 365 nm) de una disolución de **1<sub>trans</sub>** (18  $\mu\text{M}$ ) en agua (pH 4.5, buffer citrato 10 mM). Arriba derecha: curva de irradiación correspondiente (a 458 nm). Abajo izquierda: espectros de absorción UV/vis de la recuperación térmica (25  $^{\circ}\text{C}$ ) de la muestra anterior. Abajo derecha: curva de recuperación térmica correspondiente (a 458 nm).

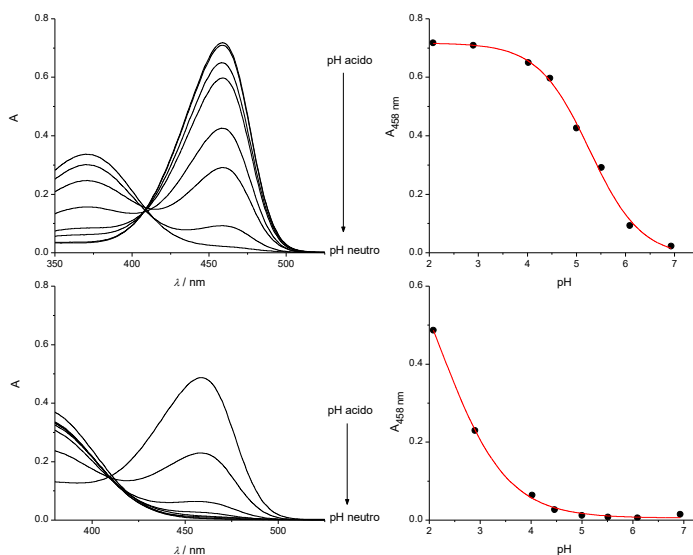


**Figura 3.7.** Arriba izquierda: espectros de absorción UV/vis después de la irradiación (a 365 nm) hasta el estado fotoestacionario de **1<sub>trans</sub>** (18 μM) en agua (buffer citrato 10 mM) a diferentes pH. Arriba derecha: curva de valoración de pH correspondiente (a 458 nm). Abajo izquierda: espectros de absorción UV/vis de la recuperación térmica (24 horas, 25 °C) de las muestras anteriores. Abajo derecha: curva de valoración de pH correspondiente (a 458 nm).

Los resultados obtenidos de los ajustes de las dos figuras anteriores se recogen en la Tabla 3.1:

**Tabla 3.1.** Constantes de velocidad y  $pK_a$  aparentes de la formación fotoactivada de **2** a partir de **1<sub>trans</sub>** ( $I_{abs} = 4.4 \cdot 10^{-8}$  mol fotones  $s^{-1}$ ) y de la reacción térmica inversa (25 °C).

| Transformación               | $k_{obs}/s^{-1}$    | $pK_a$     |
|------------------------------|---------------------|------------|
| <b>1<sub>trans</sub> → 2</b> | $3.3 \cdot 10^{-2}$ | 5.3        |
| <b>2 → 1<sub>trans</sub></b> | $2.7 \cdot 10^{-3}$ | $\leq 2.2$ |

Luego se repitieron estos experimentos pero en presencia de CB8 (Figuras 3.8 y 3.9) para elegir, con los valores de  $pK_a$  obtenidos, los valores de pH adecuados en los estudios posteriores de lógica secuencial y desplazamiento competitivo del tripéptido.

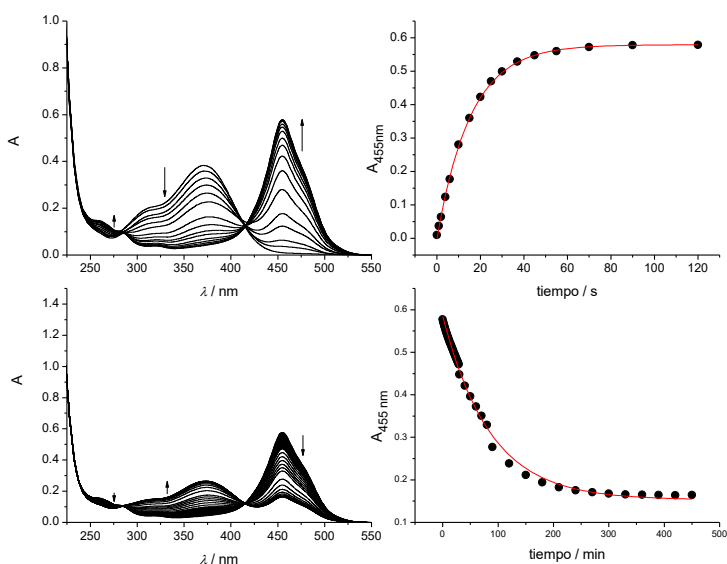


**Figura 3.8.** Arriba izquierda: espectros de absorción UV/vis de la irradiación (a 365 nm) de una disolución de  $1_{trans}$  (18  $\mu$ M) y CB8 (9  $\mu$ M) en agua (pH 4.5, buffer citrato 10 mM). Arriba derecha: curva de irradiación correspondiente (a 455 nm). Abajo izquierda: espectros de absorción UV/vis de la recuperación térmica (25 °C) de la muestra anterior. Abajo derecha: curva de recuperación térmica correspondiente (a 455 nm).

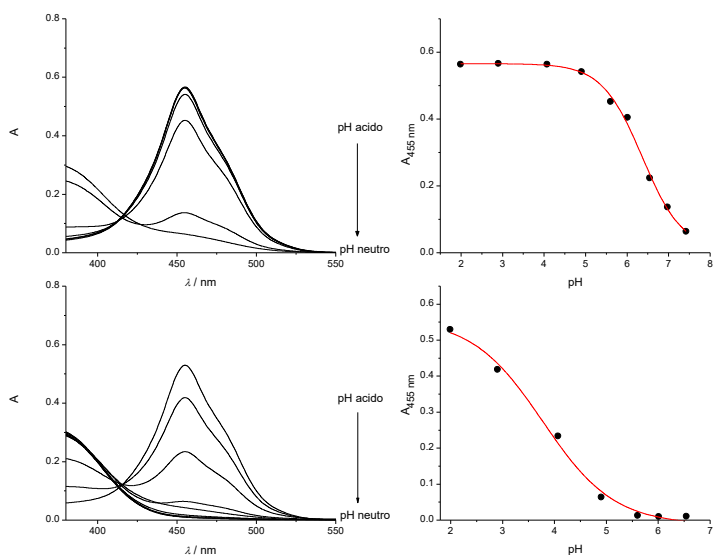


**Figura 3.9.** Arriba izquierda: espectros de absorción UV/vis después de la irradiación (a 365 nm) hasta el estado fotoestacionario de **1<sub>trans</sub>** (18 μM) y CB8 (9 μM) en agua (buffer citrato 10 mM) a diferentes pH. Arriba derecha: curva de valoración de pH correspondiente (a 455 nm). Abajo izquierda: espectros de absorción UV/vis de la recuperación térmica (24 horas, 25 °C) de las muestras anteriores. Abajo derecha: curva de valoración de pH correspondiente (a 455 nm).

En la Tabla 3.2 se muestran los resultados de los ajustes de las dos figuras superiores:

**Tabla 3.2.** Constantes de velocidad y pK<sub>a</sub> aparentes de la formación fotoactivada de **2** a partir de **1<sub>trans</sub>** en presencia de CB8 ( $I_{\text{abs}} = 4.4 \cdot 10^{-8}$  mol fotones s<sup>-1</sup>) y de la reacción térmica inversa (25 °C).

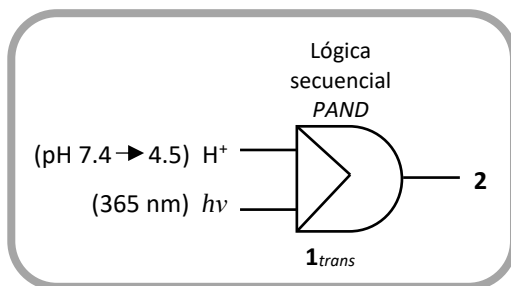
| Transformación                                     | $k_{\text{obs}}/\text{s}^{-1}$ | pK <sub>a</sub> |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|
| <b>1<sub>trans</sub> → 2</b> (en presencia de CB8) | $6.5 \cdot 10^{-2}$            | 6.4             |
| <b>2 → 1<sub>trans</sub></b> (en presencia de CB8) | $2.0 \cdot 10^{-4}$            | 3.8             |

Teniendo en cuenta los valores de  $pK_a$  aparentes (Tablas 3.1 y 3.2), se decidió utilizar los valores de pH 7.4 (no se forma el catión flavilio) y 4.5 (se forma el catión flavilio y se produce la reacción térmica inversa). Cabe destacar que en ciertas situaciones de importancia biológica se encuentran condiciones de pH similares a las elegidas por nosotros para este trabajo. Como por ejemplo, en la diferenciación de células tumorales que suelen tener un pH 2 o 3 unidades menores que las células sanas, característica que se aprovecha habitualmente en sistemas de localización selectiva.<sup>27</sup>

### 3.3. LÓGICA SECUENCIAL DEL SISTEMA CHALCONA/FLAVILIO

La lógica secuencial se fundamenta principalmente en la función de una puerta lógica *AND* con prioridad (*PAND*, *priority AND*), es decir, sólo si se aplican los dos *inputs* (1 binario) y siempre que sea en el orden correcto se produce el *output*. Esta forma de aplicar *inputs* a un sistema se ha utilizado en *keypad locks* moleculares.<sup>23,28,29</sup>

Como se deduce de la fotoquímica del sistema chalcona/flavilio su lógica secuencial se puede esquematizar de la siguiente manera:



**Esquema 3.7.** Puerta lógica *PAND* de la transformación de  $1_{trans}$  en  $2$ .

En otras palabras, para formar el catión flavilio  $2$  (*output* = 1) partiendo de una disolución acuosa de chalcona  $1_{trans}$  a pH 7.4, primero hay que ajustar el pH a 4.5 añadiendo ácido a la disolución (*input* 1) y luego irradiar la muestra con luz de 365 nm (*input* 2).

Para confirmar este comportamiento lógico del sistema diseñamos un experimento variando el número y el orden de los *inputs* siguiendo por espectroscopia de absorción UV/vis (Figura 3.10), y así construimos la tabla de la verdad de la puerta lógica *PAND*, Tabla 3.3.

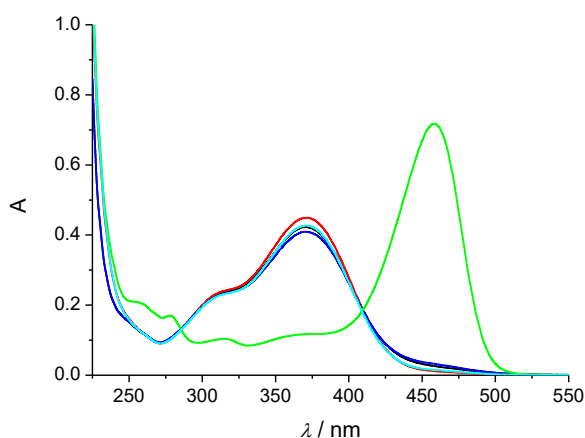


**Figura 3.10.** Espectros de absorción UV/vis de la chalcona  $1$  ( $18 \mu\text{M}$ ) en agua. Negro: a pH 7.4; rojo: a pH 4.5; azul: a pH 7.4 y luego irradiado con luz de 365 nm; verde: a pH 4.5 y luego irradiado a 365 nm; cian: a pH 7.4 irradiado con luz de 365 nm y luego ajustado a pH 4.5.

**Tabla 3.3.** Tabla de la verdad de la puerta lógica *PAND* (de la figura 3.10).

| <b>Input 1</b><br>(ácido) | <b>Input 2</b><br>(luz de 365nm) <sup>[a]</sup> | <b>Output</b><br>(A <sub>458 nm</sub> ) |
|---------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| 0 (pH 7.4)                | 0                                               | 0 (0.026)                               |
| 1 (pH 4.5)                | 0                                               | 0 (0.013)                               |
| 0 (pH 7.4)                | 1                                               | 0 (0.033)                               |
| 1 (pH 4.5) <sup>[b]</sup> | 1 <sup>[c]</sup>                                | 1 (0.718)                               |
| 1 (pH 4.5) <sup>[c]</sup> | 1 <sup>[b]</sup>                                | 0 (0.015)                               |

[a]  $I_{\text{abs}} = 4.4 \cdot 10^{-8}$  mol fotones  $\text{s}^{-1}$ . [b] *Input* aplicado en primer lugar. [c] *Input* aplicado en segundo lugar.

Efectivamente, como se señala en la Tabla 3.3, donde el *output* es la absorbancia del sistema a 458 nm correspondiente al máximo de absorción del catión flavilio **2** (la absorbancia de la chalcona en esa longitud de onda es prácticamente despreciable), sólo se forma el producto deseado al añadir primero ácido y luego irradiar con luz la chalcona. Si se cambia el orden, primero se irradia a pH neutro y luego se acidifica la disolución no se forma **2** (ver espectro cian de la Figura 3.10), debido a que la reacción de isomerización inversa de **1<sub>cis</sub>** a **1<sub>trans</sub>** es más rápida que la adición del ácido.

Todo esto se observó además mediante fotólisis con lámpara flash.

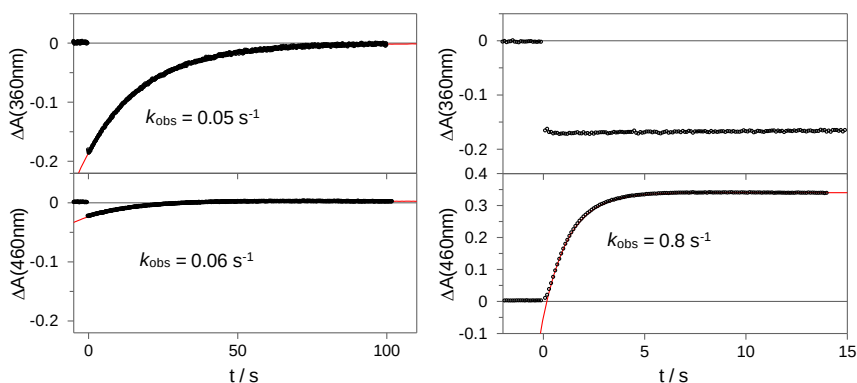


**Figura 3.11.** Señales de absorbancia de fotólisis flash de dos disoluciones de chalcona **1** en agua (buffer citrato) a 360 nm (máximo de absorción *trans*-chalcona) y a 460 nm (máximo de absorción catión flavilio). Izquierda: pH = 7.4. Derecha: pH = 4.0.

En la Figura 3.11 izquierda se puede ver que a pH neutro al absorber la muestra el pulso de luz se produce un blanqueamiento a 360 nm que corresponde a la desaparición de **1<sub>trans</sub>** para formarse la mezcla **1<sub>cis</sub>**/hemicetal que tiene un coeficiente de extinción molar más bajo, y después **1<sub>trans</sub>** se recupera en apenas 1 minuto. En lo que respecta a 460 nm no se produce incremento de absorbancia confirmando que no se forma el catión flavilio a ese pH. Por otro lado, en el rango de pH reversible (pH = 4.0, Figura 3.11 derecha) la disminución de absorbancia a 360 nm no recupera y a 460 nm se produce un incremento de absorbancia de 0.3 debido a la formación de **2**.

