



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Quimiodetección de Nucleótidos con
Receptores Artificiales Basados en
Piridin-2,6-Dicarboxiamida.” Síntesis y
Reconocimiento Molecular.**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

Ivan Jonathan Bazany Rodriguez



Director: Dr. Alejandro Dorazco González

Toluca, Estado de México; 2 de Julio de 2014



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

3er. Oficio E.P./450/2014
20 de junio de 2014

P. QUÍM. IVAN JONATHAN BAZANY RODRÍGUEZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UAEM
P R E S E N T E

La Dirección de la Facultad de Química de la UAEM, comunica a Usted que el Jurado de su Evaluación Profesional, en la modalidad TESIS, estará formado por:

M. en C. A. MARÍA MAGDALENA
GARCÍA FABILA
PRESIDENTE

Dr. DAVID CORONA BECERRIL
VOCAL

Dr. ALEJANDRO DORAZCO GONZÁLEZ
SECRETARIO

Dr. CARLOS GONZÁLEZ ROMERO
SUPLENTE

Sin más por el momento le envío un respetuoso saludo.

ATENTAMENTE
PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO
"2014, 70 Aniversario de la Autonomía ICLA-UAEM"

M. en A. P. GUADALUPE OFELIA SANTAMARÍA GONZÁLEZ
DIRECTORA



U. A. E. M.
FACULTAD DE QUÍMICA
DIRECCION



C.c.p. Archivo

www.uaemex.mx

Rimane come sei... e allora scoprirai che la storia di ogni nostro minuto appartiene soltanto a noi... dentro te, ascolta il tuo cuore e nel silenzio troverai le parole, chiudi gli occhi e poi tu lasciati andare prova ad arrivare... è difficile... ma... tu non rinunciare mai... crede in te, ascolta il tuo cuore... prova a volare... apri le braccia quasi fino a toccare... ogni sogno che vuoi... ogni volta, che non sai cosa fare, prova a volare... tu prova a volare...

Cheope, F. Pausini, V. Mastrofrancesco, A. Mastrofrancesco, C. Cohiba.



Agradecimientos

Al **Dr. Alejandro Dorazco González** por su asesoría en el proyecto y por su amistad.

A los miembros del jurado: **Dr. David Corona Becerril** y **M. en C. A. María Magdalena García Fabila** por sus valiosos comentarios.

Al **Dr. Diego Martínez Otero** por sus aportaciones en difracción de Rayos X.

A la **M. en C. Lizbeth Triana Cruz** y la **M. en C Alejandra Núñez Pineda** por su apoyo en la obtención de espectros de IR.

A la **Ma. en C. María de las Nieves Zavala Segovia** por su ayuda en la obtención de espectros de RMN,

A la **Dra. Gabriela Roa Morales** y a la **Dra. Patricia Balderas Hernández** por permitir utilizar el Espectrofotómetro de UV-Visible.

Al **Dr. Erick Cuevas Yáñez** por el espacio otorgado en su laboratorio de Química Orgánica.

A mi amiga **Mariana Nicolás Gómez** por su ayuda y compañía en los experimentos de fluorescencia.

A mi amiga **L.I.A. Citlalit Martínez Soto** por su gran ayuda en la parte informática de esta tesis.

Dedicatorias

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr este sueño, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento. **Papá y Mamá.**

A mis maestros que en este andar por la vida, influyeron con sus lecciones y experiencias en formarme como una persona de bien y preparada para los retos que pone la vida, a todos y cada uno de ellos les dedico cada una de estas páginas de mi tesis.

A mis hermanos **Christopher** y **Julio** que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, por darme ánimo, por brindarme su confianza y por comprender mi forma de ser.

A todos aquellos amigos que a lo largo de nueve semestres compartimos momentos inolvidables, históricos, buenos, tristes y alegres. **Dulce** y **Zaira** muchas gracias por sus consejos, palabras de ánimo, confianza y amistad, las adoro. **Moncho, Howard, Nacho** gracias por aquellos momentos de relax y sobre todo por su amistad.

Juanita, Elo, Cynthia, Vik, Luis, Cinthia, Mari Tere y **Tere** este trabajo no hubiese sido tan divertido sin su chispa, sin su compañía en los laboratorios, sin su apoyo incondicional y sobre todo sin su don para escucharme. Los aprecio y los quiero mucho. **Juanita** muchas gracias por aquellas palabras que ayudaron tanto. Gracias a todos ustedes que fueron un gran apoyo emocional durante el tiempo en que escribía esta tesis.

A mi mejor amiga **Marianita** que sin sus consejos, abrazos y maneras de molestarme, ciertamente creo que mi transcurso en la facultad, hubiese sido monótono y común. **Marianita** gracias por esos momentos compartidos, tú me conoces mejor que nadie y sabes que te quiero muchísimo, nuestra amistad es para siempre.

No podía olvidar hacer mención de mi gran amiga **Anaid**, gracias por confiar en mí, por darme tantos ánimos al final de mi carrera, por compartir tantas cosas, por ser una persona increíble y maravillosa. *Ti voglio bene e ricordati che io starò tra le cose che tu vivi.*

Maguito, Jozh, Nancy, Karly, Kari, Lizz, Rouse, Luis Felipe, David, Sam, Cris, Yezz, Cristi, Areli, Laura, Rene y **Carlos** son fabulosos, gracias por su lindísima amistad, por los momentos vividos y por los consejos, agradezco a la vida haberlos conocido.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO 1. MARCO TEÓRICO.....	5
Sección A. Naturaleza de Las Interacciones No Covalentes.....	6
1. Interacciones No Covalentes.....	6
1.1 Interacciones Electroestáticas (Pares Iónicos).....	6
1.2 Apilamiento π	7
1.3 Fuerzas de van der Waals.....	8
1.4 Enlace de Hidrógeno.....	9
Sección B. Reconocimiento Molecular.....	11
1. Sistemas Anfitrión-Huésped.....	11
2. Complejos Anfitrión-Huésped por Enlaces de Hidrógeno.....	12
3. Mecanismos de Respuesta en Quimiosensores Fluorescentes.....	13
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	15
Sección A. Receptores Artificiales para Nucleótidos.....	16
1. Receptores Basados en Dicarboxiamidas.....	16
2. Receptores Basados en Antraceno.....	17
3. Receptores Basados en Pireno.....	19
4. Receptores Basados en Acridina, Fenantrolina y Fenantridina.....	21
5. Receptores Basados en Flavonas.....	25

OBJETIVOS.....	26
HIPÓTESIS.....	26
JUSTIFICACIÓN.....	27
CAPÍTULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	28
Sección A. Condiciones Generales de Instrumentación.....	29
1. Disolventes y Reactivos.....	29
2. Instrumentación.....	30
2.1 Métodos Potenciométricos.....	30
2.2 Métodos Espectroscópicos y Espectrométricos.....	30
2.3 Difracción de Rayos X de Monocristal.	31
Sección B. Síntesis y Caracterización.....	32
1. Síntesis de Receptores Basados en Piridin-2,6-dicarboxamida.....	32
1.1 Receptor Dicationico BQ3RTf.....	33
1.2 Receptor Dicationico BQ3BzTf.....	34
1.3 Receptor Monocationico MQ3RTf.....	35
Sección C. Estudios de Reconocimiento Molecular.....	36
1. Titulaciones Espectrofluorimétricas.....	36
2. Titulaciones Espectrofotométricas por UV-Vis.....	37
3. Titulaciones Espectroscópicas por RMN.....	37
3.1 Titulación por ¹ H RMN.....	37
3.2 Titulación por ³¹ P RMN.....	37
4. Determinación Potenciométrica de Constantes de Acidez (pKa) en Receptores Dicationicos.....	38

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
Sección A. Estructuras Cristalinas.....	40
1. Monocristales Obtenidos de las Diferentes Sales de los Receptores.....	40
2. Receptores Basados en Piridin-2,6-dicarboxiamida.....	41
2.1 Receptor BQ3R.....	41
2.1.1 Compuesto BQ3RTf.....	41
2.1.2 Compuesto BQ3RBr.....	44
2.2 Receptor BQ3Bz.....	45
2.2.1 Compuesto BQ3BzTf.....	45
2.2.2 Compuesto BQ3BzCITf.....	47
3. Receptor Basado en N-quinolin Benzamida.....	48
3.1 Receptor MQ3R.....	48
3.1.1 Compuesto MQ3RTf.....	48
4. Análisis Estructural de los Receptores.....	50
Sección B. Reconocimiento Molecular.....	52
1. Estudios por Espectroscopia de Fluorescencia.	52
2. Determinación de Constantes de Acidez.....	59
3. Estudios por Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H y ³¹ P.....	62
4. Estudios por Espectroscopia Ultravioleta-Visible.	64
5. Análisis de Constantes de Asociación y Perspectivas.	66
CONCLUSIONES.....	68
REFERENCIAS.....	69
ANEXOS.....	72

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

A	Absorbancia
Å	Armstrong
ADP	Adenosin Difosfato
AMP	Adenosin Monofosfato
aq.	Acuoso
ATP	Adenosin Trifosfato
BQ3	N,N'-Bis(quinolin)piridin-2,6-dicarboxamida
Bz	Grupo Bencilo
CHES	Ácido Ciclohexilaminoetanosulfónico
CTP	Citosin Trifosfato
δ	Desplazamiento Químico
d	Señal Doble
dd	Señal Doble de Doble
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- d_6	Dimetilsulfóxido Deuterado
DPA	Dipicolinamida
D ₂ O	Oxido de Deuterio
EM	Espectrometría de Masas
eq.	Equivalente
EI	Impacto Electrónico
h	Hora
FAB	Bombardeo de Átomos Rápidos
GTP	Guanosin Trifosfato
HEPES	Ácido N-2-hidroxiethylpiperacina-N'-2-etanosulfónico
I	Intensidad de Fluorescencia
IR	Infrarrojo
J	Constante de Acoplamiento

K_{ass}	Constante de Asociación
K_{sv}	Constante de Stern-Volmer
λ	Longitud de Onda
m	Multiplete
M	Molaridad
M^+	Ión Molecular
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrilo
MES	Ácido 2-(N-morfolín)etanosulfónico
MHz	Megahertz
min	Minutos
MOPS	Ácido 3-(N-morfolín)propanosulfónico
MQ3	N-(3-quinolin)benzamida
m/z	Relación Masa Carga
pH	Potencial de Hidrógeno
PPi	Pirofosfato
ppm	Partes por Millón
[Q]	Concentración del Receptor
ρ	Fluorescencia Residual
R	Grupo Alquílico (-CH ₂ CO ₂ CH ₂ CH ₃)
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protio
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ³¹ P	Resonancia Magnética Nuclear de Fosforo
s	Señal Simple
T%	Transmitancia
t	Señal Triple
Tf	Triflato
TMS	Tetrametilsilano
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

RESUMEN

Una tendencia actual de la Química Supramolecular es desarrollar sensores moleculares artificiales con alta afinidad y selectividad en agua. Durante la última década se han reportado un gran número de receptores para aniones y nucleótidos basados en grupos donadores de enlaces de hidrógeno que tienen éxito en medios no acuosos (DMSO, MeCN, CHCl₃),¹ pero pierden su eficacia por completo en agua, lo cual limita seriamente sus aplicaciones como sensores químicos. En este contexto, los derivados de sales de quinolinio han sido estudiados en detección y reconocimiento molecular de aniones por sus relevantes propiedades fotofísicas. En este tenor, el presente trabajo describe la síntesis de una nueva serie de moléculas orgánicas que presentan cierta solubilidad en H₂O. Los compuestos BQ3RTf y BQ3BzTf están basados en el fragmento piridin-2,6-dicarboxiamida, mientras que MQ3RTf está basado en el fragmento benzamida. La estructura cristalina de los receptores BQ3RTf y BQ3BzTf demuestran que la cavidad es un sitio de asociación ya que se observa que los grupos amida interactúan por enlaces de hidrógeno con los iones triflato, por lo que se espera que los perfiles de Stern-Volmer con aniones tetraédricos (grupos fosfato en los nucleótidos) muestren un comportamiento parabólico que es típico de una asociación. Las estructura cristalina de BQ3RBr y BQ3BzClTf muestran que el halogenuro no se aloja en la cavidad de los receptores, en contraste se espera que el perfil de Stern-Volmer de cada uno de los receptores en presencia de Br⁻ y Cl⁻ presente un comportamiento lineal que es típico para procesos donde no hay una asociación. Las constantes de Stern-Volmer ($K_{SV} = 2 - 131$) muestran que los receptores pueden detectar concentraciones milimolares de nucleótidos y aniones con una tendencia ATP > GTP > ADP > CTP > AMP > Cl⁻ > PPI. El receptor dicatiónico BQ3RTf se asocia con aniones mucho más fuerte que su análogo monocatiónico MQ3RTf. El receptor BQ3RTf muestra selectividad para ATP ($K_{ass} = 1759 \pm 70 \text{ M}^{-1}$ $K_{SV} = 105$). Las titulaciones por ¹H RMN y ³¹P RMN de BQ3RTf confirman que los grupos amida interactúan con el grupo fosfato terminal del ATP y adicionalmente se corrobora que los grupos quinolinio son sitios que interactúan con la base purica del ATP a través de apilamiento π .

INTRODUCCIÓN

En 1987, Donald Cram, Jean-Marie Lehn y Charles Pedersen fueron galardonados con el premio Nobel de Química “por el desarrollo y uso de moléculas que presentan interacciones de estructura específica de alta selectividad”. Fue el reconocimiento de la comunidad científica a un nuevo campo emergente dentro de la Química: la Química Supramolecular. Lehn define esta ciencia como, **“La Química más allá de la molécula que estudia las entidades organizadas de alta complejidad que resultan de la asociación de dos o más moléculas mediante enlaces intermoleculares no covalentes”**.²

La Química Supramolecular comprende el reconocimiento molecular o complejación selectiva entre entidades supramoleculares, proceso que resulta fundamental en los mecanismos operativos presentes en los seres vivos. Se puede decir que el reconocimiento es una unión con un propósito, como un receptor es un ligando con un propósito. Ello implica un proceso de reconocimiento con una pauta a través de un conjunto de interacciones moleculares estructuralmente muy bien definidas. Una de las metas u objetivos de muchos investigadores que se dedican a la Química Supramolecular es imitar los procesos biológicos y entender cada una de las etapas que ocurren en determinado proceso. Así surge el concepto “Huésped-Anfitrión”³ o Química “Host-Guest” que está basado en una evolución del modelo “Llave-Cerradura” formulado por Fischer hace más de cien años.⁴

El presente trabajo de síntesis y reconocimiento molecular está enfocado a los estudios de asociación en medio acuoso y pH técnicamente fisiológico entre nucleótidos (especies aniónicas que tienen una participación fundamental en un amplio número de procesos biológicos) y receptores dicatiónicos que tienen en su estructura un fragmento comúnmente utilizado denominado piridin-2,6-dicarboxiamida. La información se ha dividido en diferentes capítulos entre los que se encuentran antecedentes, marco teórico, desarrollo experimental, resultados y discusión, conclusión y anexos; con el propósito de cubrir los lineamientos que el método científico amerita.

El apartado de antecedentes recopila y describe brevemente aquellos receptores más sobresalientes en el reconocimiento molecular de nucleótidos, haciendo énfasis en dos hechos, primero que dichos receptores realizan el reconocimiento molecular en medios proticos (MeOH, H₂O) lo cual es poco común y en segundo lugar, logran detectar nucleótidos en rangos de pH cercanos al fisiológico.

El capítulo destinado al marco teórico, contiene la información que representa el fundamento químico bajo el cual se realizó la experimentación. Comprende generalidades que van desde las principales interacciones no covalentes hasta el proceso de reconocimiento molecular.

La descripción detallada de los diferentes procedimientos utilizados en cada proceso químico se encuentra escrita en el desarrollo experimental. Se hace alusión a temperaturas, concentraciones, métodos y técnicas que se emplearon a lo largo del trabajo en el laboratorio. De igual manera, se incluyen aspectos sobre la caracterización de cada receptor sintetizado, es decir, los datos espectroscópicos y cristalográficos de cada uno, así mismo sus características físicas y rendimiento.

De los estudios de reconocimiento molecular podemos citar el uso de equipo instrumental como la Espectroscopia de Fluorescencia de Emisión que juega un papel importante en esta investigación, gracias al fenómeno espectroscópico de emisión de fluorescencia es posible la determinación de K_{ass} y K_{sv} , a partir de perfiles de Stern-Volmer que se obtienen de titulaciones fluorimétricas que proporcionan información acerca del proceso de extinción de la fluorescencia de los receptores sintetizados. Otro tipo de Métodos Espectroscópicos que complementan el estudio de reconocimiento molecular entre nucleótidos-receptores radica en el uso de la Espectrofotometría de UV-Visible y la Espectroscopia de RMN.

Una titulación espectroscópica de RMN ¹H y ³¹P nos permite averiguar que átomos de la molécula huésped (Nucleótido) se encuentran interaccionando con el receptor, el desplazamiento a campos altos o bajos de ciertas señales correspondientes al huésped indican una interacción supramolecular, es decir que ciertos átomos del huésped interaccionan directamente con el receptor para formar un complejo Receptor-Huésped.

La espectroscopia de UV-Visible ofrece un método confiable para determinar constantes de asociación (K_{ass}) por lo tanto el uso de esta técnica resulta ser útil para corroborar que efectivamente se lleva a cabo una asociación entre los receptores y sustratos de estudio.

Adicionalmente se hace uso de Métodos Potenciométricos que ayudaron a determinar pKa en los receptores dicatiónicos, los valores de pKa ofrecen información útil que ayuda a saber si a pH=6.5 (pH de trabajo) los grupo amida de BQ3RTf y BQ3BzTf se encuentran protonados, monoprotónados o totalmente desprotonados al momento de realizar las titulaciones fluorescentes, espectrofotométricas de UV-Visible y espectrométricas de RMN con los huéspedes de estudio, esto debido a que los átomos de hidrógeno de los grupos amida son el sitio de asociación, si no existen estos sitios de asociación, no puede haber reconocimiento molecular entre el receptor y el huésped.

La Difracción de Rayos X de Monocristal juega un rol interesante e igual de importante comparándolo con la Espectroscopia de Fluorescencia de Emisión, gracias a las estructuras cristalinas de los sistemas Huésped-Anfitrión se pueden analizar todas aquellas interacciones intermoleculares entre ambas moléculas, esto ofrece un complemento integral y conciso del modo de unión (reconocimiento molecular) receptor-sustrato en el estado sólido en contra parte con los estudios en solución llevados a cabo en las titulaciones fluorimétricas.

Los obstáculos que se fueron encontrando, las decisiones tomadas para solucionarlos y las resoluciones inferidas, así como la justificación de los resultados obtenidos durante la elaboración del proyecto se presentan en el apartado llamado resultados y discusión, donde se formula una conclusión póstuma al apartado basada en los resultados en estado sólido y en solución.

Finalmente, en los anexos se incluyen los datos cristalográficos y espectros de ^1H RMN, ^{13}C RMN, IR, y EM de cada uno de los productos sintetizados.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

La Química Supramolecular es un campo interdisciplinario de la Química que se encarga del estudio de todas aquellas interacciones intermoleculares y su efecto en la asociación de moléculas, reconocimiento molecular y ensamblajes moleculares. Las supramoléculas son entidades químicas formadas por dos o más moléculas, que se mantienen unidas por interacciones no covalentes como por ejemplo enlaces de hidrógeno o apilamiento π . Uno de los temas centrales de esta disciplina es el estudio de los sistemas Anfitrión-Huésped, el estudio de estos sistemas se centra en la forma en que estos se asocian y las interacciones que intervienen en el proceso de unión. Los sistemas Anfitrión-Huésped se engloban en un proceso llamado reconocimiento molecular. Es por ello que este capítulo fue dividido en dos secciones.

La sección A describe interacciones no covalentes que intervienen en los sistemas Anfitrión-Huésped como lo son enlaces de hidrógeno, apilamiento π , formación de pares iónicos, efectos hidrofóbicos, fuerzas de van der Waals, etc. cabe resaltar que el entendimiento de la naturaleza de los enlaces de hidrógeno ha permitido diseñar receptores para una amplia gama de moléculas de importancia biológica, por lo que el enlace de hidrógeno es considerado como la interacción intermolecular más importante de la Química Supramolecular. La sección B se refiere a los aspectos más relevantes del reconocimiento molecular, adicionalmente dentro de la sección B existe un apartado dedicado a los diferentes mecanismos de respuesta que pueden observarse en el diseño de quimiosensores luminiscentes para aniones, una justificación de este apartado radica en el extenso arsenal de receptores artificiales para detectar aniones a través de alguno de los cuatro mecanismos básicos en estos sistemas, uno de estos mecanismos de respuesta, el más popular, reside en la interacción directa entre el “anión (huésped)” y el “receptor (anfitrión)” que generalmente posee grupos fluorogénicos capaces de transducir una señal óptica que es monitoreada por métodos convencionales de análisis.

SECCIÓN A. NATURALEZA DE LAS INTERACCIONES NO COVALENTES

1 Interacciones No Covalentes.

Las especies supramoleculares se mantienen unidas mediante una gran variedad de interacciones no covalentes. En términos generales estas son de menor fuerza comparándolas con un enlace covalente alcanzando valores de enlace entre 2-300KJ mol⁻¹, mientras los enlaces covalentes se encuentran entre 150-450KJmol⁻¹. Este grupo de interacciones no covalentes o también mencionadas en algunas ocasiones como interacciones supramoleculares fueron reconocidas por primera vez por van der Waals en el siglo XIX. En la Tabla 1.1 se muestran las principales interacciones y fuerzas de enlace que presentan.

Tabla 1.1 Resumen de interacciones no covalentes con respectivas fuerzas de enlace.⁵

Interacción	Fuerza (KJ mol ⁻¹)
Ión-Ión	200-300
Ión-Dipolo	50-200
Dipolo-Dipolo	5-50
Enlace de Hidrógeno	4-120
Catión-π	5-80
Apilamiento π-π	0-50
van der Waals	<5
Efecto Hidrofóbico	Relacionada con la energía de interacción del solvente.

1.1 Interacciones Electroestáticas (Pares Iónicos).

Las interacciones electrostáticas están fundamentadas en la ley de Coulomb y abarcan las interacciones ión-ión, ión-dipolo y dipolo-dipolo. La atracción entre cargas de signo opuesto puede considerarse como el mayor componente de las fuerzas intermoleculares. Se considera que la interacción entre dos especies es calculada como la suma de las interacciones entre los pares de cargas puntuales, lo cual viene planteado en la ecuación que se presenta a continuación.

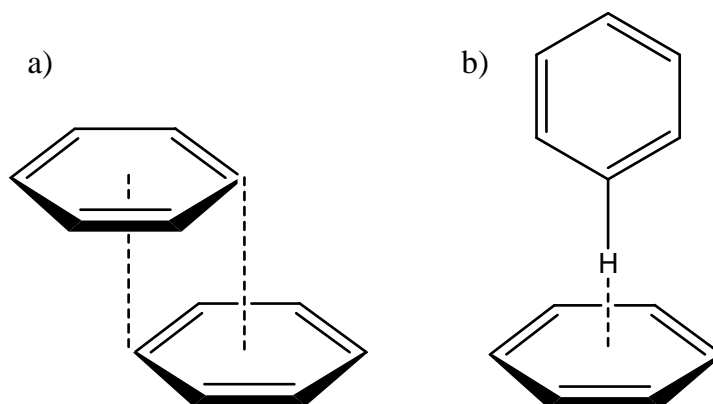
$$V = \sum_{i=1}^{N_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_o r_{ij}} \dots\dots\dots[1]$$

Donde N_A y N_B son las cargas puntuales de las moléculas (A y B), q_i y q_j son las cargas de los átomos de cada molécula, ϵ_0 es la constante de permitividad eléctrica en el vacío y r_{ij} es la distancia entre las moléculas (A y B).⁶

Las interacciones electrostáticas son consideradas de gran importancia a nivel biológico, estas son fuertemente dependientes de la distancia, en el caso de interacciones por par iónico depende del inverso de esta ($1/r$) y no muestran dependencia de la direccionalidad, es decir, éstas pueden ocurrir independientemente de la orientación de las especies participantes. Una descripción clásica de par iónico proviene de las ecuaciones de Bjerrum y Fouss las cuales consideran la distancia entre los átomos, la constante dieléctrica y las cargas permanentes del anión y el catión.⁶⁻⁷ En Química Supramolecular existen muchos sistemas que forman complejos estables mediante estas interacciones.

1.2 Apilamiento π .

El apilamiento π - π es una interacción débil que ocurre entre anillos aromáticos. Estas son de gran importancia en diferentes niveles y ejemplo de ello son las observadas en diferentes procesos biológicos como el plegamiento de proteínas y la estructura tridimensional del ADN. Se considera que existen dos tipos de orientaciones o conformaciones que generan un apilamiento favorable entre anillos aromáticos: un tipo de apilamiento se denomina cara-cara (Esquema 1.1), y un segundo tipo es conocido como cara-borde.



Esquema 1.1 Apilamientos presentes en el dimero del benceno. a) Cara-Cara y b) Cara-Borde.⁵

Estas interacciones son débiles, por ejemplo la interacción de un par de moléculas de benceno ha sido calculada en 2.2 KJ/mol.⁹

Los sistemas heteroaromáticos (O, N y S incorporados en la estructura) son más propensos a presentar estas interacciones, debido a que se observa un incremento en la deslocalización de electrones en el sistema y se favorecen las conformaciones desplazadas; de igual forma las cargas netas presentes en estos sistemas influyen en su geometría y energía.⁸⁻⁹

En un sistema π - π la densidad de carga negativa de la nube de electrones π puede provocar repulsión entre anillos en el acomodo cara-cara, sin embargo, cuando las unidades aromáticas están desplazadas de tal forma que las cargas positivas de estas queden en posición correcta, se puede ejercer una fuerza atractiva con el sistema π . (Ver *Esquema 1.1-a*) La literatura ofrece numerosos ejemplos de receptores que interactúan con nucleótidos por apilamiento π .¹⁰⁻¹²

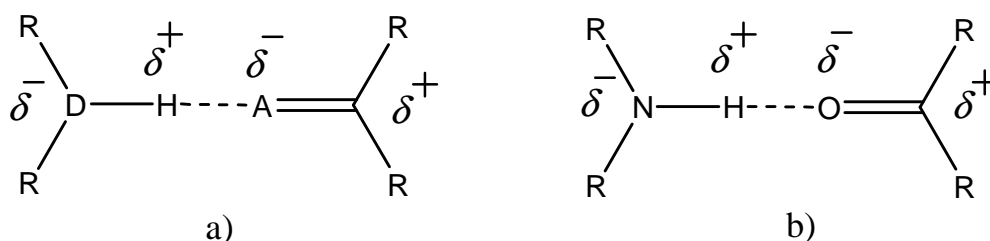
1.3 Fuerzas de van der Waals.

La primera evidencia sobre la existencia de este tipo de interacción fue reportada por Johannes Diderik van der Waals en 1873. Estas interacciones incluyen tres diferentes tipos de asociación entre dipolos y surgen a partir de las fluctuaciones de la distribución de electrones entre dos especies que se encuentran cercanas. La fuerza de estas interacciones es dependiente de la polarizabilidad de las moléculas que participan, siendo las más polarizables las que forman interacciones más fuertes y su dependencia de la distancia es expresada como $1/r^6$.

Cuando las moléculas que están interactuando a cierta distancia poseen dipolos permanentes y alinean esos dipolos de forma atractiva se conocen como interacciones de Keesom. Por otro lado, cuando una molécula con un dipolo permanente induce un dipolo en otra cercana se conocen como interacción de Debye y por último la interacción entre dos moléculas no polares pero polarizables es conocida como interacción de London. En la Química Supramolecular, específicamente en sistemas Anfitrión-Huésped, estas interacciones juegan roles importantes.

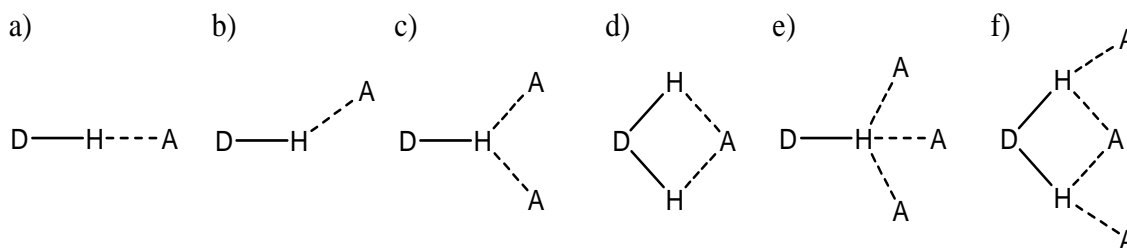
1.4 Enlace de Hidrógeno.

Los enlaces de hidrógeno son interacciones no covalentes de suma importancia en la naturaleza y en los materiales. La versatilidad de esta interacción se refleja en la gran cantidad de estructuras cristalinas que se han descrito hasta ahora. Un enlace de hidrógeno se forma cuando la electronegatividad de D con relación al átomo de hidrógeno H es suficiente como para atraer la densidad electrónica que forma parte del enlace covalente D-H y dejar al átomo H parcialmente desprotegido. Para que el aceptor A interactúe con el donador D este debe tener un par de electrones no compartidos o electrones polarizables π . (Esquema 1.2).



Esquema 1.2. a) Representación clásica de enlace de hidrógeno. b) Enlace de hidrógeno establecido entre un grupo carbonilo (aceptor) y un grupo amino (donador).⁵

Las estructuras cristalinas ofrecen un excelente medio para estudiar los enlaces de hidrógeno. La gran cantidad de estructuras encontradas en la Cambridge Structural Database son una fuente abundante de información. El Esquema 1.3 muestra las representaciones de las geometrías observadas en los enlaces de hidrógeno.



Esquema 1.3. Geometrías presentes en enlaces de hidrógeno. a) Lineal. b) Doblada. c) Donador bifurcado. d) Aceptor bifurcado. e) Trifurcado. f) Triple centro bifurcado.⁵

Los investigadores que estudian al enlace de hidrógeno por Espectroscopia de Infrarrojo, Espectroscopia Raman y Espectroscopia de Microondas, pueden dar una definición con base a sus efectos sobre las vibraciones moleculares. Los espectroscopistas de RMN observa un desplazamiento de la señal química provocada por el cambio en el ambiente electrónico alrededor del protón. En Difracción de Rayos X o de Neutrones se observan características geométricas de los enlaces, como ángulos y distancias. Los termodinámicos miden energías de enlace de hidrógeno, las calculan teóricamente y determinan las configuraciones asociadas con la misma energía. Todas estas propiedades proveen criterios para clasificar los enlaces de hidrógeno tal y como se muestra en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. Propiedades del enlace de hidrógeno fuerte, moderado y débil.¹³

	Fuerte	Moderado	Débil
Interacción D-H\cdotsA	Mayoritariamente covalente	Mayoritariamente electrostático	Electrostático
Longitud de Enlace	D-H \approx H \cdots A	D-H < H \cdots A	D-H \ll H \cdots A
H\cdotsA (Å)	~1.2-1.5	~1.5-2.2	2.2-3.2
D\cdotsA (Å)	2.2-2.5	2.5-3.2	3.2-4.0
Ángulo de Enlace (°)	175-180	130-180	90-150
Energía de Enlace (Kcal/mol)	14-40	4-15	<4
Desplazamiento Relativo en Banda de IR ν_s	25%	10-25%	<10%
Desplazamiento señal ^1H a campo bajo (ppm)	12-22	<12	-
Ejemplo	-Dímeros en fase gas con ácidos o bases fuertes. -Esponja de protones. -Complejos con HF.	-Ácidos. -Alcoholes. -Fenoles. -Todas las moléculas biológicas.	-Dímeros en fase gas con ácidos o bases débiles. -C-H \cdots O/N

El entendimiento de la naturaleza de los enlaces de hidrógeno ha permitido diseñar receptores para una amplia gama de moléculas de importancia biológica. Por lo que el enlace de hidrógeno es considerado como la interacción intermolecular más importante de la Química Supramolecular.

