



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN CH/ π EN EL ORIGEN DE LA INTERACCIÓN
CARBOHIDRATO-COMPUESTO AROMÁTICO

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. LORENA BAUTISTA IBÁÑEZ



TUTOR: Dr. GABRIEL EDUARDO
CUEVAS GONZÁLEZ-BRAVO

AÑO: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

- ❖ Al *Dr. Gabriel Cuevas* por darme la oportunidad de colaborar en este proyecto, recibirme en su grupo de investigación y las facilidades otorgadas para la conclusión del mismo. (Tutor)
- ❖ Al *Dr. Aarón Rojas Aguilar* por todos los conocimientos y experiencia compartidos para desarrollar la parte termodinámica en su laboratorio, y los diferentes informes y manuscritos resultantes del presente proyecto doctoral. (Comité Tutor)
- ❖ Al *Dr. Jesús Hernández Trujillo* por sus valiosas aportaciones y retos que contribuyeron a mi formación profesional; así como por su tiempo y comentarios en la revisión del presente manuscrito. (Comité Tutor)
- ❖ De la misma forma agradezco a los *Drs. Miguel Costas Basín, Luis Gerardo Zepeda, Federico del Rio, Jesús Hernández y Rodolfo Gómez*, por sus aportaciones a este proyecto en la revisión del presente manuscrito de tesis.
- ❖ Al *Ing. Francisco Gínez* por su asesoría para utilizar los diferentes calorímetros del laboratorio 25 del CINVESTAV-Ciudad de México, y a la *Dra. Beatriz Quiroz* por su valiosa colaboración en el desarrollo de los experimentos de ^1H -RMN en el Instituto de Química, UNAM.
- ❖ Al *Ing. Luis Velasco* y *M. en C. Javier Pérez Flores* por la realización de los espectros de masas y a la *Q. Eréndira García* por la realización de los espectros de infrarrojo del Instituto de Química.
- ❖ Al *Profr. Dr. François Diederich* por la asesoría y afectuosa bienvenida en su grupo de trabajo para realizar mi estancia doctoral y a la *Dra. Corinne Baumgartner* por permitirme colaborar en su proyecto doctoral como parte de mi estancia en el ETH-Zürich.
- ❖ A todo el personal de la *Coordinación de Posgrado* dirigida por la *Dra. Josefina de Gyves* por todas las facilidades y apoyo para poder concluir con éxito esta etapa de mi formación profesional.
- ❖ Al personal del *Instituto de Química* y del *CINVESTAV* por realizar su trabajo de manera tan efectiva para que los estudiantes podamos desarrollar nuestros proyectos con el menor número de contratiempos posible.
- ❖ Al personal de la biblioteca “*Jesús Romo Armería*” del Instituto de Química, *Guadalupe Anaya* y *Jesús Martínez* por su disposición, apoyo y facilidades para acceder a la información de la misma.
- ❖ A los *M. en C. Guillermo Roura, Dr. Cuauhtémoc Alvarado, Ing. Mariano Marcone* y *M. en C. Rosario Olguín* por ser los mejores compañeros que puede una persona tener en esta ardua tarea de la investigación científica.
- ❖ También a los *Drs. Melchor Herrera, Minerva Gamboa, Teresa Eusebio y Alejandro Valdez* por todas las experiencias compartidas y su apoyo incondicional durante mi estancia en el CINVESTAV.

Dedicatoria

A mi esposo Guillermo Roura Pérez y a mi hijo Sebastián Roura Bautista, les agradezco con todo mi amor su apoyo incondicional para concluir este trabajo. A la vida por tener a estas dos personitas tan maravillosas a mi lado. Los amo...

A mis padres y hermanos, mi familia política y a todos los amigos que compartieron conmigo esta etapa de mi vida.

La síntesis y caracterización de los carbohidratos y análisis por RMN se realizaron en el laboratorio 1-1 y el laboratorio de RMN del Instituto de Química, bajo la dirección del Dr. Gabriel Cuevas.

El análisis calorimétrico en el laboratorio 25 del CINVESTAV, con la asesoría del Dr. Aarón Rojas Aguilar.

Así mismo se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**BECARIA CONACYT No. 159325**), a través de una beca de Doctorado y con el apoyo de los proyectos **IN209600 de la DGAPA, 40390Q y 49921** del CONACYT.

Se tuvo la posibilidad de realizar una estancia de investigación en el ETH-Zürich bajo la asesoría del Prof. Dr. François Diederich, con el apoyo de una **beca mixta** otorgada por el CONACYT y una cantidad complementaria otorgada por el Dr. Diederich.

El presente trabajo fue aceptado para publicación en el *Journal of Organic Chemistry*: **Bautista-Ibáñez Lorena**, Ramirez-Gualito Karla, Quiroz-García, Rojas-Aguilar Aarón and Cuevas Gabriel, Calorimetric Measurement of the CH/ π Interaction Involved in the Molecular Recognition of Saccharides by Aromatic Compounds. *J. Org. Chem.*, **2008**, 73, 849-857.

Y se presentó en los siguientes congresos:

- IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN CH- π EN EL ORIGEN DE LA INTERACCIÓN CARBOHIDRATO-RESIDUO AROMÁTICO (I). Poster.

XX National Congress of Termodinamics, Tlaxcala, México. Septiembre 2005.

- IMPORTANCIA DE LA INTERACCIÓN CH- π EN EL ORIGEN DE LA INTERACCIÓN CARBOHIDRATO-RESIDUO AROMÁTICO (II). Poster.

II Meeting of Mexican Academy of Organic Chemistry. Guanajuato, México. Febrero 2006.

i. ÍNDICE

i. ÍNDICE.....	1
ii. TABLAS.....	3
iii. FIGURAS.....	5
iv. ESQUEMAS.....	6
v. RESUMEN.....	7
vi. ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1. La Interacción CH-π.....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
3. OBJETIVOS.....	15
4. PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DEL PROYECTO.....	16
4.1. Síntesis de los derivados permetilados.....	18
4.2. Microcalorimetría Calvet.....	19
4.3. Titulación Anisotrópica.....	23
4.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	25
4.4.1. Medición de la entalpia y la temperatura de fusión utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	29
4.4.2. Determinación de pureza.....	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
5.1 Interacción CH/π.....	33

5.2 Estudio calorimétrico	45
5.3 Glucopiranosidos peracetilados.....	58
5.3.1. 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo (a-GP) y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido de acetilo (b-GP).....	58
5.3.1 Acetato de metilo: 1,2-Dimetoxibenceno	64
6. PARTE EXPERIMENTAL	66
6.1 Materiales y Métodos.....	66
6.2 Metodología Experimental	68
6.2.1 Síntesis de los carbohidratos permetilados	68
6.2.2 Caracterización espectroscópica de los carbohidratos permetilados.....	70
6.2.2.1 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo	70
6.2.2.2 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo	71
6.2.2.3 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido de acetilo	72
6.2.3 Titulación anisotrópica ^1H -RMN:	73
6.2.4 Entalpías de disolución por calorimetría de flujo de calor:.....	73
6.2.5 Entalpías de Sublimación y Vaporización por calorimetría diferencial de barrido: 75	
7. CONCLUSIONES	78
8. BIBLIOGRAFÍA.....	80
9. ANEXO A.....	84

ii. TABLAS

<i>Tabla 1 Titulación Anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de ^1H-RMN.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabla 2 Titulación Anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-galctopiranosido de metilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de ^1H-RMN</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 3 Diferencias en el desplazamiento químico en ^1H-RMN de los compuestos permetilados debidas al efecto del benceno</i>	<i>41</i>
<i>Tabla 4 Titulación anistrópica de acetato de metilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de ^1H-RMN</i>	<i>43</i>
<i>Tabla 5 Entalpías de solvatación de MP en diferentes disolventes (1:10, mol:mol). Determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15K</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 6 Entalpías de solvatación de GTP en diferentes disolventes (1:10, mol:mol). Determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15K</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 7 Diferencias energéticas para CH/π presente en el compuesto GTP y ausente en el compuesto MP.....</i>	<i>51</i>
<i>Tabla 8 Valores de energía de CH/π para MP a partir de la ecuación (14)</i>	<i>53</i>
<i>Tabla 9 Valores energéticos de CH/π para GTP a partir de la ecuación (14).....</i>	<i>54</i>
<i>Tabla 10 Entalpías de Solvatación del acetato de metilo ($\Delta_{\text{vap}}H=29.32 \text{ kJ mol}^{-1}$) en diferentes disolventes (1:10, mol:mol). Determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15K</i>	<i>57</i>

Tabla 11 Titulación anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de $^1\text{H-RMN}$ 61

Tabla 12 Titulación anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido de acetilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de $^1\text{H-RMN}$ 62

Tabla 13 Entalpías de solvatación del 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo ($\Delta_{\text{vap}}H=29.32 \text{ kJ mol}^{-1}$) en diferentes disolventes (1:10), determinadas a partir de las entalpías de disolución, medidas por microcalorimetría Calvet a 303.15K, y de las entalpías de cambio de fase medidas por DSC.....63

Tabla 14 Valores energéticos para la Energía de interacción ($E_{1,2}$) a partir de la ecuación (14), para el 2,3,4,6-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo ($D_{\text{vap}}H= 29.32 \text{ kJ mol}^{-1}$) en diferentes disolventes (1:10), determinadas a partir de las entalpías de disolución, medidas por microcalorimetría Calvet a 303.15 K, y las entalpías de cambio de fase, medidas por DSC.....64

Tabla 15 Disolución de acetato de metilo en 1,3-DMB, en diferentes proporciones.....65

iii. FIGURAS

<i>Figura 1. Proceso de solvatación y cantidades termoquímicas requeridas en la determinación de la entalpía de solvatación de los carbohidratos.....</i>	<i>20</i>
<i>Figura 2. Modelo de Bovey que ilustra la anisotropía magnética del benceno (1).....</i>	<i>24</i>
<i>Figura 3 Sistemas de análisis térmico</i>	<i>26</i>
<i>Figura 4 Representación esquemática de los bucles de control de temperatura del DSC</i>	<i>28</i>
<i>Figura 5 Curva de Fusión del pentaacetato de β-D-glucosa</i>	<i>30</i>
<i>Figura 6 Gráfico de van't Hoff para la fusión.....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 7 Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de los protones anulares de los piranósidos permetilados</i>	<i>37</i>
<i>Figura 8 Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de los protones metílicos de los piranósidos permetilados</i>	<i>38</i>
<i>Figura 9 Efecto del benceno en el desplazamiento químico de los grupos metilo del acetato de metilo.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 10 Interacción del benceno con los protones anulares de α-GP y β-GP.....</i>	<i>59</i>
<i>Figura 11 Interacción del benceno con los grupos metilo de α-GP y β-GP.....</i>	<i>60</i>

iv. ESQUEMAS

<i>Esquema 1. Geometrías que favorecen la interacción CH/π</i>	12
<i>Esquema 2. Otras Interacciones más fuertes interfieren con la interacción CH/π</i>	16
<i>Esquema 3. Los carbohidratos peracetilados y permetilados permiten eliminar las interacciones adicionales posibles (puente de hidrógeno, interacción π/π), el acetato de metilo es la molécula de referencia</i>	17
<i>Esquema 4. Posición del grupo CH, de cloroformo, respecto a la nube π del benceno (1)</i>	25
<i>Esquema 5 Disolventes aromáticos sustituidos con grupos electrodonadores</i>	34
<i>Esquema 6 Efecto de la interacción CH/π sobre el desplazamiento químico (ppm) de los compuestos MP y GTP, diferencias calculadas con la ecuación (12)</i>	44
<i>Esquema 7 Condiciones de reacción para permetilar piranósidos en este trabajo</i>	69

V. RESUMEN

En este estudio se evaluó experimentalmente el calor de disolución de diferentes carbohidratos tales como el 2,3,4,6-tetra-*O*-metil- α -D-manopiranosido de metilo y 2,3,4,6-tetra-*O*-metil- β -D-galactopiranosido de metilo con diferentes disolventes aromáticos. Las entalpías de solvatación en benceno son -78.8 ± 3.9 y -88.7 ± 5.5 kJ mol⁻¹ para cada carbohidrato, respectivamente, y estos valores arrojaron una energía de interacción CH- π de 9.9 kJ mol⁻¹. Por otro lado, al estudiar por RMN los efectos de adicionar benceno a soluciones de cloroformo de los dos carbohidratos, se observó que en efecto existe un reconocimiento entre las especies en la solución ya que el benceno interacciona específicamente con los átomos de hidrógeno del anillo de piranosa en las posiciones 3, 4 y 5 localizados en la cara α del β -galactósido de metilo.

Al comparar las mediciones experimentales de la energía asociada a esta interacción con los resultados de cálculos teóricos, previamente obtenidos en el grupo de trabajo, fue posible determinar la existencia de interacciones CH- π entre los carbohidratos y derivados bencénicos.

vi. ABSTRACT

In this study, we evaluated the experimental heat of dissolution of different carbohydrates, such as methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- α -D-mannopyranoside and methyl 2,3,4,6-tetra-*O*-methyl- β -D-galactopyranoside with different aromatic solvents. For each carbohydrate the solvation enthalpies in benzene were -78.8 ± 3.9 , and -88.7 ± 5.5 kJ mol⁻¹, respectively, and these values yielded a CH/ π energy of interaction of 9.9 kJ mol⁻¹. In addition, NMR studies of the effect of the addition of benzene to chloroform solutions of the two carbohydrates showed that benzene specifically interacts with the hydrogen atoms of the pyranose ring at positions 3, 4, and 5 located on the α face of the methyl- β -galactoside, so it is, in fact, able to recognize it.

By comparing the experimental measurements of the energy of interaction with theoretical calculations, the latest previously reported for this working group, it was possible to determine the existence of CH- π interactions between carbohydrates and benzene derivatives.

1. INTRODUCCIÓN

La interacción CH/ π , en la cual el grupo CH es alifático, aromático, vinílico, acetilénico, etc., es una de las interacciones más débiles conocidas. Sin embargo, esta interacción es muy importante, (1) pues contribuye de manera significativa a la estabilidad total de las estructuras de las proteínas, (2), (3), (4) el reconocimiento selectivo y la afinidad de enlace entre las proteínas y los ligantes, (5), (6), (7) la preferencia conformacional del ADN; (8) así como a la estereoselectividad de las reacciones orgánicas. (9), (10) Por lo tanto, determinar la energía que caracteriza a esta interacción es muy importante.

Las interacciones CH/ π han sido investigadas cualitativamente a través de estudios de mutación de proteínas, (11) espectroscopia de IR y RMN, (12), (13), (14) análisis cristalográfico por rayos-X, (15), (16) y por métodos computacionales. (17), (18), (19)

Sin embargo, la cuantificación de una interacción débil normalmente no es fácil y por lo tanto existen solamente algunos reportes de estudios en esta área, incrementando la relevancia del presente trabajo. (20), (21)

Más difícil es aun evaluar la contribución de una sola interacción no covalente la cual está involucrada en un evento biológico o químico específico. Por lo tanto, el desarrollo de modelos moleculares simples con el objetivo de evaluar la contribución de una interacción CH/ π en los procesos de reconocimiento molecular es extremadamente importante.

En vista de que gran variedad de acontecimientos biológicos, de importancia fundamental, depende de la interacción proteína-carbohidrato, en este trabajo se demuestra la relevancia de medir de manera eficiente una interacción CH/ π , origen del reconocimiento. (22), (23)

1.1. La Interacción CH- π

El concepto de interacción CH/ π se originó en la observación experimental de que el benceno y los compuestos aromáticos relacionados, capaces de interactuar con protones, por su alta densidad electrónica anular, se disuelven de manera exotérmica en cloroformo; esto debido a la electronegatividad de los átomos de cloro, que producen un incremento en la acidez del átomo de hidrógeno, provocando que el cloroformo se comporte como donador de protones. Esta propiedad se aprovecha en la formación del dicloro carbeno. (24)

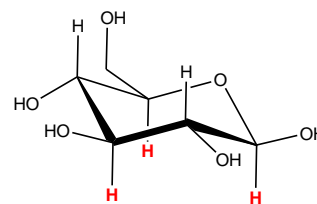
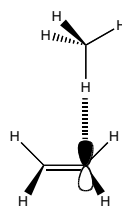
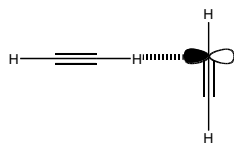
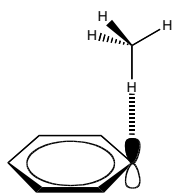
La interacción CH/ π es un enlace de tipo puente de hidrógeno débil, que se produce entre una base blanda y un ácido blando (CH= ácido blando y electrones π = base blanda) originada fundamentalmente por fuerzas electrostáticas, con contribuciones menores relacionadas con la transferencia de carga. Se caracteriza por aportar una energía de estabilización del orden de 4.2 kJ mol⁻¹ y es aditiva si se produce más de una. Además la interacción CH/ π es dependiente de la geometría molecular, (25), (26) es direccional y es propia tanto de ambientes polares como no polares (esquema 1). (27) Su estudio permite contribuir al entendimiento de las fuerzas intermoleculares débiles y es fundamental porque define propiedades como la conformación, la selectividad, (10) el reconocimiento quiral, (28) el

empaquetamiento cristalino, el autoensamblaje, las reacciones en estado sólido, (12) los cristales líquidos, la química de coordinación y la estructura de proteínas, entre otras muchas. (29), (30) La trascendencia de esta interacción en eventos biológicos fundamentales ha sido aceptada recientemente y permite explicar muchos fenómenos, entre ellos la unión específica de ligantes a proteínas. (31), (32), (33), (34)

Como se observa en el Esquema 1 para producirse una interacción CH/ π , el enlace C-H se debe encontrar en posición perpendicular a la nube π y en el caso particular de los carbohidratos esta interacción se ve altamente favorecida cuando tres de los H, en la cara α del anillo de pirano, son axiales (Esquema 1a). (1)

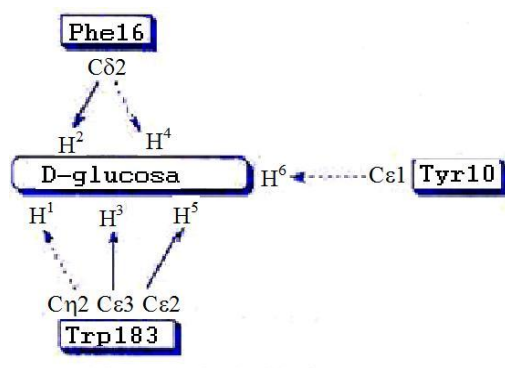
En el sitio de unión de proteínas que reconocen carbohidratos como glucosidasas, glucotransferasas y lectinas, es posible localizar residuos de aminoácidos aromáticos como triptófano, fenilalanina, tirosina e histidina, y se ha sugerido que la geometría observada, en la que el plano del anillo aromático se encuentra orientado en forma perpendicular a los enlaces C-H del carbohidrato, es consecuencia de la interacción estabilizante entre el carbohidrato y los residuos aromáticos de las proteínas. A esta disposición se le denomina “empaquetamiento” (Stacking). (35)

Desafortunadamente, los estudios de difracción de rayos X de proteínas de mejor calidad tienen una incertidumbre de 1.8 Å y recientemente se ha alcanzado una resolución de 1.2 Å, (36), (37) aunque esto, aún, no permite estudiar la interacción ni definir acertadamente la geometría de los complejos. (38), (39)



a)

b)



c)

Esquema 1. Geometrías que favorecen la interacción CH/π, a) la geometría lineal es la más favorecida en la interacción CH--π; b) los H en posición 1, 3 y 5 deben estar orientados hacia la misma cara del carbohidrato para favorecer una interacción CH/π; c) en la glucosa, los enlaces C-H del metino orientados axialmente, participan simultáneamente en las interacciones con los carbonos sp^2 de los anillos aromáticos

2. ANTECEDENTES

La evidencia de una interacción molecular débil se puede obtener a partir de diversos tipos de mediciones, a través de métodos espectrométricos tanto clásicos como modernos, por ejemplo, el espectro de IR revela la interacción específica de los átomos de hidrógeno así como la perturbación sobre sus modos vibracionales en el complejo molecular y frecuentemente proporciona evidencia a cerca de la unión XH/ π putativa. (40), (41) En principio era el método espectroscópico más popular para detectar fuerzas moleculares débiles como el puente de hidrógeno.

Por otra parte, la resonancia magnética nuclear (RMN) evidencia el ambiente electrónico del átomo de hidrógeno y proporciona uno de los medios más útiles para detectar interacciones débiles. Un desplazamiento a campo bajo o alto denota que el hidrógeno está en una orientación específica respecto al sistema de electrones π , de este modo se verifica que el XH está complejado con el sistema π . (42) La dispersión óptica rotatoria (ORD) o la espectrometría de dicroísmo circular (CD), si son utilizadas de manera adecuada, pueden servir como una herramienta confiable para estudiar la naturaleza de la interacción. (43) Otras técnicas incluyen métodos clásicos como mediciones termodinámicas, como es el caso del presente trabajo.