### 3.4. CARACTERIZACIÓN SUPRAMOLECULAR DEL COMPLEJO FLAVILIO/CB8

Una vez conocida la fotoquímica y la lógica secuencial para generar el competidor flavilio **2**, se procede al estudio de las interacciones supramoleculares entre esta especie y el CB8 donde va a tener lugar

su inclusión, para deshacer el complejo ternario formado previamente por el péptido Phe-Gly-Gly (**3**) y el CB8 ( $K_{2:1} = 1.5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-2}$ , pH 7.0, buffer fosfato 10 mM).<sup>30</sup>

En primer lugar, se realizó la valoración directa de **2** con CB8 en medio muy ácido (pH = 1), donde el catión es estable termodinámicamente.

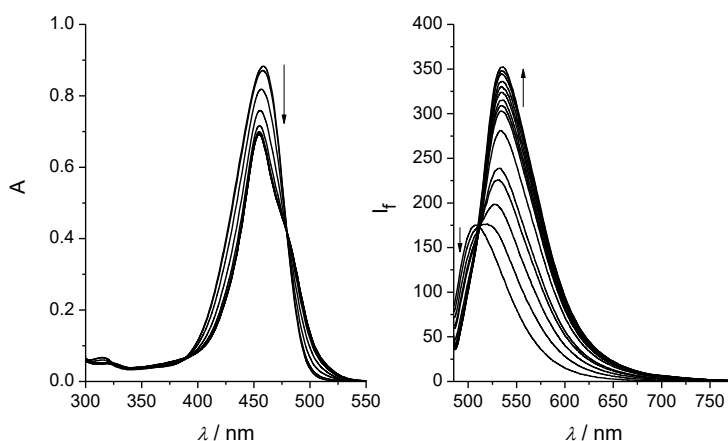


**Figura 3.12.** a) Espectros de absorción UV/vis de la valoración de **2** (18  $\mu\text{M}$ ) con CB8 a pH 1 (rojo: sin CB8; azul: 51.4  $\mu\text{M}$  CB8). B) Espectros de fluorescencia de la valoración de **2** (4  $\mu\text{M}$ ) con CB8 a pH 1 (rojo: sin CB8; azul: 8.3  $\mu\text{M}$  CB8).

La Figura 3.12 muestra una variación importante en la absorción UV/vis y fluorescencia de **2** al complejarse con CB8.<sup>31</sup>

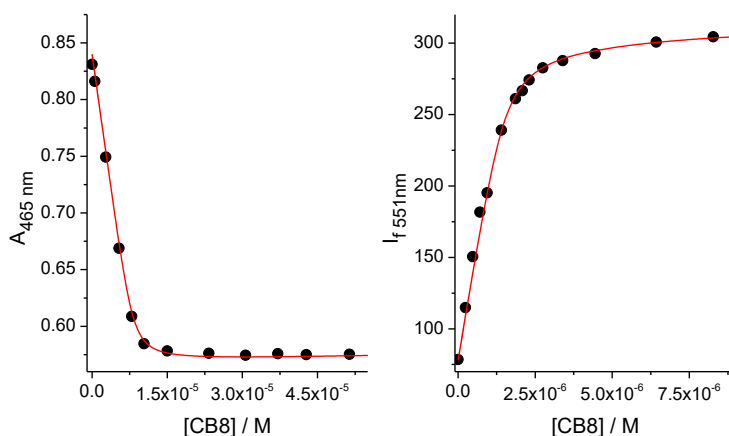


**Figura 3.13.** Izquierda: curva de valoración de absorción UV/vis (a 465 nm) de **2** (18  $\mu$ M) con CB8 a pH 1. Derecha: curva de valoración de fluorescencia (a 551 nm) de **2** (4  $\mu$ M) con CB8 a pH 1. La línea roja muestra el ajuste correspondiente de acuerdo con un complejo 2:1.

El ajuste global<sup>32</sup> de los datos de la valoración de **2** con CB8 dio un valor de la constante de asociación  $K$  de  $1.3 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-2}$  para un modelo de complejación de 2 huéspedes y 1 anfitrión (Figura 3.13).

Para confirmar la estequiometría 2:1 del complejo se utilizó el método del *Job's plot*, cuyo resultado se ilustra en la Figura 3.14.

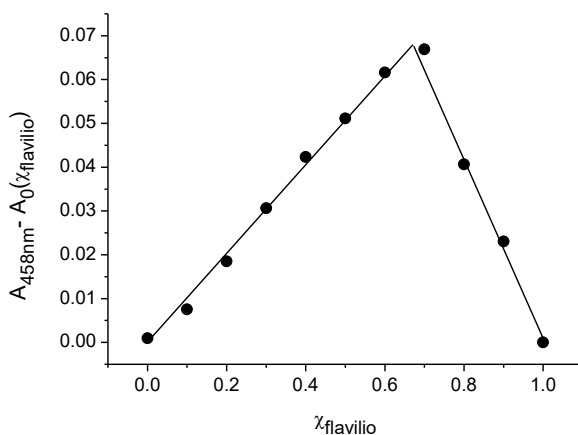


**Figura 3.14.** *Job's plot* de la complejación de **2** con CB8 a pH 1 con una concentración molar total de 10  $\mu\text{M}$ . Se monitorizó por espectroscopia de absorción UV/vis y se representa a 458 nm variando la concentración de **2**.

Por último, la espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN aportó más pruebas de la formación del complejo fuerte flavilio<sub>2</sub>·CB8.

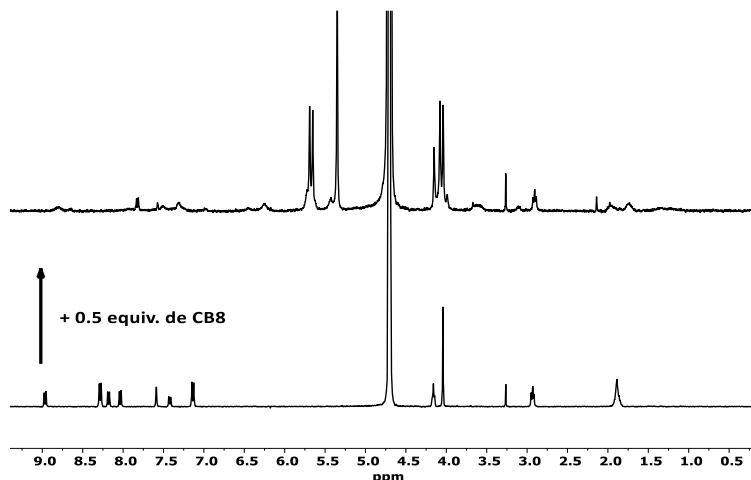


**Figura 3.15.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. Abajo: flavilio **2** en  $\text{D}_2\text{O}$  (0.7 mM, pD 2.). Arriba: flavilio (0.4 mM) después de adicionarle 0.5 equivalentes de CB8 (0.2 mM).

Si nos fijamos en los protones aromáticos, el ensanchamiento y el desplazamiento a campo más alto de sus señales indican una inmersión profunda del catión flavilio en el macrociclo (Figura 3.15).

Para finalizar la caracterización supramolecular del complejo flavilio/CB8, si se comparan las Tablas 3.2 y 3.1 de la sección 3.2.2, se puede añadir que la presencia de CB8 en la fotoproducción de flavilio, así como en la reacción inversa, produce incrementos en los valores de  $\text{pK}_a$  lo que mejora bastante la aplicación del sistema para fines biológicos.<sup>33</sup> Y además la reacción térmica inversa **2**  $\rightarrow$  **1<sub>trans</sub>** se

hace más lenta que si el catión flavilio no está complejado, ya que éste se estabilizada en el interior del CB8.

### 3.5. LIBERACIÓN FOTOACTIVADA DE TRIPÉPTIDO DE SU COMPLEJO CON CB8

Después de caracterizar la afinidad en la encapsulación del catión flavilio (**2**) por el CB8 y sabiendo que su constante de asociación es un orden de magnitud mayor que la del tripéptido **3** Phe-Gly-Gly ( $K_{CB8}(\mathbf{2}) = 1.3 \cdot 10^{12} \text{ M}^{-2}$ ,  $K_{CB8}(\mathbf{3}) = 1.5 \cdot 10^{11} \text{ M}^{-2}$ ),<sup>30</sup> se procede a intentar el desplazamiento competitivo de éste último mediante la generación de **2** activada con luz.

Para ello se volvió a hacer uso de la espectroscopia de absorción UV/vis que nos permitió adquirir los cambios espectrales al irradiar a 365 nm una disolución acuosa con cantidades estequiométricas de **1** (precursor de **2**), **3** y CB8 a pH 4.5, y compararlos con los espectros de **2** libre y de **2** con CB8.

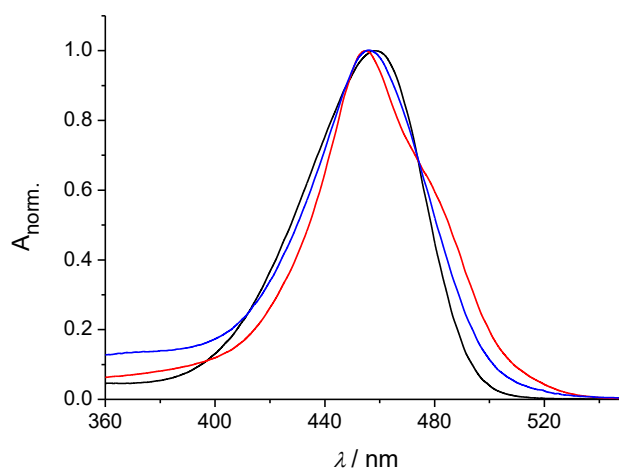


**Figura 3.16.** Espectros de absorción UV/vis de disoluciones irradiadas (365 nm, 60 segundos) en agua a pH 4.5 (buffer citrato 10 mM). **Rojo:** **1** (5  $\mu$ M) y CB8 (2.5  $\mu$ M); **negro:** **1** (5  $\mu$ M); **azul:** **1** (5  $\mu$ M), **3** (5  $\mu$ M) y CB8 (2.5  $\mu$ M).

Se puede considerar viendo los resultados del experimento (Figura 3.16), que aproximadamente el 50% del tripéptido **3** es liberado del cucurbiturilo por acción del catión flavilio **2**. Este mismo ensayo se realizó a pH 7.4 y como era de esperar no se generó catión flavilio y por tanto tampoco desplazamiento de **3**.

También se monitorizó la liberación del tripéptido de su complejo con CB8 por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN. Para ello la señal que aparece como singlete perteneciente a los protones de los CH del CB8 (a 5.4-5.5 ppm) nos sirve como indicador, ya que su desplazamiento químico es suficientemente diferente cuando el macrociclo contiene en su interior a **3** o a **2**.

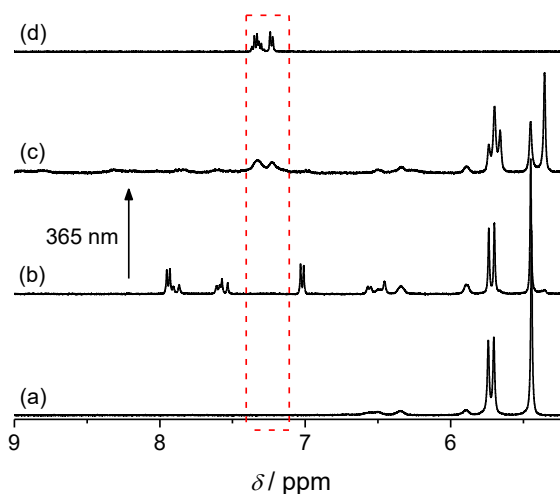


**Figura 3.17.** Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN parciales en  $\text{D}_2\text{O}$  de a) **3** (1 mM) y CB8 (0.5 mM); b) **3** (0.2 mM), CB8 (0.1 mM) y **1** (0.4 mM) a pD 4.2; c) misma mezcla que b)

después de 1h de irradiación a 365 nm; d) **3** libre. El rectángulo rojo señala la zona de los protones aromáticos de la fenilalanina cuando **3** está libre.

Si nos fijamos en la Figura 3.17c, se observan simultáneamente los dos singletes al irradiar la mezcla para liberar **3** mediante la generación de **2**, esto se debe a que el intercambio es lento en la escala de tiempo del RMN. Pero se puede afirmar con certeza que se ha producido la liberación de la carga del interior del CB8 a pD 4.2, ya que la integración de las señales de los CH del CB8 (5.4-5.5 ppm) indican un 60% de liberación de **3** y además las señales de los protones aromáticos de la fenilalanina están en la misma posición, después de la exposición a la luz, que cuando **3** está libre (Figura 3.17d). Cabe destacar que la chalcona **1** no tiene capacidad para desplazar el tripéptido del CB8 (Figuras 3.17a y b). Además, en estas condiciones experimentales el catión flavilio puede volver a chalcona mediante activación térmica y por consiguiente el péptido se vuelve a complejar en la cavidad. Pues bien después de la recuperación del sistema, se obtuvo un 20% del péptido total recuperado, y al ajustar un poco el pD a menos ácido (4.5-4.9) se consigue entre un 40 y un 50% del péptido formando complejo (aunque hay que tener en cuenta que en aplicaciones donde se usa la liberación no es un requisito esta capacidad de recuperación).

### 3.6. CONCLUSIONES

Se ha conseguido diseñar un sistema chalcona/flavilio que es capaz de generar un competidor catión flavilio **2** que se une fuertemente al CB8 y tiene la capacidad de liberar el tripéptido Phe-Gly-Gly **3** del

interior del macrociclo. Para llevar a cabo este proceso el sistema depende de la aplicación de dos *inputs* (ácido y luz) siguiendo una secuencia lógica con prioridad (puerta lógica *PAND*) donde primero se ajusta el pH a 4.5 (*input* 1) y después se irradia a 365 nm (*input* 2). El huésped **3** forma un complejo ternario con el CB8 con estequiometría 2:1, por lo que se puede afirmar que nuestro sistema es competente incluso para desplazar compuestos que forman dímeros en el interior de la cavidad.

De una manera más general, el dispositivo funciona porque se produce un intercambio de información química entre el sistema fotoactivado y el complejo supramolecular anfitrión-huésped.<sup>34-37</sup> Por tanto, puede ser de utilidad en aplicaciones biológicas debido a su alta selectividad para la liberación de compuestos de interés mediante su activación con luz.

### **3.7. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**

#### **Materiales y métodos**

Todos los productos químicos y disolventes para síntesis y para preparación de muestras se utilizaron tal como se recibieron siendo de pureza de grado de reactivo o espectrofotométrico. El agua era de grado milli-Q. El cucurbit[8]urilo se adquirió en Aldrich.

Los experimentos de valoración UV/vis a pH 1 se hicieron en cubetas de cuarzo de 1 cm, añadiendo al catión flavilio **2** (18  $\mu$ M), CB8 desde una disolución madre (que contiene la misma concentración de flavilio que en la cubeta). Un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603

o un Varian Cary 50 se usó para adquirir los espectros de absorción UV/vis.

La valoración seguida por fluorescencia se llevó a cabo de la misma forma que los de absorción UV/vis pero con una concentración menor de catión flavilio (4  $\mu\text{M}$ ). El fluorímetro utilizado fue un Varian Cary Eclipse.

