Universidad de Sonora

División de Ingeniería

Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales

Reconocimiento molecular de glucosamina por el ciclofano (cyp)H₃ y su complejo lantánido Eu[cyp]

Como requisito para obtener el título de

Maestra en Ciencia de Materiales

Presenta

Q. B. C. Teresita de Jesús Moreno Pérez

Directora de Tesis

Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín

Co-directora

Dra. Yedith Soberanes Duarte

Hermosillo, Sonora a agosto de 2020

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON





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

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual de la Universidad de Sonora y del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del director de tesis, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director de la Tesis.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al DIPM, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dra. Teresa del Castillo Castro

Jefe del Departamento

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado designado para revisar la tesis de maestría de Teresita de Jesús Moreno Pérez han dictaminado que el trabajo cumple satisfactoriamente como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencia de Materiales otorgado por la Universidad de Sonora.

Km fler.

Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín Presidente

oberanles L EDITA

Dra. Yedith Soberanes Duarte Secretario

la Santaw30

Dra. Hisila del Carmen Santacruz Ortega Sinodal

Villegas m Orena

Dra. Lorena Armenta Villegas Sinodal

Drá. Elizabeth Carvajal Millán Sinodal Externo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad de Sonora y al Departamento de Investigación de Polímeros y Materiales, en especial al área de Química Supramolecular por aceptarme en el programa de posgrado y por permitirme realizar uso de las instalaciones para desarrollar mi proyecto de tesis. Y a CONACyT por la beca otorgada.

Agradezco el apoyo de la Dra. Rosa Elena Navarro Gautrín y la Dra. Yedith Soberanes Duarte por aceptarme como su alumna y confiar en mi trabajo, por ver en mí potencial para continuar mis estudios de posgrado bajo su guía.

Agradezco el apoyo de la Dra. Hisila Santacruz, Dra. Lorena Armenta y de la Dra. Elizabeth Carvajal por aceptar formar parte de mi comité. También al Dr, Ulises Orozco por su apoyo en el trabajo de modelado molecular.

Agradezco a mis compañeros del posgrado por sus aportaciones y buenos comentarios. A mis amigos que siempre tuvieron una palabra de aliento para seguir adelante.

Agradezco a Dios por darme a mi familia. Agradezco a mis padres, que junto a mis hermanos son mi tesoro más valioso, por permitirme seguir mis sueños y ser mi más importante pilar.

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABLAS	. iii
RESUMEN	. iv
ABSTRACT	v
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO	4
Objetivo General	4
Objetivos Particulares	4
ANTECEDENTES	5
Estudio de los carbohidratos	5
Glicosaminoglicanos	8
Funciones de los GAGs	8
Glucosamina	. 9
Glucosamina como tratamiento	10
Reconocimiento de Carbohidratos	11
La química Supramolecular en el Reconocimiento Molecular	11
Interacciones en reconocimiento de carbohidratos	13
Efecto del solvente en reconocimiento molecular	14
Macrociclos	16
Complejos metálicos en el reconocimiento de carbohidratos	17
Técnicas Utilizadas para el Reconocimiento Molecular de Carbohidratos	17
MATERIALES Y EQUIPO	19
Materiales	19
Equipo	19
METODOLOGÍA	21
Síntesis del Ciclofano (cyp)H ₃	21
Síntesis del Complejo Eu[cyp]	27
Caracterización del Complejo Eu[cyp]	28

Análisis de masas	. 28
Espectroscopia de infrarrojo (FTIR/ATR)	. 29
Resonancia magnética nuclear de 1H	. 29
Difracción de rayos X	. 29
Estudio de formación del complejo Eu[cyp] en solución, mediante el método d variaciones continuas, por UV-vis	e . 29
Estudios de Coordinación del Ligante (cyp)H₃ con Glucosamina por UV-vis	. 30
Curva Job por UV-vis	. 30
Estudios de Coordinación del Ligante (cyp)H₃ con Glucosamina Mediante RM ¹H. Titulación Continua y Batch	N . 31
Titulación continua	. 31
Titulación batch	. 31
Estudios de Coordinación del Complejo Eu[cyp] con Glucosamina UV-vis	. 31
RESULTADOS Y DISCUSIONES	. 32
Complejo Eu[cyp]	. 32
Estudio de Formación del Complejo Eu[cyp] en Solución, Mediante el Método Variaciones Continuas, por UV-vis	de . 36
Estudios de Coordinación del Ligante (cyp)H₃ con Glucosamina	. 38
Estudios de Coordinación por Resonancia Magnética Nuclear	. 41
Titulación continua glucosamina-cyp	.42
Titulación batch Glucosamina 25 mM con (cyp)H₃ 40 mM pD 6.45	. 43
Titulación batch (cyp)H₃ 40 mM con glucosamina 25 mM pD 7.25	. 44
Titulación batch (cyp)H $_3$ 40 mM con glucosamina 25 mM en DMSO	. 46
Modelado Molecular	. 47
Estudios de Coordinación del Complejo Eu[cyp] con Glucosamina UV-vis	. 50
CONCLUSIONES	. 51
RECOMENDACIONES	. 52
BIBLIOGRAFÍA	. 53
ANEXOS	. 59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia disacárida básica del ácido hialurónico (conformado por el	
ácido β-D- glucurónico y por β-D-glucosamina N acetilada)	6
Figura 2. Presentación de los carbohidratos en la matriz extracelular ^[15]	7
Figura 3. Estructura química de la glucosamina	. 10
Figura 4. Estructura de un ligante macrocíclico ^[39]	. 16
Figura 5. Reacción del 2-aminofenol protegido	. 21
Figura 6. Espectro de RMN ¹ H del 2-aminofenol protegido	. 22
Figura 7. Reacción de la formación de la <i>p</i> -diamida	. 23
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H de la formación de la <i>p</i> -diamida	. 24
Figura 9. Reacción de obtención de la <i>p</i> -diamina	. 25
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H de la <i>p</i> -diamina en CDCl ₃ , 25 °C	. 25
Figura 11. Esquema de reacción del ligante (cyp)H ₃	. 26
Figura 12. Espectro de RMN ¹ H del producto de la síntesis del ciclofano (cyp)H ₃ ,	en
D ₂ O a pD = 7.2	. 27
Figura 13. Esquema de reacción del complejo Eu[cyp]	. 28
Figura 14. Espectros de IR del ligante (cyp)H₃libre y de su complejo con europio.	33
Figura 15. Estructura molecular del complejo Eu[cyp]	. 33
Figura 16. Espectro de RMN ¹ H del complejo Eu[cyp]	. 36
Figura 17. Espectros electrónicos de soluciones del ciclofano (cyp)H ₃ con diferent	tes
relaciones molares de EuCl₃, en buffer trizma a pH 7.2	. 37
Figura 18. Curva de Job elaborada con soluciones del ciclofano (cyp)H $_3$ con	
diferentes relaciones molares de EuCl $_3$, en buffer trizma a pH 7.2, obteniendo	
estequiometría 1:1 (ligante:metal)	. 37
Figura 19. Espectros de absorción del ciclofano (cyp)H₃ con glucosamina en buffe	эr
trizma a pH 7.26	. 40
Figura 20. Gráfica a diferentes relaciones molares (cyp)H ₃ :GlcN, donde se puede	
observar que el complejo tiene una estequiometría 1:1	. 40

Figura 21. Asignación de señales a los protones de la molécula de glucosamina. Se
marcan con color rojo las principales señales seguidas ^[48]
Figura 22. Asignación de señales a los protones de la molécula del ciclofano. Se
marcan con color rojo las principales señales seguidas ^[49]
Figura 23. Gráfica de protonación del ciclofano (cyp)H₃ a diferentes valores de pD
Figura 24. Espectros RMN ¹ H obtenidos de la titulación de glucosamina 5 mM con
(cyp)H₃ 100 mM pD 6.75. En rojo se señalan los desplazamientos más significativos.
Figura 25. Espectros RMN ¹ H de la titulación batch de glucosamina 25 mM con
(cyp)H₃ 40 mM pD 6.45. En rojo se señalan los desplazamientos más significativos.
Figura 26. Espectros RMN ¹ H de la titulación batch de glucosamina 25 mM con
(cyp)H₃ 40 mM a pD 7.25. En rojo se señalan los desplazamientos más
significativos45
Figura 27. Protones que presentan mayor desplazamiento: a) β -glucosamina y b)
ligante (cyp)H ₃
Figura 28. Espectros RMN ¹ H de la titulación batch de glucosamina 25 mM con
(cyp)H ₃ 40 mM en DMSO- <i>d</i> ₆
Figura 29, Modelado molecular de la interacción entre GlcN y el ligante (cyn)Ha
i igura 23. Modelado molecular de la interacción entre Olch y en igante (cyp) 13,
donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios
donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios
donde se puede observar diferentes interacción entre GlcN y el ligante (cyp)H ₃ , Figura 30. Modelado molecular de la interacción entre GlcN y el ligante (cyp)H ₃ , donde se puede observar la interacción entre el sitio $\beta CH(1)$ de GlcN y el anillo
donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios
donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios
donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios
donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes empleados para curva Job y absorbancias obtenidas	. 30
Tabla 2. Parámetros geométricos seleccionados para Eu[cyp]	.34
Tabla 3. Datos cristalográficos del complejo Eu[cyp]	35
Tabla 4. Volúmenes utilizados para curva Job y absorbancias obtenidas	.39
Tabla 5. Diferencia de desplazamientos de los protones del ciclofano (cyp) H_3 y	
glucosamina a diferentes pD	.47

RESUMEN

Se sintetizó el complejo Eu[cyp], a partir del ligante tipo ciclofano 2,12-dioxa-4,7,10tris(carboximetil)-1,4,7,10,13-pentaaza-15,30(1,4-fenilenbismetilenoxi)[13.10]ortociclofano, (cyp)H₃, sintetizado previamente en el Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales (DIPM) y la sal del lantánido EuCl₃. Se obtuvo monocristal del complejo y se caracterizó mediante análisis de rayos X de monocristal y distintas técnicas convencionales. El complejo presenta una geometría de coordinación de nueve, con centro metálico en el Eu(III), unido a tres átomos de nitrógeno amino, tres átomos de oxígeno carbonilo, dos átomos de oxígeno amida y un átomo de oxígeno de una molécula de agua. La celda unitaria tiene un sistema cristalino monoclínico con un grupo espacial P2₁/n con cuatro moléculas de quelato por celda, formando dímeros en estado sólido. El ciclofano (cyp)H₃, contiene en su estructura tres anillos aromáticos, lo que le proporciona rigidez a la molécula, además, tres grupos amino, dos amida y dos oxo, así como tres brazos carboxílicos; grupos con átomos donadores con diferentes habilidades de coordinación, así como un tamaño suficiente para encapsular huéspedes metálicos y moléculas biológicas. Este trabajo se centra en estudiar si ambas especies pueden reconocer a la glucosamina ya que este compuesto tiene gran importancia biológica pues está presente en procesos de regeneración de tejido, así como en procesos tumorales. Mediante estudios por UVvis, RMN y modelado molecular, se logró elucidar que existe reconocimiento molecular del carbohidrato glucosamina (GlcN) con el ligante tipo ciclofano, no siendo así, con su complejo de lantánido Eu[cyp]. Mediante cálculo de Jobs se determinó la estequiometria 1:1 cyp:GlcN, con titulaciones por RMN ¹H se pudieron elucidar interacciones entre cyp-GlcN tipo CH- π entre el anillo central del receptor y el H en posición β CH(1) del carbohidrato y por modelado molecular se proponen otras interacciones como; una interacción entre un grupo OH (glucosamina) y un átomo de oxígeno tipo éter; otra entre un grupo NH3⁺ (glucosamina) y un grupo COO⁻ y dos interacciones, una entre un grupo COO⁻ y un grupo OH de la glucosamina y otra entre este mismo grupo COO⁻ y un grupo NH del ciclofano.