Estudios recientes investigan, entre otros, el complejo MeGal-Tolueno (Metil Galactosa – Tolueno) con la técnica IR ion-dipolo (IRID), estos pretenden asignar bandas originadas por el complejo en estudio, sin embargo distan de ser una prueba fehaciente de la existencia de la interacción CH/ π . (12)

En la sección de Titulación Anisotrópica se describirán ampliamente otros ejemplos del uso de la ^1H -RMN para determinar el efecto de electrones π en el desplazamiento de los átomos de hidrógeno cuando interaccionan de manera inter/intramolecular.

Como antecedente nuestro grupo de trabajo publicó las primeras pruebas de la naturaleza estabilizante de la interacción carbohidrato-residuo aromático. (14) En dicho trabajo se establece, teóricamente, que el residuo aromático (benceno) interactúa con el carbohidrato (fucosa) con una energía de estabilización de 11.3 kJ mol^{-1} .

3. OBJETIVOS

General

El desarrollo de este proyecto pretende determinar la energía de interacción carbohidrato-compuesto aromático por métodos termodinámicos experimentales y definir la geometría de estos aductos dentro de los límites que la resonancia magnética nuclear permite, para establecer la relevancia de la interacción CH/ π .

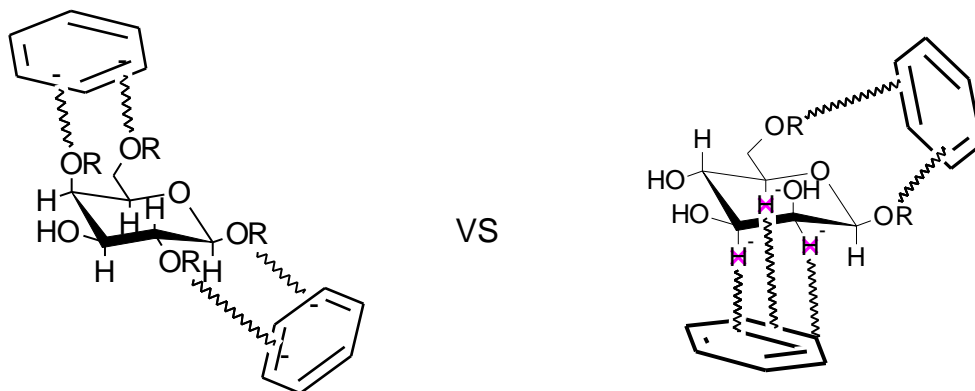
Particulares

- Obtener el valor energético de la interacción CH/ π a través de la determinación de la entalpía de solvatación, $\Delta_{dis}H$, por métodos calorimétricos.
- Determinar la geometría del complejo CARBOHIDRATO-COMPUESTO AROMÁTICO siguiendo el desplazamiento de los 1H a través de una titulación anisotrópica seguida por RMN.
- Eliminar interacciones tipo puente de hidrógeno funcionalizando los carbohidratos de interés con grupos CH_3 - en lugar de grupos -OH.
- Evaluar el efecto de los sustituyentes del anillo aromático, en la capacidad de llevar a cabo la interacción CH/ π .

4. PLANTEAMIENTO Y DESARROLLO DEL PROYECTO

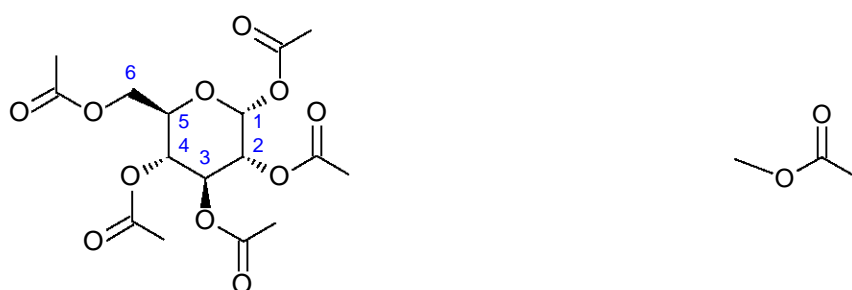
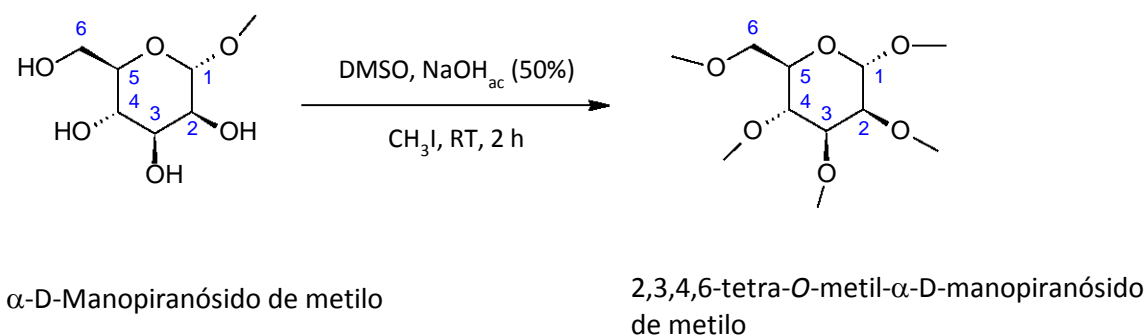
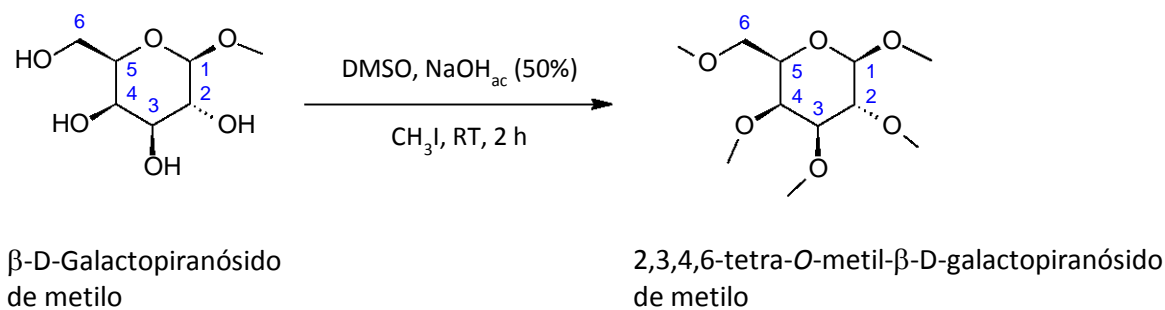
Debido a la supuesta naturaleza estabilizante de la interacción CH/ π , la energía asociada a esta puede ser determinada por métodos calorimétricos. Como esta interacción debe verse influida por la capacidad del sustrato aromático de donar densidad electrónica, se puede esperar que sea más fuerte cuando se encuentre sustituido por grupos llamados electrodonadores y se torne débil cuando la sustitución sea por grupos electroattractores. (1)

Puesto que los carbohidratos naturales presentan la capacidad de formar puentes de hidrógeno, de energía considerablemente mayor a la de las interacciones de interés (Esquema 2), los carbohidratos se modificaron para que los resultados obtenidos permitan valorar directamente la energía de la interacción CH/ π .



Esquema 2. Otras Interacciones más fuertes interfieren con la interacción CH/ π

La molécula que se utiliza como modelo de referencia, para evaluar la energía de interacción es el acetato de metilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_3$), pues esta sencilla molécula cuenta con dos grupos metilos diferentes, y ambos grupos pueden participar en una interacción CH/ π ,



Esquema 3. Los carbohidratos peracetilados y permetilados permiten eliminar las interacciones adicionales posibles (puente de hidrógeno, interacción π/π), el acetato de metilo es la molécula de referencia

Estos nuevos grupos metilo y acetilo (Esquema 3) podrían participar en la estabilización global al interactuar con el sustrato aromático. Uno de los retos a resolver es separar las contribuciones de este tipo, utilizando el acetato de metilo como molécula de referencia (AcOMe), puesto que empleando la espectrometría de RMN, a través del procedimiento llamado titulación anisotrópica, será posible determinar los aspectos referentes a la geometría del complejo.

Con esto y experimentos por separado en los que se determine la energía de las interacciones R-CO₂-CH₃--aromático y R-O-CH₃--aromático, es posible aislar la interacción de interés.

A continuación se presentan algunos aspectos relevantes de las técnicas experimentales desarrolladas.

4.1. Síntesis de los derivados permetilados

Las condiciones más favorables para permetilar glucósidos se basan en el método de Hakomori, (44) en el cual se utiliza el anión CH₃SOCH₂⁻ como una base fuerte. Existen variantes de este método en donde se emplean otras bases o disolventes, sin embargo en sustratos con numerosos grupos hidroxilo se requieren de muchos equivalentes de la base utilizada. Por esta razón, Wang y colaboradores (45) proponen el uso de NaOH en solución acuosa al 50% y un disolvente como DMSO. La presencia de agua incrementa la solubilidad del hidróxido de sodio y mejora la basicidad del medio, logrando así la alquilación completa de los carbohidratos con diferentes halogenuros de alquilo.

En este trabajo se probaron tanto el método de Hakomori como el de Wang, observando con el primero, bajos rendimientos, tiempos prolongados de reacción, demasiados subproductos y una purificación extremadamente complicada.

El método establecido por Wang permitió utilizar los α -metil glucopiranosidos comercialmente disponibles y obtener rendimientos superiores al 95% en tiempos cortos de reacción, los inconvenientes se presentaron en el proceso de purificación, pues a pesar de lo reportado por el autor, la sílice como fase estacionaria en la columna cromatográfica no resultó la más conveniente. Fue necesario realizar algunas variaciones sobre todo en la etapa de separación y purificación. Por ejemplo realizar un lavado con una solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ para eliminar el I_2 remanente, tratamiento de la fase orgánica resultante con carbón activado y posterior cristalización para alcanzar la pureza necesaria.

4.2. Microcalorimetría Calvet

La energía de interacción CH/ π se determinó calculando la entalpía de solvatación de acuerdo a las Ecuaciones 1 y 2. Esta cantidad equivale al calor transferido durante el proceso en el que una molécula del carbohidrato, en fase gas, se inserta directamente en una esfera de solvatación constituida de moléculas del disolvente aromático, manteniendo condiciones de temperatura y presión constantes en el sistema durante todo el proceso.

La cantidad de calor transferido desde el inicio hasta el final de una transformación química o física, a temperatura y presión constante, puede ser medida a través de un

microcalorímetro, mediante el cual se obtiene una cantidad termodinámica básica conocida como *entalpía*.

El proceso de solvatación y las cantidades requeridas en su medición se muestran en la Figura 1. Como se puede observar, el proceso de solvatación implica llevar el carbohidrato de la fase cristalina o líquida a la fase gaseosa, involucrando en dicho proceso la entalpía de sublimación, $\Delta_{sub}H$, en el caso de que el carbohidrato sea sólido, o la entalpía de vaporización, $\Delta_{vap}H$, si se trata de un líquido. La posterior introducción del carbohidrato, en fase gas, directamente al seno de la solución, constituye propiamente el proceso de solvatación, el cual lleva a su vez asociado una entalpía de solvatación, $\Delta_{solv}H$.

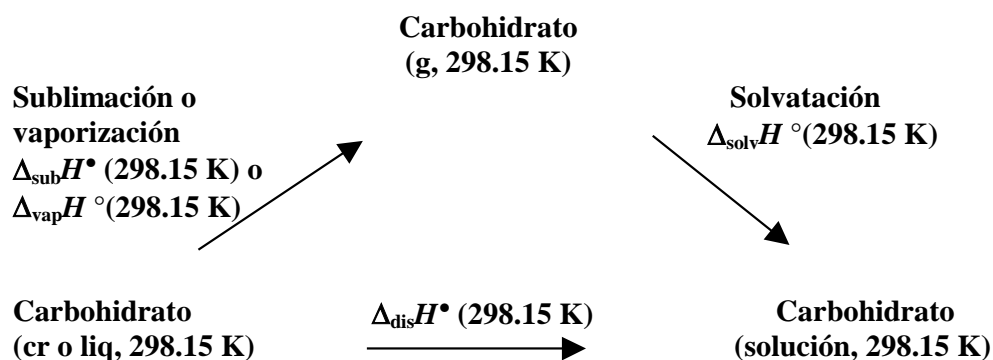


Figura 1. Proceso de solvatación y cantidades termoquímicas requeridas en la determinación de la entalpía de solvatación de los carbohidratos

La Figura 1 también permite ver que la suma del proceso de sublimación y de solvatación lleva al mismo estado final que el proceso directo de disolución, cuya entalpía de disolución, $\Delta_{dis}H$, se puede medir calorimétricamente. En consecuencia se verifica que para un derivado permetilado sólido

$$\Delta_{dis}H = \Delta_{sub}H + \Delta_{solv}H \quad (1)$$

y en consecuencia,

$$\Delta_{solv}H = \Delta_{dis}H + \Delta_{sub}H \quad (2)$$

Determinar la entalpía de solvatación de esta manera implica sustraer a la entalpía de disolución el efecto energético debido a la ruptura de los arreglos intermoleculares del cristal y/o del líquido, la energía remanente está directamente asociada entonces a la interacción de las moléculas del carbohidrato con las moléculas del disolvente.

En caso de que el carbohidrato permetilado en estudio sea un líquido, las ecuaciones (1) y (2) son aplicables siempre y cuando, se sustituya el término $\Delta_{sub}H$ por $\Delta_{vap}H$. Las entalpías de cambio de fase involucradas en este proceso se determinaron por calorimetría diferencial de barrido (DSC) y el calor de disolución por microcalorimetría Calvet.

En el caso de los microcalorímetros tipo Calvet, el flujo de calor debido a un proceso particular (por ejemplo, la disolución) es detectado directamente por la termopila del calorímetro, constituida por un arreglo adecuado de termopares. La fracción de calor transferida sobre cada termopar (dq_j), genera una diferencia de temperaturas (dT_j) entre las puntas del mismo, verificándose que:

$$dq_j \propto dT_j$$

o también,

$$dq_j = \gamma dT_j \quad (3)$$

En esta ecuación la constante de proporcionalidad γ es la conductividad térmica de la pared de la termopila. La diferencia de temperatura sobre el termopar genera a su vez una fuerza electromotriz, df_j , siendo estas cantidades proporcionales entre sí:

$$df_j \propto dT_j$$

lo cual puede escribirse como:

$$df_j = \varepsilon dT_j \quad (4)$$

donde ε es el poder termoeléctrico del termopar. Combinando las ecuaciones (3) y (4) obtenemos:

$$df_j = \frac{\varepsilon}{\gamma} dq_j \quad (5)$$

La fuerza electromotriz total, F , generada por la termopila es la suma de las fuerzas electromotrices individuales de cada termopar, en consecuencia:

$$F = KQ \quad (6)$$

donde la constante $K = \varepsilon/\gamma$, es la sensibilidad del aparato. La ecuación (6) indica entonces que la señal termoeléctrica generada por el calorímetro es proporcional al flujo de calor total, Q , detectado por la termopila.

Al graficar la señal termoeléctrica en función del tiempo e integrar el registro calorimétrico, es posible cuantificar totalmente la cantidad de calor emitida en el curso de una transformación química o física. Un calorímetro que registra el flujo de calor respecto al tiempo es de gran utilidad para el análisis de fenómenos físicos muy lentos como son la adsorción,

disolución, gelatinización o cambios estructurales en reacciones orgánicas lentas, e incluso es posible identificar una bacteria por su curva termogénica. (46)

En lo que concierne a este proyecto de investigación, se empleó la microcalorimetría Calvet para la medición del calor de disolución de los siguientes compuestos: *acetato de metilo*; *2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo*; *2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo* y *2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo*. (47)

Los experimentos de disolución se efectuaron isotérmicamente en un calorímetro Calvet C80 de la marca Setaram, el cual opera en forma diferencial utilizando dos termopilas como sensores, constituidos estos de termopares en un arreglo adecuado. La sensibilidad de las termopilas es de $2 \mu W$ y se encuentran ensambladas dentro de un bloque calorimétrico con un control de temperatura de hasta $0.001 K$. Cada termopila o sensor permite alojar una celda de acero inoxidable, que corresponden: una a la muestra y otra a la referencia, ambas con las mismas características y especificaciones descritas en la parte experimental de esta tesis.

4.3. Titulación Anisotrópica

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de protones (RMN) evidencia el ambiente electrónico del átomo de hidrógeno y es uno de los medios más útiles para detectar interacciones débiles. Un desplazamiento a campo alto o a campo bajo en la resonancia del protón demuestra que el hidrógeno está en una orientación con respecto al sistema de electrones π , de este modo se verifica que el grupo XH está complejado con el sistema π . (1) El desplazamiento a campo bajo se atribuye al efecto del campo eléctrico y la anisotropía

magnética, los cuales son ocasionados por los pares de electrones libres, sobre el átomo que acepta al hidrógeno. Sin embargo, la señal de resonancia magnética de protón del CHCl_3 es conocida por desplazarse a campo alto cuando está disuelto en disolventes aromáticos. El fenómeno ha sido atribuido a los efectos anisotrópicos diamagnéticos de los electrones π presentes en el anillo aromático. Esto es útil para indicar la presencia de un tipo específico de interacción entre un grupo CH y un sistema π . (48)

En el estudio realizado por Reeves y Schneider se describe cómo la señal de resonancia del protón del cloroformo se desplazó a campo alto de manera significativa en benceno, tolueno o mesitileno. Este tipo de desplazamiento de δ_{CH} en disolventes aromáticos ha sido ampliamente estudiado y se conoce como desplazamiento inducido por disolventes aromáticos (ASIS), como se muestra en el modelo de Bovey (Figura 2).

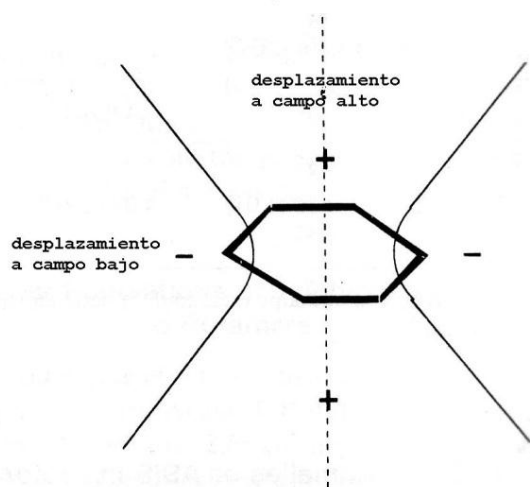
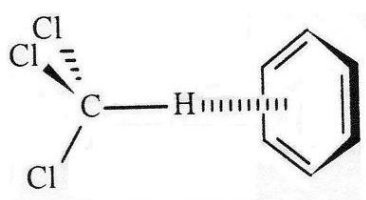


Figura 2. Modelo de Bovey que ilustra la anisotropía magnética del benceno (1)

De esta manera se puede afirmar que el átomo de hidrógeno del cloroformo debe estar localizado, en promedio, cercano a o justo arriba del plano del anillo aromático como se aprecia en el Esquema 4.



Esquema 4. Posición del grupo CH, de cloroformo, respecto a la nube π del benceno (1)

La titulación anisotrópica consiste en la adición paulatina de un sustrato (aromático para nuestro caso) a una muestra (por ejemplo, un carbohidrato) de concentración conocida, las regiones moleculares de la muestra que interactúen preferentemente con las de alta densidad electrónica del sustrato aromático experimentarán corrimiento a campo alto. La magnitud del corrimiento está asociada con la intensidad de la interacción. En los casos en los que no hay corrimiento diferenciado no se puede hablar de estructura del complejo, pero cuando existe, se puede establecer con certidumbre la estructura de la supramolécula resultante. (49)

4.4. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

En la actualidad, existen dos tipos de sistemas de análisis térmico diferencial que son los más conocidos y utilizados: el análisis térmico diferencial (ATD) y la calorimetría diferencial de barrido (DSC). La diferencia fundamental entre ambos sistemas es el modo de calentamiento de la muestra y la señal detectada. Ambos dispositivos se ilustran en la Figura 3.