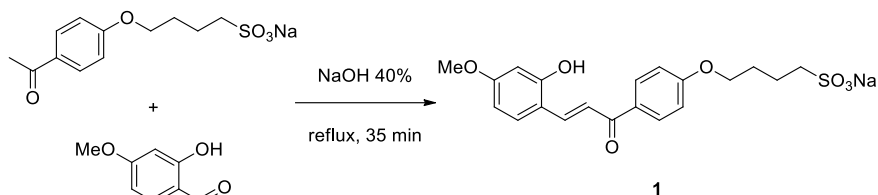
Para ajustar el pH de las disoluciones tamponadas con citrato se usaron HCl o NaOH y un pH-metro Hanna HI221.

Los experimentos de RMN se hicieron a 25 °C en un espectrómetro Bruker AMX-400 a 400 MHz ( $^1\text{H}$ ) y a 101 MHz ( $^{13}\text{C}$ ).

Las irradiaciones se hicieron con una lámpara de TLC de 24 W ( $I_{\text{abs}} = 4.4 \cdot 10^{-8}$  mol fotones  $\text{s}^{-1}$ ) a 365 nm. Para determinar los rendimientos cuánticos de las fotorreacciones se utilizó un actinómetro de ferrioxalato.<sup>38</sup>

Los ensayos de fotólisis flash se realizaron en un espectrofotómetro Varian Cary 5000 dotado con una sonda de fibra óptica con interfaz Harrick FiberMate acoplada a un porta-cubetas de 4 vías Ocean Optics. El compartimento se aisló de la luz exterior y para dar el pulso de luz blanca se usó el flash de una cámara comercial Achiever 630AF (Hong Kong, China) colocado en contacto con la cubeta de cuarzo de 10x2 mm. La densidad óptica se mide a través del paso óptico de 10 mm y la excitación pulsada a través del paso óptico de 2 mm para reducir efectos de difusión.<sup>39</sup>

## Síntesis de chalcona 1



**Esquema 3.8.** Síntesis de *trans*-chalcona 1.

4'-(1-Sulfo-4-butiloxi)-acetofenona sal de sodio<sup>14</sup> (0.48 g, 1.7 mmol) y 2-hidroxí-4-metoxibenzaldehído (0.25 g, 1.7 mmol) se disolvieron en 5 ml de NaOH al 40%. La mezcla se puso a reflujo durante 35 minutos bajo atmósfera de nitrógeno y con agitación vigorosa. Después de enfriarla en un baño de hielo, la disolución se neutralizó con HCl concentrado y se llevó a sequedad. El producto crudo se disolvió en agua destilada y se filtró pa eliminar cualquier material insoluble. La fase acuosa se concentró por evaporación y el producto se purificó por cromatografía flash en columna de fase reversa (C<sub>18</sub>) con elución en gradiente desde 100% H<sub>2</sub>O hasta 70% H<sub>2</sub>O/30% CH<sub>3</sub>CN. El producto final **1** se obtuvo como un sólido naranja amorfo (0.13 g, 20% rendimiento).

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.71 (m, 3H), 7.35 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 7.19 (d,  $J$  = 15.4 Hz, 1H), 6.79 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 2H), 6.40 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H), 6.35 (s, 1H), 3.87 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 2.94 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 1.89–1.74 ppm (m, 4H).

<sup>13</sup>C-NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  191.96, 164.83, 164.36, 163.44, 143.13, 132.70, 131.92, 131.79, 118.75, 117.12, 115.36, 106.83, 102.69, 68.94, 55.68, 52.27, 29.32, 22.92 ppm.

HRMS (modo negativo)  $[M-Na]^-$ : Calculada para  $C_{20}H_{21}O_7S$  405.1003;  
Encontrada 405.1017.

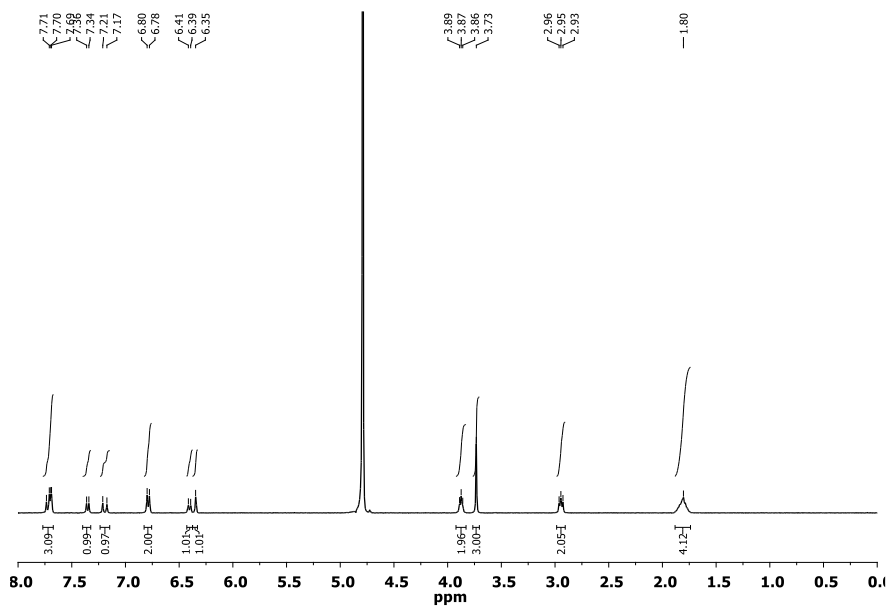


Figura 3.18. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN de **1**.

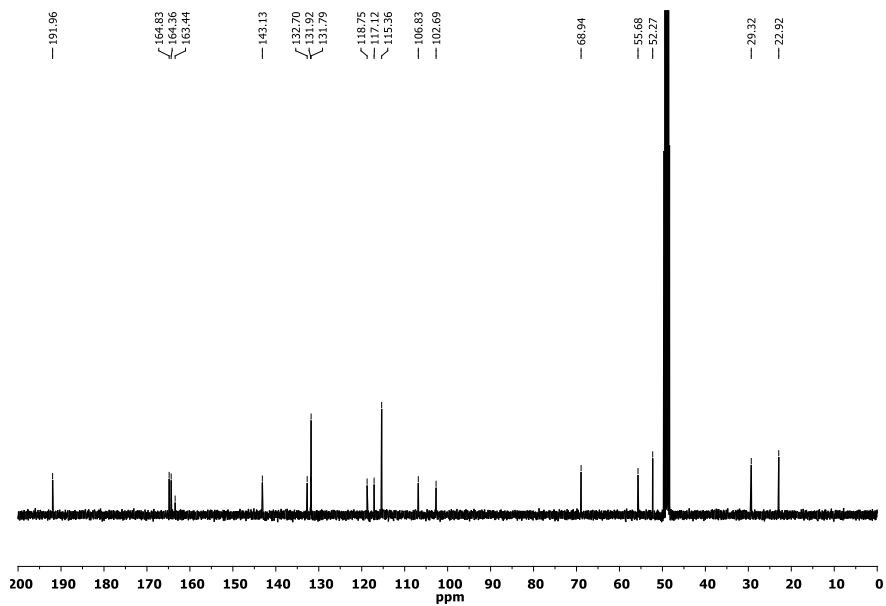


Figura 3.19. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de **1**.

### 3.8. REFERENCIAS

- [1] P. Ceroni, A. Credi, M. Venturi, *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 4068.
- [2] D.-H. Qu, Q.-C. Wang, Q.-W. Zhang, X. Ma, H. Tian, *Chem. Rev.* **2015**, *115*, 7543.
- [3] M. Karimi, P. Sahandi Zangabad, S. Baghaee-Ravari, M. Ghazadeh, H. Mirshekari, M. R. Hamblin, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 4584.
- [4] G. Yu, M. Xue, Z. Zhang, J. Li, C. Han, F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 13248.
- [5] G. Yu, W. Yu, Z. Mao, C. Gao, F. Huang, *Small* **2015**, *11*, 919.
- [6] J. del Barrio, S. T. J. Ryan, P. G. Jambrina, E. Rosta, O. A. Scherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 5745.
- [7] G. Yu, C. Han, Z. Zhang, J. Chen, X. Yan, B. Zheng, S. Liu, F. Huang, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 8711.
- [8] F. Tian, D. Jiao, F. Biedermann, O. A. Scherman, *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 1207.
- [9] J. del Barrio, P. N. Horton, D. Lairez, G. O. Lloyd, C. Toprakcioglu, O. A. Scherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 11760.
- [10] G. Ragazzon, M. Baroncini, S. Silvi, M. Venturi, A. Credi, *Nat. Nanotechnol.* **2015**, *10*, 70.
- [11] L. Stricker, E.-C. Fritz, M. Peterlechner, N. L. Doltsinis, B. J. Ravoo, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 4547.

- [12] A. Díaz-Moscoso, F. A. Arroyave, P. Ballester, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 3046.
- [13] S. T. J. Ryan, J. del Barrio, R. Suardíaz, D. F. Ryan, E. Rosta, O. A. Scherman, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 16096.
- [14] N. Basílio, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 15208.
- [15] J. Vázquez, M. A. Romero, R. N. Dsouza, U. Pischel, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 6245-6248.
- [16] M. A. Romero, N. Basílio, A. J. Moro, M. Domingues, J. A. González-Delgado, J. F. Arteaga, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2017**, 23, 13105.
- [17] U. Pischel, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1356.
- [18] J. Andréasson, U. Pischel, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, 44, 1053.
- [19] J. Andréasson, U. Pischel, *Chem. Soc. Rev.* **2018**, 47, 2266.
- [20] A. P. de Silva, H. Q. N. Gunaratne, C. P. McCoy, *Nature* **1993**, 364, 42.
- [21] J. Andréasson, U. Pischel, S. D. Straight, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 133, 11641.
- [22] I. S. Turan, G. Gunaydin, S. Ayan, E. U. Akkaya, *Nat. Commun.* **2018**, 9, 805.
- [23] D. Margulies, C. E. Felder, G. Melman, A. Shanzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 347.

- [24] F. Pina, M. J. Melo, M. Maestri, R. Ballardini, V. Balzani, *J. Am. Chem. Soc.*, **1997**, *119*, 5556.
- [25] F. Pina, M. J. Melo, C. A. T. Laia, A. J. Parola, J. C. Lima, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 869.
- [26] A. Zubillaga, P. Ferreira, A. J. Parola, S. Gago, N. Basílio, *Chem. Commun.* **2018**, *54*, 2743.
- [27] M. Hammarson, J. Andersson, S. M. Li, P. Lincoln, J. Andréasson, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 7130.
- [28] J. Andréasson, S. D. Straight, T. A. Moore, A. L. Moore, D. Gust, *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 3936.
- [29] C. P. Carvalho, Z. Domínguez, J. P. Da Silva, U. Pischel, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 2698.
- [30] L. M. Heitmann, A. B. Taylor, P. J. Hart, A. R. Urbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12574.
- [31] N. Barooah, J. Mohanty, A. C. Bhasikuttan, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 13225.
- [32] P. Thordarson, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1305.
- [33] I. Ghosh, W. M. Nau, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 764.
- [34] D. V. Berdnikova, T. M. Aliyeu, T. Paululat, Y. V. Fedorov, O. A. Fedorova, H. Ihmels, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 4906.
- [35] P. Remón, U. Pischel, *ChemPhysChem* **2017**, *18*, 1667.

- [36] A. Llopis-Lorente, P. Díez, A. Sánchez, M. D. Marcos, F. Sancenón, P. Martínez-Ruiz, R. Villalonga, R. Martínez-Máñez, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15511.
- [37] J. S. Park, J. Park, Y. J. Yang, T. T. Tran, I. S. Kim, J. L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7598.
- [38] M. Montalti, A. Credi, L. Prodi, M. T. Gandolfi, (2006), *Handbook of Photochemistry*, CRC Press, Boca Raton.
- [39] M. Maestri, R. Ballardini, F. J. S. Pina, M. J. Melo, *J. Chem. Educ.* **1997**, *74*, 1314.

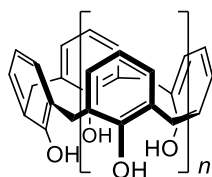
***CAPÍTULO 4. LIBERACIÓN  
ACTIVADA CON LUZ DE ESPECIES  
BIOLÓGICAS DE CALIXARENOS***

## 4.1. INTRODUCCIÓN

En los trabajos descritos en los capítulos anteriores se han desarrollado sistemas supramoleculares con cucurbit[ $n$ ]urilos. Por otro lado, los calix[ $n$ ]arenos son macrociclos que pueden ser interesantes y no presentan los problemas de solubilidad de los CBN ya que pueden tener sustituyentes que solventan estos inconvenientes. Sorprendentemente no hay estudios publicados de liberación de huéspedes activada con luz de calix[ $n$ ]arenos (sin modificar sintéticamente), por lo cual nos aventuramos a investigar en esta dirección.

Como ya se introdujo en el Capítulo 1 de esta tesis doctoral, los calix[ $n$ ]arenos son oligómeros cíclicos obtenidos de la condensación de formaldehído con fenol en medio básico.<sup>1</sup> Fue en 1944 cuando Zinke y Ziegler<sup>2</sup> asignaron una estructura cíclica tetramérica a esos compuestos, posteriormente caracterizados por cristalografía de rayos X por Cornforth.<sup>3</sup> La síntesis paso a paso fue desarrollada por Hayes y Hunter<sup>4</sup> y extendida por Kämmerer.<sup>5</sup> El nombre de calixareno lo introdujo Gutsche<sup>6</sup> en 1978, por el parecido entre la forma del calix[4]areno y la de un jarrón griego llamado cráter del cáliz.

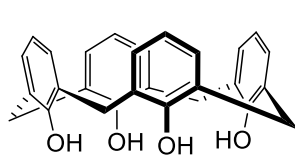
Los homólogos más accesibles son los de 4, 6 y 8 monómeros (Esquema 4.1), aunque se conocen los miembros de la familia desde  $n = 4$  a 14.<sup>1</sup>



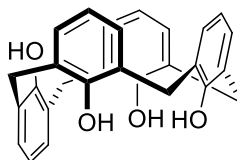
calix[4]areno:  $n = 1$   
 calix[6]areno:  $n = 3$   
 calix[8]areno:  $n = 5$

**Esquema 4.1.** Estructura de los homólogos calix[ $n$ ]arenos más utilizados.

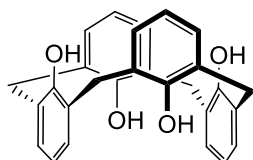
Este conjunto de macrociclos se caracterizan por no ser completamente rígidos, sino que tienen movilidad a temperatura ambiente ya que las unidades de fenol pueden rotar sobre los enlaces  $\text{Ar-CH}_2\text{-Ar}$ , pudiendo adoptar diferentes conformaciones (Esquema 4.2).