SECCIÓN B. RECONOCIMIENTO MOLECULAR

1 Sistemas Anfitrión-Huésped.

El reconocimiento molecular es una de las grandes áreas que conciernen a la Química Supramolecular. La forma en que un anfitrión y un huésped se asocian generalmente está mediada por las interacciones no covalentes que participan simultáneamente en ese proceso.² El principio llave-cerradura propuesto por Fisher describe los factores esenciales en el proceso de reconocimiento molecular, uno de ellos es el ajuste geométrico perfecto que debe existir entre ambas especies.¹⁴ Por otro lado, y algo que va de la mano con lo anterior es la existencia de los sitios necesarios de unión entre ambas especies, es decir, que estos sitios de unión en el anfitrión sean complementarios en el huésped. Cuando un anfitrión muestra preferencia hacia un determinado huésped se conoce como selectividad, y surge de los factores mencionados anteriormente. El ejemplo más utilizado para describir este principio es el de los sistemas enzimáticos. Koshland propuso que el mecanismo de unión de estos sistemas es más de un proceso activo, donde la enzima cambia de forma durante el enlace con la finalidad de unirse con el sustrato, esto se conoce como ajuste inducido. Cuando un anfitrión está preorganizado, este no debe sufrir grandes cambios conformacionales para unir al huésped, de tal forma que son energéticamente más favorables (Figura 1.1).

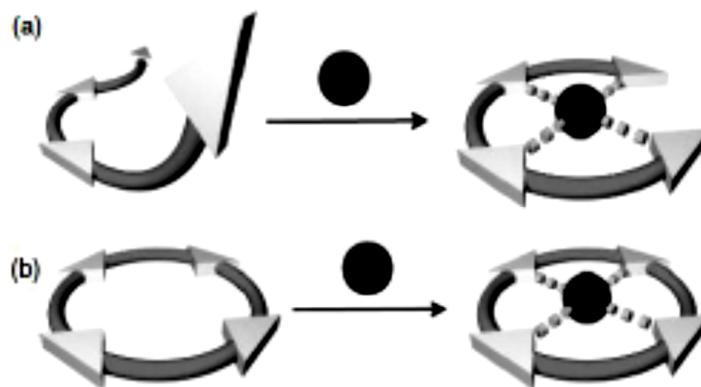
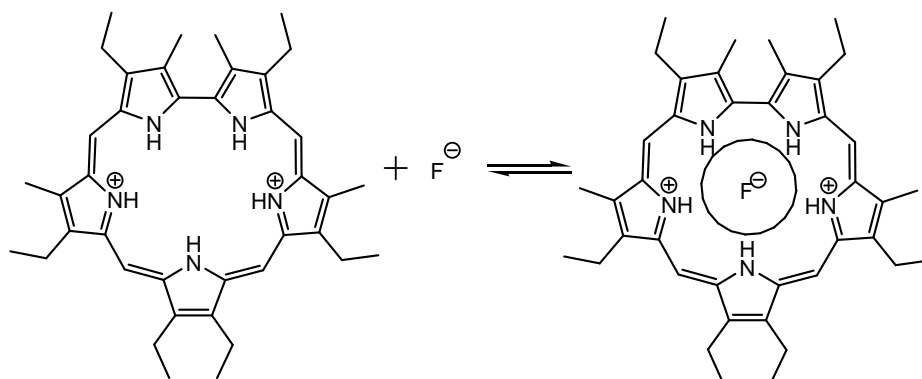


Figura 1.1 a) La molécula no preorganizada sufre cambios conformacionales con la finalidad de unir a un huésped. b) Una molécula que posee una estructura preorganizada no necesita cambios conformacionales significativos al momento de unir a determinado huésped.⁵

2 Complejos Anfitrión-Huésped por Enlaces de Hidrógeno.

El reconocimiento molecular es la base del procesamiento de la información a nivel supramolecular. Éste puede dar lugar a cambios en las propiedades electrónicas, iónicas, ópticas o conformacionales de una especie supramolecular, generando con esto una señal.¹⁵ Dentro de este campo, los enlaces de hidrógeno contribuyen en gran manera a la afinidad y selectividad en reconocimiento molecular, ya que resultan esenciales en algunos sistemas químicos y biológicos para mantener su forma y función así como para explicar fenómenos biológicos tan complejos a nivel molecular como los procesos de asociación enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, replicación, transcripción y traducción del material genético, etc. Aunque un enlace clásico de hidrógeno individual es relativamente débil (1-6Kcal/mol), colectivamente pueden tener una gran fuerza, influyendo en la obtención de una conformación preferente mediante la formación de una estructura tridimensional rígida.¹⁶⁻¹⁷

El entendimiento de la naturaleza de los enlaces de hidrógeno, ha permitido diseñar receptores para una amplia gama de moléculas de importancia biológica.¹⁶⁻¹⁷ La mayoría de los receptores tienen como propósito primordial servir como mimetizadores de procesos biológicos basados en el reconocimiento molecular mediado por enlaces de hidrógeno utilizando sistemas simples. Podemos citar como ejemplo la hexadeciltetrametilsapfirina diprotonada, cuyo núcleo está constituido por un macrociclo con 5 átomos de nitrógeno. Este compuesto es muy selectivo a F^- frente al resto de haluros. Se encuentra formando enlaces de hidrógeno con los grupos NH .¹⁸



Esquema 1.4 Hexadeciltetrametilsapfirina diprotonada y su respectivo complejo supramolecular con fluoruro.¹⁸

3 Mecanismos de Respuesta en Quimiosensores Fluorescentes.

Un sensor químico o quimiosensor es cualquier dispositivo capaz de transformar información química en una señal analítica.¹⁹ Gran parte del trabajo en Química Supramolecular está enfocado, desde hace unas décadas, al estudio y uso de los quimiosensores sintéticos como un medio de mimetizar los receptores naturales. Recientemente, la demanda de sensores sintéticos se ha incrementado rápidamente debido a sus interesantes aplicaciones para usos analíticos. Es un campo para el que se prevé un crecimiento rápido.²⁰

En reconocimiento molecular para que un receptor pueda funcionar como quimiosensor, debe emitir una señal macroscópica que será inducida por la interacción del huésped y que tiene que poder medirse fácilmente. En este proceso, la información a nivel molecular, como la presencia o ausencia de determinadas especies en disolución se amplifica a nivel macroscópico, permitiendo por tanto su determinación cualitativa o cuantitativa.

Los sensores fluorescentes tienen la capacidad de interactuar selectiva y reversiblemente al sustrato con un cambio simultáneo en la fluorescencia. Existen cuatro mecanismos generales de respuesta fluorescente (*ver Figura 1.2*) que se presentan en la interacción del sensor (Anfitrión) y el sustrato (Huésped).²¹⁻²² De acuerdo a la Figura 1.2 proseguimos a describir cada uno de los mecanismos de respuesta:

- a) Estos sensores pueden ser de dos tipos. Aquellos en los que la unión del sustrato produce una disminución en la emisión de fluorescencia (Tipo CEQ. Del inglés Chelation Enhancement of Quenching) o aquellos en los que se produce un incremento en la emisión de fluorescencia (Tipo CEF. Del inglés Chelation Enhancement of Fluorescence). La unidad fluorescente está unida covalentemente al sitio donde se coordina el sustrato.
- b) Sensores en los cuales se da un amortiguamiento (Quenching) de la emisión de fluorescencia como consecuencia de la colisión directa del sustrato con la unidad fluorescente. Al igual que el diseño (a) la unidad fluorescente se encuentra unida covalentemente a la unidad receptora.

- c) Sensores donde la unidad receptora y la unidad fluorescente se encuentran formando un asociado molecular. Cuando se añade un determinado sustrato a la disolución de este conjunto, se produce una reacción de desplazamiento por lo que la unidad receptora pasa a formar un complejo con el sustrato, desplazando a la unidad fluorescente hacia la disolución y recuperando ésta su comportamiento espectroscópico no coordinado.
- d) Sensores que actúan como dosímetros, donde el sustrato le confiere determinadas propiedades cuando se mantiene unido al receptor y que son activadas una vez que el complejo molecular se separa dejando libre al sustrato y dosificando fluorescencia por parte del receptor.

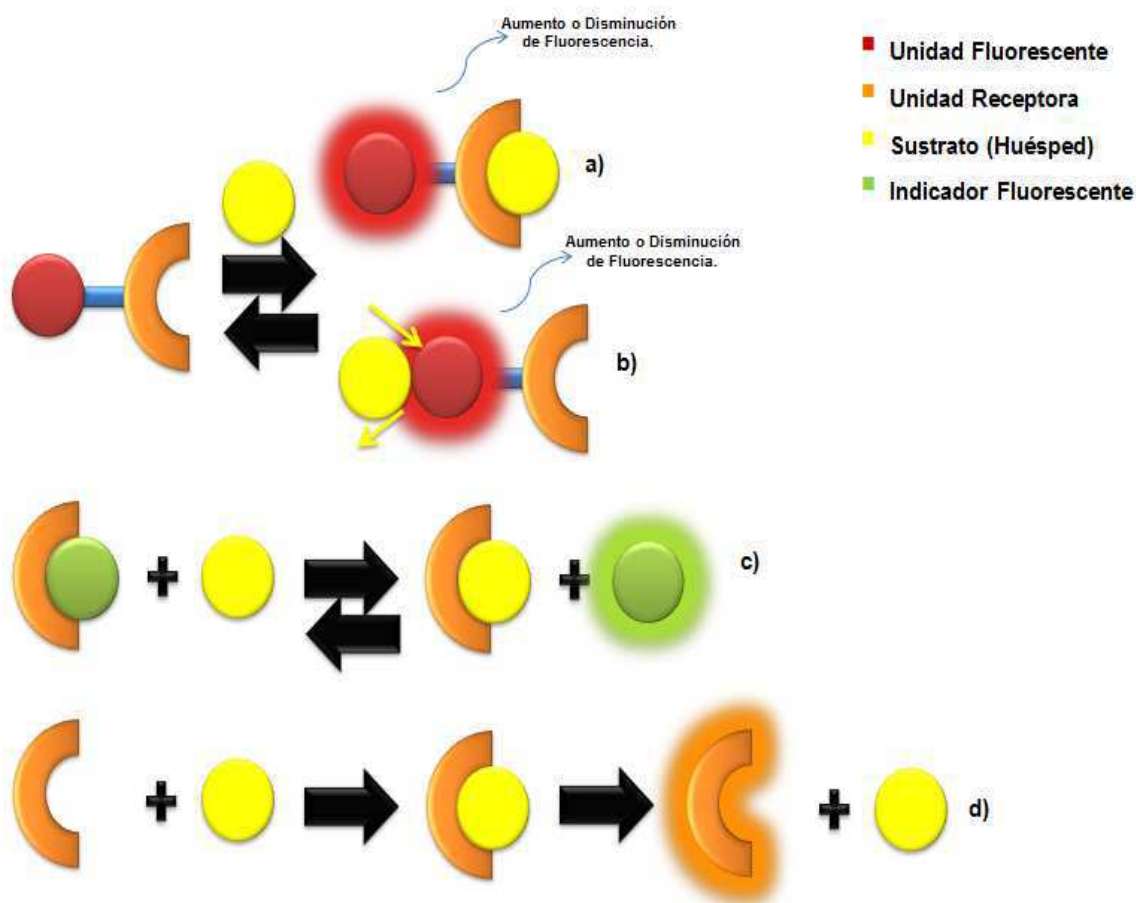


Figura 1.2 Mecanismos de respuesta fluorescente presentes en la interacción sensor-sustrato.

CAPÍTULO 2 ANTECEDENTES

El reconocimiento molecular de aniones es un área de gran interés dentro de la Química Supramolecular, esto debido a que las especies aniónicas (halogenuros, nucleótidos, cofactores y sustratos de enzimas) juegan un papel importante en los procesos bioquímicos y ambientales.²³⁻²⁵ Al respecto, a la fecha se han sintetizado muchos sistemas que han mostrado ser capaces de unir selectivamente y con buena afinidad a este tipo de huéspedes. Cabe mencionar que el conocimiento generado de estas investigaciones es la base del desarrollo de sensores y/o transportadores de estas especies con aplicaciones en análisis y separación.

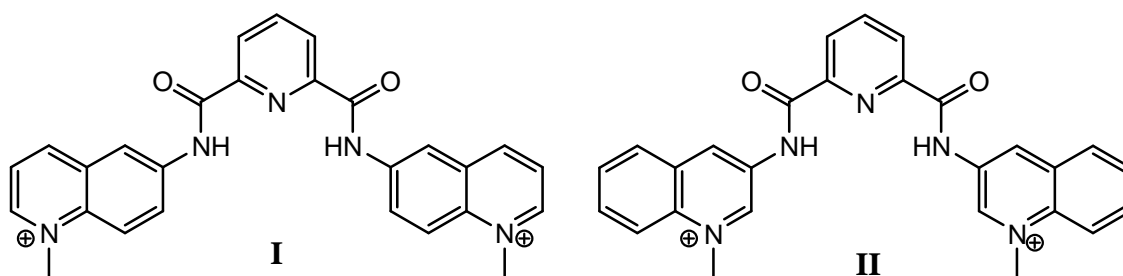
Un área que ha recibido gran atención es el reconocimiento dirigido hacia nucleótidos y sus derivados. Existen un gran número de sistemas capaces de unir mediante interacciones no covalentes este tipo de huéspedes, es por ello que este capítulo recopila aquellos receptores más sobresalientes en el reconocimiento de nucleótidos. Cabe resaltar que existe abundante investigación científica dirigida al reconocimiento de este tipo de huéspedes, sin embargo, es limitado el número de reportes dirigido a la quimiodetección en medios proticos y aún es más reducida la cifra en medio únicamente acuoso, de esta manera logramos centrarnos en un determinado tipo de sensores que pueden detectar nucleótidos en solución acuosa o en una mezcla de disolventes proticos.

El capítulo está dividido en cinco apartados, cada uno describe determinado tipo de receptores en función a los grupos funcionales o fragmentos que tienen el rol de ser unidades fluorescentes o unidades receptoras. Los apartados comprenden a receptores basados en dicarboxiamidas, derivados del antraceno, derivados de pireno, derivados de acridina, fenantrolina, fenantridina y basados en flavonas.

SECCIÓN A. RECEPTORES ARTIFICIALES PARA NUCLEÓTIDOS.

1. Receptores Basados en Dicarboxiamidas.

Los derivados de amidas secundarias son utilizados como grupos donadores de enlaces de hidrógeno, en receptores para aniones. Las amidas y sus derivados se usan debido a que presentan una conformación rígida y átomos de hidrógeno ácidos. El fragmento de piridin-2,6-dicarboxiamida es comúnmente utilizado para reconocer aniones. Los receptores **I** y **II** son moléculas fluorescentes que reconocen eficientemente nucleótidos en agua a pH=6.5 mostrando una mayor afinidad con ATP y GTP. La extinción de la fluorescencia tanto de **I** y **II** en presencia de estos nucleótidos se ajusta a un mecanismo dinámico (colisiones) y estático (asociación huésped-sensor).²⁶



Esquema 2.1 Receptores para nucleótidos basados en dicarboxiamidas.²⁶

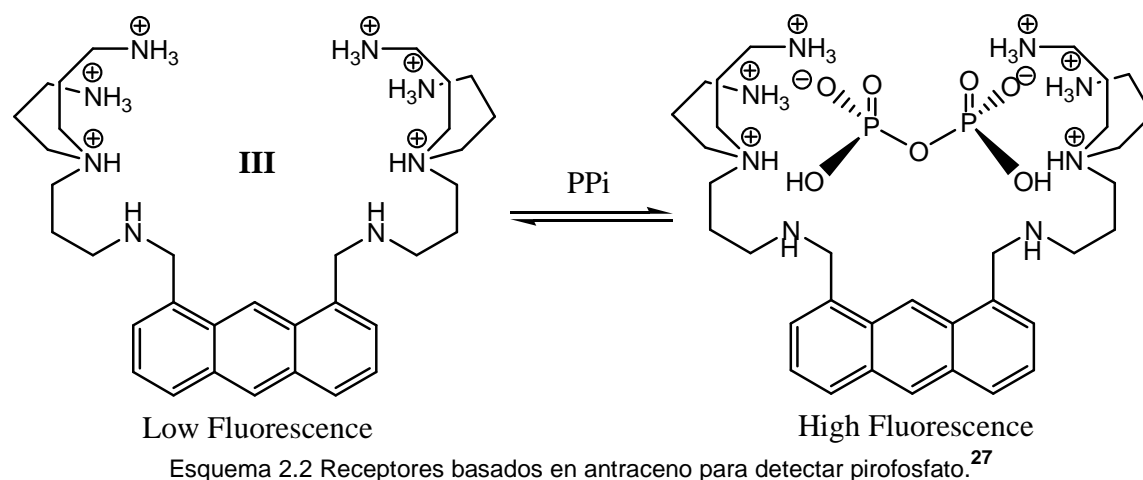
Los valores de K_{ass} y K_{sv} de los receptores **I** y **II** se encuentran recopilados en la Tabla 2.1. de acuerdo a los valores calculados para **I** y **II** corroboramos que existe una alta selectividad por GTP para **I** y de ATP para **II**. Se observa también que la afinidad de estos receptores es mayor para aquellos nucleótidos que poseen bases nitrogenadas derivadas de la purina como lo es la guanina y la adenina.

Tabla 2.1 Constantes de asociación y de Stern-Volmer para **I** y **II**. (M^{-1})²⁶

Nucleótido	I		II	
	K_{ass}	K_{sv}	K_{ass}	K_{sv}
GTP	5500	160	4700	200
CTP	2100	36	1900	21
ATP	5400	130	6000	190
ADP	1600	150	4800	570
AMP	-	470	1600	380

2. Receptores Basados en Antraceno.

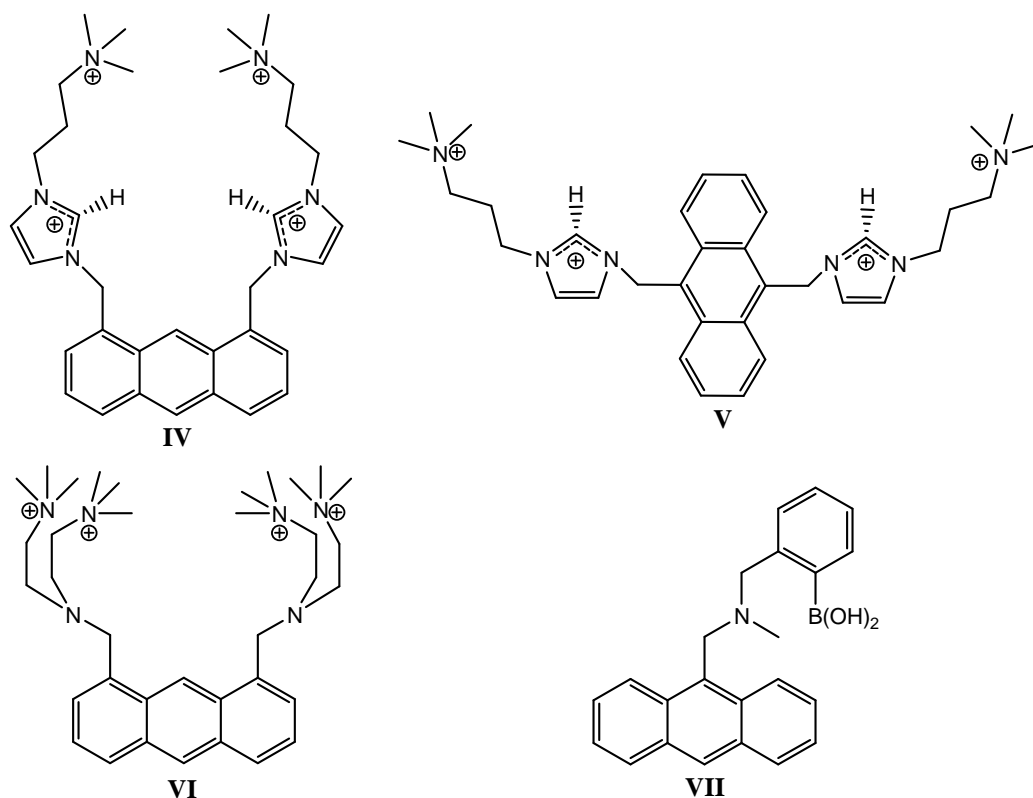
Los grupos naftaleno y antraceno son moléculas fluorogénicas que son ampliamente utilizadas en el diseño de nuevos sensores para el reconocimiento de muchos cationes y aniones. Los receptores basados en estas moléculas aromáticas se encuentran por lo regular enlazados a través de un espaciador alifático que une la unidad fluorescente de la unidad receptora. El desarrollo de **III** fue enfocado al reconocimiento del ión pirofosfato, $P_2O_7^{4-}$ (PPi) en un medio 100% acuoso. **III** se une al pirofosfato 2000 veces más fuertemente que al fosfato, la unión provoca un incremento en la intensidad de fluorescencia. El complejo 1:1 presenta una $K=2.9 \times 10^{-6}$ M a pH=7 (0.05 M HEPES).²⁷



Yoon ha informado de una nueva serie de sensores fluorescentes basados en antraceno, **IV** puede efectivamente y selectivamente reconocer GTP sobre ATP, ADP, AMP, pirofosfato, dihidrógeno fosfato, fluoruro y cloruro. El compuesto **IV** al interaccionar con GTP disminuye notablemente la intensidad de fluorescencia a pH=7.4 (10 mM HEPES). A las mismas condiciones **V** resulto ser más selectivo para ATP que GTP, mientras que el compuesto **VII** resulto ser selectivo para AMP.²⁸

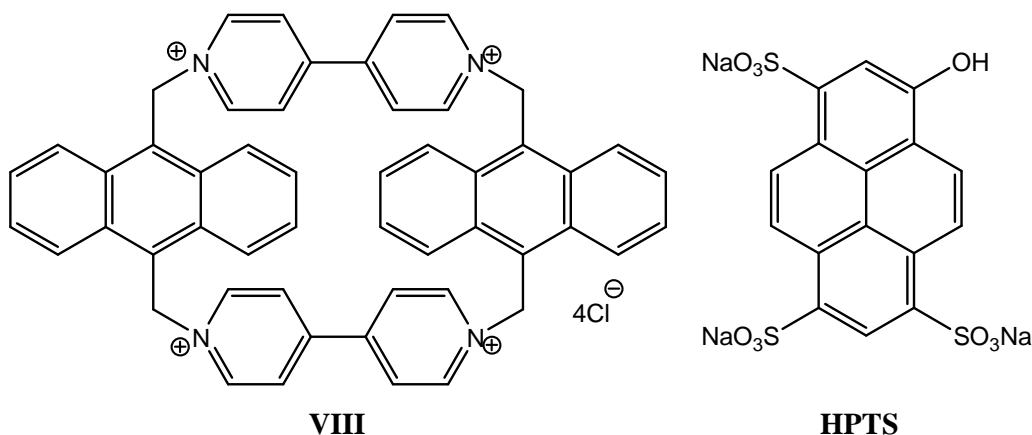
Tabla 2.2 Constantes de asociacion para **IV**, **V**, **VI** y **VII**.

	Compuesto	GTP	ATP	ADP	AMP
K_a (M)	IV	87000	15000	614	121
	V	24000	51000	-	-
	VI	4100	7700	2300	2000
	VII	6200	5200	4800	13000

Esquema 2.3 Receptores basados en antraceno para detectar nucleótidos.²⁸

Recientemente Ramaiah ha reportado un ciclofano que puede reconocer selectivamente ATP y GTP. El compuesto **VIII** presenta dos unidades de antraceno enlazadas a grupos piridinio, la cavidad es lo suficientemente grande para alojar la base nitrogenada de adenina o guanina a través de apilamiento π y los grupos piridinio interactúan electrostáticamente con el grupo fosfato terminal. A condiciones fisiológicas el ciclofano enlaza primeramente un indicador fluorescente (**HPTS**) que apaga completamente la emisión de la fluorescencia, posteriormente el complejo **VIII-HPTS** reacciona con el nucleótido desplazando al indicador fluorescente, promoviendo que este último recobre su naturaleza fluorescente.²⁹

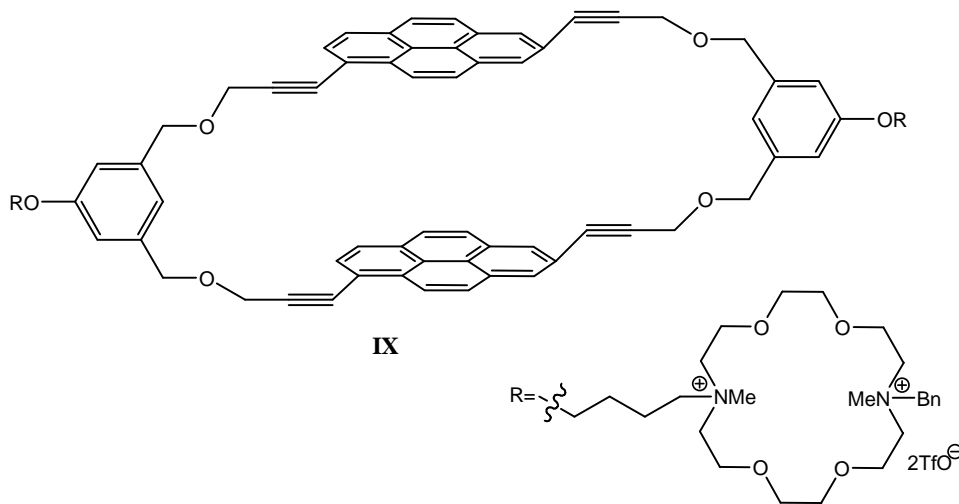
Figura 2.1 Visualización del mecanismo de reconocimiento de **VIII** con GTP.²⁹



Esquema 2.4 Receptor sintetizado por Ramaiah para detectar nucleósidos trifosfato.²⁹

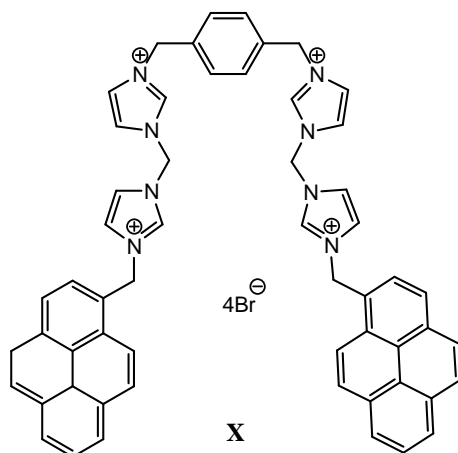
3. Receptores Basados en Pireno.

El pireno es una molécula que al igual que muchas estructuras aromáticas presenta fluorescencia, es por ello que se han sintetizado un gran número de receptores basados en esta molécula. Inouye y colaboradores sintetizaron una serie de pirenofanos y encontraron que **IX** puede reconocer nucleótidos. La habilidad para reconocer decrece en el orden de trifostatos > difosfatos > monofostatos. Con ATP como ejemplo, la emisión de fluorescencia de **IX** es reducida con la adición de ATP. El mecanismo de interacción es a través de apilamiento π entre la nucleó base y los fluoróforos de pireno e interacciones electrostáticas entre las diazoniacoronas con grupos fosfato.³⁰



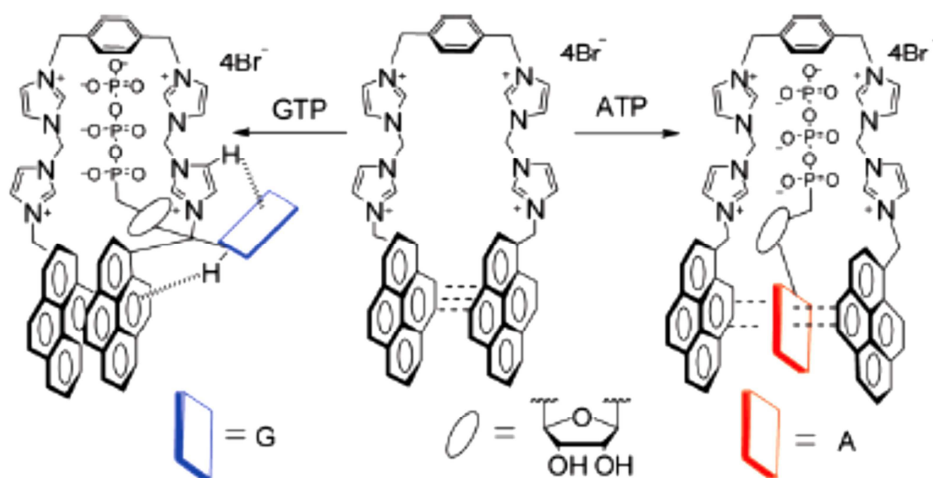
Esquema 2.5 Receptor basado en pireno. Diseñado para reconocer nucleótidos.³⁰

Yoon ha diseñado un receptor fluorescente soluble en agua basado en pireno y grupos imidazolio. El compuesto **X** reconoce eficientemente ATP sobre otras estructuras similares como GTP, CTP etc. a pH=7.4.³¹



Esquema 2.6 Receptor diseñado por Yoon para detectar ATP.³¹

Yoon postula que el núcleo base de guanina, citosina, timina o uracilo interaccionan recíprocamente desde el exterior con el dímero pireno-pireno que se encuentra estabilizado a través de apilamiento π y por ello no existe un cambio notable en la emisión de la fluorescencia. Por otro lado, la adenina puede estar entre los dos grupos pireno, provocando una separación que da lugar a la fluorescencia del monómero de pireno.

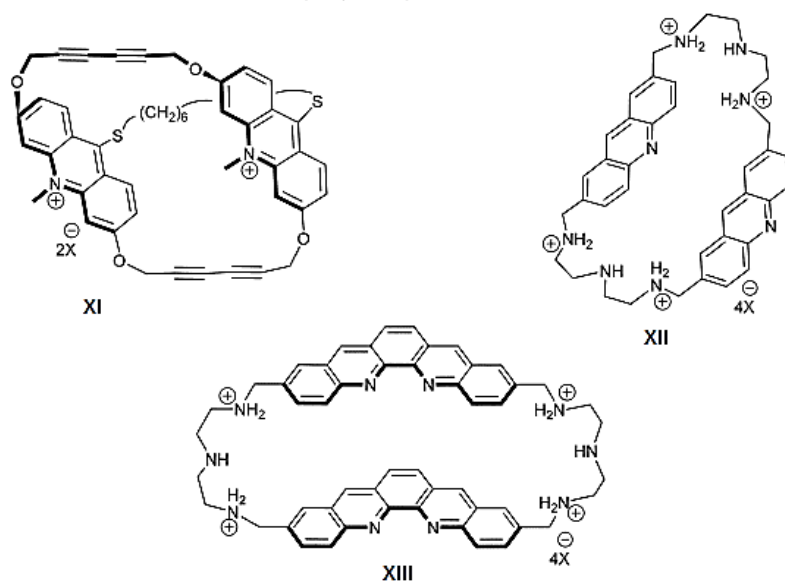


Esquema 2.7 Propuesta del modo de enlace de **X** con ATP y GTP.³¹

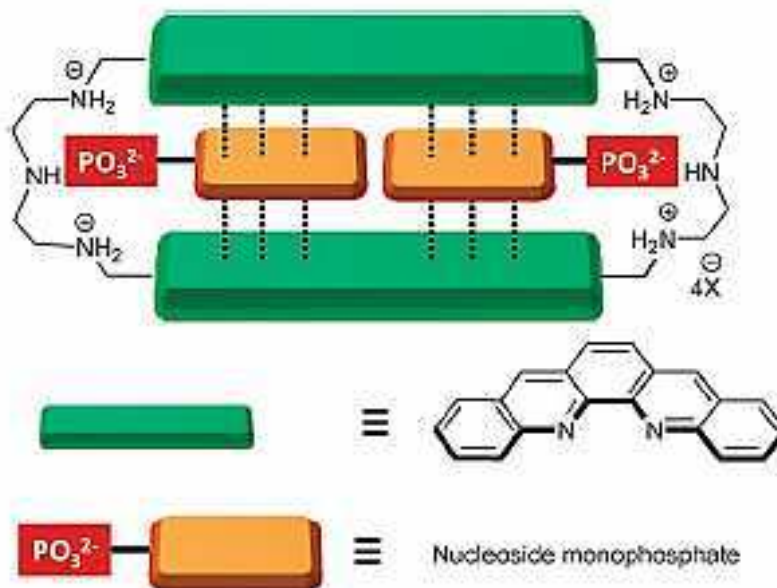
4. Receptores Basados en Acridina, Fenantridina y Fenantrolina.