ABSTRACT

The Eu[cyp] complex was synthesized from the cyclophane-type ligand 2,12-dioxa-4.7.10-tris (carboxymethyl) -1,4,7,10,13-pentaaza-15,30 4-(1, phenylenebismethyleneoxy) [13.10] ortho-cyclophane, previously (cyp)H₃, synthesized in the Department of Research in Polymers and Materials (DIPM) and the lanthanide salt EuCl₃. The complex was monocrystallized and characterized by single crystal X-ray analysis and various conventional techniques. The complex has a coordination geometry of nine, with a metallic center at Eu(III), attached to three amino nitrogen atoms, three carbonyl oxygen atoms, two amide oxygen atoms and one oxygen atom of a water molecule. The unit cell has a monoclinic crystal system with a $P2_1/n$ spatial with four chelate molecules per cell, forming dimers in solid state. The cyclophane (cyp)H₃, contains in its structure three aromatic rings, which provides rigidity to the molecule, in addition, three amino groups, two amide and two oxo, as well as three carboxylic arms; clusters with donor atoms with different coordination abilities, as well as large enough to encapsulate metallic hosts and biological molecules. This work focuses on studying whether both species can recognize glucosamine since this compound has great biological importance since it is present in tissue regeneration processes, as well as in tumor processes. Through UV-vis, ¹H NMR and molecular modeling studies, it was possible to elucidate that there is molecular recognition of glucosamine carbohydrate (GlcN) with the cyclophane-type ligand, but not with its lanthanide complex Eu[cyp]. By means of Jobs calculation, the 1:1 cyp:GlcN stoichiometry was determined, with ¹H NMR titrations interactions between cyp-GlcN type CH- π between the central ring of the receptor and the H in position $\beta CH(1)$ of the carbohydrate and by molecular modeling other interactions are proposed such as; an interaction between an OH group (glucosamine) and an ethertype oxygen atom; another between an NH³⁺ group (glucosamine) and a COO- group and two interactions, one between a COO- group and an OH group of glucosamine and another between this same COO- group and an NH group of cyclophane.

INTRODUCCIÓN

La 2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosa (D-glucosamina, GlcN) es un carbohidrato abundante entre los polisacáridos y glicoconjugados presentes en la naturaleza, ya que desempeña un papel importante en las superficies de las células, pues es un componente de muchas glucoproteínas celulares, glucolípidos y glicosaminoglicanos [1]. La GlcN se ha utilizado ampliamente como un régimen alternativo para las enfermedades relacionadas con las articulaciones, como la artritis reumatoide (AR) y la osteoartritis (OA) [2]. El envejecimiento de la población y el incremento en la esperanza de vida son factores contribuyentes; sin embargo, también hay una alta incidencia de OA en personas de edad más joven. Un tratamiento óptimo para la OA idealmente proporcionaría alivio de los síntomas y la preservación de la función, sería seguro y retrasaría el daño de la estructura articular. Los compuestos de GlcN apropiados pueden ser buenos candidatos para este desafío terapéutico [3] ya que desempeña un papel en la vía biosintética, siendo un precursor en la biosíntesis de glicoaminoglucanos, una sustancia necesaria para la construcción del cartílago de control de las articulaciones. Debido a sus grupos reactivos hidroxilo y amino, la GlcN se ha utilizado para generar muchas moléculas importantes desde el punto de vista medicinal y material utilizando reacciones químicas y enzimáticas. Estos derivados de glucosamina sintéticos han demostrado una potente actividad biológica y se usan en investigaciones medicinales [1]. Además, se ha comprobado la capacidad lítica que posee este monosacárido en células tumorales actuando sin influir en las células sanas [1-4], pues es tóxica para líneas celulares malignas in vitro, y un agente lítico eficaz para varios tipos de tumores trasplantados in vivo, con poca toxicidad para los tejidos sanos del huésped [4,5]. La actividad anticancerígena de la GlcN se demostró por primera vez hace más de 50 años [4]. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a la actividad anticancerígena de la glucosamina aún no se conocen bien.

Elucidar los mecanismos de acción de la glucosamina sobre células tumorales supone un gran reto dentro de la comunidad científica, pues de conocerse, el uso de este carbohidrato como tratamiento anticancerígeno sería más efectivo. A mediados de la década de 1980, surgió el concepto de química supramolecular, o mejor conocida, como "química más allá de la molécula", gracias a Jean-Marie Lehn [6]. Esta rama de la química se ocupa del estudio de entidades organizadas de una alta complejidad que resultan de la asociación de dos o más especies químicas unidas por interacciones de tipo no covalente. Esta disciplina ha encontrado aplicaciones en áreas diversas como la química medicinal y analítica [7], pues su principio se basa en las interacciones que suceden en sistemas biológicos.

Los componentes de una especie supramolecular llevan por nombre sustrato y receptor molecular. Los receptores moleculares envuelven al sustrato y establecen numerosas interacciones de enlace no covalentes que pueden ser del tipo de interacciones débiles, por ejemplo, fuerzas de Van der Walls, el enlace de hidrógeno o las atracciones dipolo-dipolo. Estas entidades pueden contener espacios libres dentro de la molécula en las cuales se puede acomodar el sustrato.

La química supramolecular comprende el estudio de ligantes macrocíclicos, los cuales han atraído gran atención en consideración a sus interesantes propiedades como ligante para formar complejos con cationes, aniones y moléculas neutras. A lo largo del desarrollo de la química supramolecular, se han logrado sintetizar varios tipos de ligantes macrocíclicos como los calixarenos, ciclodextrinas, éteres corona, cavitandos y ciclofanos.

El estudio de los ciclofanos se ha desarrollado como una disciplina de investigación central con numerosos enlaces a otras áreas. También se ha demostrado que funcionan como plantillas supramoleculares versátiles para la síntesis de diferentes materiales inorgánicos y la encapsulación de biomoléculas activas. Cualidad relacionada con las características estructurales inusuales de muchos de estos compuestos, las cuales les permiten formar complejos con diferentes sustratos. La incorporación de iones metálicos en los sistemas supramoleculares cíclicos permite el diseño de nuevos receptores. Los ligantes que forman complejos con iones metálicos son capaces de unirse a bases de Lewis a través de sitios de coordinación disponibles presentes en diversas biomoléculas [6].

El grupo de investigación en Química Supramolecular del DIPM-UNISON, ha sintetizado una serie de ciclofanos derivados del ácido etilendiaminotetracético

(EDTA) y del ácido dietilentriaminopentaacético dianhídrido (DTPA) con diferentes aminas. Estos ligantes de tipo ciclofano muestran propiedades muy interesantes, como reconocimiento de sustratos catiónicos de gran importancia biológica entre ellas algunos aminoácidos y neurotransmisores como: fenetilamina, histamina, serototina, triptamina tiramina y dopamina [8], la formación de complejos con metales de transición como Cu(II) y Fe(II) [9,10], además de la formación de complejos con iones lantánidos como Gd(III) y Eu(III) como posibles agentes de contraste para resonancia magnética de imagen [11].

Los iones de los lantánidos(III) pueden formar complejos con una amplia variedad de ligantes. El interés en estos complejos ha aumentado, debido a su estado de oxidación 3⁺, lo que le da una estabilidad que ningún otro conjunto de elementos posee hasta ahora [12], permitiéndoles la formación de complejos ternarios con diferentes sustratos. Los complejos lantánidos han recibido una atención importante en las últimas décadas, principalmente debido a sus aplicaciones en la biomedicina [13].

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO

En este proyecto se propone elucidar el tipo de interacción que se lleva a cabo entre el carbohidrato glucosamina (GlcN) y el receptor sintético 2,12-dioxa-4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10,13-pentaaza-15,30(1,4-fenilenbismetilenoxi)[13.10]ortoci-clofano, (cyp)H₃ y su complejo Eu[cyp], con el fin de tratar de entender el tipo de reacciones entre los distintos grupos funcionales.. Este nuevo conocimiento ayudaría a entender algunos procesos biológicos.

Objetivo General

• Sintetizar y caracterizar el complejo del lantánido Eu(III) con el ciclofano (cyp)H₃ y evaluar la capacidad de reconocer la glucosamina, tanto del complejo como del ciclofano (cyp)H₃.

Objetivos Particulares

• Obtener el ciclofano (cyp)H₃, de acuerdo con la metodología reportada por Soberanes y colaboradores.

• Sintetizar el complejo Eu[cyp].

 Caracterizar el complejo mediante punto de fusión, solubilidad, masas y distintas técnicas espectroscópicas como UV-vis, IR, RMN ¹H y difracción de rayos X.

• Evaluar la capacidad del ciclofano y de su complejo de reconocer glucosamina mediante titulaciones por UV-vis y RMN ¹H.

• Simular teóricamente mediante modelado molecular la interacción del ciclofano y su complejo con la glucosamina.

ANTECEDENTES

No es sorprendente que la biología utilice los carbohidratos como algo más que bloques de construcción estructurales o fuentes de combustible bioquímico [14]. Además de la evidente y bien conocida función como fuente de energía de los carbohidratos estas biomoléculas también juegan un papel importante como constituyentes estructurales en diferentes organismos en distintos reinos. Sin embargo, un nuevo campo de investigación está surgiendo y está relacionado con el papel que juegan los carbohidratos dentro de la glicobiología donde intervienen en numerosos procesos tanto fisiológicos como patológicos. Como procesos fisiológicos se puede mencionar el desarrollo, crecimiento, diferenciación, reconocimiento y embriogénesis celular y como procesos patológicos los procesos infecciosos, de inflamación y tumorales. Estos procesos pueden provocar modificaciones postraduccionales de las proteínas regulando así su actividad biológica [15].

Estudio de los carbohidratos

La glicobiología se encarga del estudio de la estructura molecular y función biológica de los carbohidratos libres o presentes en conjugados como las glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos, así como de las proteínas que interactúan específicamente con estos y su implicación causal en el desarrollo de patologías, diagnóstico y terapia [15, 16].

En las células de los mamíferos se pueden encontrar diferentes tipos de monosacáridos tales como la glucosa (Glc), la galactosa (Gal), la glucosamina (GlcN), la xilosa (Xyl), la manosa (Man), la fucosa (Fuc), entre otros. Estos monosacáridos se pueden unir formando disacáridos y moléculas más complejas (Figura 1) como oligosacáridos y polisacáridos. Debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos que presentan pueden formar tanto estructuras lineales como ramificadas. Además, estas moléculas modificaciones posteriores pueden sufrir como sulfataciones, fosforilaciones, acetilaciones aumentando así su diversidad estructural y, con frecuencia, se pueden encontrar en combinación con otras biomoléculas, formando así moléculas más grandes como la N-acetil galactosamina (GalNAc), la N-acetil glucosamina (GlcNAc), el ácido Glucurónico (GlcA), y el ácido siálico o el ácido Nacetilneuraminico (NeuAc) [15].



Figura 1. Secuencia disacárida básica del ácido hialurónico (conformado por el ácido β -D- glucurónico y por β -D-glucosamina N acetilada).

En la naturaleza hay diferentes tipos de biomoléculas tales como los ácidos nucleicos, las proteínas, los lípidos y los carbohidratos siendo este último grupo el tipo más abundante. El conjunto de todos los carbohidratos tanto libres como formando moléculas con mayor complejidad, que se encuentran en el organismo forman el glicoma. El estudio del glicoma es bastante más complejo que el estudio del proteoma (estudio de proteínas), del genoma (estudio del ADN) y del lipidoma (estudio de las membranas lipídicas). Esta complejidad se debe a la gran diversidad de carbohidratos que existen en la naturaleza, a la multitud de enlaces que se producen entre ellos (donde se forman polisacáridos ramificados o lineales) y a que se asocian a gran variedad de proteínas. Esta última asociación da lugar a los llamados glicosaminoglicanos (GAGs) que se encuentran en la matriz extracelular de las células eucariotas formando glicoconjugados con proteínas denominados proteoglicanos (Figura 2).