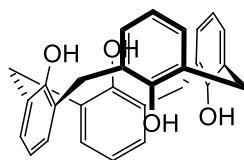
cono



cono parcial



1,3-alterno



1,2-alterno

**Esquema 4.2.** Posibles conformaciones del calix[4]areno.

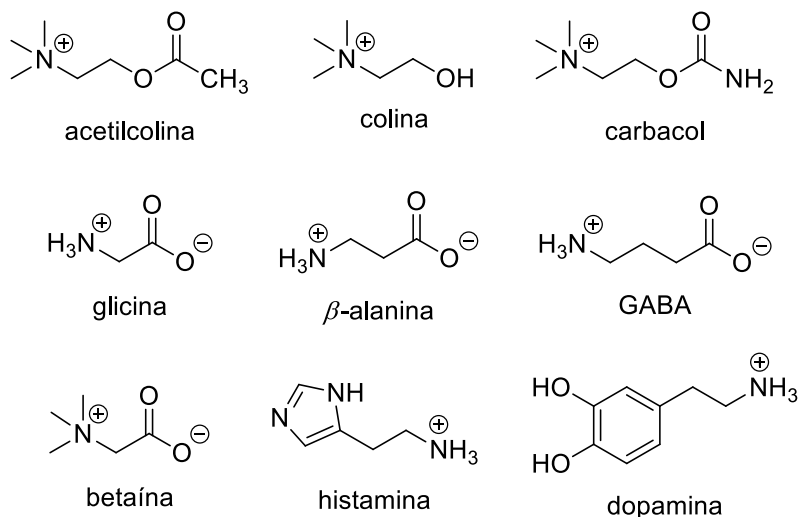
Los calix[ $n$ ]arenos no sustituidos son poco solubles en agua, por lo que la incorporación de grupos polares incrementan su solubilidad. En 1984, Arduini publicó el primer calix[4]areno soluble en medio acuoso, funcionalizado en la parte inferior (hidroxilos) con grupos carboxilatos.<sup>7</sup> Shinkai modificó calix[4]areno y calix[6]areno con aminoácidos en la parte superior (posición *para*),<sup>8</sup> y también hay

ejemplos con grupos fosfonato ( $-\text{PO}(\text{OH})_2$ )<sup>9</sup> o grupos sulfonamidas ( $-\text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH})_2$ ).<sup>10</sup>

Los macrociclos sintéticos que conforman la familia de los calix[*n*]arenos son conocidos por tener una amplia variedad de aplicaciones entre las que se encuentran la utilización como cromóforos y fluoróforos,<sup>9</sup> la complejación en disolución de iones metálicos,<sup>11,12</sup> de aniones<sup>13,14</sup> y de huéspedes neutros<sup>15</sup> o su uso como sensores potenciométricos en electrodos selectivo de iones.

16-19

Dentro de la Química anfitrión-huésped de los calix[*n*]arenos hay una serie de compuestos que están implicados en procesos químicos y biológicos, y que resultan muy interesantes como huéspedes, los iones amonio. En condiciones fisiológicas estas especies se forman por protonación de los grupos amino. Tanto los aminoácidos, como los péptidos y proteínas, así como algunos neurotransmisores contienen en su estructura estos grupos amino o amonio cuaternarios (Esquema 4.3).<sup>20,9</sup>



**Esquema 4.3.** Algunas aminas e iones amonio cuaternarios con importancia biológica.

Pues bien, la inclusión de un ion amonio en la cavidad cónica de un calix[*n*]areno se produce en parte por atracción electrostática de la carga positiva del huésped con las caras de los anillos aromáticos ricas en electrones del anfitrión, es decir, mediante interacción catión- $\pi$  (Figura 4.1).<sup>21-23</sup> En estudios publicados anteriormente, se ha demostrado esta contribución para la formación de múltiples complejos tanto para amonios cuaternarios<sup>24</sup> como para sales de tetraalquilamonio<sup>22,25</sup> en medio orgánico. En el caso de los anfitriones *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos existe también la aportación adicional de las cargas negativas de los grupos sulfonato. Pero además se puede considerar otra situación diferente a la hora de formar el enlace no covalente entre el anfitrión y el huésped, y es que se transfiera un protón de los grupos -OH del calix[*n*]areno a la amina para formar el catión amonio y el anión calix[*n*]areno y

seguidamente se de la asociación de éstos iones e inclusión del huésped (que es coordinado en forma de trípode por enlaces de hidrógeno).<sup>26-28</sup>

Lo que determinará la naturaleza en la formación del complejo será principalmente la movilidad conformacional del calix[n]areno.<sup>9</sup>

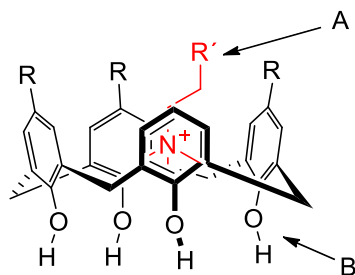
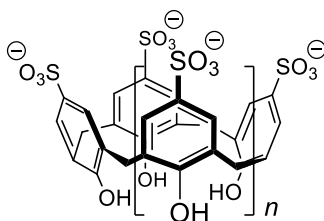


**Figura 4.1.** Calix[4]areno y un huésped amonio. Sitios de unión posibles: A) interacción catión- $\pi$ , B) interacción ion-dipolo o enlace de hidrógeno.<sup>9</sup>

Por otro lado, los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos no ramificados formados por unidades de disacáridos (un amino azúcar y un azúcar ácido). Estos compuestos ejercen sus actividades biológicas a través de la localización, estabilización, y activación o inactivación de proteínas.<sup>29</sup> Esas interacciones tienen un papel fundamental tanto en procesos fisiológicos<sup>30,31</sup> como patológicos.<sup>32</sup> Por tanto resulta de interés tener acceso a la síntesis de compuestos que sean capaces de reproducir el comportamiento de los GAGs.

Los *p*-sulfonatocalix[n]arenos ( $n = 4, 6$  y  $8$ , Esquema 4.4) son macrociclos que pueden resultar magníficos imitadores de los GAGs debido a sus estructuras, densidades y distribuciones de carga, y tamaños, además de ser muy solubles en agua. De hecho, se han demostrado sus capacidades como antivirales,<sup>33</sup> bloqueadores de

los canales de cloruros,<sup>34</sup> antitrombóticos<sup>35</sup> e inhibidores de la actividad de la *lisil oxidasa*.<sup>36</sup>



*p*-sulfonatocalix[4]areno:  $n = 1$

*p*-sulfonatocalix[6]areno:  $n = 3$

*p*-sulfonatocalix[8]areno:  $n = 5$

**Esquema 4.4.** Estructura general de los *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos.

Por tanto, nuestro interés en utilizar *p*-sulfonatocalix[*n*]arenos (a partir de ahora se abreviarán como SCX*n*) en medio acuoso aumenta considerablemente, y para ello podemos apoyarnos en estudios previos de estos macrociclos. Shinkai determinó las constantes de asociación *K* y los parámetros termodinámicos de la complejación de cationes trimetilaniinio y 1-adamantiltrimetilamonio en agua.<sup>37,38</sup> Por su parte, Gokel y Kaifer estudiaron la inclusión de derivados de ferroceno con SCX6, observando que este macrociclo tiene una buena afinidad por iones trimetilamonio voluminosos.<sup>39</sup>

Con huéspedes biológicos también hay sistemas donde se han empleado SCX*n*. Allá por 1995 Lehn determinó las constantes de asociación (*K*) de acetilcolina con SCX4 y SCX6 obteniendo valores de  $5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  y  $8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  respectivamente.<sup>40</sup> Shinkai desarrolló un sistema fluorescente para la detección de acetilcolina mediante el desplazamiento de un catión pireno del interior de SCX6 (Figura 4.2) en agua/metanol.<sup>41</sup> Nau por su parte, diseñó un sensor fluorescente

de acetilcolina y colina que incluye SCX4, lucigenina y las enzimas *acetilcolinesterasa* y *colina oxidasa*.<sup>42</sup>

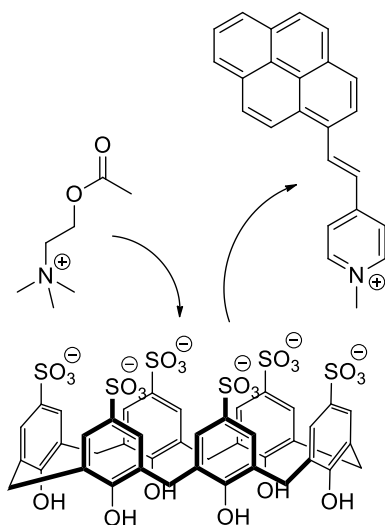


**Figura 4.2.** Desplazamiento de derivado de pireno por acetilcolina de SCX6.<sup>9</sup>

La afinidad por aminoácidos ha sido igualmente estudiada, observándose para el SCX4 la formación de complejos 1:1, siendo más fuertes con aminoácidos básicos como la arginina y la lisina que con aminoácidos alifáticos o aromáticos como valina, leucina, fenilalanina, histidina y triptófano.<sup>43,44</sup> A pH 5 la interacción electrostática de arginina y lisina con el macrociclo es considerable con  $K$  del orden de  $10^3 \text{ M}^{-1}$  (ver Figura 4.3).<sup>9,44</sup>

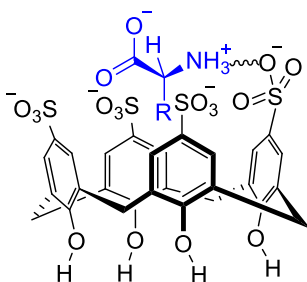
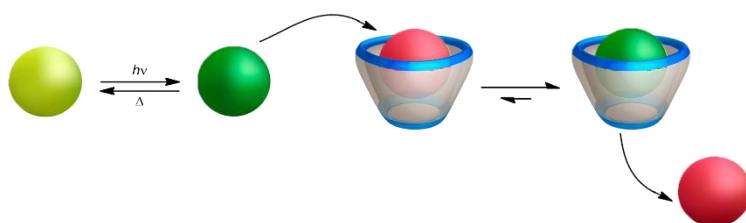


**Figura 4.3.** Inclusión de un aminoácido en SCX4.<sup>9</sup>

Además, arginina y lisina tienen un papel fundamental en la secuencia de péptidos que están implicados en los sitios de reconocimiento de los GAGs.<sup>44</sup>

Considerando todo lo anterior, y los trabajos previos sobre sistemas que incorporan el interruptor molecular *trans*-chalcona/flavilio para el desplazamiento fotoactivado de huéspedes del interior de macrociclos (en nuestro caso cucurbit[*n*]urilos, CB*n*),<sup>45,46</sup> se ha decidido emplear por primera vez la luz como estímulo para, formando un catión flavilio que actúe como competidor, desplazar huéspedes de interés del interior de macrociclos (sin modificaciones sintéticas) altamente solubles en agua como son los SCX*n*.

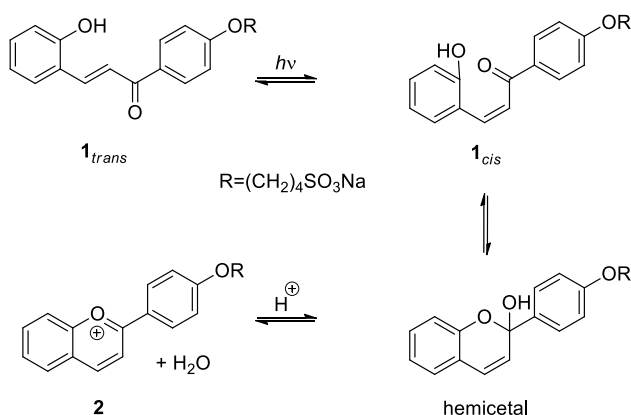
El sistema que se describe en este capítulo consta de un anfitrión SCX4, los huéspedes biológicos lisina, arginina y acetilcolina, y una *trans*-chalcona como precursora de un competidor flavilio (Esquema 4.5).



**Esquema 4.5.** Representación del principio de liberación activada con luz desarrollada en este capítulo. **Amarillo:** *trans*-chalcona, **verde:** catión flavilio, **rojo:** lisina, arginina o acetilcolina, **azul:** SCX4.

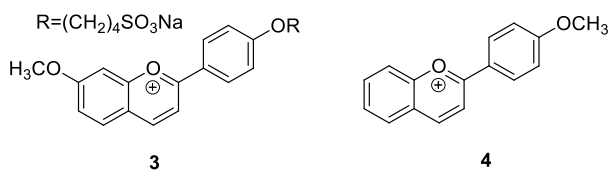
## 4.2. CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA CHALCONA/FLAVILIO

Al igual que en el capítulo 3 de esta tesis doctoral, en este trabajo se utiliza un interruptor molecular (Esquema 4.6) que permite la transposición inducida con luz UV entre una chalcona neutra (**1**) y un ion flavilio cargado (**2**), que tiene una afinidad por el macrociclo anfitrión cuatro órdenes de magnitud mayor que su precursor no cargado (ver en apartado 4.3).



**Esquema 4.6.** Reacciones químicas reversibles del sistema chalcona (**1**)/flavilio (**2**).

La *trans*-chalcona (**1**) soluble en agua se intercambia con otras especies mediante estímulos de pH y luz de la misma manera que lo hacen otros sistemas de flavilio (Esquema 4.7), como el 4-metoxiflavilio (**3**) presentado en el Capítulo 3 de esta tesis<sup>46</sup> o el 4'-metoxiflavilio (**4**) descrito por Pina.<sup>47,48</sup>



**Esquema 4.7.** Estructuras de derivados de flavilio **3** y **4** estudiados anteriormente.<sup>46-48</sup>

La transformación de **1<sub>trans</sub>** en **2** así como la correspondiente reacción inversa térmicamente activada para pasar de **2** a **1<sub>trans</sub>** ya han sido caracterizadas previamente<sup>45</sup> por lo que en este capítulo solo se resumen las principales características de estos procesos.