La estructura química de la acridina, la fenantrolina y fenantridina consta de tres anillos planos unidos entre sí. Las moléculas son aromáticas y empíricamente se cree que la rigidez de sus anillos favorece a la fluorescencia provocando que el rendimiento cuántico sea mayor. Existen receptores artificiales especializados en detectar nucleótidos usando derivados de algunos de estos compuestos. Lehn ha sintetizado ciclofanos bis-intercalados basados en acridina. El ciclofano **XI** exhibe una interacción fuerte con moléculas como AMP y adenosina. La espectroscopia de absorción indica una estequiometría 1:1 para la formación de AMP- **XI**.³²

Por otra parte Later diseñó dos ciclofanos (**XII-XIII**) usando acridinas puenteadas por poliaminas cargadas. El ciclofano **XIII** exhibe un complejo estequiométrico 1:2 (huésped-anfitrión) con nucleósidos monofosfato, mientras que con nucleósidos difosfato y trifosfato exhibe una estequiometría 1:1. El inusual modo de unión entre un par de nucleósidos monofosfato y la cavidad del ciclofano no solo es atribuido a las interacciones básicas de apilamiento π e hidrofobicidad, también se basa en la estabilidad adicional que se genera por los enlaces de hidrógeno entre los dos nucleó base que se encuentran dentro del complejo supramolecular.³³

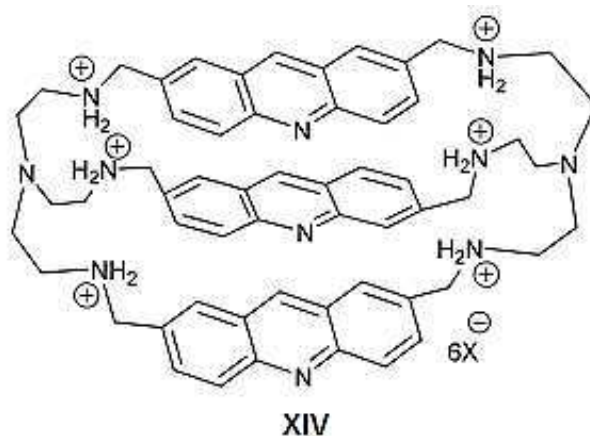


Esquema 2.8 **XI** receptor sintetizado por Lehn que quimiodetecta AMP.³² **XII-XIII** receptores sintetizados por Later para quimiodetectar nucleótidos.³³



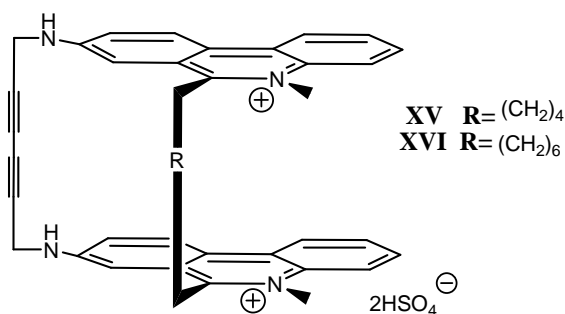
Esquema 2.9 Representación del complejo 2:1 formado entre el ciclofano **XIII** y dos nucleósidos monofosfato.³³

El macrobicyclo **XIV** contiene tres unidades de acridina, fue sintetizado por Lehn, en solución acuosa forma complejos altamente estables con nucleótidos que presentan bases derivadas de la purina. Las principales interacciones no covalentes en la formación de los complejos es atribuido al apilamiento π entre las unidades de acridina y las bases nitrogenadas derivadas de la purina.³⁴



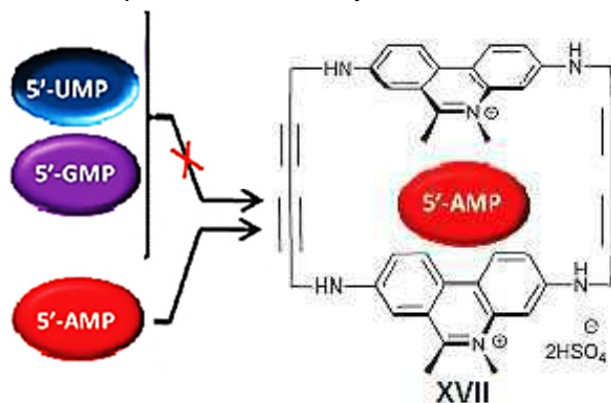
Esquema 2.10 Receptor basado en tres grupos acridina.³⁴

Los ciclofanos basados en fenantridina **XV-XVI** contienen puentes flexibles y rígidos en la posición 6,6' de la fenantridina y puentes rígidos bis(acetilénico) en las posiciones 8,8'-amino. Estos sistemas cíclicos mostraron diferencias pronunciadas en los espectros de absorción y emisión de fluorescencia, indicando la existencia de fuertes interacciones de apilamiento intramolecular. Los estudios de interacción de varios nucleótidos como ATP, ADP, AMP, GMP, CMP, UMP, TMP con **XV** o **XVI** muestran una extinción en la emisión de la fluorescencia. Las constantes de estabilidad de los complejos receptor-nucleótido fueron calculadas a partir de datos de titulaciones fluorimétricas, estas se encuentran en el orden de 10^5 - 10^6 $\text{dm}^3\text{mol}^{-1}$ con una estequiometría 1:1.³⁵



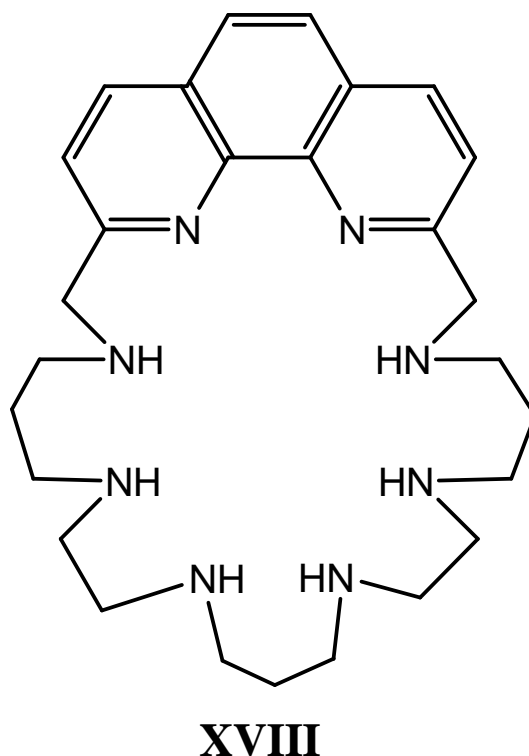
Esquema 2.11 Receptores derivados de fenantridina para reconocer nucleótidos.³⁵

Later Schneider ha diseñado un ciclofano rígido que puentea a través de grupos amino bis(acetilénico) de longitud corta dos unidades de fenantridina. Se observó que este ciclofano interacciona fuertemente con AMP con un incremento en la intensidad de fluorescencia significativo comparado con GMP y UMP.³⁶



Esquema 2.12 Reconocimiento selectivo de AMP usando **XVII**.³⁶

El macrociclo **XVIII** es un derivado de la fenantrolina, fue diseñado por Bencini et al. puede reconocer selectivamente ATP entre GTP, TTP, CTP, ADP y AMP a pH=6 a través de un mecanismo de apagamiento en la emisión de fluorescencia. El compuesto **XVIII** puede fácilmente protonarse en solución acuosa para así obtener una especie hexacatiónica a $\text{pH} \leq 7$. Esta especie policationica puede formar complejos con nucleotidos monofosfato, difosfato y polifosfato.³⁷



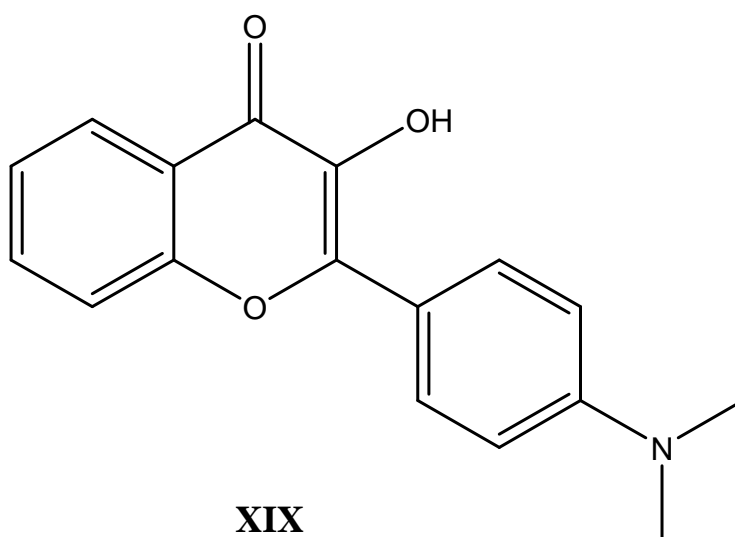
Esquema 2.13 Receptor sintetizado por Bencini que puede reconocer selectivamente ATP entre GTP, TTP, CTP, ADP y AMP a pH=6.³⁸

La adición de ATP a **XVIII** hexaprotonada (proporción molar 1:1) puede completamente extinguir la fluorescencia de **XVIII**, mientras que para ADP, AMP o algún otro nucleósido trifosfato induce a un decrecimiento de la fluorescencia muy pequeño. El apagamiento de la fluorescencia es atribuido a interacciones electrostáticas de tipo ion-ion y enlaces de hidrógeno entre los grupos fosfato y los grupos amonio. El apilamiento π entre la núcleo base y la fenantrolina contribuyen también con la extinción de la fluorescencia.

5. Receptores Basados en Flavonas.

Los flavonoides son moléculas hidrosolubles, fluorogénicas y cromogénicas de origen natural. La mayor parte de los flavonoides son derivados de la cromona (1,4-benzopirona). Dentro del grupo de los flavonoides se encuentra el grupo de las flavonas, que debido a sus propiedades fotoquímicas, se han buscado sintetizar compuestos que se deriven de estas con el propósito de funcionar como receptores tanto colorimétricos como fluorescentes que pudieran mimetizar procesos biológicos.

Existen reportes de flavonas artificiales que pueden reconocer determinado tipo de aniones, como lo es 3-Hidroxi-4'-(dimetilamino)flavona **XIX** que puede formar complejos con ATP que llevan a un incremento de intensidad de fluorescencia y un desplazamiento considerable a rojo de la de la excitación de la longitud de onda de **XIX**. Este cambio no sucede en presencia de algún otro nucleótido, por lo que el uso de **XIX** en pruebas *in vitro* ha sido estudiado, un ejemplo representativo es la detección de ATP en mitocondrias, donde se corrobora la especificidad de **XIX** para reconocer ATP, por lo que es posible realizar estudios *in vivo* para ATP.³⁸



Esquema 2.14 Receptor artificial constituido por un grupo flavonoide capaz de formar complejos con ATP que llevan a un incremento de intensidad en la emisión de fluorescencia.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Diseñar, sintetizar y evaluar nuevos quimiosensores fluorescentes para nucleótidos (ATP, GTP, CTP, ADP, AMP) y aniones con importancia biológica (halogenuros, pirofosfato) que compitan en afinidad y/o selectividad con los receptores informados hasta la fecha, esto mediante la inserción de cargas positivas en su estructura química y el uso de grupos fluorogénicos.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Sintetizar dos sensores químicos derivados de piridin-2,6-dicarboxamida con grupos N-alkil y N-bencil quinolinio insertados en el fragmento de los grupos amida.
2. Caracterizar los nuevos compuestos por técnicas Espectroscópicas y por Difracción de Rayos-X de Monocristal.
3. Realizar estudios de reconocimiento molecular en medios acuosos por titulaciones espectroscópicas (RMN, UV-Vis y Fluorescencia de Emisión).
4. Calcular las constantes de asociación a través de datos experimentales entre los quimiosensores y los nucleótidos propuestos para este estudio.

HIPÓTESIS

Se demostrará que compuestos catiónicos basados en N,N'-Bis(quinolin)piridin-2,6-dicarboxamida con grupos N-bencilados o N-alkilados serán quimiosensores fluorescentes para nucleótidos como ATP, GTP, CTP, ADP, AMP y aniones inorgánicos en medios acuosos.

JUSTIFICACIÓN

El proyecto propuesto explora uno de los retos modernos de la Química, que es el desarrollo y estudio de nuevos sistemas Receptor-Huésped con selectividad y afinidad que mimetizan los procesos biológicos. El proyecto ataca el diseño de nuevos quimiosensores, su síntesis química y estudio de asociación con moléculas que tienen relevancia biológica en enfermedades, procesos bioquímicos y Química Medicinal.

Se ha reportado en la bibliografía un gran arsenal de sensores para nucleótidos, sin embargo muy pocos realizan el estudio de reconocimiento a pH fisiológico y en medios próticos como lo es el agua, ya que en muchos casos el agua compite con los sitios de asociación que comúnmente son enlaces de hidrógeno, en este contexto la presente investigación realiza todo el estudio de reconocimiento molecular de nucleótidos en solución acuosa y pH cercano al fisiológico (6.5) con la finalidad de potencializar sus aplicaciones como quimiosensores.

Sintéticamente hablando los sensores químicos para nucleótidos reportados a la fecha resultan ser moléculas complejas y multifuncionalizadas que prácticamente hacen laborioso, costoso y complicado el proceso de síntesis y por ello el presente estudio aborda la síntesis de quimiosensores partiendo de moléculas sencillas y baratas como el dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo que a través de una simple reacción de sustitución nucleofílica unimolecular con dos equivalentes de 3-aminoquinolina se obtiene el fragmento de interés "Piridin-2,6-Dicarboxiamida" y en consecuencia de esto la ruta de síntesis resulta ser más sustentable. Por otra parte los quimiosensores son técnicas analíticas poderosas que requieran poco equipo especializado (por ejemplo un Espectrofotómetro de UV-Vis o de Fluorescencia de Emisión) y pueden ser aplicados confiablemente por personal no especializado en química, lo cual convierte a este proyecto en incluyente con la sociedad y sectores fundamentales para México como son el sector salud, clínico, etc.

CAPÍTULO 3 DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental de esta tesis se desarrolló en el laboratorio de Química Orgánica del Centro Conjunto de Investigación en Química Sustentable de la Universidad Autónoma del Estado de México y la Universidad Nacional Autónoma de México, los estudios de fluorescencia se llevaron a cabo en el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El capítulo detalla todo el proceso metodológico llevado a cabo a lo largo de esta investigación. Este fue dividido en tres secciones:

1. Sección A. Condiciones generales de Instrumentación.

Sección destinada a describir cada una de las condiciones del equipo instrumental, procedimiento técnico de análisis, uso de materiales, disolventes y reactivos.

2. Sección B. Síntesis y Caracterización.

Sección dedicada al procedimiento de síntesis, purificación y caracterización de cada uno de los receptores empleados en este estudio.

3. Sección C. Estudios de Reconocimiento Molecular.

Sección encargada de detallar la metodología de cada uno de los experimentos de titulación iniciando con la preparación de soluciones stock y procesos de dilución, hasta terminar con el procedimiento de determinación de constantes de acidez.

Adicionalmente en el apartado de anexos se puede observar cada uno de los espectros de resonancia magnética nuclear, infrarrojos, masas y datos cristalográficos.

SECCIÓN A. CONDICIONES GENERALES DE INSTRUMENTACIÓN

1 Disolventes y Reactivos.

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de fuentes comerciales (Sigma-Adrich), se usaron tal y como se recibieron, excepto en los casos que se indique el método de purificación. La mayoría de los disolventes son anhidros o grado HPLC, sin embargo algunos fueron secados por técnicas convencionales.

Tabla 3.1 Disolventes y reactivos utilizados en este estudio.

Disolventes y Reactivos	Método de Purificación
Metanol	-
Tolueno	Secado por 24h con CaH ₂ /destilación simple.
Acetona	Secado por 1h con Na ₂ SO ₄ /filtración por gravedad.
Dimetilformamida	-
Eter Dietílico	-
Agua Desionizada	-
Dimetil Sulfoxido	-
Dimetil Sulfoxido Hexadeuterado	-
Oxido de Deuterio	-
Dicloruro de Piridin-2,6-dicarbonilo	-
3-aminoquinolina	-
Cloruro de Benzoilo	-
Bromoacetato de Etilo	-
Bromuro de Bencilo	-
Trifluorometilsulfonato de Plata	Secado a 70°C por 3h.
Cloruro de Sodio	-
Bromuro de Sodio	-
Bicarbonato de Sodio	-
Hidróxido de Sodio	-
Ácido Trifluoroacético	-
Adenosin Trifosfato de Sodio	-
Adenosin Difosfato de Sodio	-
Adenosin Monofosfato de Sodio	-
Guanosin Trifosfato de Sodio	-
Citosin Trifosfato de Sodio	-
Pirofosfato de Sodio	-
Ácido 3-(N-mofolín)propanosulfónico	-
Ácido Ciclohexilaminoetanosulfónico	-
Ácido 2-(N-morfolín)etanosulfónico	-

2 Instrumentación.

Los estudios de asociación, identificación y caracterización de los productos se realizaron a través de Métodos Cristalográficos, Espectroscópicos, Espectrométricos y Potenciométricos como Rayos X, IR, RMN, EM, UV-Vis y Fluorescencia.

2.1 Métodos Potenciométricos.

Los experimentos Potenciométricos fueron realizados con un Potenciómetro MeterLab modelo PHM210 con una precisión de ± 0.005 unidades de pH y electrodos de vidrio marca BOECO.

2.2 Métodos Espectroscópicos y Espectrométricos.

Los espectros de IR, se realizaron usando un equipo Perkin-Elmer Attenuated Total Reflectance FT-Spectrometer (ATR); en todos los espectros obtenidos se muestra el número de onda (cm^{-1}) contra el por ciento de transmitancia (%T).

Los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C y ^{31}P , se realizaron utilizando TMS como referencia y como disolvente deuterado DMSO- d_6 y/o D_2O , para ^1H el equipo operó a 300MHz, ^{13}C a 75MHz y ^{31}P a 121.46MHz. Equipo Bruker Advanced 300MHz. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm.

Los espectros de masas fueron obtenidos usando un Espectrómetro de Masas marca Jeol modelo JMS AX-505 HA, las muestras se analizaron por inyección directa y el modo de ionización en algunos casos fue por EI o FAB.

Los experimentos por Espectrofotometría de UV-Visible fueron hechos con un Espectrofotómetro de arreglo de diodos, Perkin Elmer modelo Lambda 25, con resolución de 2nm con una precisión de longitud de onda $<\pm 0.5\text{nm}$ y una precisión fotométrica $<\pm 0.005\text{A}$ a 1.2, acoplados a un controlador de temperatura a 25°C . Las celdas utilizadas son de cuarzo (Paso óptico [1cm], Volumen [3mL]).

Los experimentos por Espectroscopía de Fluorescencia fueron realizados con un Espectrofluorómetro Varian modelo Cary Eclipse (ventana espectral de 200 a 800nm), con una exactitud de longitud de onda de $\pm 0.5\text{nm}$ y una relación señal ruido 550/1. Las celdas utilizadas son de cuarzo (Paso óptico [1cm], Volumen [3mL]).

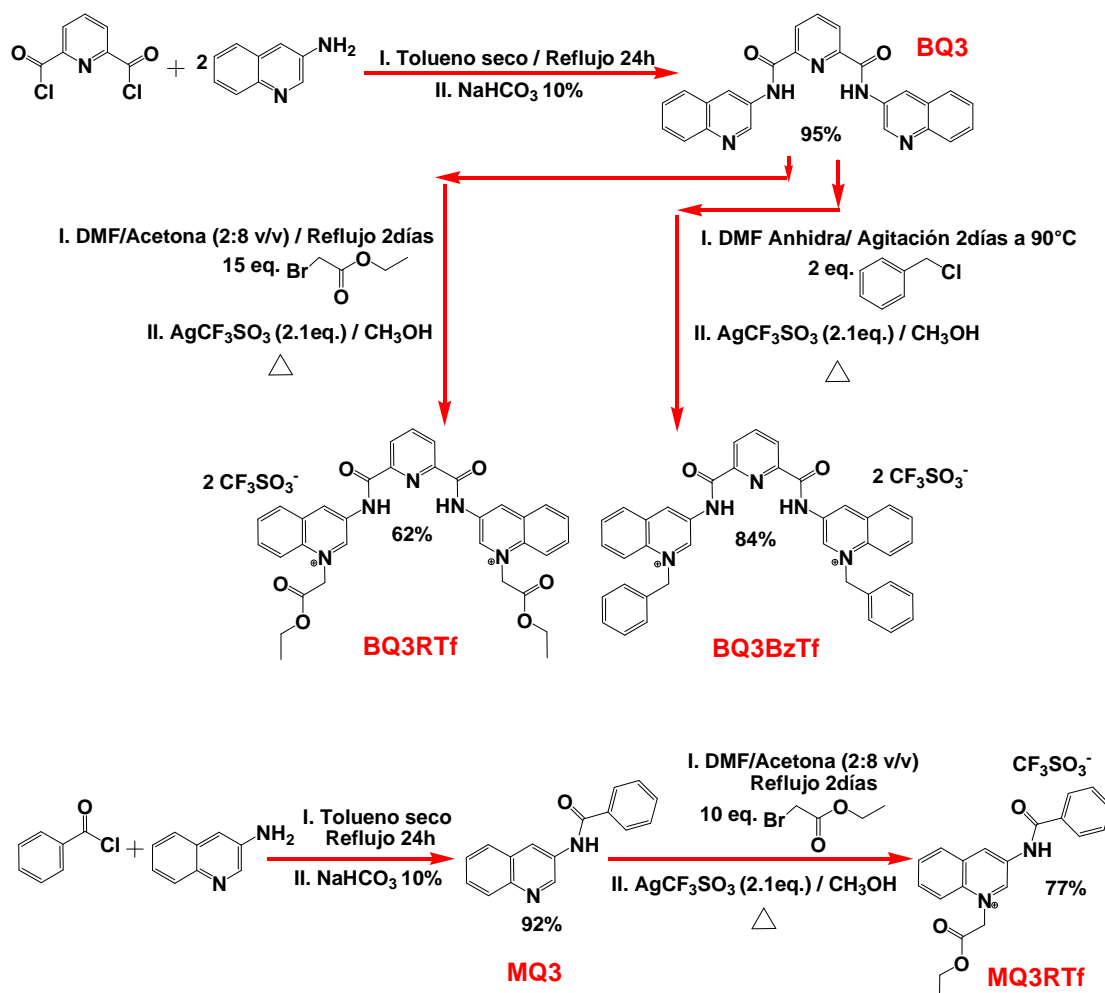
2.3 Difracción de Rayos X de Monocristal.

Los estudios por Difracción de Rayos X fueron realizados con un Difractómetro de Monocristal Bruker-APEX con un detector de área CCD y un monocromador de grafito ($\lambda_{\text{MoK}\alpha} = 0.71073\text{\AA}$). Los datos fueron colectados a $T = 100\text{K}$. Las intensidades medidas fueron reducidas a F^2 y correlacionadas por absorción con SADABS (SAINT-NT). Las estructuras fueron resueltas por métodos directos y refinadas usando el software SHELXTL-NT. Los átomos diferentes al hidrógeno fueron refinados anisotrópicamente. Los átomos de hidrógeno del tipo CH fueron localizados en posiciones geoméricamente calculadas usando un modelo rígido. Los átomos de hidrógeno del tipo OH y NH fueron localizados por mapas diferenciales de Fourier y refinados mediante modelo rígido, fijando las longitudes de enlace a 0.84\AA y 0.86\AA , respectivamente. Las figuras fueron creadas con SHELXTL-NT, MERCURY 1.4. Las interacciones de enlace de hidrógeno fueron calculadas con el programa WINGX.

SECCIÓN B. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN

1 Síntesis de Receptores Basados en Piridin-2,6-dicarboxamida.

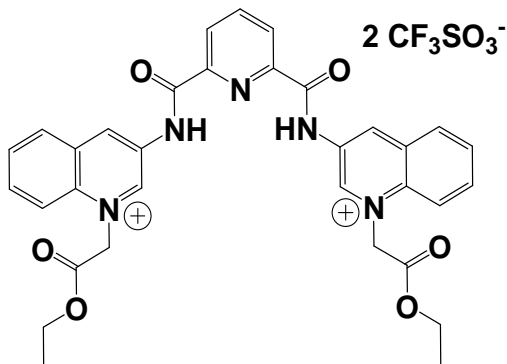
El Esquema 3.1 representa de manera generalizada la ruta sintética de cada uno de los compuestos empleados en este estudio. A través de las sales de triflato se realizaron los estudios de reconocimiento molecular. La caracterización de los compuestos fue realizada por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , Espectrometría de Masas (FAB/EI), Espectroscopía de Infrarrojo (ATR) y Difracción de Rayos X de Monocristal. Los datos cristalográficos y los espectros se encuentran en la sección de Anexos.



Esquema 3.1 Ruta sintética de los receptores de piridin-2,6-dicarboxamida (BQ3RTf, BQ3BzTf) y la respectiva N-quinolin benzamida de BQ3RTf.

1.1 Receptor Dicationico BQ3RTf.

Trifluorometilsulfonato de N,N'-Di(3-N''-etilacetatoquinolinio)piridin-2,6-dicarboxiamida.



Una mezcla de 3-aminoquinolina (1.5g) y dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo (1.06g) en 50mL de tolueno seco se colocó a reflujo por 24 horas. De la mezcla de reacción se obtuvo un precipitado amarillo que fue colectado por filtración a vacío, lavado con acetona y neutralizado con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 15% para así obtener un polvo blanco correspondiente al compuesto N,N'-bis(3-quinolin)piridin-2,6-dicarboxiamida (BQ3) en un rendimiento de 95%. Este compuesto se hizo reaccionar con 15 equivalentes de bromoacetato de etilo en DMF/Acetona (2:8 v/v, 30mL) por 2 días. El precipitado amarillo fue separado por filtración y lavado con metanol frío para obtener el bromuro de N,N'-Di(3-N''-etilacetatoquinolinio)piridin-2,6-dicarboxiamida (BQ3RBr). La sal de bromuro fue disuelta en 500mL de metanol caliente y posteriormente se adicionaron dos equivalentes de triflato de plata. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 4 horas a 80°C. El precipitado gris correspondiente al bromuro de plata fue filtrado por gravedad a 80°C y el filtrado se dejó en reposo para obtener a través de evaporación lenta cristales de BQ3RTf adecuados para la Difracción de Rayos X. BQ3RTf se obtuvo en un rendimiento del 62%.

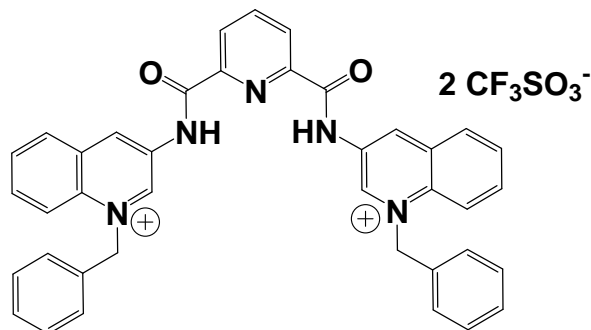
¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 2H), 10.19(s, 2H), 9.64 (s, 2H), 8.58 (m, 4H), 8.42 (m, 3H), 8.23 (d, J=6Hz, 2H), 8.09 (d, J=7.3Hz, 2H), 6.28 (s, 4H), 4.26 (q, J=7.08Hz, 4H), 1.30 (t, J=7.10Hz, 6H).

¹³C NMR (75MHz, DMSO-*d*₆) δ 166.25, 162.72, 147.57, 145.55, 141.31, 137.24, 135.97, 135.22, 132.61, 130.82, 130.40, 129.50, 126.73, 118.97, 63.25, 58.32, 13.88.

IR (ATR) cm⁻¹ 3254.87, 3088.52, 1752.94, 1691.36, 1542.24, 1256.36, 1152.36. **Masas FAB⁺** [M+Tf] 742.

1.2 Receptor Dicatiónico BQ3BzTf.

Trifluorometilsulfonato de N,N'-Di(3-N''-bencilquinolinio)piridin-2,6-dicarboxiamida.



En 50mL de tolueno seco se disolvió una mezcla de 3-aminoquinolina (1.5g) y dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo (1.06g), esta reacción se montó a reflujo durante 24 horas. El precipitado amarillo que se formó fue colectado por filtración a vacío, lavado con acetona y neutralizado con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 15%, de esta manera se obtuvo un polvo blanco correspondiente al compuesto N,N'-bis(3-quinolin)piridin-2,6-dicarboxiamida (BQ3) en un rendimiento de 95%. Este compuesto se hizo reaccionar con 2 equivalentes de bromuro de bencilo en DMF anhidra (7mL) por 2 días. El precipitado que se formó fue separado por filtración y lavado con metanol frío para obtener el bromuro de N,N'-Di(3-N''-bencilquinolinio)piridin-2,6-dicarboxiamida (BQ3BzBr). La sal de bromuro fue disuelta en 400mL de metanol caliente y posteriormente se adicionaron dos equivalentes de triflato de plata. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 4 horas a 80°C. El precipitado gris correspondiente al bromuro de plata fue filtrado por gravedad a 80°C y el agua madre se dejó en reposo para obtener a través de evaporación lenta cristales de BQ3BzTf adecuados para la Difracción de Rayos X. BQ3BzTf se obtuvo en un rendimiento del 84%.

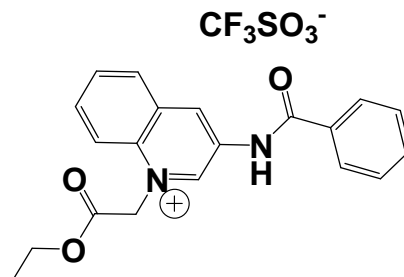
¹H NMR (300MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.93 (s, 2H), 10.27 (s, 2H), 9.66 (s, 2H), 8.57 (q, J= 8.5Hz, 7H), 8.17 (m, 2H), 8.04 (t, J= 7.9Hz, 2H), 7.48 (m, 4H), 7.39 (m, 6H), 6.46 (s, 4H).

¹³C NMR (75MHz, DMSO-*d*₆) δ 162.70, 147.57, 144.73, 141.31, 135.82, 135.22, 134.66, 133.67, 132.82, 130.63, 130.53, 130.06, 129.36, 129.20, 127.74, 126.69, 119.38, 63.16.

IR (ATR) cm⁻¹ 3294.93, 1684.91, 1544.20, 1223.95, 1165.51. **Masas** FAB⁺ [M+Tf] 750.

1.3 Receptor Monocatiónico MQ3RTf.

Trifluorometilsulfonato de N-(3-N'-etilacetatoquinolinio)benzamida.