Las glicoproteínas están formadas por carbohidratos ramificados siendo estos N-glicanos u O-glicanos y por proteínas. Dentro de este grupo se encuentra a la glucosamina N acetilada unida a residuos de serina o treonina. Los glicos-fingolípidos están formados por glicosaminoglicanos unidos a lípidos de membrana. Y por último, el GPI (glicosil fosfatidil linositol) que se une a proteínas que se anclan a la membrana mediante lípidos [17]. Todo esto explica la razón por lo que se llevan a cabo tantas funciones en la célula, pues la diversidad de glicoconjugados presentes en la matriz extracelular es muy basta [16].



Figura 2. Presentación de los carbohidratos en la matriz extracelular [15].

El papel de los oligo y los polisacáridos y sus conjugados en la biología celular no debe subestimarse. Las funciones de los carbohidratos en los organismos son muy variadas, desde el almacenamiento de energía y el mantenimiento de la forma celular hasta la provisión de la unicidad inmunológica de los microorganismos [18]. Los carbohidratos están involucrados en diferentes funciones biológicas como el reconocimiento en el crecimiento axonal, coagulación de la sangre, reconocimiento célula-célula, interacciones antígeno-anticuerpo, actúan como un factor estructural en matrices extra-celulares y llevan a cabo las modificaciones post-translacionales de péptidos. Además, para que las células lleven a cabo sus funciones de forma normal se necesita unos patrones de glicosidación correctos, ya que lo contrario provocaría abominaciones genéticas [15].

Glicosaminoglicanos

Los glicosaminoglicanos (GAGs), se consideran como biomoléculas inertes y están restringidos en su función biológica al relleno del espacio durante la orientación y organización de la matriz extracelular. Sin embargo, los avances recientes en la investigación de la glicoinmunología establecieron su participación en una variedad de eventos de señalización celular que están asociados con el inicio y la regulación de la inflamación, la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos. Se ha sugerido que los GAGs juegan como mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios durante el inicio y la progresión de infecciones al interactuar con diversas clases de proteínas [19]. Además, estudios clínicos han sugerido un papel importante de los GAGs en pacientes con osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR), psoriasis, esclerodermia, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedades cardiovasculares, infecciones de transmisión sexual, enfermedades neurodegenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la enfermedad de Alzheimer [20], los diferentes tipos de cáncer y en varias infecciones bacterianas y virales en el sistema inmunitario humano. Considerando la intensidad y el gradiente de los GAGs en la fisiopatología humana, los investigadores se centran activamente en ellos como nuevos objetivos terapéuticos. Aunque hasta la fecha, se tiene un puñado de evidencia de los roles inmunomoduladores de los GAGs, se sabe muy poco sobre sus estructuras, biosíntesis y mecanismo de acción en situaciones fisiológicas y patológicas [21].

Funciones de los GAGs

Los GAGs son biomoléculas que realizan muchos procesos biológicos además de funciones estructurales y moduladoras. Una clasificación que se puede hacer de las funciones biológicas de los glicosaminoglicanos es según la forma en que reconocen a diferentes proteínas [22].

Debido a las numerosas funciones que los GAGs realizan en el organismo, estos polisacáridos son muy útiles para su aplicación en medicina por sus

propiedades anti-inflamatoriorias, anticoagulantes, como agentes antitumorales entre otros.

La estructura de un disacárido, oligosacárido o polisacárido se determina por la secuencia de monosacáridos que la conforman, además de los enlaces glicosídicos disponibles, la estereoquímica de las uniones glicosídicas ($\alpha \circ \beta$) y por el grado y tipo de sustitución de los grupos hidroxilos de la estructura. También el efecto anomérico del anillo de hexapiranosa es parte determinante de estas estructuras. Este efecto provoca que la conformación del carbono anomérico pueda ser del tipo $\alpha \circ \beta$, dependiendo de si los anillos de hexapiranosa tienen el oxígeno interglicosídico en su forma ecuatorial o axial [15].

La investigación glicoquímica y de la glicobiológica ha sufrido recientemente un gran crecimiento y se ha convertido rápidamente en uno de los tópicos principales de la ciencia moderna. Se ha descubierto que los carbohidratos tienen un papel bastante importante en el reconocimiento biológico, el desarrollo de enfermedades y el control de la respuesta inmune [23].

La alta diversidad estructural de los residuos de sacárido y sus enlaces permite que las moléculas que contienen carbohidratos presenten una gran cantidad de señales a su entorno, lo que las hace muy adecuadas para el control del reconocimiento molecular en las células vivas, altamente involucradas en la transducción de señales, y en múltiples vías biosintéticas [24].

Un glicosaminoglicano que se ha mencionado mucho y en el cual se centra este trabajo de investigación es la glucosamina, este carbohidrato está presente en varios procesos biológicos de gran importancia, los cuales han atraído la atención hacia su investigación.

Glucosamina

La glucosamina (2 amino-2-desoxi-D glucosa, GlcN) (Figura 3) y la N-acetil glucosamina (GlcNAc) son amino monosacáridos que son componentes de los glucosaminoglicanos, que constituyen una parte importante de la matriz de todos los tejidos conectivos. La entrada de GlcN en las células es estimulada por la insulina e

involucra el sistema transportador de glucosa. Cuando la GlcN libre ingresa a las células, su metabolismo posterior se limita significativamente a su fosforilación (a glucosamina-6-fosfato) [25].



Figura 3. Estructura química de la glucosamina.

Glucosamina como tratamiento

La glucosamina es un azúcar de amino que se ha utilizado como un tratamiento alternativo para enfermedades relacionadas con las articulaciones, como la AR y OA a pesar de que su farmacocinética y farmacodinámica no están bien definidas [2]. Además de su acción condroprotectora, existen estudios en los que se sostiene que la GlcN posee acción anticancerígena, pues se ha observado la inhibición del crecimiento en células cancerosas a través de la actividad proteómica [3-5, 25, 26].

Muchos estudios *in vivo* han implicado que la GlcN tiene acciones preventivas y adyuvantes sobre la AR en ratas e importantes efectos modificadores de los síntomas sobre la OA en ensayos clínicos en humanos. Además, los resultados de muchos estudios *in vitro* han demostrado que GlcN inhibe la expresión de la actividad de muchos mediadores inflamatorios, incluyendo la ciclooxigenasa-2, la sintasa inducible de óxido nítrico, las metaloproteasas de la matriz y el factor nuclear κ B (NF- κ B) que respaldan aún más su actividad antiinflamatoria [3,5,25].

Reconocimiento de Carbohidratos

El reconocimiento molecular de los carbohidratos es un tema investigado activamente en la química bioorgánica. La importancia del reconocimiento de carbohidratos en biología, y los desafíos involucrados, han llevado a un gran interés en imitar proteínas de unión a sacárido como las lectinas [27]. El proceso de reconocer carbohidratos es difícil, esto debido a la similitud entre el sustrato (carbohidrato) y el solvente (que en sistemas biológicos es el agua) por lo que, el progreso en dilucidar estas interacciones ha sido lento [14].

La poca comprensión de los principios que dominan el reconocimiento de los carbohidratos a nivel molecular ha estimulado una intensa investigación realizada en gran medida a través de receptores sintéticos, que podrían diseñarse y modificarse adecuadamente para reconocer selectivamente sacáridos específicos y muestre los factores involucrados y los criterios requeridos para un reconocimiento efectivo. Dada la complejidad del reconocimiento de glucoconjugados, la atención se ha centrado principalmente en monosacáridos u oligosacáridos cortos.

Esta simplificación se ha basado en la evidencia de que, en eventos biológicos, incluso para polisacáridos complejos, sólo los mono u oligosacáridos terminales generalmente se atribuyen a procesos de reconocimiento [17].

La química Supramolecular en el Reconocimiento Molecular

El reconocimiento de carbohidratos a través de interacciones no covalentes es uno de los objetivos desafiantes de la química biomimética y supramolecular [1]. Esto se debe en parte a los diversos procesos de reconocimiento celular de oligosacáridos en las superficies celulares [2], y en parte a la complejidad 3D, incluso en estructuras de monosacáridos [3, 28, 29].

Las últimas dos décadas han sido testigos del avance en la síntesis de una amplia biblioteca de receptores sintéticos para el reconocimiento molecular de carbohidratos, principalmente diseñados para el reconocimiento biomimético a través de interacciones no covalentes con la intención de obtener análogos artificiales de lectinas, los receptores naturales para carbohidratos [30]. Debido a que los carbohidratos son moléculas quirales que ocurren naturalmente en una forma enantiomérica, inspiradas en lectinas y sobre la base de consideraciones de complementariedad intuitivas, uno esperaría que el receptor que mejor se adapta a un azúcar específico debería ser una estructura enantiopura quiral, que se ajuste adecuadamente a la funcionalidad y la geometría requisitos del sustrato objetivo [31]. Entre los diferentes receptores artificiales informados hasta la fecha, los receptores a base de benceno han sido ampliamente explotados para la unión de cationes y aniones, pero todavía están en gran parte inexplorados para el reconocimiento de sacáridos [32, 33].

Es probable que los avances en esta área no sólo proporcionen información sobre los fenómenos de reconocimiento molecular, sino que también faciliten el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos o quimiosensores. Debido a la casi imperceptible variación en las estructuras de los monosacáridos y la disposición tridimensional de su funcionalidad, el diseño de receptores biomiméticos selectivos y efectivos para estas biomoléculas todavía representa un desafío significativo [32].

Aunque el reconocimiento molecular de carbohidratos es relevante en el agua, la mayoría de los estudios con receptores sintéticos se ha llevado a cabo en solventes lipofílicos, a menudo en CDCl₃, por varias razones: las propiedades de unión pueden detectarse convenientemente y medirse cuantitativamente por espectroscopía de RMN, los receptores investigados a menudo son solubles en solventes orgánicos pero no en agua, y lo más importante, las interacciones de enlace de H pueden visualizarse en comparación con otros medios polares. Un solvente orgánico no competitivo representa, por lo tanto, un ambiente conveniente para la detección de algunos receptores, a pesar de que el enlace H intramolecular de los sacáridos debe superarse para que se produzca la unión. Sin embargo, los sacáridos son insolubles en CDCl₃ y otros solventes lipofílicos. Este problema se ha abordado haciendo uso de mono y oligosacáridos glicosilados con grupos lipofílicos, como los aromáticos y las cadenas de alquilo, que son más o menos solubles en solventes orgánicos y permiten una evaluación directa de las capacidades de unión del receptor [33].

Interacciones en reconocimiento de carbohidratos

Las interacciones de carbohidrato-proteína juegan un papel importante en muchos procesos biológicos como ya hemos mencionado, desde procesos reguladores hasta patologías como la diseminación tumoral. Estas interacciones pueden ser responsables de mediar diversas actividades celulares, como el reconocimiento celular, el crecimiento y la apoptosis. Una gran variedad de proteínas, con funciones y topologías muy diferentes, participan en el reconocimiento de carbohidratos, incluidas las enzimas, los receptores periplásmicos, los anticuerpos y lectinas.

Debido al carácter anfifílico de los oligosacáridos, una variedad de fuerzas media el proceso de reconocimiento, con muchos tipos de interacciones reveladas en las estructuras de rayos X disponibles de los complejos de proteínas de azúcar. Los grupos polares de los azúcares están unidos por donantes y aceptores de enlaces H en la cadena principal de la proteína y las cadenas laterales polares. Las regiones apolares (formadas principalmente por los grupos CH de piranosa) se complementan con superficies no polares de las proteínas y, en particular, tienden a acumularse contra los residuos aromáticos en las cadenas laterales del receptor. Se han propuesto argumentos convincentes que sugieren que la desolvatación de tales parches apolares es la fuerza impulsora de las interacciones intermoleculares.