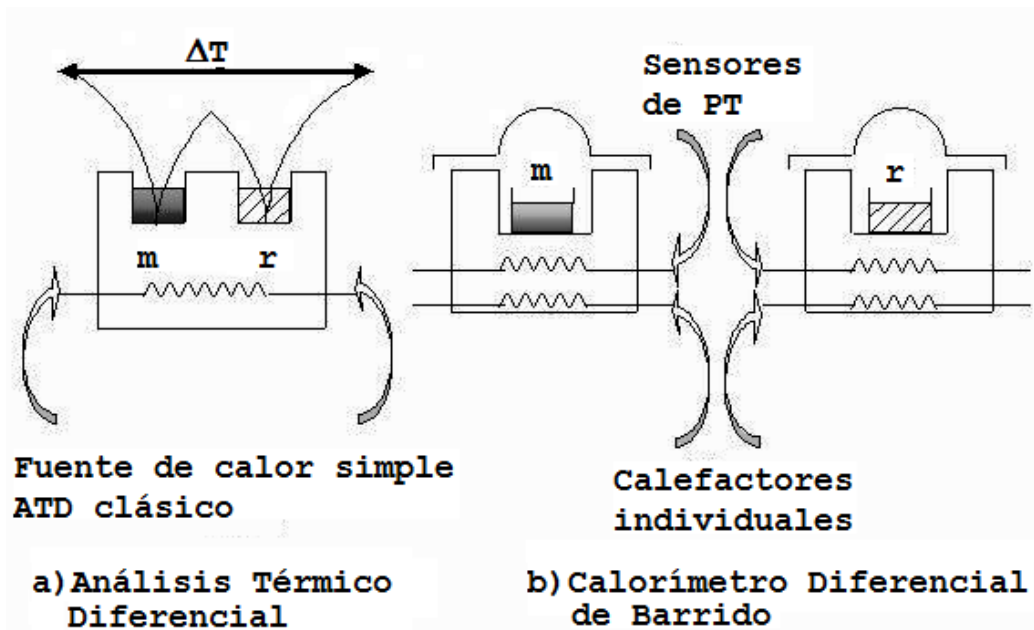


Figura 3 Sistemas de análisis térmico

En el análisis térmico diferencial, la muestra a analizar y la referencia son calentadas por una misma fuente de calor, variando la temperatura. Sus respectivas temperaturas son medidas, usualmente por termopares, en función del tiempo, esto con el fin de detectar cualquier diferencia ΔT , que se genere como consecuencia de algún cambio de fase o fenómeno químico que experimente la muestra analizada, en cada momento. Se caracteriza por ser una técnica principalmente cualitativa, que permite detectar si los procesos que ocurren en la muestra son endotérmicos o exotérmicos e indica la temperatura a la cual tienen lugar estos cambios energéticos. Cuando se calibra de manera adecuada el equipo es posible convertir el ATD en una técnica semicuantitativa para poder obtener información sobre la cantidad de calor involucrado en los procesos.

En contraste, en la calorimetría diferencial de barrido (DSC), la muestra y la referencia son calentadas por separado, es decir, cada una posee un sistema calefactor individual, lo cual permite operar bajo el principio de “balance nulo” de temperatura.

En efecto, el control de temperatura del sistema está dividido en dos bucles distintos; el primero de ellos controla la temperatura media, de forma que la temperatura de la muestra y de la referencia aumenta a cierta velocidad predeterminada permitiendo su registro y graficado en una computadora.

El segundo bucle realiza la operación del principio de “balance nulo”, el cual consiste en asegurar que si se llega a producir una diferencia de temperatura entre la muestra y la referencia, se pueda modificar inmediata y automáticamente la potencia de entrada a cada uno de los sistemas calefactores, esto con la finalidad de anular instantáneamente dicha diferencia, por lo que siempre se tendrá la certeza de que se mantienen ambos calefactores a la misma temperatura conforme avanza el barrido de temperatura, siendo la potencia eléctrica invertida proporcional al calor involucrado en el proceso endotérmico o exotérmico generado en la muestra en estudio.

La señal eléctrica producida es enviada a la computadora, donde es graficada en forma de un registro calorimétrico cuya área es proporcional al calor asociado al cambio de fase, descomposición, transición cristalina o cualquier otro fenómeno térmico que se presente en la celda de muestra. (8)

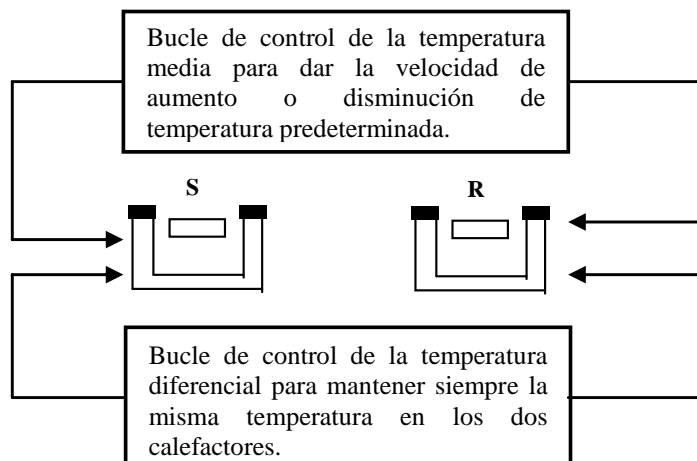


Figura 4 Representación esquemática de los bucles de control de temperatura del DSC

Las celdas de detección del DSC son dobles e independientes, construidas de una aleación Platino-Iridio, con resistencias calefactoras y sensores de temperatura integrados. La precisión del sistema es de $\pm 0.5\%$ y cuenta con una sensibilidad de 0.01 mW, con una exactitud en el control de temperatura de ± 0.1 K lo cual permite hacer determinaciones altamente confiables. (9)

Para mantener estable el bloque en el cual están soportados los sensores de medición, éste tiene acoplado un intercambiador de calor a través del cual circula etilenglicol con una temperatura de 278.15 K, el cual proviene de un baño a temperatura constante Lauda modelo RM6, con intervalo de operación de 253.15 K a 393.15 K, una precisión de ± 0.02 K en el control de temperatura y una capacidad de seis litros. Cabe señalar que el DSC7 utiliza flujo de nitrógeno de alta pureza con la finalidad de mantener una atmósfera inerte durante la realización de un experimento.

4.4.1. Medición de la entalpia y la temperatura de fusión utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Una sustancia en estado cristalino guarda una estructura bien definida, es decir, sus moléculas están colocadas de forma regular y ordenada gracias a enlaces intermoleculares, dichas moléculas vibran en torno a su posición de equilibrio. Si existe un aumento de temperatura, las vibraciones se incrementan, involucrando a su vez mayor energía en cada vibración, hasta alcanzar un punto de ruptura de los enlaces intermoleculares, en el cual las moléculas pueden deslizarse unas sobre otras y los grupos de átomos que las forman tienen la capacidad de rotar respecto a los enlaces que los unen. Este proceso físico se llama fusión ya que macroscópicamente hay un cambio de la fase sólida a fase líquida, y la temperatura a la que sucede este cambio físico, a una P determinada, se le denomina temperatura de fusión.

El equipo DSC7 tiene la capacidad de realizar un barrido lineal de temperatura sobre una muestra cristalina, es decir, que conforme va transcurriendo el tiempo va incrementándose la temperatura del sólido en condiciones controladas, creándose un registro calorimétrico de potencia calefactora requerida en función del tiempo. Si el cristal experimenta un cambio de fase como el descrito arriba, el calorímetro diferencial de barrido detecta el calor asociado al proceso y a través del programa Pyris genera un termograma, representado en la Figura 5, donde el área bajo la curva representa el cambio de entalpía asociado a la transformación física.

En un registro calorimétrico de este tipo, la fracción del material fundido en la muestra es proporcional al área parcial determinada a una cierta temperatura bajo la curva de fusión.

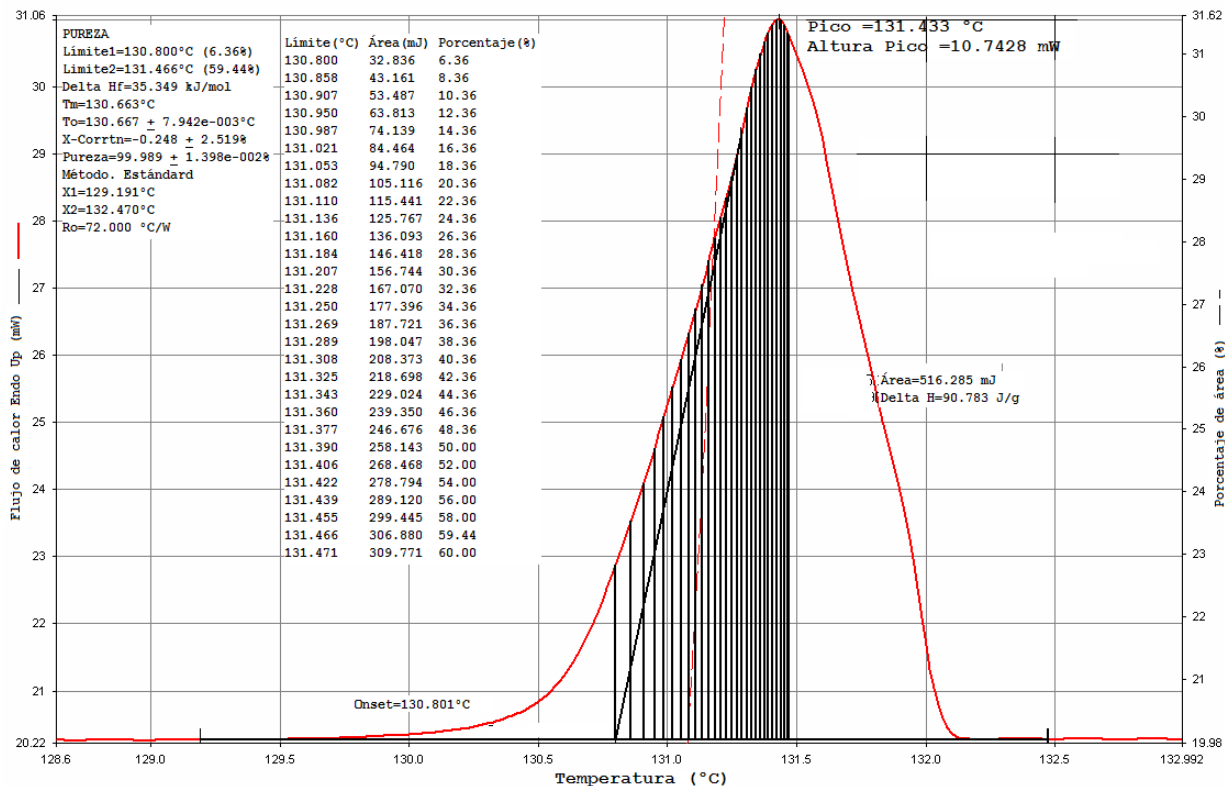


Figura 5 Curva de Fusión del pentaacetato de β-D-glucosa

La entalpía de fusión es la cantidad de energía necesaria, en forma de calor, para que un mol de sustancia en su temperatura de fusión cambie del estado sólido al estado líquido a presión constante.

Como se indicó en los párrafos anteriores, en un registro calorimétrico la entalpía de fusión es el área bajo la curva. Además, la entalpía de fusión es la diferencia entre la entalpía de formación del compuesto en la fase líquida y la entalpía de formación del mismo compuesto en fase sólida, lo que se puede representar de la siguiente manera:

$$\Delta_{fus}H_m^\circ = \Delta_fH_m^\circ(l) - \Delta_fH_m^\circ(s) \tag{7}$$

4.4.2. Determinación de pureza

En calorimetría diferencial de barrido, la pureza de la muestra tiene un efecto importante sobre la altura y la amplitud del pico de fusión, esto significa que una pequeña cantidad de impureza en la muestra afecta la definición de la señal mostrada en el registro calorimétrico. La pureza de las sustancias a analizar es fundamental en la obtención de datos termoquímicos, es por eso que se recurrió a la calorimetría diferencial de barrido para determinar ese parámetro.

La determinación de la pureza utilizando DSC está basada en el hecho de que la variación del punto de fusión de una sustancia impura con respecto al de la misma sustancia pura, $T_0 - T_m$, viene dado por la ecuación de van't Hoff para el proceso de fusión:

$$T_0 - T_m = \frac{RT_0^2 X_2}{\Delta_{fus}H_m^0} \quad (8)$$

en donde $\Delta_{fus}H_m^0$ es la entalpía de fusión en J mol^{-1} , R es la constante de los gases en unidades de $\text{J K}^{-1} \text{mol}^{-1}$, X_2 es la fracción molar de la impureza, T_0 es la temperatura de fusión de la sustancia completamente pura y T_m es la temperatura de fusión de la sustancia impura.

Durante el experimento calorimétrico, la fracción de muestra fundida, f , puede expresarse en términos de las temperaturas de fusión de la sustancia pura y la temperatura de fusión de la sustancia impura de la siguiente manera:

$$f = \frac{T_0 - T_m}{T_0 - T_s} \quad (9)$$

donde T_s representa la temperatura a la cual una fracción dada de la muestra se funde, y puede despejarse como:

$$T_s = T_0 - \left(\frac{T_0 - T_m}{f} \right) \quad (10)$$

sustituyendo la ecuación de van't Hoff (8) en la ecuación (10), tenemos la siguiente expresión:

$$T_s = T_0 - \left[\frac{RT_0^2 X_2}{\Delta_{fus} H_m^0} \right] * \frac{1}{f} \quad (11)$$

Por lo tanto la representación gráfica de T_s frente a $(1/f)$ debe ser una línea recta, como la de la Figura 6, cuya pendiente es igual a $\left[\frac{RT_0^2 X_2}{\Delta_{fus} H_m^0} \right]$. También en este gráfico, T_0 es el valor de la intersección de la recta con el eje de las ordenadas, y corresponde a la temperatura de la muestra completamente pura. A este gráfico lineal se le conoce como gráfico de van't Hoff para la fusión. (8)- (10)

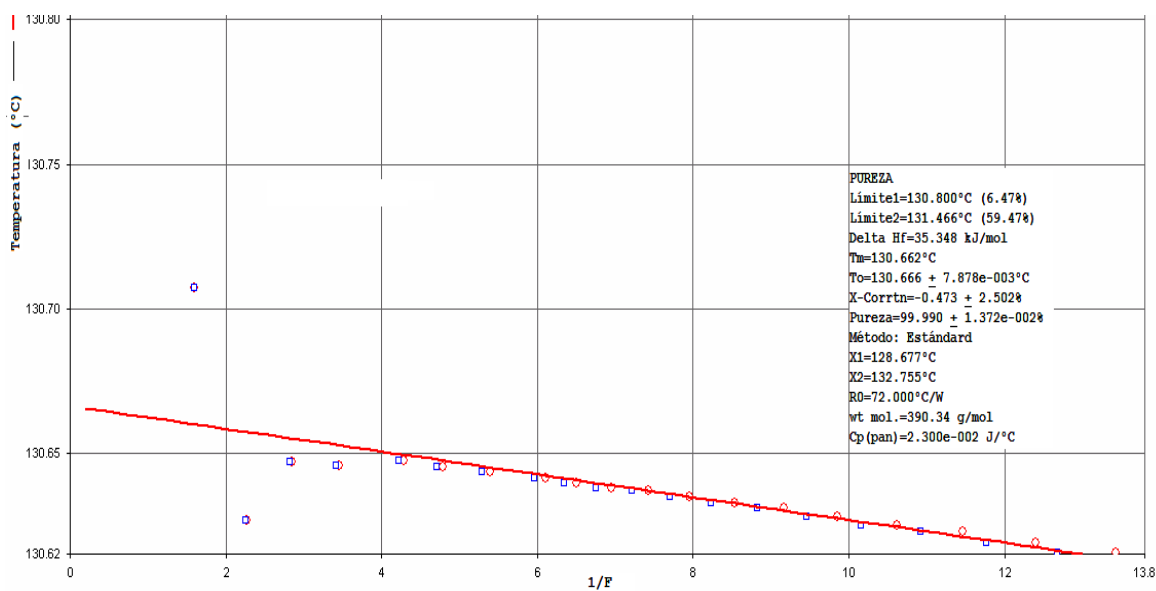


Figura 6 Gráfico de van't Hoff para la fusión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para este estudio se utilizaron dos derivados permetilados de carbohidratos: 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo (**GTP**), 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo (**MP**); dos peracetilados: 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido de acetilo (**b-GP**), 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo (**a-GP**); y el acetato de metilo. El derivado permetilado de galactosa es un derivado de la fucosa. De acuerdo a cálculos computacionales y resultados experimentales genera una interacción CH/ π cuando se mezcla con un compuesto aromático. (14) El segundo derivado elegido, **2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo**, un derivado de la manosa, carece de la geometría necesaria para experimentar la interacción CH/ π entre los H del anillo de piranosa y el derivado aromático empleado, por tal motivo sirve como una referencia para determinar el valor de la interacción CH- π . Debido a que los carbohidratos libres tienen una región polar (por los grupos hidroxilo), son insolubles en los disolventes aromáticos elegidos.

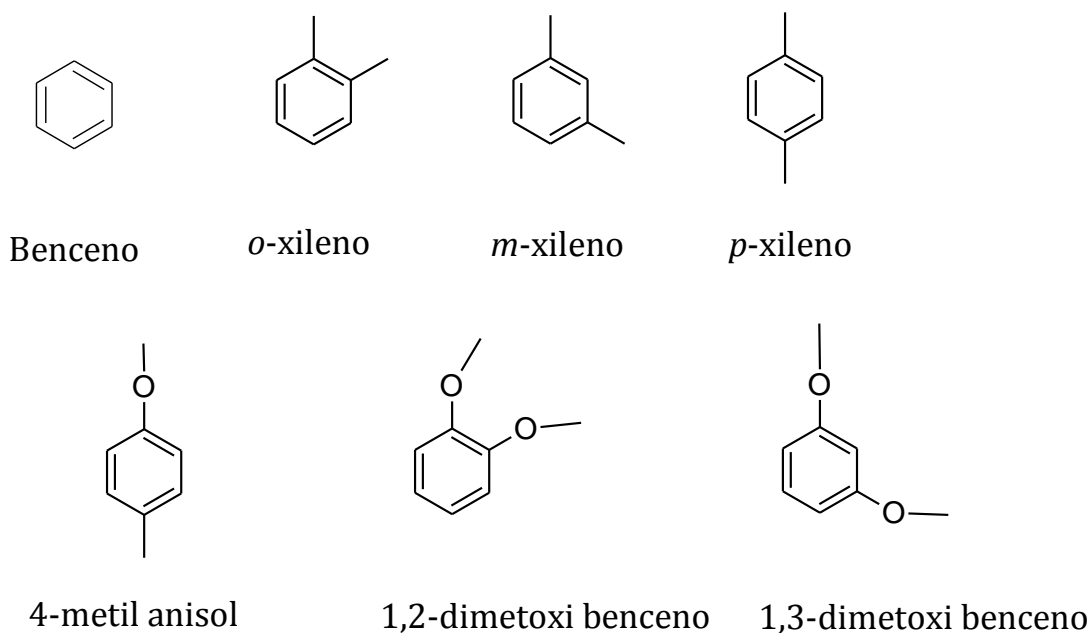
5.1 Interacción CH/ π

La energía asociada a la interacción CH/ π es menor que la energía asociada a los puentes de hidrógeno convencionales. Por lo tanto, el uso de compuestos aromáticos, capaces de formar puentes de hidrógeno convencionales, para determinar la interacción CH/ π no es adecuado en este caso, debido al posible enmascaramiento de la interacción de interés. Así, los disolventes aromáticos, como el benceno y los derivados antes mencionados son de gran utilidad para determinar la existencia de la interacción CH/ π .

Para poder utilizar al benceno y sus derivados fue necesario modificar los piranósidos, a través de la permetilación con yoduro de metilo en las condiciones indicadas en el Esquema 3. Esta reacción cambia el carácter anfifílico del carbohidrato al modificar los grupos hidroxilo. El uso de grupos metilo se considera apropiado debido a que no representan grandes problemas por volumen estérico. Las modificaciones se realizaron partiendo de los piranósidos de metilo.

La metodología seguida en este trabajo, permetilación y purificación de los carbohidratos resultó en la obtención de *2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo* (en adelante referido como: **MP**) y *2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo* (será referido como: **GTP**) con elevada pureza, estrictamente necesaria para los experimentos calorimétricos, 99.7% y 99.8%, respectivamente, determinada por cromatografía de gases.

Los disolventes utilizados en las disoluciones se esquematizan a continuación:



Esquema 5 Disolventes aromáticos sustituidos con grupos electrodonadores

Con base en los reportes bibliográficos, donde se evidencia con los corrimientos químicos en ^1H -RMN hacia campo alto, que experimentan las señales específicas para cada protón del anillo de pirano después de la adición de un compuesto aromático, la existencia de interacciones CH/ π , (14) se decidió evaluar el efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno de las moléculas MP y GTP; además de acetato de metilo y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α/β -D-glucopiranosido de acetilo (a-GP y b-GP, respectivamente).

En la Figura 7 y en las Tablas 1 y 2 se puede observar claramente el efecto sobre los átomos de hidrógeno del anillo de la molécula GTP, que tienen corrimientos químicos evidentes hacia campo alto debidos a la adición paulatina de benceno. Esto es indicativo de que se encuentran directamente bajo la zona de protección de la nube electrónica del benceno, contrario a lo que sucede con los hidrógenos del anillo de la molécula MP que denotan un marcado desplazamiento hacia campo bajo y por ende se confirma que se encuentran en la zona de desprotección del anillo de benceno.

En la Figura 8 también se observa, en ambos compuestos, un efecto protector sobre los grupos metilo, por parte del benceno, este punto es de vital importancia y será de gran utilidad para explicar posteriormente las diferencias energéticas determinadas.