Una mezcla de 3-aminoquinolina (1.0g) y cloruro de benzoilo (0.8mL) en 50mL de tolueno seco se colocó a reflujo por 24 horas. De la mezcla de reacción se obtuvo un precipitado amarillo que fue colectado por filtración a vacío, lavado con acetona y neutralizado con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 15% para así obtener un polvo beige correspondiente al compuesto N-(3-quinolin)benzamida (MQ3) en un rendimiento del 92%. Posteriormente MQ3 se hizo reaccionar con 10 equivalentes de bromoacetato de etilo en DMF/Acetona (2:8 v/v 20mL) por 2 días. Posteriormente a la mezcla de reacción se adiciono éter etílico frio (40mL) para precipitar el compuesto correspondiente a la sal de bromuro (MQ3RBr). El precipitado de MQ3RBr fue separado por filtración y lavado con éter etílico frio. La sal de bromuro fue disuelta en 500mL de metanol caliente y posteriormente se adiciono un equivalente de triflato de plata. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 4 horas a 80°C. El precipitado gris correspondiente al bromuro de plata fue filtrado por gravedad a 80°C y el agua madre se dejó en reposo para obtener a través de evaporación lenta cristales de MQ3RTf adecuados para la Difracción de Rayos X. MQ3RTf se obtuvo en un rendimiento del 77%.

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 11.43 (s, 1H), 10.03 (d, J= 2.2Hz, 1H), 9.44 (s,1H), 8.50 (d, J= 8.0Hz, 1H), 8.40 (d, J= 9.0Hz, 1H), 8.18 (t, J= 7.9Hz, 1H), 8.07 (m, 3H), 7.69 (m, 3H), 6.23 (s, 2H), 4.25 (q, J= 7.1Hz, 2H), 1.26 (t, J= 7.1Hz, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (75MHz, DMSO- d_6) δ 166.22, 166.04, 145.42, 136.50, 136.49, 135.41, 134.55, 133.40, 132.83, 130.31, 130.18, 129.25, 128.82, 127.88, 118.62, 62.50, 57.97, 13.88.

IR (ATR) cm^{-1} 3329.92, 3097.34, 1748.91, 1681.05, 1516.71, 1255.49, 1152.67. **Masas FAB⁺** [M+Tf] 335

SECCIÓN C. ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN MOLECULAR

1 Titulaciones Espectrofluorimétricas.

Las titulaciones fluorimétricas, fueron realizadas de la siguiente manera. Se prepararon soluciones stock de cada uno de las sales de triflato de los receptores y se usaron para obtener más diluidas directamente en las celdas de fluorescencia, se grabaron los espectros de emisión con una longitud de onda de excitación de 350nm y se adicióno alícuotas de soluciones concentradas de los aniones. Los espectros fueron grabados por duplicado después de agitar y esperar un par de minutos. Las concentraciones de las soluciones utilizadas en los experimentos se muestran en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Concentraciones usadas en las titulaciones fluorimétricas.

Receptor	Huésped	[Receptor] Stock (M)	[Receptor] celda (M)	[Huésped] Stock (M)	[MOPS] Stock (M)
BQ3R	ATP	7.0×10^{-4}	8.6×10^{-6}	0.08	0.04
	ADP				
	AMP				
	GTP			0.15	
	CTP				
	$H_3P_2O_7^-$				
	Cl^-			0.3	
Br^-					
MQ3	ATP	9.4×10^{-4}	7.5×10^{-6}	0.08	
	ADP				
	AMP				
	GTP			0.15	
	CTP				
	$H_3P_2O_7^-$				
	Cl^-			0.3	
Br^-					
BQ3Bz	Cl^-	7.11×10^{-4}	20×10^{-6}		

2 Titulaciones Espectrofotométricas por UV-Vis.

La titulación espectrofotométrica fue hecha siguiendo la siguiente metodología. Se preparó una solución stock concentrada, $7.0 \times 10^{-4} \text{M}$ del receptor en MeOH y a partir de esta solución se tomó una alícuota que fue diluida con una solución buffer, 0.04M de MOPS en una celda de cuarzo hasta obtener una concentración de $9.6 \times 10^{-5} \text{M}$, posteriormente se tomó el espectro de absorción y directamente en la celda se adicionaron alícuotas de una solución stock concentrada, 0.08M de ATP.

Los espectros de absorción para cada una de las adiciones del nucleótido se tomaron por duplicado después de 1min. Los datos experimentales fueron utilizados para determinar la constante de asociación.

3 Titulaciones Espectroscópicas por RMN.

El estudio de asociación por RMN, fue hecho para el receptor BQ3R y el nucleótido ATP debido a que posee una alta afinidad con respecto a otros nucleótidos o aniones inorgánicos empleados en este estudio.

3.1 Titulación por ^1H RMN.

La titulación se realizó directamente en un tubo de resonancia, se pesaron 5mg de BQ3RTf que se disolvieron en 700 μL de una mezcla de D_2O y $\text{DMSO-}d_6$ en una relación 1:1, se grabó el espectro y posteriormente en un tubo de resonancia diferente se agregaron 5mg de ATP disueltos en una mezcla 1:1 de D_2O y $\text{DMSO-}d_6$, el espectro se grabó. En un tercer tubo de resonancia se mezclaron 5mg de BQ3RTf y 5mg de ATP a la misma relación de disolventes deuterados. Después de un minuto de agitación se grabó el espectro.⁵²

3.2 Titulación por ^{31}P RMN.

La titulación se realizó directamente en un tubo de resonancia, se pesaron 5mg de ATP que se disolvieron en 700 μL de una mezcla de D_2O y $\text{DMSO-}d_6$ en una relación 1:1, se grabó el espectro y posteriormente en un tubo de resonancia diferente se agregó una mezcla de 5mg de ATP con 5mg de BQ3RTf disueltos en una mezcla 1:1 de D_2O y $\text{DMSO-}d_6$. Después de un minuto de agitación se grabó el espectro.⁵²

4 Determinación Potenciométrica de Constantes de Acidez (pKa) de Receptores Dicatiónicos.

Para determinar las constantes de acidez de los receptores dicatiónicos se hicieron experimentos típicos de perfiles de pH contra emisión de fluorescencia en solución acuosa. Los experimentos consistieron en preparar soluciones stock de los receptores BQ3RTf y BQ3BzTf. Para ambos receptores se realizó una dilución hasta una concentración de $8.12 \times 10^{-6} \text{M}$ en un volumen de 35ml, en presencia de una mezcla buffer 0.04m de MOPS, MES y CAPS, se llevó la solución hasta pH 2.5 con ácido trifluoroacético y se comenzó a titular con una solución 0.5m de NaOH, tomando pH y espectro de emisión después de cada adición.²⁶

CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

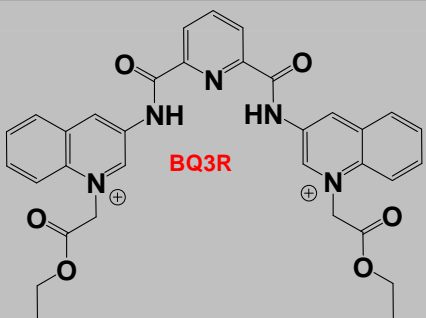
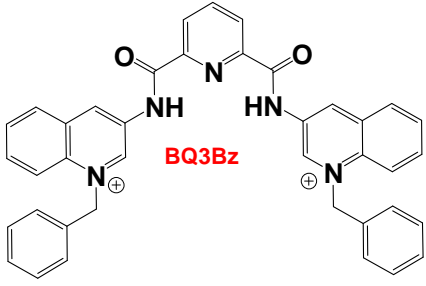
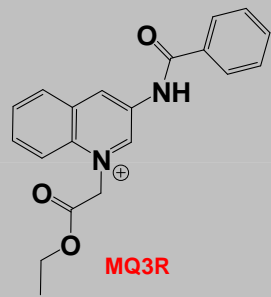
Los resultados más sobresalientes de este trabajo enfocados a la síntesis química de los receptores así como también a los estudios de sus estructuras cristalinas y al reconocimiento molecular con nucleótidos y aniones inorgánicos mediado por técnicas espectroscópicas se muestran a continuación. El capítulo está dividido en dos secciones: la sección A describe la síntesis y el análisis estructural de cinco compuestos, estos corresponden a tres sales de triflato de los receptores MQ3R, BQ3R y BQ3Bz, a una sal mixta de triflato-cloruro de BQ3Bz y a la sal de bromuro de BQ3R. El estudio incluye el análisis estructural y estudio de las interacciones receptor-anión presentes en estado sólido. Por lo tanto la Difracción de Rayos X de Monocristal juega un rol interesante e igual de importante comparándolo con la Espectroscopia de Fluorescencia de Emisión, gracias a las estructuras cristalinas de los sistemas estudiados se pueden analizar todas aquellas interacciones intermoleculares entre el anión y el receptor. La sección B engloba todo el estudio relacionado al reconocimiento molecular de los nucleótidos y de algunos aniones inorgánicos (cloruro, bromuro y pirofosfato) con receptores basados en piridin-2,6-dicarboxiamida en agua, en especial con la sal de triflato de BQ3R. Los estudios van desde fenómenos fluorescentes hasta fenómenos magnéticos que involucran el desplazamiento de señales en Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear. La primer parte de la sección B está enfocada a los estudios de asociación receptor-nucleótido llevados a cabo por titulaciones fluorimétricas para los receptores N-alquilados sintetizados en este estudio. La segunda parte involucra el cálculo de constantes de acidez únicamente para los receptores dicatiónicos. La tercera y cuarta parte discuten la titulación espectrofotométrica UV-Vis y la titulación espectroscópica de RMN (^1H y ^{31}P) entre el receptor BQ3R y ATP, la razón por la que únicamente se hizo el estudio del sistema BQ3R-ATP incurre en el elevado valor de su constante de asociación obtenida por Espectroscopia de Fluorescencia de Emisión frente al resto de los demás huéspedes.

SECCIÓN A. ESTRUCTURAS CRISTALINAS

1 Monocristales Obtenidos de Las Diferentes Sales de Los Receptores.

Cristales adecuados para Difracción de Rayos-X de Monocristal fueron obtenidos para los compuestos de la Tabla 4.1. La estructura cristalina de los compuestos corresponde a tres sales de triflato (BQ3RTf, BQ3BzTf, MQ3RTf), una sal de bromuro (BQ3RBr) y una sal mixta de triflato-cloruro (BQ3BzClTf).

Tabla 4.1 Receptores de piridin-2,6-dicarboxiamida (BQ3R, BQ3Bz) y la respectiva N-quinolin benzamida de BQ3R.

Receptor catiónico	Anión	Nomenclatura del compuesto.
 <p style="text-align: center;">BQ3R</p>	Triflato	BQ3RTf
	Bromuro	BQ3RBr
 <p style="text-align: center;">BQ3Bz</p>	Triflato	BQ3BzTf
	Cloruro Triflato	BQ3BzClTf
 <p style="text-align: center;">MQ3R</p>	Triflato	MQ3RTf

Los compuestos fueron obtenidos por la reacción de dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo con dos equivalentes de 3-aminoquinolina en tolueno seco seguido por un tratamiento con un agente alquilante (bromoacetato de etilo) para BQ3RTf o un agente bencilante (bromuro de bencilo) para BQ3BzTf en DMF-Acetona. Las sales de triflato de los compuestos fueron obtenidas por intercambio con triflato de plata en CH₃OH-H₂O. El compuesto MQ3RTf fue preparado por la misma ruta sintética pero utilizando bromuro de benzoílo en lugar de dicloruro de piridin-2,6-dicarbonilo. (*Ver Capítulo 3; Sección B; Página32*).

En la Tabla 4.2 se enlistan los compuestos de los que se obtuvieron monocristales adecuados para Difracción de Rayos X.

Tabla 4.2 Nomenclatura utilizada de las diferentes estructuras cristalinas de los receptores con diferentes aniones.

Compuesto	Disolvente de Cristalización
BQ3RTf	H ₂ O
BQ3RBr	CH ₃ OH-H ₂ O
MQ3RTf	H ₂ O
BQ3BzTf	CH ₃ OH
BQ3BzClTf	CH ₃ OH-H ₂ O

2 Receptores Basados en Piridin-2,6-dicarboxiamida.

2.1 Receptor BQ3R.

2.1.1 Compuesto BQ3RTf.

La evaporación lenta de una solución acuosa saturada del complejo BQ3RTf produce cristales rectangulares e incoloros adecuados para Difracción de Rayos X.

La Figura 4.1 muestra la estructura cristalina de la sal de triflato de BQ3R y las interacciones receptor-anión encontradas en el cristal. El receptor es prácticamente plano, los ángulos diedros entre los anillos de quinolina y el anillo central de piridina son 18.79° y 13.56°. Los grupos N-alifáticos de las quinolinas se encuentran en posición *antiperiplanar*. Un anión triflato está posicionado por debajo del plano del anillo central de piridina, la distancia entre el átomo de oxígeno (O7) y el plano es de 0.936Å.

El cristal muestra que los enlaces NH de los grupos amida se encuentran orientados en forma convergente hacia el átomo de oxígeno formando dos enlaces de hidrógeno del tipo N-H \cdots O. Las distancias y ángulos se resumen en la Tabla 4.3 Una interacción adicional ocurre a través de dos enlaces de hidrógeno del tipo C-H \cdots O con grupos CH aromáticos que están en la posición dos con respecto a los átomos de nitrógeno de los grupos quinolinio.

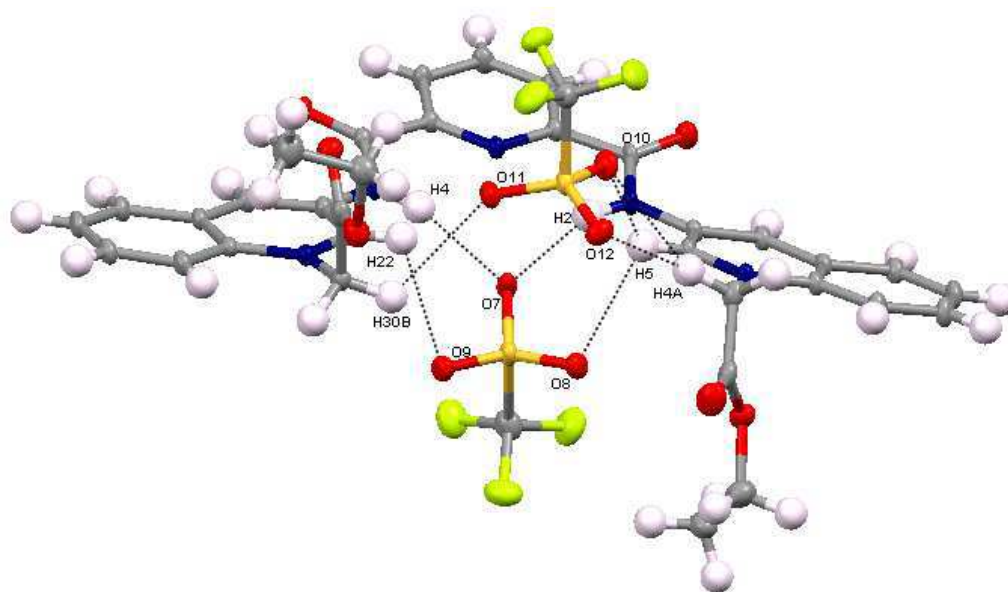


Figura 4.1 Perspectiva de la estructura cristalina de la sal de triflato de BQ3R. Los elipsoides térmicos se muestran con una probabilidad del 50%.

El segundo anión triflato se localiza fuera de la cavidad. Las distancias y ángulos se muestran en la Tabla 4.3 Los átomos de oxígeno (O10, O11, O12) se encuentran interaccionando con grupos CH alifáticos próximos al átomo de nitrógeno de las quinolinas formando enlaces de hidrógeno del tipo C-H \cdots O, adicionalmente también el átomo de oxígeno (O10) se encuentra formando un enlace de hidrógeno con un grupo CH aromático que está en la posición dos con respecto al átomo de nitrógeno de una de las quinolinas.

Enfocándonos a la conformación del receptor, se esperaría que el modo de asociación con el anión triflato y con otros aniones tetraédricos como fosfato sea similar tanto en estado sólido como en solución.

La distancia entre los grupos NH de las amidas convergentes es de $\text{NH}\cdots\text{HN}$, 3.0834 Å, y entre los grupos CH que están en la posición dos con respecto a los átomos de nitrógeno de las quinolinas, que también forman la cavidad es de $\text{CH}\cdots\text{HC}$, 4.3871 Å.

Tabla 4.3 Enlaces de hidrógeno seleccionados dentro de la estructura cristalina de la sal de triflato del receptor BQ3R.

Compuesto	Enlace-H	D-H [Å]	H \cdots A [Å]	D \cdots A [Å]	\angle DHA [°]	Simetría
BQ3RTf	C4-H4A \cdots O12	0.970(6)	2.408	3.489(9)	149.5(4)	x,y,z
	C4-H4A \cdots O10	0.970(6)	2.43	3.272(8)	148.0(4)	x,y,z
	C5-H5 \cdots O10	0.930(5)	2.554	3.108(8)	129.7(4)	x,y,z
	C30-H30B \cdots O11	0.970(4)	2.618	3.086(9)	114.6(3)	x,y,z
	C22-H22 \cdots O9	0.929(5)	2.127	2.939(6)	110.6(4)	-1+x,y,z
	C5-H5 \cdots O8	0.930(5)	2.183	2.981(8)	113.3(3)	-1+x,y,z
	N2-H2 \cdots O7	0.859(4)	2.488	3.009(4)	158.5(3)	-1+x,y,z
N4-H4 \cdots O7	0.860(3)	2.48	2.943(6)	160.7(3)	-1+x,y,z	

El arreglo cristalino del compuesto BQ3RTf se muestra en la Figura 4.2 y consiste en capas alternadas de iones triflato y unidades de receptor. Los cationes interactúan con dos aniones triflato los cuales se encuentran en lados opuestos del receptor.

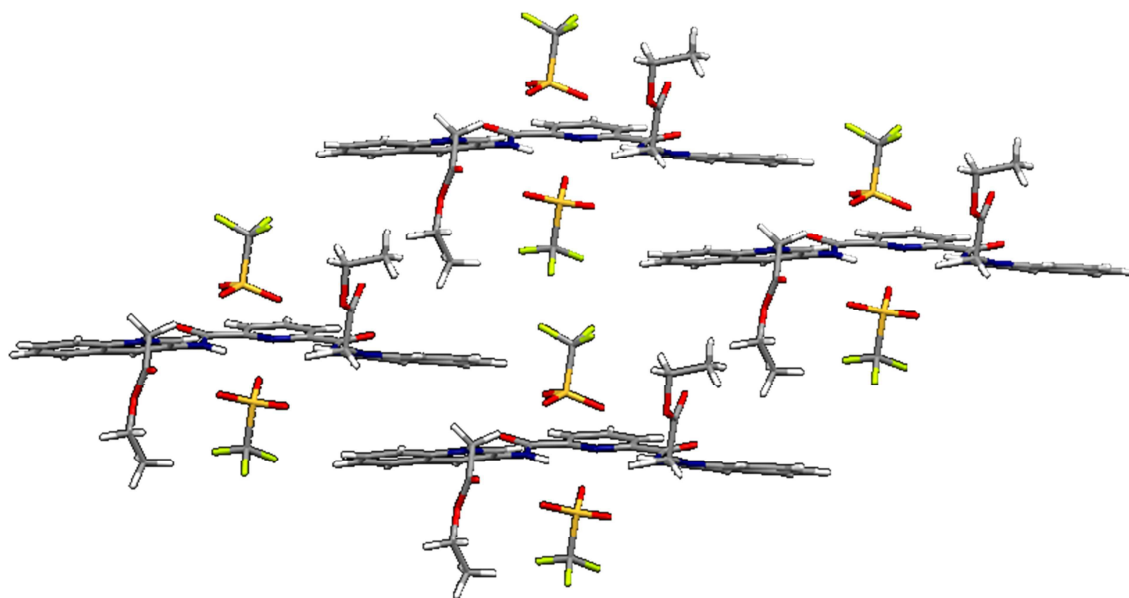


Figura 4.2 Arreglo cristalino de la sal de triflato de BQ3R.

2.1.2 Compuesto BQ3RBr.

La recrystalización en metanol-agua del bromuro de BQ3 produjo por evaporación lenta cristales color amarillo adecuados para Difracción de Rayos X. (Ver Figura 4.3).

El receptor posee los dos grupos amida en forma convergente, la distancia $\text{NH}\cdots\text{HN}$ y $\text{CH}\cdots\text{HC}$ es de 3.139 Å y 4.545 Å respectivamente, a diferencia de la sal de triflato este compuesto tiene una molécula de agua dentro de la cavidad. Las distancias y ángulos para enlaces de hidrógeno seleccionados se muestran en la Tabla 4.4

Tabla 4.4 Enlaces de hidrógeno seleccionados dentro de la estructura cristalina del compuesto BQ3RBr.

Compuesto	Enlace-H	D-H [Å]	H \cdots A [Å]	D \cdots A [Å]	\angle DHA [°]	Simetría
BQ3RBr	C15-H15 \cdots O31	0.950(7)	2.508	3.25(1)	134.5(4)	x,y,z
	C18-H18 \cdots O31	0.950(6)	2.430	3.22(1)	141.0(5)	x,y,z
	N2-H2 \cdots O31	0.86(5)	2.02	2.847(8)	160(5)	x,y,z
	N4-H4 \cdots O31	0.85(5)	2.05	2.898(9)	170(6)	x,y,z

La molécula de agua interactúa con el receptor a través de enlaces de hidrógeno del tipo $\text{N-H}\cdots\text{OH}_2$, $\text{C-H}\cdots\text{OH}_2$. Dos átomos de bromo interactúan por enlaces de hidrógeno con la molécula de agua hospedada en la cavidad.

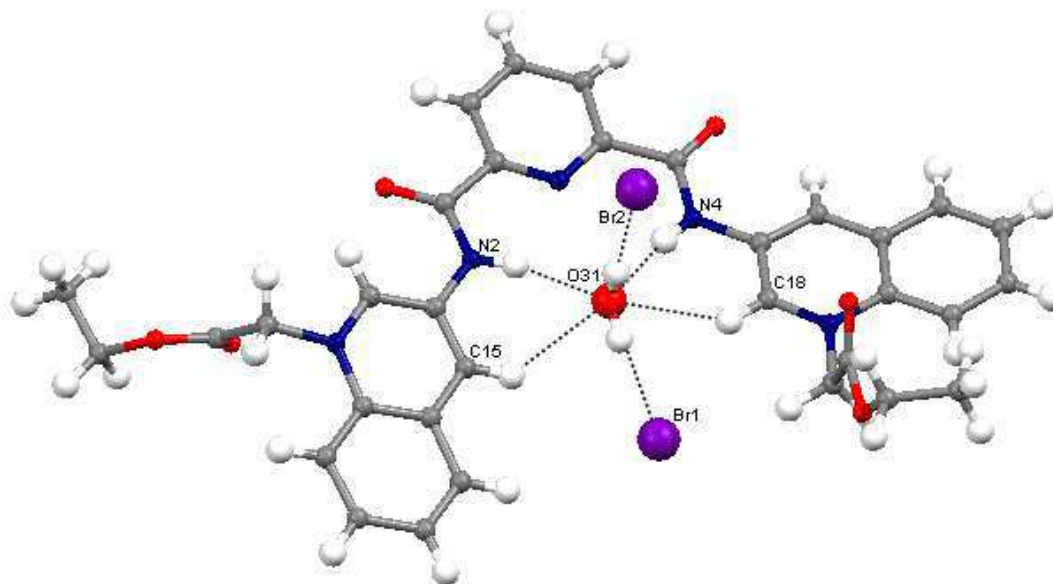


Figura 4.3 Perspectiva de la estructura molecular de la sal de bromuro de BQ3R. Los elipsoides térmicos se muestran en una probabilidad del 50%.

2.2 Receptor BQ3Bz.

2.2.1 Compuesto BQ3BzTf.

Cristales adecuados para la Difracción de Rayos X se formaron a partir de una solución saturada en metanol. La evaporación lenta produce cristales incoloros en forma cuadrada. La estructura cristalina del compuesto BQ3BzTf junto con las interacciones receptor-anión se muestran en la Figura 4.4 El receptor es prácticamente plano, los grupos NH de las amidas se encuentran orientados en forma convergente hacia la cavidad y los grupos N-bencilo de las quinolinas se encuentran en posición *antiperiplanar*. La Tabla 4.5 muestra distancias intermoleculares y ángulos para los enlaces de hidrógeno seleccionados.

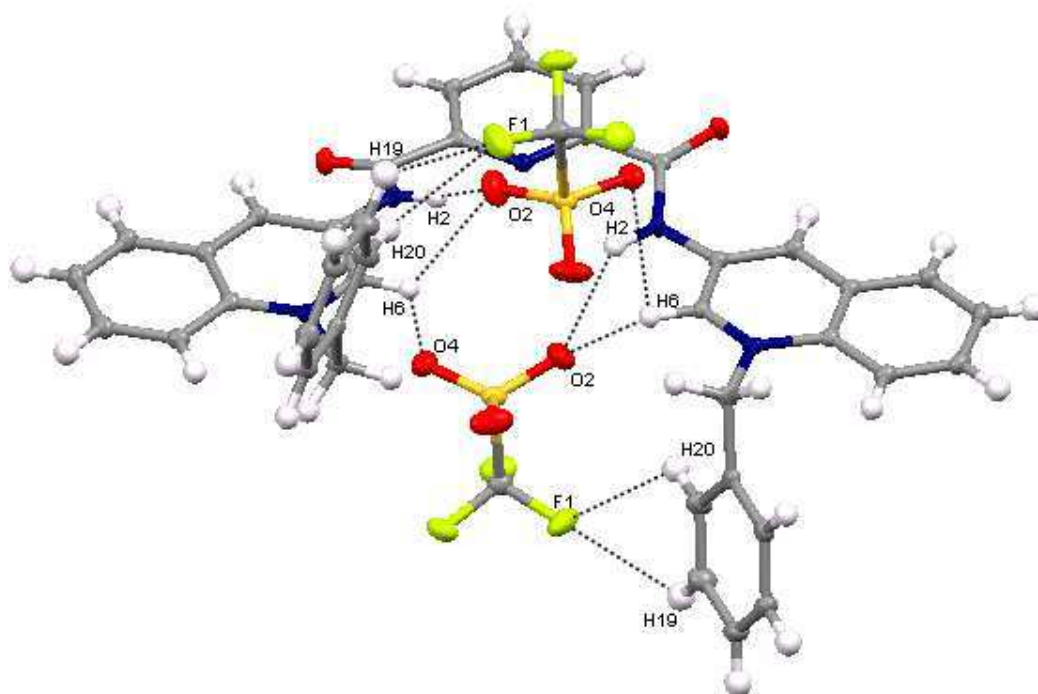


Figura 4.4 Perspectiva de la estructura molecular de la sal de triflato de BQ3Bz. Los elipsoides térmicos se muestran con una probabilidad del 50%.

Los dos anillos de quinolina y la piridina central están prácticamente en el mismo plano, las quinolinas N-benciladas se encuentran rotadas a 3.41° con respecto al anillo central de piridina. La distancia N...N entre los grupos amida es de 3.38\AA .

Dos aniones triflato están enlazados al receptor a través de interacciones del tipo N-H...O, C-H...O y CH...F. Ambos aniones son equivalentes ya que presentan los mismos enlaces de hidrógeno, uno está interaccionando por la parte superior de la cavidad y el otro está posicionado en la parte inferior de la cavidad.

Tabla 4.5 Enlaces de hidrógeno seleccionados dentro de la estructura cristalina del compuesto BQ3BzTf.

Compuesto	Enlace-H	D-H [Å]	H...A [Å]	D...A [Å]	∠DHA [°]	Simetría
BQ3BzTf	C20-H20...F1	0.950(2)	2.583	3.106(2)	114.7(1)	x,y,z
	C19-H19...F1	0.950(2)	2.583	3.101(3)	114.6(1)	x,y,z
	C6-H6...O2	0.950(2)	2.369	2.970(2)	120.8(1)	x,y,z
	C6-H6...O4	0.950(2)	2.667	2.898(2)	94.3(1)	x,y,z
	N2-H2...O2	0.84(2)	2.189	2.891(2)	141(2)	x,y,z
	C6'-H6'...O4'	0.950(2)	2.667	2.898(2)	94.3(1)	x,y,z
	C6'-H6'...O2'	0.950(2)	2.369	2.970(2)	120.8(1)	-x,y,1/2-z
	N2'-H2'...O2'	0.84(2)	2.189	3.106(2)	141(2)	-x,y,1/2-z
	C20'-H20'...F1'	0.950(2)	2.583	3.101(3)	114.7(1)	-x,y,1/2-z
	C19'-H19'...F1'	0.950(2)	2.583	2.891(2)	114.6(1)	-x,y,1/2-z

La Figura 4.5 muestra la estructura tridimensional del compuesto BQ3BzTf. La red tridimensional se extiende con dicatiónes y triflatos alternados en los tres ejes.

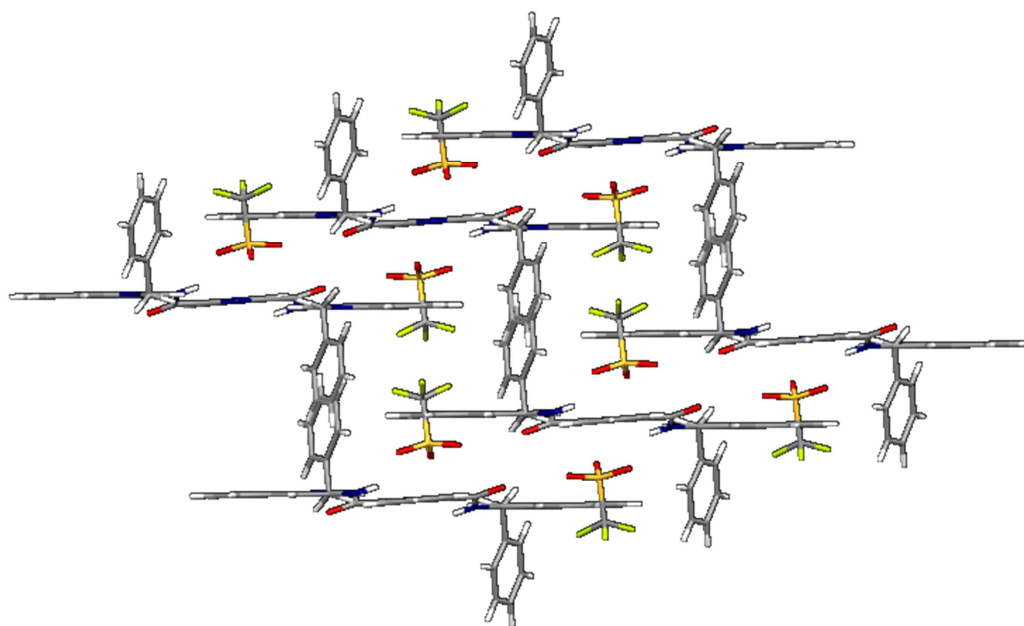


Figura 4.5 Empacotamiento cristalino del compuesto BQ3BzTf.

2.2.2 Compuesto BQ3BzClTf.

La cristalización de una mezcla 1:1 de la sal de triflato de BQ3Bz con NaCl en metanol-agua produce cristales cúbicos e incoloros de la sal mixta adecuados para la Difracción de Rayos X. La Tabla 4.6 muestra las distancias y ángulos para enlaces de hidrógeno seleccionados representados en la estructura cristalina de Figura 4.6.

Tabla 4.6 Enlaces de hidrógeno seleccionados dentro de la estructura cristalina del compuesto BQ3BzCLTf.