Para lograr una formación cuantitativa de catión flavilio (**2**) partiendo de *trans*-chalcona (**1**) es necesario irradiar una disolución acuosa de ésta en torno a 366 nm a pH ácido. Esta transformación tiene un rendimiento cuántico ( $\Phi$ ) de 0.08 y se puede monitorizar tanto por espectroscopia de absorción UV/vis, donde aparece la banda característica a 437 nm de **2**, como por espectroscopia de <sup>1</sup>H-RMN.<sup>45</sup>

La reversibilidad del sistema se alcanza calentando la disolución de **2** aproximadamente a 70 °C para obtener **1<sub>trans</sub>** con un rendimiento del 94% ( $k_{\text{obs}} = 3.97 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ).<sup>45</sup>

El  $\text{pK}_a$  aparente de la transformación **1<sub>trans</sub>** → **2** resulta de gran utilidad para determinar el pH adecuado en el que trabajar con el sistema. Entonces, teniendo en cuenta el valor de  $\text{pK}_a$  4.2 (Figura 4.4), sería adecuado para nuestro interruptor molecular trabajar a pH no superior a 4. Pero hay que tener en cuenta que en medio muy

ácido (pH 1) el sistema no se comporta de forma reversible debido a la alta estabilidad del catión flavilio (la conversión térmica de **2** a **1<sub>trans</sub>** tiene un tiempo de vida medio de 100 días más o menos).<sup>45</sup>

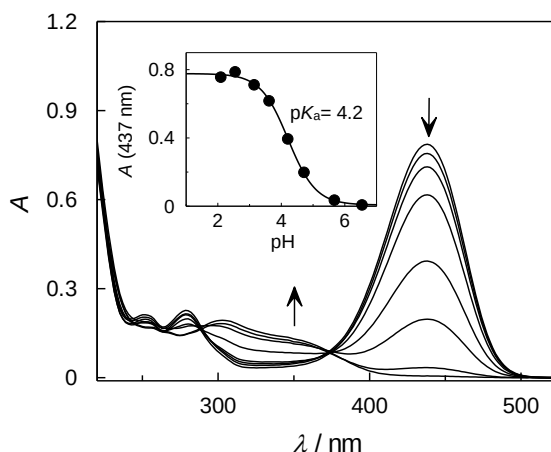
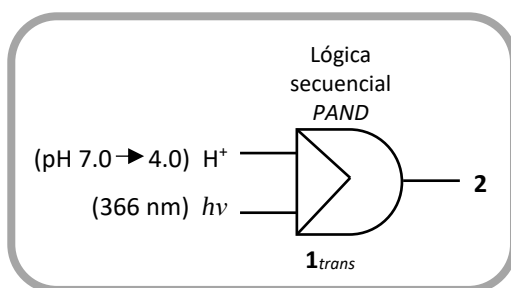


**Figura 4.4.** Espectros de absorción UV/vis después de irradiar hasta el estado fotoestacionario una disolución de **1<sub>trans</sub>** (19  $\mu$ M) en agua a diferentes pH. Figura insertada: curva de valoración de pH correspondiente (a 437 nm).<sup>45</sup>

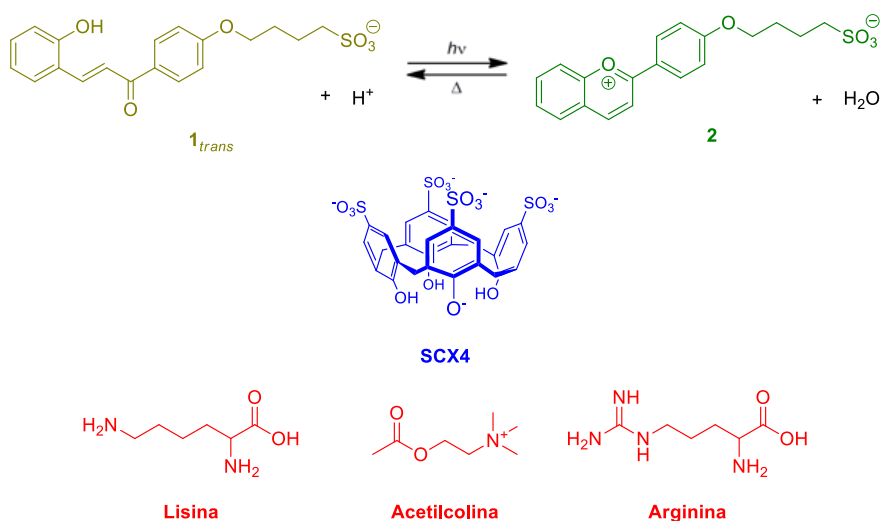
En cuanto a la lógica secuencial del sistema **1<sub>trans</sub>**/**2** se deduce la existencia de una puerta lógica *PAND* (descrita con detalle en el Capítulo 3 de esta tesis doctoral) similar a la del sistema del flavilio **3** (Esquema 4.8).



**Esquema 4.8.** Puerta lógica *PAND* de la conversión de **1<sub>trans</sub>** en **2**.

### 4.3. CARACTERIZACIÓN SUPRAMOLECULAR DE LOS COMPLEJOS INDIVIDUALES DE LISINA, ARGININA, ACETILCOLINA Y FLAVILIO CON SCX4

En primer lugar, se determinaron por separado las afinidades de cada una de las especies biológicas (lisina, arginina y acetilcolina) con el anfitrión SCX4 (estructuras en Esquema 4.9) en medio acuoso en condiciones de acidez adecuadas para que en los experimentos posteriores de desplazamiento con el catión flavilio se lograra un balance favorable entre la máxima liberación de los huéspedes del interior de la cavidad y la recuperación del flavilio para volver a chalcona, consiguiéndose así que el sistema sea reversible.



**Esquema 4.9.** Interruptor molecular (*trans*-chalcona **1**/flavilio **2**), macrociclo SCX4 y compuestos biológicos utilizados en este estudio.

Se realizaron las valoraciones directas de lisina, arginina y acetilcolina con SCX4 siguiéndolas por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN (Figuras 4.5, 4.6 y 4.7) a pD 4.5 (aunque este valor está por encima

del  $pK_a$  de la transformación de **1**<sub>trans</sub> en **2**, no impide que se consiga un buen desplazamiento del huésped correspondiente y posterior recuperación del sistema en los experimentos de liberación, ver apartado 4.4).

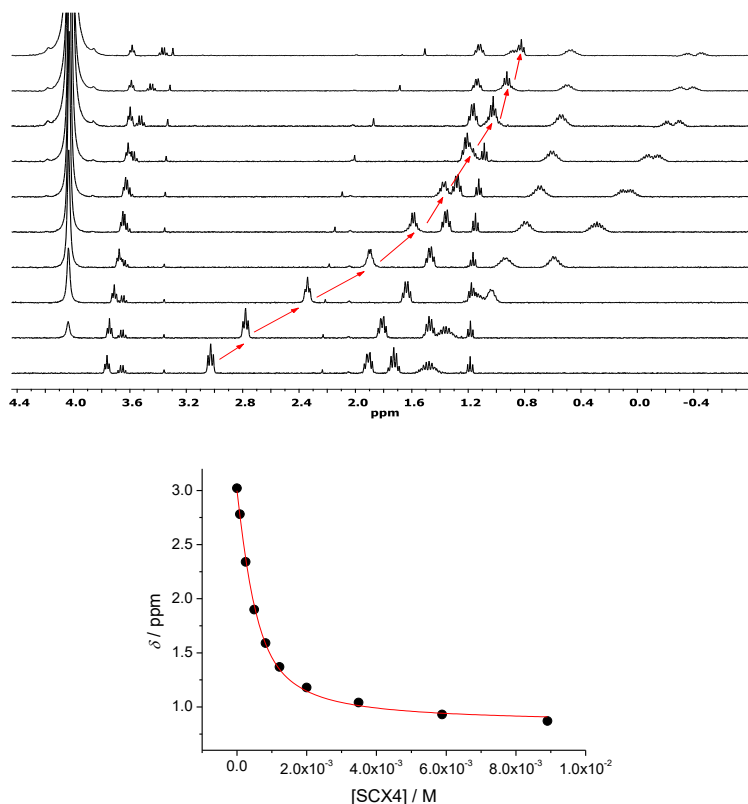


**Figura 4.5.** Arriba: espectros de <sup>1</sup>H-RMN de la valoración de lisina (0.5 mM) con SCX4. Abajo: desplazamiento químico de una señal de <sup>1</sup>H-RMN de lisina frente a la concentración de SCX4. La línea roja muestra el ajuste correspondiente.

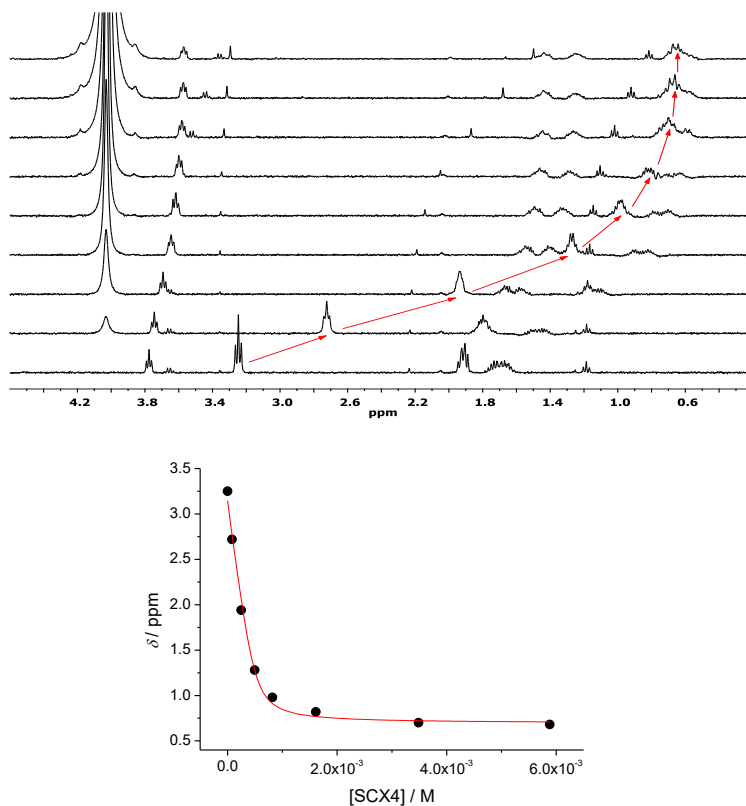
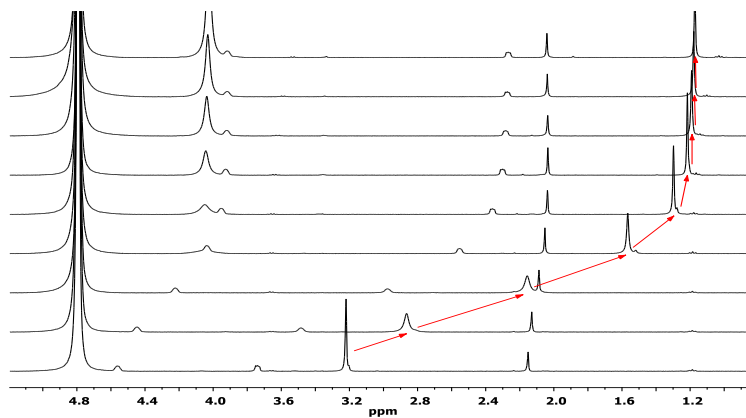


**Figura 4.6.** Arriba: espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la valoración de arginina (0.5 mM) con SCX4. Abajo: desplazamiento químico de una señal de  $^1\text{H}$ -RMN de arginina frente a la concentración de SCX4. La línea roja muestra el ajuste correspondiente.



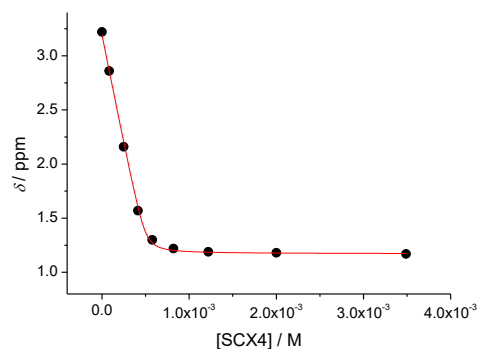
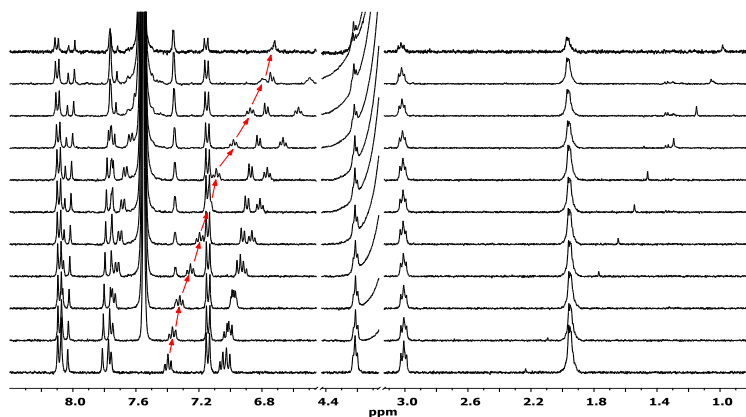


**Figura 4.7.** Arriba: espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la valoración de acetilcolina (0.5 mM) con SCX4. Abajo: desplazamiento químico de una señal de  $^1\text{H}$ -RMN de acetilcolina frente a la concentración de SCX4. La línea roja muestra el ajuste correspondiente.

Asimismo, para **1**<sub>trans</sub> y **2** también se determinó sus afinidades con SCX4, a pD 7.0 para la chalcona neutra monitorizando por  $^1\text{H}$ -RMN y a pH 2 para el catión flavilio siguiendo por espectroscopia de fluorescencia (Figuras 4.8 y 4.9).



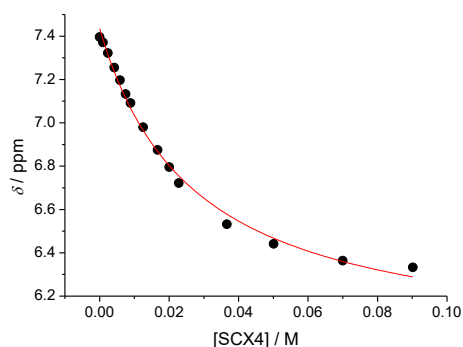


**Figura 4.8.** Arriba: espectros de  $^1\text{H}$ -RMN de la valoración de **1** (0.5 mM) con SCX4. Abajo: desplazamiento químico de una señal de  $^1\text{H}$ -RMN de **1** frente a la concentración de SCX4. La línea roja muestra el ajuste correspondiente.

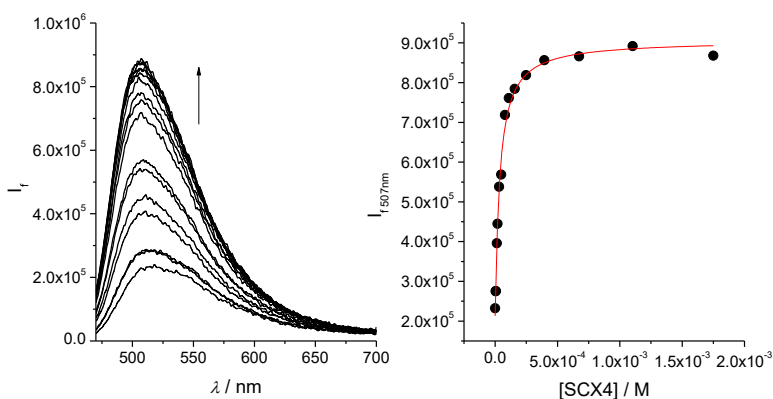


**Figura 4.9.** Izquierda: espectros de fluorescencia ( $\lambda_{\text{exc}} = 462 \text{ nm}$ ) de la valoración de **2** (4  $\mu\text{M}$ ) con SCX4. Derecha: curva de valoración de fluorescencia (a 507 nm). La línea roja muestra el ajuste correspondiente.

En las condiciones elegidas, los aminoácidos lisina y arginina mostraron una interacción eficiente con la cavidad, aunque menor que el ion amonio cuaternario de la acetilcolina, abarcando entre ellos un rango de afinidad de  $10^3$  a  $10^5 \text{ M}^{-1}$ . Para la chalcona **1<sub>trans</sub>** la constante de asociación tiene un valor muy bajo ( $3.7 \cdot 10^1 \text{ M}^{-1}$ ),

como consecuencia de no existir interacción alguna. Por último el catión flavilio **2** (cuya formación total mediante irradiación a 366 nm de **1** en medio ácido es controlada por espectroscopia de absorción UV/vis) muestra una alta afinidad por el SCX4 con  $K = 2.9 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$  (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Afinidad de las diferentes especies con SCX4.

| Huésped                         | $K (10^3 \text{ M}^{-1})$ | pH  |
|---------------------------------|---------------------------|-----|
| Lisina                          | 3.9                       | 4.5 |
| Arginina                        | 28                        | 4.5 |
| Acetilcolina                    | 190                       | 4.5 |
| <i>trans</i> -Chalcona <b>1</b> | 0.0037                    | 7.0 |
| Flavilio <b>2</b>               | 29                        | 2.0 |

#### 4.4. LIBERACIÓN FOTOACTIVADA DE LISINA, ARGININA Y ACETILCOLINA DE SCX4

Una vez llevada a cabo la caracterización de los complejos individuales, se está en disposición de examinar la liberación inducida mediante un estímulo externo como la luz, de los huéspedes biológicos de interés del macrociclo. Para ello se estudiaron los desplazamientos competitivos con **2** mediante espectroscopia de RMN, en diferentes condiciones variando el pH y las concentraciones de anfitrión, huésped y competidor.