En las Tablas 1 y 2 se presentan los correspondientes valores numéricos de las gráficas ilustradas en las Figuras 7 y 8, los cuales muestran el efecto que tiene la adición consecutiva de benceno sobre el desplazamiento químico de los diferentes átomos de hidrógeno. Para el compuesto GTP, con excepción del átomo de hidrógeno en la posición 2, los demás protones del

anillo piránico sufren un efecto protector por parte del disolvente. Este efecto se puede evaluar a través de la siguiente diferencia:

$$\Delta\delta = \delta_{CDCl_3} (ppm) - \delta_{C_6D_6} (ppm) \quad (12)$$

Se toma como desplazamiento químico inicial, el desplazamiento que presentan los protones en la solución con cloroformo puro. El desplazamiento de las señales se modifica lentamente conforme aumenta la proporción de benceno en la mezcla; de este modo tenemos que un valor positivo de $\Delta\delta$, para la molécula GTP, significa un efecto de protección de los protones anulares.

Así, en el compuesto GTP, el hidrógeno H3 corre de 3.14 a 2.97 ppm, el H4 se desplaza desde 3.65 hasta 3.44 ppm y el H5 va desde 3.49 hasta 3.32 ppm. También es importante recalcar el efecto protector del benceno sobre los protones en posición 6 del compuesto GTP.

Este comportamiento es totalmente contrario al efecto que el mismo disolvente tiene en los mismos átomos de hidrógeno del compuesto MP; es decir, el H3 se desplaza desde 3.49 a 3.69 ppm, el H4 va desde 3.32 hasta 3.74 ppm y finalmente H5 corre desde 3.55 hasta 3.80 ppm. El efecto del disolvente no es protector para el compuesto MP.

Los grupos metilo están expuestos al disolvente y en ambos casos sufren un efecto protector, de acuerdo a lo observado en las gráficas, que aumenta conforme aumenta la concentración de benceno en la solución.

Estos resultados soportan las observaciones previamente reportadas y confirman la presencia de una interacción CH/ π entre el benceno y el carbohidrato GTP, donde el benceno sustituye al cloroformo en la primera esfera de solvatación.

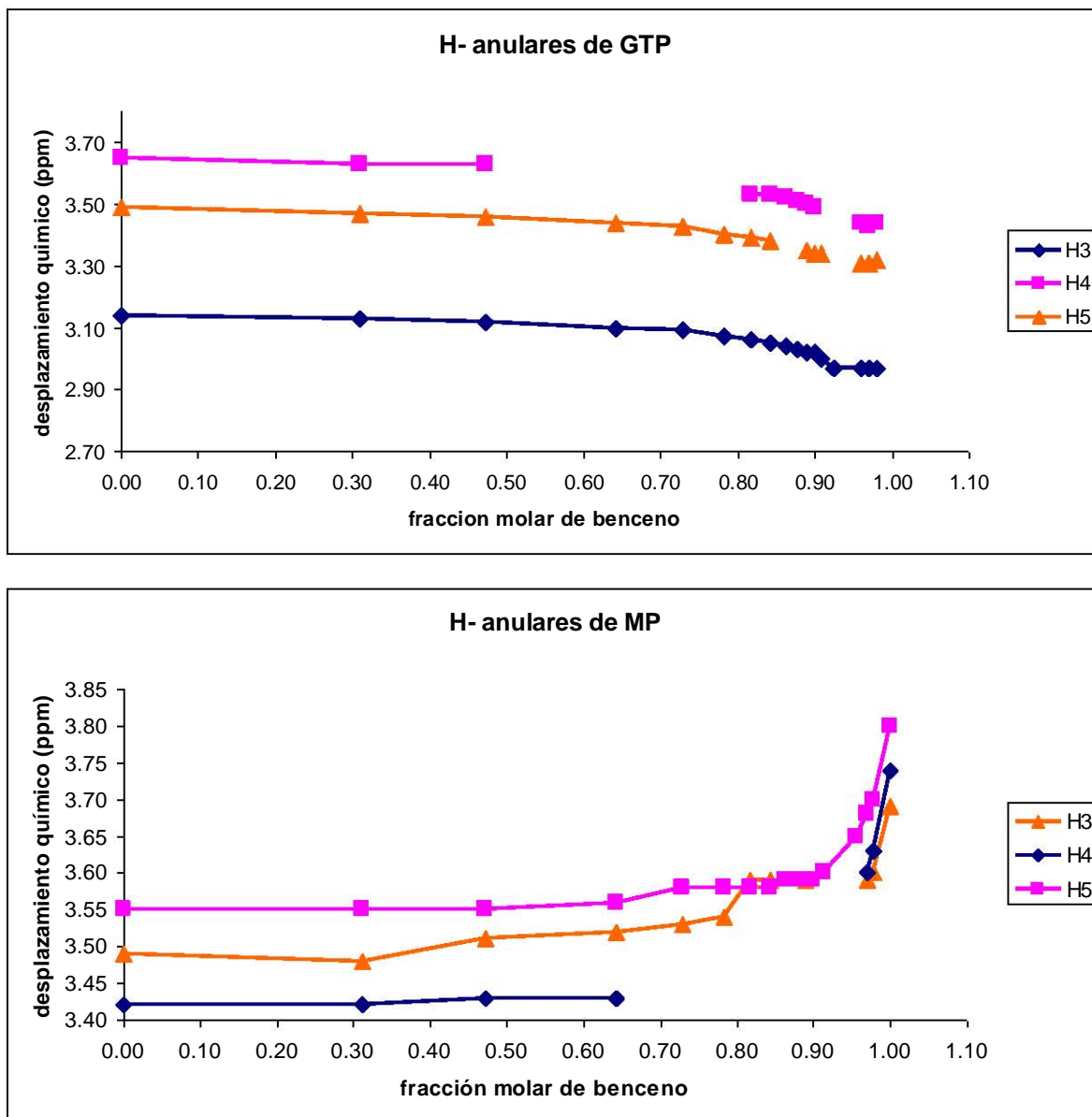


Figura 7 Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de los protones anulares de los piranósidos permetilados

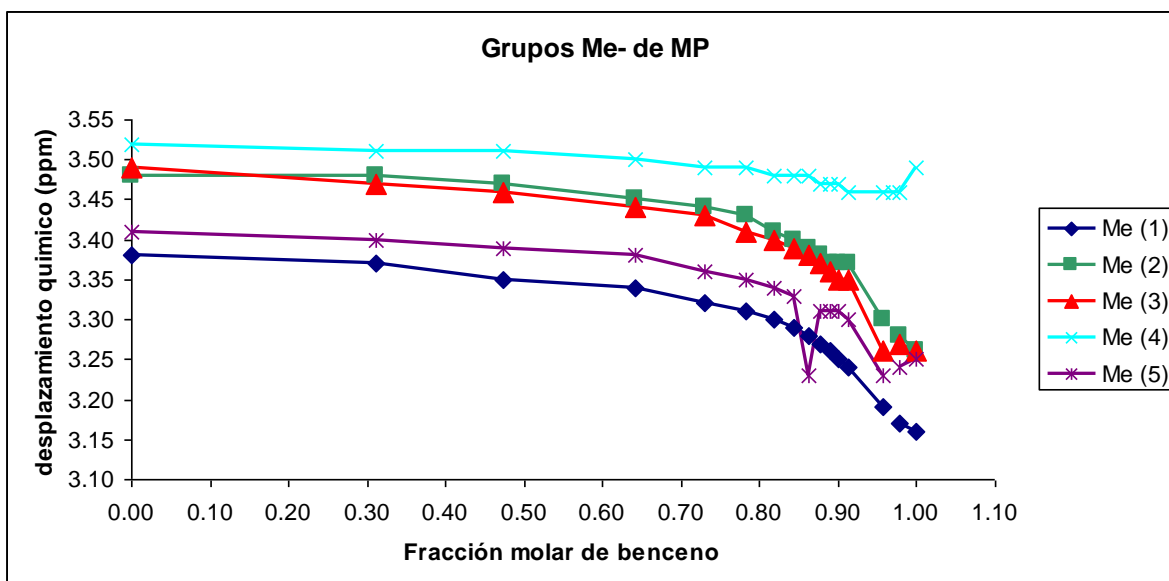
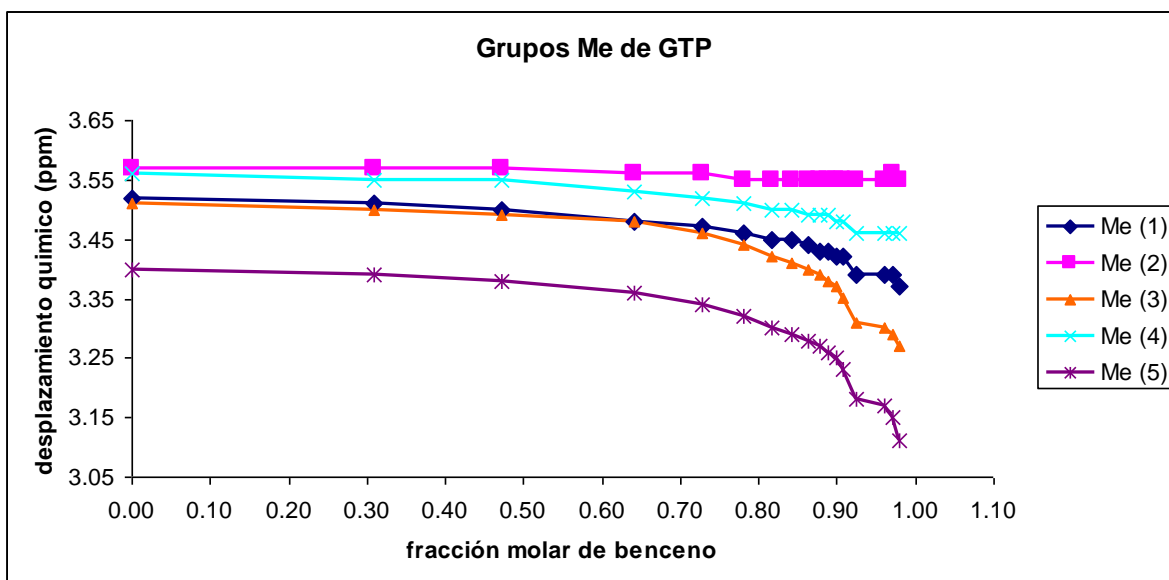
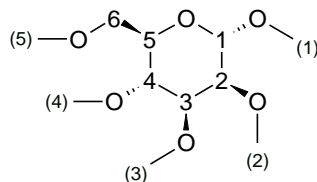


Figura 8 Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de los protones metílicos de los piranósidos permetilados

Tabla 1 Titulación Anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo. Efecto del benceno sobre el

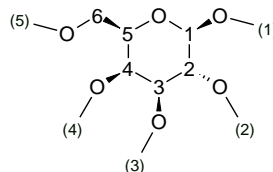
desplazamiento químico de 1H-RMN



Frac. mol de benceno	[mol:mol] (a)	H1 (d)	H2 (dd)	H3 (dd)	H4 (t)	H5 (ddd)	H6a (dd)	H6b (dd)	Me (1) (s)	Me(2) (s)	Me (3) (s)	Me (4) (s)	Me (5) (s)
0.00	0	4.79	3.56	3.49	3.42	3.55	3.59	3.59	3.38	3.48	3.49	3.52	3.41
0.312	1:0.5	4.78	3.56	3.48	3.42	3.55	3.58	3.58	3.37	3.48	3.47	3.51	3.40
0.473	1:1	4.78	3.55	3.51	3.43	3.55	3.57	3.57	3.35	3.47	3.46	3.51	3.39
0.642	1:2	4.77	3.55	3.52	3.43	3.56			3.34	3.45	3.44	3.50	3.38
0.729	1:3	4.76	3.53	3.53		3.58	3.57	3.57	3.32	3.44	3.43	3.49	3.36
0.782	1:4	4.75	3.53	3.54		3.58	3.56	3.56	3.31	3.43	3.41	3.49	3.35
0.818	1:5	4.74	3.52	3.59		3.58	3.55	3.55	3.30	3.41	3.40	3.48	3.34
0.843	1:6	4.74	3.52	3.59		3.58			3.29	3.40	3.39	3.48	3.33
0.863	1:7	4.73	3.50			3.59			3.28	3.39	3.38	3.48	3.23
0.878	1:8	4.72	3.48			3.59	3.55		3.27	3.38	3.37	3.47	3.31
0.890	1:9	4.72	3.49	3.59		3.59	3.55	3.50	3.26	3.37	3.36	3.47	3.31
0.900	1:10	4.72	3.47			3.59	3.55		3.25	3.37	3.35	3.47	3.31
0.913	1:12.5	4.71	3.47			3.60	3.55		3.24	3.37	3.35	3.46	3.30
0.956	1:25.1	4.69	3.44			3.65		3.54	3.19	3.30	3.26	3.46	3.23
0.970	1:37.7	4.69	3.44	3.59	3.60	3.68	3.58	3.55				3.46	
0.977	1:50.2	4.69	3.45	3.60	3.63	3.70	3.58	3.55	3.17	3.28	3.27	3.46	3.24
1.00	1:100	4.70	3.48	3.69	3.74	3.80	3.67	3.62	3.16	3.26	3.26	3.49	3.25

(a) relación molar [2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo:benceno], el carbohidrato (1 mol= 0.449 mmol) se disolvió en CDCl₃ y posteriormente se adicionó C₆D₆ en las proporciones indicadas.

Tabla 2 Titulación Anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-galctopiranosido de metilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de ¹H-RMN



Frac. mol de benceno	[mol:mol]	Hb	H2	H3	H4	H5	H6a	H6b	Me(1)	Me (2)	Me (3)	Me (4)	Me (5)
	(a)	(d)	(dd)	(dd)	(dd)	(ddd)	(dd)	(dd)	(s)	(s)	(s)	(s)	(s)
0.00	0.00	4.15	3.30	3.14	3.65	3.49	3.59	3.62	3.52	3.57	3.51	3.56	3.40
0.309	1:0.50	4.14	3.30	3.13	3.63	3.47	3.52	3.61	3.51	3.57	3.50	3.55	3.39
0.472	1:1	4.13	3.31	3.12	3.63	3.46	3.52	3.60	3.50	3.57	3.49	3.55	3.38
0.641	1:2	4.12	3.31	3.10		3.44	3.50	3.59	3.48	3.56	3.48	3.53	3.36
0.728	1:3	4.11	3.32	3.09		3.43	3.49	3.59	3.47	3.56	3.46	3.52	3.34
0.781	1:4	4.11	3.33	3.07		3.40	3.48	3.57	3.46	3.55	3.44	3.51	3.32
0.817	1:5	4.10	3.34	3.06	3.53	3.39	3.47	3.57	3.45	3.55	3.42	3.50	3.30
0.843	1:6	4.10	3.34	3.05	3.53	3.38	3.47	3.57	3.45	3.55	3.41	3.50	3.29
0.862	1:7	4.09	3.36	3.04	3.52		3.46	3.56	3.44	3.55	3.40	3.49	3.28
0.877	1:8	4.09		3.03	3.51		3.46	3.56	3.43	3.55	3.39	3.49	3.27
0.889	1:9	4.09	3.38	3.02	3.50	3.35	3.45	3.56	3.43	3.55	3.38	3.49	3.26
0.899	1:10	4.08	3.37	3.02	3.49	3.34	3.45	3.56	3.42	3.55	3.37	3.48	3.25
0.908	1:12	4.08	3.39	3.00		3.34	3.44	3.56	3.42	3.55	3.35	3.48	3.23
0.925	1:25	4.08		2.97					3.39	3.55	3.31	3.46	3.18
0.960	1:36	4.09	3.50	2.97	3.44	3.31	3.45	3.57	3.39	3.55	3.30	3.46	3.17
0.971	1:51	4.10	3.53	2.97	3.43	3.31	3.46	3.59	3.39	3.56	3.29	3.46	3.15
0.979	1:100	4.13	3.65	2.97	3.44	3.32	3.48	3.63	3.37	3.55	3.27	3.46	3.11

(a) relación molar [2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-galactopiranosido de metilo:benceno], el carbohidrato (1 mol= 0.432 mmol) se disolvió en CDCl₃ y posteriormente se adicionó C₆D₆ en las proporciones indicadas.

A partir de los resultados discutidos, podemos afirmar dos hechos importantes: Primero, que aun cuando las interacciones disolvente-grupo CH₃- son similares para ambos compuestos, se observan diferencias importantes en el desplazamiento químico para los H anulares de ambos compuestos por las interacciones soluto-disolvente, diferencias que se pueden atribuir a la interacción CH/ π adicional en el compuesto GTP la cual está ausente en el compuesto MP. Segundo, que la solvatación del compuesto GTP no es aleatoria, a pesar de no existir una cavidad o un sitio preorganizado.

Tabla 3 Diferencias en el desplazamiento químico en ¹H-RMN de los compuestos permetilados debidas al efecto del benceno

MP				GTP			
# de H	δ_{CDCl_3}	$\delta_{C_6D_6}$	$\Delta\delta = \delta_{CDCl_3} - \delta_{C_6D_6}$	# de H	δ_{CDCl_3}	$\delta_{C_6D_6}$	$\Delta\delta = \delta_{CDCl_3} - \delta_{C_6D_6}$
	(ppm)	(ppm)			(ppm)	(ppm)	
H ₁	4.79	4.70	0.09	H ₁	4.15	4.13	0.02
H ₂	3.56	3.48	0.08	H ₂	3.30	3.65	-0.35
H ₃	3.49	3.69	-0.20	H ₃	3.14	2.97	0.17
H ₄	3.42	3.74	-0.32	H ₄	3.65	3.44	0.21
H ₅	3.55	3.80	-0.25	H ₅	3.49	3.32	0.17
H _{6a}	3.59	3.67	-0.08	H _{6a}	3.59	3.48	0.11
H _{6b}	3.59	3.62	-0.03	H _{6b}	3.62	3.63	-0.01
Me ₁	3.38	3.16	0.22	Me ₁	3.52	3.37	0.15
Me ₂	3.48	3.26	0.22	Me ₂	3.57	3.55	0.02
Me ₃	3.49	3.26	0.23	Me ₃	3.51	3.27	0.24
Me ₄	3.52	3.49	0.03	Me ₄	3.56	3.46	0.10
Me ₅	3.41	3.25	0.16	Me₅	3.40	3.11	0.29

Para verificar el desplazamiento de los grupos metilo equivalentes de ambos carbohidratos, se realizaron los mismos experimentos pero se utilizó una molécula más sencilla:

acetato de metilo (Figura 9 y Tabla 4). Como resultado, se comprueba el mismo efecto observado en piranosidos permetilados y de acuerdo con la Tabla 3, se destaca que las diferencias en el desplazamiento químico de los protones de ambos grupos metilo, ocasionadas por la adición paulatina de benceno, en algunos casos, son similares.

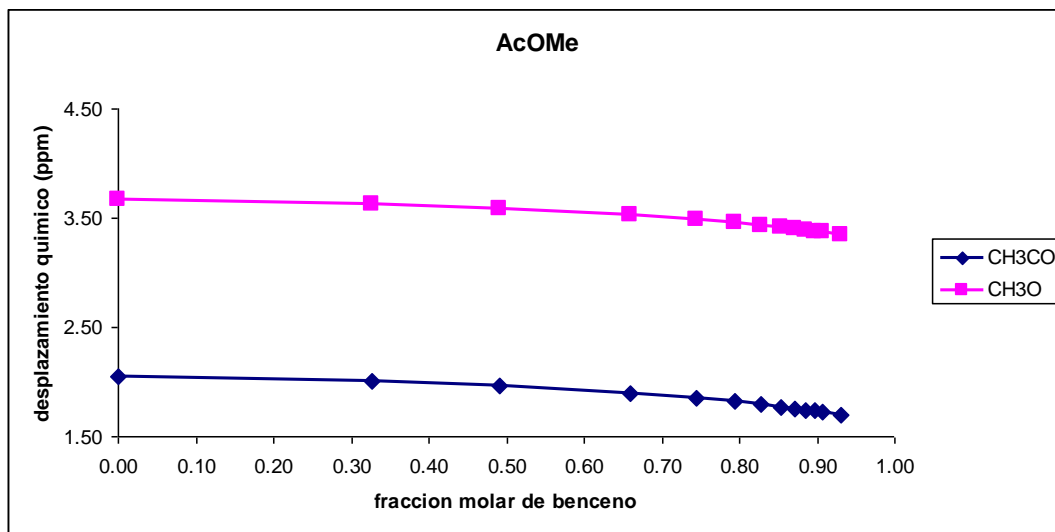


Figura 9 Efecto del benceno en el desplazamiento químico de los grupos metilo del acetato de metilo

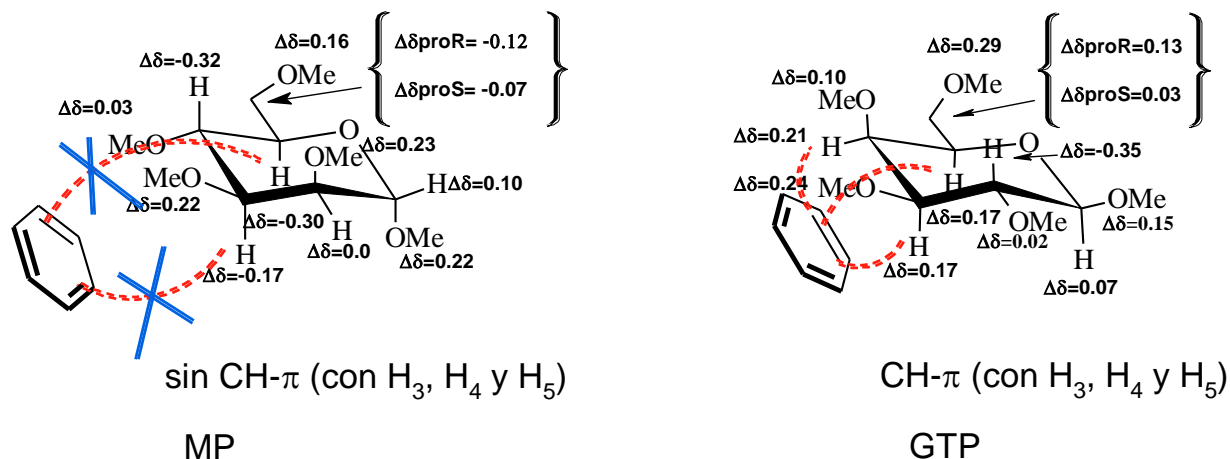
Tabla 4 Titulación anisotrópica de acetato de metilo. Efecto del benceno sobre el desplazamiento químico de ^1H -RMN

(mol:mol)	$\delta \text{CH}_3\text{CO}$	$\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3(\text{ppm})} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6(\text{ppm})}$	$\delta \text{CH}_3\text{O}$	$\Delta\delta = \delta_{\text{CDCl}_3(\text{ppm})} - \delta_{\text{C}_6\text{D}_6(\text{ppm})}$
1:0	2.052	0.000	3.663	0.000
1:0.5	2.005	0.047	3.620	0.043
1:1	1.964	0.088	3.584	0.079
1:2	1.900	0.152	3.526	0.137
1:3	1.851	0.201	3.482	0.181
1:4	1.817	0.235	3.451	0.212
1:5	1.790	0.262	3.428	0.235
1:6	1.769	0.283	3.410	0.253
1:7	1.753	0.299	3.396	0.267
1:8	1.743	0.309	3.388	0.275
1:9	1.733	0.319	3.379	0.284
1:10	1.722	0.330	3.369	0.294
500 μL	1.695	0.357	3.347	0.316

La Figura 7 ilustra el corrimiento químico paulatino de los protones del anillo de los carbohidratos cuando se adiciona benceno. Estos resultados soportan el modelo propuesto en el Esquema 6, donde una molécula de benceno se aproxima selectivamente a la cara α del compuesto GTP. Los valores negativos para $\Delta\delta$, resultantes de aplicar la ecuación 12, implican la desprotección de los protones, compuesto GTP; mientras que valores positivos para $\Delta\delta$ indican la protección de los protones, compuesto MP; esto es más evidente en la Tabla 3.