Los estudios de RMN han demostrado la presencia de interacciones entre hidrógenos que pertenecen a las caras apolares de los anillos de azúcar y los residuos aromáticos de las cadenas laterales de proteínas y se han vinculado la fuerza de la interacción con el tamaño. Además, los estudios sobre el papel de los oligosacáridos unidos a N durante el plegamiento de proteínas han revelado que la incidencia de aminoácidos aromáticos en proximidad a los glicanos durante el proceso de plegamiento es mayor que los niveles estándar que ocurren en la superficie o dentro del núcleo de la proteína. Juntos, estos datos proporcionan implicaciones significativas para el reconocimiento molecular de los carbohidratos en solución de agua y, de hecho, se han descrito receptores artificiales de carbohidratos que explotan las interacciones carbohidrato-aromáticas. También se han investigado los complejos carbohidrato-aromáticos utilizando métodos computacionales, lo que sugiere que la interacción debe ser principalmente contactos intermoleculares de van der Waals y / o interacción CH-π [34].

Las estructuras de carbohidratos están dominadas por grupos hidroxilo, y los grupos hidroxilo son muy similares al agua. Todos los receptores deben discriminar entre sustrato y agua, y para los sustratos de carbohidrato esto es intrínsecamente desafiante. El reconocimiento biomolecular está impulsado en parte por interacciones directas y en parte por el efecto hidrofóbico. Para los sustratos de carbohidratos, la interacción entre estas fuerzas es difícil y algo controvertida. Sin embargo, en medios acuosos, la fuerza impulsora para el reconocimiento del carbohidrato está lejos de ser clara.

Sin embargo, recientemente, la evidencia ha salido a la luz de un efecto hidrofóbico "no clásico" impulsado entálpicamente y esto puede desempeñar un papel en los eventos de unión de lectina-sacárido. Además, una variedad de estudios modelo han indicado roles para CH $-\pi$. Debido a estos descubrimientos se puede asumir que las interacciones polares también son importantes y que tanto las interacciones polares funcionan en conjunto para lograr el reconocimiento biológico de carbohidratos [14].

Las interacciones no covalentes se pueden clasificar en función de la geometría (interacciones de apilamiento), restos interactivos (enlace de hidrógeno, enlaces catiónicos o halógenos) o en función de su naturaleza física (electrostática o dispersión). Las interacciones aromáticas de carbohidratos a menudo se ven como interacciones de apilamiento debido a la orientación paralela de los carbohidratos interactivos y los anillos aromáticos y también como interacción CH- π debido al hecho de que los enlaces C-H generalmente apuntan hacia el sistema aromático [15, 35,36].

Efecto del solvente en reconocimiento molecular

Las moléculas de carbohidratos son notoriamente flexibles y en ambientes acuosos o fisiológicos sus estructuras conformacionales pueden verse influenciadas por la interacción con iones o moléculas vecinas y particularmente, por la hidratación explícita. Esto a su vez, puede influir en su reconocimiento molecular selectivo en los sitios receptores de proteína-carbohidrato, se piensa que involucra su conformación preferida de solución [37]. Los químicos supramoleculares que intentan emular la formación de lectinasacárido se enfrentan a un desafío considerable. Si las interacciones polares y apolares son importantes, entonces ambos tipos de unidades deben incorporarse, posicionarse adecuadamente, en los diseños de los receptores. Además, los sacáridos son sustratos relativamente grandes, y un receptor debe abarcar o encerrar su objetivo. De hecho, los receptores de carbohidratos artificiales tienden a estar entre las construcciones biomiméticas más grandes de tipo anfitrión-huésped. El control conformacional es particularmente importante, en parte para mantener la forma adecuada de la cavidad y en parte para evitar el contacto entre los grupos de unión H autocomplementarios.

Por lo tanto, los requisitos para los receptores de carbohidratos son: (1) tamaño suficiente para encapsular completamente el sustrato, (2) una matriz de grupos funcionales tanto polares como apolares que coinciden con el potencial superficial de un carbohidrato, y (3) suficiente rigidez para evitar el reconocimiento intramolecular o autoasociación. Para los carbohidratos el agua es el medio perfecto, pues les permite por decirlo de alguna manera "ser felices", por lo que necesitan ser persuadidos para ingresar a un sitio de unión, es por eso que las constantes de asociación entre carbohidratos y receptores son bajas.

En contraste con el éxito logrado por muchos en solventes orgánicos, el progreso en medios acuosos ha sido lento. Todavía hay relativamente pocos ejemplos de receptores sintéticos, que operan a través de interacciones no covalentes, que han demostrado claramente que se unen a los carbohidratos en el agua. Además de cumplir con los criterios estructurales descritos anteriormente, la caracterización completa y confiable de los fenómenos de unión puede ser más difícil en el agua.

Dentro de la química supramolecular se han estudiado diferentes tipos de receptores sintéticos que cumplen con las características necesarias para cubrir los requerimientos antes mencionados.

15

Macrociclos

Los macrociclos (Figura 4) han despertado interés por sus propiedades estructurales, espectroscópicas que se originan a partir de su conformación rígida bien definida.

Desde el punto de vista de la química anfitrión-huésped, la cavidad central de los macrociclos posee un atractivo importante por la rigidez del espacio. Por lo tanto, si los grupos funcionales se ubican dentro de la cavidad, sus posibles interacciones pueden ser predecibles. En algunos casos, dicha arquitectura realizaría la preorganización de los grupos funcionales para reconocer fuertemente las moléculas huéspedes coordinadas en la cavidad [38].



Figura 4. Estructura de un ligante macrocíclico [39].

De esta clasificación de estructuras supramoleculares se desprende la de los ciclofanos los cuales además de cumplir con las características de rigidez y disposición de grupos funcionales dentro de la cavidad forzosamente deben incluir en su estructura anillos aromáticos los cuales les proveen capacidad extra de contribuir al reconocimiento de moléculas biológicas. Además, les permite la capacidad de formar complejos metálicos y a partir de estos realizar una segunda complejación con las biomoléculas en los que en algunos casos mejora el reconocimiento.

Complejos metálicos en el reconocimiento de carbohidratos

La integración de iones metálicos dentro de los sistemas de reconocimiento supramolecular es una forma práctica de mejorar la unión y especificidad del sustrato, ya que comúnmente se observa que los enlaces de coordinación son fuertes y altamente dependientes de la orientación del donante de ligando con respecto al centro del metal. Este motivo de unión es empleado por la naturaleza para el reconocimiento de carbohidratos en lectinas de "tipo C", donde el ion metálico es Ca⁺. Los iones lantánidos se han empleado para imitar el papel del Ca⁺ en estos casos. Los iones de los lantánidos(III) pueden formar complejos con una amplia variedad de ligantes. El interés en estos complejos ha aumentado, debido a su estado de oxidación 3⁺, lo que le da una estabilidad que ningún otro conjunto de elementos posee hasta ahora [12]. Por otra parte, los lantánidos también tienen una utilidad cada vez mayor en síntesis orgánica, química bioorgánica y en el área de la medicina.

El desarrollo de sistemas de señalización es un tópico importante por lo que los complejos de ciclofanos con metales lantánidos han recibido una atención importante en las últimas décadas, principalmente debido a sus aplicaciones biomédicas [13]. Las propiedades magnéticas peculiares de los iones lantánidos(III) pueden explotarse para el desarrollo de poderosas sondas de RMI además se pueden utilizar como quimiosensores luminiscentes para diagnóstico médico.

Técnicas Utilizadas para el Reconocimiento Molecular de Carbohidratos

La investigación de las interacciones anfitrión-huésped en disolventes orgánicos a menudo se lleva a cabo mediante espectroscopía de RMN ¹H, ya que los espectros se interpretan fácilmente y las constantes de unión se calculan fácilmente a partir de los movimientos de la señal. La unión H intermolecular se puede observar directamente a través de cambios en el campo en las resonancias de protones, y los efectos de protección y desprotección de las unidades aromáticas también pueden proporcionar evidencia clara de reconocimiento. La única desventaja real de usar la espectroscopía de RMN para determinar las constantes de unión es que las soluciones no pueden ser muy diluidas, por lo que las constantes de unión

interacciones intermoleculares y las estequiometrias huésped-anfitrión todavía pueden inferirse en complejos fuertes y verificarse utilizando técnicas alternativas como la espectroscopía de fluorescencia y la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) [14].

MATERIALES Y EQUIPO

Materiales

Los materiales que se utilizaron en la síntesis del ciclofano, el complejo y en los estudios espectroscópicos se encuentran disponibles comercialmente y se enuncian a continuación:

- 1. Ácido clorhídrico (HCI), marca Fermont
- 2. Ácido clorhidríco deuterado (DCI), 40% en D₂O, marca Aldrich
- Ácido dietilentriaminopentaacético dianhídrido (DTPA), 99% marca Aldrich
- 4. Alcohol etílico (C₂H₅OH), marca Baker
- 5. Buffer Tris, 99% marca Sigma
- 6. Carbonato de Europio (Eu₂(CO₃)₃), marca Aldrich
- 7. Cloruro de Europio (EuCl₃), marca Aldrich
- 8. D-Glucosamina hidroclorada, marca Aldrich
- 9. N,N-Dimetilformamida (DMF), marca Fisher Scientific
- 10. 2,2-Dimetil-2-silapentano-5-sulfanato de sodio (DSS), marca Aldrich
- 11. Hidróxido de potasio deuterado (KOD), 40% en D₂O, marca Aldrich
- 12. Hidróxido de sodio NaOH, marca Aldrich
- 13. Óxido de deuterio (D₂O), 99.9%, marca Aldrich

Los reactivos se utilizan tal y como se obtuvieron del proveedor, excepto: el DMF, el cual se tratará durante 24 horas previas a la reacción con malla molecular 4-A° previamente activada a 100 °C durante 24 horas, con el propósito de secar lo más posible el disolvente y con esto obtener un mayor rendimiento.

Equipo

1. Balanza analítica Sartorius

2. Difractómetro Bruker Kappa APEX II DUO (ubicado en la Universidad de Arizona)

3. Espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer modelo Frontier

4. Espectrómetro de masas Agilent Technologies modelo 6130 Quadrupole LC/MS

5. Espectrofotómetro Perkin - Elmer Modelo Lambda 20

6. Espectrómetro de resonancia magnética nuclear (RMN), Bruker Avance de 400 MHz

7. Lector de pH Thermo Scientific

METODOLOGÍA

Síntesis del Ciclofano (cyp)H₃

El ciclofano 2,12-dioxa-4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10,13-pentaaza-15,30(1,4-feni lenbismetilenoxi)[13.10]orto-ciclofano, (cyp)H₃ se obtiene de una reacción de condensación entre el DTPA con la amina 2,2'-(1,3-fenilenbismetilenox) bisbencenamina, de acuerdo con la metodología reportada por Soberanes [40]. La amina 2,2'-(1,3-fenilenbismetilenox)bisbencenamina no se encuentra disponible en el mercado por lo que es necesario sintetizar, para esto se siguió la metodología reportada por Moreno-Corral [41]. Seguido se describe la síntesis de esta y del ciclofano (cyp)H₃.

El reactivo de partida es el 2-aminofenol. Primeramente, se llevó a cabo una protección de 2-aminofenol (Figura 5), colocando en un matraz de reacción 10 g (0.91 mmol) en 100 mL de agua deionizada. Por separado, en un embudo de adición se añadieron 8.64 mL (0.91 mmol) de anhídrido acético y 30 mL de metanol. El amino fenol se dejó en agitación durante 30 minutos y transcurrido el tiempo, se dejó pasar la solución del anhídrido acético gota a gota en un lapso no menor a 20 minutos. La reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente y mediante cromatografía se siguió la reacción, utilizando una mezcla de solventes hexano:acetona, 60:40, hasta que en una placa de cromatografía se observó una diferencia entre reactivos y productos. La agitación se mantuvo durante 24 horas.



Figura 5. Reacción del 2-aminofenol protegido.