Compuesto	Enlace-H	D-H [Å]	H ^{»»»} A [Å]	D ^{»»»} A [Å]	∠DHA [°]	Simetría
BQ3BzClTf	N2-H2 ^{»»»} O3	0.85(3)	2.15(3)	2.950(3)	157(3)	x,y,z
	N4-H4 ^{»»»} O3	0.81(3)	2.28(3)	3.020(3)	153(3)	x,y,z
	C25-H25 ^{»»»} O3	0.949(3)	2.500(2)	3.258(3)	136.8(2)	x,y,z
	C9-H9 ^{»»»} O3	0.950(3)	2.535(2)	3.245(3)	131.6(2)	x,y,z

La Figura 4.6 muestra la estructura cristalina de la sal mixta de BQ3Bz. El ion triflato no se encuentra interaccionando directamente en la cavidad del receptor, la cavidad se encuentra ocupada por una molécula de agua que forma puentes de hidrógeno del tipo N-H^{»»»}OH₂, C-H^{»»»}OH₂. Los grupos N-bencilo de las quinolinas se encuentran en posición *synperiplanar*.

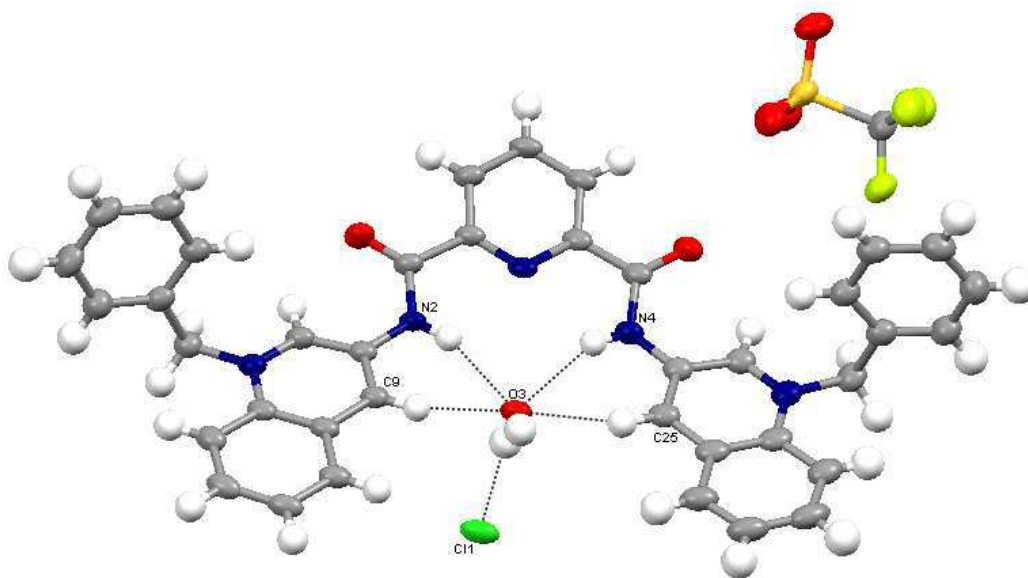


Figura 4.6 Perspectiva de la estructura molecular de la sal mixta de triflato y cloruro de BQ3Bz. Los elipsoides térmicos se muestran con una probabilidad del 50%.

3 Receptor Basado en N-quinolin Benzamida.

3.1 Receptor MQ3R.

3.1.1 Compuesto MQ3RTf.

El propósito de sintetizar y obtener la estructura cristalina de este compuesto se justifica con el fin de estudiar y comparar el efecto de la cavidad que poseen los receptores basados en piridin-2,6-dicarboxiamida (BQ3R Y BQ3Bz). La ausencia de la cavidad o la presencia de esta nos permite estudiar y comparar el modo de asociación entre receptor-anión, y de esta manera saber si la cavidad influye en la selectividad con los aniones de estudio. Para esto se preparó la análoga N-quinolin benzamida de BQ3R, de la cual se obtuvieron cristales incoloros a partir de la evaporación lenta de una solución acuosa saturada de la sal de triflato (MQ3RTf). El receptor es monocatiónico y se encuentra interaccionando con un ion triflato. Como se puede observar en la Figura 4.7, el receptor está interaccionando con un átomo de oxígeno (O6) del el ion triflato a través de tres enlaces de hidrógeno, dos del tipo C-H...O y un del tipo N-H...O. La Tabla 4.7 muestra distancias intermoleculares y ángulos para los enlaces de hidrógeno seleccionados.

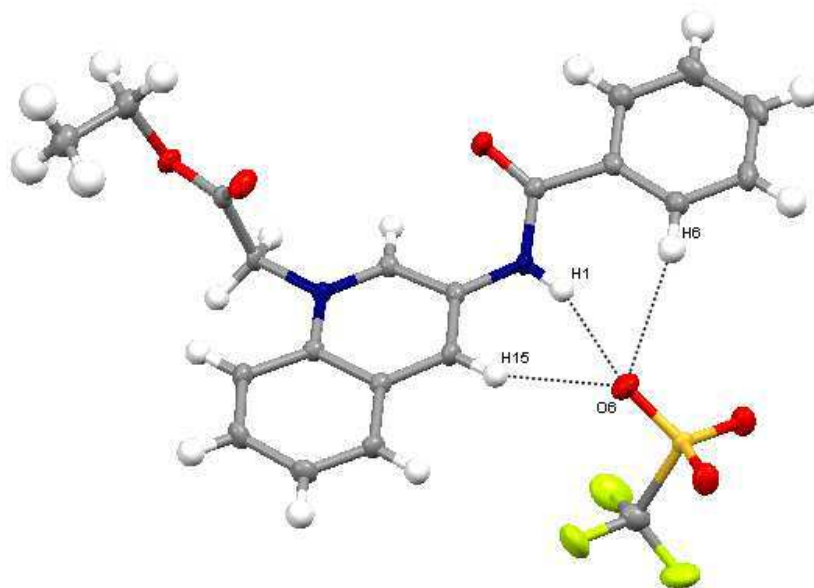


Figura 4.7 Perspectiva de la estructura molecular de la sal de triflato de MQ3R. Los elipsoides térmicos se muestran con una probabilidad del 50%.

El grupo quinolinio y la benzamida están prácticamente en el mismo plano, el grupo quinolinio N-alkilado está rotado a 8.18° con respecto al anillo de la benzamida. La estructura cristalina de MQ3RTf manifiesta interacciones del tipo $\text{CH}\cdots\text{X}^-\cdots\text{HC}$, ambos son aromáticos, un grupo CH pertenece al anillo de la quinolina y está situado en la posición cuatro con respecto a su átomo de nitrógeno, el segundo grupo CH se encuentra posicionado en el anillo de la benzamida. El grupo amida contribuye directamente con un enlace de hidrógeno.

Tabla 4.7 Enlaces de hidrógeno seleccionados dentro de la estructura cristalina del compuesto MQ3RTf.

Compuesto	Enlace-H	D-H [Å]	H \cdots A [Å]	D \cdots A [Å]	\angle DHA [°]	Simetría
MQ3RTf	C6-H6 \cdots O6	0.950(2)	2.596	3.477(2)	154.4(1)	x,y,z
	C15-H15 \cdots O6	0.950(2)	2.514	3.217(2)	130.9(1)	x,y,z
	N1-H1 \cdots O6	0.83(3)	2.12	2.903(2)	159(2)	x,y,z

La estructura tridimensional del compuesto MQ3RTf se muestra en la Figura 4.8 y consiste en capas alternadas de iones triflato y unidades de receptor.

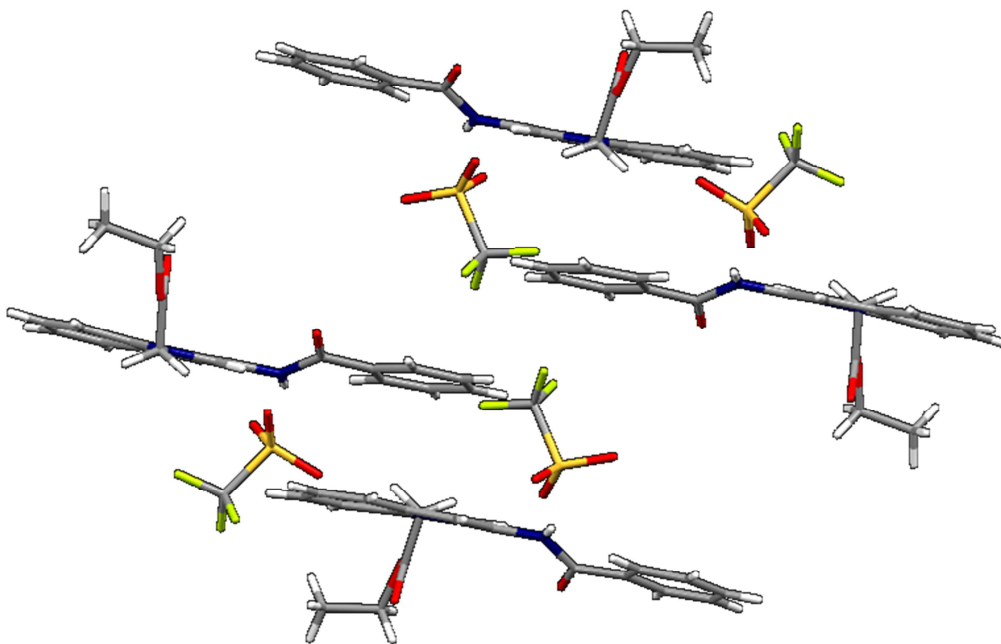


Figura 4.8 Empaquetamiento cristalino del compuesto MQ3RTf.

4 Análisis Estructural de los Receptores.

Las estructuras cristalinas correspondientes a las sales de triflato de BQ3R y BQ3Bz muestran que el anión está posicionado en la cavidad del receptor, a través de enlaces de hidrógeno del tipo $\text{NH} \cdots \text{X}^- \cdots \text{HC}$, similar a lo descrito en la literatura para algunos receptores con grupos amino o ureidopiridinio.⁴⁸ La estructura cristalina correspondiente a la sal de triflato de MQ3R manifiesta interacciones del tipo $\text{CH} \cdots \text{X}^- \cdots \text{HC}$ y $\text{NH} \cdots \text{X}^-$, un grupo CH pertenece al anillo de la quinolina y está situado en la posición cuatro con respecto a su átomo de nitrógeno, el segundo grupo CH se encuentra posicionado en el anillo de la benzamida, el grupo NH corresponde a la amida y este contribuye directamente con un enlace de hidrógeno.

Los resultados de las estructuras sólidas descritas en este capítulo muestran que la conformación de BQ3R y BQ3Bz está pre-organizada para hospedar debido a que los grupos NH de las amidas se encuentran orientados dentro de la cavidad, similar a los receptores de piridin-2,6-dicarboxiamida que se han informado.⁴⁹ En la Figura 4.9 el receptor MQ3R presenta en estado sólido dos interacciones adicionales además de las tres que se han descrito, sin embargo son interacciones que suceden con otra unidad de receptor, por lo que se esperaría que las interacciones entre receptor y anión en solución apaguen la fluorescencia mayoritariamente por un mecanismo dinámico provocado por colisiones entre anión-receptor que por una asociación formal receptor-anión, por lo tanto la presencia de una cavidad en el receptor contribuye en gran medida a que el anión se encuentre asociado formalmente.

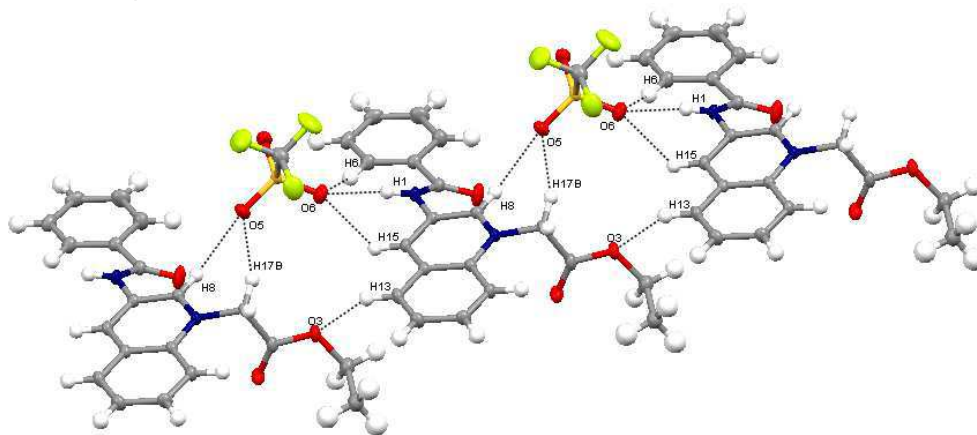


Figura 4.9 Interacciones intermoleculares entre un anión triflato y dos unidades de receptor MQ3R.

Para los casos BQ3RTf y BQ3BzTf los grupos amida son prácticamente coplanares con el anillo de la piridina central, la mayor desviación se observa para el triflato de BQ3Bz, donde los grupos amida están rotados 17.78° en direcciones opuestas con respecto al plano de la piridina central. Los grupos amida del compuesto BQ3RTf presenta ángulos de rotación diferentes con respecto al plano de la piridina central, ambos ángulos están rotados en direcciones opuestas con respecto al mismo plano de la piridina central. (Ver *Tabla 4.8*).

Tabla 4.8 Rotación de grupos amida con respecto al anillo de piridina central en receptores basados en piridin-2,6-dicarboxiamida empleados en este estudio.

Compuesto	\angle Rotación [°]
BQ3RTf	7.13
	8.65
BQ3BzTf	17.78

En las estructuras cristalinas de BQ3RTf y BQ3BzTf (Ver *Figura 4.1 y 4.4*) observamos que el anión tetraédrico de triflato se encuentra formalmente asociado a través de enlaces de hidrógeno situados en la cavidad del receptor, por lo que se intuiría que aniones tetraédricos como SO_4^{-2} , HSO_4^- , PO_4^{-3} , $\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^-$ o bien la cadena secuencial de tres grupos fosfato en los nucleótidos sea similar.

Enfocándonos a la conformación de las sales de triflato de los receptores BQ3R y BQ3Bz, observamos que los grupos NH de amida se encuentran orientados en forma convergente hacia al centro de la cavidad y estos están formando enlaces de hidrógeno con los átomos de oxígeno de dos iones triflato, adicionalmente dos enlaces de hidrógeno del tipo CH aromáticos también se encuentran interaccionando de la misma manera, por lo tanto para fines de este estudio con nucleótidos y de acuerdo a los resultados en estado sólido y solución se esperaría que la cavidad sea un sitio de interacción con los grupos fosfato y los grupos quinolinio sean sitios para interactuar con las bases de purina (ATP, GTP) o pirimidina (CTP) a través de apilamiento π , tal como lo propone la referencia 26.

SECCIÓN B. RECONOCIMIENTO MOLECULAR

1 Estudios por Espectroscopia de Fluorescencia.

Las sales de triflato de los compuestos sintetizados fueron probadas como quimiosensores para aniones con relevancia biológica los cuales incluyen especies inorgánicas (Cl^- , $\text{H}_3\text{P}_2\text{O}_7^-$) y sales de sodio de nucleótidos (ATP, GTP, CTP, ADP y AMP). En general la adición de alícuotas de aniones extingue la fluorescencia de soluciones acuosas de los quimiosensores MQ3RTf, BQ3RTf y BQ3BzTf a pH= 6.5 (MOPS, 40 mM). Los perfiles de Stern-Volmer (I_0/I vs $[Q]$; I_0 = Intensidad fluorescente del receptor, I = Intensidad después de cada adición de alícuotas de aniones, $[Q]$ = Concentración del receptor) obtenidos de titulaciones fluorimétricas proporcionan información acerca del proceso de extinción de la fluorescencia del receptor BQ3RTf. En general se pueden observar tres procesos:⁵⁰⁻⁵¹

1. *Apagamiento dinámico*, donde el proceso de extinción de la emisión fluorescente es por colisiones aleatorias entre el sensor y el anión, típicamente el perfil se observa como una línea recta donde la pendiente corresponde a la constante de Stern-Volmer y los datos pueden ser ajustados a la siguiente ecuación:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_{sv} [Q] \dots\dots\dots[2]$$

Este comportamiento se observa comúnmente para halogenuros y aniones inorgánicos que no presentan asociación con los sensores.

2. *Apagamiento dinámico y estático*, en este caso el fluoroforo (sensor) y el apagador (anión) forman un complejo supramolecular estable no fluorescente. En este contexto el apagamiento es una mezcla del dinámico con estático (asociación). El perfil (I_0/I vs $[Q]$) se caracteriza por una pendiente y los datos pueden ser ajustado a la ecuación:

$$\frac{I_0}{I} = (1 + K_{sv} [Q])(1 + K_{ass} [Q]) \dots\dots\dots[3]$$

Donde K_{ass} representa la constante de asociación entre el sensor-huésped.

3. *Apagamiento dinámico y estático con un aducto fluorescente*, en este caso el apagador (anión) se une al sensor y forman un complejo supramolecular que todavía es fluorescente (la emisión del sistema sensor-anión no es apagada completamente). Los perfiles de Stern-Volmer se observan como una parábola y los datos pueden ajustarse a la siguiente ecuación:

$$\frac{I_o}{I} = \frac{(1 + K_{sv} [Q])(1 + K_{ass} [Q])}{(1 + \rho K_{ass} [Q])} \dots\dots\dots[4]$$

Donde ρ es definida como la fluorescencia residual del complejo supramolecular.

En este contexto fueron realizados experimentos para los tres sensores. El compuesto BQ3RTf y su derivado de benzamida MQ3RTf son solubles en concentraciones micromolares en agua pura conteniendo un buffer MOPS (40 mM) a pH = 6.5. Sus espectros de emisión ($\lambda_{ex}= 350$ nm) son mostrados en la Figura 4.10. Los máximos de emisión son 416 nm y 415 nm para BQ3RTf y MQ3RTf respectivamente.

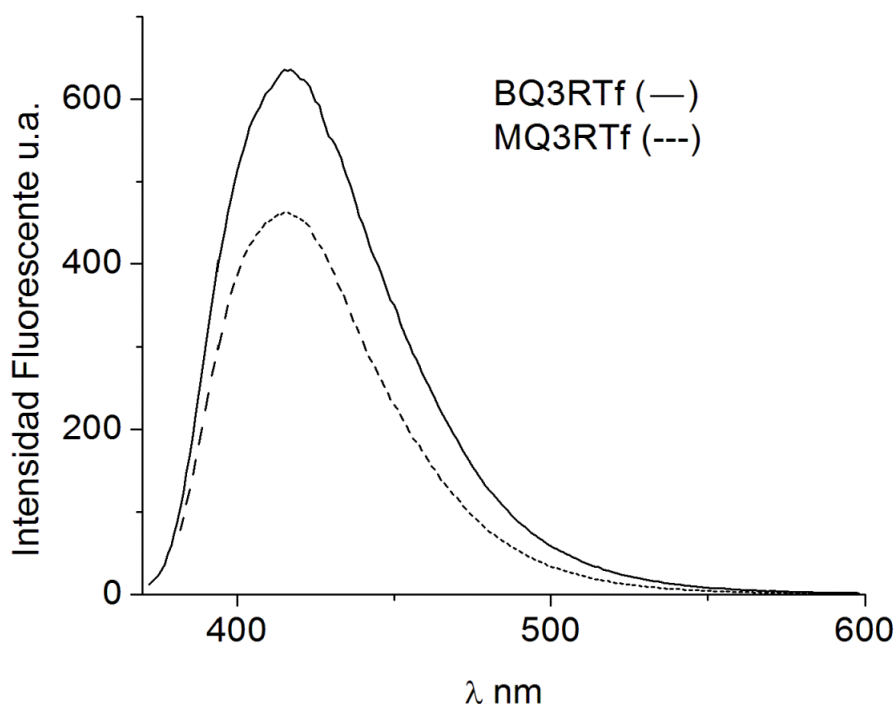


Figura 4.10 Espectros de emisión fluorescente ($\lambda_{ex}=350$ nm) para los receptores BQ3RTf (10 μ M) y MQ3RTf (10 μ M) a pH=6.5 (MOPS, 40mM) en agua.

En el caso de BQ3RTf la adición de los nucleótidos genera una fuerte respuesta de apagamiento de sus soluciones acuosas, sin modificación del máximo. La Figura 4.11 muestran las titulaciones fluorimétricas para ATP (0-3.5 mM) y GTP (0-3.0 mM).

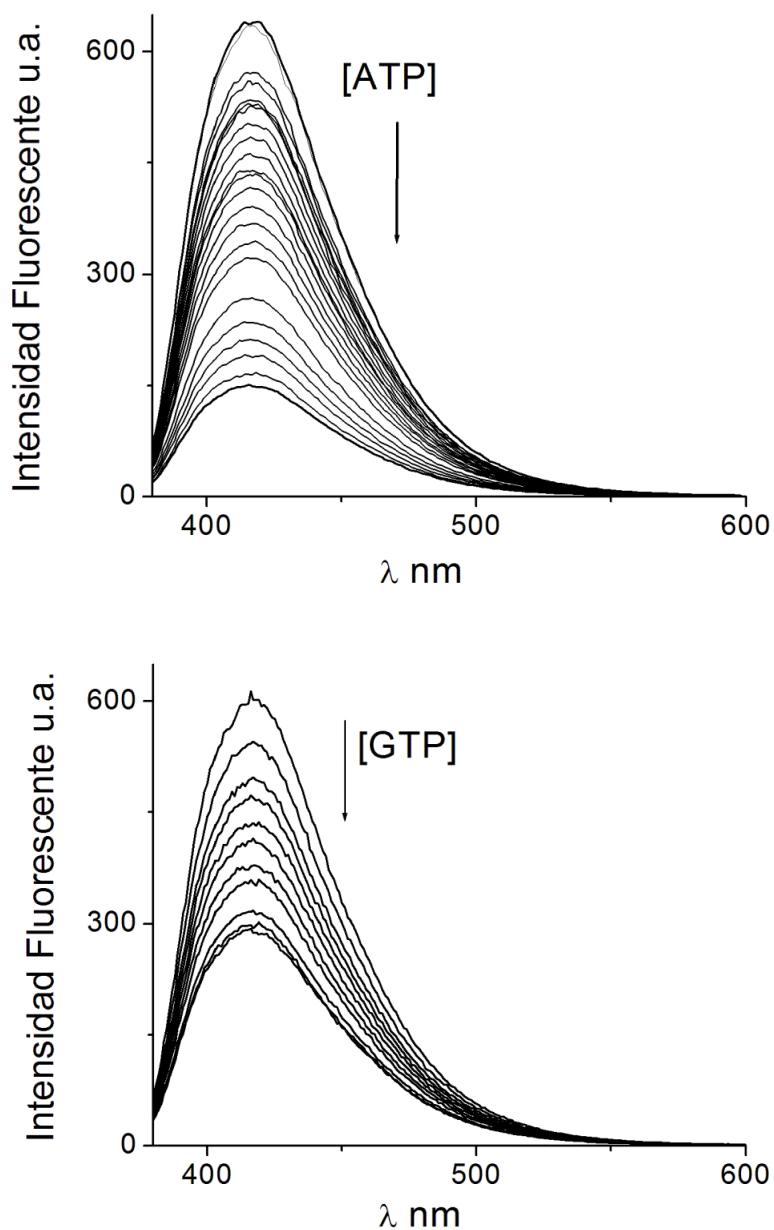


Figura 4.11 Titulaciones fluorimétricas ($\lambda_{ex}= 350$ nm) de BQ3RTf (10 μ M) a pH = 6.5 (MOPS, 40 mM) con adiciones de sales de sodio de ATP y GTP.

La Figura 4.12 muestra los perfiles de Stern-Volmer de BQ3RTf con una serie de nucleótidos en las condiciones experimentales de la Figura 4.11.

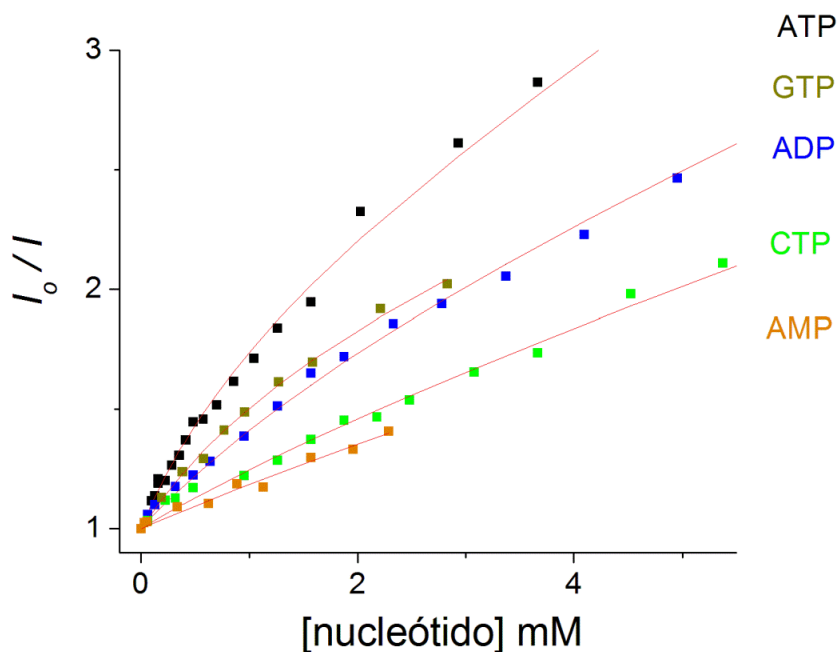


Figura 4.12 Perfiles de las titulaciones fluorescentes de BQ3RTf con nucleótidos.

Para todos los nucleótidos los perfiles muestran un comportamiento parabólico que puede ser bien ajustado para un apagamiento dinámico-estático con asociación sensor-nucleótido que todavía tiene emisión fluorescente (caso 3). Este comportamiento es esperado debido a que el receptor BQ3RTf tiene en su estructura química un sitio de asociación para aniones formado por grupos amida acidificados. La estructura cristalina muestra que los grupos amida están convergentes hacia la cavidad del receptor. (Ver *Figura 4.1, Capítulo 4; Sección A*). Estudios previos en nuestro grupo de investigación han demostrado que aniones inorgánicos pueden alojarse en esta cavidad en solución. La tabla 4.9 resume los valores calculados de las constantes de Stern-Volmer y las constantes de asociación para BQ3RTf y MQ3RTf con los aniones. La afinidad del receptor por los nucleótidos estudiados tiene la siguiente tendencia $ATP > GTP > ADP > CTP > AMP > \text{Pirofosfato}$. Esta tendencia se encuentra correlacionada con la respuesta al apagamiento de la emisión fluorescente por los aniones.

Pirofosfato interacciona con el receptor BQ3RTf con una constante de asociación considerable de 239 M^{-1} pero con un apagamiento débil $K_{sv} = 10.0 (0.5)$. En este contexto se espera que los grupos fosfato de los nucleótidos sean el sitio de asociación con la cavidad del receptor BQ3RTf. Los aniones cloruro, bromuro y pirofosfato dan un apagamiento más débil que los nucleótidos, cloruro y bromuro tienen perfiles (I_0/I vs [anión]) con un comportamiento lineal que es típico para procesos dinámicos. Los valores se ajustan perfectamente a este proceso y a la ecuación presentada para el caso 1.

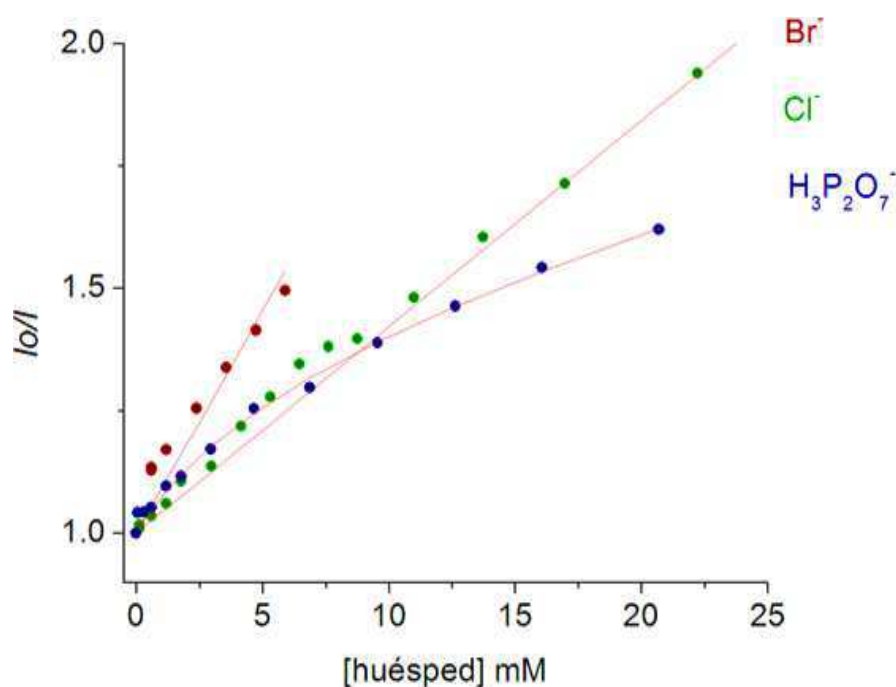


Figura 4.13 Perfiles de las titulaciones fluorescentes de BQ3RTf con cloruro, bromuro y pirofosfato.

Estructuralmente MQ3RTf es un análogo de BQ3RTf que solo contiene un grupo quinolinio cuaternizado y no contiene una cavidad o sitio de asociación que pudiera alojar algún anión, este solo presenta un grupo amida acidificado. En este contexto se espera que los aniones no se asocien con MQ3RTf en medio acuoso, ya que las moléculas de agua compiten fuertemente por el sitio de asociación y por lo tanto su perfil de Stern-Volmer solo presenta un apagamiento dinámico por colisiones aleatorias.

Las adiciones de ATP y GTP presentan asociación débil con MQ3RTf ($K_{\text{ass}} = 356$ y 803 M^{-1} respectivamente) comparada con el sensor BQ3RTf. En todos los casos las constantes de Stern-Volmer también son menores que su derivado que contiene una cavidad (BQ3RTf). La presencia de un sitio de asociación en forma de una cavidad aumenta considerablemente la asociación con los aniones. La Figura 4.14 Muestra una comparación de las constantes de asociación calculadas entre BQ3RTf y MQ3RTf.