En el Esquema 6 se observa que el benceno protege la región de las posiciones 3-6 de GTP. La molécula de benceno está orientada hacia los grupos -CH- enlazados en las posiciones 3,

4 y 5 del anillo de piranósido como consecuencia del reconocimiento molecular. Sin embargo, también se puede apreciar que los otros grupos $-CH_3-$ y $-CH_2-$ también son afectados por la nube π del benceno. Con base en estas observaciones proponemos que GTP es rodeado por 3 moléculas de benceno.



Esquema 6 Efecto de la interacción CH/π sobre el desplazamiento químico (ppm) de los compuestos MP y GTP, diferencias calculadas con la ecuación (12)

Es importante diferenciar entre el reconocimiento y los procesos de solvatación. El primero implica solamente una molécula de benceno asociada con una región específica del carbohidrato a través de interacciones débiles. El último incluye diferentes moléculas de disolvente aleatoriamente asociadas con el carbohidrato.

El arreglo supramolecular propuesto para GTP, no ocurre en el compuesto MP, por lo que se concluye que éste experimenta solvatación, las moléculas de benceno solo rodean al

carbohidrato (valores $\Delta\delta$ menores, si el benceno interacciona directamente con el carbohidrato los valores $\Delta\delta$ son mayores), pero no reconocimiento. Lo dicho anteriormente se fundamenta en el hecho de que el protón más protegido en la posición 6 es el pro-R que tiende a orientarse en dirección al anillo bencénico. La presencia de un grupo metoxilo ecuatorial en la posición 4 del compuesto MP evita que el benceno tenga acceso a la cara α del carbohidrato y así pueda interaccionar con los protones anulares respectivos. También se observa que el grupo metoxilo en C4 evita el arreglo del patrón de tres enlaces C-H anulares en la misma dirección, de acuerdo con los antecedentes bibliográficos es la condición requerida para la existencia de la interacción CH/ π . (1)

5.2 Estudio calorimétrico

De acuerdo con el estudio por ^1H -RMN, la configuración diferente del centro estereogénico en posición 4 y los cambios más importantes en el desplazamiento químico de los protones que se encuentran en la cara α de los carbohidratos, podemos afirmar que el compuesto MP no puede presentar la interacción CH/ π adicional entre los protones anulares y el benceno, mientras que el compuesto GTP sí presenta esta interacción (Esquema 6).

Con estas observaciones, se diseñó un estudio calorimétrico para determinar la energía asociada con la interacción CH/ π .

Las Tablas 5, 6 y 10 contienen los datos de la entalpía de solvatación, $\Delta_{sol}H$, de disolución, $\Delta_{dis}H$, y de vaporización, $\Delta_{vap}H$, de los compuestos MP, GTP y acetato de metilo,

respectivamente, de acuerdo al modelo de solvatación de la Figura 1. Las entalpías de disolución se determinaron vía calorimetría Calvet y las entalpías de cambio de fase se midieron con el calorímetro diferencial de barrido.

Cada uno de los valores de $\Delta_{dis}H$ es el promedio de al menos 3 determinaciones para cada disolvente realizadas en las mismas condiciones. La incertidumbre es la desviación estándar de la media. Los datos a partir de los cuales se obtienen los respectivos promedios se presentan a detalle en el anexo de este trabajo.

En el caso de la incertidumbre asociada a $\Delta_{sol}H$, ésta se define como la incertidumbre asociada al proceso de disolución elevada al cuadrado más la incertidumbre del proceso de vaporización/sublimación también elevada al cuadrado, y finalmente se calcula la raíz cuadrada de ésta suma.

Los disolventes utilizados para este trabajo son 1-metoxi-4-metilbenceno (**1**), o-xileno (**2**), m-xileno (**3**), p-xileno (**4**), 1,2-dimetoxibenceno (**5**), 1,3-dimetoxibenceno (**6**) y benceno (**7**). En todos los casos, los sustituyentes aumentan la densidad electrónica al anillo de benceno. Por consiguiente, si la densidad electrónica del benceno se incrementara en el sentido de Hammett, la interacción sería más fuerte si esta tuviera un carácter de puente de hidrógeno.

El término $\Delta_{dis}H$ es la cantidad de calor necesaria para romper las interacciones moleculares del compuesto MP, de naturaleza líquida, y la red cristalina del compuesto GTP a presión constante; y la posterior asociación de las moléculas de cada uno de estos compuestos con las moléculas de disolvente, dando lugar a una esfera de solvatación. Esto explica la magnitud de los valores, los cuales son considerablemente mayores para el sólido que para el

líquido. Un valor positivo para $\Delta_{dis}H$ indica que el compuesto es más estable en estado sólido, que en solución, puesto que el rompimiento de la estructura cristalina requiere energía.

Tabla 5 Entalpías de solvatación de MP en diferentes disolventes (1:10, mol:mol).

Determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15K

DISOLVENTE	$\Delta_{vap}H$ (333.15 K) (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{dis}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{solv}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)
Benceno	75.18	-3.65	-78.826 ± 3.898
<i>o</i> -xileno	75.18	0.94	-72.554 ± 3.899
<i>m</i> -xileno	75.18	2.62	-72.181 ± 3.897
<i>p</i> -xileno	75.18	2.63	-72.552 ± 3.897
4-metil anisol	75.18	0.94	-74.239 ± 3.898
1,3-dimetoxi benceno	75.18	-1.07	-76.246 ± 3.899
1,2-dimetoxi benceno	75.18	1.06	-74.122 ± 3.897

En la Tabla 5 se observa que para el compuesto MP, la disolución es exotérmica, en 1,3-dimetoxibenceno y benceno; es decir MP es más estable en estos disolventes.

En la serie de los xilenos (2-4) la disolución es marcadamente endotérmica, siendo más estable la disolución de MP con *o*-xileno; mientras que los compuestos oxigenados presentan el siguiente orden creciente de estabilidad (al disolver a MP): 1,3-DMB < 4-metil anisol < 1,3- DMB; es decir, el $\Delta_{dis}H$ paso de ser endotérmico a exotérmico.

Tabla 6 Entalpías de solvatación de GTP en diferentes disolventes (1:10, mol:mol).

Determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15K

DISOLVENTE	$\Delta_{vap}H$ (313.15 K) (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{dis}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{solv}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)
Benceno	105.25	16.54	-88.708 ± 5.536
<i>o</i> -xileno	105.25	18.91	-86.331 ± 5.536
<i>m</i> -xileno	105.25	19.39	-85.859 ± 5.547
<i>p</i> -xileno	105.25	19.25	-85.996 ± 5.564
4-metil anisol	105.25	17.39	-87.854 ± 5.655
1,3-dimetoxi benceno	105.25	16.18	-89.070 ± 5.545
1,2-dimetoxi benceno	105.25	17.97	-87.275 ± 5.582

En la disolución del compuesto GTP todos los valores de $\Delta_{dis}H$ son endotérmicos, debido a la naturaleza cristalina del carbohidrato, pero el orden de estabilidad creciente de las soluciones es *m*-xileno < *p*-xileno < *o*-xileno < 1,2-DMB < 4-metil anisol < benceno < 1,3-DMB.

Retomando la introducción de esta tesis, tenemos que el proceso de solvatación es global; es decir, incluye todas las interacciones posibles entre los compuestos participantes y entre los mismo compuestos per se (soluto-soluto, soluto-disolvente, disolvente-disolvente, etc.) Así, para el compuesto GTP se tiene lo siguiente: una vez que se rompe la red cristalina, el disolvente interactúa con el soluto y es posible evaluar el intercambio de energía en este proceso.

La energía de solvatación, $\Delta_{solv}H$, del compuesto MP indica un sistema más favorecido para la solución con benceno con un valor de $-78.8 \pm 3.9 \text{ kJ mol}^{-1}$, en relación con los otros disolventes aromáticos. Este complejo es seguido en términos de estabilidad, debida al proceso de solvatación, por los sistemas con disolventes oxigenados siendo los menos estables aquellos formados con los isómeros de xileno. De dichos isómeros las interacciones más estables son aquellas formadas con los isómeros *o*- y *p*-xileno. La diferencia energética entre el sistema menos estable y el más estable es de 6.6 kJ mol^{-1} .

De manera importante, los valores del $\Delta_{solv}H$ son considerablemente mayores para el compuesto GTP ($-88.7 \pm 5.5 \text{ kJ mol}^{-1}$) que para MP. Para GTP como soluto en cambio, el benceno no forma el sistema más estable. De hecho el sistema más estable es el formado con el 1,3-dimetoxibenceno (Tabla 6). Los xilenos contribuyen en menor medida a la estabilidad, aunque es el *o*-xileno el que contribuye más a la estabilización con el valor energético de solvatación más bajo. La diferencia energética entre los extremos es de 3.2 kJ mol^{-1} .

Al relacionar la diferencia energética entre los compuestos GTP y MP con los resultados observados por ^1H -RMN, proponemos que esta se debe principalmente a la energía de la interacción CH/ π . Esta diferencia se puede estimar a través de la ecuación (13)

$$\text{energía CH}/\pi = \Delta_{solv}H_m^0(GTP) - \Delta_{solv}H_m^0(MP) \quad (13)$$

Es posible tomar en cuenta que el término $\Delta_{solv}H_{(MP)}$ incluye solamente las interacción entre los grupos metilo y el disolvente, mientras que el término $\Delta_{solv}H_{(GTP)}$ incluye también la interacción CH/ π (debida al reconocimiento); por lo tanto, la interacción entre los carbohidratos y el benceno resulta en una energía CH/ π de 9.9 kJ mol^{-1} .

Las interacciones carbohidrato-compuesto aromático han sido estudiadas ampliamente utilizando métodos computacionales, donde los valores de energía resultantes oscilan entre 10.5 y 20.9 kJ mol⁻¹ cuando se utiliza el método MP2. Los cálculos utilizando el método Hartree-Fock y funcionales híbridos describen interacciones pequeñas y hasta repulsivas. (50), (51), (52) Por tal motivo también es muy importante contar con el valor experimental de referencia (Tabla 7) de 9.9 kJ mol⁻¹, como referencia para comparar los valores teóricos disponibles. (14)

Por otra parte, se esperaba que los sustituyentes electrodonadores incrementaran la energía de interacción debido a su capacidad donadora hacia el anillo. Sin embargo, los xilenos producen interacciones estabilizantes (13.78 kJ mol⁻¹ para o-xileno, 13.44 para p-xileno y 13.68 para m-xileno) similares con respecto a los éteres (13.15 kJ mol⁻¹ para 1,2-DMB y 12.82 kJ mol⁻¹ para 1,3-DMB). El 4-metil-anisol produce una energía de CH/ π de 13.62 kJ mol⁻¹, similar a la del m-xileno. Por lo tanto, la densidad electrónica no parece ser un factor determinante en la fuerza y/o existencia de la interacción CH/ π .

Las diferencias expresadas en la Tabla 7, resultado de la ecuación 13, evidencia que los derivados bencénicos con grupos más electrodonadores no necesariamente producen las interacciones más estabilizantes, pues el 1,3-DMB, con un donador más fuerte CH₃O-, presenta un efecto entálpico más débil con respecto, por ejemplo, al m-xileno, en contraste con la sugerencia previa. (14)

Tabla 7 Diferencias energéticas para CH/π presente en el compuesto GTP y ausente en el compuesto MP

energía $CH/\pi = \Delta_{solv}H_m^0 (GTP) - \Delta_{solv}H_m^0 (MP)$ (kJ)	DISOLVENTE
13.62	4-metil-anisol
13.78	o-xileno
13.44	p-xileno
13.68	m-xileno
13.15	1,2-DMB
12.82	1,3-DMB
9.88	Benceno

Estos resultados manifiestan que, el término entálpico es una contribución relevante en el proceso de reconocimiento carbohidrato-compuesto aromático. También, de acuerdo a reportes previos, (53) se tiene que a una T constante de 303 K, siendo la supramolécula benceno-carbohidrato, el término entrópico sería el mismo que el término entálpico cuando este alcanza un valor de 32.67 kJ mol⁻¹. El valor final para la interacción sería el balance entre ambos términos, y también ha sido ya descrito. (7) No obstante, las contribuciones entrópicas evaluadas por medio de técnicas de RMN deben interpretarse cuidadosamente, por ejemplo, en moléculas pequeñas su contribución al equilibrio conformacional es muy alta y esto no puede explicarse de manera sencilla. (54) Sin embargo, los valores tan elevados no han sido cuestionados en otros procesos asociados con las proteínas donde se han utilizado las mismas técnicas. Por lo tanto, las entropías elevadas pueden deberse a eventos directamente

relacionados con la determinación experimental per se y no representarían realmente al fenómeno físico.

En este trabajo también se utilizó el modelo propuesto por Berry, Rice y Ross (ecuación 14) para comparar los valores de energía de interacción obtenidos a través del modelo de solvatación de la Figura 1. (55)

$$E_{1,2} = \left(\frac{\Delta_{dis}E}{Z} \right) + \frac{1}{2} (E_{1,1} + E_{2,2}) \quad (14)$$

Esta aproximación asocia el valor energético para el proceso de disolución ($\Delta_{dis}E$), que correspondería al $\Delta_{dis}H$ medido en el calorímetro, con la energía necesaria para romper las interacciones soluto-soluto ($E_{1,1}$) y disolvente-disolvente ($E_{2,2}$), valor que corresponde al $\Delta_{vap}H$ o $\Delta_{sub}H$ de cada una de las especies participantes (soluto y disolvente), así como del número de moléculas de disolvente (Z) asociadas con el soluto para disolverlo, para los experimentos realizados el valor de $Z = 10$.

Remitiéndonos a la introducción de esta tesis, tenemos que un total de 3 átomos de hidrógeno interactúan con la nube electrónica de una molécula de benceno y de acuerdo al análisis del Esquema 6 proponemos lo siguiente: que son tres moléculas de benceno las que afectan a los átomos de hidrógeno tanto de los grupos metilo como a los hidrógenos del anillo de piranósido, está es la razón por la cual se realiza el cálculo con $Z= 3$. La relación 1:10 del carbohidrato respecto al disolvente permite garantizar la saturación de la esfera de solvatación, $Z=10$.

La obtención de las entalpías de cambio de fase para los compuestos MP y GTP se describe ampliamente en la parte experimental.

Los resultados para ambos compuestos (MP y GTP) se muestran en las Tablas 8 y 9.

Los valores de las entalpías de cambio de fase ($\Delta_{vap}H$) de los disolventes se tomaron de la literatura. Sólo en el caso de los disolventes 4-metil-anisol y el 1,3-DMB (1,3-dimetoxi benceno), la entalpía de cambio de fase no ha sido determinada, por lo que se tomaron los valores de los isómeros 3-metil-anisol y 1,2-DMB (1,2-dimetoxi benceno), respectivamente. (56), (57)

Tabla 8 Valores de energía de CH/ π para MP a partir de la ecuación (14)

MP				
Disolvente	$\Delta_{vap}H^{(1)}$ (kJ mol ⁻¹)	$E_{1,2}^a$ (kJ mol ⁻¹) Z = 10	$E_{1,2}^b$ (kJ mol ⁻¹) Z = 3	$\sigma_{tot} (\pm)$
4-metil anisol	51.50 ⁽²⁾	63.43	63.65	2.12
<i>o</i> -xileno	43.45	59.58	60.19	1.95
<i>m</i> -xileno	42.68	59.23	59.93	1.96
<i>p</i> -xileno	40.00	57.85	58.46	1.96
1,2-DMB	66.90 ⁽³⁾	71.14	71.39	2.21
1,3-DMB	66.90 ⁽³⁾	70.93	70.68	2.21
Benceno	33.92	54.18	53.33	1.96

⁽¹⁾ valores tomados de la literatura. ⁽²⁾ valor del 3-metil anisol. ⁽³⁾ valor del 1,2-DMB

Al comparar los valores de la Tabla 8 y la Tabla 9 se confirma la participación de la interacción CH/π en la estabilización del compuesto GTP, es decir, $E_{1,2}$ siempre es más alta para el compuesto GTP que para el compuesto MP. En este caso, la dispersión de valores es pequeña y diferente del caso previo, el benceno aporta el sistema más estable. Este hecho se puede justificar si se considera el tamaño estérico de los compuestos.

Tabla 9 Valores energéticos de CH/π para GTP a partir de la ecuación (14)

Disolvente	GTP				$\Delta E_{1,2}^a$ Z = 10	$\Delta E_{1,2}^b$ Z = 3
	$\Delta_{vap}H^{(1)}$ (kJ mol ⁻¹)	$E_{1,2}^a$ (kJ mol ⁻¹) Z = 10	$E_{1,2}^b$ (kJ mol ⁻¹) Z = 3	$\sigma_{tot} (\pm)$		
	4-metil anisol	51.50 ⁽²⁾	80.11	84.17		
<i>o</i> -xileno	43.45	76.24	80.65	2.77	16.66	20.46
<i>m</i> -xileno	42.68	75.90	80.43	2.77	16.67	20.50
<i>p</i> -xileno	40.00	74.55	79.04	2.78	16.70	20.58
1,2-DMB	66.90 ⁽³⁾	87.87	92.06	2.96	16.73	20.67
1,3-DMB	66.90 ⁽³⁾	87.69	91.46	2.96	16.76	20.78
Benceno	33.92	71.23	75.10	2.77	17.05	21.76

⁽¹⁾ valores tomados de la literatura. (57) y (56) ⁽²⁾ valor reportado para 3-metil anisol. ⁽³⁾ valor reportado para 1,2-DMB

Por otro lado, tomando en cuenta los resultados obtenidos en el estudio por RMN se propone que la esfera de solvatación se satura con tres moléculas de benceno por cada molécula de carbohidrato. En las Tabla 1 y 2 se puede observar que en este punto (Z=3), la mayoría de los protones enlazados al anillo de pirano comienzan a tener un desplazamiento

químico constante, es decir el efecto anisotrópico comienza a ceder. Es decir, el efecto permanece casi constante. No obstante, los grupos metilo expuestos al disolvente continúan experimentando el efecto protector del benceno.

Para GTP el valor calculado de $E_{1,2}$ considerando tres moléculas de disolvente por cada molécula de soluto, se incrementa hasta prácticamente 4.0 kJ mol^{-1} cuando $Z = 10$ moléculas de disolvente, por ejemplo, cuando se disuelve GTP en benceno; se tiene que cuando $Z = 3$, $E_{1,2} = 71.23 \text{ kJ mol}^{-1}$; y cuando $Z = 10$ entonces $E_{1,2} = 75.10 \text{ kJ mol}^{-1}$. Sin embargo, cuando se realiza este mismo cálculo para MP, se observa que $Z = 3$ y $Z = 10$ producen valores de $E_{1,2}$ prácticamente iguales para dicha molécula (Tabla 8). Esto se puede atribuir a que la energía de interacción se distribuye entre un número más pequeño de moléculas vecinas.