El producto obtenido se filtró utilizando un filtro de vidrio M. Se obtuvo un polvo y se secó en estufa de vacío a temperatura ambiente, durante siete horas. El polvo seco se resuspendió en etanol absoluto (400 mL) disolviéndose parcialmente. La solución resultante se concentró con ayuda de una bomba de aire a temperatura ambiente hasta aproximadamente 100 mL, obteniéndose un precipitado, el cual se separó mediante filtración. El polvo se secó en estufa de vacío a temperatura ambiente durante siete horas. Mediante espectroscopia de RMN se comprobó la pureza del 2-aminofenol protegido. El producto de la protección del 2-aminofenol se obtuvo como un sólido café claro con un rendimiento del 82.13%. El espectro de RMN ¹H se muestra en la Figura 6, las señales se asignaron a los protones de acuerdo a sus desplazamientos de la siguiente manera: δ = 9.72 (s, 1H, H-f), δ = 9.29 (s, 1H, H-a), δ = 7.67 (dd, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-e), δ = 6.93 (dt, *J* = 1.4 Hz, 1H, H-c), δ = 6.85 (dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8 Hz, H-b), δ = 6.75 (dt, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8 Hz, 1H, H-d), δ = 2.09 (s, 3H, H-g).



9.8 9.7 9.6 9.5 9.4 9.3 9.2 9.1 9.07.9 7.8 7.7 7.6 7.5 7.4 7.3 7.2 7.1 7.0 6.9 6.8 6.7 6.6 6.5 2.3 2.2 2.1 2.0 f1 (ppm)



El siguiente paso es obtener la *p*-diamida que se muestra en la reacción de la Figura 7, para esto se tomaron 2.01 g (0.198 mmol) de 2-aminofenol protegido obtenido, se colocaron en un matraz junto con 1.5 equivalentes (0.19 mmol; 2.752 g) de K₂CO₃ y 50 mL de DMF. La mezcla de dejó a reflujo a 70 °C durante 30 minutos. Después se agregaron 0.5 equivalentes de α , α '-dibromo-*p*-xileno (0.066 mmol; 1.742 g) y de nuevo se dejó a reflujo, manteniéndose monitoreada por cromatografía hasta observar cambios. A los seis días la reacción se retiró del sistema y la mezcla obtenida se pasó por filtro de vidrio M. La parte líquida se evaporó hasta sequedad utilizando un rotavapor y se resuspendió en 100 mL de acetona. La mezcla obtenida se filtró en filtro de vidrio y el sólido se secó con vacío a temperatura ambiente durante ocho horas. Se realizó un espectro de RMN para conocer la pureza del producto.



Figura 7. Reacción de la formación de la *p*-diamida.

El producto de la síntesis de la *p*-diamida se obtuvo como un sólido café claro con un rendimiento del 32.02%. En la Figura 8 se muestra el espectro de RMN ¹H tomado en un equipo de 400 MHz en CDCl₃ a 25 °C. La asignación de las señales corresponde a los desplazamientos δ = 8.39 (d. J = 7.48 Hz, 2H, H-c), δ = 7.79 (s, 2H, H-b), δ = 7.48 (s. 4H, H-h), δ = 7.03 (m. 4H, H-d y H-e), δ = 6.96 (d. J = 7.65 Hz, 2H, H-f), δ = 5.18 (s. 4H, H-g), δ = 2.20 (s, 6H, H-a).



Figura 8. Espectro de RMN ¹H de la formación de la *p*-diamida.

La *p*-diamida obtenida se desprotegió para obtener una diamina con el siguiente procedimiento: en un matraz de reacción se colocaron 2.5 g (6.17 mmol) de la *p*-diamida con 10 equivalentes de NaOH (6.17 mmol; 2.469 g) y 250 mL de etanol como solvente.

La solución se sometió a reflujo a temperatura de 70 °C y se siguió mediante cromatografía de placa hasta observar cambios entre los reactivos y productos. A los 15 días la reacción se retiró del sistema. Los productos se colocaron en un vaso de precipitado y mediante flujo de aire se concentraron hasta sequedad. En la Figura 9 se muestra el esquema de reacción.



Figura 9. Reacción de obtención de la *p*-diamina.

De la reacción de desprotección se obtiene la *p*-diamina (2,2'-(1,3fenilenbismetilenox)bisbencenamina) y acetato de sodio. La separación del producto se llevó a cabo mediante tres lavados con 40 mL de 1,2-dicloroetano y 50 mL de agua deionizada en un embudo de separación.



Figura 10. Espectro de RMN ¹H de la *p*-diamina en CDCI₃, 25 °C.

La fracción orgánica se concentró con flujo de aire a temperatura ambiente y se obtuvo un polvo color café con rendimiento del 87.31%. Mediante espectroscopia de RMN se comprobó la pureza del producto. En la Figura 10, se muestra el espectro de RMN ¹H las señales muestran los siguientes desplazamientos: δ = 7.46 (s, 4H, H-g), δ = 6.84 (m, 4H, H-c y H-d), δ = 6.73 (m, 4H, H-b y H-e), δ = 5.09 (s, 4H, H-f), δ = 3.84 (s, 4H, H-a).

Ya obtenida la *p*-diamina, en un sistema de reacción, provisto de un matraz y un embudo de adición se llevó a cabo la reacción que se muestra en la Figura 11. Se colocaron 1.350 g (4.21 mmol) en un embudo de adición con 30 mL de DMF y en el matraz 1.670 g de DTPA (4.67 mmol) con 140 mL de DMF. La solución del embudo se adicionó gota a gota al matraz tardando aproximadamente 30 minutos en añadirse por completo. Se siguió la reacción por cromatografía en placa, pasadas 24 horas se retiró la reacción. La mezcla resultante se filtró con papel y se evaporó hasta un volumen aproximado de 30 mL. Se agregaron 100 mL de acetona fría precipitando un polvo color crema. El sólido se pasó a un filtro de vidrio M y se secó a vacío a temperatura ambiente durante cuatro horas. El producto obtenido se purificó por recristalización con acetona:agua (50:50) y acetona fría y secó al vacío por seis horas. Se obtuvo un polvo color café claro con un rendimiento del 86.23%. Se realizó un espectro de RMN ¹H en D₂O a 25 °C el cual se muestra en la Figura 12.



Figura 11. Esquema de reacción del ligante (cyp)H₃.

De acuerdo a los desplazamientos de las señales se asignaron a los protones de la siguiente manera: δ = 2.35 (t, J = 16. Hz, 4H, H-2), δ = 2.60 (t, J = 12. Hz, 4H, H-3), δ = 2.90 (s, 4H, H-4), δ = 3.22 (s, 2H, H-1), δ = 3.34 (s, 4H, H-5), δ = 5.20 (s, 4H, H-10), δ = 7.08 (t, J = 16. Hz, 2H. H-8), δ = 7.28 (m, J = 24. Hz, 4H. H-7 y H-6), δ = 7.63 (s, 4H. H-11), δ = 7.87 (d. J = 8 Hz, 2H. H-9). El producto obtenido es el ligante,12-dioxa-4,7,10-tris(carboximetil)-1,4,7,10,13-pentaaza-15,30(1,4fenilenbismetilenoxi) [13.10]orto-ciclofano, (cyp)H₃.



8.2 8.0 7.8 7.6 7.4 7.2 7.0 6.8 6.6 6.4 6.2 6.0 5.8 5.6 5.4 5.2 3.6 3.4 3.2 3.0 2.8

Figura 12. Espectro de RMN ¹H del producto de la síntesis del ciclofano (cyp)H₃, en D_2O a pD = 7.2.

Síntesis del Complejo Eu[cyp]

Para obtener el complejo Eu[cyp] a partir del ciclofano (cyp)H₃ y carbonato del lantánido, se siguió este procedimiento. En un vaso de precipitado se colocaron 0.300 g (0.443 mmol) del ligante (cyp)H₃ en 15 mL de agua deionizada con agitación

magnética a 60 °C, poco a poco se agregaron 0.236 g (0.48 mmol) de Eu₂(CO₃)₃. La mezcla se dejó en agitación durante 48 horas, después se filtró con papel filtro; la parte sólida se secó a vacío a temperatura ambiente durante seis horas y la parte líquida se concentró a 60 °C sobre una placa de calentamiento. El sólido resultante de la filtración se purificó suspendiéndolo en etanol manteniéndolo en agitación por tres horas, se filtró con papel y se secó a vacío a temperatura ambiente durante seis horas, obteniendo un sólido blanco con rendimiento del 31.17%. La fracción líquida, correspondiente al etanol, se evaporó a temperatura ambiente, obteniendo monocristales, los cuales se difractaron por rayos X.



Figura 13. Esquema de reacción del complejo Eu[cyp].

Caracterización del Complejo Eu[cyp]

Tanto el sólido como los cristales obtenidos en la reacción anterior se caracterizaron mediante distintas técnicas.

Análisis de masas

Los productos resultantes de la síntesis del complejo Eu[cyp] se analizaron en un espectrómetro de masas Agilent Technologies modelo 6130 Quadrupole LC/MS. Las muestras se prepararon colocando 5 mg del polvo en un vial limpio y seco y se

agregaron 0.200 mL de agua grado HPLC y 0.800 mL de metanol grado HPLC, se agitó brevemente en el sonicador para solubilizar completamente.

Espectroscopia de infrarrojo (FTIR/ATR)

En un espectrómetro FT-IR Perkin-Elmer modelo Frontier, por reflectancia total atenuada (ATR), se tomaron los espectros de IR de los productos obtenidos, así como del ciclofano cyp.

Resonancia magnética nuclear de 1H

El espectro de RMN ¹H del complejo se adquirió a temperatura ambiente en un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Avance 400 que opera a 400 MHz. Para llevar a cabo las mediciones, el polvo se disolvió en óxido de deuterio (D₂O) y se utilizó 2,2-Dimetil-2-silapentano-5-sulfanato de sodio (DSS) como referencia interna y Li₂CO₃ para disolver la muestra.

Difracción de rayos X

Se obtuvo un monocristal del complejo Eu[cyp], lo que permitió estudiar la coordinación del ciclofano (cyp)H₃ con el ion Eu(III). Los datos se colectaron mediante un difractómetro de rayos X en la Universidad de Arizona, Bruker Kappa APEX II DUO, con radiación Mo-Ka monocromada de grafito (= 0.71073 Å) generada por un tubo sellado, y un detector de área CCD APEX II. Los datos fueron corregidos para efectos de absorción por el método Multi-Scan (SADABS). Mediante el uso de Olex2 [42], la estructura se resolvió con el programa de solución de estructura ShelXT [43] utilizando mínimos cuadrados, y se refinó con el paquete de refinamiento ShelXL [44] utilizando mínimos cuadrados. El análisis de la estructura cristalina se realizó con el programa Mercury 3.10.2 [45].

Estudio de formación del complejo Eu[cyp] en solución, mediante el método de variaciones continuas, por UV-vis

El complejo Eu[cyp] se obtuvo en solución, utilizando el método de variaciones continuas mediante espectroscopia de UV-vis a partir del ciclofano (cyp)H₃ y del cloruro de europio. El método de variaciones continuas se basa en mezclar soluciones de los reactantes a la misma concentración variando las proporciones y

se mide una propiedad adecuada de las soluciones resultantes. En esta ocasión se midió la absorbancia de las soluciones, las cuales se prepararon como se muestra en la Tabla 1. A partir de los valores obtenidos de absorbancia determinó su estequiometría.

# Vial	mL (cyp)H ₃	mL EuCl₃	Fracción molar	Abs ₂₈₀
1	4.0	0	1.0:0.0	0.93289
2	3.5	0.5	0.875:0.125	0.77204
3	3.0	1.0	0.750:0.250	0.63554
4	2.5	1.5	0.625:0.375	0.47978
5	2.0	2.0	0.5:0.5	0.31035
6	1.5	2.5	0.375:0.625	0.22211
7	1.0	3.0	0.250:0.750	0.15091
8	0.5	3.5	0.125:0.875	0.07497
9	0	4.0	0.0:1.0	0.00146

Tabla 1. Volúmenes empleados para curva Job y absorbancias obtenidas.