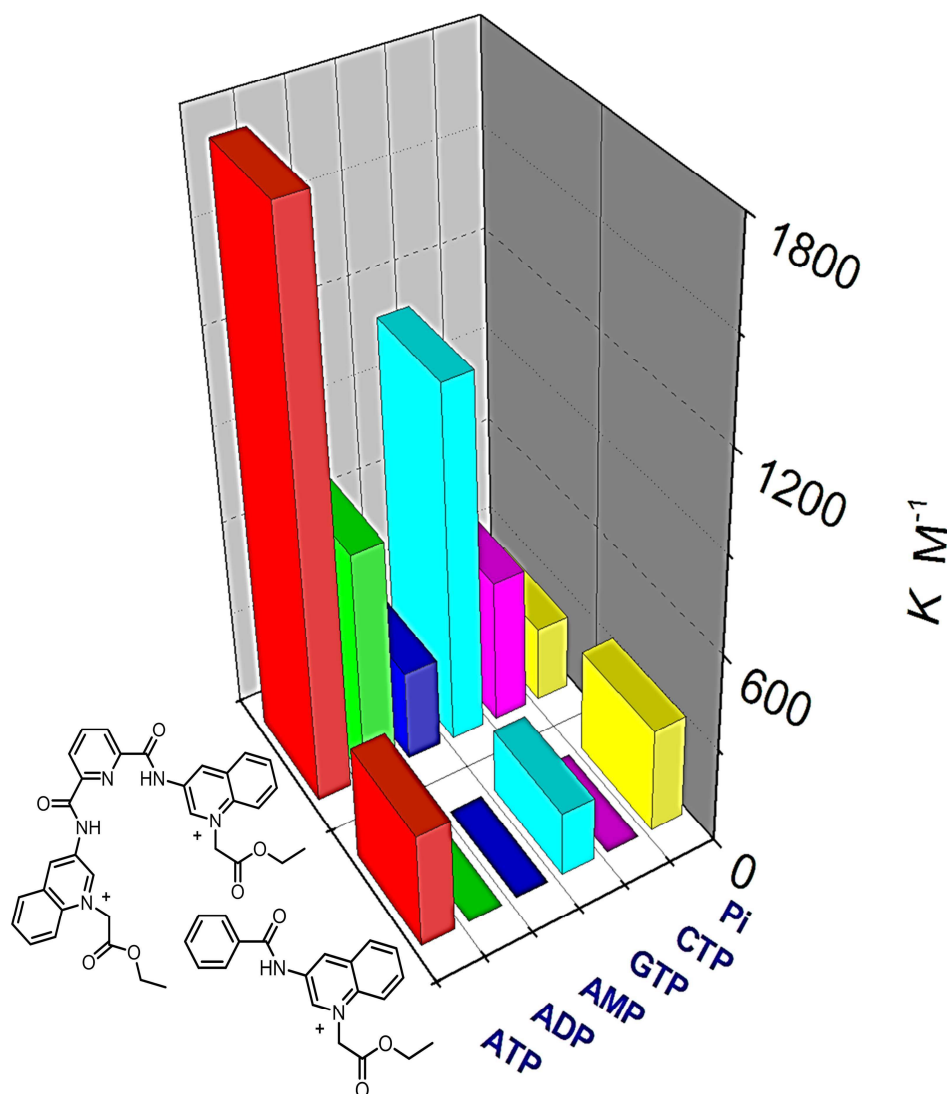


Figura 4.14 Constantes de asociación calculadas de BQ3RTf y MQ3RTf con nucleótidos y pirofosfato a $pH = 6.5$ en agua.

Tabla 4.9 Constantes de asociación, de Stern-Volmer y ρ de BQ3RTF y MQ3Tf con nucleótidos y aniones inorgánicos.

Nucleótido/ Anión Inorgánico	BQ3RTf			MQ3RTF		
	K_{ass}	K_{sv}	ρ	K_{ass}	K_{sv}	ρ
ATP	1759(70)	105(2)	0.40	356(63)	28(2)	0.8
ADP	731(43)	83(3)	0.45	-	29(0.3)	-
AMP	284(121)	53.81 416nm	0.5	-	17(0.6)	-
GTP	1129(19)	131(11) 416nm	0.45	803	4	0.9
CTP	455(60)	90(5)	0.6	-	-	-
PPi	239(20)	10.0(0.5) 416nm	0.7	368.9(63)	2.0(0.4) 412 nm	0.85
Cl⁻	-	42(0.6) 416nm	-	-	11.9(0.3) 412 nm	-
Br⁻	-	83(1) 416 nm	-	-	18.36(0.3) 412 nm	-

El receptor BQ3BzTf es insoluble en agua inclusive a concentraciones micromolares, por lo que resultó difícil realizar los experimentos de reconocimiento molecular con aniones inorgánicos y nucleótidos. La preparación de una solución stock de BQ3BzTf 10mM agua-metanol 4:1 basta para solubilizar por completo al receptor, sin embargo al momento de realizar las titulaciones con soluciones de nucleótidos usando un buffer 100% acuoso de (MOPS), la disolución presenta turbidez debido a que precipita el receptor. Una solución stock de BQ3BzTf 10mM en DMSO de igual manera basta para solubilizar al receptor, sin embargo al momento de realizar las titulaciones se observa una disminución en la intensidad de fluorescencia de BQ3BzTf, este fenómeno puede ser atribuido al efecto del disolvente, es decir, el DMSO manifiesta un fuerte efecto apagador de la fluorescencia del receptor BQ3BzTf. El pH del buffer de MOPS es 6.5 y las constantes de acidez de BQ3BzTf ($pK_{a1}= 4.04$, $pK_{a2}= 6.73$) indican que el receptor se encuentra prácticamente desprotonado, al no existir un sitio de asociación (átomos de hidrógeno) el sustrato no puede ser reconocido, además de que la especie desprotonada presenta un efecto electrónico conocido como PET (Photoinduced Electron Transfer) que origina un apagamiento casi completo de la fluorescencia, por estos motivos no se realizaron estudios de reconocimiento con el receptor BQ3BzTf.

2 Determinación de Constantes de Acidez.

Para determinar las constantes de acidez de los receptores dicatiónicos se hicieron experimentos típicos de perfiles de pH contra emisión de fluorescencia en solución acuosa utilizando la siguiente ecuación:

$$I_{Total} = \frac{0.5I_{Iah} + (I_{Iahh} - 0.5I_{Iah}) * 10^{(pK_1 - pH)}}{1 + 10^{(pK_1 - pH)}} + \frac{I_{Ia} - 0.5I_{Iah} + 0.5I_{Iah} * 10^{(pK_2 - pH)}}{1 + 10^{(pK_2 - pH)}} \dots [5]$$

Donde I_{Ia} es la absorbancia de la especie desprotonada, I_{Iah} es la absorbancia de la especie monoprotonada, I_{Iahh} es la absorbancia de la especie diprotonada y I_{Total} es la suma de cada una de las absorciones de cada especie.²⁶

Los valores de las constante de acidez de los receptores ofrecen información útil que ayuda a saber si a pH=6.5 (pH de trabajo) los grupo amida de BQ3RTf y BQ3BzTf se encuentran protonados, monoprotonados o totalmente desprotonados al momento de realizar las titulaciones fluorescentes, espectrofotométricas y espectrométricas de RMN con los huéspedes de estudio, esto debido a que los átomos de hidrógeno de los grupos amida son el sitio de asociación, si no existen estos sitios de asociación no puede haber reconocimiento molecular entre el receptor y el huésped.

La Figura 4.15 representa la titulación de BQ3BzTf utilizando una solución 0.5m de NaOH como titulante.

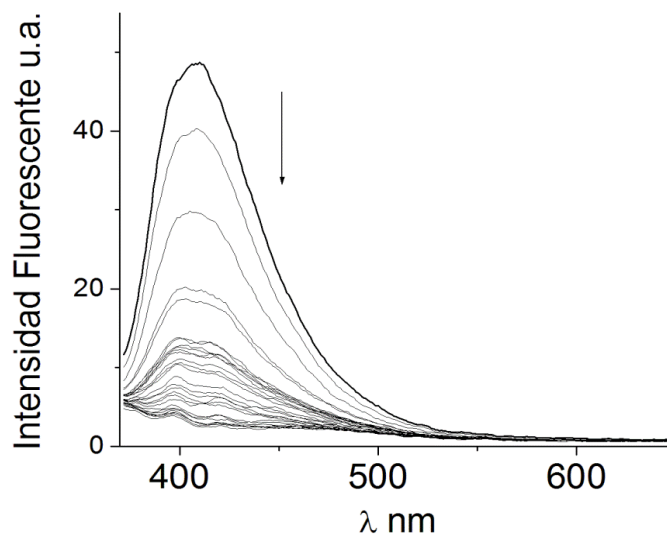


Figura 4.15 Titulación de una solución $8.12 \times 10^{-6} \text{M}$ de BQ3BzTf; buffer MOPS, MES y CAPS [0.04m].

Como se puede observar en la Figura 4.15 correspondiente a la titulación de BQ3BzTf con NaOH, el espectro de fluorescencia del receptor BQ3BzTf disminuye en su intensidad a medida que se va añadiendo hidróxido de sodio, esta tendencia es de esperarse ya que la concentración del receptor diprotonado va disminuyendo conforme se añade el titulante, llega un momento donde practicamente al tener un exceso de agente titulante el receptor deja de fluorescer, esto nos dice que la especie desprotonada presenta un efecto electrónico conocido como PET (Photoinduced Electron Transfer) que origina un apagamiento casi completo de la fluorescencia.

Las figuras 4.16-4.17 representan la curva de titulación del receptor BQ3BzTf y BQ3RTf obtenidas de la ecuación descrita con anterioridad, donde los valores de las constantes de acidez se representan en la Tabla 4.10.

Como se puede observar en Figura 4.16 que representa el perfil de intensidad de fluorescencia contra el pH del receptor BQ3BzTf, observamos que la intensidad disminuye conforme el pH aumenta. Se pueden observar dos puntos de inflexión que corresponden a los pKa del receptor, la Tabla 4.10 presenta los valores de estos pKa.

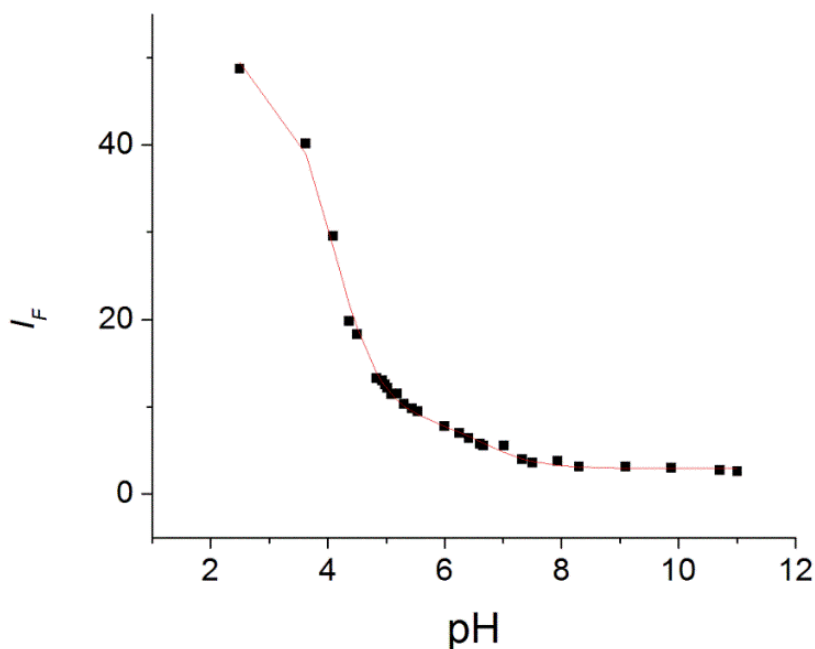


Figura 4.16 Perfil I_F vs pH de una titulación de BQ3BzTf con NaOH; buffer MOPS, MES y CAPS [0.04m].

La Figura 4.17 correspondiente al receptor BQ3RTf representa el perfil de intensidad de fluorescencia contra el pH, se puede observar que la intensidad de fluorescencia disminuye conforme el pH aumenta. Se pueden observar dos puntos de inflexión que corresponden a los pKa del receptor, la Tabla 4.10 presenta los valores de estos pKa.

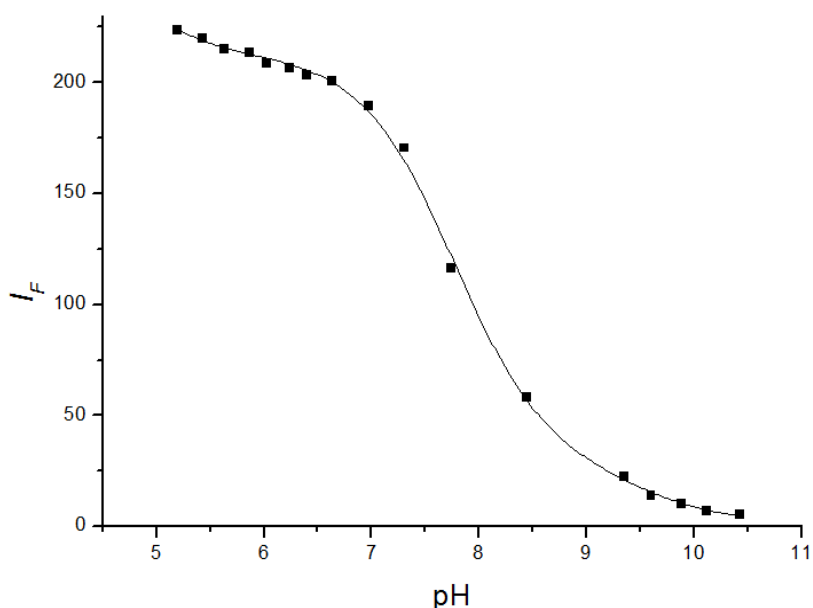


Figura 4.17 Perfil I_F vs pH de una titulación de BQ3RTf con NaOH; buffer MOPS, MES y CAPS [0.04m].

Tanto en la Figura 4.16 como en la Figura 4.17 se observan dos puntos de inflexión que corresponden a cada uno de los pKa de los grupos amida presentes en los receptores. En ambas graficas el primer punto de inflexión correspondiente al pK_{a1} de los receptores y este es muy notorio, sin embargo el segundo punto de inflexión es muy pequeño lo que indica que a medida que el receptor se hace más débil, el punto de inflexión correspondiente al pK_{a2} se hace menos definido.

Tabla 4.10 Constantes de acidez de los receptores dicatiónicos.

Sensor	Intensidad de emisión de fluorescencia (u.a)	pK_{a1}	pK_{a2}
BQ3RTf	610 (416nm)	7.76	9.52
BQ3BzTf	50 (410nm)	4.04	6.73

3 Estudios por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{31}P .

De acuerdo a los experimentos de reconocimiento molecular llevados a cabo por titulaciones fluorimétricas entre los receptores y nucleótidos se logra observar que para el sistema BQ3RTf-ATP se observa un importante apagamiento de la fluorescencia, es decir que el receptor BQ3RTf presenta cierta selectividad por asociarse con ATP y por lo tanto el complejo BQ3RTf-ATP posee una constante de asociación alta (K_{ass}), por este motivo se decidió realizar únicamente para el receptor BQ3RTf una titulación espectroscópica de RMN utilizando como sustrato al ATP. El experimento consiste en obtener primeramente los espectros individuales de ^1H y ^{31}P de ATP (0.5mg, 700 μL de D_2O -DMSO- d_6 1:1) y posteriormente se obtiene un espectro de ^1H y ^{31}P de la mezcla BQ3RTf-ATP (0.5mg BQ3RTf, 0.5mg ATP 700 μL de D_2O -DMSO- d_6 1:1), este sencillo experimento nos permite averiguar que átomos de la molécula de ATP se encuentran interaccionando con el receptor BQ3RTf, el desplazamiento a campos altos o bajos de ciertas señales en el ATP indican una interacción supramolecular, es decir que ciertos átomos interaccionan directamente con el receptor para formar un complejo Receptor-Huésped.⁵² La Figura 4.18 representa el experimento de titulación de RMN llevado a cabo de acuerdo a las condiciones descritas con anterioridad, donde se puede observar que las señales (1,2,3) de ^1H de ATP se desplazan a campos altos (*Ver Tabla 4.11*) lo que indica una interacción donde los núcleos de hidrógeno se encuentran a favor del campo magnético externo y por lo tanto se encuentran protegidos, esto es normal para apilamiento π , donde se cree que la base púrica del ATP se encuentra interaccionando con alguno de los grupos quinolinio presentes en el receptor BQ3RTf. En los espectros de ^{31}P RMN de ATP se observan tres señales típicas correspondientes a los tres núcleos de fósforo presentes en la molécula, cuando se graba el espectro de ATP-BQ3RTf se observa que todas las señales en ^{31}P se desplazan pero γ presenta un desplazamiento mayor (*Ver Tabla 4.11*) lo que indica que este núcleo de fósforo está interaccionando fuertemente con el receptor BQ3RTf, este fenómeno puede ser explicado por el hecho de que el fósforo γ representa el grupo fosfato terminal en el ATP y se piensa que alguno de los átomos de oxígeno cargado negativamente está formalizando dos enlaces de hidrógeno con los grupos amida NH presentes en la cavidad del receptor BQ3RTf (*Ver Esquema 4.1*).

Tabla 4.11 Desplazamientos químicos representativos en RMN de ^1H y ^{31}P correspondientes al ATP y a una mezcla ATP-BQ3RTf. (D_2O - $\text{DMSO-}d_6$).

^1H				^{31}P			
Señal	ATP	ATP + BQ3RTf	$\Delta\delta$	Señal	ATP	ATP + BQ3RTf	$\Delta\delta$
1	8.56	8.42	0.14	α	-10.35	-10.0	0.35
2	8.34	8.15	0.19	β	-22.0	-22.4	0.4
3	6.08	5.84	0.24	γ	-9.88	-7.5	2.38

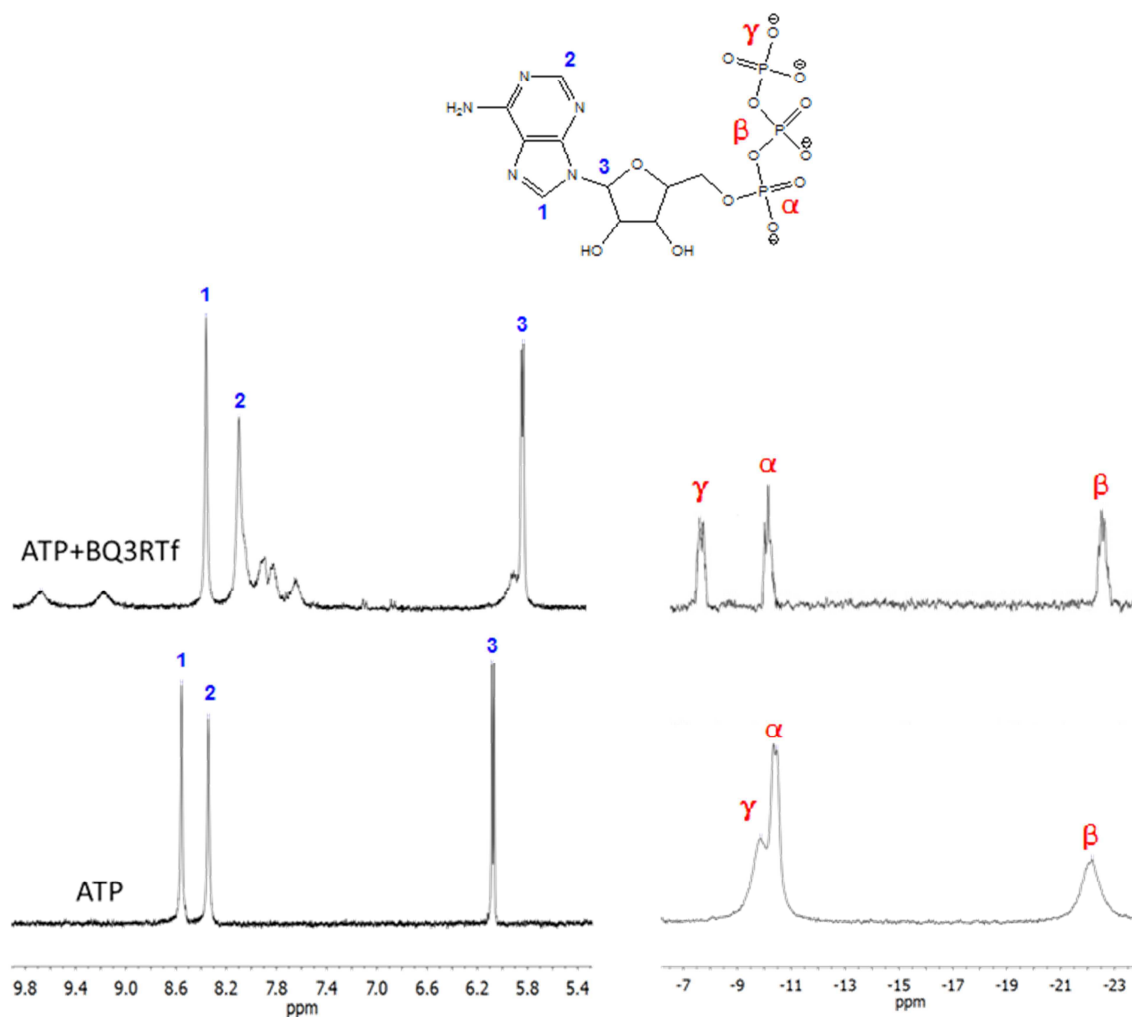


Figura 4.18 Espectros de ^1H RMN y ^{31}P RMN de ATP (0.5mg, 700 μL D_2O - $\text{DMSO-}d_6$ 1:1, pH=6.5) y espectros de ^1H RMN y ^{31}P RMN de una mezcla ATP+BQ3RTf (0.5mgBQ3RTf, 0.5mg ATP, 700 μL D_2O - $\text{DMSO-}d_6$ 1:1, pH=6.5).

4 Estudios por Espectroscopia Ultravioleta-Visible.

La espectroscopia de UV-Visible ofrece un método confiable para determinar constantes de asociación (K_{ass}) por lo tanto el uso de esta técnica resulta ser útil para corroborar que efectivamente se lleva a cabo una asociación entre los receptores y sustratos de estudio. Es por ello que se realizó una titulación espectrofotométrica entre el receptor BQ3RTf y ATP ya que de acuerdo a los experimentos por Espectroscopia de Fluorescencia este sistema posee la constante de asociación más alta (K_{ass}). En general la adición de cantidades micromolares de ATP provocan un cambio de absorbancia en el quimiosensor BQ3RTf a pH= 6.5 (MOPS, 40 mM). La Figura 4.19 ofrece el espectro de UV-Visible de BQ3RTf y su respectiva N-quinolin benzamida, podemos observar que el receptor BQ3RTf absorbe más fuerte que su respectiva N-quinolin benzamida. La Figura 4.20 representa la titulación entre BQ3RTf y ATP donde se observan claramente la presencia de dos puntos isosbesticos en los 375 y 302 nm. Estos puntos isosbesticos comprueban la presencia de dos especies en solución, lo que significa que irrefutablemente existe una especie supramolecular (asociación del receptor con ATP) además del receptor.

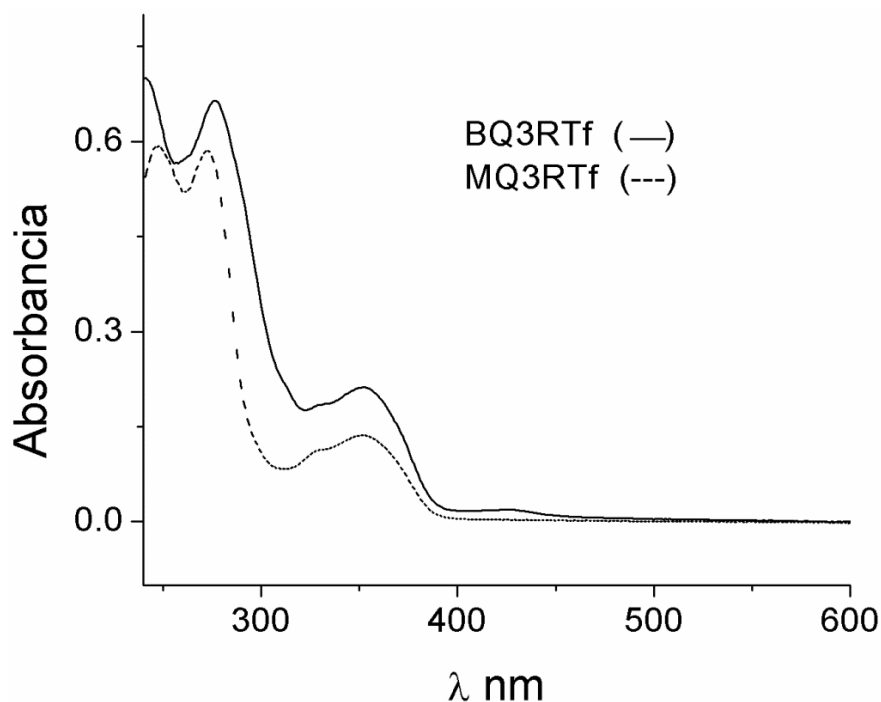


Figura 4.19 Espectros de UV-Visible de los receptores BQ3RTf y MQ3RTf a pH=6.5 (10mM).

El perfil ΔA vs [ATP] muestra un comportamiento parabólico (Figura 4.21) que se ajusta a la siguiente ecuación.

$$A = \frac{K_{ass} \Delta \epsilon_{RS} [S]_T [R]_T + \epsilon_R [R]_T}{1 + K_{ass} [S]_T} \dots\dots\dots[6]$$

Donde A representa el cambio observado en la absorbancia, K_{ass} constante de asociación, $[S]_T$ concentración total del sustrato, $[R]_T$ concentración total del receptor, $\Delta \epsilon_{RT}$ coeficiente de absortividad molar del complejo supramolecular y ϵ_R coeficiente de absortividad molar del receptor.

El valor de la constante de asociación calculada por espectroscopia de UV-Visible es de $384.58M^{-1}$, este valor es mucho más pequeño comparándolo con el valor obtenido a través de espectroscopia de fluorescencia ($1759M^{-1}$), esto radica en la sensibilidad de la técnica, es mucho más sensible detectar un fenómeno de emisión fluorescente que un fenómeno de absorción en la región UV-Visible.

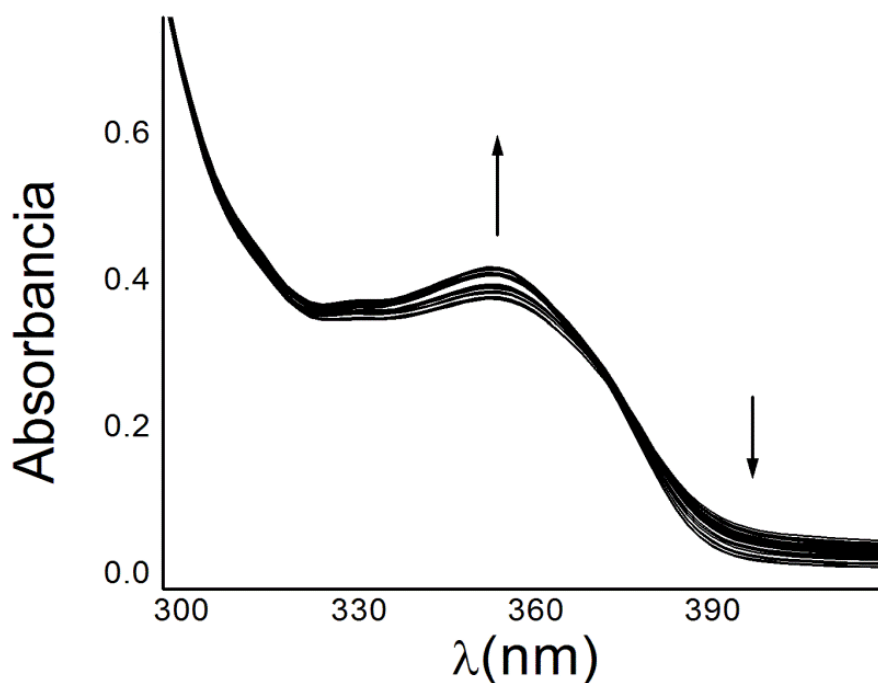
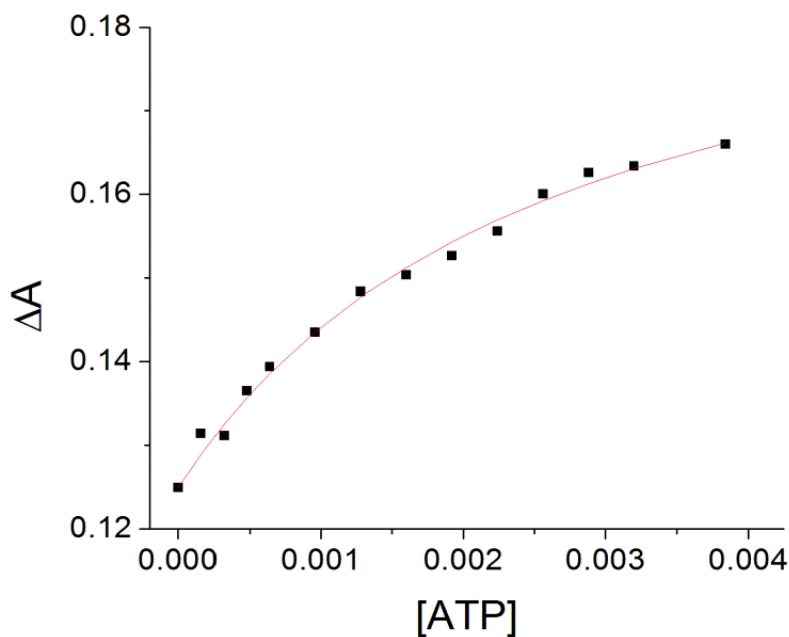


Figura 4.20 Titulación espectrofotométrica entre BQ3RTf y ATP a pH= 6.5 (MOPS, 40 mM).

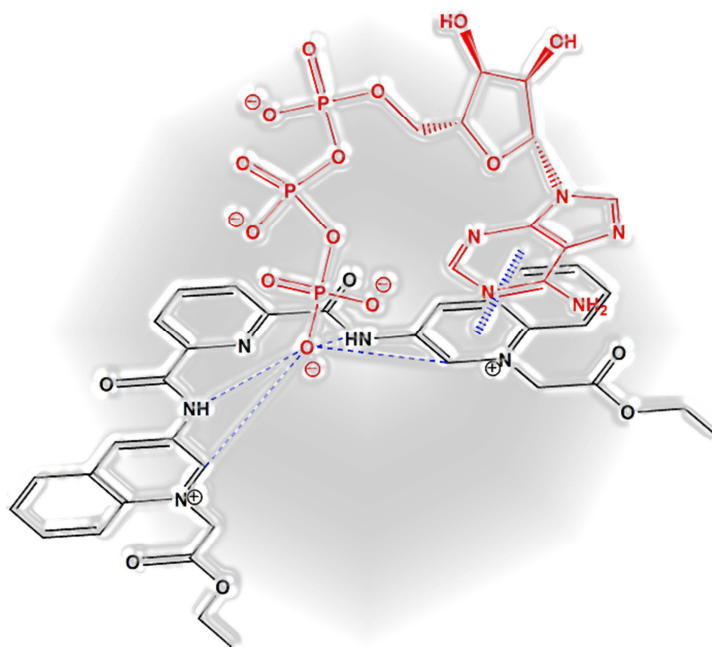
Figura 4.21 Perfil ΔA vs [ATP] usando BQ3RTf.

5 Análisis de Constantes de Asociación y Perspectivas.

Una inspección a los valores de las constantes de asociación colectadas en la Tabla 4.9 indican que el receptor dicatiónico BQ3RTf se asocia con aniones mucho más fuerte que su análogo monocatiónico MQ3RTf. Este fenómeno se repite para el caso de las constantes de Stern-Volmer. Las constantes de Stern-Volmer ($K_{sv} = 2 - 131$) muestran que los receptores pueden detectar concentraciones milimolares de nucleótidos y aniones con una tendencia $ATP > GTP > ADP > CTP > AMP > Cl^- > PPi$.

Los perfiles de fluorescencia de BQ3RTf para cloruro y bromuro muestran una tendencia que es típica de estos aniones donde el mecanismo de extinción de la emisión de la fluorescencia describe a un único proceso de índole dinámico donde colisiones aleatorias entre el sensor y el anión provoca que disminuya la emisión de la fluorescencia, el perfil de este tipo de mecanismo tiende a la linealidad donde la pendiente corresponde a la constante de Stern-Volmer. Para el caso del perfil de fluorescencia de BQ3RTf-pirofosfato se observa un mecanismo de extinción de la fluorescencia dinámico y estático con un aducto fluorescente, los datos experimentales se ajustan a la ecuación del proceso tres (comportamiento parabólico).