En condiciones muy ácidas, a pH 2, la especie activada fotoquímicamente **2** muestra una alta capacidad de competir, desplazando casi la totalidad de la carga fuera del SCX4 (Figura 4.10). Pero, como ya se conoce, en esas condiciones el catión flavilio es tan estable que el sistema no es reversible.

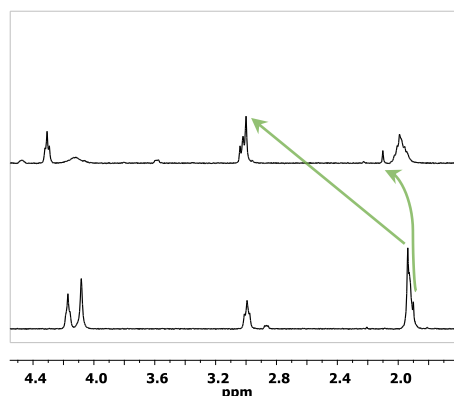


**Figura 4.10.** Abajo: espectro parcial de  $^1\text{H}$ -RMN de acetilcolina (0.1 mM), SCX4 (0.25 mM) y **1** (1 mM) en  $\text{D}_2\text{O}$  a pD 2. Arriba: espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la muestra anterior irradiada a 366 nm durante 1 hora. Las flechas verdes indican el desplazamiento de dos señales representativas de acetilcolina.

Así, es necesario encontrar un medio moderadamente ácido donde funcione bien el desplazamiento y el competidor pueda retornar a su forma **1<sub>trans</sub>**. Esto se consigue a pH 4.5 y dependiendo de la afinidad de cada huésped es posible liberar más o menos de la cavidad del SCX4. También se optimizaron las concentraciones de las especies para lograr el mejor funcionamiento del sistema posible.

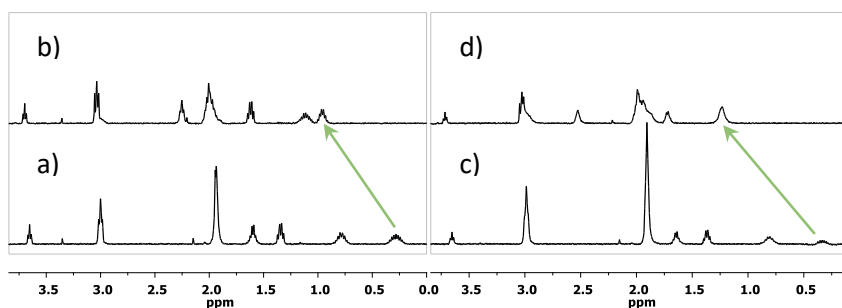


**Figura 4.11.** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  (pD 4.5, buffer acetato 5 mM). a) Lisina (0.5 mM), SCX4 (1 mM) y **1** (1 mM). b) Muestra a) irradiada a 366 nm durante 1 h. c) Lisina (0.5 mM), SCX4 (1 mM) y **1** (2 mM). d) Muestra c) irradiada a 366 nm durante 3.5 h. Las flechas verdes indican el desplazamiento de una señal representativa de lisina.

Como se puede apreciar en la Figura 4.11, doblando los equivalentes de flavilio, se consigue un mayor desplazamiento para un mismo huésped, en este caso lisina. Lo mismo se realizó para los otros dos huéspedes (Figura 4.12) hasta encontrar las concentraciones adecuadas.

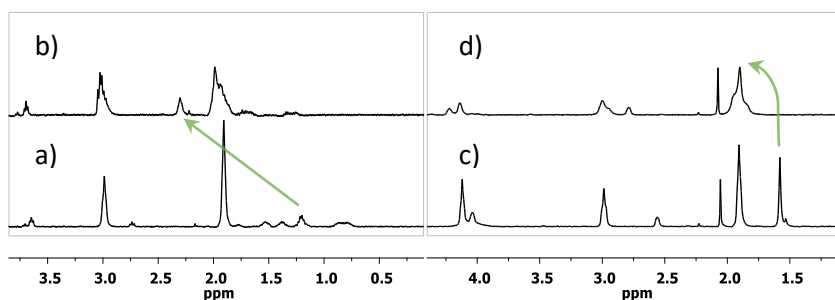


**Figura 4.12.** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  (pD 4.5, buffer acetato 5 mM). a) Arginina (1 mM), SCX4 (1 mM) y **1** (2 mM). b) Muestra a) irradiada a 366 nm durante 3.5 h. c) Acetilcolina (0.5 mM), SCX4 (0.5 mM) y **1** (2 mM). d) Muestra c) irradiada a 366 nm durante 3.5 h. Las flechas verdes indican el desplazamiento de una señal representativa de arginina y acetilcolina.

Para demostrar la reversibilidad total del sistema, fue necesario calentar a 60 °C las muestras y volver a adquirir los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN. En la Figura 4.13 se puede observar la caracterización de este proceso para lisina.

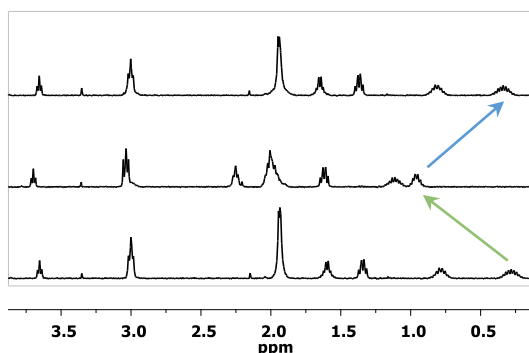


**Figura 4.13.** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  (pD 4.5, buffer acetato 5 mM). Abajo: lisina (0.5 mM), SCX4 (1 mM) y **1** (1 mM). Centro: muestra a) irradiada a 366 nm durante 1 hora. Arriba: muestra b) calentada a 60 °C durante 6 horas. Las flechas verde y azul indican el desplazamiento de una misma señal representativa de lisina tras irradiar y calentar respectivamente.

Finalmente se probó el sistema a pH neutro y como era de esperar no se liberó nada del macrociclo (Figura 4.14), debido a que no se encuentra la cantidad necesaria de protones en el medio para que se produzca la formación del catión flavilio.

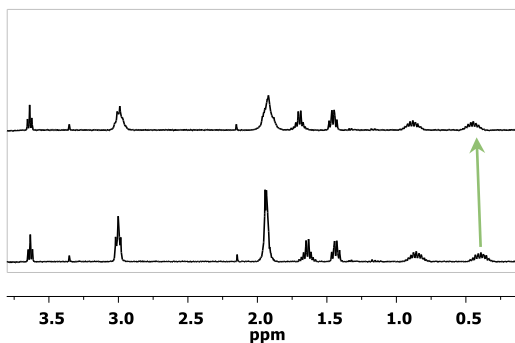


**Figura 4.14.** Espectros parciales de  $^1\text{H}$ -RMN en  $\text{D}_2\text{O}$  (pD 7.5, buffer fosfato 5 mM). Abajo: lisina (0.5 mM), SCX4 (1 mM) y **1** (1 mM). Arriba: muestra a) irradiada a 366 nm durante 1 hora. La flecha verde indica el desplazamiento de una señal representativa de lisina.

En la Tabla 4.2 se cuantifican los diferentes estudios de liberación fotoinducida realizados en términos de porcentaje de huésped complejoado:

**Tabla 4.2.** Liberación de huéspedes de SCX4.

| Huésped      | pD  | % complejoado<br>antes de irradiar | % complejoado<br>después de irradiar |
|--------------|-----|------------------------------------|--------------------------------------|
| Acetilcolina | 2   | 71                                 | 12                                   |
| Lisina       | 4.5 | 64                                 | 23                                   |
| Arginina     | 4.5 | 80                                 | 37                                   |
| Acetilcolina | 4.5 | 80                                 | 64                                   |
| Lisina       | 7.5 | 62                                 | 59                                   |
| Arginina     | 7.5 | 78                                 | 74                                   |
| Acetilcolina | 7.5 | 98                                 | 98                                   |

Para calcular los % de la tabla superior se ha utilizado la fórmula siguiente, considerando el desplazamiento químico ( $\delta$ ) de una misma señal de  $^1\text{H}$ -RMN:

$$\% \text{ complejoado} = \frac{\delta_{\text{obs}} - \delta_{\text{huésped libre}}}{\delta_{\text{complejo}} - \delta_{\text{huésped libre}}}$$

De los resultados obtenidos cabe destacar que la efectividad del sistema para la administración de estos fármacos sigue el siguiente

orden: lisina > arginina > acetilcolina. Además si nos fijamos en una misma especie, por ejemplo acetilcolina, cuanto mayor es la concentración de protones (pH más bajo) menor es su complejación inicial debido a la competición que ejercen éstos por entrar en la cavidad, sin embargo, mayor es su liberación. Por lo tanto a pH 4.5 se consigue un balance favorable entre estas dos situaciones además de la recuperación del sistema hasta el estado inicial.

## 4.5. CONCLUSIONES

Se ha desarrollado con éxito un sistema de liberación controlada de especies de elevado interés biológico como son los aminoácidos lisina y arginina y el neurotransmisor acetilcolina. Para ello, se ha utilizado un interruptor molecular *trans*-chalcona/flavilio controlable mediante estímulos de luz y pH aplicados de manera secuencial (primero se aumenta la acidez del medio a pH 4.5 y después se expone a luz UV de 366 nm). Como cápsula portadora se ha usado un macrociclo *p*-sulfonatocalix[4]areno altamente soluble en agua y cuya afinidad con los huéspedes ha sido determinada, comprendiendo un rango de 2 órdenes de magnitud.

Para lograr el máximo rendimiento del sistema, se han optimizado las condiciones del desplazamiento fotoinducido en términos de concentración de las especies implicadas y de la acidez del medio, consiguiéndose muy buenos resultados con este método para la administración de los medicamentos. Así mismo, se logra la reversibilidad total del sistema mediante la reacción inversa,

activada térmicamente, del catión flavilio para dar el producto inicial *trans*-chalcona.

## 4.6. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### Materiales y métodos.

Acetilcolina, lisina y arginina son productos comerciales en TCI, Sigma-Aldrich y Merck respectivamente, con alta pureza y se usaron tal como se recibieron. El SCX4 en su forma de sal sódica también fue adquirido en Sigma-Aldrich. La chalcona **1** estaba disponible de estudios previos.<sup>45</sup>

Los experimentos de valoración directa se realizaron añadiendo SCX4 a la disolución del huésped al pH deseado. La concentración del huésped fue compensada en la disolución madre de SCX4, para evitar efectos de dilución durante la titulación. Para las valoraciones a pD 4.5 fue necesario usar buffer acetato 5 mM.

Respecto a los experimentos de fotoliberación, se optimizaron las concentraciones relativas de chalcona **1** y complejo huésped-SCX4 para lograr el máximo desplazamiento del huésped. Lo mismo se hizo con el valor de pD, que fue controlado usando un buffer fosfato en las medidas a pD 7.5 y un buffer acetato en las medidas a pD 4.5.

El pH de las disoluciones se ajustó con HCl o NaOH y se midió con un pH-metro Crison basic 20+.

Las irradiaciones se llevaron a cabo con una lámpara de Xenon-Hg usando un filtro de 366 nm.

Para adquirir los espectros de fluorescencia se usó un SPEX Fluorolog-3 modelo FL3-22.

Los experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN se realizaron en un espectrómetro Bruker AMX-400 a 400 MHz. Las disoluciones para RMN se prepararon en  $\text{D}_2\text{O}$  y el pD se ajustó con DCl o NaOD. Las correcciones debidas a los efectos isotópicos se hicieron usando la ecuación  $\text{pD} = \text{pH}^* + 0.4$ , donde  $\text{pH}^*$  es la lectura tomada del pHmetro.

## 4.7. REFERENCIAS

- [1] F. Arnaud-Neu, M.-J. Schwing-Weill, *Synthetic Metals* **1997**, *90*, 157.
- [2] A. Zinke, E. Ziegler, *Chem. Ber.* **1944**, *77*, 264.
- [3] J. W. Cornforth, P. D'A Hart, G. A. Nicholls, R. J. W. Rees, J. A. Stock, *Br. J. Pharmacol.* **1955**, *10*, 73.
- [4] B. T. Hayes, R. F. Hunter, *Chem. Ind* **1956**, 193; *J. Appl. Chem.* **1958**, *8*, 743.
- [5] H. Kämmerer, G. Happel, F. Caesar, *Makromol. Chem.* **1972**, *162*, 179.
- [6] C. D. Gutsche, R. Muthukrishnan, *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 4905.
- [7] A. Arduini, A. Pochini, S. Reverberi, R. Ungaro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 981.

- [8] T. Nagasaki, Y. Tajiri, S. Shinkai, *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas* **1993**, *112*, 407.
- [9] A. Späth, B. König, Beilstein *J. Org. Chem.* **2010**, *6*, doi:10.3762/bjoc.6.32.
- [10] S. Shinkai, H. Kawabata, T. Matsuda, H. Kawaguchi, O. Manabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1990**, *63*, 1272.
- [11] A. Ikeda, S. Shinkai, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1713.
- [12] A. T. Yordanov, D. M. Roundhill, *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *170*, 93.
- [13] P. D. Beer, *Chem. Commun.* **1996**, *0*, 689.
- [14] J. L. Atwood, K. T. Holman, J. W. Steed, *Chem. Commun.* **1996**, *0*, 1401.
- [15] U. Darbost, X. Zeng, M. Giorgi, I. Jabin, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10552.
- [16] D. Diamond, *J. Inclusion Phenom. Mol. Recognit. Chem.* **1994**, *19*, 149.
- [17] D. Diamond, M. A. McKervey, *Chem. Soc. Rev.* **1996**, *25*, 15.
- [18] M. Giannetto, G. Mori, A. Notti, S. Pappalardo, M. F. Parisi, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4631.
- [19] N. V. Shvedene, M. Y. Nemilova, V. V. Kovalev, E. A. Shokova, I. V. Pletnev, *Sens. Actuators B* **1995**, 372.