Las concentraciones de EuCl₃ y del ligante (cyp)H₃ fueron de 0.15 mM, la solución del ligante se preparó en buffer trizma 0.01 M pH 7.2, y el cloruro de europio en agua deionizada. Las soluciones se midieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20, en celdas de cuarzo de 1 cm.

Estudios de Coordinación del Ligante (cyp)H₃ con Glucosamina por UVvis

Curva Job por UV-vis

Se obtuvo una curva Job de un estudio de variaciones continuas de soluciones del ciclofano (cyp)H₃ y glucosamina a una concentración 0.05 mM, pH 7.26 en solución reguladora trizma. Los volúmenes utilizados y la fracción molar correspondiente se muestran en la Tabla 3. Los viales con las soluciones preparadas se mantuvieron a

temperatura ambiente durante 24 horas antes de ser leídas. Para las lecturas se utilizó un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20 y las muestras se montaron en una celda de 1 cm de espesor para 1 mL de volumen. Antes de cada lectura la celda fue lavada con la solución que sería medida.

Estudios de Coordinación del Ligante (cyp)H₃ con Glucosamina Mediante RMN ¹H. Titulación Continua y Batch

Titulación continua

Se llevaron a cabo titulaciones continuas de glucosamina-(cyp) y (cyp)-glucosamina en D₂O a pD 6.75. Para la titulación glucosamina-cyp, en un tubo de RMN se añadió un volumen de 500 µL de una solución 5 mM de glucosamina y se varió la concentración del cyp, añadiendo alícuotas de 5 µL de una solución 100 mM de (cyp)H₃ en D₂O a pD 6.75. Se tomaron los espectros de resonancia, entre cada medición se esperaron cinco minutos considerando tiempo suficiente para que se diera la complejación. Para la titulación cyp-glucosamina, en el tubo se colocó la solución de (cyp)H₃ y se tituló con glucosamina.

Titulación batch

Se realizaron titulaciones batch a partir de soluciones madre del ciclofano a 40 mM y de 25 mM la glucosamina a diferentes valores de pD, 7.25, 7.45, 6.45 y 5.75. Las soluciones se colocaron en tubos para RMN a diferentes relaciones molares. Las lecturas se realizaron 24 h después de preparar los tubos. También se llevó a cabo una titulación batch utilizando DMSO como solvente. Las concentraciones del ciclofano y de glucosamina utilizadas fueron las mismas que en los experimentos con D₂O.

Estudios de Coordinación del Complejo Eu[cyp] con Glucosamina UVvis

Se llevó a cabo la titulación del complejo Eu[cyp] (0.15 mM) dejando un volumen constante de 3 mL en la celda de lectura y agregando alícuotas de 10 μ L de glucosamina (9 mM). Entre cada lectura se agitó la solución por tres minutos llegando a un volumen final añadido de 150 μ L.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Complejo Eu[cyp]

El producto resultante de la reacción del ligante (cyp)H₃ y Eu₂CO₃ que se investiga en la Figura 13, es un sólido blanco con rendimiento de 31.17%, su temperatura de descomposición es de 280 ± 2 °C y es ligeramente soluble en agua. Se analizó mediante espectrometría de masas por la técnica de ionización por electrospray (ESI), mostrando una abundancia relativa máxima del 70.68% el ion molecular corresponde al isotopo ¹⁵¹Europio con una masa molar de 150.9198 g/mol dando un pico máximo en 828 [M+H]⁺.

Se tomaron espectros de IR de los productos obtenidos, tanto del ciclofano como del complejo. En la Figura 14 se muestra el espectro de $(cyp)H_3$ donde se puede observar las bandas características de sus principales grupos funcionales: a 3320 cm⁻¹, N-H de la amina, generada por la vibración de estiramiento, a 1675 cm⁻¹ aparece una banda intensa generada por la vibración de estiramiento del carbonilo (C=O) del grupo ácido, en 1615 y 1525 cm⁻¹ se asignaron a los grupos amida I y II respectivamente, las cuales resultan del acoplamiento de las vibraciones de flexión en el plano de N–H y el estiramiento de C=O amida y a 813 cm⁻¹ se presenta una señal que corresponde a la vibración de la flexión C-H del benceno *p*-disustituido.

El espectro de infrarrojo del complejo presenta prácticamente las mismas señales diferenciándose en que las señales del grupo ácido que se encuentra alrededor de 1675 cm⁻¹ presente en el ligante, desaparece al formar el complejo, señales de los grupos carbonilo ácido se traslapan con las señales de los grupos amida (1596 cm⁻¹), debido a que se desplazan a menor energía, como se aprecia en la Figura 14, confirmando que existe un enlace metal-ligante [46]. Además, las señales de los complejos son más delgadas, debido a que la rigidez de la molécula aumenta al coordinar los átomos donadores del ligante con el ion Eu(III).



Figura 14. Espectros de IR del ligante (cyp)H₃ libre y de su complejo con europio.

Se obtuvo un monocristal del complejo Eu[cyp], lo que permitió estudiar la coordinación del ciclofano (cyp)H₃ con el ion Eu(III). En la Figura 15, se muestra la estructura molecular del complejo, obtenida de la difracción del monocristal.



Figura 15. Estructura molecular del complejo Eu[cyp].

En la estructura se puede observar y confirmar que el metal tiene una coordinación de nueve, unido con tres átomos de nitrógeno amino, tres átomos de oxígeno carboxilato, dos átomos de oxígeno amida y un átomo de oxígeno de una molécula de agua. En la tabla 2 pueden consultarse las distancias de enlace del átomo de Eu(III) con los átomos coordinados.

Distancias de enlaces (Å)				
Eu1-O1 _{amida}	2.488(5)	Eu1–O _{agua}	2.475(7)	
Eu1–O2 _{amida}	2.420(5)	Eu1-N1 _{amino}	2.662(6)	
Eu1–O6carboxilato	2.390(6)	Eu1-N2 _{amino}	2.622(7)	
Eu1–O8carboxilato	2.365(6)	Eu1–N3 _{amino}	2.767(7)	
Eu1–O9carboxilato	2.331(5)			

Tabla 2. Parámetros geométricos seleccionados para Eu[cyp]•H₂O

En la Tabla 3 se muestran los datos cristalográficos obtenidos. La celda unitaria tiene un sistema cristalino monoclínico con un grupo espacial P21/n con cuatro moléculas por celda, formando dímeros. El peso molecular obtenido por difracción de rayos X es de 846.66 g/mol.

Fórmula empírica	C34H38EuN5O11
Peso molecular	846.66
Sistema cristalino	Monoclínico
Grupo espacial	P21/n
a/Å	16.9138(9)
b/Å	10.8054(5)
c/Å	21.8835(12)
α/°	90
β/°	93.835(3)
γ/°	90
Volumen/Å ³	3990.5(4)
Z	4
ρ _{calc} g/cm ³	1.426
µ/mm ⁻¹	11.766
Final R indexes [I>=2σ (I)]	$R_1 = 0.0834$, $wR_2 = 0.2122$
Final R indexes [all data]	$R_1 = 0.0948$, $wR_2 = 0.2215$

Tabla 3. Datos cristalográficos del complejo Eu[cyp]•H2O

El polvo obtenido de la reacción del ciclofano (cyp)H₃ y carbonato del lantánido, se analizó mediante RMN ¹H. El espectro se muestra en la Figura 16, donde se observan 34 señales, que corresponden a los 34 protones del complejo, lo que indica que no hay simetría en la molécula y los desplazamientos de las señales van desde 25 ppm campo bajo hasta campo muy alto -13.38 ppm. Este comportamiento se debe al efecto paramagnético del Eu(III). La interacción entre el núcleo resonante y el electrón desapareado altera enormemente los niveles de energía del primero. En consecuencia, se observarán desplazamientos inusuales del núcleo, denominados desplazamientos hiperfinos [47].



Figura 16. Espectro de RMN ¹H del complejo Eu[cyp].

Estudio de Formación del Complejo Eu[cyp] en Solución, Mediante el Método de Variaciones Continuas, por UV-vis

En la Figura 17 se muestran los espectros de UV-vis del ciclofano (cyp)H₃ con EuCl₃ obtenidos de las soluciones a diferentes relaciones molares. Las soluciones de EuCl₃ y del ligante (cyp)H₃ se prepararon a la misma concentración, 0.15 mM. La solución del ligante se preparó en buffer trizma 0.01 M a pH 7.2 y el cloruro de europio en agua deionizada. Los espectros muestran una banda de absorción a 280 nm, que varía de acuerdo a las diferentes relaciones molares ciclofano:metal.



Figura 17. Espectros electrónicos de soluciones del ciclofano $(cyp)H_3$ con diferentes relaciones molares de EuCl₃, en buffer trizma a pH 7.2.

A esta longitud de onda se tomaron los valores para el estudio de variaciones continuas. La gráfica de Job se muestra en la Figura 18, donde se puede ver que el equilibrio entre el ciclofano y el metal está en 0.5, lo que indica el complejo tiene una estequiometría 1:1.



Figura 18. Curva de Job elaborada con soluciones del ciclofano $(cyp)H_3$ con diferentes relaciones molares de EuCl₃, en buffer trizma a pH 7.2, obteniendo estequiometría 1:1 (ligante:metal).

Estudios de Coordinación del Ligante (cyp)H₃ con Glucosamina

Para el reconocimiento molecular entre el ciclofano (cyp)H₃ y la glucosamina se llevaron a cabo estudios de coordinación entre ambos compuestos mediante espectroscopia de UV-vis y resonancia magnética nuclear.

Los espectros de UV-vis obtenidos del ciclofano (cyp)H₃ a diferentes relaciones molares de glucosamina se muestran en la Figura 19. Las soluciones de glucosamina (GlcN) y del ligante (cyp)H₃ se prepararon en buffer trizma 0.01 M a una concentración de 0.05 mM (Tabla 3). Los espectros se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20, en celdas de cuarzo. Al aumentar la relación molar de glucosamina se puede observar una disminución de la banda a 280 nm, lo que indica una interacción entre ambas moléculas. En la Figura 20 se muestra la gráfica a diferentes relaciones molares (cyp)H₃:GlcN a 280 nm donde se puede observar que el complejo tiene una estequiometría 1:1.

# Vial	mL (cyp)H ₃	mL GluN	(cyp)H₃/GluN	Abs ₂₈₀
1	1.50	0.00	1.0:0.0	0.30438
2	1.35	0.15	0.9:0.1	0.27348
3	1.20	0.30	0.8:0.2	0.24574
4	1.05	0.45	0.7:0.3	0.2175
5	0.90	0.60	0.6:0.4	0.1846
6	0.75	0.75	0.5:0.5	0.15726
7	0.60	0.90	0.4:0.6	0.14613
8	0.45	1.05	0.3:0.7	0.09591
9	0.30	1.20	0.2:0.8	0.06554
10	0.15	1.35	0.1:0.9	0.03671
11	0.00	1.50	0.0:1.0	0.00889

Tabla 4. Volúmenes utilizados para curva Job y absorbancias obtenidas.

Las concentraciones de glucosamina (GlcN) y del ligante $(cyp)H_3$ fueron de 0.05 mM, ambas soluciones se prepararon en buffer trizma 0.01 M a su respectivo pH. Las soluciones fueron medidas en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 20, en celdas de cuarzo de 1 cm.



Figura 19. Espectros de absorción del ciclofano $(cyp)H_3$ con glucosamina en buffer trizma a pH 7.26. Se observa una disminución en la banda a 280 nm al aumentar la relación molar de GluN.



Figura 20. Gráfica a diferentes relaciones molares (cyp)H₃:GlcN, donde se puede observar que el complejo tiene una estequiometría 1:1.

Estudios de Coordinación por Resonancia Magnética Nuclear

Se realizaron estudios de coordinación entre el ciclofano y GlcN mediante titulaciones por resonancia magnética nuclear a diferentes pD. En la Figura 21 se muestra la asignación de las señales correspondientes a los protones de GlcN y en la Figura 22 la del ciclofano.



Figura 21. Asignación de señales a los protones de la molécula de glucosamina. Se marcan con color rojo las principales señales seguidas ^[48].