En la Tabla 9, también observamos que las diferencias entre $\Delta E_{1,2}$ con $Z = 10$ y $Z = 3$, ($\Delta E_{1,2} = E_{GTP} - E_{MP}$) es en promedio 4 kJ mol^{-1} ; es decir, cuando $Z = 3$, GTP en disolución es más favorecido por 20.5 kJ mol^{-1} , en promedio. Esto es en comparación con los aproximadamente 16.6 kJ mol^{-1} calculados utilizando 10 moléculas de disolvente. Por ejemplo, para el benceno la energía va desde 17.05 hasta $21.76 \text{ kJ mol}^{-1}$. Estos resultados concuerdan con la afirmación de que el compuesto GTP experimenta una interacción estabilizante de acuerdo con el reconocimiento molecular, mientras que la molécula del compuesto MP experimenta solamente solvatación.

En resumen, los resultados no se ven afectados de manera importante cuando se consideran tres o diez moléculas dentro de la esfera de solvatación porque a pesar del exceso de disolvente, el número de moléculas involucradas en la primera esfera de solvatación del

carbohidrato, de acuerdo con el Esquema 6, es tres. Y de estas tres moléculas, solamente una es responsable del proceso de reconocimiento y como consecuencia su principal contribuyente energético, diferencia promedio de 4 kJ mol^{-1} .

Como se estableció en la discusión de los resultados de RMN, cuando se adicionó el benceno, los grupos metilo de ambos carbohidratos muestran un desplazamiento hacia campo alto. Esto lleva a varias preguntas: ¿Cuál es el efecto que tiene la contribución energética de los grupos metilo sobre el complejo una vez que se encuentra solvatado? ¿Podrían estos ocultar la interacción CH/ π de interés? Con el fin de responder a estas preguntas, se realizó el estudio del efecto que tendría el benceno sobre el acetato de metilo, inicialmente disuelto en cloroformo (Tabla 4), y también se determinó el calor de solvatación del acetato de metilo en los diferentes compuestos aromáticos (Tabla 10).

Retomando las diferencias calculadas en el desplazamiento químico en CDCl_3 y en C_6D_6 para el acetato de metilo, enlistadas en la Tabla 4, se puede establecer que ambos grupos metilo, de diferente naturaleza química, a causa de la áidez de los hidrógenos del grupo acetilo, experimentan de manera equitativa el efecto protector del benceno. Así, el acetato de metilo es solvatado por el benceno que se orienta hacia los átomos de hidrógeno. Este comportamiento se esperaba sería ser similar al mostrado experimentalmente por los cinco grupos metoxilo de los carbohidratos.

En la tabla 10 se puede observar que el valor de $\Delta_{solv}H$ es menos exotérmico para el acetato de metilo que para GTP y MP, y que la variación debida al tipo de compuesto aromático

empleado es insignificante. Este comportamiento también es usual de los carbohidratos MP y GTP al ser disueltos en los mismos disolventes aromáticos.

Tabla 10 Entalpías de Solvatación del acetato de metilo ($\Delta_{vap}H=29.32$ kJ mol⁻¹) en diferentes disolventes (1:10, mol:mol). Determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15K

DISOLVENTE	Q_{dis} (303.15 K) (J)	$\Delta_{dis}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{solv}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)
Benceno	4.321	1.073	-28.25 ± 0.01
<i>o</i> -xileno	4.673	1.75	-27.57 ± 0.02
<i>m</i> -xileno	4.798	1.83	-27.49 ± 0.05
<i>p</i> -xileno	4.557	1.725	-27.60 ± 0.01
4-metil anisol	1.858	0.642	-28.70 ± 0.03
1,2-dimetoxi benceno	3.420	1.35	-27.97 ± 0.04

Si se considera que los dos grupos metilo, presentes en el AcOMe, pueden ser solvatados de la misma manera, en este caso por el benceno, se puede considerar que ambos contribuyen con un 50 % a la energía total de solvatación.

En otras palabras, para el acetato de metilo disuelto en benceno, el $\Delta_{solv}H$ es de - 28.25 kJ mol⁻¹ y retomando las observaciones hechas por RMN se tiene que ambos grupos CH₃- se desplazan hacia campo alto de manera paralela, por lo tanto energéticamente contribuirían con la misma cantidad de energía, es decir, el valor para una interacción CH/ π sería aproximadamente -14.13 kJ mol⁻¹.

Por consiguiente, al ser una interacción aditiva, (14) se concluye para los compuestos MP y GTP que la energía asociada con la solvatación de los mismos correspondería a 5 veces este valor, multiplicando $-14.13 \text{ kJ mol}^{-1}$ por los 5 grupos metilo que posee cada carbohidrato para obtener la energía con la que contribuyen al $\Delta_{solv}H$, $-70.75 \text{ kJ mol}^{-1}$, finalmente restando esta cantidad al valor total determinado experimentalmente, se tiene que la diferencia, aproximadamente 18 kJ mol^{-1} , corresponde a la interacción CH/ π de los hidrógenos (H3, H4 y H5) del anillo de pirano del compuesto GTP con el anillo bencénico.

5.3 Glucopiranosidos peracetilados

5.3.1. 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo (a-GP) y 2,3,4,6-tetra-O-acetil- β -D-glucopiranosido de acetilo (b-GP)

En la Figura 10 (Tablas 11 y 12) se puede observar claramente la ausencia de algún efecto de la nube aromática del benceno sobre los átomos de hidrógeno del anillo de las moléculas **a-GP** y **b-GP**, pues dichos hidrógenos no presentan corrimientos químicos evidentes hacia campo alto con la adición paulatina de benceno, a excepción del protón H5 de b-GP, es decir, no son afectados por el benceno de manera directa. Sin embargo, se observa que los grupos metilo de ambos compuestos se encuentran bajo la zona de protección de la nube electrónica del benceno (Figura 11), estas observaciones apoyan los datos obtenidos para los compuestos MP y GP.

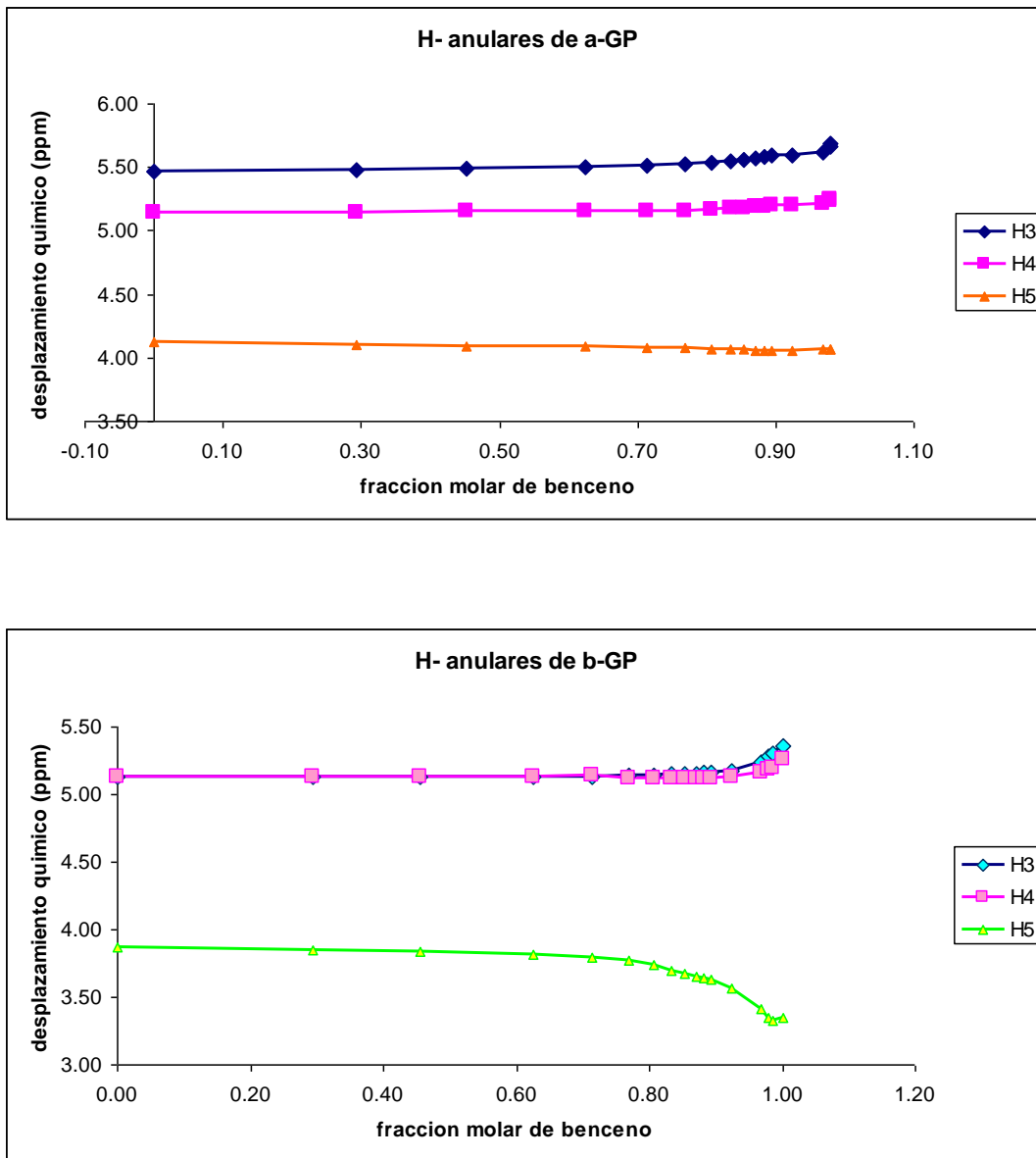


Figura 10 Interacción del benceno con los protones anulares de a-GP y b-GP

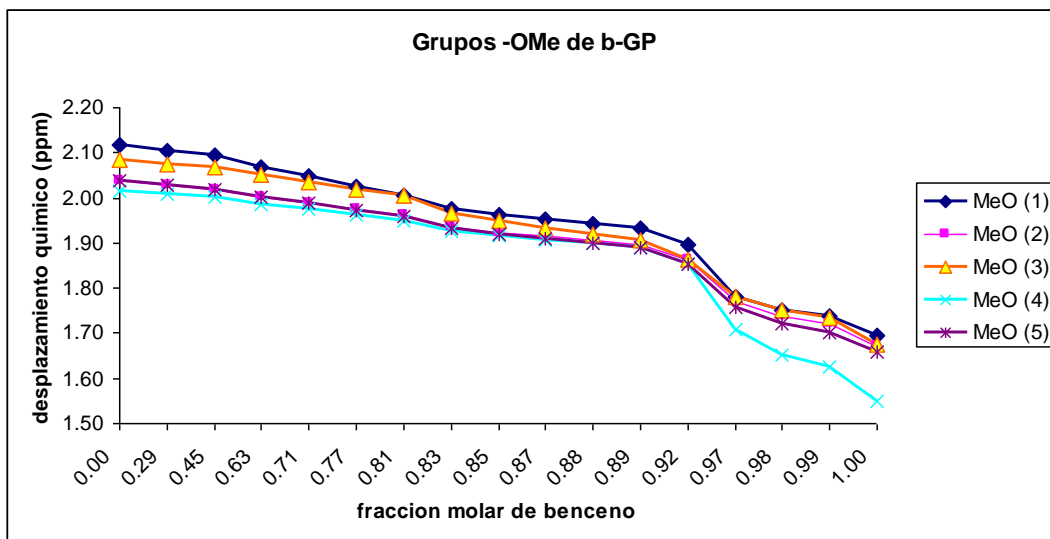
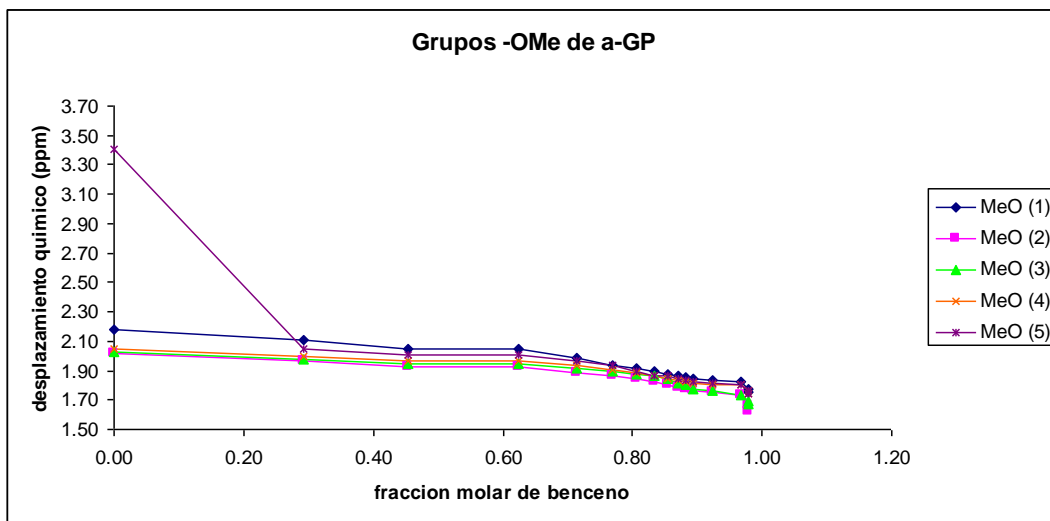
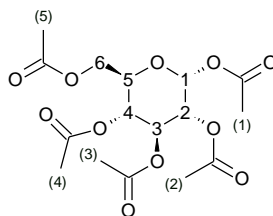


Figura 11 Interacción del benceno con los grupos metilo de a-GP y b-GP

Tabla 11 Titulación anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo. Efecto del benceno sobre el

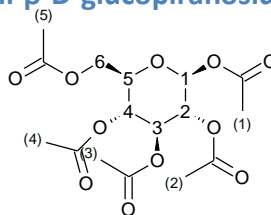
desplazamiento químico de ^1H -RMN



Fracción molar de benceno	H1 (d)	H2 (dd)	H3 (dd)	H4 (t)	H5 (ddd)	H6a (dd)	H6b (dd)	MeO (1) (s)	MeO (2) (s)	MeO (3) (s)	MeO (4) (s)	MeO (5) (s)
0.00E+00	6.33	5.10	5.47	5.14	4.12	4.27	4.10	2.18	2.02	2.03	2.05	3.41
2.93E-01	6.34	5.10	5.48	5.14	4.10	4.26	4.07	2.11	1.97	1.98	2.00	2.05
4.53E-01	6.35	5.10	5.49	5.15	4.09	4.25	4.06	2.05	1.93	1.95	1.97	2.01
6.25E-01	6.35	5.10	5.50	5.15	4.09	4.25	4.06	2.05	1.93	1.95	1.97	2.01
7.14E-01	6.36	5.10	5.51	5.15	4.08	4.25	4.04	1.99	1.89	1.92	1.94	1.97
7.69E-01	6.37	5.11	5.52	5.16	4.08	4.24	4.03	1.94	1.86	1.90	1.91	1.94
8.07E-01	6.39	5.11	5.54	5.17	4.07	4.24	4.03	1.92	1.84	1.88	1.89	1.90
8.33E-01	6.40	5.12	5.55	5.18	4.07	4.24	4.02	1.90	1.82	1.86	1.86	1.87
8.54E-01	6.41	5.12	5.56	5.18	4.07	4.24	4.02	1.88	1.80	1.84	1.84	1.86
8.70E-01	6.42	5.13	5.57	5.19	4.06	4.24	4.02	1.87	1.78	1.81	1.83	1.84
8.82E-01	6.42	5.13	5.58	5.19	4.06	4.24	4.02	1.85	1.77	1.80	1.82	1.83
8.93E-01	6.43	5.14	5.59	5.20	4.06	4.24	4.02	1.84	1.76	1.77	1.81	1.82
9.23E-01	6.44	5.14	5.60	5.20	4.06	4.24	4.01	1.83	1.75	1.76	1.80	1.81
9.68E-01	6.45	5.15	5.62	5.21	4.07	4.25	4.01	1.82	1.73	1.73	1.80	1.80
9.80E-01	6.49	5.17	5.66	5.24	4.07	4.25	4.01	1.77	1.66	1.69	1.76	1.76
9.80E-01	6.51	5.18	5.69	5.25	4.07	4.26	4.02	1.75	1.62	1.67	1.74	1.74

Tabla 12 Titulación anisotrópica de 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido de acetilo. Efecto del benceno sobre el

desplazamiento químico de ¹H-RMN



Fracción molar de benceno	H1 (d)	H2 (dd)	H3 (dd)	H4 (t)	H5 (ddd)	H6a (dd)	H6b (dd)	MeO (1) (s)	MeO (2) (s)	MeO (3) (s)	MeO (4) (s)	MeO (5) (s)
0.00E+00	5.73	5.27	5.13	5.13	3.87	4.11	4.30	2.12	2.04	2.09	2.02	2.04
2.94E-01	5.73	5.27	5.13	5.13	3.85	4.11	4.29	2.10	2.03	2.08	2.01	2.03
4.55E-01	5.73	5.27	5.13	5.13	3.84	4.10	4.29	2.09	2.02	2.07	2.00	2.02
6.25E-01	5.73	5.26	5.13	5.14	3.81	4.09	4.28	2.07	2.00	2.05	1.99	2.00
7.15E-01	5.72	5.26	5.13	5.14	3.79	4.08	4.27	2.05	1.99	2.04	1.97	1.99
7.69E-01	5.72	5.26	5.14	5.13	3.77	4.07	4.26	2.03	1.98	2.02	1.96	1.97
8.07E-01	5.72	5.26	5.14	5.12	3.74	4.06	4.26	2.01	1.96	2.00	1.95	1.96
8.34E-01	5.71	5.25	5.16	5.12	3.69	4.43	4.24	1.98	1.94	1.97	1.93	1.93
8.54E-01	5.71	5.25	5.16	5.12	3.67	4.04	4.24	1.96	1.92	1.95	1.92	1.92
8.70E-01	5.70	5.25	5.16	5.12	3.66	4.03	4.23	1.95	1.92	1.93	1.91	1.91
8.82E-01	5.70	5.25	5.16	5.12	3.64	4.02	4.23	1.94	1.91	1.92	1.90	1.90
8.93E-01	5.70	5.25	5.16	5.13	3.63	4.02	4.23	1.93	1.90	1.91	1.89	1.89
9.23E-01	5.70	5.26	5.17	5.13	3.57	4.00	4.21	1.90	1.86	1.86	1.85	1.85
9.68E-01	5.72	5.28	5.24	5.16	3.41	3.96	4.19	1.78	1.77	1.78	1.71	1.76
9.80E-01	5.73	5.28	5.29	5.19	3.35	3.95	4.18	1.75	1.74	1.75	1.65	1.72
9.85E-01	5.74	5.30	5.30	5.20	3.32	3.95	4.18	1.74	1.72	1.73	1.63	1.70
1	5.82	5.37	5.36	5.26	3.35	3.98	4.20	1.70	1.67	1.68	1.55	1.66

Debido a la evidencia de RMN, donde no hay comportamiento alguno que indique la presencia de una interacción con los protones del anillo de pirano, para el análisis calorimétrico se decidió realizar únicamente los experimentos para el compuesto a-GP. Al restar al valor experimental, la contribución entálpica de los 5 grupos metilo (CH_3CO), la diferencia se podría atribuir a posibles interacciones π/π entre la nube aromática del benceno y el carbonilo del grupo acetilo de los carbohidratos. Únicamente para corroborar los valores de la interacción de los metilos y el anillo bencénico se determinó la $E_{1,2}$ a través de la ecuación (14).

Los resultados obtenidos con este compuesto (a-GP) siguen la pauta de los resultados obtenidos para los carbohidratos permetilados.