- [20] S. Moerkerke, V. Malytskyi, L. Marcélis, J. Wouters, I. Jabin, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 8967.
- [21] K. Araki, H. Shimizu, S. Shinkai, *Chem. Lett.* **1993**, *22*, 205.
- [22] J. L. Atwood, A. J. Szumna, *Supramol. Chem.* **2002**, *2*, 479.
- [23] J. Hong, J. Song, S. Ham, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 1327.
- [24] R. Arnecke, V. Böhmer, R. Cacciapaglia, A. Dalla Cort, L. Mandolini, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4901.
- [25] A. Casnati, P. Jacopozzi, A. Pochini, F. Ugozzoli, R. Cacciapaglia, L. Mandolini, R. Ungaro, *Tetrahedron* **1995**, *51*, 591.
- [26] C. D. Gutsche, M. Iqbal, I. Alam, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 4314.
- [27] G. Görmär, K. Seiffarth, M. Schulz, C. L. Chachimbombo, *J. Prakt. Chem.* **1991**, *333*, 475.
- [28] P. Thuéry, Z. Asfari, M. Nierlich, J. Vicens, *Acta Crystallogr. Sect. C: Cryst. Struct. Commun.* **2002**, *58*, o223.
- [29] R. E. Hileman, J. R. Fromm, J. M. Weiler, R. J. Linhardt, *Bioessays* **1998**, *20*, 156.
- [30] J. Folkman, Y. Shing, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1992**, *313*, 355.
- [31] L. Kjellen, U. Lindahl, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, *60*, 443.
- [32] A. T. Riegel, A. Wellstein, *Breast Ca. Res. Treatment* **1994**, *31*, 309.

- [33] K. M. Hwang, Y. M. Qi, S. Y. Liu, PCT Int. Appl. WO 92122709, 1992; S. J. Harris, PCT Int. Appl. WO 0244121, 2002.
- [34] J. L. Atwood, R. J. Bridges, R. K. Junega, A. K. Singh, U.S. Patent 5489612 A, 1996.
- [35] K. M. Hwang, Y. M. Qi, S. Y. Liu, W. Choy, J. Chen, U.S. Patent 5441983 A, 1995.
- [36] D. Hulmes, E. Aubert-Foucher, A. Coleman, PCT Int. Appl. WO 2000007585, 2000.
- [37] S. Shinkai, K. Araki, T. Matsuda, O. Manabe, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1989**, 62, 3856.
- [38] S. Shinkai, K. Araki, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110, 7214.
- [39] L. Zhang, A. Macias, T. Lu, J. L. Gordon, G. W. Gokel, A. E. Kaifer, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1017.
- [40] J. M. Lehn, R. Meric, J. P. Vigneron, M. Cesario, J. Guilhem, C. Pascard, Z. Asfari, J. Vicens, *Supramol. Chem.* **1995**, 5, 97.
- [41] K. N. Koh, K. Araki, A. Ikeda, H. Otsuka, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 755.
- [42] D.-S. Guo, V. D. Uzunova, X. Su, Y. Liu, W. M. Nau, *Chem. Sci.* **2011**, 2, 1722.
- [43] G. Arena, A. Casnati, A. Contino, A. Magri, F. Sansone, D. Sciotto, R. Ungaro, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, 4, 243.

- [44] N. Douteau-Guével, F. Perret, A. W. Coleman, J.-P. Morel, N. Morel-Desrosiers, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **2002**, 524.
- [45] N. Basílio, U. Pischel, *Chem. Eur. J.* **2016**, 22, 15208.
- [46] M. A. Romero, R. J. Fernandes, Artur J. Moro, N. Basílio, U. Pischel, *Chem. Comm.* **2018**, 54, 13335.
- [47] F. Pina, M. J. Melo, C. A. T. Laia, A. J. Parola, J. C. Lima, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 869.
- [48] F. Pina, M. J. Melo, M. Maestri, R. Ballardini, V. Balzani, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5556.

## ***CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES GENERALES***

## 5.1. CONCLUSIONES GENERALES

La importancia que ha adquirido el diseño de sistemas supramoleculares con anfitriones sintéticos que tengan la capacidad de reproducir el comportamiento de biomoléculas en medio acuoso, es el principal motivo que ha impulsado el desarrollo de esta tesis doctoral.

En primer lugar, en el Capítulo 1, se realiza una descripción amplia de la química anfitrión-huésped y de las propiedades de los macrociclos  $CB_n$ , así como de las aplicaciones de sus complejos supramoleculares en el ámbito biológico. Todo esto ayuda a reforzar la idea de que los  $CB_n$  son excelentes candidatos para alcanzar el objetivo de diseñar sistemas supramoleculares con moléculas bioactivas y modular su funcionamiento con luz, con el fin de conseguir realizar de manera controlada la liberación de estas especies de interés en agua.

En el Capítulo 2 se lleva a cabo la caracterización de los complejos de varios productos naturales de la familia de los terpenos con los anfitriones homólogos  $CB_7$  y  $CB_8$ . En el caso de los complejos con la cavidad de mayor tamaño se han descubierto interacciones con afinidades del orden de nanomolar. Con el homólogo más pequeño  $CB_7$  los huéspedes terpénicos muestran afinidades menores, en un rango que comprende cuatro órdenes de magnitud, situación adecuada que permitió llevar a cabo el desplazamiento fotoactivado de estas especies de sus complejos de manera selectiva y secuencial, mediante la generación de un competidor protegido inicialmente

con el grupo fotolábil *o*-nitrobencilo. Este sistema se puede utilizar con otros huéspedes funcionales debido a que no es necesario que ni el anfitrión ni el huésped sean activos fotoquímicamente.

Otro sistema de liberación controlada desarrollado con éxito se muestra en el Capítulo 3, y consiste en la utilización de un interruptor molecular *trans*-chalcona/flavilio para lograr el desplazamiento del tripéptido Phe-Gly-Gly alojado previamente en la cavidad del CB8. El funcionamiento del sistema depende de la aplicación de dos estímulos diferentes (ácido y luz) según una secuencia lógica con prioridad (puerta lógica *PAND*) que insta a bajar primero el pH para después proceder a la irradiación con luz UV. Sólo esta secuencia forma el catión flavilio con capacidad de competir. El complejo formado por el huésped biológico con el CB8 es de carácter ternario con dos moléculas de tripéptido en el interior del macrociclo y aun así el flavilio elegido tiene la capacidad de competir e inducir la liberación deseada.

Finalmente, en el Capítulo 4, se consigue el funcionamiento de un tercer sistema para la liberación controlada de los aminoácidos lisina y arginina y el neurotransmisor acetilcolina. Como anfitrión en este sistema se utiliza el *p*-sulfonatocalix[4]areno (SCX4) que tiene una solubilidad en agua alta. Se han caracterizado los complejos supramoleculares de los huéspedes bioactivos con el macrociclo con afinidades que abarcan 2 órdenes de magnitud. Como especie competidora se utiliza un flavilio diferente generado a partir de su forma de *trans*-chalcona de manera similar a la descrita en el

Capítulo 3. Los resultados obtenidos para la liberación de los huéspedes son buenos y además la reversibilidad del sistema se consigue mediante activación térmica.

El conjunto de los resultados cumple con el objetivo inicial de lograr la liberación controlada con luz de los huéspedes bioactivos de sus complejos anfitrión-huésped. El concepto genereal es muy flexible y se puede extender potencialmente a otros huéspedes, anfitriones y competidores fotoactivables.

## **5.2. GENERAL CONCLUSIONS**

The importance of the design of supramolecular systems with synthetic hosts that have the ability to reproduce the behaviour of biomolecules in aqueous media, is the main reason that has driven the development of this doctoral thesis.

First, in Chapter 1, a general description of the host-guest chemistry and the properties of the CB $n$  macrocycles, as well as the applications of their supramolecular complexes in the biological field, is provided. This strengthens the idea that CB $n$  are excellent candidates to achieve the goal of designing supramolecular systems with bioactive molecules and modulate their operation with light, in order to achieve a controlled release of these species of interest in water.

In Chapter 2, the characterization of the complexes of several natural products of the terpene family with homologous hosts CB7 and CB8 is described. In the case of the complexes with the larger

CB8 cavity, interactions in the order of nanomolar affinity have been discovered. With the smaller CB7 homologue the terpenic guests show lower affinities, in a range of four orders of magnitude, an adequate situation that allowed to accomplish the photoactivated displacement of these species of their complexes in a selective and sequential manner, by generating an initially protected competitor with the photolabile *o*-nitrobenzyl group. This system can be used with other functional guests because it is not necessary that the host or the guest are photochemically active.

Another successfully developed controlled release system is shown in Chapter 3, and consists of the use of a *trans*-chalcone/flavylium molecular photoswitch to achieve the displacement of the tripeptide Phe-Gly-Gly previously located in the CB8 cavity. The operation of the system depends on the application of two different stimuli (acid and light) according to a logical sequence with priority (*PAND* logic gate) that urges to lower the pH first and then proceed to irradiate with ultraviolet light. Only this sequence forms the flavylium cation with the capacity to compete. The complex formed by the biological guest with the CB8 has ternary character, containing two molecules of tripeptide in the macrocycle and the chosen flavylium has the ability to compete and induce the desired release.

Finally, in Chapter 4, the operation of a third system for the controlled release of the aminoacids lysine and arginine and the neurotransmitter acetylcholine is achieved. As the host in this

system *p*-sulfonatecalix[4]arene (SCX4) is used, which has a high water solubility. The supramolecular complexes of bioactive guests have been characterized with the macrocycle with affinities spanning two orders of magnitude. As a competing species a different flavilyum generated from its *trans*-chalcone form is used in a similar way as described in Chapter 3. The results obtained for the release of the guests are good and also the reversibility of the system is achieved by thermal activation.

The combined results validate the initial objective of achieving light-controlled release of bioactive guests from discrete host-guest complexes. The general conceptual approach is highly flexible and can be potentially extended to other guests, hosts and phototriggers.

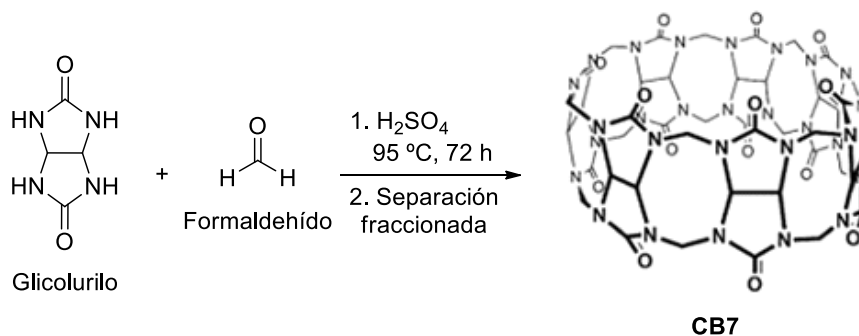
## ***CAPÍTULO 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL GENERAL***

## 6.1. DESARROLLO EXPERIMENTAL GENERAL

### 6.1.1. Síntesis de CB7

La síntesis de CB7 se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Nau<sup>1</sup> variando la purificación final, que fue optimizada por Basílio en la Universidad Nova de Lisboa.

El glicolurilo (97%) y el formaldehído (disolución acuosa al 37%) se adquirieron en Sigma-Aldrich, el ácido sulfúrico (98 %) y el ácido maleico (estándar para RMN) en Fluka y la acetona en VWR.



**Esquema 5.1.** Síntesis y purificación de CB7

Se añaden a un matraz de fondo redondo formaldehído (20 ml de una disolución acuosa al 37%) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  9 M (60 ml), y se enfría la mezcla en un baño de hielo con agitación. Cuando la mezcla se encuentra a 5 °C, se añaden al matraz de reacción 11.4 g de glicolurilo en pequeñas porciones (muy lentamente durante 2 horas) manteniendo la temperatura en 5 °C. Una vez añadido todo el glicolurilo, se coloca la mezcla a 95°C durante 72h (inicialmente se observa un gel que al calentar se disuelve por completo).

Pasado ese tiempo, se vierte la mezcla de reacción en 200 ml de agua Milli-Q y se añaden 800 ml de acetona. Con ello, se induce la precipitación de todos los oligómeros y polímeros CB $n$ . Se decanta la suspensión y a continuación se lava el sólido con 1.5 litros de acetona/agua (8:2 v/v) para eliminar el ácido. Se obtiene una mezcla de CB $n$  en forma de polvo blanco.

Para eliminar la máxima cantidad de CB6, se añaden al sólido obtenido 400 ml de agua Milli-Q y se coloca durante 1 hora en un agitador magnético (la solubilidad en agua del CB6 está limitada a 20  $\mu$ M, mientras que el CB7 es soluble hasta 5 mM). Se filtra la suspensión para separar el CB6 sólido.

Con el objetivo de inducir la precipitación de CB7, se añaden al líquido filtrado 300 ml de acetona. Se aplica agitación durante unos 15 minutos y una vez precipitado el sólido se filtra a vacío y se seca en estufa a 80°C durante 24h. Se caracteriza el producto CB7 por  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 4.16 (d, 14H), 5.47 (s, 14H), 5.72 ppm (d, 14H).

Si el producto contiene > 15% de CB5 ( $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$ : 4.35 (d, 14H), 5.55 (s, 14H), 5.68 ppm (d, 14H)) se adicionan 200 ml de agua Milli-Q sobre el sólido y se aplica agitación durante unos minutos. Para inducir la precipitación de CB7 se añaden 200 ml de metanol (el CB5 es más soluble en la mezcla agua/metanol que el CB7). Se filtra a vacío el sólido y se seca el sólido en estufa a 80°C durante 24h. Se caracteriza el producto por  $^1\text{H}$ -RMN. Saltar este paso si no se tiene CB5.

Finalmente se disuelve el sólido en 20 ml de agua Milli-Q (usar más agua si es necesario hasta que no quede sólido en suspensión) y se deja que difunda acetona en la disolución acuosa durante una semana, de forma que se cristaliza el CB7 y se obtiene puro sin CB5. Pasado este tiempo, se filtran los cristales a vacío hasta sequedad total. Se caracteriza el producto por  $^1\text{H}$ -RMN.

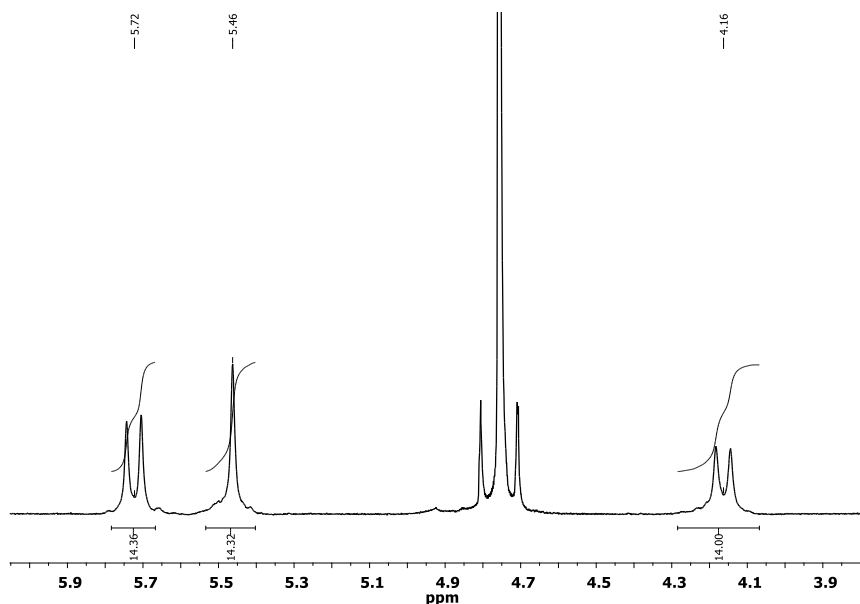


**Figura 5.1.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de CB7

### 6.1.2 Caracterización de CB7 y CB8

Para cuantificar con exactitud la pureza del CB7 sintetizado se recurre al uso de ácido maleico como referencia. Se prepara una muestra de CB7 1 mM y 7 equivalentes de ácido maleico en  $\text{D}_2\text{O}$ . Se adquiere espectro de  $^1\text{H}$ -RMN y se compara la integral de la señal del ácido maleico (6.2 ppm) con las de las señales del CB7. Se repite

este proceso preparando dos muestras más y se calcula el valor medio de los tres resultados en % de pureza.