Los perfiles de fluorescencia de BQ3RTf muestran asociación con los nucleótidos estudiados manifestando una selectividad para ATP ($K_{\text{ass}} = 1759 \pm 70 \text{ M}^{-1}$ $K_{\text{SV}} = 105$). Los datos experimentales se ajustan a un mecanismo dinámico (colisiones) y estático (asociación Huésped-Sensor) para la extinción de la fluorescencia de BQ3RTf. Este mecanismo comprende un apagamiento dinámico y estático con un aducto fluorescente, en este caso el apagador (nucleótido) se une al sensor y forman un complejo supramolecular donde la emisión del sistema Huésped-Anfitrión no se extingue por completo. Cabe notar que de acuerdo a los estudios de fluorescencia, RMN y espectroscopia de UV-Visible resulta prometedora la selectividad que manifiesta el receptor BQ3RTf con ATP frente a otros nucleótidos, por lo cual esto abre una perspectiva donde el receptor BQ3RTf puede competir en afinidad y/o selectividad con los receptores informados hasta la fecha que detectan ATP en solución acuosa. Para fines de este estudio con nucleótidos y de acuerdo a los resultados en estado sólido y solución se propone un modo de asociación (Receptor-Nucleótido) donde la cavidad de los receptores dicatiónicos funciona como un sitio de interacción con los grupos fosfato, mientras que los grupos quinolinio actúan como sitios de interacción con las bases de purina (ATP, GTP) o pirimidina (CTP) a través de apilamiento π .



Esquema 4.1 Propuesta del modo de enlace entre el receptor BQ3R y ATP.

CONCLUSIONES

Se han diseñado y sintetizado tres nuevos quimiosensores fluorescentes para nucleótidos y aniones inorgánicos con relevancia biológica. Cada sensor químico ha sido caracterizado por técnicas Espectroscópicas y por Difracción de Rayos X de monocristal. Los sensores BQ3RTf y BQ3BzTf son derivados de piridin-2,6-dicarboxamida con grupos N-alquil y N-bencil quinolinio insertados en el fragmento de los grupos amida. Las constantes de Stern-Volmer ($K_{SV} = 2 - 131$) muestran que los receptores pueden detectar concentraciones milimolares de nucleótidos y aniones con una tendencia $ATP > GTP > ADP > CTP > AMP > Cl^- > PPI$. Los estudios en solución acuosa permitieron el análisis de los diferentes procesos que extinguen la emisión de la fluorescencia en los sistemas Huésped-Anfitrión a partir de los perfiles de Stern-Volmer. Los perfiles de fluorescencia de BQ3RTf muestran asociación con los nucleótidos estudiados manifestando una selectividad para ATP ($K_{ass} = 1759 \pm 70 \text{ M}^{-1}$ $K_{SV} = 105$). Los datos experimentales se ajustan a un mecanismo dinámico (colisiones) y estático (asociación huésped-sensor) para la extinción de la fluorescencia de BQ3RTf. Por otra parte los perfiles de fluorescencia de BQ3RTf para cloruro y bromuro muestran una tendencia que es típica de estos aniones donde el mecanismo de extinción de la emisión de la fluorescencia describe a un único proceso de índole dinámico donde colisiones aleatorias entre el sensor y el anión provoca que disminuya la emisión de la fluorescencia. Por otra parte las estructuras cristalinas de las sales de triflato de los receptores dicatiónicos (BQ3RTf, BQ3BzTf) muestran una conformación pre-organizada para hospedar aniones debido a que los grupos NH de las amidas se encuentran orientados dentro de la cavidad y estos forman dos enlaces de hidrógeno que interaccionan con uno de los átomos de oxígeno que componen el anión triflato, por lo que aniones tetraédricos como $P_2O_7^{4-}$ o bien la cadena secuencial de tres grupos fosfato en los nucleótidos sea similar. Combinando los estudios en estado sólido y en solución acuosa y en particular debido a la selectividad que manifestó el receptor BQ3RTf por ATP frente a otros nucleótidos alientan a abrir una perspectiva donde el receptor BQ3RTf puede competir en afinidad y/o selectividad con los receptores informados hasta la fecha que detectan ATP en solución acuosa.

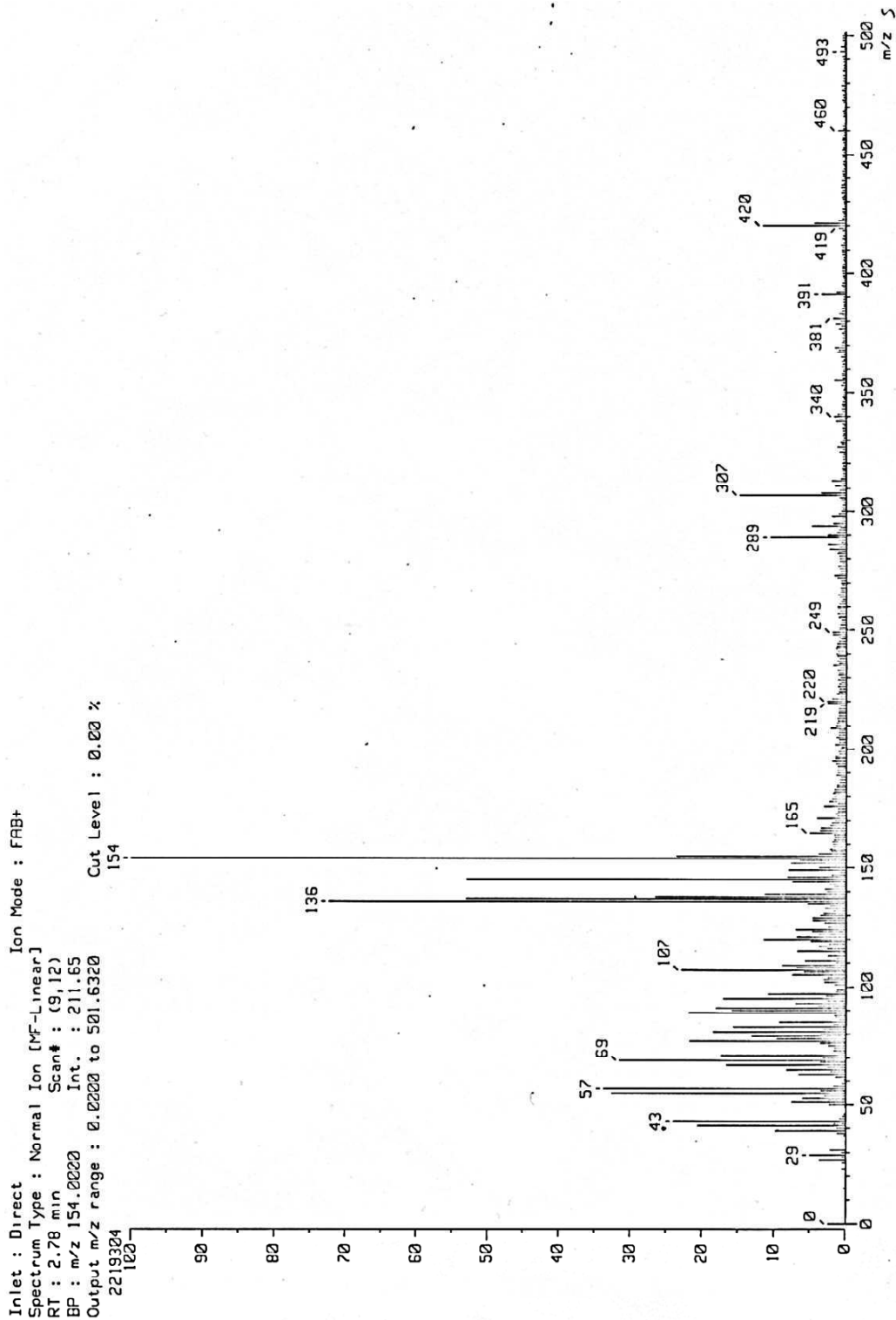
REFERENCIAS

1. Amendola, L. Fabbrizzi and L. Mosca, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, 39, 3889-3915.
2. J. M. Lehn, "Supramolecular Chemistry. Concepts and Perspectives", VCH, Weinheim (Alemania), **1995**.
3. D. J. Cram, *Science* **1983**, 219, 1177.
4. E. Fischer, *Ber. Dt. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985-2993.
5. J. W. Steed, *Chem. Commun.* **2006**.
6. J. Schneider, A. Yatsimirsky, *Principles and Methods in Supramolecular Chemistry*. Wiley-VCH, London, **2000**.
7. R. A. Robison, R. H. Stokes, *Electrolite Solution*, Butterworths, London, **1995**.
8. P. A. Gale, S. Camiolo, J. L. Sessler, J. L. Atwood, J. W. Steed. (Eds) *The Encyclopedia of Supramolecular Chemistry*, Marcel Dekker.
9. C. A. Hunter, L. D. Sarson, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1994**, 33, 2313.
10. V. M. Rotello, E. A. Viani, G. Deslongchamps, B. A. Murray, J. Jr. Rebek, *J. Am. Chem. Soc.*, 115(2) **1993** 797.
11. Y. Chang, L. Hsin, I. C. Ming, *J. Org. Chem.* 73, **2008**, 4608.
12. M. W. Hosseini, A. J. Blacker, J. M. Lehn, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, 112, 3896.
13. G. A. Jeffrey, *An Introduction to Hydrogen Bonding*, Oxford University Press: Oxford **1997**.
14. E. Fisher, *Ver Dtsch. Chem. Ges.* **1894**, 27, 2985.
15. L. Fabbrizzi, M. Licchelli, P. Pallavicini, L. Parodi, A. Taglietti, "Transition Metals in Supramolecular Chemistry", Editado por J.P. Sauvage, Wiley, New York, **1999**.
16. P. A. Gale, S. E. Garcia-Garrido. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 1233.
17. J. L. Sessler, P. A. Gale, W. S. Cho. *Anion Receptor Chemistry*, Royal Society Of Chemistry: Cambridge, UK. **2000**
18. M. Shionoya, H. Furuta, V. Lynch, A. Arriman, J.L. Sessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 14, 5714.
19. J. P. Desvergne, A. W. Czarnik, *Chemosensor for Ion and Molecule Recognition*; NATO Asi Series, Series C; Kluwer Academic Publishers: London, **1997**.

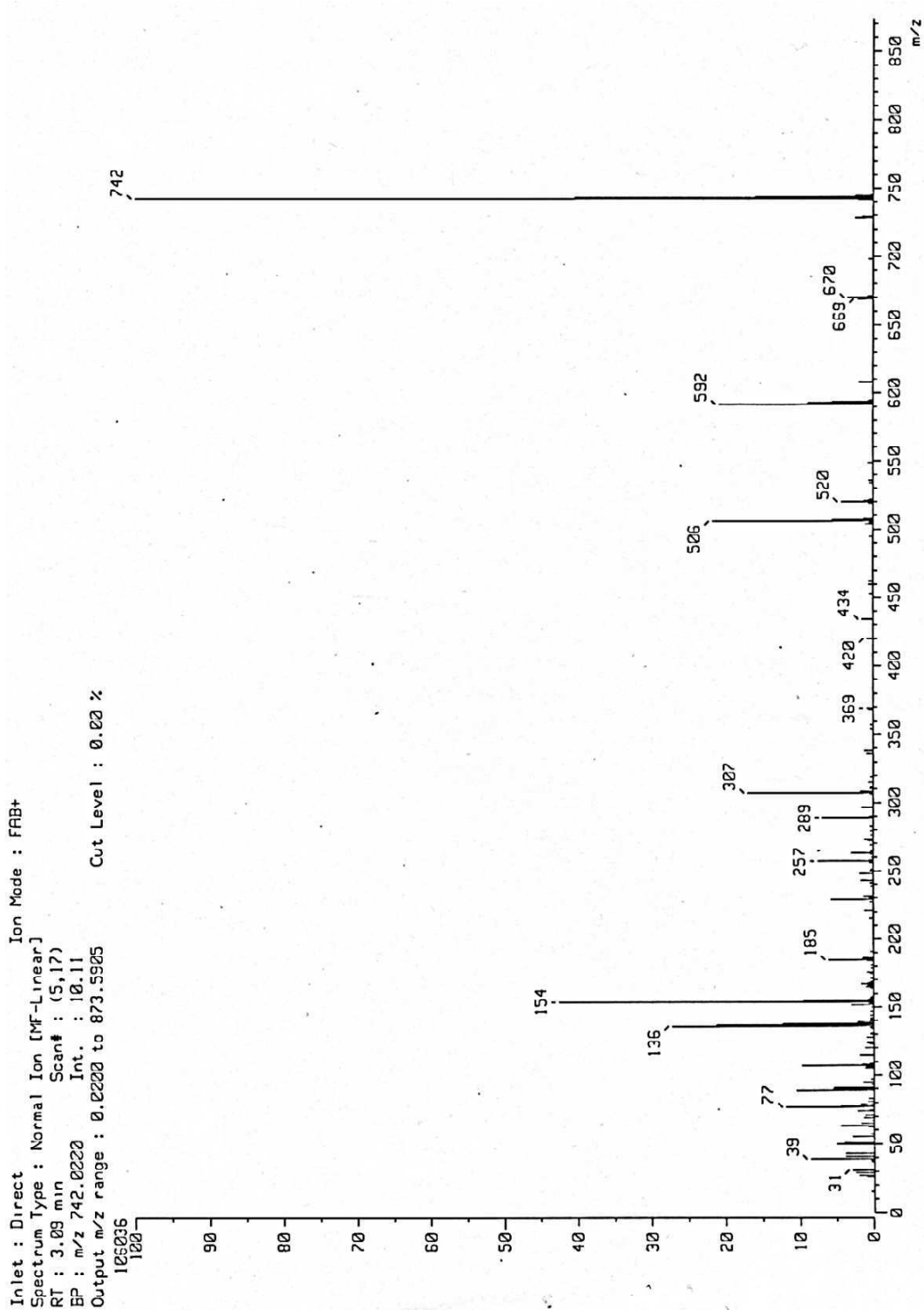
-
20. E. V. Anslyn, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 3, 687-699.
21. S. K. Kim, D. H. Lee, J. Hong, J. Yoon. *ACR*, **2009**, 42, 23-31.
22. X. J. Zhao, C. Z. Huang. *Trends in Analytical Chemistry*, **2010**, 29, 4.
23. P. D. Beer, P. A. Gale, *Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives. Angew. Chem.* **2001**, 40, 486–516.
24. S. Basurto, O. Riant, D. Moreno, J. Rojo, T. Torroba, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 4673-4688.
25. V. Alcázar, M. Segura, P. Prados, J. de Mendoza, *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 1033-1036.
26. A. Dorazco-González, M. Flores-Alamo, C. Godoy-Alcántar, H. Höpfl, A. K. Yatsimirsky, *The RSC Adv*, **2014**, 4, 455-466.
27. a) D.H. Vance, A.W. Czarnik, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 9397-9398.
28. a) S.K. Kim, N.J. Singh, J. Kwon, I.C. Hwang, S.J. Park, K.S. Kimb, J. Yoon, *Tetrahedron.* **2006**, 62, 6065. b) J.Y. Kwon, N.J. Singh, H.N. Kim, S.K. Kim, K.S. Kim, J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 8892. c) H. N. Kim, J. H. Moon, S. K. Kim, J. Y. Kwon, Y. J. Jang, J. Y. Lee, J. Yoon. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 76, 3805–3811.
29. a) P. P. Neelakandan, M. Hariharan, D. Ramaiah, *Org. Lett.* **2005**, 7, 5765–5768. P. b) P. Neelakandan, M. Hariharan, D. Ramaiah, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 11334–11335.
30. a) M. Inouye, K. Fujimoto, M. Furusyo and H. Nakazumi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 1452–1458. b) H. Abe, Y. Mawatari, H. Teraoka, K. Fujimoto, M. Inouye, *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 495.
31. Z. C. Xu, N. J. Singh, J. Lim, J. Pan, H. N. Kim, S. Park, K. S. Kim, J. Yoon, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, 131, 15528-15593.
32. S. Claude, J. M. Lehn, F. Schmidt and J. P. Vigneron, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 1182–1185.
33. O. Baudoin, F. Gonnet, M. P. Teulade-Fichou, J. P. Vigneron, J. C. Tabet, J. M. Lehn. *Chem.–Eur. J.* **1999**, 5, 2762–2771.
34. M. P. Teulade-Fichou, J. P. Vigneron, J. M. Lehn, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* **1996**, 2169–2175.

-
35. a) P. Cudi, M. Žinić, V. Tomisic, V. Simeon, J.P. Vigneron, J.-M. Lehn, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 1073–1075. b) I. Piantanida, B. S. Palm, P. Čudić, M. Žinić, H.J. Schneider, *Tetrahedron*, **2004**, 60, 6225–6231.
36. I. Piantanida, B. S. Palm, P. Čudić, M. Žinić and H. J. Schneider, *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 6779–6783.
37. C. Bazzicalupi, S. Biagini, A. Bencini, E. Faggi, C. Giorgi, I. Matera, B. Valtancoli. *Chem. Commun.* **2006**, 4087.
38. V. G. Pivovarenko, O. B. Vadzyuk, S. O. Kosterin. *J. Fluoresc.* **2006**, 16, 9.
39. Y. L. Tang, F. D. Feng, M. H. Yu, L. L. An, F. He, S. Wang, Y. L. Li, D. B. Zhu, G. C. Bazan, *Adv. Mater.* **2008**, 20, 703.
40. S. E. Schneider, S. N. O'Neil, E. V. Anslyn, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 542.
41. F. Pin, M. A. Bernardo, E. Garcia-España. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2000**, 10, 2143.
42. J. Costamagna, G. Ferraudi, B. Matsuhira, M. Campos-Vallette, M. Villagram, J. Vargas, M. J. Aguirre. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 196, 125.
43. M. D. Ward. *Annu. Rep. Prog. Chem. Sect. a: Inorg. Chem* **2002**, 196, 125.
44. D. A. Jose, S. Mishra, A. Ghosh, A. Shrivastav, S. K. Mishra, A. Das, *Org. Lett.* **2007**, 9, 1979.
45. A. Ojida, I. Takashima, T. Kohira, H. Nonaka, I. Hamachi, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 12095.
46. J. V. Carolan, S.J. Butler, K.A. Jolliffe, *J. Org. Chem.* **2009**, 74, 2992.
47. A. K. Nair, P. P. Neelakandan. D. Ramaiah, *Chem. Commun.* **2009**, 6352–6354.
48. D. R. Turner, M. J. Parerson, J. W. Steed. *J. Org. Chem.* **2006**, 71, 1598-1608.
49. K. Bowman-James. *Acc. Chem. Res.* **2005**, 38, 671.
50. V. Amendola, M. Boiocchi, L. Fabbrizzi, A. Palchetti. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 120 – 127.
51. V. Amendola, L. Fabbrizzi, E. Monzani. *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 76-82.
52. H. Fenniri, M. W. Hosseini, J. M. Lehn, *Helv. Chim. Acta*, **1997**, 80, 786-803.

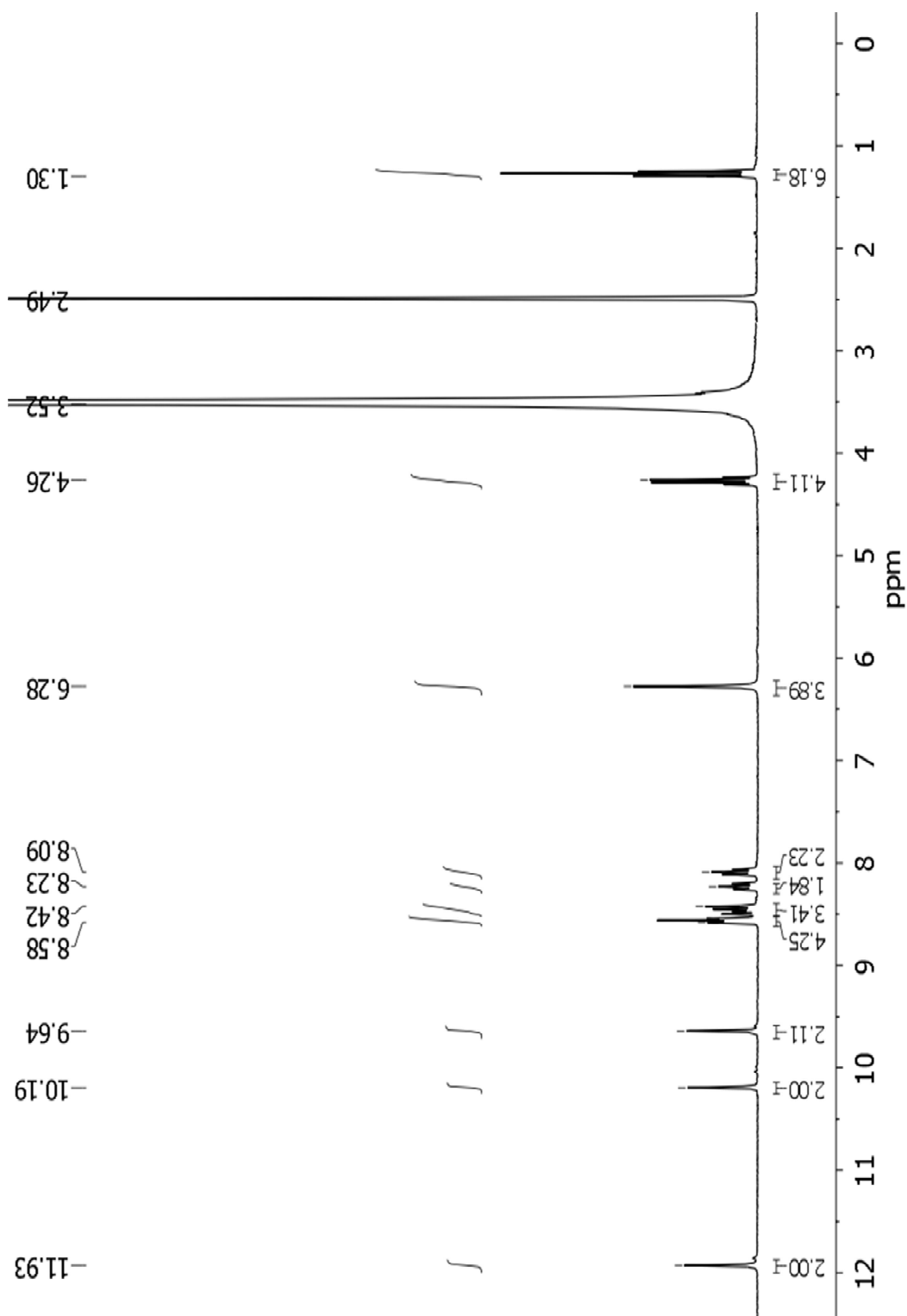
1. Fragmentograma 1. EM BQ3 (FAB).
2. Fragmentograma 2. EM BQ3RTf (FAB) [M+Tf]
3. Espectro 1. ^1H RMN BQ3RTf (DMSO- d_6)
4. Espectro 2. ^{13}C RMN BQ3RTf (DMSO- d_6)
5. Espectro 3. IR BQ3RTf (ATR).
6. Fragmentograma 3. EM BQ3BzTf (FAB) [M+Tf]
7. Espectro 4. ^1H RMN BQ3BzTf (DMSO- d_6).
8. Espectro 5. ^{13}C RMN BQ3BzTf (DMSO- d_6).
9. Espectro 6. IR BQ3RTf (ATR).
10. Fragmentograma 4. EM MQ3 (EI).
11. Fragmentograma 5. EM MQ3RTf (FAB) [M+Tf]
12. Espectro 7. ^1H RMN MQ3RTf (DMSO- d_6)
13. Espectro 8. ^{13}C RMN MQ3RTf (DMSO- d_6)
14. Espectro 9. IR BQ3RTf (ATR).
15. Tabla A. Datos cristalográficos de las sales de triflato de los receptores sintetizados.



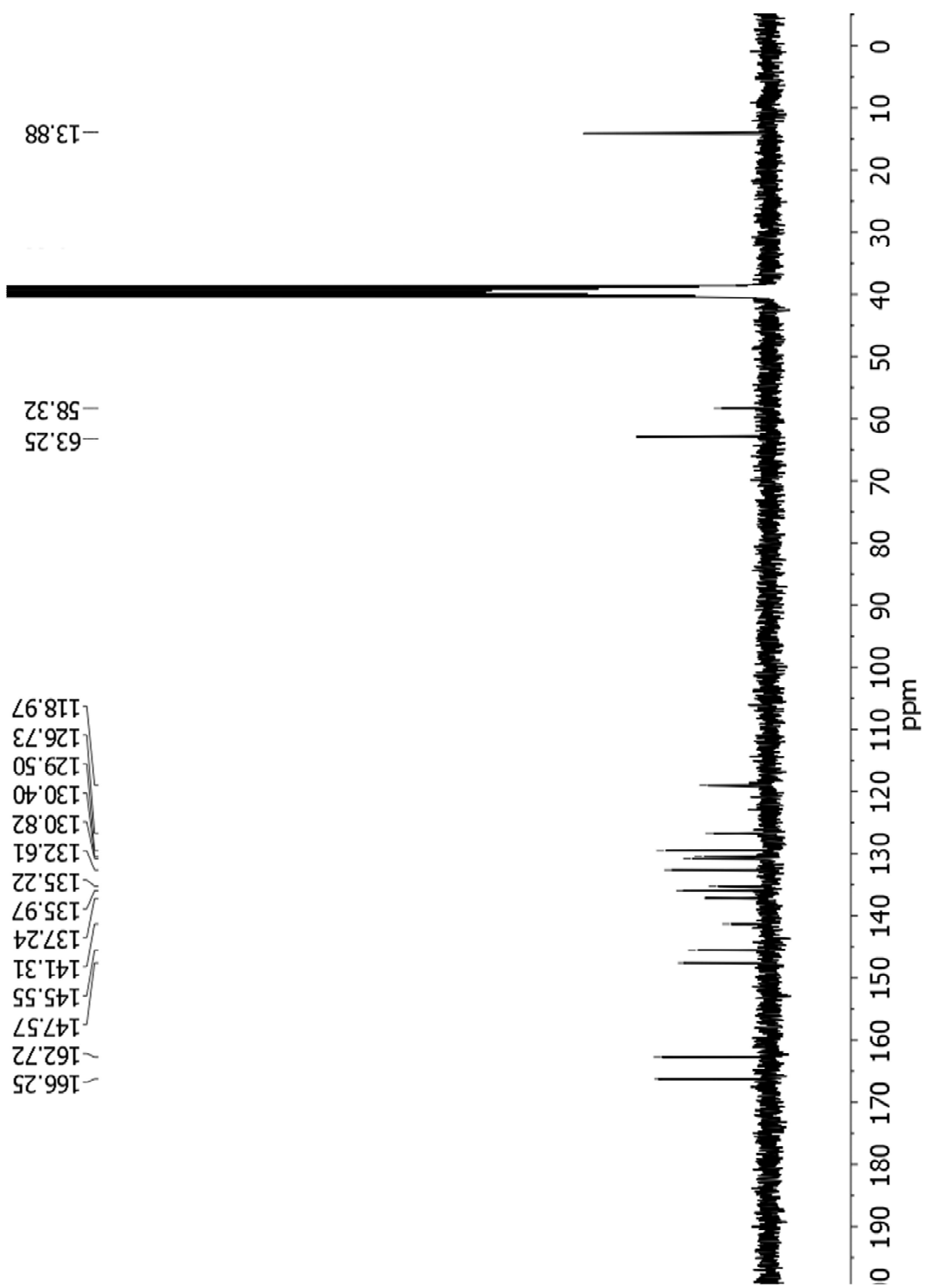
Fragmentograma 1. EM BQ3 (FAB).



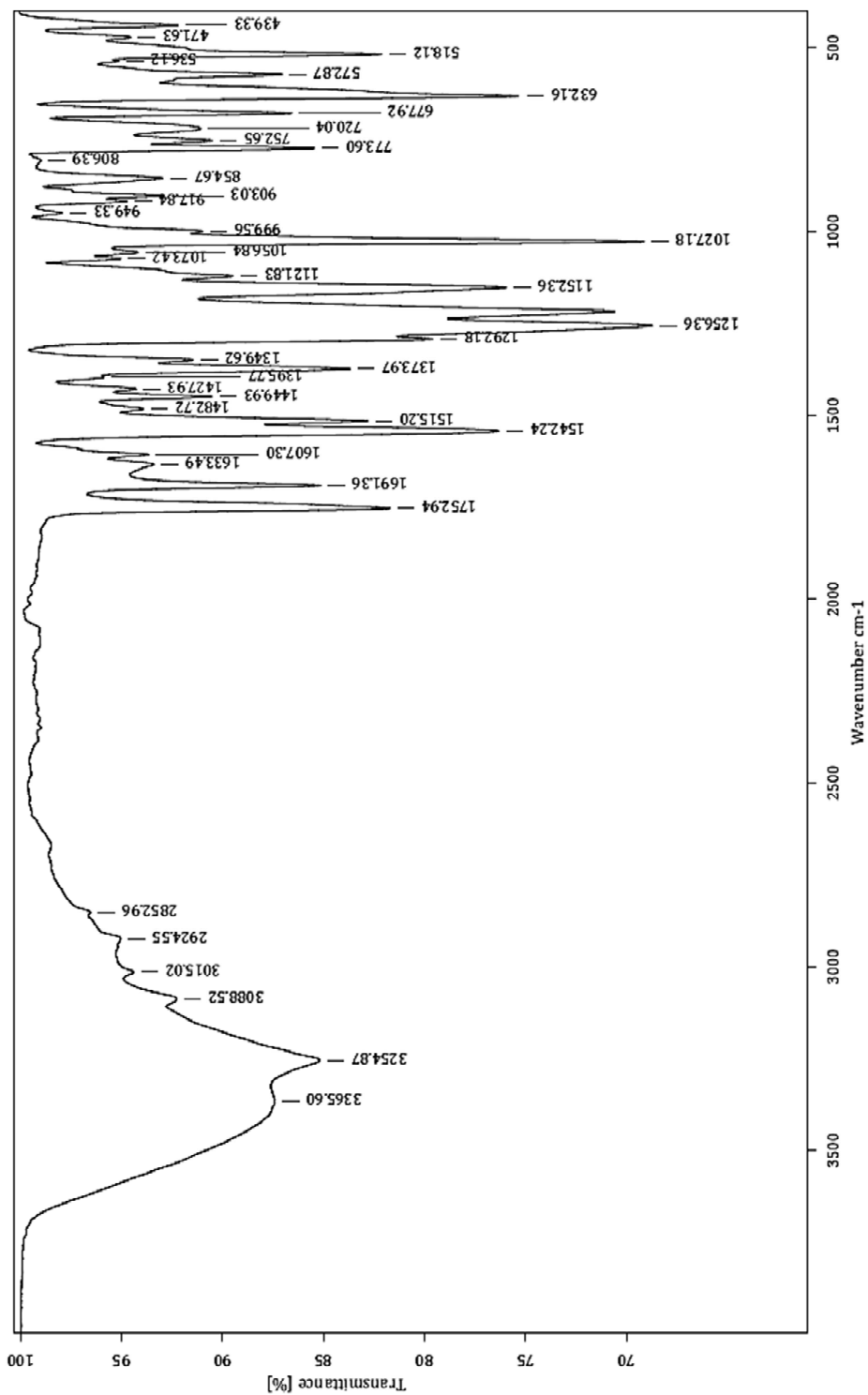
Fragmentograma 2. EM BQ3RTf (FAB) [M+Tf]



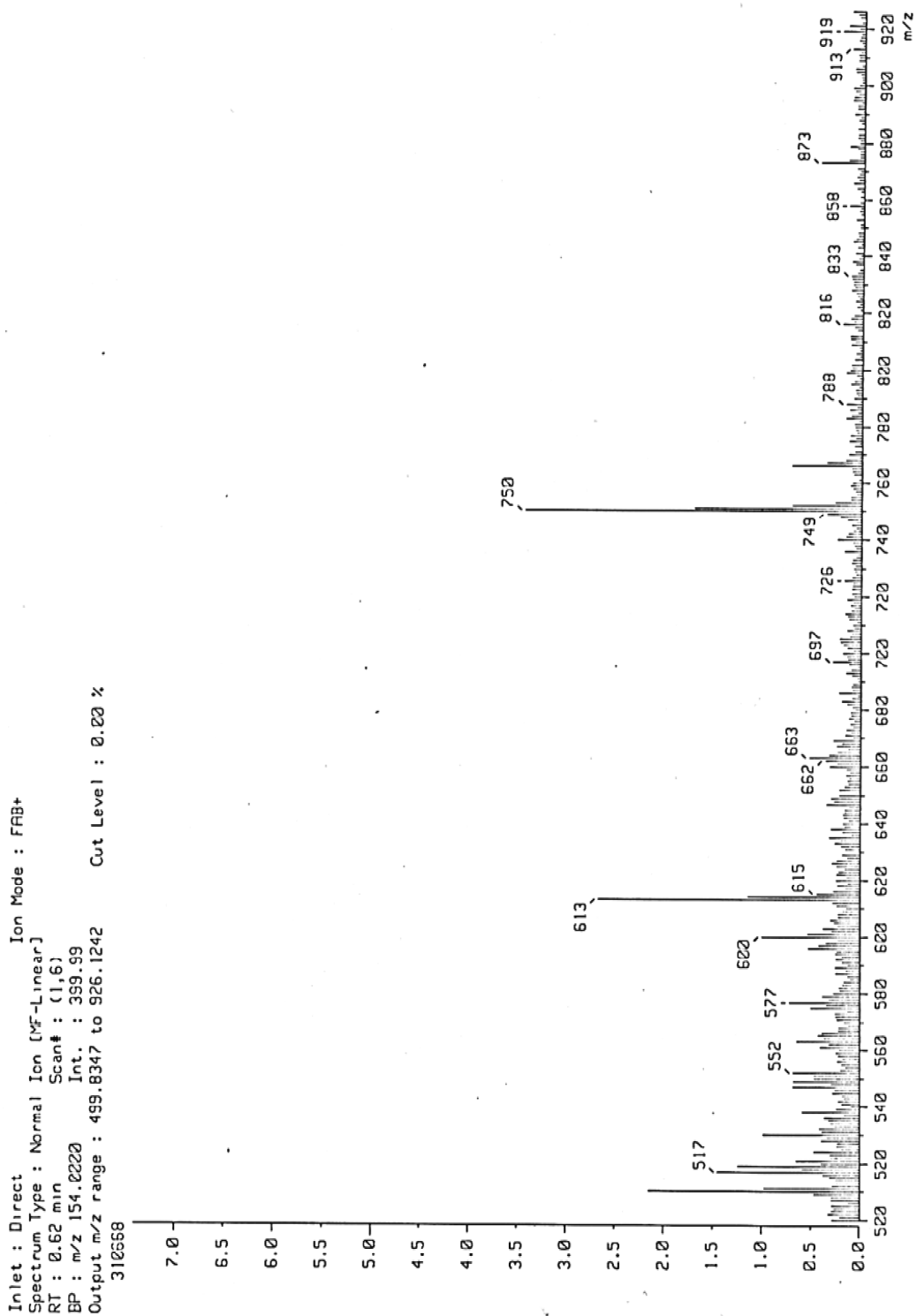
Espectro 1. ^1H RMN BQ3RTf (DMSO- d_6).