Tabla 13 Entalpías de solvatación del 2,3,4,6-tetra-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo ($\Delta_{\text{vap}}H=29.32 \text{ kJ mol}^{-1}$) en diferentes disolventes (1:10), determinadas a partir de las entalpías de disolución, medidas por microcalorimetría Calvet a 303.15K, y de las entalpías de cambio de fase medidas por DSC

DISOLVENTE (1:10) (soluto/disolv)	$\Delta_{\text{vap}}H$ (313.15 K) ^{¡Error!} arcador no definido. (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{dis}}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{solv}}H$ (303.15 K) (kJ mol ⁻¹)
Benceno	122.90	17.20	-105.70 ± 0.44
<i>o</i> -xileno	122.90	3.67	-119.23 ± 0.13
<i>m</i> -xileno	122.90	2.83	-120.07 ± 0.09
<i>p</i> -xileno	122.90	2.83	-120.07 ± 0.10
4-metil anisol	122.90	10.59	-112.31 ± 0.30
1,3-dimetoxi benceno	122.90	17.18	-105.72 ± 0.25
1,2-dimetoxi benceno	122.90	20.17	-102.73 ± 0.51

Tabla 14 Valores energéticos para la Energía de interacción (E_{1,2}) a partir de la ecuación (14), para el 2,3,4,6-O-acetil- α -D-glucopiranosido de acetilo (DvapH= 29.32 kJ mol⁻¹) en diferentes disolventes (1:10), determinadas a partir de las entalpías de disolución, medidas por microcalorimetría Calvet a 303.15 K, y las entalpías de cambio de fase, medidas por DSC

a-GP			
Disolvente	$\Delta_{vap}H^{(1)}$ (kJ mol ⁻¹)	$E_{12}^{a)}$	$\sigma_{tot} (\pm)$
1-metoxi-4-metil benceno	51.50 ⁽²⁾	88.26	0.84
o-xileno	43.45	83.54	0.02
m-xileno	42.68	83.07	0.21
p-xileno	40.00	81.73	0.21
1,2-DMB	66.90 ⁽³⁾	96.62	1.05
1,3-DMB	66.90 ⁽³⁾	96.92	1.05
Benceno	33.92	80.13	0.21

a) Z=10 moléculas de disolvente. ⁽¹⁾ valores tomados de la literatura. ⁽²⁾ valor del 3-metil anisol. ⁽³⁾ valor del 1,2-DMB

5.3.1 Acetato de metilo: 1,2-Dimetoxibenceno

Al realizar los respectivos experimentos calorimétricos de disolución del acetato de metilo en 1,3-DMB se observó que dependiendo de la cantidad de disolvente adicionada el proceso podía pasar de endotérmico a exotérmico; sin embargo, al obtener los valores de $\Delta_{sol}H$ las diferencias energéticas entre una concentración y otra no son muy significativas, pero en vista de que los cambios ligeros en la concentración del disolvente adicionado pueden hacer el cambio tan

notable en la naturaleza del proceso de disolución, se recomienda en un estudio posterior realizar más experimentos para llegar a una conclusión contundente. Por lo pronto, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15 Disolución de acetato de metilo en 1,3-DMB, en diferentes proporciones

(mol:mol)	Q_{dis} (J)	$\Delta_{\text{dis}}H$ (kJ mol ⁻¹)	$\Delta_{\text{solv}}H$ (kJ mol ⁻¹)
1:1	1.090	0.17	-29.04
1:2	0.681	0.16	-29.05
1:3	0.328	0.08	-29.13
1:5	0.107	0.03	-29.18
1:6	-0.041	-0.01	-29.22
1:7	-0.052	-0.01	-29.22
1:8	-0.055	-0.01	-29.22
1:10	-0.137	-0.06	-29.27

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 Materiales y Métodos

Los reactivos y disolventes para la modificación de los carbohidratos están comercialmente disponibles. El CH_2Cl_2 , *n*-Hexano y AcOEt fueron purificados por destilación fraccionada empleando una columna *Vigreux*, el *n*-Hexano se pasó por una columna empacada con tonsil antes de la destilación fraccionada. Para la re-cristalización se empleó *n*-Hexano grado HPLC. Los lavados con carbón activado se realizaron utilizando AcOEt como disolvente. El mercurio utilizado en los experimentos de calorimetría fue químicamente puro, bi-destilado y comercial.

Cromatografía en capa fina: Placas de aluminio cubiertas con sílica gel 60 F254, Sigma-Aldrich, con indicador de luz-UV. Revelador disolución de sulfato cérico al 1 % en H_2SO_4 1N.

Cromatografía en columna: Sílica gel (40-63 μm y 70-230 mesh) Merck.

Espectros de IR (cm^{-1}): Espectrofotómetro *Perkin Elmer* 552.

Espectros de ^1H , ^{13}C y bidimensionales (δ (ppm), J (Hz)): *Varian-Inova* 500 y 125 MHz, respectivamente.

Espectros de Masas (m/z , %): IC-MS, EI-MS: Jeol AX505 HA, a 272.9°C y 275.7°C.

Punto de Fusión: Calorímetro Diferencial de Barrido DSC7, por el método de van't Hoff.

Calorimetría Calvet: Microcalorímetro Calvet C80 Setaram, con dos termopilas con sensibilidad de 2 μ W, control de temperatura de 0.001 K. Celdas de mezclado con rondana metálica y con membrana de aluminio ambas construidas en acero inoxidable, operado a temperatura constante de 303 K.

Calorimetría Diferencial de Barrido: Calorímetro DSC7, celdas abiertas de aluminio *Perkin Elmer*.

Masas: Balanza Sartorius NC 210P, sensibilidad 10 μ g; y Balanza Sartorius 4503Micro, sensibilidad 0.001 mg.

6.2 Metodología Experimental

6.2.1 Síntesis de los carbohidratos permetilados

Para permetilar los carbohidratos deseados se probaron los métodos propuestos por Ciucano y colaboradores, y Wang y colaboradores, (45), (58) en ambos se propone utilizar el anión CH_3SO_2^- como una base fuerte, partiendo del DMSO, el cual es también el disolvente de la reacción, y una base fuerte como el NaOH en solución acuosa al 50%. Como agente metilante se emplea el CH_3I .

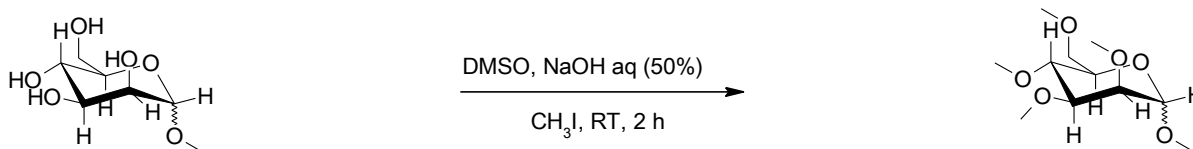
Método de Ciucano: la α -D-Glucosa (0.5 g, 5.15 mmol, 1.0 eq.) se disolvió en dimetil sulfóxido (50 mL). Se incorporó lentamente NaOH (2.0 g, 8.75 mmol, 1.7 eq.), la mezcla se agitó hasta formar una suspensión gelatinosa y se adicionó gota a gota CH_3I (10.0 mL, 30.99 mmol, 6.00 eq.).

Para terminar la reacción se añadieron H_2O (100mL) y CH_2Cl_2 (100 mL) para extraer la fase orgánica. La fase orgánica se lavó con H_2O (3 x 100 mL), se secó (Na_2SO_4) y se concentró al vacío. La mezcla de reacción se disolvió en CH_2Cl_2 y se percoló en una columna empacada con gel de sílice (malla gruesa) para eliminar el DMSO residual. Finalmente se purifica por cromatografía en columna (mezcla de los isómeros α/β).

Método de Wang: El α/β -D-piranósido de metilo (1 g, 5.15 mmol, 1.0 eq.) se disolvió en DMSO (18 mL), se incorporó lentamente una solución de NaOH ac. (50 %, w/w) (1.8 mL, 8.75 mmol, 1.7 eq.), la mezcla estuvo en agitación hasta que se observó la formación de un

suspensión gelatinosa, posteriormente se añadió gota a gota el CH₃I (1.93 mL, 30.99 mmol, 6.00 eq.), la mezcla de reacción estuvo en agitación por 2 h a temperatura ambiente (*Esquema 5*).

Posteriormente se añadió H₂O dest., (100 mL), se separaron las fases y se extrajo la fase acuosa con CH₂Cl₂ (3 x 100 mL). Las fases orgánicas combinadas se lavaron con una solución saturada de Na₂S₂O₃ (200 mL), se secaron sobre Na₂SO₄, se filtraron y se concentraron al vacío.

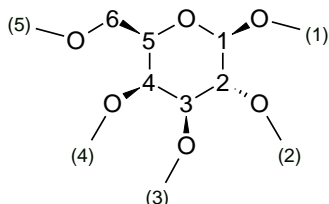


Esquema 7 Condiciones de reacción para permethylar piranósidos en este trabajo

La mezcla de reacción se disolvió en AcOEt (\pm 30 mL), a esta disolución se adicionó carbón activado (20 %, w/w). La suspensión color negro se agitó dentro de un baño maría por 20 min. La mezcla se filtró sobre celita después de 8 h. Finalmente el producto 2, 3, 4, 6-tetra-*O*-metil- β -D-galactopiranosido de metilo se re-cristalizó de *n*-hexano (\geq 90 %) y el 2,3,4,6-tetra-*O*-metil- α -D-manopiranosido de metilo se trató con carbón activado tres veces más, hasta alcanzar una pureza del 99.8 y 99.7 % para cada compuesto, determinada por CG.

6.2.2 Caracterización espectroscópica de los carbohidratos permetilados

6.2.2.1 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-galactopiranosido de metilo



Rendimiento: 735 mg (73 %). Sólido Blanco. M.p. 43.34 °C.

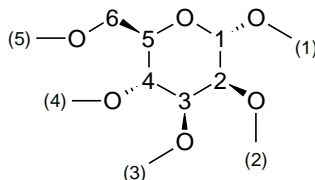
IR (KBr): 2932 m , 2824 m , 1551 w , 1388 w , 1256 w , 1185 w , 1124 m , 1079 s , 1050 m , 1000 w , 965 w , 754 w , 692 w .

¹H-RMN (500 MHz, C₆D₆): 2.96-2.98 (dd, J= 9.5, 3.0, 1H, H-C(3)); 3.11 (s, 3H, H₃C(5)); 3.27 (s, 3H, H₃C(3)); 3.31-3.34 (ddd, J= 1.0, 5.5, 7.0, 1H, H-C(5)); 3.37 (s, 3H, H₃C(1)); 3.44-3.45 (dd, J= 1.0, 3.0, 1H, H-C(4)); 3.46 (s, 3H, H₃C(4)); 3.47-3.50 (dd, J= 5.5, 9.0, 1H, H-C(6a)); 3.55 (s, 3H, H₃C(2)); 3.61-3.65 (dd, J= 7.5, 9.0, 1H, H-C(6b)); 3.63-3.67, (dd, J= 7.5, 9.5, 1H, H-C(2)); 4.13 (d, J= 7.5, 1H, H-C(1)).

¹³C-RMN (125 MHz, C₆D₆): 56.2; 58.3; 58.8; 60.6; 60.9; 71.4; 73.4; 75.6; 81.3; 84.8; 105.3.

CI-MS: 251 ([M+H]⁺; [C₁₁H₂₂O₅]^{H+}).

6.2.2.2 2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo



Rendimiento: 3.475 g (90 %). Aceite amarillo.

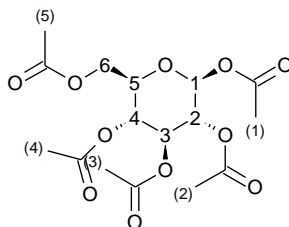
IR (película): 2980m, 2910s, 2829m, 1451m, 1377m, 1325m, 1291m, 1191s, 1114s, 1065s, 997m, 972m, 925w, 883w, 844w, 796w, 663w, 633w.

¹H-RMN (500 MHz, C₆D₆): 3.16 (s, 3H, H₃C(1)); 3.25 (s, 3H, H₃C(5)); 3.26 (s, 3H, H₃C(3)); 3.26(s, 3H, H₃C(2)); 3.48-3.49 (t, J = 1.2, 1H, H-C(2)); 3.48 (s, 3H, H₃C(4)); 3.59-3.62 (dd, J = 2.0, 10.5, 1H, H-C(6b)); 3.65-3.67 (dd, J = 4.5, 10.5, 1H, H-C(6a)); 3.68-3.70 (dd, J = 3.0, 6.0, 1H, H-C(3)); 3.73 (t, J = 9.5, 1H, H-C(4)); 3.79-3.82 (ddd, J = 1.5, 5.0, 9.0, 1H, H-C(5)); 4.70 (d, J = 2.0, 1H, H-C(1)).

¹³C-RMN (125 MHz, C₆D₆): 54.4; 57.2; 58.9; 59.0; 60.4; 72.4; 72.5; 77.0; 77.4; 82.6; 99.0.

CI-MS: 251 ([M+H]⁺; [C₁₁H₂₂O₅]^{H+}).

6.2.2.3 2,3,4,6-tetra-O-acetil-β-D-glucopiranosido de acetilo



Comercialmente disponible, 99.8 % de pureza. Polvo Blanco.

IR (película): 2980m, 2910s, 2829m, 1451m, 1377m, 1325m, 1291m, 1191s, 1114s, 1065s, 997m, 972m, 925w, 883w, 844w, 796w, 663w, 633w.

¹H-RMN (500 MHz, C₆D₆): 3.16 (s, 3H, H₃C(1)); 3.25 (s, 3H, H₃C(5)); 3.26 (s, 3H, H₃C(3)); 3.26(s, 3H, H₃C(2)); 3.48-3.49 (t, J = 1.2, 1H, H-C(2)); 3.48 (s, 3H, H₃C(4)); 3.59-3.62 (dd, J = 2.0, 10.5, 1H, H-C(6b)); 3.65-3.67 (dd, J = 4.5, 10.5, 1H, H-C(6a)); 3.68-3.70 (dd, J = 3.0, 6.0, 1H, H-C(3)); 3.73 (t, J = 9.5, 1H, H-C(4)); 3.79-3.82 (ddd, J = 1.5, 5.0, 9.0, 1H, H-C(5)); 4.70 (d, J = 2.0, 1H, H-C(1)).

¹³C-RMN (125 MHz, C₆D₆): 54.4; 57.2; 58.9; 59.0; 60.4; 72.4; 72.5; 77.0; 77.4; 82.6; 99.0.

CI-MS: 390.34 ([C₁₆H₂₂O₁₁]⁺). (59)

6.2.3 Titulación anisotrópica ^1H -RMN:

El piranósido permetilado o peracetilado (108 mg, 0.43 mmol) fue disuelto en CDCl_3 (0.5 mL) y se midió el espectro de ^1H -RMN, después de esto se adicionaron alícuotas de 38.8 μL (0.43 mmol) y 22.8 μL (0.25 mmol) de C_6D_6 , respectivamente, hasta obtener una solución del carbohidrato saturada con benceno, se comenzó con una relación 1:0.5 hasta 1:50.24 (piranósido/benceno) después de cada adición se tomó el respectivo espectro de ^1H (Tablas 1-2 y 11-12).

Para el AcOMe (113 mg, 1.52 mmol) las alícuotas de C_6D_6 adicionadas fueron de 135.2 μL , el procedimiento fue el mismo. Los residuos del carbohidrato que interaccionaron intermolecularmente con el anillo aromático de benceno experimentaron corrimientos a campos más altos, la magnitud de los cambios en el desplazamiento químico está relacionada directamente con el incremento en la fuerza de interacción (Tabla 3).

6.2.4 Entalpías de disolución por calorimetría de flujo de calor:

Los experimentos de disolución se llevaron a cabo por calorimetría de flujo de calor, utilizando un calorímetro diferencial Calvet Setaram C80, con una resolución calorimétrica de 0.12 μW y un límite en poder de 2 a 5 μW . Todos los experimentos de disolución se realizaron isotérmicamente a 303.2 K.

Para este grupo de experimentos se emplearon celdas de acero inoxidable con membrana de teflón y/o aluminio, utilizando masas de alrededor de 50 mg para cada piranósido

y una cantidad de disolvente aromático de 350 a 550 mg, dichas cantidades son las apropiadas para ser colocadas en cada uno de los contenedores de la celda, con el fin de obtener una señal térmica máxima.

La relación molar resultante de carbohidrato/disolvente, después del proceso de disolución fue 1:10. Las masas de las sustancias involucradas en un experimento de disolución con esta técnica fueron medidas en la balanza Sartorius NC210 P con una sensibilidad de 10 μ g.

La metodología experimental consiste en depositar en la celda de muestra una cierta cantidad de soluto y, como ya se indicó, separándola del disolvente a través de la tapa metálica y el mercurio, el cual durante el mezclado por rotación ayuda también a homogeneizar el sistema. La celda de referencia se prepara de manera idéntica excepto que no se deposita muestra.

Para poder referir los resultados de entalpía de disolución a la cantidad de sustancia presente en cada experimento, tanto el soluto como el disolvente se pesan de la misma forma en la balanza Sartorius MC 210 P.

Una vez que las celdas de disolución (con membrana o mercurio) se colocan en los sensores del calorímetro Calvet, la temperatura y el flujo de calor son estabilizados en un tiempo aproximado de 90 min., después de este tiempo se comienza la adquisición de datos. Cinco minutos son suficientes para obtener una buena línea base inicial, se procede entonces a romper la membrana de las celdas de membrana, según sea el caso, se inicia la rotación del calorímetro C80 por 15 min para promover el proceso de disolución.

El análisis de las curvas de disolución, generadas por el software de tratamiento de datos del calorímetro C80 mostró que para la cantidad de energía (7.0 J) involucrada en algunos de los experimentos de disolución la transferencia de calor terminaba antes de 120 min. Al final de un experimento de disolución la diferencia entre la línea de base inicial y final no era más de 0.01 mW, lo cual significa una incertidumbre máxima en la cuantificación del área bajo la curva de ± 0.069 J. El calorímetro C80 trabaja a presión constante, por consecuencia la integración de la curva de flujo de calor en función del tiempo, proporciona directamente la entalpía de disolución, $\Delta_{dis}H$, de cada carbohidrato en el respectivo disolvente aromático. En la Tabla 5 y 6 la incertidumbre asociada al valor promedio de la entalpía de disolución representa la desviación estándar.

Otro tipo de celdas utilizadas en este trabajo son celdas de mezclado que constan de dos compartimientos, en el primero se deposita la muestra a disolver (solute) y en el segundo se coloca el disolvente, separados ambos por una pequeña tapa metálica y una capa de mercurio.

6.2.5 Entalpías de Sublimación y Vaporización por calorimetría diferencial de barrido:

Las mediciones calorimétricas de las entalpías de sublimación o vaporización de los carbohidratos se efectuaron utilizando un calorímetro DSC7 modificado que opera isotérmicamente. (60), (61)

El elemento sensible de este mecanismo es un bloque calorimétrico *Perkin Elmer DSC7* dentro una cámara de vacío conectado al dispositivo de control DSC7 a través de un pasamuros

eléctrico. El sistema de sublimación/vaporización se evacua con una bomba rotatoria de vacío y la presión residual interna de la cámara se monitorea con un manómetro, un manómetro Pirani. Se emplearon celdas de vaporización/sublimación estándar de aluminio abiertas, disponibles comercialmente con Perkin Elmer.

A partir de experimentos preliminares se estableció como temperatura de trabajo 333.15 K.

En cada experimento de sublimación/vaporización se depositaron alrededor de 10.0 mg del respectivo carbohidrato en el interior de las celdas y se pesaron en una microbalanza Sartorius 4503, cuya sensibilidad es de 1.0 μ g.

Una vez preparadas las celdas se depositan en el sensor calorimétrico, se espera a la estabilización del flujo de calor y temperatura, y se comienza la adquisición de datos. Para obtener una buena línea de base inicial son suficientes cinco minutos de registro de datos, posteriormente se abre la válvula conectada a la bomba de vacío, entonces la presión dentro de la cámara de vacío disminuye rápidamente promoviendo el proceso de sublimación o vaporización, según sea el caso.

Durante la preparación de la muestra, la estabilización térmica y el cambio de presión, debido a la evacuación inicial, una pequeña fracción de la sustancia sublima o evapora. Por lo tanto es necesario determinar la masa perdida durante dichos procedimientos, esto se determinó con experimentos independientes, repitiendo exactamente el procedimiento experimental hasta el paso en el que se abre la válvula de vacío, inmediatamente se detiene el

experimento llevando la temperatura a 25°C y rompiendo el vacío. Rápidamente se calcula la pérdida de masa por diferencia de peso.

Se empleó el programa Pyris del calorímetro DSC7 para adquirir los datos y efectuar la integración del área bajo la curva del cambio de fase. Conociendo el área bajo la curva de sublimación o vaporización, la masa inicial, la pérdida de masa durante la carga y estabilización térmica, se obtiene la entalpía de sublimación o vaporización con la siguiente relación:

$$\Delta_{sub/vap}H = \frac{\text{área de sub/vap (W*s)}}{(\text{masa inicial (g)} - \text{masa perdida (g)})} \quad (15)$$

En la tabla 6 la incertidumbre asociada al valor promedio de la entalpía de sublimación o vaporización de los piranosidos representa la desviación estándar.

El bloque calorimétrico asociado al sistema de vacío del DSC7 es calibrado en energía y temperatura utilizando muestras de alta pureza de Indio y Zinc.

7. CONCLUSIONES

Cuando los resultados calorimétricos y de RMN se combinan es posible proponer que la interacción CH/ π es estabilizante en una magnitud que va de 9 a 13 kJ mol⁻¹, dependiendo del sustrato aromático utilizado y es de naturaleza entálpica. Estos valores de energía se obtuvieron utilizando el método para determinar la energía de solvatación.

La determinación de la energía de interacción, $E_{1,2}$, confirmó la existencia de una interacción carbohidrato-compuesto aromático estabilizante, y junto con el Esquema 6 permitieron establecer que al menos tres moléculas de benceno están asociadas con el soluto.