Por otra parte, el CB8 utilizado en los estudios presentados en los Capítulos 2 y 3 de esta tesis doctoral que fue adquirido en Aldrich no se puede caracterizar por espectroscopia de  $^1\text{H}$ -RMN debido a sus problemas de solubilidad. Por tanto las concentraciones de las disoluciones stock en agua de este macrociclo se cuantificaron por espectroscopia de absorción UV/vis, mediante valoración directa con el colorante perclorato de *p*-*N,N*-dimetilaminofeniltropilio (DMAT).<sup>2</sup> En este experimento se produce un fuerte cambio en la pendiente de la recta al representar la absorbancia a una  $\lambda$  frente a los equivalentes de CB8 (la constante de asociación 2:1 DMAT/CB8 es bastante elevada) que permite determinar la concentración exacta de la disolución stock de CB8.

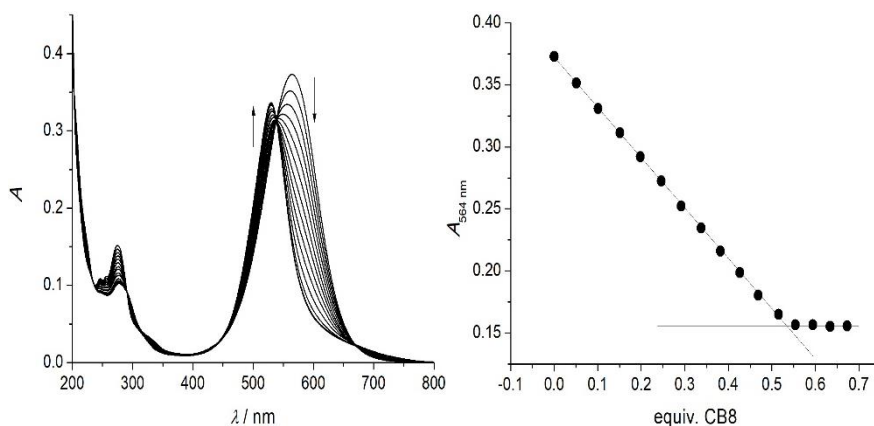


**Figura 5.2.** Izquierda: Espectros de absorción UV/vis de la valoración de DMAT (9.68  $\mu\text{M}$ ) con CB8 en agua a pH 4. Derecha: curva de valoración correspondiente (las líneas representan el ajuste manual de los puntos).

## 6.2. REFERENCIAS

- [1] C. Márquez, F. Huang, W. M. Nau, IEEE Trans. Nanobiosci. 2004, 3, 39–45.
- [2] J. Vázquez, P. Remón, R. N. Dsouza, A. I. Lazar, J. F. Arteaga, W. M. Nau, U. Pischel, Chem. Eur. J. 2014, 20, 9897.

# CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL

## Lista de publicaciones

1. *Photocaged Competitor Guests: A General Approach Toward Light-Activated Cargo Release From Cucurbiturils*. Miguel A. Romero, Nuno Basílio, Artur J. Moro, Mara Domingues, José A. González-Delgado, Jesús F. Arteaga, y Uwe Pischel. *Chemistry – A European Journal*, 2017, 23, 13105-13111.
2. *Terpenes Show Nanomolar Affinity and Selective Binding with Cucurbit[8]uril*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Johan Mendoza, Jesús F. Arteaga, Nuno Basílio, y Uwe Pischel. *Israel Journal of Chemistry*, 2018, 58, 487-492.
3. *Light-induced cargo release from a cucurbit[8]uril host by means of a sequential logic operation*. Miguel A. Romero, Rita J. Fernandes, Artur J. Moro, Nuno Basílio y Uwe Pischel. *Chemical Communications*, 2018, 54, 13335-13338.

## Lista de contribuciones en congresos y jornadas

1. *Binding of terpenes by cucurbituril macrocycles*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Johan Mendoza, Jesús F. Arteaga, Nuno Basílio y Uwe Pischel. **Póster**, 24th International Conference on Physical Organic Chemistry 01-06 Julio de 2018, Faro, Portugal.
2. *Light-induced release of bio-relevant cargo from 4-sulfocalix[4]arene in water*. Miguel A. Romero, Nuno Basílio, Jesús F. Arteaga y Uwe Pischel. **Póster**, Book of abstracts 6<sup>th</sup> Portuguese Young Chemists Meeting 15-18 Mayo de 2018, Setúbal, Portugal.

3. *Delivery of terpenic natural products by means of supramolecular chemistry in water.* Miguel A. Romero, Nuno Basílio, Jesús F. Arteaga y Uwe Pischel. **Comunicación oral**, XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química 25-29 Junio de 2017, Barcelona, España.
4. *Encapsulación de productos naturales terpénicos en cucurbiturilos en disolución acuosa.* Miguel A. Romero, Jesús F. Arteaga y Uwe Pischel. **Comunicación oral II Jornada de doctorandos CyTIA**, 28 Octubre de 2016, Huelva, España.
5. *Encapsulation of terpenic natural products by cucurbiturilos in aqueous solution.* Miguel A. Romero, Jesús F. Arteaga y Uwe Pischel. **Póster**, XXVI Reunión Bienal de Química Orgánica 14-17 Junio de 2016, Punta Umbría, España.

## **CURRICULUM VITAE**

**MIGUEL ÁNGEL ROMERO CARRASCO**



### **DATOS PERSONALES**

C/ Comarca de Doñana, nº 27

21830 Bonares (Huelva, España)

Nacido el 22 de noviembre de 1989 (29 años)

Teléfono: 636734644

E-mail: miguelangel.romero@diq.uhu.es

### **FORMACIÓN ACADÉMICA**

2007-2012    Licenciado en Química por la Universidad de Huelva

-    Optativas:

Termodinámica Química Aplicada (Matrícula de Honor)

Materias Primas y Procesos Industriales Inorgánicos

Sistemas Dinámicos en Química

Análisis Agroalimentario

Análisis Medioambiental

Tecnología de Polímeros

Química Bioanalítica

2012-2013    Máster Oficial Ciencia y Tecnología Química por la Universidad de Huelva

2014-2018    Doctorado en Síntesis y Fotoquímica Orgánica por la Univ. de Huelva. Programa de Doctorado Ciencia y Tecnología Industrial y Ambiental. Línea de Investigación Catálisis Homogénea y Fotoquímica Orgánica.

### **FORMACIÓN COMPLEMENTARIA**

Introducción a los métodos de estructura electrónica (2017), Modulo formativo orientado hacia la mejora de la productividad y la financiación externa en la investigación (2015), Introducción a LaTeX como editor de textos científicos (2015), Buenas prácticas en la selección y uso de equipos de protección individual en laboratorios (2015), Fotoprotección (2011-2012), Recursos informáticos para el aula (2011-2012), Radioquímica (2010-2011), Fisicoquímica del agua (2009-2010).

### **CONTRIBUCIONES EN CONGRESOS O JORNADAS**

- Comunicación poster: *Binding of terpenes by cucurbituril macrocycles*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Johan Mendoza, Jesús F. Arteaga, Nuno Basílio, Uwe Pischel, Book of abstracts *24th International Conference on Physical Organic Chemistry* 01-06 Julio de 2018, Faro, Portugal.
- Comunicación poster: *Light-induced release of bio-relevant cargo from 4-sulfocalix[4]arene in water*. Miguel A. Romero, Nuno Basílio, Jesús F. Arteaga, Uwe Pischel, Book of abstracts *6th Portuguese Young Chemists Meeting* 15-18 Mayo de 2018, Setúbal, Portugal.
- Comunicación oral: *Delivery of terpenic natural products by means of supramolecular chemistry in water*. Miguel A. Romero, Nuno Basílio, Jesús F. Arteaga, Uwe Pischel, Book of abstracts *XXXVI Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química* 25-29 Junio de 2017, Barcelona, España.
- Comunicación oral: *Encapsulación de productos naturales terpénicos en cucurbiturilos en disolución acuosa*. Miguel A. Romero, Jesús F. Arteaga, Uwe Pischel, Book of abstracts *II*

*Jornada de doctorandos CyTIA*, 28 Octubre de 2016, Huelva, España.

- Comunicación poster: *Encapsulation of terpenic natural products by cucurbiturils in aqueous solution*. Miguel A. Romero, Jesús F. Arteaga, Uwe Pischel, Book of abstracts *XXVI Reunión Bienal de Química Orgánica* 14-17 Junio de 2016, Punta Umbría, España.
- Comunicación oral: *Síntesis asimétrica de Apocarotenoides. Acceso a la familia de los Megastigmanos*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Jesús F. Arteaga, Book of abstracts *I Jornada de doctorandos CyTIA*, 29 Octubre de 2015, Huelva, España.
- Comunicación poster: *Asymmetric approach towards Apocarotenoids belonging to the Megastigmane family*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Jesús F. Arteaga, Book of abstracts *XXXV Reunión Bienal de la Real Sociedad Española de Química*, 19-23 Julio de 2015, A Coruña, España.

## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**

- *Light-induced cargo release from a cucurbit[8]uril host by means of a sequential logic operation*. Miguel A. Romero, Rita J. Fernandes, Artur J. Moro, Nuno Basílio and Uwe Pischel. *Chemical Communications*, 2018, 54, 13335-13338.
- *Terpenes Show Nanomolar Affinity and Selective Binding with Cucurbit[8]uril*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Johan Mendoza, Jesús F. Arteaga, Nuno Basílio, and Uwe Pischel. *Israel Journal of Chemistry*, 2018, 58, 487-492.
- *Photocaged Competitor Guests: A General Approach Toward Light-Activated Cargo Release From Cucurbiturils*. Miguel A. Romero, Nuno Basílio, Artur J. Moro, Mara Domingues, José A. González-Delgado, Jesús F. Arteaga, and Uwe Pischel. *Chemistry – A European Journal*, 2017, 23, 13105-13111.
- *Universal access to megastigmanes through controlled cyclisation towards highly substituted cyclohexenes*. José A.

González-Delgado, Miguel A. Romero, Uwe Pischel, and Jesús F. Arteaga. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2017, 15, 408-415.

- *Impact of natural sources-derived antioxidants on the oxidative stability and rheological properties of castor oil based-lubricating greases*. Mercedes González, Rocío Gallego, Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, Jesús F. Arteaga, Concepción Valencia, José M. Franco. *Industrial Crops and Products*, 2016, 87, 297-303.
- *Phototriggered release of amine from a cucurbituril macrocycle*. J.Vázquez, M. A. Romero, R. N. Dsouza, U. Pischel. *Chemical Communications*, 2016, 52, 6245-6248.
- *Synthesis of Stilbene Derivatives: A Comparative Study of the Antioxidant Activity*. Miguel A. Romero, José A. González-Delgado, and Jesús F. Arteaga. *Natural Product Communications*, 2015, 10, 1257-1262.

## **ESTANCIAS**

- Universitat Politècnica de Valencia con el Dr. Ramón Martínez Mañez (Marzo – Abril 2017).
- Universidade Nova de Lisboa con el Dr. Fernando Jorge da Silva Pina (Octubre 2017 – Enero 2018).

## **EXPERIENCIA LABORAL**

- Personal investigador correspondiente a los Proyectos de Investigación de Excelencia de la Junta de Andalucía desde Enero de 2016 hasta la actualidad.
- Docente en las asignaturas Introducción al laboratorio Químico II y Laboratorio de Química Orgánica del grado en Química en la Universidad de Huelva en los cursos académicos 2015-2016, 2016-2017 y 2017-2018.
- Tutor Trabajo Fin de Grado en los cursos académicos 2014-2015, 2016-2017 y 2017-2018 de alumnos de la titulación Grado de Química de la Universidad de Huelva.

- Colaboración en prácticas docentes en la asignatura Laboratorio de Química Orgánica del curso 2013-2014 de la titulación Grado de Química de la Universidad de Huelva. Colaboración en prácticas docentes en la asignatura Laboratorio I del curso 2014-2015 de la titulación Máster Interuniversitario de Química de la Universidad de Huelva.

## ANEXOS

Los artículos publicados en el apartado “Anexos” han sido retirados de la tesis debido a restricciones relativas a derechos de autor. En sustitución de éstos ofrecemos la siguiente información: referencia bibliográfica, enlace a la revista y resumen.

- Romero Carrasco, M.A., González Delgado, J.A., Mendoza, J., Arteaga, J.F., Basílio, N., Pischel, U.: “Terpenes Show Nanomolar Affinity and Selective Binding with Cucurbit[8]uril”. Israel Journal of Chemistry. Nº 58, págs. 487–492 (2018). DOI: 10.1002/ijch.201700119

Enlace al artículo: <https://doi.org/10.1002/ijch.201700119>

### RESUMEN:

Eucalyptol, fenchyl alcohol, and geranylamine were tested for the binding to cucurbit[8]uril. Nanomolar affinities were found, giving rise to a highly selective binding of the terpenes by cucurbit[8]uril when compared to the smaller cucurbit[7]uril. This was rationalized with a better size fit with the larger macrocycle. These notions were supported by the calculation of the packing coefficient and NMR measurements of the free and complexed terpenes. The binding process is mainly enthalpically driven, which is associated with the release of high-energy water.

-Romero Carrasco, M.A.; Basílio, N.; Moro, A.J.; Domingues, M.; González Delgado, J.A., Arteaga, J.F., Pischel, U.: “Photocaged Competitor Guests: A General Approach Toward Light-Activated Cargo Release From Cucurbiturils”. Chemistry - A European Journal. Vol. 23, nº. 53, (2017). DOI: 10.1002/chem.201702185

Enlace al artículo: <https://doi.org/10.1002/chem.201702185>

### RESUMEN:

A general approach toward the light-induced guest release from cucurbit[7]uril by means of a photoactivatable competitor was devised. An o-nitrobenzyl-caged competitor is photolyzed to generate a competitive guest that can displace cargo from the host macrocycle solely based on considerations of chemical equilibrium. With this method the release of terpene guests from inclusion complexes with cucurbit[7]uril was demonstrated. The binding of the herein investigated terpenes, all being lead fragrant components in essential oils, has been characterized for the first time. They feature binding constants of up to  $10^8 \text{ L mol}^{-1}$  and a high differential binding selectivity (spanning four orders of magnitude for the binding constants for the particular set of terpenes). By fine-tuning the photoactivatable competitor guest, selective and also sequential release of the terpenes was achieved.

-Romero Carrasco, M.A., Fernandes, R.J., Moro, A.J., Basílio, N., Pischel, U.: "Light-induced cargo release from a cucurbit[8]uril host by means of a sequential logic operation". Chemical Communications. Nº 95(2018). DOI: 10.1039/C8CC07404F

Enlace al artículo: <https://doi.org/10.1039/C8CC07404F>

**RESUMEN:**

The logically controlled and light-induced release of a tripeptide model cargo from a cucurbit[8]uril host macrocycle by means of a photoswitch was shown in water. This provides a new approach to photoresponsive and selective release in a meaningful pH window.