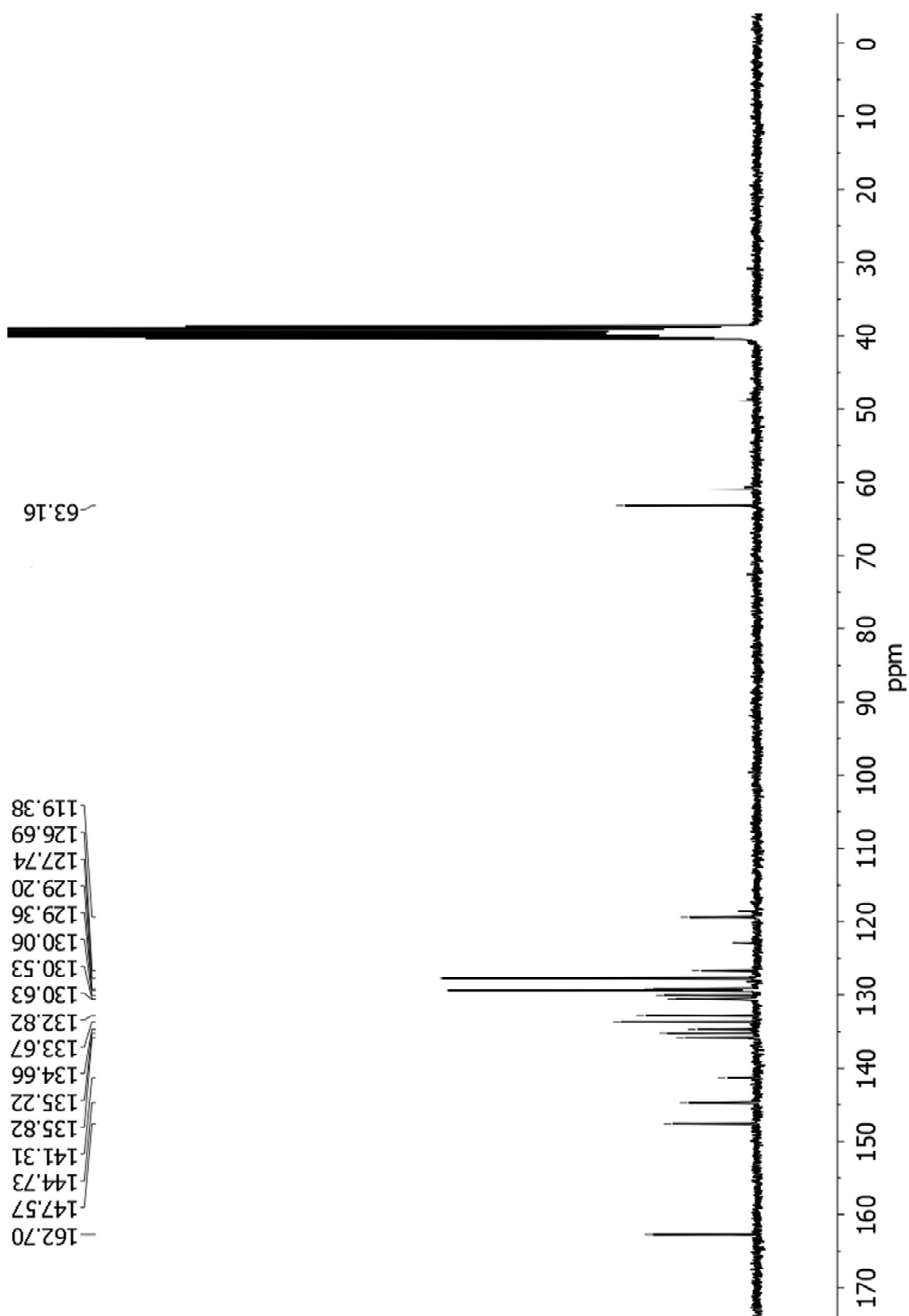
Espectro 2. ^{13}C RMN BQ3RTf ($\text{DMSO-}d_6$).



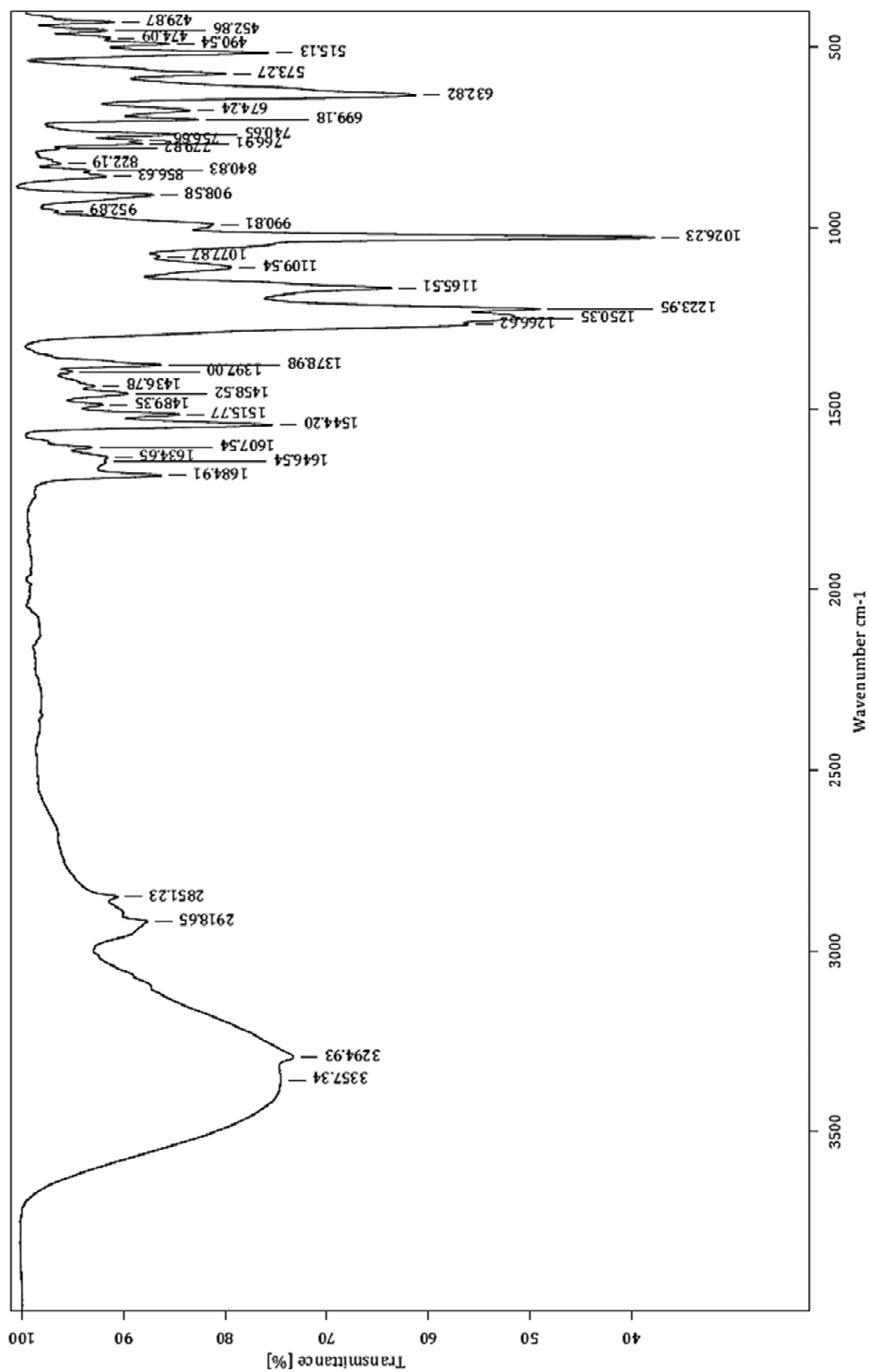
Espectro 3. IR BQ3RTf (ATR).



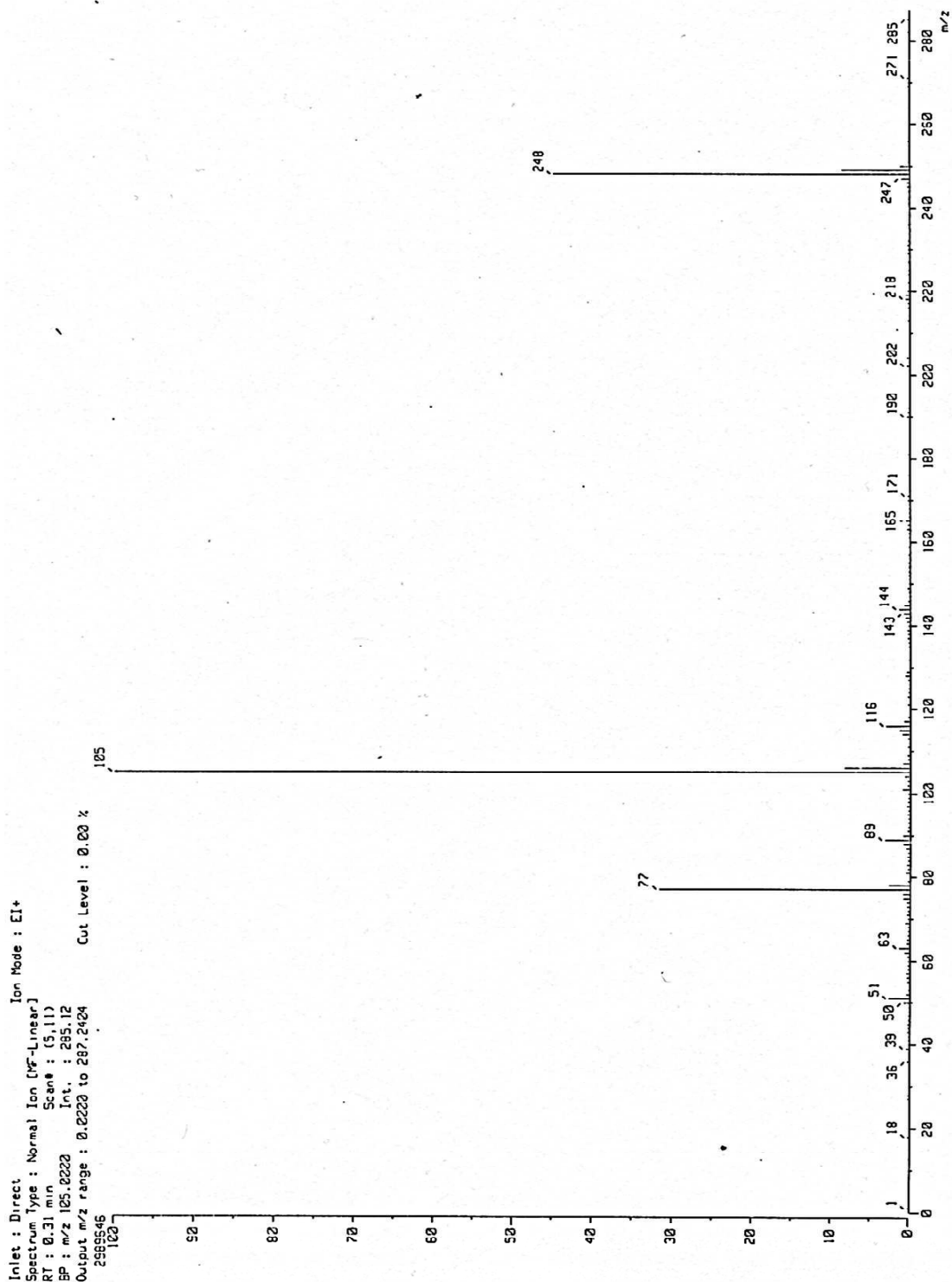
Fragmentograma 3. EM BQ3BzTf (FAB) [M+Tf]



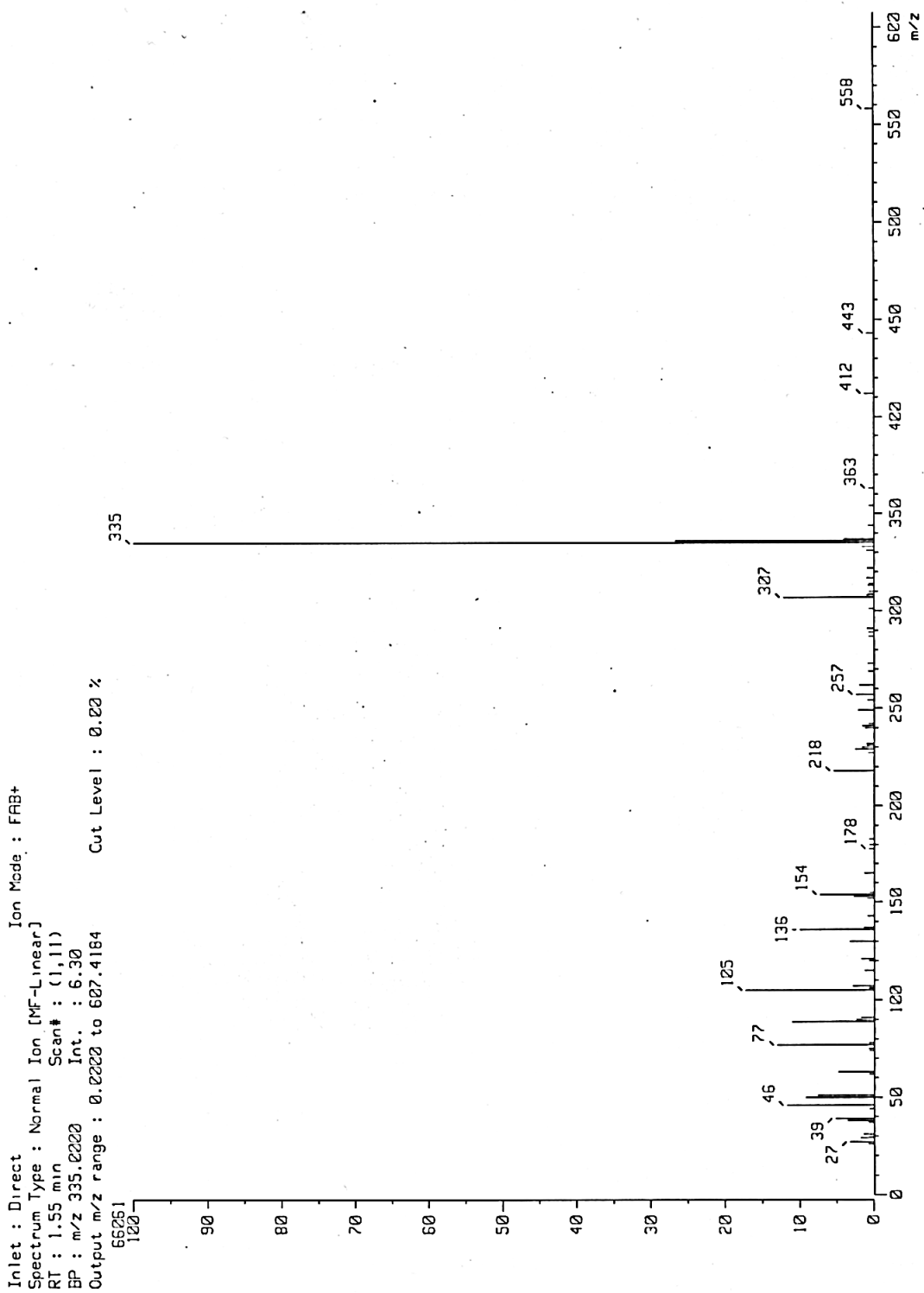
Espectro 5. ^{13}C RMN BQ3BzTf (DMSO- d_6).



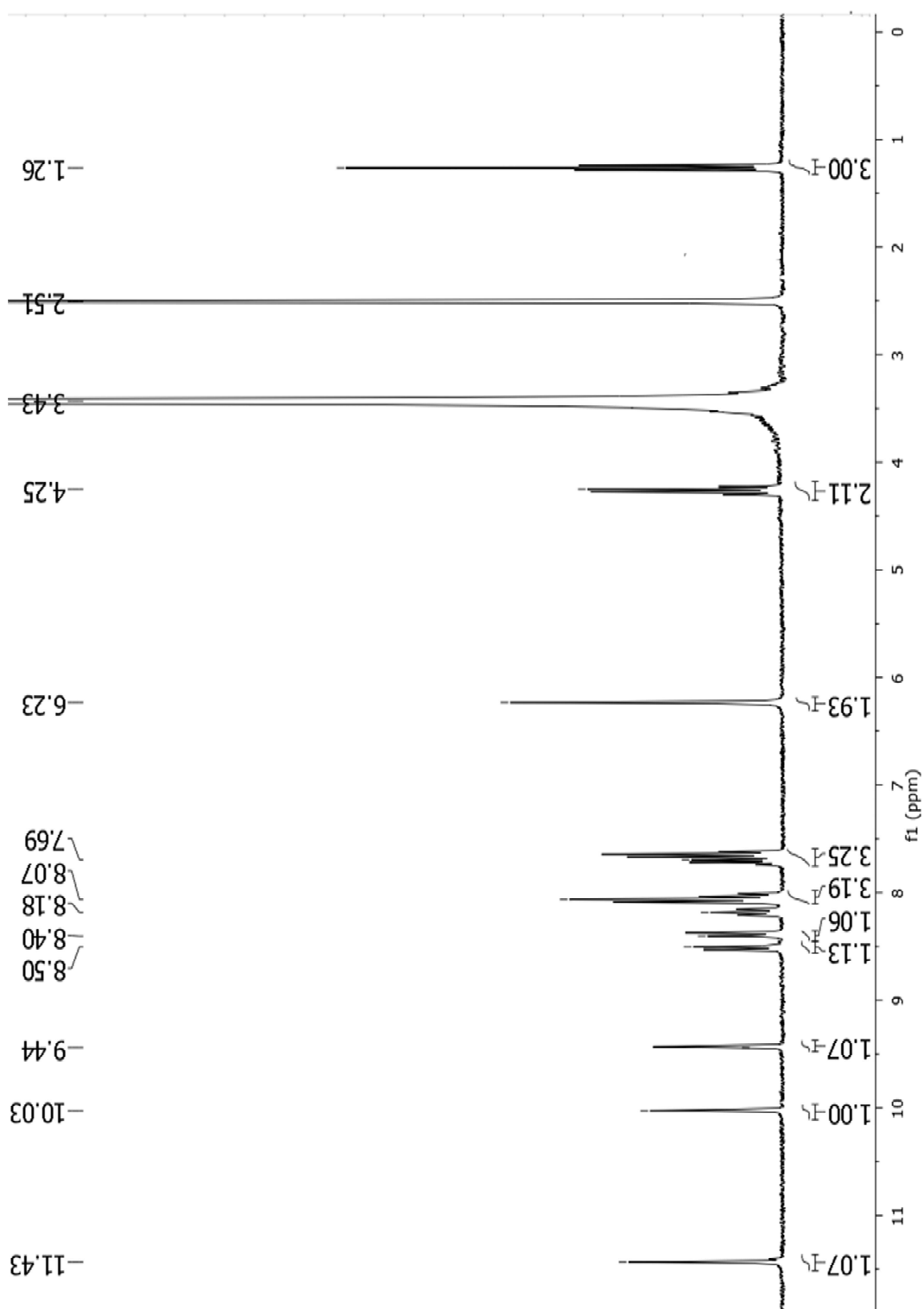
Espectro 6. IR BQ3BzTf (ATR).



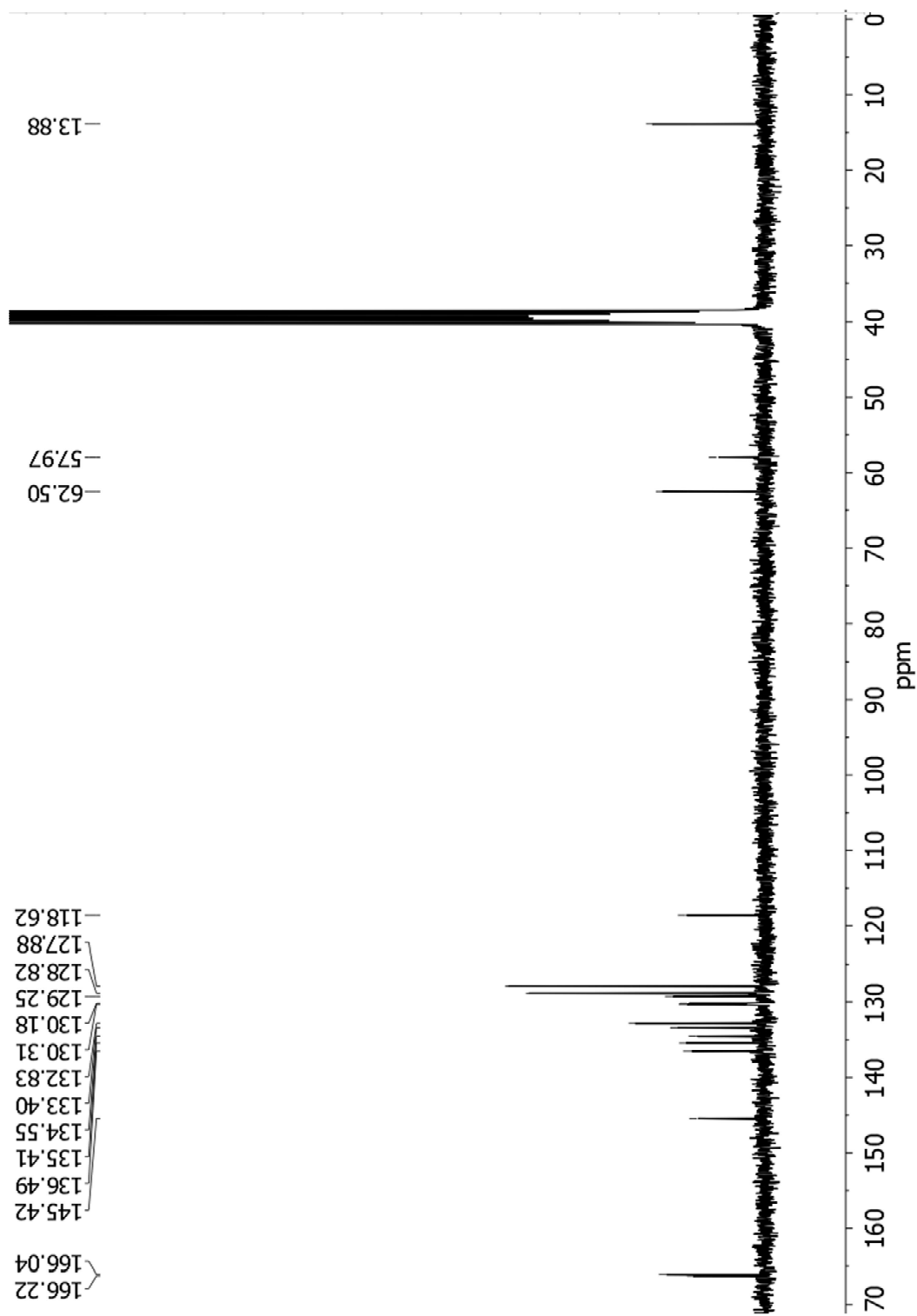
Fragmentograma 4. EM MQ3 (EI).



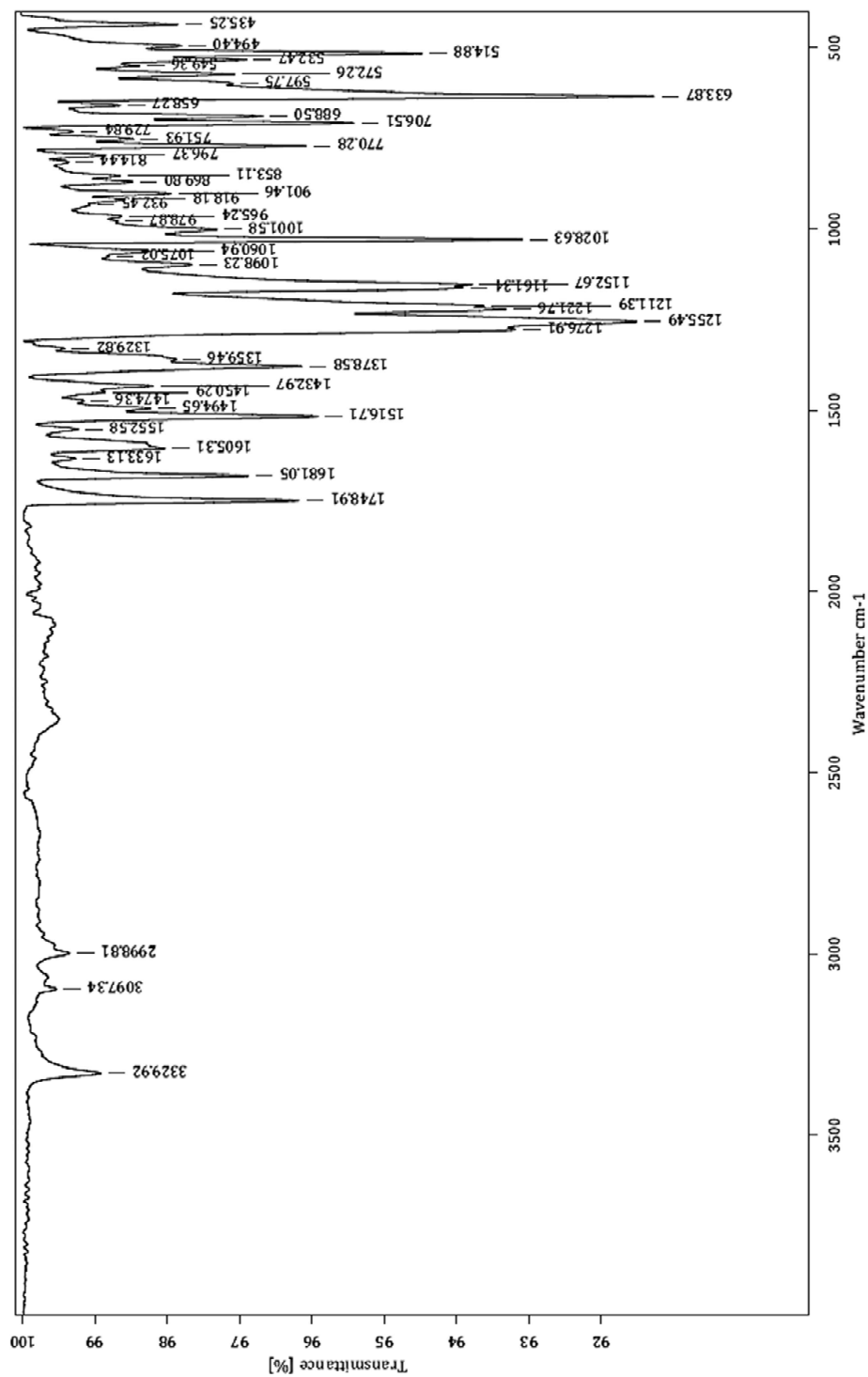
Fragmentograma 5. EM MQ3RTf (FAB) [M+Tf]



Espectro 7. ¹H RMN MQ3RTf (DMSO-d₆).



Espectro 8. ^{13}C RMN MQ3RTf (DMSO- d_6).



Espectro 9. IR MQ3RTf (ATR).

DATOS CRISTALOGRAFICOS	BQ3RTf	BQ3BzTf	MQ3RTf
Empirical formula	C ₃₅ H ₃₁ F ₆ N ₅ O ₁₂ S ₂	C ₄₁ H ₃₁ F ₆ N ₅ O ₈ S ₂	C ₂₁ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₆ S
Formula weight	891.77	899.83	484.44
Temperature	292(2) K	100(2) K	100(2) K
Wavelength	1.54178 Å	0.71073 Å	1.54178 Å
Crystal system	Triclinico	Monoclinico	Monoclinico
Space group	P -1	C 2/c	P 21/c
Volume	1923.1(3) Å ³	3736.7(3) Å ³	2122.89(9) Å ³
Z	2	4	4
Density (calculated)	1.540 mg/m ³	1.599 mg/m ³	1.516 mg/m ³
Absorption coefficient	2.143 mm ⁻¹	0.238 mm ⁻¹	1.985 mm ⁻¹
Unit cell dimensions	a = 11.5465(11) Å	a = 16.9725(7) Å	a = 9.3162(2) Å
	b = 12.4990(9) Å	b = 10.8785(4) Å	b = 15.1106(4) Å
	c = 15.0516(13) Å	c = 21.5068(9) Å	c = 15.1042(4) Å
	α = 89.603(6)°	α = 90°	α = 90°
	β = 76.005(6)°	β = 109.7750(9)°	β = 93.2292(18)°
	γ = 66.495(6)°	γ = 90°	γ = 90°

Tabla A. Datos cristalográficos de las sales de triflato de los receptores sintetizados.