Figura 22. Asignación de señales a los protones de la molécula del ciclofano. Se marcan con color rojo las principales señales seguidas ^[49].

En la Figura 23 se muestra la gráfica de protonación del ciclofano a diferentes valores de pD, como se puede ver, a pD 6, que es cercano al pH fisiológico, no se observan cambios de los desplazamientos, por lo que se eligió llevar el estudio a este valor.



Figura 23. Gráfica de protonación del ciclofano (cyp)H₃ a diferentes valores de pD ^[40].

Titulación continua glucosamina-cyp

Los espectros obtenidos de la titulación de glucosamina con $(cyp)H_3$ a pD 6.75 se muestran en la Figura 24. El primer espectro de abajo hacia arriba, corresponde al ciclofano solo y el segundo a la glucosamina. Se observa que a medida que se añade la solución de cyp, la señal a 7.65 ppm, que corresponde a los protones *i* y la de 5.19 ppm, que corresponde a los protones *d* del ciclofano se desplazan a campo alto, además aparece un hombro en ambas señales.



Figura 24. Espectros RMN ¹H obtenidos de la titulación de glucosamina 5 mM con (cyp)H₃ 100 mM pD 6.75. En rojo se señalan los desplazamientos más significativos.

La señal del protón $\beta CH(1)$ a 4.85 ppm de la glucosamina, muestra un mayor desplazamiento mientras que las otras permanecen sin modificarse, lo que indica que quizá se lleve a cabo una interacción entre la glucosamina y el anillo aromático central del ciclofano. Como los desplazamientos fueron pequeños se consideró que el tiempo que requiere para observar la interacción al llegar al equilibrio debería ser mayor. Por lo que se realizaron otras titulaciones batch con la intención de alargar el tiempo de reacción, además se decidió variar un poco el pD.

Titulación batch Glucosamina 25 mM con (cyp)H₃ 40 mM pD 6.45

Los espectros obtenidos de la titulación bach a pD 6.45 se muestran en la Figura 25. Las soluciones fueron preparadas 24 horas antes de leerse. Los desplazamientos mas significativos son de los protones *i* a 7.65 ppm y *d* a 5.19 ppm del ciclofano y los protones $\alpha CH(1)$ a 5.45 ppm y $\beta CH(1)$ a 4.85 ppm.



Figura 25. Espectros RMN ¹H de la titulación batch de glucosamina 25 mM con $(cyp)H_3$ 40 mM pD 6.45. En rojo se señalan los desplazamientos más significativos.

Los resultados obtenidos nos permitieron mejorar las condiciones que nos permitirían observar mejor la interacción entre el ciclofano y la glucosamina. Se optó por aumentar el pD para acercarnos más a condiciones fisiológicas.

Titulación batch (cyp)H₃ 40 mM con glucosamina 25 mM pD 7.25

Se realizó un nuevo experimento a pD 7.65, pero las señales que corresponden a $\beta CH(1)$ se traslapan con la señal de D₂O, además las señales correspondientes a $\alpha CH(1)$ y $\alpha CH(2)$ muestran un ligero desplazamiento. Así que se prepararon nuevas soluciones a pD 7.25. A este nuevo pD y después de 24 horas de preparadas las soluciones, se tomaron los espectros. Estas condiciones parecieron ser las mejores, pues logró observarse muy bien el desplazamiento de los protones de glucosamina y del ciclofano. En la Figura 26 se muestra el apilado de espectros, donde el primer espectro de abajo a arriba corresponde al ciclofano y el siguiente a GlcN.



Figura 26. Espectros RMN ¹H de la titulación batch de glucosamina 25 mM con $(cyp)H_3$ 40 mM a pD 7.25. En rojo se señalan los desplazamientos más significativos.

Puede observarse que conforme se aumenta la concentración del ciclofano las señales sufren cambios. Los protones que presentan mayor desplazamiento son $\beta CH(1)$ a 4.85 ppm, asignación según el esquema de la Figura 27a de la glucosamina y los protones *d* a 5.19 ppm e *i* a 7.65 ppm del ligante, Figura 27b.



Figura 27. Protones que presentan mayor desplazamiento: a) β -glucosamina y b) ligante (cyp)H₃.

Titulación batch (cyp)H₃ 40 mM con glucosamina 25 mM en DMSO

Se realizó una titulación de GlcN con (cyp)H₃ en DMSO-d₆ con la intención de conocer el efecto del solvente en la complejación entre las dos especies. Como puede apreciarse en la Figura 28 claramente las señales que corresponden a NH_3 (7.91 ppm), OH(1) (7.15 ppm), OH(4) (5.61 ppm) y los protones $\alpha CH(1)$ (5.17 ppm) y $\beta CH(1)$ (4.51 ppm) de glucosamina desaparecen por completo a partir de la relación molar 1:3, pero las demás señales se mantienen lo que podría deberse a una complejación en esos sitios.



Figura 28. Espectros RMN ¹H de la titulación batch de glucosamina 25 mM con $(cyp)H_3$ 40 mM en DMSO-*d*₆.

En la Tabla 4 se condensa la información obtenida de los diferentes experimentos realizados. En ella se pueden observar los desplazamientos más significativos de los protones que presentaron mayor desplazamiento a los diferentes pD.

	(сур)Н₃		Glucosamina	
	Δδ protones		Δδ protones	
pD	D	i	αCH(1)	βCH(1)
5.75	0.0083	0.0058	0.0049	0.0028
6.45	0.0424	0.0324	0.0005	0.0064
6.75	0.0062	0.0049	0.0022	0.0135
7.25	0.0274	0.0339	0.0017	0.0187
7.65	0.0369	0.0291	0.0026	

Tabla 5. Diferencia de desplazamientos de los protones del ciclofano $(cyp)H_3 y$ glucosamina a diferentes pD.

Todos los experimentos se realizaron utilizando D_2O como solvente con una mínima cantidad de DSS como referencia. El pD* de las soluciones se ajustó con DCI y KOD en las cantidades necesarias.

 $pD = pH_{meas} + 0.45$

Modelado Molecular

Se realizó modelado molecular simulando la interacción entre el ligante (cyp)H₃ y la glucosamina. Los cálculos de estructura electrónica se realizaron con el método de la Teoría de Funcionales de la Densidad (DFT, por sus siglas en inglés: Density Functional Theory) [49] utilizando el funcional de la energía de intercambiocorrelación: wB97XD, junto con la base orbital atómica: 6-31G(d) [50]. Todos los cálculos se realizaron en fase gas verificando mediante un análisis de frecuencias que las geometrías moleculares correspondieran a mínimos sobre la superficie de energía potencial. El software utilizado para realizar los cálculos fue el paquete Gaussian 09 (G09). Nivel de teoría: wB97XD/6-31G(d). Los resultados muestran que entre el ciclofano y la glucosamina existen diferentes tipos de interacciones. Como se muestra en la Figura 29, señalado con el número 1 se puede ver una interacción entre un grupo OH (glucosamina) y un átomo de oxígeno tipo éter; con el número 2 se señala una interacción entre el grupo NH³⁺ (glucosamina) y un grupo COO⁻ del ciclofano.



Figura 29. Modelado molecular de la interacción entre GlcN y el ligante $(cyp)H_3$, donde se puede observar diferentes interacciones en diferentes sitios.

El número 3 señala dos interacciones, una entre un grupo COO⁻ del ciclofano y un grupo OH de la glucosamina y otra entre este mismo grupo COO⁻ y un grupo NH del ciclofano. Con los números 4 y 5 se señalan las interacciones entre el carbonilo del grupo amida del ciclofano con un hidroxilo de la glucosamina y una interacción del NH del grupo amida con un hidroxilo de la glucosamina.

Los resultados arrojaron que la interacción observada en los desplazamientos de RMN ¹H son posibles, pues según se puede ver en la Figura 30 se está dando una interacción de tipo CH- π entre el anillo del centro del ciclofano y el carbono $\beta CH(1)$ de glucosamina.



Figura 30. Modelado molecular de la interacción entre GlcN y el ligante (cyp)H₃, donde se puede observar la interacción entre el sitio $\beta CH(1)$ de GlcN y el anillo central del ciclofano por interacciones de tipo CH- π .

Esta información sugiere que la interacción que se lleva a cabo entre el ligante y el huésped es del tipo CH- π (Figura 31), ya que los protones involucrados pertenecen al área de los aromáticos en el caso del ciclofano y al protón del carbono 1 de la glucosamina. Esta información es consistente, según la bibliografía este tipo de interacciones es muy común entre carbohidratos y receptores de tipo natural o sintético que tengan unidades aromáticas en su estructura [36].



Figura 31. Ejemplos de interacción CH/ π . Geometrías prevalentes de interacciones carbohidrato-aromático CH/ π : (A) Se puede interactuar a través de ambas caras (solo la cara A está disponible); (B) interacción a través de hidrógenos en los átomos C3, C4, C5 y C6; (C) interacción a través de átomos de hidrógeno en C1, C2 y C3.

Estudios de Coordinación del Complejo Eu[cyp] con Glucosamina UVvis

Se realizó una titulación continua entre el complejo Eu[cyp] y la glucosamina. En los espectros de la Figura 32, se observa una pequeña variación al cambio de las relaciones molares complejo:glucosamina, y en el inserto se muestra que conforme se realizan las adiciones no se llega a una saturación entre las especies, por lo que se infiere que no se está dando una complejación entre estos compuestos.



Figura 32. Espectro de absorbancia de la titulación del complejo Eu[cyp] y glucosamina.

Se intentó llevar a cabo una titulación batch mediante RMN ¹H, sin embargo, la solución requerida a la concentración necesaria no fue posible elaborarse por la baja la solubilidad del complejo.

CONCLUSIONES

Se obtuvo el ciclofano (cyp)H₃ siguiendo la metodología reportada.

La síntesis del complejo Eu[cyp] se realizó con éxito obteniendo un rendimiento del 31.17 %.

Mediante análisis de rayos X de monocristal se elucidó su estructura. El complejo tiene una coordinación de nueve, unido a tres átomos de nitrógeno amino, tres átomos de oxígeno carbonilo, dos átomos de oxígeno amida y un átomo de oxígeno de una molécula de agua. La celda unitaria tiene un sistema cristalino monoclínico con cuatro moléculas de quelato por celda, formando dímeros en estado sólido.

Mediante espectroscopia UV-vis se estudió que hay interacción entre el (cyp)H₃ y la glucosamina y mediante el cálculo de Jobs se determinó la estequiometría 1:1 cyp:GlcN.

Se observaron interacciones entre cyp-GluN tipo CH- π entre el anillo central del receptor y el átomo H en posición $\beta CH(1)$ del carbohidrato mediante los desplazamientos obtenidos por RMN ¹H.

De la estructura propuesta para el sistema por modelado molecular se proponen las siguientes interacciones; una interacción entre un grupo OH (GlcN) y un átomo de oxígeno tipo éter (ciclofano); otra entre un grupo NH₃⁺ (GlcN) y un grupo COO⁻ del ciclofano y dos interacciones, una entre un grupo COO⁻ y un grupo OH de la glucosamina y otra entre este mismo grupo COO⁻ y un grupo NH del ciclofano.

Existe reconocimiento molecular del carbohidrato glucosamina con el ligante tipo ciclofano, no siendo así, con su complejo de lantánido Eu[cyp].

RECOMENDACIONES

Debido a la baja solubilidad del complejo en D_2O , se sugiere realizar otros experimentos por RMN ¹H en DMSO-*d*₆.

BIBLIOGRAFÍA

[1] Cui, G. (2017). Synthesis and characterization of Eu(III) complexes of modified Dglucosamine and poly(N-isopropylacrylamide). *Materials Science and Engineering C*, 603-608. http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.059

[2] Jo, J.-R. (2014). Short-term treatment with glucosamine hydrochloride specifically downregulates hypoxia-inducible factor-1α at the protein level in YD-8 human tongue cancer cells. *International Journal of Oncology*, 1699-170.