La magnitud del valor de la interacción CH/ π no varía de acuerdo a la naturaleza electrónica de la nube aromática del disolvente en el sentido de Hammett. Se puede entonces afirmar que el volumen estérico de los sustituyentes en los disolventes impide que la asociación carbohidrato-benceno sustituido siga un comportamiento Hammett, a mayor densidad electrónica en el anillo más fuerte la interacción carbohidrato-sustrato aromático.

A través de las mediciones experimentales de la energía asociada con esta interacción y realizando una comparación de los mismos con los resultados teóricos reportados previamente, fue posible determinar la energía y existencia de las interacciones CH/ π entre los carbohidratos y proteínas.

Es bien sabido que los disolventes tienen propiedades generales que los hacen un continuo microscópico caracterizado por propiedades físicas tales como densidad, constante

dieléctrica, índice de refracción, etc., aunque como un discontinuo, tiene moléculas, que de manera individual, interactúan entre sí a través de interacciones específicas. Interacciones que fueron consideradas al calcular la energía de las interacciones CH/ π , $E_{1,2}$, de los carbohidratos estudiados, a través de la ecuación 14. (62)

En resumen los objetivos iniciales de este proyecto doctoral se cumplieron a cabalidad como a continuación se puede leer de manera puntual:

- Se determinó experimentalmente el valor energético de la interacción CH/ π en la supramolécula carbohidrato-compuesto aromático.
- De acuerdo a los datos obtenidos por calorimetría y RMN se establece que: tres moléculas del compuesto aromático están asociadas con una de soluto.
- La magnitud de la entalpía de solvatación no varía de acuerdo a la naturaleza del sustituyente del benceno en el sentido de Hammett, a mayor densidad electrónica en el anillo mayor fuerza de interacción con el carbohidrato.
- De acuerdo con los resultados, **GTP** experimenta reconocimiento molecular y **MP** únicamente solvatación.
- Se determinó experimentalmente el calor de cambio de fase de los siguientes compuestos: acetato de metilo, α -metil-manopiranosido permetilado y β -metil-galactopiranosido permetilado.

Finalmente, este trabajo constituye una propuesta experimental, ^1H -RMN y termodinámica, para estudiar interacciones intermoleculares débiles en solución.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Nishio, M., Hirota, M., Umezawa, Y.** *The CH- π Interaction. Evidence, Nature, and Consequences.* New York : Wiley-VCH, 1998. Para más información sobre el tema consultar: www.tim.hi-ho.ne.jp/dionisio/.
2. **Burley, S.K., Petsko, G.A.** 1985, *Science*, Vol. 229, págs. 23-28.
3. **Brandl, M., Weiss, M.S., Jabs, A., Sühnel, J., Hilgenfeld, R.** 2001, *J. Mol. Biol.*, Vol. 307, págs. 357-377.
4. **Harigai, M., Kataoka, M., Imamoto, Y.** 2006, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 128, págs. 10646-10647.
5. **Vyas, N.K., Vyas, M.N., Quijcho, F.A.** 1998, *Science*, Vol. 242, págs. 1290-1295.
6. **Obst, U., Banner, D.W., Weber, L., Diederich, F.** 1997, *Chem. Biol.*, Vol. 4, págs. 287-295.
7. **Chávez, M.I., Andreu, C., Vidal, P., Aboitz, N., Freire, F., Groves, P., Asension, J.L., Asensio, G., Muraki, Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J.** 2005, *Chem. Eur. J.*, Vol. 11, págs. 7060-7074.
8. **Umezawa, Y., Nishio, M.** *Nucleic Acids Res.*, Vol. 30, págs. 2183-2192.
9. **Nishio, M.** 2005, *Tetrahedron*, Vol. 61, págs. 6923-6950. y referencias ahí citadas.
10. **Zushi, S., Kodama, Y., Nishihata, K., Umemura, K., Nishio, M.** 1980, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. 53, págs. 3631-3640.
11. **Nakagawa, Y., Irie, K., Yanagita, R.C., Ohigashi, H., Tsuda, K.** 2005, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 127, págs. 5746-5747. ver ahí referencia [3c].
12. **Screen, J., Stanca-Kaposta, E.C., Gamblin, D.P., Liu, B., Macleod, N.A., Snoek, L.C., Davis, B.G., Simons, J.P.** 2007, *Angew. Chem.*, Vol. 119, págs. 3718-3722. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2007, 46, 3644-3648.
13. **Sugimoto, H., Aida, T., Inoue, S.** 1995, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, págs. 1411-1412.
14. **Fernández-Alonso, M.C., Cañada, F.J., Jiménez-Barbero, J., Cuevas, G.** 2005, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 127, págs. 7379-7386.
15. **Nishio, M.** 2004, *Cryst. Eng. Comm.*, Vol. 6, págs. 130-158.
16. **Tsuzuki, S., Honda, K., Uchimar, T., Mikami, M., Tanabe, K.** 2000, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 122, págs. 3746-3753.
17. **Ribas, J., Cubero, E., Luque, F.J., Orozco, M.** 2002, *J. Org. Chem.*, Vol. 67, págs. 7057-7065.

18. **Frontera, A., Garau, C., Quiñonero, D., Ballester, P., Costa, A., Deyá, P.M.** 2003, *Org. Lett.*, Vol. 5, págs. 1135-1138.
19. **Re, S., Nagase, S.** 2004, *Chem. Commun.*, págs. 658-659.
20. **Bautista-Ibáñez, L., Ramírez-Gualito, K., Quiroz-García, B., Rojas-Aguilar, A., Cuevas, G.** 3, 2008, *J. Org. Chem.*, Vol. 73, págs. 849-857.
21. **Schneider, H.J.** 2009, *Angew. Chem.*, Vol. 121, págs. 3982-4036. *Ibidem*, 48, 3924-3977..
22. **Vyás, N.K.** 1991, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, Vol. 1, pág. 732.
23. **Carrillo, R., López-Rodríguez, M., Martín, V.S., Martín, T.** 2009, *Angew. Chem.*, Vol. 48, págs. 7803-808.
24. **Tamres, M.** 1952, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 74, pág. 3375.
25. **Gabi., Siebert, H.C., Jiménez-Barbero, J., Rüdiger, H.** 2004, *Chembiochem*, Vol. 5, pág. 740.
26. **Spiwok, V., Lipovova, P., Skálová, T., Buchtelová, E., Hâsek, J., Králová, B.** 2004, *Carbohydr. Res.*, Vol. 339, pág. 2275.
27. **Shimohigashi, Y., Maeda, I., Nose, T., Ikesue, K., Sakamoto, H., Ogawa, T., Ide, Y., Kawahara, M., Nezu, T., Tereda, Y., Kawano, K., Ohno, M.** 1996, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, págs. 2479-2485.
28. **Terraneo, G., Potenza, D., Canales, A., Jiménez-Barbero, J., Baldrige, K., Bernardi, A.** 2007, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 129, págs. 2890-2900.
29. **Desiraju, G.R., Steiner, T.** *Weak Hydrogen Bond in Structural Chemistry and Biology*. Oxford : Oxford University Press., 1999.
30. **Nishio, M., Hirota, Umezawa, Y., Takeuchi, Y.** 1995, *Tetrahedron*, Vol. 51, pág. 8665.
31. **Samanta, U., Pal, D., Chakrabarti, P.** 2000, *Proteins*, Vol. 38, pág. 288.
32. **Bundle, D., Alibés, R., Nilar, S., Otter, A., Warwas, M., Zhang, P.** 1998, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 120, pág. 5317.
33. **Isbister, B., Phaedria, M., Hilaire, St., Toone, E.** 1995, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 117, pág. 12877.
34. **Mikkelsen, L., Henáiz, M., Martín-Pastor, M., Skrydstrup, T., Jiménez-Barbero, J.** 2002, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 124, pág. 14940.
35. **Elgabish, S., Sanan, B.** 1997, *Trends Biochem. Sci.*, Vol. 22, pág. 462.
36. **Hong, S.K., Kim, K.H., Kim, E.E.** 2010, *Acta Cryst.*, Vol. F66, págs. 20-22.

37. **Petkum, S., Jindou, S., Shimon, L.J.W., Rosenheck, S., Bayer, E.A., Lamed, R., Frolow, F.** 2010, *Acta Cryst.*, Vol. D66, págs. 33-43.
38. **CNRS.** [En línea] <http://webenligne.cermav.cnrs.fr/lectines/>.
39. **Komori, H., Seo, D., Sakurai, T., Higuchi, Y.** 2010, *Acta Cryst.*, Vol. F66, págs. 301-301.
40. **Woodward, L.A.** *Introduction to the Theory of Molecular Vibration and Vibrational Spectroscopy.* Oxford, UK : Oxford University Press, 1972.
41. **Herzberg, G.** *Infrared and Raman Spectra of Polyatomic Molecules.* New York : Van Nostrand, 1945.
42. **Emsley, J.W., Feeney, J., Sutcliffe, L.H.** *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* Oxford : Pergamon Press, 1966.
43. **Djerassi, C.** *Optical Rotatory Dispersion.* New York : McGraw-Hill, 1960.
44. **Hakomori, S.J.** 1964, *Biochem. (Tokyo)*, Vol. 55, pág. 205.
45. **Wang, H., Sun, L., Glazebnik, S., Zhao, K.** 1995, *Tetrahedron Lett.*, Vol. 36, pág. 2953.
46. **Rossini, F., [ed.].** *Experimental Thermochemistry.* New York : Interscience Publishers, 1995. pág. 237.
47. **Robles, L.** CINVESTAV (Ciudad de México), Instituto Tecnológico de Orizaba. 2006. Tesis de Licenciatura. Determinación de la Entalpía de vaporización.
48. **Reeves, L.W., Schneider, W.G.** 1957, *Can. J. Chem.*, Vol. 35, pág. 251.
49. **Johnson, Jr, C.E., Bovey, F.A.** 1958, *J. Chem. Phys.*, Vol. 29, pág. 1012.
50. **Spiwok, V., Lipovova, P., Skálová, T., Vondrackova, E., Dohnalek, J., et al.** 2005, *J. Comput- Aided Mol. Des.*, Vol. 19, pág. 887.
51. **Sujatha, M.S., Sasidhar, Y.U., Balaji, P.V.** 2005, *Biochemistry*, Vol. 44, pág. 8554.
52. **Ibídem.** 2004, *Protein Sci.*, Vol. 13, pág. 2502.
53. **Kronis, K.A., Carver, J.P.** 1985, *Biochemistry*, Vol. 24, pág. 834.
54. **Juarísti, E., Cuevas, G.** 1999, *Tetrahedron*, Vol. 55, pág. 359.
55. **Berry, R.S., Rice, S.A., Ross, J.** *Physical Chemistry.* New York : John Wiley and Sons, 1980.
56. **Majer, J., Svoboda, V., Lencka, M.** 1985, *J. Chem. Thermodyn.*, Vol. 17, pág. 365.
57. **Cox, J. D., Pilcher, G.** *Thermochemistry of Organic and Organometallic Compounds.* New York : Academic Press, 1970.
58. **Ciucanu, I., Kerek, F.** 1984, *Carb. Research.*, Vol. 131, págs. 209-217.

59. NIST Standard Reference Database. [ed.] P.J., Mallard, W.G. Linstrom. junio 2005.
60. **Rojas-Aguilar, A., Orozco-Güareño, E., Martínez-Herrera, M.** 2001, J. Chem. Thermodyn., Vol. 33, pág. 1405.
61. **Rojas-Aguilar, A., Orozco-Güareño, E.** 2033, Thermochim. Acta, Vol. 405, págs. 93-107.
62. **Reichardt, C.** *Solvents and Solvent Effects in Organic Chemistry*. 2nd Ed. s.l. : VCH: Weinheim, 1990.

9. ANEXO A

Tabla A1. Entalpías de Disolución del 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en 4-metil anisol (1:10, mol:mol), determinadas por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento #	masa (a)	área (b)	Q (c)	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	Jg^{-1}	kJmol^{-1}
1	102.96	0.386	3.746	0.94
2	102.71	0.375	3.654	0.92
3	101.16	0.422	4.170	1.04
4	97.75	0.304	3.107	0.78
5	105.38	0.429	4.066	1.02
Media	101.99	0.383	3.749	0.94
Desviación estándar	2.81	0.050	0.418	0.11

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A2. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en o-xileno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento #	masa ^(a)	Área ^(b)	Q	$\Delta_{\text{dis}}H_{m\nu}$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	106.01	1.194	11.261	2.2
2	102.17	1.060	10.375	2.60
3	105.84	1.056	9.981	2.50
4	101.64	1.048	10.309	2.58
Media	103.92	1.090	10.482	2.62
Desviación estándar	2.33	0.070	0.548	0.14

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A3. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en p-xileno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento #	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	100.49	1.059	10.540	2.64
2	102.30	1.068	10.435	2.61
Media	101.40	1.063	10.488	2.63
Desviación estándar	1.28	0.006	0.074	0.02

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A4. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en m-xileno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa ^(a)	Área ^(b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	109.82	1.298	11.815	2.96
2	102.17	1.239	12.125	3.04
Media	105.10	1.268	11.970	2.10
Desviación estándar	5.41	0.042	0.219	0.06

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A5. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en 1,2-dimetoxibenceno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	101.36	0.428	4.219	1.06
2	102.73	0.433	4.210	1.05
Media	102.05	0.430	4.214	1.06
Desviación estándar	0.97	0.003	0.006	0.002

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A6. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en 1,3-dimetoxibenceno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento #	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_{mv}$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	101.18	-0.464	-4.582	-1.15
2	104.31	-0.413	-3.957	-0.99
Media	102.75	-0.438	-4.270	-1.07
Desviación estándar	2.21	0.036	0.442	0.11

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A7. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en benceno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento #	masa ^(a)	Área ^(b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	111.34	-1.465	-13.156	-3.29
2	221.31	-3.238	-14.632	-3.66
3	106.54	-1.612	-15.132	-3.79
4	104.46	-1.461	-13.989	-3.50
5	99.86	-1.596	-15.977	-4.00
Media	102.16	-1.528	-14.983	-3.65
Desviación estándar	3.25	0.095	1.406	0.27

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- α -D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A8. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en 4-metil anisol (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	100.00	6.491	64.912	16.25
2	100.77	6.702	66.508	16.65
3	103.50	7.387	71.373	17.86
4	104.97	7.887	75.136	18.81
Media	104.24	7.637	73.254	17.39
Desviación estándar	1.04	0.353	2.661	1.17

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galctopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A9. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en o-xileno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa ^(a)	Área ^(b)	Q	$\Delta_{dis}H_{mv}$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	102.95	7.765	75.420	18.88
2	104.18	7.849	75.338	18.86
3	102.90	7.707	74.899	18.75
4	102.65	7.865	76.620	19.18
Media	102.78	7.786	75.759	18.91
Desviación estándar	0.18	0.112	1.217	0.18

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A10. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en p-xileno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa ^(a)	Área ^(b)	Q	$\Delta_{dis}H_{mv}$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	101.88	8.183	80.317	20.10
2	100.84	7.732	76.673	19.19
3	102.18	7.694	75.302	18.85
4	104.80	7.895	75.336	18.86
Media	103.49	7.795	75.319	19.25
Desviación estándar	1.85	0.142	0.024	0.59

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A11. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en m-xileno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{\text{dis}}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	101.38	7.857	77.496	19.40
2	101.30	7.946	78.437	19.63
3	107.47	8.080	75.184	18.82
4	102.25	8.047	78.701	19.70
Media	104.86	8.064	76.942	19.39
Desviación estándar	3.69	0.023	2.487	0.40

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A12. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en 1,2-dimetoxibenceno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	103.01	7.132	69.234	17.33
2	102.03	7.148	70.058	17.54
3	101.37	7.691	75.866	18.99
4	101.82	7.334	72.028	18.03
Media	101.60	7.512	73.947	17.97
Desviación estándar	0.32	0.252	2.714	0.74

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A13. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en 1,3-dimetoxibenceno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	Masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	103.93	6.810	65.524	16.40
2	101.01	6.585	65.193	16.32
3	107.72	6.727	62.453	15.63
4	104.47	6.825	65.326	16.35
Media	106.10	6.776	63.889	16.18
Desviación estándar	2.30	0.069	2.032	0.36

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A14. Entalpías de Disolución de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en benceno (1:10, mol:mol), determinada por microcalorimetría Calvet a 303.15 K en kJ mol^{-1}

Experimento	masa (^a)	Área (^b)	Q	$\Delta_{dis}H_m$
	mg	J	J g^{-1}	kJmol^{-1}
1	109.15	7.109	65.126	16.30
2	103.99	6.914	66.491	16.64
3	106.64	7.124	66.800	16.72
4	104.08	6.856	65.870	16.49
Media	105.36	6.990	66.335	16.54
Desviación estándar	1.81	0.189	0.657	0.19

(a) la masa de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) área de la curva en el termograma.

Tabla A15. Entalpía de Vaporización de 2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo, determinada por DSC.

Experimento	m_1 (a)	m_2 (b)	m_3 (c)	Área total (d)	Área del pico (e)	T	Q_{vap}	$\Delta_{vap}H_m$,
	mg	mg	mg	mJ	mJ	K	J g ⁻¹	kJ mol ⁻¹
1	22.079	0.374	21.414	6818.470	490.803	323.15	295.495	73.96
2	12.229	0.157	11.911	4253.721	543.176	333.15	311.530	77.97
3	10.750	0.089	10.519	4052.467	692.274	333.15	319.434	79.95
4	11.546	0.091	11.303	4243.765	680.740	333.15	315.236	78.90
5	8.857	0.071	8.669	3186.662	714.540	333.15	285.162	71.37
6	9.187	0.071	8.995	3217.475	750.902	333.15	274.221	68.63
7	12.583	0.145	12.272	4176.816	760.071	333.15	278.417	69.68
8	11.936	0.094	11.685	3997.167	713.453	333.15	281.030	70.34
9	11.233	0.102	10.983	3759.066	730.605	333.15	275.745	69.02
10	9.268	0.062	9.084	3402.849	793.733	333.15	287.229	71.89
11	10.244	0.088	10.021	3588.507	712.434	333.15	287.008	71.84
12	9.148	0.077	8.950	3338.167	714.444	333.15	293.142	73.37
Media	11.588	0.118	11.317	4002.928	691.431		291.971	73.08
Desviación estándar	3.552	0.085	3.421	972.221	87.689		15.571	3.90
$\Delta_{vap}H_m$ (298.15K) =								75.177 ± 3.90

(a) masa inicial de 2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo en cada experimento; (b) masa residual después de la vaporización; (c) masa evaporada; (d) área total de la curva del proceso de vaporización; (e) área correspondiente solamente al pico de vaporización cuando cambia la primera derivada.

Tabla A16. Entalpías de Vaporización de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo, determinada por DSC.

Experimento	m_1 ^(a)	m_2 ^(b)	m_3 ^(c)	Área Total ^(d)	Área del Pico ^(e)	T	Q_{vap}	$\Delta_{vap}H_m$
	mg	mg	mg	mJ	mJ	K	J g ⁻¹	kJ mol ⁻¹
1	10.900	0.146	10.734	5242.193	501.490	313.15	441.664	110.54
2	12.443	0.072	12.348	5828.598	631.089	313.15	420.924	105.35
3	11.166	0.101	11.044	4985.671	690.690	313.15	388.889	97.33
4	10.194	0.074	10.101	4733.062	794.535	313.15	389.913	97.59
5	9.042	0.088	8.937	4509.534	775.573	313.15	417.801	104.57
6	10.602	0.083	10.499	5008.272	809.251	313.15	399.934	100.10
7	10.069	0.082	9.968	5430.304	994.637	313.15	444.979	111.37
8	10.390	0.105	10.266	5369.683	944.175	313.15	431.098	107.90
Media	10.601	0.094	10.487	5138.415	767.680		416.900	104.35
Desviación estándar	0.980	0.024	0.9786	418.479	160.630		22.107	5.53
$\Delta_{vap}H_m (273.15K) =$								105.25 \pm 5.53

(a) masa inicial de 2,3,4,6-tetra-O-metil- β -D-galactopiranosido de metilo en cada experimento; (b) masa residual después de la vaporización; (c) masa evaporada; (d) área total de la curva del proceso de vaporización; (e) área correspondiente solamente al pico de vaporización cuando cambia la primera derivada.

Los experimentos de vaporización o sublimación no se realizaron a temperatura ambiente razón por la cual fue necesario realizar la corrección por temperatura, a través del siguiente procedimiento:

Entalpía de Vaporización del 2,3,4,6-tetra-O-metil-α-D-manopiranosido de metilo

$$\Delta_l^g H_m(T \text{ exp}) - \Delta_l^g H_m(298.15K) / \text{kJ} * \text{mol}^{-1} = -6 \times 10^{-2} (T \text{ exp} - 298.15)$$

$$73.077 - \Delta_l^g H(298.15) = -2.1 \text{ kJ} * \text{mol}^{-1}$$

$$\Delta_l^g H(298.15) = 73.077 + 2.1 = 75.177 \text{ kJ} * \text{mol}^{-1}$$

El mismo procedimiento de corrección aplica para el 2,3,4,6-tetra-O-metil-β-D-galactopiranosido de metilo.