[3] Lomonte, A. B. (2018). Multicenter, randomized, double-blind clinical trial to evaluate efficacy and safety of combined glucosamine sulfate and chondroitin sulfate capsules for treating knee osteoarthritis. *Advances in Rheumatology*, 1-10.

[4] Bekesi, J. G. (1972). Cytotoxic Effects of D-Glucosamine on the Ultrastructures of Normal and Neoplastic Tissues in Vivo. *Cancer Research*, 756-765.

[5] Bekesi, J. G. (1970). Inhibitory Effects of D-Glucosamine on the Growth of Walker 256 Carcinosarcoma and on Protein, RNA, and DNA Synthesis. *Cancer Research*, 2905-2912.

[6] Ramaiah, D. (2010). Functional cyclophanes: Promising hosts for optical biomolecular recognition. *Chemical Society Reviews*, 39, 4158–4168. DOI: 10.1039/b920032k

[7] Hernández-Molina, y.; Ferrer-Serrano, a.;Blanco-Ponce, M. Nuevo macrociclo tipo amino/amida: Síntesis, caracterización y constantes de acidez/basicidad. Revista Cubana de Química, v. 26, p. 32-36, 2014. issn 2224-5421.

[8] Arvízu-Santamaría, A. G. y col. Complexation of neurotransmitters – dopamine, serotonin and melatonin – with a DTPA-based cyclophane of high rigidity: ¹H NMR shift and line-broadening. *Supramolecular Chemistry*, v. 29, n. 9, p. 658-667, 2017/09/02 2017. ISSN 1061-0278. Disponible en < https://doi.org/10.1080/10610278.2017.1332368 >.

[9] Sugich-Miranda, R. y col. Antioxidant capacity of binuclear Cu(II)-cyclophanes, insights from two synthetic bioactive molecules. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, v. 24, n. 6, p. 379-383, 2010. ISSN 1099-0461.

[10] Salazar-Medina, A. J. y col. antioxidant capacity of two novel bioactive Fe(III)cyclophane complexes. *Molecules*, v. 18, n. 2, p. 1762-1774, 2013.

[11] Navarro, R. E. y col. Isomeric DTPA-amide macrocycles of *p*-xylenediamine and
their complexation with Gd³⁺. *Polyhedron*, v. 92, p. 105-110, 5/28/ 2015. ISSN 0277-
5387.5387.Disponibleen:<</td>

http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277538715001497 >.

[12] M.L. Aulsebrook, *et al.* (2017). Lanthanide complexes for luminescence-based sensing of low molecular weight analytes. *Coordination Chemistry Reviews*, https://doi.org/10.1016/j.ccr.2017.11.018.

[13] Dos Santos, C. M. G. y col.. Recent developments in the field of supramolecular lanthanide luminescent sensors and self-assemblies. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 252, n. 23, p. 2512-2527, 2008/12/01/ 2008. ISSN 0010-8545

[14] Walker D. B., G. J. (2009). Progress in biomimetic carbohydrate recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66:3177–3191. DOI 10.1007/s00018-009-0081-

[15] García Jiménez, M.J. (2018). Reconocimiento molecular entre GAGs y proteínas extracelulares. Estudios estructurales mediante RMN y dinámica molecular. (Tesis Doctoral Inédita). *Universidad de Sevilla, Sevilla*.

[16] Köwitsch A, Zhou G, Groth T. Medical application of glycosaminoglycans: a review. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(1):e23-e41. DOI:10.1002/term.2398

[17] Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al., editors. Essentials of Glycobiology [Internet]. 3rd edition. *Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2015-2017. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310274/

[18] Toukach, F. V. (2013). Recent advances in computational predictions of NMR parameters for the structure elucidation of carbohydrates: methods and limitations. *The Royal Society of Chemistry*, 42, 8376--8415, DOI: 10.1039/c3cs60073d Disponible en: www.rsc.org/csr.

[19] Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR. Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J*. 2010;277(19):3876-3889. DOI:10.1111/j.1742-4658.2010.07798.x [20] Ariga T, Miyatake T, Yu RK. Role of proteoglycans and glycosaminoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and related disorders: amyloidogenesis and therapeutic strategies--a review. *Journal Neuroscience Research*. 2010;88(11):2303-2315. DOI:10.1002/jnr.22393

[21] Gulati, K. (2015). Mechanistic and therapeutic overview of glycosaminoglycans: the unsung heroes of biomolecular signaling. Springer Science Business Media New York, 33:1–17. DOI 10.1007/s10719-015-9642-2

[22] Molinari, M. N-glycan structure dictates extension of protein folding or onset of disposal. *Nat Chem Biol* **3**, 313–320 (2007). https://doi.org/10.1038/nchembio880

[23] Barb AW, Prestegard JH. NMR analysis demonstrates immunoglobulin G Nglycans are accessible and dynamic. *Nat Chem Biol*. 2011;7(3):147-153. doi:10.1038/nchembio.511

[24] Valentin Wittmann and Roland J. Pieters. Bridging lectin binding sites by multivalent carbohydrates *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 4492-4503 https://doi.org/10.1039/C3CS60089K

[25] Rivlin, M. (2016). Glucosamine and N-acetyl glucosamine as new CEST MRI agents for molecular imaging of tumors. *Nature*, DOI: 10.1038/srep32648 5.

[26] Kumar, R. (2017). Highly luminescent, heteroatom-doped carbon quantum dots for ultrasensitive sensing of glucosamine and targeted imaging of liver cancer cells. *Journal of Materials Chemistry, The Royal Society of Chemistry*, 2190-2197. DOI: 10.1039/c6tb03141b

[27] Ríos, P. (2017). Enantioselective carbohydrate recognition by synthetic lectins in water. *Royal Society of Chemistry*, 4056–4061. DOI: 10.1039/c6sc05399h

[28] Kim, Y.-H. (2002). Molecular Recognition of Carbohydrates through Directional Hydrogen Bonds by Urea-Appended Porphyrins in Organic Media. *WILEY-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA*, 41, No. 16, 2947-2950.

[29] Davis, A. P. (1998). A Tricyclic Polyamide Receptor for Carbohydrates in Organic
Media. WILEY-VCH Verlag GmbH, 37, No. 16 1433-7851/98/3716-2271 \$
17.50+.50/0.

[30] Jin S, Cheng Y, Reid S, Li M, Wang B. Carbohydrate recognition by boronolectins, small molecules, and lectins. *Med Res Rev.* 2010;30(2):171-257.
 DOI:10.1002/med.20155.

[31] Nativi, C. (2011). Diaminopyrrolic Receptors for Selective Recognition of Mannosides, Part 1: Design, Synthesis, and Affinities of Second-Generation Tripodal Receptors. *Chemistry European Journal*, 4814 – 4820. DOI: 10.1002/chem.201002871

[32] Mazik, M. (2005). Molecular Recognition of Carbohydrates with Artificial Receptors: Mimicking the Binding Motifs Found in the Crystal Structures of Protein-Carbohydrate Complexes. *Journal of American Chemical Society*, 127, 9045-9052. DOI: 10.1021/ja043037i

[33] Vacca, A. (2004). A New Tripodal Receptor for Molecular Recognition of Monosaccharides. A Paradigm for Assessing Glycoside Binding Affinities and Selectivities by 1H NMR Spectroscopy. *Journal of American Chemistry Society*, 126, 16456-16465 DOI: 10.1021/ja045813s.

[34] Terraneo G, et al. (2007). A Simple Model System for the Study of Carbohydrate-Aromatic Interactions. *Journal American Chemical Society*, 129, 2890-2900. DOI 10.1021/ja066633g

[35] Spiwok, V. (2017). CH-π interactions in carbohydrate recognition. *Molecules*, 1038-1050. DOI:10.3390/molecules22071038

[36] Hunter, C. A. (2001). Aromatic interactions. *The Royal Society of Chemistry*, 651–669. DOI: 10.1039/b008495f

[37] Simons, J. P. (2009). Conformational change and selectivity in explicitly hydrated carbohydrates. *Tetrahedron: Asymmetry, Elsevier*, Vol. 20, 718–722.

[38] Abe, H. T. Y. (2016). D^{3h}-Symmetrical Shape-Persistent Macrocycles Consisting of Pyridine–Acetylene–Phenol Conjugates as an Efficient Host Architecture for Saccharide Recognition. *Chemistry European Journal*, 22, 18944 – 18952. DOI : 10.1002/chem.201603987

[39] Soberanes, Y.; Navarro, R.E.; Inoue, M.; Velázquez-Contreras, E.F.; Beltran Torres, M.; Lugo, G.; Sotelo-Mundo, R.R.; Salazar-Medina, A.J. Syntheses, Characterization, and Antioxidant Evaluation of Cu²⁺, Mn²⁺, and Fe³⁺ Complexes with a 14 Membered EDTA-Derived Macrocycle. *Molecules* 2019, 24, 3556.

[40] Soberanes, Y. y col. Fluorescent aza-cyclophanes derived from diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), and their complexation with Gd(III). *Polyhedron*, v. 35, n. 1, p. 130-136, 3/16/ 2012. ISSN 0277-5387. Disponible en: < http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S02775387 12000320 >.

[41] Moreno-Corral (2011) Síntesis y caracterización de nuevos oxaazaciclofanos de 18-, 20- y 22- miembros y sus estudios de complejación en solución y estado sólido con cationes metálicos y aniones orgánicos e inorgánicos. (Doctorado) Universidad de Sonora, México.

[42] Dolomanov, O. V.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H., OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography* 2009, 42 (2), 339-341.

[43] Sheldrick, G., SHELXT - Integrated space-group and crystal-structure determination. *Acta Crystallographica Section A* 2015, 71 (1), 3-8.

[44] Sheldrick, G. M., Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica. Section C*, Structural Chemistry 2015, 71 (Pt 1), 3-8.

[45] Macrae, C. F.; Edgington, P. R.; McCabe, P.; Pidcock, E.; Shields, G. P.; Taylor, R.; Towler, M.; van de Streek, J., Mercury: visualization and analysis of crystal structures. *Journal of Applied Crystallography* 2006, 39 (3), 453-457.

[46] Nakamoto, K. Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Part A: Theory and Applications in Inorganic Chemistry. *Wiley*, 2008.
ISBN 9780470405796. Disponible en: < https://books.google.com. mx/ books
?id=9t3h8pVgnyQC >.

[47] Alcaraz, M. (2006). Resonancia magnética nuclearen sistemas paramagnéticos. Real Sociedad Española de Química, 102(1) 27-33.

[48] Bertuzzi, D. L., Becher, T. B., Capreti, N. M. R., Amorim, J., Jurberg, I. D., Megiatto, J. D., Ornelas, C., Global Challenges 2018, 2, 1800046. https://doi.org/10.1002/gch2.201800046

[49] Soberanes, Y., Navarro, R.E., Inoue, M. et al. Interaction of Na⁺ and K⁺ ions with DTPA-amide dioxa-pentaaza-cyclophanes: effect of electrostatic field in macrocyclic

cavity on UV absorption spectra and protonation. J Incl Phenom Macrocycl Chem 92, 419–426 (2018). https://doi.org/10.1007/s10847-018-0864-3

[50] Kohn, W.; Becke, A. D. & Parr, R. G. Density Functional Theory of Electronic Structure. *The Journal of Physical Chemistry*. 1996, 100, 12974-12980.

[51] Chai, J.-D. & Head-Gordon, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2008, 10, 6615-6620. DOI: 10.1039/B810189B

ANEXOS

Congresos

- Participación en la XXIII Reunión Universitaria de Investigación en Materiales en 2018, con el título: Síntesis, caracterización y evaluación antioxidante de complejos lantánidos derivados de macrocíclos.
- 2. Participación en el congreso internacional POLYMAT 2019 con el título; Synthesis and characterization of lanthanide complex Eu[cyp].
- Participación en la XXIV Reunión Universitaria de Investigación en Materiales en 2019, con el título: Synthesis and characterization of lanthanide complex Eu[cyp].